

Aus der Abteilung Unfallchirurgie, Plastische und Wiederherstellungschirurgie

(Prof. Dr. med. K. M. Stürmer)

im Zentrum Chirurgie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Beeinflussung der Frakturheilung und des Stoffwechsels des osteopenischen  
Knochens durch Hormone, Raloxifen und Bisphosphat im Rattentiermodell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jakob Johannes Schumann

aus Bielefeld

Göttingen 2009

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatterin: PD Dr. med. E. Stürmer

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Osteoporose .....</b>	<b>1</b>
1.2	<b>Definition, Einteilung und Pathogenese der Osteoporose .....</b>	<b>2</b>
1.2.1	Definition und Einteilung.....	2
1.2.2	Grundlagen des Knochenstoffwechsels und Pathogenese der Osteoporose.....	4
1.3	<b>Diagnostik der Osteoporose.....</b>	<b>5</b>
1.3.1	Anamnese .....	5
1.3.2	Körperliche Untersuchung.....	6
1.3.3	Radiologische Diagnostik .....	6
1.3.3.1	<i>Konventionelles Röntgen.....</i>	<i>7</i>
1.3.3.2	<i>Osteodensitometrie .....</i>	<i>7</i>
1.3.4	Laborparameter.....	9
1.4	<b>Die ovariectomierte Ratte als Modell der postmenopausalen Osteoporose .....</b>	<b>13</b>
1.5	<b>Therapie der Osteoporose .....</b>	<b>14</b>
1.5.1	Prävention und Basistherapie .....	14
1.5.1.1	<i>Indikationen zur medikamentösen Osteoporosetherapie .....</i>	<i>15</i>
1.5.2	Anti-osteoporotische Substanzen.....	17
1.5.2.1	<i>Hormonersatztherapie .....</i>	<i>18</i>
1.5.2.2	<i>Selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERMS) .....</i>	<i>19</i>
1.5.2.3	<i>Bisphosphonate.....</i>	<i>19</i>
1.5.2.4	<i>Phytoöstrogene .....</i>	<i>21</i>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
2.1	<b>Versuchsaufbau.....</b>	<b>23</b>
2.1.1	Versuchstiere .....	23
2.1.2	Ovariectomie der Ratten .....	23
2.1.3	Tibiaosteotomie .....	24
2.1.4	Futterapplikation und Testsubstanzen.....	24
2.1.5	Versuchsende .....	25

---

<b>2.2</b>	<b>Versuchsdurchführung</b> .....	<b>26</b>
2.2.1	Radiographische Auswertung .....	26
2.2.2	Biomechanische Testung .....	27
2.2.3	Auswertung der biomechanischen Kompressionstests .....	29
2.2.4	Serumanalyse .....	31
2.2.5	Genanalyse .....	33
2.2.6	Statistische Auswertung der Ergebnisse .....	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Feinfokusröntgen der Rattentibiae</b> .....	<b>40</b>
3.1.1	Einfluss einer akzessorischen Fibulafraktur auf die Achsstellung der Frakturfragmente.....	41
3.1.2	Ergebnisse des biomechanischen Kompressionstests.....	43
3.1.2.1	<i>Elastizität</i> .....	43
3.1.2.2	<i>Streckgrenze</i> .....	44
<b>3.2</b>	<b>Auswertung der Serumanalyse</b> .....	<b>45</b>
<b>3.3</b>	<b>Genexpression im metaphysären Kallus</b> .....	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Ratte als Osteoporosemodell</b> .....	<b>54</b>
<b>4.2</b>	<b>Metaphysäres Osteotomie-Modell</b> .....	<b>56</b>
<b>4.3</b>	<b>Auswertungsverfahren</b> .....	<b>58</b>
<b>4.4</b>	<b>Einfluss der Testsubstanzen auf die Frakturheilung</b> .....	<b>60</b>
4.4.1	Estradiol .....	60
4.4.2	Raloxifen .....	61
4.4.3	Alendronat.....	61
4.4.4	Cimicifuga racemosa.....	62
<b>4.5</b>	<b>Kritische Betrachtung der Ergebnisse</b> .....	<b>63</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>70</b>

---

## Tabellenverzeichnis

---

Tab.1: Definitionen der Osteoporose.....	2
Tab.2: Einteilung der Osteoporose .....	3
Tab.3: Risikofaktoren der Osteoporose .....	6
Tab.4: Laborparameter bei Osteoporose.....	10
Tab.5: Risikoabschätzungen für Schenkelhalsfrakturen bei Osteoporose.....	16
Tab.6: Medikamente Osteoporose anabol vs. resorptiv .....	17
Tab.7: Testsubstanzen und Dosierungen .....	25
Tab.8: Einteilung der Futtergruppen .....	25
Tab.9: Übersicht über die verwendeten Primer und Proben .....	38
Tab.10: Tabellarische Ergebnisse der biomechanischen Kompressionstests .....	45
Tab.11: Tabellarische Ergebnisse der Serumparameter Osteocalcin und RatLaps .	47
Tab.12: Ergebnisse der Genexpression .....	53
Tab.13: Gesamtübersicht Futter-/Gewichtsdokumentation.....	66
Tab.14: Gesamtübersicht Gewichtsentwicklung .....	68

---

**Abbildungsverzeichnis**

---

Abb.1(a-c): Röntgendarstellung der Rattentibia (a) nach der Operation, (b) fünf Wochen nach Osteotomie ohne Implantat in einem anterior-posterioren und (c) lateralen Strahlengang.....	27
Abb.2: Lagerung der Tibia im Hartgipsbett zur biomechanischen Prüfung.....	28
Abb.3: Lagerung des eingebetteten Knochens in der Prüfmaschine.....	29
Abb.4: Darstellung eines typischen Kraft-Zeit-Graphen mechanischer Tests.....	30
Abb.5: Radiographische Einteilung der untersuchten Rattentibiae nach Achsstellung +/- akzessorischer Fibulafraktur.....	41
Abb.6: Darstellung des Achswinkels der Tibiafragmente.....	42
Abb.7 : Darstellung der Lokalisation der akzessorischen Fibulafraktur von Ratten nach operativ durchgeführter Tibiafraktur.....	42
Abb.8: Messergebnisse für den Parameter 'Elastizität'.....	43
Abb.9: Messergebnisse für den Parameter 'Streckgrenze'.....	44
Abb.10: Bestimmung der Serumkonzentration von Osteocalcin mittels Radioimmunoassay.....	46
Abb.11: Bestimmung der Serumkonzentration von Ratlaps mittels Radioimmunoassay.....	46
Abb.12: Bestimmung der Genexpression von Osteocalcin im Kallus mittels Real-Time PCR.....	48
Abb.13: Bestimmung der Genexpression von IgF-1 im Kallus mittels Real-Time PCR.....	49
Abb.14: Bestimmung der Genexpression von ER $\alpha$ im Kallus mittels Real-Time PCR.....	50
Abb.15: Bestimmung der Genexpression von Kollagen 1 $\alpha$ 1 im Kallus mittels Real-Time PCR.....	51
Abb.16: Bestimmung der Genexpression von TRAP im Kallus mittels Real-Time PCR.....	52

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

%	Prozent
∅	keine
/s.	pro Sekunde
°	Grad
° C	Grad Celsius
A	Alendronat
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ANA	Antinukleärer Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
ASP	Asparaginsäure
α	alpha
BSG	Blutkörpernkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
β	beta
C	osteoporotische Kontrollgruppe
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CR	Cimicifuga racemosa
C-reaktives Protein	Capsel-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	double strain
DVO	Dachverband Osteologie
DXA	Dual Energy X-Ray Absorptiometrie
E2	Östrogen
ER	Östrogenrezeptor
et al.	et alii
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
gamma-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
Gly	Glycin

---

GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Stimulations-Faktor
Gr.	Gruppe
h	Stunden
H <sub>2</sub> O	Wasser
ICTP	Typ-I-Kollagen : carboxyterminales quervernetztes Telopeptid
IGF-1	Insulin-like growth factor
IgG	Immunglobulin G
IL	Illinois
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KV	Kilovolt
LH	Luteinisierendes Hormon
LHRH	Luteinisierendes Hormon Releasing Hormon
LWS	Lendenwirbelssäule
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-Stimulations-Faktor
mg	Milligramm
mg/d	Milligramm pro Tag
min	Minuten
Mittelabw.	Mittelabweichung
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MORE	Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Mittelwert
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
N	Newton
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OC	Osteocalcin
ODF	Osteoklastendifferenzierungs-Faktor
OVX	Ovarektomie

---

PCR	Polymerase chain reaction
PTH	Parathormon
QCT	quantitative Computertomographie
QUS	quantitative Ultrasonometrie
R	Raloxifen
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real-Time PCR
S.	Seite
SERM	Selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator
SD	Standardabweichung
SF	soyfree
SHAM	nicht osteoporotische Kontrollgruppe
sog.	sogenannt
ss	single strain
Tab.	Tabelle
TGF- $\beta$ -1	Transforming-growth-factor- $\beta$ -1
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TRAP	Tartrat-resistente Saure Phosphatase
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
u.a.	und andere
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
vs.	versus
WHI	Women's Health Initiative
WHO	World Health Organization
X-Ray	Röntgen
z.B.	zum Beispiel

---

# 1 Einleitung

---

## 1.1 Osteoporose

Die Osteoporose zählt mittlerweile aufgrund ihrer hohen Prävalenz zu einer der zehn verbreitetsten Volkskrankheiten (Bartl et al. 2003). Allein in Deutschland werden die jährlichen Kosten für das Gesundheitssystem der etwa 6 Millionen betroffenen Osteoporosepatienten (Bitterling et al. 2005) auf über 10 Milliarden Euro geschätzt (Götte und Dittmar 2001).

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, deren Folge, die Fraktur, durch eine Verminderung der Knochenmasse, sowie eine veränderte Mikroarchitektur des Knochengewebes entsteht (WHO 1994). Sie manifestiert sich vorwiegend nach dem 50. Lebensjahr. Etwa jede dritte Frau und jeder vierte Mann erkrankt im Laufe seines Lebens an Osteoporose, wobei eine Unterscheidung zwischen postmenopausaler Osteoporose und seniler Altersosteoporose gemacht wird. Im Anbetracht der demographischen Entwicklung wird die Zahl der betroffenen Menschen in den nächsten Jahren deutlich steigen (Eisenmenger et al. 2006). Daher kommt der Behandlung, der rechtzeitigen Diagnosestellung und entsprechender Therapie, sowie der Prävention der Osteoporose und der daraus resultierenden Frakturen eine enorme Bedeutung zu, nicht nur für die Betroffenen, sondern auch für die Volkswirtschaft.

Es ist nur konsequent, dass es in den letzten Jahren eine deutliche Zunahme der Publikationen über das Krankheitsbild der Osteoporose gegeben hat und sie auch weiterhin Gegenstand vieler aktueller Forschungen ist.

Mit Hilfe von Leitlinien zur Behandlung, Diagnose und Prävention versucht der Dachverband Osteologie (DVO 2006) eine bessere Versorgung der Osteoporosepatienten in der Bundesrepublik Deutschland zu erreichen, um den enormen Defiziten beispielsweise in der Pharmakotherapie der postmenopausalen Osteoporose (Besthorn et al. 2002) oder aber der Diagnose und vor allem der Nachsorge der Erkrankung Rechnung zu tragen (Hajcsar et al. 2000; Khan et al. 2001).

Laut Besthorn et al. (2002) sowie Schlager et al. (2001) konnte in Studien aus Deutschland gezeigt werden, dass mehr als 90 % der weiblichen Osteoporosepatientinnen keine adäquate Therapie erhalten.

## 1.2 Definition, Einteilung und Pathogenese der Osteoporose

### 1.2.1 Definition und Einteilung

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung. Eine Verminderung der Knochenmasse und eine Veränderung der Mikroarchitektur des Knochengewebes führen bei der Osteoporose zu einer verminderten Bruchfestigkeit und Schwächung des Knochens und somit zu einem erhöhten Frakturrisiko (WHO 1994).

Osteoporose wird laut WHO über die Bestimmung der Knochendichte (DXA) definiert. Referenzwerte hierbei sind die Knochenmasse gesunder Erwachsener im Alter zwischen 20 und 40 Jahren (sog. T-Score) oder die Werte gleichaltriger, knochengesunder Erwachsener (sog. Z-Score).

**Tab.1: Definitionen der Osteoporose (WHO 1994)**

• Normal	T-Score $< -1,0$ (Standardabweichung der Knochenmasse = SD)
• Osteopenie	geringe Knochenmasse: T-Score zwischen $-1,0$ und $-2,5$ SD
• Osteoporose	T-Score mehr als $-2,5$ SD
• Manifeste Osteoporose	= schwere Osteoporose mit einer oder mehreren pathologischen Frakturen: T-Score mehr als $-2,5$ ( $-2,0$ ) SD

Eine Unterteilung der Osteoporose erfolgt in primäre und sekundäre Osteoporose (Lin und Lane 2004). Diese Einteilung orientiert sich an der Ätiologie der Erkrankung, was klinisch und vor allem therapeutisch von Bedeutung ist. Bei der primären Osteoporose unterscheidet man die postmenopausale Osteoporose von der Altersosteoporose (Riggs et al. 1982). Die postmenopausale Osteoporose ist durch einen Anstieg der Frakturnrate bei Frauen einige Jahre nach Eintritt der Menopause gekennzeichnet, während bei der Altersosteoporose überwiegend Menschen ab 75 Jahre (Verhältnis Frauen: Männer 2:1) betroffen sind. Eine Einteilung in Bezug auf die Pathophysiologie ist ebenfalls möglich. Bei der postmenopausalen Osteoporose sind Osteoblasten und Osteoklasten aktiviert, wobei durch die größere Schnelligkeit der knochenabbauenden Osteoklasten eine negative Knochenbilanz entsteht. Dieser *high-turn-over-Osteoporose* ist die *low-turn-over-Altersosteoporose* gegenüberzustellen, bei der eine Verlangsamung von knochenbildenden und

knochenresorbierenden Zellen vorliegt. Hiervon abzugrenzen ist die sekundäre Osteoporose, bei der eine Grunderkrankung für den Knochenmassenverlust und das erhöhte Frakturrisiko verantwortlich ist. Die primäre Osteoporose hat mit über 90% den um ein Vielfaches größeren Anteil an allen Osteoporosen.

**Tab.2: Einteilung der Osteoporose (aus Herold 2004, S. 645 mit Ergänzungen aus DVO 2006 und Fitzpatrick 2002)**

Primäre Osteoporose	Sekundäre Osteoporose	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Postmenopausale Osteoporose (Typ-I-Osteoporose)</li> <li>▪ Altersosteoporose (Typ-II-Osteoporose)</li> <li>▪ Idiopathische Osteoporose junger Menschen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Endokrinologische Erkrankungen                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyperkortisolismus</li> <li>- Hyperthyreose</li> <li>- Hyperparathyreoidismus</li> <li>- Diabetes mellitus Typ I</li> </ul> </li> <li>▪ Gastrointestinale Erkrankungen                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Morbus Crohn</li> <li>- Billiäre Zirrhose</li> <li>- Sprue</li> <li>- Pankreasinsuffizienz</li> </ul> </li> <li>▪ Neoplasien                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Plasmozytom</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Medikamente                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Glukokortikoide</li> <li>- Heparine</li> <li>- Thyroxin</li> <li>- LHRH-Analoga</li> <li>- Antiepileptika</li> </ul> </li> <li>▪ Immobilisation</li> <li>▪ Rheumatische Erkrankungen</li> <li>▪ Angeborene Bindegewebserkrankungen                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Marfan-Syndrom</li> <li>- Ehlers-Danlos-Syndrom</li> </ul> </li> </ul>

Das Frakturrisiko bei der postmenopausalen Osteoporose ist für die Brust- und Lendenwirbelsäule sowie den distalen Radius am größten (Reid 2003), wobei es sich meist um eine Fragilitätsfraktur, also eine Fraktur ohne adäquates Trauma, handelt (Cummings und Melton 2002). Die Hauptlokalisation bei der Altersosteoporose ist das proximale Femur. Wesentlicher Grund dafür sind altersbedingte Stürze, z.B. aufgrund von neuromuskulärer Dysfunktion (Cooper 2003).

Bei den sekundären Osteoporosen sind oft jüngere Menschen und Männer betroffen (Fitzpatrick 2002). Die Glukokortikoid-induzierte Form ist die häufigste Form der sekundären Osteoporosen, bei denen es vor allem im Bereich der Wirbelsäule zu einer erhöhten Frakturierung kommt.

### **1.2.2 Grundlagen des Knochenstoffwechsels und Pathogenese der Osteoporose**

Die Osteoporose manifestiert sich zunächst am spongiösen Knochen (Banse et al. 2001; Thomsen et al. 2002) , was zu einer Rarefizierung der Trabekel und damit zu mechanischer Instabilität führt.

Im Knochengewebe finden lebenslang Auf- und Abbauprozesse statt (*bone remodelling*). Beim gesunden Menschen nimmt die Knochenmasse etwa bis zum 25.-30. Lebensjahr zu, bis die sogenannte *peak bone mass* erreicht wird, und sich im Folgenden die Knochenbilanz negativiert und der Abbau der Knochenmasse überwiegt (Siegenthaler und Blum 2006). An diesen Umbauprozessen sind vor allem Osteoblasten und Osteoklasten beteiligt. Osteoblasten sezernieren organische Komponenten der Knochenmatrix, wie z.B. Kollagen Typ I, Glykosaminoglykane oder Chondroitinsulfat, und sind so für den Knochenaufbau von entscheidender Bedeutung, während die Osteoklasten den Knochen mit Hilfe von Enzymen abbauen.

Bei der Osteoporose liegt ein Missverhältnis dieses Prozesses vor. Man unterscheidet *high-turn-over-* (postmenopausale Osteoporose) von *low-turn-over-* Osteoporose (Altersosteoporose)(siehe 1.2.1).

Neben der multifaktoriellen Genese der Osteoporose, wie z.B. genetischen, physikalischen oder auch alimentären Faktoren, gilt bei der postmenopausalen Osteoporose ein kausaler Zusammenhang zwischen Östrogenmangel und Zunahme des Frakturrisikos als wahrscheinlich (DVO 2006; Reid 2003). Bartl (2001) konnte einen Verlust der Knochenmasse um bis zu 4% /Jahr aufgrund des Östrogenabfalls im Vergleich zum durchschnittlichen Knochenverlust von 1% / Jahr, zeigen.

Man geht davon aus, dass Östrogen zum Teil rezeptorvermittelt, teils über einen anderen Weg auf Knochenzellen und deren Vorläuferzellen wirkt. Hoyland et al. (1997) konnten durch Nachweis von Östrogenrezeptoren in Osteoblasten, Osteoklasten und Monozyten des Knochenmarks diese Theorie stützen.

Für die Beteiligung am Knochenstoffwechsel sind mehrere Zytokine identifiziert worden: Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),

Makrophagen-Kolonie-Stimulations-Faktor (M-CSF) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulations-Faktor (GM-CSF) werden bei Östrogenmangel in Osteoblasten und Monozyten des Knochenmarks sezerniert. Sie stimulieren parakrin die Aktivierung und Differenzierung der Osteoklasten. Östrogene supprimieren diese Zytokinsekretion und somit auch die Osteoklastenaktivität (Horowitz 1993).

Weitere beim Knochenstoffwechsel beteiligte Zytokine sind der Osteoklastendifferenzierungs-Faktor (ODF) und der Transforming-growth-factor- $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ -1). TGF- $\beta$ -1 hemmt die Aktivität von Osteoklasten und fördert deren Apoptose (Beaudreuil et al. 1995). Er wird in Osteoblasten sezerniert und durch Estradiol hochreguliert, mit der Folge einer verminderten Knochenresorption (Manolagas 2000).

Neben seiner direkten Wirkung auf die Knochenzellen greift Östrogen auch an anderen Orten positiv auf den Knochenstoffwechsel ein. So fördert es die Kalziumresorption im Magen-Darm-Trakt, stimuliert die Calcitoninausschüttung, verbessert die tubuläre Reabsorption von Kalzium in der Niere und verbessert die Durchblutung der Knochen.

### **1.3 Diagnostik der Osteoporose**

Die Diagnostik der Osteoporose umfasst neben der körperlichen Untersuchung sowie der Anamnese das konventionelle Röntgen, die Osteodensitometrie und Laborwertbestimmungen. Die Ultraschalluntersuchung kann auch für die Diagnose der Osteoporose herangezogen werden, ist jedoch weniger aussagekräftig als die Osteodensitometrie. Ziel der Diagnostik ist die ätiologische Einteilung sowie die Erstellung eines individuellen Risikoprofils des Patienten, mit daraus resultierender Optimierung der Therapie.

#### **1.3.1 Anamnese**

Ziel der Anamnese ist es, neben der Erfragung aktueller Beschwerden erste differentialdiagnostische Rückschlüsse zwischen primärer und sekundärer Osteoporose zu erlangen. Alter, Gewichts- und Körpergrößenveränderungen, Vorerkrankungen, vorherige Frakturen und Stürze sowie Risikofaktoren sollten erfragt werden.

Risikofaktoren der Osteoporose sind neben den Ursachen der sekundären Osteoporose (siehe 1.2.1) vor allem:

**Tab.3: Risikofaktoren der Osteoporose**

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Weibliches Geschlecht</li> <li>• Rassenzugehörigkeit (z.B. kaukasisch)</li> <li>• Alter &gt; 70</li> <li>• Frühe Menopause</li> <li>• Späte Menarche</li> <li>• Nullipara</li> <li>• Prämenopausale Amenorrhoe</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nikotinkonsum</li> <li>• Alimentärer Kalziummangel</li> <li>• Unterernährung, Untergewicht</li> <li>• Vorherige Fraktur ohne adäquates Trauma</li> <li>• Osteoporotische Fraktur in der Familie</li> <li>• Mangelnde Sonnenlichtexposition</li> <li>• Alkoholabusus</li> </ul>
--	---

### 1.3.2 Körperliche Untersuchung

Bei der körperlichen Untersuchung steht die Untersuchung der Wirbelsäule im Vordergrund. Hier ergeben sich osteoporosespezifische Befunde wie z.B. der „Witwenbuckel“ oder das „Tannenbaumphänomen“ (Scheidt-Nave et al. 2003). Auch eine Verminderung der Körpergröße kann dem frühzeitigen Erkennen einer Osteoporose dienen. Eine Abnahme um mehr als 4 cm kommt laut DVO die Funktion eines Surrogatparameters (Marker, der in klinischen Studien einen Messwert anzeigt, dessen Beeinflussung die Wirkung einer Intervention, also z.B. einer Therapie, auf ein übergeordnetes medizinisches Phänomen z.B. das Auftreten einer Krankheit oder eines Symptoms) zu (DVO 2006).

### 1.3.3 Radiologische Diagnostik

Die bildgebenden Verfahren, wie konventionelles Röntgen oder die Osteodensitometrie, spielen in der Diagnostik der Osteoporose eine entscheidende Rolle. Eine frühzeitige Diagnose vor Entstehen einer Fraktur ist nur mit der Skelettradiographie und der Knochendichtemessung möglich. Die Osteodensitometrie ist derzeit die einzige objektive und direkte Methode zur Bestimmung der Knochenmineraldichte und somit zur Abschätzung der Knochenbrüchigkeit und des Frakturrisikos (Grampp et al. 1999).

Eine weitere diagnostische Methode ist die quantitative Ultrasonographie, die in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen hat. Wenn es gelingt,

standardisierte Verfahren für diese Untersuchungstechnik zu erlangen, ist sie aufgrund ihrer geringen Kosten, schnellen Durchführbarkeit und fehlenden Strahlenexposition eine in der Zukunft sicherlich interessante Alternative. Allerdings kann sie aufgrund ihrer limitierten Eindringtiefe nur am oberflächennahen Knochen, wie Radius, Calcaneus oder Finger durchgeführt werden, was ihre Aussagekraft hinsichtlich zentraler Frakturen einschränkt.

### **1.3.3.1 Konventionelles Röntgen**

Bei einer manifesten Osteoporose sind die konventionellen Röntgenaufnahmen wesentlicher Bestandteil der Diagnostik. Mit ihnen können z.B. an der Wirbelsäule Sinterungsfrakturen, Deck- und Grundplatteneinbrüche oder die Ausbildung von Fisch- und Keilwirbeln festgestellt werden. Sie sind also für die Verlaufskontrolle bei manifesten osteoporotischen Wirbelkörperfrakturen unverzichtbar (Jergas und Schmid 1999).

Für die frühzeitige Diagnose einer Osteoporose sind sie allerdings nicht verwendbar, da eine Demineralisierung auf den Röntgenaufnahmen erst ab 20-40% sichtbar ist und der Knochenmineralsalzgehalt nicht beurteilbar ist.

### **1.3.3.2 Osteodensitometrie**

Die Osteodensitometrie ist zur Diagnose einer Osteoporose (ohne Frakturen) unabdingbar (Hadji et al. 2001), da ein Verlust der Knochenmasse schon vor Auftreten einer Fraktur diagnostizierbar ist.

Die von der WHO 1994 eingeführte Stadieneinteilung (siehe 1.2.1) aufgrund osteodensitometrischer Untersuchungsergebnisse hat bis heute Gültigkeit und bezieht sich auf den bewiesenen Zusammenhang niedriger in der Densitometrie gemessener Knochendichtewerte und Osteoporose-typischer Frakturen (WHO 1994).

