

Aus der Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie –
Abteilung Unfallchirurgie, Plastische- und Wiederherstellungschirurgie
(Prof. Dr. med. K. M. Stürmer)
im Zentrum Chirurgie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Der Einfluss von Strontiumranelat auf die metaphysäre
Frakturheilung osteopener Ratten**

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

vorgelegt von
Anna Weidemann
aus
Heiligenstadt

Göttingen 2013

Dekan:

Prof. Dr. Heyo Klaus Kroemer

I. Berichterstatter/in:

PD Dr. Stephan Sehmisch

II. Berichterstatter/in:

Prof. Dr. Dr. Franz-Josef Kramer

Tag der mündlichen Prüfung:

01.10.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Einführung in das Thema und Fragestellung.....	1
1.2	Knochen.....	2
1.2.1	Knochenmatrix.....	3
1.2.2	Knochenzellen.....	4
1.2.3	Knochenumbau.....	6
1.3	Osteoporose.....	6
1.3.1	Definition Osteoporose.....	6
1.3.2	Epidemiologie.....	7
1.3.3	Einteilung der Osteoporose.....	8
1.3.4	Ätiologie und Pathogenese der Osteoporose.....	8
1.3.5	Risikofaktoren für Osteoporose und osteoporotische Frakturen.....	9
1.3.6	Klinik der Osteoporose.....	11
1.3.7	Diagnostik der Osteoporose.....	12
1.3.8	Therapie der Osteoporose.....	14
1.4	Fraktur und Frakturheilung.....	20
1.4.1	Besonderheit der osteoporotischen Fraktur.....	20
1.4.2	Formen der Frakturheilung.....	20
1.4.3	Frakturheilung und Osteoporose.....	21
1.4.4	Frakturheilung im metaphysären Osteotomie-Modell.....	22
2	Material und Methoden.....	23
2.1	Versuchsablauf.....	23
2.2	Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	24
2.3	Ovarektomie.....	25
2.4	Osteotomie und Osteosynthese.....	26
2.5	Obduktion und Präparation.....	27
2.6	Biomechanischer Test.....	28
2.6.1	Durchführung des biomechanischen Tests.....	28
2.6.2	Interpretation der Kraft-Weg-Diagramme.....	29
2.6.3	Messparameter.....	30

2.6.4	Validierung.....	31
2.7	Mikro-Computertomographie.....	31
2.7.1	Durchführung des Scans	32
2.7.2	Auswertung.....	33
2.7.3	Messparameter.....	39
2.7.4	Validierung.....	41
2.8	Mikroradiographie.....	41
2.8.1	Herstellung der histologischen Schnitte und der Mikroradiographien	41
2.8.2	Auswertung der Mikroradiographien.....	42
2.8.3	Messparameter.....	46
2.9	Polychrome Sequenzmarkierung.....	47
2.9.1	Ziel und Prinzip des Verfahrens.....	47
2.9.2	Auswertung.....	48
2.9.3	Zeitpunkt der frühesten Überbrückung des Frakturspalts.....	51
2.9.4	Messparameter.....	52
2.10	Validierung des Untersuchers für die Mikroradiographie und die polychrome Sequenzmarkierung.....	53
2.11	Statistik	53
3	Ergebnisse.....	54
3.1	Körpergewicht der Tiere im Verlauf.....	55
3.2	Tägliche Futtermenge pro Tier im Verlauf.....	57
3.3	Uterusgewicht	59
3.4	Ergebnisse des biomechanischen Tests.....	59
3.4.1	Elastizität.....	59
3.4.2	Streckgrenze und Maximalkraft	60
3.5	Ergebnisse der Mikrocomputertomographie.....	61
3.5.1	Kortikalisparameter	61
3.5.2	Kallusparameter	63
3.5.3	Parameter, die den gesamten Knochen betreffen.....	65
3.5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Mikrocomputertomographie.....	67
3.6	Ergebnisse der Mikroradiographie.....	69
3.6.1	Repräsentative Mikroradiographien.....	70

3.6.2	Kortikalis.....	71
3.6.3	Kallus.....	73
3.6.4	Trabekel.....	76
3.6.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	78
3.7	Ergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung.....	79
3.7.1	Repräsentative Bilder der polychromen Sequenzmarkierung	80
3.7.2	Kallus plattennah.....	81
3.7.3	Kallus plattenfern	83
3.7.4	Kallus endostal	85
3.7.5	Gesamter Kallus.....	87
3.7.6	Zeitpunkt der frühesten Überbrückung des Frakturspalts.....	88
3.7.7	Zusammenfassung der Ergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung	89
4	Diskussion.....	91
4.1	Die ovariectomierte Ratte als Osteoporosemodell und das metaphysäre Frakturmodell.....	91
4.2	Körpergewicht und tägliche Futteraufnahme der Ratten.....	93
4.3	Diskussion der Ergebnisse des biomechanischen Tests.....	94
4.4	Diskussion der Ergebnisse der Mikrocomputertomographie	95
4.5	Diskussion der Ergebnisse der Mikroradiographie.....	97
4.6	Diskussion der Ergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung.....	100
4.7	Schlussfolgerungen	103
5	Zusammenfassung.....	105
6	Literaturverzeichnis	107
7	Anhang.....	117
7.1	Tabellenverzeichnis.....	117
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	119
7.3	Abkürzungsverzeichnis.....	124

1 Einleitung

1.1 Einführung in das Thema und Fragestellung

Die Osteoporose ist mit weltweit rund 200 Millionen Betroffenen eine ernst zu nehmende Erkrankung (Lin und Lane 2004). In Deutschland betrug 2003 die Zahl an betroffenen Menschen 7,8 Millionen, wovon 6,5 Millionen Frauen waren. Die Kosten, bedingt durch die Osteoporose, wurden dabei auf 5,4 Milliarden Euro geschätzt (Häussler et al. 2007).

Diese Knochenkrankung zeichnet sich durch ihren klinisch oft schleichenden und symptomlosen Verlauf aus, bei dem es zu einem ständigen Verlust an Knochenmasse, insbesondere der trabekulären Strukturen, kommt. Die herabgesetzte Knochenqualität in Form verminderter Knochenmineralisierungsdichte (BMD) und verschlechterter Mikroarchitektur führt zu einer gesteigerten Knochenbrüchigkeit. Es ereignen sich verhängnisvolle Fragilitätsfrakturen in Folge inadäquater Traumata. Das erhöhte Frakturrisiko stellt das Hauptproblem der Osteoporose dar. Zu den typischen osteoporoseassoziierten Frakturen gehören Wirbelkörper-, proximale Femur-, distale Radius-, proximale Humerus-, und Beckenfrakturen (Bartl 2011). Vor allem vertebrale Frakturen gehen mit einem erhöhten Risiko für weitere Knochenbrüche (Melton et al. 1999) und einer erhöhten Mortalität (Cauley et al. 2000) einher.

Derzeit gibt es bereits einige Substanzen, die für die Therapie der Osteoporose zugelassen sind. Die meisten Therapeutika zeichnen sich entweder durch ihre osteoanabole oder antiresorptive Wirkung aus. Es gibt jedoch ein Medikament, das beide Effekte in sich vereint und dem gestörten Knochenumbau mit der gesteigerten Rate an Knochenresorption bei der Osteoporose entgegenwirkt (Canalis et al. 1996; Baron und Tsouderos 2002). Dieses Medikament ist das seit 2004 für die Osteoporosetherapie zugelassene Strontiumranelat (SR). Strontiumranelat kann dem Trabekelverlust entgegenwirken, die BMD wieder steigern und zeichnet sich durch die Reduktion des Frakturrisikos aus (Marie et al. 1993; Meunier et al. 2004; Reginster et al. 2005; Manette et al. 2006). Hinsichtlich der Tatsache, dass die Osteoporose oft erst durch das Auftreten einer Fragilitätsfraktur entdeckt wird und dass die Frakturheilung bei dieser Erkrankung gestört abläuft (Kubo et al. 1999; Namkung-Matthai et al. 2001; Hao et al. 2007), ist die Erforschung der Effekte der Osteoporosemedikamente auf die

Frakturheilung von besonderer Bedeutung. Die Anzahl der Studien, die sich mit der Wirkung von Stontiumranelat auf die osteoporotische Frakturheilung beschäftigt haben, ist gering. Diese bisherigen Ergebnisse bezogen sich auf die diaphysäre osteoporotische Knochenheilung, welche bei der Osteoporose eher unbedeutend ist (Li et al. 2010; Ozturan et al. 2011). Daher war das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, wie sich SR auf die Heilung der weitaus häufigeren metaphysären Fraktur auswirkt. Des Weiteren galt es herauszufinden, ob eine bereits bestehende Therapie mit SR als Osteoporoseprophylaxe bei Auftreten einer Fraktur fortgeführt oder abgebrochen werden sollte. Bezüglich der bisherigen Erkenntnisse über SR könnte man davon ausgehen, dass die Gabe dieses Medikaments als Osteoporoseprophylaxe und als Frakturtherapie eine positive Wirkung auf die Frakturheilung zeigen wird.

1.2 Knochen

Der menschliche Körper besitzt 220 Knochen. Sie machen ungefähr 10 kg und damit rund 15 % unseres Körpergewichtes aus. Der Knochen ist mit seinen vielfältigen Aufgaben unentbehrlich. Zunächst dient er als Stütze für den gesamten Körper. Jegliche Muskeln setzen mit ihren Sehnen am Knochen an. Damit ist er für die Fortbewegung immens wichtig. Des Weiteren erfüllen die Knochen eine Schutzfunktion. So schützen die Rippen die Thoraxorgane und der Schädel und die Wirbelsäule das ZNS. Es werden das Knochenmark und damit die gesamte Hämatopoese beherbergt. Weiterhin dient der Knochen als Mineraldepot. So werden 99% des gesamten Kalziums, 85% des Phosphats und 50 % des Magnesiums in den Knochen gespeichert (Bartl 2011).

Grob unterteilt man das Skelett in das Rumpf- oder Axialskelett und das Extremitätenskelett. Die langen Röhrenknochen werden makroskopisch in Diaphyse (Schaft), Metaphyse (trichterförmige Erweiterung des Schafts) und Epiphyse eingeteilt. Des Weiteren besteht jeder Knochen aus einer inneren Spongiosa und einer äußeren Kompakta (Kortikalis). Die Spongiosa setzt sich aus dünnen Bälkchen (Trabekeln) zusammen, deren Knochenlamellen flächig angeordnet sind. In den Maschen zwischen den Trabekeln befindet sich das Knochenmark. Die Kompakta hingegen ist in sogenannten Osteonen organisiert, welche aus 5-20 konzentrischen Knochenlamellen bestehen. Diese verleihen der Kortikalis ihre Festigkeit. Sämtliche inneren Knochenoberflächen werden vom Endost ausgekleidet, einer dünnen Schicht von nicht

mineralisierten Kollagenfibrillen und einer kontinuierlichen Lage sogenannter *lining cells* (mesenchymale Stammzellen, Osteoprogenitorzellen, ruhende Osteoblasten, ruhende Osteoklasten). Äußerlich ist der Knochen mit Periost bedeckt, was aus einem straffen Bindegewebe (Stratum fibrosum) und einer Lage *lining cells* (Stratum osteogenicum) besteht.

Es werden zwei Arten von Knochen unterschieden. Der unreife Geflechtknochen, in dem die Kollagenfibrillen noch geflechtartig verwoben sind und der reife Lamellenknochen, in dem die Kollagenfibrillen in histologisch erkennbaren Schichten (Lamellen) angeordnet sind. Geflechtknochen entsteht überall dort, wo Knochengewebe sehr rasch gebildet wird, wie zum Beispiel in der Entwicklung oder bei der Frakturheilung. Dieser wird jedoch im Zuge des natürlichen Knochenumbaus allmählich in den biomechanisch höherwertigen Lamellenknochen umgewandelt (Lüllmann-Rauch 2009).

1.2.1 Knochenmatrix

Die Knochenmatrix besteht aus organischen und anorganischen Bestandteilen. Die organische Komponente kann man in Kollagen- und Nicht-Kollagen-Proteine einteilen. Das fibrilläre Kollagen Typ I bildet den Hauptbestandteil der organischen Knochenmatrix. Nachdem die Kollagenmoleküle von den Osteoblasten synthetisiert und sezerniert wurden, bilden sie ein fibrilläres Netzwerk, was dem Knochen eine besondere Zugfestigkeit verleiht. Annähernd gleich ausgerichtete Kollagenfibrillen ergeben schließlich eine Knochenlamelle, wobei die Verlaufsrichtung zur nächsten Knochenlamelle wechselt. Zu den Nicht-Kollagen-Proteinen, die auch von den Osteoblasten synthetisiert werden, zählen Proteoglykane und verschiedene Glykoproteine. Spezifische Glykoproteine wie Osteokalzin und Sialoprotein fördern die Bindung von Kalzium und sind damit für die Mineralisation von Bedeutung. Die anorganische Komponente der Matrix bilden vor allem die Hydroxylapatit-Kristalle, kleine hexagonale Kristalle aus Phosphat und Kalzium, die sich den Kollagenfibrillen longitudinal anlagern und diese somit mineralisieren (vgl. 1.2.2.1, S. 4). Sie sind für die Druckfestigkeit des Knochens verantwortlich. Wegen seiner Druck- und Zugfestigkeit wird der Knochen auch als biegefest bezeichnet (Junqueira und Carneiro 2005; Lüllmann-Rauch 2009).

1.2.2 Knochenzellen

1.2.2.1 Osteoblasten

Osteoblasten sind kubisch bis zylinderförmige Zellen, die stets auf einer freien Oberfläche des Knochens zu finden sind. Sie gehen aus Osteoprogenitorzellen hervor, welche sich aus mesenchymalen Stammzellen ableiten. Ihre Aufgabe ist vor allem die Synthese der organischen Bestandteile der Knochenmatrix. Kollagen Typ I, Proteoglykane und Glykoproteine werden auf schon vorhandener mineralisierter Matrix abgelagert (Apposition). Diese noch nicht mineralisierte Schicht wird als Osteoid bezeichnet (Junqueira und Carneiro 2005). Des Weiteren sind Osteoblasten für die Regulation der Mineralisation verantwortlich. Der Mechanismus der Mineralisation ist im Detail noch nicht geklärt. Sie läuft in zwei Phasen ab. Zunächst werden sogenannte Matrixvesikel von der Osteoblastenoberfläche abgeschnürt. In diesen Vesikeln wird Kalzium und Phosphat angereichert, aus welchen, bei Überschreiten des Löslichkeitsprodukts, schließlich Hydroxylapatit-Kristalle entstehen. Diese wachsen in der zweiten Phase fortlaufend, bis es zur Ruptur der Matrixvesikelmembran kommt und die Kristalle im Extrazellulärraum zwischen den Kollagenfibrillen abgelagert werden (Orimo 2010). Eine weitere bedeutende Aufgabe der Osteoblasten ist die Regulation des Osteoklastenhaushalts. Sie produzieren zum Beispiel den sogenannten RANKL, dessen Rezeptor (RANK) auf den Osteoklasten sitzt, dessen Aktivierung als Hauptstimulus für die Osteoklastenreifung gilt. Gebildet wird auch das Osteoprotegerin, was die Osteoklastendifferenzierung aus Vorstufen hemmt und gleichzeitig als RANK-Rezeptorantagonist wirkt (Bartl 2011). Osteoprotegerin wurde zum ersten Mal von Simonet et al (1997) in einem Paper beschrieben. Manolagas fasste das Schicksal der Osteoblasten gut zusammen. Sie gehen entweder in den Ruhezustand über und werden zu *lining cells*, gehen in Apoptose oder differenzieren sich zu Osteozyten (Manolagas 2000).

1.2.2.2 Osteozyten

Osteozyten sind von mineralisierter Knochenmatrix umschlossene Osteoblasten. Sie wurden im Zuge des Knochenumbaus eingemauert und liegen somit in Lakunen zwischen den Knochenlamellen. Mit ihren zahlreichen Ausläufern stehen sie über *Gap junctions* mit den umliegenden Zellen in Verbindung, was für ihre Funktion unentbehrlich ist (Lüllmann-Rauch 2009). Ihre Funktionen sind sehr vielseitig und noch nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass die Osteoidosteozyten auch

an der Kontrolle und der Regulation der Mineralisation beteiligt sind. Die Mineralisierungsvorgänge wurden besonders entlang ihrer sich ausbildenden dendritischen Fortsätze beobachtet (Barragan-Adjemian et al. 2006). Osteozyten spielen des Weiteren eine Rolle bei den physiologischen Prozessen der Knochenbildung und Knochenresorption. Mittels löslicher Faktoren können sie die Osteoklastenbildung und deren Aktivierung unterstützen (Tanaka et al. 1995). Ihre Apoptose kann Osteoklasten rekrutieren mittels Signalen auf den Apoptosekörperchen (Kogianni et al. 2008). Die Osteozytenapoptose ist damit essentiell für Schadensreparaturen und den normalen Skelettersatz. Als nicht unwichtige Entdeckung gilt ihre Funktion als Mechanosensoren. Besonders die dendritischen Fortsätze nehmen Bewegungen der intrakanalikulären Flüssigkeit bei mechanischer Belastung wahr und transduzieren diese. Es werden zahlreiche zelluläre Prozesse in den Osteozyten aktiviert, wie zum Beispiel: Genaktivierungen, die Öffnung von *Gap junctions* oder die Freisetzung von Prostaglandinen und Stickstoffmonoxid (Bonewald 2011). Die Osteozyten ermöglichen damit eine Anpassung der Knochenbildung an die aktuellen Belastungssituationen.

1.2.2.3 Osteoklasten

Osteoklasten sind sehr große mehrkernige Zellen, die durch Fusion vieler Osteoklastenprogenitorzellen entstehen. Sie sind Teil des monozytären Phagozytensystems. Ihre Hauptaufgabe ist die Knochenresorption. Ihre Aktivität wird vor allem, wie in 1.2.2.1 (S. 4) beschrieben, von den Osteoblasten reguliert. Aktivierte Osteoklasten liegen der mineralisierten Matrix direkt an. Um ihre Funktion zu erfüllen, besitzen sie drei verschiedene Membrandomänen: Die Verdichtungszone, welche die Resorptionslakune mittels Integrinen von der Extrazellulärflüssigkeit abschirmt. Die *ruffled border*, eine vielfach gefaltete Membrandomäne, an der Protonen mittels einer H^+ -ATPase in die Lakune gepumpt werden. Dabei wird ein pH-Wert von bis zu 4,5 erreicht. Die Protonen werden durch die zytoplasmatische Carboanhydrase II bereitgestellt und dienen der Auflösung der Hydroxylapatit-Kristalle. Die organischen Bestandteile der Matrix werden mittels proteolytischer Enzyme wie lysosomalen Cystein-Proteinasen (z.B. Kathepsin K) und Matrixmetalloproteasen lysiert. Die Matrix-Fragmente werden in die Zelle aufgenommen und an der dritten Membrandomäne, der glatten basolateralen Rückseite, wieder abgegeben (Transzytose). In den Transzytosevesikeln ist wohl der allseits bekannte Osteoklastenmarker Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)

lokalisiert, welcher reaktive Sauerstoffspezies generiert, die die Kollagenfragmente noch weiter zerlegen (Väänänen et al. 2000).

1.2.3 Knochenumbau

Das Skelett befindet sich in ständigem Umbau. Während der Entwicklung und des Wachstums erhält es durch die kontinuierlichen Umbauten seine Form und Größe. Dabei wird auch der unreife Geflechtknochen durch Lamellenknochen ersetzt. Dieser Prozess wird als *modeling* bezeichnet. Doch auch das adulte Skelett wird ständig erneuert. Dabei geht es darum, alten Knochen durch neuen zu ersetzen, um Funktionsverluste und deren Konsequenzen zu vermeiden. Innerhalb von zehn Jahren wird das komplette Skelett einmal regeneriert. Man spricht dabei von *remodeling* (Manolagas 2000). Der Knochenumbau ist in sogenannten *basic multicellular units* (BMUs) organisiert. Zu jeder Zeit sind mehr als 1 Millionen solcher Bautrupps im adulten Skelett im Einsatz. Sie bestehen aus einer Osteoklastenfront, die ungeachtet bestehender Osteone kleine Tunnel in den Knochen frisst, gefolgt von Osteoblasten, die dem Rand ansitzen und den resorbierten Knochen wieder ersetzen und einsproßenden Gefäßen, Nerven und Bindegewebe, die den Hohlraum ausfüllen. Während ihrer gesamten Arbeitszeit, die mehrere Monate betragen kann, behält die BMU ihre Größe, Form und innere Organisation. Dabei werden untergegangene Zellen kontinuierlich durch neue ersetzt (Parfitt 1994). Reguliert wird der Knochenumbau wahrscheinlich, wie in 1.2.2.2 (S. 4) beschrieben, über die Osteozyten, welche die Reparaturbedürftigkeit des Knochens wahrnehmen und die entsprechenden Zellen rekrutieren.

1.3 Osteoporose

1.3.1 Definition Osteoporose

1.3.1.1 Definition Osteoporose der DVO

“Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine mikroarchitektonische Verschlechterung des Knochengewebes charakterisiert ist, mit einem konsekutiven Anstieg der Knochenfragilität und der Neigung zu Frakturen. Sind bereits eine oder mehrere Frakturen als Folge der Osteoporose aufgetreten, liegt eine manifeste Osteoporose vor.” (Pfeilschifter 2009, S.304)

1.3.1.2 Definition Osteoporose WHO 1994

Laut der WHO liegt eine Osteoporose vor, wenn die durch die DXA-Methode (vgl. 1.3.7.2, S. 12) ermittelte Knochenmineraldichte eines Patienten um 2,5 Standardabweichungen unter dem statistischen Mittelwert prämenopausaler ca. 30 jähriger Frauen liegt. Dieser Referenzwert wurde gewählt, weil im Alter zwischen 25 und 30 Jahren die maximale Knochendichte, die sogenannte *peak bone mass*, erreicht wird.

Die Standardabweichungen werden als T-Score angeben. Dabei bedeutet ein T-Score von ≥ -1 den Normalbefund, ein T-Score von -1 bis $-2,5$ Osteopenie und ein T-Score von $\leq -2,5$ präklinische Osteoporose. Treten neben dem T-Score von $-2,5$ noch Frakturen auf, spricht man von manifester Osteoporose.

1.3.2 Epidemiologie

Die Osteoporose ist mit 200 Millionen Betroffenen weltweit die häufigste metabolische Knochenerkrankung (Lin und Lane 2004).

2003 waren in Deutschland 7,8 Millionen aus der Gruppe der Über-50-Jährigen von Osteoporose betroffen, was einer Prävalenz von 26% entspricht (Häussler et al. 2007). 2009 wurde die Zahl der erkrankten Deutschen dieser Altersgruppe auf 6,3 Millionen mit einer Prävalenz von 14 % geschätzt. Dabei ist die Prävalenz für Frauen mit 24% viel höher als für Männer mit 6% (Hadji et al. 2013). Die WHO berichtete 1994, dass bis zu 30% der postmenopausalen Frauen an Osteoporose leiden. Dabei steigt die Prävalenz mit dem Alter. Während zum Beispiel nur 17 % der 50-64-jährigen Frauen betroffen sind, beträgt die Prävalenz für über 75-Jährige schon 48% (Hadji et al. 2013).

Laut den Daten der *Bone Evaluation Study* 2009 kommt es in Deutschland pro Jahr zu 885.000 Neuerkrankungen, was einer Inzidenz von 2.1% entspricht (Hadji et al. 2013).

Auch die statistische Wahrscheinlichkeit für osteoporotische Frakturen ist für Frauen höher als für Männer gleichen Alters. Das Risiko, eine hüftgelenksnahe Fraktur zu erleiden, beträgt zum Beispiel für eine 50-jährige Frau 15,6%, während ein 50-jähriger Mann nur ein Risiko von 4,7% hat (Kanis et al. 2002).

1.3.3 Einteilung der Osteoporose

Die Osteoporose lässt sich in primäre und sekundäre Formen unterteilen. Bei der primären Osteoporose unterscheidet man zwischen zwei Typen, der postmenopausalen Osteoporose (Typ 1), welche die häufigste Form darstellt und der senilen Osteoporose (Typ 2), wobei natürlich der Östrogenmangel in der Menopause auch ein Prozess des Alterns ist. Die sekundären Formen machen 5 % der Osteoporosefälle aus und können zahlreiche Ursachen haben. Eine der Wichtigsten stellt wohl die medikamenteninduzierte Osteoporose durch Glukokortikoide dar (Bartl 2011).

1.3.4 Ätiologie und Pathogenese der Osteoporose

Auf Grund der großen Anzahl an Ursachen der Osteoporose soll in diesem Punkt nur auf die primären Ursachen eingegangen werden.

1.3.4.1 Östrogenmangel

Der Hauptpathogenitätsfaktor für die Entwicklung der Osteoporose der Frau ist der Mangel an Sexualhormonen nach Eintritt der Menopause, wodurch es zum ständigen Verlust an Knochenmasse kommt (Pacifci 1998). Es herrscht ein Ungleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenbildung zugunsten der Resorption. Dieses lässt sich durch die Wirkung des Östrogens auf den Knochen erklären. Eigentlich bewirkt der Sexualhormonmangel eine Aktivierung des gesamten Knochenumbaus. Man sollte meinen, dass dadurch die Knochenmasse eher steigen als sinken sollte. Allerdings führt jede Steigerung des Knochenumbaus letztlich zum Knochenverlust, da der Knochenabbau viel schneller erfolgt als der Knochenaufbau. Zusätzlich hat Östrogen antiapoptotische Effekte auf die Osteoblasten und Osteozyten und fördert die Osteoklastenapoptose um das 2-3-fache. Ein Östrogenmangel verkürzt daher die Lebensdauer von Osteoblasten und Osteozyten und verlängert diejenige von Osteoklasten. Östrogen hat durch verschiedene Mechanismen einen hemmenden Einfluss auf die Osteoklasten. Zum einen kann es über die Steigerung der Osteoprotegerinproduktion und die Hemmung der RANKL-Produktion deren Entwicklung und Aktivität inhibieren. Zum anderen aktiviert es das Zytokin TGF- β , welches erwiesenermaßen die Osteoklastenapoptose induziert. Über die indirekte Hemmung anderer Zytokine wie IL-1 und TNF- α kann es die Osteoklasten noch weiter inhibieren (Manolagas 2000; Raisz 2005; Demontiero et al. 2012).

1.3.4.2 Weitere Alterserscheinungen

Eine weitere Ursache, die beide Geschlechter gleichermaßen betrifft, stellt der sekundäre Hyperparathyroidismus dar, der durch einen Vitamin-D-Mangel (vgl. 1.3.8.2, S. 15) im Alter hervorgerufen wird. Eine altersabhängige reduzierte intestinale und renale Kalziumabsorption und eine verminderte Kalziumzufuhr verstärken noch diesen Prozess. Die gesteigerte PTH-Sekretion (vgl. 1.3.8.2, S. 15) führt zu einer gesteigerten Knochenresorption, um den Kalziummangel auszugleichen.

Ein weiterer Punkt ist die Alterung der Zellen. Besonders der Abfall der Replikations- und Differenzierungskapazität der Osteoblasten schwächt den Knochenaufbau.

Auch die Akkumulation von Fett im Knochenmark mit steigendem Alter sollte nicht vernachlässigt werden. Das Ganze geschieht auf Kosten der Osteoblasten, da auf Grund einer Transkriptionsfaktorverschiebung im Alter sich die mesenchymalen Stammzellen zu Adipozyten statt zu Osteoblasten differenzieren (Demontiero et al. 2012).

1.3.4.3 Folgen

Alle genannten Ursachen führen zu demselben Ergebnis. Die BMD und damit die Knochenqualität und die Knochenfestigkeit werden herabgesetzt. Die Spongiosa wird dabei, auf Grund ihrer größeren Angriffsfläche, fünfmal schneller abgebaut als die Kortikalis. Es entstehen tiefe Resorptionslakunen, ganze Trabekel verschwinden, was die Trabekelkonnektivität deutlich verschlechtert. Die für die Osteoporose empfindlichsten Skelettareale sind metaphysäre Knochenabschnitte wie der proximale Femur und die Lendenwirbelsäule (Manolagas 2000; Bartl 2011).

1.3.5 Risikofaktoren für Osteoporose und osteoporotische Frakturen

1.3.5.1 Nicht modifizierbare Risikofaktoren

Eine wichtige Rolle für die Entwicklung einer Osteoporose spielen die Gene. Zahlreiche Zwillings- und Familienstudien ergaben, dass die Regulation der BMD, aber auch die *peak bone mass*, die Skelettgeometrie wie die Schenkelhalsgeometrie oder das Auftreten von Frakturen genetisch vorprogrammiert sind. Auch das Alter des Eintretens der Menarche oder der Menopause ist genetisch determiniert. Gene für den Vitamin-D-Rezeptor oder den Östrogenrezeptor sind zum Beispiel mit der Knochenmasse und auch mit osteoporotischen Frakturen assoziiert (Stewart und Ralston 2000).

Des Weiteren sind das Alter und das weibliche Geschlecht wichtige Risikofaktoren (vgl. 1.3.4.2, S. 9 und 1.3.4.1, S. 8). Frauen haben ein doppelt so großes Risiko für osteoporotische Frakturen als Männer gleichen Alters und T-Scores (Bartl 2011).

1.3.5.2 Modifizierbare Risikofaktoren

Ein wichtiger beeinflussbarer Risikofaktor ist der chronische Bewegungsmangel. Eine Immobilisierung durch eine lange Bettruhe oder einen Aufenthalt im Weltall führt zu einem Verlust von mineralisierter Knochenmasse von 1-2% im Monat. Der Wiederaufbau hingegen kostet die 3-4-fache Zeit (Ohshima 2010). Deswegen ist es gerade bei der Versorgung der osteoporotischen Frakturen wichtig, die Patienten so schnell wie möglich zu mobilisieren, um den Knochenschwund nicht noch weiter voranzutreiben.

Aber auch eine übermäßige sportliche Aktivität stellt einen Risikofaktor dar. Studien zeigten zum Beispiel, dass Extremsport bei Frauen zu Zyklusstörungen bis hin zu einer sekundären Amenorrhö führen kann, was im Verlauf in einer Verminderung der Knochendichte resultiert (Marcus et al. 1985; Hetland et al. 1993).

Einen weiteren Risikofaktor stellt der BMI dar. Es ist erwiesen, dass gerade untergewichtige Frauen eine verminderte Knochendichte aufweisen (vgl. 1.3.8.1, S. 14). Aber auch ein Übergewicht wirkt sich schlecht auf den Knochen aus. Übergewichtige Frauen haben zwar eine höhere Östrogenproduktion in den Fettzellen, jedoch auch eine größere Masse an Knochenmarkfett auf Kosten der Osteoblastogenese (Cao 2011).

Eine Fehlernährung, wie zum Beispiel eine verminderte Kalziumaufnahme und ein falscher Lebensstil mit einem ausgeprägten Zigaretten- und Alkoholkonsum, erhöhen auch das Risiko für die Entwicklung einer Osteoporose (vgl. 1.3.8.1, S. 14).

Auch eine depressive Stimmungslage scheint risikobehaftet zu sein. In zahlreichen Studien zeigten sich eine Verminderung der BMD und ein erhöhtes Frakturrisiko bei Personen mit Depressionen. Wie es zu diesem Zusammenhang kommt, ist noch nicht vollständig geklärt. Bei der Depression sind bestimmte Hormonspiegel erhöht, die den Knochenumbau beeinflussen. Außerdem neigen Depressionskranke eher zu Stürzen, in Folge von Konzentrationsschwäche und der Wirkung vieler Antidepressiva (Wu et al. 2010).

Nicht nur Antidepressiva, sondern auch andere Medikamente können die Entwicklung der Osteoporose fördern. Besonders die längerfristige Einnahme von Glukokorti-

koiden (bereits ab 3 Monaten) schädigt den Knochen enorm durch verschiedenste Mechanismen. Vor allem senkt es die Anzahl an Knochenzellen (Popp et al. 2006).

1.3.6 Klinik der Osteoporose

Bei der Osteoporose handelt es sich um eine Erkrankung, die viele Jahre symptomlos und still verläuft. Die erste Manifestation ist häufig eine Fraktur. Zu den typischen osteoporoseinduzierten Frakturen gehören: Wirbelkörper-, Schenkelhals-, distale Radius-, subkapitale Humerus- und Beckenfrakturen. Dabei ist die Wirbelkörperfraktur wohl die häufigste (Bartl 2011). Sie kann klinisch durch akute Rückenschmerzen und Bewegungseinschränkung oder durch Körpergrößenabnahme (Ettinger et al. 1992; Nevitt et al. 1998) auffallen, aber auch völlig symptomlos und damit unerkannt bleiben, was ein weltweites Problem darstellt (Delmas et al. 2005). Dabei gilt eine Körpergrößenabnahme als Indikator für das Vorliegen von Wirbelkörperbrüchen (Xu et al. 2011). Eine klinisch gesicherte vertebrale Fraktur geht außerdem mit einem erhöhten Risiko für weitere Frakturen (Melton et al. 1999) und einer erhöhten Mortalität (Cauley et al. 2000) einher. Denn das Auftreten von Frakturen in höherem Alter ist oft mit Bettlägerigkeit und einer dauerhaften Immobilisierung verbunden.

Schmerzen nehmen einen hohen Stellenwert bei dieser Erkrankung ein. Neben den akuten Schmerzen durch das Frakturereignis leiden die Betroffenen oft unter chronischen Schmerzen, die durch die Fehlstatik des Achsenskeletts hervorgerufen werden. Zu dieser Fehlstatik kommt es zum Beispiel durch unerkannte Wirbelkörpereinbrüche (Bartl 2011). Selbst bei symptomatischen Patienten werden die Frakturen oft nicht erkannt. In einer Studie mit 344 Rückenschmerzpatienten betrug zum Beispiel die Prävalenz unentdeckter Wirbelkörperfrakturen 39 % (Ehsanbakhsh et al. 2011).

Des Weiteren leiden Osteoporosepatienten häufiger an Zahnproblemen. Dieser Zusammenhang ist zwar umstritten, aber es scheint eine höhere Prävalenz für Parodontose und für Zahnverlust bei Osteoporosepatienten vorzuliegen (Estrugo-Devesa et al. 2013).

Aufgefallen ist außerdem, dass Frauen mit Osteoporose eine signifikant dünnere Haut aufweisen als Frauen gleichen Alters ohne Osteoporose. Eine geringe Hautdicke kann damit ein Indikator für die Entwicklung einer Osteoporose sein (Orme und Belchetz 1994).

1.3.7 Diagnostik der Osteoporose

Die Basisdiagnostik besteht aus einer Anamnese, einer klinischen Untersuchung und einer Knochendichtemessung. Gegebenenfalls schließen sich noch eine bildgebende Diagnostik und ein Basislabor an. Die Indikation zur Basisdiagnostik ergibt sich aus dem klinischen Risikoprofil des Patienten. Sie wird empfohlen, wenn das 10-Jahresrisiko, eine Wirbelkörperfraktur und/oder eine proximale Femurfraktur zu erleiden, 20 % und höher ist.

Weitere Untersuchungen wie CT, MRT, Szintigraphie und Knochenbiopsien gehören nicht zur Basisdiagnostik und werden nur unter bestimmten Bedingungen durchgeführt, wie zum Beispiel zur Abklärung von Differentialdiagnosen. Das soll aber an dieser Stelle nicht aufgeführt werden (Pfeilschifter 2009).

1.3.7.1 Anamnese und klinische Untersuchung

Ein wichtiger Punkt der Anamnese ist die Frage nach den Schmerzen des Patienten. Man sollte die genaue Lokalisation, Intensität und Dauer der Schmerzen erfragen. Des Weiteren sind die Wirbelsäulenbeweglichkeit und der Muskeltonus zu untersuchen. Zur Testung der Koordination und der Muskelkraft dienen verschiedene Tests. Bei dem *Timed up & go* - Test bittet man den Patienten von einem Stuhl aufzustehen, drei Meter zu gehen und sich wieder zurück auf den Stuhl zu setzen. Dabei wird die Zeit registriert. Dieser Test kann mit dem Tandemstandtest kombiniert werden, bei dem man die Zeit misst, wie lange der Patient in einer Weise aufrecht stehen kann, sodass sich die Fußspitze des einen Fußes und die Ferse des anderen Fußes berühren.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Frage nach der Körpergrößenabnahme. Dazu inspiziert man die Statik und die Haltung des Patienten. Typische Zeichen für Wirbelkörperdeformationen und -brüche können ein Rundrücken, das so genannte Osteoporosebäuchlein und das Tannenbaumphänomen (charakteristische Hautfalten bedingt durch Rumpferkürzung) sein (Pfeilschifter 2009, Bartl 2011).

1.3.7.2 Knochendichtemessung

Bei der Knochendichtemessung geht es darum, die *bone mineral density* (BMD) zu bestimmen, um daraus den T-Score zu ermitteln.

Als Goldstandard für die Ermittlung der BMD gilt auf Grund ihrer hohen Präzision die DXA- Methode (Dual Energy X-Ray Absorptiometry) (Gardner et al. 2006).

Diese Methode ist das einzige Verfahren, was zur Definition der Osteoporose und zur Stellung der Therapieindikation zugelassen ist. Die Knochendichtemessung macht ein

frühes Erkennen der Erkrankung möglich und eignet sich zur Abschätzung des Frakturrisikos. Des Weiteren kann es auch für die Verlaufskontrolle eingesetzt werden (Bartl 2011).

a) DXA-Methode

Die Messung wird am proximalen Femur und an den Lendenwirbelkörpern L1-L4, von denen mindestens zwei beurteilbar sein müssen, durchgeführt. Dabei werden an der jeweiligen Stelle zwei Energiestrahlen durch den Körper geschickt. Anhand der Durchgangsstrahlung errechnet der Computer die Masse des Mineralgehaltes des Knochens. Daraus kann dann die BMD und schließlich der T-Score ermittelt werden. Vorteile dieser Methode sind die fehlende Invasivität, die Schnelligkeit, die geringe Strahlenbelastung und die Präzision (Bartl 2011).

b) Alternativen

Die Alternativen zur DXA-Methode sollten nur in Ausnahmefällen genutzt werden. Eine Alternative ist die quantitative Computertomographie (QCT), welche allerdings eine hohe Strahlenbelastung für den Patienten bedeutet. Die ermittelten T-Werte lassen sich allerdings bezüglich der Risikoabschätzung nicht auf die T-Werte der DXA-Methode übertragen. Eine Weitere ist die quantitative Ultraschallmessung, die sich durch die fehlende Strahlenbelastung auszeichnet, aber nur an gut zugänglichen Knochen durchgeführt werden kann (Pfeilschifter 2009, Bartl 2011).

1.3.7.3 Bildgebende Diagnostik

Eine Röntgenaufnahme der Wirbelsäule ist bei akut aufgetretenen starken oder chronischen und bisher nicht abgeklärten Rückenschmerzen zu empfehlen. Wirbelkörperdeformitäten, wie Keil- und Fischwirbel, weisen auf Wirbelkörperbrüche hin (Pfeilschifter 2009, Bartl 2011).

1.3.7.4 Basislabor

Wenn die Anamnese, die klinische Untersuchung und die DXA-Messung Anlass dazu geben, werden bestimmte Laboruntersuchungen durchgeführt mit dem Ziel, die wichtigsten laborchemischen Risikofaktoren und vor allem auch die sekundären Osteoporoserisiken festzustellen. Auch zum Ausschluss von Differentialdiagnosen, wie der Osteomalazie, eignet sich das Basislabor (Pfeilschifter 2009).

