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

# Vergleichende Analyse der Effektivität von horizontaler und vertikaler Ganzkörpervibration auf die osteoporotische Tibiafrakturheilung im Rattentiermodell

### INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

### Malte Bösch

aus

Hannover

Göttingen 2016

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent/in	Prof. Dr. med. E. K. Stürmer
Ko-Referent/in:	PD Dr. med. D. Seidlova-Wuttke
Drittreferent/in:	Prof. Dr. hum. biol. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 21.12.2016

## Inhaltsverzeichnis

InhaltsverzeichnisI		
Abbildungsverzeichnis IV		
Tabellenverzeichnis VI		
Abkürzur	ngsverzeichnis	VIII
1 Einlei	tung	
1.1 Zie	elsetzung	1
1.2 Hi	stologische Grundlagen	2
1.2.1	Knochengewebe	2
1.2.2	Knochenzellen	3
1.2.3	Knochenumbau	5
1.2.4	Frakturheilung	6
1.3 Os	teoporose	7
1.3.1	Definition	7
1.3.2	Einteilung	8
1.3.3	Klinik	
1.3.4	Frakturheilung bei Osteoporose	
1.3.5	Risikofaktoren	13
1.3.6	Allgemeine Diagnostik	16
1.3.7	Spezielle Diagnostik	16
1.3.8	Therapie	19
1.4 Ga	nzkörpervibration	25
2 Mater	ial und Methoden	
2.1 Ve	rsuchsanordnung	
2.1.1	Versuchstiere	
2.1.2	Futter	
2.1.3	Fluoreszenzfarbstoffe	
2.1.4	Ovarektomie	
2.1.5	Osteotomie und Plattenosteosynthese	
2.1.6	Ganzkörpervibration (WBV)	
2.1.7	Obduktion	35
2.2 Bi	omechanischer Test	
2.2.1	Ablauf	
2.2.2	Auswertung	
2.3 Mi	krocomputertomographie	
2.3.1	Scan	

2.3	.2 Rekonstruktion	40
2.3	.3 Auswertung	41
2.4	Mikroradiographie	43
2.4	.1 Herstellung der Mikroradiographien	43
2.4	.2 Auswertung	44
2.4	.3 Morphometrischer Auswertungsalgorithmus	44
2.5	Polychrome Sequenzmarkierung	50
2.5	.1 Prinzip	50
2.5	.2 Fluorochrome	50
2.5	.3 Auswertung	51
2.5	.4 Morphometrischer Auswertungsalgorithmus	51
2.5.5	Statistik	56
3 Erg	ebnisse	
3.1	Gewicht der Versuchstiere im Verlauf	
3.2	Futteraufnahme im Verlauf	
3.3	Uterusgewicht am Tag der Obduktion	63
3.4	Biomechanischer Test	64
3.4	.1 Elastizität	64
3.4	.2 Streckgrenze	65
3.5	Mikro-CT	65
3.5	.1 Messparameter des Gesamtgewebes	66
3.5	.2 Messparameter der Kortikalis	68
3.5	.3 Messparameter des spongiösen Gewebes	70
3.6	Mikroradiographie	73
3.6	.1 Messparameter der Kortikalis	73
3.6	.2 Messparameter der Knochendurchmesser	75
3.6	.3 Messparameter des Kallus	76
3.6	.4 Messparameter des trabekulären Netzwerkes	78
3.7	Polychrome Sequenzmarkierung	81
3.7	1 Ventrale Messparameter	81
3.7	.2 Dorsale Messparameter	83
3.7	.3 Endostale Messparameter	84
3.8	Zusammenfassung aller Ergebnisse	
4 Dis	kussion	
4.1	Modell für die osteonorotische Frakturheilung	
4.2	Gewicht und Futteraufnahme	
4.3	Analyse des biomechanischen Tests	
4.4	Analyse der Ergebnisse der Mikrocomputertomographie (uCT) und	der
Mikr	oradiographie	
4.5	Analyse der polychromen Sequenzmarkierung	

	4.6	Fazit	104
5	Zus	sammenfassung	106
6	Lite	eraturverzeichnis	108

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des Ovars vor Durchtrennung und Ligatur des Eileiters31
Abbildung 2: Untere Rattenextremität mit schematischer Darstellung der
Osteotosyntheseplatte und Höhe der Osteotomieebene (modifiziert nach Popesko et al.
2002)
Abbildung 3: Bohrung eines Schraubenkanals
Abbildung 4: Anlegen der Schablone zur Bestimmung der Osteotomieebene
Abbildung 5: Durchführung der Osteotomie mittels Piezo-Säge
Abbildung 6: Definitive Belegung der Bohrlöcher mit Schrauben
Abbildung 7: Readaption der Muskeln per Faden 34
Abbildung 8: Hautverschluss mittels Klammernaht
Abbildung 9: Vibrationstisch für vertikale Vibration inklusive Steuerungseinheit
Abbildung 10: Vibrationstisch für horizontale Vibration inklusive Steuerungseinheit
Abbildung 11: Tibia in Haltevorrichtung
Abbildung 12: Tibia samt Haltevorrichtung in Zwick Werkstoffprüfmaschine
Abbildung 13: typisches Kraft-Weg-Diagramm eines Drei-Punkt-Biegeversuches an einer
Rattentibia
Abbildung 14: Messrahmen in 3D-OsteoAnalyse; der Rahmen ist auf die Osteotomieebene
zentriert und beinhaltet den Bereich 2,5 mm ober- und unterhalb der Osteotomie 42
Abbildung 15: Spongiöses Gewebe ohne Kortikalis markiert
Abbildung 16: Histogramm in 3D-OsteoAnalyse (die grünen Messbalken rahmen das
spongiöse Gewebe ohne die Kortikalis ein) 42
Abbildung 17: Peaks im Histogramm und Flächenzuordnung: 1 = Luft, 2 = Probenhalter, 3 =
spongiöses Gewebe (weicher und harter Kallus), 4 = Kortikalis
Abbildung 18: Standardisierte Ausrichtung der Osteotomieebene an der Hilfslinie
Abbildung 19: Standardisierte, computerassistierte Graudetektion eines Tibiaschnittes 45
Abbildung 20 a-j: Standardisierte, computerassistierte Detektion der Kallus-, Kortikalis- und
Trabekelflächen der metaphysären Rattentibia während der mikroradiographischen-
Untersuchung 47
Abbildung 21: Die Bilder a-f zeigen die standadisierte, computerassistierte Bestimmung der
Knochenflächen von Kortikalis, gesamtem Knochen und Kallus 48
Abbildung 22: Standardisierte Ausrichtung der Osteotomieebene an der Hilfslinie 52
Abbildung 23: Bild eines zur Fluoreszenz angeregten Schnittes nach 100 s Belichtungszeit 52
Abbildung 24 a-j: Standardisierte, computerassistierte Detektion der Kallus-, Kortikalis- und
Trabekelflächen der metaphysären Rattentibia während der polychromen
Sequenzmarkierung
Abbildung 25: CG markierter Anteil 55
Abbildung 26: AK markierter Anteil 55
Abbildung 27: TC markierter Anteil 55
Abbildung 28: Darstellung des mittleren Körpergewichts der Versuchstiere der einzelnen
Gruppen pro Versuchswoche über den gesamten Verlauf des Versuchs; <sup>6</sup> = signifikant
gegenüber allen anderen Testgruppen, *= p < 0,05 = signifikant 59

Abbildung 29: Darstellung der mittleren täglichen Futteraufnahme jedes Versuchstieres im
Verlauf pro Woche; <sup>6</sup> = signifikant gegenüber allen anderen Testgruppen, *= p < 0,05 = signifikant
Abbildung 30: Darstellung des Messparameters Uterusgewicht am Tag der Obduktion (g); <sup>1</sup> =
signifikant gegenüber SHAM, *= p < 0,05 = signifikant
Abbildung 31: Darstellung des Messparameters Elastizität
Abbildung 32: Darstellung des Messparameters Streckgrenze
Abbildung 33: Darstellung des Messnarameters BV/TV (Anteil des mineralisierten Knochens
am Gesamtvolumen): $^{1}$ = signifikant gegenüber SHAM. * = n < 0.05 = signifikant
Abbildung 34: Darstellung des Messnarameters mittlere Dichte Gesamtgewebe: <sup>1</sup> =
signifikant gegenüber SHAM. $* = n < 0.05 = signifikant$
Abbildung 35: Darstellung des Messparameters Volumen Gesamtgewebe
Abhildung 36: Darstellung des Messnarameters Dichte Gesamtgewebe: 1 = signifikant
gegen  gegen üher SHAM * = n < 0.05 67
Abhildung 37: Darstellung des Messnarameters mittlere Dichte Kortikalis: 1 = signifikant
r = 100 model and $r = 100$ m $r = 100$
Abhildung 38. Darstellung des Messnarameters Volumen Kortikalis: $1 = signifikant$
$aggan \ bar SHAM * - n < 0.05 - significant $
Abbindung 57. Dai stenung des Messparameters Dichte Kortikans, $^{-}$ – signifikant gegenüber SHAM 5 – signifikant gegenüber 35Hz-horiz *= n < 0.05 – signifikant
Abhildung 40: Darstellung des Messnarameters mittlere Dichte snongiöses Cowebe $1 -$
Abbindung 40. Dai stending des Messparameters initiere Dichte spongioses dewebe, $-$ signifikant gegenüber SHAM * – n $< 0.05$ – signifikant 70
$\frac{1}{1000}$
Abbildung 42: Darstellung des Messparameters Dichte spongiöses Gewebe
Abbindung 42: Darstenung des Messparameters Dichte spongloses Gewebe; $^{2}$ = Signmkant gegenüber SHAM $^{*}$ = n < 0.05 = cignifikent
gegenuber ShAM, $-p < 0.05 - Significant$
Additioning 43: Darstellung des Messparameters Kortikansuicke distai ventral; $*$ = signifikant
gegenuber ShAM, $^{-}$ – Signifikant gegenuber OVA, $^{-}$ – p < 0.05 – Signifikant
Abbildung 44: Darstellung des Messparameters Kortikansuicke distal dorsai
Additioning 45: Darstellung des Messparameters Knochendichte Kortikalis distal ventral; <sup>+</sup> =
signifikant gegenuber SHAM, $^{2}$ = signifikant gegenuber UVX, $^{3}$ = signifikant gegenuber
35Hz-vert, *= Signifikant gegenüber 70Hz-vert, <sup>3</sup> = Signifikant gegenüber 35Hz-noriz * =
p < 0.05 = significant
Abbildung 46: Darstellung des Messparameters Knochendichte Kortikalis distal dorsal
Abbildung 47: Darstellung des Messparameters Knochendurchmesser proximal; <sup>2</sup> =
signifikant gegenüber OVX, <sup>s</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-horiz, *= p < 0,01 =
significant
Abbildung 48: Darstellung des Messparameters Knochendurchmesser distal
Abbildung 49: Darstellung des Messparameters Kallusdicke ventral; <sup>2</sup> = signifikant
gegenuber OVX, * = $p < 0.05$ = signifikant
Abbildung 50: Darstellung des Messparameters Kallusdicke dorsal
Abbildung 51: Darstellung des Messparameters Knochendichte Kallus ventral; <sup>1</sup> = signifikant
gegenüber SHAM, * = p < 0,05 = signifikant
Abbildung 52: Darstellung des Messparameters Knochendichte Kallus dorsal; <sup>1</sup> = signifikant
gegenüber SHAM <sup>, 2</sup> = signifikant gegenüber OVX, * = p < 0,05 = signifikant

Abbildung 53: Darstellung des Messparameters Knochendichte Kallus endostal; <sup>1</sup> =
signifikant gegenüber SHAM, ² = signifikant gegenüber OVX, ³ = signifikant gegenüber
35Hz-vert, * = p < 0,05 = signifikant77
Abbildung 54: Darstellung des Messparameters Knochendichte der Trabekel distal
Abbildung 55: Darstellung des Messparameters Anzahl Trabekelkreuzungen absolut 78
Abbildung 56: Darstellung des Messparameters Dichte der Trabekelkreuzungen; <sup>2</sup> =
signifikant gegenüber OVX, <sup>3</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-vert, <sup>5</sup> = signifikant
gegenüber 35Hz-horiz, * = p < 0,05 = signifikant
Abbildung 57: Darstellung des Messparameters mittlere Trabekeldichte
Abbildung 58: Darstellung des Messparameters gesamte Kallusfläche ventral81
Abbildung 59: Darstellung des Messparameters CG-Kallusfläche ventral81
Abbildung 60: Darstellung des Messparameters AK-Kallusfläche ventral
Abbildung 61: Darstellung des Messparameters TC-Kallusfläche ventral; 1 = signifikant
gegenüber SHAM, $^2$ = signifikant gegenüber OVX, $^3$ = signifikant gegenüber 35Hz-vert, *
= p < 0,05 = signifikant 82
Abbildung 62: Darstellung des Messparameters gesamte Kallusfläche dorsal; <sup>1</sup> = signifikant
gegenüber SHAM, <sup>3</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-vert, * = p < 0,05 = signifikant 83
Abbildung 63: Darstellung des Messparameters CG-Kallusfläche dorsal; <sup>1</sup> = signifikant
gegenüber SHAM, * = p < 0,05 = signifikant83
Abbildung 64: Darstellung des Messparameters AK-Kallusfläche dorsal; <sup>2</sup> = signifikant
gegenüber OVX, <sup>3</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-vert, <sup>5</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-
horiz, * = p < 0,05 = signifikant
Abbildung 65: Darstellung des Messparameters TC-Kallusfläche dorsal; <sup>3</sup> = signifikant
gegenüber 35Hz-vert, * = p < 0,05 = signifikant
Abbildung 66: Darstellung des Messparameters gesamte endostale Kallusfläche
Abbildung 67: Darstellung des Messparameters CG-Kallusfläche endostal; 1 = signifikant
gegenüber SHAM, ² = signifikant gegenüber OVX, * = p < 0,05 = signifikant
Abbildung 68: Darstellung des Messparameters AK-Kallusfläche endostal
Abbildung 69: Darstellung des Messparameters TC-Kallusfläche endostal
Abbildung 70: Darstellung der Messergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung
unabhängig von der Lokalisation in mm <sup>2</sup>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Krankheiten mit erhöhtem Risiko, eine generalisierte Osteoporose zu entwicke	eln
(modifiziert nach Lindsay und Cosman 2010)	11
Tabelle 2: Risikofaktoren für osteoporotische Frakturen (modifiziert nach Lindsay und	
Cosman 2010)	16
Tabelle 3: Antiosteoporotische Medikamente (modifiziert nach Bartl 2011)	19
Tabelle 4: Empfehlung für spezifische medikamentöse Therapie (modifiziert nach DVO-	
Leitlinie 2014)	22
Tabelle 5: Einteilung der Ratten in die unterschiedlichen Versuchsgruppen	30
Tabelle 6: Messparameter der Mikro-CT mit Einheiten und Bedeutung	43

۲abelle 7: Messparameter der Mikroradiographie mit Einheit und Bedeutung	9
Fabelle 8: Injizierte Fluorochrome in ihrer zeitlichen Abfolge	51
۲abelle 9: Messparameter der polychromen Sequenzmarkierung mit Einheit und Bedeutung	5
	6
Гabelle 10: Darstellung der mittleren Körpergewichte ± Standardabweichung der	
Versuchstiere im Verlauf in Gramm [g]6	0
Fabelle 11: Darstellung der mittleren täglichen Futteraufnahme ± Standardabweichung	
jedes Versuchstieres im Verlauf pro Woche in Gramm6	2
Fabelle 12: Darstellung des Messparameters Uterusgewicht am Tag der Obduktion ±	
Standardabweichung in Gramm [g]6	3
Fabelle 13: Zusammenfassung der Mittelwerte ± Standardabweichung der Messergebnisse	
des biomechanischen Tests6	5
Fabelle 14: Zusammenfassung der Mittelwerte ± Standardabweichung der Messergebnisse	
der MikroCT-Untersuchung7	2
Fabelle 15: Zusammenfassung der Mittelwerte ± Standardabweichung der Messergebnisse	
der Mikoradiographie	0
Fabelle 16: Zusammenfassung der Mittelwerte ± Standardabweichung der Messergebnisse	
der polychromen Sequenzmarkierung8	6
۲abelle 17: Zusammenfassung aller signifikanten Unterschiede zur SHAM-Gruppe	8
۶ د۹ ۲abelle 18: Zusammenfassung aller signifikanten Unterschiede zur OVX-Gruppe	0

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
AK	Alizarinkomplexon
ANOVA	Analysis of Variance
AP	Alkalische Phosphatase
АТР	Adenosintriphosphat
BMD	Bone Mineral Density
BUA	Broadband Ultrasound and Attenuation
BV/TV	Bone Volume/Total Volume
CG	Calcein-Grün
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
СТ	Computertomographie
dB	Dezibel
DVO	Dachverband Osteologie e. V.
DXA	Dual-Röntgen-Absorptiometrie
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
et al.	et alii
EZM	Extrazelluläre Matrix
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GVal	Grey Values

HR-CT	High-Resolution-Computertomographie
Hz	Hertz
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1
К	Kelvin
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kVp	Kilo Voltage Peak
1	Liter
LWS	Lendenwirbelsäule
m	Meter
MHz	Megahertz
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
ms	Millisekunde
Ν	Newton
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NIH	National Institutes of Health
nmol	Nanomol
OVX	Ovarektomie
PSM	Polychrome Sequenzmarkierung
РТН	Parathormon
qCT	Quantitative Computertomographie

QUS	Quantitativer Ultraschall
RANKL	Receptor Activator of NF-ĸB Ligand
S	Sekunde
S.	Seite
SD	Standardabweichung
SERM	selektiver Östrogen Rezeptor
SHAM	scheinoperiert
SOS	Speed of Sound
Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
TBS	Trabekulärer Bone Score
тс	Tetracyclin-Hydrochlorid
vgl.	vergleiche
W	Watt
WBV	Whole Body Vibration
WHO	World Health Organization
XO	Xylenolorange
μΑ	Mikroampere
μСТ	Mikro-Computertomographie
μSv	Mikrosievert

### **1** Einleitung

#### 1.1 Zielsetzung

Durch die demographische Entwicklung in unserer Wohlstandsgesellschaft werden wir mit einer stetig steigenden Anzahl an altersbedingten Erkrankungen konfrontiert.