Neben dem Goldstandard, der Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA), stehen mit der quantitativen Computertomographie sowie der quantitativen Ultrasonometrie weitere Verfahren zur Verfügung.

Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA):

Die DXA Messung stellt derzeit die Methode der Wahl in der Osteoporosediagnostik dar (Ringe 1998, Scheidt-Nave et al. 2003). Sie ist die weltweit am meisten verbreitete Methode (Consensus Development Conference 1993). Prinzip ist die

Erfassung und quantitative Messung des Kalzium-Hydroxylapatit-Gehalts des Knochens (Pollähne und Minne 2001), der als Marker für die Knochenmasse gilt. Wegen seiner klinischen Relevanz wird dieses Verfahren hauptsächlich an der Lendenwirbelsäule und der Hüfte durchgeführt (Leib et al. 2004). Johnell et al. (2005) konnten einen Zusammenhang zwischen Knochendichtegehalt am Oberschenkelhals und späteren Hüftfrakturen zeigen. Neben seiner allgemeinen Akzeptanz, sind die geringe Strahlenbelastung (DVO 2006), die geringen Kosten und die schnelle Durchführbarkeit (Bartl et al. 2003) die entscheidenden Vorteile der DXA gegenüber anderen bildgebenden Verfahren. Die DXA wird zusammen mit Risikofaktoren zu der Diagnosefindung der Osteoporose eingesetzt und kann deren Schweregrad bestimmen. Sie dient so zur Abschätzung eines Frakturrisikos mit der Konsequenz einer eventuell sinnvollen präventiven medikamentösen Behandlung oder aber auch zur Überprüfung des Therapieerfolgs.

Im Hinblick auf die Bestimmung der Zusammensetzung der trabekulären Strukturen und Mikroarchitektur des Knochens ist die Osteodensitometrie limitiert und somit kritisch zu sehen. Die Bruchfestigkeit des Knochens hängt nicht nur von der Masse, sondern auch in erheblichem Maße von dessen trabekulärer Struktur ab. Das Frakturrisiko ist primär abhängig von der Knochenarchitektur (Engelke et al. 1999), welche nach Boivin et al. (2005) neben der Größe, Masse, Dichte und Mineralisation des Knochens zu den Hauptkomponenten der Knochenqualität zählt.

#### Quantitative Computertomographie:

Bei der quantitativen Computertomographie (QCT) ist eine selektive Messung von Kortikalis und Spongiosa des Knochens möglich. Sie wird standardisiert an der LWS und am proximalen Femur durchgeführt, da hier die trabekuläre Veränderung des Knochens zuerst stattfindet.

Vorteile dieser Untersuchungsmethode sind neben der langjährigen Erfahrung vor allem die hohe Präzision und die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen trabekulärem Knochen und Kortikalis. Dennoch hat sie eine geringere Bedeutung im klinischen Alltag als die DXA. Dies liegt vor allem an den hohen Kosten und der höheren Strahlenbelastung gegenüber der DXA (Raisz 2005) sowie fehlender Geräte aufgrund hoher Auslastung.

#### Quantitative Ultrasonometrie:

Mit der quantitativen Ultrasonometrie (QUS) steht für die frühzeitige Diagnose der Osteoporose in den letzten Jahren ein, neben der DXA-Methode, vielversprechendes und kostengünstiges Verfahren zur Verfügung. Bei dieser röntgenfreien Methode wird mittels Ultraschall die Knochendichte am Os calcaneus gemessen. Schnabel et al. (2005) konnten in einer Vergleichstudie zwischen DXA-Schenkelhals und QUS am Fersenbein erstmals eine zuverlässige Identifikation der erniedrigten Knochendichte zeigen. Sollte sich dies in weiteren Studien und Untersuchungen bestätigen, könnte die QUS in naher Zukunft einen wichtigeren Stellenwert in der Osteoporosediagnostik einnehmen.

#### **1.3.4 Laborparameter**

Die laborchemische Untersuchung beinhaltet neben einem Basislabor auch Untersuchungen zum Ausschluss oder zur Bestätigung sekundärer Osteoporosen sowie spezifische Knochenumbaumarker. Sie dient so der differentialdiagnostischen, ätiologischen Einteilung der Osteoporose sowie der Unterscheidung zwischen *high-turn-over-* bzw. *low-turn-over-*Osteoporose.

**Tab.4: Laborparameter bei Osteoporose (DVO 2006; Gomez et al. 1995; Eastell 1998; Fassbender et al. 2002; Kanis 2002)**

<b>Basislabor</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Blutbild</li> <li>▪ C-reaktives Protein</li> <li>▪ BSG</li> <li>▪ Kalzium</li> <li>▪ Phosphat</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ alkalische Phosphatase</li> <li>▪ gamma-GT</li> <li>▪ Kreatinin</li> <li>▪ Harnstoff</li> </ul>
<b>Knochenumbaumarker</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Knochenaufbau</li> <li>▪ Osteocalcin</li> <li>▪ knochenspezifische AP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Knochenresorption</li> <li>▪ Pyridinium</li> <li>▪ Desoxypyridinolin(Urin)</li> <li>▪ C-terminales Telopeptid des Kollagens Typ I</li> </ul>
<b>Sekundäre Osteoporose</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Parathormon (Hyperparathyroidismus)</li> <li>▪ Cortisol, ACTH (Hypercortisolismus)</li> <li>▪ Östrogen, LH,FSH (Östrogenmangel)</li> <li>▪ TSH, FT 4(Hyperthyreose)</li> <li>▪ Xylose (Malabsorption)</li> <li>▪ Eiweißelektrophorese (Plasmozytom)</li> <li>▪ Rheumafaktoren, ANA (Rheumatoide Erkrankungen)</li> <li>u.a.</li> </ul>	

Die Knochenumbaumarker dienen der Beschreibung der Knochenumbauvorgänge und bieten die Möglichkeit eines Einblicks in die Dynamik des Knochenstoffwechselgeschehens. Erhöhte biochemische Parameter des Knochenabbaus im Blut und/oder Urin haben sich in Studien als ein unabhängiger

Marker von Risikofaktoren für Frakturen erwiesen (Jamal et al. 2005; Brown et al. 2005) und spielen seit langem eine unterstützende Rolle in der Diagnostik der postmenopausalen Osteoporose. Vorteil ist die nichtinvasive Bestimmung, die ohne Strahlenexposition erhoben werden kann. Allerdings können Knochenmarker weder zwischen Veränderungen am trabekulären und kortikalen Knochen unterscheiden oder Aussagen über die Höhe des Knochenmasseverlustes verschiedener Skelettlokalisationen machen, noch ist eine Beurteilung der Knochenstruktur anhand von Knochenmarkern möglich. Im Gegensatz zur Knochendichtebestimmung, die eher Summationseffekte bzw. Resultate stattgehabter Vorgänge anzeigt, sind die Knochenmarker in der Lage, Veränderungen rasch anzuzeigen bzw. aktuelle Degradations- und Formationsaktivitäten frühzeitig widerzuspiegeln (Christenson 1997). Somit sind Knochendichtemessung mit Bestimmung der aktuellen statischen Knochenmasse und die Knochenmarker mit Erfassung des dynamischen Knochenumsatzes zwei Größen, die sich in der Gesamtdiagnostik einer Knochenerkrankung komplementär ergänzen.

In der Literatur werden verschiedene biochemische Parameter, die in direktem Zusammenhang mit dem Umbau der Knochenmatrix stehen, beschrieben. In Hinsicht auf die Osteoblastenaktivität ist die knochenspezifische alkalische Phosphatase zu nennen, ein Enzym, dessen Gesamtaktivität zu etwa gleichen Teilen aus Leber und Knochen stammt und einen guten Einblick in die Knochenneubildung vermittelt. Osteocalcin ist ein weiterer wichtiger Parameter, welcher als wesentliches nichtkollagenes Knochenprotein während der Matrixmineralisationsphase synthetisiert und überwiegend direkt in die Knochenmatrix integriert wird, so dass nur ein kleiner Teil im Serum messbar ist.

Die Osteoklastenaktivität kann dagegen durch Knochenabbaumarker bestimmt werden. Hier kann die Kalziumausscheidung im Urin herangezogen werden. Weitere wichtige Marker sind die Tartrat-resistente saure Phosphatase, die schnell auf akute reaktive Prozessabläufe reagiert und das Hydroxyprolin im 24-h-Sammelurin, welches aus abgebautem Kollagen stammt und nicht wiederverwertet wird. Weiterhin sind noch die quervernetzten Telopeptide, das carboxyterminale Telopeptid und das aminoternale Telopeptid, sowie die Kollagencrosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin im Harn und das Typ-I-Kollagen (carboxyterminales quervernetztes Telopeptid (ICTP)) im Serum zu nennen.

Fast alle Knochenumsatzmarker unterliegen den Schwankungen einer zirkadianen Rhythmik von 5-10% (Delmas 1995).

Die mangelnde Standardisierung dieser Parameter unter klinischen Alltagsbedingungen und die fehlende Evaluation im Kontext mit anderen Risikofaktoren lassen aber generelle Empfehlungen für den Einsatz der laborchemischen Knochenstoffwechselfparameter in der Routinediagnostik zurzeit noch nicht zu (DVO 2006).

Im Folgenden sind die untersuchten Marker der Serumanalyse und Genexpression dargestellt.

Osteocalcin (OC):

Osteocalcin (*bone gla protein*) ist ein nichtkollagenes Protein, welches bei den meisten Tierspezies und dem Menschen aus 49 Aminosäuren besteht. Die Ratte stellt mit einer Anzahl von 50 Aminosäuren eine Ausnahme dar. Es ist ein calciumbindendes Protein, das von Osteoblasten und Odontoblasten während der Mineralisationsphase produziert wird (Houben et al. 1997), und damit einen hochspezifischen Knochenmarker darstellt. Nach der Freisetzung aus den Osteoblasten wird etwa 80% des Osteocalcins in die Knochenmatrix eingebaut, ca. 20% werden in die Blutzirkulation sezerniert. Der Serum-Osteocalcinspiegel steht somit mit der Knochenumsatzrate in Zusammenhang.

Saure Knochenphosphatase (TRAP):

Die saure Knochenphosphatase gehört zur Gruppe der Sauren Phosphatasen, die im Körper ubiquitär vorkommen. Derzeit sind fünf verschiedene Isoformen bekannt. Das in dieser Studie untersuchte Isoenzym Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) ist knochenspezifisch, in der Osteoklastenmembran verankert und wird zur Knochenresorption freigesetzt. Wirksamkeit und Identität der TRAP konnten von Oddie et al.(2000) und Nakasato et al. (1999) nachgewiesen werden.

Kollagen-I-Telopeptide:

Bei der physiologischen Knochenresorption entstehen als Abbauprodukte des Typ-I-Kollagens die Typ-I-Kollagen-Telopeptide ( $\beta$ -Crosslaps). Typ-I-Kollagen ist nicht knochenspezifisch. Es kommt auch im Knorpel, in Bändern, Sehnen, in der Haut und anderen Bindegeweben vor. Die Typ-I-Kollagenfibrille hat die Struktur einer Tripelhelix. Sowohl am N-terminalen als auch am C-terminalen Ende liegen die drei

Aminosäureketten in nichthelikaler Struktur vor. Diese Enden werden als Telopeptide bezeichnet und sind bevorzugter Ort für Quervernetzungen zu den Aminosäuren der helikalen Region der nächsten Kollagenfibrille (Pedersen et al. 1998; Rosenquist et al. 1998). Die C-terminalen linearen Kettenenden enthalten eine Asp-Gly-Sequenz, welche spontan eine  $\beta$ -Isomerisierung durchlaufen kann. Es wird angenommen, dass diese Isomerisierung mit dem Alterungsprozess von Proteinen einhergeht. Diese sogenannten isomerisierten Telopeptide sind spezifisch für den Abbau des im Knochen vorkommenden Typ-I-Kollagens.

Östrogenrezeptoren (ER):

Für Östrogene (E2) gibt es mindestens zwei, vermutlich auch weitere Rezeptoren, die zur Familie der Steroidrezeptoren gezählt werden: ER- $\alpha$  und ER- $\beta$ . Dem ER- $\beta$  werden östrogen-antagonistische Wirkungen zugeschrieben. Der hier untersuchte ER- $\alpha$  vermittelt die durch Östrogen hervorgerufene positive osteoanabole Wirkung auf den Knochenumsatz. Knochen, besonders solche mit trabekulären Strukturen, werden durch die An- oder Abwesenheit von Östrogenen in hohem Maße beeinflusst. Es gilt als sicher, dass die postmenopausale Osteoporose auf eine Verminderung des Östrogenspiegels zurückzuführen ist.

Insulin-like growth factor (IGF-1):

Insulin-like growth factor, auch als Somatomedin bekannt, ist ein dem Insulin strukturell und funktionell ähnliches Polypeptid, welches als Wachstumsfaktor inzwischen in fast allen Geweben des Körpers nachgewiesen worden ist. IGF-1 gilt neben Osteocalcin als biochemischer Marker für eine erhöhte Osteoblastenaktivität.

#### **1.4 Die ovariectomierte Ratte als Modell der postmenopausalen Osteoporose**

Die ovariectomierte Ratte ist ein etabliertes Modell für Osteopenie (Kalu 1991; Frost und Jee 1992), bei dem Prozesse wie z.B. der lamelläre Knochenaufbau oder das Remodelling in den Spongiosaanteilen des Knochens auf den Menschen übertragbar sind. Der Knochenverlust in der proximalen Tibiametaphyse beträgt drei Monate nach der Ovariectomie etwa 50% (Wronski et al. 1985; Faugere et al. 1986; Frost und Jee 1992; Thompson et al. 1995).

Ein weiterer Vorteil der ovariectomierten Ratte als Osteoporosemodell liegt darin, dass es seit ihrer Anerkennung durch die amerikanische Food-and-Drug-Administration 1994 als Modell zur Untersuchung von medikamentöser Behandlung

und Prophylaxe der Osteoporose (Thompson et al. 1995) eine große Anzahl von Studien zu diesem Thema gegeben hat und somit eine gute Vergleichbarkeit der gewonnenen Ergebnisse mit vorherigen Studien gegeben ist. In vielen dieser Osteoporose-Studien wird zur Verbesserung der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ein Großtierversuch empfohlen. Ein ubiquitär geeignetes Großtiermodell für die Osteoporose wird jedoch weiterhin gesucht.

Beim Menschen sind die osteoporotischen Frakturen vorwiegend an der Wirbelsäule und den Metaphysen der langen Röhrenknochen, also im distalen Radius, dem proximalen Femur, sowie dem proximalen Humerus, lokalisiert. Bis jetzt haben sich die Studien der Frakturheilung in normalen und osteoporotischen Knochen auf die Heilung diaphysärer Knochen fokussiert (Kubo et al. 1999; Li J et al. 2000; Li C et al. 2001; Schmidmaier et al. 2001; Cao et al. 2002; Nakajima et al. 2002; Hatano et al. 2004). Modelle und Studien zur metaphysären Knochenheilung existierten bisher fast nicht, obwohl bekannt ist, dass die osteoporotischen Veränderungen im diaphysären Knochen wesentlich geringer und abweichend zu denen im metaphysären, trabekulären Knochen sind.

In dieser Studie wird mit Hilfe von biomechanischen Tests und serologischen Untersuchungen die Wirksamkeit verschiedener Medikamente auf die Frakturheilung bei der ovariectomierten Ratte in der Metaphyse der Tibia getestet. Insbesondere die biomechanischen Eigenschaften des einer nach metaphysär induzierten Fraktur geheilten Tibiaknochens spielen bei der Osteoporose eine große Rolle und sind größtenteils von der Elastizität der Extrazellulärmatrix abhängig (Stürmer et al. 2006).

Während mit radiologischen und mikroskopischen Untersuchungen die Elastizität über die Mikroarchitektur des Knochens nur indirekt messbar ist, kann mit mechanischen Tests diese direkt gemessen werden.

## **1.5 Therapie der Osteoporose**

Bei der Therapie der Osteoporose unterscheidet man die Prävention und Basistherapie von der speziellen medikamentösen Therapie.

### **1.5.1 Prävention und Basistherapie**

In den S3-Leitlinien des DVO (2006) werden allgemeine Maßnahmen für eine Verbesserung der Knochenstabilität sowie zur Verminderung von sturzbedingten peripheren Frakturen empfohlen. Zu dieser Prophylaxe und Basistherapie zählen

etwa eine regelmäßige körperliche Aktivität, Vermeidung von Immobilisation, ausreichende Kalzium- und Vitamin-D-Zufuhr, Meidung von Nikotin und Alkohol, Abklärung unklaren Untergewichtes, ggf. Hüftprotektoren und andere adaptive Hilfsmittel sowie ab dem 70.Lebensjahr eine jährliche Sturzanamnese.

Medikamente, die eine Osteoporose fördern oder beispielsweise durch Minderung der Vigilanz als Sturzursache in Frage kommen, sollten kritisch auf ihr Nutzen-Risiko-Verhältnis kontrolliert werden.

#### **1.5.1.1 Indikationen zur medikamentösen Osteoporosetherapie**

Neben der Basistherapie und Primärprophylaxe haben spezielle, medikamentöse Therapieschemata einen wichtigen Stellenwert in der Therapie der Osteoporose. In den aktuellen Leitlinien des Dachverbandes für Osteologie (DVO) von 2006 sind die folgenden Indikationen für die medikamentöse Therapie einer Osteoporose empfohlen worden: Relative Indikation für den Beginn einer medikamentösen Therapie ab einem 20%igen 10-Jahres-Schenkelhalsfrakturrisikoäquivalent. Absolute Indikation besteht ab 40%igem Risiko. Die folgende Tabelle zeigt die Bedingungen für die Risikoabschätzung an:

**Tab.5: Risikoabschätzungen für Schenkelhalsfrakturen bei Osteoporose (DVO 2006)**

> 20%iges 10-Jahres-Schenkelhalsfrakturrisikoäquivalent
Lebensalter bis 64 Jahre und T-Wert LWS oder Gesamtfemur < -3,5
Lebensalter 65-74 Jahre und T-Wert LWS oder Gesamtfemur < -2,5
Lebensalter ab 75 Jahre und T-Wert LWS oder Gesamtfemur < -2,0
Lebensalter bis 64 Jahre, prävalente Wirbelkörperfraktur und T-Wert LWS oder Gesamtfemur < -2,0
> 40%iges 10-Jahres-Schenkelhalsfrakturrisikoäquivalent
Lebensalter bis 64 Jahre und T-Wert LWS oder Gesamtfemur < -4,5
Lebensalter 65-74 Jahre und T-Wert LWS oder Gesamtfemur < -3,5
Lebensalter ab 75 Jahre und T-Wert LWS oder Gesamtfemur < -3,0
Lebensalter bis 64 Jahre, prävalente Wirbelkörperfraktur und T-Wert LWS oder Gesamtfemur < -3,0
Lebensalter ab 65 Jahre, prävalente Wirbelkörperfraktur und T-Wert LWS oder Gesamtfemur < -2,0

Zu beachten ist, dass das in der Tabelle dargestellte Risiko nur die Knochendichte (T-Score) und das Lebensalter berücksichtigt. Bei weiteren zusätzlichen Risikofaktoren erhöht sich das Gesamtfrakturrisiko und somit die Dringlichkeit eines Therapiebeginns. Zu diesen Risikofaktoren gehören:

- Periphere Fraktur nach einem Bagateltrauma
- Osteoporotische Fraktur der Mutter
- Multiple Stürze
- Nikotinkonsum
- Immobilisation.

Bei mehr als einer osteoporose-typischen Wirbelkörperfraktur wird unabhängig vom T-Wert eine medikamentöse Therapie empfohlen.

Bei Patienten mit osteoporotisch bedingten Fragilitätsfrakturen, z.B. an den Wirbelkörpern, sollte eine adäquate Schmerztherapie eingeleitet werden. Auch Rehabilitationsmaßnahmen sowie Physiotherapie stehen zur Therapie der Osteoporose und den daraus resultierenden Folgeerkrankungen zur Verfügung.

### 1.5.2 Anti-osteoporotische Substanzen

Bei den für die spezielle Osteoporosetherapie zur Verfügung stehenden Medikamenten unterscheidet man Medikamente mit antiresorptiver Wirkung von solchen mit osteoanaboler Wirkung.

**Tab.6: Medikamente Osteoporose anabol vs. resorptiv**

Antiresorptive Substanzen	Osteoanabole Substanzen
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bisphosphonate</li> <li>▪ Raloxifen</li> <li>▪ Kalzitonine</li> <li>▪ Kalzium</li> <li>▪ Vitamin D</li> <li>▪ Statine</li> <li>▪ Östrogene</li> <li>▪ Östrogen/Gestagen</li> <li>▪ Phytoöstrogene</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Parathormon</li> <li>▪ Fluoride</li> <li>▪ Strontium</li> <li>▪ Anabolika</li> <li>Testosteron</li> </ul>

Für die Therapie der postmenopausalen Osteoporose sind Raloxifen, Teriparatid, Strontiumranelat, Östrogene sowie die Bisphosphonate Alendronat, Risedronat und Ibandronat als Therapeutika mit dem Evidenzgrad A klassifiziert, während beim Mann in Deutschland bisher nur Alendronat zur Behandlung der Osteoporose als Therapieoption mit dem Evidenzgrad A zur Verfügung steht (PTH laut aktuellen Leitlinien 2006 nur in der Schweiz zugelassen).

Im Folgenden wird die Wirkung der in dieser Studie untersuchten Medikamente dargestellt.

### 1.5.2.1 Hormonersatztherapie

Die postmenopausale Hormonersatztherapie mit Östrogen bzw. Östrogen und Gestagen hat in den letzten Jahren deutlich an Bedeutung verloren. Ende der 90er Jahre galt die Hormonersatztherapie als Mittel der Wahl gegen klimakterische Beschwerden und Osteoporoseprophylaxe bei Frauen in den Wechseljahren.

Durch verschiedene Studien, wie die Womens´ Health Initiative (Rossouw et al. 2002) oder die Million-Women-Studie, konnte jedoch ein ungünstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis nachgewiesen werden, sodass die Indikation für eine Hormonersatztherapie nur noch bei Frauen "mit hohem Frakturrisiko, die eine Unverträglichkeit oder Kontraindikation gegenüber anderen zur Osteoporoseprävention zugelassenen Arzneimitteln aufweisen", (DVO 2006), gestellt wird. Die WHI-Studie mit 27000 Teilnehmerinnen wurde nach 5,8 Jahren abgebrochen, da für eine kombinierte Östrogen-Gestagen-Therapie sowohl ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, Thrombose und Schlaganfälle, als auch für Brustkrebs nachgewiesen werden konnte (Rossouw et al. 2002). Trotz der ebenfalls bestätigten Senkung des Frakturrisikos und der Senkung des Risikos, ein kolorektales Karzinom zu bekommen, sind ihre Risiken im Vergleich zum Nutzen dieser Therapieform zu hoch.

Auch der Studienarm mit der alleinigen Östrogen-Monotherapie wurde wie auch die kombinierte Gestagen-Östrogen-Therapie vorzeitig abgebrochen. Auch hier zeigte sich ein signifikant höheres Risiko für Thrombembolien und Schlaganfälle sowie ein deutlich erhöhtes Risiko für Endometriumkarzinome bei erniedrigter Mammakarzinominzidenz und signifikanter Frakturreduktion (Rossouw et al. 2002).

Basierend auf diesen Fakten hat der Dachverband für Osteologie in seiner 2006 überarbeiteten Neufassung der Leitlinien für Osteoporose eine Reihe von Kontraindikationen für eine postmenopausale Hormontherapie aufgezählt. Absolut kontraindiziert ist eine Hormonersatztherapie bei vorbestehender koronarer Herzkrankheit, vorangegangenen thrombembolischen Ereignissen, vorangegangenem Schlaganfall, bei Thrombophilie, schwerer Einschränkung der Leberfunktion. Ebenso kontraindiziert ist wegen des stark erhöhten Risikos für die Entstehung eines Endometriumkarzinoms die alleinige Östrogen-Therapie bei Frauen mit intaktem Uterus.

### 1.5.2.2 Selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERMS)

In dieser Studie wird der bekannteste SERM Raloxifen untersucht. Nach der Zulassung von Tamoxifen zur adjuvanten Therapie des rezeptorpositiven Mammakarzinoms steht es seit 1998 als SERM der 2. Generation zur Verfügung. Diese Medikamentengruppe wurde entwickelt, um die positiven östrogen-agonistischen Wirkungen am Knochenstoffwechsel und Fettstoffwechsel auszunutzen und gleichzeitig östrogen-antagonistische Wirkungen an Brustdrüse und Uterus zu erzielen. SERMs wirken über spezifische Bindungen mit Östrogenrezeptoren und lösen so über Modulation des Rezeptors agonistische oder antagonistische Effekte aus. Auch die unterschiedliche Affinität zu Östrogenrezeptor  $\alpha$  und  $\beta$  erklärt den teils gleich-, teils gegensinnigen Effekt der SERMs im Vergleich zu Östrogen, da diese eine gewebespezifische Verteilung mit hoher Heterogenität aufweisen.

Seine antiresorptive Wirkung am Knochen, durch Hemmung der Osteoklasten, bedingt bei unveränderter osteoblastärer Neubildung wird für die Behandlung der postmenopausalen Osteoporose ausgenutzt.