1.3.8 Therapie der Osteoporose

1.3.8.1 Allgemeine Maßnahmen

a) Schmerztherapie

Die erste Manifestation der Osteoporose ist häufig das Auftreten einer Fraktur im mittleren oder unteren Wirbelsäulenabschnitt. Das ruft bei den Patienten akute Schmerzen hervor, die nach Abheilung der Fraktur in chronische Schmerzen übergehen können. Zunächst ist eine gelockerte Bettruhe mit anschließenden Übungen zu Entlastungshaltungen sinnvoll. Später sollten dann Muskelaufbau und sporttherapeutische Maßnahmen erfolgen. Zur akuten Schmerzlinderung empfiehlt es sich, vorübergehend Analgetika einzusetzen. Dazu eignet sich das WHO-Stufenschema. Dabei sollte auf die Medikamentenwahl geachtet werden, da zum Beispiel nichtsteroidale Antirheumatika wie Ibuprofen, Indometazin und Diclofenac osteoblastenhemmend wirken, was vor allem für die Frakturheilung nicht förderlich wäre (Krischak et al. 2007). Vor der Behandlung gilt es, diverse Differentialdiagnosen für Knochenschmerz auszuschließen, wie zum Beispiel maligne Erkrankungen, Osteomalazie oder Arthrose (Bartl 2011).

b) Ernährung und Lebensweise

Eine ausgewogene Ernährung kann nicht nur bei der Behandlung der Osteoporose hilfreich sein, sondern auch bei der Prävention der Erkrankung. Es sollte zum Beispiel auf eine kalziumreiche Ernährung geachtet werden. Die von der DVO empfohlene tägliche Kalziummenge beträgt 1000 mg und kann mit einer Zufuhr von Milchprodukten, frischem Obst und grünem Gemüse oft gut abgedeckt werden. Eine Supplementierung sollte nur bei mangelnder Kalziumzufuhr erfolgen (Pfeilschifter 2009, Bartl 2011).

Des Weiteren wird eine ausreichende Zufuhr der Vitamine D, C, A, K, B12 empfohlen. Ein niedriger Vitamin-B12-Spiegel ist zum Beispiel mit einer niedrigeren BMD verbunden und stellt somit einen Risikofaktor für die Osteoporose dar (Tucker et al. 2005).

Alkohol sollte nur mäßig konsumiert werden. Alkohol in geringen Maßen steigert sogar die BMD. Exzessiver Alkoholkonsum ist allerdings ein entscheidender Risikofaktor für die Osteoporose (Fini et al. 2012).

Auch der Nikotinkonsum sollte eingestellt werden, da der Knochen in vielerlei Hinsicht geschädigt wird. Eine Studie zeigte zum Beispiel für postmenopausale Frauen, dass die BMD für den gesamten Körper bei Raucherinnen signifikant ($p < 0.0001$) niedriger ist als bei den Frauen, die nie geraucht haben (Gerdhem und Obrant 2002). Im Allgemeinen sollte eine Unterernährung ($BMI < 20 \text{ kg/m}^2$) unbedingt erkannt und behandelt werden. Es ist erwiesen, dass untergewichtige Frauen ein erhöhtes Risiko für Osteoporose und Frakturen aufweisen (Pfeilschifter 2009, Horst-Sikorska und Ignaszak-Szczepaniak 2011).

c) Bewegung

Es ist nicht abzustreiten, dass körperliche Bewegung eine Wohltat in vielerlei Hinsicht für den gesamten Körper ist. Auch auf den Knochen wirkt sie sich positiv aus, auch wenn ihr Stellenwert und Nutzen in der Osteoporosetherapie noch nicht vollständig erforscht ist. Fest steht, dass eine regelmäßige körperliche Aktivität eine der bestimmenden Faktoren für die BMD darstellt und auch einen wichtigen Beitrag zur allgemeinen Gesundheit des Bewegungsapparates leistet, da der Bewegungsapparat auf eine erhöhte mechanische Belastung entsprechend reagiert. In derzeitigen Studien mit postmenopausalen Frauen fällt die Zunahme der BMD infolge sportlicher Aktivität oft bescheiden aus. Jedoch zeigte sich eine höhere Resistenz gegen Knochenbrüche. Aus diesem Grund sollte die Anordnung von körperlicher Aktivität durch den Arzt eine der ersten Interventionen in der Osteoporosetherapie sein. Der Knochenverlust im Alter und postmenopausal kann durch Bewegung nicht aufgehalten werden. Allerdings deuten Studien daraufhin, dass durch lebenslange körperliche Bewegung eine höhere Ausgangs-BMD erreicht und auch der Knochenverlust verlangsamt werden kann (Sternfeld und Dugan 2011).

1.3.8.2 Spezifische Therapie

Die Osteoporose ist eine ernst zu nehmende Erkrankung und darf nicht als normaler Alterungsprozess angesehen werden. Daher bedarf diese Erkrankung einer adäquaten Therapie. Die Indikation zur Therapie ist in den DVO Leitlinien 2009 festgelegt. Darin wird eine spezifische medikamentöse Therapie empfohlen, wenn „das (...) geschätzte 10-Jahres-Risiko für Wirbel- und proximale Femurfrakturen über 30% beträgt und die T-Werte der DXA-Knochendichtemessung an der LWS, am proximalen Gesamtfemur oder am Schenkelhals erniedrigt sind“ (Pfeilschifter 2009, S. 317). Ziel

der Therapie ist die Optimierung des Knochenumbaus, eine Steigerung der Knochendichte, die Verbesserung der Knochenqualität, die Reduktion des Frakturrisikos und damit die Verbesserung der physischen, psychischen und koordinativen Situation der Patienten. Man unterscheidet zwei Therapiekonzepte. Zum einen die osteoanabole Therapie, die eine progressive Zunahme der Knochenmasse und die Bildung neuer Knochenbälkchen bewirken soll. Präparate dieses Konzepts sind zum Beispiel PTH/Teriparatid und Strontium. Zum anderen die antiresorptive Therapie, unter der es zur raschen Abnahme des Knochenumbaus und der Mikroporosität und damit zur Zunahme der Knochenqualität und der Knochendichte kommt. Allerdings nimmt die anfänglich hohe Knochenbilanz über die Jahre langsam ab. Medikamentenbeispiele hierfür sind Bisphosphonate, Raloxifen, Östrogene, Kalzium und Vitamin D (Bartl 2011).

a) Vitamin D

Vitamin D₃ oder auch Cholecalciferol gilt als Prohormon und kann in der Haut mit Hilfe von UV-Licht gebildet oder über die Nahrung aufgenommen werden. Nach zwei Hydroxylierungen jeweils in der Leber und der Niere entsteht das Hormon Calcitriol. Calcitriol ist vor allem wichtig für die Kalziumresorption aus dem Darm. Es spielt aber auch eine Rolle im Knochenmetabolismus. In Kurzzeitstudien konnte gezeigt werden, dass das Hormon als Monotherapie für Osteoporose die Knochenbildung stimuliert und die Knochenresorption reduziert (Peppone et al. 2010). Am effektivsten ist allerdings die Kombination von Calciferol mit einem anderen Osteoporosemedikament. Dieses wurde in mehreren Studien bestätigt. Kombiniert man zum Beispiel das Hormon mit einer HRT, kann eine signifikant höhere BMD erreicht werden als mit einer HRT allein (Gallagher et al. 2001). Die DVO empfiehlt eine tägliche Gabe von 800-2000 IE Vitamin D, da bei rund 50% der Osteoporosepatienten eine Serum-25-Hydroxy-Vitamin-D-Konzentration von < 20 ng/ml vorliegt, was vermehrt mit Stürzen und Frakturen einhergeht (Pfeilschifter 2009).

b) Hormonersatztherapie (HRT)

Wie schon in 1.3.4.1 (S. 8) beschrieben, liegt der Osteoporose unter anderem ein Mangel an Sexualhormonen zu Grunde. Daher ist es naheliegend, dass der Verlust der Gonadenfunktion und damit der stetige Verlust an Knochenmasse durch eine Hormonersatztherapie ausgeglichen werden kann. Unter einer HRT versteht man eine Östrogen-Gestagen-Kombinationstherapie. Wie Östrogen wirkt wurde ebenfalls schon

in 1.3.4.1 (S. 8) aufgeführt. In der Tat wurde beschrieben, dass die Hormonersatztherapie zu einer signifikanten Zunahme der BMD führt (Writing Group for the PEPI Trial 1996). In der *Women's Health Initiative Study* konnte gezeigt werden, dass die langfristige Anwendung einer HRT das Risiko für Hüft-, Wirbel- und andere osteoporotische Frakturen signifikant senkt. Allerdings steigt unter dieser Therapie auch das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, invasiven Brustkrebs, thromboembolische Ereignisse und Schlaganfälle drastisch an (Rossouw et al. 2002). Daher sollte sich die HRT trotz ihrer hohen Effektivität nur auf möglichst wenige Jahre unmittelbar nach der Menopause beschränken.

c) Selektive-Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM)

Selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren wirken gewebespezifisch entweder agonistisch oder antagonistisch auf den Östrogen-Rezeptor. Ihre agonistische Wirkung wird demnach in der Osteoprosetherapie genutzt. Ihre antagonistische Wirkung spielt zum Beispiel in der Behandlung von Brustkrebs eine Rolle.

So kam Tamoxifen vor allem für die Prävention von Brustkrebs auf den Markt. Auf den Knochen wirkt es sich bei postmenopausalen Frauen positiv aus, indem es die BMD der Lendenwirbelsäule erhält und das Auftreten von Radius-, Hüft- und Wirbelsäulenfrakturen reduziert (Love et al. 1992, Fisher et al. 1998).

Für die Behandlung von Östrogen-Rezeptor-positiven Mammakarzinomen wird heute jedoch bevorzugt Raloxifen eingesetzt, da es sich nicht wie Tamoxifen stimulierend auf das Endometriumwachstum auswirkt (Black et al. 1994). Zur Osteoporosetherapie eignet es sich auf Grund seiner positiven Wirkung auf die BMD und der Frakturrisikoreduktion vor allem für vertebrale Frakturen. (Delmas et al. 1997, Ettinger et al. 1999).

d) Bisphosphonate

Bisphosphonate gehören zu den antiresorptiven Therapeutika. Ihre Wirkung beruht vor allem auf der Beeinträchtigung der Osteoklastenfunktion. Zunächst führen sie durch die Hemmung der H^+ -ATPase (Carano et al. 1990, David et al. 1996) und der lysosomalen Enzyme (Felix et al. 1976) zu einem verzögerten Auflösen der Hydroxylapatit-Kristalle, was die Knochenresorption erschwert. Des Weiteren induzieren diese Substanzen die Apoptose reifer Osteoklasten (Russell 2007) und inhibieren die weitere Osteoklastendifferenzierung (Löwik et al. 1988). Derzeit zugelassen sind die stickstoffhaltigen Bisphosphonate Alendronat, Ibandronat, Risedronat und Zoledro-

nat. Viele Studien haben gezeigt, dass diese Präparate die Frakturrate sowohl von Wirbelkörperfrakturen als auch von peripheren Frakturen vermindern (Pfeilschifter 2009). Das neueste und potenteste Bisphosphonat Zoledronat zeigte zum Beispiel in der HORIZON-Studie in 3 Jahren eine Risikoreduktion für neue Wirbelkörperfrakturen um 70% und für Hüftfrakturen um 41% (Black et al. 2007). Allerdings ist zu betonen, dass Bisphosphonate wie Alendronat die Frakturheilung bei Osteoporose verzögern (Cao et al. 2002, Kolios et al. 2010, Fu et al. 2013). Daher eignen sich diese Substanzen nicht als Behandlung einer osteoporotischen Fraktur.

e) PTH/Teriparatid (1-34)

Das Parathormon (PTH) ist eine 84 Aminosäuren langes Protein, was physiologischerweise kontinuierlich von den Zellen der Nebenschilddrüse produziert und sezerniert wird. Es dient der Regulation der Kalziumhomöostase (Rassow 2008). Bei einer intermittierenden medikamentösen Injektion zeigt PTH einen starken osteoanabolen Effekt. Am Menschen wurde dies erstmals von Reeve et al. (1980) beschrieben. Unter PTH kommt es zu einem kontinuierlichen Knochenzugewinn einschließlich einer signifikanten Zunahme der Trabekeldicke. In den Studien wird häufig das aminoterminal PTH-Fragment Teriparatid (1-34) eingesetzt. Teriparatid führt neben einer Zunahme der Trabekeldicke auch zu einer Steigerung der Trabekelvernetzung, was die biomechanische Kompetenz des Knochens verbessert (Hodsman et al. 2005). Beide Substanzen zeigten in Studien außerdem eine Reduktion des Frakturrisikos (Green-span et al. 2007, Neer et al. 2001). Zur Osteoporosetherapie und zur Frakturrisikoreduktion sind beide Präparate zugelassen (Pfeilschifter 2009).

f) Kalzitinin

Kalzitinin ist ein Hormon, das in den C-Zellen der Schilddrüse produziert wird, um die Kalzium-Homöostase zu regulieren. Den Angriffspunkt im Knochen liefern die Osteoklasten, welche in ihrer Beweglichkeit und Differenzierung und Fusion aus Vorläuferzellen gestört werden (Pondel 2000). Diese Funktion macht die Rolle des Kalzitonins als Osteoporosemedikament deutlich. In der Tat konnte in der PROOF-Studie gezeigt werden, dass Kalzitinin als Nasenspray (200 IE/d) verabreicht, das Risiko für neue Wirbelkörperfrakturen bei den postmenopausalen Frauen mit Osteoporose um 33% senken konnte (Chesnut et al. 2000). Die deutlich bessere Datenlage hinsichtlich der Frakturreduktion der Bisphosphonate schränkt jedoch den Einsatz von Kalzitinin zur Osteoporosetherapie ein (Bartl 2011).

g) *Strontiumranelat*

Strontiumranelat ist ein neuartiges, knochenaffines Medikament zur Osteoporosetherapie, das aus 2 Atomen stabilen nicht radioaktivem Strontium gebunden an Ranelicsäure besteht. Strontium gehört der Gruppe der Erdalkalimetalle an und weist somit ähnliche Eigenschaften wie Kalzium auf. Ranelicsäure wurde speziell entwickelt, um eine maximale Resorption der Substanz bei guter Verträglichkeit zu gewährleisten (Bartl 2011).

Der Nachteil der meisten Osteoporosemedikamente ist, dass sie entweder die Knochenbildung steigern oder die Knochenresorption hemmen. Strontiumranelat jedoch vereint beide Wirkungen. Es ist erwiesen, dass es *in vitro* sowohl einen osteoanabolen Effekt hat, indem es zum einen die Replikation von Osteoblastenprogenitorzellen fördert und zum anderen die Synthese von Kollagen und Nicht-Kollagen-Proteinen in Osteoblasten steigert (Canalis et al. 1996), als auch einen antiresorptiven Effekt aufweist, indem es die Osteoklasten beeinflusst. Die Osteoklastenwirkung beruht erstens auf einer Hemmung der Proosteoklastendifferenzierung, zweitens auf einer dosisabhängigen Hemmung der Resorptionsaktivität der Osteoklasten und drittens auf einer dosisabhängigen Hemmung der Expression von Carboanhydrase II und dem Vitronectin-Rezeptor (Baron und Tsouderos 2002). Man hatte Bedenken, dass Strontiumranelat Auswirkungen auf die Knochenmineralisierungszusammensetzung haben könnte. Es zeigte sich jedoch, dass es nur zu Bruchteilen in den Knochen eingebaut wird. Weniger als ein Kalziumion von 10 Kalziumionen pro Kristall wird durch Strontiumranelat ersetzt. Es hat somit in niedrigen Dosierungen keine nachteiligen Auswirkungen auf das mineralische Profil, auch längerfristig nicht (Boivin et al. 1996, Grynepas et al. 1996, Barbara et al. 2004). Strontiumranelat verbessert also, auch auf lange Zeit gesehen, die Knochenwiderstandskraft durch die Steigerung der Knochenmasse und durch eine Verbesserung der Mikroarchitektur durch eine Zunahme der Trabekelanzahl und der Kortikalisdicke, wobei die Knochensteifigkeit erhalten bleibt (Ammann et al. 2004). Bei postmenopausalen Frauen führt Strontiumranelat neben einer Erhöhung der Knochendichte auch zu einer Senkung des Frakturrisikos. Dies wurde in zwei großen Studien erwiesen. An der SOTI-Studie nahmen 1649 postmenopausale Frauen (über 50 Jahre) mit Osteoporose und einer bereits bestehenden Wirbelkörperfraktur teil. Unter Strontiumranelattherapie konnte im Vergleich zur Placebogruppe in den 3 Jahren Versuchsdauer eine Risikoreduktion für neue Wirbelkörperfrakturen von 41 % beobachtet werden (Meunier et al. 2004). In der TROPOS-Studie wurden 5091

postmenopausale Frauen mit Osteoporose untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass auch das Risiko für nichtvertebrale Frakturen unter Strontiumranelattherapie signifikant kleiner ist und zwar nach 3 Jahren um 16 % im Vergleich zur Placebogruppe (Reginster et al. 2005). Die Nebenwirkungen unterschieden sich in diesen Studien nicht wesentlich von der Placebogruppe. Gelegentlich kam es zu Übelkeit, Diarrhö und Kopfschmerzen und selten zu thromboembolischen Komplikationen (weniger als 0,7% der Fälle) (Bartl 2011).

1.4 Fraktur und Frakturheilung

Eine Fraktur, vor allem die Wirbelkörperfraktur, stellt oft das erste Symptom der Osteoporose dar und ist Folge der Ausdünnung der Knochen. Auf Grund des hohen Stellenwertes der Frakturen in der Osteoporoseproblematik, wurde als Schwerpunkt dieser Arbeit die Frakturheilung unter dem Medikament Strontiumranelat untersucht.

1.4.1 Besonderheit der osteoporotischen Fraktur

Die Fraktur ist eine akute Kontinuitätsunterbrechung des Knochens. Es gibt verschiedene Arten von Frakturen. Im Falle der Osteoporose spricht man von pathologischen Frakturen, da sie stets ohne adäquates Trauma erfolgen (Bartl 2011).

1.4.2 Formen der Frakturheilung

1.4.2.1 Direkte/primäre Frakturheilung

Die direkte Frakturheilung kann nur bei einer Versorgung des gebrochenen Knochens mit einer absolut stabilen Osteosynthese erfolgen. Es wird zwischen Kontaktheilung, bei der durch Kompression der Knochenfragmente aufeinander, der Frakturspalt durch regenerierende Osteone überbrückt wird und Spaltheilung, bei der kein direkter Knochenkontakt besteht und zunächst Geflechtknochen gebildet wird, unterschieden. Den beiden Formen ist gemeinsam, dass anders als bei der indirekten Knochenheilung sofort Knochen und kein Kallus gebildet wird (Berchtold 2008).

1.4.2.2 Indirekte/sekundäre Frakturheilung

Die indirekte Frakturheilung wird bei der Spontanheilung beziehungsweise bei der konservativen Knochenbruchbehandlung beobachtet. Die Knochenneubildung zeich-

net sich dabei durch endostale und periostale Kallusbildung aus. Sie lässt sich in vier Phasen unterteilen:

a) Entzündungsphase: 0-4 Wochen

Sie beginnt mit der Fraktur und der Ausbildung eines Frakturhämatoms, welches im Zuge dieser Phase durch einwachsende Fibroblasten und einwandernde Granulozyten und Mastzellen organisiert wird. Des Weiteren kommt es zu ausgeprägten Neovaskularisationen.

b) Granulationsphase (weicher Kallus): 3-8 Wochen

Von peripher nach zentral wird zunächst bindegewebiger Kallus gebildet, welcher den Frakturspalt überbrückt und später in chondro- und osteoblastäres Gewebe umgebaut wird. Nekrotisches Knochengewebe wird durch Osteoklasten abgebaut.

c) Phase der Kallushärtung: 6 Wochen – 4 Monate

Der Kallus wird nun mineralisiert und Geflechtknochen bildet sich belastungsorientiert aus.

d) Remodelingphase: 3-24 Monate

Die Frakturheilung endet mit der Umwandlung des Geflechtknochens in Lamellenknochen und der Wiederherstellung der ursprünglichen Knochenstruktur.

(Rössler und Rütter 2007, Siewert 2012)

1.4.3 Frakturheilung und Osteoporose

Es ist erwiesen, dass die Frakturheilung in osteoporotischen Knochen nicht nur verzögert (McCann et al. 2008), sondern auch beeinträchtigt abläuft. Das ist eine logische Folge, wenn man bedenkt, dass im osteoporosegeschädigten Knochen ein minderwertiger Aufbau und eine mangelhafte Mineralisation von Knochensubstanz erfolgt und auch im neu gebildeten Kallus eine fehlerhafte Struktur und Verknüpfung der Kollagenmoleküle vorliegt (Hao et al. 2007).

1.4.4 Frakturheilung im metaphysären Osteotomie-Modell

Ein Bruch der Metaphyse heilt für gewöhnlich direkt/primär mit endostaler Knochenbrücke und Mikrokallusbildung und nur mit dezenter periostaler Kallusbildung. Nur bei fehlender Fibulastabilität, zum Beispiel in Folge eines Fibulabruches, kommt es zu ausgeprägter periostaler Kallusbildung. Die, bei dem in 2.4 beschriebenen Osteotomie-Modell, verwendete Osteosyntheseplatte und der gewählte Osteotomiespalt von 0,5 mm lassen allerdings Mikrobewegungen zu, wodurch es trotzdem zu einer minimalen periostalen Kallusbildung und damit zum Teil zu einer indirekten/sekundären Frakturheilung kommt. Es ist bekannt, dass ein Spalt von 0,5 mm die Frakturheilung verkompliziert. Deswegen eignet sich dieses Modell für die Untersuchung der Wirkung bestimmter Stoffe wie zum Beispiel Strontiumranelat auf die Frakturheilung. Des Weiteren ist zu betonen, dass nur mit einem metaphysären Osteotomie-Modell die Frakturheilung bei Osteoporose optimal untersucht werden kann, da im klinischen Alltag osteoporotische Brüche der langen Röhrenknochen fast ausschließlich metaphysäre Frakturen sind (Stuermer et al. 2010).

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsablauf

Die Versuchsdauer erstreckte sich insgesamt über 13 Wochen. Es wurden 60 weibliche Ratten des Stammes Sprague-Dawley in 5 Gruppen, je 12 Tiere pro Gruppe, eingeteilt (Tab. 1). Der Versuch begann mit einer Ovariectomie, durch die bei den 3 Monate alten Ratten eine Osteoporose induziert werden sollte. Nach 8 Wochen führte man bei allen Tieren eine metaphysäre Osteotomie der Tibiae mit anschließender Osteosynthese durch. Nach weiteren 5 Wochen endete der Versuch mit der Obduktion der Tiere. Während der gesamten Versuchszeit verabreichte man den Ratten eine Standarddiät in Form von sojafreiem Futter (ssniff SM R/M, 10 mm-Pellets, ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland). Einige Tiere erhielten in den gruppenspezifischen Zeiträumen eine Spezialdiät in Form des Futterzusatzstoffes Strontiumranelat (Tab. 1). Die Futteraufnahme und das Tiergewicht wurden einmal pro Woche registriert. Die erste Gruppe diente als Kontrollgruppe (SHAM). Diese Ratten wurden scheinovarektomiert, erkrankten somit nicht an Osteoporose, erhielten aber wie alle anderen Tiere 8 Wochen nach Versuchsbeginn die Osteotomie. Die 12 Tiere der zweiten Gruppe (OVX) wurden nur ovariectomiert und osteotomiert, ohne Strontiumranelat zu erhalten. Die dritte Gruppe (Strontiumranelat vor Osteotomie) wurde ovariectomiert und osteotomiert und erhielt Strontiumranelat in den 8 Wochen zwischen der Ovariectomie und der Osteotomie. Die ovariectomierten Ratten der vierten Gruppe (Strontiumranelat nach Osteotomie) erhielten erst nach erfolgter Osteotomie das Strontiumranelat bis zum Ende des Versuchs. Und die fünfte Gruppe (Strontiumranelat vor und nach Osteotomie) schließlich bekam den Zusatzstoff ab dem Zeitpunkt der Ovariectomie vor und nach der Osteotomie.

Um die Kinetik der Frakturheilung untersuchen zu können, wurden den Ratten in den Wochen nach der Osteotomie zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Frakturheilung vier verschiedene Fluorochrome (XO, CG, AK, TC) appliziert.

Nach der Obduktion wurden die Tibiae vollständig freipräpariert. Es folgten schließlich biomechanische und morphologische Untersuchungen.

Die im Rahmen dieses Versuches durchgeführten Tierversuche wurden gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes von der Bezirksregierung Braunschweig ab dem 14.09.2011 ge-

nehmigt (G 11.560). Gefördert wurde dieses Projekt durch die Elsbeth-Bonhoff Stiftung mit dem Zuwendungsbescheid 70 vom 24.02.2011.

Tabelle 1: Darstellung der Gruppen und der Behandlung der Ratten

Gruppennummer	Gruppebezeichnung	Behandlung
1	SHAM	Scheinovarektomie + Osteotomie
2	OVX	Ovarektomie + Osteotomie
3	SR nach Osteo	Ovarektomie + Osteotomie + Strontiumranelatgabe im Zeitraum zwischen Osteotomie und Obduktion (5 Wochen)
4	SR vor Osteo	Ovarektomie + Osteotomie + Strontiumranelatgabe im Zeitraum zwischen Ovarektomie und Osteotomie (8 Wochen)
5	SR vor+nach Osteo	Ovarektomie + Osteotomie + Strontiumranelatgabe im Zeitraum zwischen Ovarektomie und Obduktion (13 Wochen)

2.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Der Versuch wurde mit 60 weiblichen Ratten des Stammes Sprague Dawley (Zuchtanstalt Fa. Winkelmann, Borken, Deutschland) begonnen. Davon starben ein Tier während der Ovarektomie und vier Tiere während der Osteotomie. Drei Ratten mussten nach der Obduktion auf Grund eines zu hohen Uterusgewichts und des damit verbundenen fraglichen Erfolges der Ovarektomie aus der Wertung genommen werden.

Die Tiere waren zu Beginn des Versuches drei Monate alt und hatten ein Durchschnittsgewicht von 264 g. Während der Versuchszeit wurden drei bis vier Ratten pro Käfig in speziellen Makrolon®-Käfigen vom Typ IV in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen gehalten. Die Reinigung erfolgte alle drei Tage. Sojafreies Futter und Wasser stand den Versuchstieren zur freien Verfügung. Den Futterzusatzstoff Strontiumranelat erhielten die Ratten in den entsprechenden Zeiträumen (Tab. 1). Bei dem Strontiumranelatfutter handelte es sich ebenfalls um sojafreies Futter, dem allerdings pro kg Futter 10,52 g Strontiumranelat beigemischt wurden. Einmal die Woche wurde das Restfutter gewogen und genau auf

1500 g wieder aufgefüllt. Damit konnte anschließend die durchschnittliche Futtermittelaufnahme pro Tag pro Tier ausgerechnet werden. Auch das Körpergewicht der Tiere wurde jede Woche registriert. Die Ratten wurden bei einer Raumtemperatur von 20°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55% gehalten. Ein Tag-Nacht-Wechsel wurde simuliert, indem alle 12 h die Beleuchtung an- bzw. ausgestellt wurde.

2.3 Ovariectomie

Zur Induktion der Osteoporose wurden 48 Tiere (ausgenommen Gruppe 1) ovariectomiert. Durch die Ovariectomie lässt sich bei den Ratten ein ähnlicher Knochen-schwund induzieren, wie er bei postmenopausalen Frauen auftritt (Kalu 1991).

Vor Beginn der Operation wurden die Ratten narkotisiert. Dazu erfolgte eine Sedierung mit CO₂, sowie eine intraperitoneale Injektion eines Gemischs aus 60 mg Ketamin (Medistar, Holzwickede, Deutschland) und 10 mg Xylazin (Riemser, Greifswald-Insel Riems, Deutschland).

Es erfolgte anschließend die Vorbereitung des Operationsgebietes, indem die laterale Partie zwischen Rippenbogen und Hinterläufen bilateral rasiert und desinfiziert wurde. Man setzte einen Hautschnitt im entsprechenden Gebiet paravertebral und präparierte in die Tiefe bis zum Peritoneum. Folglich wurde die Bauchhöhle eröffnet und das Ovar samt seiner angrenzenden Strukturen dargestellt. Zunächst unterband man die Tuba uterina und die zuführenden Gefäße, um anschließend den Eierstock scharf abzutrennen. Es erfolgten letztlich der Peritonealverschluss und der Muskelverschluss mit 4.0 Vicrylfäden (Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland). Die Haut wurde geklammert (Michel wound brackets 7,5 x 1,75 mm, Gebrüder Martin GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland). Man fuhr mit der kontralateralen Seite in gleicher Weise fort.

Des Weiteren bekam jedes Tier eine Nummer zugewiesen, um eine Identifikation während der Versuchszeit möglich zu machen. Dazu platzierte man einen elektronischen Chip im subkutanen Fettgewebe des Nackens.

Postoperativ applizierte man jedem Tier 3 ml einer isotonen Kochsalzlösung, um einem drohenden Wasserverlust vorzubeugen. Die Tiere wurden in einen mittels einer Wärmeplatte gewärmten Käfig gelegt und bis zum Erwachen beobachtet.

Während der Ovariectomie starb ein Tier aus der Gruppe Strontiumranelat nach Osteotomie, wodurch die Versuchstierzahl auf insgesamt 59 vermindert wurde.

2.4 Osteotomie und Osteosynthese

8 Wochen nach der Induktion der Osteoporose wurden nun 59 Ratten osteotomiert. Analog zur Ovariectomie erhielten die Tiere auch bei der Osteotomie eine Narkose (vgl. 2.3, S. 25). Zur weiteren Operationsvorbereitung rasierte man die Hinterbeine der Ratten und desinfizierte diese.

Als ersten Operationsschritt setzte man mit einem Skalpell einen 3 cm langen Hautschnitt über der medio-ventralen Tibia. Dann wurde der Knochen frei präpariert. Dazu durchtrennte man die Muskelfaszie und löste die Beugemuskulatur unter Schonung des Periosts von der Tibia ab, sodass nun die ventrale Tibiakante zum Vorschein kam. Mit dem Skalpell wurde nun die Osteotomielinie mittels einer Schablone markiert. Diese sollte ca. 7 mm distal des Tibiaplateaus liegen. Es folgte die Auflage einer 5-Loch-Leibinger-Platte aus Titan (57-05140 XS-Titanfixationsplatte T-Form 90°, Stryker Trauma, Selzach, Schweiz), sodass die Osteotomielinie genau mittig zwischen den zwei proximalen und den zwei distalen Bohrkanälen gelegen war. Anschließend wurde, mit Ausnahme des Bohrkanals über der Osteotomielinie, in die vorhandenen Bohrkanäle vorgebohrt und die Platte kurzzeitig mittels passender Schrauben leicht fixiert. Es erfolgte nun die temporäre Entfernung des Synthesematerials und damit die eigentliche Osteotomie. Dazu durchtrennte der Operateur unter Schonung des Weichgewebes den Knochen mit Hilfe von gepulstem Ultraschall (OT 7 Piezosurgery®, Mectron Medical Technology, Carasco, Italien) auf der markierten Osteotomielinie. Die Leibinger-Platte wurde erneut angebracht und in jeden vorbereiteten Bohrkanal eine Schraube eingedreht. Es verblieb ein standardisierter Osteotomiespalt von 0.5 mm gemäß des verwendeten OT 7 Piezosurgery®-Sägeblattes (Abb. 1).

Als letztes erfolgte die Readaptation der Beugemuskulatur mittels eines Vicryl 4.0 Fadens (Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) unter Schonung eines medial laufenden Gefäßstranges sowie die Klammerung (Michel wound brackets 7 x 1,75 mm, Gebrüder Martin GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) und Desinfektion (Braunovidon®, Bayer, Leverkusen) der Haut. Mit dem kontralateralen Hinterlauf wurde genauso verfahren.

Postoperativ wurden die Tiere in einen vorgewärmten Käfig gelegt. Außerdem erfolgte eine Applikation von 3 ml isotoner Natriumchlorid-Lösung sowie einmalig Decentan (5 mg/kg KG, Merck, Darmstadt, Deutschland) subkutan. Bis zum Erwachen wurden die Ratten beobachtet.

Als Schmerzmedikation erhielten die Tiere am Operationstag einmal und am 1. und 2. postoperativen Tag zweimal täglich Rimadyl (4 mg/kg KG, Pfizer, Karlsruhe, Germany) subkutan (Stuermer et al. 2010).

Bei der Osteotomie kam es zum Verlust von 2 Tieren aus der Gruppe Strontiumranelat nach Osteotomie und 2 Tieren aus der Gruppe Strontiumranelat vor und nach Osteotomie. Der Versuch wurde also mit 55 Ratten fortgesetzt.

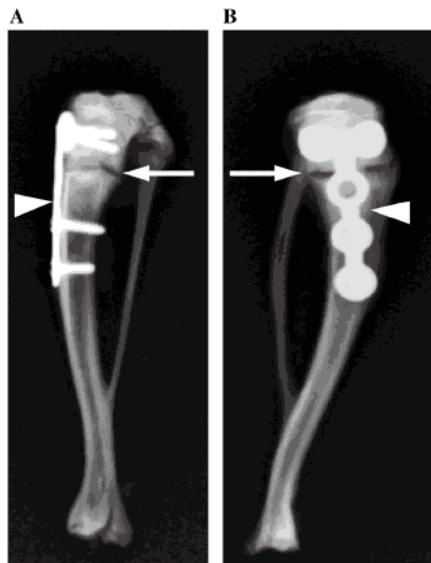


Abb. 1: Darstellung der korrekten Position der Osteotomie (Pfeil) und der Osteosyntheseplatte (Pfeilspitze); A=Osteosyntheseplatte von der Seite, B=Osteosyntheseplatte von vorne (Komrakova et al. 2010, S. 482)

2.5 Obduktion und Präparation

Der Versuch endete mit der Obduktion der Ratten 5 Wochen nach Osteotomie. Die Tiere wurden mittels Dekapitation getötet. Für diese Arbeit wurde nur eine der beiden Tibiae einer Ratte verwendet, welche man randomisiert auswählte. Dafür wurden die entsprechenden Unterschenkelknochen behutsam vom Knie- und Fußgelenk abgetrennt. Des Weiteren entfernte man das Osteosynthesematerial. Die Abpräparation des Weichgewebes erfolgte aus Zeitgründen zunächst nur grob. Dabei musste man sehr

behutsam vorgehen, um die zarte Fibula zu schonen. Zu einem späteren Zeitpunkt präparierte man die Knochen von jeder einzelnen Muskel- und Sehnenfaser fein säuberlich frei. Bis zu der Verwendung für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden die Tibiae in 5 ml Röhren bei -20 °C gelagert.

Die Aufbewahrung der anderen Tibia erfolgte für spätere Genuntersuchungen bei -80 °C. Des Weiteren entnahm man verschiedene Muskeln, die Wirbelsäule sowie die Femora der Tiere, welche in den anderen Versuchsteilen analysiert wurden.

2.6 Biomechanischer Test

2.6.1 Durchführung des biomechanischen Tests

Dieser Test diente der Auswertung der Steifigkeit und der Widerstandskraft der Kalluse der Tibiae. Es galt herauszufinden, ob Unterschiede hinsichtlich der Elastizität und der Streckgrenze zwischen den einzelnen Gruppen zu erkennen waren. Dazu übte man eine Kraft senkrecht auf die vordere Kante der Tibiametaphyse (1mm unterhalb der Osteotomielinie) aus. In einem Diagramm wurde während des Versuches die einwirkende Kraft gegen den Weg aufgetragen.

Zunächst mussten die Tibiae rund 15 min. im 5 ml Röhren auftauen.

Die Durchführung des Tests erfolgte mit einer Werkstoffprüfmaschine. (Typ 145660 Z020/TND Zwick/Roell, Ulm, Deutschland), welche mit Hilfe des Programms "testXpert®" (Zwick/Roell, Ulm, Deutschland) gesteuert wurde. Ein wichtiger Bestandteil der Maschine war eine speziell dafür entwickelte Trägerplatte für die Knochen, ein Metallblock mit zwei senkrecht zueinander stehenden Kerben und vier Schrauben zum individuellen Positionieren der Tibiae (Abb. 2). Die Knochen mussten so eingespannt werden, dass sie sich in Richtung ihrer Longitudinalachse zwar ausdehnen, aber seitlich nicht verrutschen konnten. Die Tibiae sollten sich also ohne Probleme herausheben lassen. Richtig positioniert, berührten sie genau an drei Stellen ihre Auflagefläche. Als Auflagepunkte dienten die beiden Kondylen, die in der einen Kerbe liegen sollten und die ehemalige distale tibiofibuläre Synosthose, die in der anderen Kerbe positioniert wurde.

Die zweite wichtige auch speziell entwickelte Vorrichtung war ein Rollenstempel mit zirkulärer Nut. Die vordere Tibiakante sollte während der Durchführung möglichst

genau in dieser Nut liegen. Nach dem korrekten Positionieren der Knochen auf der Trägerplatte, positionierte man diese unter der Stanze (Abb. 3).

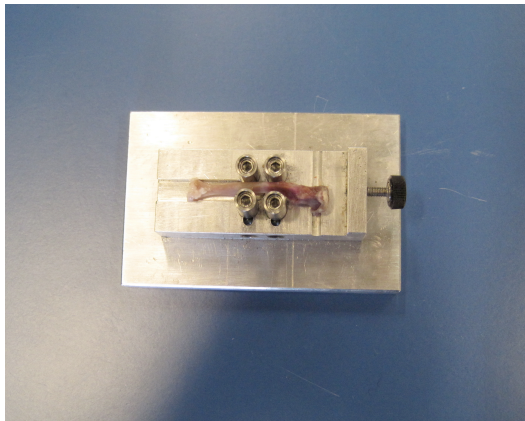


Abb. 2: Trägerplatte für die Tibiae

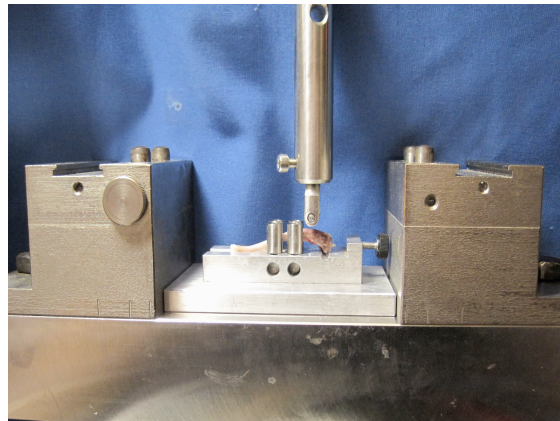


Abb. 3: Korrekte Position der Trägerplatte samt Tibia in der Werkstoffprüfmaschine

Eine ständige Befeuchtung mit NaCl verhinderte das Austrocknen der Tibiae während des Tests.