Hochrechnungen zufolge waren im Jahr 2009 6,3 Millionen Menschen in Deutschland von Osteoporose betroffen (Hadji et al. 2013). "*Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist, mit einem konsekutiven Anstieg der Knochenfragilität und der Neigung zu Frakturen" (NIH Consensus Development Panel 2001, Übersetzung nach Pfeilschifter et al. 2014, S. 18). Am häufigsten treten Frakturen an Wirbelkörpern, proximalem Femur, Humerus und distalem Unterarm auf (Melton et al. 2013). Durch die osteoporotischen Frakturen ist sowohl eine Einschränkung der Lebensqualität, unter anderem durch Verringerung der Mobilität, als auch eine erhöhte Mortalität der betroffenen Patienten nachweisbar (Cauley et al. 2000; Kanis et al. 2004a). Bleibler et al. untersuchten 2012 in einem Wirtschaftssimulationsmodell die jährlichen Kosten von osteoporosebedingten Frakturen. Sie zeigten in ihrem Modell einen rasanten Kostenanstieg von 1 Milliarde Euro für das Jahr 2010 auf 6,1 Milliarden für das Jahr 2050 auf.* 

Die mit Osteoporose verbundenen Folgeerkrankungen, die exorbitanten Kosten für das Gesundheitssystem und nicht zuletzt der Leidensdruck für die betroffenen Patienten machen eine intensive Erforschung der Behandlungsmöglichkeiten unerlässlich.

In vorangegangenen Arbeiten wurde die Auswirkung von mechanischen Einflüssen auf die Frakturheilung erforscht und es wurden positive Ergebnisse dargelegt. Es herrscht jedoch keine Klarheit über das im Einzelfall optimale Vibrationsregime. Da sich die Osteoporose an der Metaphyse der langen Röhrenknochen am deutlichsten manifestiert, werden in der vorliegenden Arbeit die potenziellen Effekte in einem Tierversuch an osteoporotischen Ratten - an dieser Stelle untersucht. Ziel dieser Arbeit ist es, nach einem Vibrationsregime zu suchen, das sich am vorteilhaftesten auf die metaphysäre Knochenbruchheilung im Rattentiermodel auswirkt. Es werden die Einflüsse von jeweils 35 Hz-Therapie und 70 Hz-Therapie in horizontaler beziehungsweise vertikaler Ausrichtung miteinander verglichen.

#### 1.2 Histologische Grundlagen

#### 1.2.1 Knochengewebe

Knochengewebe ist ein spezielles Bindegewebe, das hauptsächlich eine stützende Funktion besitzt und durch eine mineralisierte, extrazelluläre Matrix charakterisiert ist. Es ist unerlässlich für den Bewegungsapparat, da es als Ansatzund Ursprungspunkt für Muskeln dient und Organen wie Gehirn oder Lunge Schutz gewährt. Darüber hinaus besitzt es eine metabolische Funktion für viele Ionen und ist der wichtigste Kalziumspeicher des Körpers.

Essenzielle Anforderung, die das Knochengewebe erfüllen muss, ist eine hohe Belastbarkeit mit größtmöglicher Stabilität bei gleichzeitig geringstmöglichem Gewicht. Knochen ist ein dynamisches Gewebe, das einem ständigen Umbau – mit kontinuierlichem Auf- und Abbau – unterworfen ist. Um dies gewährleisten zu können, ist eine gute Durchblutung der Knochen unerlässlich. Diese Prozesse werden hormonell reguliert und durch die im Folgenden beschriebenen Zellen des Knochens (Osteozyten, Osteoblasten, Osteoklasten, Osteoprogenitorzellen) ermöglicht. Der Umbau wird durch die lokale Beanspruchung getriggert.

Knochengewebe besteht aus einem organischen Teil (95% Kollagen Typ I) und einem anorganischen Teil (Hydroxylapatit). Diese Teile sind fest miteinander verbunden und bilden eine extrazelluläre Matrix (EZM). Makroskopisch wird Knochengewebe in kompakten Knochen (Substantia corticalis oder Substantia compacta) und spongiösen Knochen (Substantia spongiosa) unterteilt. Kompakter Knochen bildet die Außenschicht, welche die Substantia spongiosa umgibt. Sie bildet ein verzweigtes Netzwerk von Trabekeln, die entsprechend der Biege- und Druckbeanspruchung, die auf die jeweiligen Knochen wirken, ausgerichtet sind (Wolff 1892). Reifes Knochengewebe wird als Lamellenknochen bezeichnet, welcher sich aus Knochenlamellen (2–4  $\mu$ m dick) zusammensetzt. Sie sind miteinander verbunden und enthalten in Aussparungen (Lakunen) Knochenzellen (Welsch 2006).

#### 1.2.2 Knochenzellen

#### 1.2.2.1 Osteoprogenitorzellen

Osteoprogenitorzellen sind Vorgängerzellen der Osteoblasten. Sie entspringen aus mesenchymalen Stammzellen, sind maßgebend am Aufbau der EZM beteiligt und essenziell für die Osteogenese. Sie sind sowohl im Endost als auch im Periost lokalisiert und werden im Falle eines Knochenbruches über den Transkriptionsfaktor CBFA1 zur Ausdifferenzierung in Osteoblasten angeregt (Welsch 2006; Ross und Pawlina 2011).

#### 1.2.2.2 Osteoblasten

Osteoblasten sind knochenbildende Zellen, die u. a. Kollagen Typ I, Proteoglykane, Osteonektin und Osteokalzin aktiv sezernieren. In Wachstumsphasen liegen sie den Trabekeln, je nach Aktivität in einer ein- bis mehrlagigen Zellschicht, auf und bilden unverkalkte Knochenmatrix (Osteoid). Das Osteoid bildet einen Saum zwischen den Osteoblasten und den Trabekeln. Proteoglykane, Osteokalzin und Matrixvesikel, die sich aus den Osteoblasten abschnüren, tragen zur Mineralisierung des Osteoids durch Hydroxylapatit bei. Ihre Aktivität wird durch den insulinähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) angeregt. Osteoblasten besitzen die alkalische Phosphatase (AP) als Oberflächenprotein, das in Abhängigkeit zu ihrer Aktivität vorliegt und bei Wachstum oder Frakturheilung im Serum nachgewiesen werden kann. Die einzelnen Zellen sind über Nexus miteinander verbunden.

Neben dem Aufbau sind Osteoblasten auch am Abbau des Knochens beteiligt, da nur Osteoblasten über einen Parathormonrezeptor verfügen. Dadurch werden sie zum Osteoidabbau angeregt und aktivieren Osteoklasten über Zytokine (Welsch 2006; Ross und Pawlina 2011; Junqueira et al. 2005).

#### 1.2.2.3 Osteozyten

Osteozyten sind vollständig von Matrix eingefasste, komplett ausdifferenzierte Osteoblasten. Sie kommunizieren mit Zellen der endostalen und periostalen Oberfläche über ein Netzwerk aus Canaliculi. Je weiter entfernt die Osteozyten von der Oberfläche liegen, desto weniger Zellorganellen besitzen sie. Sie sind für die Aufrechterhaltung der Matrix zuständig: Wenn die Osteozyten absterben, wird die Matrix resorbiert. Vieles deutet darauf hin, dass sie Schlüsselzellen in der Regulation der Skelett- und Mineralhomöostase sind. Sie sind sowohl am Phosphat- als auch am Kalziumstoffwechsel beteiligt und somit für die Funktionsfähigkeit des Knochens unerlässlich. Ihr Anteil an den Knochenzellen beträgt über 90 %, und sie können Jahrzehnte überleben (Bonewald 2011). Tatsumi et al. konnten endgültig nachweisen, dass die Osteozyten die "Mechanorezeptoren" des Knochens sind. So steuern sie den Knochenumbau abhängig von den auf den Knochen einwirkenden Kräften, indem sie die an der Oberfläche liegenden Osteoklasten und Osteoblasten beeinflussen (Tatsumi et al. 2007).

Des Weiteren nehmen die Osteozyten über die Produktion von Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF) Einfluss auf die Myelopoese (Fulzele et al. 2013) und somit auf die Hämatopoese.

#### 1.2.2.4 Osteoklasten

Osteoklasten sind die Gegenspieler der Osteoblasten. Sie sind für die Resorption der verkalkten Matrix verantwortlich. Diese mehrkernigen Riesenzellen entstehen aus myeloischen Vorläuferzellen und sind in der Lage, sich amöboid fortzubewegen (Chambers et al. 1984). Sie befinden sich ebenfalls an der Oberfläche der Trabekel in sog. Howship-Lakunen (nach John Howship, 1781-1841, Chirurg aus London). Die Membran der Seite, die dem Knochen zugewandt ist, bildet einen Faltensaum (engl.: *ruffled border*), der ihre Oberfläche vergrößert und in deren Umgebung viele Mitochondrien und Lysosomen liegen. Am Rand des Faltensaumes sind die Osteoklasten über Aktinfilamente eng mit der Matrix verbunden. Im Bereich unterhalb des Faltensaumes befindet sich die Resorptionszone, in der durch Sezernierung von Protonen über eine ATPabhängige Pumpe ein saures Milieu geschaffen wird, das die Matrix zunächst demineralisiert. Proteasen, Phosphatasen und Metalloproteasen bauen anschließend die organischen Bestandteile der Matrix ab (v.a. Kollagen). Die gelösten Bestandteile werden von den Osteoklasten phagozytiert und an Kapillaren weitergeleitet.

Ein Osteoklast ist so in der Lage, pro Zeiteinheit die gleiche Menge an Knochen zu resorbieren, die 100 Osteoblasten aufbauen würden (Albrektsson et al. 1985; Welsch 2006; Junqueira et al. 2005).

#### 1.2.3 Knochenumbau

Im Wachstum übersteigt der Aufbau den Abbau. Für das Wachstum von besonderer Bedeutung ist das Periost, ein Bindegewebe mit drei Schichten (Adventitia, Fibroelastica, Kambiumschicht) an der Außenseite aller Knochen. Es ist für das Dickenwachstum der Knochen verantwortlich. Das Längenwachstum der Röhrenknochen erfolgt in der sog. Epiphysenfuge mit drei Zonen: Proliferationszone (Chondrozyten bilden Säulenknorpel), hypertrophe Knorpelzone (enthält Blasenknorpel, in dem Chondrozyten absterben und Knorpelmatrix mineralisiert) und Verknöcherungszone (Stammzellen wandern ein, differenzieren zu Osteoblasten und bilden Knochenmatrix) (Welsch 2006; Junqueira et al. 2005).

Ein Umbau (sog. Remodeling) des Knochens findet – nach Abschluss des Größenwachstums mit circa 20 Jahren – lebenslang statt. Er ist abhängig von der Belastung, von den Muskeln, von der Bewegung, den Hormonen und Wachstumsfaktoren zum Zweck der Reparatur, vom Kalziumstoffwechsel und von der Anpassung an Belastungen. Entsprechend seiner Belastung wird Knochengewebe entweder hypertrophieren oder atrophieren und seine Trabekel nach den mechanischen Kräften ausrichten, um größtmögliche Stabilität zu erreichen (Wolffs Gesetz [Wolff 1892]).

Wird ein Knochen also nicht beansprucht, nehmen die Osteozyten dies "mechanisch" wahr und regen Osteoklasten zur Knochenresorption an. Bei Beanspruchung wiederum werden Osteoblasten zum Knochenwachstum angeregt (Turner et al. 2009).

Nach Abschluss des Längenwachstums der Knochen erreicht die Knochenmasse zwischen dem 25. und 30. Lebensjahr ihren Höhepunkt (Peak Bone Mass). Wie groß die maximal erreichte Knochendichte wird, hängt maßgeblich von der Genetik, dem Hormonstatus, der Bewegung und der Ernährung ab. Ab dem 30. Lebensjahr verliert jeder Mensch pro Jahr 1% seiner Knochenmasse. Wird mit zunehmendem Alter ein bestimmter Wert der Knochenmasse unterschritten, kann es zu osteoporotischen Frakturen kommen (Bartl 2011). Wann diese Schwelle erreicht wird, hängt wiederum von der individuell erlangten Peak Bone Mass und diversen Faktoren wie Rauchen, Geschlecht, Gewicht, proximalen Femurfrakturen bei Vater oder Mutter oder Immobilität ab.

#### 1.2.4 Frakturheilung

Eine Fraktur ist definitionsgemäß eine Kontinuitätsunterbrechung des Knochens in zwei oder mehr Teile durch direkte oder indirekte Gewalteinwirkung.

Es gibt traumatische, atraumatische und pathologische Frakturen. Bei der Form traumatischen Gewalteinwirkung ursächlich, ist eine die die Widerstandsfähigkeit des Knochens übertrifft. Die atraumatische Form resultiert meist aus lang andauernder Belastung, wie zum Beispiel bei langen Fußmärschen, sog. Marschfrakturen. Diese sich wiederholende Dauerbelastung führt zu Mikrotraumata (engl.: *micro cracks*), die in ihrer Summe eine Fraktur bedingen können. Die pathologische Fraktur wird durch ein inadäguates, vergleichsweise geringes Trauma hervorgerufen und ist durch eine vorherige pathologische Veränderung des Knochengewebes bedingt, wie zum Beispiel bei Osteoporose. Die Dimension der Schädigung der Weichteile und Gefäße ist abhängig von der Art des Bruches und hat großen Einfluss auf den Heilungsverlauf. Der Weichteilschaden und die Unfallenergie sind gute Prädiktoren für die Entwicklung von Komplikationen (Karladani et al. 2001). Grundvoraussetzung für eine primäre Frakturheilung sind Ruhe im Frakturspalt, ausreichende Durchblutung und Kontakt der Bruchstücke zueinander (Adler 2005; Hirner und Weise 2008).

#### 1.2.4.1 Primäre Frakturheilung

Der Knochen heilt direkt (primär), wenn das Periost intakt geblieben oder die Knochenenden in Kontakt geblieben sind. Bei der primären Knochenbruchheilung werden die Frakturenden direkt überbrückt. Es entsteht kein Kallus. Man unterscheidet die Kontaktheilung von der Spaltheilung. Wenn die beiden Knochenbruchstücke direkt aneinander liegen und komprimiert werden, können die Havers-Kanäle von einem in das andere Fragment wachsen. Wenn die Knochenstücke zwar fest fixiert sind, jedoch keinen direkten Kontakt haben, kommt es zur Spaltheilung. Es entsteht zunächst Geflechtknochen, der später in Lamellenknochen umgebildet wird. Primäre Frakturheilung ist das Ziel einer Kompressionsosteosynthese (Hirner und Weise 2008; Adler 2005).

#### 1.2.4.2 Sekundäre Frakturheilung

Bei allen konservativen Behandlungsmethoden, durch überbrückende Plattenosteosynthese und bei Marknagelosteosynthese ist die Voraussetzung für eine primäre Knochenbruchheilung nicht gegeben, da die Knochenenden nicht starr miteinander verbunden sind, sondern minimale Bewegungen zugelassen werden. Deswegen heilt der Knochen hier über den "Umweg" eines bindegewebigen Kallus im Sinne der sogenannten indirekten (sekundären) Knochenbruchheilung. Diese verläuft in verschiedenen aufeinanderfolgenden Phasen: Unmittelbar nach dem Frakturieren des Knochens füllen sich der Spalt und das angrenzende Gewebe mit Blut aus den Gefäßen, die durch die Fraktur eingerissen wurden. Ein Frakturhämatom entsteht. Ab dem 2. Tag wandern Osteoblasten und Fibroblasten ein und bilden innerhalb der ersten Wochen nach der Fraktur einen Kallus aus fibrillärem Bindegewebe. So wird das Frakturhämatom durch Granulationsgewebe ersetzt. Zusätzlich werden neue Kapillaren gebildet, an deren Enden sich Osteoidsäume bilden. Zytokine und Wachstumsfaktoren werden freigesetzt. Pluripotente mesenchymale Stammzellen werden dazu angeregt, sich in Osteoblasten zu differenzieren. Sie beginnen mit der Bildung von unverkalkter Knochenmatrix, die im Anschluss durch Einlagerung von Hydroxylapatit mineralisiert wird. Diese Art der Frakturheilung wird auch im vorliegenden Rattentiermodell verwendet.

Im Optimalfall ist eine Fraktur beim Menschen, je nach Lokalisation, über die beschriebene Kallusbildung nach 4–6 Wochen überbrückt. Dadurch ist sie jedoch noch nicht belastungsstabil. Es folgt die Phase der Kallushärtung, die bis zu 4 Monate dauern kann. In dieser Phase entsteht aus dem weichen ein harter Kallus. Nach 3–4 Monaten ist der Knochen wieder so belastbar wie vor der Fraktur. Zunächst entsteht Faserknochen, der noch durch Lamellenknochen ersetzt werden muss, um so die ursprüngliche Knochenformation mit durchgehendem Markraum wiederherzustellen. Dieses Remodeling ist erst nach bis zu 24 Monaten vollständig abgeschlossen – abhängig vom Patientenalter und von der Lokalisation der Fraktur. Im Wachstumsalter verläuft die Heilung deutlich schneller als im fortgeschrittenen Alter. Achsabweichungen und Längendifferenzen können noch ausgeglichen werden (Adler 2005; Hirner und Weise 2008; Welsch 2006).

#### **1.3** Osteoporose

#### 1.3.1 Definition

Die Definition von Osteoporose des NIH Consensus of Development Panel of Osteoporosis aus dem Jahr 2001 lautet:

"Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist, mit einem konsekutiven Anstieg der Knochenfragilität und der Neigung zu Frakturen" (Übersetzung nach Pfeilschifter et al. 2014, S. 18).