In mehreren Studien und vor allem in der MORE-Studie (Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation) konnte dargestellt werden, dass Raloxifen bei postmenopausalen Frauen eine Senkung des vertebrealen Frakturrisikos bewirkt und es zu einer signifikanten Erhöhung der Knochenmineraldichte kommt (Delmas et al. 2002; Ettinger et al. 1999).

Durch seine zusätzlichen protektiven Wirkungen am kardiovaskulären System (Delmas et al. 1997) und an der Brustdrüse (Cauley et al. 2001) und seine im Gegensatz zu Tamoxifen und zur Östrogentherapie nicht stimulierenden Effekte auf das Uterusendometrium bei postmenopausalen Frauen (Cohen et al. 2000) ist Raloxifen vom Dachverband Osteologie als Klasse-A-Medikament zur Behandlung postmenopausaler Osteoporose klassifiziert worden.

### 1.5.2.3 Bisphosphonate

Bisphosphonate sind metabolisch stabile organische Pyrophosphatverbindungen, die durch Hemmung verschiedener Proteine in Osteoklasten deren Fähigkeit zur Resorption von Knochensubstanz hemmen. Sie lagern sich an der Oberfläche der mineralisierten Knochensubstanz ab und können so ebenfalls deren Abbau durch

Osteoklasten verhindern. Damit werden sie zu den antiresorptiven Substanzen in der Osteoporosetherapie gezählt.

Diese verminderte Resorptionsfähigkeit führt zu einer Verbesserung der Knochenarchitektur, in Form einer verstärkten Mineralisierung des Knochengewebes, und somit zu einem positiven Effekt auf die Knochendichte und einer damit verbundenen Senkung des Frakturrisikos bei postmenopausaler Osteoporose. Dieser Effekt gilt sowohl für vertebrale, als auch für periphere Frakturen (Cranney et al. 2003).

Der Wirkungseintritt zur Verminderung von Frakturen ist bereits nach 6 Monaten festzustellen (Harrington et al. 2004), wobei in randomisierten Studien auch nach fünf Jahren Behandlung noch kein Effizienzverlust nachweisbar war (Sorensen et al. 2003).

Die oben genannten Studien beziehen sich auf das Bisphosphonat Risedronat, welches neben Alendronat und Ibandronat zu den im Moment wichtigsten zur Therapie der postmenopausalen Osteoporose zugelassenen Medikamenten gehört. Sie gehören alle der Gruppe der Aminobisphosphonate an.

Aktuelle Vergleichsstudien zeigen allerdings einen therapeutischen Vorteil von Alendronat gegenüber Risedronat innerhalb dieser beiden vom Dachverband Osteologie als Klasse A klassifizierten Substanzen bei postmenopausaler Osteoporose (DVO 2006).

In Bezug auf eine Verbesserung der hier untersuchten Frakturheilung in der frühen Phase der Osteoporose zeigten sich bisher jedoch keine eindeutig positiven Effekte des Alendronats. Kolios et al. (2009) konnten sogar eine Verschlechterung der Knochenqualität und der biomechanischen Eigenschaften im Vergleich mit östrogenbehandelten Tieren feststellen, und das bei ähnlichen biomechanischen Eigenschaften wie denen der unbehandelten osteoporotischen Tiere.

Um die am häufigsten auftretende unerwünschte Wirkung, die gastrointestinalen Symptome (Hamilton et al. 2003), zu verringern, wurde die Dosierung von 5mg/d für Risedronat bzw. 10 mg/d bei Alendronat auf die Dosierung einer oralen Tablette einmal wöchentlich auf 35 mg bzw. 70 mg mit Erfolg erprobt.

#### 1.5.2.4 Phytoöstrogene

Phytoöstrogene sind in einer Vielzahl von Pflanzen nachweisbar und werden chemisch in die Gruppe der Polyphenole eingeteilt. In Futterstudien und tierexperimentellen Studien in Göttingen wurden *Vitex agnus castus*, *Belamcanda chinensis*, *Silybum marianum* sowie *Cimicifuga racemosa* eingesetzt. In einer Studie mit männlichen orchietomierten Ratten konnte ein therapeutischer Nutzen der Phytoöstrogene *Agnus castus* und *Cimicifuga racemosa* in der Behandlung der männlichen Osteoporose festgestellt werden (Seidlová-Wuttke et al. 2005; Sehmisch et al. 2009 a). Ihnen allen ist eine östrogene Aktivität gemeinsam, da sie chemisch dem 17 $\beta$ -Estradiol ähneln und wie das Sexualhormon mit dem Östrogenrezeptor interagieren. Sie werden laut Brzezinski und Debi (1999) der Gruppe der SERM zugeordnet, da sie über Bindung an die Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  sowohl eine dem Östrogen agonistische als auch antagonistische Wirkung entfalten.

#### Cimicifuga Racemosa

*Cimicifuga Racemosa* (CR), die Traubensilberkerze, ist eine in den fruchtbaren Gegenden Nordamerikas vorkommende Pflanze aus der Familie der Hahnenfußgewächse (Ranunculaceae). Das Rhizom (Wurzelstock) dieses Gewächses mit seinen pharmakologisch aktiven Inhaltsstoffen wie u.a. Triterpenglykosid oder dem Isoflavon Formononetin wird seit Jahren für pharmazeutische Zwecke genutzt. Neben seiner Indikation als Gynäkologikum mit lindernder Wirkung bei klimakterischen Beschwerden (Wuttke et al. 2003) werden seit einigen Jahren auch die Wirkung bzw. die Anwendung zur Osteoporose-Prophylaxe bei postmenopausalen Frauen getestet und untersucht. Dem *Cimicifuga*extract BNO 1055 werden SERM-artige Eigenschaften unterstellt (Seidlova-Wuttke et al. 2003 a), die erwünschte östrogenartige Effekte an Knochen, Hypophyse und Lipidstoffwechsel erzielen und antiöstrogene Eigenschaften in Bezug auf Endometrium und Mamma ausüben. Diese Ergebnisse konnten auch in einer experimentellen Studie im Vergleich zu Estradiol-17  $\beta$  an ovariectomierten Ratten (Seidlová-Wuttke et al. 2003 b) und in anderen Studien (Zierau et al. 2002) unterstützt werden.

Die Anwendung von *Cimicifuga Racemosa* zur Therapie und Prophylaxe der postmenopausalen Osteoporose ist Gegenstand aktueller Forschungen. In den Leitlinien des Dachverbandes Osteologie nimmt es als Therapeutikum derzeit noch keinen Platz ein. Als Gynäkologikum findet es, bei einer empfohlenen Tagesdosis von 40 mg, Anwendung bei prämenstruellen, dysmenorrhoeischen sowie klimakterisch bedingten neurovegetativen Beschwerden.

---

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1 Versuchsaufbau

#### 2.1.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 73 drei Monate alte, 220-260 g schwere Sprague-Dawley-Ratten (Winkelmann, Borken, Deutschland) verwendet, von denen 6 wegen Tod prae- oder postoperativ aus dem Versuch herausgenommen werden mussten. Die Ratten wurden für die gesamte Zeit der Studie in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Göttingen in Gruppen von 4 Tieren pro Käfig (Typ Makrolon® IV) gehalten. Die Raumtemperatur betrug 23°C bei 55% rel. Luftfeuchtigkeit und einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus (Raumbeleuchtung 6 bis 18 Uhr). Leitungswasser und Futter standen ad libitum zur Verfügung und die Betreuung der Tiere erfolgte durch Tierärzte, erfahrene Tierpfleger sowie durch Mitarbeiter der Unfallchirurgischen Abteilung Göttingen. Es liegt für die Tierversuche eine Genehmigung der Bezirksregierung Braunschweig vor (AZ 509.42502/01-53.03).

#### 2.1.2 Ovariectomie der Ratten

Die Ovariectomie der Ratten erfolgte in einer Ketamin/Xylazin-Anästhesie (Ketamin: Hostaket®, Fa.Hoechst, Bad Soden, Xylazin: Rompun®, Fa. Bayer, Leverkusen) in einem Mischverhältnis von 5:3. Die Dosierung betrug 0,01 ml/g KG und wurde intraperitoneal appliziert. Sie wurde von Frau Dr. med. D. Seidlovà-Wuttke aus der Abteilung für klinische und experimentelle Endokrinologie des Universitätsklinikums Göttingen durchgeführt.

Über eine Inzision der paravertebralen Haut zwischen Rippenbogen und Hinterläufnern wurde nach Rasur und Desinfektion vorsichtig bis zum Peritoneum präpariert und die Bauchhöhle eröffnet. Im Folgenden wurden die Tubae uterinae dargestellt und ligiert, die Ovarien abgesetzt, das Peritoneum mit Vicrylfäden verschlossen und die Hautwunden geklammert. In gleicher Narkose wurde jedem Tier ein Tansponder-Uno Micro-Id-System, Iso-Transponder (12mm) (Uno-Roesvaststaal BV, Zevenaar, Holland) subkutan implantiert. So konnte durch Identifizierung über die Tanspondernummer eine individuelle Überwachung des Allgemeinzustandes und der Gewichtsentwicklung eines jeden einzelnen Tieres gewährleistet werden.

### **2.1.3 Tibiaosteotomie**

Nach Ovariectomie wurden die Ratten noch in derselben Anästhesie folgendem operativen Verfahren an beiden proximalen Tibiae unterzogen:

Über einen anterior-medialen Zugang, der von den medialen Femurkondylen bis etwa zur Mitte der Tibia reichte, wurde das proximale Drittel der Tibia epiperiostal präpariert, ohne das umliegende Gewebe zu beschädigen. Mit einer Kanüle wurde der Kniegelenksspalt markiert. Anschließend wurde eine 5-Loch-Leibinger-T-Platte (57-05140, Stryker Trauma, Selzach, Schweiz) mit je zwei proximalen und distalen 1,2 mm Schrauben anterior-medial an der Tibia fixiert. Um die Osteotomie vorzunehmen, wurde die Platte temporär entfernt. Die Osteotomie wurde 7 mm unterhalb des Kniegelenks mit einem „pulsed“ Ultraschallgerät (Piezosurgery®, Mectron Medical Technology, Carasco Italien) durchgeführt. Mit diesem Gerät ist es möglich die Osteotomie durchzuführen, ohne die umliegenden Nerven, Sehnen, Bänder und Muskeln zu schädigen. Nach der Osteotomie wurde die Platte wieder in der vorherigen Position befestigt, und man erhielt einen Osteotomiespalt von etwa 1mm. Nach Spülung und Desinfektion des Operationsgebietes wurde die Muskelfaszie mit Vicryl® 4.0 (Eticon Norderstedt, Johnson & Johnson, Deutschland) readaptiert und die darüber liegende Haut mit Klammern (Michel wound brackets 12 x 3 mm, Gebrüder Martin GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) verschlossen. Abschließend bekamen die Tiere eine Einzeldosis von 5 mg/kg Perphenacin s.c., sowie in den 48 Stunden postoperativ vier Injektionen Caprofen (4mg/kg) als Schmerzprophylaxe.

### **2.1.4 Futterapplikation und Testsubstanzen**

Nach der Osteotomie wurden die Versuchstiere in 6 verschiedene Futtergruppen á 12 bzw. 13 Ratten eingeteilt. Als Basisnahrung bekamen die Ratten sojafreies Futter (ssniff SM R/M, 10 mm-Pellets, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland), welches bis auf die beiden Kontrollgruppen noch mit einem spezifischen Futterzusatz ergänzt wurde (siehe Tabelle 6). Die beiden Kontrollgruppen bildeten einerseits 13 Tiere, die nach Ovariectomie und Osteotomie sojafreies Futter erhielten (OVX) sowie andererseits 12 Tiere, die nicht ovariectomiert worden waren, und nach Osteotomie ebenfalls nur sojafreies Futter erhielten (Intakt).

Futter sowie Wasser standen den Versuchstieren ad libitum zur Verfügung, wobei die verzehrte Futtermenge zweimal wöchentlich pro Käfig bestimmt wurde, um die

durchschnittliche aufgenommene Menge an Futter respektive Wirksubstanz pro Tier in drei- bis viertägigem Abstand zu dokumentieren (Gesamtübersicht Tab. 9). Des Weiteren wurde jede Ratte einmal wöchentlich gewogen, und dabei wurden die Gewichtsveränderungen notiert.

Die Ratten wurden während der Frakturheilung 5 Wochen dieser spezifischen Diät unterzogen.

**Tab.7: Testsubstanzen und Dosierungen**

Substanz	Abkürzung	Dosierung (in g/kg Futter)
Alendronat	A	0,01
Cimicifuga racemosa	CR	1,66
Estradiol	E	0,0174
Raloxifen	Ral	0,1665
Sojafrei (intakt)	SHAM	
Sojafrei (+OVX)	C	

**Tab.8: Einteilung der Futtergruppen**

Futtergruppen	
Tiernummer	Gruppe
Nr. 1- 12	SHAM
Nr. 13 – 25	C
Nr. 26 – 36	A
Nr. 37 – 49	Ral
Nr. 50 – 61	CR
Nr. 62 – 73	E

### 2.1.5 Versuchsende

5 Wochen nach Ovariectomie, Osteotomie und Fütterung der Testsubstanzen wurden die Tiere in CO<sub>2</sub>-Narkose durch Dekapitation getötet. Hierbei wurde Blut für die

Bestimmung der Serumparameter Osteocalcin und TRAP gewonnen. Anschließend wurden die Rattentibiae von Haut, Muskeln und Sehnen freipräpariert. Nach Entfernung der T-Platte und der Schrauben wurden die Tibiae sofort bei  $-20^{\circ}\text{C}$  (Morphologie) bzw.  $-80^{\circ}\text{C}$  (Molekularbiologie) eingefroren. Jede rechte und linke Tibia wurde randomisiert je einer biomechanischen, histologischen und mikroradiographischen Analyse unterzogen, während die kontralaterale Tibia in der Abteilung für Klinische und Experimentelle Endokrinologie genanalytisch untersucht wurde.

## 2.2 Versuchsdurchführung

### 2.2.1 Radiographische Auswertung

Zur Untersuchung der Frakturheilung wurden je eine der beiden Tibiae geröntgt und hinsichtlich der Kallusbildung, Achsstellung, begleitender Fibulafraktur und eventueller Materiallockerung untersucht. Dafür wurden die Knochen mittels eines Spezialfilms (Fuji HR-E 30 Medical X-ray) und Faxitron-Cabinet Röntgengerätes (Hewlett-Packard, Faxitron Cabinet, Modell 43855A; Faxitron X-ray system, IL 60089, USA) mit 40 KV über 6 Minuten geröntgt. Es wurden anterior-posterior sowie Aufnahmen mit lateralem Strahlengang angefertigt (Abb.1a-c).

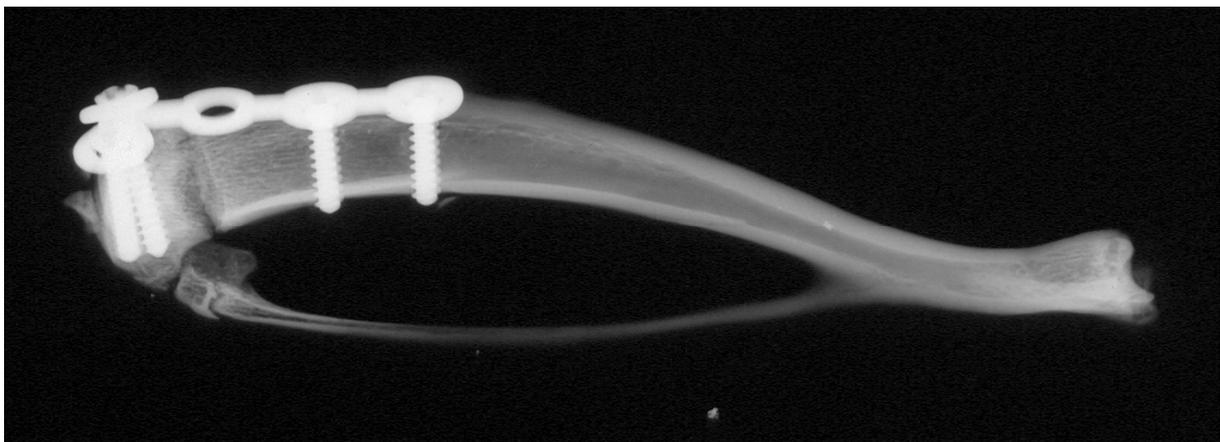


Abb.1(a)

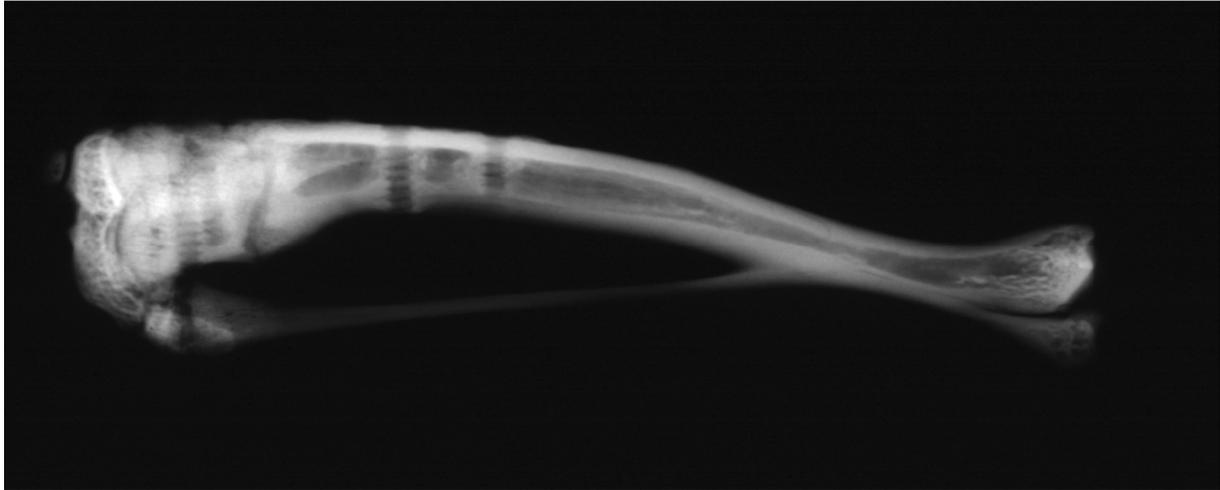


Abb.1(b)

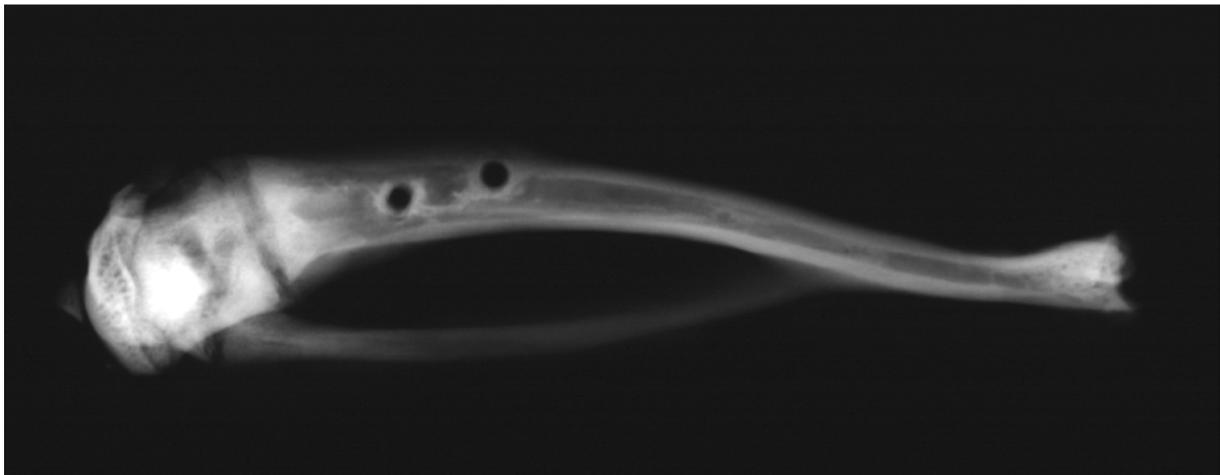


Abb.1(c)

**Abb.1(a-c): Röntgendarstellung der Rattentibia (a) nach der Operation, (b) fünf Wochen nach Osteotomie ohne Implantat in einem anterior-posterioren und (c) lateralen Strahlengang.**

Der Progress der Frakturheilung ist an dem vage sichtbaren Frakturspalt mit geringer periostealer Kallusformation zu erkennen.

### 2.2.2 Biomechanische Testung

Für den biomechanischen Elastizitätsversuch stand eine von Stürmer et al. neu entwickelte Bruch- und Biegetest-Apparatur zur Verfügung (Stürmer et al. 2006). Es wurde eine Materialprüfmaschine (Firma Zwick/Roell, Typ 145660 Z020/TND, Ulm, Deutschland) für diesen Biegeversuch verwendet. Nach Auftauen der Unterschenkelknochen wurden diese so in einem Hartgipsbett (GC Fujirock®; GC Europe N.V.) fixiert, dass sowohl ein Abkippen der Tibia bei Druckausübung, als auch eine Einschränkung der Dehnbarkeit nach proximal und distal verhindert werden konnte. Der Knochen wurde so gelagert, dass die Fibula komplett mit Gips

bedeckt wurde und die Tibia nur im Bereich der proximalen Syndesmose und der distalen Synostose eine Auflagefläche hatte (siehe Abb.1)

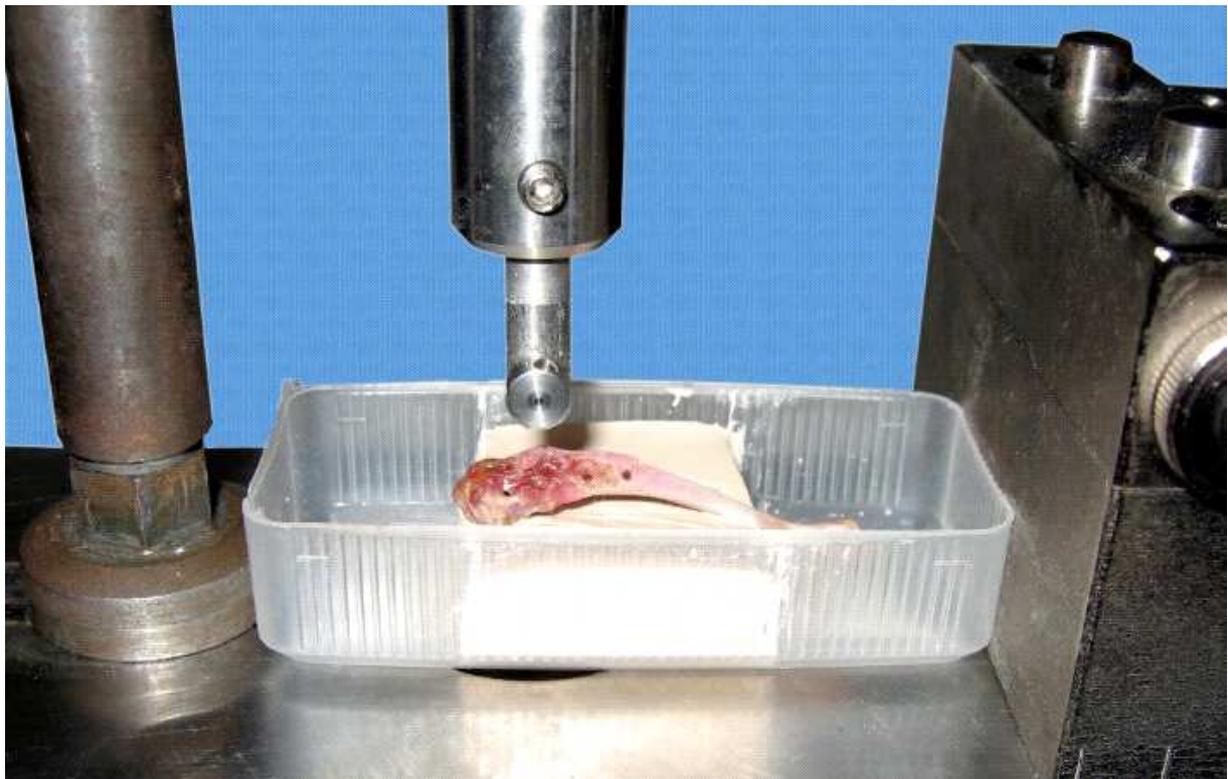


**Abb.2: Lagerung der Tibia im Hartgipsbett zur biomechanischen Prüfung**

Die Maschine wurde für einen Messbereich des Kraftaufnehmers zwischen 2N und 200N eingestellt. Die relative Auflösung betrug 0,2% bei 0,4% FN (2N Nennkraft), die Vorkraft 1N und der Kraftvorschub betrug 50mm/s. Nach Erreichen dieser Vorkraft von 1N erfolgte eine visuelle Kontrolle der Lage des Knochens und des Stempels in Bezug auf die korrekte Position über der metaphysären Kallusformation (Abb. 2 zeigt die Vorrichtung vor Beginn der Vorkraft). Anschließend wurde mit den Biegeversuchen begonnen. Die Aufzeichnungen der auf die Tibia einwirkenden Kraft und der Verformung wurden mit der speziell entwickelten Testexpert-Software (Firma Zwick) an einem PC analysiert und manuell durch den Prüfer bei einer Kräfteinwirkung von etwa 50-60 N für die negative Kontrollgruppe sowie etwa 60-70 N für alle anderen Gruppen gestoppt, um eine Zerstörung oder Beschädigung des Kallus zu verhindern (Dehnungsversuch). Diese Werte stammen aus vorherigen Erfahrungen bei Bruchtests von intakten Rattentibiae nach spezifischer Behandlung mit den verwendeten Substanzen (Stürmer et al. 2006). Des Weiteren konnte der Prüfer den Kurvenverlauf während der Tests am Monitor direkt mitverfolgen und so unter Berücksichtigung einer typischen Bruchkurve (siehe Abb.3) die Tests stoppen, da sich das Brechen des Knochens durch einen deutlichen Steigungsabfall des zuvor linearen Kurvenverlaufs im Kraft-Weg-Diagramm vorankündigt.