Der Rollenstempel wurde nun mit einer Geschwindigkeit von 50 mm/min abgesenkt. Nachdem eine Vorkraft von 1N erreicht wurde, sollte noch einmal die korrekte Lage der Tibia überprüft werden. Es erfolgt nun ein kontinuierliches Absenken des Rollenstempels, wodurch die einwirkende Kraft zunahm. Alle 0,1 mm Absenkung des Rollenstempels wurde die entsprechende Kraft von der Software registriert und gespeichert. Am Bildschirm konnte der Kurvenverlauf des Kraft-Weg-Diagramms direkt mit verfolgt werden. Da die Tibia nur gebogen aber nicht gebrochen werden sollte, wurde der Test automatisch abgebrochen, wenn es zu einem Abfall der Kurve über 2 N beziehungsweise zu einer Änderung des linearen Kurvenverlaufs von mehr als 2 mm kam (Stuermer et al. 2006).

Den Test führte man nun nacheinander mit jeder einzelnen Tibia durch.

2.6.2 Interpretation der Kraft-Weg-Diagramme

Im typischen Kraft-Weg-Diagramm ließen sich drei Phasen definieren. In der ersten Phase war ein linearer Anstieg zu beobachten (Abb. 4, Bereich a). Im Knochen kam es zur reversiblen Dehnung der Kollagenfasern. Dieser Vorgang wurde als elastische Deformation bezeichnet. Die zweite Phase begann mit der sogenannten Streckgrenze (*yield load*) und endete mit der Maximalkraft (Abb. 4, Bereich b). Die Kurve stieg in diesem Bereich nicht mehr linear an. In den Tibiae traten nun vereinzelt Mikrofraktu-

ren der Trabekel auf. Man sprach daher von einer plastischen Deformation. In der dritten Phase war ein Abfall der Kurve zu erkennen (Abb. 4, Bereich c). Es ereigneten sich zahlreiche Mikrofrakturen im Knochen, welche schließlich zu einem vollständigen Bruch führten (Stuermer et al. 2006). Den vollständigen Bruch des Knochens galt es jedoch zu verhindern, da die Tibiae für die folgenden Versuche unbrauchbar wären. Daher wurde der Versuch am Ende der zweiten Phase also nach Erreichen der Maximalkraft von der Software automatisch abgebrochen.

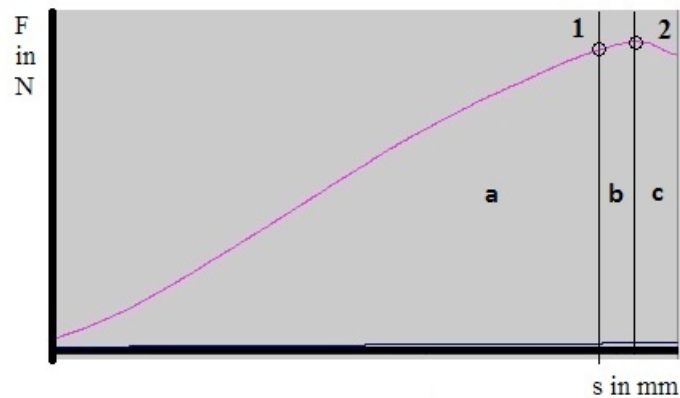


Abb. 4: typisches Kraft-Weg-Diagramm: a=elastische Deformation, b=plastische Deformation, c=beginnender Knochenbruch, 1=yield load, 2=Maximalkraft; Testgruppe SHAM

2.6.3 Messparameter

2.6.3.1 Elastizität

Die Elastizität der Tibiae ist ein Maß für die Steigung der Kurve im Kraft-Weg-Diagramm. Dieser Messparameter besitzt die Einheit N/mm.

Sie wird errechnet, indem man den Quotienten aus den Differenzen zweier Kraftwerte ($F_2 - F_1$) und entsprechender Wegwerte ($s_2 - s_1$) im linearen Teil der Kurve bestimmt.

2.6.3.2 Streckgrenze (yield load)

Als Streckgrenze ist der Wert definiert, an dem die Kurve im Kraft-Weg-Diagramm nicht mehr linear ansteigt und als Äquivalent im Knochen die Kollagenfasern maximal gedehnt sind. Sie bildet den Übergang von der elastischen zur plastischen Deformation.

Sie wird bestimmt, indem man eine Regressionsgerade und eine Standardabweichung aus den individuellen Daten des linearen Teils des Graphen berechnet. Der Wert, bei dem es zu einer Abnahme der Elastizität (Steigung) um mehr als das doppelte einer Standardabweichung kommt, wird als Streckgrenze definiert. Dieser Messparameter wird in N angegeben.

2.6.3.3 Maximalkraft (F_{max})

Die Maximalkraft ist die größte Kraft, der die Tibiae standhalten können. Nach Erreichen der Maximalkraft kommt es zum Abfall der Kurve. Dieser Messparameter wird in N angegeben (Stuermer et al. 2006).

2.6.4 Validierung

Um den Messfehler durch den Untersucher möglichst gering zu halten, sollte vor dem eigentlichen Test eine Validierung erfolgen. Dazu dienten 20 Tibiae aus 10 Testratten, die in Größe und Gewicht den Versuchstieren ähnelten. Nach dem Kennenlernen und Beherrschen der Arbeitsschritte der Methode wurden wie im eigentlichen Test die Messparameter Elastizität, Streckgrenze und Maximalkraft bestimmt. Die Einweisung in die Geräte und Arbeitsschritte und die Überprüfung der Ergebnisse erfolgte durch ein erfahrenes Mitglied der Arbeitsgruppe im Umgang mit der Methode. Nur wenn die Abweichung der Ergebnisse zwischen der linken und der rechten Tibia eines Tieres und der einzelnen Testtiere untereinander unter 10% lag, wurde der Test mit den Versuchstibiae durchgeführt.

2.7 Mikro-Computertomographie

Für die hochauflösenden Mikro-Computertomographien wurde ein „bench top“ Proben-CT der Marke „eXplore Locus SP“ (GE HealthCare, USA) eingesetzt. Die Proben wurden dabei mit den in Tabelle 2 dargestellten Parametern untersucht.

Insgesamt erfolgte die Ausführung von 18 Scans mit 54 Knochen.

Tabelle 2: Darstellung der Scanparameter des Scanprotokolls

Scan Parameter	Wert+Einheit
Röhrenspannung	72 kVp
Röhrenstrom	90 μ A
Anzahl der Projektionen (360° Scan)	900
Belichtungszeit Detektor	1600 ms
Scanmode	Vollrotation 360°
Detektorbinning	2x2
Effektive „voxel“-Größe	0.029 mm

2.7.1 Durchführung des Scans

Die Durchführung erfolgte in 4 Arbeitsschritten.

Arbeitsschritt 1: Vorwärmen der Röntgenröhre

Röntgenstrahlen werden in der hier verwendeten Röntgenröhre durch den Beschuss einer Metallanode mit beschleunigten Elektronen, emittiert aus einer Glühkathode, erzeugt. Beide Prozesse produzieren Wärme und verändern ihre Charakteristika im warmen Zustand. Um einen stabilen Fluss der Röntgenstrahlung zu erzielen und Beschädigung der Röhre durch abruptes An- und Ausschalten zu vermeiden, muss diese langsam angefahren werden. Dieser „Aufwärmvorgang“ dauerte ca. 15 Minuten.

Arbeitsschritt 2: Vorbereitung der Probe auf den Scan

Währenddessen konnte die Probe vorbereitet werden. Es wurden immer drei Tibiae gleichzeitig gescannt. Um die spätere Vergleichbarkeit der einzelnen Aufnahmen zu gewährleisten, wurde in jeden Scan ein Kalibrierungsphantom integriert. Dieses Phantom besteht aus 5 Einschlüssen verschiedener, dem System bekannter Materialien und kann benutzt werden, die Grauwerte der rekonstruierten Aufnahme in die Hounsfield-Skala umzuwandeln. Die Knochen wurden mit den Kondylen nach unten jeweils in einer Kammer des Probenhalters positioniert, um später die Metaphysen besser auswerten zu können. Jede Kammer war mit einer Einkerbung versehen, um im Folgenden die einzelnen Tibiae noch identifizieren zu können. Anders als beim herkömmlichen Personen-CT ist in diesem System Röntgenquelle und Detektor in Ruhe und die Probe rotiert um die eigene Achse. Bewegungen der Proben waren, auf Grund der langen Scanzeiten und der hohen Ortsauflösung des Systems, strikt zu vermeiden.

Daher wurden die Knochen in ihrer jeweiligen Kammer mit Hilfe von Schaumstoffstücken fixiert, welche nahezu transparent für Röntgenstrahlung sind und daher hervorragend eignen.

Arbeitsschritt 3: Scannen

Sobald das Vorwärmen abgeschlossen war, konnte die Probe im Gerät platziert und der Scan gestartet werden. Vor jedem Scan sollte zuerst noch eine Kalibrierung erfolgen. Dazu wurden 5 Luftbilder und 5 Dunkelbilder angefertigt. Auch die Höhe der Probe konnte optimal so eingestellt werden, dass die Tibiametaphysen und das Phantom gut zu sehen waren. Man erhielt schließlich 899 Bilder.

Arbeitsschritt 4: Rekonstruktion

Für die 3D-Rekonstruktion wurde ein klassischer „filtered back projection“ (FBP)-Algorithmus eingesetzt, welcher in die zugehörige Software des Systems integriert ist. Die Rekonstruktion erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde automatisch das gesamte Scanvolumen in einer „groben“ Qualität berechnet. Mit Hilfe des so genannten mini_vol und der Software GEHC MicroView (v2.1.2, GE Healthcare) konnten dann in 3D die Regionen für die einzelnen Knochen und für die Referenzmaterialien des Phantoms gewählt werden. Im zweiten Schritt erfolgte dann die Kalibrierung des Datensatzes durch Auswertung der Grauwerte der Referenzmaterialien und die nachfolgende Rekonstruktion der einzelnen Knochen.

2.7.2 Auswertung

Die Auswertung der erstellten dreidimensionalen Aufnahmen der Tibiae erfolgte mit Hilfe der dafür entwickelten Software 3 D Osteoanlyze v 1.000.4. Dieses Programm ermöglichte die 3D-Darstellung, die Analyse der Knochendichte und die Messung der Volumina der einzelnen Knochenkomponenten.

2.7.2.1 Arbeitsschritte

Arbeitsschritt 1: Anpassung der Transparenz und des Kontrasts

Um eine Vergleichbarkeit bei der Auswertung der unterschiedlichen Knochenproben zu gewährleisten, muss sowohl die 3D- als auch die 2D-Darstellung für jede einzelne Tibia angepasst werden. Die Visualisierung in der 3D-Darstellung ist wesentlich von der Transparenzfunktion abhängig. Die Anpassung der Transparenz führt dabei zu

einer optimalen Darstellung der Knochenstrukturen (Abb. 5 + Abb. 6). Analog dazu wurde die für die 2D Darstellung verwendete Kontrastfunktion, wie in Abb. 7 und Abb. 8 beschrieben, variiert.

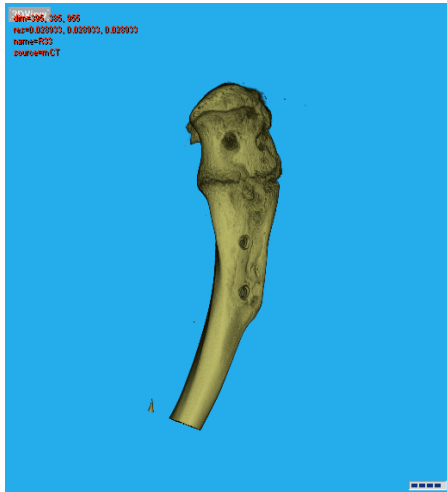


Abb. 5: 3D-Darstellung mit optimal angepasster Transparenz; Testgruppe SR nach Osteo

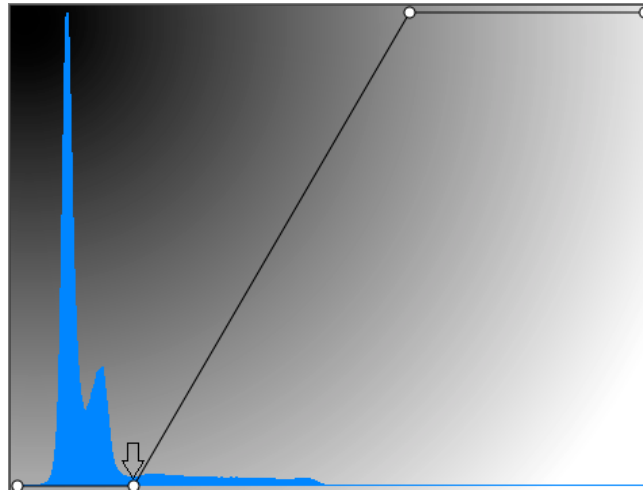


Abb. 6: zugehöriges Grauwerthistogramm mit optimal angepasster Transparenz: Pfeil bezeichnet den Punkt der verändert werden muss; Testgruppe SR nach Osteo



Abb. 7: 2D-Darstellung eines optimal angepassten Kontrasts; Testgruppe SR nach Osteo

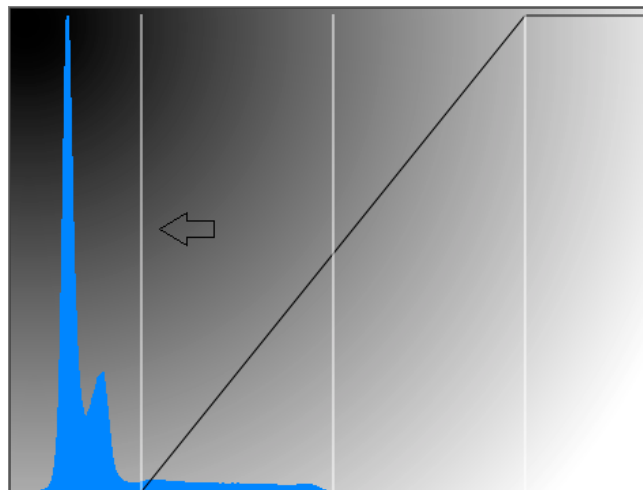


Abb. 8: zugehöriges Grauwerthistogramm mit optimal angepassten Kontrast: Pfeil bezeichnet die Linie, die verschoben werden muss; Testgruppe SR nach Osteo

Arbeitsschritt 2: Erstellung eines Messrahmens

Für die Knochenanalyse wurde nicht der gesamte Knochen verwendet, sondern nur ein spezifischer Bereich der Metaphyse. Dazu positionierte man einen standardisierten Messrahmen mit je 9 mm Länge und Breite und 4,5 mm Höhe im Bereich des ehemaligen Osteotomiespalts, sodass exakt je 2,25 mm über und unter der Osteotomielinie

im Messbereich lagen (Abb. 9). Die Tibiaanteile außerhalb des Messrahmens wurden nun entfernt.

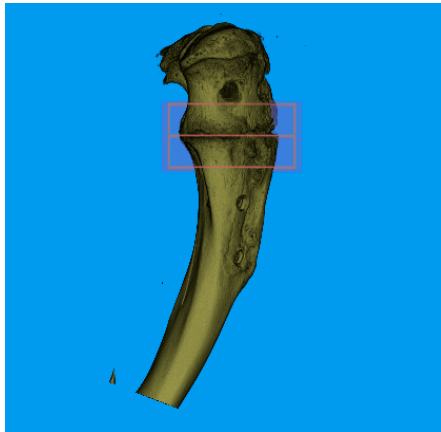


Abb. 9: korrekte Position des Messrahmens; Testgruppe SR nach Osteo

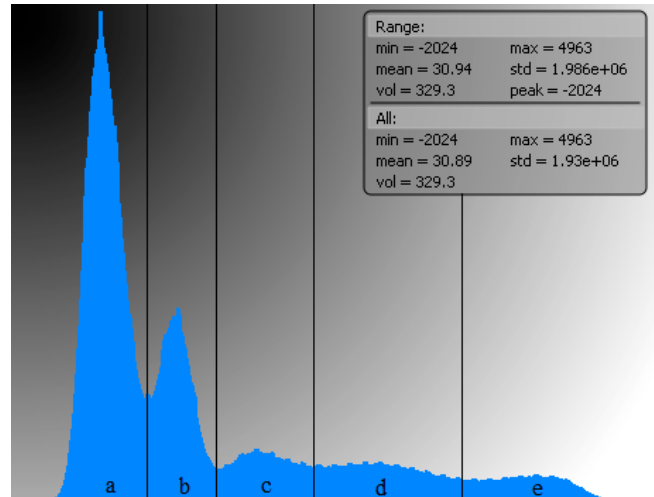


Abb. 10: typisches Grauwert-Histogramm: a=Luft, b= Probenhalter, c= weicher Kallus, d= harter Kallus, e= Kortikalis; Testgruppe OVX

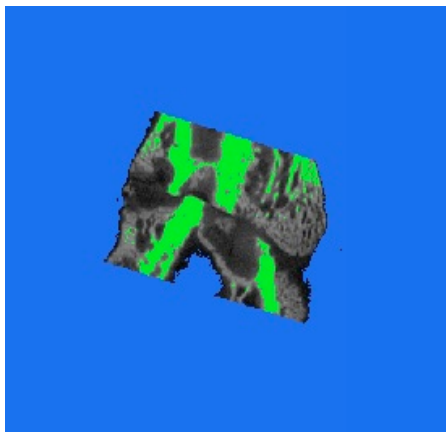


Abb. 11: visuelle Darstellung des eingegrenzten Grauwertbereichs am Beispiel der Kortikalis; Testgruppe OVX

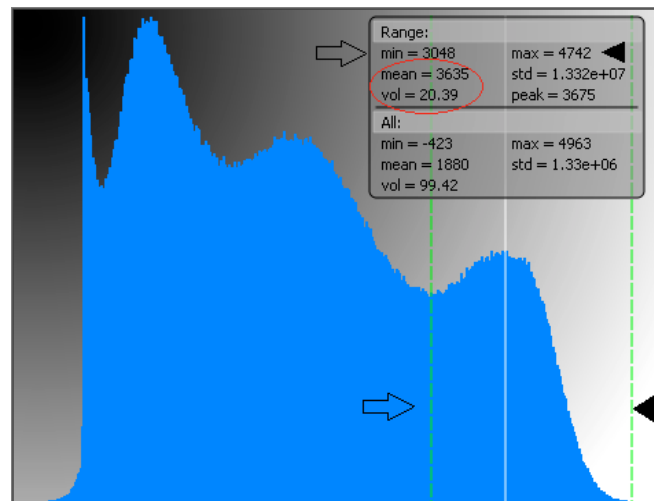


Abb. 12: Eingrenzung eines Grauwertbereichs am Beispiel der Kortikalis; Pfeil=unterer Schwellenwert (min), Pfeilspitze=oberer Schwellenwert (max), Kreis=Kortikalisdichte (mean)+Kortikalisvolmen (vol); Testgruppe OVX

Arbeitsschritt 3: Erstellen eines Grauwert-Histogramms

Mit Hilfe der Software ließ sich ein Grauwert-Histogramm erstellen. Die x-Werte stellen dabei die ansteigenden Helligkeitswerte (Röntgenschwächungswerte) und der jeweilige y-Wert die Anzahl der Bildpunkte, die in den entsprechenden Grauwertbereich fallen, dar. Von links nach rechts wurde das Gewebe also immer dichter und somit härter. Es bleibt darauf hinzuweisen, dass die Röntgenschwächungswerte ein

Maß der relativen Elektronendichte eines Materials und nicht dessen Massendichte darstellen und daher nicht direkt (ohne Kenntnis der Materialzusammensetzung) in Knochendichte umgerechnet werden können. Um auf die Mineralisierung des Knochens schließen zu können, muss daher immer ein Vergleich mit einem Kalibrierstandard aus ähnlichem Material (meist Hydroxylapatit) erfolgen (vgl. 2.7.3.3, S. 40). Im typischen Grauwert-Histogramm ergaben sich fünf Peaks entsprechend den fünf verschiedenen Materialien: Luft, Probenhalter, weicher (bindegewebiger) Kallus, harter (mineralisierter) Kallus und kortikaler Knochen (Abb. 10). Mittels des Programms blendete man nun die Dichten von Luft und Probenhalter aus, um nur die Dichten des Knochens auszuwerten. Um jeden Dichtebereich des Knochens einzeln analysieren zu können, konnte man jedem Grauwertbereich manuell einen unteren und einen oberen Schwellenwert zuordnen (Abb. 12) und diesen dadurch im 2D-Bild visualisieren (Abb. 11). Der jeweilige Bereich färbte sich entsprechend grün. Für jeden abgegrenzten Grauwertbereich errechnete das Programm unter anderem die mittlere Dichte und das Volumen (Abb. 12). Nur diese Werte waren für die Auswertung relevant.

2.7.2.2 Auswertungsstrategien

Um die Auswertung standardisiert durchführen zu können, wurden folgende zwei Auswertungsmethoden verwendet.

Auswertungsstrategie 1: Auswertung mit definierten Schwellenwerten

Weicher Kallus und harter Kallus konnten manchmal, insbesondere in der SHAM-Gruppe, nicht klar voneinander abgegrenzt werden, deswegen wählte man für die erste Methode definierte untere Schwellenwerte für die Grauwertbereiche Kortikalis sowie harter und weicher Kallus. Ermittelt wurden die definierten unteren Schwellenwerte folgendermaßen. Aus jeder Gruppe wählte man zwei Tibiae aus, bei denen in den erstellten Grauwert-Histogrammen alle drei Grauwertbereiche in Form von Peaks gut zu erkennen waren. Anschließend wurde in jedem Grauwert-Histogramm der untere Schwellenwert zunächst genau zwischen den Kortikalispeak und den Peak des harten Kallus verschoben und der Wert abgelesen und notiert (Abb. 13, Markierung a). Dann verschob man in gleicher Weise den unteren Schwellenwert genau zwischen den Peak des harten und den Peak des weichen Kallus und danach schließlich zwischen den Peak des weichen Kallus und den restlichen Grauwertbereich des Probenhalters und notierte sich jeweils die Werte (Abb. 13, Markierung b+c). Man erhielt also bei fünf Versuchsgruppen für jeden Grauwertbereich 10 untere Schwellenwerte,

aus denen nun der Mittelwert gebildet wurde. Diese Mittelwerte galten nun als die definierten unteren Schwellenwerte für die einzelnen Grauwertbereiche. Mit diesen definierten Werten wurde dann jede einzelne Tibia ausgewertet (Tab. 3).

Die oberen Schwellenwerte mussten nicht definiert werden, da immer der untere Schwellenwert eines Grauwertbereichs dem oberen Schwellenwert des angrenzenden Grauwertbereichs entsprechen musste. Der obere Schwellenwert für den Kortikalisbereich entsprach dem Ende der Datenkurve (Abb. 13).

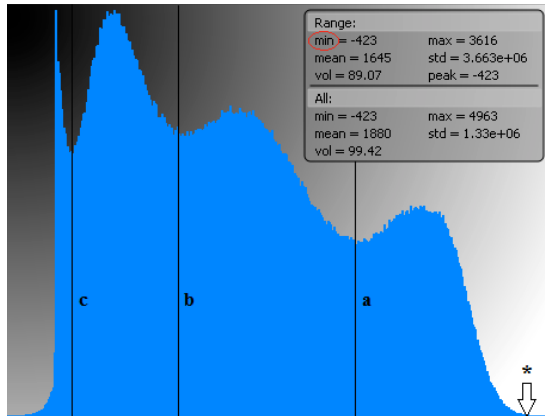


Abb. 13: Beispiel für das Finden der unteren Schwellenwerte bei einer der ausgewählten Ratten: a=unterer Schwellenwert Kortikalis, b=unterer Schwellenwert harter Kallus, c=unterer Schwellenwert weicher Kallus, Kreis=Wert, der jeweils abgelesen werden muss, *=Ende der Datenkurve; Testgruppe OVX

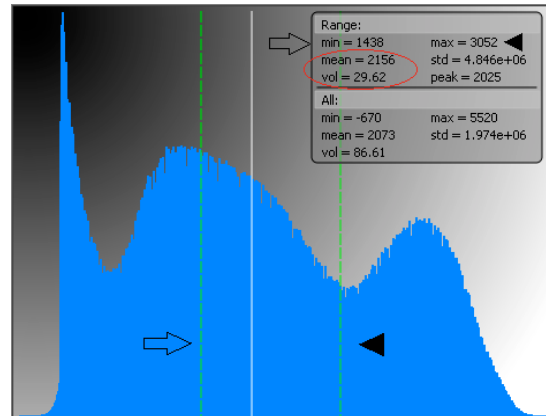


Abb. 14: Beispiel für die Anwendung des gefundenen unteren Schwellenwertes für den harten Kallus: Pfeil=unterer Schwellenwert (min), Pfeilspitze=oberer Schwellenwert (max), Kreis=Dichte harter Kallus (mean)+Volumen harter Kallus (vol); Testgruppe SR vor Osteo

Um die Dichte und das Volumen des gesamten Kallus und des gesamten Knochengewebes zu ermitteln, wählte man für den Kallus als unteren Schwellenwert den unteren Schwellenwert des Grauwertbereichs des weichen Kallus und als oberen Schwellenwert den oberen Schwellenwert des harten Kallus. Für das gesamte Knochengewebe wurde als unterer Schwellenwert der untere Schwellenwert des Grauwertbereichs des weichen Kallus und als oberer Schwellenwert der obere Schwellenwert des Kortikalisbereichs gewählt.

Abbildung 14 stellt ein Anwendungsbeispiel für den definierten Schwellenwert des harten Kallusbereichs dar. In diesem Grauerthistogramm waren nicht alle drei Grauwertbereiche gut zu erkennen. Für die Abgrenzung des weichen Kallus verschob man also den unteren Schwellenwert auf ca. 1435 (eine genauere Einstellung war leider nicht möglich) und den oberen Schwellenwert auf ca. 3046. Die Dichte (2156

GVal) und das Volumen (29,62 mm³) dieses Bereichs konnten abgelesen und in eine Exceltabelle übertragen werden.

Tabelle 3: Darstellung der ermittelten definierten unteren Schwellenwerte

Unterer Schwellenwert für den Grauwertbereich der Kortikalis (GVal)	Unterer Schwellenwert für den Grauwertbereich des harten Kallus (GVal)	Unterer Schwellenwert für den Grauwertbereich des weichen Kallus (GVal)
3046	1435	184

Auswertungsstrategie 2: Peakorientierte Auswertung

Der Kortikalis-Peak ließ sich stets in jedem Histogramm gut erkennen. Deshalb bestand die andere Methode darin, den kortikalen Knochen peakorientiert vom restlichen Knochengewebe abzugrenzen. Es wurde dabei nicht mehr zwischen dem weichen und dem harten Kallus unterschieden. Auch die Abgrenzung des restlichen Knochengewebes vom Grauwertbereich des Probenhalters erfolgte peakorientiert. Für die Eingrenzung des Kortikalisbereichs setzte man also den unteren Schwellenwert genau zwischen den Kortikalispeak und den/die Peak(s) des restlichen Gewebes und den oberen Schwellenwert ans Ende der Datenkurve und notierte sich die Werte (Abb. 15).

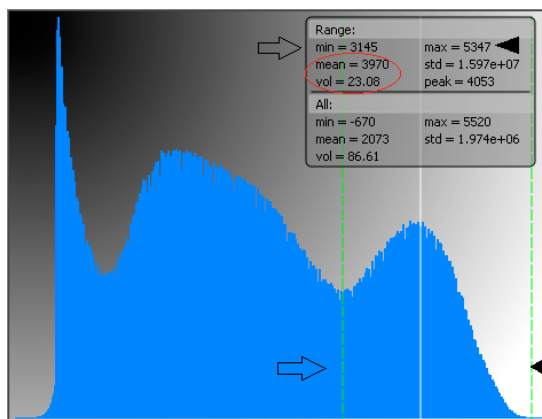


Abb. 15: Beispiel für die Eingrenzung des Kortikalisbereichs peakorientiert:
 Pfeil=unterer Schwellenwert (min),
 Pfeilspitze=oberer Schwellenwert (max),
 Kreis=Kortikalisdichte (mean)+Kortikalisvolumen (vol); Testgruppe SR vor Osteo

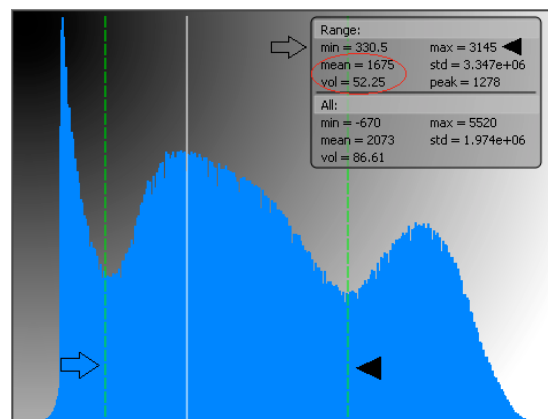


Abb. 16: Beispiel für die Eingrenzung des Bereichs des restlichen Knochengewebes:
 Pfeil=unterer Schwellenwert (min),
 Pfeilspitze=oberer Schwellenwert (max),
 Kreis=Dichte restliches Gewebe (mean)+Volumen restliches Gewebe (vol); Testgruppe SR vor Osteo

Für die Eingrenzung des Bereichs des restlichen Gewebes wurde der untere Schwellenwert genau zwischen den/die Peak(s) des restlichen Gewebes und den Grauwertbereich des Probenhalters verschoben. Der obere Schwellenwert des restlichen Gewebes entspricht dem unteren Schwellenwert des Kortikalisbereichs (Abb. 16).

Die Schwellenwerte wurden somit für jede Tibia individuell gewählt. Die Dichte und das Volumen des gesamten Knochengewebes wurden gemäß der Auswertungsstrategie 1 bestimmt.

2.7.3 Messparameter

2.7.3.1 Auswertung mit definierten Schwellenwerten

Tabelle 4: Darstellung der Messparameter der Auswertung mit definierten Schwellenwerten mit Einheit und Bedeutung

Messparameter	Einheit	Bedeutung
Mittlere Kortikalisdichte	GVal	Mittelwert der ermittelten Dichtewerte im Bereich * bis a in Abb. 13
Kortikalisvolumen	mm ³	Volumen im Bereich * bis a in Abb. 13
Mittlere Dichte harter Kallus	GVal	Mittelwert der ermittelten Dichtewerte im Bereich a bis b in Abb. 13
Volumen harter Kallus	mm ³	Volumen im Bereich a bis b in Abb. 13
Mittlere Dichte weicher Kallus	GVal	Mittelwert der ermittelten Dichtewerte im Bereich b bis c in Abb. 13
Volumen weicher Kallus	mm ³	Volumen im Bereich b bis c in Abb. 13
Mittlere Dichte gesamter Kallus	GVal	Mittelwert der ermittelten Dichtewerte im Bereich a bis c in Abb. 13
Volumen gesamter Kallus	mm ³	Volumen im Bereich a bis c in Abb. 13
Mittlere Dichte total	GVal	Mittelwert der ermittelten Dichtewerte im Bereich * bis c in Abb. 13
Volumen total	mm ³	Volumen im Bereich * bis c in Abb. 13

2.7.3.2 Peakorientierte Auswertung

Tabelle 5: Darstellung der Messparameter der peakorientierten Auswertung mit Einheit und Bedeutung

Messparameter	Einheit	Bedeutung
Mittlere Kortikalisdichte	GVal	Mittelwert der ermittelten Dichtewerte im in Abb. 15 dargestellten Bereich
Kortikalisvolumen	mm ³	Volumen im in Abb. 15 darstellten Bereich
Mittlere Dichte gesamter Kallus	GVal	Mittelwert der ermittelten Dichtewerte im in Abb. 16 dargestellten Bereich
Volumen gesamter Kallus	mm ³	Volumen im in Abb. 16 darstellten Bereich
Mittlere Dichte total	GVal	Mittelwert der ermittelten Dichtewerte im Bereich Pfeil (Abb. 16) bis Pfeilspitze (Abb. 15)
Volumen total	mm ³	Volumen im Bereich Pfeil (Abb. 16) bis Pfeilspitze (Abb. 15)

2.7.3.3 Errechnung der BMD aus den ermittelten Dichtewerten

Da die Knochendichte typischerweise als BMD angegeben wird, erfolgte die Umrechnung der GValues in Massendichte. Dazu diente ein Phantom (QRM, Bayern) mit fünf Kammern, welche mit Hydroxylapatit unterschiedlicher, bekannter Dichte bestückt waren. Dieses Phantom wurde mit dem gleichen Protokoll, welches man auch für die Knochen verwendete, gescannt und rekonstruiert (vgl. 2.7.1, S. 32) und jede einzelne Kammer mit der Software 3 D Osteoanalyse v 1.000.4 ausgewertet (vgl. 2.7.2.1, S. 33). Der Messrahmen betrug hier 1 mm x 1 mm. Die oberen und unteren Schwellenwerte entsprachen den Enden der Datenkurve. Für die einzelnen Massendichten ergaben sich folgende GValues (Tab. 6).

Tabelle 6: Darstellung der Phantomdichten und den entsprechenden Dichten in GVal

Dichte in mg/cm^3	Dichte in GVal
200	807
400	1677
600	2441
800	3134
1000	3850

Diese Werte wurden in ein Diagramm übertragen und es wurde mittels linearer Regression die Ausgleichsgerade bestimmt (Abb. 17).

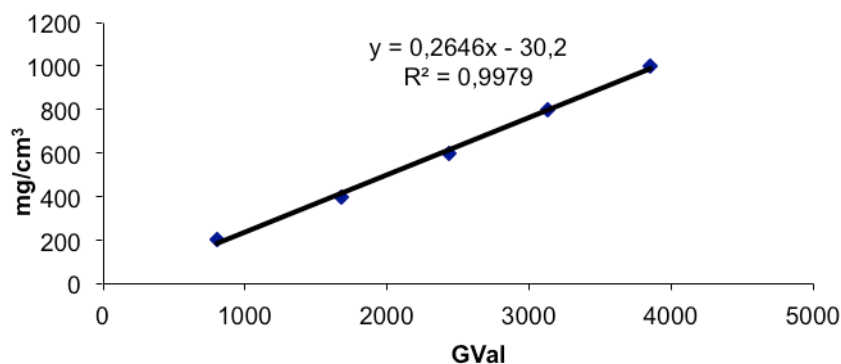


Abb. 17: Darstellung der linearen Regression mit Regressionsgleichung und Korrelationskoeffizient

Es ergab sich also folgende Umrechnungsgleichung:

$$y = m * GVal + b$$

für die Parameter

y = BMD in mg/cm³

m = 0,2646

GVal = Dichte in GVal (Rohdaten der Knochenanalyse)

b = - 30,2

2.7.3.4 Berechnung Bone Volume über Total Volume (BV/TV)

Unter BV/TV versteht man den Anteil an mineralisiertem Knochen am Gesamtvolumen des Knochens. Diese Messgröße wird für gewöhnlich in % angegeben. Die Bezeichnung dieser Messgröße erfolgte entsprechend der ASBMR-Nomenklatur (Parfitt et al. 1987). Die Berechnung konnte mittels der Rohdaten erfolgen. Dabei verwendete man folgende Formel:

$$BV/TV = \text{Kortikalisvolumen/Gesamtvolumen} \times 100\%$$

2.7.4 Validierung

Zum Kennenlernen und Beherrschen der Software 3 D Osteoanalyse v 1.000.4 wurden zunächst 5 Versuchstibiae randomisiert ausgewählt und ausgewertet. Auf Grund der Neuheit der Methode und der dadurch noch nicht vollständig entwickelten Auswertungstaktik, wurden in der Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Christian Dullin (Abteilung Radiologie, Universitätsmedizin Göttingen) auf der Grundlage der Daten die in 2.7.2.2 (S. 36) beschriebenen Auswertungsstrategien entwickelt und angewandt.

2.8 Mikroradiographie

2.8.1 Herstellung der histologischen Schnitte und der Mikroradiographien

An die erfolgte mCT-Analyse schloss sich die histologische Untersuchung an. Dazu mussten zunächst histologische Schnitte angefertigt werden. Als ersten Arbeitsschritt erfolgte eine Entwässerung und Entfettung der Tibiae. Dazu führte man die Knochen für eine bestimmte Zeit einer Alkoholreihe zu. Sie wurden 4 Tage in 70 %igen, 3 Tage in 80 %igen, 8 Tage in 96%igen Ethanol, 3 Tage in ein 1:1 Gemisch aus 96%igen

Ethanol und Methylmethacrylsäure (MMA) und für weitere 3 Tage in reine MMA eingelegt.

Anschließend bettete man jede Tibia für sich in sogenannten Rollrandflaschen mit einem Fassungsvermögen von 40 ml ein. Hinzugefügt wurde ein Gemisch aus 1000 ml MMA, 200 ml Dibutylphtalat und 29 g Benzoylperoxid. Bis zur vollständigen Aushärtung galt es dann, 3 Wochen abzuwarten.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden nun 150 µm dicke sagittale Schnitte mittels einer Innenlochsäge (Leica SP 1600 Sägemikrotom, Bensheim, Deutschland) angefertigt. Für die Auswertung wählte man drei aufeinanderfolgende, knochenmittige Präparate aus.

Von den ausgewählten Schnitten wurden schließlich die Mikroradiographien mittels eines Faxitron-Röntgengerätes (Modell-Nr. 43855A, Faxitron X-ray system, Hewlett-Packard, San Diego, USA) auf einem Kodak Professional Film (INDUSTREX SR45 Film ISO 9002, Rochester, New York) angefertigt. Belichtet wurde über 3 Minuten bei einer Röhrenspannung von 10 kV und einer Stromstärke von 0,3 mA.

2.8.2 Auswertung der Mikroradiographien

2.8.2.1 Apparaturen und Software

Für die Auswertung wurde das Leica Stereomakroskop (MZ 7-5, Bensheim, Deutschland) und die Software Leica Quantimet Qwin 2003 (Leica, Bensheim, Deutschland) verwendet. Durch eine am Makroskop installierte Kamera (Leica DFC 490, Bensheim, Deutschland) konnten die Bilder direkt auf den Computer (Intel Pentium 4, 2.6GHz) übertragen werden.

Es wurde standardisiert mit folgenden Einstellungen am Makroskop gearbeitet, die auf Grund von diversen Vorversuchen als optimal befunden wurden. Man arbeitete mit einer 10-fachen Vergrößerung (1,0er Objektiv) und einer geringen Blendenöffnung. Dazu wählte man die Schalterposition B der mechanischen Blende, wobei Schalterposition A die minimalste und Schalterposition E die maximalste Blendenöffnung bedeutete. Die Belichtung erfolgte mittels einer Kaltlichtlampe (Leica KL 1500 LCD, Bensheim, Deutschland) mit einer Betriebstemperatur von 3000 K. Es war außerdem darauf zu achten, die Auswertung in einem abgedunkelten Raum durchzuführen, da sonst Störungen im Bild und somit eine Verfälschung der Werte entstehen konnten.

2.8.2.2 Arbeitsschritte

Arbeitsschritt 1: Beurteilung der Auswertbarkeit der Mikroradiographien

Zunächst mussten die drei zentralen Mikroradiographien einer Tibia unter dem Makroskop auf ihre Auswertbarkeit überprüft werden. Dabei schaute man, ob die Kortikalis klar und deutlich definiert werden konnte. Einige Bilder wiesen zum Beispiel proximal der Osteotomie gar keine Kortikalis auf, andere wiederum zu viel in Form von einer breiten Kortikalisfläche bei zu weit peripheren Schnitten. Solche Mikroradiographien wurden auf Grund drohender Verfälschung der Werte aussortiert.

