

Aus der Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie  
(Prof. Dr. med. K. M. Stürmer)  
der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen

---

**Der Einfluss von vertikaler Ganzkörpervibration in  
Kombination mit Strontiumranelat und Teriparatid auf die  
metaphysäre Frakturheilung der osteopenen Rattentibia**

---

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

vorgelegt von  
**Viktoria Patrizia Nühren**  
aus  
Weilburg

Göttingen 2017

**Dekan:** Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer  
**Referent/in:** PD. Dr. med. S. Sehmisch  
**Koreferent/in:** Prof. Dr. med. W. Wuttke  
**Drittreferent/in:** Prof. Dr. med. Dr. dent. K. G. Wiese

**Datum der mündlichen Prüfung:** 28.03.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Der Einfluss von vertikaler Ganzkörpervibration in Kombination mit Strontiumranelat und Teriparatid auf die metaphysäre Frakturheilung der osteopenen Rattentibia" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1  EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.....	1
1.2  KNOCHEN .....	2
1.2.1 Anatomie.....	2
1.2.2 Knochenzellen .....	3
1.2.3 Knochenmatrix .....	4
1.2.4 Knochenumbau.....	5
1.2.5 Peak Bone Mass.....	7
1.3  OSTEOPOROSE .....	7
1.3.1 Definition .....	7
1.3.2 Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung .....	8
1.3.3 Einteilung der Osteoporose.....	8
1.3.4 Ätiologie und Pathogenese.....	9
1.3.5 Klinik der Osteoporose.....	11
1.3.6 Diagnostik.....	12
1.3.7 Therapie der Osteoporose .....	13
1.3.7.1 Indikationsstellung zur medikamentösen Therapie.....	14
1.3.7.2 Präparate .....	14
1.3.7.3 Ganzkörpervibration.....	22
1.4  FRAKTUREN .....	23
1.4.1 Definition .....	23
1.4.2 Osteoporotische Frakturen .....	23
1.4.3 Frakturheilung .....	24
1.4.4 Frakturheilung bei Osteoporose .....	25
1.5  DIE OVARIKТОMIERTE RATTE.....	25
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>26</b>
2.1  VERSUCHSAUFBAU.....	26
2.2  VERSUCHSTIERE UND TIERHALTUNG .....	27
2.3  OVARIKТОMIE .....	28
2.4  OSTEOTOMIE UND OSTEOSYNTHESE .....	29
2.5  GANZKÖRPERVIBRATION .....	30
2.6  OBDUKTION UND PRÄPARATION.....	31

2.7	BIOMECHANISCHER TEST .....	31
2.7.1	Prinzip .....	31
2.7.2	Durchführung .....	31
2.7.3	Interpretation .....	32
2.7.4	Parameter .....	33
2.7.5	Validierung .....	33
2.8	MIKROCOMPUTERTOMOGRAPHIE .....	34
2.8.1	Prinzip .....	34
2.8.2	Durchführung .....	34
2.8.3	Auswertung .....	35
2.8.4	Umrechnung von mittlerer Dichte zu BMD .....	37
2.8.5	Berechnung von Bone Volume über Total Volume .....	38
2.8.6	Validierung .....	38
2.9	MIKRORADIOGRAPHIE .....	38
2.9.1	Histologische Aufarbeitung .....	38
2.9.2	Auswertung der Mikroradiographien .....	39
2.9.2.1	Geräte und Voreinstellungen .....	39
2.9.2.2	Vorgehen .....	40
2.9.3	Parameter .....	43
2.9.3.1	Gesamter Knochen .....	43
2.9.3.2	Kortikalis .....	43
2.9.3.3	Kallus .....	43
2.9.3.4	Trabekulärer Knochen .....	44
2.9.4	Berechnungsgrundlage der Messparameter .....	44
2.9.5	Validierung .....	44
2.10	POLYCHROME SEQUENZMARKIERUNG .....	44
2.10.1	Prinzip .....	44
2.10.2	Durchführung .....	45
2.10.3	Auswertung .....	46
2.10.4	Bestimmung des Zeitpunktes der frühesten knöchernen Frakturspaltüberbrückung .....	47
2.10.5	Parameter .....	48
2.10.5.1	Kallus ventral .....	48
2.10.5.2	Kallus dorsal .....	48
2.10.5.3	Kallus endostal .....	48
2.10.5.4	Gesamter Kallus .....	48
2.11	STATISTIK .....	49
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
3.1	KÖRPERGEWICHT .....	51
3.2	UTERUSGEWICHT .....	53
3.3	NAHRUNGS-AUFNAHME .....	54
3.4	ERGEBNISSE DES BIOMECHANISCHEN TESTS .....	56

3.4.1	<i>Elastizität</i> .....	56
3.4.2	<i>Streckgrenze</i> .....	56
3.4.3	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse des biomechanischen Tests</i> .....	57
3.5	ERGEBNISSE DER MIKROCOMPUTERTOMOGRAPHIE.....	57
3.5.1	<i>Kortikalis</i> .....	57
3.5.1.1	BMD.....	57
3.5.1.2	Volumen.....	58
3.5.2	<i>Knöcherner Kallus</i> .....	58
3.5.2.1	BMD.....	58
3.5.2.2	Volumen.....	59
3.5.3	<i>Weichgewebe</i> .....	59
3.5.3.1	BMD.....	59
3.5.3.2	Volumen.....	60
3.5.4	<i>Gesamter Kallus</i> .....	60
3.5.4.1	BMD.....	60
3.5.4.2	Volumen.....	61
3.5.5	<i>Gesamter Knochenausschnitt</i> .....	61
3.5.5.1	BMD.....	61
3.5.5.2	Volumen.....	62
3.5.6	<i>BV/TV</i> .....	62
3.5.6.1	<i>knöcherner Kallus/ gesamter Kallus</i> .....	62
3.5.6.2	<i>Kortikalis und knöcherner Kallus/ gesamter Knochenausschnitt</i> .....	63
3.5.7	<i>Übersicht über die Ergebnisse der Untersuchung mittels MCT für die verschiedenen Gruppen und Knochenabschnitte</i> .....	63
3.6	ERGEBNISSE DER MIKORADIOGRAPHIE.....	65
3.6.1	<i>Gesamter Knochen</i> .....	65
3.6.1.1	Knochendurchmesser proximal.....	65
3.6.1.2	Knochendurchmesser distal.....	65
3.6.2	<i>Kortikalis</i> .....	66
3.6.2.1	Kortikalisdicke ventral, distal.....	66
3.6.2.2	Kortikalisdicke dorsal, distal.....	66
3.6.2.3	Kortikalisdichte ventral, distal.....	67
3.6.2.4	Kortikalisdichte dorsal, distal.....	67
3.6.3	<i>Kallus</i> .....	68
3.6.3.1	Kallusdicke ventral.....	68
3.6.3.2	Kallusdicke dorsal.....	68
3.6.3.3	Kallusdicke ventral.....	69
3.6.3.4	Kallusdicke dorsal.....	69
3.6.3.5	Kallusdicke endostal.....	70
3.6.4	<i>Trabekulärer Knochen distal</i> .....	70
3.6.4.1	Anzahl der Trabekelkreuzungen.....	70
3.6.4.2	Dichte der Trabekelkreuzungen.....	71
3.6.4.3	Dichte des trabekulären Knochens.....	71
3.6.4.4	Mittlere Trabekeldicke.....	72

3.6.5	<i>Übersicht über die Ergebnisse der Untersuchung mittels Mikroradiographie für die verschiedenen Gruppen und Knochenabschnitte</i> .....	72
3.7	ERGEBNISSE DER POLYCHROMEN SEQUENZMARKIERUNG.....	74
3.7.1	<i>Ventraler Kallus</i> .....	74
3.7.1.1	Gesamtfläche.....	74
3.7.1.2	CG-markierte Fläche.....	74
3.7.1.3	AK-markierte Fläche .....	75
3.7.1.4	TC-markierte Fläche.....	75
3.7.1.5	Übersicht der fluoreszenzmarkierten Flächen des ventralen Kallus .....	76
3.7.2	<i>Dorsaler Kallus</i> .....	77
3.7.2.1	Gesamtfläche.....	77
3.7.2.2	CG-markierte Fläche.....	77
3.7.2.3	AK-markierte Fläche .....	78
3.7.2.4	TC-markierte Fläche.....	78
3.7.2.5	Übersicht der fluoreszenzmarkierten Flächen des dorsalen Kallus .....	79
3.7.3	<i>Endostaler Kallus</i> .....	80
3.7.3.1	Gesamte Fläche .....	80
3.7.3.2	CG-markierte Fläche.....	80
3.7.3.3	AK-markierte Fläche .....	81
3.7.3.4	TC-markierte Fläche.....	81
3.7.3.5	Übersicht der fluoreszenzmarkierten Flächen des endostalen Kallus .....	82
3.7.4	<i>Übersicht über die Ergebnisse der Untersuchung mittels polychromer Sequenzmarkierung für die verschiedenen Gruppen und Kallusabschnitte</i> .....	83
3.7.5	<i>Zeitpunkt der frühesten knöchernen Frakturspaltüberbrückung</i> .....	85
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>87</b>
4.1	DIE OVARIKTOMIERTE RATTE ALS OSTEOPOROTISCHES TIERMODELL.....	87
4.2	DAS METAPHYSÄRE FRAKTURMODELL .....	88
4.3	KÖRPERGEWICHT UND NAHRUNGS-AUFNAHME .....	88
4.4	GANZKÖRPERVIBRATION .....	89
4.5	TERIPARATID.....	90
4.6	GANZKÖRPERVIBRATION IN KOMBINATION MIT TERIPARATID .....	91
4.7	STRONTIUMRANELAT .....	92
4.8	GANZKÖRPERVIBRATION IN KOMBINATION MIT STRONTIUMRANELAT .....	93
4.9	SCHLUSSFOLGERUNG.....	94
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>98</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>108</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Schweregradeinteilung der Osteoporose nach Minne. ....	11
Tabelle 2: Bezeichnung und Behandlung der Versuchsgruppen.....	27
Tabelle 3: Gruppengrößen zum Zeitpunkt der Auswertung.....	28
Tabelle 4: Scanprotokoll der MCT.....	34
Tabelle 5: Definierte Schwellenwerte der Grauwertbereiche.....	37
Tabelle 6: Alkoholreihe zur Entwässerung und Entfettung der Tibiae.....	39
Tabelle 7: Röntgenprotokoll zu Erstellung der Mikroradiographien.....	39
Tabelle 8: Messparameter des gesamten Knochens mit Einheit und Bezeichnung nach ASBMR- Nomenklatur (Dempster et al. 2013; Parfitt et al. 1987).....	43
Tabelle 9: Messparameter der Kortikalis mit Einheit und Bezeichnung nach ASBMR- Nomenklatur (Dempster et al. 2013; Parfitt et al. 1987).....	43
Tabelle 10: Messparameter des Kallus mit Einheit und Bezeichnung nach ASBMR-Nomenklatur (Dempster et al. 2013; Parfitt et al. 1987).....	43
Tabelle 11: Messparameter des trabekulären Knochens mit Einheit und Bezeichnung nach ASBMR-Nomenklatur (Parfitt et al. 1987, Dempster et al. 2013).....	44
Tabelle 12: Schema zur Verabreichung der Fluorochrome (Merck, Darmstadt, Deutschland)...	45
Tabelle 13: Messparameter für den ventralen Kallusanteil. ....	48
Tabelle 14: Messparameter für den dorsalen Kallusanteil. ....	48
Tabelle 15: Messparameter für den endostalen Kallusanteil.....	48
Tabelle 16: Messparameter für den gesamten Kallus (ventral, dorsal und endostal). ....	48
Tabelle 17: Kennzeichnung von Signifikanzen im Ergebnisteil.....	50
Tabelle 18: Körpergewicht [g] im Verlauf± Standardabweichung (Eimer 2014). ....	52
Tabelle 19: Mittleres Uterusgewicht [g] ± Standardabweichung bei Obduktion (Eimer 2014). .	53
Tabelle 20: Mittlere Nahrungsaufnahme [g Futter/d/Tier]± Standardabweichung über die gesamte Versuchsdauer. ....	54
Tabelle 21: Mittlere Nahrungsaufnahme [g Futter/d/Tier]± Standardabweichung im Verlauf. .	55
Tabelle 22: Mittelwerte± Standardabweichung von Elastizität [N/mm] und Streckgrenze [N]. .	57
Tabelle 23: Mittelwerte± Standardabweichung von BMD [mg/cm <sup>3</sup> ] und Volumen [mm <sup>3</sup> ] der verschiedenen Knochenabschnitte.....	63
Tabelle 24: Mittelwerte± Standardabweichung der Parameter der Mikroradiographie. ....	72
Tabelle 25: Mittelwerte± Standardabweichung der Parameter des ventralen Kallus.....	83
Tabelle 26: Mittelwerte± Standardabweichung der Parameter des dorsalen Kallus.....	83
Tabelle 27: Mittelwerte± Standardabweichung der Parameter des endostalen Kallus.....	84
Tabelle 28: Zeitpunkt der frühesten knöchernen Frakturspaltüberbrückung [d] mit Mittelwert. .....	85

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biomechanischer Test.....	32
Abbildung 2: typisches Kraft-Weg-Diagramm. PTH T67. ....	33
Abbildung 3: Positionierung des Messrahmens. ....	36
Abbildung 4: Auswahl des zu untersuchenden Areals. ....	36
Abbildung 5: Typisches Grauwerthistogramm, OVX+VIB T36. ....	37
Abbildung 6: Darstellung einer Mikroradiographie unter dem Makroskop (Weidemann 2013). .....	41
Abbildung 7: Darstellung der Graudetektion, leichte Überdetektion (Weidemann 2013). ....	41
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Flächendefinition. ....	42
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Dickemessung der ventralen, distalen Kortikalis. ....	42
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Dickemessung des dorsalen Kallus. ....	42
Abbildung 11: Auswahl der CG-markierten Flächen (Weidemann 2013). ....	47
Abbildung 12: Auswahl der AK-markierten Fläche (Weidemann 2013). ....	47
Abbildung 13: Auswahl der TC-markierten Fläche (Weidemann 2013). ....	47
Abbildung 14: Darstellung des mittleren Körpergewichts [g] mit Standardabweichung im Verlauf (Eimer 2014). ....	51
Abbildung 15: Darstellung des mittleren Uterusgewichtes [g] mit Standardabweichung (Eimer 2014). ....	53
Abbildung 16: Darstellung der mittleren täglichen Nahrungsaufnahme [g Futter/d/Tier] pro Versuchstier im Verlauf mit Standardabweichung. ....	54
Abbildung 17: Darstellung der Elastizität [N/mm] mit Standardabweichung. ....	56
Abbildung 18: Darstellung der Streckgrenze [N] mit Standardabweichung. ....	56
Abbildung 19: Darstellung der BMD [mg/cm <sup>3</sup> ] der Kortikalis mit Standardabweichung. ....	57
Abbildung 20: Darstellung des Kortikalisvolumens [mm <sup>3</sup> ] mit Standardabweichung. ....	58
Abbildung 21: Darstellung der BMD [mg/cm <sup>3</sup> ] des knöchernen Kallus mit Standardabweichung.....	58
Abbildung 22: Darstellung des Volumens [mm <sup>3</sup> ] des knöchernen Kallus mit Standardabweichung.....	59
Abbildung 23: Darstellung der BMD [mg/cm <sup>3</sup> ] des Weichgewebes mit Standardabweichung.....	59
Abbildung 24: Darstellung des Weichgewebenvolumens [mm <sup>3</sup> ] mit Standardabweichung. ....	60
Abbildung 25: Darstellung der BMD [mg/cm <sup>3</sup> ] des gesamten Kallus mit Standardabweichung.....	60
Abbildung 26: Darstellung des Volumens [mm <sup>3</sup> ] des gesamten Kallus mit Standardabweichung.....	61
Abbildung 27: Darstellung der BMD [mg/cm <sup>3</sup> ] des gesamten Knochenausschnittes mit Standardabweichung.....	61
Abbildung 28: Darstellung des Volumens [mm <sup>3</sup> ] des gesamten Knochenausschnittes mit Standardabweichung.....	62

**Abbildung 29: Darstellung von BV/TV [%] mit Standardabweichung. .... 62**

**Abbildung 30: Darstellung von BV/TV [%] mit Standardabweichung. .... 63**

**Abbildung 31: Darstellung des proximalen Knochendurchmessers [mm] mit  
Standardabweichung..... 65**

**Abbildung 32: Darstellung des distalen Knochendurchmessers [mm] mit  
Standardabweichung..... 65**

**Abbildung 33: Darstellung der ventralen, distalen Kortikalisdicke [mm] mit  
Standardabweichung..... 66**

**Abbildung 34: Darstellung der dorsalen, distalen Kortikalisdicke [mm] mit  
Standardabweichung..... 66**

**Abbildung 35: Darstellung der ventralen, distalen Kortikalisdicke [%] mit  
Standardabweichung..... 67**

**Abbildung 36: Darstellung der dorsalen, distalen Kortikalisdicke [%] mit  
Standardabweichung..... 67**

**Abbildung 37: Darstellung der ventralen Kallusdicke [mm] mit Standardabweichung. .... 68**

**Abbildung 38: Darstellung der dorsalen Kallusdicke [mm] mit Standardabweichung. .... 68**

**Abbildung 39: Darstellung der ventralen Kallusdicke [%] mit Standardabweichung. .... 69**

**Abbildung 40: Darstellung der dorsalen Kallusdicke [%] mit Standardabweichung. .... 69**

**Abbildung 41: Darstellung der endostalen Kallusdicke [%] mit Standardabweichung. .... 70**

**Abbildung 42: Darstellung der Anzahl der Trabekelkreuzungen mit  
Standardabweichung. .... 70**

**Abbildung 43: Darstellung der Dichte der Trabekelkreuzungen [1/mm<sup>2</sup>] mit  
Standardabweichung..... 71**

**Abbildung 44: Darstellung der Dichte des distalen trabekulären Knochens [%] mit  
Standardabweichung..... 71**

**Abbildung 45: Darstellung der mittleren Trabekeldicke [µm] mit Standardabweichung. .... 72**

**Abbildung 46: Darstellung der gesamten ventralen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit  
Standardabweichung..... 74**

**Abbildung 47: Darstellung der CG-markierten ventralen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit  
Standardabweichung..... 74**

**Abbildung 48: Darstellung der AK-markierten ventralen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit  
Standardabweichung..... 75**

**Abbildung 49: Darstellung der TC-markierten ventralen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit  
Standardabweichung..... 75**

**Abbildung 50: Gesamte fluoreszenzmarkierte Flächen des ventralen Kallus [mm<sup>2</sup>]. .... 76**

**Abbildung 51: Pro Tag fluoreszenzmarkierte Flächen des ventralen Kallus [µm<sup>2</sup>/d]. .... 76**

**Abbildung 52: Darstellung der gesamten dorsalen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit  
Standardabweichung..... 77**

**Abbildung 53: Darstellung der CG-markierten dorsalen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit  
Standardabweichung..... 77**

**Abbildung 54: Darstellung der AK-markierten dorsalen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung..... 78**

**Abbildung 55: Darstellung der TC-markierten dorsalen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung..... 78**

**Abbildung 56: Gesamte fluoreszenzmarkierte Flächen des dorsalen Kallus [mm<sup>2</sup>]..... 79**

**Abbildung 57: Pro Tag fluoreszenzmarkierte Flächen des dorsalen Kallus [µm<sup>2</sup>/d]..... 79**

**Abbildung 58: Darstellung der gesamten endostalen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung..... 80**

**Abbildung 59: Darstellung der CG-markierten endostalen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung..... 80**

**Abbildung 60: Darstellung der AK-markierten endostalen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung..... 81**

**Abbildung 61: Darstellung der TC-markierten endostalen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung..... 81**

**Abbildung 62: Gesamte fluoreszenzmarkierte Flächen des endostalen Kallus [mm<sup>2</sup>]..... 82**

**Abbildung 63: Pro Tag fluoreszenzmarkierte Flächen des endostalen Kallus [µm<sup>2</sup>/d]. ..... 82**

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Alizarinkomplexon
ASBMR	American Society for Bone and Mineral Research
ATP	Adenosintriphosphat
BMD	Bone-Mineral-Density
BMU	Bone-Multicellular-Units
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CG	Calceingrün
CHMP	Committee for Medical Products for Human Use
CRP	C-reaktives Protein
CRPS	Complex Regional Pain Syndrome
CT	Computertomographie
DVO	Dachverband Osteologie
DXA	Dual-Energy X-Ray Absorptiometry
ESCEO	European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis
HORIZON	The Health Outcomes and Reduced Incidence with Zoledronic Acid Once Yearly
HRT	Hormone Replacement Therapy
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
IOF	International Osteoporosis Foundation
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MCT	Mikrocomputertomographie
MPS	Monozytäres Phagozytosesystem
MRT	Magnetresonanztomographie
NIH	National Institutes of Health
NON-OVX	Keine Ovariectomie
OBD	Obduktion
OPG	Osteoprotegerin

OST	Osteotomie
OVX	Ovariektomie
PRAC	Pharmacovigilance Risk Assessment Committee
PTH	Parathormon
RANK	Receptor-Activator of Nuclear-Factor- $\kappa\beta$
RANKL	Receptor-Activator of Nuclear-Factor- $\kappa\beta$ -Ligand
SERM	Selektiver Estrogenrezeptormodulator
SOTI	Spinal Osteoporosis Therapeutic Intervention
SR	Strontiumranelat
TC	Tetrazyklinhydrochlorid
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor
TOP	Treatment of Osteoporosis with Parathyroid Hormone
TROPOS	Treatment of Peripheral Osteoporosis
VFA	Vertebral Fracture Assessment
VIB	Ganzkörpervibration
WBV	Whole-Body-Vibration
WHO	World Health Organization
XO	Xylenolorange
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung
$\gamma$ -GT	Gamma-Glutamyltransferase

# 1 Einleitung

## 1.1 Einleitung und Fragestellung

Die Osteoporose zählt neben Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen zu den bedeutendsten Volkskrankheiten der Industrienationen. Durch ihre Folgen entstehen allein in Deutschland jährlich Kosten in Milliardenhöhe. Zusätzlich zu der hohen finanziellen Belastung des Gesundheitssystems führt die Osteoporose durch chronische Schmerzen, Bewegungseinschränkungen sowie häufige Stürze und daraus resultierende pathologische Frakturen zu einer schweren Einschränkung der Lebensqualität der Betroffenen.

Antiosteoporotische pharmakologische wie nicht-pharmakologische Therapien werden seit Jahren intensiv erforscht. Der Schwerpunkt lag dabei bisher meist auf der Verbesserung der Knochendichte und -struktur intakter Knochen. Da Osteoporose jedoch häufig erst infolge einer pathologischen Fraktur apparent wird, stellt sich die Frage, wie im Falle einer Fraktur mit der antiosteoporotischen Therapie zu verfahren ist. Trotz der hohen klinischen Relevanz existieren bisher sehr wenige aussagekräftige Studien zum Einfluss antiosteoporotischer Therapien auf den häufig gestörten Heilungsprozess pathologischer Frakturen. In einem Großteil der veröffentlichten Studien erfolgte zudem die Untersuchung diaphysärer Frakturen, obwohl die im Rahmen der Osteoporose auftretenden pathologischen Frakturen meist im metaphysären Knochenabschnitt auftreten. Die Abteilung für Unfallchirurgie und Orthopädie der Universitätsmedizin Göttingen beschäftigt sich daher seit einiger Zeit mit der Erforschung antiosteoporotischer medikamentöser und nicht-medikamentöser Therapien und deren Wirkung auf die Heilung metaphysärer Frakturen der osteopenen Rattentibia (Stürmer et al. 2010a).

Im Mittelpunkt dieser Forschungsarbeit steht die Untersuchung der Wirkstoffe Strontiumranelat und Teriparatid sowie der mechanischen Therapieform der Ganzkörpervibration. Für sich haben alle drei Therapieformen in der Vergangenheit eine positive Wirkung sowohl auf die Knochendichte und -struktur als auch auf die Frakturheilung gezeigt (Komrakova et al. 2013; Komrakova et al. 2015; Sehmisch et al. 2009). Strontiumranelat wirkt durch seinen dualen Mechanismus sowohl antiresorptiv als auch förderlich auf die Knochenneubildung (Cianferotti et al. 2013). Das Parathormon, welches als körpereigenes Hormon kontinuierlich sezerniert eine osteokatabole Wirkung entfaltet, wirkt bei intermittierender Gabe bislang als einziges antiosteoporotisches Medikament osteoanabol (Hodsman et al. 2005). Bei der Ganzkörpervibration werden durch den mechanischen Reiz an das muskuloskelettale System der Erhalt von Knochendichte und -struktur sowie die Muskelaktivität gefördert. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch die Kombination der

Ganzkörpervibration mit antiosteoporotischen Medikamenten wie Raloxifen und Estradiol eine additive Wirkung erzielt werden kann (Stürmer et al. 2014). Es stellt sich nun die Frage, inwieweit durch die Kombination der Ganzkörpervibration mit den beschriebenen Pharmaka synergistische Effekte auf die Frakturheilung osteoporotischer Knochen erzielt werden können.

Der durch Hormonmangel induzierte Verlust an Knochenmasse, wie er bei der postmenopausalen Osteoporose beobachtet wird, ist weitgehend vergleichbar mit der durch Ovariectomie induzierten Osteopenie bei Ratten (Kalu 1991). Die ovariectomierte Ratte ist demnach ein in der Erforschung der postmenopausalen Osteoporose etabliertes Modell.

Ziel dieser Arbeit ist der Vergleich der Wirkung von Strontiumranelat, Teriparatid und Ganzkörpervibration allein sowie einer Kombination der mechanischen Therapie mit jeweils einem der Wirkstoffe auf die metaphysäre Frakturheilung der osteopenen Rattentibia nach Osteotomie.

## **1.2 Knochen**

Knochengewebe zählt histologisch zur Gruppe der Binde- und Stützgewebe. Es besteht aus spezialisierten Zellen (Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten) und mineralisierter extrazellulärer Matrix (im wesentlichen Kollagenfasern und Hydroxylapatit) (Lüllmann-Rauch 2006). Zu den Aufgaben des Knochens zählen die mechanische Stütz- und Schutzfunktion, die Blutbildung im roten Knochenmark und der Mineralhaushalt. Die entsprechenden Anforderungen (Druck-, Zug- und Biegefestigkeit) erfüllt das Knochengewebe durch seine spezielle Gewebearchitektur. Dadurch und durch die allgemeine Skelettarchitektur werden maximale Stabilität bei größtmöglicher Beweglichkeit und möglichst geringem Gewicht sowie der Schutz der inneren Organe und des zentralen Nervensystems erreicht. Der Knochen ist dabei trotz seiner hohen Stabilität ein dynamisches Organ, das einem ständigen Umbau unterliegt und stark durchblutet wird (Bartl 2011).

### **1.2.1 Anatomie**

Makroskopisch unterscheidet man lange (Röhren-)Knochen (Femur, Tibia und Humerus), kurze Knochen (Ossa carpi), platte Knochen (Skapula, Sternum), pneumatische Knochen (Os ethmoidale) und irreguläre Knochen (Wirbel). Der Aufbau des Knochens soll hier anhand des Röhrenknochens beschrieben werden. Die Epiphyse bildet das proximale und das distale Gelenkende. Die Gelenkflächen sind mit hyalinem Knorpel ausgekleidet. Dazwischen liegt der Schaft, die Diaphyse, in dessen Inneren sich die Markhöhle befindet. Hier findet ab der Geburt die Blutbildung statt (vorgeburtlich sind Leber und Milz die primären blutbildenden Organe). Die Metaphyse verbindet Epi- und Diaphyse trichterförmig. Hier liegt die Zone des

Längenwachstums, die knorpelige Epiphysenfuge, die nach Ende des Wachstums zur Epiphysenlinie verknöchert.

Die äußeren Oberflächen des Knochens sind, mit Ausnahme der Gelenkflächen, von der Knochenhaut, dem Periost, überzogen. Es besteht aus einer äußeren Schicht aus straffem Bindegewebe und sogenannten Sharpey-Fasern, die in die Kortikalis einstrahlen, sowie einer zellreichen inneren Schicht. Das Periost ist reich an Nervenfasern und dadurch – im Gegensatz zum Knochen selbst – ausgesprochen schmerzempfindlich. Die inneren Oberflächen des Knochens kleidet das Endost, bestehend aus nicht-mineralisierten Kollagenfibrillen und sogenannten *bone-lining cells*, aus.

### 1.2.2 Knochenzellen

Unter den spezialisierten Zellen des Knochens unterscheidet man Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten.

Die Osteoblasten werden auch als „Knochenbildner“ bezeichnet. Sie synthetisieren den organischen Bestandteil der Knochenmatrix, das Osteoid, und steuern dessen Mineralisierung. Zusätzlich nehmen sie über Aktivierung der Osteoklasten Einfluss auf den Knochenumbau. Dazu sind sie epithelartig auf den Knochenoberflächen angeordnet.

Durch Auflagerung weiterer Osteoblasten und Mineralisation des Osteoids werden alte Osteoblasten eingemauert und entwickeln sich so zu Osteozyten. Über die Hälfte der alten Osteoblastenpopulation geht jedoch in Apoptose über, nur einige wenige verfallen in einen inaktiven Zustand und nehmen ihre ursprüngliche Position als *bone-lining cells* am Endost ein (Lüllmann-Rauch 2006).

Von mineralisierter Knochenmatrix umgeben, ruhen die ausdifferenzierten Osteozyten in Lakunen, kommunizieren jedoch über feine, in Canaliculi verlaufende Zellfortsätze miteinander und mit den aktiven Osteoblastenpopulationen. Ihre genaue Funktion ist bisher nicht hinreichend geklärt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass Osteozyten wesentlichen Einfluss auf die Regulation des Kalzium- und Phosphatstoffwechsels haben (Lippuner 2012). Auch scheinen sie als Mechanosensoren eine Rolle beim belastungsadaptierten Knochenumbau zu spielen. Zusätzlich werden ihnen in geringem Maße osteoblastische und osteoklastische Fähigkeiten zugesprochen (Lüllmann-Rauch 2006).

Die Osteoklasten entstammen der hämatopoetischen Zellreihe und sind dem monozytären Phagozytosesystem (MPS) zuzuordnen. Durch Fusion von einkernigen Präosteoklasten entstehen die mehrkernigen Riesenzellen, für deren Proliferation und Differenzierung zahlreiche regulierende Faktoren wie M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), Vitamin D und nicht zuletzt der Receptor-Activator of Nuclear-Factor- $\kappa$ B-Ligand (RANKL) verantwortlich sind. Die Aufgabe der

Osteoklasten besteht im Abbau von Knochenmatrix. Dabei sind sie hocheffektiv: ein Osteoklast baut dieselbe Menge an Knochenmatrix ab, für deren Aufbau 100-150 Osteoblasten nötig sind (Lüllmann-Rauch 2006). Durch Sekretion von Säure lösen sie die mineralischen Komponenten der Knochenmatrix auf. Die organischen Anteile, wie beispielsweise das Kollagen Typ I, werden durch lysosomale Enzyme wie Kathepsin K zersetzt. Die Matrixfragmente nimmt der Osteoklast endozytotisch auf, gibt sie an seiner Rückseite exozytotisch ab und setzt auf diesem Wege Kalzium und Phosphat frei. Die so entstandenen Erosionshöhlen werden Howship-Lakunen genannt. Die Aktivierung der Osteoklasten wird durch die Osteoblasten reguliert (Lüllmann-Rauch 2006).

### **1.2.3 Knochenmatrix**

Die mineralisierte Knochensubstanz besteht aus organischen (25%) wie auch mineralischen (50%) Komponenten sowie zu 25% aus Wasser. Die Knochengrundsubstanz enthält hauptsächlich Kollagen Typ I (90%) und zu geringeren Anteilen Proteoglykane und Glykoproteine (Osteokalzin, Osteonektin und Osteopontin, Bartl 2011). In dieses Osteoid werden bei der Ossifikation mineralische Komponenten wie Kalzium, Phosphat sowie geringere Mengen anderer anorganischer Ionen (Karbonat, Natrium, Magnesium, Fluor und diverse Spurenelemente) eingelagert. Es entstehen Hydroxylapatitkristalle, die sich longitudinal an die Kollagenfibrillen anlagern (Lüllmann-Rauch 2006). Durch diese Kombination von druck-, zug- und biegefesten Bestandteilen erhält der Knochen seine außergewöhnliche Belastbarkeit und Stabilität. Abhängig von der räumlichen Organisation der Kollagenfasern werden, wie folgt, verschiedene histologische Knochenarten beschrieben.

Im Geflechtknochen ordnen sich die Kollagenfasern in scheinbar zufällig verwobenen Bündeln an. Er ist mechanisch wenig belastbar, kann jedoch schneller gebildet werden als Lamellenknochen. Dementsprechend findet er sich hauptsächlich im fetalen Skelett, wo er jedoch im Laufe der Zeit zu stabilerem Lamellenknochen umstrukturiert wird. Beim Erwachsenen ist Geflechtknochen vor allem bei Frakturheilung und eventuell in Knochentumoren anzutreffen, wird jedoch auch hier in der Regel schnell umgebaut.

Der Lamellenknochen gilt als „reifes“ Knochengewebe. Durch seine geordnete Struktur weist er eine viel höhere mechanische Belastbarkeit auf als Geflechtknochen. Allerdings dauert seine Konstruktion auch entsprechend länger. Eine Knochenlamelle zeigt eine Dicke von 3-5  $\mu\text{m}$ . Die mineralisierten Kollagenfibrillen ordnen sich innerhalb einer Lamelle gleichsinnig, von einer Lamelle zur nächsten jedoch gegensinnig an. So entsteht ein überlappendes Muster. Getrennt werden die lamellären Schichten von jeweils einer Lage Osteozyten in ihren Lakunen. Die Lamellen folgen einer unterschiedlichen Architektur, abhängig davon, ob sie sich im

Bereich der Substantia Compacta oder der Substantia Spongiosa befinden (Lüllmann-Rauch 2006).

Spongiöser Knochen findet sich im Inneren des Knochens. Er ist aus kleinen Knochenbälkchen aufgebaut, in denen sich die Lamellen flächig entlang der Trabekeloberfläche ausrichten. In die Zwischenräume der Trabekel sind Gefäße und das Knochenmark eingelagert, von dort ernähren sich die Knochenzellen durch Diffusion. Die Ausrichtung der Trabekel erfolgt entlang der Belastungslinien und hat wichtige statische Bedeutung für den Knochen. Die Aufgabe, zu registrieren, in welche Richtung Kräfte auf den Knochen wirken, kommt den Osteozyten mit ihrer mechanosensorischen Funktion zu.

Im Gegensatz zur Spongiosa sind die Lamellen des kompakten Knochens in Osteonen organisiert. Die Kompakta umgibt den Knochen wie eine Rinde an Epi-, Meta- und Diaphyse. Ein Osteon oder Havers-System besteht aus 5-20 Speziallamellen, die konzentrisch um einen Havers-Kanal angeordnet sind. Der Havers-Kanal ist wie alle inneren Knochenoberflächen mit Endost ausgekleidet und führt Kapillaren, Arteriolen, Venolen und Nervenfasern. Er hält so direkt oder indirekt über die quer verlaufenden Volkmann-Kanäle Verbindung zur Markhöhle und zu den Gefäßen des Periosts. Über Canaliculi gelangen Nährstoffe durch Diffusion vom Havers-Kanal zu den umgebenden Osteozyten. Die Flächen zwischen den zylinderförmigen Osteonen füllen sogenannte Schaltlamellen aus. Sie sind Überreste alter Osteone, die im Zuge des permanenten Remodelings teilweise abgebaut wurden. Nur der äußerste Rand der Kompakta folgt nicht der Organisation nach dem Havers-System. Hier verlaufen die Lamellen als kontinuierliche Generallamellen auf ganzer Länge um den Knochen (Lüllmann-Rauch 2006).

Unter dem Gesichtspunkt der Osteoporose ist eine Einteilung in ein axiales und ein peripheres Skelett sinnvoll. Während der Knochen des axialen Skeletts zu 70% seines Volumens aus spongiösem Knochen besteht, ist der des peripheren Skeletts zum größten Teil aus kortikalem Knochen aufgebaut. Allein in der Metaphyse finden sich hier spongiöse Knochenanteile (Alonso-Bouzon und Duque 2011).

#### **1.2.4 Knochenumbau**

Im Knochen findet ein kontinuierlicher Umbau des Gewebes statt, das sogenannte Remodeling. Während der Knochenentwicklung dient es der Formung des Knochens sowie dem Umbau von Geflechtknochen in mechanisch hochwertigeren Lamellenknochen. Später beugt es dem Gewebeverschleiß vor, indem Mikroschäden repariert werden und altes Gewebe durch neues ersetzt wird. Besondere Bedeutung hat das Remodeling für die funktionelle Anpassung der Trabekelarchitektur an Belastung. Bei Bewegung ist der Knochen Kräften ausgesetzt, die entlang bestimmter Kraftlinien wirken. Dies wird von den mechanosensorisch aktiven Osteozyten

wahrgenommen und über Kommunikation mit den Osteoblasten und Osteoklasten kommt es zum belastungsadaptierten Umbau des Gewebes. Bei vermehrter Belastung wird Knochenmasse aufgebaut, dementsprechend verringert sie sich bei Entlastung. Nicht zuletzt spielt das Remodeling auch eine wesentliche Rolle im Mineralhaushalt, vor allem für den Kalziumstoffwechsel, da bei Bedarf durch den Abbau von Knochenmasse schnell Kalzium bereitgestellt wird, während einem Überschuss an freiem Kalzium durch den Aufbau von Knochengewebe begegnet werden kann. So werden innerhalb eines Jahres bis zu 8% der gesamten Knochenmasse umgebaut, wobei dies größtenteils den spongiösen Knochen betrifft, von dessen Gesamtmasse ca. 25% jährlich umgebaut werden, während die Remodeling-Rate in der Kompakta nur bei etwa 2,5% liegt (Bartl 2011). Der Ablauf dieser Umbauvorgänge soll im Folgenden skizziert werden. Zentrale Einheit des Remodelings ist die sogenannte bone-multicellular-unit (BMU), bestehend aus knochenbildenden Osteoblasten und knochenabbauenden Osteoklasten, die über verschiedene Mediatoren und membranständige Proteine einem komplizierten System der Hemmung und Aktivierung unterliegen (Coupling). In der Kompakta schaffen die Osteoklasten einer BMU einen Bohrkanal. In diesen wachsen die Gefäße und Nervenfasern ein, die später im Havers-Kanal zu liegen kommen, während Osteoblasten Generation für Generation jeweils eine Schicht Osteoid an der inneren Wand des Bohrkanals anbauen. Durch Mineralisierung des Osteoids wird eine Osteoblastengeneration nach der anderen eingemauert. Die Osteoblasten verbleiben so als Osteozyten in den Lakunen und trennen die neu entstandenen Speziallamellen voneinander. Nur der Havers-Kanal mit den darin verlaufenden Strukturen bleibt am Ende frei. Anstatt eingemauert zu werden, geht die letzte Osteoblastengeneration in einen Ruhezustand über. Sie legt sich zusammen mit undifferenzierten Vorläuferzellen an die innere Wand des Havers-Kanals an und kleidet ihn so als Endost aus. Dieser Vorgang nimmt mehrere Monate in Anspruch. In der Spongiosa, die bekanntlich nicht in Osteonen organisiert ist, läuft das Remodeling etwas anders ab. Die Osteoklasten schaffen sogenannte Howship-Lakunen. Diese oberflächlichen Einbuchtungen werden dann von Osteoblasten Lamelle für Lamelle wieder aufgefüllt (Lüllmann-Rauch 2006).