In dieser Studie wurden durch Biegeversuche an der Tibiametaphyse der Punkt der ersten plastischen Verformung (Streckgrenze) sowie die Elastizität der einzelnen Knochen getestet. Dazu wurde über den Stempel auf die ventrale Tibiakante auf Höhe der Osteotomielinie eine orthogonale Kraft ausgeübt und die einwirkende Kraft gegen den Weg, das Durchbiegen der Tibia, aufgetragen.

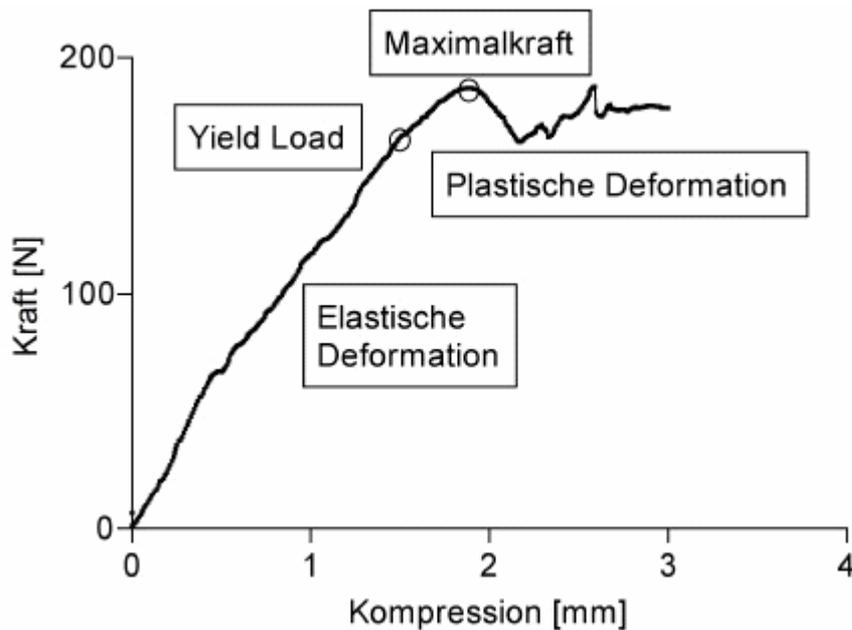
Die Reliabilität der Prüfmaschine wurde in einem vorausgegangenen Rechts-Links-Versuch validiert und bestätigt (Stürmer et al. 2006).



**Abb.3: Lagerung des eingebetteten Knochens in der Prüfmaschine**

### **2.2.3 Auswertung der biomechanischen Kompressionstests**

Zur Untersuchung des Einflusses der Futterzusätze auf die Frakturheilung wurden die Rattentibiae über 35 Tage nach operativ durchgeführter Fraktur mit Zusätzen in der Nahrung behandelt und anschließend biomechanischen Tests unterzogen. Anhand der gewonnenen Daten generierte die Testexpert-Software einen Kraft-Zeit-Graphen. Die in Abb. 3 dargestellte Kurve zeigt einen typischen Verlauf und ermöglicht eine generelle Einteilung in drei Teile, wie er für mechanische Tests an Rattentibiae schon von Stürmer et al. 2006 beschrieben wurde.



**Abb.4: Darstellung eines typischen Kraft-Zeit-Graphen mechanischer Tests**

Zunächst steigt der Graph linear an. Dies entspricht der elastischen Verformung der Tibia. In dieser Phase des Kompressionstests treten noch keine strukturellen Veränderungen des Knochens auf, und es besteht grundsätzlich eine Reversibilität der aufgetretenen Verformungen. Der gemessene Parameter der Steigung entspricht in diesem Teil der elastischen Verformung der Tibia, also der maximalen linearen Steigung. Im weiteren Verlauf nimmt die Steigung ab und nimmt einen eher zur x-Achse parallelen Verlauf. Dies entspricht der nun stattfindenden plastischen Deformation des Knochens. Die nun auftretenden strukturellen Veränderungen äußern sich in Form von trabekulären Mikrofrakturen und sind nicht mehr reversibel. Der Punkt des Übergangs von elastischer in plastische Deformation wurde als Streckgrenze (*yield load*) bezeichnet. Die Streckgrenze ist als der Moment des Versuches definiert, in dem die Steigung ihre Linearität verliert und niedrigere Werte annimmt. Um ihn zu bestimmen, wird aus den individuellen Daten des noch linear ansteigenden Teil des Graphen die Regressionsgerade und deren Standardabweichung berechnet. Der Untersucher definierte die Streckgrenze als den Punkt, an dem der Graph den Bereich der doppelten Standardabweichung der Regressionsgeraden verließ (Stürmer et al. 2006).

Um eine weitere Beschädigung der Versuchsknochen im Hinblick auf die mikroradiographische Auswertung zu verhindern, wurden die Kompressionstests nach Erreichen der Streckgrenze manuell abgebrochen. Der Wert der maximalen

Kraft wurde also nicht mehr erreicht. Der auf diesen Punkt folgende unregelmäßige Verlauf mit teils negativen Steigungen in der Abbildung der typischen Bruchkurve ist als Fraktur der Tibia zu deuten, wurde aber, wie oben beschrieben, in dieser Versuchsreihe ebenfalls nicht erreicht.

Die Werte für die Steigung und die Streckgrenze wurden aus den mechanischen Kompressionstests bestimmt und für die Auswertung des zu untersuchenden Osteoporosemodells verwendet.

#### **2.2.4 Serumanalyse**

Die Bestimmung der Osteocalcinkonzentration im Rattenserum wurde mit einem Sandwich-ELISA-Test vorgenommen. Dieser speziell für Ratten hergestellte ELISA ist in der Lage sowohl carboxyliertes, als auch decarboxyliertes Rattenosteocalcin zu messen (Rat-MID® Osteocalcin Elisa, Nordic Bioscience Diagnostics A/S Herlev, Dänemark). Die Durchführung für dieses kommerziell erhältliche Kit erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Durch den Hersteller wurden die angegebenen Normbereiche der Osteocalcinkonzentration im Serum (ng/ml) 3 Monate alter, weiblicher Sparque-Dawley- Ratten mit diesem Assay wie folgt angegeben:

Probandenanzahl	n=30
MW	417,8 ng/ml
SD	83,5 ng/ml
Mittelabw.	15,3 ng/ml

Reagenzien und Material:

Rat–MID, Osteocalcin ELISA der Firma Nordic Bioscience Diagnostics

A/S, Herlev, Dänemark, bestehend aus:

- Streptavidin–beschichtete Mikrotiterplatte (MTP)
- Probendiluent
- Osteocalcinstandards A–F (0, 35,5; 110,3; 247,8; 479,3 und 1071,2 ng/ ml)
- Kontrolle (185,8 ng/ml)
- synthetisches, humanes Osteocalcin
- Primärer Antikörper (spezifisch für die mittlere Molekülstruktur, Aminosäuren 21–29) zu vermischen mit primärem Inkubationspuffer
- Sekundärer Antikörper (peroxidasekonjugiert, spezifisch für Mäuse-IgG)
- Tetramethylbenzidin (TMB)– Chromogen–Lösung
- Stopplösung
- Waschlösung
- Abdeckfolie für MTP
- Assay Reader Sunrise Remote, Tecan, Crailsheim
- Bidestilliertes Wasser, Reinstwasseranlage der Serie Ultra Clear, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
- Präzisionspipette 10 µl , 1000 µl mit dazugehörigen Spitzen von Eppendorf AG, Hamburg
- Semiautomatische Multipipette, 300 µl , Eppendorf AG, Hamburg
- ELISA–Plattenschüttler Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg
- Vortex Mixer MS2 Minishaker, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen

Das Funktionsprinzip des Testes ist eine kompetitive Bindung der monoklonalen Antikörper mit gebundenem und freiem Osteocalcin.

Zunächst wurde die Mikrotiterplatte vorinkubiert. Zu diesem Zweck wurde synthetisches humanes Osteocalcin zugegeben. Um nun das nicht gebundene

humane Osteocalcin nach der Vorinkubation zu entfernen, folgte die erste Waschung. Anschließend werden die Standards, die Serumproben und der monoklonale Antikörper zugegeben und inkubiert. Es folgte eine zweite Waschung und die Zugabe eines mit Peroxidase markierten Antikörpers, der sich an die bereits gebundenen monoklonalen Antikörper anheftete. Die Peroxidase wandelte das zugegebene Substrat Tetramethylbenzidin in eine farbige Lösung um. Das Ende der Farbreaktion wurde durch Zugabe einer Stopplösung erreicht. Die gemessene Farbintensität war umgekehrt proportional zur Konzentration des Osteocalcins. Die Standardisierung der Messergebnisse wurde durch die Zugabe von humanem Osteocalcin erreicht, welches das gleiche Bindungsverhalten gegenüber dem markierten Antikörper besitzt.

Für die Bestimmung der Fragmente des Kollagen-Typ-I im Rattenserum wurde das hierfür entwickelte Kit verwendet (RatLaps™ Elisa, Nordic Bioscience Diagnostics A/S, Herlev, Dänemark).

### **2.2.5 Genanalyse**

Für die Genanalyse wurde Gewebe aus dem Kallus der metaphysären Tibia entnommen. Die Aufarbeitung der Proben und Messungen wurden in der Abteilung für Klinische und Experimentelle Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt und freundlicherweise zur Auswertung zur Verfügung gestellt. Es wurden die Werte für Osteocalcin (OC), Alkaline Phosphatase (AP), Kollagen-1 $\alpha$ 1 und Tartrat-resistente Phosphatase (TRAP) ermittelt.

#### **RNA Isolierung**

Die Isolierung der RNA aus dem Gewebe wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Hersteller-Protokoll durchgeführt.

Zunächst wurden die Gewebefragmente mit flüssigem Stickstoff herunter gekühlt und mit einem Mikro-Dismembrator (B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland) mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden 50 mg des zerkleinerten Gewebes mit 0,3 ml RLT-Puffer versetzt und 10s im Ultraschallbad homogenisiert. Dieser Puffer bewirkt das Lysieren der Zellen, und das im RLT-Puffer enthaltene Guanidin-Isothiocyanat inaktiviert RNasen, womit das Isolieren der intakten RNA ermöglicht wird. Im Anschluss wurden die lysierten Proben über QIAShredder™-Säulen (Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben. Das Gemisch wurde auf die

Extraktionssäule gegeben und entsprechend der Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Mit 50µl  $H_2O_{velc}$  wurde die RNA von der Säule eluiert.

Die Konzentration der abschließend in 50µl RNase-freiem Wasser vorliegenden RNA wurde zunächst photometrisch (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 260 und 280nm gemessen. Die Proben wurden bis zur quantitativen Bestimmung bei  $-70^{\circ}C$  gelagert.

#### Photometrische Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration wurden 5µl der RNA-Lösung in 75µl  $H_2O_{velc}$  verdünnt. Eine genauere Bestimmung erlaubt die photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration. Die Extinktion wird mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Die Konzentration ergibt sich aus dem Lambert-Beer-Gesetz:

Lambert-Beer-Gesetz:  $E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$

$E_{\lambda}$  = Extinktion bei der Wellenlänge  $\lambda$

$\epsilon_{\lambda}$  = molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$  in  $M^{-1}$

$c$  = Konzentration der Teilchen in der Lösung in mol/l

$d$  = Schichtdicke der durchstrahlten Lösung in cm

Für die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration lautet die abgeleitete Formel:

$$c = E_{260} \cdot k/d$$

$c$  = Konzentration der Nukleinsäure in µg / ml

$E_{260}$  = Extinktion bei 260 nm

$d$  = 0,5cm (Dicke der verwendeten Quarzglas-Küvette)

$k$  = nukleinsäurespezifischer Koeffizient in µg / ml

Werte für  $k$ :      dsDNA:      50µg / ml (ds = double strain)

                         ssDNA:      33µg / ml (ss = single strain)

                         RNA:        40µg / ml

Mittels einer weiteren Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 280nm, dem Absorptionsmaximum der meisten Proteine, lässt sich der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  berechnen.

Mit diesem Quotienten kann man die Reinheit einer Nukleinsäurelösung beurteilen. Er sollte einen Wert zwischen 1,6 und 2,0 annehmen. Außerdem wird durch eine Messung bei 230nm der Salzgehalt der Probe bewertet.

### Synthese der cDNA

Durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase Reverse Transkriptase wird RNA in cDNA umgeschrieben. Um einen kurzen, doppelsträngigen Startbereich für das Enzym zu erhalten, können sequenzspezifische Primer, „random“-Hexamere oder Oligo-Primer eingesetzt werden. Dabei betrug die Konzentration der eingesetzten Oligoprimer 100ng in einem Volumen von 1 $\mu$ l.

Für jede Probe wurde 150ng Gesamt-RNA eingesetzt:

5fach Synthesepuffer	4 $\mu$ l
dNTP-Mix (10mM)	1 $\mu$ l
Reverse Transkriptase (200U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
RNAse Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Gesamt RNA	150ng
Nukleasefreies Wasser	ad 20 $\mu$ l.

Das Reaktionsgemisch wurde als erstes 10 min bei 22°C und anschließend 50 min bei 42°C inkubiert und zuletzt für 10 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und nach kurzem Zentrifugieren sofort in der RT-PCR eingesetzt oder bei -70°C eingefroren.

### Darstellung der quantitativen real-time PCR

Die quantitative real-time PCR oder auch quantitative Echtzeit-PCR stellt eine Weiterentwicklung der Mitte der achtziger Jahre von K.B. Mullis entwickelten Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) dar (Mullis und Faloona 1987).

Die PCR ist eine sehr schnelle und sensitive Methode zur In-vitro-Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte und ermöglicht somit die Detektion kleinster DNA-Konzentrationen (Erlich et al. 1991).

Das Prinzip der PCR-Reaktion basiert auf der enzymatischen Vermehrung eines bestimmten DNA-Abschnittes, der zwischen zwei Startersequenzen, den sogenannten Primern, liegt. Die Basenabfolge der beiden Primer muss komplementär zur amplifizierenden DNA-Sequenz sein. Die Grundlage für die heute angewandte real-time quantitative PCR wurde 1992 durch Higuchi geschaffen (Higuchi et al. 1992).

Die real-time RT-PCR ermöglicht die Analyse von RT-PCRs in Echtzeit. Es kamen genspezifische Sonden zum Einsatz, an welche am 5'-Ende ein Reporterfluoreszenzfarbstoff (6-Carboxy-fluorescein, FAM) und am 3'-Ende ein Quencherfarbstoff (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin, TAMRA) gekoppelt wurden (TaqMan™-Prinzip)(Cardullo et al. 1988; Livak et al. 1995). Die Methode basiert auf der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq-DNA-Polymerase. Zwischen den zwei spezifischen Oligonucleotid-Primern liegt ein zusätzliches, fluoreszenzmarkiertes Oligonucleotid, die so genannte TaqMan-Probe. TaqMan-Proben sind Sonden, die, wie oben beschrieben, mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem intern eingebauten oder am 3'-Ende liegenden Quencher markiert sind. Bei der Neustrangsynthese schneidet die Taq-Polymerase durch ihre 5'-3'-Exonucleaseaktivität die TaqMan-Probe in kleine Fragmente, wodurch es zu einer Loslösung des Reporters vom Quencher kommt und die Reporterfluoreszenz freigesetzt wird. Die Zunahme der Reporterfluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen und ist somit proportional zu der Menge des DNA-Templates in der Probe. Der Anstieg der Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Abi Prism 7700 Sequence Detektors (TaqMan™, Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, Californien, USA) im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst. Die Quantifizierung der Fluoreszenzänderung erfolgte über die Berechnung einer Standardkurve (siehe unten).

Die in dieser Studie verwendeten Primer und Proben wurden mit Hilfe der Primer Express Software (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ausgewählt und sind in Tabelle 9 dargestellt. Sie wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen.

Jede PCR lief mit der entsprechenden cDNA, einer Kontrolle und sechs cDNA Proben mit bekannter Konzentration, damit eine Standardkurve erstellt werden konnte.

Für die PCR-Zyklen wurden die Reagenzien auf eine optisch durchlässige 96-Well-Microtiterplatten pipettiert (MicroAmp®, PE Applied Biosystems) und die Fluoreszenzveränderungen mit Hilfe des ABI Prism 7700 Sequence Detection Systems (PE, Applied Biosystems) gemessen.

Für die TaqMan-PCR wurden bei einem Reaktionsvolumen von 25µl folgende Reagenzien eingesetzt:

1 X TaqMan™ Universal PCR Master Mix (PE, Applied Biosystems)

50-900 nM pro Primer

175-225 nM pro Probe

2-4 µl cDNA

Die Reaktionsgemische wurden anschließend mit destilliertem Wasser auf 25µl aufgefüllt.

Die RT-PCR wurde im Folgenden auf dem ABI Prism 7700 Sequence Detection System (TaqMan® PE, Applied Biosystems) unter nachstehenden Zyklus-Bedingungen durchgeführt.

Start: 2 Minuten 50°C Inaktivierung kontaminierende r Nukleinsäuren aus vorhergehenden PCRs mittels Uracil-glycosylase

10 Minuten 95°C AmpliTaq Gold- Aktivierung

40 Zyklen

15 Sekunden 95°C Denaturierung der DNA

1 Minute 60°C Primeranlagerung und DNA-Synthese  
(+ Freisetzung des Reporterfluoreszenzfarbstoffes)

Standardkurven:

Für die Herstellung von cRNA wurde das PCR-Produkt kloniert und mit Hilfe des TOPO TA Cloning™ Kit unter Berücksichtigung der Anweisungen des Herstellers in den pCR™ II-TOPO Vektor eingebaut (Invitrogen, Groningen, Niederlande). Die anschließende Sequenzierung erfolgte durch die Firma Seqlab GmbH (Seqlab

GmbH, Göttingen, Deutschland). Die Vektoren wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen behandelt und mit dem Wizard™ DNA Clean-Up System (Promega, Mannheim, Deutschland) gereinigt. Die folgende RNA-Synthese wurde nach Herstellerangaben mit dem RiboMAX™ Large Scale RNA Production System (Promega, Mannheim, Deutschland) unter Verwendung sowohl der SP6, als auch der T7-Polymerase durchgeführt. Nach photometrischer Bestimmung der vorhandenen RNA-Konzentrationen wurde die RNA, wie oben beschrieben, mit der RNA-abhängigen DNA-Polymerase Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und eine Verdünnungsreihe (zehnfach) erstellt. Die Standardkurve erhielt man, indem man die korrespondierenden  $C_t$ -Werte aus der RT-PCR gegen die bekannten cDNA-Konzentrationen auftrug. Um die relativen Genexpressionslevel der aus dem in dieser Studie untersuchten Kallus zu erhalten, wurden die entsprechenden  $C_t$ -Werte in die dazugehörigen Standardkurven eingefügt.

**Tab.9: Übersicht über die verwendeten Primer und Proben**

Gen	Primer (fwd und rev)	Probe	Größe (BP)
Ratten Osteocalcin (OC)	5'-CAAAGCCCAGCGACTCTGA-3' 5'-AGGTAGCGCCGGAGTCTATTC-3'	5'-FAM-CCTTCATGTCCAA- GCAGGAGGGCAGT-TAMRA-3'	85
Ratten Collagen I (Coll I)	5'-GGCGAAGGCAACAGTCGAT-3' 5'-TCCATTCCGAATTCCTGGTCT-3'	5'-FAM-TGCACGAGTCACA- CCGGAACTTGG-TAMRA-3'	173
ER $\alpha$	5'-AAGCTGGCCTGACTCTGCAG-3' 5'-GCAGGTCATAGAGAGGCACGA-3'	5'-FAM-CGTCTGGCCCAGC- TCCTCCTCATC-TAMRA-3'	144
Ratten Tartrat-resistente saure Phosphatase Typ 5	5'-GATCACCTTGGCAATGTCTCG-3' 5'-GGCTGACAAAGTCGTCGGAAT-3'	5'-FAM-TGCCTACTCCAAG- ATCTCCAAGCGCTG-TAMRA-3'	175
IgF-1	5'-TGTCGTCTTCACATCTCTTCTACCTG-3' 5'-CCACACACGAACTGAAGAGCGT-3'	5'-FAM-TTACCAGCTCGG CCACAGCCGGAC-TAMRA-3'	121

### **2.2.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Die Ergebnisse des biomechanischen Tests, der Serumparameter sowie der Genanalyse wurden statistisch mit dem Programm Graph Pad Prism (Version 4.00 April 2003, GraphPad Software Inc., San Diego, USA) ausgewertet. Die Ergebnisse der zu untersuchenden Futtergruppen wurden mit Hilfe des *one-way* ANOVA und anschließenden Tukey-Kramer-post-hoc-Tests auf Signifikanz der Unterschiede geprüft. Die Unterschiede wurden mit  $p \leq 0,05$  als signifikant gewertet.

### 3 Ergebnisse

---

Die nachfolgenden Ergebnisse sind radiographische Auswertungen, biomechanische Tests, sowie Serumanalysen und Bestimmungen von Genexpressionen von 67 Sprague-Dawley-Ratten, welche mit verschiedenen Futterzusätzen gefüttert wurden. Die beiden Kontrollgruppen bildeten einerseits 13 Tiere, die nach Ovariectomie und Osteotomie, sojafreies Futter erhielten (osteoporotische Kontrollgruppe (C)), sowie andererseits 12 Tiere, die nicht ovariectomiert worden waren, und nach Osteotomie ebenfalls nur sojafreies Futter erhielten (nicht osteoporotische Kontrollgruppe (SHAM)).

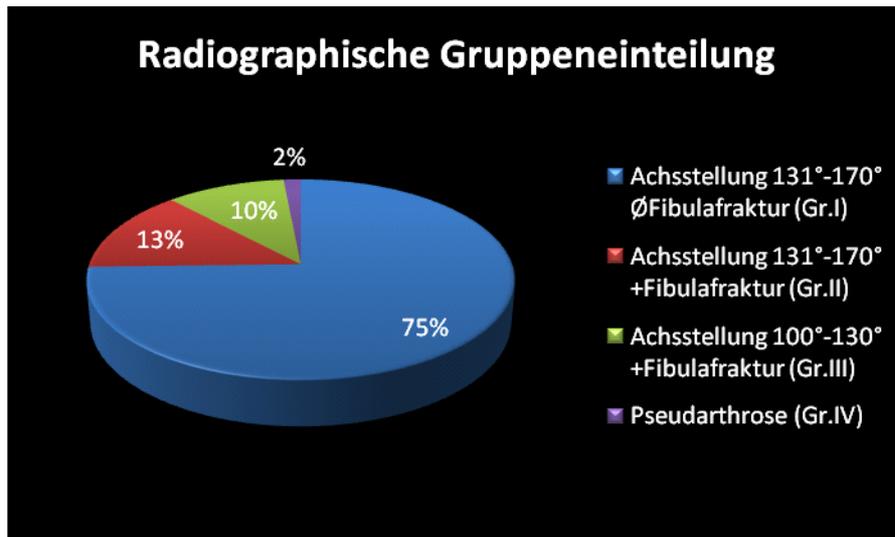
#### 3.1 Feinfokusröntgen der Rattentibiae

In der Radiographie waren 35 Tage nach beidseitiger Tibiaosteotomie 66 von 67 Tibiae radiologisch knöchern fest verheilt. Bei der weiteren Analyse der Feinfokusröntgenbilder der Tibia konnten 4 verschiedene Typen der Heilung unterschieden werden.

Zum ersten Typ zählen alle Knochen, bei denen erstens eine regelrechte Achsstellung zwischen proximalem und distalem Frakturteil vorlag, bei denen es zweitens zu keiner Fibulafraktur gekommen war und schließlich bei denen Heilungstendenzen in Form von Kallusbildung zu erkennen waren (50 von 67 Tieren).

Beim zweiten und dritten Typ handelt es sich um Knochen, bei denen es zu einer akzessorischen Fibulafraktur gekommen war. Sie unterscheiden sich jedoch durch den Grad der Achsabweichung. Während bei der zweiten Gruppe die Achsabweichung in Platten- und/oder Schraubenebene weniger als  $40^\circ$  (Achsstellung somit  $130^\circ - 170^\circ$ ) betrug (9 Tiere), waren es beim dritten Typ zwischen  $40^\circ$  und  $70^\circ$  (Achsstellung  $\leq 130^\circ$ ) (7 Tiere). Aufgrund der veränderten Knochenstatik im Vergleich zu den ersten beiden Gruppen, wurde dieser dritte Typ nicht biomechanisch analysiert.