Arbeitsschritt 2: Positionieren der Mikroradiographien unter dem Makroskop

Jedes Bild für sich wurde immer in gleicher Weise unter dem Makroskop platziert. Dabei sollte die plattennahe kallusarme Tibiavorderseite links, die plattenferne meist kallusreichere Tibiarückseite rechts, der proximale Anteil oben und der distale Anteil unten zu liegen kommen. Wie bereits beschrieben, wurde das makroskopische Bild direkt auf den Computer übertragen (Abb. 18). Am Monitor sollte nun der Knochen im vorgegebenen Messrahmen (2 mm vertikal, 5 mm horizontal) zentriert und die untere Kante des Osteotomiespalts auf einer vorgegebenen Orientierungslinie positioniert werden.

Arbeitsschritt 3: Optimierung der Bildschärfe und des Kontrasts

Die Bildschärfe konnte mit dem entsprechenden Regler am Makroskop optimiert werden. Eine optimale Kontrasteinstellung wurde durch die Software ermöglicht.

Arbeitsschritt 4: Graudetektion

Der folgende Arbeitsschritt beinhaltete die Graudetektion. Dabei sollten alle Knochenstrukturen durch die Software erfasst werden. Eine manuelle Nachdetektion war meist erforderlich, wobei eine leichte Überdetektion erlaubt war (Abb. 19).

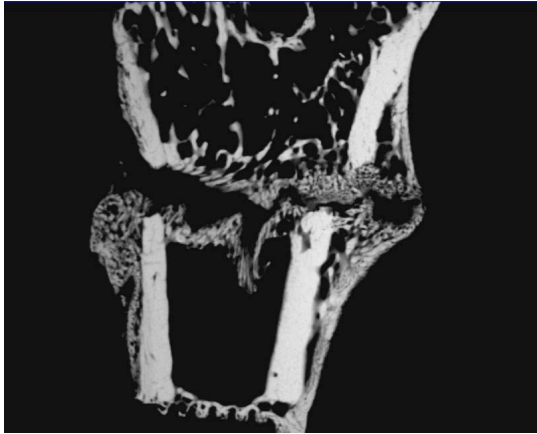


Abb. 18: Korrekte Position der Tibiae unter dem Makroskop; Testgruppe SR vor Osteo

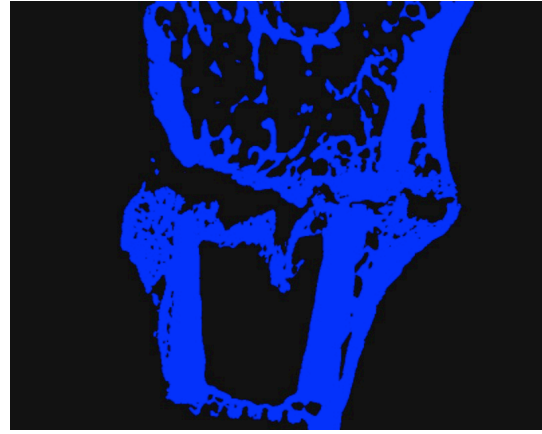


Abb. 19: Graudetektion bei leichter Überdetektion; Testgruppe SR vor Osteo

Arbeitsschritt 5: Flächendefinition

Nun mussten die einzelnen Kompartimente des Knochens voneinander abgegrenzt werden (Abb. 20). Dazu umkreiste man die jeweilige Fläche mit der Maus. Dabei bestand auch die Möglichkeit, nicht miteinander verbundene Flächenanteile jede für sich zu umfahren, um diese dann später zu einer Gesamtfläche zu verbinden. Eine versehentliche doppelte Auswahl einer Fläche oder eines Flächenanteils wurde durch die Software verhindert. Folgende Knochenbestandteile wurden, vorgegeben durch das Programm, nacheinander bestimmt:

a) Gesamter Knochen inklusive Kallus: Dabei umrandete man den gesamten Knochen ein Stück weit über den Messrahmen hinaus.

b) Kortikalis proximal/ plattennah: Dabei handelte es sich um die vordere proximal des Osteotomiespalts gelegene Kortikalis.

c) Kortikalis proximal/plattentfern: Es wurde die hintere, distal des Osteotomiespalts gelegene Kortikalis ausgeschnitten.

d) Kortikalis distal/plattennah: Dabei grenzte man die vordere Kortikalis distal des Osteotomiespalts vom restlichen Knochengewebe ab.

e) *Kortikalis distal/plattentfern*: Es wurde die hintere Kortikalis distal des Osteotomiepalts vom restlichen Gewebe abgegrenzt.

f) *Kallus plattennah*: Standardisiert definierte man den Kallus an den Vorderseiten der Tibiae, indem man die plattennahe proximale Kortikalis mit der plattennahen distalen Kortikalis mittig durch eine Linie verband. Das Gewebe ventral dieser Grenzlinie und ventral der genannten Kortikalis bezeichnete man als plattennahen Kallus.

g) *Kallus plattentfern*: In gleicher Weise wurde der hintere Kallus von der proximalen und distalen plattentfernen Kortikalis abgegrenzt.

h) *Endostaler Kallus*: Als endostalen Kallus bezeichnete man das Kallusgewebe im Inneren des Knochens. Ventral und dorsal wurde er bereits von dem plattennahen und plattentfernen Kallus abgegrenzt. Nach kranial und kaudal schnitt man den endostalen Kallus vom Trabekelwerk ab. Dabei konnte das Kallusgewebe durch seine kompaktere Struktur gut von den Trabekeln unterschieden werden.

i) *Proximale Trabekelfläche*: Das proximale Trabekelwerk war nun schon indirekt definiert. Es wurde nach ventral und dorsal von der proximalen plattennahen und plattentfernen Kortikalis und nach kranial und kaudal durch das Ende des Messrahmens und den endostalen Kallus begrenzt.

j) *Distale Trabekelfläche*: In gleicher Weise wurde auch das distale Trabekelwerk definiert.

Arbeitsschritt 6: Dickenbestimmung von Kortikalis und Kallus

Die Messlinien sollten dabei über die jeweilige Fläche hinaus gezeichnet werden (Abb. 21). Gewertet wurde durch die vorherige Flächendefinition nur der Bereich in der jeweiligen Fläche. Die Reihenfolge der einzelnen Arbeitsschritte wurde ebenfalls wieder durch die Software vorgegeben.

a) *Kortikalisdicke distal/plattennah*: Die Kortikalisdicke bestimmte man durch fünf parallele Messlinien vertikal zur Längsachse der zu messenden Kortikalis nahe des Osteotomiepalts.

b) *Kortikalisdicke distal/plattenfern*: vgl. a)

c) *Kallusdicke plattennah*: Man zeichnete hierfür mehrere parallele Messlinien in die gesamte Fläche des vorderen Kallus.

d) *Kallusdicke plattenfern*: In gleicher Weise wurde mit dem hinteren Kallus verfahren.

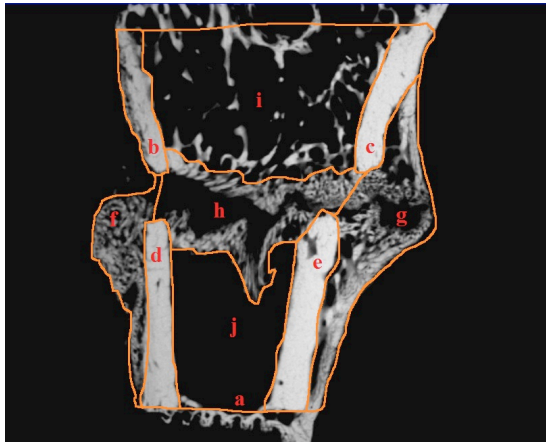


Abb. 20: Flächendefinition: a=Gesamter Knochen inklusive Kallus, b=Kortikalis proximal/ plattennah, c=Kortikalis proximal/ plattenfern, d=Kortikalis distal/ plattennah, e=Kortikalis distal/ plattenfern, f= Kallus plattennah, g=Kallus plattenfern, h=endostaler Kallus, i=proximale Trabekelfläche, j= distale Trabekelfläche; Testgruppe SR vor Osteo

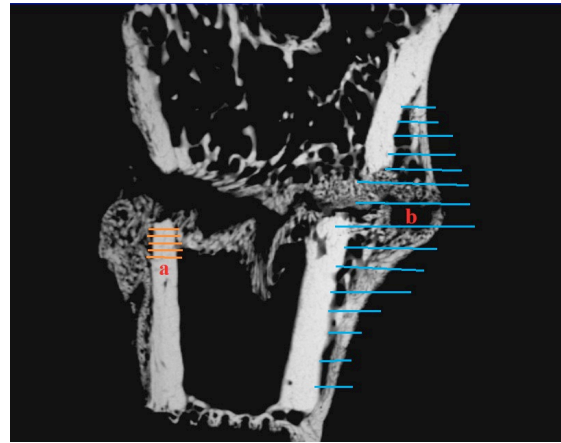


Abb. 21: Dickenbestimmung: a=Kortikalisdicke, b=Kallusdicke; Testgruppe SR vor Osteo

2.8.3 Messparameter

2.8.3.1 Kortikalis

Tabelle 7: Messgrößen Kortikalis mit Einheit und Bedeutung

Messgröße	Einheit	Bedeutung
Kortikalisdicke distal plattennah	mm	Mittelwert der fünf Messlinienbeträge aus Arbeitsschritt 6a)
Kortikalisdicke distal plattenfern	mm	Mittelwert der fünf Messlinienbeträge aus Arbeitsschritt 6b)
Kortikalisdichte distal plattennah	%	Anteil an mineralisiertem Knochen bezogen auf die plattennahe distale Kortikalisfläche
Kortikalisdichte distal plattenfern	%	Anteil an mineralisiertem Knochen bezogen auf die plattenferne distale Kortikalisfläche

2.8.3.2 Kallus

Tabelle 8: Messgrößen Kallus mit Einheit und Bedeutung

Messgröße	Einheit	Bedeutung
Kallusdicke plattennah	mm	Mittelwert der Messlinienbeträge aus Arbeitsschritt 6e)
Kallusdicke plattenfern	mm	Mittelwert der Messlinienbeträge aus Arbeitsschritt 6f)
Kallusdichte plattennah	%	Anteil an mineralisiertem Knochen bezogen auf die plattennahe Kallusfläche
Kallusdichte plattenfern	%	Anteil an mineralisiertem Knochen bezogen auf die plattenferne Kallusfläche
Kallusdichte endostal	%	Anteil an mineralisiertem Knochen bezogen auf die endostale Kallusfläche

2.8.3.3 Trabekel

Tabelle 9: Messgrößen Trabekel mit Einheit und Bedeutung

Messgröße	Einheit	Bedeutung
Trabekeldichte distal	%	Anteil an mineralisiertem Knochen bezogen auf die distale Trabekelfläche
Anzahl der Trabekelkreuzungen	absolut	Absolute Anzahl der Trabekelkreuzungen in der distalen Trabekelfläche
Dichte der Trabekelkreuzungen	1/mm ²	Anzahl der Trabekelkreuzungen pro mm ² distaler Trabekelfläche
Mittlere Trabekeldicke	µm	Mittelwert der Trabekeldurchmesser in der distalen Trabekelfläche

Auch an dieser Stelle ist bezüglich der Messgrößenbezeichnung auf die ASBMR-Nomenklatur von Parfitt et al. (1987) hinzuweisen.

2.9 Polychrome Sequenzmarkierung

2.9.1 Ziel und Prinzip des Verfahrens

Die polychrome Sequenzmarkierung ermöglichte die genaue Untersuchung der Kinetik der Frakturheilung. Ziel war es nachzuvollziehen, in welchem Zeitraum welcher Kallusanteil und wieviel Kallus gebildet wurden und an welchem Tag es zu der frühesten knöchernen Überbrückung des Frakturspaltes kam. Man erhielt somit im Gegensatz zum mCT und zur Mikroradiographie ein dynamisches Bild der Frakturheilung.

Um dies zu verwirklichen, applizierte man den Ratten zu festgelegten Zeitpunkten in Anlehnung an Rahn (1976) die vier verschiedenen Fluorochrome Xylenolorange-

tetranatriumsalz (XO), Calcein-Grün (CG), Alizarinkomplexon (AK) und Tetracyclinhydrochlorid (TC) (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Alizarinkomplexon-Applikation wurde dabei einmal wiederholt, um die Anfärbung zu intensivieren (Komrakova et al. 2010). Nach der Applikation bildete das jeweilige Fluorochrom mit Kalzium einen Chelatkomplex, welcher in Folge der Mineralisierung in den neu gebildeten Knochen eingebaut wurde. Knochenabschnitte, mit einer höheren Umbaurate als der Kallus, färbten sich somit stärker an als solche mit einer niedrigeren wie die Kortikalis. Es färbte sich dabei immer nur der Knochen an, der bis zu dem Injektionszeitpunkt des jeweiligen Fluorochroms gebildet wurde und auch noch nicht durch das vorherige Fluorochrom markiert war.

Die Farbstoffe wurden den lebenden Tieren subkutan injiziert. Dazu löste man XO, CG und AK in destilliertem Wasser und TC in isotoner Kochsalzlösung. Die genauen Angaben zu Applikationszeitpunkt, Anfärbungszeitraum und Dosierung kann man der Tabelle 10 entnehmen.

Tabelle 10: Darstellung der Applikationszeitpunkte, Anfärbungszeiträume und Dosierungen der verschiedenen Fluorochrome

Fluorochrom	Applikationszeitpunkt in Tagen nach Osteotomie	Färbungszeitraum in Tagen	Dosierung in mg/kg Körpergewicht	Dosierung in ml
XO	13	0-13	90	0,5
GC	18	14-18	10	0,3
AK1	24	19-26	30	0,5
AK2	26	19-26	30	0,5
TC	36 (1 h vor Obduktion)	27-36	25	0,5

2.9.2 Auswertung

2.9.2.1 Apparaturen und Software

Die Herstellung der histologischen Schnitte wurde bereits in 2.8.1 (S. 41) beschrieben. Für die Auswertung der polychromen Sequenzmarkierung wurden diese mit Eukitt® (Fa. Kindler, Freiburg, Deutschland) auf Objektträgern (52 x 76 mm) eingedeckt.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung erfolgte mit dem Auflicht-Fluoreszenz-Stereomakroskop (Leica Stereomakroskop MZ 7-5 mit FluoCombi III, Bensheim, Deutschland). Es wurde mit Blaufluoreszenz gearbeitet, unter der sich XO orange, CG

grün, AK rot und TC gelb darstellte. Das Makroskop war mit einer Quecksilberhöchstdrucklampe mit einer Leistung von 100 W und einer Kamera ausgestattet, die wie schon bei der Mikroradiographie mit Hilfe der Software die Bilder direkt auf den Computer übertrug.

Man wählte wiederum standardisiert folgende Einstellungen, welche durch Vorversuche als optimal befunden wurden. Es wurde mit einer 16-fachen Vergrößerung (1,6-er Objektiv) und einem Anregungsfilter für den Wellenbereich 450-490 nm, der die Fluorochromanregung durch blaues Licht gewährleisten sollte, gearbeitet. Mit Hilfe der Software wählte man eine Belichtungszeit von 111 s. Auch bei der Auswertung der polychromen Sequenzmarkierung sollte wieder auf die Abdunkelung des Arbeitsplatzes geachtet werden.

2.9.2.2 Arbeitsschritte

Arbeitsschritt 1: Beurteilung der Auswertbarkeit der Schnitte

Die Auswertbarkeit der Schnitte wurde auf die gleiche Weise beurteilt wie in 2.8.2.2 (S. 43, Arbeitsschritt 1) erläutert.

Arbeitsschritt 2: Positionieren der Schnitte unter dem Makroskop

Jeder einzelne Schnitt wurde in gleicher Weise positioniert wie schon bei der Mikroradiographie beschrieben (vgl. 2.8.2.2, S. 43, Arbeitsschritt 2). Unter Blaufluoreszenz sollte man erst nach dem Zentrieren des Knochens auf der Orientierungslinie arbeiten, da unter diesen Bedingungen die Knochenstrukturen nicht so optimal voneinander abgegrenzt werden konnten.

Arbeitsschritt 3: Flächendefinition

Alle folgenden Flächen wurden, wie in 2.8.2.2 (S. 43, Arbeitsschritt 5) beschrieben, definiert. Dieser Arbeitsschritt gestaltete sich unter Blaufluoreszenz ein wenig schwieriger, da zum Beispiel die Kortikalis auf Grund ihrer geringen Umbaurate meist kaum fluoreszierte und somit schwieriger zu erkennen war. Der Kallus zeigte auf Grund seiner hohen Umbaurate die stärkste Fluoreszenz und war somit gut von den Nachbarstrukturen abzugrenzen:

- a) *Gesamter Knochen inklusive Kallus,*
- b) *Kortikalis proximal/ plattennah,*
- c) *Kortikalis proximal/plattenfern,*

- d) *Kortikalis distal/plattennah,*
- e) *Kortikalis distal/plattenfern,*
- f) *Kallus plattennah,*
- g) *Kallus plattenfern,*
- h) *Endostaler Kallus.*

Arbeitsschritt 4: Definition der fluorochrommarkierten Knochenflächen

Die jeweils gleichfarbigen Areale wurden einzeln umkreist und nachfolgend zu einer großen Fläche zusammengefügt. Einzugrenzen waren die Areale im plattennahen, endostalen und plattenfernen Kallus. Durch die vorherige Definition dieser Flächen ordnete die Software jedes eingegrenzte Areal einem dieser Kallusanteile zu.

a) *XO-markierte Fläche:* Die durch das Fluorochrom Xylenorange-tetranatriumsalz orange gefärbten Bereiche waren winzige Areale, umschlossen von CG-markierten Flächen, und somit kaum zu definieren. Man zählte sie aus diesem Grund zu den CG-markierten Arealen dazu und wertete sie zusammen mit diesen aus (Abb. 22).

b) *CG-markierte Fläche:* Die durch das Fluorochrom Calcein-Grün grün gefärbten Bereiche waren gemäß des frühen Injektionszeitpunkts und des natürlichen Knochenumbaus am trabekelnahesten lokalisiert (Abb. 22).

c) *AK-markierte Fläche:* Die durch das Fluorochrom Alizarinkomplexon rot gefärbten Areale waren von den CG-markierten Bereichen trabekelwärts und von den TC-markierten Bereichen in Richtung Osteotomiespalt eingeschlossen (Abb. 23).

d) *TC-markierte Fläche:* Die durch das Fluorochrom Tetracyclin-hydrochlorid gelb gefärbten Bereiche bildeten proximal und distal jeweils die Grenzschicht zum Osteotomiespalt (Abb. 24).

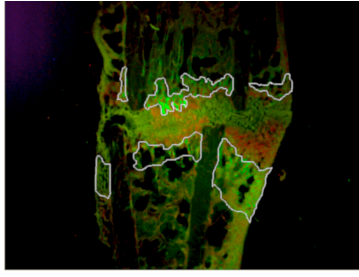


Abb. 22: CG-markierte Fläche; Testgruppe SHAM

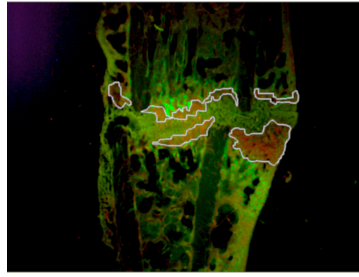


Abb. 23: AK-markierte Fläche; Testgruppe SHAM

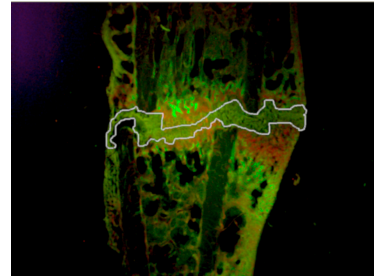


Abb. 24: TC-markierte Fläche; Testgruppe SHAM

2.9.3 Zeitpunkt der frühesten Überbrückung des Frakturspalts

Um den Tag der frühesten knöchernen Frakturüberbrückung bei jeder einzelnen Tibia zu bestimmen, wurden für die Auswertung nicht nur 3 sondern bis zu 11 histologische Schnitte herangezogen. Da die Überbrückung des Frakturspalts vor allem periostal begann, konnte man somit sichergehen, tatsächlich die früheste Überbrückung zu erkennen. Wie schon in 2.9.1 (S. 47) beschrieben, färbte sich immer nur der Knochen an, der bis zu dem Injektionszeitpunkt des jeweiligen Fluorochroms gebildet wurde und auch noch nicht durch das vorherige Fluorochrom markiert war (Abb. 25).

Man nahm sich also jeden einzelnen Schnitt einer Tibia vor und schaute, ob eine knöchernen Brücke die beiden Osteotomieenden verband. Anhand der Farbe und der Fläche des Gewebes konnte man dann abschätzen, an welchem Tag die erstmalige Überbrückung stattgefunden haben muss. War zum Beispiel eine zarte grügefärbte Brücke zu erkennen, kam es zu der frühesten Frakturüberbrückung am Tag 16 der Frakturheilung, da Calcein-Grün am Tag 18 appliziert wurde. War die Brücke kräftiger, fand die Überbrückung eher am Tag 14 schon statt (Abb. 25). Aus den ermittelten Zeitpunkten für die einzelnen Tibiae, wurde schließlich für jede Versuchsgruppe ein Mittelwert gebildet.

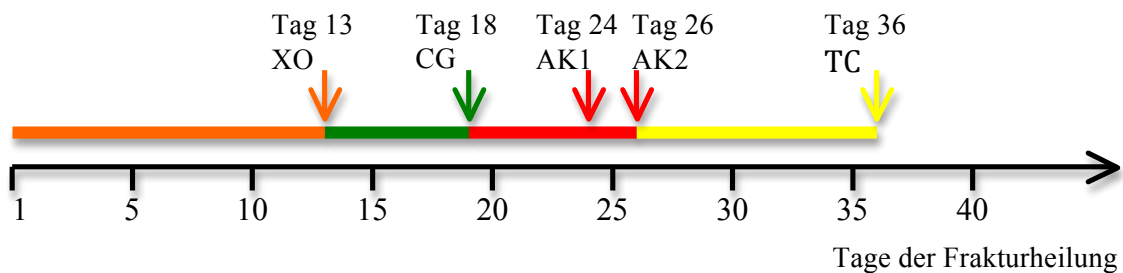


Abb. 25: Visuelle Darstellung der Applikationszeitpunkte der Fluorochrome und der Färbungszeiträume

2.9.4 Messparameter

2.9.4.1 Kallus plattennah

Tabelle 11: Messgrößen für den plattennahen Kallus mit Einheit und Bedeutung

Kallusfläche plattennah	Einheit	Bedeutung
Gesamt-Kallusfläche	mm ²	absolute Fläche des gesamten Kallus
CG-markierte Fläche	mm ²	absolute Fläche des CG-markierten plattennahen Kallus
AK-markierte Fläche	mm ²	absolute Fläche des AK-markierten plattennahen Kallus
TC-markierte Fläche	mm ²	absolute Fläche des TC-markierten plattennahen Kallus

2.9.4.2 Kallus plattenfern

Tabelle 12: Messgrößen für den plattenfernen Kallus mit Einheit und Bedeutung

Kallusfläche plattenfern	Einheit	Bedeutung
Gesamt-Kallusfläche	mm ²	absolute Fläche des plattenfernen Kallus
CG-markierte Fläche	mm ²	absolute Fläche des CG-markierten plattenfernen Kallus
AK-markierte Fläche	mm ²	absolute Fläche des AK-markierten plattenfernen Kallus
TC-markierte Fläche	mm ²	absolute Fläche des TC-markierten plattenfernen Kallus

2.9.4.3 Kallus endostal

Tabelle 13: Messgrößen für den endostalen Kallus mit Einheit und Bedeutung

Kallus endostal	Einheit	Bedeutung
Gesamt-Kallusfläche	mm ²	absolute Fläche des endostalen Kallus
CG-markierte Fläche	mm ²	absolute Fläche des CG-markierten endostalen Kallus
AK-markierte Fläche	mm ²	absolute Fläche des AK-markierten endostalen Kallus
TC-markierte Fläche	mm ²	absolute Fläche des TC-markierten endostalen Kallus

2.9.4.4 Gesamter Kallus

Tabelle 14: Messgröße für den gesamten Kallus mit Einheit und Bedeutung

Gesamter Kallus	Einheit	Bedeutung
Kallusfläche total	mm ²	Summe aus der Gesamt-Kallusfläche plattennah, Gesamt-Kallusfläche plattenfern und Gesamt-Kallusfläche endostal

2.10 Validierung des Untersuchers für die Mikroradiographie und die polychrome Sequenzmarkierung

Um auch bei den in 2.8 (S. 41) und 2.9 (S. 47) beschriebenen Methoden den Messfehler möglichst gering zu halten, sollte vor der eigentlichen Anwendung der Versuche an den Versuchstibiae eine Validierung erfolgen. Dazu wurde eine Versuchstibiae randomisiert ausgewählt und zehnmal in Folge mit der jeweiligen Methode ausgewertet und alle genannten Messparameter bestimmt. Wichen die Einzelwerte weniger als 5% von den jeweiligen Mittelwerten ab, so konnte mit der eigentlichen Auswertung begonnen werden.

2.11 Statistik

Die statistische Auswertung sowie die Erstellung der im Ergebnisteil vorkommenden graphischen Darstellungen erfolgte für alle angewandten Methoden mit der Software GraphPad Prism (Version 4.0a, Mai 2003, GraphPad Software, San Diego, USA). Für jeden einzelnen Messparameter erfolgte ein Vergleich hinsichtlich Mittelwert, Minimum und Maximum, Standardabweichung und Standardfehler zwischen den einzelnen Gruppen. Um Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen festzustellen, wurde eine Kombination aus einer one-way ANOVA und dem Tukey-Kramer post-hoc Test angewandt. Als Signifikanzniveau galt ein p-Wert $\alpha \leq 0,05$.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Körpergewichtsbestimmung, der täglichen Futteraufnahme, der Uterusgewichte, des biomechanischen Tests, der Mikrocomputertomographie, der Mikroradiographie und der polychromen Sequenzmarkierung werden alle in gleicher Weise dargestellt. Die Ergebnispräsentation erfolgt zunächst für jede Messgröße in Form von Linien- oder Säulendiagrammen, in denen für jede einzelne Gruppe der jeweilige Mittelwert mit einer Standardabweichung abgebildet ist. Die Signifikanzen sind mit Symbolen gekennzeichnet. Als Signifikanzniveau gilt $p < 0,05$, wobei im Folgenden $p < 0,05$ als signifikant, $p < 0,01$ als hoch signifikant und $p < 0,001$ als höchst signifikant bezeichnet wird. Folgende Symbole werden verwendet, um Signifikanzen zwischen den Versuchsgruppen deutlich zu machen:

a = signifikant zu allen anderen Gruppen

b = signifikant zu SHAM

c = signifikant zu OVX

d = signifikant zu SR nach Osteo

e = signifikant zu SR vor Osteo

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

*** = $p < 0,001$

Am Ende jedes Ergebnisteils werden alle Mittelwerte der Messgrößen mit jeweils einer Standardabweichung und die Signifikanzen in einer Tabelle zusammengefasst.

3.1 Körpergewicht der Tiere im Verlauf

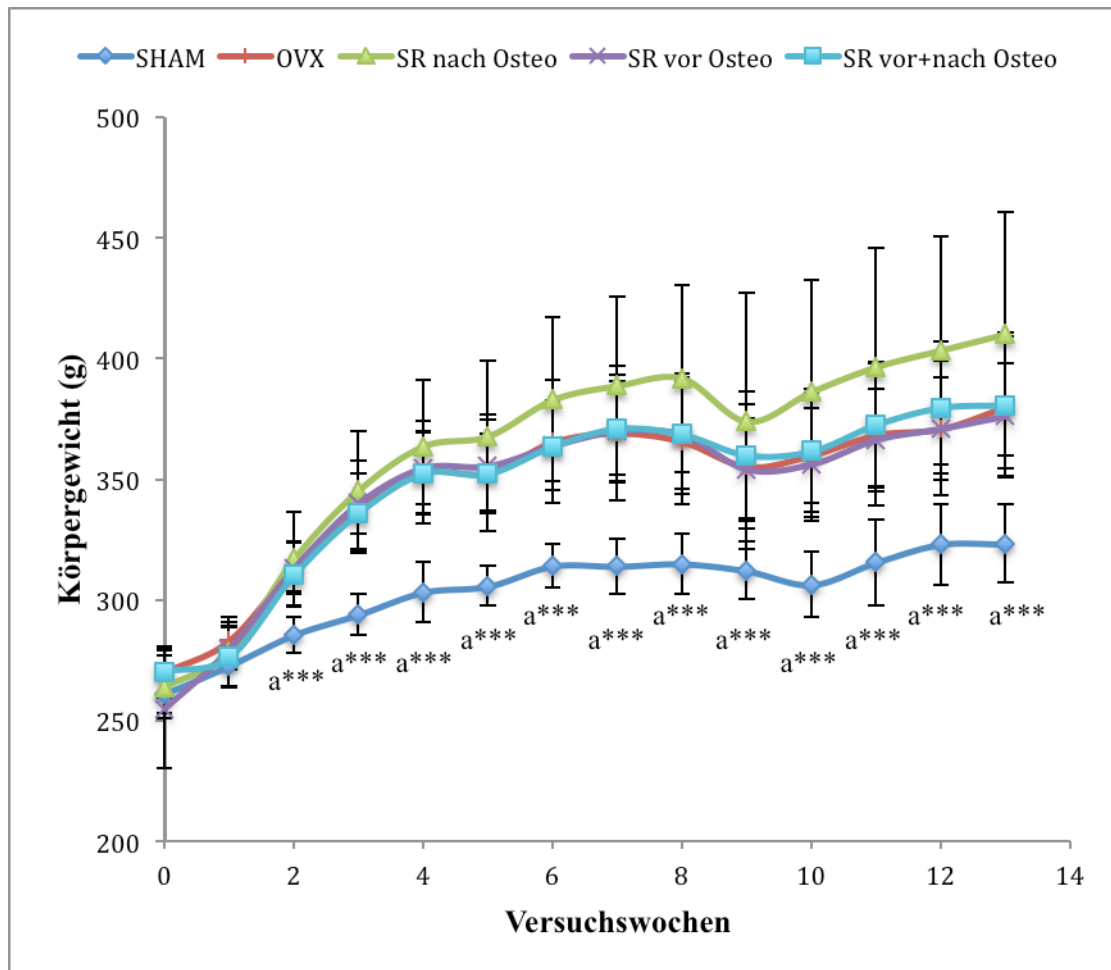


Abb. 26: Darstellung des mittleren Körpergewichts der Tiere jeder Gruppe pro Versuchswoche vom Beginn (Versuchswoche 0) bis zum Ende (Versuchswoche 13) des Versuchs; a=signifikant zu allen anderen Gruppen; *** = $p < 0,001$

Bei der Betrachtung der Körpergewichte fiel zunächst auf, dass alle Tiere stetig zunahmen (Abb. 26, Tab. 15). Des Weiteren kam es bei allen Gruppen nach der Ovariectomie beziehungsweise nach der achten Woche zu einem kurzzeitigen Abfall der Körpergewichte. Zu Beginn des Versuchs, das heißt am Tag der Ovariectomie waren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Körpergewichtes zwischen den Versuchsgruppen erkennbar. Allerdings wurde ab 2 Wochen nach der Ovariectomie ein höchst signifikanter Unterschied zwischen den Tieren der Gruppe SHAM und allen ovariectomierten Tieren deutlich, welcher bis zum Ende des Versuchs bestehen blieb. Während die Ratten der Gruppen OVX, SR vor Osteo und SR vor+nach Osteo fast in gleichem Maße zunahmen, zeigten die Tiere der Versuchsgruppe SR nach Osteo im Vergleich, wenn auch nicht signifikant, eine sogar noch höhere Körpergewichtszu-

nahme. Zu beachten waren allerdings die sehr hohen Standardabweichungen bei dieser Gruppe.

Tabelle 15: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Körpergewichte der Tiere über die Versuchswochen in Gramm

Versuchswochen	SHAM	OVX	SR nach Osteo	SR vor Osteo	SR vor+nach Osteo
0	261 \pm 8	270 \pm 11	264 \pm 13	255 \pm 24	270 \pm 9
1	273 \pm 9	283 \pm 8	279 \pm 14	280 \pm 9	276 \pm 13
2	285 \pm 7 (a ^{***})	314 \pm 10	317 \pm 19	313 \pm 11	310 \pm 14
3	294 \pm 9 (a ^{***})	338 \pm 19	345 \pm 25	340 \pm 12	336 \pm 16
4	303 \pm 13 (a ^{***})	353 \pm 21	364 \pm 28	355 \pm 15	352 \pm 17
5	306 \pm 8 (a ^{***})	353 \pm 24	368 \pm 31	355 \pm 20	352 \pm 17
6	314 \pm 9 (a ^{***})	365 \pm 25	383 \pm 34	364 \pm 19	364 \pm 18
7	314 \pm 11 (a ^{***})	369 \pm 28	389 \pm 37	370 \pm 21	371 \pm 22
8	315 \pm 12 (a ^{***})	366 \pm 26	392 \pm 39	368 \pm 22	368 \pm 25
9	312 \pm 12 (a ^{***})	355 \pm 26	374 \pm 53	354 \pm 21	360 \pm 26
10	306 \pm 14 (a ^{***})	360 \pm 26	386 \pm 46	356 \pm 23	362 \pm 26
11	315 \pm 18 (a ^{***})	368 \pm 29	397 \pm 49	366 \pm 21	373 \pm 26
12	323 \pm 17 (a ^{***})	371 \pm 28	403 \pm 47	371 \pm 21	380 \pm 27
13	323 \pm 16 (a ^{***})	380 \pm 29	410 \pm 51	376 \pm 22	381 \pm 30

a=signifikant zu allen anderen Gruppen; *** = p < 0,001

3.2 Tägliche Futtermittelaufnahme pro Tier im Verlauf

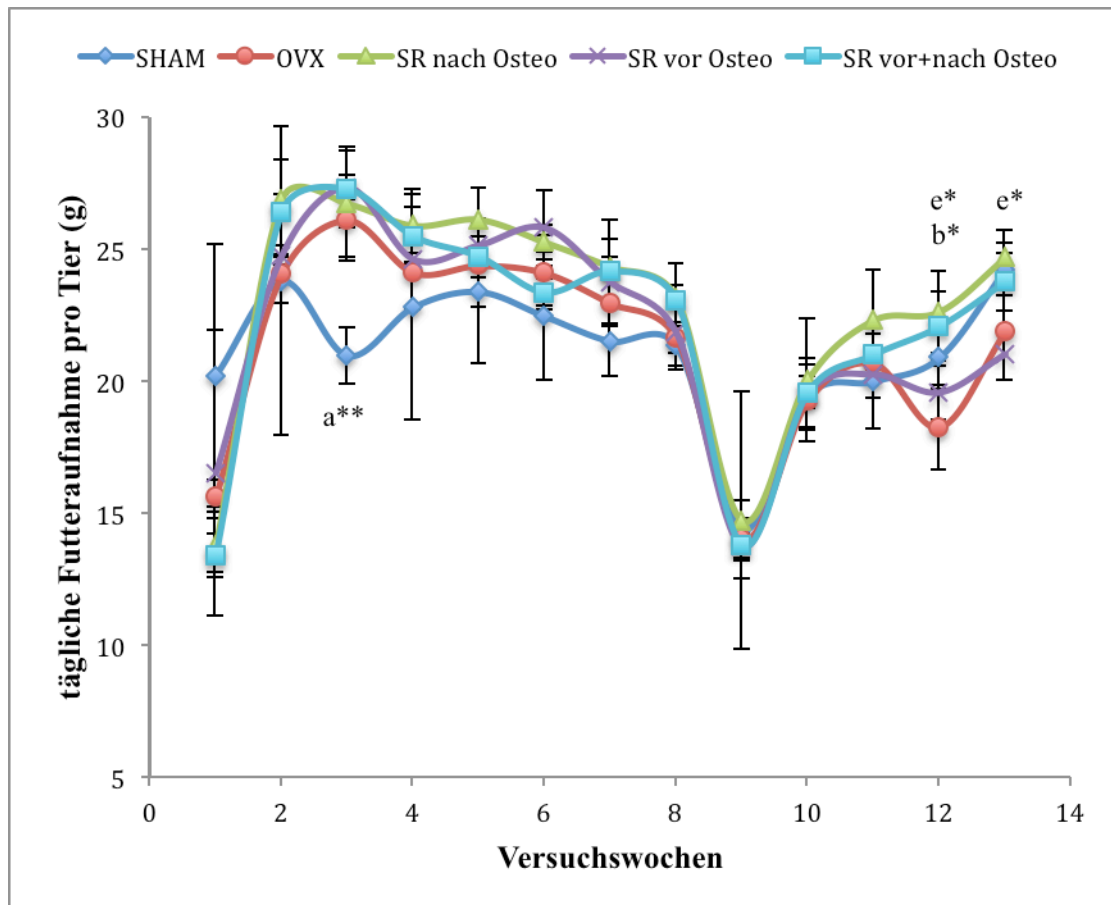


Abb. 27: Darstellung der mittleren täglichen Futtermittelaufnahme pro Tier jeder Gruppe pro Versuchswoche; a=signifikant zu allen anderen Gruppen, b=signifikant zu SHAM, d=signifikant zu SR nach Osteo, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$

Bei der Betrachtung der täglichen Futtermittelaufnahmen der ovariectomierten Tiere fiel auf, dass sie ab der zweiten Versuchswoche, verglichen mit der ersten Woche, tendenziell mehr Futter aufnehmen (Abb. 27, Tab. 16). Die tägliche Futtermittelaufnahme der Kontrollgruppe SHAM stieg in diesem Zeitraum nicht ganz so drastisch an. In der dritten Versuchswoche nahmen die Kontrolltiere sogar hoch signifikant weniger Futter zu sich als alle ovariectomierten Tiere. In der Woche nach der Osteotomie (Versuchswoche 9) sank die tägliche Futtermittelaufnahme bei allen Ratten. Zum Ende des Versuchs zeigten sich noch einmal signifikante Unterschiede. In der 12. Versuchswoche war bei den Tieren der Gruppe SR nach Osteo eine signifikant höhere Futtermittelaufnahme zu beobachten als bei den Tieren der Gruppen SHAM und SR vor Osteo. In der 13. Versuchswoche zeigte die Versuchsgruppe SR nach Osteo nur noch gegenüber SR vor Osteo signifikant höhere Werte.

Die durchschnittliche tägliche Strontiumranelataufnahme der Tiere der Strontiumranelatgruppen betrug dabei 654 ± 132 mg/kg/Tag. Wie man an der schwankenden täglichen Futterraufnahme pro Tier im Verlauf des Versuchs sehen konnte, schwankte dementsprechend auch die tägliche SR-Aufnahme mit einem Minimalwert von 295 mg/kg/Tag und einem Maximalwert von 948 mg.