Die Regulierung des Remodelings ist essentiell für ein ausgewogenes Verhältnis von Auf- und Abbau. Neben hormonellen Einflüssen scheinen besonders lokale Vorgänge wie Zell-Zell-Interaktion, Zytokine oder elektromagnetische Potenziale an der Regulation beteiligt. Eine zentrale Rolle spielt hier das Zytokin M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor). Von Osteoblasten sezerniert treibt es die Osteoklastenproliferation an. Ebenso wichtig scheint das Protein RANKL. Es ist auf der Osteoblastenoberfläche lokalisiert. Durch Interaktion mit dem zugehörigen Rezeptor, dem Receptor-Activator of Nuclear-Factor- $\kappa\beta$  (RANK), auf Osteoklasten und ihren Vorläuferzellen, fördert es deren Fusion, Differenzierung und Aktivierung, während es sie gleichzeitig vor dem programmierten Zelltod schützt. Als

Gegenspieler von RANKL/RANK wirkt das von Osteoblasten sezernierte OPG (Osteoprotegerin). Es bindet ebenfalls an RANK und wirkt so als kompetitiver Hemmer. Zusätzlich nehmen verschiedene Wachstumsfaktoren im Sinne einer Rückkopplung Einfluss auf das Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten. Während PTH, Vitamin D und verschiedene Zytokine, Interleukine und Prostaglandine die Expression von RANK fördern, wird diese unter dem Einfluss von Estrogen, TGF- $\beta$  und mechanischer Belastung gehemmt.

Relevant ist dies besonders in Hinblick auf das Krankheitsbild der Osteoporose. Dieser Knochenschwund und das damit verbundene erhöhte Risiko für Knochenbrüche, vor allem in überwiegend spongiösen Knochen, sind bedingt durch eine Negativbilanz im Remodeling. Ursächlich können Veränderungen im Hormonhaushalt, beispielsweise bei Frauen nach der Menopause ein abfallender Estrogenspiegel, sein. Dieser führt durch verminderte RANKL-Hemmung und vermehrte Osteoklastenaktivität zu einem gesteigerten Abbau der Knochenmasse (Bartl 2011; Lippuner 2012; Lüllmann-Rauch 2006).

### **1.2.5 Peak Bone Mass**

Unter Peak Bone Mass versteht man die maximale Knochendichte, die für gewöhnlich zwischen dem 25. und dem 30. Lebensjahr erreicht wird. Danach wird die bis zu diesem Zeitpunkt positive Knochenbilanz negativ, was zu einem durchschnittlichen Verlust an Knochenmasse von 0,5-1% pro Jahr führt. Die Peak-Bone-Mass und der darauf folgende Abbau werden vor allem durch Hormone, Bewegung, Ernährung und eine genetische Determinante beeinflusst (Alonso-Bouzon und Duque 2011). Diese Vorgänge sind geschlechterunabhängig, jedoch kann der Verlust an Knochenmasse bei Frauen nach der Menopause durch den erniedrigten Estrogenspiegel von 1% auf bis zu 4% pro Jahr ansteigen (Bartl 2011).

## **1.3 Osteoporose**

### **1.3.1 Definition**

Es existieren verschiedene anerkannte Definitionen der Osteoporose. Das NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis 2001 definiert Osteoporose allgemein als „[...] eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist, mit der Folge vermehrter Knochenbrüchigkeit.“ (Bartl 2011, S. 21; NIH 2001). Dahingegen definiert sich die Osteoporose laut WHO allein für Frauen über die Werte der mittels Dual-Energy X-Ray Absorptiometry (DXA) an Femur und Lendenwirbelsäule gemessenen Knochendichte. Der nach der DXA-Methode ermittelte Wert wird auch als T-Score bezeichnet. Danach besteht eine Osteoporose bei einem Knochendichtewert mindestens 2,5 Standardabweichungen unter dem

statistischen Mittelwert gesunder prämenopausaler Frauen, entsprechend einem T-Score  $\leq -2,5$  SD (WHO 2007). Unabhängig von der genauen Definition wird eine Osteoporose erst dann als manifest bezeichnet, wenn in ihrer Folge eine oder mehrere Frakturen aufgetreten sind.

### **1.3.2 Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung**

Laut WHO sind derzeit über 75 Millionen Menschen in den USA, Europa und Japan von Osteoporose betroffen. Allein in den USA und Europa entstehen jährlich um die 4,5 Millionen osteoporotische Frakturen (WHO 2007).

Das Risiko, im Laufe des Lebens eine osteoporotische Fraktur des Unterarms, der Hüfte oder der Wirbelsäule zu erleiden, wird in den Industriestaaten auf 30-40% geschätzt und entspricht damit annähernd dem Risiko, an einer koronaren Herzkrankheit zu erkranken. Frauen sind, bedingt durch den postmenopausal sinkenden Estrogenspiegel, weitaus häufiger betroffen als Männer. So waren unter den insgesamt 7,8 Millionen im Jahr 2003 in Deutschland von Osteoporose betroffenen Menschen 6,4 Millionen Frauen (Häussler et al. 2007). Ca. 30% aller Frauen in Deutschland erkranken postmenopausal an Osteoporose (Bartl 2011).

Zwar verläuft der altersbedingte Knochenschwund asymptomatisch, die sekundär durch die Frakturfolgen bedingte Morbidität stellt jedoch in Form von Bettlägerigkeit, chronischen Schmerzleiden, Arbeitsunfähigkeit und ähnlichem eine enorm hohe Belastung für das Gesundheitssystem sowie für soziale Strukturen dar. So belaufen sich in der BRD die durch Osteoporose und ihre Folgen entstehenden Kosten auf über 5 Milliarden Euro jährlich (Bartl 2011). Die höchste Morbidität und Mortalität entsteht dabei durch Hüftfrakturen, die knapp 20% der osteoporotischen Frakturen ausmachen (WHO 2007). Durch den demographischen Wandel wird sich das lebenslange Risiko pathologischer Frakturen voraussichtlich in den nächsten 50 Jahren bei Frauen wie bei Männern verdreifachen (WHO 2007).

Trotz der gravierenden sozioökonomischen Folgen und der hohen Prävalenz, ist die Osteoporose eine unterdiagnostizierte und untertherapierte Volkskrankheit. So wurden lediglich 21,7% der Patienten, die 2003 mindestens eine pathologische Fraktur erlitten hatten, medikamentös antiosteoporotisch behandelt (Häussler et al. 2007).

### **1.3.3 Einteilung der Osteoporose**

Die primäre, generalisierte Osteoporose wird in zwei Formen unterteilt, die postmenopausale (Typ I) und die senile Form (Typ II). Der Typ I betrifft Frauen zwischen dem 51. und dem 75. Lebensjahr. Ursächlich ist der postmenopausale Estrogenmangel, der sich aus dem Abfall der ovariellen Aktivität ergibt. Dadurch

sinkt unter anderem die Interleukin-6 Produktion, was eine vermehrte Aktivität der Osteoklasten und damit den vermehrten Abbau vor allem spongiöser Knochenanteile zur Folge hat. Zwar betrifft der Typ I in erster Linie Frauen, jedoch kann auch bei Männern eine durch Testosteronmangel bedingte Osteoporose auftreten. Die Abnahme der Testosteronproduktion bei Männern folgt im Gegensatz zu der Abnahme der Estrogenproduktion bei Frauen einer linearen Kurve, sodass der Verlust der Knochenmasse hier zwar kontinuierlich aber wesentlich langsamer abläuft (Manolagas 2000).

Der Übergang von der postmenopausalen zur senilen Osteoporose ist fließend. Sie tritt ab dem 70. Lebensjahr auf und wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Mit zunehmendem Alter nimmt die Aktivität der Osteoblasten ab (Involution). Die osteoklastische Aktivität überwiegt, sodass sowohl spongiöse als auch kortikale Knochenmasse verloren geht. Immobilität, ein gestörter Vitamin D-Stoffwechsel und ein häufig im Alter entstehender sekundärer Hyperparathyreoidismus verstärken den Effekt. Das Verhältnis von Frauen und Männern beträgt bei der senilen Osteoporose nur mehr 2:1 (Bartl 2011).

Von der generalisierten Osteoporose abzugrenzen ist die wesentlich seltenere lokalisierte Variante, die als Folge von Immobilisation (Inaktivitätsosteoporose), im Zusammenhang mit einem komplexen regionalen Schmerzsyndrom (CRPS) oder einem Gorham-Stout-Syndrom auftreten kann. Des Weiteren unterscheidet man primäre Osteoporosen (Typ I und II) von sekundären, welche durch diverse Stoffwechselerkrankungen (u.a. endokrinologisch, hepatisch, alimentär oder nephrologisch), onkologisch oder medikamentös bedingt sein können. Auch eine genetische Komponente konnte in Zwillingstudien nachgewiesen werden (Bartl 2011).

#### **1.3.4 Ätiologie und Pathogenese**

An dieser Stelle soll vornehmlich auf die primäre Form der Osteoporose eingegangen werden, da diese Arbeit schwerpunktmäßig die Frakturheilung unter Estrogenmangel zum Thema hat.

Der Mangel an Sexualhormonen ist mit Abstand der wichtigste Faktor bei der Entstehung der postmenopausalen Osteoporose. Estrogen und Testosteron spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Knochenumbaus. Beide fördern die Expression von OPG (vergl. Abschnitt 1.2.4) und unterdrücken die Produktion verschiedener Zytokine, z.B. des Interleukin-6 (IL-6) und dessen Rezeptoruntereinheiten IL-6R $\alpha$  und gp130. IL-6 wiederum sorgt einerseits für eine gesteigerte Genese von Osteoklasten und Osteoblasten, andererseits für eine vermehrte Expression des RANKL, welcher für die Aktivierung der Osteoklasten verantwortlich ist. Besteht also ein Estrogenmangel, steigt die Knochenumbaurate

durch die vermehrte Differenzierung an Osteoklasten und Osteoblasten an (Manolagas 2000). Da aber der Abbau wesentlich schneller vonstattengeht, als die Synthese neuer Knochenmatrix, wird mehr Knochenmasse abgebaut, als neu synthetisiert werden kann. Verstärkt wird dieser Effekt durch die im Rahmen des Hormonmangels verminderte Wirkung der Sexualhormone auf die Lebensspanne der Knochenzellen. Die durchschnittliche Lebensspanne der Osteoklasten beträgt 12 Tage, die der Osteoblasten 100 Tage (Jilka 2003). Während Estrogen die Lebensspanne von Osteoblasten verlängert, induziert es gleichzeitig die Apoptose der Osteoklasten. Durch den Wegfall der proapoptotischen Estrogenwirkung verlängert sich demnach die Lebensdauer der Osteoklasten in einer Estrogenmangelsituation, wodurch die Osteoklasteneinheiten das Knochengewebe tiefer perforieren können. Gleichzeitig verkürzt sich die Lebensdauer der Osteoblasten und Osteozyten, sodass weniger Knochenmatrix synthetisiert wird. Es wird vermutet, dass der Untergang der Osteozyten außerdem zu einer gestörten Mechanosensorik und einer eingeschränkten Detektion von Mikrofrakturen führt, wodurch sowohl Reparaturmechanismen als auch die Anpassung an Belastung insuffizient ablaufen. Die Folge ist ein Verlust an Knochenqualität, der meist schon vor einem signifikanten Verlust an Knochenmasse auftritt. Anstatt der statisch günstigen, aus vielen, dünnen, gut vernetzten Trabekeln bestehenden Architektur, bleibt nur ein brüchiges Gerüst aus wenigen, verdickten, schlecht verknüpften Trabekeln bestehen. Durch die tiefe Perforation der Osteoklastenkolonien können auch kortikale Knochenanteile beschädigt werden (Manolagas 2000).

Zusammenfassend basiert die Pathogenität des Mangels an Sexualhormonen also auf einem Missverhältnis von Knochenauf- und -abbau bei einer insgesamt gesteigerten Remodeling-Rate, sodass es sowohl zu einem Verlust an Knochenmasse als auch zu einem Verlust der strukturellen Integrität des Knochens kommt.

Dem Pathomechanismus der senilen Osteoporose liegt eine vermehrte endostale Resorption bei gleichzeitig verminderter periostaler Auflagerung von Knochenmatrix zugrunde. Daraus resultiert eine Verschmälerung und zunehmende Porosität der Kortikalis sowie eine Ausdünnung des spongiösen Trabekelwerks mit dem Verlust trabekulärer Knotenpunkte (Demontiero et al. 2012).

Auch hier spielt ein altersbedingter Abfall der Sexualhormone bei Männern wie Frauen eine wichtige Rolle, wobei Frauen durch den rasanten Estrogenabfall nach der Menopause wesentlich stärker betroffen sind als Männer, bei denen der Abfall langsam und kontinuierlich verläuft. Eine Abgrenzung der senilen zur postmenopausalen Form ist demnach klinisch weder möglich, noch relevant. Allerdings wurden auch Mechanismen beobachtet, die unabhängig von den Sexualhormonen zu einem Verlust an Knochenmasse und -qualität führen. Durch die im Alter verminderte Sonnenexposition, die verminderte Zufuhr von Vitamin D mit

der Nahrung sowie einen verminderten Vitamin D-Metabolismus in der Haut entsteht ein sekundärer Hyperparathyreoidismus. Der erhöhte Parathormonspiegel bedingt einen gesteigerten Umbau des Knochens, wobei in erster Linie die Osteoklastenaktivität erhöht wird, was zu einem Verlust kortikaler Knochenmasse führt (Lips 2001). Häufig besteht gleichzeitig ein Mangel an Kalzium, welches zusammen mit Vitamin D essentiell für die Synthese von Knochenmatrix ist (Duque und Troen 2008).

Ein wichtiger, jedoch bisher nicht zur Gänze verstandener, Mechanismus ist die im Alter veränderte Differenzierung von Stammzellen. Es wurde eine auf Kosten der Osteoblastogenese gesteigerte Adipogenese beobachtet. Die Osteoblasten werden von den Adipozyten verdrängt. Zudem verkürzt sich durch eine scheinbar toxische Wirkung der Adipozyten die Lebensdauer der Osteoblasten (Alonso-Bouzon und Duque 2011).

### 1.3.5 Klinik der Osteoporose

Klinisch lässt sich die Osteoporose nach Minne in 4 Schweregrade einteilen (vergl. Tabelle 1). Kriterien hierfür sind der T-Score, abgelaufene Frakturen sowie das Frakturrisiko.

**Tabelle 1: Schweregradeinteilung der Osteoporose nach Minne.**

Schweregrad	Definition	T-Score	Frakturen	Frakturrisiko
<b>0</b>	Osteopenie	-1 bis -2,5 SD	Keine	Gering
<b>1</b>	Messtechnische Osteoporose	<-2,5 SD	Keine, Röntgen: betonte Wirbelkonturen, vertikale Akzentuierung der Spongiosa	Hoch
<b>2</b>	Schwere Osteoporose	<-2,5 SD	Wirbelkörper-einbrüche und Frakturen (Fisch-/Keilwirbel)	Sehr hoch
<b>3</b>	Manifeste Osteoporose	<-2,5 SD	Axiale und extra-vertebrale Frakturen	Sehr hoch

Der Knochenschwund an sich verläuft symptomfrei. Erst Frakturen und Wirbelkörperbrüche lassen die Osteoporose klinisch sichtbar werden. Die Patienten beschreiben bei Einbruch eines Wirbelkörpers akute, stechende Rückenschmerzen in den entsprechenden Bereichen. Durch die veränderte Statik der Wirbelsäule entstehen häufig chronische Rückenschmerzen. Zusätzlich kommt es zu einem beträchtlichen Höhenverlust der Wirbelsäule, was zu einem Baastrup-Syndrom, einer schmerzhaften Berührung der Dornfortsätze führen kann. Durch die Keilform der Brustwirbelkörper entsteht ein Rundrücken.

### **1.3.6 Diagnostik**

Der Dachverband Osteologie (DVO) empfiehlt in seiner 2009 veröffentlichten Leitlinie zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen eine Basisdiagnostik bei Patienten, bei denen anhand ihres klinischen Risikoprofils ein mindestens 20%iges Risiko besteht, innerhalb der nächsten zehn Jahre eine Wirbelkörper- und/oder proximale Femurfraktur zu erleiden. Die empfohlene Basisdiagnostik beinhaltet unter anderem eine ausführliche Anamnese, die neben einer Schmerzanamnese und dem Erfragen funktioneller Einschränkungen auch potentielle Risikofaktoren einer primären sowie mögliche Hinweise auf eine sekundäre Osteoporose erfassen sollte (DVO 2009). Die klinische Untersuchung dient der Feststellung etwaiger Fehlstellungen und Einschränkungen von Muskelkraft, Koordination und Bewegungsumfang. Bei anamnestischem oder klinischem Verdacht auf sekundäre osteologische Grunderkrankungen und zur Erfassung laborchemisch darstellbarer Risikofaktoren empfiehlt sich die Erstellung eines Basislabors.

Die Messung der Bone-Mineral-Density (BMD) ist die einzige Möglichkeit zur Früherkennung einer Osteoporose. Sie ermöglicht die Einschätzung des Frakturrisikos und die Festlegung eines Schweregrades. Außerdem liefern Kontrolluntersuchungen Informationen über den Krankheitsprogress und die Wirksamkeit der Behandlung (Bartl 2011).

Die einzige von der WHO, ESCEO, IOF und dem DVO anerkannte Standardmethode zur Definition einer Osteoporose und zur Stellung einer Therapieindikation ist die DXA. Dabei erfolgt eine Durchleuchtung von Lendenwirbelsäule und Hüfte mit zwei Energiestrahlen unterschiedlicher Intensität. Aus der Menge der Strahlung, die nicht vom Gewebe resorbiert wurde, ergibt sich die Masse des Mineralgehaltes. Das Ergebnis wird in  $\text{g/cm}^2$  (Mineralgehalt/Fläche) angegeben und dient der Errechnung des T-Scores (Bartl 2011).

Bei akuten, neu aufgetretenen oder chronischen, bisher nicht abgeklärten Rückenschmerzen ist eine bildgebende Diagnostik angezeigt (DVO 2009). Neben dem VFA (Vertebral Fracture Assessment) steht hier die röntgenologische Darstellung der Brust- und Lendenwirbelsäule im Vordergrund. Sie ermöglicht die Beurteilung

abgelaufener Frakturen oder Wirbelkörperdeformitäten anhand betonter Wirbelkonturen und Deformitäten wie Fisch-, Keil- oder Plattwirbel sowie Ballonierungen der Bandscheibenräume als Zeichen des beginnenden Einsinkens von Grund- und Deckenplatten (Bartl 2011). Zwar eignet sich das Röntgen nicht zur Früherkennung der Osteoporose (erst ein Verlust von 30-40% der Knochenmasse wird auf dem Röntgenbild sichtbar), umso bedeutender ist es zur differentialdiagnostischen Abgrenzung der Osteoporose zu degenerativ entzündlichen Erkrankungen, Osteomalazie, malignen Läsionen und zum Hyperparathyreoidismus (Bartl 2011). CT, MRT und Knochenszintigraphie spielen in der Diagnostik der Osteoporose eine untergeordnete Rolle und dienen allenfalls der differentialdiagnostischen Abgrenzung (DVO 2009).

### **1.3.7 Therapie der Osteoporose**

Primäres Therapieziel bei Osteoporose ist die Frakturprävention. Neben einer spezifischen medikamentösen Therapie gilt es, Risikofaktoren zu meiden, die den Verlauf der Osteoporose negativ beeinflussen. Während sich das Alter, das Geschlecht und die Anzahl abgelaufener Frakturen nicht beeinflussen lassen, besteht eine Vielzahl modulierbarer Risikofaktoren.

Durch eine regelmäßige Sturzanamnese lässt sich das individuelle Sturzrisiko bestimmen und durch präventive Maßnahmen reduzieren bzw. die Verletzungsgefahr minimieren. Einen wichtigen präventiven Faktor stellt die Ernährung dar. Ein Mangel an Vitamin D und Kalzium erhöht nachweislich das Risiko für Stürze und Frakturen und sollte deswegen ab einem Serum-25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> <20ng/ml ausgeglichen werden. Untergewicht und Nikotin sollten vermieden werden. Es ist zudem nachgewiesen, dass vermehrte körperliche Aktivität zu einer passageren Zunahme der Knochenmasse führt (Langsetmo et al. 2012; Muir et al. 2013).

Bei klinischen und laborchemischen Hinweisen auf eine sekundäre Osteoporose sollte der auslösende Faktor erkannt und soweit möglich beseitigt werden. Bei Bestehen einer Grunderkrankung, wie Morbus Cushing, primärem Hyperparathyreoidismus, einer Hypothyreose oder einem Diabetes mellitus, sollte diese optimal eingestellt werden, um weitere negative Einflüsse auf die Knochendichte zu vermeiden. Liegt ein medikamenteninduzierter Knochenschwund vor, müssen Risiko und Nutzen der Behandlung sorgfältig abgewogen werden. Eine Glitazonbehandlung bei Frauen sollte auf ein anderes Antidiabetikum umgestellt, die Einnahme oraler Glukokortikoide durch andere immunsuppressive Medikamente wie Azathioprin und Methotrexat reduziert oder vermieden werden. Ebenso ist der Einsatz sturzfördernder Medikamente (Sedativa, Orthostase auslösende Medikamente, Neuroleptika, Antidepressiva) sorgsam abzuwägen. Auch Protonenpumpen-inhibitoren wird in der Langzeittherapie eine Erhöhung des Sturzrisikos

zugeschrieben (DVO 2009). Zusätzlich empfiehlt sich eine schmerztherapeutische und psychosoziale Mitbetreuung (Bartl 2011).

### **1.3.7.1 Indikationsstellung zur medikamentösen Therapie**

Die Indikation zur medikamentösen Therapie der Osteoporose besteht:

- Bei einem nach epidemiologischen Daten geschätzten 10 Jahresrisiko für Wirbelkörper- oder proximale Frakturen >30% und einem gleichzeitig erniedrigten T-Score,
- bei abgelaufenen inadäquaten singulären (Grad 2-3 nach Genant) oder multiplen (Grad 1-3 nach Genant) Wirbelkörperfrakturen und einem T-Score  $\leq -2,0$ , oder
- bei einer hochdosierten Glukokoidtherapie ( $\geq 7,5$  mg Prednisolonäquivalent) über mindestens drei Monate und einem T-Score  $\leq -1,5$ .

Abhängig von Alter und Geschlecht kann ungeachtet weiterer Risikofaktoren ein stark erniedrigter T-Score als Indikation für eine medikamentöse Therapie ausreichen (z.B. T-Score  $< -4,0$  für Frauen bis 60 und Männer bis 70 Jahre). Das Vorliegen von Risikofaktoren hebt die Therapieschwelle anhand des T-Scores um 0,5 bei einem, bzw. um 1,0 bei zwei oder mehr zusätzlichen Risikofaktoren an, maximal jedoch bis zu einem T-Score von  $-2,0$ , da oberhalb dieses Wertes die Wirksamkeit einer medikamentösen Therapie bisher nicht belegt werden konnte. Als Risikofaktoren gelten hier unter anderem Stürze, abgelaufene Frakturen, Frakturen in der Familienanamnese, Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus, Hyperparathyreoidismus etc. sowie die Einnahme knochenwirksamer Medikamente (DVO 2009).

### **1.3.7.2 Präparate**

Der Großteil der zur Zeit verfügbaren Präparate zur Osteoporosetherapie wirkt antiresorptiv durch Unterdrückung der Osteoklastenaktivität (z.B. Bisphosphonate, Estrogene, Kalzium und Vitamin D u.a.). Es existieren jedoch auch Medikamente, die durch die Stimulation der Osteoblastenaktivität und deren Differenzierung einen anabolen Effekt auf den Knochen ausüben, darunter rekombinantes Parathormon, Teriparatid und Strontiumranelat. Das Ziel beider Therapieansätze ist es, eine positive Knochenbilanz zu erzeugen (Alonso-Bouzon und Duque 2011; Bartl 2011).

#### *1.3.7.2.1 Kalzium und Vitamin D*

Primäre Maßnahme der Osteoporosetherapie ist in der Regel die Substitution von Kalzium und Vitamin D. Der altersbedingte Mangel an Vitamin D sowie die verminderte intestinale Kalziumresorption, bedingen einen erhöhten Parathormon-

spiegel. Das Parathormon hält den Serumkalziumspiegel u.a. durch die Mobilisation von Kalzium aus dem Knochen im Normbereich, wodurch dessen Struktur angegriffen wird. Die Substitution von Vitamin D steigert die intestinale Kalziumresorption, die zusätzliche Gabe von Kalzium verstärkt den positiven Effekt auf das Serumkalzium und der Parathormonspiegel fällt zurück in den Normbereich. Außerdem konnte bewiesen werden, dass Vitamin D die Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten steigert und somit die Entstehung neuer Knochenmasse fördert. Zusätzlich hemmt es die Adipogenese und verschiebt so das Gleichgewicht zugunsten der Osteoblasten (Alonso-Bouzon und Duque 2011; Duque und Troen 2008).

#### 1.3.7.2.2 *Hormonersatztherapie*

Der Mangel an Sexualhormonen ist der größte Pathogenitätsfaktor der postmenopausalen Osteoporose (vergl. Abschnitt 1.3.4). Es überrascht daher wenig, dass sich die Hormonersatztherapie – kurz HRT (Hormone Replacement Therapy) – durch eine hohe Effektivität auszeichnet. So kann bei langfristiger Anwendung (mindestens 5-15 Jahre) die Inzidenz für Hüft-, Wirbel- und Unterarmfrakturen um bis zu 50% gesenkt werden. Damit zeigt die HRT hinsichtlich der Knochendichte und des Frakturrisikos eine höhere Effektivität als Raloxifen, Kalzitonin oder Kalzium, zumal sie als einzige Therapieform auch das Risiko für Unterarmfrakturen senkt. Die Wirkung der HRT auf die Knochendichte der Lendenwirbelsäule und der Hüfte ist mit der von Bisphosphonaten vergleichbar. Während die HRT jedoch ausschließlich im Zeitraum der Einnahme effektiv ist, entfalten Bisphosphonate ihre Wirkung noch bis zu zwölf Monate nach Absetzen des Präparats (Bartl 2011).

Die HRT besteht aus einer Behandlung mit Estrogenen allein oder einer Kombinationstherapie aus Estrogenen und Gestagenen. Die Kombination mit Gestagenen empfiehlt sich insbesondere bei intaktem Uterus und bei sehr niedriger Knochendichte, da Progesteron hier ein osteoanaboler Effekt zugeschrieben wird. Trotz der hohen Effektivität vor allem bei peri- und postmenopausalem Einsatz, verliert die Hormonersatztherapie aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen zunehmend an Popularität (Alonso-Bouzon und Duque 2011). Zu den bekannten Nebenwirkungen gehören Endometriumhyperplasie, Blutungsstörungen, ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Brust-, Ovarial- und Endometriumkarzinomen sowie ein erhöhtes Risiko für thrombembolische Ereignisse und Myokardinfarkte (Zhao et al. 2013). Zwar ist die Datenlage hinsichtlich der Risikosteigerung nicht eindeutig und teilweise widersprüchlich, dennoch wurde nach der Veröffentlichung der *Women's Health Initiative Study 2003*, die zwar eine deutliche Abnahme des Frakturrisikos, jedoch auch eine Zunahme der Inzidenz von Mammakarzinomen belegte, die Indikation für eine HRT auf einen Zeitraum von wenigen Jahren

unmittelbar nach der Menopause bei zusätzlichen klimakterischen Beschwerden beschränkt (Anderson et al. 2003; Bartl 2011; Cauley et al. 2003).

#### 1.3.7.2.3 *Selective Estrogen-Receptor Modulators – SERM*

Eine Alternative zur HRT stellen selektive Estrogenrezeptormodulatoren dar. Tamoxifen, das ursprünglich wegen seiner antiestrogenen Wirkung auf das Brustgewebe in der Mammakarzinomtherapie Anwendung fand, wirkt gleichzeitig proestrogen auf Knochen, Leber und Fettstoffwechsel. Es wirkt jedoch auch am Uterus als Estrogenagonist, wodurch es zu Endometriumhyperplasie und Blutungsstörungen kommt. Bevorzugt wird daher Raloxifen eingesetzt. Es wirkt agonistisch an den Estrogenrezeptoren des Knochens, jedoch antagonistisch an Brust und Uterus. So wird versucht, die positiven Effekte der HRT zu erhalten, ohne die Nebenwirkungen in Kauf nehmen zu müssen. Tatsächlich lässt sich mit Raloxifen das Risiko für Wirbelkörperfrakturen um bis zu 50% senken (Bartl 2011). Zudem wurde ein positiver Effekt auf die Heilung osteoporotischer Frakturen beobachtet (Stürmer et al. 2010b).

#### 1.3.7.2.4 *Bisphosphonate*

Die derzeit zugelassenen Bisphosphonatpräparate Alendronat, Risendronat, Etidronat, Ibandronat und Zoledronat sind allesamt schwefelhaltige Analoga des Pyrophosphats. Ihr Wirkmechanismus ist in erster Linie antiresorptiv, jedoch werden ihnen auch in geringerem Maße anabole Effekte zugeschrieben. Sie wirken dabei sowohl auf spongiösen als auch kompakten Knochen.

Bisphosphonate zeigen eine hohe Affinität vor allem zu arrodieren Arealen der Knochenoberfläche, also den Orten, wo gerade Knochenumbau stattfindet. Dort hemmen sie die Osteoklasten der BMUs auf unterschiedlichem Wege: Zum einen kommt es zu einer verminderten Rekrutierung von Osteoklastenvorläufern sowie zu einer vermehrten Apoptose vorhandener Osteoklasten. Durch Hemmung der Protonen-ATPase der Osteoklasten wird der Knochenumbau zusätzlich verlangsamt. Abgelagertes Bisphosphonat wird in den Knochen eingebaut und macht ihn widerstandsfähiger gegen Osteoklasteneinheiten (Bartl 2011; Manolagas 2000). Zusätzlich zum antiresorptiven Effekt wirken Bisphosphonate antiapoptotisch auf Osteoblasten und Osteozyten. Die Synthese von Kollagen I wird gesteigert. Der anabole Effekt fällt jedoch wesentlich geringer aus als bei anderen anabolen Präparaten, wie z.B. PTH und SR, da insgesamt die Knochenumbaurate herunter reguliert wird, Knochenaufbau aber nur dort stattfindet, wo zuvor Knochen abgebaut wurde (Manolagas 2000). Dennoch kann durch Bisphosphonate über Jahre eine kontinuierlich positive Knochenbilanz bei einem günstigen Nebenwirkungsprofil erzielt werden (Bartl 2011). Nach einer Studie des *HORIZON Pivotal Fracture Trail* (HORIZON: Health Outcomes and Reduced Incidence with Zoledronic Acid Once

Yearly) lässt sich durch eine jährliche Injektion von Zolendronat über 3 Jahre das Risiko vertebraler Frakturen um 71%, das von Hüftfrakturen um 41% und das anderer extravertebraler Frakturen um 25% senken (Black et al. 2007; Lyles et al. 2007).

Entsprechend der Hemmung des Knochenumbaus durch Bisphosphonate ist auch eine Verlangsamung der Frakturheilung zu beachten. Vor allem der Umbau von Geflecht- zu Lamellenknochen ist hiervon betroffen (Saito et al. 2010). Experimentell zeigte sich zwar eine Zunahme von Größe und Mineralgehalt des Kallus, vereinzelt auch eine erhöhte mechanische Belastbarkeit unter Bisphosphonatgabe, allerdings wurde gleichzeitig ein verzögertes Remodeling des Kallusgewebes beobachtet (Amanat et al. 2007; Cao et al. 2002; J Li et al. 1999). Auch klinische Studien im Rahmen des *HORIZON Recurrent Fracture Trail* ergaben zwar eine erhöhte BMD der gesamten Hüfte sowie des Schenkelhalses, jedoch keinen positiven Effekt auf Dauer und Qualität der Heilung von Hüftfrakturen (Colón-Emeric et al. 2011; Lyles et al. 2007). Rozental et al. beobachteten in ihrer klinischen Studie eine verlängerte Heilungsdauer von distalen Radiusfrakturen unter Bisphosphonattherapie. Die Therapie soll dennoch nach Ablauf einer Fraktur weitergeführt werden, da diese Verzögerung der Frakturheilung klinisch nicht relevant ist (Rozental et al. 2009).

Sowohl die lokale als auch die systemische Applikation von Bisphosphonaten wirkt fördernd auf die Stabilität von Osteosynthesen. Dieser Effekt ist den antiresorptiven Eigenschaften von Bisphosphonaten zuzuschreiben, durch die der Abbau des Gewebes, in das die Osteosynthese verankert ist, gehemmt wird (Skoglund et al. 2004; Tengvall et al. 2004).

#### 1.3.7.2.5 *Strontiumranelat*

Strontiumranelat (SR) ist das erste zur Therapie der postmenopausalen Osteoporose zugelassene Präparat einer neuen Klasse von knochenwirksamen Substanzen, die sowohl den Knochenaufbau fördern als auch in geringerem Maße die Knochenresorption verhindern (Cianferotti et al. 2013).

Der Wirkmechanismus erschließt sich aus der Struktur des Präparates und dem Ablauf des physiologischen Knochenumbaus: Strontium ist ein knochenaffines Erdalkalimetall, welches sich am Knochen ähnlich wie Kalzium verhält. SR setzt sich aus zwei Atomen stabilem Strontium und einem Molekül Ranelicsäure zusammen, welche eine hohe intestinale Resorption ermöglicht. 50-80% der aufgenommenen Dosis wirken aktiv am Knochen und werden teilweise in neu gebildete Knochensubstanz eingebaut (Bartl 2011; Boivin et al. 2010).

Der physiologische Knochenumbau wurde bereits im Abschnitt 1.2.4 detailliert beschrieben. Die komplizierte Interaktion der verschiedenen Zellen und Komponenten erschwert ein Eingreifen in dieses zarte Gleichgewicht. Osteoklasten

sezernieren zum einen Faktoren, die Osteoblasten stimulieren, sodass die Gabe antiresorptiver Medikamente gleichzeitig die Neuformation von Knochen inhibiert. Da Osteoblasten umgekehrt ebenfalls die Osteoklasten aktivieren, wird durch osteoanabole Präparate, die mittels Aktivierung der Osteoblasten den Knochenaufbau fördern sollen, gleichzeitig durch Osteoklastenaktivierung die Resorptionsrate erhöht. Eine Steigerung der BMD ist demnach nur möglich, wenn Resorptions- und Formationsvorgänge entkoppelt sind. In diesem „anabolen Fenster“ wirkt SR mit seinem dualen Wirkmechanismus gleichzeitig osteoanabol und antiresorptiv (Bartl 2011; Cianferotti et al. 2013). Dies geschieht über die Aktivierung von Kation-sensing-Rezeptoren. Eine vermehrte OPG-Expression und eine gleichzeitig verminderte Expression von RANKL führt, über eine gesteigerte Präosteoblasten-replikation und Kollagensynthese, zu einer erhöhten Produktion von Knochenmatrix. Zugleich sinkt durch Inhibierung der Osteoklastendifferenzierung die Resorptionsaktivität im Knochen (Bartl 2011). Im Ergebnis zeigt sich ein erhöhter Kortikalisdurchmesser sowie eine verbesserte trabekuläre wie auch kortikale Mikroarchitektur. Das heißt, es wird eine verbesserte Knochenstärke und -qualität erreicht, während der Heterogenitätsindex, also das Verhältnis von primärer zu sekundärer Mineralisation, auch unter Langzeittherapie erhalten bleibt (Boivin et al. 2010; Cianferotti et al. 2013).

Die klinische Wirksamkeit bezüglich der Reduktion des Frakturrisikos wurde in den beiden Phase III Studien SOTI (Spinal Osteoporosis Therapeutic Intervention) und TROPOS (Treatment of Peripheral Osteoporosis) zunächst über einen Zeitraum von 5 Jahren untersucht. Dort zeigte sich drei Jahre nach Therapiebeginn eine Reduktion des relativen Risikos für neue vertebrale Frakturen um 41% (Meunier et al. 2004). Das relative Risiko extravertebraler Frakturen sank innerhalb von drei Jahren nach Therapiebeginn um 16%. In der Hochrisikogruppe (Frauen  $\geq 74$  Jahre, T-Score  $< -3$ ) wurde eine Risikoreduktion für Hüftfrakturen um 36% belegt (Reginster et al. 2005). Auch die open-label Erweiterung der Studien auf 10 Jahre erwies eine dauerhafte Erhöhung der BMD und Reduktion des relativen Frakturrisikos bei guter Verträglichkeit und hoher Compliance (Cianferotti et al. 2013).