Als eine vierte Gruppe wurden alle Präparate zusammengefasst, bei denen es zu keiner Kalzifizierung des Kallus kam, bzw. sich eine Pseudarthrose ausgebildet hatte (eine Tibia). Auch an dieser Tibia wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt, da auch hier, wie oben dargestellt, die veränderte biomechanische Situation und nicht die Testsubstanzen im Wesentlichen die Frakturheilung triggern.

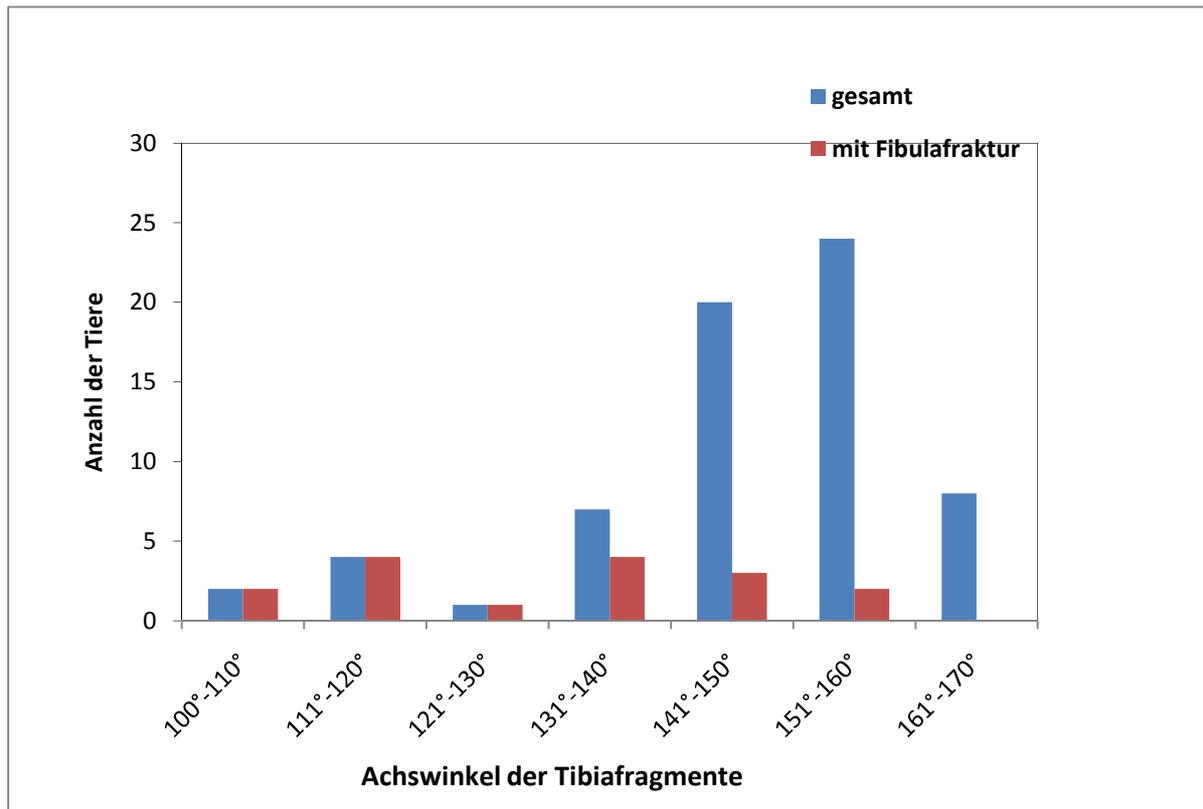


**Abb.5: Radiographische Einteilung der untersuchten Rattentibiae nach Achsstellung +/- akzessorische Fibulafraktur**

### 3.1.1 Einfluss einer akzessorischen Fibulafraktur auf die Achsstellung der Frakturfragmente

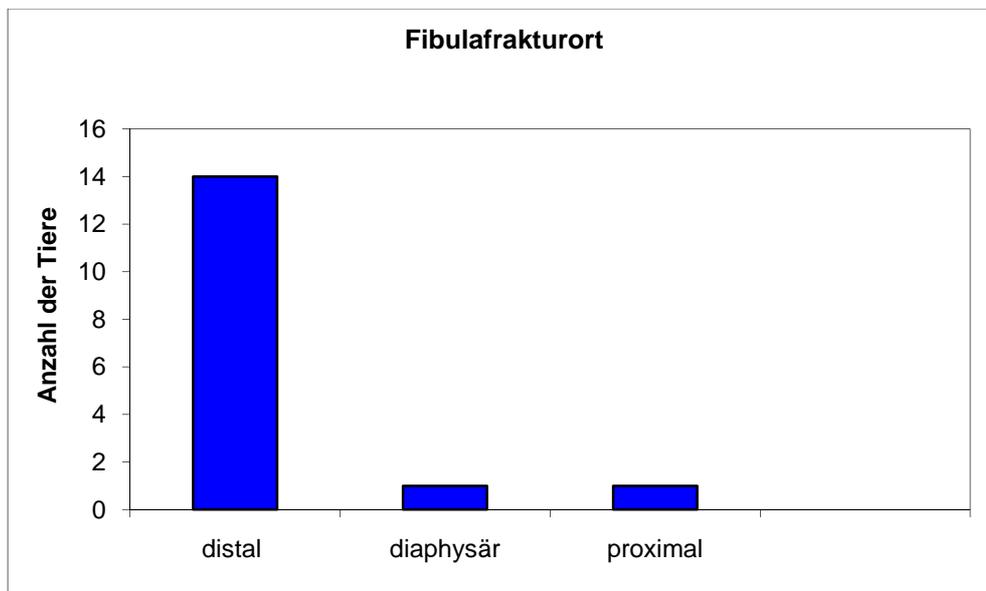
Bei der radiologischen Auswertung ergab sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Stellung der beiden Tibiafragmente zueinander und einer intra- oder postoperativ entstandenen akzessorischen Fibulafraktur. Diese war bei 87,5% im distalen Fibuladrittel lokalisiert (Abb.6). Hier besteht eine Synostose mit der Tibia.

Ohne Fibulafraktur fand sich bei 94% der Knochen ein Winkel zwischen 140° und 170°, der somit als normaler Winkel anzunehmen ist. Einzig bei 3 von 50 Präparaten ohne Fibulafraktur zeigte sich ein Winkel zwischen 130° und 140°. Beim Vergleich der Gesamtheit aller untersuchten Knochen (Abb.5 blau) mit denen bei begleitender Fibulafraktur (Abb.5, rot) wird der Einfluss der Fibula auf die Knochenstatik und damit den Verlauf der Frakturheilung deutlich. Ein Winkel zwischen 140° und 170° wurde nur bei 5 von 16 Knochen mit begleitender Fibulafraktur gemessen. Bei den anderen 11 Präparaten führte die Fibulafraktur zu einem starken Abkippen des proximalen Frakturfragments gegenüber dem distalen Fragment. Insgesamt wurden 7 Knochen von den weiteren Tests ausgeschlossen, da bei diesen Präparaten der Winkel  $\leq 130^\circ$  war und somit von einer deutlich veränderten Knochenstatik ausgegangen werden muss.



**Abb.6: Darstellung des Achswinkels der Tibiafragmente.**

Der Achswinkel wurde radiographisch proximal vs. distal des Tibiafrakturspalts aller untersuchten Ratten (blau) und der Ratten mit gleichzeitiger akzessorischer Fibulafraktur (rot) ermittelt.



**Abb.7 : Darstellung der Lokalisation der akzessorischen Fibulafraktur von Ratten nach operativ durchgeführter Tibiafraktur**

Die abgebildeten Ergebnisse wurden radiographisch nach experimentell durchgeführter operativer Fraktur der Rattentibiae ermittelt.

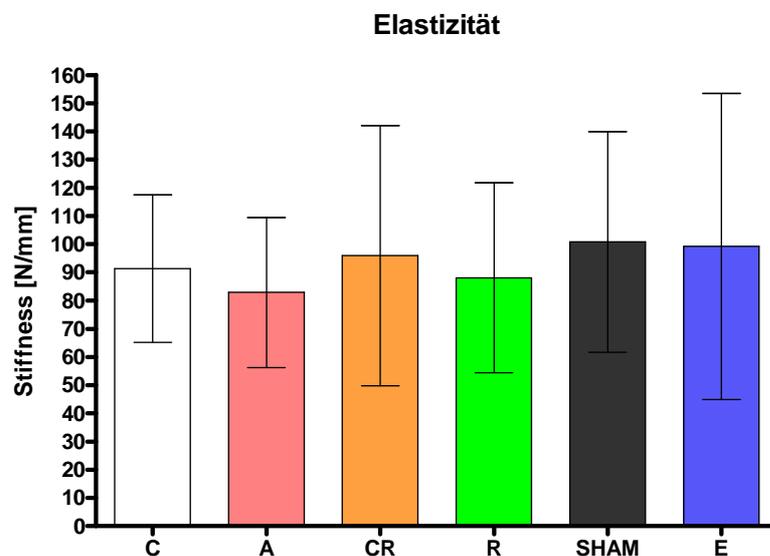
### 3.1.2 Ergebnisse des biomechanischen Kompressionstests

Um den Einfluss der Testsubstanzen Alendronat, Cimicifuga racemosa, Raloxifen und Östrogen im Futter miteinander zu vergleichen, wurde ein biomechanischer Kompressionstest durchgeführt. Abb.3 zeigt eine typische Bruchkurve.

Die Angaben der Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse folgen am Ende des Abschnittes in tabellarischer Form (siehe Tabelle 8). Im Folgenden wird ein  $p \leq 0,05$  als signifikant bewertet.

#### 3.1.2.1 Elastizität

Bestimmt wurden für jeden Knochen die Elastizität, welche der linearen Steigung des Graphen in Abb.3 entspricht, sowie die Streckgrenze (*yield load*), die dem Punkt der ersten elastischen Verformung entspricht.



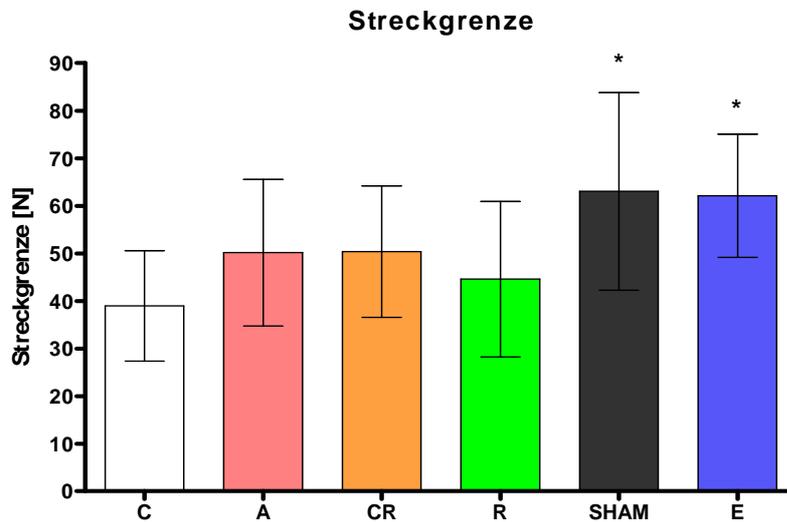
**Abb.8: Messergebnisse für den Parameter 'Elastizität'**

Die Ratten wurden nach operativ durchgeführter Tibiafraktur über einen Zeitraum von 35 Tagen mit Zusätzen von Alendronat (A), Cimicifuga racemosa (CR), Raloxifen (R), Östrogen (E) im Futter bzw. rein sojafreiem Futter (C= osteoporotische Kontrolle bzw. SHAM= gesundes Tier) behandelt und anschließend biomechanischen Tests unterzogen.

Der Parameter 'Elastizität' zeigt für die untersuchten Substanzen keine signifikanten Unterschiede zur osteoporotischen Kontrollgruppe (C). Es zeigen sich jedoch für die

Östrogen- und nicht osteoporotische Kontrollgruppe (SHAM) erwartungsgemäß die höchsten Mittelwerte. Die Alendronat-Gruppe hat mit  $50,14 \pm 15,41$  den geringsten Mittelwert.

### 3.1.2.2 Streckgrenze



**Abb.9: Messergebnisse für den Parameter 'Streckgrenze'**

Die Ratten wurden nach operativ durchgeführter Tibiafraktur mit Zusätzen von Alendronat (A), Cimicifuga racemosa (CR), Raloxifen (R), Östrogen (E) im Futter bzw. rein sojafreiem Futter (C+SHAM) über 35 Tage behandelt. Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung. (\*  $p \leq 0,05$  vs C)

Die Streckgrenze markiert den Punkt der ersten irreversiblen plastischen Verformung der Knochenstruktur der Tibia. Hier ergab sich für die mit Östrogen behandelte Gruppe sowie für die nicht osteoporotische Gruppe (SHAM) ein signifikanter Unterschied zur osteoporotischen Kontrollgruppe, jedoch nicht zu der mit Raloxifen behandelten Gruppe (Abb.9). Dabei wurde bei diesen Tieren der Punkt bis zur ersten irreversiblen Knochenstrukturänderung durch Biegunskräfte erst bei etwa 1,5-fachem Kraftaufwand im Vergleich zur osteoporotischen Kontrollgruppe (C) erreicht. Bei den mit Alendronat, Raloxifen und Cimicifuga behandelten Tieren ergaben sich lediglich höhere Mittelwerte, allerdings aufgrund der hohen Standardabweichungen keine signifikante Verbesserung des Wertes.

**Tab.10: Tabellarische Ergebnisse der biomechanischen Kompressionstests**

Gruppe	Steigung	Streckgrenze
C	91.29 ± 26.14	38,98 ± 11,62
SHAM	100,4 ± 39,58	66,38 ± 14,63 *
A	82,87 ± 26,56	50,14 ± 15,41
CR	95,93 ± 46,15	50,39 ± 13,81
R	88,05 ± 33,75	44,56 ± 16,35
E	99,19 ± 54,26	63,62 ± 12,70 *

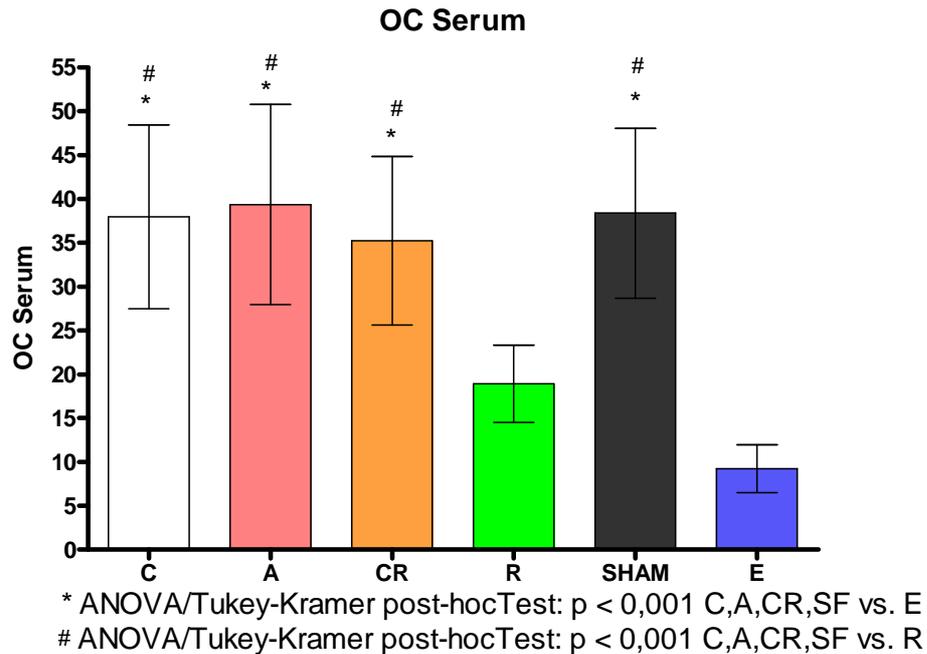
Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben.

\*  $p \leq 0,05$  vs. C

### 3.2 Auswertung der Serumanalyse

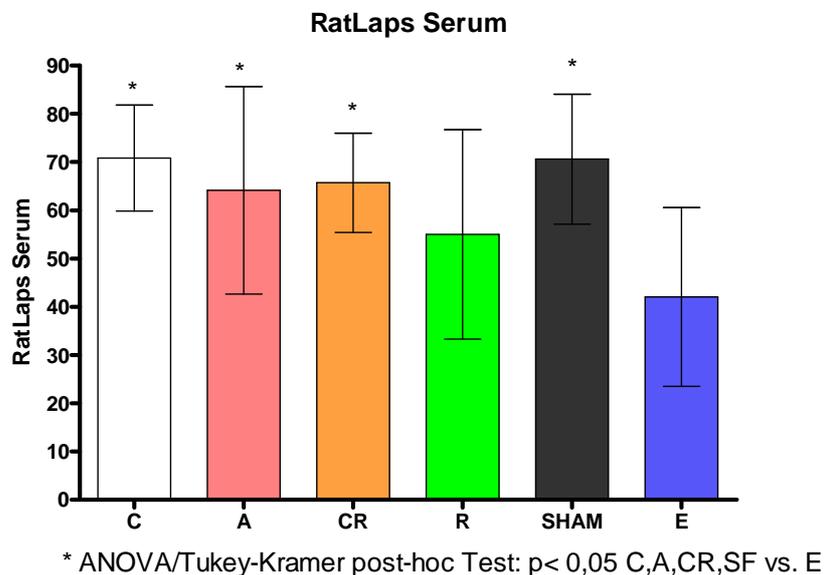
Die Serumwerte für Osteocalcin und Ratlaps spiegeln die Wirkung der Testsubstanzen auf das gesamte (osteoporotische) Skelett wider. Somit zeigen hohe Werte für beide Genexpressionen einen *high-turn-over*, niedrige Werte ein eher ruhendes Skelett an.

Bei der Auswertung der Serumwerte für Osteocalcin zeigten sich signifikante ( $p = 0,001$ ) Unterschiede sowohl zwischen der Östrogengruppe, als auch zwischen der Raloxifengruppe und allen anderen vier untersuchten Testgruppen (C, A, CR, SHAM). Dabei war das von den Osteoblasten in der Mineralisationsphase gebildete Osteocalcin, welches ein osteoanaboler Parameter ist, bei den mit Raloxifen und Östrogen behandelten Ratten hochsignifikant geringer im untersuchten Serum zu messen.



**Abb.10: Bestimmung der Serumkonzentration von Osteocalcin mittels Radioimmunoassay**

Die ovariectomierten Ratten wurden nach operativer Tibiafraktur über einen Zeitraum von 35 Tagen mit den verschiedenen Nahrungszusätzen Alendronat (A), Raloxifen (R), Cimicifiga racemosa (CR), Östrogen (E), sowie sojafreier Nahrung für die OVX- und SHAM-Gruppe behandelt.



**Abb.11: Bestimmung der Serumkonzentration von Ratlaps mittels Radioimmunoassay**

Die ovariectomierten Ratten wurden nach operativer Tibiafraktur über einen Zeitraum von 35 Tagen mit den verschiedenen Nahrungszusätzen Alendronat (A), Raloxifen (R), Cimicifiga racemosa (CR), Östrogen (E), sowie sojafreier Nahrung für die OVX- und SHAM-Gruppe behandelt.

Die Ratlaps sind bei der Knochenresorption entstehende Abbauprodukte des Typ-I-Kollagens und ein Serummarker für die Knochenresorption. Bei den Abbauprodukten des Kollagen Typ I zeigte die Östrogengruppe eine signifikante Erniedrigung im

Vergleich zu allen anderen untersuchten Gruppen, außer zur Raloxifengruppe. Bei den mit Östrogen behandelten Tieren waren diese isomerisierten Telopeptide signifikant geringer im Serum messbar.

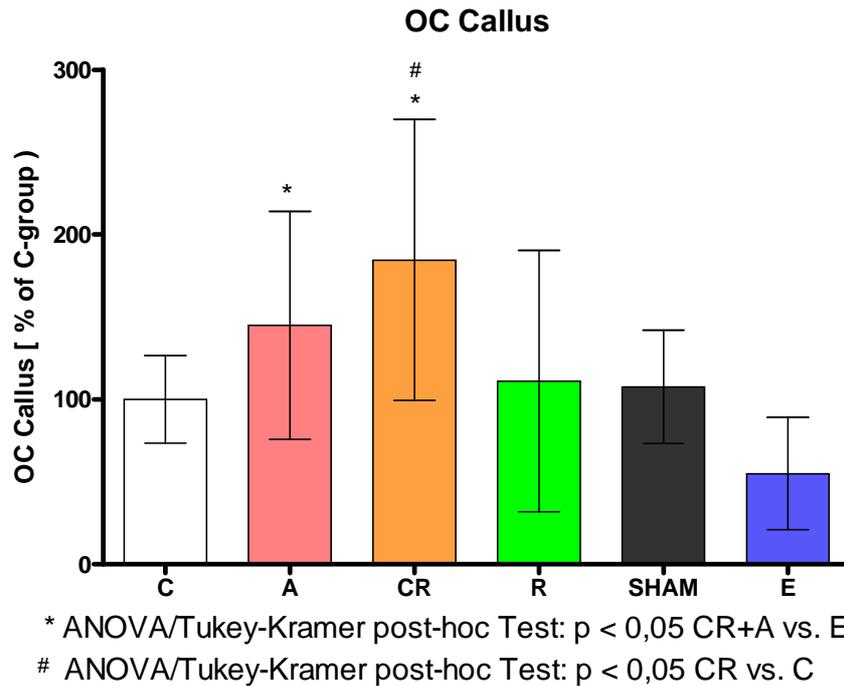
**Tab.11: Tabellarische Ergebnisse der Serumparameter Osteocalcin und RatLaps**

Gruppe	Osteocalcin	Ratlaps
C	37,96 ± 10,5	70,83 ± 11
A	39,36 ± 11,42	64,14 ± 21,5
CR	35,23 ± 9,61	65,72 ± 10,31
R	18,92 ± 4,4	54,99 ± 21,73
E	9,24 ± 2,73	42,06 ± 18,54
SHAM	38,38 ± 9,67	70,62 ± 13,46

Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben

### 3.3 Genexpression im metaphysären Kallus

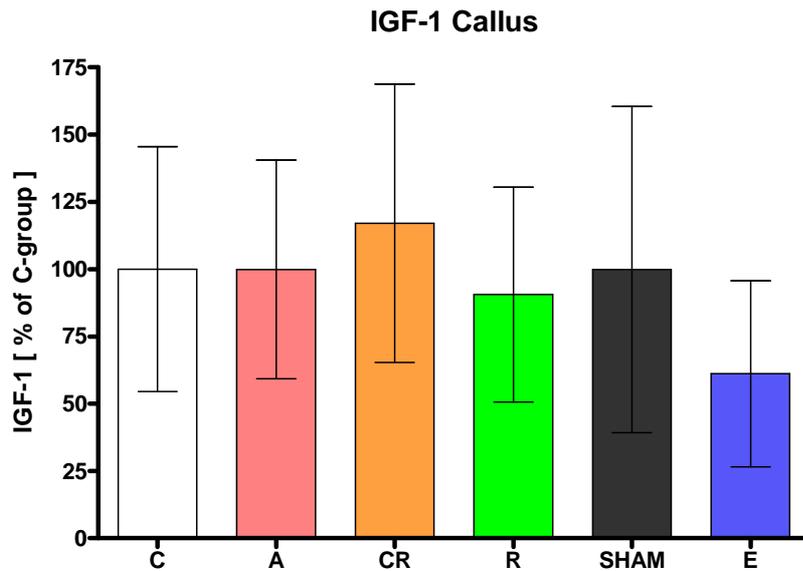
Die Induktion der Frakturheilung erfolgt durch ein Wechselspiel von Aktivierung und Deaktivierung von Genen, welche über eine Proteingeneration den Prozess der Heilung triggert. Als wesentliche Gene der Frakturheilung wurde in der vorliegenden Arbeit die Genexpression von Osteocalcin, IgF-1, ER $\alpha$ , Kollagen 1 $\alpha$ 1 und TRAP nach Fraktur in Abhängigkeit der verschiedenen Testsubstanzen untersucht. Bei den durch Real-Time RT-PCR gewonnenen Daten der Genexpression werden zunächst die Ergebnisse der Osteoblasten-Produkte wie Osteocalcin, IgF-1, ER $\alpha$  sowie Kollagen 1 $\alpha$ 1 ausgewertet, abschließend der für die Knochenresorption wichtige Marker TRAP.



**Abb.12: Bestimmung der Genexpression von Osteocalcin im Kallus mittels Real-Time PCR**

Die ovariectomierten Ratten wurden nach operativer Tibiafraktur über einen Zeitraum von 35 Tagen mit den verschiedenen Nahrungszusätzen Alendronat (A), Raloxifen (R), Cimicifuga racemosa (CR), Östrogen (E), sowie sojafreier Nahrung für die OVX- und SHAM-gruppe behandelt und anschließend aus dem neu gebildeten metaphysären Kallus Gewebeproben entnommen.