Tabelle 16: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der täglichen Futterraufnahme pro Tier jeder Gruppe über die Versuchswochen in Gramm

Versuchswochen	SHAM	OVX	SR nach Osteo	SR vor Osteo	SR vor+nach Osteo
1	20,20 \pm 4,96	15,62 \pm 0,61	13,76 \pm 1,02	16,52 \pm 5,41	13,38 \pm 0,82
2	23,79 \pm 5,85	24,04 \pm 1,09	26,88 \pm 0,18	24,75 \pm 0,05	26,40 \pm 1,98
3	20,96 \pm 1,06 (a**)	26,10 \pm 1,43	26,71 \pm 2,15	27,33 \pm 0,47	27,26 \pm 1,45
4	22,80 \pm 4,28	24,12 \pm 1,42	25,89 \pm 1,39	24,61 \pm 0,25	25,48 \pm 1,10
5	23,38 \pm 2,75	24,38 \pm 1,60	26,12 \pm 1,19	25,14 \pm 0,73	24,71 \pm 0,77
6	22,45 \pm 2,43	24,10 \pm 1,40	25,26 \pm 0,66	25,80 \pm 1,43	23,35 \pm 0,51
7	21,51 \pm 1,35	22,95 \pm 0,86	24,32 \pm 0,37	23,74 \pm 1,65	24,15 \pm 1,97
8	21,33 \pm 0,75	21,63 \pm 0,58	23,16 \pm 0,47	21,82 \pm 1,41	23,05 \pm 1,42
9	14,38 \pm 0,42	14,00 \pm 1,50	14,72 \pm 4,88	13,73 \pm 0,53	13,79 \pm 0,52
10	19,43 \pm 1,21	19,26 \pm 0,14	20,05 \pm 2,33	19,52 \pm 1,36	19,57 \pm 0,61
11	19,99 \pm 1,80	20,68 \pm 1,31	22,31 \pm 1,88	20,25 \pm 0,29	20,99 \pm 0,32
12	20,89 \pm 1,21	18,26 \pm 1,60	22,63 \pm 1,55 (b*,e*)	19,57 \pm 1,02	22,06 \pm 1,31
13	24,21 \pm 1,00	21,88 \pm 1,86	24,67 \pm 1,04 (e*)	21,02 \pm 1,00	23,75 \pm 1,10

a=signifikant zu allen anderen Gruppen, b=signifikant zu SHAM, d=signifikant zu SR nach Osteo, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$

3.3 Uterusgewicht

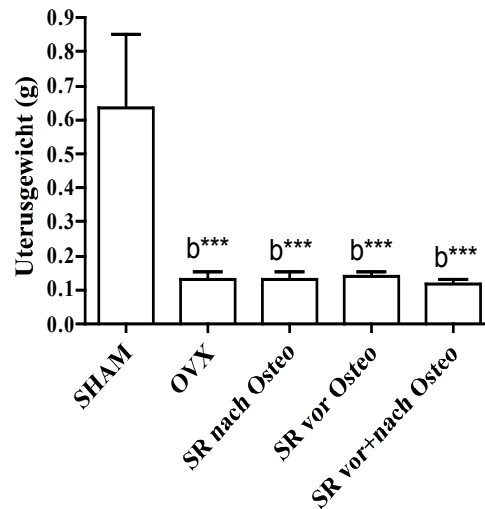


Abb. 28: Darstellung des mittleren Uterusgewichtes der Tiere jeder Versuchsgruppe am Tag der Obduktion; b=signifikant zu SHAM, *** = $p < 0,001$

Alle ovariectomierten Tiere zeigten höchst signifikant geringere Uterusgewichte als die Kontrolltiere der Gruppe SHAM (Abb. 28, Tab. 17).

Tabelle 17: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Uterusgewichte jeder Versuchsgruppe am Tag der Obduktion

Messgröße	SHAM	OVX	SR nach Osteo	SR vor Osteo	SR vor+nach Osteo
Uterusgewicht (g)	0,64 \pm 0,21 (b***)	0,13 \pm 0,03 (b***)	0,13 \pm 0,03 (b***)	0,14 \pm 0,02 (b***)	0,12 \pm 0,02 (b***)

b=signifikant zu SHAM, ***= $p < 0,001$

3.4 Ergebnisse des biomechanischen Tests

Nach der Präsentation der Ergebnisse jeder einzelnen Messgröße in Form von Säulendiagrammen erfolgt die Zusammenfassung der Mittelwerte mit jeweils einer Standardabweichung tabellarisch.

3.4.1 Elastizität

Bezüglich der Elastizität der Knochen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 29, Tab. 18). Die Kontrollgruppe SHAM tendierte jedoch zu der höchsten Elastizität. Zu beachten waren auch die hohen Standardabweichungen.

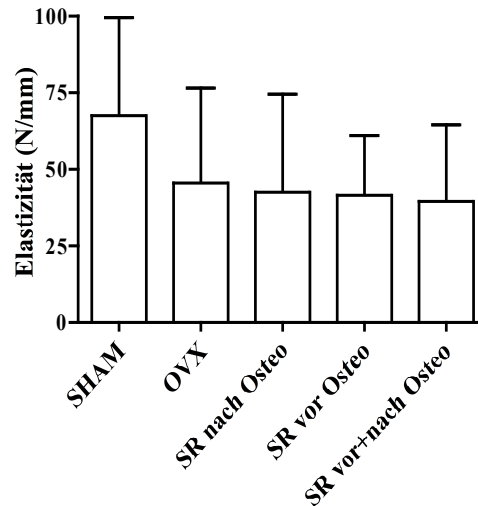


Abb. 29: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Elastizität

3.4.2 Streckgrenze und Maximalkraft

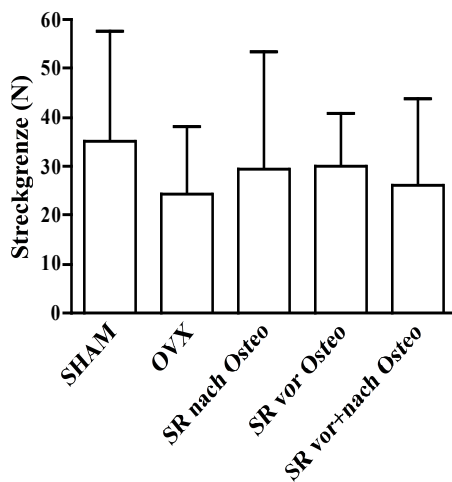


Abb. 30: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Streckgrenze

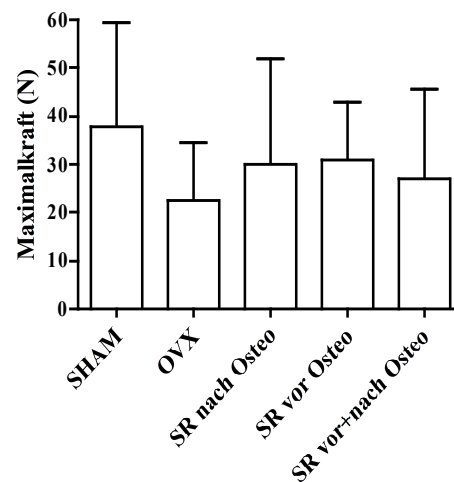


Abb. 31: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Maximalkraft

Auch hinsichtlich der Streckgrenze und der Maximalkraft konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden (Abb. 30+ Abb. 31, Tab.18). Man beachte auch hier die hohen Standardabweichungen. Die Ergebnisse sahen bei den beiden Messgrößen ähnlich aus. Dabei zeigte die Kontrollgruppe SHAM die höchsten Werte. Die Strontiumranelatgruppen tendierten zu höheren Werten als die Gruppe OVX.

Tabelle 18: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des biomechanischen Tests

Parameter	SHAM	OVX	SR nach Osteo	SR vor Osteo	SR vor + nach Osteo
Elastizität (N/mm)	67,56 \pm 32,05	45,56 \pm 31,24	42,34 \pm 32,05	41,50 \pm 19,64	39,45 \pm 25,12
Streckgrenze (N)	35,19 \pm 22,34	24,35 \pm 13,75	29,54 \pm 23,96	29,94 \pm 11,03	26,10 \pm 17,70
Maximalkraft (N)	37,89 \pm 21,71	22,41 \pm 12,05	30,03 \pm 21,99	30,83 \pm 12,14	27,08 \pm 18,42

3.5 Ergebnisse der Mikrocomputertomographie

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Microcomputertomographien in Form von Säulendiagrammen beschrieben. Dabei erfolgt die Darstellung der Messgrößen der beiden Auswertungsstrategien *Auswertung mit definierten Schwellenwerten* und *peakorientierte Auswertung* nebeneinander, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Anschließend erfolgt die Zusammenfassung aller Ergebnisse.

3.5.1 Kortikalisparameter

3.5.1.1 BMD Kortikalis

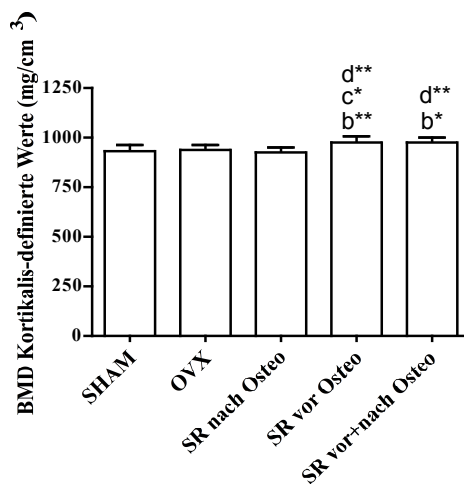


Abb. 32: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BMD Kortikalis nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten; b=signifikant zu SHAM, c=signifikant zu OVX, d= signifikant zu SR nach Osteo, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$

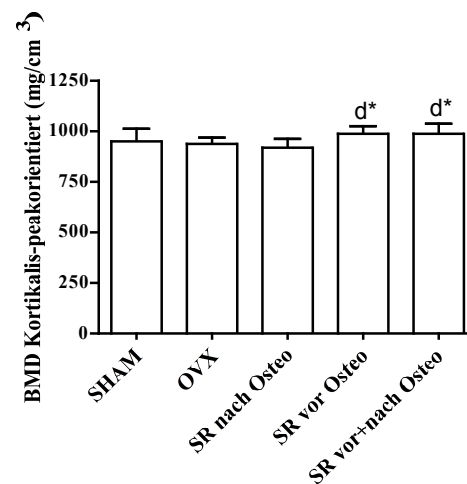


Abb. 33: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BMD Kortikalis nach peakorientierter Auswertung; d= signifikant zu SR nach Osteo, *= $p < 0,05$

Bezüglich der BMD der Kortikalis zeigten sich bei beiden Auswertungsstrategien signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 32 +Abb. 33, Tab. 19).

Bei der Auswertung mit definierten Schwellenwerten war die mittlere Kortikalisdichte der Gruppen SR vor Osteo und SR vor+nach Osteo hoch signifikant höher als die der Gruppe SHAM und hoch signifikant höher als bei der Gruppe SR nach Osteo (Abb. 32). Die Gruppe SR nach Osteo wies dazu noch einen signifikant höheren Wert als die Gruppe OVX auf. Im Vergleich dazu zeigten die Versuchsgruppen SR vor Osteo und SR vor+nach Osteo bei der peakorientierten Auswertung nur eine signifikant höhere BMD der Kortikalis als die Gruppe SR nach Osteo (Abb. 33).

3.5.1.2 Kortikalisvolumen

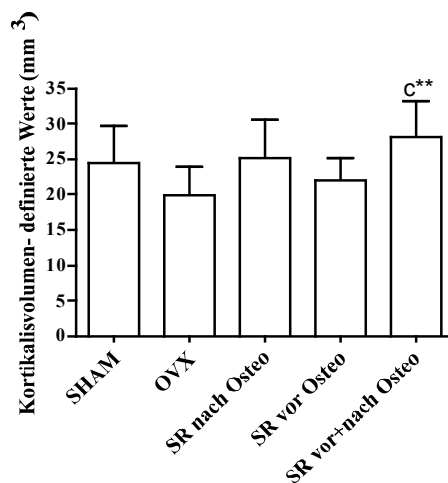


Abb. 34: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalisvolumen nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten; c=signifikant zu OVX, **= $p < 0,01$

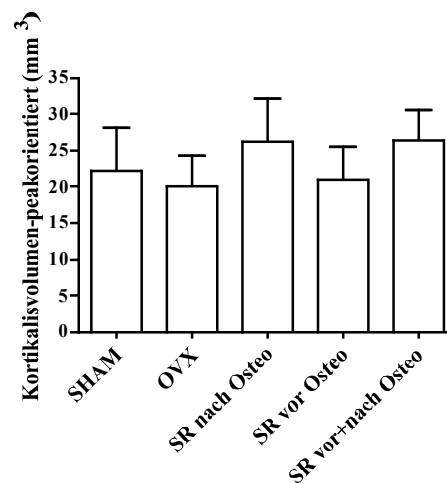


Abb. 35: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalisvolumen nach peakorientierter Auswertung

Bei der Auswertung mit definierten Schwellenwerten zeigte sich für die Gruppe SR vor+nach Osteo ein hoch signifikant höheres Kortikalisvolumen im Vergleich zur Gruppe OVX (Abb. 34, Tab. 19). Bei der peakorientierten Auswertung hingegen waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar (Abb. 35, Tab. 19). Allerdings tendierte auch hier die Gruppe SR vor+nach Osteo zu einem höheren Wert als die Gruppe OVX, wobei bei dieser Auswertung auch auf die Prominenz der Gruppe SR nach Osteo zu achten war.

3.5.2 Kallusparameter

3.5.2.1 BMD Kallus

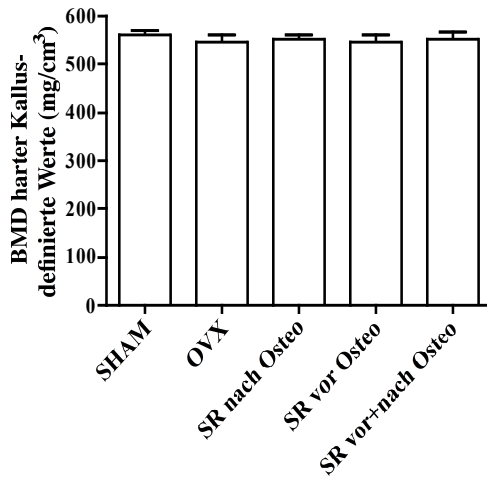


Abb. 36: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BMD harter Kallus nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten

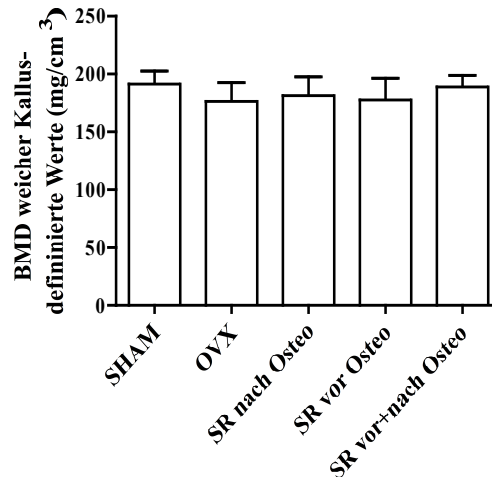


Abb. 37: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BMD weicher Kallus nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten

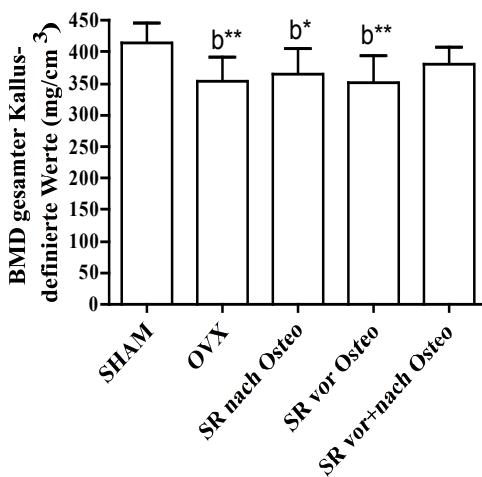


Abb. 38: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BMD gesamt Kallus nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten; b=signifikant zu SHAM, *=p < 0,05, **=p < 0,01

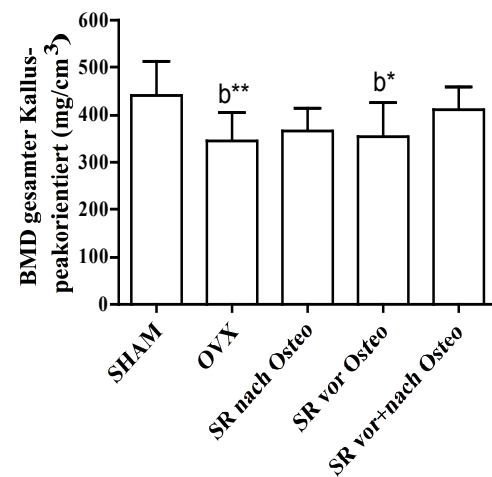


Abb. 39: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BMD gesamt Kallus nach peakorientierter Auswertung; b=signifikant zu SHAM, *=p < 0,05, **=p < 0,01

Bei der Auswertung mit definierten Schwellenwerten konnten durch die definierten Schwellenwerte die harten von den weichen Anteilen des Kallus abgegrenzt und getrennt ausgewertet werden. Wenn man die Messgrößen harter Kallus und weicher Kallus einzeln betrachtete, waren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der BMD zwischen den Versuchsgruppen feststellbar (Abb. 36 + Abb. 37, Tab. 20). Betrachtet man jedoch den gesamten Kallus, so zeigte die Kontrollgruppe SHAM gegenüber der Gruppen OVX und SR vor Osteo eine hoch signifikant und gegenüber der Gruppe SR

nach Osteo eine signifikant höhere BMD des Kallus (Abb. 38, Tab. 20). Bei der peakorientierten Auswertung war die gesamte Kallusdichte von SHAM dann nur noch gegenüber OVX hochsignifikant und gegenüber SR vor Osteo signifikant erhöht (Abb. 39, Tab. 20).

3.5.2.2 Kallusvolumen

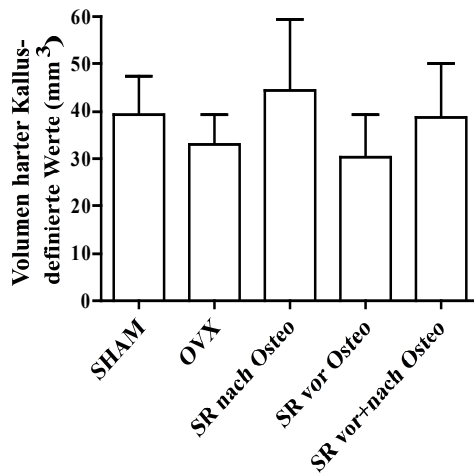


Abb. 40: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Volumen harter Kallus nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten

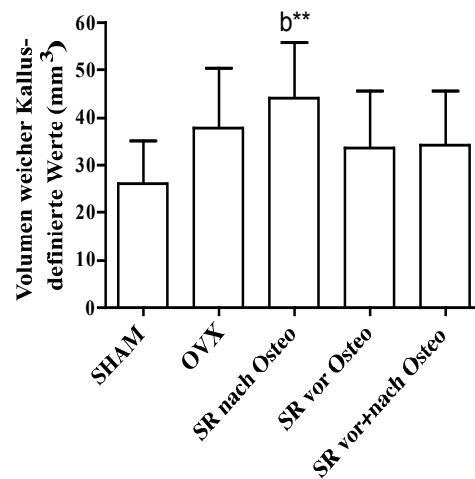


Abb. 41: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Volumen weicher Kallus nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten; b=signifikant zu SHAM, **= $p < 0,01$

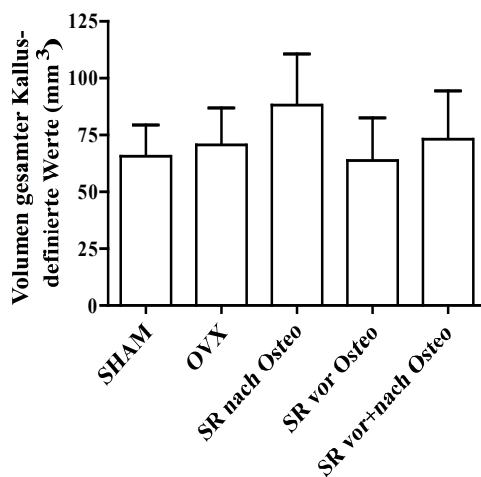


Abb. 42: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Volumen gesamter Kallus nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten

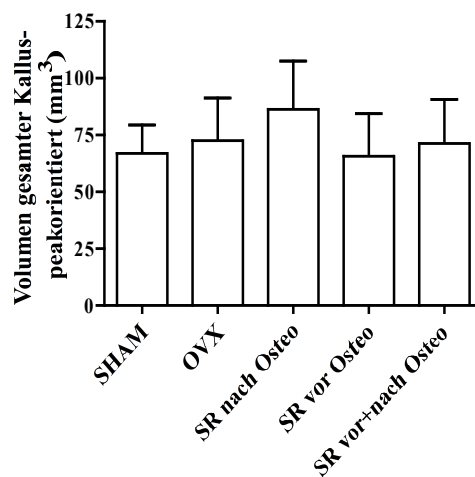


Abb. 43: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Volumen gesamter Kallus nach peakorientierter Auswertung

Bei der Auswertung mit definierten Schwellenwerten wurden bezüglich des harten Kallusvolumens keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt (Abb. 40, Tab. 20). Bei der Messgröße Volumen weicher Kallus hingegen

zeigte die Gruppe SR nach Osteo jedoch einen hoch signifikant höheren Wert als die Kontrollgruppe SHAM (Abb. 41, Tab. 20). Hinsichtlich des gesamten Kallusvolumens waren weder bei der Auswertung mit definierten Schwellenwerten noch bei der peakorientierten Auswertung signifikante Unterschiede zu erkennen (Abb. 42 + Abb. 43, Tab. 20). Jedoch zeigte sich bei beiden Auswertungsstrategien, dass die Gruppe SR nach Osteo zu einem höheren Kallusvolumen als die restlichen Gruppen tendiert.

3.5.3 Parameter, die den gesamten Knochen betreffen

3.5.3.1 BMD Gesamt

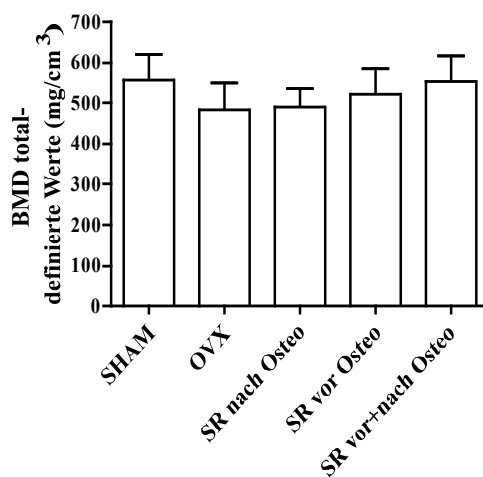


Abb. 44: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BMD total nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten

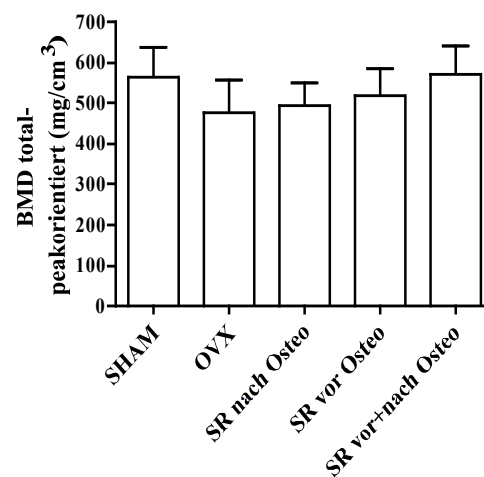


Abb. 45: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BMD total nach peakorientierter Auswertung

Bei beiden Auswertungsstrategien konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der BMD des gesamten Gewebes festgestellt werden (Abb. 44 + Abb. 45, Tab. 21). Auffällig war, dass die Versuchsgruppe SR vor+nach Osteo sowohl bei der Auswertung mit definierten Schwellenwerten als auch bei der peakorientierten Auswertung zu einer ähnlich hohen BMD tendierte wie die Kontrollgruppe SHAM. Auch die anderen beiden Strontiumranelatgruppen wiesen immerhin höhere Werte als die OVX-Gruppe auf.

3.5.3.2 Gesamtvolumen

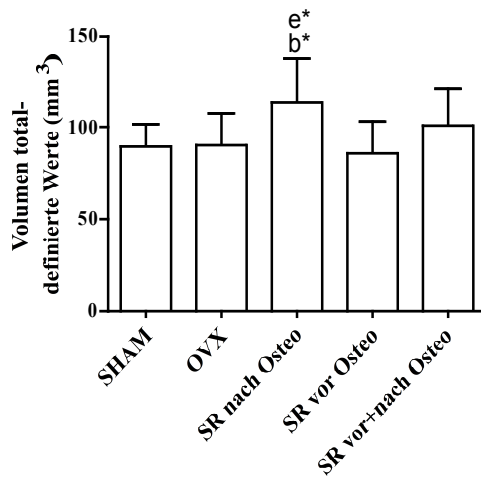


Abb. 46: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Volumen total nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten; b=signifikant zu SHAM, e=signifikant zu SR vor Osteo, *=p < 0,05

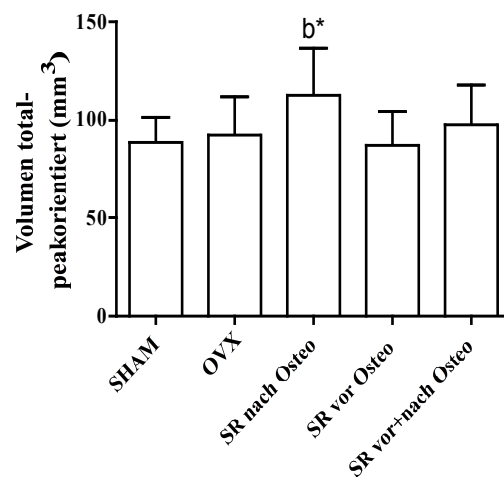


Abb. 47: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Volumen total nach peakorientierter Auswertung; b=signifikant zu SHAM, *=p < 0,05

Bezüglich des Gesamtvolumens zeigte die Versuchsgruppe SR nach Osteo bei der Auswertung mit definierten Schwellenwerten signifikant höhere Werte als die Gruppen SHAM und SR vor Osteo (Abb. 46, Tab. 21). Bei der peakorientierten Auswertung war das Gesamtvolumen dieser Versuchsgruppe nur noch gegenüber der Kontrollgruppe SHAM signifikant höher (Abb. 47, Tab. 21).

3.5.3.3 BV/TV

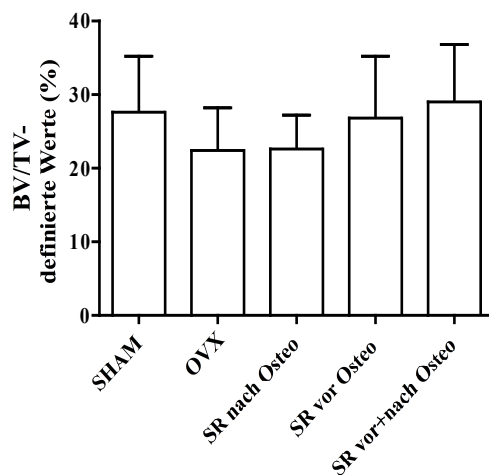


Abb. 48: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BV/TV nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten

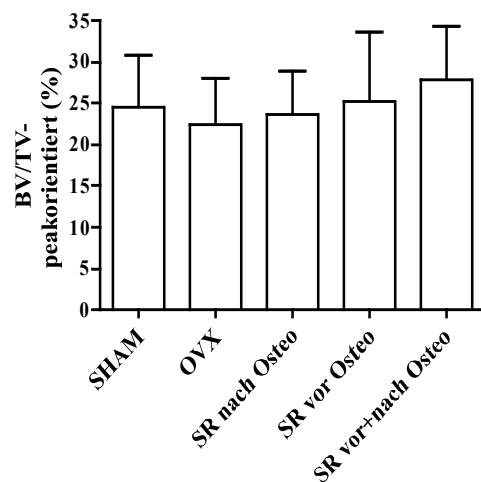


Abb. 49: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BV/TV nach peakorientierter Auswertung

Bezüglich der Messgröße Bone Volume über Tissue Volume waren bei beiden Auswertungsstrategien keine Unterschiede erkennbar (Abb. 48 + Abb. 49, Tab. 21). Bei

der Auswertung mit definierten Schwellenwerten zeichnete sich der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe SHAM und der Gruppe OVX stärker ab. Bei beiden Auswertungsstrategien tendierte die Gruppe SR vor+nach Osteo zu dem höchsten BV/TV-Wert.

3.5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Mikrocomputertomographie

3.5.4.1 Kortikalisparameter

Tabelle 19: Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung der Messgrößen der Kortikalis

Kortikalisparameter	SHAM	OVX	SR nach Osteo	SR vor Osteo	SR vor + nach Osteo
BMD Kortikalis-definierte Werte (mg/cm ³)	928,7± 29,13	936,3± 23,14	923,2± 25,24	975,3± 30,78 (d**,c*, b**)	971,9± 28,77 (d**, b*)
BMD Kortikalis-peakorientiert (mg/cm ³)	946,5± 61,98	935,0± 30,53	918,8± 39,17	986,4± 38,70 (d*)	985,4± 52,40 (d*)
Kortikalisvolumen-definierte Werte (mm ³)	24,41± 5,26	19,88± 4,09	25,18± 5,46	22,06± 3,06	28,18± 5,01 (c**)
Kortikalisvolumen-peakorientiert (mm ³)	22,24± 5,89	20,12± 4,07	26,14± 6,06	20,97± 4,45	26,36± 4,20

b=signifikant zu SHAM, c=signifikant zu OVX, d= signifikant zu SR nach Osteo, *=p < 0,05, **=p < 0,01

3.5.4.2 Kallusparameter

Tabelle 20: Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung der Messgrößen des Kallus

Kallusparameter	SHAM	OVX	SR nach Osteo	SR vor Osteo	SR vor + nach Osteo
BMD harter Kallus- definierte Werte (mg/cm ³)	561,4± 9,62	547,1± 13,59	552,9± 8,36	547,0± 15,30	551,6± 15,31
BMD weicher Kallus- definierte Werte (mg/cm ³)	191,9± 11,01	176,1± 16,13	181,9± 15,45	177,2± 19,09	188,4± 10,39
BMD gesamter Kallus- definierte Werte (mg/cm ³)	414,6± 31,87	352,5± 39,32 (b**)	365,1± 39,62 (b*)	351,1± 43,60 (b**)	381,1± 26,09
BMD gesamter Kallus- peakorientiert (mg/cm ³)	441,4± 70,91	347,0± 57,45 (b**)	365,5± 49,25	355,9± 70,93 (b*)	410,8± 47,49
Volumen harter Kallus- definierte Werte (mm ³)	39,31± 8,23	32,94± 6,48	44,40± 14,95	30,28± 9,19	38,78±11,3 0
Volumen weicher Kallus- definierte Werte (mm ³)	26,28± 8,79	37,82± 12,8	44,05± 11,8 (b**)	33,70± 11,9	34,37± 11,39
Volumen gesamter Kallus- definierte Werte (mm ³)	65,59± 13,93	70,76± 16,18	88,45± 22,01	63,98± 18,89	73,15± 21,20
Volumen gesamter Kallus- peakorientiert (mm ³)	66,75± 12,87	72,34± 18,76	86,52± 21,39	65,94± 18,69	71,63± 19,25

b=signifikant zu SHAM, c=signifikant zu OVX, e= signifikant zu SR vor Osteo, *= 0,01 < p < 0,05, **=0,001 < p < 0,01, ***=p < 0,001

3.5.4.3 Parameter, die den gesamten Knochen betreffen

Tabelle 21: Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung der Messgrößen des gesamten Knochens

Parameter	SHAM	OVX	SR nach Osteo	SR vor Osteo	SR vor + nach Osteo
BMD total-definierte Werte (mg/cm ³)	557,5± 62,69	483,5± 64,95	491,3± 43,82	521,2± 65,02	552,6± 64,55
BMD total-peakorientiert (mg/cm ³)	565,2± 72,69	477,5± 80,03	495,2± 53,51	517,3± 67,76	570,4± 71,38
Volumen total-definierte Werte (mm ³)	90,12± 11,68	90,59± 17,08	113,4± 24,36 (e*,b*)	86,15± 17,32	101,2± 19,84
Volumen total-peakorientiert (mm ³)	88,90± 12,32	92,45± 19,62	112,6± 24,33 (b*)	86,81± 17,59	97,99± 19,82
BV/TV- definierte Werte (%)	27,71± 7,46	22,52± 5,80	22,66± 4,53	26,91± 8,30	28,95± 7,80
BV/TV- peakorientiert (%)	24,45± 6,44	22,45± 5,49	23,68± 5,16	25,19± 8,36	27,79± 6,54

b=signifikant zu SHAM , e= signifikant zu SR vor Osteo, *=p < 0,05

3.6 Ergebnisse der Mikroradiographie

Dieser Ergebnisteil beginnt zunächst mit der Darstellung einer repräsentativen Mikroradiographie aus jeder Gruppe. Anschließend erfolgt wieder die Darstellung der Ergebnisse; zuerst in Form von Säulendiagrammen und zum Schluss zusammenfassend in einer Tabelle.

3.6.1 Repräsentative Mikroradiographien

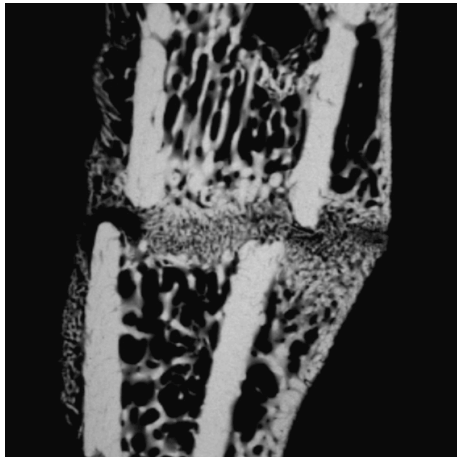


Abb. 50: Mikroradiographie aus der Gruppe SHAM

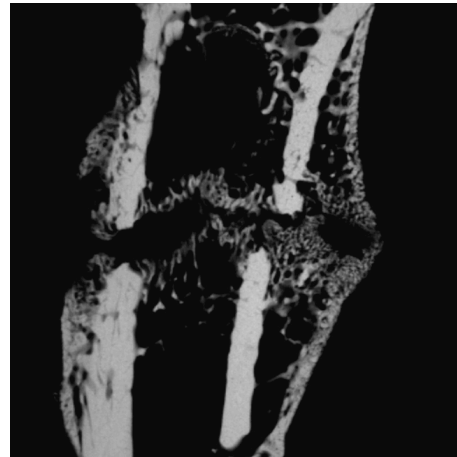


Abb. 51: Mikroradiographie aus der Gruppe OVX

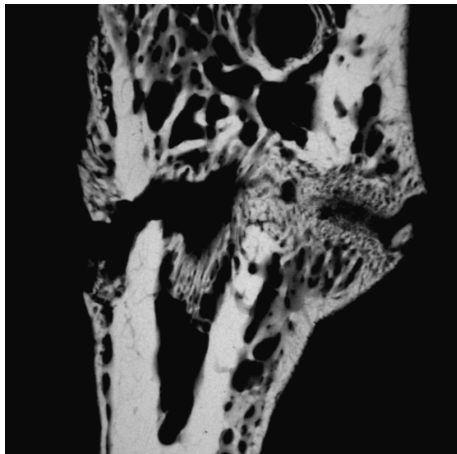


Abb. 52: Mikroradiographie aus der Gruppe SR nach Osteo



Abb. 53: Mikroradiographie aus der Gruppe SR vor Osteo

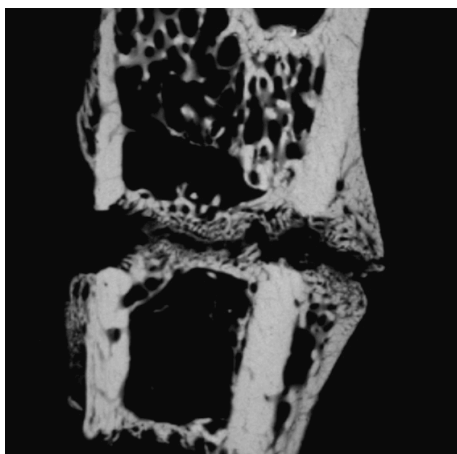


Abb. 54: Mikroradiographie aus der Gruppe SR vor+nach Osteo

Bei der Betrachtung der Mikroradiographien fiel auf, dass die Kallusbildung bei allen Gruppen plattenfern bedeutend stärker ausgeprägt war als plattennah (Abb. 50-54).

Die Gruppe SHAM zeigte einen nahezu vollständig überbrückten Frakturspalt (Abb. 50), während bei den anderen Gruppen die Osteotomielinie noch deutlich zu sehen war (Abb. 51-54). Auch der Kallus selbst erschien bei dieser Versuchsgruppe dichter im Vergleich zu den anderen Gruppen. Des Weiteren wurden bei den scheinoperierten Tieren distal der Osteotomie üppige Trabekelformationen deutlich. Bei allen ovariectomierten Tieren zeigte sich die distale Trabekelfläche nahezu leer.

3.6.2 Kortikalis

3.6.2.1 Kortikalisdicke distal plattennah

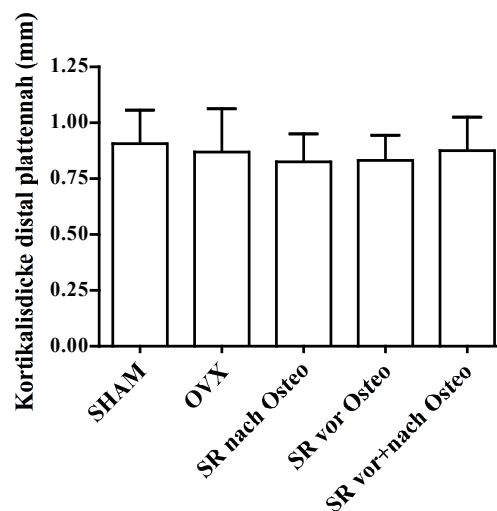


Abb. 55: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalisdicke distal plattennah

Bezüglich der distalen plattennahen Kortikalisdicke waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu erkennen (Abb. 55, Tab. 22). Dabei tendierten die Knochen der Gruppen SR nach Osteo und SR vor Osteo vergleichsweise eher zu einer geringeren distalen plattennahen Kortikalisdicke.

3.6.2.2 Kortikalisdicke distal plattenfern

Im Gegensatz zur distalen plattennahen Kortikalisdicke zeigten sich bezüglich der distalen plattenfernen Kortikalisdicke mehrere signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 56, Tab. 22). Die Knochen der Gruppe SR nach Osteo wiesen zu allen anderen Gruppen eine signifikant geringere distale plattenferne Kortikalisdicke auf. Dabei war der Unterschied zur Gruppe SR vor Osteo mit $p < 0,001$ sogar höchst signifikant.