Günstige Auswirkungen einer SR-Therapie auf die Frakturheilung scheinen nur bei gestörter, nicht aber bei physiologisch ablaufender Frakturheilung zu bestehen (Jørgensen und Schwarz 2011). Während Brüel et al. keinen Einfluss von SR auf die mechanischen Eigenschaften der diaphysär frakturierten Tibiae ihrer nicht-ovariektomierten Ratten nachweisen konnten, beobachteten Li et al., Ozturan et al. und Habermann et al. bei ihren ovariektomierten Ratten eine deutlich fortgeschrittenere Frakturheilung unter SR-Therapie als in der Kontrollgruppe. Dies äußerte sich vor allem in einer erhöhten BMD im Frakturgebiet, deutlich erhöhter mechanischer Belastbarkeit sowie einer qualitativ hochwertigeren trabekulären Architektur und einem höheren Anteil an Lamellenknochen (Brüel et al. 2011;

Habermann et al. 2010; YF Li et al. 2010; Ozturan et al. 2011). Auch Komrakova et al. konnten zuletzt einen positiven Effekt von SR auf die Heilung pathologischer Frakturen nachweisen. Hierbei zeigte sich vor allem bei einer Applikation von SR sowohl vor als auch nach Frakturierung eine erhöhte BMD von Kortikalis und gesamten Knochen, eine höhere Kallusdichte sowie eine frühere knöcherne Überbrückung des Frakturspaltes, als in den Kontrollgruppen (Komrakova et al. 2015). Zwar liegen bislang keine klinischen Studien zur Frakturheilung unter SR vor, Fallberichten zufolge ist aber ein positiver Einfluss auf das Zusammenwachsen der Knochenfragmente pathologischer Frakturen selbst bei Bestehen einer Pseudarthrose 20 Monate nach Fraktur zu beobachten (Alegre et al. 2012; Negri und Spivacow 2012).

Auf Rat des PRAC (Pharmacovigilance Risk Assessment Committee) beschränkte das CHMP (Committee for Medical Products for Human Use) im Jahr 2014 die Zulassung von SR wegen kardiovaskulärer Nebenwirkungen. Es soll zukünftig nur noch bei hohem Frakturrisiko angewandt werden, sofern keine alternative Therapie möglich ist. Dennoch spielt SR weiterhin eine Rolle in der Behandlung der Osteoporose (Komrakova et al. 2015).

#### 1.3.7.2.6 *Parathormon*

Im Gegensatz zu antiresorptiven Substanzen, welche über die Inhibition osteoklastenvermittelter Resorption zwar eine positive Knochenbilanz erreichen, jedoch zu keiner Knochenneubildung führen, wird durch osteoanabole Substanzen eine osteoblastenvermittelte Neuf ormation von Knochen erreicht (Augustine und Horwitz 2013). Dies geschieht entweder direkt durch die Verlängerung der Lebensdauer von Osteoblastengenerationen oder indirekt durch die Stimulation von skelettalen Wachstumsfaktoren (z.B. IGF-I) oder die Hemmung von Wachstumsfaktorantagonisten, z.B. Sklerostin, (Canalis et al. 2007; Dempster et al. 1993).

Derzeit sind in Europa zwei osteoanabole Substanzen zur Behandlung der Osteoporose zugelassen: das Parathormonfragment Teriparatid (PTH 1-34) sowie vollständig rekombinantes Parathormon (PTH 1-84). Die Anwendung ist auf einen Zeitraum von 18 Monaten beschränkt, da über die sichere Gabe der Präparate über die Dauer von zwei Jahren hinaus keine Studiendaten vorliegen (Augustine und Horwitz 2013). Die Sorge um das gesteigerte Risiko von Osteosarkomen unter PTH-Therapie konnte bisher weder widerlegt noch bestätigt werden, sodass die Präparate für die Therapie von Kindern und Patienten mit Morbus Paget, ossären Metastasen, malignen skelettalen Veränderungen oder nach einer Bestrahlung von Skelettanteilen nicht zugelassen sind (Canalis et al. 2007).

Das Parathormon, ein natürliches, von der Nebenschilddrüse sezerniertes Hormon, bewirkt über den PTH-1-Rezeptor eine Erhöhung des Serumkalziums (Canalis et al.

2007). Es erhöht die renale Rückresorption und über die vermehrte Ausschüttung von Kalzitronin auch die intestinale Resorption von Kalzium. Außerdem wird durch eine Erhöhung der Knochenumbaurate Kalzium aus dem Knochen freigesetzt (Bartl 2011; Hodsman et al. 2005). Dementsprechend wirkt die kontinuierliche Sekretion von Parathormon osteokatabol. Bei intermittierender Gabe jedoch wird eine osteoanabole Wirkung erzielt. Zwar erhöht sich auch hier die Remodeling-Rate, allerdings wird in den einzelnen BMUs vermehrt neue Knochenmasse produziert und abgelagert. Der genaue Mechanismus ist bisher nicht ausreichend verstanden, es wird vermutet, dass die bone-lining-cells vermehrt aktiviert werden. Ebenso unklar ist, wieso durch die intermittierende Gabe von PTH eine so gegensätzliche Wirkung zur kontinuierlichen Gabe erzielt wird. Erwiesen ist jedoch eine Zunahme von Knochenmasse, Trabekelstärke und -vernetzung sowie der Kortikalisdicke. Auch eine Zunahme der Knochengröße konnte beobachtet werden – ein physiologischer Altersprozess zum Ausgleich des Knochenmasseverlustes, der durch PTH beschleunigt zu werden scheint (Hodsman et al. 2005).

Klinisch wirkt sich dies positiv auf das relative Risiko vertebraler sowie extravertebraler Frakturen aus. Im Rahmen der Phase III Studie von Neer et al. erhielten 1637 postmenopausale Frauen mit vorausgegangenen vertebralem Frakturen entweder täglich 20µg Teriparatid, 40µg Teriparatid oder einen Placebo subkutan über 21 Monate. Die Inzidenz vertebraler Frakturen reduzierte sich in dieser Zeit um 65%, die extravertebraler Frakturen um 59%. Über DXA wurde außerdem eine Zunahme der Knochendichte vertebral um 8-9% sowie femoral um 3% gemessen (Canalis et al. 2007; Neer et al. 2001). Zu bedenken ist, dass die DXA möglicherweise den Zuwachs an Knochenmasse unterschätzt, da sich durch die erhöhte Remodeling-Rate der Heterogenitätsindex zu Lasten der sekundären Mineralisierung verschiebt und so neu gebildetes Gewebe weniger stark mineralisiert wird (Hodsman et al. 2005). Die höhere Dosis erzielte vergleichbare Ergebnisse, es wurden allerdings mehr Nebenwirkungen beschrieben. Insgesamt zeigte sich Teriparatid gut verträglich. Hyperkalzämien waren gering ausgeprägt und durch verminderte Substitution von Kalzium und Vitamin D leicht zu behandeln (Canalis et al. 2007). Die TOP-Studie (Treatment of Osteoporosis with Parathyroid Hormone) erzielte ebenfalls gute Ergebnisse unter der Therapie mit PTH (1-84). Die Inzidenz neuer Frakturen zeigte sich erniedrigt, die BMD stieg vertebral um 6,9%, an der gesamten Hüfte um 2,1% und am Schenkelhals um 2,5% (Greenspan et al. 2007).

Über die Wirkung von Teriparatid und PTH (1-84) auf die Frakturheilung ist bisher vergleichsweise wenig bekannt. Es wird vermutet, dass durch die oben genannten Vorgänge eine vermehrte Kallusformation und ein beschleunigter Umbau des Kallusgewebes erreicht wird (Nakajima et al. 2002). Andreassen et al. zeigten in einer Studie eine signifikante Steigerung der mechanischen Belastbarkeit am Frakturspalt sowie des Volumens und des Mineralgehaltes des Kallus unter der intermittierenden

Gabe von PTH (1-34) (60 µg/kg/Tag bzw. 200 µg/kg/Tag) nach 20 und 40 Tagen. Sie verwendeten dafür ein diaphysäres Tibiaosteotomiemodell der Ratte (Andreassen et al. 1999). Tsiridis et al. erforschten die Wirkung von PTH (1-34) an einem metaphysären Tibiaosteotomiemodell des Hasen und beschrieben eine beschleunigte Frakturheilung sowie einen um 30% erhöhten Mineralgehalt des Kallus unter der täglichen Gabe von 10 µg/kg für 28 Tage nach Osteotomie (Tsiridis et al. 2007). Den Einfluss von PTH (1-84) (100 µg/kg/Woche über 4 Wochen) auf die gestörte Frakturheilung spongiöser Knochenanteile zeigten Nozaka et al. am methaphysären Tibiaosteotomiemodell ovariektomierter und gesunder Ratten. In beiden Gruppen wurde eine erhöhte Verknüpfung und ein vermehrtes Volumen spongiösen Knochens festgestellt (Nozaka et al. 2008). Diese Ergebnisse lassen einen positiven Effekt von PTH (1-34) und PTH (1-84) auf die normale und gestörte Frakturheilung kortikalen und spongiösen Knochens vermuten. Bisher wurde jedoch nur eine klinische Studie zu dieser Fragestellung veröffentlicht. Darin erhielten postmenopausale Frauen eine Woche nach Auftreten einer distalen Radiusfraktur für acht Wochen entweder 20 µg Teriparatid, 40µ Teriparatid oder ein Placebo. Die besten Ergebnisse erzielte die Gruppe mit der niedrigeren Teriparatiddosis, in der eine signifikant verkürzte Heilungsdauer (7,4 Wochen bis zum Bridging vs. 9,1 Wochen in der Placebogruppe und 8,8 Wochen unter der höheren Dosis Teriparatid) nachgewiesen werden konnte (Aspenberg et al. 2010). Die gegenüber der Behandlung mit 20 µg Teriparatid verlängerte Heilungsdauer unter der höheren Dosis könnte mit dem von Neer et al. beschriebenen radialen BMD-Verlust unter PTH zusammenhängen (Aspenberg et al. 2010; Neer et al. 2001).

Insgesamt scheint PTH zwar einen deutlichen positiven Einfluss auf die Knochenheilung zu haben, die ideale Dosierung scheint allerdings von der empfohlenen Dosis zur Frakturprophylaxe abzuweichen. Bei der Frakturheilung spielen sowohl der Kochenaufbau als auch der Knochenumbau eine zentrale Rolle. Die gewünschte Wirkung besteht also nicht aus einer Entkopplung dieser beiden Vorgänge, sondern aus einer gekoppelten Steigerung beider Mechanismen (Ellegaard et al. 2010). Es bedarf entsprechend einer weiterführenden experimentellen und klinischen Erforschung von idealer Behandlungsdauer und Dosierung zur bestmöglichen Beeinflussung der Frakturheilung bei Osteoporose durch PTH.

#### 1.3.7.2.7 *Neue Präparate*

Derzeit werden verschiedene neue Substanzen zur Osteoporosetherapie erprobt. Darunter der RANKL-Antikörper Denosumab, Kathepsin-K- Inhibitoren wie Odanacatib, Integrin-Inhibitoren sowie der Sclerostin-Antikörper Romosozumab. Entsprechend dem Schwerpunkt dieser Arbeit soll darauf hier nicht näher eingegangen werden.

### 1.3.7.3 Ganzkörpervibration

Es ist bekannt, dass Bewegung einen großen Einfluss auf den Umbau des Knochens und seine statische Anpassung an Belastungen hat, auch wenn die genauen Mechanismen bisher nur teilweise geklärt sind. Dementsprechend stellt Immobilität ein großes Problem in der Behandlung von Osteoporose und dadurch bedingten pathologischen Frakturen dar, da sie mit einem Verlust an Knochensubstanz sowie Muskelmasse einhergeht. Körperliche Aktivität erfordert allerdings ein hohes Maß an Compliance und birgt die Gefahr von Stürzen und daraus folgenden Frakturen (Stürmer et al. 2010a; Verschueren et al. 2004).

Die Ganzkörpervibration (Whole-Body-Vibration, WBV) ist ein Versuch, dem Knochen einen Reiz zu bieten, der Umbaumechanismen und damit eine Verbesserung der Knochenarchitektur fördert sowie durch eine Aktivierung des Bewegungsapparates einer Muskelatrophie vorzubeugen. Zwar konnten verschiedene Studien sowohl beim Tier als auch beim Menschen einen positiven Effekt von Vibration auf das muskuloskeletale System nachweisen, die Ergebnisse bezüglich der idealen Behandlungsdauer, Vibrationsfrequenz und -amplitude sind allerdings nicht eindeutig (Judex et al. 2007; Rubin et al. 2004; Sehmisch et al. 2009; Stürmer et al. 2010a). Auch ein positiver Einfluss von WBV auf die Frakturheilung konnte nachgewiesen werden. Unter einer Vibrationstherapie von 70 Hz bei einer Amplitude von 0,4 mm in Kombination mit Estradiol und Raloxifen zeigte sich eine höhere mechanische Belastbarkeit, endostale Knochenformation sowie trabekuläre Dichte als bei alleiniger Therapie durch Estradiol mit Raloxifen oder WBV (Stürmer et al. 2014). Stärkere Vibration (90 Hz, 0,5 mm) resultierte hingegen in einer verminderten mechanischen Belastbarkeit. Während bei ovariectomierten Versuchstieren eine frühere Kallusbildung und höhere kortikale sowie trabekuläre Dichte beobachtet wurde, zeigte sich die Kallusbildung bei nicht-ovariectomierten Tieren verzögert (Stürmer et al. 2010a). Im direkten Vergleich von WBV bei 35 Hz und 45 Hz ließ sich ein osteoanaboler Effekt nur durch Vibration bei 35 Hz, nicht jedoch bei 45 Hz nachweisen. Ein positiver Einfluss auf die Frakturheilung konnte nicht beobachtet werden, durch Vibration bei 45 Hz zeigten sich Knochenformation und mechanische Belastbarkeit des Kallus sogar vermindert (Wehrle et al. 2014). Es wird deutlich, dass das ideale Vibrationsregime zur Frakturprophylaxe sich von dem zur Verbesserung der Frakturheilung unterscheidet. Zur Ermittlung des jeweils idealen Vibrationsregimes, auch in Kombination mit medikamentöser Therapie, werden weiterführende experimentelle Studien benötigt.

## **1.4 Frakturen**

### **1.4.1 Definition**

Wird die Kontinuität des Knochengewebes unterbrochen, entsteht eine Fraktur. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Durch direkte oder indirekte Gewalteinwirkung können traumatische Frakturen entstehen. Eine Sonderform stellt die Ermüdungsfraktur dar. Sie resultiert aus zahlreichen Mikrotraumata durch andauernde Überlastung des Knochens, die im Zuge der Knochenheilung und des Umbaus nicht adäquat repariert werden konnten. Entsteht eine Fraktur spontan, ohne adäquates Trauma, bezeichnet man die Fraktur als pathologisch. Ursächlich ist hier ein Stabilitätsverlust der Knochenmasse entweder durch lokale Faktoren wie Knochentumoren oder -metastasen, oder aber durch systemische Grunderkrankungen wie Osteoporose oder Osteomalazie, wobei Osteoporose die häufigste Ursache von Spontanfrakturen darstellt (Bartl 2011).

### **1.4.2 Osteoporotische Frakturen**

Hauptursache des erhöhten Frakturrisikos bei Osteoporose ist nicht nur die verminderte Knochendichte, sondern in erster Linie die verminderte Knochenqualität. Durch die alltägliche körperliche Belastung entstehen im Knochen Mikrofrakturen, die durch die verminderte osteoblastische Aktivität nicht ausreichend repariert werden können. Begünstigt durch die Hochregulation der Osteoklastenaktivität, werden die dadurch entstehenden freistehenden Knochenbälkchen abgebaut, bevor sie wieder Anschluss an Knotenpunkte des Knochengewebes finden können. Die mechanische Belastbarkeit des Knochens nimmt ab und es können pathologische Frakturen entstehen. So kann es selbst bei normaler Knochendichte durch die Zerstörung der Binnenstruktur zu Frakturen kommen (Bartl 2011).

Die häufigsten osteoporotisch bedingten Frakturen sind Wirbelfrakturen und metaphysäre Frakturen der langen Röhrenknochen Femur, Humerus und Radius, da dort der Spongiosaanteil relativ zur Kortikalis hoch ist. Bei der postmenopausalen Osteoporose dominieren durch den Verlust spongiösen Knochens vor allem Wirbelkörper- und Radiusfrakturen, während die senile Osteoporose in erster Linie durch kortikale Schäden hüftnahe Frakturen verursacht (Alonso-Bouzon und Duque 2011).

Wirbelkörperfrakturen gehen mit einer über 20%igen Höhenminderung im Verlauf, bei einem absoluten Höhenverlust über 4mm, einher (Bartl 2011). Die betroffenen Wirbel sind deformiert, es entstehen typische Formen wie Fischwirbel bei Grund- und Deckenplattendehformierung, bevorzugt im Lendenbereich, Keilwirbel bei Vorderwanddeformierung vor allem der Brustwirbelsäule oder „Pancake“-Wirbel bei Kompressionsdeformierung (Bartl 2011). Proximale Femurfrakturen sind

insbesondere ab einem Alter von 65 Jahren die häufigste Frakturart. Zumeist sind sie medial am Schenkelhals oder pertrochantär gelegen, seltener subtrochantär. Ebenso wie proximale Femurfrakturen entstehen auch distale Radiusfrakturen meist durch ein Sturztrauma.

### **1.4.3 Frakturheilung**

Durch die Frakturheilung soll die Integrität des Knochengewebes wiederhergestellt werden. Man unterscheidet eine primäre und eine sekundäre Form, wobei die sekundäre der natürlichen Frakturheilung entspricht.

Durch die Fraktur werden im gut durchbluteten Knochengewebe unter anderem auch Blutgefäße verletzt, sodass ein Hämatom entsteht. Nach einer Entzündungsphase mit Makrophagen- und Granulozytenmigration beginnt die sekundäre Frakturheilung mit dem Umbau dieses Hämatoms zu Granulationsgewebe, welches hauptsächlich aus neu einsprießenden Gefäßen und straffem Bindegewebe besteht. Stammzellen, vor allem aus dem periostalen Bereich, proliferieren und differenzieren zu Fibro-, Chondro- und Osteoblasten. Während Osteoklasten totes Knochengewebe im Frakturbereich abräumen, wird zur Stabilisierung der Frakturteile von Fibroblasten, Chondroblasten und Osteoblasten ein fibrocartilaginärer Kallus gebildet. Diese narbige Verbindung wird sowohl vom Periost aus als auch von innen heraus durch enchondrale Ossifikation zu Geflechtknochen umorganisiert. Dieser wiederum wird im Laufe der Zeit zu stabilem Lamellenknochen umgebaut und die ursprüngliche trajektoriale Knochenstruktur wiederhergestellt. Das im Überschuss gebildete Gewebe wird von Osteoklasten resorbiert (Lüllmann-Rauch 2006).

Die primäre Frakturheilung umgeht die Bildung eines knöchernen Kallus. Hier entsteht direkt Lamellenknochen, wenn auch die Lamellen vorerst quer zur Längsachse angeordnet sind. Über die Monate werden sie durch längs verlaufende Lamellen ersetzt. Allerdings ist eine primäre Frakturheilung nur möglich, wenn die Frakturrenden stabil fixiert und im Abstand von unter 1 mm adaptiert sind. Dies ist nur durch operative Osteosynthese zu erreichen.

Eine Schwierigkeit der Osteosynthese besteht in der absoluten Ruhigstellung der Fraktur, denn sobald die Frakturrenden in Bewegung geraten, entsteht ein Kallus und die sekundäre Frakturheilung beginnt. Besonders diffizil gestaltet sich dies häufig bei pathologischen Frakturen (z.B. bei Osteoporose). Hier besteht der Defekt nicht nur in der Fraktur, sondern auch in der veränderten Knochenmasse, sodass z.B. Schrauben nicht den nötigen Halt finden, um die Frakturrenden, Platten oder Nägel den gegebenen Anforderungen entsprechend zu fixieren. So kommt es vor, dass Osteosynthesen oder Prothesen sich postoperativ lockern und revidiert werden müssen. Zusätzlich kann sich die Knochenheilung gegebenenfalls verzögern, wodurch das Entstehen von Pseudarthrosen begünstigt wird.

#### **1.4.4 Frakturheilung bei Osteoporose**

Die Frage, ob Osteoporose tatsächlich Einfluss auf die Frakturheilung nimmt, konnte bis heute nicht eindeutig beantwortet werden. Zwar konnte in klinischen Studien eine verzögerte Frakturheilung nachgewiesen werden (He et al. 2011; Meyer et al. 2001; Oliver et al. 2013), es ist jedoch nicht möglich, dies eindeutig der osteoporotischen Veränderung zuzuschreiben, da bei älteren, multimorbiden Patienten meist zusätzliche Faktoren wie das Alter, Stoffwechselerkrankungen (z.B. der Schilddrüse und der Nebenschilddrüse, Diabetes mellitus) sowie Malnutrition eine nicht unwesentliche Rolle spielen. Um Einflüsse dieser Art zu minimieren wurden tierexperimentelle Studien durchgeführt, deren Ergebnisse jedoch keine befriedigenden Antworten lieferten, insbesondere was Ursache und Zeitpunkt der gestörten Knochenheilung betrifft (McCann et al. 2008). In einigen Studien konnte eine verminderte Knochenmasse sowie ein verzögerter Heilungsprozess v.a. in der mittleren bis späten Heilungsphase nachgewiesen werden (Hao et al. 2007). Es zeigten sich eine gestörte Kallusbildung, eine verzögerte enchondrale Ossifikation sowie eine fehlerhafte Mikroarchitektur des neuen Gewebes. Die Mineralisation des Kallus war verzögert, woraus eine reduzierte Knochenqualität resultierte. Es wird vermutet, dass die gesteigerte Umbaurate osteoporotischer Knochen und die damit verbundene erhöhte Resorption der Knochenmatrix ursächlich für die verminderte Qualität und die verzögerte Heilung sind (Hao et al. 2007).

#### **1.5 Die ovariectomierte Ratte**

Der durch Hormonmangel induzierte Verlust an Knochenmasse, wie er bei der postmenopausalen Osteoporose beobachtet wird, ist weitgehend vergleichbar mit der durch Ovariectomie induzierten Osteopenie bei Ratten (Kalu 1991). Die ovariectomierte Ratte ist demnach ein in der Erforschung der postmenopausalen Osteoporose etabliertes Modell.

Eine Gradeinteilung des Knochenschwundes anhand des T-Scores und damit eine Unterscheidung von Osteopenie und Osteoporose ist im Tiermodell nicht sinnvoll, da hier die Referenzgruppe zur Festlegung eines Normwertes fehlt. Die ossären Strukturveränderungen der Ratte nach Ovariectomie werden in dieser Arbeit als Osteopenie beschrieben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchsaufbau

Die Genehmigung des Tierversuches erfolgte nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Tierschutzantrag: G854.12). Die Leitung hatte PD Dr. med. Stephan Sehmisch. Der Versuch erstreckte sich über insgesamt 101 Tage. Zu Versuchsbeginn wurde der Bestand aus 88 drei Monate alten, weiblichen Ratten des Stammes Sprague-Dawley in sieben Gruppen eingeteilt (vergl. Tabelle 2). Jede Gruppe bestand aus jeweils zwölf Tieren in den zwei Kontrollgruppen und 13 Tieren in Gruppen, die eine wirkstoffhaltige Therapie erhielten. Durch den Verlust einzelner Versuchstiere infolge operativer Intervention verringerten sich die Gruppengrößen im Verlauf, ohne das Signifikanzniveau zu gefährden.

76 der 88 Versuchstiere erhielten initial zur Induktion einer Osteoporose eine Ovariectomie. Die zwölf Tiere der ersten Kontrollgruppe wurden nicht ovariectomiert. Nach 55 Tagen erfolgte bei allen Versuchstieren eine beidseitige proximal metaphysäre Osteotomie der Tibia, die durch eine Plattenosteosynthese versorgt wurde. Weitere 46 Tage später folgten die Obduktion der Versuchstiere sowie die Präparation der Tibiae. Hierbei wurde der Erfolg der Ovariectomie anhand der Uterusgröße bei allen ovariectomierten Tieren kontrolliert und bestätigt. Die Tibiae wurden vollständig freipräpariert und gesäubert, Platten und Schrauben wurden entfernt.

Über die Gesamtdauer des Versuchs, erhielten alle Tiere ausschließlich sojafreies Futter. Die Nahrungsaufnahme und das Gewicht der Versuchstiere wurden wöchentlich dokumentiert.

In den sechs Wochen nach Osteotomie erhielten die Tiere entsprechend der Gruppeneinteilung eine antiosteoporotische Therapie. Die Kontrollgruppe NON-OVX, bestehend aus nicht-ovariectomierten Tieren, erhielt keine Therapie. Die Tiere der Kontrollgruppe OVX wurden zwar ovariectomiert, erhielten aber ebenso keine Therapie. Die Gruppe OVX+VIB erhielt ab dem fünften Tag nach Osteotomie eine WBV. Diese erfolgte nach einem festen Schema zweimal täglich für jeweils 15 Minuten bei 70 Hz vertikaler Vibration mit einer Amplitude von 0,5 mm. Die Gruppe SR erhielt ab Osteotomie 600-625 mg/kgKG/Tag SR als Futterzusatz, während die Gruppe SR+VIB zusätzlich zu SR ebenfalls eine WBV erhielt. Den Tieren der Gruppe PTH wurde ab Osteotomie fünfmal pro Woche 40 µg/kgKG des rekombinanten PTH-Fragments Teriparatid subkutan injiziert. Die Gruppe PTH+VIB wurde entsprechend zusätzlich einer WBV unterzogen.

Außerdem erhielten alle Gruppen im Rahmen der polychromen Sequenzmarkierung vier verschiedene Fluorochrominjektionen, um später den zeitlichen Verlauf von Frakturheilung sowie Knochenauf- und -umbau nachvollziehen zu können (vergl. Abschnitt 2.10.2, Tabelle 12).

Nach Präparation und Reinigung der Tibiae wurden diese biomechanisch und morphologische untersucht.

**Tabelle 2: Bezeichnung und Behandlung der Versuchsgruppen.**

Nr.	Bezeichnung	Behandlung
1	NON-OVX	Osteotomie
2	OVX	Ovariectomie und Osteotomie
3	OVX+VIB	Ovariectomie, Osteotomie und WBV
4	SR	Ovariectomie, Osteotomie und SR
5	SR+VIB	Ovariectomie, Osteotomie, SR und WBV
6	PTH	Ovariectomie, Osteotomie und PTH (1-34)
7	PTH+VIB	Ovariectomie, Osteotomie, PTH (1-34) und WBV

## 2.2 Versuchstiere und Tierhaltung

Bei den Versuchstieren handelte es sich um ausschließlich weibliche Ratten der Rasse Sprague-Dawley (Zuchtanstalt Fa. Winkelmann, Borken, Deutschland). Die Tiere waren zu Versuchsbeginn drei Monate alt und hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 234 g. Die Tiere wurden in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen gehalten. Jeweils vier bis fünf Tiere wurden in einem Makrolon® Käfig Typ IV gehalten, welcher wöchentlich gereinigt wurde. Die Raumtemperatur betrug 20°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55%. Ein Tag-Nacht Rhythmus wurde durch eine Zeitschaltung des Raumlichtes simuliert. Wasser sowie sojafreies Futter standen den Tieren stets zur Verfügung. Durch wöchentliches Wiegen des Restfutters ließ sich die durchschnittliche Nahrungsaufnahme pro Tier ermitteln. Nach dem Wiegen wurde das Futter stets auf das Ausgangsgewicht von 1500 g aufgefüllt. Zusätzlich wurde wöchentlich das Körpergewicht der Ratten dokumentiert. Die Gruppen SR und SR+VIB erhielten sojafreies Futter mit einem Zusatz von 10,52 g SR pro kg Futter, woraus sich anhand der durchschnittlichen Nahrungsaufnahme der Tiere eine mittlere tägliche Aufnahme von 612 mg SR pro kg Körpergewicht ergab. Die Tiere der Gruppen PTH und PTH+VIB erhielten von Montag bis Freitag einmal täglich eine subkutane Injektion von 40 µg Teriparatid pro kg Körpergewicht. Die Gruppen

OVX+VIB, SR+VIB und PTH+VIB wurden zweimal täglich zur selben Uhrzeit für jeweils 15 Minuten nach dem festgelegten Vibrationsschema behandelt.

Der Tierbestand zählte zu Beginn 88 Ratten. Während Ovariectomie und Osteotomie verstarben insgesamt 12 Ratten, sodass der Versuch mit 76 Ratten fortgeführt wurde. Bei der Präparation der Knochen sowie beim biomechanischen Test wurde jeweils eine Tibia beschädigt. Für die biomechanischen und morphologischen Tests standen demnach letztendlich 74 Tibiae zur Verfügung (vergl. Tabelle 3).

**Tabelle 3: Gruppengrößen zum Zeitpunkt der Auswertung.**

<b>Gruppe</b>	<b>Anzahl der Tiere pro Gruppe bei Auswertung</b>
NON-OVX	9
OVX	10
OVX+VIB	11
SR	11
SR+VIB	11
PTH	11
PTH+VIB	11

### **2.3 Ovariectomie**

Dem zur Erforschung der postmenopausalen Osteoporose etablierten Modell der ovariectomierten Ratte folgend wurden 76 Versuchstiere, mit Ausnahme der Kontrollgruppe NON-OVX, zu Versuchsbeginn ovariectomiert.

Um die intraperitoneale Injektion der Narkose zu erleichtern, wurden die Ratten mit CO<sub>2</sub> sediert. Erst dann wurde die Narkose, bestehend aus 0,3 ml eines Gemisches aus Ketamin (115 mg/kgKG) und Xylazin (8 mg/kgKG), injiziert. Nach dem Wiegen erhielt jede Ratte zur Identifizierung einen Transponder (Uno Micro-Id-System, Iso-Transponder, 12 mm, UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Niederlande), der in das subkutane Gewebe im Nackenbereich eingesetzt wurde. In Vorbereitung der Operation erfolgte die Rasur der Ratten vom Rippenbogen bis zu den Hinterläufen und diesubkutane Injektion einer prophylaktischen Antibiose mit Enrofloxacin (Baytril 2,5 %®, Fa. Bayer, Leverkusen, 5 mg/kg KG) sowie das Auftragen eines Gels zum Schutz der Augen vor dem Austrocknen während der Narkose.

Nach Hautdesinfektion wurde in Seitenlage mittels Schere im Winkel zwischen Wirbelsäule und Rippenbogen die Haut inzidiert. Die weitere Präparation erfolgte teils stumpf, teils scharf, durch das subkutane Bindegewebe und die Muskulatur, bis zur Spaltung des Peritoneums und damit der Eröffnung der Bauchhöhle. Mit der

Pinzette ließ sich das Ovar mit dem ihm umgebenden Fettgewebe leicht identifizieren und externalisieren. Nach Abklemmen der Tuba uterina und der versorgenden Gefäße wurden diese mittels Fadenligatur abgesetzt und das Ovar scharf abgetrennt. Dabei war besonders auf eine vollständige Entfernung des Ovarialgewebes zu achten, da bereits geringe Mengen Restgewebe den Erfolg der Operation gefährden konnten. Ob eine restlose Entfernung der Ovarien gelungen war, ließ sich nach Versuchsende anhand des Gewichtes des Uterus beurteilen, welcher unter Estrogenmangel zunehmend atrophiert. Uterus und Tube wurden in die Bauchhöhle reponiert und diese durch eine Muskelnahrt mit 4.0 Vicrylfäden (Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Der Hautverschluss erfolgte durch Klammern (Michel wound brackets 7,5 x 1,75 mm, Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Nach erneuter Desinfektion mit Braunol-Lösung wurde der Vorgang entsprechend kontralateral wiederholt.

Zur Schmerzstillung und um eine ausreichenden Hydratisierung der Tiere sicherzustellen, erhielten diese 0,25 ml Rimadyl (4 mg/kg KG, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) sowie 3 ml 0,9% NaCl subkutan. In beheizten Käfigen wurden sie bis zum Erwachen beobachtet. Während der Ovariectomie verstarben zwei Versuchstiere, der Versuch wurde mit 86 Ratten fortgeführt.

## **2.4 Osteotomie und Osteosynthese**

55 Tage nach Induktion der Osteoporose erfolgte bei allen Gruppen die metaphysäre Osteotomie mit Osteosynthese. Dem Vorgehen bei der Ovariectomie entsprechend, wurden die Ratten mit CO<sub>2</sub> sediert und durch intraperitoneale Injektion von 0,3 ml Ketamin/Xylazin narkotisiert. Zur weiteren Vorbereitung wurden ein Gel zum Schutz der Augen aufgetragen, eine prophylaktische Antibiose verabreicht (Enrofloxacin, Baytril 2,5 %®, Fa. Bayer, Leverkusen, 5 mg/kgKG) und die Hinterläufe ventralseitig rasiert und desinfiziert.

Nach vertikaler Inzision der Haut über dem Knie mittels Skalpell erfolgte die scharfe, jedoch schonende, Präparation von Muskeln und Faszien zur Freilegung der ventralen Fläche der Tibia. Als Landmarke zur Orientierung diente der Gelenkspalt zwischen Femur und Tibia. Über der Metaphyse, ca. 2-3 mm unterhalb des Gelenkspaltes der Tibia wurde eine 5-Loch-Leibinger-Platte aus Titan (57-05140 XS-Titanfixationsplatte T-Form 90°, Stryker Trauma, Selzach, Schweiz) aufgelegt und die Kanäle für die Titanschrauben vorgebohrt. Entsprechend der lokalen Knochenstärke wurden proximal zwei 6-7 mm lange Schrauben verwendet, distal wurden abhängig von den gegebenen Stabilitätsverhältnissen zwei 3-4 mm lange Schrauben eingebracht. Dies ermöglichte eine genaue Reposition der Frakturhälften nach Osteotomie. Das Osteosynthesematerial wurde vorläufig entfernt und die Tibia mithilfe von gepulstem Ultraschall (OT 7 Piezosurgery®, Mectron Medical

Technology, Carasco, Italien) ca. 4-5 mm unterhalb des Gelenkspaltes, mittig zwischen den proximalen und distalen Bohrlöchern, unter Schonung von Fibula und umliegendem Gewebe vollständig durchtrennt. Die so entstandenen Frakturhälften wurden durch Wiederanbringen der Platte in der vorher gewählten Position exakt reponiert und mittels Schrauben fixiert. Der verbleibende Osteotomiespalt entsprach mit 0,5 mm der Dicke des verwendeten OT 7 Piezosurgery®-Sägeblattes. Durch eine Muskelnahrt mit Vicryl 4.0 Fäden (Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) wurde die Muskulatur readaptiert und die Haut mit Klammern (Michel wound brackets 7,5 x 1,75 mm, Gebrüder Martin GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) verschlossen. Nach Desinfektion (Braunovidon®, Bayer, Leverkusen) wurde am anderen Bein entsprechend verfahren.

Wie schon bei der Ovariectomie erhielten die Tiere 3 ml 0,9% NaCl und 0,25 ml Rimadyl (4 mg/kgKG, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) sowie zusätzlich Decentan (5 mg/kgKG, Merck, Darmstadt, Deutschland) subkutan und wurden in Wärmekäfigen bis zum Erwachen beobachtet. Am ersten und zweiten postoperativen Tag erhielten die Ratten zur Schmerzstillung zweimal täglich Rimadyl in vorheriger Dosierung.

Die stabile Plattenosteosynthese erwies sich vor allem bei den ovariectomierten Tieren häufig als Herausforderung, da die durch Osteoporose verminderte Knochenmasse den Schrauben nicht den erforderlichen Halt bot. In diesem Fall wurden in der Regel längere Schrauben in die distalen Bohrlöcher der T-Platte eingebracht, um die für die primäre Frakturheilung benötigte Stabilität zu gewährleisten.

## **2.5 Ganzkörpervibration**

Am fünften Tag nach Osteotomie begann die WBV von insgesamt 38 Tieren (OVX+VIB, SR+VIB und PTH+VIB). In vorangegangenen Studien zur WBV bei Frakturheilung konnte ein positiver Effekt der vertikalen Vibration auf die Dichte von Kortikalis und Kallus sowie die Kallusgröße nachgewiesen werden (Komrakova et al. 2013; Trautmann 2014). Daher wurde für diesen Versuch eine vertikale Vibration bei 70 Hz mit einer Amplitude von 0,5 mm gewählt. Vibriert wurde zweimal täglich zur selben Zeit für jeweils 15 Minuten. Jeweils sechs bis sieben Ratten wurden dafür gleichzeitig in einen gepolsterten Vibrationskäfig gesetzt, der auf einem Vibriertisch angebracht war (Vibriertisch VTG, Drehstrom-Vibrationsmotoren HVL/HVE Vibra Schultheis, Offenbach). Die Ratten konnten sich in dem Käfig frei bewegen, es wurde jedoch darauf geachtet, dass alle Ratten während der Vibration durchgehend Bodenkontakt hatten.

## **2.6 Obduktion und Präparation**

14 Wochen nach der Ovariectomie und sechs Wochen nach der Osteotomie erfolgte die Tötung der Versuchstiere durch Dekapitation. Bei der Kontrolle des Uterusgewichtes zeigte sich eine zufriedenstellende Uterusatrophie bei allen ovariectomierten Versuchstieren, sodass keines der Tiere vom Versuch ausgeschlossen werden musste. Die Tibiae wurden behutsam am Kniegelenk abgetrennt. Lediglich eine der beiden Tibiae wurde für diesen Versuch verwendet. Die Auswahl erfolgte randomisiert. Die jeweils gegenseitigen Tibiae wurden für Genuntersuchungen separat bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Für parallele Versuchsreihen erfolgte zudem die Präparation von Muskeln, Wirbelsäule und Femora der Versuchstiere. Die für diesen Versuch ausgewählten Tibiae wurden vorsichtig unter Schonung der Fibula zunächst nur von größerem Weichgewebe befreit und das Osteosynthesematerial entfernt. Später erfolgte die gründliche Säuberung der Knochen von jeglichen verbliebenen Weichgeweberesten. Die Tibiae wurden in den Zeiträumen bis zu Beginn der Tests sowie zwischen diesen in 5-ml Kunststoffröhrchen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und bei Bedarf aufgetaut.