Man spricht jedoch erst von einer manifesten Osteoporose, wenn bereits mindestens eine Fraktur aufgetreten ist. Eine weitere Definition aus dem Jahr 1994 wurde von der World Health Organisation (WHO) aufgestellt und besagt, dass eine Knochenmineraldichte-Abweichung in der Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DXA) von –2,5 Standardabweichungen (SD) vom Mittelwert bei einer Messung der Mineralisierung der Lendenwirbelsäule (LWS) oder des proximalen Femurs bei einer 30-jährigen Frau oder einem über 50-jährigen Mann (nach Ausschluss anderer Erkrankungen, die die Knochendichte verringern) eine Osteoporose nachweist. Da sich die Messmethoden und Geräte unterscheiden und nicht immer vergleichbar sind, wird die Knochendichte in Standardabweichungen vom altersund geschlechtsspezifischen Mittelwert der maximalen Knochendichte angegeben (sog. T-Wert oder T-Score).

#### 1.3.2 Einteilung

#### 1.3.2.1 Ausdehnung

Anhand der Ausdehnung der Osteoporose unterscheidet man zwischen einer lokalisierten, selteneren und einer generalisierten, häufigeren Art der Osteoporose. Die lokalisierte Form tritt neben dem Complex Regional Pain Syndrome (CRPS), der transitorischen Osteoporose bei Schwangeren und dem Gorham-Syndrom hauptsächlich durch Inaktivität der Extremitäten zum Beispiel bei Gipsbehandlung nach einer Fraktur auf. Sie betrifft nur einzelne Skelettregionen. Die deutlich häufigere generalisierte Osteoporose hingegen ist über große Teile des Skeletts verteilt. Sie betrifft in der juvenilen und postmenopausalen Form hauptsächlich die Wirbelsäule und die Metaphysen der langen Röhrenknochen. Bei der senilen Form sind zusätzlich die Knochen der Extremitäten und des Schädels betroffen (Bartl 2011).

#### 1.3.2.2 Geschwindigkeit des Knochenumbaus

Diese Einteilung bezieht sich auf das im Normalfall vorherrschende Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -abbau. Man unterscheidet niedrigen

Knochenumsatz (Low Turnover), hohen Knochenumsatz (High Turnover) und besonders schnellen Knochenverlust (Fast Loosers). Bisphosphonate (siehe 1.3.8.7) stellen für jede dieser Formen die Therapie der Wahl dar. Bei rechtzeitigem Therapiebeginn ist mit guten Erfolgen zu rechnen (Bartl 2011).

#### 1.3.2.3 Alter und Geschlecht

Die häufigste Form ist die postmenopausale Osteoporose (primäre Osteoporose Typ I). 50–60 Jahre alte Frauen haben zu 15 % und 70 Jahre alte Frauen zu 45 % einen DXA-T-Score von unter –2,5. Sie haben somit nach Definition der WHO eine Osteoporose. Diese tritt infolge der erniedrigten Östrogenproduktion auf. Bei Männern beträgt die Krankheitshäufigkeit in den gleichen Altersgruppen 2,4 % beziehungsweise 17 % (Pfeilschifter et al. 2014).

Bei der postmenopausalen Osteoporose werden Osteoklasten verstärkt aktiviert, da Interleukin 6 sowie weitere Zytokine bedingt durch den Östrogenmangel vermindert sind. Parathormon verstärkt den Knochenabbau. Durch diese Effekte wird die Spongiosa der Knochen stärker resorbiert. Daher sind vor allem die Knochen mit hohem Spongiosa-Anteil (Wirbelkörper und proximale Femora) gefährdet zu frakturieren.

Die senile Osteoporose (primäre Osteoporose Typ II) kann fließend aus einer postmenopausalen Osteoporose hervorgehen. Sie tritt nach dem 70. Lebensjahr bei Frauen doppelt so häufig auf wie bei Männern. Ursächlich liegen ihr die verringerte Anzahl an Osteoblasten, Bewegungsmangel sowie Kalzium- und Vitamin-D-Mangel zugrunde. Sowohl der verlangsamte Knochenstoffwechsel als auch ein erhöhter Knochenabbau spielen eine Rolle. Auch die Kortikalis wird bei dieser Form der Osteoporose vermehrt abgebaut, infolgedessen treten deutlich häufiger Frakturen auf.

Die idiopathische juvenile Osteoporose betrifft Kinder vor der Pubertät (zwischen 8 und 14 Jahren) und ist selbstlimitierend. Es treten Kompressionsfrakturen der Wirbelkörper verbunden mit schweren Rückenschmerzen auf.

Vor allem bei Männern zwischen dem 30. und dem 50. Lebensjahr tritt die idiopathische Osteoporose junger Erwachsener auf. Sie ist durch Wirbelkörperfrakturen aufgrund einer erhöhten Knochenresorption charakterisiert. Ein massiver Nikotinabusus kann hier ursächlich zugrunde liegen (Bartl 2011).

#### 1.3.2.4 Ursache

Als primäre Osteoporosen bezeichnet man die in Kap. 1.3.2.3 beschriebenen Formen, denen im Gegensatz zu sekundären Osteoporosen ursächlich keine andere Erkrankung zugrunde liegt. Die sekundäre Form beinhaltet nur 5% der Osteoporose-Fälle, ist aber für 20% der Osteoporose-assoziierten Frakturen verantwortlich (Bartl 2011). Weitere Ursachen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Krankheiten mit erhöhtem Risiko, eine generalisierte Osteoporose
zu entwickeln (modifiziert nach Lindsay und Cosman 2010)

Hypogonadischer Zustand	Turner-Syndrom					
51 0	Klinefelter-Syndrom					
	Anorexia nervosa					
	hypothalamische Amenorrhö					
	Hyperprolaktinämie					
Endokrinologische	Cushing-Syndrom					
Dysfunktionen	Hyperparathyreoidismus					
5	Thyreotoxikose					
	Diabetes mellitus Typ 1					
	Akromegalie					
	Nebenniereninsuffizienz					
Ernährungs-	Mangelernährung					
und gastrointestinalbedingte	parenterale Ernährung					
Krankheiten	Malabsorptionssyndrom					
	Gastrektomie					
	biliäre Zirrhose					
	perniziöse Anämie					
Rheumatologische	rheumatoide Arthritis					
Erkrankungen	Spondylitis ankylosans					
Hämatologische Störungen	multiples Myelom					
	Lymphome und Leukämien					
	Malignom-assoziierte PTH-Produktion					
	Mastozytose					
	Hämophilie					
	Thalassämie					
Erbkrankheiten	Osteogenesis imperfecta					
	Marfan-Syndrom					
	Hämochromatose					
	Hypophosphatasie					
	Glykogenspeicherkrankheiten					
	Homocystinurie					
	Ehlers-Danlos-Syndrom					
	Porphyrie					
-	Epidermolysis bullosa					
Andere	Immobilisation					
	COPD					
	Schwangerschaft					
	Skoliose					
	Multiple Sklerose					
	Sarkoidose					
	Amyloidose					

### 1.3.2.5 Schweregrad

Der Schweregrad der Osteoporose wird anhand des T-Wertes definiert. Er setzt das Messergebnis in Beziehung zu einem Referenzwert der 30-jährigen, gesunden Bevölkerung und gibt Abweichungen in Standardabweichungen (SD) an. Für den klinischen Alltag ist der T-Wert zum Beispiel in Bezug auf die Behandlungsstrategie relevant. Beim gesunden Skelett weicht die Knochendichte um weniger als 1 SD ab. Von Osteopenie spricht man bei Abweichungen von mehr als 1 und weniger als 2,5 SD. Bei mehr als –2,5 SD und keinen vorliegenden Frakturen spricht man von einer präklinischen Osteoporose, bei mindestens einer vorliegenden Fraktur von einer manifesten Osteoporose.

Der Z-Wert ist ein weiterer Parameter zur Einschätzung des Schweregrades der Osteoporose. Er bezieht sich auf die Mittelwerte der Knochendichte von gleichaltrigen Vergleichspersonen und sinkt im Alter dementsprechend geringer als der T-Wert (Bartl 2011).

#### 1.3.3 Klinik

Eine Osteoporose kann lange Zeit klinisch stumm verlaufen. Oft wird sie erst nach Auftreten von Frakturen diagnostiziert. Durch diese Frakturen ergeben sich die Hauptprobleme, die mit einer Osteoporose verbunden sind: Die Lebensqualität ist durch Bewegungseinschränkung und akute und/oder chronische Schmerzen reduziert. Die Mortalität nach einer osteoporotischen Fraktur steigt insbesondere im hohen Lebensalter an (Cauley et al. 2000; Kanis et al. 2004a). Schmerzen und Verformungen der Wirbelsäule sind meist im Brust- und Lendenbereich lokalisiert. Sie können entweder chronisch bestehen oder nach Überlastung akut auftreten. Die Deformierungen nehmen häufig eine charakteristische Form an: Scheitel in der Mitte der Thorakalwirbel und ausgleichende Hyperlordose der Lendenwirbelsäule. Dies geht mit einem Größenverlust einher. Am Rücken bilden sich dann typischerweise Hautfalten: das sogenannte "Tannenbaumphänomen" (Niethard et. al. 2009).

#### 1.3.4 Frakturheilung bei Osteoporose

Eine problemlose Frakturheilung hängt von mehreren Faktoren ab, wie z.B. der lokalen Durchblutung und dem Vorhandensein von ausreichend Knochengewebe. Mängel bei der Frakturheilung werden durch ein hohes Alter des Patienten, einen schlechten Allgemeinzustand, Störungen der Durchblutung sowie durch Osteoporose gefördert (Hirner und Weise 2008). Patienten mit Osteoporose unterscheiden sich von gesunden Patienten in ihrer Knochenmasse, im Mineralgehalt der Knochen und in der Qualität der Mikrostrukturen. Da der Knochenstoffwechsel bei Osteoporose gestört ist, erschwert dies eine adäquate Heilung in normaler Zeit.

Kubo et al. verglichen 1999 die Frakturheilung normaler Ratten mit der eines osteoporotischen Rattenmodells (durch Ovarektomie [OVX] und kalziumarme Diät induziert). Durch den OVX-bedingten Östrogenmangel sank die Knochendichte. Der Knochenverlust in dem OVX-Rattenmodell verstärkte sich durch die Kalziumreduktion in der Nahrung zusätzlich (Kalu et al. 1989). Trotzdem verliefen die ersten 6 Wochen der Frakturheilung nahezu identisch wie bei den normalen Ratten. Erst nach 12 Wochen konnte histologisch eine osteoporotische Veränderung an der Bruchstelle registriert werden: Die Knochendichte nahm ab, und die Bruchfestigkeit war ebenfalls reduziert (Kubo et al. 1999). Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe, bei denen eine Verzögerung der Frakturheilung bereits nach 5 bzw. 6 Wochen im (metaphysären) Rattentiermodell gezeigt werden konnte (Komrakova et al. 2009; Sehmisch et al. 2009; Stuermer et al. 2010a; Stuermer et al. 2010b; Komrakova et al. 2013; Stuermer et al. 2014). In Experimenten von Cesnjaj et al. (1991) konnte nachgewiesen werden, dass sich die Knochenbruchheilung bei ovarektomierten Ratten, die demineralisierte Knochenmatrix von normalen Ratten transplantiert bekommen hatten, wie bei normalen Ratten verhielt.

OVX-Ratten wiesen eine verzögerte enchondrale Ossifikation, eine größere Anzahl von Osteoklasten an den Trabekeln und unregelmäßiger angeordnete Trabekel im Kallus auf (Xu et al. 2004). Die Knochendichte erreichte ihren Höhepunkt während der Heilung in der 6. Woche nach Fraktur (Mu et al. 2010). Die Frakturheilung unterscheidet sich also erst im weiteren Verlauf der Heilung, nicht jedoch zu Beginn.

#### 1.3.5 Risikofaktoren

Bei gesunden Menschen wird durch das Remodeling bis zu einem gewissen Alter der gleiche Anteil an Knochenmasse aufgebaut, der zuvor abgebaut wurde. Dieses Gleichgewicht verschiebt sich mit zunehmendem Alter zugunsten des Abbaus. Bei Frauen wird dieser Punkt nach dem 50. Lebensjahr erreicht. Das Risiko, eine Fraktur zu erleiden, ist also maßgeblich vom Alter abhängig (Kanis et al. 2002). Zwischen dem 50. und 90. Lebensjahr steigt das Risiko für Frauen, eine Fraktur zu erleiden, alle 10 Jahre um den Faktor 2–4. Das Alter ist als eigenständiger Risikofaktor für eine Fraktur zu betrachten (Albrand et al. 2003). Das weibliche Geschlecht ist ab einem Alter über 60 Jahren mit einem circa um den Faktor 2 erhöhten Risiko für osteoporotische Wirbelkörperfraktur verbunden (Kanis et al. 2004b). Jede Fraktur nach dem 50. Lebensjahr sollte im Hinblick auf eine Osteoporose-Assoziation untersucht werden. Bei postmenopausalen Frauen stellen laut GLOW-Studie nicht vertebrale Frakturen einen eigenständigen Risikofaktor für Folgefrakturen dar (Hooven et al. 2009).

Eine Kalziumaufnahme unterhalb der empfohlenen Tagesdosis von 1000–1200 mg für Erwachsene führt zu einem relativen sekundären Hyperparathyreoidismus, der die Knochenresorption erhöht, um das Kalziumlevel im Serum konstant zu halten. Ist die Kalziumaufnahme bereits während der Wachstumsphase gestört, wirkt sich dies negativ auf die erreichte Peak Bone Mass aus.

Eine niedrige Vitamin-D-Aufnahme ist in Abhängigkeit von Alter, Rasse, Ernährungszustand, chronischen Leber- und Nierenerkrankungen oder wenig Tageslicht (z.B. in der nördlichen Hemisphäre) ebenfalls als Risikofaktor für Osteoporose einzustufen. Empfohlene Serum-Vitamin-D-Spiegel sollten >75 nmol/l (30 ng/ml) liegen. Zu niedrige Spiegel können zum kompensatorischen sekundären Hyperparathyreoidismus führen. In den Wintermonaten kann so bei Frauen die Knochenmasse saisonal sinken und der Turnover beschleunigt werden. Die Höhe des Risikos, bei Serumspiegeln zwischen 20 und 30 ng/ml eine Fraktur zu erleiden, ist nicht eindeutig geklärt (de Koning et al. 2013).

Durch einen sinkenden Serumöstrogenspiegel wird ein Ungleichgewicht des Remodelings ausgelöst. Dadurch wird an mehr Punkten der Knochentrabekel Remodeling betrieben.

Lange Bettruhe oder Inaktivität nach Verletzungen führt zu einem Verlust an Knochenmasse, wohingegen hohe Aktivität (z.B. Leistungssport, der am besten bereits vor der Pubertät begonnen wurde) die Knochenmasse erhöht. In ländlichen Bevölkerungsschichten mit hoher körperlicher Aktivität von der Jugend bis ins hohe Alter ist eine geringere Frakturrate nachgewiesen worden. Wenn mit dem körperlichen Training erst im Alter begonnen wird, ist der Effekt auf das Skelett moderat. Es ist allerdings davon auszugehen, dass durch die gesteigerte Fitness weniger Stürze und so auch weniger Knochenbrüche auftreten.

Langfristiger Zigarettenkonsum wirkt sich nachteilig auf die Knochenmasse aus. Toxische Einflüsse wirken direkt auf die Osteoblasten und stören somit den Östrogenmetabolismus (durchschnittlich 0,8–1,7 Jahre frühere Menopause laut Midgette und Baron 1990). Die durch das Rauchen hervorgerufenen Lungenerkrankungen (z.B. COPD) können eine medikamentöse Therapie erfordern (Cortison), die sich negativ auf die Knochenmasse auswirkt.

Diverse Medikamente wirken potenziell schädlich auf die Knochenmasse und können eine Osteoporose induzieren. Glukokortikoide sind am weitesten verbreitet. Cyclosporine und zytotoxische Medikamente, die zum Beispiel im Rahmen einer Organtransplantation verordnet werden, erhöhen das Risiko, Knochenmasse zu verlieren und Frakturen zu erleiden. Organfehlfunktionen (Leber- und Nierenversagen) treten in diesen Fällen zusätzlich gehäuft auf und beschleunigen den Knochenmasseverlust. Antikonvulsiva beeinflussen das Cytochrom-P450-System den Vitamin-D-Stoffwechsel. Alkoholabusus. und Aromatase-Inhibitoren, Aluminium, GnRH-Agonisten, Heparin und Lithium sind ebenfalls mit einem erhöhten Osteoporoserisiko verbunden (Lindsay und Cosman 2010). Weitere Risikofaktoren für osteoporotische Frakturen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Nicht beeinflussbar	Frakturanamnese als Erwachsener Frakturanamnese Verwandter ersten Grades weibliches Geschlecht hohes Alter kaukasische Rasse Demenz
Potenziell beeinflussbar	Rauchen Körpergewicht <58 kg
Östrogenmangel	frühe Menopause (<45 Jahre) oder bilaterale Ovarektomie
Andere	geringe Kalziumaufnahme Alkoholismus inadäquate Bewegung rezidivierende Stürze beeinträchtigte Sehkraft trotz adäquater Korrektur

Tabelle 2: Risikofaktoren für osteoporotische Frakturen (modifiziert nachLindsay und Cosman 2010)

#### 1.3.6 Allgemeine Diagnostik

Der Dachverband Osteologie e.V. (DVO) empfiehlt als allgemeine Diagnostik neben Anamnese und klinischem Befund die DXA-Osteodensitometrie und ein Basislabor. Sollten Anzeichen für eine osteoporosebedingte Wirbelkörperfraktur vorliegen, wird eine zusätzliche Bildgebung angeraten.