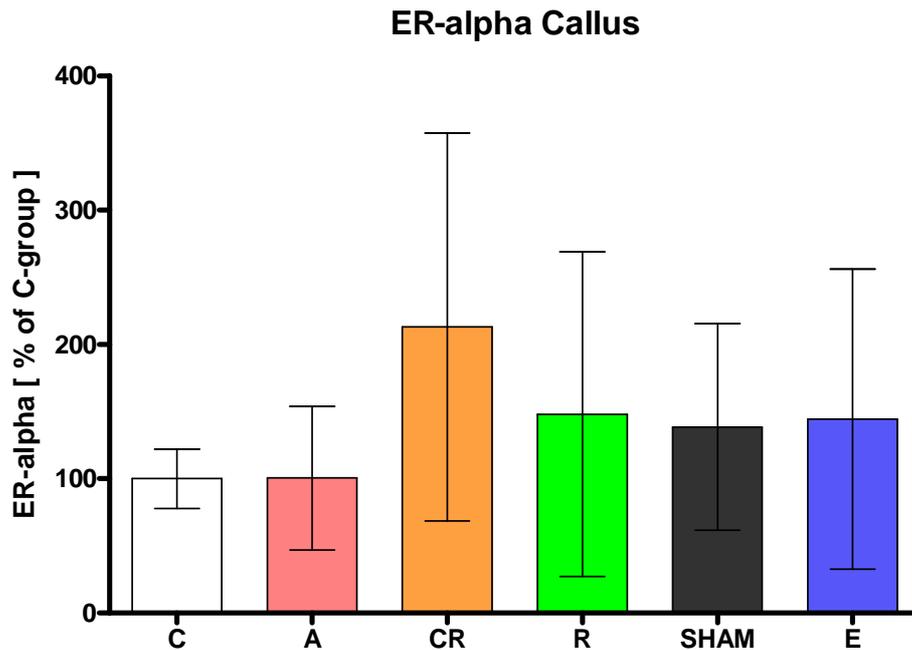
Bei der Bestimmung der Genexpression von Osteocalcin im Kallus zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Cimicifuga-Gruppe und der osteoporotischen Kontrollgruppe (C), sowie ein signifikanter Unterschied von Cimicifuga zu Östrogen. Die mit Cimicifuga racemosa gefütterten Tiere exprimierten dabei annähernd die doppelte bzw. dreifache Menge an Osteocalcin im Kallus. Desweiteren bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Alendronat- und Östrogengruppe. Alendronat führte hierbei zu einer doppelt so hohen Osteocalcingenexpression verglichen mit den mit Östrogen behandelten Tieren. Die Genexpression von Osteocalcin ist ein Zeichen für eine gesteigerte Aktivität der Osteoblasten. Es ist deshalb anzunehmen, dass die Osteoblastenaktivität zum untersuchten Zeitpunkt, 35 Tage nach Ovariectomie und induzierter Tibiafraktur, bei den mit Cimicifuga racemosa und Alendronat behandelten Tieren deutlich höher ist als bei den Tieren der Kontrollgruppe, sowie vor allem bei den Tieren, die mit Östrogen als Futterzusatz behandelt wurden.



**Abb.13: Bestimmung der Genexpression von IgF-1 im Kallus mittels Real-Time PCR**

Die ovariectomierten Ratten wurden nach operativer Tibiafraktur über einen Zeitraum von 35 Tagen mit den verschiedenen Nahrungszusätzen Alendronat (A), Raloxifen (R), Cimicifuga racemosa (CR), Östrogen (E), sowie sojafreier Nahrung für die OVX- und SHAM-gruppe behandelt und anschließend aus dem neu gebildeten metaphysären Kallus Gewebeproben entnommen.

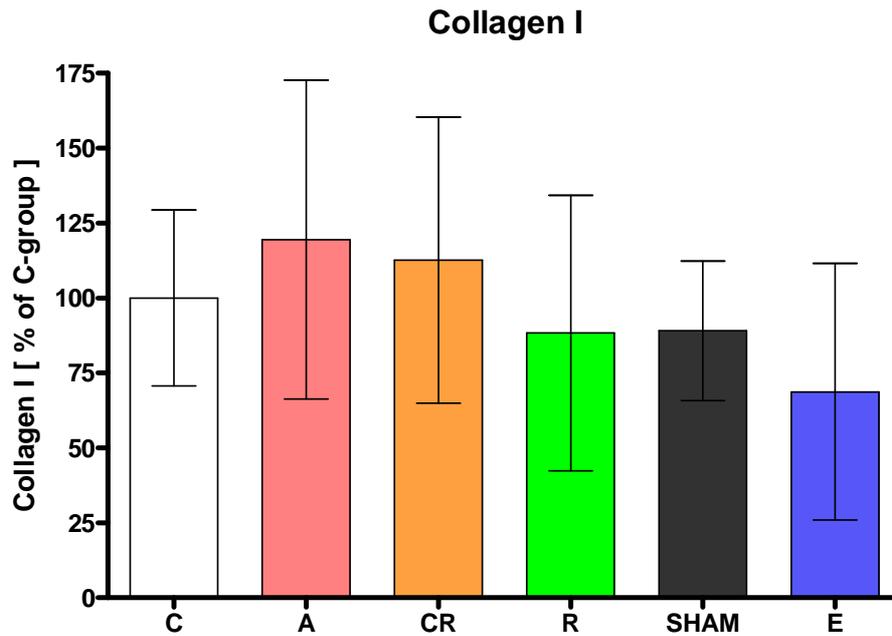
IGF-1 gilt neben Osteocalcin als biochemischer Marker für die Osteoblastenaktivität. Es ergeben sich für die Genexpression von IGF-1 im neu gebildeten Kallus keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dies kann zum Teil auch auf die hohe Standardabweichung zurückgeführt werden. Bemerkenswert ist aber, dass auch hier der Mittelwert der Östrogengruppe am geringsten und der der Cimicifuga-Gruppe am höchsten ist.



**Abb.14: Bestimmung der Genexpression von ER $\alpha$  im Kallus mittels Real-Time PCR**

Die ovariectomierten Ratten wurden nach operativer Tibiafraktur über einen Zeitraum von 35 Tagen mit den verschiedenen Nahrungszusätzen Alendronat (A), Raloxifen (R), Cimicifuga racemosa (CR), Östrogen (E), sowie sojafreier Nahrung für die OVX- und SHAM-gruppe behandelt und anschließend aus dem neu gebildeten metaphysären Kallus Gewebeproben entnommen.

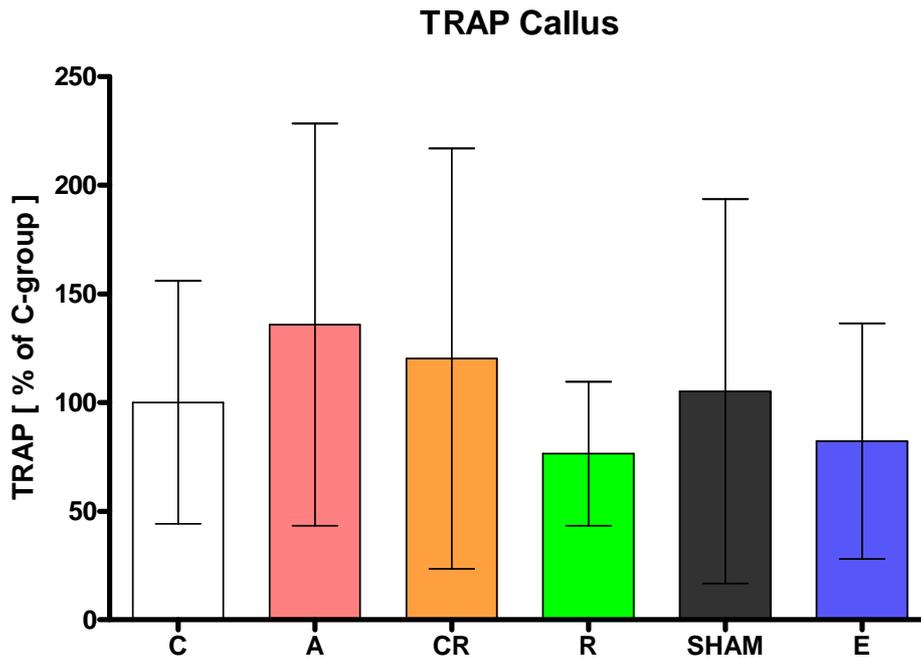
Der Östrogenrezeptor  $\alpha$  vermittelt die Östrogenwirkung auf die Knochenzellen. Knochen, besonders solche mit trabekulären Strukturen, werden durch die An- oder Abwesenheit von Östrogenen in hohem Maße beeinflusst. In unseren Untersuchungen ergaben sich auch für die Genexpression des Östrogenrezeptors  $\alpha$  aufgrund der hohen Standardabweichungen keine signifikanten Unterschiede. Wiederum zeigt die Cimicifuga-Gruppe einen mehr als doppelt so hohen Mittelwert im Vergleich zur osteoporotischen Kontrollgruppe (C). Alendronat (A), welches nicht ER $\alpha$  adressiert, zeigt ebenso niedrige Werte wie die osteoporotische Kontrollgruppe (C).



**Abb.15: Bestimmung der Genexpression von Kollagen 1 $\alpha$ 1 im Kallus mittels Real-Time PCR**

Die ovariectomierten Ratten wurden nach operativer Tibiafraktur über einen Zeitraum von 35 Tagen mit den verschiedenen Nahrungszusätzen Alendronat (A), Raloxifen (R), Cimicifuga racemosa (CR), Östrogen (E), sowie sojafreier Nahrung für die OVX- und SHAM-gruppe behandelt und anschließend aus dem neu gebildeten metaphysären Kallus Gewebeproben entnommen.

Kollagen 1 $\alpha$ 1 ist ebenfalls ein Osteoblasten-Produkt und damit ein Maß für ihre Aktivität. Auch beim Kollagen 1 $\alpha$ 1 ergaben sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Wie bei Osteocalcin, IgF-1 und ER  $\alpha$  führte der Östrogengzusatz zu einer erniedrigten Genexpression in den Kalluszellen der Rattentibia. Raloxifen als SERM zeigt, wie SHAM, vergleichsweise niedrige Werte.



**Abb.16: Bestimmung der Genexpression von TRAP im Kallus mittels Real-Time PCR**

Die ovariectomierten Ratten wurden nach operativer Tibiafraktur über einen Zeitraum von 35 Tagen mit den verschiedenen Nahrungszusätzen Alendronat (A), Raloxifen (R), Cimicifuga racemosa (CR), Östrogen (E), sowie sojafreier Nahrung für die OVX- und SHAM-gruppe behandelt und anschließend aus dem neu gebildeten metaphysären Kallus Gewebeproben entnommen.

Die saure Knochenphosphatase ist knochenspezifisch und wird zur Knochenresorption freigesetzt. Erhöhte Werte des in der Osteoklastenmembran vorkommenden osteokatabolen Enzyms spiegeln somit eine vermehrte Osteoklastenaktivität wider. Für die Expression dieses Knochenabbaumarkers Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) ergaben sich bei der Auswertung der Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede. Die höchsten Werte zeigten die Cimicifuga- und Alendronat-Gruppen, während Raloxifen und Östrogen nur eine geringe Genexpression von TRAP induzierten.

**Tab.12: Ergebnisse der Genexpression**

Gruppe	Osteocalcin	IGF-1	ER- $\alpha$	TRAP	Kollagen I
C	100 $\pm$ 26,53	100 $\pm$ 45,48	100 $\pm$ 22,18	100 $\pm$ 55,89	100 $\pm$ 29,4
SF	107,5 $\pm$ 34,47	99,85 $\pm$ 60,61	138,3 $\pm$ 76,87	105,2 $\pm$ 88,57	89,03 $\pm$ 23,33
A	144,9 $\pm$ 69,13	99,94 $\pm$ 40,60	100,4 $\pm$ 53,48	135,8 $\pm$ 92,65	119,5 $\pm$ 53,21
R	111,1 $\pm$ 79,32	90,53 $\pm$ 39,93	147,9 $\pm$ 120,8	76,42 $\pm$ 33,07	88,31 $\pm$ 45,93
CR	184,5 $\pm$ 85,17	117 $\pm$ 51,66	212,8 $\pm$ 144,3	120,2 $\pm$ 96,74	112,7 $\pm$ 47,76
E	54,92 $\pm$ 34,11	61,16 $\pm$ 34,58	144,2 $\pm$ 111,6	82,25 $\pm$ 54,22	68,73 $\pm$ 42,87

Die dargestellten Werte beziehen sich jeweils auf die Genexpression von OC, IGF-1, ER- $\alpha$ , TRAP und Kollagen-1 $\alpha$ 1 der osteoporotischen Kontrollgruppe (=100)  
Darstellung der Werte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

---

## 4 Diskussion

---

Die Osteoporose ist eines der größten und folgenschwersten Probleme der Östrogenmangel-bedingten Erkrankungen der postmenopausalen Frau. Dabei stellen die osteoporotisch bedingten Frakturen sowohl für den Chirurgen als auch für die Patientinnen nach wie vor ein noch nicht adäquat gelöstes Problem dar. Es gibt zwei Überlegungen und Möglichkeiten, den in dieser Arbeit untersuchten Heilungsprozess der osteoporotischen Fraktur zu verbessern: einerseits die stetige Weiterentwicklung und Verbesserung von neuartigen Implantaten, um eine bessere Verankerung im destruierten osteoporotischen Knochen zu erzielen, sowie andererseits die Veränderung der Knochensubstanz und Knochenqualität mit Hilfe einer medikamentösen Therapie, um die Kallusbildung zu beschleunigen und zu verbessern. Diese Arbeit beschäftigte sich mit der zweiten Möglichkeit. Das neu entwickelte und biomechanisch stabile metaphysäre Osteotomie-Modell, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, beruht auf einer metaphysären Miniplatten-Osteosynthese bei einer osteopenischen Ratte. Es bietet die Möglichkeit, verschiedene Substanzen in Bezug auf deren Einfluss auf die Frakturheilung im osteoporotischen Knochen zu untersuchen.

### 4.1 Die Ratte als Osteoporosemodell

Die Erforschung der Osteoporose beim Menschen unterliegt zahlreichen Einschränkungen. So ist z.B. die Möglichkeit der Untersuchung einer homogenen Patientengruppe über einen ausreichend langen Zeitraum meistens nicht möglich. Durch die sorgfältige Auswahl eines der jeweiligen Fragestellung angepassten Tiermodells können diese Probleme teilweise überwunden werden. Es bietet sich die Möglichkeit, große homogene Gruppen von Tieren zusammenzustellen und externe Einflüsse weitgehend auszuschalten. Weiterhin kann der Untersuchungszeitraum durch die Induktion von osteoporotischen Veränderungen am Knochen der Ratte erheblich verkürzt werden (Turner 2001).

Zahlreiche Tierarten wie zum Beispiel Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen, Hunde und Schafe werden für die Erforschung der Osteoporose eingesetzt. Dennoch ist mit keinem der Modelle die Ätiologie der Osteoporose beim Menschen exakt widerzuspiegeln. Das Modell der ovariectomierten Ratte ist als ein Modell für die postmenopausale Osteoporose im Menschen weltweit anerkannt (Baron et al. 1984;

Wronski et al. 1985; Kimmel et al. 1990; Kalu 1991; Mosekilde et al. 1993; Thompson et al. 1995; Li M et al. 1997). Es ist wegen seiner guten Praktikabilität, einer allgemeinen Akzeptanz und eines hohen Wissenstandes in Bezug auf seine Einsetzbarkeit für medizinische Fragestellungen das am meisten verwendete Tiermodell und wurde auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Es sind bereits zahlreiche Untersuchungen über die Vergleichbarkeit der Osteopenie ovariectomierter Ratten mit der postmenopausalen Osteoporose durchgeführt worden, und es ist festgestellt worden, dass der durch die Ovariectomie induzierte Knochenverlust der Ratte in vielen Punkten den Umbauprozessen des Knochens im menschlichen Klimakterium gleicht (Kalu 1991). Es kommt sowohl bei der postmenopausalen Frau, als auch bei der ovariectomierten Ratte unter Östrogenmangel zu einem erhöhten Knochenumbau, wobei die Knochenresorption die Knochenneubildung übertrifft. Da sowohl die Osteoblasten, als auch die Osteoklastenaktivität erhöht ist, spricht man von einer *high-turn-over-Osteoporose*. In ovariectomierten Ratten wird ein biphasischer Verlauf des Knochensubstanzverlustes im Femur (Yamazaki and Yamaguchi 1989; Li M et al. 1997), in der proximalen Tibiametaphyse (Wronski et al. 1989 b) und in den Wirbeln (Wronski et al. 1989 a; Mosekilde 1993) beobachtet. An der Tibia ist er gekennzeichnet durch eine schnelle Anfangsphase mit dem größten Knochenmasseverlust (0,82% pro Tag). Diese Phase dauert 3 Monate, gefolgt von einer 5-6 Monate anhaltenden Plateauphase der Stabilisierung und einer letzten Phase mit langsamem Knochenmassenverlust (0,08% pro Tag) (Wronski et al. 1989 b). Auch bei postmenopausalen Frauen verläuft der Knochensubstanzverlust in der ersten Zeit nach der Menopause zunächst schnell, gefolgt von einer langsameren Phase (Riggs und Melton 1986; Stepan et al. 1987). Beiden Spezies gemein ist ebenfalls die Tatsache, dass der Knochenverlust in der Spongiosa größer ist als in der Kortikalis und dass dieser Knochenverlust in den Wirbelkörpern stärker hervortritt als in den langen Röhrenknochen. Die Entwicklung einer Osteopenie bei Ratten ist besonders deutlich an Knochen mit einem hohen Anteil an Spongiosa zu beurteilen, z.B. an der Tibia (Wronski et al. 1986; Da Paz et al. 2001; Kavuncu et al. 2003) oder am Femur (Kimmel et al. 1990; Geusens et al. 1990). Dabei ist das Spongiosavolumen der proximalen Tibiametaphyse fünf Wochen nach einer Ovariectomie im Vergleich zur Kontrolle halbiert (Wronski et al. 1985; Faugerer et al. 1986; Frost et al. 1992). Histologisch zeigten sich in diesen Untersuchungen Osteoklasten und Osteoblasten, die in ihrer Anzahl vermehrt und

größer waren als im gesunden Knochengewebe. Daraus lässt sich schließen, dass Knochenresorption und Knochenaufbau nach Ovariectomie in stärkerem Umfang stattfinden. Dass trotz dieses erhöhten Ab- und Aufbaus von Knochengewebe das Spongiosavolumen abnimmt, ist außerdem ein Hinweis darauf, dass der Knochenumsatz zugunsten des Abbaus verschoben ist (Wronski et al. 1986; Roudebush et al. 1993; Dempster et al. 1995; Thompson et al. 1995). Ein ähnlicher Mechanismus wird für die Entstehung der postmenopausalen Osteoporose bei der Frau vermutet (Heaney et al. 1978).

Auch vergleichende Studien von Serum- und Harnparametern bestätigen, dass die Veränderungen, die bei Mensch und Tier durch den Östrogenmangel hervorgerufen werden, Parallelen zwischen den Species aufweisen. Weitere Vorteile des Rattenmodells sind die vielen Ähnlichkeiten des Rattenskeletts mit dem menschlichen (z.B. lamelläre Knochenaufbau, Remodeling in den Spongiosaanteilen).

Neben den oben dargestellten Vorteilen der Ratte als Osteoporosemodell, gibt's es jedoch andererseits auch Unterschiede zwischen dem menschlichen Knochenstoffwechsel und dem der Ratten (z.B. geringeres intrakortikales Remodeling) (Li und Mosekilde, 1995).

## **4.2 Metaphysäres Osteotomie-Modell**

Beim Menschen sind die osteoporotischen Frakturen vorwiegend in der Wirbelsäule und den Metaphysen der langen Röhrenknochen, also im distalen Radius, dem proximalen Femur und dem proximalen Humerus lokalisiert. Bis jetzt wurde die Frakturheilung in normalen und osteoporotischen Knochen lediglich im diaphysären Knochenanteil beschrieben (Kubo et al. 1999; Li J et al. 2000; Schmidmaier et al. 2001; Cao et al. 2002; Hatano et al. 2004). Modelle und Studien mit einer metaphysären Knochenheilung existieren kaum, und wurden, wenn überhaupt, meist nur am gesunden Knochen und nicht am osteoporotischen Knochen untersucht. Sie wurden bei der Ratte als „pullout trial“ (Aspenberg et al. 2008), beim Schaf als partielle Osteotomie (Claes et al. 2009), beim Kaninchen als Defektheilung (Morgan et al. 2008) oder unter einer wechselnden biomechanischen Stabilität (Tsiridis et al. 2007) durchgeführt. Die Aufgabe des hier verwendeten metaphysären Osteotomie-Modells ist es, von Beginn der Frakturheilung der Tibiametaphyse an für eine stabile biomechanische Fixierung der Fragmente zu sorgen, um auf diese Weise eine

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Testsubstanzen zu erzielen. Dafür wurde eine 5-Loch T-Platte mit konvergierenden Schrauben in der Epiphyse der Tibia fixiert. Dabei ist zu beachten, dass die biomechanische Stabilität der Tibia nicht nur von der Fixierung derselben durch die T-Platte abhängt, sondern die Intaktheit der Fibula ebenfalls eine wichtige Rolle spielt. Fibula und T-Platte bilden zwei Säulen, die den Osteotomie-Spalt dreidimensional stabilisieren. Wenn dieser stabilisierende Faktor der Fibula wegfällt, kommt es zu einer andersartigen Frakturheilung des metaphysären Tibiaspalt, gekennzeichnet durch Instabilität und unterschiedliche Kallusformation. Teilweise wachsen die Fragmente nicht einmal zusammen. Aus diesem Grund wurden in den vorliegenden Untersuchungen einige Knochen nicht weiter untersucht und wegen ihrer ungleichen biomechanischen Ausgangsbedingungen ausgeschlossen. Es ist davon auszugehen, dass die beschriebene biomechanische Instabilität die Frakturheilung derart beeinflusst, dass eine Auswertung und Analyse der untersuchten antiosteoporotischen Effekte der Testsubstanzen nicht adäquat durchführbar ist und die Einflüsse kaschiert werden. Eine große biomechanische Stabilität, wie sie in diesem Modell bei intakter Fibula anzutreffen ist, äußert sich mit vornehmlich endostaler Knochenheilung bei gleichzeitiger wesentlich geringerer periostaler Heilung. Dies ist typisch für die Frakturheilung der Metaphyse bei stabilen Bedingungen. Claes et al. beschrieben im Jahr 1997 dagegen eine deutlich erkennbare Beschleunigung der periostalen Kallusformation bei instabilen Verhältnissen.

Die Untersuchung eines metaphysären Osteotomie-Modells hat im Vergleich zum diaphysären Modell der Tibia oder des Femur der Ratte einige Vorteile. Die Mechanismen der Frakturheilung in der Metaphyse unterscheiden sich von denen in der Diaphyse. In der Diaphyse kommt es hauptsächlich zu einer periostalen Kallusbildung, während der metaphysäre Knochen bei der Frakturheilung im Wesentlichen endostal heilt, bei nur geringer periostaler Kallusbildung. Bei den hier untersuchten Tieren kam es aufgrund der gewählten Osteosyntheseplatte und des 1mm großen Frakturspalt ebenfalls zu einer nur geringen periostalen Kallusbildung. Die klinisch relevanten Frakturen des Menschen bei Osteoporose finden typischerweise in den Metaphysen statt, da die Osteoporose diese auf eine andere Weise und in einem größeren Ausmaß als den diaphysären Knochen betrifft. Wronski et al. konnten im Jahr 1985 zeigen, dass die Knochenmineraldichte im metaphysären Tibiaknochen der Ratte nach drei Monaten bis zu 50% niedriger ist

und damit wesentlich geringer als im diaphysären Knochen (Blythe und Buhsbaum 1976). Beim metaphysären Knochen kommt es zu einem Abbau der trabekulären Struktur, während es bei der diaphysären Knochenheilung zu einer kompensatorischen Verbreiterung des Knochendurchmessers kommt, um der Verdünnung des kortikalen Knochens entgegenzuwirken. Daraus folgt, dass die Effekte auf die Diaphyse im Vergleich zur Metaphyse wesentlich geringer sind, was sich auch in verschiedenen Studien gezeigt hat, in denen die gemessene diaphysäre biomechanische Stabilität nicht so hoch war wie erwartet (Danielsen et al. 1993; Aerssens et al. 1996; Rahn 1976; Ohishi et al. 1998).

Das hier verwendete metaphysäre Frakturmodell der Ratte beruhte auf einem standardisierten 0,5 mm großen Frakturspalt. Um die Wirkungen der Testsubstanzen auf die Heilungsprozess und die Kallusbildung untersuchen und beurteilen zu können, war es wichtig, einen gleichbleibend definierten Bereich, in diesem Fall den 0,5 mm breiten Frakturspalt, zu haben. Es ist bekannt, dass ein kleiner Frakturspalt (= 2mm) eine bessere Frakturheilung gewährleistet als ein größerer (Claes et al. 1997; Iwaniec et al. 2007).

Die Dauer von 5 Wochen nach Osteotomie wurde für diese Untersuchung gewählt, da nach 5 Wochen die Frakturheilung im Gegensatz zu vorausgegangenen Untersuchungen noch nicht abgeschlossen gewesen ist, sondern der Heilungsprozess noch in Gange war (Blythe et al. 1976).