## **2.7 Biomechanischer Test**

### **2.7.1 Prinzip**

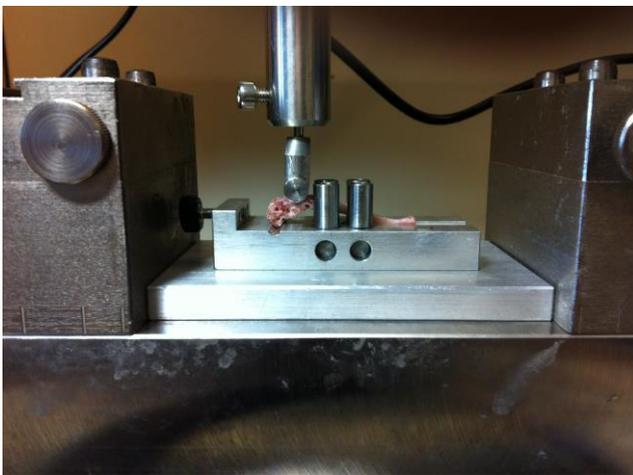
Zur Abbildung der Elastizität und Widerstandsfähigkeit des Kallus erfolgte die biomechanische Untersuchung mittels 3-Punkt-Biegetest. Hierbei wurde durch senkrechte Druckbelastung der vorderen Tibiakante und anhand von simultanen Messungen der Kraftübertragung [N] sowie der Deformation [mm] ein Profil der ossären Widerstandskraft und Elastizität in Form eines Kraft-Weg-Diagrammes erstellt. Die Elastizität [N/mm] ist bei diesem Test als die Steigung des linearen Kurvenverlaufs definiert. Die Streckgrenze [N] (Yield-load) beschreibt den Endpunkt der elastischen Deformation und damit den Übergang zur plastischen Deformation des Knochens (Komrakova et al. 2011).

### **2.7.2 Durchführung**

Vor Testbeginn wurden die Knochen aufgetaut und mit NaCl-Lösung befeuchtet, um ihrem Austrocknen vorzubeugen. Die Fibula wurde entfernt. Durchgeführt wurde der Test mithilfe einer Werkstoffprüfmaschine (Typ 145660 Z020/TND Zwick/Roell, Ulm, Deutschland), welche durch die Software "testXpert®" (Zwick/Roell, Ulm, Deutschland) gesteuert wurde. Für den Test eigens angefertigt wurden eine Aluminiumträgerplatte sowie ein Stempel zur Kraftübertragung. Die Trägerplatte war folgendermaßen konzipiert: Eine Quer- und eine Längsrille dienten zur Positionierung der Tibia. Dabei kamen die beiden Tibiakondylen in die Querrille zu

liegen, während die distale Tibiaepiphyse in der Längsrille stabilisiert wurde. Dies verhinderte ein Verrutschen des Knochens, gewährleistete jedoch eine Beweglichkeit in longitudinaler Ebene. Die laterale Beweglichkeit der Tibia wurde durch vier Schrauben vollständig unterbunden. Nach Einspannen der Tibia auf die Trägerplatte ließ sich der Knochen also bei erhaltener longitudinaler Beweglichkeit leicht herausheben, blieb aber in der lateralen Ebene stabil. Dabei lag der Knochen an drei Punkten auf: den beiden Tibiakondylen sowie der distalen Epiphyse. Nun erfolgte die Positionierung der Trägerplatte unter dem Stempel. Hierbei handelte es sich um einen Rollstempel mit zirkulärer Nut, in welche die ventrale Tibiakante zu liegen kommen sollte, um auch hier ein laterales Abgleiten zu verhindern und dabei longitudinal Bewegungen zuzulassen. Der Stempel lag ca. 2-3 mm distal des ehemaligen Osteotomiespaltes auf. Die Krafteinwirkung erfolgte senkrecht (Komrakova et al. 2013).

Der Stempel senkte sich nun mit einer Geschwindigkeit von 5 mm/min ab. Bei Erreichen einer Vorkraft von 1 N erfolgte eine erneute Lagekontrolle und gegebenenfalls eine Korrektur der Tibiaposition. Die testXpert® Software nahm im Intervall von jeweils 0,1 mm Absenkung eine Kraftmessung vor und stellte dies in einem Kraft-Weg-Diagramm dar. Bei einer Abweichung vom linearen Kurvenverlauf wurde der Test automatisch abgebrochen, sodass Frakturen vermieden wurden (Stürmer et al. 2014).



**Abbildung 1: Biomechanischer Test.**

### **2.7.3 Interpretation**

Durch den zunehmenden Stempeldruck kommt es zu einer reversiblen, elastischen Deformation des Knochens, vornehmlich durch die Dehnung kollagener Fasern. Als Korrelat zur Elastizität des Knochens zeigt sich eine lineare Steigung im Diagramm. Bei Erreichen der Streckgrenze (Yield-load), also der Kraft, die der Knochen maximal aufnehmen kann, ohne dass strukturelle Schäden entstehen, beginnt der Übergang in die plastische Deformation. Es entstehen irreversible Veränderungen in der

Knochenstruktur, die im Diagramm durch einen Steigungsabfall sichtbar werden. Die Kurve steigt weiter an bis die Maximalkraft erreicht ist. Danach kommt es durch Frakturierung zu einem raschen Abfall der Kurve. Um eine Frakturierung zu vermeiden wurde der Test bei Erreichen der Maximalkraft maschinell abgebrochen.

#### 2.7.4 Parameter

Die Elastizität [N/mm] entspricht der Steigung im linearen Kurvenabschnitt. Die Bestimmung der Streckgrenze [N] erfolgt durch Errechnen der Regressionsgeraden des linearen Kurvenabschnittes und deren Standardabweichung. Die Streckgrenze [N] ist definiert als eine Abnahme der Elastizität um mehr als die doppelte Standardabweichung (Stürmer et al. 2006). Die Maximalkraft  $F_{\max}$  [N] entspricht dem höchsten Punkt der Kurve und beschreibt die maximale Kraft, welcher der Knochen standhalten kann, ohne dass Frakturen entstehen.

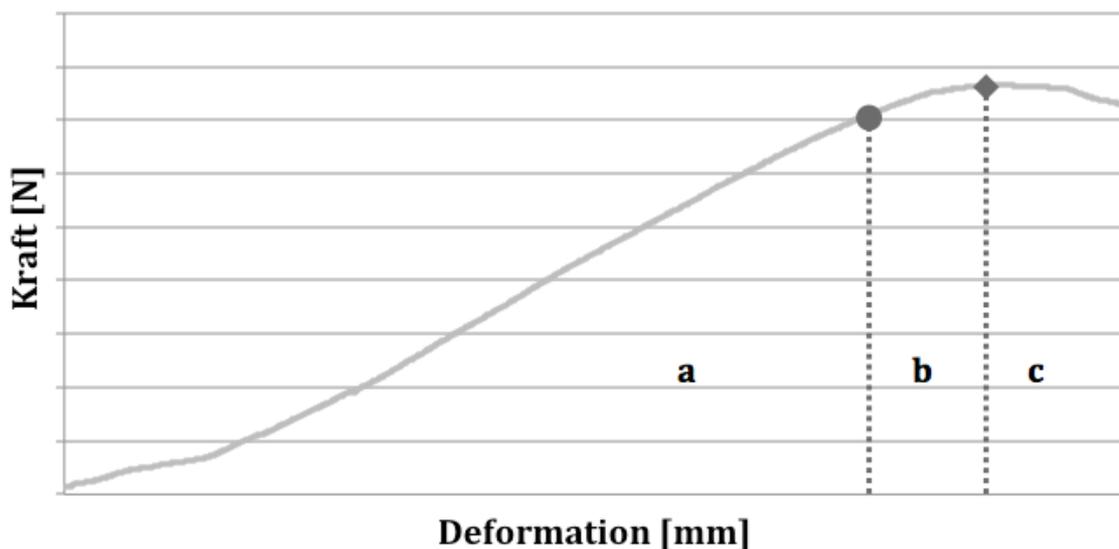


Abbildung 2: typisches Kraft-Weg-Diagramm. PTH T67.

a= elastische Deformation; b= plastische Deformation; c= beginnende Fraktur; •= Yield-load; ◻=  $F_{\max}$

#### 2.7.5 Validierung

Zur Reduktion von Fehlmessungen seitens des Untersuchenden wurde vor Beginn des Versuchs eine Validierung durchgeführt. Nach ausführlicher Einführung am Gerät erfolgte die Messung im oben erläuterten Verfahren an insgesamt 20 intakten Rattentibiae (10 Versuchstiere, jeweils linke und rechte Tibia), die anhand von Größe und Gewicht mit den eigentlichen Versuchstieren vergleichbar waren.

Nach der Auswertung der Parameter zeigte sich die Differenz der Messwerte im Seitenvergleich sowie der Tiere untereinander  $< 10\%$ , sodass die eigentliche Versuchsreihe begonnen werden konnte.

## 2.8 Mikrocomputertomographie

### 2.8.1 Prinzip

Die Mikrocomputertomographie (MCT) ist ein Scanverfahren, das sich vor allem durch eine hohe Ortsauflösung (29  $\mu\text{m}$ ) auszeichnet. Damit ist es hervorragend zur Ermittlung von Knochendichtewerten sowie von Volumina verschiedener Knochenabschnitte geeignet. Ziel dieser Untersuchung war die Messung der Dichte und des Volumens von Kortikalis, Kallus und Weichgewebe der Rattentibiae, um anhand dieser Werte Rückschlüsse auf die Qualität der Frakturheilung zu ziehen.

Für die Untersuchung wurde der Mikrocomputertomograph „eXplore Locus SP-Scanner“ (GE Healthcare, Ontario, Kanada) verwendet. Die Steuerung sowie die 3D-Rekonstruktion der Daten erfolgte mithilfe der Software „eXplore MicroView“ (v2.1.2, GE Healthcare). Zur Auswertung der gewonnenen Daten diente das Programm 3D-OsteoAnalyze (v1.000.4), entwickelt und bereitgestellt durch Christian Dullin (Abteilung für diagnostische Radiologie, Universitätsmedizin Göttingen).

Die Messungen erfolgten nach folgendem Protokoll (vergl. Tabelle 4).

**Tabelle 4: Scanprotokoll der MCT.**

Parameter	Wert [Einheit]
Röhrenspannung	72 [kVp]
Röhrenstrom	90 [ $\mu\text{A}$ ]
Belichtungszeit	1600 [ms]
Scanmodus	360° Vollrotation
Anzahl der Projektionen	900
Effektive Voxel-Größe	0,029 [mm]
Detektorbinning	2x2

### 2.8.2 Durchführung

Vorbereitend wurden die Tibiae jeweils 15 Minuten vor dem Scan bei Raumtemperatur aufgetaut. Vor dem ersten Scan jedes Tages wurde der Computertomograph innerhalb von 15 Minuten auf einen Sollwert von 12,98°C vorgewärmt.

Es wurden jeweils drei Tibiae gleichzeitig gescannt. Diese wurden nach dem Auftauen in ein gekammertes Kunststoffröhrchen gelegt. Die Kondylen zeigten dabei nach unten, da vor allem der metaphysäre Bereich mit dem Osteotomiespalt abzubilden war. Zur Identifizierung der Knochen wurde deren Verteilung in die durch

Einkerbungen markierten Kammern protokolliert. Durch die hohe Ortsauflösung und die damit verbundene lange Scandauer steigt das Risiko von Bewegungsartefakten. Um solchen vorzubeugen, wurden die Tibiae zur Vermeidung jeglicher Bewegung während des Scans mit röntgentransparenten Schaumstoffwürfeln in den Kammern stabilisiert.

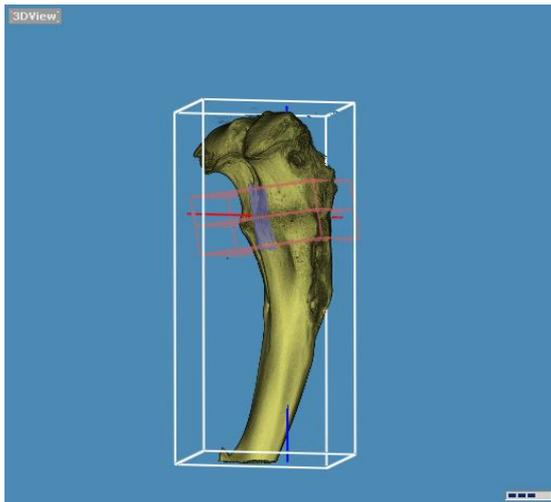
Unterhalb der Kammern befand sich ein Phantom, bestehend aus fünf Zylindern unterschiedlich röntgentransparenter Materialien. Dieses diente der Kalibrierung der Grauwerte im Rahmen der Rekonstruktion und gewährleistete damit die Vergleichbarkeit der Grauwerte verschiedener Scans.

Nun wurde das Probenröhrchen verschlossen und auf eine Rotationsplatte zwischen Strahlenquelle und Detektor gestellt. Zunächst konnte manuell am Computer der Bildausschnitt optimiert werden, sodass sowohl das Phantom als auch die Tibiametaphyse dargestellt wurden. Danach wurde die Probe kurzzeitig aus dem Gerät entfernt und ein Hell-Dunkel-Scan zur Kalibrierung durchgeführt. So konnten die erhaltenen Daten vor der Rekonstruktion um den errechneten Faktor korrigiert werden. Die Probe wurde erneut eingestellt und der Scan begonnen.

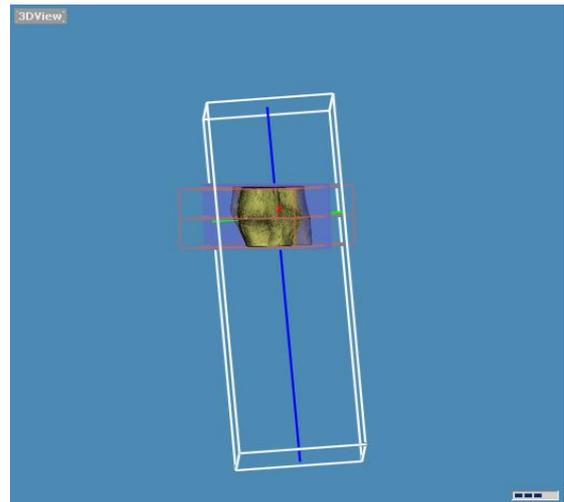
Nach Beendigung des Scans erfolgte die 3D-Rekonstruktion der Daten am Computer mittels „eXplore MicroView“-Software (v2.1.2, GE Healthcare). Dazu wurden die Werte zunächst anhand der Phantomzylinder kalibriert. Danach wurden die Knochen einzeln manuell bei geringer Auflösung ausgewählt, rekonstruiert und anhand der Kalibrierungswerte korrigiert.

### **2.8.3 Auswertung**

Zur Auswertung wurden die Daten in das Programm 3D-OsteoAnalyze (v1.000.4) importiert. Zunächst wurden Kontrast und Transparenz anhand einer dreidimensionalen sowie einer zweidimensionalen Darstellung manuell angepasst. Dies ermöglichte eine verbesserte Diskriminierung der verschiedenen zu bewertenden Knochenkomponenten. Ein Messrahmen von 9x9x4,5 mm wurde in der dreidimensionalen Ansicht am ehemaligen Osteotomiespalt ausgerichtet, sodass Knochen und Kallus in der gesamten Zirkumferenz bis jeweils 2,25 mm proximal und distal der Osteotomielinie erfasst waren (vergl. Abbildung 3 und 4) Anhand dieses Bildausschnittes wurde nun ein Grauwert histogramm erstellt, in dem die relative Elektronendichte (X-Achse, [Gval]) gegen die Anzahl der Bildpunkte im entsprechenden Grauwertbereich (Y-Achse) aufgetragen war (Weidemann 2013). Das Histogramm ließ fünf Peaks entsprechend den Medien Luft, Probenhalter, Weichgewebe, knöchernen Kallus und Kortikalis erkennen. Der Bildausschnitt wurde manuell auf die relevanten Bereiche Weichgewebe, knöcherner Kallus und Kortikalis begrenzt.

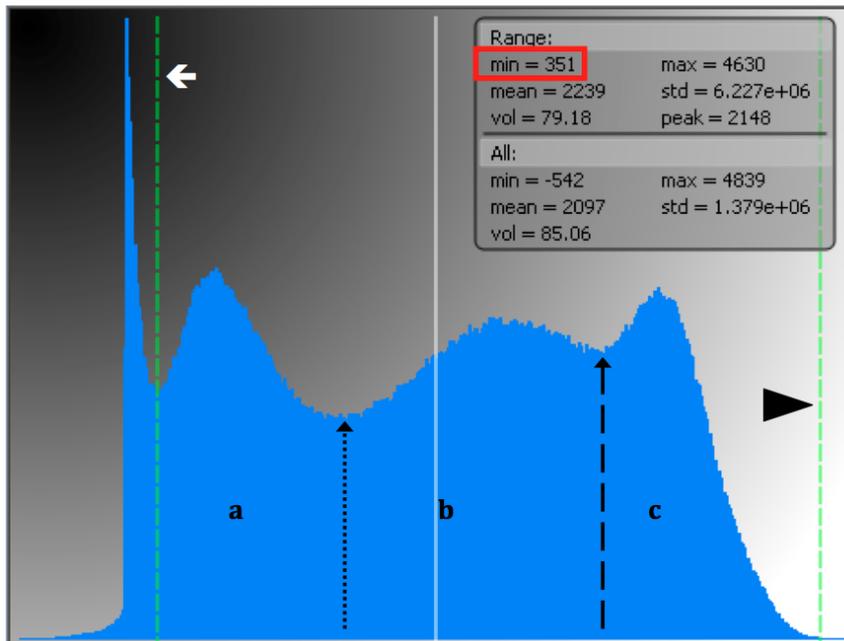


**Abbildung 3: Positionierung des Messrahmens.**



**Abbildung 4: Auswahl des zu untersuchenden Areals.**

Durch Auswahl eines oberen und unteren Schwellenwertes berechnete das Programm nun für den ausgewählten Bereich die mittlere Dichte sowie das Volumen. Die Abgrenzung der Grauwertbereiche erfolgte anhand definierter Schwellenwerte, da diese Auswertungsstrategie in vorangegangenen Arbeiten, im Vergleich zur individuellen Festlegung der Schwellenwerte, größere Objektivität und Validität bewiesen hatte (Weidemann 2013). Zur Erstellung definierter Werte für die Grauwertbereiche von Weichgewebe, knöchernem Kallus und Kortikalis wurden aus jeder Gruppe jeweils zwei Knochen ausgewählt, bei denen im Histogramm eine klare Abgrenzung der drei Peaks möglich war. Im Histogramm dieser 14 Proben wurden nun individuell die unteren Schwellenwerte für Kortikalis, knöchernen Kallus und Weichgewebe festgelegt. Eine separate Definition der oberen Schwellenwerte war nicht erforderlich, da diese sich aus den unteren Schwellenwerten der benachbarten Abschnitte ergeben. So bildet der untere Schwellenwert der Kortikalis gleichzeitig den oberen Schwellenwert für den Grauwertbereich des knöchernen Kallus, der untere Schwellenwert desselben bildet den oberen Schwellenwert des Weichgewebes. Der obere Schwellenwert der Kortikalis wurde als das Ende der Datenkurve definiert. Die folgenden definierten Schwellenwerte ergaben sich aus den Mittelwerten der 14 individuell vermessenen unteren Schwellenwerte (vergl. Tabelle 5).



**Abbildung 5: Typisches Grauwerthistogramm, OVX+VIB T36.**

a= Grauwertbereich Weichgewebe, b= Grauwertbereich knöcherner Kallus, c= Grauwertbereich Kortikalis, weißer Pfeil= unterer Schwellenwert Weichgewebe, Pfeil gepunktet= unterer Schwellenwert knöcherner Kallus, Pfeil gestrichelt= unterer Schwellenwert Kortikalis, Pfeilspitze= Ende der Datenkurve, rotes Kästchen= unterer Schwellenwert Weichgewebe in Gval.

**Tabelle 5: Definierte Schwellenwerte der Grauwertbereiche.**

Grauwertbereich	Unterer Schwellenwert [Gval]
Kortikalis	3058
Knöcherner Kallus	1515
Weichgewebe	347

Diese definierten Werte wurden für die Auswertung aller Histogramme verwendet. Das Programm errechnete daraus für die Grauwertbereiche die mittlere Dichte [Gval] und das Volumen [mm<sup>3</sup>].

Diese Parameter wurden bestimmt für das Weichgewebe, den knöchernen Kallus, die Kortikalis, den gesamten Kallus (Weichgewebe und knöcherner Kallus) und das gesamte Histogramm (Weichgewebe, knöcherner Kallus und Kortikalis).

#### 2.8.4 Umrechnung von mittlerer Dichte zu BMD

Die Umrechnung von mittlerer Dichte [Gval] in die für die Knochendichte (BMD) übliche Einheit [g/cm<sup>3</sup>] wurde durch den Vergleich mit einem Phantom möglich. Das Phantom enthielt fünf Kammern mit Hydroxylapatit unterschiedlicher, bekannter

Dichte [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ]. Diese wurden dem allgemeinen Vorgehen entsprechend mittels MCT gescannt, rekonstruiert und ausgewertet. Dann wurde in einem Diagramm die bekannte Dichte [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ] gegen die gemessene mittlere Dichte [Gval] aufgetragen. Durch Erstellen einer linearen Regressionsgeraden ergab sich folgende Gleichung zur Umrechnung:

$$\text{BMD } [\text{g}/\text{cm}^3] = 0,2646 \times \text{Gval} - 30,2$$

(Stürmer et al. 2014; Weidemann 2013).

### 2.8.5 Berechnung von Bone Volume über Total Volume

Um den Anteil des mineralisierten Gewebes am Gesamtvolumen eines Knochenabschnittes zu ermitteln wurde der Quotient BV/TV errechnet. Dies geschah zum einen für den Anteil mineralisierten Gewebes am Kallus (BV/TV Kallus). Dabei repräsentiert das Volumen des knöchernen Kallus (BV Kallus) den mineralisierten Anteil am gesamten Kallus, also knöchernem Kallus und Weichgewebe zusammen (TV Kallus). Zum anderen wurde der Quotient für den gesamten Knochenabschnitt errechnet (BV/TV gesamt). Das mineralisierte Gewebe setzte sich hierbei aus den Volumina von Kortikalis und knöchernem Kallus zusammen (BV gesamt). Errechnet wurde dessen prozentualer Volumenanteil am gesamten Knochenabschnitt (TV gesamt). Die Berechnung erfolgte anhand der Rohdaten durch Anwendung folgender Formeln:

$$\text{BV/TV Kallus } [\%] = \frac{\text{Volumen des knöchernen Kallus}}{\text{Volumen des gesamten Kallus}} \times 100 \%$$

$$\text{BV/TV gesamt } [\%] = \frac{\text{Volumen von Kortikalis und knöchernem Kallus}}{\text{Volumen des gesamten Knochenabschnittes}} \times 100 \%$$

### 2.8.6 Validierung

Wie beim biomechanischen Test erfolgte auch bei der Auswertung der MCT eine Validierung zum geübten Umgang mit dem Programm 3D-OsteoAnalyse. Dafür wurden fünf Tibiae aus der Versuchsreihe randomisiert ausgewählt und ausgewertet.

## 2.9 Mikroradiographie

### 2.9.1 Histologische Aufarbeitung

Zur histologischen Untersuchung der Tibiae wurden Mikroradiographien nach folgendem Verfahren erstellt:

Zur Entwässerung und Entfettung durchliefen die Tibiae eine Alkoholreihe in aufsteigender Konzentration (vergl. Tabelle 6).

**Tabelle 6: Alkoholreihe zur Entwässerung und Entfettung der Tibiae.**

Dauer der Exposition [Tage]	Zusammensetzung der Lösung
4	70% Ethanol
3	80% Ethanol
8	96% Ethanol
3	96% Ethanol+ Methylmetacrylat, 1:1 Gemisch
3	Reines Methylmetacrylat

Im Anschluss folgte die Einbettung der Knochen. Hierzu wurde ein Gemisch von 1000ml Methylmetacrylat, 200 ml Dibutylphthalat und 29 g Benzoylperoxid verwendet. Die Knochen wurden in 40 ml Rollrandfläschchen eingebracht und diese mit dem Gemisch aufgefüllt und verschlossen. Nach drei Wochen waren die Präparate vollständig ausgehärtet und konnten aus den Fläschchen gelöst werden. Mithilfe einer Innenlochsäge (Leica SP 1600 Sägemikrotom; Bensheim; Deutschland) wurden von jeder Tibia jeweils drei aufeinander folgende Sagittalschnitte von 150 µm Breite entlang der ehemaligen Schraubenebene gefertigt. Bei der Auswahl der Schnitte wurde besonders auf eine zentrale Schnittebene geachtet.

Mithilfe eines Röntgengerätes (Modell-Nr. 43855A, Faxitron X-ray system, Hewlett-Packard, San Diego, USA) wurden nun durch Belichtung eines Kodak Professional Films (INDUSTREX SR45 Film ISO 9002, Rochester, New York) von den Schnittpräparaten Mikroradiographien erstellt. Zum Röntgenprotokoll vergl. Tabelle 7.

**Tabelle 7: Röntgenprotokoll zu Erstellung der Mikroradiographien.**

Parameter	Wert [Einheit]
Röhrenspannung	10 [kV]
Belichtungszeit	3 [min]
Stromstärke	0,3 [mA]

## 2.9.2 Auswertung der Mikroradiographien

### 2.9.2.1 Geräte und Voreinstellungen

Für die Auswertung der Mikroradiographien wurde das Leica Stereomakroskop (MZ 7-5, Bensheim, Deutschland) verwendet. Mithilfe der darin integrierten Kamera (Leica DFC 490, Bensheim, Deutschland) konnten die Bilder direkt auf den PC übertragen und dort mit der Software Leica Quantimet Qwin 2003 (Leica, Bensheim,

Deutschland) bearbeitet und ausgewertet werden. Die Belichtung erfolgte mit einer Kaltlichtlampe (Leica KL 1500 LCD, Bensheim, Deutschland) bei einer Betriebstemperatur von 3000 K. Das Objektiv 1,0 sorgte für eine zehnfache Vergrößerung. Mit der Schalterposition B wurde eine mäßige Blendenöffnung eingestellt (Schalterposition A: minimale Öffnung; Schalterposition E: maximale Öffnung). Diese Voreinstellungen wurden durch die Auswertungen vorangegangener Versuchsgruppen etabliert.

### **2.9.2.2 Vorgehen**

#### *Schritt 1: Auswahl der Mikroradiographien*

Zunächst galt es, die Auswertbarkeit der Mikroradiographien zu prüfen. Vorausgesetzt war ein gerader Anschnitt der Kortikalis in allen Abschnitten. War die Kortikalis durch eine zu weit lateral gelegene Schnittebene unvollständig oder verbreitert angeschnitten, wurde diese Mikroradiographie von der Auswertung ausgeschlossen.

#### *Schritt 2: Ausrichtung*

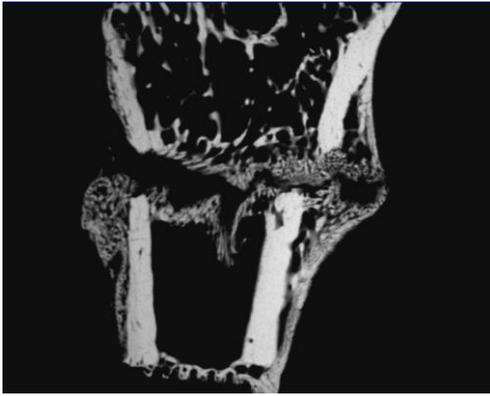
Nun wurden die Mikroradiographie unter dem Makroskop ausgerichtet, sodass auf dem Bild, das von der Kamera auf den Computer übertragen wurde, die ventrale Tibia, auf der zuvor die Osteosyntheseplatte aufgeschraubt gewesen war, links im Bild dargestellt war. Die dorsale Tibia war entsprechend rechts zu sehen, während der Anteil proximal der Osteotomie oben und der Anteil distal der Osteotomie unten im Bild dargestellt wurde. Die genaue Positionierung erfolgte anhand eines Messrahmens (2 mm vertikal, 5 mm horizontal). Die in dessen Mitte horizontal verlaufende Orientierungslinie wurde an der Obergrenze des distalen Kortikalisanschnittes ausgerichtet.

#### *Schritt 3: Bildschärfe und Kontrast*

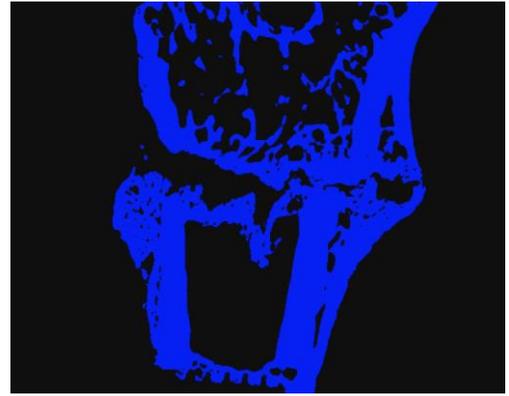
Die Bildschärfe konnte manuell am Makroskop optimiert werden. Der Kontrast wurde mithilfe der Software anhand der Belichtungszeit (Exposure) eingestellt. Als Richtwert galten dabei 230 ms Belichtungszeit. Durch den Untersuchenden wurde der Kontrast justiert.

#### *Schritt 4: Graudetektion*

Zur Erfassung aller sichtbaren Knochenanteile erfolgte im nächsten Schritt die Graudetektion. Nach der automatischen Graudetektion durch die Software, wurde diese durch den Untersuchenden manuell korrigiert. Dabei wurde eine geringe Überdetektion toleriert (vergl. Abbildung 7).



**Abbildung 6:** Darstellung einer Mikroradiographie unter dem Makroskop (Weidemann 2013).



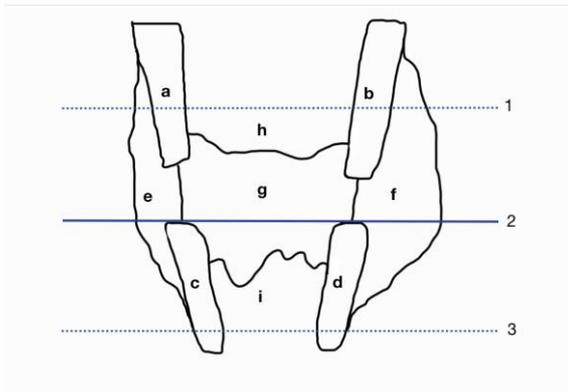
**Abbildung 7:** Darstellung der Graudetektion, leichte Überdetektion (Weidemann 2013).

#### *Schritt 5: Flächenmarkierung*

Durch Umfahren der jeweiligen Abschnitte mit der Computer-Maus wurden nun die zu analysierenden Flächen markiert (vergl. Abbildung 8). Folgende Flächen wurden erfasst:

- a) Gesamter Knochen inklusive Kallus*
- b) Kortikalis ventral, proximal*
- c) Kortikalis dorsal, proximal*
- d) Kortikalis ventral, distal*
- e) Kortikalis dorsal, distal*
- f) Kallus ventral*
- g) Kallus dorsal*
- h) Kallus endostal*
- i) Trabekulärer Knochen proximal*
- j) Trabekulärer Knochen distal*

Eine Mehrfachauswahl von Flächen wurde durch die Software verhindert.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Flächendefinition.**

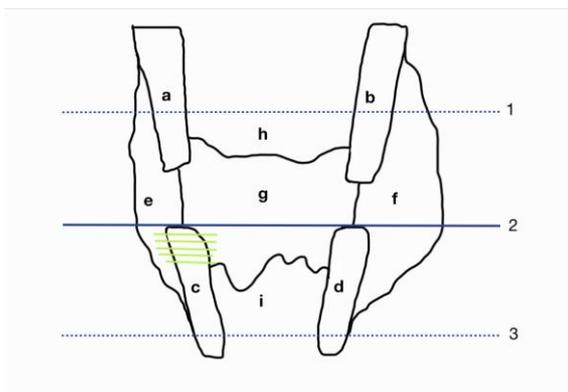
a= Kort. ventr. prox., b= Kort. dors. prox., c= Kort. ventr. dist., d= Kort. dors. dist., e=Kallus ventr., f= Kallus dors., g=Kallus endostal, h= trab. Kn. prox., i= trab. Kn. dist., 1= Begrenzung Messrahmen prox., 2= Orientierungslinie, 3= Begrenzung Messrahmen dist.

*Schritt 6: Bestimmung der Dicke von Knochen, Kortikalis und Kallus*

Zur Bestimmung der Dicke von Knochen, Kortikalis und Kallus wurden die jeweiligen Knochenabschnitte durch parallele waagrechte Linien in regelmäßigen Abständen durchzogen (vergl. Abbildung 9 und 10). Gemessen wurden:

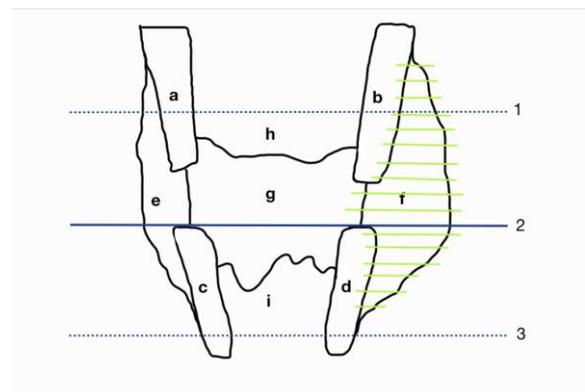
- a) *Knochendurchmesser proximal*
- b) *Knochendurchmesser distal*
- c) *Kortikalisdicke ventral, distal*
- d) *Kortikalisdicke dorsal, distal*
- e) *Kallusdicke ventral*
- f) *Kallusdicke dorsal*

Die Software wertete dabei nur jeweils den Bereich aus, der zuvor bei der Flächenmarkierung umfahren worden war.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Dickemessung der ventralen, distalen Kortikalis.**

grüne Linien= Vektoren zur Dickemessung



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Dickemessung des dorsalen Kallus.**

grüne Linien= Vektoren zu Dickemessung

### 2.9.3 Parameter

Die im Folgenden aufgeführten Messparameter wurden nach der manuellen Markierung durch die Software (Quantimet Qwin 2003, Leica, Bensheim, Deutschland) ermittelt.

#### 2.9.3.1 Gesamter Knochen

**Tabelle 8: Messparameter des gesamten Knochens mit Einheit und Bezeichnung nach ASBMR-Nomenklatur (Dempster et al. 2013; Parfitt et al. 1987).**

Parameter	Einheit	ASBMR
Knochendurchmesser proximal	mm	B. Dm
Knochendurchmesser distal	mm	B. Dm

#### 2.9.3.2 Kortikalis

**Tabelle 9: Messparameter der Kortikalis mit Einheit und Bezeichnung nach ASBMR-Nomenklatur (Dempster et al. 2013; Parfitt et al. 1987).**

Parameter	Einheit	ASBMR
Kortikalisdicke ventral, distal	mm	Ct. Wi
Kortikalisdicke dorsal, distal	mm	Ct. Wi
Kortikalisdicke ventral, distal	%	Ct. Dn
Kortikalisdicke dorsal, distal	%	Ct. Dn

#### 2.9.3.3 Kallus

**Tabelle 10: Messparameter des Kallus mit Einheit und Bezeichnung nach ASBMR-Nomenklatur (Dempster et al. 2013; Parfitt et al. 1987).**

Parameter	Einheit	ASBMR
Kallusdicke ventral	mm	Cl. Wi
Kallusdicke dorsal	mm	Cl. Wi
Kallusdicke ventral	%	Cl. Dn
Kallusdicke dorsal	%	Cl. Dn
Kallusdicke endostal	%	Cl. Dn

### 2.9.3.4 Trabekulärer Knochen

**Tabelle 11: Messparameter des trabekulären Knochens mit Einheit und Bezeichnung nach ASBMR-Nomenklatur (Parfitt et al. 1987, Dempster et al. 2013).**

Parameter	Einheit	ASBMR
Anzahl der Trabekelkreuzungen distal	Absolut	Tb. N
Dichte der Trabekelkreuzungen	1/mm <sup>2</sup>	Tb. N mm <sup>2</sup>
Dichte trabekulärer Knochen distal	%	Cn. Dn
Mittlere Trabekeldicke distal	µm	Tb. Wi

### 2.9.4 Berechnungsgrundlage der Messparameter

Die Dickewerte [mm] für Knochen, Kortikalis und Kallus ergeben sich aus den Mittelwerten der in *Schritt 6* eingezeichneten Vektoren. Die Werte für die Dichte [%] von Kortikalis, Kallus und trabekulärem Knochen entsprechen dem Anteil mineralisierten Knochens in dem zuvor umfahrenen Bereich. Die Dichte der Trabekelkreuzungen [1/mm<sup>2</sup>] entspricht der Anzahl an Trabekelkreuzungen pro mm<sup>2</sup> Fläche distalen trabekulären Knochens. Die mittlere Trabekeldicke [µm] beschreibt den mittleren Durchmesser der erfassten Trabekel.

Die jeweils dritte Tabellenspalte beinhaltet die histomorphometrische Nomenklatur der ASBMR (Dempster et al. 2013; Parfitt et al. 1987).

### 2.9.5 Validierung

Wie bei den vorherigen Versuchen erfolgte auch vor der Auswertung der Mikroradiographien eine Validierung, um Fehler seitens des Untersuchenden zu minimieren. Dafür wurde eine Mikroradiographie randomisiert ausgewählt und zehnmal in Folge wie beschrieben ausgewertet. Da die einzelnen Ergebnisse weniger als 5 % von den Mittelwerten abwichen, konnte mit der Auswertung begonnen werden.

## 2.10 Polychrome Sequenzmarkierung

### 2.10.1 Prinzip

Ziel dieses Versuches war es, den zeitlichen Ablauf der Frakturheilung zu beurteilen. Möglich wurde dies durch die Verabreichung von Fluorochromen. Dabei handelt es sich um Farbstoffe, die sich in verkalktem Gewebe ablagern, das sich zum Zeitpunkt der Verabreichung im Aufbau befinden (Rahn 1976). Durch die Injektion verschiedenfarbiger Fluorochrome zu unterschiedlichen Zeitpunkten ließ sich nachvollziehen, welche Anteile von Kallus und Knochen wann und in welchem

Umfang gebildet wurden. Es färbten sich jeweils die Bereiche an, die bis zum Zeitpunkt der Verabreichung des Farbstoffes neu gebildet worden waren, ohne dass sich dabei die Farbstoffe vermischten oder überlagerten. Das heißt, bei Verabreichung des Farbstoffes XO an Tag zwölf nach Osteotomie färbte sich das Gewebe orange, welches vom Tag der Osteotomie bis zu Tag zwölf neu gebildet und mineralisiert worden war. CG wiederum färbte durch Injektion an Tag 22 nach Osteotomie das Gewebe grün, welches von Tag 13 bis Tag 22 gebildet und mineralisiert worden war, usw. Damit ließ sich ein dynamisches Bild der Frakturheilung erstellen, während der vorangegangene biomechanische Test und die Untersuchung mittels MCT die Frakturheilung lediglich darstellen konnten.