In der Anamnese sollte neben der Erfassung von Risikofaktoren, die es zu beseitigen oder zu behandeln gilt, gezielt nach dem Gewicht und der Körpergröße gefragt werden, um einen eventuellen Größenverlust in den letzen Jahren zu bemerken.

Der klinische Befund gibt Aufschluss über Schmerzen und Bewegungseinschränkungen – auch im Zusammenhang mit eventuellen Frakturen. Eine Knochendichtemessung sollte durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob eine Osteoporose vorliegt (T-Wert < –2,5), ob ggf. bereits eingeleitete Therapiemaßnahmen wirksam sind und um das Frakturrisiko abzuschätzen.

#### 1.3.7 Spezielle Diagnostik

Es stehen heutzutage mehrere Möglichkeiten zur Verfügung, um die Knochendichte und -masse zu messen und damit eine Aussage über das Frakturrisiko machen zu können. Diese umfassen die Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DXA), quantitative Computertomographie (qCT), Xtreme-CT, High-Resolution-CT (HR-CT), quantitative Sonographie (QUS), Trabecular Bone Score (TBS) und biochemische Knochenabbauparameter.

#### 1.3.7.1 Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DXA)

In der Dual-Röntgen-Absorptiometrie werden zwei Röntgenquellen verwendet, die sich minimal in ihrer Energie unterscheiden, um die Mineralisierung des Gewebes zu errechnen. Anhand der Energieabsorption können der Muskel- und der Fettanteil herausgerechnet werden. Es wird keine dreidimensionale Masse berechnet, sondern ein flächenbezogener Mineralgehalt in g/cm<sup>2</sup>. Am verbreitetsten sind Messungen der Lendenwirbelsäule und der Hüfte. Bei Messungen der Wirbelsäule werden allerdings nicht nur der Wirbelkörper, sondern auch die Wirbelbögen einbezogen. Spondylophyten, Skoliosen und andere degenerative Veränderungen der Wirbelsäule können das Messergebnis verändern.

Ein großer Vorteil der DXA ist die sehr geringe Strahlenbelastung (10  $\mu$ Sv). Da sich die Ergebnisse der Messungen je nach Hersteller des Messgerätes unterscheiden, hat sich der T-Wert etabliert (Lindsay und Cosman 2010; Bartl 2011).

#### 1.3.7.2 Quantitative Computertomografie (qCT)

Diese Technik wird ebenfalls üblicherweise zur Messung der Knochendichte der Wirbelsäule sowie der Hüfte eingesetzt. Auch Ulna, Radius und Tibia können untersucht werden. Dieses Verfahren ist das einzige, das ein dreidimensionales Ergebnis liefert. Im Vergleich zur DXA erhält man durch das qCT einen Dichtewert, der Knochenmasse pro Volumeneinheit in g/cm<sup>3</sup> ausdrückt. Mit dem CT ist es möglich, spezifisch die Knochentrabekel, gesondert von Kortikalis und Volumen, zu analysieren. Nachteile dieses Verfahrens sind die hohen Kosten, die Strahlenbelastung (100  $\mu$ Sv) und eine verminderte Reproduzierbarkeit im Vergleich zur DXA. Für regelmäßige Untersuchungen bzw. Verlaufsbeurteilungen ist die qCT somit nicht geeignet, obwohl Wang et al. 2012 nachweisen konnten, dass die qCT der DXA in der Vorhersage des Risikos, eine Wirbelkörperfraktur zu erleiden, überlegen ist.

Als primäre Diagnostik empfiehlt der DVO die qCT nur in Einzelfällen, wenn eine primäre DXA-Untersuchung nicht möglich ist oder die Ergebnisse einer DXA-Untersuchung an Hüften und LWS nicht verwertbar sind.

#### 1.3.7.3 Xtreme-CT und High-Resolution-CT (HR-CT)

Diese hochauflösenden Techniken bieten die Möglichkeit, die Mikrostruktur des Knochens bis zu den einzelnen Verbindungen des Trabekelsystems darzustellen. Zum Einsatz kommen diese Verfahren jedoch nur bedingt zur Verlaufskontrolle und um Frakturrisiken abzuschätzen, da eine Überlegenheit gegenüber DXA und qCT in Studien bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Cohen et al. 2010).

#### 1.3.7.4 Quantitativer Ultraschall (QUS)

quantitativen Parameter des Ultraschalls sind die Die gemessenen Schallgeschwindigkeit (Sound of Speed = SOS in m/s) und die Schallabschwächung (Broadband Ultrasound and Attenuation = BUA in db/MHz). Aus BUA und SOS lässt sich die Knochendichte berechnen, zusammen mit der gewebespezifischen Reflexion der Schallwellen und mithilfe eines Schallsenders und eines Empfängers, die auf entgegengesetzten Seiten des zu untersuchenden Körperteils angelegt werden. Die heute zur Verfügung stehenden Geräte eignen sich nur für den Einsatz an Knochen mit geringem Weichteilmantel, also an Phalangen, Calcaneus, Radius und Tibia. Mit dem QUS ist es sicher möglich, eine erniedrigte Knochendichte in der Peripherie zu erkennen (Schnabel et al. 2005). Die Vergleiche der Knochendichte bei QUS-Untersuchungen der Tibia mit DXA-Untersuchungen von Lendenwirbelsäule und proximalem Femur der gleichen Patienten korrelierten jedoch nicht (Tuna et al. 2008). Also schließen normale Knochendichtewerte in der Peripherie eine Osteoporose an Wirbelsäule, Femur oder Hüfte nicht aus. Patienten mit einem T-Wert von -2,5 in der QUS sollten sich einer Osteodensitometrie unterziehen (Muftic et al. 2013). Aufgrund der kostengünstigen Einsatzmöglichkeit und der fehlenden Strahlenbelastung wird trotzdem diskutiert, ob sich die QUS möglicherweise als Screeningverfahren zur Bewertung des Frakturrisikos eignet.

#### 1.3.7.5 Trabecular Bone Score (TBS)

Der Trabecular Bone Score ist ein struktureller Parameter, der lokale Abweichungen von Graustufen in DXA-Bildern analysieren kann. Der TBS bildet den Zustand der Mikroarchitektur ab. Viele trabekuläre Verknüpfungen drücken sich in einem hohen, wenige in einem niedrigen TBS-Wert aus. Der TBS kann somit laut neuesten Untersuchungen zur Einschätzung des 10-Jahres-Frakturrisikos verwendet werden – unabhängig von der Knochendichte (Iki et al. 2014).

#### 1.3.7.6 Biochemische Knochenabbauparameter

Eine weitere Möglichkeit, um das Frakturrisiko im Labor zu bestimmen, sind Knochenmarker in Urin und Blut. Mit ihrer Hilfe kann man abschätzen, wie schnell Knochengewebe umgebildet wird, um so den Verlauf einer bereits eingeleiteten Therapie zu verfolgen.

Alkalische Phosphatase, Osteokalzin (Szulc et al. 1993) und Osteonektin sind spezifisch für den Knochenaufbau, Desoxypyridinolin und Cross-Link-Telopeptidase spezifisch für den Abbau. Eine Diagnose lässt sich anhand dieser Parameter jedoch nicht stellen.

#### 1.3.8 Therapie

Die Therapie der Osteoporose besteht zum einen in der Behandlung der zugrunde liegenden Krankheit und zum anderen in der Prävention von Frakturen. Ob eine medikamentöse Therapie sinnvoll ist, muss im Einzelfall entschieden werden: Sie ist abhängig von Alter, Geschlecht, Wirbelkörperfrakturen, T-Score und speziellen Risikofaktoren. Generell empfiehlt der DVO, der die Interessen aller zuständigen, sich mit Osteologie befassenden Fachgesellschaften bündelt, eine Therapie ab einem Frakturrisiko von 30% und einem T-Score von weniger als –2,0 gemessen in der DXA an LWS oder Hüfte.

Die folgenden Abschnitte beziehen sich auf die 2014 veröffentlichte Leitlinie des Dachverband Osteologie e.V. (Pfeilschifter 2014). Tabelle 3 gibt einen Überblick über die pharmakologischen Ansatzpunkte der Therapie.

Antiresorptive Substanzen	Osteoanabole Substanzen			
- Bisphosphonate	- Parathormon			
- Raloxifen	- Teriparatid			
- Kalzitonine	- Fluoride			
- Kalzium	- Strontium			
- Östrogene	- Anabolika			
<ul> <li>Östrogen/Gestagen und Tibolon</li> </ul>	- Testosteron			
- Denosumab				
<ul> <li>Kathepsin K-Inhibitoren</li> </ul>				
- Vitamin D				
- Vitamin-D-Metabolite				
- Statine				

Tabelle 3: Antiosteoporotische Medikamente (modifiziert nach Bartl 2011)

Patienten sollten hinsichtlich ihrer Risikofaktoren aufgeklärt und die beeinflussbaren Faktoren möglichst ausgeschaltet werden. Eine vorbestehende Medikation muss hinsichtlich ihrer Indikation überprüft werden: Vor allem Glukokortikoide und L-Thyroxin, die beide mit Knochensubstanzverlust einhergehen können, aber auch Medikamente, die eine orthostatische Hypotonie bedingen können, gehören hinsichtlich der Sturzgefahr überprüft und möglichst reduziert. Darüber hinaus sollten diuretische Medikamente so eingestellt werden, dass eine Nykturie nach Möglichkeit vermieden und dadurch die Gefahr nächtlicher Stürze reduziert wird. Nikotin- und Alkoholabusus sollten therapiert, sekundäre Ursachen einer Osteoporose abgeklärt und gegebenenfalls behandelt werden.

#### 1.3.8.1 Kalzium

Die ausreichende Kalziumaufnahme in Kombination mit einem entsprechenden Vitamin-D-Spiegel kann den Knochensubstanzverlust verlangsamen, den Bone-Turnover aufhalten und das Osteoporoserisiko somit senken. Der Kalziumbedarf von 1000 mg/Tag bei 19–50-Jährigen und 1200 mg/Tag bei über 50-Jährigen sollte möglichst über die tägliche Nahrung (z.B. Milchprodukte) abgedeckt werden (Hong et al. 2013). Falls dies nicht gelingt, muss Kalzium supplementiert werden. Eine relative Kontraindikation zur Kalzium-Applikation besteht lediglich bei Patienten mit Hyperkalzämie, Nephrolithiasis und Niereninsuffizienz. Sie benötigen im Einzelfall hausärztliche Kontrolle. Im Falle der Supplementation sollte die Einzeldosis Kalzium 500 mg und die tägliche Dosis 1500 mg nicht überschreiten, da die Kalziumaufnahme bei größeren Dosen sinkt. Kalzium sollte mit den Mahlzeiten verabreicht werden, damit genügend Magensäure vorhanden ist, die notwendig ist, um die Kalziumverbindungen zu spalten. Die Darmpassage wird dadurch ebenfalls verlangsamt und die Resorption erhöht. Die alleinige Einnahme von Kalzium ist bei einer manifesten Osteoporose nicht ausreichend, aber antiresorptive Medikamente haben einen größeren Effekt auf die Knochendichte, wenn sie zusammen mit Kalzium eingenommen werden (Bruyere und Reginster 2008; van den Bergh 2011). Aufgrund möglicher Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten sollte auf eine separate Einnahme geachtet werden. Die ausreichende tägliche Proteinversorgung ist für die Wirksamkeit des Kalziums unerlässlich (Lindsay und Cosman 2010; Bartl 2011).

#### 1.3.8.2 Vitamin D

Vitamin D wird entweder unter dem Einfluss von ultraviolettem Licht in der Haut synthetisiert, oder es kann mit Nahrungsergänzungsmitteln zugeführt werden. Vitamin D ist unerlässlich für die Regulierung der Kalzium-Homöostase. Über Hydroxylierungen in Leber und Niere wird es in die biologisch aktive Form 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> umwandelt. 25(OH)D<sub>3</sub> wird in der Leber gespeichert. Der Kalziumhaushalt kann im Serum abgelesen werden. Effekte der biologisch aktiven Form sind die erhöhte Kalziumresorption aus dem Darm, die erniedrigte Kalziumausscheidung über die Niere, der vermehrte Einbau von Kalzium in den Knochen und aktivierende Einflüsse auf die Zellen des Knochens. Durch tägliche Sonnenlicht-Exposition von circa 30 Minuten an Unterarmen und Gesicht kann ein Mangelzustand in den meisten Fällen vermieden werden. Große Teile der Bevölkerung haben einen Serum-25(OH)D<sub>3</sub>-Spiegel unter dem anzustrebenden von 20 ng/ml (= 50 nmol/l). Bei den meisten Patienten kann durch eine tägliche Gabe von 800–2000 IE Vitamin D pro Tag ein adäquater Spiegel erreicht werden. Durch höhere Serum-25(OH)D<sub>3</sub>-Konzentrationen kann kombiniert mit der Kalziumaufnahme eine schrittweise Verbesserung der Knochendichte erreicht werden (Bischoff-Ferrari et al. 2009).

Eine weitere Indikation von Vitamin-D-Substitution stellen Rachitis und renale Osteopathie dar, bei der die Hydroxylierung in den Nieren geschädigt ist. In Tabelle 4 werden die Empfehlungen des DVO zur medikamentösen Therapie in Abhängigkeit vom Alter und dem T-Score dargestellt, wobei der Erfolg einer Therapie für T-Werte größer als –2 nicht belegt ist.

Alter des Patienten in Jahren		T-Wert					
Frau	Mann	-2,0 bis -2,5	-2,5 bis -3,0	-3,0 bis -3,5	-3,5 bis -4,0	<-4,0	
50-60	60–70	nein	nein	nein	nein	ја	
60–65	70–75	nein	nein	nein	ја	ја	
65–70	75-80	nein	nein	ја	ја	ја	
70–75	80-85	nein	ја	ја	ја	ја	
>75	>85	ја	ја	ја	ја	ја	

Tabelle 4: Empfehlung für spezifische medikamentöse Therapie (modifiziert nach DVO-Leitlinie 2014)

#### 1.3.8.3 Parathormon-Analoga

Parathormon (PTH) ist ein 84 Aminosäuren langes Peptidhormon, das für die Kalzium-Homöostase ausschlaggebend ist. Teriparatid ist ein rekombinantes 1-34-PTH-Fragment, das seit 2003 in Deutschland als Wirkstoff zur Osteoporosetherapie zugelassen ist. Diese osteoanabole Substanz senkt die Wirbelkörperfrakturrate, nicht jedoch die Rate von Hüftfrakturen. Es bewirkt die Neubildung von Knochengewebe, indem es die Osteoblasten anregt und den Knochenabbau durch Osteoklasten hemmt. Remodeling wird angeregt, wobei der Aufbau überwiegt. Die Knochenbilanz wird also positiv. Prä-Osteoblasten werden zur Differenzierung in aktive Osteoblasten angeregt, und ältere Osteoblasten sterben seltener durch Apoptose. Die Trabekelverbindungen und die Dicke der Kortikalis nehmen bei Frauen zu (Jiang et al. 2003). Neer et al. konnten 2001 eine Verringerung der Frakturhäufigkeit der Wirbelkörper bei Einnahme von Teriparatid nachweisen. Auch die Knochendichte bei Männern entwickelt sich bei täglicher Teriparatidgabe positiv (Orwoll et al. 2003). Die Einnahme sollte 18 Monate nicht überschreiten.

#### 1.3.8.4 Kalzitonin

Kalzitonin ist ein Polypeptid, das in den C-Zellen der Schilddrüse gebildet wird. Als Gegenspieler des PTH bewirkt es eine Hemmung der Freisetzung von Kalzium aus den Knochen durch Osteoklasten. Unter Kalzitonineinfluss können die Osteoklasten ihre "ruffled border" nicht aufrechterhalten. Es ist zur Behandlung von Osteoporose postmenopausaler Frauen sowie von Hyperkalzämie und Morbus Paget zugelassen. Es existieren sowohl subkutane als auch nasale und orale Applikationsformen. Eine Reduktion des lumbalen Frakturrisiko konnte nachgewiesen werden, der Einfluss auf die periphere Frakturrate ist nicht abschließend bewiesen (Cranney et al. 2002).

#### 1.3.8.5 Fluor

Fluor bewirkt eine radiologische Zunahme der Knochendichte, indem es den Anbau von Knochensubstanz durch Osteoblasten anregt. Es wird als Fluorapatit in die Matrix anstelle einer Hydroxy-Gruppe eingelagert. Trotz der teils deutlichen Zunahme an Knochendichte ist eine Reduktion von Wirbelkörper- oder nicht vertebralen Frakturen nicht nachgewiesen (Karow und Lang-Roth 2012). Die Elastizität des Knochens verringert sich unter Fluor-Medikation, sodass das Frakturrisiko bei einem Sturz sogar steigt.

#### 1.3.8.6 Strontiumranelat

Strontiumranelat besteht aus Ranecilinsäure und Strontium. Es imitiert die Wirkung von Kalzium auf den Kationen-Sensing-Rezeptor und wirkt hemmend auf die Aktivität der Osteoklasten bzw. aktivierend auf die Kollagenproduktion der Osteoblasten. Des Weiteren regt es zur Proliferation von Osteoprogenitorzellen an. Das Risiko von Hüft- und Wirbelkörperfrakturen kann gesenkt werden (Karow und Lang-Roth 2012).

Die 2014 veröffentlichte Auswertung einer randomisierten Studie an 7500 postmenopausalen Frauen mit Osteoporose durch die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) hat ergeben, dass durch die Behandlung mit den Präparaten Protelos® und Osteor® ein erhöhtes Risiko besteht, Myokardinfarkte, thrombotische und embolische Ereignisse zu erleiden. Deswegen empfiehlt die EMA die Behandlung mit Protelos® und Osteor® nur bei Patienten ohne kardiovaskuläre Vorerkrankungen sowie bei Patienten mit schwerer Osteoporose ohne die Möglichkeit einer anderweitigen medikamentösen Behandlung. Patienten mit ischämischen Herzerkrankungen, peripherer arterieller Verschlusskrankheit und/oder zerebrovaskulären Erkrankungen oder mit unkontrolliertem Bluthochdruck dürfen die Präparate nicht mehr erhalten (EMA/84749/2014).