### **4.3 Auswertungsverfahren**

Die Fraktur gilt als das entscheidende Kennzeichen der Osteoporose. Sie ist das Ergebnis eines physikalischen Stabilitätsverlustes des Knochens durch verschiedene Ursachen. Daher sind biomechanische Tests in der Osteoporoseforschung essentiell, da nur so eine Aussage über die physikalische Stabilität, d.h. die biomechanische Qualität eines Knochens gemacht werden kann. Diese sind bereits etabliert und wurden bisher an diaphysären Tibiae, Femora und speziell präparierten Lendenwirbelkörpern untersucht (Ikeda et al. 2001; Chachra et al. 2000; Tezval et al. 2009; Sehmisch et al. 2009 b). Sie bezogen sich allerdings alle auf den diaphysären Teil des osteoporotischen Knochens, während sie sich in der vorliegenden Untersuchung auf den metaphysären Anteil bezogen. Zur Genauigkeit der ermittelten biomechanischen Ergebnisse ist festzuhalten, dass durch die individuelle Fixierung eines jeden einzelnen Tibiaknochens versucht wurde, die individuellen anatomischen

Unterschiede der einzelnen Unterschenkel der Ratten zu berücksichtigen- das manuelle Beenden der Tests und die exakte Lage der Stempelrolle auf dem metaphysären zusammengeheilten Frakturspalt aber die, im Rahmen des durch menschliches Ermessen vorkommenden Schwankungen und Unterschiede aufweist. In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse der biomechanischen Untersuchungen an metaphysären Rattentibiae durch die aus dem Blut gewonnenen Serummarker Osteocalcin und Ratlaps, und den gemessenen Werten der Genexpression von Osteocalcin, IGF-1, ER-alpha, Kollagen 1, sowie TRAP aus dem metaphysären Kallus ergänzt. Die Knochenumbaumarker dienen der Beschreibung der Knochenumbauvorgänge und bieten so die Möglichkeit eines Einblicks in die Dynamik des Knochenstoffwechselgeschehens. Sie haben sich in Studien als ein unabhängiger Risikofaktor für Frakturen erwiesen (Jamal et al. 2005; Brown et al. 2005). Sie sind osteoblasten- bzw. osteoklastenspezifisch (siehe 1.3.4.) und können so eine sinnvolle ergänzende Aussage zu den durch die Wirkung der Testsubstanzen auf die metaphysäre Frakturheilung erzielten biomechanischen Ergebnissen liefern. Allerdings lassen die mangelnde Standardisierung dieser Parameter unter klinischen Alltagsbedingungen und die fehlende Evaluation im Kontext mit anderen Risikofaktoren eine generelle Empfehlung für den Einsatz der laborchemischen Knochenstoffwechselfparameter in der Routinediagnostik noch nicht zu (DVO 2006). Veränderungen des Knochenstoffwechsels sind nicht spezifisch für eine bestimmte Erkrankung, sondern reflektieren eher Veränderungen im Stoffwechsel des gesamten Skeletts, unabhängig von der zugrundeliegenden Ursache (Seibel 2005). Bei der Frakturheilung sind die Osteoblasten und Osteoklasten maximal aktiviert, sodass eine zusätzliche lokale Stimulation dieser Zellen durch einen externen Faktor als gering anzunehmen ist. Dies zeigt sich auch in den Versuchen, die in dieser Arbeit beschrieben werden. Auch weisen die meisten Knochenmarker eine hohe, nichtspezifische Variabilität auf, der verschiedene Ursachen zugrunde liegen. Während präanalytische und analytische Faktoren wie zum Beispiel Entnahmezeitpunkt der Proben (circadiane Rhythmik), Beachtung der UV-Licht- und Temperaturempfindlichkeit einiger Marker, Wahl des Analyseverfahrens und technische Ausführung im Vorfeld berücksichtigt werden müssen, sind biologische Ursachen der Variabilität häufig unveränderbar (z.B. Alter, Geschlecht, Zyklusstadium, Jahreszeit, andere skelettale Erkrankungen).

## 4.4 Einfluss der Testsubstanzen auf die Frakturheilung

### 4.4.1 Estradiol

Die Unterdrückung des Knochensubstanzverlustes durch 17 $\beta$ -Estradiol wurde in mehreren Studien anhand des Tiermodells der ovariectomierten Ratte nachgewiesen (Wronski et al. 1988; Schmidt et al. 2000; Da Paz et al. 2001; Anderson et al. 2002; Kavuncu et al. 2003). Auch Taxel et al. konnten im Jahr 2008 zeigen, dass Östrogen bereits nach kurzer Applikationsdauer die Osteoklastogenese vermindert und somit die Pathogenese der Osteoporose entscheidend beeinflussen kann. 17 $\beta$ -Estradiol wurde aufgrund seiner nachgewiesenen osteoanabolen Wirkung in dieser Studie neben der SHAM-Gruppen zur Positivkontrolle eingesetzt.

In den biomechanischen Tests erzielte die Östrogengruppe erwartungsgemäß bessere Ergebnisse als die Negativkontrollgruppe (C). Neben höheren Mittelwerten beim Parameter Elastizität wurden signifikant höhere Ergebnisse bei der Streckgrenze gemessen. Die Ergebnisse zeigten annähernd dieselben Werte wie die der SHAM-Gruppe, die keiner Ovariectomie unterzogen worden war. Auch die Ergebnisse der Blutwerte und der Genexpression spiegeln beim Östrogen die erwarteten Ergebnisse wider. Die hohe Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität, die für die sogenannte *high-turn-over*-Osteoporose bei der postmenopausalen Osteoporose verantwortlich gemacht wird, entsteht auch bedingt durch das Fehlen der ovariellen Hormone, hauptsächlich dem Östrogen. So sind die signifikant niedrigeren Werte für Osteokalzin und Ratlaps im Serum, sowie die Downregulation aller gemessenen Genexpressionen mit einer Suppression der Osteoblasten und Osteoklasten durch die Östrogentherapie zu erklären.

Insgesamt lässt sich durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sagen, dass eine Applikation von 17 $\beta$ -Estradiol die Frakturheilung im Vergleich zur osteoporotischen Kontrollgruppe und zu anderen getesteten Substanzen deutlich verbessert und neben der bereits bekannten antiosteoporotischen Wirkung ein positiver Effekt auf die Frakturheilung beim osteopenischen Knochen festzustellen ist (Stürmer et al. 2009).

#### **4.4.2 Raloxifen**

Das zu der Gruppe der Östrogenrezeptormodulatoren gehörende Raloxifen ist seit mehreren Jahren als Klasse-A Medikament zur Behandlung postmenopausaler Osteoporose zugelassen (DVO 2006). Seine positive Wirkung auf den Knochenstoffwechsel konnte anhand von Tierversuchen (Stürmer et al. 2006; Folwarczna et al. 2007) sowie in klinischen Studien belegt werden (Dane et al. 2007).

In den biomechanischen Versuchen im Rahmen dieser Arbeit hat Raloxifen die positiven Erwartungen erfüllen können. Sowohl bei dem Parameter der Elastizität, als auch bei der Streckgrenze konnte eine verbesserte Biomechanik im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Allerdings drückten sich diese nur durch deutlich erhöhte Mittelwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe aus, und es wurden aufgrund der hohen Standardabweichung keine signifikanten Unterschiede erreicht. Bei den Serumwerten konnte ähnlich zum Östrogen eine Erniedrigung der Knochenstoffwechselmarker gemessen werden. Das Osteocalcin war signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie zu den Alendronat-, CR- und SHAM-Tieren. Bei den Ratlaps waren die Mittelwerte deutlich geringer. Sowohl Osteocalcin, als auch Ratlaps erreichten allerdings nicht das Niveau der Östrogengruppe. Diese Effekte können auf die östrogenartige Wirkung des Raloxifens am Knochen zurückzuführen sein. Bei den Genexpressionen im Kallus zeigten sich bei Raloxifen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. Sie lagen bei OC und IGF-1 im Niveau, bei ER-alpha darüber und bei Kollagen-I und TRAP leicht unter dem Niveau der ovariectomierten, osteoporotischen Tiere.

Nimmt man die biomechanischen Werte sowie die Ergebnisse der Knochenserummarker, so kann beim SERM Raloxifen durchaus ein positiver Effekt auf die Frakturheilung beim osteoporenschen Knochen beobachtet werden. Die osteoprotektiven Eigenschaften sind bei unseren Untersuchungen allerdings geringer, als die beobachteten Effekte des Estradiols auf die Knochenheilung.

#### **4.4.3 Alendronat**

Das Aminobisphosphonat Alendronat wird zu den antiresorptiven Substanzen in der Osteoporosetherapie gezählt. Der Wirkmechanismus beruht auf einer Hemmung von in Osteoklasten vorkommenden Proteinen, wodurch deren Fähigkeit zur Resorption von Knochensubstanz vermindert wird. Zu erwarten wäre also eine Verbesserung der Knochenbiomechanik bei reduzierten Knochenmarkern der Osteoklasten, in

unserem Versuch den Ratlaps, sowie der TRAP. Entgegen diesen Erwartungen und ähnlich zu den von Kolios et al. (2009) erhobenen Daten wurden allerdings keine signifikanten Unterschiede der Alendronatgruppe zur Kontrollgruppe erzielt. Bei der Elastizität und der TRAP wurden sogar verschlechterte bzw. erhöhte Werte im Vergleich zu den OVX-Tieren gemessen. Die Werte der Streckgrenze, den Serumparametern und den restlichen Genexpressionen lagen alle in etwa auf dem Niveau der Kontrollgruppe oder wichen lediglich geringfügig ab. Dieses schlechte Ergebnis der Alendronatgruppe könnte mit der Tatsache zu erklären sein, dass sich die Frakturheilung und Kallusbildung vermutlich unter Alendronattherapie verlangsamen. Die kurze Versuchsdauer von 5 Wochen könnte also dafür verantwortlich sein, dass die Werte des nachgewiesenermaßen antiosteoporotisch wirkenden Bisphosphonats Alendronat so schlecht ausgefallen sind. Alendronat könnte zwar langfristig die Stabilität osteoporotischer Knochen durch Hemmung der Osteoklasten beeinflussen, übt allerdings keinen positiven Effekt auf die Frakturheilung im osteopenischen Knochen aus. Diese reduzierte biomechanische Qualität und verringerte Elastizität stimmt mit klinischen Studien überein, bei denen es unter Alendronattherapie zu einer insuffizienten Frakturheilung von Femora gekommen ist (Goh et al. 2008; Neviaser et al. 2008). Eine weitere Erklärung für die schlechten Ergebnisse könnte eine Verringerung der Gewebheterogenität aufgrund der extremen Suppression des *bone-turn-overs* durch Alendronat sein, die eine Kalzifizierung und somit einem spröden Knochen nach sich zieht.

#### 4.4.4 *Cimicifuga racemosa*

Wuttke et al. konnten bereits 2003 in Tierversuchen eine antiosteoporotische Wirkung von *Cimicifuga racemosa* belegen. In weiterführenden Studien derselben Arbeitsgruppe wurde ebenfalls die osteoprotektive Wirkung mit gleichzeitigem geringem östrogentypischen Nebenwirkungsprofil in einer klinischen, doppelblinden Studie an 62 postmenopausalen Patientinnen beobachtet (Wuttke et al. 2006).

Die Analyse der hier gewonnenen Daten der mit *Cimicifuga racemosa* behandelten Tiere gestaltet sich schwierig. Bei den biomechanischen Tests zeigt sich lediglich eine geringfügige Verbesserung der Streckgrenze und der Elastizität im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Die Serumwerte für Osteocalcin und Ratlaps liegen im Bereich der osteoporotischen Tiere und bei den aus dem Kallus gewonnenen Genexpressionen ist, neben einer leichten Erhöhung der Werte für Kollagen I, IGF-1, TRAP und ER-alpha, eine

deutliche und signifikante Erhöhung des Osteoblastenparameters Osteokalzin festzustellen. Es besteht also anders als bei der Kontrollgruppe interessanterweise noch am 35.Tag ein Anstieg der Knochenstoffwechsellmarker. Dies könnte bedeuten, dass die Frakturheilung noch nicht abgeschlossen ist.

Insgesamt ist also beim Phytohormon CR in dieser Studie im Vergleich zur OVX-Gruppe kein positiver Effekt auf die Frakturheilung zu beobachten gewesen. Mögliche Ursachen könnten die kurze Applikationsdauer sowie die hier verwendeten zu geringen Dosierungen von CR sein. So wurde bei denen von Wuttke et al. (2003) beobachteten Ergebnissen eine wesentlich höhere Dosierung bei längerer Applikationsdauer verwendet.

#### **4.5 Kritische Betrachtung der Ergebnisse**

Die kritische Analyse der Messergebnisse und des Versuchsaufbaus ist im Hinblick auf das Erschließen neuer Therapie- und Prophylaxeoptionen bei der Behandlung der Osteoporose unerlässlich. So ist zum Beispiel die Applikationsdauer der untersuchten Substanzen von 5 Wochen im Vergleich zu anderen Studien anderer Arbeitsgruppen eher kurz (Picherit et al 2000; Wuttke et al. 2006; Mosekilde et al. 1998). Eine ausreichende Wirksamkeit der Antiosteoporotika ist möglicherweise deshalb nicht gewährleistet. Allerdings steht in dieser Versuchsanordnung ein prophylaktischer statt therapeutischer Ansatz im Bezug auf eine Verminderung der Knochenmasse und Knochenstruktur im Vordergrund, so dass die geringere Dauer der Versuche durchaus Sinn macht.

Die Versuchsanordnung der einzeitigen Durchführung der Ovariectomie und Osteotomie ist ebenfalls kritisch zu betrachten. Mit der Einzeitigkeit der Operationen wird in dem 35-tägigen Zeitraum lediglich das Modell einer beginnenden postmenopausalen Osteoporose erzeugt, jedoch nicht das einer manifesten. Die Wirkung der Prüfsubstanzen mag mehr oder weniger intensiv bei Applikation auf den osteoporotischen Knochen in Heilung sein. Der hier gewählte Ansatz konnte keine Aussage über einen Zusammenhang von physikalischen zu genanalytischen Messergebnissen machen. Eine Korrelation der Biomechanik zur Genexpression war in dieser Versuchsreihe nicht möglich. Am Beispiel von Östrogen und der SHAM-Gruppe zeigt sich z.B., dass der Aussagewert der untersuchten Genexpression in diesem Versuchsarm der Studie als gering einzustufen ist. Bei beidseits guten Ergebnissen in der Kallusqualität und guten biomechanischen Eigenschaften sind die

Werte der Genexpression eher gegenläufig. Bei Östrogen zeigen sich im Vergleich zur SHAM-Gruppe deutlich geringere Werte sowohl in der Genexpression der osteoblastären als auch der osteoklastären Marker. Auch die großen Standardabweichungen und die daraus resultierenden wenig signifikanten Unterschiede innerhalb der untersuchten Substanzen bei der Genexpression lassen eine wissenschaftliche Aussage über die genanalytischen Ergebnisse bei kurzer Applikationsdauer und Untersuchung der metaphysären Frakturheilung bei osteopenischen Ratten eher nicht zu.

Die untersuchten Serumparameter stehen bekanntermaßen eher für den Gesamtorganismus, also die Schwere des Knochenumbaus bzw. der Osteoporose, als für die lokale Frakturheilung.

Insgesamt ist somit in der Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse lediglich eine Aussage über die biomechanischen Eigenschaften dieses Modells zu machen. Eine Etablierung der Zusammensetzung des Versuchsansatzes mit einer genanalytischen, laborchemischen sowie biomechanischen Komponente allein scheint für die Zukunft nicht sinnvoll. Eine morphologische Analyse des Knochens könnte die Parameter 'Genexpression' und 'Biomechanik' zusammenbringen bzw. ihre Differenzen erklären.

---

## 5 Zusammenfassung

---

Die Osteoporose zählt zu einer der meist verbreiteten weltweiten Volkskrankheiten. In Anbetracht der demographischen Entwicklung in Form eines zunehmenden Alterns der Gesellschaft wird dieser Erkrankung und ihrer häufigsten klinischen Manifestation, der Fraktur, eine immer größere Bedeutung zukommen. Gerade im Hinblick auf die Senkung der Kosten für die Therapie der Osteoporose sind Prävention und Prophylaxe, aber auch Therapie und anschließende Rehabilitationsmaßnahmen entscheidende Faktoren. In der hier vorgelegten Arbeit wurde versucht, mit einem neu entwickelten metaphysären Osteotomiemodell eine Aussage über die Frakturheilung bei osteopenischen Bedingungen zu erzielen. Die Osteopenie in der Tibiametaphyse der ovariectomierten Ratte ist gut vergleichbar mit der Manifestation der Osteoporose beim Menschen im distalen Radius, der Hüfte oder im proximalen Humerus. Es hat sich gezeigt, dass dieses Modell für die Evaluation verschiedener Substanzen bei der Behandlung der postmenopausalen Osteoporose und ihrer Frakturheilung eine hohe Aussagekraft hat.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung geben einen deutlichen Hinweis, dass Östrogen und in etwas geringerer Weise auch Raloxifen die Frakturheilung im osteopenischen Knochen verbessern und insgesamt zu einer größeren Stabilität des Kallus führen. Die Kallusqualität im Bezug auf deren biomechanische Eigenschaften gleicht denen des gesunden Knochens, vertreten durch die SHAM-Gruppe. Für Alendronat und *Cimicifuga racemosa* konnte in dieser Studie dagegen kein eindeutiger Benefit im Bezug auf die Frakturheilung festgestellt werden. Die zusammenfassenden Aussagen beziehen sich auf die physikalischen Messergebnisse, da eine Korrelation der Biomechanik zu Serumparametern und Genexpression in dieser Versuchsreihe nicht möglich war.

Insgesamt ist in Zukunft mit einer Etablierung des metaphysären Osteotomiemodells die Möglichkeit gegeben, ausführliche Untersuchungen über den Nutzen diverser antiosteoporotischer Medikamente in der Frakturheilung beim osteopenischen Knochen zu erstellen.

## 6 Anhang

Tab.13: Gesamtübersicht Futter-/Gewichtsdokumentation

Ratten Nr	Gruppe	KG Versuchsbeginn	KG Versuchsende	FG/Tag [g]	Futter gesamt [g]	Dosierung [mg/g]	mg/tag
1	SF (SHAM)	254	+++	15,64	547,4	entfällt	entfällt
2		234	268				
3		224	235				
4		250	268				
5	SF (SHAM)	242	242	14,69	514,5	entfällt	entfällt
6		243	250				
7		235	250				
8		222	250				
9	SF (SHAM)	244	269	15,57	544,95	entfällt	entfällt
10		248	262				
11		211	249				
12		249	263				
13	SF + OVX	228	+++	21,27	744,45	entfällt	entfällt
14		239	320				
15		248	346				
16		247	+++				
17	SF + OVX	266	337	14,98	524,3	entfällt	entfällt
18		267	351				
19		269	321				
20		245	270				
21	SF + OVX	252	336	15,3	535,5	entfällt	entfällt
22		244	316				
23		227	290				
24		253	316				
25		257	335				
26	Alendronat	229	283	16,57	579,95	0,01	0,1657
27		221	305				
28		241	349				
29		221	306				
30	Alendronat	254	332	17,94	627,9	0,01	0,1794
31		246	343				
32		227	313				
33	Alendronat	246	319	15,75	551,25	0,01	0,1575
34		258	307				
35		262	371				
36		256	303				

Ratten Nr	Gruppe	KG Versuchsbeginn	KG Versuchsende	FG/Tag [g]	Futter gesamt [g]	Dosierung [mg/g]	mg/tag
37	Raloxifen	243	+++	16,47	576,45	0,1665	2,7424
38		254	280				
39		239	270				
40		243	+++				
41	Raloxifen	251	255	12,67	443,45	0,1665	2,1097
42		238	243				
43		231	248				
44		257	275				
45	Raloxifen	250	270	12,2	427	0,1665	2,0313
46		269	281				
47		270	271				
48		254	267				
49		250	268				
50	Cimicifuga	236	308	16,2	567	1,66	26,892
51		268	302				
52		238	298				
53		254	293				
54	Cimicifuga	268	322	14,74	515,9	1,66	24,473
55		240	282				
56		257	327				
57		247	323				
58	Cimicifuga	242	277	14,07	492,45	1,66	23,336
59		248	+++				
60		255	297				
61		264	322				
62	Östrogen	230	209	11,7	409,5	0,0174	0,2035
63		233	231				
64		241	222				
65		232	192				
66	Östrogen	259	239	11,43	400,05	0,0174	0,1989
67		251	240				
68		259	232				
69		251	236				
70	Östrogen	247	235	11,57	404,95	0,0174	0,2014
71		259	260				
72		235	221				
73		249	245				

Tab.14: Gesamtübersicht Gewichtsentwicklung

Ratten Nr	Gruppe	Versuchsbeginn	KG 1.Tag post OP	KG 4.Tag post OP	KG 8.Tag post OP	KG 11.Tag post OP	KG 15.Tag post OP	KG 18.Tag post OP	KG 22.Tag post OP	KG 25.Tag post OP	KG 29.Tag post OP	KG 32.Tag post OP	Versuchsende
1	SF (SHAM)	254	217	233	+++								
2		234	215	226	237	243	245	248	252	250	248	248	268
3		224	208	217	229	228	228	231	228	223	232	236	235
4		250	238	245	254	270	270	266	270	273	269	267	268
5	SF (SHAM)	242	228	234	222	224	237	243	251	241	252	242	242
6		243	228	236	233	239	246	249	252	251	270	254	250
7		235	216	230	241	242	249	252	257	253	271	257	250
8		222	200	209	216	235	243	230	233	238	257	251	250
9	SF (SHAM)	244	226	232	240	263	266	269	268	266	273	273	269
10		248	230	236	236	243	236	240	252	248	253	261	262
11		211	198	206	218	233	240	241	240	242	248	252	249
12		249	238	242	236	245	250	254	255	265	260	264	263
13	SF + OVX	228	+++										
14		239	205	221	229	250	266	282	298	308	313	317	320
15		248	202	231	239	263	286	306	319	336	344	346	346
16		247	+++										
17	SF + OVX	266	245	244	260	277	282	297	309	319	324	330	337
18		267	256	263	287	294	302	321	329	337	337	342	351
19		269	249	246	257	269	274	288	257	304	305	317	321
20		245	229	240	253	266	265	267	263	261	268	270	270
21	SF + OVX	252	247	258	248	280	287	309	312	326	324	330	336
22		244	239	243	237	261	268	280	290	300	303	314	316
23		227	233	234	224	250	259	271	273	278	280	285	290
24		253	253	255	249	275	284	298	309	312	309	312	316
25		257	261	269	255	281	293	306	314	319	325	329	335
26	Alendronat	229	203	217	223	232	250	245	259	267	270	275	283
27		221	197	211	221	237	243	263	275	285	287	290	305
28		241	228	245	261	282	292	312	328	337	338	345	349
29		221	204	223	235	249	247	275	280	291	297	300	306
30	Alendronat	254	235	254	259	270	287	297	308	315	321	325	332
31		246	227	240	248	256	275	293	316	324	336	342	343
32		227	200	227	237	245	261	279	291	305	308	310	313
33	Alendronat	246	247	256	262	256	285	295	305	309	309	312	319
34		258	258	265	272	266	299	306	308	313	309	309	307
35		262	260	278	289	287	322	342	354	365	363	366	371
36		256	252	251	253	260	273	279	287	295	297	301	303

Ratten Nr	Gruppe	Versuchs- beginn	KG 1.Tag post OP	KG 4.Tag post OP	KG 8.Tag post OP	KG 11.Tag post OP	KG 15.Tag post OP	KG 18.Tag post OP	KG 22.Tag post OP	KG 25.Tag post OP	KG 29.Tag post OP	KG 32.Tag post OP	Versuchs- ende
37	Raloxifen	243	+++										
38		254	222	230	239	252	259	249	267	268	274	276	280
39		239	215	227	230	239	244	236	262	265	263	267	270
40		243	+++										
41	Raloxifen	251	240	228	240	233	243	251	249	255	253	253	255
42		238	219	212	217	206	223	231	231	242	243	243	243
43		231	217	214	226	221	236	244	240	249	247	248	248
44		257	241	230	236	229	247	255	262	275	275	275	275
45	Raloxifen	250	253	247	243	262	252	261	258	264	265	267	270
46		269	256	254	252	268	247	272	255	279	285	285	281
47		270	277	246	247	267	257	269	265	270	270	270	271
48		254	246	248	247	266	249	266	251	274	274	274	267
49		250	243	244	244	267	247	260	250	266	270	270	268
50	Cimicifuga	236	208	234	241	257	264	279	288	286	304	305	308
51		268	205	222	233	245	255	266	271	272	292	299	302
52		238	217	225	238	251	257	271	277	275	290	292	298
53		254	210	215	223	239	248	263	271	267	286	290	293
54	Cimicifuga	268	260	261	273	283	293	304	299	313	315	318	322
55		240	218	209	222	226	233	262	248	283	280	280	282
56		257	249	247	269	276	289	307	301	327	324	324	327
57		247	240	245	259	253	279	294	299	312	315	318	323
58	Cimicifuga	242	244	239	244	252	256	261	263	271	280	279	277
59		248	+++										
60		255	245	239	234	243	249	264	266	281	289	293	297
61		264	265	251	257	268	278	293	297	305	316	319	322
62	Östrogen	230	200	196	197	204	215	188	199	203	206	208	209
63		233	217	211	214	219	226	208	205	224	227	230	231
64		241	205	204	214	216	217	213	210	218	219	220	222
65		232	198	194	200	208	213	183	179	186	187	189	192
66	Östrogen	259	251	247	232	228	231	236	228	224	232	236	239
67		251	237	237	222	218	235	235	233	242	232	236	240
68		259	240	237	228	225	228	233	227	230	225	226	232
69		251	240	233	229	228	228	228	214	210	219	228	236
70	Östrogen	247	250	238	236	231	229	233	230	230	237	237	235
71		259	258	254	253	252	249	246	244	245	254	257	260
72		235	230	226	218	214	216	212	217	215	216	220	221
73		249	250	239	239	239	232	237	236	228	227	238	245