Die Reihenfolge der verabreichten Fluorochrome hing im Wesentlichen von ihrer Verträglichkeit und ihrem Einfluss auf den Knochenstoffwechsel ab. Da zum Beispiel Tetrazykline bekanntermaßen den Knochenaufbau hemmen, wurde dieser Farbstoff als letzter, unmittelbar vor der Obduktion der Tiere verabreicht wurde (Rahn 1976).

### 2.10.2 Durchführung

Die Farbstoffe wurden den Tieren nach dem in Tabelle 12 aufgeführten Schema subkutan verabreicht. Die Zeiträume, in denen Gewebe auf- und umgebaut wurde sowie die zugehörige Farbe unter Blaufluoreszenz sind ebenfalls der Tabelle 12 zu entnehmen. Die Dosierungen entsprechen der Empfehlung zur polychromen Sequenzmarkierung von B. A. Rahn (Rahn 1976). Die Verabreichung des Farbstoffes Tetrazyklin fand eine Stunde vor der Tötung der Tiere statt und erfolgte wegen der kurzen Wirkungszeit in der doppelten von Rahn empfohlenen Dosierung (Rahn 1976).

**Tabelle 12: Schema zur Verabreichung der Fluorochrome (Merck, Darmstadt, Deutschland).**

<b>Zeitpunkt d. Injektion [d nach OST]</b>	<b>Farbstoff (Abkürzung)</b>	<b>Dosierung</b>	<b>Zeitraum der Anfärbung des neuen Gewebes [Farbe unter Blaufluoreszenz]</b>
12	Xylenolorange (XO)	90 mg/kgKG	Tag 0-12 [orange]
22	Calceingrün (CG)	10 mg/kgKG	Tag 13-22 [grün]
32	Alizarinkomplexon (AK)	30 mg/kgKG	Tag 23-32 [rot]
42	Tetrazyklinhydrochlorid (TZ)	30 mg/kgKG	Tag 33-42 [gelb]

### 2.10.3 Auswertung

Für die Auswertung wurden die für die Mikroradiographie verwendeten histologischen Schnitte (vergl. Abschnitt 2.9.1) mit Eukitt® (Fa. Kindler, Freiburg, Deutschland) auf Objektträger aufgebracht. Die Untersuchung derselben erfolgte mithilfe eines Auflicht-Fluoreszenz-Stereomakroskops (Leica Stereomakroskop MZ 7-5 mit FluoCombi III, Bensheim, Deutschland). Eine Quecksilberhöchstdrucklampe mit einer Leistung von 100 W erzeugte in Verbindung mit einem Anregungsfilter für Wellenlängen von 450-490 nm eine Blaufluoreszenz, worunter die verschiedenen Farbstoffe sichtbar wurden. Wie schon bei der Mikroradiographie wurde das Bild über eine Kamera (Leica DC 300F, Bensheim, Deutschland) auf den Computer übertragen und konnte dort mit der Software Leica Quantimet QWin 2003 (Leica, Bensheim, Deutschland) bearbeitet und ausgewertet werden.

Eine 16-fache Vergrößerung (Objektiv 1,6) sowie eine Belichtungszeit von 111 s hatte sich in vorangegangenen Versuchen als optimal erwiesen.

#### *Schritt 1: Auswahl der Schnitte*

Analog zum in Abschnitt 2.9.2.2 beschriebenen Vorgehen erfolgte die Auswahl der Schnitte anhand ihrer Auswertbarkeit.

#### *Schritt 2: Ausrichtung*

Die Ausrichtung der Schnitte erfolgte ebenfalls analog zur Mikroradiographie (vergl. Abschnitt 2.9.2.2, Schritt 2)

#### *Schritt 3: Flächenmarkierung*

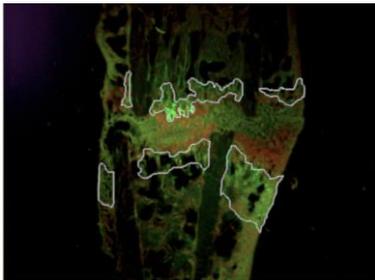
Folgende Flächen wurden nach Einschalten der Blaufluoreszenz durch Umfahren mit der Computer-Maus markiert:

- a) *Gesamter Knochen inklusive Kallus*
- b) *Kortikalis ventral, proximal*
- c) *Kortikalis dorsal, proximal*
- d) *Kortikalis ventral, distal*
- e) *Kortikalis dorsal, distal*
- f) *Kallus ventral*
- g) *Kallus dorsal*
- h) *Kallus endostal*

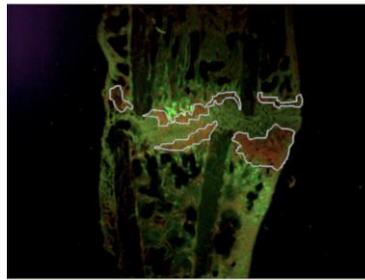
Die durch seine hohe Umbaurate bedingte starke Abfärbung des Kallus erleichterte seine Abgrenzung zu anderen Strukturen. Die Kortikalis war wegen ihrer geringen Umbaurate und damit schwachen Fluoreszenzmarkierung schwieriger abzugrenzen.

#### *Schritt 4: Definition gleichfarbiger fluoreszenzmarkierter Flächen*

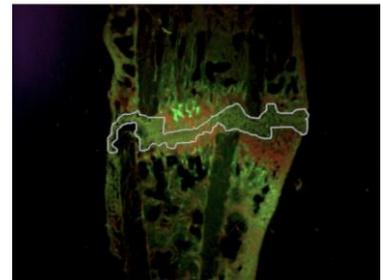
Im nächsten Schritt wurden die jeweils gleichfarbigen fluoreszenzmarkierten Flächen zu markiert, indem sie einzeln umfahren und danach zu einer Fläche zusammengerechnet wurden. Die Zuteilung der fluoreszenzmarkierten Flächen zu den Bereichen Kallus ventral, dorsal und endostal, war der Software anhand der bereits in *Schritt 3* erfolgten Definition dieser Flächen möglich. Da die durch XO markierten Flächen sehr klein und komplett von CG markierten Arealen umgeben waren, wurden diese Flächen gemeinsam erfasst und ausgewertet. Eine separate Definition der XO markierten Flächen war aufgrund ihrer geringen Größe nicht möglich (vergl. Abbildungen 11 bis 13).



**Abbildung 11: Auswahl der CG-markierten Flächen**  
(Weidemann 2013).



**Abbildung 12: Auswahl der AK-markierten Fläche**  
(Weidemann 2013).



**Abbildung 13: Auswahl der TC-markierten Fläche**  
(Weidemann 2013).

#### **2.10.4 Bestimmung des Zeitpunktes der frühesten knöchernen Frakturspaltüberbrückung**

Um den Zeitpunkt zu bestimmen, an dem erstmalig der Frakturspalt von knöchernem Gewebe überbrückt wurde, wurden elf statt lediglich drei Schnitte pro Tibia ausgewertet, da diese erste Gewebsbrücke meist in den periostalen Abschnitten der Tibiae zu finden war. Jeder Schnitt wurde einzeln auf knöcherne Verbindungen der Frakturhälften untersucht. Bei Erfolg ließ die Farbe der Fluoreszenzmarkierung sowie die Stärke der Gewebsbrücke auf den Zeitpunkt deren Bildung und damit auf den frühesten Zeitpunkt der knöchernen Überbrückung des Frakturspaltes schließen. War die knöchernen Gewebsbrücke beispielsweise grün gefärbt, deutete dies auf eine erste Frakturspaltüberbrückung im Zeitraum von Tag 13 bis Tag 22 nach Osteotomie hin. Wann genau in diesem Zeitraum sich die Gewebsbrücke gebildet hatte, ließ sich an ihrer Fläche abschätzen. So wäre eine sehr feine Gewebsbrücke eher später in diesem Zeitraum gebildet worden (z.B. Tag 19), eine breite, kräftige Gewebsbrücke wäre dagegen eher in größerem Abstand zur CG-Injektion entstanden (z.B. Tag 14). Nachdem auf diese Weise für jede einzelne Tibia der Zeitpunkt der frühesten knöchernen Frakturspaltüberbrückung ermittelt war, wurde für jede der sieben Gruppen ein Mittelwert errechnet.

## 2.10.5 Parameter

### 2.10.5.1 Kallus ventral

Tabelle 13: Messparameter für den ventralen Kallusanteil.

Parameter	Einheit
Gesamte ventrale Kallusfläche	mm <sup>2</sup>
CG-markierte ventrale Kallusfläche	mm <sup>2</sup>
AK-markierte ventrale Kallusfläche	mm <sup>2</sup>
TC-markierte ventrale Kallusfläche	mm <sup>2</sup>

### 2.10.5.2 Kallus dorsal

Tabelle 14: Messparameter für den dorsalen Kallusanteil.

Parameter	Einheit
Gesamte dorsale Kallusfläche	mm <sup>2</sup>
CG-markierte dorsale Kallusfläche	mm <sup>2</sup>
AK-markierte dorsale Kallusfläche	mm <sup>2</sup>
TC-markierte dorsale Kallusfläche	mm <sup>2</sup>

### 2.10.5.3 Kallus endostal

Tabelle 15: Messparameter für den endostalen Kallusanteil.

Parameter	Einheit
Gesamte endostale Kallusfläche	mm <sup>2</sup>
CG-markierte endostale Kallusfläche	mm <sup>2</sup>
AK-markierte endostale Kallusfläche	mm <sup>2</sup>
TC-markierte endostale Kallusfläche	mm <sup>2</sup>

### 2.10.5.4 Gesamter Kallus

Tabelle 16: Messparameter für den gesamten Kallus (ventral, dorsal und endostal).

Parameter	Einheit
Gesamte Kallusfläche	mm <sup>2</sup>

## **2.11 Statistik**

Die statistische Auswertung aller Versuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism (Version 5.0, Mai 2003, GraphPad Software, San Diego, USA). Mithilfe dieser Software wurden außerdem die graphischen Darstellungen im Ergebnisteil erstellt. Für jeden Parameter wurden Mittelwert, Minimum, Maximum und Standardabweichung berechnet und die Werte der sieben Gruppen verglichen. Eine Kombination der Tests one-way ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc-Test diente zur Erkennung signifikanter Unterschiede. Das Signifikanzniveau wurde auf den p-Wert  $\alpha \leq 0,05$  festgelegt.

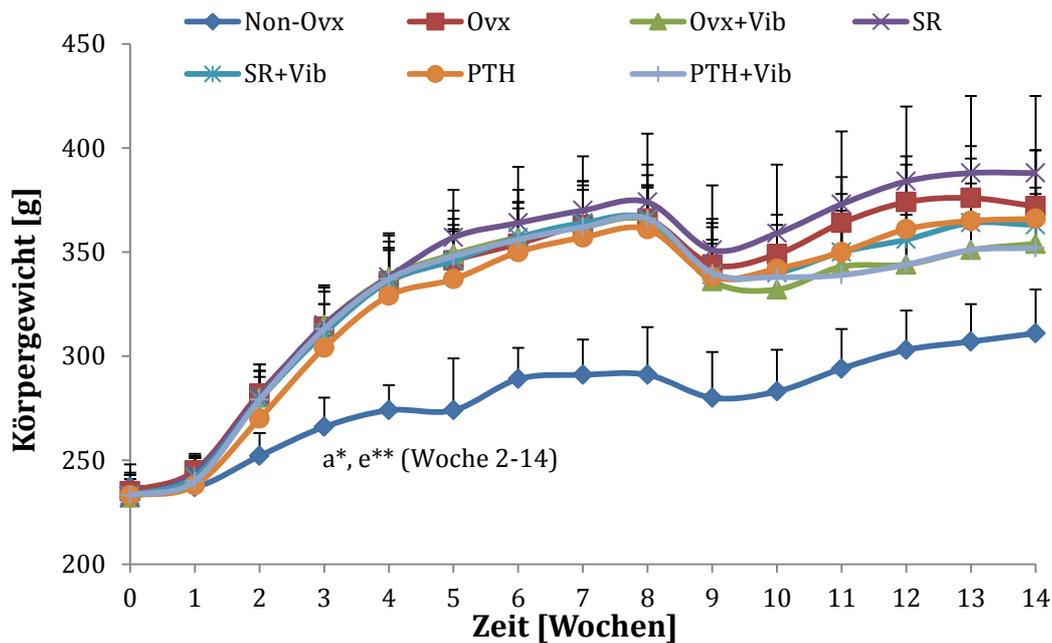
### 3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Messergebnisse von Körpergewicht, Uterusgewicht, Nahrungsaufnahme, biomechanischem Test, Mikrocomputertomographie, Mikroradiographie und polychromer Sequenzmarkierung in Linien- und Säulendiagrammen sowie als Tabellen dargestellt. Aufgeführt sind jeweils die Mittelwerte der Messparameter mit deren Standardabweichung. Signifikanzen werden wie in Tabelle 17 beschrieben gekennzeichnet.

**Tabelle 17: Kennzeichnung von Signifikanzen im Ergebnisteil.**

<b>Kennzeichnung</b>	<b>Bedeutung</b>
*	Signifikant ( $p < 0,05$ )
**	Hochsignifikant ( $p < 0,01$ )
***	Höchstsignifikant ( $p < 0,001$ )
a	Signifikant zu allen Gruppen
b	Signifikant zu NON-OVX
c	Signifikant zu OVX
d	Signifikant zu OVX+VIB
e	Signifikant zu SR
f	Signifikant zu SR+VIB
g	Signifikant zu PTH
h	Signifikant zu PTH+VIB

### 3.1 Körpergewicht



**Abbildung 14:** Darstellung des mittleren Körpergewichts [g] mit Standardabweichung im Verlauf (Eimer 2014). a = signifikant zu allen Gruppen, e = signifikant zu SR, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$

Die Versuchstiere wurden über die gesamte Dauer des Versuchs wöchentlich gewogen. Zu Versuchsbeginn betrug das Durchschnittsgewicht der Versuchstiere 234 g, dabei bestanden keine signifikanten Gewichtsunterschiede zwischen den Gruppen. Im Verlauf kam es bei allen Tieren bis zur achten Woche zu einer stetigen Gewichtszunahme. Nach der Osteotomie in Woche acht kam es in allen Gruppen zu einer Gewichtsabnahme, von Woche neun bis zum Versuchsende zeigt die Kurve jedoch wieder in allen Gruppen eine positive Tendenz. Von Woche zwei bis zum Versuchsende nahmen die Tiere der Gruppen OVX, OVX+VIB, SR+VIB, PTH und PTH+VIB signifikant mehr an Gewicht zu als die, der Kontrollgruppe NON-OVX. Die Gruppe SR zeigte hochsignifikante Unterschiede zu NON-OVX in diesem Zeitraum.

Auch wenn sich unter den ovariectomierten Tieren keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtszunahme zeigen, fällt doch auf, dass zuletzt die Tiere, die der WBV zugeführt worden waren, weniger an Gewicht zunahmten als die Tiere, die nicht vibriert wurden.

Die Ergebnisse der Körpergewichtsanalyse wurden bereits im Rahmen einer Dissertation von Christine Eimer veröffentlicht, die eine parallele Versuchsreihe am intakten Femur derselben Versuchstiere durchführte (Eimer 2014).

**Tabelle 18: Körpergewicht [g] im Verlauf± Standardabweichung (Eimer 2014).**

OVX= Ovariectomie; OST=Osteotomie; OBD= Obduktion

Woche	NON-OVX	OVX	OVX+VIB	SR	SR+VIB	PTH	PTH+VIB
0 OVX	237±6	235±8	232±11	232±5	233±8	233±11	233±15
1	237±15	245±4	242±9	244±9	242±10	238±10	240±11
2	252±11 a*, e**	282±14	280±13	281±15	279±11	270±14	279±14
3	266±14 a*, e**	314±17	315±16	315±19	311±14	304±21	313±20
4	274±12 a*, e**	336±16	338±17	338±21	336±15	329±23	337±21
5	274±25 a*, e**	346±14	349±17	357±23	346±17	337±24	348±22
6	289±15 a*, e**	354±17	357±17	364±27	357±17	350±24	356±24
7	291±17 a*, e**	363±17	362±18	370±26	364±18	357±27	362±22
8 OST	291±23 a*, e**	366±16	365±16	374±33	366±18	361±26	366±26
9	280±22 a*, e**	344±18	336±18	351±31	339±17	338±26	340±26
10	283±20 a*, e**	349±19	332±20	359±33	340±19	342±26	338±25
11	294±19 a*, e**	364±22	343±19	373±35	350±20	350±28	339±24
12	303±19 a*, e**	374±22	344±18	384±36	356±21	361±31	344±24
13	307±18 a*, e**	376±25	351±22	388±37	364±19	365±30	351±26
14 OBD	311±21 a*, e**	372±27	354±17	388±37	363±18	366±33	352±26

a= signifikant zu allen Gruppen, e= signifikant zu SR, \*=p< 0,05, \*\*= p< 0,01

### 3.2 Uterusgewicht

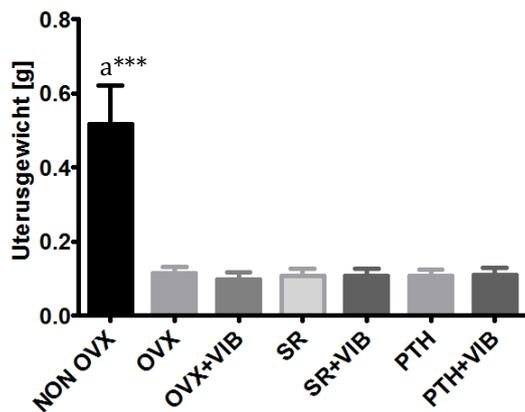


Abbildung 15: Darstellung des mittleren Uterusgewichtes [g] mit Standardabweichung (Eimer 2014). a= signifikant zu allen Gruppen, \*\*\*= p< 0,001

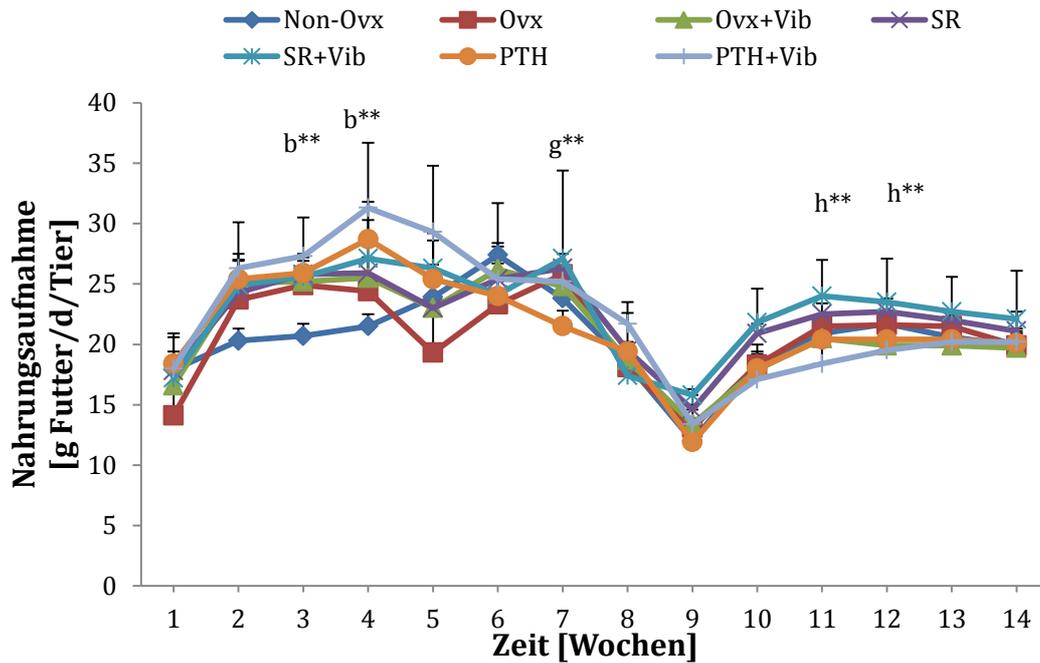
Die Uteri der ovariectomierten Tiere zeigten sich allesamt adäquat größenreduziert. Es bestanden höchstsignifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe NON-OVX. Auch die Ergebnisse der Uterusgewichtskontrolle wurden bereits im Rahmen ihrer Dissertation von Christine Eimer veröffentlicht (Eimer 2014).

Tabelle 19: Mittleres Uterusgewicht [g] ± Standardabweichung bei Obduktion (Eimer 2014).

Parameter [Einheit]± SD	NON-OVX	OVX	OVX+VIB	SR	SR+VIB	PTH	PTH+VIB
Uterusgewicht [g] ± SD	0,52 ±0,1 a***	0,12 ±0,02	0,1 ±0,02	0,1 ±0,02	0,11 ±0,02	0,12 ±0,02	0,12 ±0,02

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

### 3.3 Nahrungsaufnahme



**Abbildung 16: Darstellung der mittleren täglichen Nahrungsaufnahme [g Futter/d/Tier] pro Versuchstier im Verlauf mit Standardabweichung.** b= signifikant zu NON-OVX, g= signifikant zu PTH, h= signifikant zu PTH+VIB, \*\*= p< 0,01

In den ersten vier Wochen nach Ovariectomie war eine rasche Steigerung der täglichen Nahrungsaufnahme zu beobachten. Dabei zeigte sich in der dritten Woche die Nahrungsaufnahme der Gruppen SR, SR+VIB, PTH und PTH+VIB hochsignifikant höher als die der Gruppe NON-OVX. In Woche vier war lediglich die Nahrungsaufnahme der Gruppe PTH+VIB hochsignifikant höher als die, der Gruppe NON-OVX. In den Wochen vier bis sieben blieb die Nahrungsaufnahme vergleichsweise konstant, fiel jedoch von Woche sieben bis neun stark ab. Lediglich die Gruppe SR+VIB zeigte eine hochsignifikant höhere Nahrungsaufnahme als die Gruppe PTH. Eine Wochen nach Osteotomie nahm die Nahrungsaufnahme wieder stetig zu und verlief von Woche elf bis zum Versuchsende relativ konstant. In Woche zehn und elf war die Nahrungsaufnahme der Gruppe SR+VIB hochsignifikant höher als die, der Gruppe PTH+VIB. Auffällig ist die vergleichsweise große Standardabweichung in den Gruppen PTH und PTH+VIB (vergl. Tabelle 20).

**Tabelle 20: Mittlere Nahrungsaufnahme [g Futter/d/Tier] ± Standardabweichung über die gesamte Versuchsdauer.**

Parameter [Einheit]± SD	NON-OVX	OVX	OVX+VIB	SR	SR+VIB	PTH	PTH+VIB
Nahrungsaufnahme [g Futter/d/Tier]	20,53 ±3,52	20,68 ±3,84	21,17 ±3,88	22,27 ±3,36	22,83 ±3,68	21,42 ±4,22	22,38 ±5,16

Tabelle 21: Mittlere Nahrungsaufnahme [g Futter/d/Tier] ± Standardabweichung im Verlauf.

Woche	NON-OVX	OVX	OVX+VIB	SR	SR+VIB	PTH	PTH+VIB
1	17,9 ±4,3	14,1 ±2,4	16,6 ±2,1	17,8 ±1,6	17,2 ±1,8	18,4 ±2,2	18 ±2,9
2	20,3 ±0,6	23,7 ±0,8	25,1 ±2,4	24,3 ±2,6	24,9 ±2,1	25,4 ±1,6	26,3 ±3,8
3	20,7 ±0,2	24,9 ±0,8	25,2 ±1,3	25,8 ±1,7 b**	25,6 ±1,3 b**	25,9 ±1,3 b**	27,3 ±3,2 b**
4	21,5 ±0,9	24,4 ±1	25,5 ±1,7	25,9 ±1,3	27,1 ±3,2	28,7 ±3,1	31,3 ±5,4 b**
5	23,9 ±1,7	19,3 ±3,1	23 ±5,6	23 ±2,6	26,3 ±2,9	25,4 ±1,2	29,3 ±5,5
6	27,4 ±4,3	23,3 ±0,5	26,2 ±5,5	25,4 ±1,3	24,1 ±1,4	24 ±1,2	25,4 ±2,7
7	23,8 ±0,8	25,8 ±0,4	24,8 ±1,4	26,3 ±8,1	27,1 ±0,4 g**	21,5 ±1,3	25,2 ±0,9
8	18,4 ±0,6	18,1 ±1,5	18,7 ±1,1	19,5 ±0,7	17,4 ±0,4	19,4 ±3,2	21,7 ±1,8
9	12 ±1	13,1 ±0,8	13,4 ±1,6	14,6 ±1,2	15,8 ±0,5	11,9 ±2,7	13,4 ±2,9
10	18,4 ±0,9	18,3 ±1,7	17,9 ±0,5	20,9 ±0,8	21,8 ±2,8 h**	18 ±0,7	17,1 ±2,1
11	20,9 ±0,2	21,5 ±0,1	20,5 ±1,3	22,5 ±0,9	24 ±3 h**	20,4 ±0,3	18,4 ±1,9
12	21,7 ±1,6	21,6 ±0,8	19,9 ±0,6	22,7 ±1,1	23,5 ±3,6	20,4 ±1	19,52 ±1,8
13	20,6 ±0,3	21,5 ±0,9	19,9 ±1,1	22 ±0,3	22,7 ±2,9	20,4 ±0,8	20,2 ±1,9
14	19,9 ±1,1	19,9 ±0,5	19,7 ±0,4	21,1 ±0,2	22,1 ±4	20,1 ±1	20,2 ±2,5

b= signifikant zu NON-OVX, g= signifikant zu PTH, h= signifikant zu PTH+VIB, \*\*=  
p<0,01

### 3.4 Ergebnisse des biomechanischen Tests

#### 3.4.1 Elastizität

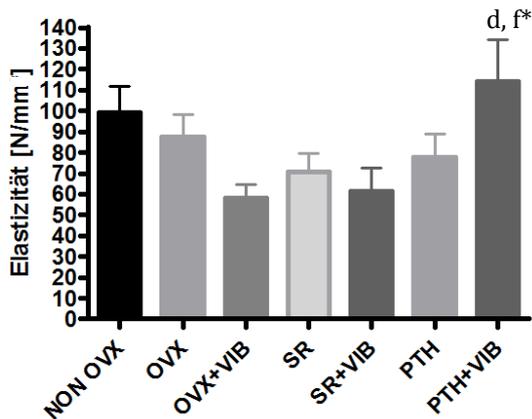


Abbildung 17: Darstellung der Elastizität [N/mm] mit Standardabweichung.

d= signifikant zu OVX+VIB, f= signifikant zu SR+VIB, \*=  $p < 0,05$

Die Gruppe PTH+VIB zeigte bezüglich der Elastizität signifikant höhere Werte als die Gruppen OVX+VIB und SR+VIB. Auch wenn ansonsten keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen waren, fällt dennoch auf, dass die Gruppe PTH+VIB insgesamt höhere Werte erzielte als die Kontrollgruppe NON-OVX.

#### 3.4.2 Streckgrenze

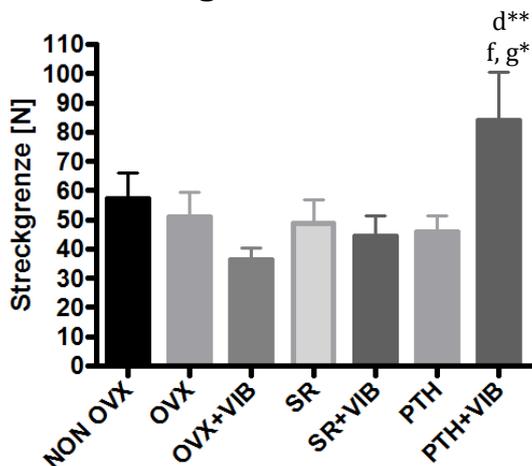


Abbildung 18: Darstellung der Streckgrenze [N] mit Standardabweichung.

d= signifikant zu OVX+VIB, f= signifikant zu SR+VIB, g= signifikant zu PTH, \*=  $p < 0,05$ , \*\*=  $p < 0,01$

Die Werte der Gruppe PTH+VIB waren hinsichtlich der Streckgrenze gegenüber der Gruppe OVX+VIB hochsignifikant erhöht. Im Vergleich zu den Gruppen SR+VIB und PTH erzielte die Gruppe PTH+VIB signifikant höhere Werte. Auch erzielte die Gruppe PTH+VIB höhere Werte als die Kontrollgruppe NON-OVX, ohne dass ein signifikanter Unterschied vorlag.

### 3.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse des biomechanischen Tests

Tabelle 22: Mittelwerte± Standardabweichung von Elastizität [N/mm] und Streckgrenze [N].

Parameter [Einheit]± SD	NON-OVX	OVX	OVX+VIB	SR	SR+VIB	PTH	PTH+VIB
Elastizität [N/mm]	98,94 ±36,32	87,7 ±32,79	57,9 ±22,74	70,79 ±28,2	61,52 ±36,8	77,51 ±37,96	114,2 ±66,01 d,f*
Streckgrenze [N]	57,27 ±24,41	50,91 ±26,9	36,42 ±11,98	48,68 ±26	44,49 ±22,69	45,67 ±18,45	84,15 ±51,06 d**, f,g*

d= signifikant zu OVX+VIB, f= signifikant zu SR+VIB, g= signifikant zu PTH, \*= p< 0,05, \*\*= p< 0,01

## 3.5 Ergebnisse der Mikrocomputertomographie

### 3.5.1 Kortikalis

#### 3.5.1.1 BMD

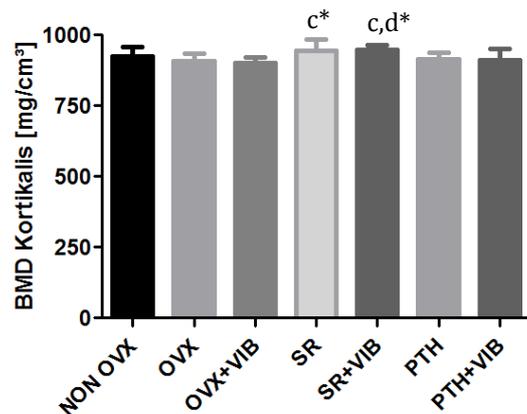
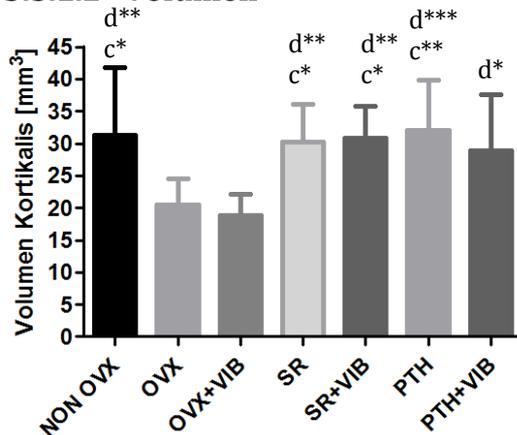


Abbildung 19: Darstellung der BMD [mg/cm<sup>3</sup>] der Kortikalis mit Standardabweichung.

c= signifikant zu OVX, d= signifikant zu OVX+VIB, \*= p< 0,05

Die Gruppe SR+VIB zeigte bezüglich der BMD signifikant höhere Werte als die Gruppen OVX und OVX+VIB. Auch die Werte der Gruppe SR waren gegenüber denen der Gruppe OVX+VIB signifikant erhöht.

### 3.5.1.2 Volumen



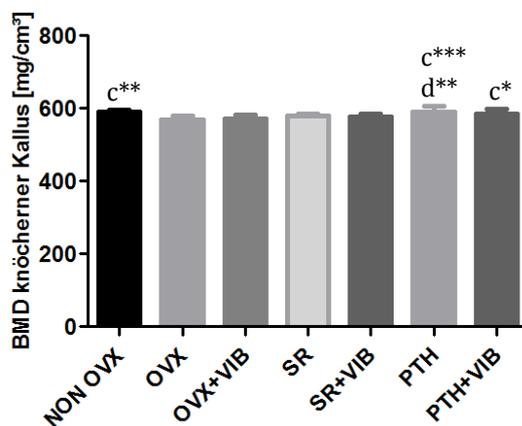
**Abbildung 20: Darstellung des Kortikalisvolumens [mm<sup>3</sup>] mit Standardabweichung.**

c= signifikant zu OVX, d= signifikant zu OVX+VIB, \*= p< 0,05, \*\*= p< 0,01, \*\*\*= p< 0,001

Gegenüber der Gruppe OVX zeigten die Gruppen NON-OVX, SR und SR+VIB signifikant, die Gruppe PTH hochsignifikant höhere Volumina. Der Unterschied zur Gruppe OVX+VIB erwies sich bei der Gruppe PTH+VIB als signifikant, bei den Gruppen NON-OVX, SR und SR+VIB als hochsignifikant und bei der Gruppe PTH als höchstsignifikant.

### 3.5.2 Knöcherner Kallus

#### 3.5.2.1 BMD



**Abbildung 21: Darstellung der BMD [mg/cm<sup>3</sup>] des knöchernen Kallus mit Standardabweichung.**

c= signifikant zu OVX, \*= p< 0,05, \*\*= p< 0,01, \*\*\*= p< 0,001

Die BMD des knöchernen Kallus der Gruppe NON-OVX war gegenüber der Gruppe OVX hochsignifikant, gegenüber der Gruppe OVX+VIB signifikant erhöht. Die Werte der Gruppe PTH zeigten sich im Vergleich zu denen der Gruppe OVX höchstsignifikant und im Vergleich zur Gruppe OVX+VIB hochsignifikant erhöht. Die Gruppe PTH+VIB zeigte außerdem signifikant höhere Werte als die Gruppe OVX.

### 3.5.2.2 Volumen

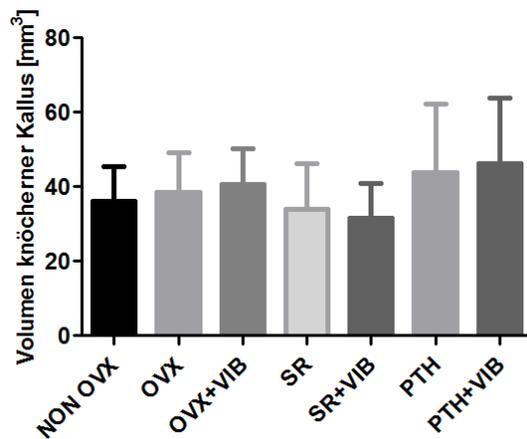


Abbildung 22: Darstellung des Volumens [mm<sup>3</sup>] des knöchernen Kallus mit Standardabweichung.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Gruppen bezüglich des knöchernen Kallusvolumens.

### 3.5.3 Weichgewebe

#### 3.5.3.1 BMD

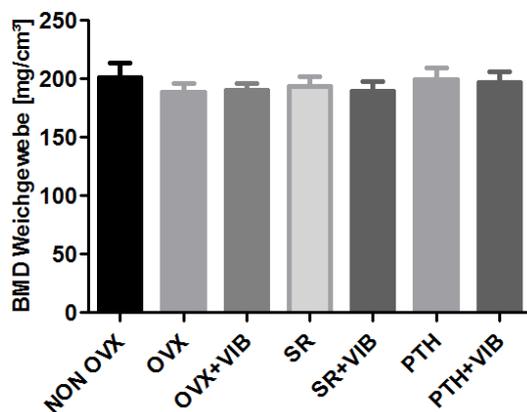


Abbildung 23: Darstellung der BMD [mg/cm<sup>3</sup>] des Weichgewebes mit Standardabweichung.

Bezüglich der BMD des Weichgewebes waren zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen.

### 3.5.3.2 Volumen

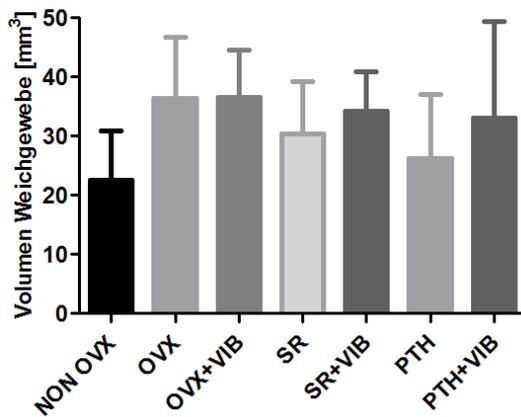


Abbildung 24: Darstellung des Weichgewebevolumens [mm<sup>3</sup>] mit Standardabweichung.

Bezüglich des Volumens des Weichgewebes waren zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Auffällig sind die hohen Standardabweichungen vor allem in der Gruppe PTH+VIB. Alle Gruppen zeigten ein höheres Weichgewebevolumen als die Kontrollgruppe NON-OVX.

### 3.5.4 Gesamter Kallus

#### 3.5.4.1 BMD

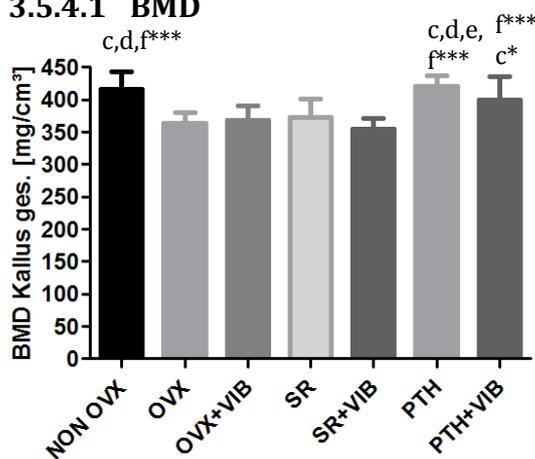


Abbildung 25: Darstellung der BMD [mg/cm<sup>3</sup>] des gesamten Kallus mit Standardabweichung. c= signifikant zu OVX, d= signifikant zu OVX+VIB, e= signifikant zu SR, f= signifikant zu SR+VIB, \*\*\*=p< 0,001

Die Kontrollgruppe NON-OVX zeigte bezogen auf den gesamten Kallus, also den knöchernen Kallus und das Weichgewebe zusammen, eine höchstsignifikant höhere BMD als die Gruppen OVX, OVX+VIB und SR+VIB sowie eine hochsignifikant höhere BMD als die Gruppe SR. Die BMD der Gruppe PTH war höchstsignifikant höher als die der Gruppen OVX, OVX+VIB, SR und SR+VIB. Außerdem zeigte die Gruppe PTH+VIB höchstsignifikant höhere Werte als die Gruppe SR+VIB sowie signifikant höhere Werte als die Gruppe OVX.