#### 1.3.8.7 Bisphosphonate

Alle Bisphosphonate wirken antiresorptiv, indem sie die Osteoklasten bzw. ihre Apoptose hemmen. Sie werden in die Knochenmatrix eingelagert, senken die Frakturrate vertebraler und nicht vertebraler Frakturen um bis zu 50%, steigern die Knochendichte und verbessern die Mikroarchitektur. Hosfield et al. konnten 2004 belegen, dass Bisphosphonate die Farnesyl-Pyrophosphat-Synthetase (FPPS) hemmen. Die Mevalonatbiosynthese ist dadurch beeinträchtigt, da ein GTPbindendes Protein posttranslational verändert wird.

Alendronat, Risedronat und Ibandronat sind für die Therapie der postmenopausalen Osteoporose zugelassen. Alendronat und Risedronat sind außerdem zur Vorbeugung von steroidinduzierter Osteoporose geeignet.

#### 1.3.8.8 Raloxifen

Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) beeinflussen den Stoffwechsel der Knochen resorptionshemmend, also gleichartig wie Östrogene. Sie verbessern so die Mikroarchitektur der Knochen. Das Risiko für Frakturen wird gesenkt. Raloxifen, ein typischer SERM, wirkt auf alle östrogensensitiven Gewebe. Es bindet an den Östrogenrezeptor und bildet eine spezielle Konformation. Nun können spezielle Koaktivator- oder Korepressorproteine an den Rezeptor binden. Das Resultat ist abhängig von den weiteren Transkriptionsfaktoren des Gewebes. So kann Raloxifen sowohl Östrogen-antagonistisch als auch -agonistisch wirken.

Durch die Behandlung über 3 Jahre mit Raloxifen kann zusätzlich die Inzidenz von Mammakarzinomen gesenkt werden (Cummings et al. 1999). Bei einer 4-jährigen Therapie ist dieser Effekt ebenfalls zu beobachten, jedoch ist ein Einfluss nur auf Östrogenrezeptor-positive Tumoren nachweisbar (Martino et al. 2004).

#### 1.3.8.9 Denosumab

Denosumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen Receptor Activator of NF-κB Ligand (RANKL), der bei Bindung die Osteoklasten hemmt und so die Knochenresorption verringern kann. Das Risiko für vertebrale und nicht vertebrale Frakturen kann gesenkt werden. Bei Männern nach Prostatakarzinom
können die Wirbelkörperfrakturhäufigkeit und der Knochenschwund gesenkt werden (Karow und Lang-Roth 2012).

#### 1.3.8.10 Östrogene

Östrogene wirken antiresorptiv und können die Frakturrate senken. Die "Women's Health Initiative Study" hat jedoch klar aufgezeigt, dass das Risiko von Brustkrebs, thromboembolischen Ereignissen, zerebralen Insulten und tiefen Venenthrombosen gesteigert ist (Rossouw et al. 2002). Deshalb sind Östrogene trotz ihrer Wirksamkeit nur bei Unverträglichkeit anderer Präparate zur Therapie empfohlen (Pfeilschifter 2014). Im Falle einer Ovarektomie kann eine Östrogensubstitution sinnvoll sein.

## 1.4 Ganzkörpervibration

Vibration ist definiert als mechanische Schwingung. Als Schwingung bezeichnet man eine sich wiederholende Veränderung der Zustandsgröße in zeitlicher Abhängigkeit (Dresig und Fidlin 2014). Vibration wird nach Dauer der Periode, Frequenz, Form der Schwingung, Amplitude, Richtung der Schwingung und Periodizität eingeteilt.

Dass Knochengewebe in Abhängigkeit von den darauf einwirkendenden Kräften einem dynamischen Umbau unterliegt, wurde von J. Wolff (1836–1902, Chirurg aus Berlin) bereits 1892 in "Das Gesetz der Transformation der Knochen" beschrieben. Der regelhafte Zusammenhang zwischen mechanischer Verformung von Knochen und dem daraus resultierenden Einfluss auf Wachstum, Modifikation, Zustand und Erhaltung des Skeletts sowie auf Knochendichte, -masse und -architektonik auf zellulärer Ebene wurde von H. Frost (1921–2004, Chirurg und Orthopäde aus den Vereinigten Staaten von Amerika) – in Erweiterung zu Wolff – in der "Mechanostat-Hypothese" genau beschrieben und mehrfach aktualisiert (Frost 1960; 1987; 2003).

Das Mechanostat-Modell beschreibt, wie kurzzeitige maximale Deformation der Knochen durch Zug der Muskeln an den Knochen auf Modeling und Remodeling wirkt und quantifiziert die Auswirkungen dieser Knochenverformung. Die Einheit für diese Verformung ist Strain (1000 µStrain entsprechen 0,1% Längenänderung). Je nach Ausmaß hat eine Verformung unterschiedliche, im Folgenden beschriebene Konsequenzen:

- Disuse: <800 μStrain
- Adapted State: 800 bis 1500 µStrain
- Overload: >1500 µStrain
- Fracture: >15000 µStrain

Im Stadium <800 µStrain werden Knochenmasse und -dichte dezimiert. Zwischen 800 und 1500 µStrain sorgen die Umbauprozesse für eine Homöostase. Oberhalb von 1500 µStrain werden Knochenmasse und -dichte vermehrt. Eine Fraktur tritt oberhalb von 15000 µStrain auf. Dieser Wert ist jedoch abhängig von der Ausrichtung der Belastungsachse.

Der Zusammenhang von körperlicher Aktivität und Knochendichte wird schon seit Dekaden erforscht. Diverse Studien konnten positive Effekte von Sport auf die Knochendichte nachweisen (Dalén und Olsson 1974; Stillman et al. 1986). Jedoch ist es wichtig, dass der Sport auf das Alter und den Gesundheitszustand des Patienten adaptiert wird (Bartl 2011). Die Ganzkörpervibration (engl.: *whole body vibration* [WBV]) wird bereits in vielen Bereichen zum Zweck der Therapie, des Trainings und der Rehabilitation eingesetzt. Sie wurde ursprünglich entwickelt, um einer Muskelatrophie bei immobilen Patienten, denen körperliche Betätigung unmöglich ist, entgegenzuwirken. Es werden eine Stärkung der Muskelkraft (Rehn et al. 2007) und der Koordinationsfähigkeit (Runge et al. 2000) sowie eine Verbesserung der Knochenqualität (Flieger et al. 1998) beschrieben. Mit der verbesserten Koordinationsfähigkeit geht eine Verminderung von Stürzen einher (Gusi et al. 2006). Dies stellt also ein wirksames Mittel dar, um die Häufigkeit von Frakturen zu reduzieren.

Diverse Studien in verschiedenen Versuchsanordnungen an Tiermodellen und an Menschen zeigen, dass sich die WBV vorteilhaft auf den Knochenstoffwechsel auswirken kann. Whedon et al. beobachteten bereits 1949, dass der Verlust an Muskelmasse bei bettlägerigen Patienten reduziert werden kann, wenn diese in einem oszillierenden Bett gelagert werden.

Da die reduzierte Muskelbeanspruchung und deren Folgen auch ein Problem in der Schwerelosigkeit darstellen, wurde die Ganzkörpervibrationstherapie unter anderem als Therapieoption für Astronauten entwickelt (Rubin et al. 2001a). Bei gesunden Patienten, die 8 Wochen strikte Bettruhe hielten und täglich eine 5minütige WBV und Widerstandsübungen über den gesamten Zeitraum erhielten, war ein Knochendichteverlust nicht signifikant messbar. Der Knochendichteverlust bei der Kontrollgruppe ohne WBV betrug im Vergleich 3,5%. Der Einfluss auf den Epiphysenkortex war hier größer als auf die Spongiosa (Rittweger und Felsenberg 2004; Rittweger et al. 2010).

In einem Versuchsaufbau bei untrainierten, postmenopausalen Frauen mit einer vertikalen Vibrationsplatte mit 12,6 Hz und einer Amplitude von 3 cm in 60°-Knieflexion über 8 Monate bei täglich 3-maliger Anwendung konnte die Überlegenheit der WBV-Therapie gegenüber einem täglichen 55-minütigen Gehtraining in Bezug auf das Frakturrisiko aufgezeigt werden (Gusi et al. 2006).

Rubin et al. publizierten Ergebnisse eines Tierversuchs, in dem hohe Frequenzen (10–100 Hz) und niedrige Amplituden (<10  $\mu$ Strain) zu einer Verdopplung der Knochenbildungsrate, zur Vermeidung einer Inaktivitätsosteoporose sowie zu einer Verbesserung der trabekulären Strukturen um 25% führten (Rubin et al. 2001a). Eine andere Studie zeigte, dass eine tägliche 30-minütige WBV von 50 Hz mit einer vertikalen Beschleunigung von 2 g über einen Zeitraum von 12 Wochen zur erfolgreichen Beseitigung von Osteoporose im OVX-Rattenmodell führte (Flieger et al. 1998). Oxlund et al. führten in einem Versuch über 90 Tage eine tägliche WBV an ovarektomierten Ratten durch. Die Frequenz betrug 45 Hz und die Amplitude 1,0 mm. In diesem Versuchsaufbau konnten ein erhöhter periostaler Knochenaufbau und eine verminderte endokortikale Knochenresorption an Femur und Tibia nachgewiesen werden. Der Rückgang der Knochendichte durch die Folgen der Ovarektomie konnte durch die Vibration also reduziert werden (Oxlund et al. 2003).

In einer weiteren Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass bei 35-tägiger WBV von ovarektomierten Ratten bei 90 Hz und einer Amplitude von 0,5 mm im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Steigerung der Knochendichte der Wirbelkörper erreicht wird. Die biomechanischen Eigenschaften konnten ebenfalls deutlich verbessert werden. Die größten Einflüsse durch die WBV waren hier auf die spongiösen Anteile des Knochens nachweisbar (Sehmisch et al. 2009).

Ergebnisse der gleichen Versuchsgruppe zur Knochenbruchheilung der Tibia bei ovarektomierten Ratten zeigten bei gleicher Versuchsanordnung eine Verbesserung der Frakturheilung. Die Überbrückung des Frakturspalts konnte durch die Vibration beschleunigt werden (Stuermer et al. 2010a). Ein Versuchsaufbau mit Ganzkörpervibration bei 35, 50, 70 und 90 Hz sowohl horizontal als auch vertikal (0,5 mm, 15 min/Tag über 30 Tage) bei osteoporotischen Ratten mit Tibia-Osteotomie und T-Platten-Osteosynthese zeigte die besten Ergebnisse in Bezug auf Knochenheilung bei den beiden niedrigeren vertikalen Frequenzen.

Gegenstand von aktuellen Untersuchungen ist auch die kombinierte Wirkung von WBV im Zusammenspiel mit medikamentösen Therapien. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass sich die Wirkung von Alendronat auf die trabekuläre Architektur im Rattenmodell verbesserte, wenn die Gabe mit Vibration kombiniert wurde (Chen et al. 2014). Auch Raloxifen und Östrogen sind Gegenstand aktueller Forschungen. Eine Studie, in der die Raloxifen- und die Östrogengabe mit einer 70 Hz-Vibrationstherapie 2-mal täglich über 6 Wochen im Rattenmodell kombiniert wurden, konnte eine positive Beeinflussung des Knochens durch die Agenzien in gleicher Weise wie durch die WBV belegen. In Kombination konnte eine gesteigerte Steifigkeit, ein verbesserter endostaler Knochen sowie eine erhöhte Knochendichte erzielt werden (Stuermer et al. 2014).

Die Kombination von PTH-Gabe mit WBV in einem Versuch an BALB/c-Mäusen (8 Wochen bei 90 Hz für 15 min/Tag an 5 Tagen/Woche) führte zu keiner Steigerung der Knochenmasse oder Verbesserung der Knochenstruktur. Die WBV verbesserte die anabole Wirkung des PTH nicht (Lynch et al. 2011).

Im vorliegenden Werk soll einerseits der Frage nach dem optimalen Vibrationsregime nachgegangen und andererseits untersucht werden, ob sich vertikale oder aber horizontale Vibration vorteilhafter auf die osteoporotische Knochenbruchheilung bei Ratten auswirkt. Im Unterschied zu vorangegangenen Versuchen erhielten die Versuchstiere in dem Tierversuch, der dieser Arbeit zugrunde liegt, zweimal täglich eine Ganzkörpervibrationstherapie.

# 2 Material und Methoden

#### 2.1 Versuchsanordnung

Es wurden 90 weibliche Versuchstiere im Alter von 3 Monaten in 6 Gruppen mit jeweils 15 Tieren eingeteilt. Eine Gruppe wurden scheinovarektomiert (SHAM), die restlichen Ratten wurden ovarektomiert (OVX). Mit Ausnahme der SHAM-Gruppe entwickelten alle Versuchstiere in den folgenden acht Wochen eine manifeste Osteoporose. Um die Frakturheilung beurteilen zu können, folgte nun eine weitere Operation. Die Tibiae wurden in einer standardisierten Methode an der Metaphyse osteotomiert und mittels Plattenosteosynthese versorgt. Die beiden Eingriffe wurden von insgesamt 84 Ratten überlebt. 6 Ratten verstarben direkt infolge der Operation bzw. der Narkose. Eine weitere Ratte musste am 9. Tag nach der Osteotomie aufgrund einer insuffizienten Osteosynthese und des damit verbundenen schlechten Allgemeinzustands durch den zuständigen Tierarzt getötet werden. Ab diesem Zeitpunkt bis zum Ende des Versuchs bestand das Versuchstierkollektiv aus 83 Ratten. 5 Tage nach der Osteotomie wurde mit der Ganzkörpervibration 2-mal täglich begonnen. Diese erfolgte auf Vibrationstischen (VTG, Drehstrom-Vibrationsmotoren Typ HVL/HVE, Vibra Schultheis, Offenbach) in horizontaler oder vertikaler Richtung. Die Frequenzen betrugen je nach Versuchsgruppe 35 Hz oder 70 Hz bei einer Amplitude von 0,5 mm. Die genaue Einteilung der Versuchstiere ist in Tabelle 5 ersichtlich. 30 Tage nach Beginn der Ganzkörpervibration wurden die Versuchstiere durch Dekapitation nach vorheriger tiefer CO<sub>2</sub>-Narkose getötet, um die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen und deren Auswertungen durchführen zu können.

Für sämtliche Versuche wurde durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit eine Genehmigung nach § 9 Abs. 1 Satz 4 Tierschutzgesetz erteilt (Aktenzeichen 33.9-42502-14).

Gruppe	Therapie
1	SHAM-OP
2	OVX
3	OVX und vertikale Vibration bei 35 Hz
4	OVX und vertikale Vibration bei 70 Hz
5	OVX und horizontale Vibration bei 35 Hz
6	OVX und horizontale Vibration bei 70 Hz

#### Tabelle 5: Einteilung der Ratten in die unterschiedlichen Versuchsgruppen

## 2.1.1 Versuchstiere

Für den Versuch wurden 90 weibliche, 3 Monate alte Ratten der Rasse Sprague Dawley (Firma Harlan-Winkelmann GmbH, Borchen) verwendet. Während des gesamten Versuches wurden die Ratten in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) des Universitätsklinikums unter fachkundiger tiermedizinischer und tierpflegerischer Aufsicht gehalten. Die Ratten wurden in Gruppen von je vier bis fünf Tieren in Käfigen der Marke Makrolon® Typ IV gehalten. Zu Beginn des Versuchs wogen sie durchschnittlich 234 g. Eine Tag-Nacht-Periodik der Beleuchtung wurde im zwölfstündigen Wechsel über den gesamten Zeitraum des Versuchs eingehalten.

#### 2.1.2 Futter

Pro Woche bekamen die Versuchstiere 1500 g Futter (ssniff SM R/M, 10 mm-Pellets; ssniff Spezialitäten, GmbH, Soest, Deutschland) je Käfig ad libidum. Am Ende jeder Woche wurde das Restfutter entnommen, gewogen und wieder aufgefüllt. Die Ratten hatten stets Zugang zu Trinkwasser.

# 2.1.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Als Fluoreszensfärbung (Syn.: Fluorochromierung) bezeichnet man die Anfärbung von Zell- und Gewebestrukturen mit Fluoreszenzfarbstoffen zur mikroskopischen Darstellung in UV- oder Blaulicht (Reiche 2006). In diesem Versuch sollte durch die Fluoreszenzfarbstoffe Xylenol, Calcein, Alizarin und Tetracyclin (siehe 2.5.2), untersucht werden, zu welchem Zeitpunkt in welcher Menge neues Knochengewebe während der Frakturheilung gebildet wird. Dies wird durch die kompetitive Bindung der Farbstoffe an die Hydroxylapatitkristalle der neugebildeten Kallusregion ermöglicht.