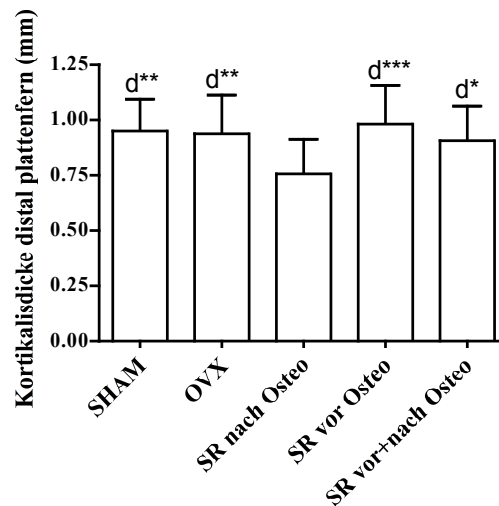


Abb. 56: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalisdicke distal plattenfern; d= signifikant zu SR nach Osteo, *=p < 0,05, **=p < 0,01, *= p < 0,001**

3.6.2.3 Kortikalisdichte distal plattennah

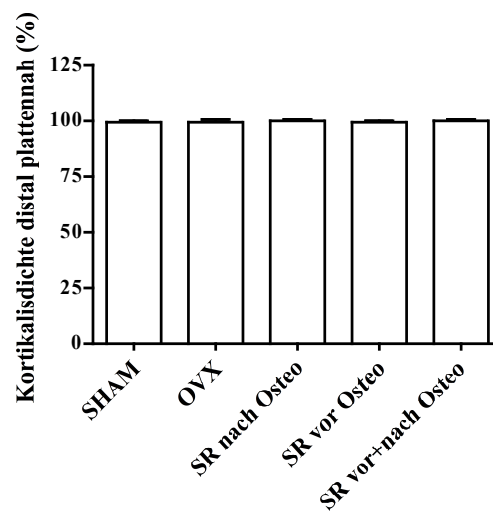


Abb. 57: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalisdichte distal plattennah

Bezüglich der distalen plattennahen Kortikalisdichte waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. (Abb. 57, Tab. 22) Die Kortikalisdichten waren in jeder Versuchsgruppe mit ca. 100% annähernd gleich.

3.6.2.4 Kortikalisdichte distal plattenfern

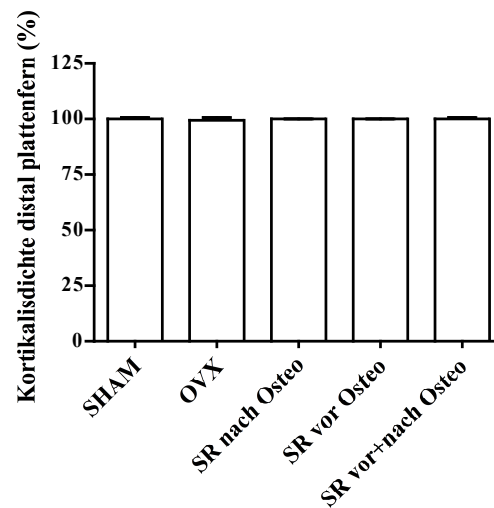


Abb. 58: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalisdichte distal plattenfern

Die Ergebnisse des Messparameters Kortikalisdichte distal plattenfern verhielten sich genauso wie die Ergebnisse des Messparameters Kortikalisdichte distal plattennah (vgl. 3.6.2.3, S. 72) (Abb. 58, Tab. 22).

3.6.3 Kallus

3.6.3.1 Kallusdicke plattennah

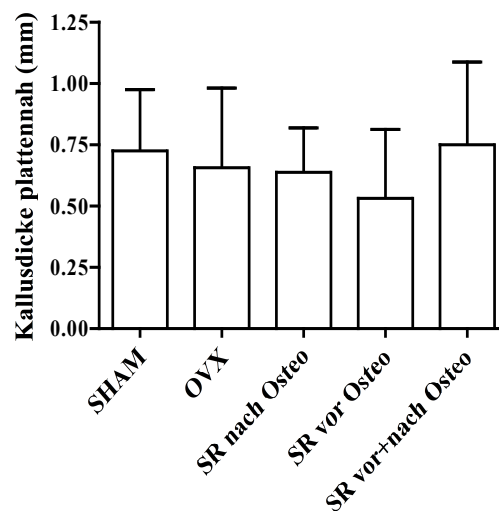


Abb. 59: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallusdicke plattennah

Hinsichtlich der plattennahen Kallusdicken waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu erkennen (Abb. 59, Tab. 23). Die Gruppe SR

vor+nach Osteo zeigte dabei mit 0,75 mm die größte und die Gruppe SR vor Osteo mit 0,54 mm die geringste plattennahe Kallusdicke.

3.6.3.2 Kallusdicke plattenfern

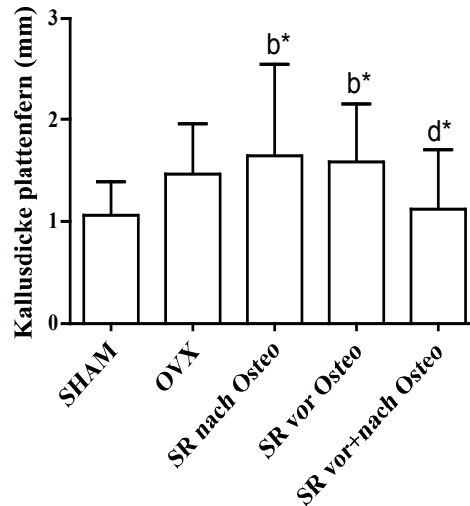


Abb. 60: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallusdicke plattenfern; b=signifikant zu SHAM, d=signifikant zu SR nach Osteo, *=p < 0,05

Bezüglich der plattenfernen Kallusdicke zeigten die Gruppen SR nach Osteo und SR vor Osteo im Vergleich zur Kontrollgruppe SHAM signifikant höhere Werte (Abb. 60, Tab. 23). Des Weiteren bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen SR nach Osteo und SR vor+nach Osteo. Zu beachten war allerdings die vergleichsweise höhere Standardabweichung bei der Gruppe SR nach Osteo.

3.6.3.3 Kallusdicke plattennah

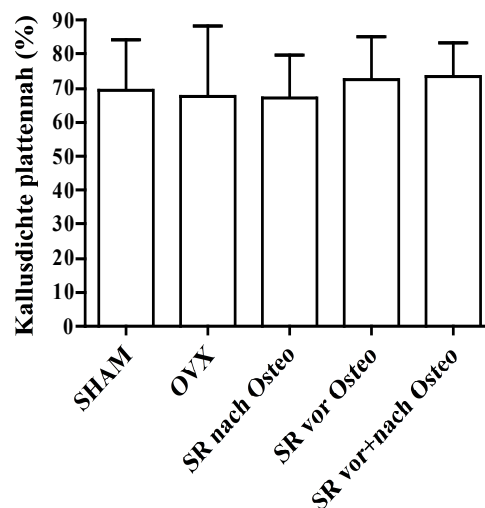


Abb. 61: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallusdicke plattennah

Bezüglich der plattennahen Kallusdichten waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (Abb. 61, Tab. 23). Die Versuchsgruppen SR vor Osteo und SR vor+nach Osteo tendierten dabei im Vergleich zu den restlichen Gruppen zu geringfügig höheren plattennahen Kallusdichten.

3.6.3.4 Kallusdichte plattenfern

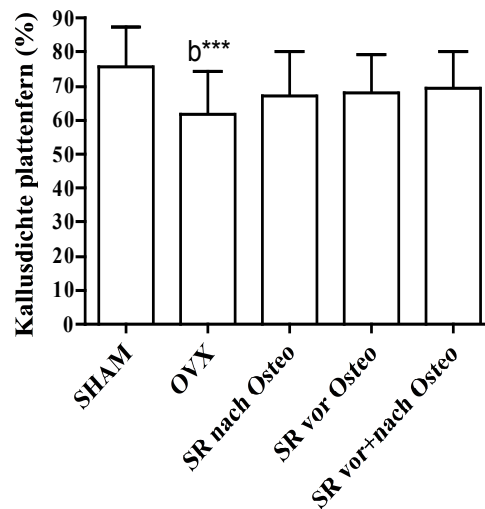


Abb. 62: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallusdichte plattenfern;
 b=signifikant zu SHAM, ***= $p < 0,001$

Hinsichtlich der plattenfernen Kallusdichte war ein höchst signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe SHAM und der Gruppe OVX zu erkennen (Abb. 62, Tab. 23).

3.6.3.5 Kallusdichte endostal

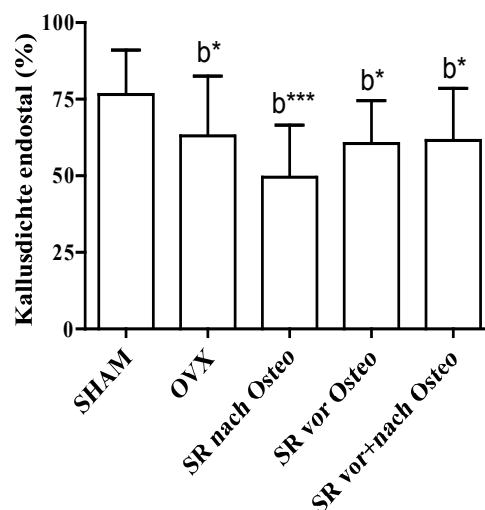


Abb. 63: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallusdichte endostal;
 b=signifikant zu SHAM, *= $p < 0,05$, ***= $p < 0,001$

Die Kontrollgruppe SHAM wies mit einem Mittelwert von 76,59 % im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen die signifikant höchste endostale Kallusdichte auf (Abb. 63, Tab. 23). Dabei war die endostale Kallusdichte der Gruppe SR nach Osteo mit einem Mittelwert von 49,64 % gegenüber SHAM sogar höchst signifikant ($p < 0,001$) verringert.

3.6.4 Trabekel

3.6.4.1 Trabekeldichte distal

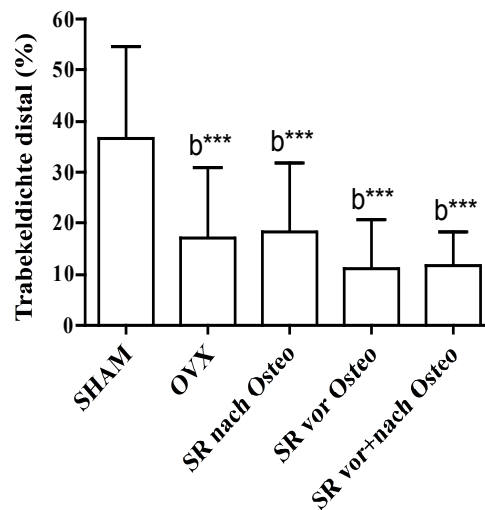


Abb. 64: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Trabekeldichte distal;
 b=signifikant zu SHAM, ***= $p < 0,001$

Wie schon bei den Mikroradiographien (Abb. 50-54) gesehen, zeigte auch die statistische Auswertung für die Kontrollgruppe SHAM eine höhere distale Trabekeldichte im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen (Abb. 64, Tab. 24). Der Unterschied war dabei mit $p < 0,001$ höchst signifikant.

3.6.4.2 Anzahl der Trabekelkreuzungen

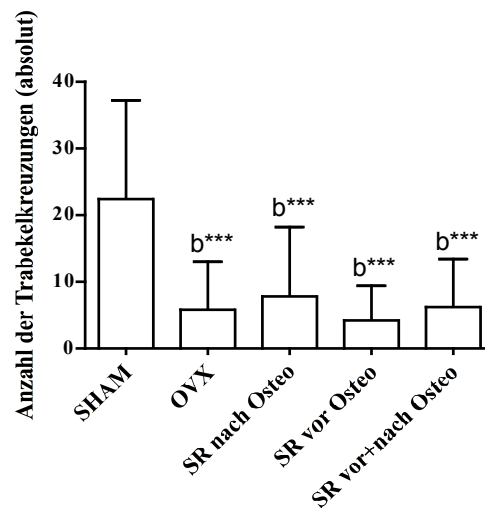


Abb. 65: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Anzahl der Trabekelkreuzungen; b=signifikant zu SHAM, *= $p < 0,001$**

Auch hinsichtlich der Anzahl der Trabekelkreuzungen wiesen alle Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe SHAM höchst signifikant geringere Werte auf (Abb. 65, Tab. 24).

3.6.4.3 Dichte der Trabekelkreuzungen

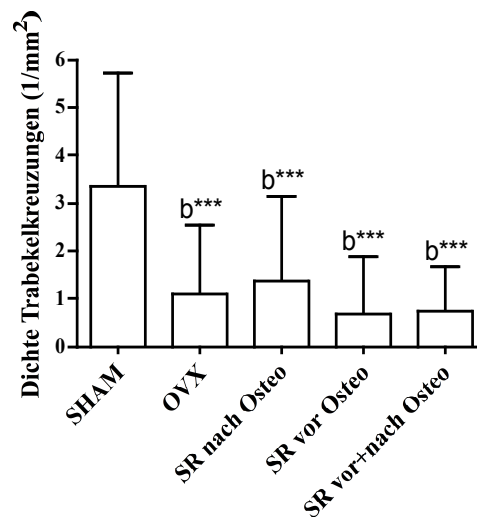


Abb. 66: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Dichte der Trabekelkreuzungen; a=signifikant zu SHAM, *= $p < 0,001$**

Auch bezüglich des Messparameters Dichte der Trabekelkreuzungen waren die Werte der Kontrollgruppe SHAM höchst signifikant höher (Abb. 66, Tab. 24).

3.6.4.4 Mittlere Trabekeldicke

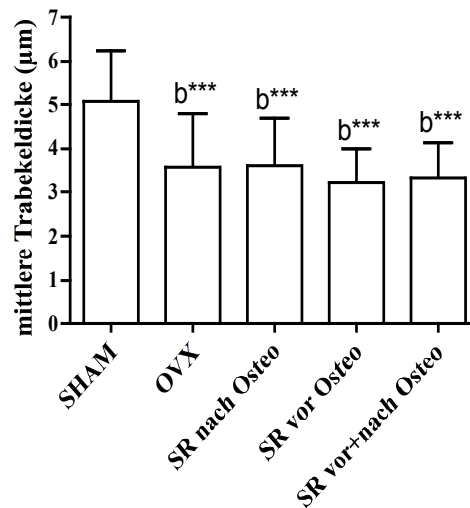


Abb. 67: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters mittlere Trabekeldicke; b=signifikant zu SHAM, ***=p < 0,001

Alle Gruppen zeigten eine höchst signifikant niedrigere mittlere Trabekeldicke im Vergleich zur Kontrollgruppe SHAM (Abb. 67, Tab. 24). Die mittleren Trabekeldicken der Strontiumranelatgruppen unterschieden sich kaum von den Werten der OVX-Gruppe.

3.6.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

3.6.5.1 Kortikalis

Tabelle 22: Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung der Kortikalismessgrößen

Parameter	SHAM	OVX	SR nach Osteo	SR vor Osteo	SR vor + nach Osteo
Kortikalisdicke distal plattennah (mm)	0,90±0,15	0,87±0,20	0,83±0,12	0,83±0,11	0,87±0,15
Kortikalisdicke distal plattenfern (mm)	0,95±0,14 (d**)	0,93±0,18 (d**)	0,76±0,15	0,98±0,17 (d***)	0,90±0,15 (d*)
Kortikalisdichte distal plattennah (%)	99,18±0,84	99,13±1,04	99,51±0,72	99,43±0,63	99,67±0,74
Kortikalisdichte distal plattenfern (%)	99,57±0,66	99,16±1,15	99,51±0,53	99,68±0,40	99,60±1,03

d=signifikant zu SR nach Osteo, *=p < 0,05, **=p < 0,01, ***=p < 0,001

3.6.5.2 Kallus

Tabelle 23: Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung der Kallusmessgrößen

Parameter	SHAM	OVX	SR nach Osteo	SR vor Osteo	SR vor + nach Osteo
Kallusdicke plattennah (mm)	0,72±0,25	0,66±0,32	0,64±0,18	0,54±0,28	0,75±0,34
Kallusdicke plattenfern (mm)	1,06±0,33	1,46±0,49	1,65±0,90 (b*)	1,58±0,58 (b*)	1,13±0,58 (d*)
Kallusdicke plattennah (%)	69,45± 14,66	67,40± 20,76	67,06± 12,53	72,37± 12,88	73,58± 9,59
Kallusdicke plattenfern (%)	75,81± 11,47	61,65± 12,71 (b***)	67,16± 12,81	68,24± 11,24	69,47± 10,83
Kallusdicke endostal (%)	76,59± 14,40	63,04± 19,69 (b*)	49,64± 17,01 (b***)	60,71± 13,65 (b*)	61,47± 16,89 (b*)

b=signifikant zu SHAM, d= signifikant zu SR nach Osteo, *=p < 0,05, ***=p < 0,001

3.6.5.3 Trabekel

Tabelle 24: Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung der Trabekelmessgrößen

Parameter	SHAM	OVX	SR nach Osteo	SR vor Osteo	SR vor + nach Osteo
Trabekeldichte distal (%)	36,54± 18,02	17,01± 13,95 (b***)	18,32± 13,60 (b***)	11,26± 9,39 (b***)	11,62± 6,79 (b***)
Anzahl der Trabekelkreuzungen	22,30± 14,82	5,77± 7,18 (b***)	7,71± 10,51 (b***)	4,04± 5,26 (b***)	6,16± 7,24 (b***)
Dichte der Trabekelkreuzungen (1/mm ²)	3,36±2,35	1,09±1,45 (b***)	1,37±1,76 (b***)	0,69±1,21 (b***)	0,74±0,93 (b***)
Mittlere Trabekeldicke (µm)	5,10±1,16	3,58±1,21 (b***)	3,62±1,06 (b***)	3,23±0,77 (b***)	3,33±0,82 (b***)

b=signifikant zu SHAM, ***=p < 0,001

3.7 Ergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung

Zunächst erfolgt auch bei der Ergebnispräsentation der polychromen Sequenzmarkierung die Darstellung eines repräsentativen Bildes aus jeder Versuchsgruppe. Anschließend werden die Ergebnisse der statistischen Auswertung in Form von Säulendiagrammen visualisiert und schließlich in einer Tabelle zusammengefasst.

3.7.1 Repräsentative Bilder der polychromen Sequenzmarkierung

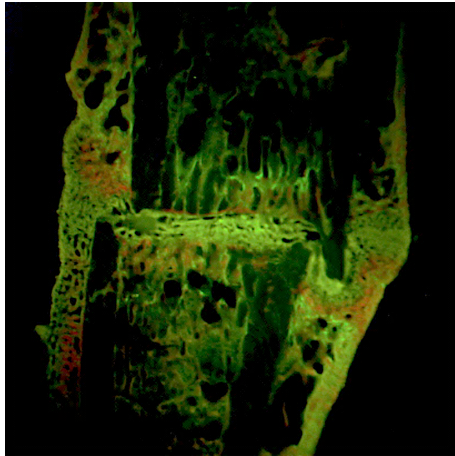


Abb. 68: Bild der polychromen Sequenzmarkierung aus der Gruppe SHAM

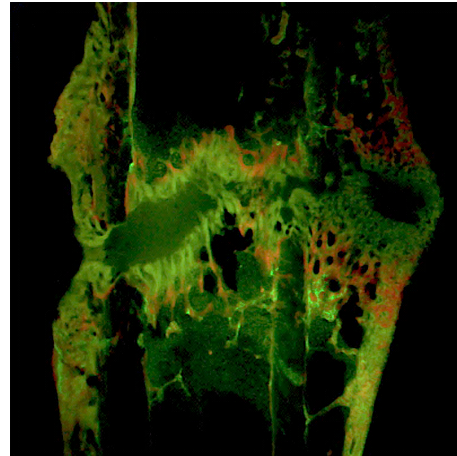


Abb. 69: Bild der polychromen Sequenzmarkierung aus der Gruppe OVX

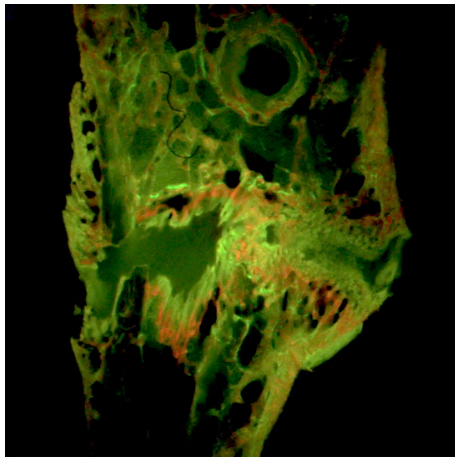


Abb. 70: Bild der polychromen Sequenzmarkierung aus der Gruppe SR nach Osteo

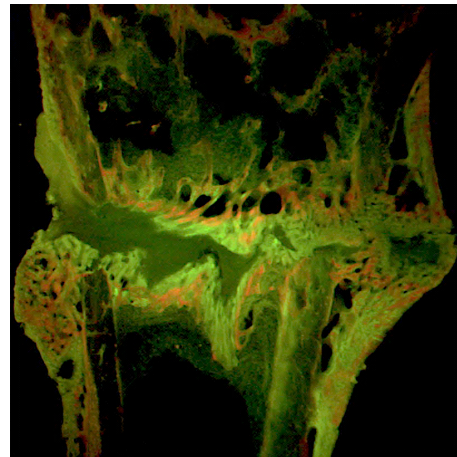


Abb. 71: Bild der polychromen Sequenzmarkierung aus der Gruppe SR vor Osteo

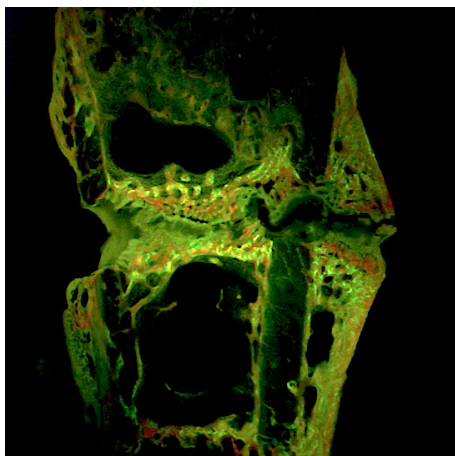


Abb. 72: Bild der polychromen Sequenzmarkierung aus der Gruppe SR vor+nach Osteo

Wie bei den Mikroradiographien fiel auch bei den Bildern der polychromen Sequenzmarkierung die nahezu vollständige Überbrückung des Frakturspalts bei der Gruppe SHAM (Abb. 68) auf, während bei allen ovariectomierten Tieren noch deutliche Lücken zu sehen waren (Abb. 69-72). Die vier Fluorochrome hatten sich in allen Gruppen vor allem im Kallusbereich angereichert. In welcher Gruppe ein Fluorochrom mehr oder weniger vertreten war, konnte man nur mit Hilfe der Software feststellen.

3.7.2 Kallus plattennah

3.7.2.1 Gesamt-Kallusfläche

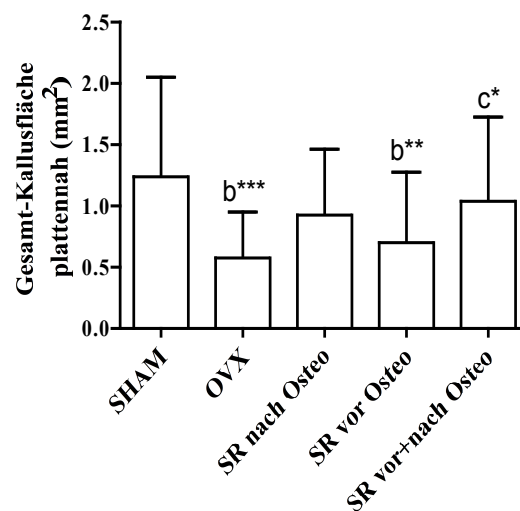


Abb. 73: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Gesamt-Kallusfläche plattennah; b=signifikant zu SHAM, c= signifikant zu OVX, *=p < 0,05, **=p < 0,01, ***=p < 0,001

Bezüglich der Messgröße der plattennahen Gesamt-Kallusfläche waren mehrere signifikante Unterschiede zu erkennen (Abb. 73, Tab. 26). Zum einen zeigten die Versuchsgruppen OVX höchst signifikant und SR vor Osteo hoch signifikant niedrigere plattennahe Gesamt-Kallusflächen als die Kontrollgruppe SHAM. Die Gruppe SR vor+nach Osteo präsentierte zum anderen signifikant höhere Werte im Vergleich zur Gruppe OVX.

3.7.2.2 CG-markierte Fläche

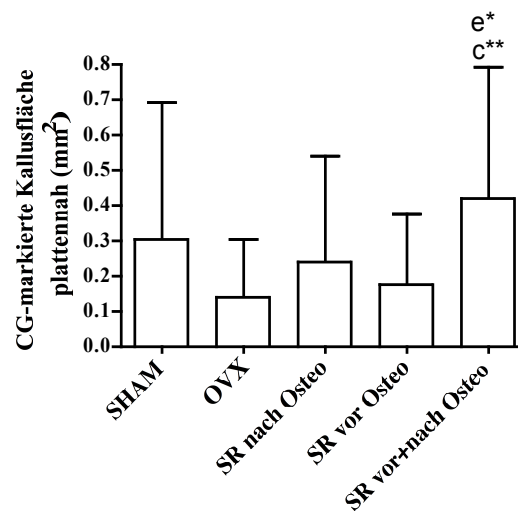


Abb. 74: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße CG-markierte Kallusfläche plattennah; c=signifikant zu OVX, e= signifikant zu SR vor Osteo, *=p < 0,05, **=p < 0,01

Die CG-markierte plattennahe Kallusfläche war bei den Gruppen OVX hoch signifikant und SR vor Osteo signifikant niedriger als bei der Versuchsgruppe SR vor+nach Osteo (Abb. 74, Tab. 26). Allerdings waren die hohen Standardabweichungen zu beachten.

3.7.2.3 AK-markierte Fläche

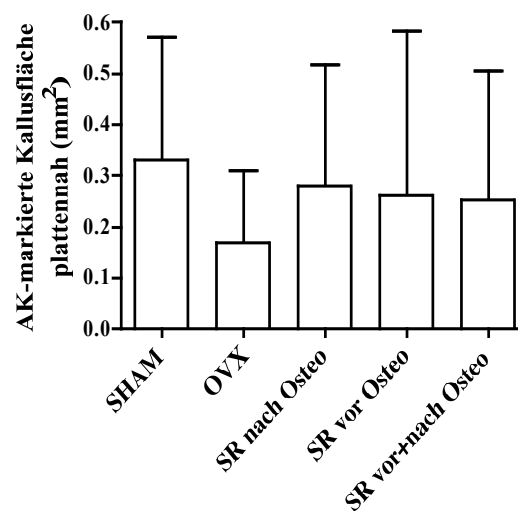


Abb. 75: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße AK-markierte Kallusfläche plattennah

Hinsichtlich der AK-markierten plattennahen Kallusfläche waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (Abb. 75, Tab. 26). Die Strontiumranelatgruppen tendierten jedoch zu höheren Werten als die Versuchsgruppe OVX. Auch hier waren wieder die sehr hohen Standardabweichungen zu beachten.

3.7.2.4 TC-markierte Fläche

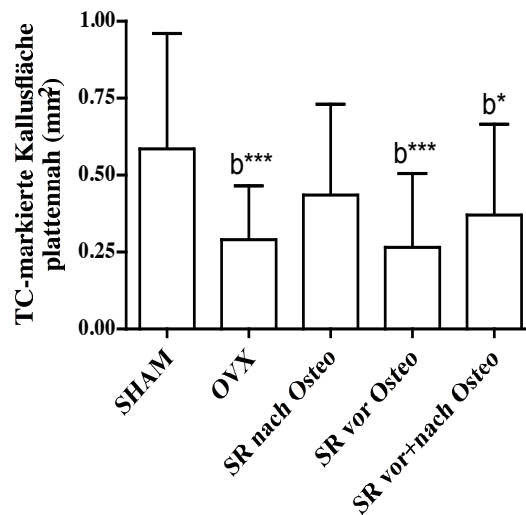


Abb. 76: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße TC-markierte Kallusfläche plattennah; b=signifikant zu SHAM, *= $p < 0,05$, *= $p < 0,001$**

Die Versuchsgruppen OVX und SR vor Osteo zeigten höchst signifikant und die Gruppe SR vor+nach Osteo signifikant niedrigere TC-markierte plattennahe Kallusflächen als die Kontrollgruppe SHAM (Abb. 76, Tab. 26).

3.7.3 Kallus plattenfern

3.7.3.1 Gesamt-Kallusfläche

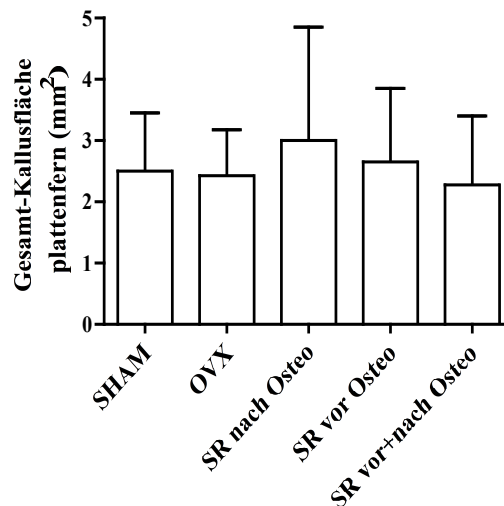


Abb. 77: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Gesamt-Kallusfläche plattenfern

Bezüglich der plattenfernen Gesamt-Kallusfläche konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 77, Tab. 27). Allerdings tendierte die Gruppe SR nach Osteo im Vergleich zu den restlichen Versuchsgruppen eher zu höheren Werten.

3.7.3.2 CG-markierte Fläche

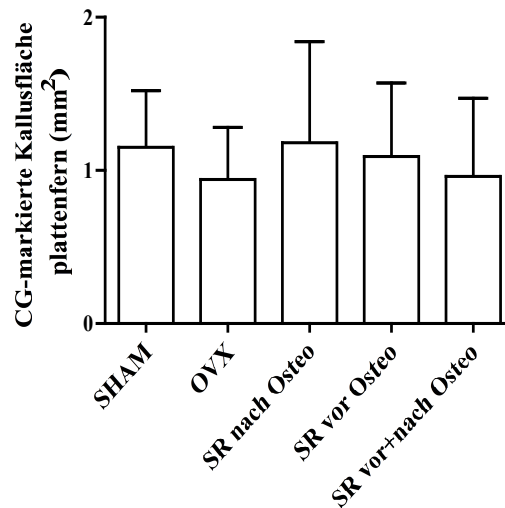


Abb. 78: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße CG-markierte Kallusfläche plattenfern

Hinsichtlich der Messgröße CG-markierte Kallusfläche plattenfern konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 78, Tab. 27).

3.7.3.3 AK-markierte Fläche

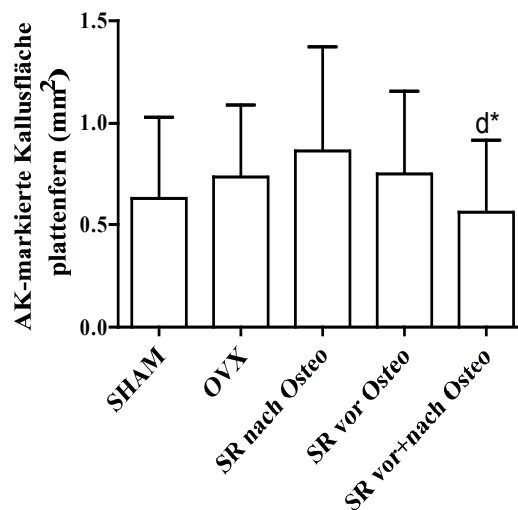


Abb. 79: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße AK-markierte Kallusfläche plattenfern; d=signifikant zu SR nach Osteo, *=p < 0,05

Die Gruppe SR nach Osteo zeigte eine signifikant höhere AK-markierte plattenferne Kallusfläche als die Versuchsgruppe SR vor+nach Osteo (Abb. 79, Tab. 27).

3.7.3.4 TC-markierte Fläche

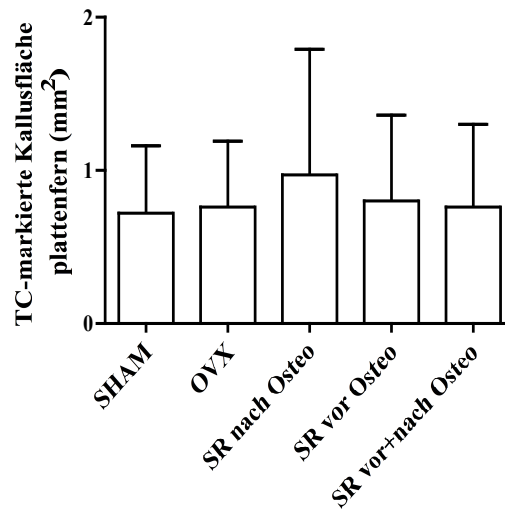


Abb. 80: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße TC-markierte Kallusfläche plattenfern

Bezüglich der TC-markierten plattenfernen Kallusfläche waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar (Abb. 80, Tab. 27). Die Versuchsgruppe SR nach Osteo wies mit durchschnittlich 0,97 mm² die größte Fläche auf.

3.7.4 Kallus endostal

3.7.4.1 Gesamt-Kallusfläche

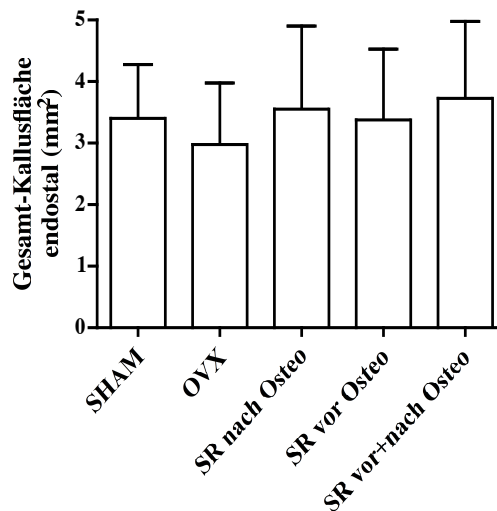


Abb. 81: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Gesamt-Kallusfläche endostal

Bei der Messgröße Gesamt-Kallusfläche endostal waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (Abb. 81, Tab. 28). Allerdings tendierten die Gruppen SR nach

Osteo und SR vor+nach Osteo sogar zu größeren Gesamtflächen als die Kontrollgruppe SHAM.

3.7.4.2 CG-markierte Fläche

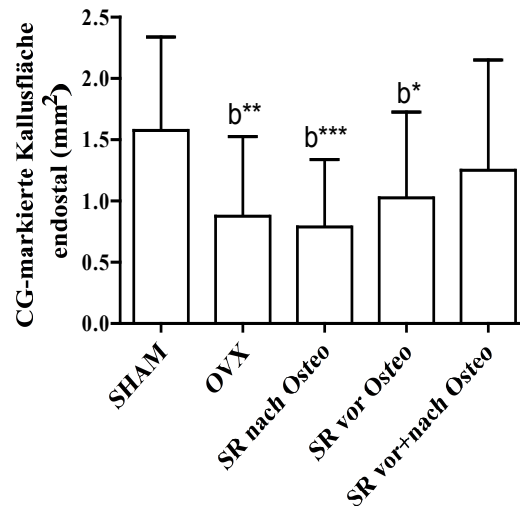


Abb. 82: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße CG-markierte Kallusfläche endostal; b=signifikant zu SHAM, *=p < 0,05, **=p < 0,01, ***=p < 0,001

Hinsichtlich der CG-markierten endostalen Kallusfläche waren mehrere Signifikanzen zu erkennen (Abb. 82, Tab. 28). Die Gruppe SR vor Osteo zeigte eine signifikant, die Gruppe OVX eine hoch signifikant und die Gruppe SR nach Osteo eine höchst signifikant niedrige Fläche im Vergleich zur Kontrollgruppe SHAM.

3.7.4.3 AK-markierte Fläche

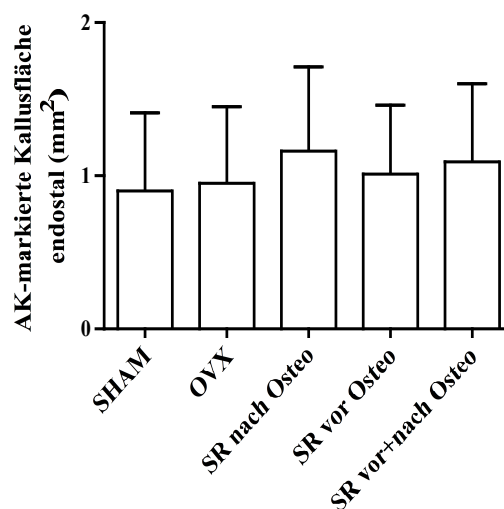


Abb. 83: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße AK-markierte Kallusfläche endostal

Bezüglich der AK-markierten endostalen Kallusfläche waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen erkennbar (Abb. 83, Tab. 28).

3.7.4.4 TC-markierte Fläche

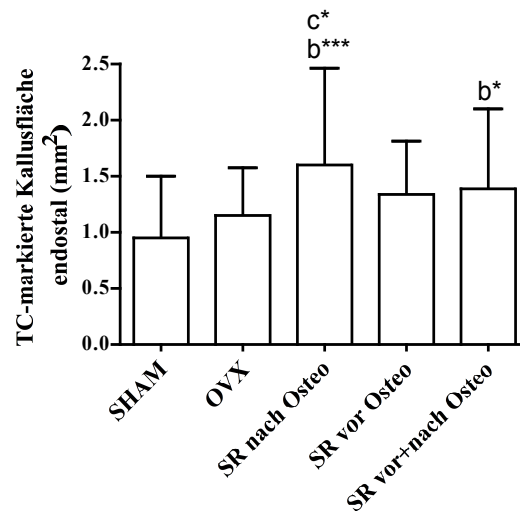


Abb. 84: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße TC-markierte Kallusfläche endostal; b=signifikant zu SHAM, c=signifikant zu OVX, *=p < 0,05, ***=p < 0,001

Die Versuchsgruppe SR nach Osteo zeigte eine höchst signifikant höhere TC-markierte endostale Kallusfläche als die Kontrollgruppe SHAM und eine signifikant höhere Fläche als die Gruppe OVX (Abb. 84, Tab. 28). Des Weiteren kam es noch zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen SHAM und SR vor+nach Osteo, wobei die letztere den höheren Wert aufwies.

3.7.5 Gesamter Kallus

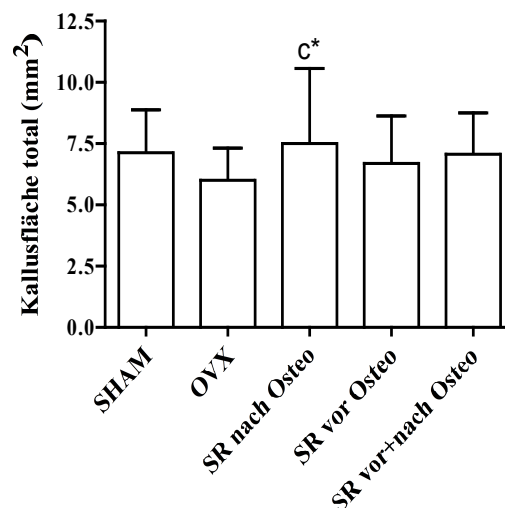


Abb. 85: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Kallusfläche total; c=signifikant zu OVX, *=p < 0,05

Betrachtete man die gesamte Kallusfläche, so zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen OVX und SR nach Osteo (Abb. 85, Tab. 29).