### 3.5.4.2 Volumen

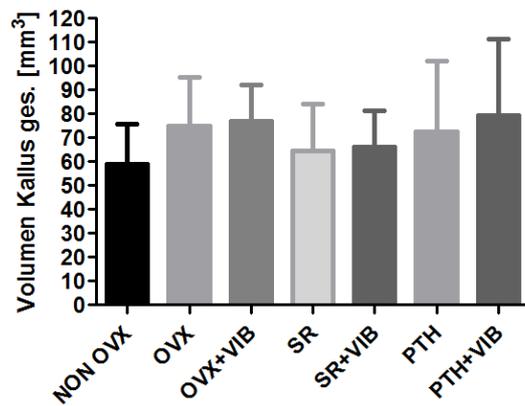


Abbildung 26: Darstellung des Volumens [mm<sup>3</sup>] des gesamten Kallus mit Standardabweichung.

Bezüglich des gesamten Kallusvolumens ergaben sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Auffällig sind die hohen Standardabweichungen in den Gruppen PTH und PTH+VIB. Die Kontrollgruppe NON-OVX zeigte das geringste gesamte Kallusvolumen.

### 3.5.5 Gesamter Knochenausschnitt

#### 3.5.5.1 BMD

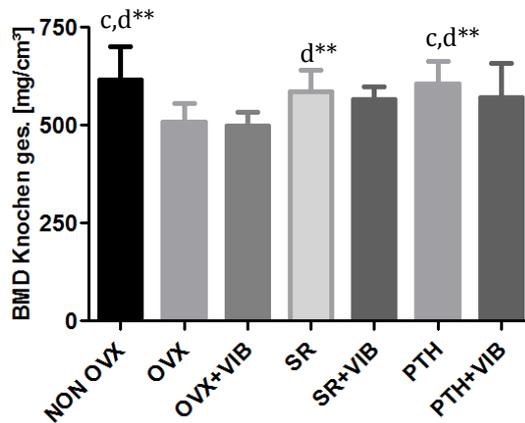


Abbildung 27: Darstellung der BMD [mg/cm<sup>3</sup>] des gesamten Knochenausschnittes mit Standardabweichung. c= signifikant zu OVX, d= signifikant zu OVX+VIB, \*\*= p< 0,01

Die BMD des gesamten Knochenausschnittes wurde in der Kontrollgruppe NON-OVX und in der Gruppe PTH hochsignifikant höher gemessen als in den Gruppen OVX und OVX+VIB. Auch die Gruppe SR zeigte hochsignifikant höhere Werte als die Gruppe OVX+VIB.

### 3.5.5.2 Volumen

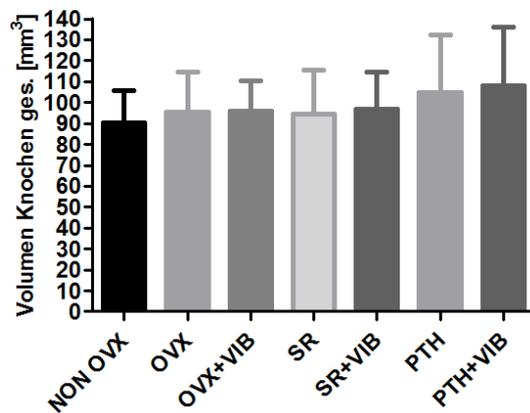


Abbildung 28: Darstellung des Volumens [mm<sup>3</sup>] des gesamten Knochenausschnittes mit Standardabweichung.

Hinsichtlich des Volumens des gesamten Knochenausschnittes zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Das größte Volumen wurde in der Gruppe PTH+VIB gemessen, das geringste Volumen zeigte die Gruppe NON-OVX.

### 3.5.6 BV/TV

#### 3.5.6.1 knöcherner Kallus/ gesamter Kallus

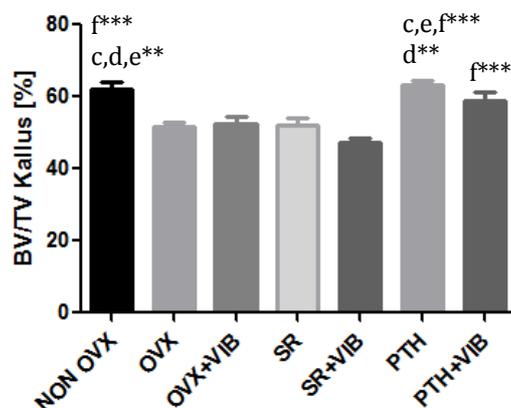
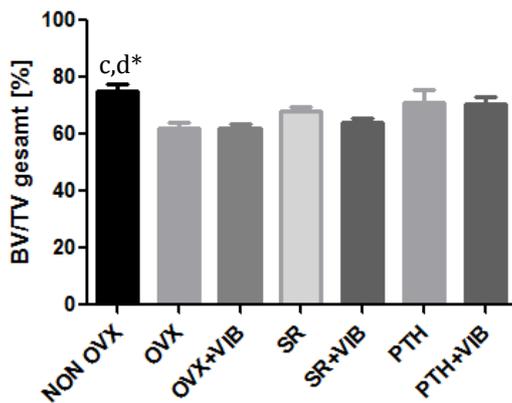


Abbildung 29: Darstellung von BV/TV [%] mit Standardabweichung. BV= knöcherner Kallus, TV= gesamter Kallus, c= signifikant zu OVX, d= signifikant zu OVX+VIB, e= signifikant zu SR, f= signifikant zu SR+VIB, \*\*=  $p < 0,01$ , \*\*\*=  $p < 0,001$

Der prozentuale Volumenanteil mineralisierten Gewebes gesamten Kallus war in der Gruppe NON-OVX höchstsignifikant größer als in der Gruppe SR+VIB sowie hochsignifikant größer als in den Gruppen OVX, OVX+VIB und SR. Auch die Gruppe PTH zeigte diesbezüglich höchstsignifikant höhere Werte als die Gruppen OVX, SR und SR+VIB sowie hochsignifikant höhere Werte als die der Gruppe OVX+VIB. Die Werte der Gruppe PTH+VIB waren lediglich gegenüber der Gruppe SR+VIB höchstsignifikant erhöht.

**3.5.6.2 Kortikalis und knöcherner Kallus/ gesamter Knochenausschnitt**



**Abbildung 30: Darstellung von BV/TV [%] mit Standardabweichung.** BV= Kortikalis+ knöcherner Kallus, TV= gesamter Knochenausschnitt, c= signifikant zu OVX, d= signifikant zu OVX+VIB, \*= p< 0,05

Der Volumenanteil mineralisierten Gewebes am gesamten Knochenausschnitt war in der Gruppe NON-OVX signifikant größer als in den Gruppen OVX und OVX+VIB. Bemerkenswert ist zudem die vergleichsweise hohe Standardabweichung der Gruppe PTH.

**3.5.7 Übersicht über die Ergebnisse der Untersuchung mittels MCT für die verschiedenen Gruppen und Knochenabschnitte**

**Tabelle 23: Mittelwerte± Standardabweichung von BMD [mg/cm<sup>3</sup>] und Volumen [mm<sup>3</sup>] der verschiedenen Knochenabschnitte.**

Parameter [Einheit]±SD	NON-OVX	OVX	OVX+VIB	SR	SR+VIB	PTH	PTH+VIB
BMD Kort. [mg/cm <sup>3</sup> ]	926,5 ±32,21	908,8 ±26,34	902 ±20,31	944,7 ±39,02 d*	948,8 ±16,23 c, d*	914,7 ±24,63	911,2 ±40,21
Vol. Kort. [mm <sup>3</sup> ]	31,25 ±10,45 c*, d**	20,51 ±4,01	18,88 ±3,25	30,17 ±5,92 c*, d**	30,77 ±5 c*, d**	31,97 ±7,82 c**, d***	28,89 ±8,64 d*
BMD kn. Kall. [mg/cm <sup>3</sup> ]	589,3 ±7,78 c**, d*	569,7 ±9,73	571,8 ±10,6	579,4 ±7,21	578,4 ±6,55	591,6 ±15,54 c***, d**	584,4 ±14,06 c*
Vol. kn. Kall. [mm <sup>3</sup> ]	36,24 ±9,18	38,55 ±10,75	40,58 ±9,76	34,12 ±12,2	31,57 ±9,44	43,82 ±18,5	46,37 ±17,51
BMD Weichg. [mg/cm <sup>3</sup> ]	201,3 ±12,53	189 ±7,39	190,5 ±5,71	193,9 ±8,12	189,5 ±8,05	199,4 ±9,99	196,8 ±9,49
Vol. Weichg. [mm <sup>3</sup> ]	22,58 ±8,32	36,36 ±10,39	36,6 ±7,97	30,36 ±8,83	34,31 ±6,62	26,3 ±19,86	33,12 ±16,31

Parameter [Einheit]±SD	NON- OVX	OVX	OVX+ VIB	SR	SR+ VIB	PTH	PTH+ VIB
BMD Kall. ges. [mg/cm <sup>3</sup> ]	416,4 ±26,67 c,d,f** *, e**	364,2 ±16,36	368 ±22,67	372,5 ±28,15	354,3 ±17,15	421 ±16,2 c, d, e, f***	399,9 ±35,19 f***, c*
Vol. Kall. ges. [mm <sup>3</sup> ]	58,94 ±16,71	74,95 ±20,43	76,92 ±15,19	64,48 ±19,59	66,01 ±15,32	72,71 ±29,64	79,49 ±31,97
BMD Kn. ges. [mg/cm <sup>3</sup> ]	617 ±83,28 c, d**	509,3 ±46,36	500 ±33,08	585,2 ±56,88 d**	565,8 ±33,02	606,1 ±58,22 c, d**	572,4 ±86,49
BMD Kn. ges. [mm <sup>3</sup> ]	90,19 ±15,5	95,4 ±19,25	95,79 ±14,4	94,72 ±20,96	96,89 ±17,76	104,7 ±27,74	108,2 ±27,94
BV/TV: kn. Kall./ Kall. ges [%]	62,2 ±5,86 f***, c,d,e**	51,52 ±3,76	52,63 ± 5,8	52,03 ±6,47	47,33 ±4,32	63,32 ±4,09 c,e,f***, d**	58,81 ±7,72 f***
BV/TV: Kort.+ kn. Kall/ Kn. ges. [%]	74,96 ±7,37 c,d*	62,33 ±4,83	62,24 ±4,94	67,99 ±5,2	64,21 ±3,79	71,18 ±15,11	70,57 ±8,2

c= signifikant zu OVX, d= signifikant zu OVX+VIB, e= signifikant zu SR, f= signifikant zu SR+VIB, \*= p< 0,05, \*\*= p< 0,01, \*\*\*=p< 0,001

## 3.6 Ergebnisse der Mikroradiographie

### 3.6.1 Gesamter Knochen

#### 3.6.1.1 Knochendurchmesser proximal

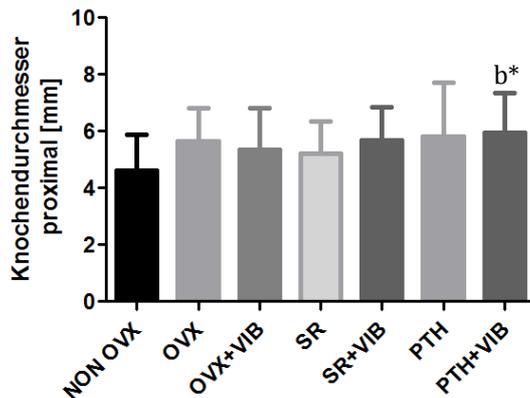


Abbildung 31: Darstellung des proximalen Knochendurchmessers [mm] mit Standardabweichung. b= signifikant zu NON-OVX, \*=  $p < 0,05$

Die Gruppe PTH+VIB zeigte einen signifikant höheren proximalen Knochendurchmesser als die Kontrollgruppe NON-OVX. Es lagen keine weiteren signifikanten Unterschiede unter den Gruppen bezüglich des proximalen Knochendurchmessers vor, insgesamt bot jedoch die Kontrollgruppe NON-OVX den geringsten Durchmesser.

#### 3.6.1.2 Knochendurchmesser distal

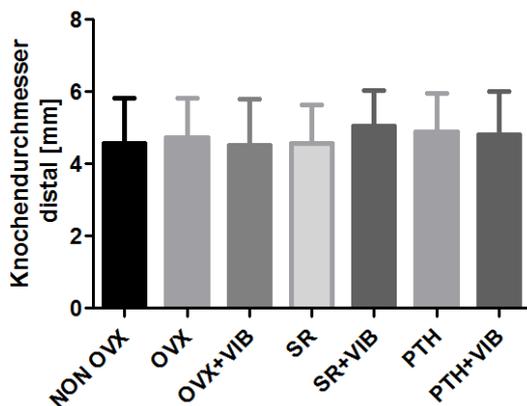


Abbildung 32: Darstellung des distalen Knochendurchmessers [mm] mit Standardabweichung.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich des distalen Knochendurchmessers waren nicht signifikant.

### 3.6.2 Kortikalis

#### 3.6.2.1 Kortikalisdicke ventral, distal

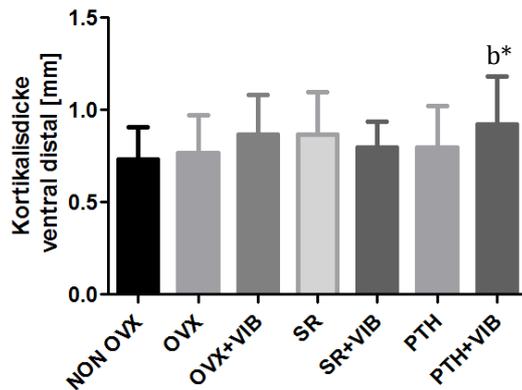


Abbildung 33: Darstellung der ventralen, distalen Kortikalisdicke [mm] mit Standardabweichung. b= signifikant zu NON-OVX, \*=  $p < 0,05$

Die Gruppe PTH+VIB zeigte eine signifikant dickere ventrale, distale Kortikalis als die Kontrollgruppe NON-OVX. Ansonsten bestanden diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

#### 3.6.2.2 Kortikalisdicke dorsal, distal

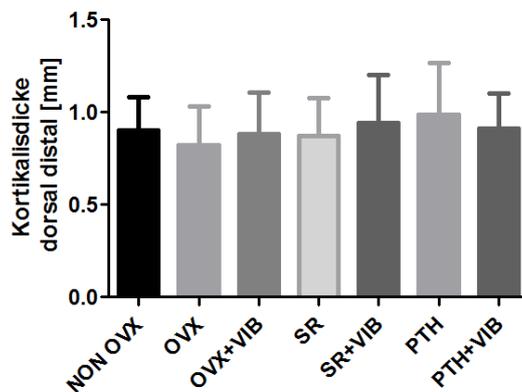


Abbildung 34: Darstellung der dorsalen, distalen Kortikalisdicke [mm] mit Standardabweichung.

Hinsichtlich der dorsalen, distalen Kortikalisdicke bestanden zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

### 3.6.2.3 Kortikalisdichte ventral, distal

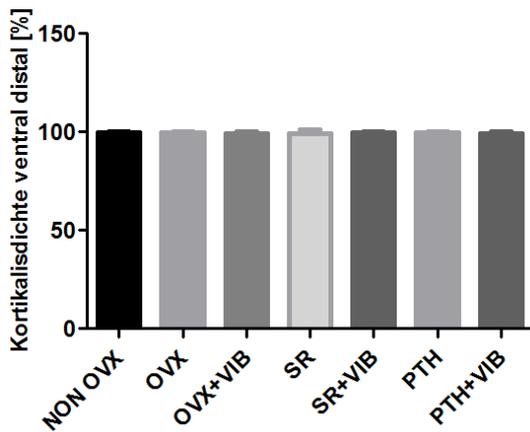


Abbildung 35: Darstellung der ventralen, distalen Kortikalisdichte [%] mit Standardabweichung.

Die Messung der ventralen, distalen Kortikalisdichte ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. In allen Gruppen betrug diese annähernd 100%.

### 3.6.2.4 Kortikalisdichte dorsal, distal

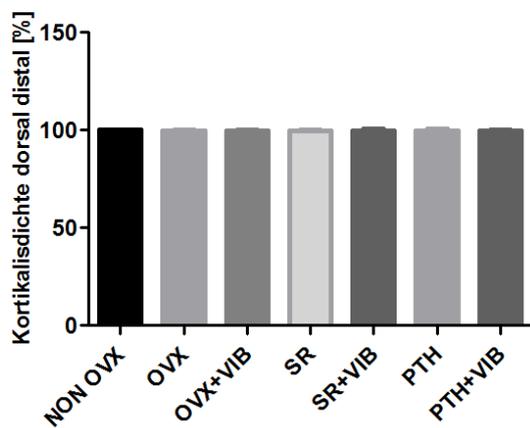


Abbildung 36: Darstellung der dorsalen, distalen Kortikalisdichte [%] mit Standardabweichung.

Auch die dorsale, distale Kortikalisdichte wies mit annähernd 100% in allen Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf.

### 3.6.3 Kallus

#### 3.6.3.1 Kallusdicke ventral

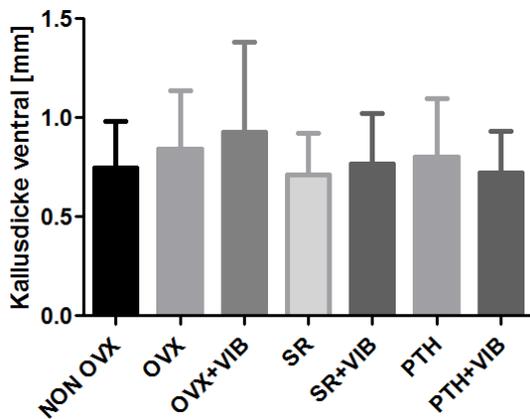


Abbildung 37: Darstellung der ventralen Kallusdicke [mm] mit Standardabweichung.

Bezüglich der ventralen Kallusdicke ergaben sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Bemerkenswert ist jedoch die hohe Standardabweichung der Gruppe OVX+VIB.

#### 3.6.3.2 Kallusdicke dorsal

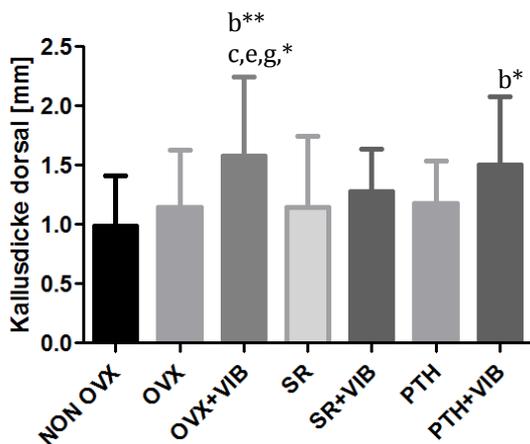
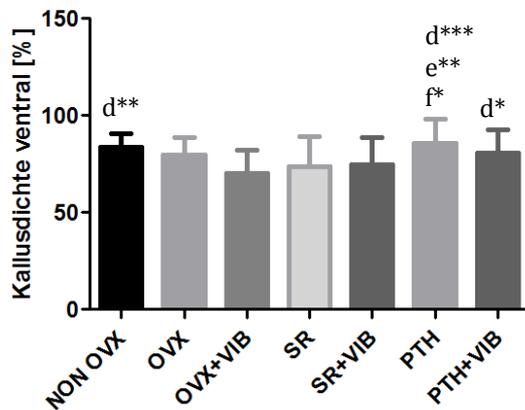


Abbildung 38: Darstellung der dorsalen Kallusdicke [mm] mit Standardabweichung.

b= signifikant zu NON-OVX, c= signifikant zu OVX, e= signifikant zu SR, g= signifikant zu PTH, \*=  $p < 0,05$ , \*\*=  $p < 0,01$

Bezüglich der dorsalen Kallusdicke ergaben sich für die Gruppe OVX+VIB hochsignifikant höhere Werte als für die Gruppe NON-OVX sowie signifikant höhere Werte als für die Gruppen OVX, SR und PTH. Auch die Gruppe PTH+VIB wies im Vergleich zu Kontrollgruppe NON-OVX signifikant höhere Werte auf.

### 3.6.3.3 Kallusdichte ventral

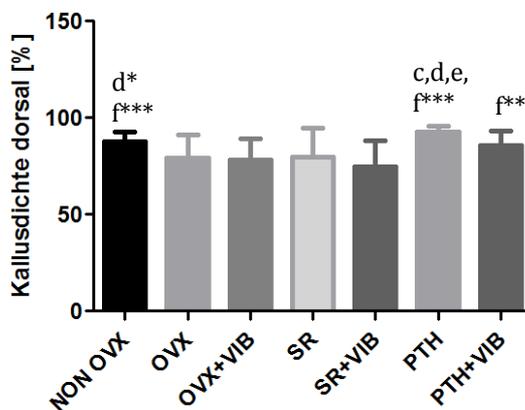


**Abbildung 39: Darstellung der ventralen Kallusdichte [%] mit Standardabweichung.**

d= signifikant zu OBV+VIB, e= signifikant zu SR, f= signifikant zu SR+VIB, \*=  $p < 0,05$ , \*\*=  $p < 0,01$ , \*\*\*=  $p < 0,001$

Bei der Untersuchung der ventralen Kallusdichte ergaben sich für die Kontrollgruppe NON-OVX hochsignifikant höhere Werte als für die Gruppe OVX+VIB. Die Werte der Gruppe PTH waren höchstsignifikant höher als die der Gruppe OVX, hochsignifikant höher als die der Gruppe SR sowie signifikant höher als die der Gruppe SR+VIB.

### 3.6.3.4 Kallusdichte dorsal



**Abbildung 40: Darstellung der dorsalen Kallusdichte [%] mit Standardabweichung.**

c= signifikant zu OVX, d= signifikant zu OBV+VIB, e= signifikant zu SR, f= signifikant zu SR+VIB, \*=  $p < 0,05$ , \*\*=  $p < 0,01$ , \*\*\*=  $p < 0,001$

Die Gruppe NON-OVX zeigte eine höchstsignifikant höhere dorsale Kallusdichte als die Gruppe SR+VIB sowie eine signifikant höhere dorsale Kallusdichte als die Gruppe OVX+VIB. Zudem waren die Werte der Gruppe PTH höchstsignifikant höher als die der Gruppen OVX, OVX+VIB, SR und SR+VIB. Die Gruppe PTH+VIB erreichte hochsignifikant höhere Werte als die Gruppe SR+VIB.

### 3.6.3.5 Kallusdichte endostal

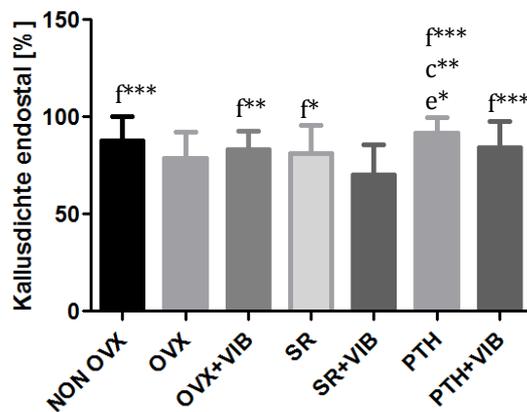


Abbildung 41: Darstellung der endostalen Kallusdichte [%] mit Standardabweichung.

c= signifikant zu OVX, e= signifikant zu SR, f= signifikant zu SR+VIB, \*= p< 0,05, \*\*= p< 0,01, \*\*\*= p< 0,001

Im Vergleich zur Gruppe SR+VIB zeigten die Gruppen NON-OVX, PTH und PTH+VIB höchstsignifikant, die Gruppe OVX+VIB hochsignifikant und die Gruppe SR signifikant höhere Werte für die endostale Kallusdichte. Außerdem wurde in der Gruppe OVX eine hochsignifikant sowie in der Gruppe SR eine signifikant geringere endostale Knochendichte gemessen als in der Gruppe PTH.

### 3.6.4 Trabekulärer Knochen distal

#### 3.6.4.1 Anzahl der Trabekelkreuzungen

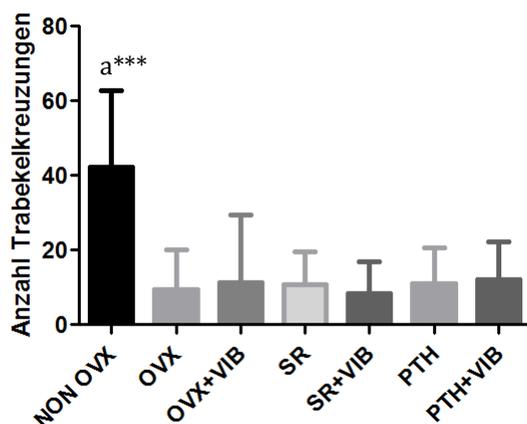


Abbildung 42: Darstellung der Anzahl der Trabekelkreuzungen mit Standardabweichung.

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

Die Anzahl der Trabekelkreuzungen des distalen trabekulären Knochens war in der Kontrollgruppe NON-OVX gegenüber allen anderen Gruppen höchstsignifikant erhöht. Zwischen den übrigen Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede. Die Gruppe OVX+VIB zeigte eine auffällig hohe Standardabweichung.

### 3.6.4.2 Dichte der Trabekelkreuzungen

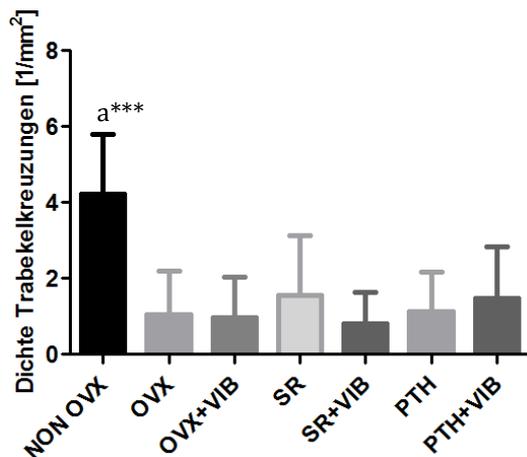


Abbildung 43: Darstellung der Dichte der Trabekelkreuzungen [1/mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung.

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

Ebenso wie die Anzahl, erwies sich auch die Dichte der Trabekelkreuzungen der Gruppe NON-OVX gegenüber den anderen Gruppen höchstsignifikant erhöht. Darüberhinaus zeigten sich keine Signifikanzen.

### 3.6.4.3 Dichte des trabekulären Knochens

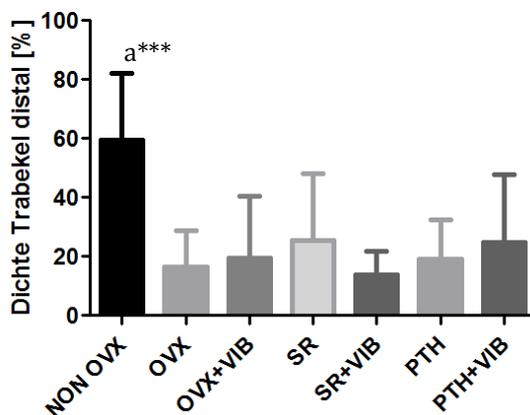


Abbildung 44: Darstellung der Dichte des distalen trabekulären Knochens [%] mit Standardabweichung. a= signifikant zu allen Gruppen, \*\*\*= p< 0,001

Für die Dichte des distalen trabekulären Knochens zeigten sich dieselben Signifikanzen wie für die der Anzahl und Dichte der Trabekelkreuzungen in diesem Bereich (vergl. 3.6.4.1 und 3.6.4.2).

### 3.6.4.4 Mittlere Trabekeldicke

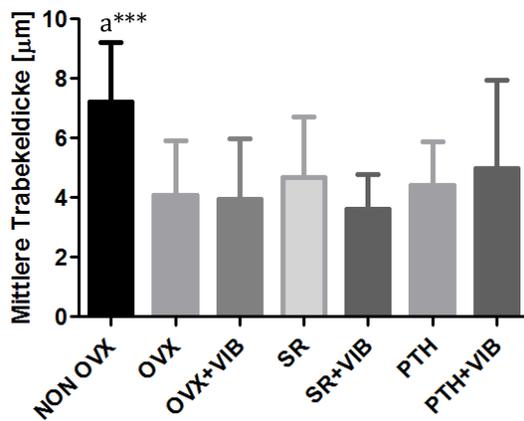


Abbildung 45: Darstellung der mittleren Trabekeldicke [µm] mit Standardabweichung. a= signifikant zu allen Gruppen, \*\*\*= p< 0,001

Auch bei der mittleren Trabekeldicke des distalen trabekulären Knochens zeigten sich dieselben Signifikanzen wie bei der Anzahl und Dichte der Trabekelkreuzungen in diesem Bereich. Die Gruppe PTH+VIB fiel durch eine hohe Standardabweichung auf

### 3.6.5 Übersicht über die Ergebnisse der Untersuchung mittels Mikroradiographie für die verschiedenen Gruppen und Knochenabschnitte

Tabelle 24: Mittelwerte± Standardabweichung der Parameter der Mikroradiographie.

Parameter [Einheit]± SD	NON-OVX	OVX	OVX+VIB	SR	SR+VIB	PTH	PTH+VIB
Kn.durchm. prox. [mm]	4,63 ±1,25	5,63 ±1,18	5,34 ±1,46	5,23 ±1,12	5,7 ±1,15	5,81 ±1,9	5,96 ±1,4 b*
Kn.durchm. dist. [mm]	4,58 ±1,26	4,73 ±1,11	4,53 ±1,27	4,58 ±1,06	5,06 ±0,98	4,9 ±1,07	4,81 ±1,2
Kort.dicke ventr. dist. [mm]	0,73 ±0,178	0,768 ±0,202	0,867 ±0,215	0,866 ±0,233	0,789 ±0,14	0,799 ±0,225	0,922 ±0,261 b*
Kort.dicke dors. dist. [mm]	0,905 ±0,178	0,822 ±0,21	0,881 ±0,228	0,875 ±0,202	0,943 ±0,258	0,985 ±0,28	0,913 ±0,19
Kort.dichte ventr. dist. [%]	99,92 ±0,157	99,81 ±0,596	99,11 ±1,164	99,3 ±1,975	99,59 ±0,887	99,87 ±0,207	99,24 ±1,168

Parameter [Einheit]± SD	NON- OVX	OVX	OVX+ VIB	SR	SR+ VIB	PTH	PTH+ VIB
Kort.dichte dors. dist. [%]	100 ±0	99,72 ±0,634	99,9 ±0,192	99,86 ±0,247	99,72 ±1,07	99,79 ±0,788	99,95 ±0,132
Kall.dicke ventr. [mm]	0,75 ±0,234	0,84 ±0,294	0,93 ±0,455	0,71 ±0,21	0,77 ±0,259	0,8 ±0,294	0,72 ±0,213
Kall.dicke dors. [mm]	0,99 ±0,426	1,14 ±0,481	1,58 ±0,665 b** c,e,g,*	1,15 ±0,602	1,28 ±0,359	1,18 ±0,353	1,5 ±0,575 b*
Kall.dichte ventr. [%]	83,93 ±0,87 d**	79,77 ±9,158	70,4 ±12,1	73,95 ±15,52	74,52 ±14,12	85,68 ±12,68 d***, e**, f*	80,62 ±12,15 d*
Kall.dichte dors. [%]	87,89 ±4,862 f***, d*	79,29 ±11,72	78,19 ±11,12	79,99 ±14,64	74,64 ±13,46	92,99 ±2,856 c,d,e, f***	85,58 ±7,504 f**
Kall.dichte endost. [%]	87,72 ±12,4 f***	78,8 ±13,24	83,05 ±9,615 f**	81,47 ±14,09 f*	70,1 ±15,88	91,91 ±7,818 f***, c**, e*	84,29 ±13,69 f***
Anz. Trab.kreuz.	42,3 ±20,48 a***	9,41 ±10,78	11,37 ±18,23	10,81 ±8,908	8,5 ±8,39	11 ±9,699	12 ±10,37
Dichte Trab.kreuz. [1/mm <sup>2</sup> ]	4,23 ±1,56 a***	1,04 ±1,164	0,96 ±1,09	1,55 ±1,578	0,82 ±0,835	1,13 ±1,036	1,48 ±1,356
Dichte trab. Kn. [%]	59,48 ±22,84 a***	16,44 ±12,46	19,65 ±20,73	25,6 ±22,56	13,82 ±8,179	19,06 ±13,47	24,93 ±22,93
Mittl. Trab.dicke [µm]	7,23 ±1,969 a***	4,1 ±1,829	3,95 ±2,026	4,68 ±2,032	3,6 ±1,167	4,42 ±1,448	5 ±2,956

a= signifikant zu allen Gruppen, b= signifikant zu NON-OVX, c= signifikant zu OVX, d= signifikant zu OVX+VIB, e= signifikant zu SR, f= signifikant zu SR+VIB, g= signifikant zu PTH, \*=  $p < 0,05$ , \*\*=  $p < 0,01$ , \*\*\*=  $p < 0,001$

### 3.7 Ergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung

#### 3.7.1 Ventraler Kallus

##### 3.7.1.1 Gesamtfläche

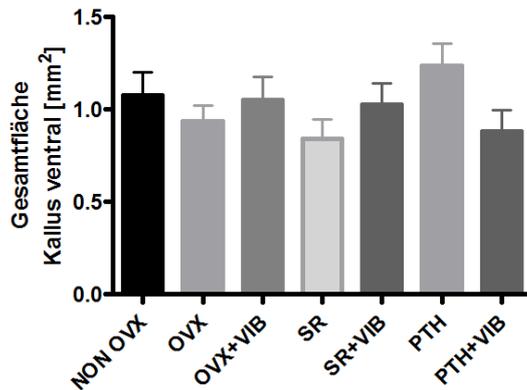


Abbildung 46: Darstellung der gesamten ventralen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung.

Hinsichtlich der gesamten ventralen Kallusfläche ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

##### 3.7.1.2 CG-markierte Fläche

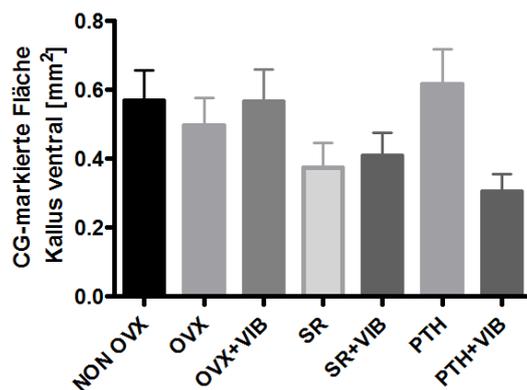


Abbildung 47: Darstellung der CG-markierten ventralen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die CG-markierte Fläche des ventralen Kallus. Die Gruppe PTH erzielte die höchsten Werte, die Gruppe PTH+VIB die niedrigsten.

### 3.7.1.3 AK-markierte Fläche

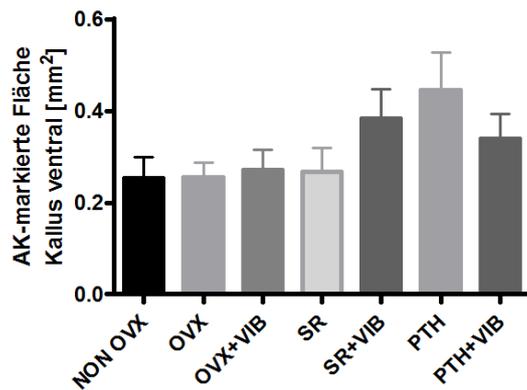


Abbildung 48: Darstellung der AK-markierten ventralen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung.

Hinsichtlich der AK-markierten ventralen Kallusfläche wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen. Die Gruppe PTH erreichte die höchsten Werte.

### 3.7.1.4 TC-markierte Fläche

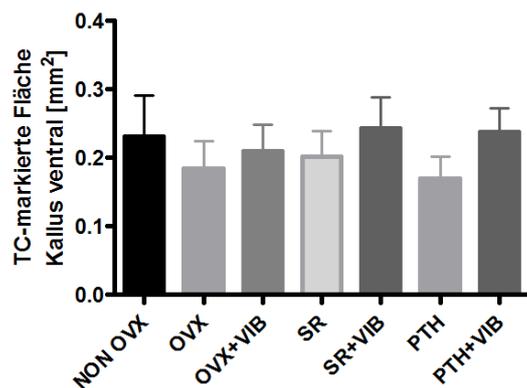


Abbildung 49: Darstellung der TC-markierten ventralen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der TC-markierten ventralen Kallusfläche gemessen.

3.7.1.5 Übersicht der fluoreszenzmarkierten Flächen des ventralen Kallus

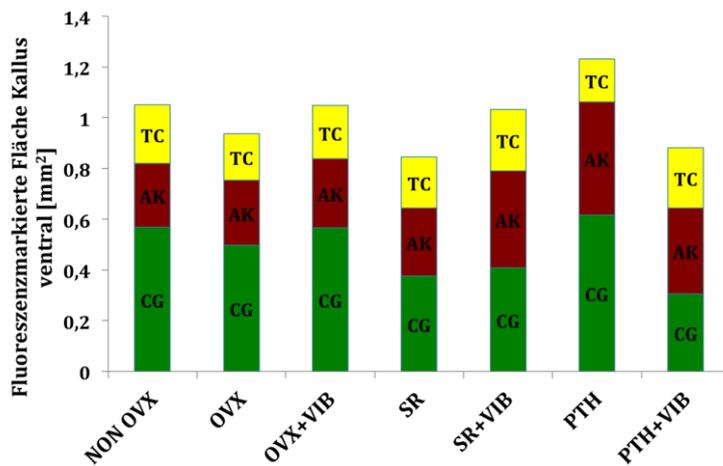


Abbildung 50: Gesamte fluoreszenzmarkierte Flächen des ventralen Kallus [mm²].