#### 2.1.4 Ovarektomie

Die Ovarektomie erfolgte bei den Versuchstieren im Alter von 3 Monaten. Zunächst wurde eine CO<sub>2</sub>-Sedierung vorgenommen. Danach wurde eine Narkose mittels 0,3 ml eines 3:1-Gemisches aus Ketamin (115 mg/kg KG) und Xylazin (8 mg/kg KG) durch Injektion in das Peritoneum eingeleitet. Die Narkose konnte durch die gewählte Konzentration für etwa eine Stunde aufrechterhalten werden. Anschließend wurden die Ratten gewogen und der Rücken rasiert. Durch einen paravertebralen Schnitt wurde nun das Retroperitoneum eröffnet und nacheinander die Haut, die einzelnen Muskelschichten und dann das Peritoneum durchtrennt, um das Ovar und den Uterus darstellen zu können (siehe Abb. 1). Die Tuben wurden samt zugehöriger Gefäße jeweils mit einer Klemme gefasst, scharf durchtrennt und mit einem Faden ligiert. Nach Kontrolle auf Bluttrockenheit wurden das Peritoneum und die Muskelschichten per Fadennaht (4.0 Vicrylfaden, Ethicon, Johnson & Johnsen, Norderstedt, Deutschland) und die Haut per Klammernaht (Michel wound brackets 7,5 x 1,75 mm, Gebrüder Martin GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) verschlossen. Nach dem Wundverschluss wurde den Ratten ein Flüssigkeitsdepot von 3 ml 0,9% NaCl-Lösung subkutan in den Nacken appliziert, um einer Dehydration entgegenzuwirken. Anschließend wurden die Tiere zum Aufwachen auf Wärmeplatten gelegt. Intraoperativ erhielt jedes Versuchstier einen subkutanen Transponder zur Identifikation während des Versuches. Weiterhin erhielt jedes Tier eine Antibiotikum-Prophylaxe mit Enrofloxacin (Baytril 2,5% , Fa. Bayer, Leverkusen.), 5 mg/kg KG subkutan und zur Analgesie 0,25 ml Rimadyl 4 mg/kg KG single shot.



Abbildung 1: Darstellung des Ovars vor Durchtrennung und Ligatur des Eileiters

8 Wochen nach Ovarektomie wurde die Tibia-Osteotomie beidseitige vorgenommen, da zu diesem Zeitraum in dem etablierten OVX-Rattenmodell (Kalu 1991) davon ausgegangen werden kann, dass sich eine manifeste Osteoporose entwickelt hatte. Die Narkose erfolgte analog zu 2.1.4. Die Hinterbeine wurden medial durch Rasur von Haaren befreit, das Operationsgebiet desinfiziert, die Haut an der Tibiakante eingeschnitten und die Muskeln vorsichtig zur Seite präpariert, um die anteromediale Tibiakante darstellen zu können. Die Osteosyntheseplatten (57-05140 XS-Titan-Fixationsplatte, T-Form 90°, Stryker Trauma, Selzach, Schweiz) wurden nun angehalten, sodass das kraniale Ende auf Höhe der Epiphyse lag (siehe Abb. 2). Nun konnte zunächst kranial und kaudal jeweils ein Bohrloch angefertigt (siehe Abb. 3) und mit einer Schraube locker belegt werden. An den angrenzenden Plattenlöchern wurde ein Loch lediglich vorgebohrt, jedoch keine Schraube eingebracht. Auf Höhe des mittigen Plattenloches sollte die Osteotomie erfolgen (siehe Abb. 2). Somit wurde hier kein Bohrloch angefertigt. Durch diese standardisierte Vorgehensweise konnte gewährleistet werden, dass die Osteotomie bei den verschiedenen Versuchstieren stets auf der gleichen Höhe angefertigt wurde. Die Tibiametaphyse wurde als Lokalisation für die Osteotomie und die anschließenden Untersuchungen gewählt, da sich dort die Osteoporose am deutlichsten manifestiert. Die locker angezogene distale Schraube wurden nun wieder gelöst, um die Platte zur Seite drehen und die Osteotomie durchführen zu können. Damit die Osteotomieebene stets in derselben Höhe (7 mm distal des Tibiaplateaus) definiert werden konnte, kam eine Schablone (siehe Abb. 4) zum Einsatz. Mittels dieser Schablone war es möglich, die exakte Lage der Osteotomieebene zu definieren. Die Osteotomie wurde mit einer Piezo-Säge (OT 7 Piezosurgery®, Metron Medical Technology, Carasco, Italien) in 90 Grad zur Kortikalis durch die komplette metaphysäre Tibia durchgeführt (siehe Abb. 5). Anschließend wurde die Platte definitiv am Knochen durch Belegung aller angefertigten Bohrlöcher mit Schrauben (siehe Abb. 6) fixiert. Die Muskeln wurden per Faden readaptiert (siehe Abb. 7) und die Haut per Klammernaht verschlossen (siehe Abb. 8). Zur Analgesie erhielten die Versuchstiere additiv Decentan (5 mg/kg KG) subkutan, die übrige postoperative Versorgung erfolgte analog zu 2.1.4.



Abbildung 2: Untere Rattenextremität mit schematischer Darstellung der Osteotosyntheseplatte und Höhe der Osteotomieebene (modifiziert nach Popesko et al. 2002)



Abbildung 3: Bohrung eines Schraubenkanals

Abbildung 4: Anlegen der Schablone zur Bestimmung der Osteotomieebene



Abbildung 5: Durchführung der Osteotomie mittels Piezo-Säge

Abbildung 6: Definitive Belegung der Bohrlöcher mit Schrauben



Abbildung 7: Readaption der Muskeln per Faden



Abbildung 8: Hautverschluss mittels Klammernaht

# 2.1.6 Ganzkörpervibration (WBV)

5 Tage nach der Osteotomie wurde mit einer Applikation von horizontaler bzw. vertikaler Ganzkörpervibration der Ratten für insgesamt 30 Tage zweimal täglich begonnen. Die Gruppenaufteilung ist in Tabelle 5 aufgeführt. Morgens und abends zu definierten Uhrzeiten wurden die Versuchstiere für jeweils 15 Minuten auf die Vibrationstische gestellt (siehe Abb. 9 und 10). Je nach Gruppeneinteilung erfolgte die WBV bei einer Amplitude von 0,5 mm in horizontaler oder vertikaler Richtung mit 35 Hz oder 70 Hz. Es wurde stets darauf geachtet, dass die Tiere mit den Hinterläufen den Boden berührten und sich nicht auf anderen Tieren abstützten, um den Effekt der Vibration bei allen Versuchstieren zu vereinheitlichen. Um dies gewährleisten zu können, erfolgte die Vibration stets in Gruppen von maximal 7–8 Tieren.

Die verwendeten Vibrationsmotoren waren in der Lage, eine Kreisschwingung zu erzeugen. Dies war durch Anbringung zweier Gewichte an den Enden einer Welle möglich. Diese kann dann durch Rotation die gewünschte Kreisschwingung erzeugen. Diese Schwingung konnte so über den Motorfuß an die gewünschten Bauteile fortgeleitet werden, in diesem Fall den Boden des Vibrationstisches. Über den Kontrollschalter an der Steuerungseinheit konnte jeweils die Frequenz auf exakt 35 Hz oder 70 Hz eingestellt werden. In dem Versuchsaufbau, der der vorliegenden Arbeit zugrunde liegt, wurden zwei verschiedene Vibrationstische verwendet. Abhängig von der Anbringung der Motoren erzeugte der eine horizontale (Abb. 10) und der andere vertikale Schwingungen (Abb. 9).



Abbildung 9: Vibrationstisch für vertikale Vibration inklusive Steuerungseinheit

Abbildung 10: Vibrationstisch für horizontale Vibration inklusive Steuerungseinheit

### 2.1.7 Obduktion

Nach 30 Tagen Ganzkörpervibration wurden die Versuchstiere durch Dekapitation in vorheriger tiefer CO<sub>2</sub>-Narkose getötet. Die Hinterläufe wurden abgetrennt und die Tibia durch Exartikulation im Gelenk vorsichtig vom Femur getrennt. Die Haut und Muskeln wurden abgetragen, um die Platten und Schrauben entfernen und wiederverwerten zu können. Jeweils eine Tibia pro Versuchstier wurde für die vorliegende Arbeit verwendet. Die Auswahl der jeweiligen Tibia erfolgte randomisiert. Die Tibia wurde komplett gesäubert und die Fibula entfernt. Anschließend wurden die Knochen bei –20 Grad Celsius gelagert, um die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen durchführen zu können. Die Wirbelkörper (Fürst 2014), Muskeln (Dissertation in Vorbereitung<sup>1</sup>) und die Femora (Dissertation in Vorbereitung<sup>2</sup>) dieses Tierversuchs sind Bestandteil weiterer Dissertationen.

# 2.2 Biomechanischer Test

#### 2.2.1 Ablauf

Ziel des biomechanischen Tests ist die Untersuchung der Belastbarkeit des entstandenen Kallus durch einen 3-Punkt-Biegeversuch, in dem die Tibia an zwei Punkten aufliegt und durch einen Druckstempel einachsig homogen belastet wird. Bevor die Versuchsreihe begonnen wurde, hat der Untersucher sich an 10 Tibia-Paaren von Ratten gleichen Alters und vergleichbar in Größe und Gewicht validiert. Erst bei ausreichender Präzision und Richtigkeit war gewährleistet, dass die durchschnittliche Messabweichung so gering zu erwarten war, dass die Effekte der WBV und nichts anderes gemessen wurden.

Bevor die jeweiligen Knochen untersucht wurden, tauten sie für 3 Stunden bei Raumtemperatur auf. Um Austrocknung entgegenzuwirken, wurden sie stets mit 0,9% NaCl-Lösung feucht gehalten. Für die biomechanische Untersuchung wurde ein Werkstoffprüfgerät (Firma Zwick Roell, Ulm, vom Typ 145660 Z020/TND) verwendet, das durch einen sich 90° vertikal absenkenden Rollen-Stempel (Stuermer et al. 2006) Kraft auf die Tibia ausüben kann (siehe Abb. 12). Das Werkstoffprüfgerät war mit einem Computer verbunden, auf dem die Gerätesoftware "testXpert" (Zwick/Roell, Ulm, Deutschland) zum Verarbeiten der entstandenen Daten verwendet wurde. Die Software maß die einwirkende Kraft in Newton (N) und stellte sie als Spannungs-Dehnungs-Kurve (Kraft-Weg-Diagramm) dar. Hierzu wurde die Tibia in einer von Stürmer et al. entwickelten Haltevorrichtung (2 cm x 1,2 cm x 8 cm großer Aluminiumblock, siehe Abb. 11)

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Mit freundlicher Genehmigung des Verfassers

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Mit freundlicher Genehmigung des Verfassers

fixiert, um die Lagerung zu standardisieren und Messabweichungen zu vermeiden. Die Tibia lag an drei Punkten, der medialen und lateralen Tibiakondyle sowie distal auf (siehe Abb. 11). Sie konnte sich bei Krafteinwirkung frei in der Horizontalen dehnen, jedoch wurde das Verkippen oder Verrutschen des Knochens verhindert. Das Tibiaköpfchen lag stets in einer dafür vorgesehenen Einkerbung in der Haltevorrichtung auf. Die Krafteinwirkung durch den Stempel des Werkstoffprüfgerätes erfolgte auf Höhe der Osteotomieebene (siehe Abb. 12). Durch die anatomische Krümmung der Tibia war gewährleistet, dass der Knochen nur an drei Punkten auflag und sich der restliche Teil in der Schwebe befand. Bei Starten des Biegungsprozesses senkte sich der Stempel zunächst bis zum Erreichen einer Vorkraft von 1 N ab und es konnte noch einmal kontrolliert werden, ob die metaphysäre Tibiakante exakt unter der am Stempel dafür vorgesehenen Einkerbung lag. Beim Fortführen der Messung senkte sich der Druckkopf weiter ab und zeichnete alle 0,1 mm die Kraft auf. Die Tibia verformte sich nun, bis die Streckgrenze (engl.: yield load) erreicht wurde. Die Software beendete die Krafteinwirkung nach Erreichen der Maximalkraft. Vor Erreichen einer Frakturierung wurde der Test allerdings manuell gestoppt, um den makroskopisch Knochen intakten in den folgenden Untersuchungen morphologisch untersuchen zu können.

Einige Knochen verformten sich durch die Krafteinwirkung so, dass sie vor Erreichen des *yield load* auf der Haltevorrichtung auflagen und ein freies Durchbiegen nicht mehr gewährleistet war. Des Weiteren waren einige Knochen schon vor Beginn des biomechanischen Versuchs durch insuffiziente Knochenbruchheilung instabil. In beiden Fällen waren die Messergebnisse unbrauchbar. Pro Versuchsgruppe konnten jedoch stets 8 oder mehr Werte für die Auswertung verwendet werden.



Abbildung 11: Tibia in Haltevorrichtung

Abbildung 12: Tibia samt Haltevorrichtung in Zwick Werkstoffprüfmaschine

#### 2.2.2 Auswertung

Die Auswertung des biomechanischen Tests erfolgte mit der Gerätesoftware "testXpert" und Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmont, USA). Zunächst wurde durch die Gerätesoftware ein Kraft-Weg-Diagramm erstellt und in einem Kurvenverlauf abgebildet, wie er bereits 2006 von Stürmer et al. geschildert wurde. Die relevanten Parameter sind zum einen die Steigung der Bruchkurve, die die Elastizität des Kallus darstellt, und zum anderen die Streckgrenze. Die Spannung, bei der die Kraft erstmalig konstant bleibt oder abfällt, wird als Streckgrenze bezeichnet (Bargel et al. 2012). Zu Beginn der Messung verformt sich die Tibia elastisch durch Dehnung kollagener Fasern, die Steigung ist hier linear. Die Streckgrenze wird an dem Punkt erreicht, an dem die elastische (reversible) in eine plastische (irreversible) Verformung übergeht. Die hierfür erforderliche Belastung ist bei jeder Tibia individuell unterschiedlich und ergibt sich durch die Summe trabekulärer Mikrofrakturen. Nach Erreichen der Streckgrenze kann ein flacherer Verlauf des Graphen beobachtet werden (Abb. 13). Die Streckgrenze wurde aus den Messergebnissen errechnet, indem die Regressionsgeraden und die Standardabweichung aus Werten des linearen Kurvenabschnittes bestimmt wurden. Die Streckgrenze ist der Punkt, an dem die Steigung um mehr als die doppelte Standardabweichung der Regressionsgeraden abfällt (Stuermer et al. 2006).



Abbildung 13: typisches Kraft-Weg-Diagramm eines Drei-Punkt-Biegeversuches an einer Rattentibia

# 2.3 Mikrocomputertomographie

#### 2.3.1 Scan

Im Anschluss an den biomechanischen Test wurden die Tibiae in einem Mikro-CT (eXplore Locus SP-Scanner; GE Healthcare, Ontario, Kanada) weitergehend untersucht. Zur Vorbereitung eines Scanvorganges des Mikro-CT musste das Gerät zunächst 15 Minuten aufgewärmt und auf Betriebstemperatur gebracht werden. Pro Messung wurden jeweils 3 Tibiae in einem Hohlzylinder, der in drei Kammern aufgeteilt war, mit Schaumstoff fixiert. Dies erfolgte, um Bewegungen während des Scans und daraus resultierende Unschärfe in der Rekonstruktion zu vermeiden. Die Tibiae wurden mit dem Tibiaplateau nach unten positioniert. Der Boden des Zylinders wies eine im CT-Scan erkennbare Gravur auf, um die Knochen eindeutig zuordnen zu können und beinhaltete einen festen Platz für ein Phantom, welches der Kalibrierung des Scans diente und je eine Kammer mit Stoffen der Dichte von Wasser, Luft und Knochen besaß. Es wurde stets direkt beim Beladen des Hohlzylinders mit den Knochen schriftlich festgehalten, welche Tibia (Versuchstier-Nummer) in welche Kammer des Zylinders gefüllt wurde, um Verwechslungen ausschließen zu können. So konnte gewährleistet werden, dass die Knochen zu jeder Zeit den Versuchstieren eindeutig zugeordnet werden konnten. Der Zylinder selbst bestand aus einem nicht röntgendichten Material. Zur

Erstellung der Daten wurde die Gerätesoftware GEHC MicroView (v2.1.2, GE Healthcare) verwendet. Vor Beginn des Scans wurde in der Gerätesoftware der Zielbereich, der von der Gravur im Boden des Hohlzylinders bis über die Bohrlöcher in den Knochen reichen musste, festgelegt. Der kaudal der Bohrungen liegende Teil der Tibia war für diesen Versuch irrelevant und wurde nicht gemessen, um den Scanvorgang so kurz wie möglich zu gestalten und das Datenvolumen für die Rekonstruktionen nicht unnötig zu vergrößern. Durch Starten des Scanvorganges erstellte der  $\mu$ -Computertomograph nun einen Rohdatensatz an Schichtbildern. Es wurde stets das folgende Scanprotokoll verwendet:

Röhrenspannung: 72 kVp

- Stromstärke: 90 µA
- Aufnahmedauer: 1600 ms
- Rotation: 360°
- Pixel-Größe: 0,029 mm
- Aufnahmen: 900

### 2.3.2 Rekonstruktion

Die dreidimensionale Rekonstruktion aus dem zweidimensionalen Schnittbild-Rohdatensatz erfolgte mithilfe der Software GEHC MicroView (v2.1.2, GE Healthcare). Die Software stellte die Schnittbild-Rohdaten in einer Mehrfelderansicht in der transversalen, der frontalen und der sagittalen Ebene dar. So war es möglich, dreidimensionale Messrahmen zu erzeugen. Zunächst musste eine Kalibrierung der Dichtewerte vorgenommen werden. In dem mitgescannten Phantom mussten die Hounsfieldwerte für Luft, Wasser und Knochen zugeordnet werden. Der Rohdatensatz enthielt pro Scan drei Tibiae, die nun einzeln rekonstruiert werden konnten. Die Zuordnung der Rekonstruktion zu einem bestimmten Versuchstier war durch die Gravur im Hohlzylinder eindeutig möglich. Es wurde in der Software erneut ein Messrahmen erzeugt, der die entsprechende Tibia umschloss. Der vom Messrahmen umschlossene Bereich wurde beim Starten des Rekonstruktionsprozesses in ein dreidimensionales Bild der jeweiligen Tibia umgewandelt und gespeichert.