---

## 7 Literaturverzeichnis

---

- Aerssens J, van Audekercke R, Talalaj M, Geusens P, Bramm E und Dequeker J (1996): Effect of 1alpha-vitamin D3 and estrogen therapy on cortical bone mechanical properties in the ovariectomized rat model. *Endocrinology* 137, 1358-1364
- Andersson N, Surve VV, Lehto-Axtelius D, Ohlsson C, Hakanson R, Andersson K und Ryberg B (2002): Drug-induced prevention of gastrectomy- and ovariectomy-induced osteopaenia in the young female rat. *J Endocrinol* 175, 695-703
- Aspenberg P, Wermelin K, Tengwall P und Fahlgren A (2008): Additive effects of PTH and bisphosphonates on the bone healing response to metaphyseal implants in rats. *Acta Orthop* 79, 111-115
- Banse X, Devogelaer JP, Munting E, Delloye C, Cornu O und Grynepas M (2001): Inhomogeneity of human vertebral cancellous bone: systematic density and structure patterns inside the vertebral body. *Bone* 28, 563-571
- Baron R, Tross R und Vignery A (1984): Evidence of sequential remodeling in rat trabecular bone: morphology, dynamic histomorphometry, and changes during skeletal maturation. *Anat Rec* 208, 137-145
- Bartl R: Osteoporose-Prävention, Diagnostik, Therapie. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York 2001
- Bartl R, Bartl C und Mutschler W (2003): Diagnosis and therapy of osteoporosis. Strategy for effective treatment after fragility fractures. *Unfallchirurg* 106, 526-541
- Beaudreuil J, Mbalaviele G, Cohen-Solal M, Morieux C, De Vernejoul MC und Orcel P (1995): Short-term local injections of transforming growth factor-beta 1 decrease ovariectomy-stimulated osteoclastic resorption in vivo in rats. *J Bone Miner Res* 10, 971-977
- Bestehorn K, Zink A und Dreher R (2002): Drug therapy in postmenopausal osteoporosis. An analysis of healthy service delivery. *Z Arztl Fortbild Qualitätssich* 96, 699-704
- Bitterling H, Vogel T, Dobler T, Mutschler W, Pfeifer KJ, Reiser M und Eibel R (2005): Role of osteoporosis in trauma diagnostics. *Rofo* 177, 1663-1669
- Blythe JG und Buchsbaum HJ (1976): Fracture healing in estrogen-treated and castrated rats. *Obstet Gynecol* 48, 351-352
- Boivin G, Vedi S, Purdie DW, Compston JE und Meunier PJ (2005): Influence of estrogen therapy at conventional and high doses on the degree of mineralization of iliac bone tissue: a quantitative microradiographic analysis in postmenopausal women. *Bone* 36, 562-567

- Brown JE, Cook RJ, Major P, Lipton A, Saad F, Smith M, Lee K, Zheng M, Hei Y und Coleman RE (2005): Bone turnover markers as predictors of skeletal complications in prostate cancer, lung cancer and other solid tumors. *J Natl Cancer Ins* 97, 59-69
- Brzezinski A und Debi A (1999): Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 85, 47-51
- Cao Y, Mori S, Mashiba T, Westmore MS, Ma L, Sato M, Akiyama T, Shi L, Komatsubara S, Miyamoto K und Norimatsu H (2002): Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 17, 2237-2246
- Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC und Wolf DE (1988): Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8790-8794
- Cauley JA, Norton L, Lippman ME, Eckert S, Krueger KA, Purdie DW, Farrerons J, Karasik A, Mellstrom D, Ng KW, Stepan JJ, Powles TJ, Morrow M, Costa A, Silfen SL, Walls EL, Schmitt H, Muchmore DB, Jordan VC und Ste-Marie LG (2001): Continued breast cancer risk reduction in postmenopausal women treated with raloxifene: 4-year results from the MORE trial. Multiple outcomes of raloxifene evaluation. *Breast Cancer Res Treat* 65, 125-134
- Chachra D, Lee JM, Kasra M und Grynypas MD (2000): Differential effects of ovariectomy on the mechanical properties of cortical and cancellous bone in rat femora and vertebrae. *Biomed Sci Instrum* 36, 123-128
- Christenson RH (1997) : Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 30, 573-593
- Claes L, Augat P, Suger G und Wilke HJ (1997): Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *J Orthop Res* 15, 577-584
- Claes L, Veesser A, Gockelmann M, Simon U und Ignatius A (2009): A novel model to study metaphyseal bone healing under defined biomechanical conditions. *Arch Orthop Trauma Surg* 129, 923-928
- Cohen FJ, Watts S, Shah A, Akers R und Plouffe L, Jr. (2000): Uterine effects of 3-year raloxifene therapy in postmenopausal women younger than age 60. *Obstet Gynecol* 95, 104-110
- Consensus Development Conference (1993): Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 94, 646-650
- Cooper C: Epidemiology of osteoporosis. In: Favus MJ, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. The American Society for Bone and Mineral Research, Washington D.C. 2003, 307-313

- Cranney A, Waldegger L, Zytaruk N, Shea B, Weaver B, Papaioannou A, Robinson V, Wells G, Tugwell P, Adachi JD und Guyatt G (2003): Risedronate for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD004523.
- Cummings SR und Melton LJ (2002): Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 359, 1761-1767
- Dane C, Dane B, Cetin A und Erginbas M (2007): Comparison of the effects of raloxifene and low-dose hormone replacement therapy on bone mineral density and bone turnover in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Gynecol Endocrinol* 23, 398-403
- Danielsen CC, Mosekilde L und Svenstrup B (1993): Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. *Calcif Tissue Int* 52, 26-33
- Da Paz LH, de Falco V, Teng NC, dos Reis LM, Pereira RM und Jorgetti V (2001): Effect of 17beta-estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. *Braz J Med Biol Res* 34, 1015-1022
- Delmas PD (1995): Biochemical markers of bone turnover. *Acta Orthop Scand Suppl* 266, 176-182
- Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux AC, Shah AS, Huster WJ, Draper M und Christiansen C (1997): Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med* 337, 1641-1647
- Delmas PD, Ensrud KE, Adachi JD, Harper KD, Sarkar S, Gennari C, Reginster JY, Pols HA, Recker RR, Harris ST, Wu W, Genant HK, Black DM und Eastell R (2002): Efficacy of raloxifene on vertebral fracture risk reduction in postmenopausal women with osteoporosis: four-year results from a randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3609-3617
- Dempster DW, Birchman R, Xu R, Lindsay R und Shen V (1995): Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. *Bone* 16, 157-161
- DVO ( Dachverband Osteologie): Leitlinien zur Prävention, Diagnose und Therapie der Osteoporose, DVO, 2006
- Eastell R (1998): Treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 338, 736-746
- Eisenmenger M, Pötzsh O, Sommer B, Mitarbeiter/innen der Gruppe IV des Statistischen Bundesamtes: 11. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung – Annahmen und Ergebnisse. Bericht zur Pressekonferenz des Statistischen Bundesamts, Berlin 7. November 2006. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2006

- Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S und Kalender W (1999): Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure. *Radiologe* 39, 203-212
- Erlich HA, Gelfand D und Sninsky JJ (1991): Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252, 1643-1651
- Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR und Stakkestad J (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
- Fassbender WJ, Scheidt-Nave C und Pfeilschifter J (2003): Evidence-based clinical practice guidelines for diagnosis and treatment of osteoporosis. *Dtsch Med Wochenschr* 128, 1615-1616
- Fassbender WJ, Steinhauer B, Stracke H, Schumm-Draeger PM und Usadel KH (2002): Validation of a new automated immunoassay for measurement of intact osteocalcin. *Clin Lab* 48, 31-38
- Faugere MC, Okamoto S, DeLuca HF und Malluche HH (1986): Calcitriol corrects bone loss induced by oophorectomy in rats. *Am J Physiol* 250, E35-38
- Fitzpatrick LA (2002): Secondary causes of osteoporosis. *Mayo Clin Proc* 77, 453-468
- Folwarczna J, Sliwinski L, Cegiela U, Pytlik M, Kaczmarczyk-Sedlak I, Nowinska B, Janiec W und Trzeciak HI (2007): Raloxifene similarly affects the skeletal system of male and ovariectomized female rats. *Pharmacol Rep* 59, 349-358
- Frost HM und Jee WS (1992): On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner* 18, 227-236
- Geusens P, Dequeker J, Nijs J und Bramm E (1990): Effect of ovariectomy and prednisolone on bone mineral content in rats: evaluation by single photon absorptiometry and radiogrammetry. *Calcif Tissue Int* 47, 243-250
- Goh S, Yang K, KOH J, Wong M, Chua S, Chua D, Howe T (2008): Subtranchanteric insufficiency fractures in patients on alendronate therapy: a caution. *J Bone Joint Surg Br.* 89, 349-53
- Gomez B, Jr., Ardakani S, Ju J, Jenkins D, Cerelli MJ, Daniloff GY und Kung VT (1995): Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. *Clin Chem* 41, 1560-1566
- Götte S und Dittmar K (2001): Epidemiology and costs of osteoporosis. *Orthopade* 30, 402-404

- Grampp S, Henk CB und Imhof H (1999): Clinical application of densitometry. *Radiologe* 39, 222-227
- Hadji P, Bock K und Wüster C (2001): Osteodensitometrie: Quo vadis? Möglichkeiten und Grenzen der modernen Osteoporosediagnostik. *Reproduktionsmedizin* 17, 261-270
- Hajcsar EE, Hawker G und Bogoch ER (2000): Investigation and treatment of osteoporosis in patients with fragility fractures. *CMAJ* 163, 819-822
- Hamilton B, McCoy K und Taggart H (2003): Tolerability and compliance with risedronate in clinical practice. *Osteoporos Int* 14, 259-262
- Harrington JT, Ste-Marie LG, Brandi ML, Civitelli R, Fardellone P, Grauer A, Barton I und Boonen S (2004): Risedronate rapidly reduces the risk for nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 74, 129-135
- Hatano H, Siegel HJ, Yamagiwa H, Bronk JT, Turner RT, Bolander ME und Sarkar G (2004): Identification of estrogen-regulated genes during fracture healing, using DNA microarray. *J Bone Miner Metab* 22, 224-235
- Heaney RP, Recker RR und Saville PD (1978): Menopausal changes in bone remodeling. *J Lab Clin Med* 92, 964-970
- Herold G: Innere Medizin. Eigenverlag, Köln 2004
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS und Griffith R (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10, 413-417
- Horowitz MC (1993): Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science* 260, 626-627
- Houben R, Soute BA, Knapen MH und Vermeer C (1997): Strategies for developing human osteocalcin standards: a critical evaluation. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 227, 100-104
- Hoyland JA, Mee AP, Baird P, Braidman IP, Mawer EB und Freemont AJ (1997): Demonstration of estrogen receptor mRNA in bone using in situ reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Bone* 20, 87-92
- Iwaniec UT, Moore K, Rivera MF, Myers SE, Vanegas SM und Wronski TJ (2007): A comparative study of the bone-restorative efficacy of anabolic agents in aged ovariectomized rats. *Osteoporos Int* 18, 351-362
- Jamal SA, Leiter RE, Bayoumi AM, Bauer DC und Cummings SR (2005): Clinical utility of laboratory testing in women with osteoporosis. *Osteoporos Int* 16, 534-540
- Jergas M und Schmid G (1999): Conventional radiology of osteoporosis and radiographic absorptiometry. *Radiologe* 39, 174-185

- Johnell O, Kanis JA, Oden A, Johansson H, De Laet C, Delmas P, Eisman JA, Fujiwara S, Kroger H, Mellstrom D, Meunier PJ, Melton LJ, 3rd, O'Neill T, Pols H, Reeve J, Silman A und Tenenhouse A (2005): Predictive value of BMD for hip and other fractures. *J Bone Miner Res* 20, 1185-1194
- Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15, 175-191
- Kanis JA (2002): Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet* 359, 1929-1936
- Kavuncu V, Sahin S, Baydas G, Ilhan N, Ozercan I, Yasar A, Pekcutucu I und Ozercan R (2003): A comparison of estrogen and two different doses of calcitonin in ovariectomized rats. *Yonsei Med J* 44, 508-516
- Khan SA, de Geus C, Holroyd B und Russell AS (2001): Osteoporosis follow-up after wrist fractures following minor trauma. *Arch Intern Med* 161, 1309-1312
- Kimmel DB und Wronski TJ (1990): Nondestructive measurement of bone mineral in femurs from ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 46, 101-110
- Kolios L, Hoerster AK, Sehmisch S, Malcherek MC, Rack T, Tezval M, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Do Estrogen and Alendronate improve metaphyseal fracture healing when applied a osteoporosis prophylaxis? *Calcif Tissue* (Epub ahead of print)
- Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshioka M, Honjo H, Urabe M, Kitajima I, Semba I und Hirasawa Y (1999): Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *J Steroid Biochem Mol Biol* 68, 197-202
- Leib ES, Lewiecki EM, Binkley N und Hamdy RC (2004): Official positions of the International Society for Clinical Densitometry. *J Clin Densitom* 7, 1-6
- Li C, Mori S, Li J, Kaji Y, Akiyama T, Kawanishi J und Norimatsu H (2001): Long-term effect of incadronate disodium (YM-175) on fracture healing of femoral shaft in growing rats. *J Bone Miner Res* 16, 429-436
- Li J, Mori S, Kaji Y, Kawanishi J, Akiyama T und Norimatsu H (2000): Concentration of bisphosphonate (incadronate) in callus area and its effects on fracture healing in rats. *J Bone Miner Res* 15, 2042-2051
- Li M, Shen Y und Wronski TJ (1997): Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 20, 55-61
- Lin JT und Lane JM (2004): Osteoporosis: a review. *Clin Orthop Relat Res* 425, 126-134.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W und Deetz K (1995): Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for

- detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4, 357-362
- 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
- Morgan EF, Mason ZD, Bishop G, Davis AD, Wigner NA, Gerstenfeld LC und Einhorn TA (2008): Combined effects of recombinant human BMP-7 (rhBMP-7) and parathyroid hormone (1-34) in metaphyseal bone healing. *Bone* 43, 1031-1038
- Mosekilde L (1995): Assessing bone quality--animal models in preclinical osteoporosis research. *Bone* 17, 343-352
- Mosekilde L, Danielsen CC und Knudsen UB (1993): The effect of aging and ovariectomy on the vertebral bone mass and biomechanical properties of mature rats. *Bone* 14, 1-6
- Mosekilde L, Thomsen JS, Orhii PB und Kalu DN (1998): Growth hormone increases vertebral and femoral bone strength in osteopenic, ovariectomized, aged rats in a dose-dependent and site-specific manner. *Bone* 23, 343-352
- Mullis KB und Faloona FA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350
- Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, Shimizu S, Moriya H, Einhorn TA und Yamazaki M (2002): Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34). *J Bone Miner Res* 17, 2038-2047
- Nakasato YR, Janickla AJ, Halleen JM, Vaananen HK, Walton SP und Yam LT (1999): Clinical Significance of Immunoassays for Type-5 Tartrate-resistant Acid Phosphatase. *Clin Chem* 45, 2150-2157
- Neviaser A, Lane J, Lenart B, Edobor-Osula F, Lorich D (2008): Low-energy femoral shaft fractures associated with alendronate use. *J Orthop Trauma* 22, 346-507
- Oddie GW, Schenk G, Angel NZ, Walsh N, Guddat LW, de Jersey J, Cassady AI, Hamilton SE und Hume DA (2000): Structure, Function and Regulation of Tartrate-resistant Acid Phosphatase. *Bone*. 27, 575-584
- Ohishi T, Takahashi M, Kushida K, Hoshino H, Tsuchikawa T, Naitoh K und Inoue T (1998): Changes of biochemical markers during fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 118, 126-130
- Pedersen BJ, Ravn P, und Bonde M (1998): Type I Collagen C-Telopeptide Degradation Products as Bone Resorption Markers. *J Clin Ligand Assay* 21, 118-127

- Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P und Barlet JP (2000): Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr* 130, 1675-1681
- Pollähne W und Minne HW (2001): Epidemiologie, Diagnostik und klinisches Bild der Osteoporose. *Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz* 44, 32-36
- Rahn BA (1976): The fluorochrome sequence labelling of the bone. *Nova Acta Leopold* 44, 249-255
- Raisz LG (2005): Clinical practice. Screening for osteoporosis. *N Engl J Med* 353, 164-171
- Reid IR: Menopause. In: Favus MJ, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. The American Society for Bone and Mineral Research, Washington D.C. 2003, 86-89
- Riggs BL und Melton LJ, 3rd (1986): Involutional osteoporosis. *N Engl J Med* 314, 1676-1686
- Riggs BL, Wahner HW, Seeman E, Offord KP, Dunn WL, Mazess RB, Johnson KA und Melton LJ, 3rd (1982): Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging. Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes. *J Clin Invest* 70, 716-723
- Ringe JD (1998): Prävention und Frühtherapie der postmenopausalen Osteoporose. *Gynäkologe* 31, 870-876
- Roudebush RE, Magee DE, Benslay DN, Bendele AM und Bryant HU (1993): Effect of weight manipulation on bone loss due to ovariectomy and the protective effects of estrogen in the rat. *Calcif Tissue Int* 53, 61-64
- Rosenquist C, Fledelius C, Christgau S, Pedersen BJ, Bonde M, Qvist P und Christiansen C (1998): Serum  $\beta$ -Crosslaps One Step ELISA. First application of monoclonal antibodies for measurement in serum of bone-related degradation products from C-terminal telopeptides of type I collagen. *Clin Chem* 44, 2281-2289
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV und Johnson KC (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 288, 321-333
- Scheidt-Nave C, Baum E, Dören M, Hadji P, Keck E, Minne H (2003): DVO-Leitlinie Osteoporose bei postmenopausalen Frauen. *Osteologie* 12, 63-91
- Schlager H, Gensthaler G, Schwarz F, Gassner W und Bestehorn K (2001) Untersuchung zur Versorgungssituation von Osteoporosepatienten in Bayern und Sachsen. *Gesundh Ökonom Qual Manag* 6, 134-137

- Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, Lucke M, Fuchs T, Stemberger A, Flyvbjerg A, Haas NP und Raschke M (2001): Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone* 28, 341-350
- Schmidt IU, Wakley GK und Turner RT (2000): Effects of estrogen and progesterone on tibia histomorphometry in growing rats. *Calcif Tissue Int* 67, 47-52
- Schnabel M, Eser G, Ziller V, Mann D, Mann E und Hadji P (2005): Bone mineral density in postmenopausal women with proximal femoral fractures--comparative study between quantitative ultrasonometry and gold standard DXA. *Zentralbl Chir* 130, 469-475
- Sehmisch S, Boeckhoff J, Wille J, Seidlova-Wuttke D, Rack T, Tezval M, Wuttke W, Stuermer KM und Stuermer EK (2009 a): Vitex agnus castus as prophylaxis for osteopenia after orchidectomy in rats compared with estradiol and testosterone supplementation. *Phytother Res* 23, 851-858
- Sehmisch S, Dullin C, Zaroban A, Tezval M, Rack T, Schmelz U, Seidlova-Wuttke D, Dunkelberg H, Wuttke W, Marten K, Stuermer KM und Stuermer EK (2009 b): The use of flat panel volumetric computed tomography (fpVCT) in osteoporosis research. *Acad Radiol* 16, 394-400
- Seibel MJ (2005): Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev* 26, 97-122
- Seidlova-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T und Wuttke W (2003 a): Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: comparison with estradiol-17beta. *Eur J Endocrinol* 149, 351-362
- Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Becker T, Christoffel V und Wuttke W (2003 b): Pharmacology of *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. *Maturitas* 44, 39-50
- Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Pitzel L und Wuttke W (2005): Effects of estradiol-17beta, testosterone and a black cohosh preparation on bone and prostate in orchidectomized rats. *Maturitas* 51, 177-186
- Siegenthaler W und Blum HE: *Klinische Pathophysiologie*. Thieme-Verlag, Stuttgart 2006, 291-335
- Sorensen OH, Crawford GM, Mulder H, Hosking DJ, Gennari C, Mellstrom D, Pack S, Wenderoth D, Cooper C und Reginster JY (2003): Long-term efficacy of risedronate: a 5-year placebo-controlled clinical experience. *Bone* 32, 120-126
- Stepan JJ, Pospichal J, Presl J und Pacovsky V (1987): Bone loss and biochemical indices of bone remodeling in surgically induced postmenopausal women. *Bone* 8, 279-284

- Stürmer EK, Seidlova-Wuttke D, Sehmisch S, Rack T, Wille J, Frosch KH, Wuttke W und Sturmer 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
- Taxel P, Kaneko H, Lee SK, Aguila HL, Raisz LG und Lorenzo JA (2008): Estradiol rapidly inhibits osteoclastogenesis and RANKL expression in bone marrow cultures in postmenopausal women: a pilot study. *Osteoporos Int* 19, 193-199
- Tezval M, Stuermer EK, Sehmisch S, Rack T, Stary A, Stebener M, Konietschke F und Stuermer KM (2009): Improvement of trochanteric bone quality in an osteoporosis model after short-term treatment with parathyroid hormone: a new mechanical test for trochanteric region of rat femur. *Osteoporos Int* (Epub ahead of print)
- Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM und Ke HZ (1995): FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 17, 125-133
- Thomsen JS, Ebbesen EN und Mosekilde L (2002): Zone-dependent changes in human vertebral trabecular bone: clinical implications. *Bone* 30, 664-669
- Tsiridis E, Morgan EF, Bancroft JM, Song M, Kain M, Gerstenfeld L, Einhorn TA, Bouxsein ML und Tornetta P, 3rd (2007): Effects of OP-1 and PTH in a new experimental model for the study of metaphyseal bone healing. *J Orthop Res* 25, 1193-1203
- Turner AS (2001): Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 1, 66-81
- WHO(1994): Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 843, 1-129
- Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC und Ignaszewski LA (1985): Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 37, 324-328
- Wronski TJ, Walsh CC und Ignaszewski LA (1986): Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 7, 119-123
- Wronski TJ, Cintron M, Doherty AL und Dann LM (1988): Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinology* 123, 681-686
- Wronski TJ, Dann LM und Horner SL (1989 a): Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 10, 295-301
- Wronski TJ, Dann LM, Scott KS und Cintron M (1989 b): Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 45, 360-366

- 
- Wuttke W, Seidlova-Wuttke D und Gorkow C (2003): The Cimicifuga preparation BNO 1055 vs. conjugated estrogens in a double-blind placebo-controlled study: effects on menopause symptoms and bone markers. *Maturitas* 44, 67-77
- Wuttke W, Gorkow C und Seidlova-Wuttke D (2006): Effects of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) on bone turnover, vaginal mucosa, and various blood parameters in postmenopausal women: a double-blind, placebo-controlled, and conjugated estrogens-controlled study. *Menopause* 13, 185-196
- Yamazaki I und Yamaguchi H (1989): Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat model. *J Bone Miner Res* 4, 13-22
- Zierau O, Bodinet C, Kolba S, Wulf M und Vollmer G (2002): Antiestrogenic activities of *Cimicifuga racemosa* extracts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80, 125-130

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Stürmer und seiner Ehefrau PD Dr. med. Ewa Stürmer für den Vorschlag des Themas und die hervorragende Betreuung. Sie waren jederzeit für mich ansprechbar und erledigten selbst umfangreiche Korrekturarbeiten sofort. Dabei standen sie mir immer mit konstruktiver Kritik und Hilfestellung zur Seite.

Ebenfalls danke ich Herrn Professor Dr. med. Wuttke und Frau Dr. med. Seidlová-Wuttke (Abt. Klinische und Experimentelle Endokrinologie) für die freundliche Überlassung der Serumparameter, der Werte für die Genexpression und die tatkräftige Mithilfe an der Versuchsdurchführung.

Vielen Dank auch an Herrn Dipl. Biol. Kauer, der bei allen Fragen und Zweifeln stets geduldig mit Rat und Tat zur Seite stand und mit fachlicher Hilfestellung für ein Gelingen der biomechanischen Tests sorgte und an Herrn Dr. med. Stephan Sehmisch für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

## **Lebenslauf**

Am 13. November 1979 wurde ich, Jakob Johannes Schumann, als viertes Kind von Dr. med. Klaus Peter Schumann und Dr. phil. Adelheid Schumann, geb. Weise, in Bielefeld geboren.

In Bielefeld besuchte ich von 1986 bis 1990 die Diesterweg-Grundschule. Anschließend wechselte ich aufs Gymnasium am Waldhof, wo ich im Mai 1999 meine Schulzeit mit dem Abitur beendete.

Im Wintersemester 2000/01 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen auf. Dort legte ich im September 2002 meine ärztliche Vorprüfung und im November 2007 mein Staatsexamen ab.

Seit Dezember 2008 arbeite ich als Assistenzarzt für Pädiatrie im Kinderkrankenhaus Porz am Rhein in Köln.