3.7.6 Zeitpunkt der frühesten Überbrückung des Frakturspalts

Tabelle 25: Darstellung der Zeitpunkte der frühesten Frakturüberbrückung in Tagen

Rattenanzahl	SHAM	OVX	SR nach Osteo	SR vor Osteo	SR vor + nach Osteo
1	20	32	34	16	14
2	32	27	33	31	16
3	27	32	20	25	21
4	16	20	19	25	25
5	18	20	25	25	20
6	20	32	20	31	16
7	27	20	20	20	31
8	20	20	32	16	22
9	31	19	32	25	25
10	31	16	23	33	14
11	16	34			
Mittelwert	23,5	24,7	25,8	24,7	20,4

Die früheste Überbrückung des Frakturspalts zeigte mit rund vier Tagen vor den intakten Tieren eindeutig die Gruppe SR vor+nach Osteo (Tab. 25, Tab. 30). Die Gruppen OVX und SR vor Osteo ließen erste Brücken am 25. Tag der Frakturheilung circa 1 Tag nach der Versuchsgruppe SHAM erkennen. Bei der Gruppe SR nach Osteo kam es erst am 26. Tag der Frakturheilung zur einer ersten Überbrückung des Frakturspalts.

3.7.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung

3.7.7.1 Kallus plattennah

Tabelle 26: Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung der Messgrößen des plattennahen Kallus

Kallusfläche plattennah	SHAM	OVX	SR nach Osteo	SR vor Osteo	SR vor + nach Osteo
Gesamt-Kallusfläche (mm ²)	1,23±0,81	0,58±0,37 (b***)	0,93±0,54	0,70±0,58 (b**)	1,04±0,69 (c*)
CG-markierte Fläche (mm ²)	0,30±0,39	0,14±0,16	0,24±0,30	0,17±0,20	0,42±0,37 (e*) (c**)
AK-markierte Fläche (mm ²)	0,33±0,24	0,17±0,14	0,28±0,24	0,26±0,32	0,25±0,25
TC-markierte Fläche (mm ²)	0,59±0,37	0,29±0,18 (b***)	0,44±0,29	0,27±0,24 (b***)	0,37±0,29 (b*)

b=signifikant zu SHAM, c=signifikant zu OVX, e= signifikant zu SR vor Osteo, *= p < 0,05, **=p < 0,01, ***=p < 0,001

3.7.7.2 Kallus plattenfern

Tabelle 27: Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung der Messgrößen des plattenfernen Kallus

Kallusfläche plattenfern	SHAM	OVX	SR nach Osteo	SR vor Osteo	SR vor + nach Osteo
Gesamt-Kallusfläche (mm ²)	2,51±0,94	2,44±0,75	3,02±1,84	2,64±1,22	2,29±1,12
CG-markierte Fläche (mm ²)	1,16±0,37	0,94±0,34	1,18±0,66	1,09±0,48	0,96±0,52
AK-markierte Fläche (mm ²)	0,63±0,40	0,74±0,35	0,87±0,51	0,75±0,40	0,57±0,35 (d*)
TC-markierte Fläche (mm ²)	0,72±0,44	0,76±0,43	0,97±0,82	0,80±0,56	0,76±0,54

d=signifikant zu SR nach Osteo, *=p < 0,05

3.7.7.3 Kallus endostal

Tabelle 28: Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung der Messgrößen des endostalen Kallus

Kallusfläche endostal	SHAM	OVX	SR nach Osteo	SR vor Osteo	SR vor + nach Osteo
Gesamt-Kallusfläche (mm ²)	3,41±0,87	2,97±1,00	3,56±1,36	3,38±1,14	3,72±1,26
CG-markierte Fläche (mm ²)	1,58±0,77	0,88±0,66 (b**)	0,79±0,55 (b***)	1,03±0,69 (b*)	1,26±0,90
AK-markierte Fläche (mm ²)	0,90±0,52	0,95±0,50	1,17±0,55	1,01±0,45	1,09±0,51
TC-markierte Fläche (mm ²)	0,95±0,55	1,14±0,43	1,60±0,86 (c*) (b***)	1,33±0,48	1,39±0,70 (b*)

d=signifikant zu SR nach Osteo, *=p < 0,05

3.7.7.4 Gesamter Kallus

Tabelle 29: Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung der Messgröße für den gesamten Kallus

Gesamter Kallus	SHAM	OVX	SR nach Osteo	SR vor Osteo	SR vor + nach Osteo
Kallusfläche total	7,14±1,72	6,00±1,36	7,50±3,10 (c*)	6,73±1,93	7,05±1,72

c=signifikant zu OVX, *= p < 0,05

3.7.7.5 Zeitpunkt der frühesten Überbrückung des Frakturspalts

Tabelle 30: Darstellung der Mittelwerte der frühesten Überbrückung der Frakturspalts für die einzelnen Gruppen

	SHAM	OVX	SR nach Osteo	SR vor Osteo	SR vor + nach Osteo
Früheste Frakturüberbrückung (d)	23,5	24,7	25,8	24,7	20,4

4 Diskussion

Strontiumranelat ist ein neuartiges Osteoporosemedikament, welches seit Oktober 2004 für die Osteoporosebehandlung postmenopausaler Frauen zugelassen ist. Seine positive Wirkung auf den osteoporotischen Knochen durch die gleichzeitige Förderung der Knochenbildung und die Hemmung der Knochenresorption sowie die Senkung des Frakturrisikos ist in zahlreichen Studien bereits bewiesen (Canalis et al. 1996, Baron und Tsouderos 2002, Meunier et al. 2004, Reginster et al. 2005). Die Ergebnisse der Strontiumranelatwirkung auf die Frakturheilung im osteoporotischen Knochen sind jedoch rar und auch nicht ganz einheitlich. Beim Menschen gibt es erste Hinweise darauf, dass Strontiumranelat eine komplizierte Frakturheilung unterstützen kann (Alegre et al. 2012). Während Strontiumranelat auf die Frakturheilung gesunder Tiere wohl keinen bis mäßigen Einfluss nimmt (Cebesoy et al. 2007, Brüel et al. 2011), bewiesen Li et al. (2010) und Ozturan et al. (2011) in vielerlei Hinsicht positive Effekte dieses Medikaments auf die Frakturheilung osteoporotischer Ratten. Die beiden letztgenannten Autoren führten allerdings diaphysäre Osteotomien an den Rattentibiae mit intramedullärer Fixation durch (Li et al. 2010, Ozturan et al. 2011). Es stellten sich daher die Fragen, wie Strontiumranelat auf die Frakturheilung bei Osteoporose der weitaus bedeutenderen metaphysären Frakturen wirkt und ob eine bereits bestehende Therapie mit Strontiumranelat bei Eintritt einer Fraktur fortgeführt oder abgebrochen werden sollte. Diese Fragestellungen galt es daher in dieser Studie zu untersuchen.

4.1 Die ovariectomierte Ratte als Osteoporosemodell und das metaphysäre Frakturmodell

Die ovariectomierte Ratte ist ein weltweit anerkanntes und etabliertes Osteoporosemodell. Dieses Modell ahmt zum einen korrekt die klinischen Charakteristika des postmenopausalen Knochenschwundes nach wie zum Beispiel der Steigerung des Knochenumbaus mit überwiegender Knochenresorption oder dem hauptsächlichsten Verlust an Spongiosa. Zum anderen weist die induzierte Osteoporose der Ratte ein ähnliches Therapieansprechen bezüglich wichtiger Osteoporosemedikamente wie Östrogen, Tamoxifen, Bisphosphonate, PTH oder Kalzitinin auf (Kalu 1991).

30-60 Tage nach erfolgter Ovariectomie kommt es in der proximalen Tibiametaphyse der Ratten zu einem Spongiosaverlust von bis zu 50 % (Jee und Yao 2001). Für diese Studie waren die acht Wochen also durchaus ausreichend für die Entwicklung einer Osteoporose bei den Tieren. Für die erfolgreiche Ovariectomie sprachen die höchst signifikant geringeren Uterusgewichte der ovariectomierten Ratten gegenüber den gesunden Tieren.

Die ovariectomierte Ratte zeigt keine spontan auftretenden Fragilitätsfrakturen, was leider die Klinik der osteoporoseerkrankten Patienten bestimmt (Jee und Yao 2001). Zu der gesteigerten Frakturhäufigkeit kommt noch die Beeinträchtigung der Frakturheilung in der frühen, mittleren und späten Phase (Kubo et al. 1999, Namkung-Matthai et al. 2001, Hao et al. 2007). Deswegen wurden zahlreiche Frakturmodelle entwickelt, um die Frakturheilung selbst und die Wirkung von Medikamenten auf die osteoporotische Knochenheilung zu untersuchen. Bei den meisten Frakturmodellen der Tibia handelt es sich um diaphysäre Frakturen, die meistens intramedullär durch Marknägel oder Kirschnerdrähte fixiert werden (Cebesoy et al. 2007, Li et al. 2010, Brüel et al. 2011, Ozturan et al. 2011). In diesem Versuch wurde ein metaphysäres Frakturmodell der Tibia mit Plattenosteosynthese verwendet. Osteoporoseerkrankte Menschen erleiden neben Wirbelkörperbrüchen vor allem metaphysäre Frakturen der langen Röhrenknochen, da die Osteoporose in den Metaphysen oft stärker ausgeprägt ist als in den Diaphysen. Es ist also zu betonen, dass diaphysäre Frakturen bei der Osteoporose klinisch keine Relevanz besitzen. Außerdem unterscheidet sich die metaphysäre (vgl. 1.4.4, S. 22) von der diaphysären Frakturheilung. Deswegen ist das metaphysäre Frakturmodell repräsentativer für die Untersuchung der osteoporotischen Frakturheilung (Stuermer et al. 2010). Dieses Modell wurde schon in zahlreichen vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe etabliert, wobei man die Wirkungen von Raloxifen und Östrogen, Equol und Genistein sowie PTH und Alendronat auf die Frakturheilung osteoporotischer metaphysärer Frakturen testete (Kolios et al. 2009, Kolios et al. 2010, Komrakova et al. 2010, Stuermer et al. 2010).

Als Heilungsdauer wurden wie in vorherigen Versuchen 5 Wochen gewählt, was der frühen bis mittleren Phase der Frakturheilung entspricht, in der die Kallusformation und die Überbrückung des Frakturspalts erfolgen (Komrakova et al. 2010).

4.2 Körpergewicht und tägliche Futtermittelaufnahme der Ratten

Während des gesamten Versuchs nahm das Körpergewicht bei allen Tieren kontinuierlich zu, was bei 3 Monate alten Sprague-Dawley-Ratten auf ein generelles Wachstum zurückzuführen ist (Berg und Harmison 1957, Komrakova et al. 2009). Ab der zweiten Versuchswoche zeigten die ovariectomierten Tiere ein höchst signifikant höheres Körpergewicht als die scheinoperierten Ratten. Es wurde schon gezeigt, dass dieses Phänomen mit einer gesteigerten Futtermittelaufnahme zusammenhängen kann (Butera 2010). Eine signifikant höhere Futtermittelaufnahme dieser Ratten gegenüber der SHAM-Gruppe lag in unserem Versuch allerdings nur nach der 3. Versuchswoche vor. Daher muss es neben einer gesteigerten Futtermittelaufnahme noch weitere Ursachen für das signifikant höhere Körpergewicht bei ovariectomierten Tieren geben. Toth et al. (2001) beobachteten zum Beispiel unabhängig von der Futtermittelaufnahme eine Zunahme der fettfreien Masse der Ratten in Folge der Ovariectomie. Dies beruhte vor allem auf einer Erhöhung der Muskelmasse durch eine gesteigerte Synthese der Muskelproteine (Toth et al. 2001). Dies wiederum kann das signifikant höhere Körpergewicht erklären. Ein weiterer Einflussfaktor könnte eine reduzierte körperliche Aktivität der ovariectomierten Tiere sein. Izumo et al. (2012) zeigten zum Beispiel, dass Östrogen einen wichtigen Einflussfaktor der zirkadianen körperlichen Bewegung der Ratten darstellt. Nach der Osteotomie kam es bei allen Tieren zu einem vorübergehenden Abfall der Futtermittelaufnahme und damit auch der Körpergewichte, was auf die Nachwirkungen der Narkose und trotz Schmerzmedikation auf postoperative Schmerzen zurückzuführen werden könnte. Dieses Phänomen wurde auch schon in früheren Versuchen beobachtet (Komrakova et al. 2009).

Alle Ratten der Strontiumranelatgruppen erhielten das Strontiumranelat oral als Futtermittelzusatzstoff, was eine schmerzfreie und einfache Methode der Wirkstoffapplikation darstellte. Dabei betrug die Dosis an SR in 1 kg Futter 10,52 g, wodurch die Tiere durchschnittlich 654 mg/kg/Tag aufnahmen. Bei intakten, adulten Ratten wurden bereits für Dosierungen zwischen 225-900 mg/kg/Tag auf metaphysischer Ebene positive Effekte auf die Knochenumbau beschrieben (Marie 2006). Amman et al. (2004) zeigten, dass eine mittlere Dosis von 625 mg/kg/Tag ausreichend für eine signifikante Steigerung der BMD, BV/TV, der Trabekeldicke und der Trabekelanzahl war. Li et al. (2010) bestätigten die positive Wirkung dieser Dosis auf die Frakturheilung. Des Weiteren werden bei den Ratten bei einer Aufnahme von 625 mg/kg/Tag ähnliche

Blutkonzentration wie bei Osteoporosepatienten erreicht, die eine therapeutische Dosis von 2g/d erhalten (Bain et al. 2009). Somit erwies sich die Dosis von 654 mg/kg/Tag als geeignet und es waren positive Effekte zu erwarten.

4.3 Diskussion der Ergebnisse des biomechanischen Tests

Biomechanische Tests kann man als eine Qualitätskontrolle der Frakturheilung sehen, indem die Elastizität und die Festigkeit des Kallus geprüft werden.

Dass Osteoporose sich negativ auf die biomechanischen Eigenschaften des Frakturkallus auswirkt, wurde schon mehrfach anhand diaphysärer Frakturmodelle des Femurs oder der Tibia gezeigt (Namkung-Matthai et al. 2001, Wang et al. 2005, Hao et al. 2007, McCann et al. 2008).

Ursächlich ist vor allem die oft beschriebene herabgesetzte Kallusqualität in Form von verminderter Kallus-BMD bei der osteoporotischen Frakturheilung (Wang et al. 2005).

Li et al. (2010) und Ozturan et al. (2011) beschrieben eine hoch bis höchst signifikante Steigerung der biomechanischen Eigenschaften des Frakturkallus unter Strontiumranelattherapie für die frühe Phase der Frakturheilung. Diese Ergebnisse konnten in unserem Versuch nur tendenziell bestätigt werden. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Elastizität, der Streckgrenze oder der Maximalkraft erkennbar. Dass Osteoporose keinen Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften des Frakturkallus in der frühen Phase der Frakturheilung hat, wurde auch schon diskutiert (Kubo et al. 1999, Melhus et al. 2007). Die gesunden Tiere zeigten allerdings tendenziell eine höhere Elastizität des Kallus als die ovariectomierten Ratten, was auf eine bessere Qualität des Kallus zum Beispiel in Form einer höheren BMD hinweisen könnte. Die Gabe von Strontiumranelat führte in diesem Versuch tendenziell nur hinsichtlich der Streckgrenze und der Maximalkraft zu besseren Werten als bei den unbehandelten ovariectomierten Ratten. Damit kann nur teilweise bestätigt werden, dass Strontiumranelat die biomechanischen Eigenschaften des Kallus einer metaphysären osteoporotischen Fraktur verbessert. Das abweichende Ergebnis im Vergleich zu Li et al. (2010) könnte auf das unterschiedliche Frakturmodell und die unterschiedliche Durchführung des biomechanischen Tests zurückzuführen sein. Bei Li et al. (2010) wurde die Tibia komprimiert, in unserem Versuch gebogen, was oft nicht ideal möglich war auf Grund zu großer Kallusflächen. Dieses Problem

könnte auch die sehr hohen Standardabweichungen erklären. Eine Torsion der Tibiae wäre daher vielleicht besser geeignet, um diesem Problem aus dem Weg zu gehen. Allerdings hätte die Torsionsbewegung die Zerstörung des Kallus bzw. den Bruch des Knochens zur Folge. Die Tibiae hätten dann nicht mehr für die folgenden mikrocomputertomographischen und histologischen Untersuchungen zur Verfügung gestanden.

4.4 Diskussion der Ergebnisse der Mikrocomputertomographie

Die Mikrocomputertomographie ist eine Methode, die in unserer Arbeitsgruppe erst seit kurzem angewendet wird. Andere Forschergruppen nutzen die Mikrocomputertomographie vor allem für die Untersuchung der Trabekelstrukturen des Knochens und der Ermittlung der BV/TV (Arlot et al. 2008, Li et al. 2010). Der Nachteil des Mikro-CT-Analyse-Programms, mit dem in unserem Versuch gearbeitet wurde, ist die schlechte Differenzierbarkeit zwischen Kallus und trabekulären Strukturen der Tibia. Die differenzierte Untersuchung dieser Strukturen erfolgte daher mit der Mikroradiographie und der polychromen Sequenzmarkierung. Allerdings wurden durch den Vergleich zweier Auswertmethoden Fortschritte in der BMD- und Volumenermittlung der Knochenstrukturen erarbeitet.

Strontiumranelat ist bekannt für seine signifikante Senkung des Frakturrisikos bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose. Als Ursache dafür wird oft die gesteigerte BMD angegeben, die ebenfalls unter Strontiumranelattherapie beobachtet wurde (Meunier et al. 2004, Reginster et al. 2005, Manette et al. 2006). Dieser Einfluss auf die BMD des Gesamtknochens konnte in diesem Versuch tendenziell bestätigt werden. Bei beiden Auswertmethoden ergab sich für die Strontiumranelatgruppen eine höhere BMD für den gesamten Knochen im Vergleich zur OVX-Gruppe, wobei die längerfristige Anwendung ähnlich hohe Werte wie SHAM erreichte (Gesamt BMD: SHAM: 558 ± 63 mg/cm³, OVX: 483 ± 65 mg/cm³, SR nach Osteo: 491 ± 44 mg/cm³, SR vor Osteo: 521 ± 65 mg/cm³, SR vor+nach Osteo: 553 ± 65 mg/cm³). Die gleiche Tendenz galt auch für das BV/TV. Strontiumranelat kann also die Masse an mineralisiertem Knochen steigern, wobei die rein prophylaktische Gabe einen größeren Effekt zu erzielen scheint als die rein therapeutische, wofür aber die unterschiedlich langen Applikationszeiträume verantwortlich sein könnten (Prophylaxe: 8 Wochen, Therapie: 5 Wochen).

Bemerkenswert ist allerdings, dass die Strontiumranelatgabe nach der Osteotomie zu dem höchsten Gesamtvolumen des Knochens führte mit Signifikanzen zu SHAM und SR vor Osteo bei der Auswertung mit definierten Schwellenwerten. Dabei hatte diese Gruppe aber die niedrigste BMD unter den Therapiegruppen. Diese Therapie scheint also die Knochenbildung, insbesondere auch die Kallusbildung zwar stark anzuregen, allerdings entsteht dabei Knochen mit ähnlicher Qualität wie bei den unbehandelten ovariectomierten Tieren.

Im Gegensatz zu vielen anderen Osteoporosemedikamenten scheint Strontiumranelat einen positiven Effekt auf die Kortikalis zu haben. Dabei wurde vor allem eine Zunahme der Kortikalismasse und Kortikalisdicke beobachtet (Ammann et al. 2004, Arlot et al. 2008). Die Kortikalis-BMD wurde in diesen Studien im Gegensatz zu unserem Versuch allerdings nicht ermittelt. Bei der Auswertung mit definierten Schwellenwerten ergab die prophylaktische Gabe von Strontiumranelat (Gruppen SR vor Osteo und SR vor+nach Osteo) eine signifikant höhere Kortikalis-BMD als bei den Gruppen SHAM, OVX und SR nach Osteo. Das deutet darauf hin, dass Strontiumranelat der Osteoporoseentwicklung entgegenwirkt, indem es den Knochen durch eine dichtere Kortikalis stärkt und, dass dieser Effekt bei bereits manifester Osteoporose nicht mehr auftritt. Die Versuchsgruppe Strontiumranelat vor+nach Osteo zeigte dazu noch ein signifikant höheres Kortikalisvolumen im Vergleich zu OVX, was den Knochen noch weiter stärkt.

Dass sich Strontiumranelat positiv auf die Kallusbildung und damit auf die Frakturheilung auswirkt, zeigten Li et al. (2010) unter anderem auch durch die hoch signifikant höhere Kallus-BMD ($0.125 \pm 0.022 \text{ mg/cm}^2$) nach 4 Wochen gegenüber den unbehandelten ovariectomierten Tieren ($0.098 \pm 0.017 \text{ mg/cm}^2$). Dieses Ergebnis konnte für die langfristige Gabe von Strontiumranelat bestätigt werden. Die Differenzierung zwischen hartem und weichem Kallus ergab zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, während aber die Gruppen OVX, SR nach Osteo und SR vor Osteo signifikant niedrigere Gesamtkallus-BMDs aufwiesen als SHAM, tendierte die Gruppe SR vor+nach Osteo zu ähnlichen Werten wie die von gesunden Tieren (wenn auch nicht signifikant zu OVX). Hinsichtlich des Kallusvolumens zeigte die SR-Gabe nach Osteotomie wieder den größten Wert mit einem hoch signifikant höheren weichen Kallusvolumen als SHAM, was die Annahme weiter bestätigt, dass die Gabe von Strontiumranelat nach Osteotomie die Kallusbildung zwar stark anregt, jedoch das neu gebildete Knochengewebe von minderer Qualität ist im Vergleich zu

dem der gesunden Tieren. Die Frakturheilung scheint unter dieser Therapie noch nicht so weit fortgeschritten zu sein, da der Kallus vor allem noch bindegewebig ist. Die Auswertung der polychromen Sequenzmarkierung (vgl. 4.6, S. 100) unterstützt diese Hypothese noch weiter, da die Frakturheilung unter dieser Therapie hinsichtlich des Beginns der endostalen Kallusbildung und der frühesten Frakturüberbrückung wie bei den unbehandelten ovariectomierten Tieren eher verzögert zu sein scheint.

Die Zunahmen der BMD und der BV/TV unter Strontiumranelat können mit der Wirkung dieses Medikament auf den Knochenumbau erklärt werden. SR steigert die Osteoblastogenese und Synthese von Matrixproteinen. Durch die gleichzeitige Hemmung der Osteoklastendifferenzierung und deren Resorptionsaktivität entsteht eine dichtere und größere mineralisierte Knochenmasse (Canalis et al. 1996, Baron und Tsouderos 2002). Dabei muss aber, wie schon in der Literatur angemerkt, beachtet werden, dass die Ergebnisse durch die mCT-Analyse überschätzt werden könnten auf Grund der größeren Röntgenabschwächung durch das im Vergleich zu Calcium größere SR-Atom (Blake und Fogelman 2005, Recker et al. 2009, Li et al. 2010). Allerdings ist zu hinterfragen, ob diese Überschätzung Relevanz besitzt, da nur weniger als ein Kalziumion von 10 Kalziumionen pro Hydroxylapatit-Kristall durch Strontiumranelat ersetzt wird (Boivin et al. 1996, Li et al. 2010).

Die Auswertung mit definierten Schwellenwerten bestätigte alle signifikanten Unterschiede, die bei der peakorientierten Auswertung zu erkennen waren, zeigte aber bei diesen Parametern noch weitere Signifikanzen auf. Außerdem ist es mit dieser Auswertung möglich, den Kallus noch besser zu differenzieren, indem mineralisiertes von nicht mineralisiertem Kallusgewebe unterschieden werden kann. Die präziseren Ergebnisse kommen wahrscheinlich von der besseren Objektivität dieser Auswertung, da die Schwellenwerte praktisch vorgegeben sind und dadurch unter höherer Standardisierung gearbeitet werden kann. Bei der peakorientierten Auswertung liegt es im Ermessen des Untersuchers, wo der Schwellenwert gesetzt wird.

4.5 Diskussion der Ergebnisse der Mikroradiographie

Bei der Mikroradiographie konnten hinsichtlich der Kortikalisdichte keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Selbst die ovariectomierten unbehandelten Tiere erreichten ähnliche Werte wie die intakten Tiere. Bei dieser Methode wird nur eine Flächendichte errechnet, während bei der Mikrocomputertomographie die Dichte vo-

lumenbezogen ermittelt wird. Das mCT scheint also in diesem Zusammenhang die Methode mit größerer Validität zu sein. Amman et al. (2004) und Arlot et al. (2008) beobachteten eine Zunahme der Kortikalisdicke unter Strontiumranelat. Diese Ergebnisse konnten in unserem Versuch nicht bestätigt werden, allerdings handelte es sich bei den genannten Studien um längere Beobachtungszeiträume von 2 Jahren (Amman et al. 2004) bzw. 1-5 Jahren (Arlot et al. 2008). Des Weiteren erfolgten die Messungen bei diesen beiden Studien an nicht frakturierten Knochen und nicht in unmittelbarer Nähe einer Fraktur wie es bei unserem Versuch der Fall war. Die Gruppe SR nach Osteo zeigte sogar zu allen Gruppen eine signifikant dünnere, distal plattenferne Kortikalis, was mit dem sehr dicken (signifikant zu SHAM und SR vor+nach Osteo) und großflächigen (vgl. 4.6, S. 100) plattenfernen Kallus in Verbindung gebracht werden könnte. Auf Grund der größeren plattenfernen Stabilität und damit der Abnahme der Belastung der plattenfernen Kortikalis wurde diese verschmälert.

Des Weiteren ergaben sich für die plattennahen und plattenfernen Kallusdicken ähnliche Werte zwischen SHAM und SR vor+nach Osteo, wobei beide Gruppen einen signifikant dünneren plattenfernen Kallus aufwiesen als die Gruppe SR nach Osteo. Diese Beobachtung könnte für einen ähnlichen Fortschritt der Frakturheilung sprechen. Im Allgemeinen stellt die Platte für den Knochen eine hohe Stabilität dar, während plattenfern noch Mikrobewegungen stattfinden können. Daher entsteht bei allen Tieren plattennah bedeutend weniger Kallusgewebe als plattenfern.

Hinsichtlich der Kallusdichte wurde bei der Mikroradiographie zwischen dem plattennahen, dem plattenfernen und dem endostalen Kallus unterschieden. Während bezüglich des plattennahen Kallus keine signifikanten Dichteunterschiede zu erkennen waren, zeigte die OVX-Gruppe bezüglich der plattenfernen Kallusdichte im Vergleich zu SHAM höchst signifikant niedrigere Werte, wobei die Strontiumranelatgruppen zu ähnlichen Werten wie bei den intakten Tieren tendierten. Leider wiesen alle ovariectomierten Ratten eine signifikant geringere endostale Kallusdichte auf als SHAM, wobei die Gruppe SR nach Osteo sogar höchst signifikant niedrigere Werte zeigte. Hinsichtlich der endostalen Kallusbildung ist die Frakturheilung der intakten Ratten also eindeutig weiter fortgeschritten. Diese Beobachtungen widersprechen teilweise den Dichteergebnissen der Mikrocomputertomographieanalyse, wobei wieder angemerkt werden muss, dass es sich hierbei nur um Flächendichten handelt und auch keine Ergebnisse über die Gesamt-Flächendichte des Kallus vorliegen.

Der Verlust an spongiösen Knochen stellt eines der Hauptprobleme der Osteoporose dar. Marie et al. (1993) zeigten, dass Strontiumranelat im Sinne der Osteoporoseprophylaxe den trabekulären Knochenschwund aufhalten kann. Auch eine Strontiumranelatgabe bei bereits bestehender Osteoporose kann die Trabekelanzahl wieder signifikant steigern, was bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose gezeigt wurde (Arlot et al. 2008). Selbst in intakten Ratten wirkte sich eine Strontiumranelatgabe durch eine signifikante Steigerung der Trabekelanzahl und der Trabekeldicke positiv auf die Mikroarchitektur des Knochens aus (Ammann et al. 2004). Li et al. (2010) beobachteten, dass auch während der Frakturheilung eine signifikante Zunahme der Trabekelanzahl und Trabekeldicke im Kallus unter Strontiumranelattherapie zu erkennen war.

Die Trabekeldichte, die mittlere Trabekeldicke, die Anzahl der Trabekelkreuzungen und die Dichte der Trabekelkreuzungen waren bei den unbehandelten ovariectomierten Tieren höchst signifikant niedriger als bei den scheinoperierten Tieren, was einen weiteren Beweis für die erfolgreiche Ovariectomie darstellte. Leider zeigte sowohl die prophylaktische als auch die therapeutische Strontiumranelatgabe ebenfalls höchst signifikant geringere Trabekelparameter als SHAM, was im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen steht. Die Unterschiede könnten zum einen mit den unterschiedlichen Applikationszeiträumen von Strontiumranelat erklärt werden (Ammann et al. 2004: 2 Jahre, Arlot et al. 2008: 1-5 Jahre). Um Aussage über die reine Prophylaxe des Trabekelverlusts zu machen, hätte man die Trabekelparameter bereits vor der Osteotomie untersuchen müssen. Da vor der Trabekelparametermessung allerdings noch das Frakturereignis und die Frakturheilung erfolgte, kann dies zum anderen als Erklärung dienen, warum die Werte dieses Versuchs von den Ergebnissen von Marie et al. (1993) abwichen. Li et al. (2010) untersuchten die Trabekelparameter im Kallusbereich im dreidimensionalen Bild (mCT), während in diesem Versuch die Trabekelfläche distal des Kallus im zweidimensionalen Bild untersucht wurde. Die Weiterentwicklung der Mikro-CT-Analyse in Hinblick auf die Trabekelanalyse in der Tibia könnte in Zukunft deutlichere Ergebnisse zeigen. Allerdings lag der Schwerpunkt dieses Versuchsteils auch eher auf der Untersuchung der Kallusformation. Die detaillierte Trabekelanalyse erfolgte Rahmen der anderen Versuchsteile anhand der Lendenwirbelsäule und dem Femur.

Die Mikroradiographie ist ein Verfahren, mit dem die Knochen nur zweidimensional ausgewertet werden können. In dem Sinne stellt die Mikrocomputertomographie mit

der dreidimensionalen Auswertung eine fortschrittlichere Methode dar. Allerdings kann mit der Mikroradiographie zwischen periostalen (plattennahen und plattenfernen) und endostalen Kallus unterschieden werden. Des Weiteren können die trabekulären Strukturen besser von den Kallusstrukturen abgegrenzt werden, was mit dem mCT-Analyseprogramm, mit dem in diesem Versuch gearbeitet wurde noch nicht ausreichend möglich ist. Allerdings können mit der Mikrocomputertomographie Parameter wie BMD, Volumen und BV/TV errechnet werden, welche besser mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen verglichen werden können. Das mCT ist also schon das effektivere Verfahren, muss allerdings hinsichtlich der Auswertung noch weiterentwickelt werden.

4.6 Diskussion der Ergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung

Dass die Osteoporose die Frakturheilung verzögert und beeinträchtigt, ist schon seit längerem bekannt (Kubo et al. 1999, Namkung-Matthai et al. 2001, Hao et al. 2007). Namkung-Matthai et al. (2001) zeigten, dass ovariectomierte Tiere nach 3 Wochen eine um 40 % geringere Kallusfläche aufweisen als scheinoperierte Tiere. Diese Beobachtung kann in diesem Versuch hinsichtlich des endostalen Kallus bestätigt werden. In den ersten 18 Tagen der Knochenheilung bildeten die scheinoperierten Tiere eine hoch signifikant größere endostale Kallusfläche als die unbehandelten ovariectomierten Tiere, was eine Verzögerung der frühen Phase der Frakturheilung bei Osteoporose bestätigt. Diese Verzögerung könnte mit dem gesteigerten Knochenumbau zu Gunsten der Knochenresorption bei der Osteoporose erklärt werden (Manolagas 2000). Islam et al. (2005) zeigten eine verlängerte Phase der enchondralen Ossifikation während der osteoporotischen Frakturheilung mit einer signifikant höheren Anzahl an Osteoblasten und Osteoklasten, wobei die Osteoklasten prominierten. Somit braucht der osteoporotische Knochen länger, um Kallus aufzubauen als der gesunde. Nach fünf Wochen besteht dieser Unterschied nicht mehr zwischen SHAM und OVX, da bei den unbehandelten ovariectomierten Tiere in der vierten und fünften Woche noch reichlich die endostale Kallusbildung erfolgte, welche hingegen bei SHAM schon weitgehend abgeschlossen war. In dieser Zeit findet bei der gesunden Frakturheilung schon großflächig die enchondrale Ossifikation mit Lamellenknochenbildung statt, während bei der osteoporotischen Frakturheilung die Kallusbildung noch längst nicht abgeschlossen ist und der Kallus vor allem noch knorpelig ist (Hao et al. 2007).

Deswegen ist es von großer Bedeutung Substanzen zu finden, die die Frakturheilung bei Osteoporose verbessern und unterstützen. Das hochwirksame und gut verträgliche antiresorptive Osteoporosemedikament Alendronat behindert zum Beispiel sowohl die frühe Phase der Frakturheilung, indem es den Beginn der Kallusbildung hinauszögert (Kolios et al. 2010), als auch die späte Phase, indem es den Kallusumbau hemmt (Cao et al. 2002, Fu et al. 2013). Strontiumranelat als antiresorptive und osteoanabole Substanz hingegen scheint das Potential zu haben die Frakturheilung bei Osteoporose positiv zu beeinflussen. Ozturan et al. (2010) zeigten, dass unter einer Strontiumranelatgabe als reine Frakturtherapie die Frakturüberbrückung nach 6 Wochen signifikant weiter fortgeschritten war im Vergleich zu den unbehandelten ovariectomierten Tieren. Diese Daten weisen darauf hin, dass Strontiumranelat in der Lage ist, der Verzögerung der Frakturheilung bei Osteoporose entgegenzuwirken. Unser Versuch gibt bei bestimmter Therapie ebenfalls Hinweise darauf.

Betrachtet man zunächst den Zeitpunkt der frühesten Frakturüberbrückung, so kam es bei der langfristigen Gabe von SR nicht zu einer Verzögerung der Frakturheilung. Die Überbrückung des Frakturspalts erfolgte sogar im Durchschnitt deutlich früher als bei den intakten Tieren, was zu der Hypothese führt, dass Strontiumranelat die Frakturheilung vielleicht sogar beschleunigen kann. Gibt man SR hingegen erst nach der Osteotomie tritt dieser Effekt nicht mehr auf. Die Osteotomieüberbrückung erfolgte bei dieser Gruppe sogar rund einen Tag später als bei der OVX-Gruppe.

Des Weiteren ist festzustellen, dass eine Strontiumranelatgabe als rein prophylaktische Therapie und als reine Frakturtherapie, die durch die Osteoporose induzierte Verzögerung der Frakturheilung während der ersten 18 Tage hinsichtlich der endostalen Kallusbildung nicht aufheben konnte (OVX, SR vor Osteo signifikant zu SHAM, SR nach Osteo höchst signifikant zu SHAM). Die kombinierte Gabe von Strontiumranelat als Osteoporoseprophylaxe und Frakturtherapie tendierte in dieser Zeit jedoch zu einem ähnlichen Fortschritt der Frakturheilung wie SHAM (kein signifikanter Unterschied zu SHAM). Innerhalb der vierten Woche zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der endostalen Kallusbildung zwischen den Gruppen. In der fünften Woche bildete die Gruppe SR nach Osteo höchst signifikant mehr endostalen Kallus als SHAM und OVX. Das deutet darauf, dass die Kallusbildung noch nicht abgeschlossen ist und dass die Frakturheilung eher verzögert abläuft. Auch die Gruppe SR vor+nach Osteo bildete signifikant mehr endostalen Kallus als die scheinoperierten Tiere. Die Kallusbildung ist also auch hier noch nicht abgeschlossen. Diese Gruppe

zeigte allerdings nach fünf Wochen, wenn auch nicht signifikant, die größte endostale Gesamtkallusfläche.

Auch hinsichtlich des plattennahen Kallus ergab die langfristige Gabe von SR die größte Kallusbildung mit signifikant höherer Kallusfläche nach 3 Wochen und nach 5 Wochen im Vergleich zu OVX, was die These, dass SR in der Lage ist, der Verzögerung der Frakturheilung induziert durch die Osteoporose entgegenzuwirken, weiter unterstützt. Des Weiteren ist zu betonen, dass diese Gruppe in den ersten drei Wochen der Frakturheilung wenn auch nicht signifikant mehr plattennahen Kallus als SHAM bildete. Die Gabe von SR vor+nach Osteo führt also früher zu periostaler Kallusbildung als es bei den intakten Tieren der Fall ist.

Betrachtet man den plattenfernen Kallus, wurden kaum signifikante Unterschiede in den gemessenen Zeiträumen festgestellt. Es sei dabei zu erwähnen, dass die Kallusbildung der Gruppe SR nach Osteo in jedem gemessenen Zeitraum die größte war mit einem signifikanten Unterschied in der 4. Woche gegenüber SR vor+nach Osteo. In dieser Gruppe kam es also vor allem zur periostalen Kallusbildung, was für die metaphysäre Frakturheilung eigentlich eher untypisch ist.

Hinsichtlich des Gesamtkallus zeigte die Gruppe SR nach Osteo nach fünf Wochen die größte Kallusfläche mit einem signifikanten Unterschied zu OVX.

Strontiumranelat wirkt sich also hinsichtlich der Kallusfläche positiv auf die Frakturheilung aus.

Durch seine gekoppelte Wirkung, die Knochenbildung zu steigern (Canalis et al. 1996), und die Knochenresorption zu hemmen (Baron und Tsouderos 2002), scheint es dem gestörten Knochenumbau und damit der gestörten Frakturheilung bei Osteoporose entgegenzuwirken und die Kallusbildung zu steigern.

Betrachtet man die reine Kallusbildung, ohne zunächst die Kallusqualität zu beachten, sollte die Strontiumranelattherapie bei Auftreten einer Fraktur weitergeführt werden, da sich diese Therapie positiv auf die endostale und periostale Kallusbildung auswirkt. Auch ein Therapiestart mit SR nach erfolgter Fraktur ist zu empfehlen, da unter dieser Therapie insgesamt signifikant mehr Kallus gebildet wurde im Vergleich zu den unbehandelten ovariectomierten Tieren. Zu beachten ist dabei allerdings, dass unter dieser Therapie vor allem eine periostale Kallusbildung aufgetreten ist. Da metaphysäre Frakturen aber eher mit endostaler Kallusbildung heilen (Stuermer et al. 2010), ist wenn möglich die erst genannte Therapie zu bevorzugen.

4.7 Schlussfolgerungen

Die Osteoporosetherapie mit Strontium gibt Hinweise auf eine positive Beeinflussung der frühen Phase der Frakturheilung. Dabei wurden durch die langfristige Strontiumranelattherapie, die zunächst der Osteoporoseprophylaxe und schließlich der Unterstützung der Frakturheilung dienen soll, die besten Ergebnisse erzielt. Diese Therapie führte im Vergleich zu den anderen Therapiegruppen zu der größten Steigerung der BMD des Knochens und des Kallus, der BV/TV und des Kortikalisvolumens gegenüber den unbehandelten osteoporotischen Tieren. Es stellte sich außerdem heraus, dass diese Therapie der oft beschriebenen Verzögerung der Frakturheilung bei Osteoporose entgegen wirken kann. Dieser Effekt zeigte sich in der deutlich früheren Frakturüberbrückung gegenüber den anderen Versuchsgruppen und besonders in den ersten drei Wochen der Frakturheilung hinsichtlich der endostalen und plattennahen Kallusbildung.