#### 2.3.3 Auswertung

Die Auswertung der in Abschnitt 2.3.2 beschriebenen Rekonstruktionen erfolgte mit der eigens entwickelten Software 3D-OsteoAnalyze v 1.000.4 (entwickelt von Christian Dullin, Funktionelle und Anatomische Kleintierbildgebung, Abteilung Diagnostische Radiologie, Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland). Mittels dieser Software war es möglich, Volumen und mittlere Dichte von Knochenanteilen zu berechnen. Die in Abschnitt 2.3.2 beschriebene Zuordnung von Hounsfieldwerten des Phantoms ermöglicht 3D-OsteoAnalyze anschließend eine Knochendichtemessung in g/cm<sup>3</sup>. Die Genauigkeit dieser Messdaten wird durch die Größe der Voxel beschränkt. Zur Festlegung des Messbereiches wurde zunächst ein Messrahmen auf die Höhe der Osteotomieebene zentriert, sodass er sich jeweils 2,5 mm proximal und distal befand. Die außerhalb des Rahmens liegenden Teile der Knochenrekonstruktion wurden verworfen, um die Rechenzeit durch irrelevante Daten nicht unnötig zu verlängern (siehe Abb. 14). Zur Berechnung der Volumina und Dichtewerte war es nun notwendig, mittels eines Histogramms Grauwertbereiche (siehe Abb. 16) für die relevanten Flächen zu bestimmen. Dies geschah mittels visueller Abgrenzung der Strukturen des Knochens voneinander (siehe Abb. 15) durch Verschieben zweier Messbalken innerhalb des Grauwerthistogramms (siehe Abb. 16). Die einzelnen Peaks des Histogramms stellen die unterschiedlichen Flächen, die sich in ihrer Dichte unterscheiden, dar. Die x-Achse des Grauwerthistogramms repräsentiert die Schwächung der Grauwerte und die y-Achse Bildpunkte. Auf der x-Achse des Histogramms liegen von rechts nach links in aufsteigender Dichte Luft, Probenhalter, weicher Kallus, harter Kallus und Kortikalis (siehe Abb. 17). Die Messbalken wurden nun so verschoben, dass zunächst das gesamte kalzifizierte Gewebe ohne Luft und Probenhalter markiert war. Die Schwellenwerte wurden in der Software gespeichert. Als Nächstes mussten die Schwellenwerte für die Kortikalis eingegrenzt und gespeichert werden. Im letzten Arbeitsschritt wurde das spongiöse Gewebe (Gesamtgewebe ohne Kortikalis) markiert und dessen Schwellenwerte in der Software hinterlegt. 3D-OsteoAnalyze war nun in der Lage, durch die definierten Markierungen innerhalb des Grauwerthistogramms die mittlere Dichte und das Volumen von Gesamtgewebe, Kortikalis und des spongiösen Gewebes zu berechnen. Das in 2.3.1 beschriebene Phantom wurde ebenfalls rekonstruiert und diente der Software zur Umrechnung der GVal-Werte in die BMD (in mg/cm<sup>3</sup>). Anhand der Daten für Kortikalis- und Spongiosavolumen und Gesamtvolumen (BV/TV) konnte der Anteil des mineralisierten Knochenanteils am Gesamtvolumen errechnet werden. Parfitt et al. legten 1987 fest, dass dieser in % angegeben wird.





Abbildung 14: Messrahmen in 3D-OsteoAnalyse; der Rahmen ist auf die Osteotomieebene zentriert und beinhaltet den Bereich 2,5 mm ober- und unterhalb der Osteotomie

Abbildung 15: Spongiöses Gewebe ohne Kortikalis markiert





Abbildung 16: Histogramm in 3D-OsteoAnalyse (die grünen Messbalken rahmen das spongiöse Gewebe ohne die Kortikalis ein)

Abbildung 17: Peaks im Histogramm und Flächenzuordnung: 1 = Luft, 2 = Probenhalter, 3 = spongiöses Gewebe (weicher und harter Kallus), 4 = Kortikalis

Messparameter	Einheit	Bedeutung		
BV/TV	%	Anteil des mineralisierten Knochens am Gesamtvolumen		
		(Kortikalisvolumen / Gesamtvolumen x 100%)		
Mittlere Dichte Gesamtge- webe	GVal	Arithmetisches Mittel der Dichtewerte im Bereich 3 und 4 in Abb. 17		
Volumen Gesamtgewebe	mm <sup>3</sup>	Volumen im Bereich 3 und 4 in Abb. 17		
Dichte Gesamtgewebe	mg/cm <sup>3</sup>	GVal in Bereich 3 und 4 in Abb. 17 umg rechnet in Massendichte		
Mittlere Dichte Kortikalis	GVal	Arithmetisches Mittel der Dichtewer im Bereich 4 in Abb. 17		
Volumen Kortikalis	mm <sup>3</sup>	Volumen im Bereich 4 in Abb. 17		
Dichte Kortikalis	mg/cm <sup>3</sup>	GVal in Bereich 4 in Abb. 17 umgerech net in Massendichte		
Mittlere Dichte spongiöses Gewebe	GVal	Arithmetisches Mittel der Dichtewerte im Bereich 3 in Abb. 17		
Volumen spongiöses Ge- webe	mm <sup>3</sup>	Volumen im Bereich 3 in Abb. 17		
Dichte spongiöses Gewebe	mg/cm <sup>3</sup>	GVal in Bereich 3 in Abb. 17 umgerech- net in Massendichte		

## Tabelle 6: Messparameter der Mikro-CT mit Einheiten und Bedeutung

# 2.4 Mikroradiographie

# 2.4.1 Herstellung der Mikroradiographien

Im Anschluss an die Mikro-CT-Untersuchungen wurden die Tibiae einer mikroradiographischen Untersuchung unterzogen. Für diesen Teil wurden die Tibiae in einer aufsteigenden Alkoholreihe (40%, 70%, 80%, 96%) dehydriert und von Fett befreit. Jeder Schritt der Alkoholreihe dauerte eine Woche. Anschließend wurden die Knochen einzeln in eine Glasform mit einem Gemisch aus 1000 ml Methylmethacrylat (MMA), 200 ml Dibutylphtalat und 29 g Benzoylperoxid eingelagert und für ca. drei Wochen bis zum vollständigen Verfestigen im Wasserbad gekühlt. Aus den entstandenen Kunststoffblöcken mit eingeschlossenen Knochen wurden mit einer Leica-Innenlochsäge (Typ SP 1600 Sägemirkotom, Leica Instruments GmbH, Nussloch) ca. 10 Sagittalschnitte pro Tibia von jeweils 150 μm Dicke hergestellt (die Schnittdicke konnte um ±20 μm variieren). Jeweils drei zentrale benachbarte Schnitte wurden pro Tibia ausgewählt. Mithilfe eines Faxitron-Röntgengerätes (Typ 43855A, IL 60089, Faxitron X-ray system, Hewlett Packard, San Diego, USA) wurden auf Kodak Professional-Film (IDUSTREX SR45 Film ISO 9002, Rochester, New York) die Mikroradiographien angefertigt. Die Filme wurden nach der abgeschlossenen Entwicklung etikettiert und archiviert. Nach dreiminütiger Belichtungszeit bei 10 kV Röhrenspannung und 0.3 mA Stromspannung entstanden die Mikroradiographien, die auf Objektträgern mittels Eukit (Fa. Kindler, Freiburg, Deutschland) fixiert wurden.

## 2.4.2 Auswertung

Ein Leica-Stereomakroskop (MZ 7-5, Bensheim, Deutschaland), das mit einer Kaltlichtlampe (Leica KL 1500 LCD) versehen war, diente zur Auswertung. Zum Scannen der Bilder in den Computer (Intel Pentium 4, 2,6 GHz) wurde eine Leica-Kamera (DC 490F, Bensheim, Deutschland) genutzt. Der Computer war mit der Software Leica Quantimet QWin 2003 (Leica, Bensheim, Deutschland) ausgestattet, der die auch Steuerung der Kamera diente. Die bestmögliche Konfigurationseinstellung von Kamera und Software wurde in vorangegangenen Versuchen festgestellt:

Zur optimalen Darstellung aller relevanten Strukturen auf dem Computerbildschirm wurde ein 1,0er-Objektiv verwendet. Die mechanische Blende wurde auf "B" eingestellt (Möglichkeiten von minimal nach maximal: A–E). Die Lampentemperatur wurde auf 3000 K eingestellt.

Durch geringe Variationen der Schichtdicke der einzelnen histologischen Schnitte von  $\pm 20$  µm ergab sich eine minimal unterschiedliche Helligkeit am Computerbildschirm. Dies erforderte eine individuelle Adaption der Belichtungszeit (innerhalb eines Bereichs von 345–460 ms).

#### 2.4.3 Morphometrischer Auswertungsalgorithmus

Mittels der Software Leica Quantimet QWin 2003 wurden die angefertigten Mikroradiographien digital ausgewertet. Vor dem Beginn der Auswertungen validierte sich der Untersucher an 30 Schnitten von 10 Tibiae. Die Auswertung erfolgte verblindet, d.h. ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit, um eine Beeinflussung der Ergebnisse zu vermeiden (Bias). Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsabläufe waren in ihrer Reihenfolge durch einen speziell programmierten Algorithmus vorgegeben:

 Einlesen der Schnitte: Die Objektträger wurden mittels der in 2.4.2 beschriebenen Geräte digital dargestellt. Um stets eine gleiche Positionierung der Tibiaschnitte zu gewährleisten, wurde die distale Osteotomielinie an einer horizontalen Hilfslinie ausgerichtet (Abb. 18). Jede Tibia wurde auf dem Computerbildschirm gleich ausgerichtet (ventral links, dorsal rechts, proximal oben, distal unten).



Abbildung 18: Standardisierte Ausrichtung der Osteotomieebene an der Hilfslinie

II. Graudetektion: Um alle sichtbaren Knochenanteile erfassen zu können, bietet die Software die Möglichkeit, manuell den Grad der Detektion festzulegen (Abb. 19). Dies erwies sich als notwendig, um Fehler in der automatischen Detektion der Software zu vermeiden.



Abbildung 19: Standardisierte, computerassistierte Graudetektion eines Tibiaschnittes

- III. Definition der relevanten Flächen: Mittels eines Stiftes, der den Mauszeiger lenkte, konnten einzelne Flächenanteile eingerahmt (siehe Abb. 20) und den nachfolgend aufgelisteten Arealen zugeordnet werden (wobei der Algorithmus die doppelte Zuordnung eines Bereiches verhinderte):
  - a. Gesamte Knochenfläche samt Kallus
  - b. Kortikalisfläche proximal ventral
  - c. Kortikalisfläche proximal dorsal
  - d. Kortikalisfläche distal ventral
  - e. Kortikalisfläche distal dorsal
  - f. Kallusfläche ventral
  - g. Kallusfläche dorsal
  - h. Kallusfläche endostal
  - *i.* Trabekelfläche proximal
  - j. Trabekelfläche distal



j

Abbildung 20 a-j: Standardisierte, computerassistierte Detektion der Kallus-, Kortikalis- und Trabekelflächen der metaphysären Rattentibia während der mikroradiographischen-Untersuchung

- IV. Anschließend wurde durch Einzeichnung von jeweils 5 Vektoren (siehe Abb.21) die Dicke von folgenden Bereichen bestimmt:
  - a. Kortikalis distal ventral
  - b. Kortikalis distal dorsal
  - c. Gesamter Knochen proximal
  - d. Gesamter Knochen distal
  - e. Kallus ventral
  - f. Kallus dorsal



Abbildung 21: Die Bilder a-f zeigen die standadisierte, computerassistierte Bestimmung der Knochenflächen von Kortikalis, gesamtem Knochen und Kallus

Messparameter	Einheit	Bedeutung		
Kortikalisdicke distal ventral	mm	Mittelwert der fünf Vektoren aus Abb. 21 a ergibt die durchschnittliche Dicke des dista- len, ventralen Kortikalisanteils		
Kortikalisdicke distal dorsal	mm	Mittelwert der fünf Vektoren aus Abb. 21 b ergibt die durchschnittliche Dicke des dista- len, dorsalen Kortikalisanteils		
Knochendurchmesser proximal	mm	Mittelwert der in Arbeitsschritt Abb. 21 c ermittelten Vektorenbeträge		
Knochendurchmesser distal	mm	Mittelwert der in Arbeitsschritt Abb. 21 d ermittelten Vektorenbeträge		
Kallusdicke ventral	mm	Mittelwert der in Arbeitsschritt Abb. 21 e ermittelten Vektorenbeträge		
Kallusdicke dorsal	mm	Mittelwert der in Arbeitsschritt Abb. 21 f ermittelten Vektorenbeträge		
Knochenflächedichte Kortikalis distal ventral	%	Prozentualer Anteil des Knochens der als Kortikalis distal ventral definierten Fläche		
Knochenflächedichte Kortikalis distal dorsal	%	Prozentualer Anteil des Knochens der als Kortikalis distal dorsal definierten Fläche		
Knochenflächendichte Kortikalis ventral	%	Prozentualer Knochenanteil der als Kallus ventral definierten Fläche		
Knochenflächendichte Kortikalis dorsal	%	Prozentualer Knochenanteil der als Kallus dorsal definierten Fläche		
Knochenflächendichte Kallus endostal	%	Prozentualer Knochenanteil der als Kallus endostal definierten Fläche		
Knochenflächendichte Trabekel distal	%	Prozentualer Knochenanteil der als Trab- ekel distal definierten Fläche		
Anzahl Trabekel absolut	absolut	Absolute Anzahl an Trabekelkreuzungen in Bereich der distalen Trabekelfläche		
Dichte Trabekelkreuzungen	1/ mm <sup>2</sup>	Anzahl der Trabekelkreuzungen pro mm <sup>2</sup> im Bereich der distalen Trabekelfläche		
Mittlere Trabekelkreuzungen	μm	Mittelwert der Trabekeldurchmesser im Bereich der distalen Trabekelfläche		

# Tabelle 7: Messparameter der Mikroradiographie mit Einheit und Bedeutung

# 2.5 Polychrome Sequenzmarkierung

#### 2.5.1 Prinzip

Auf die Mikroradiographischen Untersuchungen der Tibiae folgte eine histologische Untersuchung der Präparate. Die polychrome Sequenzmarkierung (PSM) ist eine Messtechnik zur zeitlichen und räumlichen Darstellung von Knochenneubildung (Povacz 2007) und deren Umfang. Somit stellt sie eine Möglichkeit dar, dynamische Prozesse im Verlauf der Frakturheilung abzubilden, im Vergleich zu anderen radiologischen Methoden, die nur eine Momentaufnahme zeigen. Unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe, die in einer definierten zeitlichen Reihenfolge verabreicht wurden, bildeten Chelatkomplexe mit Kalzium, die in das neugebildete Knochengewebe eingebettet wurden. Es bildeten sich nun in unterschiedlichen Farben fluoreszierende Banden aus. Eine Fixation und Herstellung der Präparate erfolgte analog zu 2.4.1. Per Fluoreszenzmikroskop konnten nun die Banden einem exakten Zeitraum innerhalb der Frakturheilung zugeordnet und hinsichtlich ihrer Größe untersucht werden.

#### 2.5.2 Fluorochrome

Nach der Osteotomie wurden zum Zweck der PSM Xylenolorange (XO), Calcein-Grün (CG), zweimal Alizarinkomplexon (AK) und Tetracyclinhydrochloride (TC) (alle Merck, Darmstadt, Deutschland) als Bolus subkutan appliziert. TC wurde in 0,9% NaCl-Lösung gelöst, die übrigen in Aqua PH5. In der Kallusregion wurden die Substanzen nach Applikation nun in das bis zur Applikation gebildete neue Knochengewebe eingebettet.

Das Applikationsvolumen der verabreichten Fluorochrome und der Verabreichungszeitpunkt ist aus Tabelle 8 ersichtlich.

Fluorochrom	Applikations-	Applikationstag	Markierungs-	Farbe in
	volumen		zeitraum	Blau-
				fluoreszenz
ХО	90 mg/kg KG	13. Tag	0-13	orange
CG	10 mg/kg KG	18. Tag	14-18	grün
АК	30 mg/kg KG	24. & 26.Tag	19-26	rot
TC	25 mg/kg KG	35. Tag	27-35	gelb

#### Tabelle 8: Injizierte Fluorochrome in ihrer zeitlichen Abfolge

#### 2.5.3 Auswertung

Per Auflicht-Fluoreszenz-Stereomakroskop (Leica Stereomakroskop MZ 7-5 mit FluoCombi III. Bensheim, Deutschland) wurden die Präparate in Blaulichtfluoreszenz ausgewertet. Eine Quecksilberhöchstdrucklampe (Leica KL 1500 LCD, Bensheim, Deutschland) mit 50 Watt Leistung wurde als Lichtquelle verwendet. Ein Anregungsfilter (Wellenlängenbereich 450-490 nm) wurde zur Anregung der Fluorochrome mit blauem Licht gebraucht. Die Software Quantimet QWin 2003 (Leica, Bensheim, Deutschland) ermöglichte die Steuerung einer Kamera (Leica DC 300F, Bensheim, Deutschland), mit deren Hilfe digitalisiert werden konnte. Die Software diente ebenfalls zur Analyse der Bilder. Die bestmögliche Konfigurationseinstellung von Kamera und Software wurde in vorangegangenen Versuchen festgestellt:

Zur optimalen Darstellung aller relevanten Strukturen auf dem Computerbildschirm wurde ein 1,6er-Objektiv verwendet. Durch die geringen Variationen der Schichtdicke der einzelnen Schnitte von ±20 µm ergab sich eine minimal unterschiedliche Helligkeit am Computerbildschirm. Dies erforderte eine individuelle Adaption der Belichtungszeit (innerhalb eines Bereichs von 9,7–12,9 s). Ein in der Software enthaltener Gain-Regler verstärkte die Helligkeit der Bilder um das Dreifache.