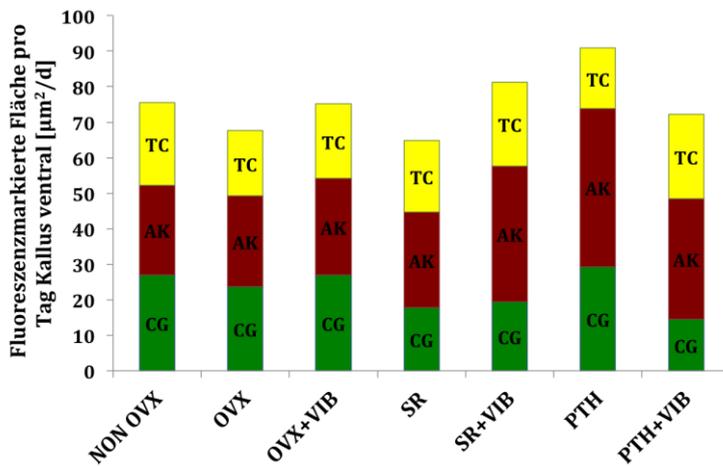
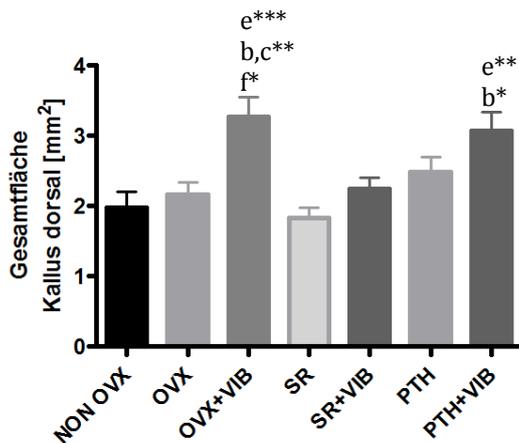


Abbildung 51: Pro Tag fluoreszenzmarkierte Flächen des ventralen Kallus [µm²/d].

Hinsichtlich der Verteilung der Fluoreszenzfarbstoffe im ventralen Kallus zeigten sich keine Signifikanzen.

### 3.7.2 Dorsaler Kallus

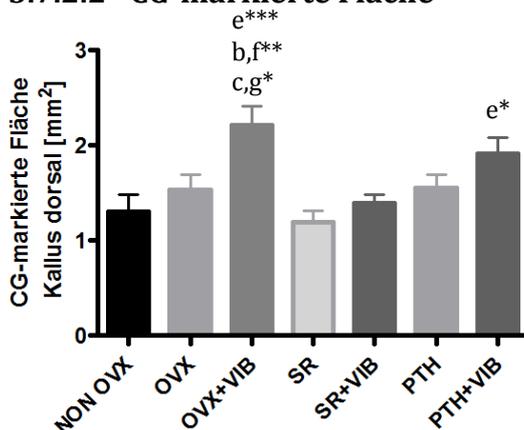
#### 3.7.2.1 Gesamtfläche



**Abbildung 52: Darstellung der gesamten dorsalen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung.** b= signifikant zu NON-OVX, c= signifikant zu OVX, e= signifikant zu SR, f= signifikant zu SR+VIB, \*= p< 0,05, \*\*= p< 0,01, \*\*\*= p< 0,001

Bezüglich der gesamten dorsalen Kallusfläche zeigte die Gruppe OVX+VIB gegenüber der Gruppe SR höchstsignifikant, gegenüber den Gruppen NON-OVX und OVX hochsignifikant sowie gegenüber der Gruppe SR+VIB signifikant höhere Werte. Zudem wurde für die Gruppe PTH+VIB eine hochsignifikant größere Fläche gemessen als für die Gruppe SR sowie eine signifikant größere Fläche als für die Gruppe NON-OVX.

#### 3.7.2.2 CG-markierte Fläche



**Abbildung 53: Darstellung der CG-markierten dorsalen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung.** b= signifikant zu NON-OVX, c= signifikant zu OVX, e= signifikant zu SR, f= signifikant zu SR+VIB, g= signifikant zu PTH, \*= p< 0,05, \*\*= p< 0,01, \*\*\*= p< 0,001

Die Unterschiede bezüglich der CG-markierten dorsalen Kallusfläche erwiesen sich für die Gruppe OVX+VIB als höchstsignifikant gegenüber der Gruppe SR, hochsignifikant gegenüber den Gruppen NON-OVX und SR+VIB sowie signifikant

gegenüber den Gruppen OVX und PTH. Die Gruppe PTH+VIB zeigte eine signifikant größere CG-markierte Fläche als die Gruppe SR.

### 3.7.2.3 AK-markierte Fläche

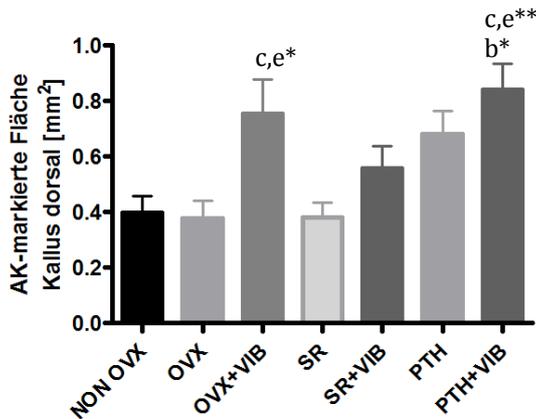


Abbildung 54: Darstellung der AK-markierten dorsalen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung. b= signifikant zu NON-OVX, c= signifikant zu OVX, e= signifikant zu SR, \*= p< 0,05, \*\*= p< 0,01

Die Gruppe OVX+VIB zeigte eine signifikant größere AK-markierte dorsale Kallusfläche als die Gruppen OVX und SR. Die Werte der Gruppe PTH+VIB waren gegenüber denen der Gruppen OVX und SR hochsignifikant und signifikant gegenüber der Gruppe NON-OVX.

### 3.7.2.4 TC-markierte Fläche

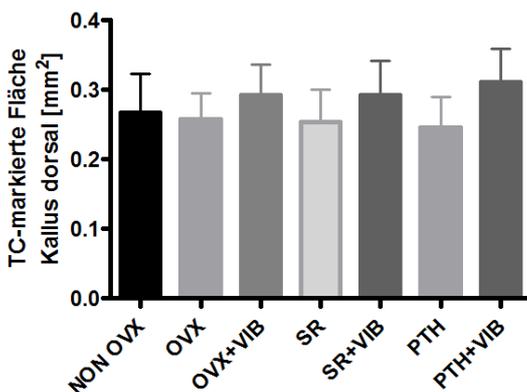
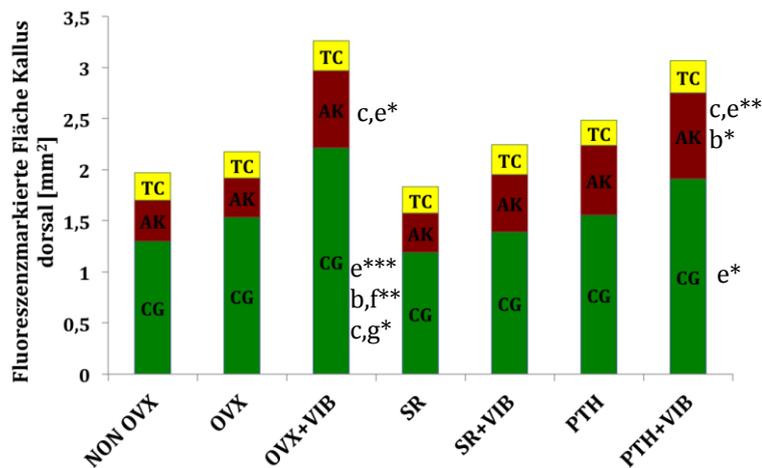


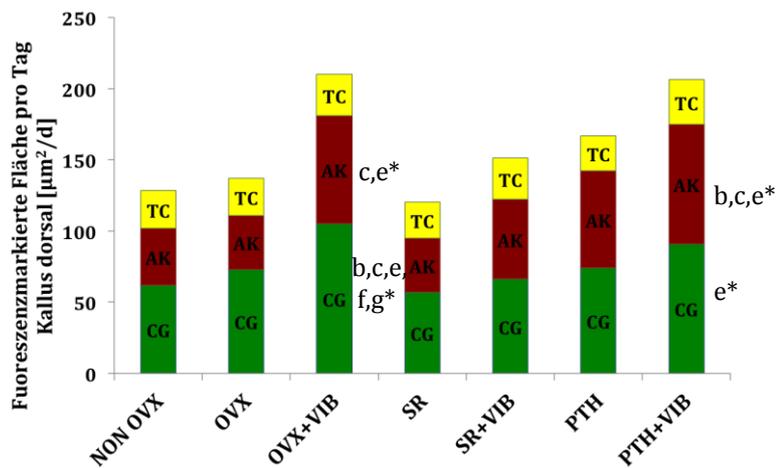
Abbildung 55: Darstellung der TC-markierten dorsalen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung.

Auch die Werte hinsichtlich der TC-markierten dorsalen Kallusfläche ergaben keine signifikanten Unterschiede.

### 3.7.2.5 Übersicht der fluoreszenzmarkierten Flächen des dorsalen Kallus



**Abbildung 56: Gesamte fluoreszenzmarkierte Flächen des dorsalen Kallus [mm²].** b= signifikant zu NON-OVX, c= signifikant zu OVX, e= signifikant zu SR, f= signifikant zu SR+VIB, g= signifikant zu PTH, \*= p< 0,05, \*\*= p< 0,01, \*\*\*= p< 0,001

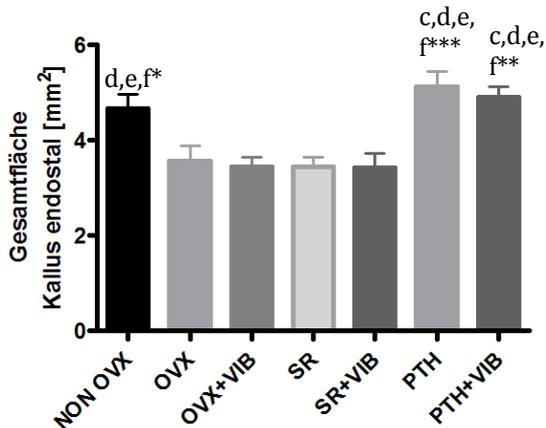


**Abbildung 57: Pro Tag fluoreszenzmarkierte Flächen des dorsalen Kallus [µm²/d].** b= signifikant zu NON-OVX, c= signifikant zu OVX, e= signifikant zu SR, f= signifikant zu SR+VIB, g= signifikant zu PTH, \*= p< 0,05

Im Zeitraum von Tag 0 bis 22 wurde in der Gruppe OVX+VIB am dorsalen Kallus täglich signifikant mehr Kallusgewebe gebildet als in den Gruppen NON-OVX, OVX, SR, SR+VIB und PTH. Im selben Zeitraum entstand in der Gruppe PTH+VIB signifikant mehr dorsales Kallusgewebe als in der Gruppe SR. Von Tag 23-32 zeigte die Gruppen OVX+VIB und PTH+VIB zudem eine stärkere tägliche dorsale Kallusbildung als die Gruppen OVX und SR. Die Werte der Gruppe PTH+VIB verhielten sich diesbezüglich außerdem signifikant gegenüber denen der Gruppe NON-OVX.

### 3.7.3 Endostaler Kallus

#### 3.7.3.1 Gesamte Fläche

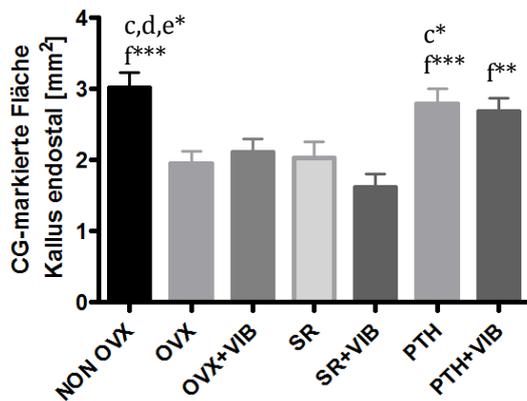


**Abbildung 58:** Darstellung der gesamten endostalen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung.

c= signifikant zu OVX, d= signifikant zu OVX+VIB, e= signifikant zu SR, f= signifikant zu SR+VIB, \*= p < 0,05, \*\*= p < 0,01, \*\*\*= p < 0,001

Die Kontrollgruppe NON-OVX zeigte eine signifikant größere endostale Kallusfläche als die Gruppen OVX+VIB, SR und SR+VIB. Für die Gruppen OVX, OVX+VIB, SR und SR+VIB ergab sich eine höchstsignifikant kleinere endostale Kallusfläche als für die Gruppe PTH sowie eine hochsignifikant kleinere Fläche als für die Gruppe PTH+VIB.

#### 3.7.3.2 CG-markierte Fläche



**Abbildung 59:** Darstellung der CG-markierten endostalen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung. c= signifikant zu OVX, d= signifikant zu OVX+VIB, e= signifikant zu SR, f= signifikant zu SR+VIB, \*= p < 0,05, \*\*= p < 0,01

Gegenüber den Gruppen OVX, OVX+VIB und SR ergab sich für die Kontrollgruppe NON-OVX eine signifikant größere CG-markierte endostale Kallusfläche. Die Flächen der Gruppe PTH zeigten sich signifikant größer als die der Gruppe OVX. Verglichen mit der Gruppe SR+VIB erwies sich die CG-markierte endostale Kallusfläche der Gruppen NON-OVX und PTH als höchstsignifikant größer, die der Gruppe PTH+VIB als hochsignifikant größer.

### 3.7.3.3 AK-markierte Fläche

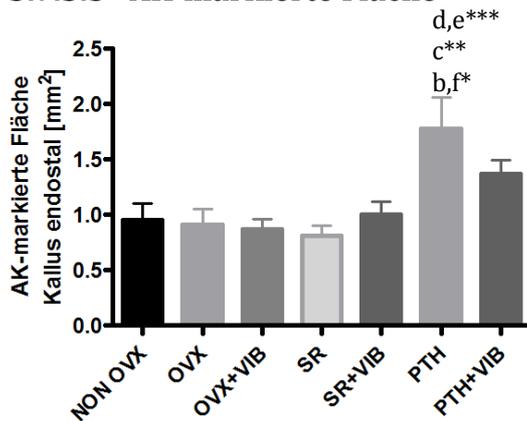


Abbildung 60: Darstellung der AK-markierten endostalen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung. b= signifikant zu NON-OVX, c= signifikant zu OVX, d= signifikant zu OVX+VIB, e= signifikant zu SR, f= signifikant zu SR+VIB, \*= p< 0,05, \*\*= p< 0,01. \*\*\*= p< 0,001

Die Gruppe PTH zeigte eine höchstsignifikant größere AK-markierte endostale Kallusfläche als die Gruppen OVX+VIB und SR, eine hochsignifikant größere Fläche als die Gruppe OVX und eine signifikant größere Fläche als die Gruppen NON-OVX und SR+VIB.

### 3.7.3.4 TC-markierte Fläche

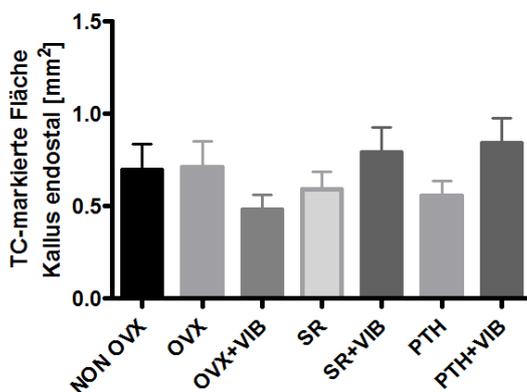
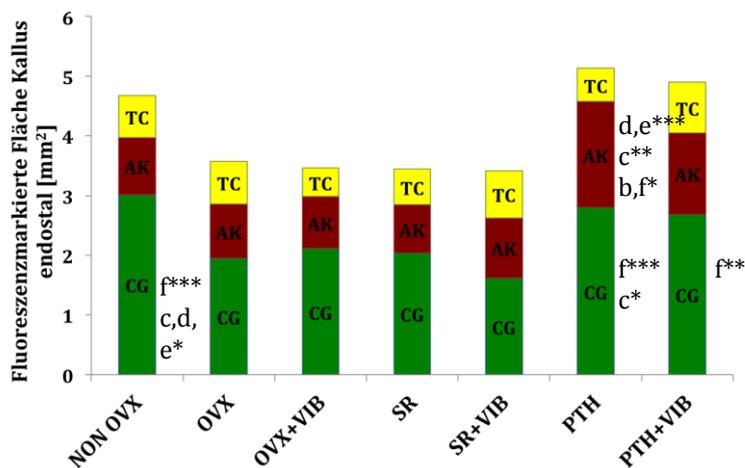


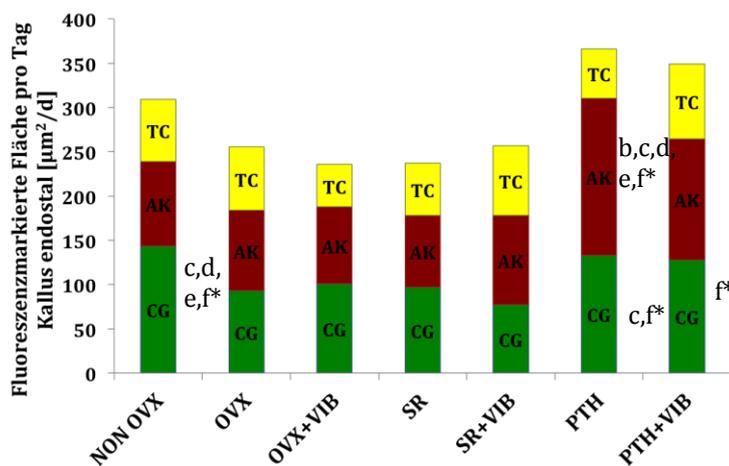
Abbildung 61: Darstellung der TC-markierten endostalen Kallusfläche [mm<sup>2</sup>] mit Standardabweichung.

Hinsichtlich der TC-markierten endostalen Kallusfläche ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, jedoch wies die Gruppe OVX+VIB die geringste Fläche auf.

### 3.7.3.5 Übersicht der fluoreszenzmarkierten Flächen des endostalen Kallus



**Abbildung 62: Gesamte fluoreszenzmarkierte Flächen des endostalen Kallus [mm²].** b= signifikant zu NON-OVX, c= signifikant zu OVX, d= signifikant zu OVX+VIB, e= signifikant zu SR, f= signifikant zu SR+VIB, \*= p< 0,05, \*\*= p< 0,01, \*\*\*= p< 0,001



**Abbildung 63: Pro Tag fluoreszenzmarkierte Flächen des endostalen Kallus [µm²/d].** b= signifikant zu NON-OVX, c= signifikant zu OVX, d= signifikant zu OVX+VIB, e= signifikant zu SR, f= signifikant zu SR+VIB, \*= p< 0,05

Von Tag 0-22 war die tägliche Produktion von endostalem Kallusgewebe der Gruppe NON-OVX signifikant höher als die der Gruppen OVX, OVX+VIB, SR und SR+VIB. Auch die Gruppe PTH zeigte diesbezüglich signifikant höhere Werte als die Gruppen OVX und SR+VIB, die Gruppe PTH+VIB zeigte diesbezüglich lediglich Signifikanzen gegenüber der Gruppe SR+VIB. Zudem wurde im Zeitraum von Tag 23-32 in der Gruppe PTH+VIB täglich signifikant mehr endostales Kallusgewebe gebildet als in den GruppenNON-OVX, OVX, OVX+VIB, SR und SR+VIB.

### 3.7.4 Übersicht über die Ergebnisse der Untersuchung mittels polychromer Sequenzmarkierung für die verschiedenen Gruppen und Kallusabschnitte

Tabelle 25: Mittelwerte± Standardabweichung der Parameter des ventralen Kallus.

Parameter [Einheit]±SD	NON-OVX	OVX	OVX+ VIB	SR	SR+ VIB	PTH	PTH+ VIB
Ges.fl. Kallus ventr. [mm <sup>2</sup> ]	1,078 ±0,592	0,939 ±0,466	1,053 ±0,721	0,844 ±0,599	1,028 ±0,648	1,238 ±0,682	0,881 ±0,639
CG-mark. Fl. ventr. [mm <sup>2</sup> ]	0,568 ±0,43	0,497 ±0,442	0,567 ±0,54	0,376 ±0,41	0,408 ±0,377	0,616 ±0,578	0,305 ±0,284
CG-mark. Fl. ventr./ Tag [µm <sup>2</sup> /d]	27,07 ±20,49	23,67 ±21,04	27 ±25,7	17,89 ±19,55	19,44 ±17,93	29,35 ±27,53	14,53 ±13,54
AK-mark. Fl. ventr. [mm <sup>2</sup> ]	0,252 ±0,222	0,256 ±0,17	0,271 ±0,253	0,268 ±0,296	0,383 ±0,357	0,446 ±0,457	0,339 ±0,291
AK-mark. Fl. ventr./ Tag [µm <sup>2</sup> /d]	25,24 ±22,21	25,56 ±16,96	27,12 ±25,3	26,78 ±29,63	38,26 ±35,65	44,56 ±45,67	33,93 ±29,1
TC-mark. Fl. ventr. [mm <sup>2</sup> ]	0,232 ±0,288	0,184 ±0,218	0,21 ±0,218	0,202 ±0,214	0,243 ±0,252	0,17 ±0,185	0,238 ±0,188
TC-mark. Fl. ventr./ Tag [µm <sup>2</sup> /d]	23,17 ±28,8	18,44 ±21,75	21,02 ±21,82	20,21 ±21,43	23,55 ±25,13	16,96 ±18,47	23,8 ±18,75

Tabelle 26: Mittelwerte± Standardabweichung der Parameter des dorsalen Kallus.

Parameter [Einheit]±SD	NON-OVX	OVX	OVX+ VIB	SR	SR+ VIB	PTH	PTH+ VIB
Ges.fl. Kallus dors. [mm <sup>2</sup> ]	1,980 ±1,107	2,173 ±0,883	3,271 ±1,618 e***, b,c**, f*	1,832 ±0,848	2,246 ±0,891	2,488 ±1,189	3,067 ±1,469 e**,b*
CG-mark. Fl. dors. [mm <sup>2</sup> ]	1,302 ±0,9	1,537 ±0,863	2,214 ±1,153 e***, b,f**, c,g*	1,196 ±0,676	1,393 ±0,522	1,557 ±0,789	1,915 ±0,954 e*

Parameter [Einheit]±SD	NON- OVX	OVX	OVX+ VIB	SR	SR+ VIB	PTH	PTH+ VIB
CG-mark. Fl. dors./ Tag [µm <sup>2</sup> /d]	62 ±42,81	73,19 ±41,1	105,43 ±54,88 b,c,e,f,g*	56,94 ±32,21	66,33 ±24,84	74,14 ±37,56	91,17 ±45,41 e*
AK-mark. Fl. dors. [mm <sup>2</sup> ]	0,399 ±0,289	0,38 ±0,338	0,756 ±703 c,e*	0,382 ±0,311	0,56 ±0,44	0,682 ±0,46	0,841 ±0,523 c,e**, b*
AK-mark. Fl. dors./ Tag [µm <sup>2</sup> /d]	39,86 ±28,9	37,95 ±33,76	75,61 ±70,26 c,e*	38,19 ±31,12	55,95 ±44,03	68,22 ±46,02	84,07 ±52,31 b,c,e*
TC-mark. Fl. dors. [mm <sup>2</sup> ]	0,268 ±0,266	0,258 ±0,202	0,293 ±0,256	0,254 ±0,268	0,293 ±0,276	0,246 ±0,253	0,311 ±0,264
Tc-mark. Fl. dors./ Tag [µm <sup>2</sup> /d]	26,75 ±26,58	25,78 ±20,21	29,27 ±25,6	25,38 ±26,8	29,26 ±27,58	24,58 ±25,27	31,14 ±26,36

b= signifikant zu NON-OVX, c= signifikant zu OVX, e= signifikant zu SR, f= signifikant zu SR+VIB, g= signifikant zu PTH, \*= p< 0,05, \*\*= p< 0,01. \*\*\*= p< 0,001

Tabelle 27: Mittelwerte± Standardabweichung der Parameter des endostalen Kallus.

Parameter [Einheit]±SD	NON- OVX	OVX	OVX+ VIB	SR	SR+ VIB	PTH	PTH+ VIB
Ges.fl. Kallus endost. [mm <sup>2</sup> ]	4,677 ±1,36 d,e,f*	3,575 ±1,695	3,453 ±1,171	3,444 ±1,182	3,422 ±1,7	5,138 ±1,723 c,d,e, f***	4,908 ±1,166 c,d,e,f**
CG-mark. Fl. endost. [mm <sup>2</sup> ]	3,017 ±1,036 c,d,e*, f***	1,95 ±0,952	2,115 ±1,101	2,040 ±1,301	1,62 ±1,025	2,798 ±1,152 f***, c*	2,684 ±1,043 f**
CG-mark. Fl. endost./ Tag [µm <sup>2</sup> /d]	143,69 ±49,35 c,d,e,f*	92,86 ±45,35	100,71 ±52,45	97,14 ±61,96	77,14 ±48,8	133,23 ±54,85 c,f*	127,79 ±49,69 f*
AK-mark. Fl. endost. [mm <sup>2</sup> ]	0,956 ±0,725	0,912 ±0,781	0,872 ±0,522	0,81 ±0,546	1,007 ±0,645	1,776 ±0,165 d,e*** c** b,f*	1,371 ±0,67

Parameter [Einheit]±SD	NON-OVX	OVX	OVX+VIB	SR	SR+VIB	PTH	PTH+VIB
AK-mark. Fl. endost./ Tag [µm <sup>2</sup> /d]	95,64 ±72,46	91,19 ±78,07	87,15 ±52,16	81 ±54,6	100,71 ±64,51	177,56 ±161,54 b,c,d,e, f*	137,1 ±66,95
TC-mark. Fl. endost. [mm <sup>2</sup> ]	0,699 ±0,656	0,7124 ±0,773	0,48 ±0,481	0,59 ±0,547	0,79 ±0,759	0,556 ±0,471	0,841 ±0,746
TC-mark. Fl. endost./ Tag [µm <sup>2</sup> /d]	69,91 ±65,6	71,24 ±77,34	48,01 ±48,1	59,03 ±54,68	79,03 ±75,86	55,58 ±47,05	84,13 ±74,61

c= signifikant zu OVX, d= signifikant zu OVX+VIB, e= signifikant zu SR, f= signifikant zu SR+VIB, g= signifikant zu PTH, \*= p< 0,05, \*\*= p< 0,01. \*\*\*= p< 0,001

### 3.7.5 Zeitpunkt der frühesten knöchernen Frakturspaltüberbrückung

Tabelle 28: Zeitpunkt der frühesten knöchernen Frakturspaltüberbrückung [d] mit Mittelwert.

X= fehlende Frakturspaltüberbrückung

Parameter [Einheit]	NON-OVX	OVX	OVX+VIB	SR	SR+VIB	PTH	PTH+VIB
<b>Tag der frühesten Frakturspaltüberbrückung aller Versuchstiere [d]</b>	20	27	20	25	23	18	19
	20	20	23	22	20	22	20
	14	16	34	20	24	20	20
	20	20	21	32	40	21	41
	14	14	18	24	20	25	34
	19	21	19	14	19	26	X
	29	26	24	42	32	21	30
	22	22	21	20	20	18	14
		20	24	23	X	20	18
		24	21	34	30	20	20
		21	20	30	20		
<b>Mittelwert [d]</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>21</b>	<b>24</b>

Während bei den Gruppen OVX, OVX+VIB und PTH – ähnlich wie bei der Kontrollgruppe NON-OVX – die früheste knöcherne Frakturspaltüberbrückung im Mittel bereits nach 20-22 Tagen zu beobachten war, erwies sie sich bei den Gruppen SR, SR+VIB und PTH+VIB mit 24-26 Tagen als deutlich verzögert. Zudem trat in Gruppen SR+VIB und PTH+VIB jeweils ein Fall von fehlender Überbrückung auf.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die ovariectomierte Ratte als osteoporotisches Tiermodell

Die ovariectomierte Ratte ist ein seit langem anerkanntes Modell zur Erforschung der postmenopausalen Osteoporose sowie der damit verbundenen präventiven und therapeutischen Interventionen. Anhand dieses Modells lässt sich über einen Zeitraum von bis zu zwölf Monaten der postmenopausale Verlust trabekulärer Knochenmasse beim Menschen simulieren. Über diesen Zeitraum hinaus weichen die ossären Veränderungen bei der Ratte jedoch deutlich von den beim Menschen beobachteten Veränderungen ab (Thompson et al. 1995). Wronski et al. wiesen nach, dass der Verlust trabekulären Knochens nach Ovariectomie biphasisch verläuft. In den ersten zehn Tagen nach Ovariectomie fiel die BMD zunächst rapide ab. Auf eine Phase der relativen Stabilisierung auf einem osteopenen Plateau folgte eine diesmal langsamer fortschreitende Verringerung der BMD sowie eine Abnahme des trabekulären Volumens. Die Abnahme der BMD war in beiden Phasen durch eine erhöhte Remodeling-Rate bedingt (Wronski et al. 1989).

Eine Gradeinteilung des Knochenschwundes anhand des T-Scores und damit eine Unterscheidung von Osteopenie und Osteoporose, wie sie am Menschen vorgenommen wird, ist im Tiermodell nicht sinnvoll, da hier die Referenzgruppe zur Festlegung eines Normwertes fehlt. Die ossären Strukturveränderungen der Ratte nach Ovariectomie werden in dieser Arbeit als Osteopenie beschrieben.

Die FDA-Richtlinien (FDA 1994) empfehlen die präklinische Erforschung potenziell antiosteoporotischer Substanzen an der ovariectomierten Ratte sowie an einem weiteren Tiermodell, welches nicht der Gruppe der Nagetiere zuzurechnen ist (FDA 1994). Hierfür eignen sich vor allem die Untersuchung von proximaler Tibia, distalem Femur und der Lendenwirbelsäule, da der durch Estrogenmangel verursachte Verlust an trabekulärer Knochenmasse besonders in diesen Bereichen nachweisbar ist (Thompson et al. 1995).

Für diese Arbeit wurden Tiere der Rasse Sprague-Dawley verwendet, da sich diese Rasse der ebenso häufig als Osteoporosemodell verwendeten Rasse Wistar durch einen stärkeren Einfluss der Ovariectomie auf Körperfettanteil und vertebrale Knochendichte überlegen zeigt (Fang et al. 2015).

Bei Versuchsbeginn waren die Tiere allesamt zwölf Wochen alt. Vorangegangene Versuche hatten erwiesen, dass die Tiere in diesem Alter sowohl ihre Peak-Bone-Mass, als auch die Geschlechtsreife erreicht haben. Dies sind wichtige Voraussetzungen für die Simulation eines Knochenmasseverlustes durch einen Mangel an Sexualhormonen (Johnston und Ward 2015). Zwar ist das Körperwachstum der Ratten mit zwölf Wochen noch nicht abgeschlossen, dies hat

jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Vergleichbarkeit der Messparameter (Leitner et al. 2009).

## 4.2 Das metaphysäre Frakturmodell

In der Vergangenheit wurde zur Erforschung osteoporotischer Frakturen weitestgehend ein diaphysäres Frakturmodell verwendet. Tatsächlich entstehen osteoporotische Frakturen beim Menschen jedoch vornehmlich an der Wirbelsäule oder im metaphysären Bereich der langen Röhrenknochen, des proximalen Femur, des proximalen Humerus oder des distalen Radius. Dies ist bedingt durch den größeren Anteil an trabekulärem Knochen in diesen Bereichen, während diaphysär der kortikale Anteil überwiegt. Der postmenopausale Verlust an Knochenmasse spielt sich vornehmlich an trabekulären Knochenstrukturen ab und ist damit am ehesten im Bereich der Metaphyse abzubilden. Demnach liegt es nahe, osteoporotische Veränderungen sowie die Heilung osteoporotischer Frakturen am metaphysären Knochen zu erforschen.

Vergleicht man die metaphysäre mit der diaphysären Frakturheilung, fallen wesentliche Unterschiede auf. Die diaphysäre Frakturheilung erfolgt entweder indirekt von Seiten des Periosts unter Bildung eines knöchernen Kallus oder im Falle einer stabilen Osteosynthese direkt durch die Bildung längsverlaufenden Lamellenknochens, wohingegen die metaphysären Defekte direkt mit endostalem Bridging und Mikrokallusbildung, jedoch ohne sichtbare periostale Kallusbildung heilen (Stürmer et al. 2010b).

2010 veröffentlichten E. K. Stürmer et al. ein metaphysäres Osteotomiemodell, welches dem bisher angewandten diaphysären Frakturmodell durch seine Nähe zum tatsächlichen Fraktur- und Heilungsgeschehen osteoporotischer Frakturen beim Menschen überlegen ist, sodass es auch in dieser Arbeit Anwendung fand. Im Rahmen der Osteosynthese wird ein Frakturspalt von 0,5 mm belassen, wodurch Mikrobewegungen ermöglicht werden. Dies führt zu einer dezenten periostalen Kallusbildung, die unter normalen Umständen bei der metaphysären, endostal betonten Frakturheilung nicht vorkommt. Der im Frakturspalt entstehende endostale Kallus erlaubt im Nachhinein die Beurteilung von Quantität, Qualität und zeitlichem Ablauf der Frakturheilung (Stürmer et al. 2010b). Das genaue Vorgehen ist in Abschnitt 2.4 beschrieben.

## 4.3 Körpergewicht und Nahrungsaufnahme

Die kontinuierliche Gewichtszunahme der Ratten (vergl. Abschnitt 3.1, *Abbildung 14*) über den gesamten Zeitraum des Versuchs ist am ehesten auf das zu erwartende Körperwachstum der erst drei Monate alten Ratten zurückzuführen. Nach Ovariectomie zeigten die operierten Tiere eine stärkere Gewichtszunahme als die der

Gruppe NON-OVX. Dies ist zum einen der gesteigerten Nahrungsaufnahme in diesen Gruppen geschuldet, zum anderen haben Studien gezeigt, dass es bei ovariectomierten Ratten zu einer Erhöhung des Körperfettanteils kommt, woraus ebenfalls eine Zunahme des Körpergewichtes resultiert (Fang et al. 2015). Die beobachteten Gewichtsveränderungen stellen ein bereits mehrfach beschriebenes Phänomen bei ovariectomierten Ratten dar (Komrakova et al. 2009; Komrakova et al. 2013). Dass die Tiere, die der WBV zugeführt wurden, tendenziell weniger an Gewicht zunahmten als die restlichen ovariectomierten Tiere, ist möglicherweise durch die gesteigerte körperliche Aktivität während der Vibration und den damit verbundenen erhöhten Grundumsatz zu erklären. Dadurch ließe sich auch die vermehrte Nahrungsaufnahme der Tiere der Gruppe SR+VIB in der ersten, bzw. der Gruppe PTH+VIB in der zweiten Hälfte des Versuchszeitraums erklären. Da der Einbruch der Gewichtskurve in Woche acht mit dem Zeitpunkt der Osteotomie zusammenfällt, liegt an dieser Stelle ein kausaler Zusammenhang nahe. Ein solcher Eingriff erklärt auch die reduzierte Nahrungsaufnahme von Woche acht bis neun.

#### **4.4 Ganzkörpervibration**

Die WBV gewinnt als nichtpharmakologische Therapie der Osteoporose und osteoporotischer Frakturen zunehmend an Bedeutung. Ein positiver Effekt vertikaler Vibration auf intakte osteoporotische Knochen wurde schon vielfach nachgewiesen, auch wenn die Frage des idealen Vibrationsregimes bisher unbeantwortet bleibt (Judex et al. 2007; Sehmisch et al. 2009; Wehrle et al. 2014; Xie et al. 2008). Die Wirkung der WBV auf die Frakturheilung osteopener Knochen ist bislang wenig untersucht worden. Rubinacci et al. konnten zeigen, dass sich die Sensitivität des Knochens für den Effekt der WBV abhängig vom Estrogenangebot verändert. Ein positiver Effekt der WBV auf die Knochenstruktur konnte bei Rubinacci et al. lediglich bei Estrogenmangel beobachtet werden (Rubinacci et al. 2008). Goodship et al. hingegen beschrieben auch einen positiven Effekt der WBV auf die Frakturheilung gesunder Knochen (Goodship et al. 2009). Ein positiver Einfluss der WBV auf die Frakturheilung osteopener Knochen wurde erst kürzlich nachgewiesen (Komrakova et al. 2013; Stürmer et al. 2010a). Durch WBV allein und in Kombination mit Raloxifen und Estradiol ließen sich positive Effekte auf die biomechanischen Eigenschaften sowie die endostale und trabekuläre Knochenstruktur nach Frakturierung erzielen, sodass es naheliegt, potenziell additive Effekte der WBV in Kombination mit anderen antiosteoporotischen Substanzen zu erforschen (Stürmer et al. 2014). Bei der Ermittlung der für die Frakturheilung optimalen Vibrationsfrequenz, zeigte eine Frequenz von 70 Hz vertikaler Vibration mit einer Amplitude von 0,5 mm die besten Ergebnisse, weswegen dieses Vibrationsregime im Rahmen dieser Arbeit Anwendung fand (Trautmann 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch die ausschließliche Behandlung mit WBV keine signifikant besseren Ergebnisse hinsichtlich biochemischer und morphologischer Eigenschaften erzielt als in den Kontrollgruppen NON-OVX und OVX. Die Werte für die biomechanische Belastbarkeit sowie die Dichte von Knochen und Kallus entsprachen annähernd denen der Gruppe OVX. Der Kallus war verglichen mit dem der gesunden und mit PTH therapierten Tiere deutlich weniger mineralisiert. Auch in der parallelen Versuchsreihe wurde an den intakten Femora der Versuchstiere infolge der WBV keine Verbesserung biomechanischer oder struktureller Eigenschaften beobachtet (Eimer 2014). Dass die durch Trautmann nachgewiesene positive Wirkung der WBV auf die Frakturheilung nicht reproduziert werden konnte, ist möglicherweise durch die unterschiedliche Behandlungsdauer zu erklären. Während die Tiere der vorliegenden Versuchsreihe über 41 Tage vibriert wurden, erhielten die Versuchstiere bei Trautmann lediglich über 30 Tage eine WBV (Trautmann 2014).