Die reine Therapie mit Strontiumranelat zur Frakturheilungsunterstützung bei bereits bestehender Osteoporose erwies sich im Vergleich zu der langfristigen SR-Gabe als weniger effektiv. Die Kallusbildung wird unter dieser Therapie zwar massiv angeregt, was man an dem hohen Kallusvolumen sehen konnte, wobei allerdings die Kallusqualität gemessen an der BMD den ovariectomierten unbehandelten Tieren glich. Es kam bei dieser Therapie vor allem zu einer periostalen Kallusbildung. Die für metaphysäre Frakturen typische endostale Kallusbildung lief allerdings wie bei den ovariectomierten unbehandelten Tieren eher verzögert ab. Für eine Verzögerung der Frakturheilung spricht auch, dass die früheste Frakturüberbrückung unter dieser Therapie rund einen Tag später erfolgte als bei der OVX-Gruppe.

Besteht eine prophylaktische Osteoporosetherapie mit Strontiumranelat, sollte diese bei Auftreten einer Fraktur entsprechend den Daten des Tierversuchs nicht abgebrochen werden. Die rein prophylaktische Therapie zeigte zwar positive Wirkung auf die BMD und die Kallusbildung, was darauf hindeutet, dass Strontiumranelat sich auch noch nach Ende der Therapie positiv auf den Knochenumbau auswirkt. Sie erwies sich aber ineffektiver als ein Fortführen der Strontiumranelattherapie.

Daher wird nach Ergebnissen dieses Versuchs, wenn möglich, eine kombinierte prophylaktische und therapeutische Strontiumranelatgabe empfohlen. Sollte bei Auftreten einer Fraktur die Therapie erst begonnen werden, muss damit gerechnet werden, dass

die Kallusbildung zwar angeregt wird, sich die Kallusqualität allerdings kaum verbessert im Vergleich zu keiner Therapie.

Für die späteren Forschungsarbeiten sollten die Mikrocomputertomographien der Tibia mit der Auswertmethode *Auswertung mit definierten Schwellenwerten* ausgewertet werden, da sich diese Methode durch größere Objektivität und Validität auszeichnete.

5 Zusammenfassung

Die Osteoporose ist eine häufige Knochenerkrankung, die weltweit einen großen Stellenwert einnimmt. Einige Medikamente sind für die Therapie dieser Erkrankung zugelassen. Strontiumranelat nimmt darunter durch seine kombinierte Wirkung eine Sonderstellung ein, da es nicht nur die Knochenbildung stimuliert, sondern auch den Knochenabbau hemmt (Canalis et al. 1996, Baron und Tsouderos 2002). Wie sich Strontiumranelat auf die osteoporotische Frakturheilung auswirkt, wurde bisher nur in wenigen Studien untersucht. Daher war das Ziel dieser Arbeit, die Wirkung von Strontiumranelat auf die metaphysäre, osteoporotische Frakturheilung der Tibia zu untersuchen, und es sollte die Frage geklärt werden, ob eine bestehende Therapie mit Strontiumranelat bei Auftreten einer Fraktur fortgeführt oder abgebrochen werden sollte.

Drei Monate alte weibliche Sprague-Dawley-Ratten wurden ovariectomiert (n=48) oder scheinoperiert (n=12). Nach 8 Wochen, in denen die ovariectomierten Tiere eine schwere Osteoporose entwickelten, erhielten alle Ratten eine bilaterale transversale Osteotomie der Tibiametaphyse, welche mit einer 5-Loch-Leibinger-Platte aus Titan mit vier Schrauben fixiert wurde. Nach weiteren fünf Wochen endete der Versuch mit der Obduktion der Tiere. Bereits vor der Ovariectomie teilte man die 60 Ratten in 5 Gruppen ein (n=12 pro Gruppe): 1) SHAM, 2) OVX, 3) SR nach Osteotomie (SR als Frakturtherapie), 4) SR vor Osteotomie (SR als Osteoporoseprophylaxe), 5) SR vor und nach Osteotomie (SR als Osteoporoseprophylaxe und Frakturtherapie). Das Strontiumranelat wurde den Ratten in den entsprechenden Zeiträumen als Futterzusatzstoff verabreicht, wobei die Tiere durchschnittlich 654 mg/kg/Tag aufnahmen. Nach der Obduktion der Versuchstiere führte man an den Tibiae biomechanische und histomorphologische Untersuchungen sowie eine Mikro-CT-Analyse durch. Für die Mikro-CT-Analyse wurden zwei Auswertungsmethoden entwickelt, deren Vergleich im Zuge dieser Arbeit stattfand. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer Kombination aus einer one-way-ANOVA und dem Tukey-Kramer post-hoc-Test ($p < 0,05$).

Die Strontiumranelatgabe führte in allen SR-Gruppen zu einer Erhöhung der biomechanischen Parameter, der Kallusdichte und der BV/TV gegenüber der OVX-Gruppe.

Die Gruppe SR vor+nach Osteo zeigte allerdings die größte Steigerung der BMD des Knochens und der BV/TV gegenüber den unbehandelten osteoporotischen Tieren. Beim Vergleich der Auswertungsstrategien der Mikro-CT-Analyse zeigte die *Auswertung mit definierten Schwellenwerten* mehr Signifikanzen auf und ließ sich standardisierter durchführen als die *peakorientierte Auswertung*. Für die folgenden Versuche sollten die Mikrocomputertomographien der Tibia also mit der Auswertungsstrategie *Auswertung mit definierten Schwellenwerten* ausgewertet werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich die Strontiumranelatgabe, zunächst unabhängig von der Applikation, nicht negativ auf die metaphysäre osteoporotische Frakturheilung auswirkt. Beginnt man die Strontiumranelatbehandlung erst nach erfolgter Fraktur, ist allerdings auch nicht mit einer Verbesserung der Frakturheilung zu rechnen. Besteht hingegen bereits eine Strontiumranelatbehandlung vor dem Eintreten einer Fraktur, so ist diese fortzuführen und sollte nicht abgebrochen werden, da sich die langfristige Gabe von Strontiumranelat im Sinne einer Osteoporoseprophylaxe und Frakturtherapie als die effektivste Behandlung erwies. Antiresorptive Substanzen wie das Bisphosphonat Alendronat zeigten als kombinierte Osteoporoseprophylaxe und Frakturtherapie eine beeinträchtigte, mit der OVX-Gruppe vergleichbare Frakturheilung (Kolios et al. 2010). Damit zeigt die Strontiumranelattherapie einen eindeutigen Vorteil gegenüber der Behandlung mit Bisphosphonaten, da sie auf Grund ihres positiven Effektes auf die Frakturheilung bei Auftreten einer Fraktur nicht abgebrochen werden muss.

6 Literaturverzeichnis

Alegre DN, Ribeiro C, Sousa C, Correia J, Silva L, de Almeida L (2012): Possible benefits of strontium ranelate in complicated long bone fractures. *Rheumatol Int* 32(2): 439-43.

Ammann P, Shen V, Robin B, Mauras Y, Bonjour JP, Rizzoli R (2004): Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. *J Bone Miner Res* 20(3): 548.

Arlot ME, Jiang Y, Genant HK, Zhao J, Burt-Pichat B, Roux JP, Delmas PD, Meunier PJ (2008): Histomorphometric and microCT analysis of bone biopsies from postmenopausal osteoporotic women treated with strontium ranelate. *J Bone Miner Res* 23(2): 215-22.

Bain SD, Jerome C, Shen V, Dupin-Roger I, Ammann P (2009): Strontium ranelate improves bone strength in ovariectomized rat by positively influencing bone resistance determinants. *Osteoporos Int* 20(8): 1417-28.

Barbara A, Delannoy P, Denis BG, Marie PJ (2004): Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells. *Metabolism* 53(4): 532-537.

Baron R, Tsouderos Y (2002): In vitro effects of S12911-2 on osteoclast function and bone marrow macrophage differentiation. *Eur J Pharmacol* 450(1): 11-7.

Barragan-Adjemian C, Nicoletta D, Dusevich V, Dallas MR, Eick JD, Bonewald LF (2006): Mechanism by which MLO-A5 late osteoblasts/early osteocytes mineralize in culture: similarities with mineralization of lamellar bone. *Calcif Tissue Int* 79(5): 340-53.

Bartl R: Osteoporose: Prävention- Diagnostik- Therapie. 4. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2011

Berchtold R: Chirurgie. Hrsg. v. Bruch HP, Trentz O. Unter Mitarbeit von Keller R, Wanner GA. 6. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer, München 2008

Berg BN, Harmison CR (1957): Growth, disease, and aging in the rat. *J Gerontol* 12(4): 370-7.

Black LJ, Sato M, Rowley ER, Magee DE, Bekele A, Williams DC, Cullinan GJ, Bendele R, Kauffman RF, Bensch WR et al. (1994): Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J Clin Invest* 93(1):63-9.

Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, Cosman F, Lakatos P, Leung PC, Man Z et al. (2007): Once-Yearly Zoledronic Acid for Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. *N Engl J Med* 356: 1809-1822.

Blake GM, Fogelman I (2005): Long-term effect of strontium ranelate treatment on BMD. *J Bone Miner Res* 20(11): 1901-4.

Boivin G, Deloffre P, Perrat B, Panczer G, Boudeulle M, Mauras Y, Allain P, Tsouderos Y, Meunier PJ (1996): Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration. *J Bone Miner Res* 11(9): 1302-11.

Bonewald LF (2011): The Amazing Osteocyte. *J Bone Miner Res* 26(2): 229–38.

Brüel A, Olsen J, Birkedal H, Risager M, Andreassen TT, Raffalt AC, Andersen JE, Thomsen JS (2011): Strontium is incorporated into the fracture callus but does not influence the mechanical strength of healing rat fractures. *Calcif Tissue Int* 88(2): 142-52.

Butera PC (2010): Estradiol and the control of food intake. *Physiol Behav* 99(2): 175-80.

Canalis E, Hott M, Deloffre P, Tsouderos Y, Marie PJ (1996): The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. *Bone* 18(6): 517-23.

Cao JJ (2011): Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res* 6: 30.

Cao Y, Mori S, Mashiba T, Westmore MS, Ma L, Sato M, Akiyama T, Shi L, Komatsubara S, Miyamoto K, Norimatsu H (2002): Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 17(12): 2237-46.

Carano A, Teitelbaum SL, Konsek JD, Schlesinger PH, Blair HC (1990): Bisphosphonates directly inhibit the bone resorption activity of isolated avian osteoclasts in vitro. *J Clin Invest* 85(2): 456-61.

Cauley JA, Thompson DE, Ensrud KC, Scott JC, Black D (2000): Risk of mortality following clinical fractures. *Osteoporos Int* 11(7): 556-61.

Cebesoy O, Tutar E, Kose KC, Baltaci Y, Bagci C (2007): Effect of strontium ranelate on fracture healing in rat tibia. *Joint Bone Spine* 74(6): 590-3.

Chesnut CH 3rd, Silverman S, Andriano K, Genant H, Gimona A, Harris S, Kiel D, LeBoff M, Maricic M, Miller P et al. (2000): A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the prevent recurrence of osteoporotic fractures study. PROOF Study Group. *Am J Med* 109(4): 267-76.

David P, Nguyen H, Barbier A, Baron R (1996): The bisphosphonate tiludronate is a potent inhibitor of the osteoclast vacuolar H(+)-ATPase. *J Bone Miner Res* 11(10): 1498-507.

Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux AC, Shah AS, Huster WJ, Draper M, Christiansen C (1997): Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med* 337(23): 1641-7.

Delmas PD, van de Langerijt L, Watts NB, Eastell R, Genant H, Grauer A, Cahall DL (2005): Underdiagnosis of vertebral fractures is a worldwide problem: the IMPACT study. *J Bone Miner Res* 20(4): 557-63.

Demontiero O, Vidal C, Duque G (2012): Aging and bone loss: new insights for the clinician. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 4(2): 61-76.

Ehsanbakhsh AR, Akhbari H, Iraee MB, Toosi FS, Khorashadizadeh N, Rezvani MR, Naseh G (2011): The Prevalence of Undetected Vertebral Fracture in Patients with Back Pain by Dual-Energy X-ray Absorptiometry (DXA) of the Lateral Thoracic and Lumbar Spine. *Asian Spine J* 5(3): 139-45.

Estrugo-Devesa A, Gómez-Vaquero C, López-López J (2013): Osteoporosis and oral diseases. *Med Clin (Barc)* 140(4): 169-74.

Ettinger B, Black DM, Nevitt MC, Rundle AC, Cauley JA, Cummings SR, Genant HK (1992): Contribution of vertebral deformities to chronic back pain and disability. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *J Bone Miner Res* 7(4): 449-56.

Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR, 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(7): 637-45.

Felix R, Graham R, Russell G, Fleisch H (1976): The effect of several diphosphonates on acid phosphohydrolases and other lysosomal enzymes. *Biochim Biophys Acta* 429(2): 429-38.

Fini M, Salamanna F, Veronesi F, Torricelli P, Nicolini A, Benedicenti S, Carpi A, Giavaresi G (2012): Role of obesity , alcohol and smoking on bone health. *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 2686-706.

Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, Vogel V, Robidoux A, Dimitrov N, Atkins J et al. (1998): Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 90(18): 1371-88.

Fu LJ, Tang TT, Hao YQ, Dai KR (2013): Long-term effects of alendronate on fracture healing and bone remodeling of femoral shaft in ovariectomized rats. *Acta Pharmacol Sin* 34(3): 387-92.

Gallagher JC, Fowler SE, Detter JR, Sherman SS (2001): Combination treatment with estrogen and calcitriol in the prevention of age-related bone loss. *J Clin Endocrinol Metab* 86(8): 3618-28.

Gardner MJ, Demetrakopoulos D, Shindle MK, Griffith MH, Lane JM (2006): Osteoporosis and skeletal fractures. *HSS J* 2(1): 62-9.

Gerdhem P, Obrant KJ (2002): Effects of cigarette-smoking on bone mass as assessed by dual-energy X-ray absorptiometry and ultrasound. *Osteoporos Int* 13(12): 932-6.

Greenspan SL, Bone HG, Ettinger MP, Hanley DA, Lindsay R, Zanchetta JR, Blosch CM, Mathisen AL, Morris SA, Marriott TB (2007): Effect of recombinant human parathyroid hormone (1-84) on vertebral fracture and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 146(5): 326-39.

Grynpas MD, Hamilton E, Cheung R, Tsouderos Y, Deloffre P, Hott M, Marie PJ (1996): Strontium increases vertebral bone volume in rats at a low dose that does not induce detectable mineralization defect. *Bone* 18(3): 253-9.

Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, Steinle T, Verheyen F, Linder R (2013): The Epidemiology of Osteoporosis-Bone Evaluation Study (BEST): An Analysis of Routine Health Insurance Data. *Dtsch Arztebl Int* 110(4): 52-7.

Häussler B, Gothe H, Göl D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D (2007): Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. *Osteoporos Int* 18(1): 77-84.

Hao YJ, Zhang G, Wang YS, Qin L, Hung WY, Leung K, Pei FX (2007): Changes of microstructure and mineralized tissue in the middle and late phase of osteoporotic fracture healing in rats. *Bone* 41(4): 631-8.

Hetland ML, Haarbo J, Christiansen C, Larsen T (1993): Running induces menstrual disturbances but bone mass is unaffected, except in amenorrhic women. *Am J Med* 95(1): 53-60.

Hodsman AB, Bauer DC, Dempster DW, Dian L, Hanley DA, Harris ST, Kendler DL, McClung MR, Miller PD, Olszynski WP et al. (2005): Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr Rev* 26(5): 688-703.

Horst-Sikorska W, Ignaszak-Szczepaniak M (2011): The role of anorexia nervosa in secondary osteoporosis development with the risk for low energy fractures. *Endokrynol Pol* 62 (Suppl 3): 1-3.

Islam AA, Rasubala L, Yoshikawa H, Shiratsuchi Y, Ohishi M (2005): Healing of fractures in osteoporotic rat mandible shown by the expression of bone morphogenetic protein-2 and tumour necrosis factor-alpha. *Br J Oral Maxillofac Surg* 43(5): 383-91.

Izumo N, Ishibashi Y, Ohba M, Morikawa T, Manabe T (2012): Decreased voluntary activity and amygdala levels of serotonin and dopamine in ovariectomized rats. *Behav Brain Res* 227(1): 1-6.

Jee WS, Yao W (2001): Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1(3): 193-207.

Junqueira LC, Carneiro J: *Histologie*. 6. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2005

Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15(3): 175-91.

Kanis JA, Johnell O, De Laet C, Jonsson B, Oden A, Ogelsby AK (2002): International variations in hip fracture probabilities: implications for risk assessment. *J Bone Miner Res* 17(7): 1237-44.

Kogianni G, Mann V, Noble BS (2008): Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *J Bone Miner Res* 23(6): 915-27.

Kolios L, Sehmisch S, Daub F, Rack T, Tezval M, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Equol but not genistein improves early metaphyseal fracture healing in osteoporotic rats. *Planta Med* 75(5): 459-65.

Kolios L, Hoerster AK, Sehmisch S, Malcherek MC, Rack T, Tezval M, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2010): Do estrogen and alendronate improve metaphyseal fracture healing when applied as osteoporosis prophylaxis? *Calcif Tissue Int* 86(1): 23-32.

Komrakova M, Werner C, Wicke M, Nguyen BT, Sehmisch S, Tezval M, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Effect of daidzein, 4-methylbenzylidene camphor or estrogen on gastrocnemius muscle of osteoporotic rats undergoing tibia healing period. *J Endocrinol* 201(2): 253-62.

Komrakova M, Stuermer EK, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, Tezval M, Daub F, Martens T, Witzhausen P, Dullin C, Stuermer KM (2010): Effect of human parathyroid hormone hPTH (1-34) applied at different regimes on fracture healing and muscle in ovariectomized and healthy rats. *Bone* 47(3): 480-92.

Krischak GD, Augat P, Blakytyn R, Claes L, Kinzl L, Beck A (2007): The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac reduces appearance of osteoblasts in bone defect healing in rats. *Arch Orthop Trauma Surg* 127(6): 453-8.

Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshioka M, Honjo H, Urabe M, Kitajima I, Semba I, 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(5-6): 197-202.

Li YF, Luo E, Feng G, Zhu SS, Li JH, Hu J (2010): Systemic treatment with strontium ranelate promotes tibial fracture healing in ovariectomized rats. *Osteoporos Int* 21(11): 1889-97.

Lin JT, Lane JM (2004): Osteoporosis: a review. *Clin Orthop Relat Res* (425): 126-34.

Löwik CW, van der Pluijm G, van der Wee-Pals LJ, van Treslong-De Groot HB, Bijvoet OL (1988): Migration and phenotypic transformation of osteoclast precursors into mature osteoclasts: the effect of a bisphosphonate. *J Bone Miner Res* 3(2): 185-92.

Love RR, Mazess RB, Barden HS, Epstein S, Newcomb PA, Jordan VC, Carbone PP, DeMets DL (1992): Effects of Tamoxifen on Bone Mineral Density in Postmenopausal Women with Breast Cancer. *N Engl J Med* 326: 852-856.

Lüllmann-Rauch R: Histologie. Verstehen - Lernen - Nachschlagen. 3. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2009

Manette C, Collette J, Sarlet N, Tancredi A, Zegels B, Reginster JY (2006): Comprehensive therapy in osteoporosis using a single drug: from ADFR to strontium ranelate. *Curr Med Chem* 13(13): 1585-90.

Manolagas SC (2000): Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21(2): 115-37.

Marcus R, Cann C, Madvig P, Minkoff J, Goddard M, Bayer M, Martin M, Gaudiani L, Haskell W, Genant H (1985): Menstrual function and bone mass in elite women distance runners. Endocrine and metabolic features. *Ann Intern Med* 102(2): 158-63.

Marie PJ: Strontium ranelate: a physiological approach for optimizing bone formation and resorption. *Bone* 38(2 Suppl 1): 10-4.

Marie PJ, Hott M, Modrowski D, De Pollak C, Guillemain J, Deloffre P, Tsouderos Y (1993): An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats. *J Bone Miner Res* 8(5): 607-15.

McCann RM, Colleary G, Geddis C, Clarke SA, Jordan GR, Dickson GR, Marsh D (2008): Effect of osteoporosis on bone mineral density and fracture repair in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 26(3): 384-93.

Melhus G, Solberg LB, Dimmen S, Madsen JE, Nordsletten L, Reinholt FP (2007): Experimental osteoporosis induced by ovariectomy and vitamin D deficiency does not markedly affect fracture healing in rats. *Acta Orthop* 78(3): 393-403.

Melton LJ 3rd, Atkinson EJ, Cooper C, O'Fallon WM, Riggs BL (1999): Vertebral fractures predict subsequent fractures. *Osteoporos Int* 10(3): 214-21.

Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD, Cannata J, Balogh A, Lemmel EM, Pors-Nielsen S (2004): The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 350(5): 459-68.

Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, Swain M, Mason RS, Murrell GA, Diwan AD, Diamond T (2001): Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone* 28(1): 80-6.

Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK et al. (2001): Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 344(19): 1434-41.

Nevitt MC, Ettinger B, Black DM, Stone K, Jamal SA, Ensrud K, Segal M, Genant HK, Cummings SR (1998): The association of radiographically detected vertebral fractures with back pain and function: a prospective study. *Ann Intern Med* 128(10): 793-800.

Orimo H (2010): The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nihon Med Sch* 77(1): 4-12.

Orme SM, Belchetz PE (1994): Is a low skinfold thickness an indicator of osteoporosis? *Clin Endocrinol (Oxf)* 41(3): 283-7.

Ohshima H. (2010): [Secondary osteoporosis UPDATE. Bone loss due to bed rest and human space flight study]. *Clin Calcium* 20(5): 709-16.

Ozturan KE, Demir B, Yucel I, Cakıcı H, Yilmaz F, Haberal A (2011): Effect of strontium ranelate on fracture healing in the osteoporotic rats. *J Orthop Res* 29(1): 138-42.

Pacifici R (1998): Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. *Endocrinology* 139(6): 2659-61.

Parfitt AM (1994): Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 55(3): 273-86.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987): Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2(6): 595-610.

Peppone LJ, Hebl S, Purnell JQ, Reid ME, Rosier RN, Mustian KM, Palesh OG, Huston AJ, Ling MN, Morrow GR (2010): The efficacy of calcitriol therapy in the management of bone loss and fractures: a qualitative review. *Osteoporos Int* 21(7): 1133-49.

Pfeilschifter J (2009): DVO-Leitlinie 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose beim Erwachsenen. Dachverband Osteologie e.V., Essen.

Pondel M (2000): Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *Int J Exp Pathol* 81(6): 405-22.

Popp AW, Isenegger J, Buergi EM, Buergi U, Lippuner K (2006): Glucocorticosteroid-induced spinal osteoporosis: scientific update on pathophysiology and treatment. *Eur Spine J* 15(7): 1035-49.

Rahn BA (1976): The fluorochrome sequence labeling of the bone. *Nova Acta Leopold* 44: 249-255

Raisz LG (2005): Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 115(12): 3318-25.

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: *Biochemie*. 2.Auflage; Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2008

Recker RR, Marin F, Ish-Shalom S, Mörnicke R, Hawkins F, Kapetanios G, de la Peña MP, Kekow J, Farrerons J, Sanz B et al. (2009): Comparative effects of teriparatide and strontium ranelate on bone biopsies and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 24(8): 1358-68.

Reeve J, Meunier PJ, Parsons JA, Bernat M, Bijvoet OL, Courpron P, Edouard C, Klenerman L, Neer RM, Renier JC et al. (1980): Anabolic effect of human parathyroid hormone fragment on trabecular bone in involutional osteoporosis: a multicentre trial. *Br Med J* 280(6228): 1340-4.

Reginster JY, Seeman E, De Vernejoul MC, Adami S, Compston J, Phenekos C, Devogelaer JP, Curiel MD, Sawicki A, Goemaere S (2005): Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *J Clin Endocrinol Metab* 90(5): 2816-22.

Rössler H, Rüter W: Orthopädie und Unfallchirurgie. 19. Auflage; Elsevier Verlag, München 2007

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC et al. (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288(3): 321-33.

Russell RG (2007): Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics* 119: 150-162.

Siewert JR, Stein HJ, Allgöwer M, Brauer RB: Chirurgie. 9. Auflage; Springer Medizin Verlag, Berlin 2012

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T et al. (1997): Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89: 309–19.

Sternfeld B, Dugan S (2011): Physical activity and health during the menopausal transition. *Obstet Gynecol Clin North Am* 38(3): 537-66.

Stewart TL, Ralston SH (2000): Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *J Endocrinol* 166(2): 235-45.

Stuermer EK, Seidlova-Wuttke D, Sehmisch S, Rack T, Wille J, Frosch KH, Wuttke W, Stuermer 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(1): 89-96.

Stuermer EK, Sehmisch S, Rack T, Wenda E, Seidlova-Wuttke D, Tezval M, Wuttke W, Frosch KH, Stuermer KM (2010): Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in the early phase of osteoporosis. A new fracture-healing model at the tibia in rat. *Langenbecks Arch Surg* 395: 63-172.

Tanaka K, Yamaguchi Y, Hakeda Y (1995): Isolated chick osteocytes stimulate formation and bone-resorbing activity of osteoclast-like cells. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 13: 61–70.

Toth MJ, Poehlman ET, Matthews DE, Tchernof A, MacCoss MJ (2001): Effects of estradiol and progesterone on body composition, protein synthesis, and lipoprotein lipase in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280(3): E496-501.

Tucker KL, Hannan MT, Qiao N, Jacques PF, Selhub J, Cupples LA, Kiel DP (2005): Low plasma vitamin B12 is associated with lower BMD: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 20(1): 152-8.

Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM (2000): The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 113: 377-381.

Wang JW, Li W, Xu SW, Yang DS, Wang Y, Lin M, Zhao GF (2005): Osteoporosis influences the middle and late periods of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Chin J Traumatol* 8(2): 111-6.

Writing Group for the PEPI Trial (1996): Effects of hormone therapy on bone mineral density: results from the postmenopausal estrogen/progestin interventions (PEPI) trial. The Writing Group for the PEPI. *JAMA* 276(17): 1389-96.

Wu Q, Liu J, Gallegos-Orozco JF, Hentz JG (2010): Depression, fracture risk, and bone loss: a meta-analysis of cohort studies. *Osteoporos Int* 21(10): 1627-35.

Xu W, Perera S, Medich D, Fiorito G, Wagner J, Berger LK, Greenspan SL (2011): Height loss, vertebral fractures, and the misclassification of osteoporosis. *Bone* 48(2): 307-1

7 Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Darstellung der Gruppen und der Behandlung der Ratten.....	24
Tabelle 2:	Darstellung der Scanparameter des Scanprotokolls.....	32
Tabelle 3:	Darstellung der ermittelten definierten unteren Schwellenwerte	38
Tabelle 4:	Darstellung der Messparameter der Auswertung mit definierten Schwellenwerten mit Einheit und Bedeutung	39
Tabelle 5:	Darstellung der Messparameter der peakorientierten Auswertung mit Einheit und Bedeutung.....	39
Tabelle 6:	Darstellung der Phantomdichten und den entsprechenden Dichten in GVal.....	40
Tabelle 7:	Messgrößen Kortikalis mit Einheit und Bedeutung.....	46
Tabelle 8:	Messgrößen Kallus mit Einheit und Bedeutung.....	47
Tabelle 9:	Messgrößen Trabekel mit Einheit und Bedeutung	47
Tabelle 10:	Darstellung der Applikationszeitpunkte, Anfärbungszeiträume und Dosierungen der verschiedenen Fluorochrome	48
Tabelle 11:	Messgrößen für den plattennahen Kallus mit Einheit und Bedeutung ...	52
Tabelle 12:	Messgrößen für den plattenfernen Kallus mit Einheit und Bedeutung...	52
Tabelle 13:	Messgrößen für den endostalen Kallus mit Einheit und Bedeutung	52
Tabelle 14:	Messgröße für den gesamten Kallus mit Einheit und Bedeutung	53
Tabelle 15:	Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Körpergewichte der Tiere über die Versuchswochen in Gramm	56
Tabelle 16:	Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der täglichen Futteraufnahme pro Tier jeder Gruppe über die Versuchswochen in Gramm.....	58
Tabelle 17:	Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Uterusgewichte jeder Versuchsgruppe am Tag der Obduktion.....	59
Tabelle 18:	Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des biomechanischen Tests	61
Tabelle 19:	Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen der Kortikalis	67

Tabelle 20: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des Kallus	68
Tabelle 21: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des gesamten Knochens.....	69
Tabelle 22: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Kortikalismessgrößen.....	78
Tabelle 23: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Kallusmessgrößen.....	79
Tabelle 24: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Trabekelmessgrößen.....	79
Tabelle 25: Darstellung der Zeitpunkte der frühesten Frakturüberbrückung in Tagen	88
Tabelle 26: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des plattennahen Kallus.....	89
Tabelle 27: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des plattenfernen Kallus	89
Tabelle 28: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des endostalen Kallus.....	90
Tabelle 29: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgröße für den gesamten Kallus.....	90
Tabelle 30: Darstellung der Mittelwerte der frühesten Überbrückung der Frakturspalts für die einzelnen Gruppen.....	90

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Darstellung der korrekten Position der Osteotomie und der Osteosyntheseplatte.....	27
Abb. 2:	Trägerplatte für die Tibiae.....	29
Abb. 3:	Korrekte Position der Trägerplatte samt Tibia in der Werkstoffprüfmaschine	29
Abb. 4:	typisches Kraft-Weg-Diagramm; Testgruppe SHAM.....	30
Abb. 5:	3D-Darstellung mit optimal angepasster Transparenz; Testgruppe SR nach Osteo.....	34
Abb. 6:	zugehöriges Grauwerthistogramm mit optimal angepasster Transparenz; Testgruppe SR nach Osteo	34
Abb. 7:	2D-Darstellung eines optimal angepassten Kontrasts; Testgruppe SR nach Osteo.....	34
Abb. 8:	zugehöriges Grauwerthistogramm mit optimal angepassten Kontrast; Testgruppe SR nach Osteo	34
Abb. 9:	korrekte Position des Messrahmens; Testgruppe SR nach Osteo	35
Abb. 10:	typisches Grauwerthistogramm; Testgruppe OVX.....	35
Abb. 11:	visuelle Darstellung des eingegrenzten Grauwertbereichs am Beispiel der Kortikalis; Testgruppe OVX	35
Abb. 12:	Eingrenzung eines Grauwertbereichs am Beispiel der Kortikalis; Testgruppe OVX.....	35
Abb. 13:	Beispiel für das Finden der unteren Schwellenwerte bei einer der ausgewählten Ratten; Testgruppe OVX.....	37
Abb. 14:	Beispiel für die Anwendung des gefundenen unteren Schwellenwertes für den harten Kallus; Testgruppe SR vor Osteo	37
Abb. 15:	Beispiel für die Eingrenzung des Kortikalisbereichs peakorientiert; Testgruppe SR vor Osteo	38
Abb. 16:	Beispiel für die Eingrenzung des Bereichs des restlichen Knochengewebes; Testgruppe SR vor Osteo	38
Abb. 17:	Darstellung der linearen Regression mit Regressionsgleichung und Korrelationskoeffizient	40

Abb. 18: Korrekte Position der Tibiae unter dem Makroskop; Testgruppe SR vor Osteo	44
Abb. 19: Graudetektion bei leichter Überdetektion; Testgruppe SR vor Osteo.....	44
Abb. 20: Flächendefinition; Testgruppe SR vor Osteo	46
Abb. 21: Dickenbestimmung; Testgruppe SR vor Osteo	46
Abb. 22: CG-markierte Fläche; Testgruppe SHAM	51
Abb. 23: AK-markierte Fläche; Testgruppe SHAM	51
Abb. 24: TC-markierte Fläche; Testgruppe SHAM.....	51
Abb. 25: Visuelle Darstellung der Applikationszeitpunkte der Fluorochrome und der Färbungszeiträume.....	51
Abb. 26: Darstellung des mittleren Körpergewichts der Tiere jeder Gruppe pro Versuchswoche vom Beginn (Versuchswoche 0) bis zum Ende (Versuchswoche 13) des Versuchs	55
Abb. 27: Darstellung der mittleren täglichen Futteraufnahme pro Tier jeder Gruppe pro Versuchswoche	57
Abb. 28: Darstellung des mittleren Uterusgewichtes der Tiere jeder Versuchsgruppe am Tag der Obduktion	59
Abb. 29: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Elastizität	60
Abb. 30: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Streckgrenze	60
Abb. 31: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Maximalkraft.....	60
Abb. 32: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BMD Kortikalis nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten.....	61
Abb. 33: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BMD Kortikalis nach peakorientierter Auswertung.....	61
Abb. 34: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalisvolumen nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten.....	62
Abb. 35: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalisvolumen nach peakorientierter Auswertung.....	62
Abb. 36: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BMD harter Kallus nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten.....	63
Abb. 37: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BMD weicher Kallus nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten	63

Abb. 38: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BMD gesamter Kallus nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten	63
Abb. 39: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BMD gesamter Kallus nach peakorientierter Auswertung	63
Abb. 40: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Volumen harter Kallus nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten	64
Abb. 41: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Volumen weicher Kallus nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten	64
Abb. 42: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Volumen gesamter Kallus nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten.....	64
Abb. 43: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Volumen gesamter Kallus nach peakorientierter Auswertung	64
Abb. 44: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BMD total nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten.....	65
Abb. 45: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BMD total nach peakorientierter Auswertung.....	65
Abb. 46: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Volumen total nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten.....	66
Abb. 47: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Volumen total nach peakorientierter Auswertung.....	66
Abb. 48: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BV/TV nach Auswertung mit definierten Schwellenwerten.....	66
Abb. 49: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters BV/TV nach peakorientierter Auswertung.....	66
Abb. 50: Mikroradiographie aus der Gruppe SHAM	70
Abb. 51: Mikroradiographie aus der Gruppe OVX.....	70
Abb. 52: Mikroradiographie aus der Gruppe SR nach Osteo.....	70
Abb. 53: Mikroradiographie aus der Gruppe SR vor Osteo	70
Abb. 54: Mikroradiographie aus der Gruppe SR vor+nach Osteo	70
Abb. 55: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalisdicke distal plattennah	71
Abb. 56: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalisdicke distal plattenfern	72

Abb. 57: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalisdichte distal plattennah	72
Abb. 58: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalisdichte distal plattenfern	73
Abb. 59: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallusdicke plattennah..	73
Abb. 60: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallusdicke plattenfern .	74
Abb. 61: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallusdicke plattennah.	74
Abb. 62: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallusdicke plattenfern	75
Abb. 63: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallusdicke endostal.....	75
Abb. 64: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Trabekeldichte distal.....	76
Abb. 65: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Anzahl der Trabekelkreuzungen.....	77
Abb. 66: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Dichte der Trabekelkreuzungen.....	77
Abb. 67: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters mittlere Trabekeldicke...	78
Abb. 68: Bild der polychromen Sequenzmarkierung aus der Gruppe SHAM	80
Abb. 69: Bild der polychromen Sequenzmarkierung aus der Gruppe OVX.....	80
Abb. 70: Bild der polychromen Sequenzmarkierung aus der Gruppe SR nach Osteo	80
Abb. 71: Bild der polychromen Sequenzmarkierung aus der Gruppe SR vor Osteo	80
Abb. 72: Bild der polychromen Sequenzmarkierung aus der Gruppe SR vor+nach Osteo	80
Abb. 73: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Gesamt-Kallusfläche plattennah	81
Abb. 74: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße CG-markierte Kallusfläche plattennah	82
Abb. 75: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße AK-markierte Kallusfläche plattennah	82
Abb. 76: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße TC-markierte Kallusfläche plattennah	83
Abb. 77: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Gesamt-Kallusfläche plattenfern	83

Abb. 78: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße CG-markierte Kallusfläche plattenfern	84
Abb. 79: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße AK-markierte Kallusfläche plattenfern	84
Abb. 80: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße TC-markierte Kallusfläche plattenfern	85
Abb. 81: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Gesamt-Kallusfläche endostal	85
Abb. 82: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße CG-markierte Kallusfläche endostal	86
Abb. 83: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße AK-markierte Kallusfläche endostal	86
Abb. 84: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße TC-markierte Kallusfläche endostal	87
Abb. 85: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Kallusfläche total.....	87

7.3 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
≤	kleiner/gleich
≥	größer/gleich
b	Paragraph
°	Grad
+	entspricht: und
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
μA	Mikroampere
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AK	Alizarinkomplexon
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosintriphosphat
BMD	Bone Mineral Density
BMI	Body Mass Index
BMU	Basic Multicellular Unit
°C	Grad Celsius
CG	Calcein-Grün
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
cm ³	Kubikzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
DVO	Dachverband Osteologie
DXA	Dual-X-ray-Absorptiometrie
et al.	et alii
g	Gramm
GVal	GValue
h	Stunde

H ⁺	Wasserstoff-Ion
HRT	Hormone Replacement Therapy/Hormonersatztherapie
IE	Internationale Einheit
IL	Interleukin
K	Kelvin
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
m ²	Quadratmeter
mA	Milliampere
Max.	Maximum
mCT	Mikro-Computertomographie
mg	Milligramm
Min.	Minimum
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
MMA	Methylmethacrylsäure
ms	Millisekunde
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OPG	Osteoprotegerin
Osteo	Osteotomie
OVX	Ovarektomie
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PTH	Parathormon
QCT	Quantitative Computertomographie
RANK	Receptor Activator of NF-κB
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
S.	Seite

s	Sekunde
SERM	selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator
SHAM	scheinoperiert
SOTI	Spinal Osteoporosis Therapeutic Intervention
SR	Strontiumranelat
Tab.	Tabelle
TC	Tetracyclin- Hydrochlorid
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAP	Tartrate-resistant Acid Phosphatase
TROPOS	Treatment of Peripheral Osteoporosis
vgl.	vergleiche
W	Watt
WHO	World Health Organisation
XO	Xylenolorange
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise auf dem Kongress *Osteologie 2013* in Weimar vom 06. bis 09. März präsentiert und ein Abstract in der Zeitschrift *Osteologie* veröffentlicht:

Komrakova M, Weidemann A, Tezval M, Stuermer KM, Sehmisch S (2013): Einfluss der Osteoporosebehandlung mit Strontiumranelat auf die Frakturheilung in ovariectomierten Ratten. *Osteologie* 22(1): 41.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Klaus Michael Stürmer als Abteilungsleiter für die Ermöglichung dieses Projekts bedanken.

Großer Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Stephan Sehmisch für die Überlassung dieses interessanten Themas und die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Vor allem bedanke ich mich ganz herzlich für die schnelle Korrektur und die hilfreichen Tipps.

Besonders möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Marina Komrakova für die fachlich kompetente und nette Betreuung bedanken. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihr intensiv, professionell und warmherzig begleitet. Ihre wertvollen Ratschläge und die konstruktive Kritik trugen wesentlich zum Gelingen bei. Außerdem ermöglichten mir ihre ständige Erreichbarkeit und die zügigen Korrekturen ein schnelles Abschließen der Dissertation.

Des Weiteren gilt mein großer Dank den MTAs Frau Ramona Castro Machguth und Frau Annette Witt, die mir mit ihrer Erfahrung tatkräftig zur Seite standen und auch immer ein offenes Ohr für aufkommende Probleme hatten.

Ich danke weiterhin Herrn Christian Dullin für die professionelle Einweisung in die Apparaturen und Programme der Mikro-CT-Analyse.