Bei allen Tieren der Gruppe OVX+VIB wurde eine knöcherne Überbrückung des Frakturspaltens beobachtet. Der Zeitraum bis zur frühesten knöchernen Frakturspaltüberbrückung war mit 22 Tagen im Mittel gegenüber den gesunden Tieren um zwei Tage, gegenüber der Gruppe OVX um einen Tag verlängert. Diese leichte Verzögerung der Frakturheilung wird auch durch die Verteilung der Fluoreszenzfarbstoffe bestätigt. Neben der frühen dorsalen Kallusbildung bis Tag 22 (CG-markierte Fläche/ Tag), wurde in der Gruppe OVX+VIB auch noch von Tag 23-32 vermehrt Kallusgewebe im dorsalen Bereich gebildet (AK markierte Fläche/ Tag). Diese späte Kallusformation war in den Kontrollgruppen NON-OVX und OVX gering ausgeprägt, wurde jedoch auch in der Gruppe PTH+VIB beobachtet. Die Kallusbildung, die bei den gesunden Tieren vornehmlich endostal ablief, fand bei der Gruppe OVX+VIB vermehrt dorsal statt. Es zeigte sich mikroradiographisch ein deutlich größerer dorsaler Kallus als in den anderen Gruppen. Dies deutet auf eine vermehrte periostale Kallusbildung hin, welche möglicherweise durch die erhöhte Mobilität der Frakturrenden infolge der mechanischen Stimulation durch die WBV zurückzuführen ist.

#### **4.5 Teriparatid**

Rekombinantes Parathormon (PTH 1-84) sowie Teriparatid (PTH 1-34) wurden 2002 durch die FDA zur Therapie der Osteoporose zugelassen. Die Zulassung umfasst die Therapie der postmenopausalen, kortikosteroidinduzierten sowie bei Männern der idiopathischen oder durch Hypogonadismus verursachten Osteoporose (Babu et al. 2015). Die intermittierende Applikation von PTH in der frühen Frakturheilungsphase hatte in vergangenen experimentellen Studien zu einer verbesserten Frakturheilung in Form von höherem Kallusvolumen, gesteigerter Kallusdichte und totaler BMD

sowie zu verbesserten biomechanischen Eigenschaften und einer früheren Frakturspaltüberbrückung geführt (Andreassen et al. 1999; Babu et al. 2015; Komrakova et al. 2010; Nozaka et al. 2008) . Auch klinisch ergaben sich Hinweise auf eine durch PTH beschleunigte Heilung distaler Radiusfrakturen (Aspenberg et al. 2010).

Eine Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften der Tibiae durch alleinige PTH-Therapie, wie sie durch Komrakova et al. beobachtet wurde, konnte im vorliegenden Versuch nicht bestätigt werden (Komrakova et al. 2010). Lediglich die intakten Femora der Versuchstiere zeigten eine erhöhte Biege- und Bruchfestigkeit (Eimer 2014).

Bei der Untersuchung mittels MCT zeigte die Gruppe PTH jedoch ein verglichen mit den nicht wirkstoffbehandelten, ovariectomierten Gruppen größeres kortikales Volumen sowie eine größere BMD des knöchernen Kallus und des gesamten Knochenausschnittes. Die BMD des gesamten Kallus war vergleichbar mit derjenigen der Kontrollgruppe NON-OVX und damit signifikant höher als unter Therapie mit SR oder ohne pharmakologische Therapie. Zudem zeigte sich der Kallus der Gruppe PTH bei Betrachtung von BV/TV wesentlich stärker mineralisiert als in den Gruppen OVX, OVX+VIB, SR und SR+VIB.

Diese Ergebnisse werden ferner durch die mikroradiographisch beobachtete erhöhte Dichte von ventralem, dorsalem und endostalem Kallus unter PTH-Therapie bestätigt. Die positiven Effekte des PTH auf die Knochen- und Kallusdichte sind vermutlich auf die osteoanabole Wirkung der Substanz zurückzuführen und entsprechen den Erwartungen, die sich anhand der Ergebnisse vorangegangener Versuchsgruppen ergaben (Komrakova et al. 2010; Komrakova et al. 2011).

Die Verteilung der Farbstoffe in der polychromen Sequenzmarkierung deutet darauf hin, dass der gegenüber den mit SR oder nicht pharmakologisch behandelten Gruppen insgesamt vergrößerte endostale Kallus vornehmlich in den Tagen 23-32 nach Osteotomie gebildet wurde, da sich die pro Tag AK-markierte Fläche deutlich größer darstellt als in den anderen Gruppen. Der Zeitpunkt der frühesten knöchernen Frakturspaltüberbrückung entsprach mit einem Mittelwert von 21 Tagen näherungsweise dem, der gesunden Tiere. Fälle von fehlender knöcherner Frakturspaltüberbrückung traten nicht auf.

#### **4.6 Ganzkörpervibration in Kombination mit Teriparatid**

Während durch alleinige Therapie mit Teriparatid keine Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften erreicht wurde, erbrachte die Kombination von PTH (1-34) mit WBV eine höhere Elastizität und eine deutlich höhere Streckgrenze als durch die alleinige Therapie mit PTH, WBV oder die Kombination von SR und WBV.

Im Vergleich zu den Kontrollgruppen NON-OVX und OVX sowie zur alleinigen SR-Gabe zeigte sich eine tendenzielle – wenn auch nicht signifikante – Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften. Die bei den Ergebnissen der Gruppe PTH+VIB aufgefallene hohe Standardabweichung bei den Ergebnissen des biomechanischen Tests war auch in früheren Versuchen unter Anwendung dieses Tier- und Frakturmodells beobachtet worden und bestätigt die Notwendigkeit einer zusätzlichen bildgebenden und histologischen Untersuchung zur Beurteilung der Frakturheilung (Komrakova et al. 2015).

Im Vergleich zur nicht therapierten Gruppe OVX führte PTH in Kombination mit WBV zu einer mikrocomputertomographisch nachgewiesenen erhöhten BMD des knöchernen wie auch des gesamten Kallus. Zudem zeigten sich in Mikroradiographie und polychromer Sequenzmarkierung ein größerer proximaler Knochendurchmesser sowie größere dorsale und endostale Kallusflächen als bei den gesunden Tieren. Die dorsale Kallusdichte war gegenüber der Gruppe SR+VIB, nicht jedoch gegenüber den Kontrollgruppen NON-OVX und OVX erhöht. Die früheste knöcherne Frakturspaltüberbrückung war mit durchschnittlich 24 Tagen deutlich verzögert, zudem trat ein Fall von fehlender Überbrückung auf. Die Zunahme des Knochendurchmessers unter PTH-Therapie stellt ein bekanntes Phänomen dar (Hodsman et al. 2005).

Weder die alleinige Therapie mit Teriparatid noch die Kombination mit WBV erreichten eine Verbesserung der trabekulären Architektur. Trabekeldicke, -dichte und Anzahl der Knotenpunkte blieben weit hinter den Werten der gesunden Tiere zurück. Jiang et al. hatten unter PTH eine Verbesserung der trabekulären Architektur durch Zunahme der Trabekelvernetzung beobachtet (Jiang et al. 2003), während Lane et al. lediglich eine Verdickung bereits bestehender Trabekel beschrieben (Lane et al. 2003). Beide Beobachtungen konnten in diesem Versuch nicht bestätigt werden.

#### **4.7 Strontiumranelat**

Mit seinem dualen Wirkmechanismus aus Stimulation der Knochenneubildung und Hemmung der Knochenresorption nimmt SR eine Sonderstellung unter den antiosteoporotischen Substanzen ein. Trotz der 2014 erfolgten Zulassungsbeschränkung hat es in der Osteoporosetherapie weiterhin einen Stellenwert. Neben seinem günstigen Einfluss auf das Frakturrisiko bewies SR in experimentellen wie klinischen Studien das Potenzial, auch die Heilung bereits bestehender Frakturen positiv beeinflussen zu können (Aslam et al. 2014; Habermann et al. 2010; Komrakova et al. 2015; YF Li et al. 2010; Ozturan et al. 2011). Die durch diese Arbeit gewonnenen Ergebnisse der SR-Therapie blieben weit hinter den anhand der aktuellen Studienlage gestellten Erwartungen zurück. Weder die mehrfach beschriebene Erhöhung der BMD im Kallusgebiet noch eine Verbesserung der

mechanischen Belastbarkeit und trabekulären Architektur konnten in diesem Versuch reproduziert werden.

Die biomechanische Belastbarkeit nach SR-Therapie zeigte sich gegenüber den gesunden Tieren vermindert, Unterschiede zur Gruppe OVX ergaben sich diesbezüglich nicht. Zwar wurde eine gegenüber der Gruppe OVX erhöhte BMD der Kortikalis beobachtet, die Dichte des Kallus war jedoch unverändert zu dieser Gruppe und gegenüber den gesunden Tieren deutlich vermindert. Der mineralisierte Anteil des Kallus war deutlich geringer als bei den gesunden oder mit PTH therapierten Tieren. Eine günstige Wirkung von SR auf die trabekuläre Knochenstruktur wurde wie auch durch die anderen angewandten Therapieformen nicht beobachtet. Die knöcherne Frakturspaltüberbrückung war, wenn auch bei allen Tieren der Gruppe SR vorhanden, mit durchschnittlich 25 Tagen deutlich verspätet. Die ausreichende Aufnahme über das Futter zur Aufrechterhaltung einer adäquaten Dosierung von SR war über den gesamten Versuch gewährleistet.

Gründe für ein Ausbleiben der erwarteten SR-Wirkung können unterschiedliche Dosierungen und Kontrollzeitpunkte sein. Auch die Behandlungsdauer ist von großer Bedeutung. So beobachteten Komrakova et al. erst kürzlich eine günstige Wirkung von SR auf die Kallusbildung und -struktur bei einer Behandlungsdauer von 13 Wochen, während eine Behandlung mit SR über fünf Wochen zu keiner wesentlichen Verbesserung führte (Komrakova et al. 2015). Die Dosierung und die Versuchsbedingungen waren mit denen dieser Versuchsreihe identisch, sodass angenommen werden kann, dass die im jetzigen Versuch gewählte Behandlungsdauer von sechs Wochen zu kurz ist, um eine wesentliche Verbesserung biomechanischer wie morphologischer Eigenschaften des Kallus zu erreichen.

Auch bei Brüel et al. zeigte sich trotz zuverlässigen Einbaus der Substanz in Knochen- und Kallusgewebe keine Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften. Die Kallusbildung war zwar vermehrt, der knöcherne Umbau jedoch vermindert. Der Versuch wurde allerdings an nicht-ovarietomierten Tieren bei wesentlich höherer Dosierung durchgeführt (Brüel et al. 2011).

#### **4.8 Ganzkörpervibration in Kombination mit Strontiumranelat**

Die Kombination antiosteoporotischer Substanzen mit der WBV ist bisher wenig erforscht. Durch die Kombination von WBV und Alendronat erreichten Camargos et al. eine erhöhte Kortikalisdicke (Camargos et al. 2015). Durch die Kombination mit WBV konnten außerdem der positive Einfluss von Raloxifen und Estradiol auf die metaphysäre Frakturheilung der osteopenen Rattentibia verstärkt werden (Stürmer et al. 2014). Die Kombination von SR und WBV führte im vorliegenden Versuch nicht zu besseren Ergebnissen als die alleinige SR-Gabe. Kortikale Dichte und Volumen der

Gruppe SR+VIB zeigten sich in der MCT gegenüber der Gruppe OVX erhöht, die Dichte von dorsalem und endostalem Kallus aber war sowohl in der MCT als auch in der Mikroradiographie geringer als bei allen anderen Gruppen. Die Dauer bis zur ersten knöchernen Frakturspaltüberbrückung betrug im Mittel 26 Tage, die Frakturheilung war damit deutlich verzögert. In einem Fall wurde eine Nichtüberbrückung des Frakturspaltes beobachtet. Die tendenziell gegenüber den anderen Gruppen vermehrte pro Tag TC-markierte endostale Kallusfläche zeigt, dass in der Gruppe SR+VIB auch noch von Tag 33-42 vermehrt endostaler Kallus gebildet wurde, was ebenfalls für eine verzögerte Frakturheilung spricht. Die biomechanische Belastbarkeit wurde nicht verbessert. Dass die Gruppen, die mit PTH behandelt wurden insgesamt bessere Ergebnisse erzielten als die mit SR behandelten Tiere, steht der Beobachtung von Habermann et al. entgegen, die unter SR-Therapie eine der Therapie mit PTH überlegene Qualität der Kallusbildung beobachtet hatten (Habermann et al. 2010).

Eine Verbesserung der trabekulären Architektur blieb auch unter SR-Therapie, unabhängig von der Kombination mit WBV, aus. Dies deckt sich mit den Ergebnissen vorangegangener Arbeitsgruppen, nicht jedoch mit denen von Zacchetti et al., die in ihrem Versuch eine deutliche Verbesserung von trabekulärer Dicke, Dichte und Verknüpfung nach SR-Therapie zeigen konnten (Komrakova et al. 2015; Zacchetti et al. 2014).

#### **4.9 Schlussfolgerung**

Die günstige Beeinflussung der biomechanischen Eigenschaften sowie der Quantität und Qualität der Kallusbildung lässt den Schluss zu, dass die Kombination der WBV mit Teriparatid potenziell zur Therapie osteoporotischer Frakturen geeignet ist. Die im Vergleich zur alleinigen PTH-Therapie verzögerte oder ausbleibende Frakturspaltüberbrückung weist jedoch darauf hin, dass das angewandte Vibrationsregime nicht optimal auf die Frakturheilung abgestimmt war. Die Kombination von WBV mit SR erbrachte gegenüber der alleinigen WBV sowie gegenüber der alleinigen SR-Therapie keinen Vorteil und führte eher zu einer Beeinträchtigung der Frakturheilung. Insgesamt zeigten sich die Ergebnisse, der mit PTH therapierten Versuchsgruppen, denen der Gruppen ohne Pharmakotherapie oder mit SR-Therapie überlegen. Auf die trabekulären Strukturen hatte keine der angewandten Therapiemethoden einen Einfluss, die ovariectomierten Tiere wiesen allesamt eine wesentlich geringe Trabekeldicke, Trabekeldichte sowie Dichte und Anzahl der Trabekelkreuzungen auf als die gesunden Tiere. Die vermehrte periostale Kallusbildung in den der Vibration zugeführten Gruppen könnte Hinweis auf eine vermehrte Mobilität der Frakturrenden sein. Dies kann zum einen durch eine begleitende Fibulafraktur, zum anderen durch mangelhaften Halt des

Osteosynthesematerials im minderwertigen, osteopenen Knochen bedingt sein. Zudem kann die erhöhte mechanische Belastung infolge der WBV eine bereits bestehende Instabilität verstärken (Stürmer et al. 2010a). In nachfolgenden Studien sollte daher im Rahmen der Osteotomie auf eine Schonung der Fibula sowie eine maximale Stabilität der Osteosynthese geachtet werden. Versuchstiere, die eine Fibulafraktur oder eine instabile Plattenosteosynthese aufweisen, sollten konsequent von der Auswertung ausgeschlossen werden.

Ein detailliertes Verständnis der Wirkung einer WBV in Kombination mit antiosteoporotischen Pharmaka erfordert weitere Versuchsreihen, in denen neben der Wahl der zur Kombination geeigneten Medikamente und deren Dosis auch das jeweils optimale Vibrationsregime erforscht werden muss. Für nachfolgende Versuchsgruppen empfiehlt sich zur Kombination mit Teriparatid die Wahl einer geringeren Vibrationsfrequenz, da die in dieser Arbeit angewandte Frequenz von 70 Hz die Frakturheilung zu stark beeinträchtigt.

Insgesamt zeigt die Ganzkörpervibration beträchtliches Potenzial, zur Therapie osteoporosebedingter pathologischer Frakturen, auch in Kombination mit antiosteoporotischen Pharmaka wie Teriparatid, eingesetzt zu werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Osteoporose zählt wegen ihrer großen sozioökonomischen Bedeutung zu den wichtigsten Volkserkrankungen der Industrienationen. Die Verbesserung von Knochendichte und -architektur steht seit vielen Jahren im Mittelpunkt der Osteoporoseforschung. Zunehmend gewinnt auch die Erforschung der Auswirkung antiosteoporotischer Therapien auf die Heilung osteoporotischer Frakturen an Bedeutung. Schwerpunkt dieser Arbeit ist der Einfluss vertikaler Ganzkörpervibration in Kombination mit den antiosteoporotischen Substanzen Strontiumranelat (SR) und Teriparatid (PTH 1-34) auf die Heilung metaphysärer Frakturen der osteopenen Rattentibia.

SR wirkt durch einen dualen Mechanismus gleichzeitig antiresorptiv und osteoanabol, was zu einer Verbesserung der kortikalen und trabekulären Mikroarchitektur und dadurch zu einer Verbesserung der Knochenstärke führt.

Durch die intermittierende Applikation des rekombinanten PTH-Fragments Teriparatid (PTH 1-34) wird eine osteoanabole Wirkung erreicht. Dies führt zu einer Zunahme der Knochenmasse, einer Verbesserung der Trabekelstärke und -Vernetzung sowie zu einer gesteigerten Kortikalisdicke. Vereinzelt konnte eine positive Wirkung von SR und PTH auf die Heilung osteoporotischer Frakturen nachgewiesen werden.

Die Ganzkörpervibration (WBV) führt zu einer Stimulation von Muskeln und Knochen durch Bewegung. Dies fördert den Erhalt von Muskelmasse und -kraft und stimuliert die statische Anpassung der Knochenstruktur an Belastung. Der Stand aktueller Forschung bietet Hinweise darauf, dass sich die WBV allein und in Kombination mit antiosteoporotischen Medikamenten auch positiv auf die Heilung osteoporotischer Frakturen auswirken kann. Das ideale Vibrationsregime zur antiosteoporotischen Therapie sowie zur Förderung der Frakturheilung konnte bisher jedoch nicht ermittelt werden.

In diesem Versuch erfolgte die Untersuchung der metaphysären Frakturheilung unter Therapie mit WBV, SR und PTH (1-34) am Modell der ovariektomierten Ratte. 88 weibliche Ratten wurden in Gruppen eingeteilt und bis auf die Tiere der Kontrollgruppe NON-OVX ovariektomiert. 55 Tage später erfolgte bei allen Tieren die beidseitige Osteotomie und Plattenosteosynthese der Tibiametaphyse. Postoperativ wurden die Tiere der Gruppen OVX+VIB, SR+VIB und PTH+VIB der WBV zugeführt. Diese erfolgte über sechs Wochen zweimal täglich für jeweils 15 Minuten bei 70 Hz vertikaler Vibration mit einer Amplitude von 0,5 mm. Die Tiere der Gruppen SR und SR+VIB erhielten außerdem 600-625 mg/kgKG/d Strontiumranelat als Futterzusatz, den Tieren der Gruppe PTH und PTH+VIB wurden fünfmal wöchentlich 40 µg/kgKG Teriparatid subkutan injiziert. Die Tiere der Kontrollgruppe OVX wurden nicht

antiosteoporitisch therapiert. Die Tiere erhielten allesamt an Tag zwölf, 22, 32 und 42 nach Osteotomie subkutane Injektionen verschiedenfarbiger Fluorochrome, um später im Rahmen der polychromen Sequenzmarkierung den zeitlichen Verlauf von Knochenauf- und -umbau nachvollziehen zu können. Sechs Wochen nach Osteotomie wurden die Tiere obduziert, Tibiae, Femora, Lendenwirbel und Muskeln wurden präpariert und gesäubert.

Die biomechanische Belastbarkeit und damit die Qualität der Frakturheilung wurde mithilfe eines Dreipunkt-Biegestests beurteilt. Durch die mikrocomputertomographische Bildgebung wurden Volumina, BMD und Mineralisationsgrad verschiedener Knochenabschnitte bestimmt. Mittels Mikroradiographie erfolgte die Messung von Dicke und Dichte der jeweiligen Abschnitte von Knochen und Kallus. Der zeitliche Verlauf der Kallusbildung sowie der Zeitpunkt der frühesten Frakturspaltüberbrückung ließen sich anhand der polychromen Sequenzmarkierung nachvollziehen.

Insgesamt zeigte sich die Behandlung mit PTH mit und ohne WBV der Behandlung mit SR mit und ohne WBV überlegen. Während die Kombination von SR mit WBV die Frakturheilung eher zusätzlich beeinträchtigte, ergaben sich Hinweise auf einen additiv förderlichen Effekt von PTH und WBV auf die Heilung osteoporotischer Frakturen. Eine Verzögerung der frühesten knöchernen Frakturspaltüberbrückung in allen Gruppen, die eine WBV erhalten hatten, lässt darauf schließen, dass das angewandte Vibrationsregime für die Frakturheilung nicht optimal gewählt war. Eine Verbesserung der trabekulären Architektur wurde in keiner der Gruppen beobachtet.

Abschließend lässt sich sagen, dass sowohl die Ganzkörpervibration als auch Teriparatid für sich und in Kombination vielversprechende Ergebnisse bezüglich der Therapie der postmenopausalen Osteoporose und der Unterstützung der Heilung dadurch entstandener Frakturen gezeigt haben. Um das große Potenzial dieser Therapiemethoden nutzen zu können, bedarf es der weiterführenden Erforschung des optimalen Vibrationsregimes und der idealen Dosierung von Teriparatid zur Therapie der Osteoporose und osteoporotischer Frakturen.

## **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, 439-443**

**Alonso-Bouzon C, Duque G (2011): [Senile osteoporosis: an update] [Article in Spanish] Rev Esp Geriatr Gerontol 46, 223-229**

**Amanat N, McDonald M, Godfrey C, Bilston L, Little D (2007): Optimal timing of a single dose of zoledronic acid to increase strength in rat fracture repair. J Bone Miner Res 22, 867-876**

**Anderson GL, Judd HL, Kaunitz AM, Barad DH, Beresford SA, Pettinger M, Liu J, McNeeley SG, Lopez AM, Women's Health Initiative I (2003): Effects of estrogen plus progestin on gynecologic cancers and associated diagnostic procedures: the Women's Health Initiative randomized trial. JAMA 290, 1739-1748**

**Andreassen TT, Ejersted C, Oxlund H (1999): Intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing rat fractures. J Bone Miner Res 14, 960-968**

**Aslam MZ, Khan MA, Chinoy MA, Jillani SA, Sultan SA, Ahmed SK (2014): Significance of strontium ranelate in healing of surgically fixed tibial diaphyseal fractures treated with strontium ranelate vs placebo; a randomised double blind controlled trial. J Pak Med Assoc 64, S123-126**

**Aspenberg P, Genant HK, Johansson T, Nino AJ, See K, Krohn K, Garcia-Hernandez PA, Recknor CP, Einhorn TA, Dalsky GP (2010): Teriparatide for acceleration of fracture repair in humans: a prospective, randomized, double-blind study of 102 postmenopausal women with distal radial fractures. J Bone Miner Res 25, 404-414**

**Augustine M, Horwitz MJ (2013): Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein analogs as therapies for osteoporosis. Curr Osteoporos Rep 11, 400-406**

**Babu S, Sandiford NA, Vrahas M (2015): Use of Teriparatide to improve fracture healing: What is the evidence? World J Orthop 6, 457-461**

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

**Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, Cosman F, Lakatos P, Leung PC, Man Z (2007): Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. N Engl J Med 356, 1809-1822**

Boivin G, Farlay D, Khebbab MT, Jaurand X, Delmas PD, Meunier PJ (2010): In osteoporotic women treated with strontium ranelate, strontium is located in bone formed during treatment with a maintained degree of mineralization. *Osteoporos Int* 21, 667-677

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, 142-152

Camargos GV, Bhattacharya P, van Lenthe GH, Del Bel Cury AA, Naert I, Duyck J, Vandamme K (2015): Mechanical competence of ovariectomy-induced compromised bone after single or combined treatment with high-frequency loading and bisphosphonates. *Sci Rep* 5, 10795

Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP (2007): Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *N Engl J Med* 357, 905-916

Cao Y, Mori S, Mashiba T, Westmore MS, Ma L, Sato M, Akiyama T, Shi L, Komatsubara S, Miyamoto K (2002): Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 17, 2237-2246

Cauley JA, Robbins J, Chen Z, Cummings SR, Jackson RD, LaCroix AZ, LeBoff M, Lewis CE, McGowan J, Neuner J (2003): Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density: the Women's Health Initiative randomized trial. *JAMA* 290, 1729-1738

Cianferotti L, D'Asta F, Brandi ML (2013): A review on strontium ranelate long-term antifracture efficacy in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 5, 127-139

Colón-Emeric C, Nordsletten L, Olson S, Major N, Boonen S, Haentjens P, Mesenbrink P, Magaziner J, Adachi J, Lyles KW (2011): Association between timing of zoledronic acid infusion and hip fracture healing. *Osteoporos Int* 22, 2329-2336

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

Dempster DW, Cosman F, Parisien M, Shen V, Lindsay R (1993): Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocr Rev* 14, 690-709

Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM (2013): Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of

the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* **28**, 2-17

Duque G, Troen BR (2008): Understanding the mechanisms of senile osteoporosis: new facts for a major geriatric syndrome. *J Am Geriatr Soc* **56**, 935-941

DVO: DVO-Leitlinie 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose beim Erwachsenen. Schattauer, Stuttgart 2009

Eimer C: Einfluss der vertikalen Ganzkörpervibration in Kombination mit Strontiumranelat und Parathormon auf das osteoporotische Rattenfemur. Med. Diss. Göttingen 2014

Ellegaard M, Jorgensen NR, Schwarz P (2010): Parathyroid hormone and bone healing. *Calcif Tissue Int* **87**, 1-13

Fang J, Yang L, Zhang R, Zhu X, Wang P (2015): Are there differences between Sprague-Dawley and Wistar rats in long-term effects of ovariectomy as a model for postmenopausal osteoporosis? *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 1491-1502

FDA: Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. Springer, Washington DC, USA 1994

Goodship AE, Lawes TJ, Rubin CT (2009): Low-magnitude high-frequency mechanical signals accelerate and augment endochondral bone repair: preliminary evidence of efficacy. *J Orthop Res* **27**, 922-930

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**, 326-339

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

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**, 631-638

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

He YX, Zhang G, Pan XH, Liu Z, Zheng LZ, Chan CW, Lee KM, Cao YP, Li G, Wei L (2011): Impaired bone healing pattern in mice with ovariectomy-induced osteoporosis: A drill-hole defect model. *Bone* 48, 1388-1400

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

Jiang Y, Zhao JJ, Mitlak BH, Wang O, Genant HK, Eriksen EF (2003): Recombinant human parathyroid hormone (1-34) [teriparatide] improves both cortical and cancellous bone structure. *J Bone Miner Res* 18, 1932-1941

Jilka RL (2003): Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol* 41, 182-185

Johnston BD, Ward WE (2015): The ovariectomized rat as a model for studying alveolar bone loss in postmenopausal women. *Biomed Res Int* 2015, 635023

Jørgensen NR, Schwarz P (2011): Effects of anti-osteoporosis medications on fracture healing. *Curr Osteoporos Rep* 9, 149-155

Judex S, Lei X, Han D, Rubin C (2007): Low-magnitude mechanical signals that stimulate bone formation in the ovariectomized rat are dependent on the applied frequency but not on the strain magnitude. *J Biomech* 40, 1333-1339

Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15, 175-191

Komrakova M, Werner C, Wicke M, Nguyen BT, Sehmisch S, Tezval M, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Effect of daidzein, 4-methylbenzylidene camphor or estrogen on gastrocnemius muscle of osteoporotic rats undergoing tibia healing period. *J Endocrinol* 201, 253-262

Komrakova M, Stuermer EK, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, Tezval M, Daub F, Martens T, Witzhausen P (2010): Effect of human parathyroid hormone hPTH (1-34) applied at different regimes on fracture healing and muscle in ovariectomized and healthy rats. *Bone* 47, 480-492

Komrakova M, Sehmisch S, Tezval M, Schmelz U, Frauendorf H, Grueger T, Wessling T, Klein C, Birth M, Stuermer KM (2011): Impact of 4-methylbenzylidene camphor, daidzein, and estrogen on intact and osteotomized bone in osteopenic rats. *J Endocrinol* 211, 157-168

Komrakova M, Sehmisch S, Tezval M, Ammon J, Lieberwirth P, Sauerhoff C, Trautmann L, Wicke M, Dullin C, Stuermer KM (2013): Identification of a

vibration regime favorable for bone healing and muscle in estrogen-deficient rats. *Calcif Tissue Int* 92, 509-520

Komrakova M, Weidemann A, Dullin C, Ebert J, Tezval M, Stuermer KM, Sehmisch S (2015): The Impact of Strontium Ranelate on Metaphyseal Bone Healing in Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int* 97, 391-401

Lane NE, Yao W, Kinney JH, Modin G, Balooch M, Wronski TJ (2003): Both hPTH(1-34) and bFGF increase trabecular bone mass in osteopenic rats but they have different effects on trabecular bone architecture. *J Bone Miner Res* 18, 2105-2115

Langsetmo L, Hitchcock CL, Kingwell EJ, Davison KS, Berger C, Forsmo S, Zhou W, Kreiger N, Prior JC, Canadian Multicentre Osteoporosis Study Research G (2012): Physical activity, body mass index and bone mineral density-associations in a prospective population-based cohort of women and men: the Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMos). *Bone* 50, 401-408

Leitner MM, Tami AE, Montavon PM, Ito K (2009): Longitudinal as well as age-matched assessments of bone changes in the mature ovariectomized rat model. *Lab Anim* 43, 266-271

Li J, Mori S, Kaji Y, Mashiba T, Kawanishi J, Norimatsu H (1999): Effect of bisphosphonate (incadronate) on fracture healing of long bones in rats. *J Bone Miner Res* 14, 969-979

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, 1889-1897

Lippuner K (2012): The future of osteoporosis treatment - a research update. *Swiss Med Wkly* 142, w13624

Lips P (2001): Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 22, 477-501

Lüllmann-Rauch R: *Histologie. Verstehen - Lernen - Nachschlagen*. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006

Lyles KW, Colon-Emeric CS, Magaziner JS, Adachi JD, Pieper CF, Mautalen C, Hyldstrup L, Recknor C, Nordsletten L, Moore KA (2007): Zoledronic acid and clinical fractures and mortality after hip fracture. *N Engl J Med* 357, 1799-1809

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

McCann RM, Colleary G, Geddis C, Clarke SA, Jordan GR, Dickson GR, Marsh D (2008): Effect of osteoporosis on bone mineral density and fracture repair in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 26, 384-393

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, 459-468

Meyer RA, Jr., Tsahakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, Kiebzak GM (2001): Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J Orthop Res* 19, 428-435

Muir JM, Ye C, Bhandari M, Adachi JD, Thabane L (2013): The effect of regular physical activity on bone mineral density in post-menopausal women aged 75 and over: a retrospective analysis from the Canadian multicentre osteoporosis study. *BMC Musculoskelet Disord* 14, 253

Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, Shimizu S, Moriya H, Einhorn TA, Yamazaki M (2002): Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34). *J Bone Miner Res* 17, 2038-2047

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

Negri AL, Spivacow FR (2012): Healing of subtrochanteric atypical fractures after strontium ranelate treatment. *Clin Cases Miner Bone Metab* 9, 166-169

NIH CaDP (2001): Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 285, 785-795

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

Oliver RA, Yu Y, Yee G, Low AK, Diwan AD, Walsh WR (2013): Poor histological healing of a femoral fracture following 12 months of oestrogen deficiency in rats. *Osteoporos Int* 24, 2581-2589

Ozturan KE, Demir B, Yucel I, Cakici H, Yilmaz F, Haberal A (2011): Effect of strontium ranelate on fracture healing in the osteoporotic rats. *J Orthop Res* 29, 138-142

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, 595-610

Rahn BA: Die polychrome Sequenzmarkierung des Knochens. Med. Habil.-Schr. Freiburg 1976

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, 2816-2822

Rozental TD, Vazquez MA, Chacko AT, Ayogu N, Bouxsein ML (2009): Comparison of radiographic fracture healing in the distal radius for patients on and off bisphosphonate therapy. *J Hand Surg Am* 34, 595-602

Rubin C, Recker R, Cullen D, Ryaby J, McCabe J, McLeod K (2004): Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli: a clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety. *J Bone Miner Res* 19, 343-351

Rubinacci A, Marenzana M, Cavani F, Colasante F, Villa I, Willnecker J, Moro GL, Spreafico LP, Ferretti M, Guidobono F (2008): Ovariectomy sensitizes rat cortical bone to whole-body vibration. *Calcif Tissue Int* 82, 316-326

Saito M, Shiraishi A, Ito M, Sakai S, Hayakawa N, Mihara M, Marumo K (2010): Comparison of effects of alfacalcidol and alendronate on mechanical properties and bone collagen cross-links of callus in the fracture repair rat model. *Bone* 46, 1170-1179

Sehmisch S, Galal R, Kolios L, Tezval M, Dullin C, Zimmer S, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Effects of low-magnitude, high-frequency mechanical stimulation in the rat osteopenia model. *Osteoporos Int* 20, 1999-2008

Skoglund B, Holmertz J, Aspenberg P (2004): Systemic and local ibandronate enhance screw fixation. *J Orthop Res* 22, 1108-1113

Stürmer EK, Seidlova-Wuttke D, Sehmisch S, Rack T, Wille J, Frosch KH, Wuttke W, Stürmer KM (2006): Standardized bending and breaking test for the normal and osteoporotic metaphyseal tibias of the rat: effect of estradiol, testosterone, and raloxifene. *J Bone Miner Res* 21, 89-96

Stürmer EK, Komrakova M, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, Tezval M, Utesch C, Mangal O, Zimmer S (2010a): Musculoskeletal response to whole-body vibration during fracture healing in intact and ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 87, 168-180

Stürmer EK, Sehmisch S, Rack T, Wenda E, Seidlova-Wuttke D, Tezval M, Wuttke W, Frosch KH, Stuermer KM (2010b): Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in the early phase of osteoporosis. A new fracture-healing model at the tibia in rat. *Langenbecks Arch Surg* 395, 163-172

Stürmer EK, Komrakova M, Sehmisch S, Tezval M, Dullin C, Schaefer N, Hallecker J, Stuermer KM (2014): Whole body vibration during fracture healing intensifies the effects of estradiol and raloxifene in estrogen-deficient rats. *Bone* 64, 187-194

Tengvall P, Skoglund B, Askendal A, Aspenberg P (2004): Surface immobilized bisphosphonate improves stainless-steel screw fixation in rats. *Biomaterials* 25, 2133-2138

Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ (1995): FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 17, 125S-133S

Trautmann LM: Einfluss der vertikalen Ganzkörpervibration verschiedener Frequenzen auf die Frakturheilung der osteoporotischen Ratte. Med. Diss. Göttingen 2014

Tsiridis E, Morgan EF, Bancroft JM, Song M, Kain M, Gerstenfeld L, Einhorn TA, Bouxsein ML, Tornetta P, 3rd (2007): Effects of OP-1 and PTH in a new experimental model for the study of metaphyseal bone healing. *J Orthop Res* 25, 1193-1203

Verschueren SM, Roelants M, Delecluse C, Swinnen S, Vanderschueren D, Boonen S (2004): Effect of 6-month whole body vibration training on hip density, muscle strength, and postural control in postmenopausal women: a randomized controlled pilot study. *J Bone Miner Res* 19, 352-359

Wehrle E, Wehner T, Heilmann A, Bindl R, Claes L, Jakob F, Amling M, Ignatius A (2014): Distinct frequency dependent effects of whole-body vibration on non-fractured bone and fracture healing in mice. *J Orthop Res* 32, 1006-1013

Weidemann A: Der Einfluss von Strontiumranelat auf die metaphysäre Frakturheilung osteopener Ratten. Med. Diss. Göttingen 2013

WHO: WHO scientific group on the assessment of osteoporosis at primary health care level, Summary Meeting Report.

[\[http://www.who.int/chp/topics/Osteoporosis.pdf\]](http://www.who.int/chp/topics/Osteoporosis.pdf), Zugriff am 18. August 2015, Brüssel, Belgien 2007

Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintron M (1989): Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 45, 360-366

Xie L, Rubin C, Judex S (2008): Enhancement of the adolescent murine musculoskeletal system using low-level mechanical vibrations. *J Appl Physiol* (1985) 104, 1056-1062

Zacchetti G, Dayer R, Rizzoli R, Ammann P (2014): Systemic treatment with strontium ranelate accelerates the filling of a bone defect and improves the material level properties of the healing bone. *Biomed Res Int* 2014, 549785

Zhao Q, Liu X, Zhang L, Shen X, Qi J, Wang J, Qian N, Deng L (2013): Bone selective protective effect of a novel bone-seeking estrogen on trabecular bone in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 93, 172-183

Veröffentlichungen der Ergebnisse dieser Arbeit:

Komrakova M, Henkies D, Furthwängler J, Tezval M, Hoffmann D, Wicke M, Stürmer KM, Sehmisch S (2014): Die Wirkung einer neuen Anti-Osteoporose-Therapie auf die Frakturheilung und Muskulatur im Rattentiermodell. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie. Berlin, Oktober 2014.

Komrakova M, Hoffmann DB, Nuehnen V, Stueber H, Wassmann M, Wicke M, Tezval M, Stuermer KM, Sehmisch S (2016): The Effect of Vibration Treatments Combined with Teriparatide or Strontium Ranelate on Bone Healing and Muscle in Ovariectomized Rats. Calcified Tissue International Juni 2016

## **Danksagung**

Ich danke Prof. Dr. Klaus Michael Stürmer, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

PD Dr. Stephan Sehmisch gilt mein Dank besonders für die Themenstellung, die zuverlässige Betreuung sowie die schnelle Korrektur meiner Arbeit.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Marina Komrakova bedanken. Unter ihrer zuverlässigen und kompetenten Betreuung blieb keine Frage unbeantwortet. Die zügigen Korrekturen, die konstruktive Kritik und nicht zuletzt die stetige Motivation ermöglichten ein schnelles Vorankommen meiner Arbeit.

Ich bedanke mich außerdem bei Anette Witt und Ramona Castro-Machguth, die mich bei meinen Versuchen tatkräftig unterstützt haben, immer ein offenes Ohr für mich hatten und im Labor für eine heitere Arbeitsatmosphäre sorgten.

Diese Studie wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG SE 1966/5-1) gefördert.