### 2.5.4 Morphometrischer Auswertungsalgorithmus

Mittels der Software Leica Quantimet QWin 2003 wurden die angefertigten PSM digital ausgewertet. Vor dem Beginn der Auswertungen validierte sich der Untersucher an 30 Schnitten von 10 Tibiae. Die Auswertung erfolgte verblindet, um eine Beeinflussung der Ergebnisse zu vermeiden. Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsabläufe waren in ihrer Reihenfolge durch einen speziell programmierten Algorithmus vorgegeben:

 Einlesen der Schnitte: Die Objektträger wurden mittels der in 2.5.3 beschriebenen Geräte digital dargestellt. Um stets eine gleiche Positionierung der Tibiaschnitte zu gewährleisten, wurde die distale Osteotomielinie an einer horizontalen Hilfslinie ausgerichtet (siehe Abb. 22). Jede Tibia wurde auf dem Computerbildschirm gleich ausgerichtet (ventral links, dorsal rechts, proximal oben, distal unten).



Abbildung 22: Standardisierte Ausrichtung der Osteotomieebene an der Hilfslinie

II. Nach dem Einlesen wurde die Kaltlichtlampe ausgeschaltet. Die Fluorochrome wurden nun zur Fluoreszenz angeregt. Nach ca. 100 s Belichtungszeit fertigte die Software bei Dunkelheit ein Bild des fluoreszierenden Schnittes an (siehe Abb. 23). Die einzelnen Flächen wiesen verschiedenen Farben, abhängig vom Farbstoff, auf.



Abbildung 23: Bild eines zur Fluoreszenz angeregten Schnittes nach 100 s Belichtungszeit

III. Definition der relevanten Flächen: Mittels eines Stiftes, der den Mauszeiger lenkte, konnten einzelne Flächenanteile eingerahmt (siehe Abb. 24) und den nachfolgend aufgelisteten Arealen zugeordnet werden (wobei der Algorithmus eine doppelte Zuordnung eines Bereiches verhinderte):

- a. Gesamte Knochenfläche Kallus
- b. Kortikalisfläche proximal ventral
- c. Kortikalisfläche proximal dorsal
- d. Kortikalisfläche distal ventral
- e. Kortikalisfläche distal dorsal
- f. Kallusfläche ventral
- g. Kallusfläche dorsal
- h. Kallusfläche endostal
- *i.* Trabekelfläche proximal
- j. Trabekelfläche distal



Abbildung 24 a-j: Standardisierte, computerassistierte Detektion der Kallus-, Kortikalis- und Trabekelflächen der metaphysären Rattentibia während der polychromen Sequenzmarkierung

IV. Flächen-Zuordnung in Abhängigkeit vom Fluorochrom: Es wurden die endostalen, ventralen und dorsalen Kallusanteile bestimmt, wobei nur die

fluoreszierenden Anteile einbezogen wurden. Die Gebiete wurden den jeweiligen Fluorochromen zugeordnet (siehe Abb. 25–27). XO konnte aufgrund seines geringen Anteils, welcher von CG überdeckt wurde, nicht gemessen werden. Die Reihenfolge (XO  $\rightarrow$  CG  $\rightarrow$  AK  $\rightarrow$  TC) wurde durch den Algorithmus festgelegt:

- a. CG markierter Anteil
- b. AK markierter Anteil
- c. TC markierter Anteil



Abbildung 25: CG markierter Anteil



Abbildung 26: AK markierter Anteil



Abbildung 27: TC markierter Anteil

# Tabelle 9: Messparameter der polychromen Sequenzmarkierung mit Einheit und Bedeutung

Messparameter	Einheit	Bedeutung		
Gesamtfläche Kallus ventral	mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche des gesamten ventralen Kal- lus		
CG-Fläche Kallus ventral	mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche des CG-markierten ventra- len Kallus		
AK-Fläche Kallus ventral	mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche des AK-markierten ventra- len Kallus		
TC-Fläche Kallus ventral	mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche des TC-markierten ventra- len Kallus		
Gesamtfläche Kallus dorsal	mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche des gesamten dorsalen Kal- lus		
CG-Fläche Kallus dorsal	mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche des CG-markierten dorsale Kallus		
AK-Fläche Kallus dorsal	mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche des AK-markierten dorsalen Kallus		
TC-Fläche Kallus dorsal	mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche des TC-markierten dorsalen Kallus		
Gesamtfläche Kallus endostal	mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche des gesamten endostalen Kallus		
CG-Fläche Kallus endostal	mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche des CG-markierten endosta- len Kallus		
AK-Fläche Kallus endostal	mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche des AK-markierten endosta- len Kallus		
TC-Fläche Kallus endostal	mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche des TC-markierten endosta- len Kallus		
Additivkallus	mm <sup>2</sup>	Summe der ventralen, dorsalen und endos- talen Kallusflächen		

# 2.5.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten und deren graphische Darstellung erfolgte mittels GraphPad Prism (Version 4.00a, April 2003, GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Eine einfaktorielle Varianzanalyse wurde als Verallgemeinerung des tTests duchgeführt, da von unabhängigen Stichproben auszugehen ist. Als Verfahren wurde eine One-way ANOVA (Analysis of Variance) gewählt. Dieses Verfahren verschaffte jedoch noch keine Klarheit über signifikante Unterschiede der Mittelwerte der einzelnen Testgruppen zueinander. Dies konnte mittels einer multiplen Vergleichstechnik untersucht werden. Es wurde ein Tukey-Kramer-posthoc-Test angewandt (Muche et al. 2011). Als Signifikanzniveau wurde ein  $\alpha < 0,05$  festgelegt. Das heißt, ein p-Wert <  $\alpha$  wird als signifikanter p-Wert angesehen.

# 3 Ergebnisse

Nachfolgend werden die Messparameter der einzelnen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit graphisch als Balken- und Liniendiagramme dargestellt. Eine Tabelle fasst am Ende jedes Abschnittes die Ergebnisse zusammnen. In den Tabellen sind sowohl die Mittelwerte der Messparameter der einzelnen Testgruppen aufgeführt als auch die entsprechenden Standardabweichung und etwaige Signifikanzen.

Die unterschiedlichen Signifikanzniveaus werden durch Symbole folgendermaßen dargestellt:

\* = p < 0,05 = signifikant

Zur weiteren Unterscheidung werden folgende Symbole verwendet:

<sup>1</sup> = signifikant gegenüber SHAM-Kontrollgruppe

<sup>2</sup> = signifikant gegenüber OVX-Testgruppe

<sup>3</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-vert-Testgruppe

<sup>4</sup> = signifikant gegenüber 70Hz-vert-Testgruppe

<sup>5</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-horiz-Testgruppe

<sup>6</sup> = signifikant gegenüber allen anderen Testgruppen



3.1 Gewicht der Versuchstiere im Verlauf

Abbildung 28: Darstellung des mittleren Körpergewichts der Versuchstiere der einzelnen Gruppen pro Versuchswoche über den gesamten Verlauf des Versuchs; <sup>6</sup> = signifikant gegenüber allen anderen Testgruppen, \*= p < 0.05 = signifikant

Aus Abb. 28 ist ersichtlich, dass alle Versuchstiere im Verlauf an Körpergewicht zunahmen. Zu Beginn des Versuchs wogen die Tiere der verschiedenen Testgruppen annährend gleich viel. Nach der Osteotomie war eine kurzzeitige Abnahme des Körpergewichtes in allen Testgruppen zu verzeichnen, ab der 11. Woche war wieder eine Zunahme zu beobachten. Ab der zweiten Versuchswoche ist ein signifikanter Unterschied von allen Testgruppen mit Ovarektomie zur SHAM-Gruppe in Bezug auf das Körpergewicht auffällig. Die SHAM-Kontrollgruppe nahm im Verlauf am wenigsten an Körpergewicht zu. Die in Abbildung 28 und Tabelle 10 verwendeten Daten sind identisch mit denen in weiteren Arbeiten aus dieser Forschungsgruppe, dort werden die Einflüsse der WBV auf die Wirbelkörper (Fürst 2014), die Muskeln (Dissertation in Vorbereitung<sup>3</sup>) und die Femora (Dissertation in Vorbereitung<sup>4</sup>) der Ratten desselben Tierversuchs untersucht.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Mit freundlicher Genehmigung des Verfassers

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Mit freundlicher Genehmigung des Verfassers

Woche	SHAM	ovx	35Hz vert	70Hz vert	35Hz horiz	70Hz horiz
1	250±13	247±14	249±12	246±11	243±13	244±10
2	253±8	262±12	263±8	257±9	257±9	256±5
3	258±10 (* <sup>6</sup> )	296±12	299±10	291±11	292±10	284±9
4	264±11 (* <sup>6</sup> )	323±13	326±13	317±12	322±11	313±13
5	265±14 (* <sup>6</sup> )	334±16	334±14	329±15	334±14	329±14
6	262±10 (* <sup>6</sup> )	339±14	342±12	333±16	340±15	334±12
7	271±13 (* <sup>6</sup> )	347±16	350±15	342±19	345±17	340±14
8	273±10 (* <sup>6</sup> )	353±17	355±16	345±19	354±17	345±15
9	275±11 (* <sup>6</sup> )	352±19	354 ±16	347±18	352±16	343±14
10	267±18 (* <sup>6</sup> )	336±17	337±23	326±14	336±16	326±16
11	265±12 (* <sup>6</sup> )	326±18	3245±20	309±13	321±17	312±15
12	273±12 (* <sup>6</sup> )	321±30	330±21	311±19	326±19	313±16
13	278±9 (* <sup>6</sup> )	336±22	335±20	321±17	338±22	319±18
14	279±9 (* <sup>6</sup> )	341±23	341±20	328±17	338±223	327±20

# Tabelle 10: Darstellung der mittleren Körpergewichte ± Standardabwei-chung der Versuchstiere im Verlauf in Gramm [g]




**Abbildung 29: Darstellung der mittleren täglichen Futteraufnahme jedes Versuchstieres im Verlauf pro Woche;** <sup>6</sup> = signifikant gegenüber allen anderen Testgruppen, \*= p < 0,05 = signifikant

Es war zu beobachten, dass alle Testgruppen bis zur Osteotomie in der 8. Woche eine leicht sinkende Futteraufnahme aufwiesen (Abb. 29). Bis zum Zeitpunkt der Osteotomie nahm die SHAM-Kontrollgruppe deutlich weniger Futter auf. Nach der Osteotomie sank die Futteraufnahme deutlich in allen Gruppen und stieg langsam bis zum Versuchsende wieder an. Berechnet wurde die Futteraufnahme pro Tier pro Tag. Die in Abbildung 29 und Tabelle 11 verwendeten Daten sind identisch mit denen in weiteren Arbeiten aus dieser Forschungsgruppe, dort werden die Einflüsse der WBV auf die Wirbelkörper (Fürst 2014), die Muskeln (Dissertation in Vorbereitung<sup>5</sup>) und die Femora (Dissertation in Vorbereitung<sup>6</sup>) der Ratten desselben Tierversuchs untersucht.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Mit freundlicher Genehmigung des Verfassers

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Mit freundlicher Genehmigung des Verfassers

Woche	SHAM	OVX	35Hz vert	70Hz vert	35Hz horiz	70Hz horiz
3	16±0,4 (* <sup>6</sup> )	21±0,9	22±0,8	22±0,7	22±0,3	21±2,6
4	16±0,8 (* <sup>6</sup> )	22±1,9	23±1,4	23±0,8	23±0,2	23±0,4
5	15±1,1 (* <sup>6</sup> )	23±1,0	22±0,6	22±0,9	23±0,7	23±0,8
6	16±0,9 (* <sup>6</sup> )	22±0,8	22±1,3	21±0,4	22±0,4	22±0,9
7	17±0,7 (* <sup>6</sup> )	21±0,9	21±0,8	21±0,9	22±0,5	22±0,8
8	16±0,5 (* <sup>6</sup> )	20±1,1	20±0,9	20±1,0	21±0,9	21±0,6
9	16±0,5	19±1,1	21±2,2	20±2,7	19±0,6	21±2,9
10	12±2,2	13±1,3	13±2,7	13±1,5	14±0,7	14±0,7
11	16±2,1	15±1,3	14±0,9	16±4,0	15±1,4	14±2,1
12	16±0,9	16±1,7	16±1,0	15±1,3	16±0,3	15±0,4
13	17±0,1	18±2,0	16±3,3	15±2,0	16±2,9	17±0,4
14	16±0,8	18±2,0	18±0,4	17±0,6	18±0,5	18±0,2

# Tabelle 11: Darstellung der mittleren täglichen Futteraufnahme ± Stan-dardabweichung jedes Versuchstieres im Verlauf pro Woche in Gramm

## 3.3 Uterusgewicht am Tag der Obduktion



Abbildung 30: Darstellung des Messparameters Uterusgewicht am Tag der Obduktion (g); <sup>1</sup> = signifikant gegenüber SHAM, \*= p < 0,05 = signifikant

Alle Testgruppen weisen nach OVX signifikant niedrigere Uterusgewichte zum Zeitpunkt der Obduktion als die SHAM-Kontrollgruppe auf (Abb. 30, Tab. 12). Die in Abbildung 30 und Tabelle 12 verwendeten Daten sind identisch mit denen in weiteren Arbeiten aus dieser Forschungsgruppe, dort werden die Einflüsse der WBV auf die Wirbelkörper (Fürst 2014), die Muskeln (Dissertation in Vorbereitung<sup>7</sup>) und die Femora (Dissertation in Vorbereitung<sup>8</sup>) der Ratten des selben Tierversuchs untersucht.

	Tabelle 12: Darstellung des Messparameters Uterusgewicht am Tag der Ob	)-
duktion ± Standardabweichung in Gramm [g]	duktion ± Standardabweichung in Gramm [g]	

Mess- größe	SHAM	OVX	35Hz vert	70Hz vert	35Hz horiz	70Hz horiz
Uterus- gewicht in g	0,62±0,16	0,12±0,01 (*1)	0,13±0,05 (*1)	0,12±0,04 (*1)	0,12±0,02 (*1)	0,12±0,02 (*1)

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Mit freundlicher Genehmigung des Verfassers

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Mit freundlicher Genehmigung des Verfassers

#### 3.4 Biomechanischer Test

Im Folgenden werden die Ergebnisse des biomechanischen Tests in Form von Balkendiagrammen dargestellt (Abb. 31–32). In Tabelle 13 erfolgt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

#### 3.4.1 Elastizität



Abbildung 31: Darstellung des Messparameters Elastizität

Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Testgruppen in Bezug auf die Elastizität erkennbar (Abb. 54, Tab. 13). Es ist jedoch eine Tendenz zu erkennen, dass alle Testgruppen mit Ganzkörpervibration eine höhere Elastizität aufweisen. Es sind hohe Standardabweichungen zu beobachten.

#### 3.4.2 Streckgrenze



Abbildung 32: Darstellung des Messparameters Streckgrenze

Es sind ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Testgruppen in Bezug auf die Streckgrenze erkennbar (Abb. 32, Tab. 13). Mit Ausnahme der 35Hzvert-Testgruppe zeigen die Testgruppen mit Ganzkörpervibration eine Tendenz zu höheren Streckgrenzen. Es sind wiederum hohe Standardabweichungen zu beobachten.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Mittelwerte ± Standardabweichung derMessergebnisse des biomechanischen Tests

Messgröße	SHAM	OVX	35Hz vert	70Hz 35Hz vert horiz		70Hz horiz	
Steigung (N/mm)	34,3±3,3	33,0±4,2	39,8±4,8	44,0±6,6	46,0±5,5	44,6±8,7	
Yield Load (N)	33,7±6,7	34,5±10,6	31,4±6,8	47,7±15,4	46,4±8,6	39,5±8,2	

## 3.5 Mikro-CT

Anschließend werden die einzenen Ergebnisse der Mikrocomputertomographie-Untersuchung mittels Balkendiagrammen dargestellt (Abb. 33–42). Im Anschluss werden alle Ergebnisse tabellarisch zusammengefasst (Tab. 14).

## 3.5.1 Messparameter des Gesamtgewebes

Als Gesamtgewebe wird die Kortikalis inklusive Kallus bezeichnet. Es wurde nur der Bereich 2,5 mm ober- und unterhalb der Osteotomieebene gemessen.

3.5.1.1 BV/TV (Anteil des mineralisierten Knochens am Gesamtvolumen)



Abbildung 33: Darstellung des Messparameters BV/TV (Anteil des mineralisierten Knochens am Gesamtvolumen); <sup>1</sup> = signifikant gegenüber SHAM, \* = p < 0,05 = signifikant

**Abbildung 34: Darstellung des Messparameters mittlere Dichte Gesamtgewebe**; <sup>1</sup> = signifikant gegenüber SHAM, \* = p < 0,05 = signifikant



#### 3.5.1.2 Mittlere Dichte Gesamtgewebe

#### 3.5.1.3 Volumen Gesamtgewebe



Abbildung 35: Darstellung des Messparameters Volumen Gesamtgewebe

#### 3.5.1.4 Dichte Gesamtgewebe



**Abbildung 36: Darstellung des Messparameters Dichte Gesamtgewebe;** <sup>1</sup> = signifikant gegenüber SHAM, \* = p < 0,05

Betrachtet man den Anteil des mineralisierten Knochens am Gesamtvolumen, weist die 35Hz-horiz-Testgruppe einen signifikanten Unterschied zur SHAM-Kontrollgruppe auf (Abb. 33, Tab. 14).

Bei der mittleren Dichte des Gesamtgewebes zeigen sowohl die OVX- Testgruppe, als auch die 35Hz-vert-, die 70Hz-vert- und die 35Hz-horiz-Testgruppe signifikant schlechtere Werte als die SHAM-Kontrollgruppe (Abb. 34, Tab. 14).

Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Testgruppen in Bezug auf das Volumen des Gesamtgewebes erkennbar (Abb. 35, Tab. 14), obwohl die 35Hzvert-, die 70Hz-vert- und die 35Hz-horiz-Testgruppe eine Tendenz in Richtung eines höheren Volumens des Gesamtgewebes aufzeigen. Es sind hohe Standardabweichungen zu finden.

Bei Betrachtung der Dichte des Gesamtgewebes zeigt die Testgruppe OVX eine signifikant niedrigere Dichte im Gegensatz zur SHAM-Kontrollgruppe. Die 35Hz-vertund die 70Hz-vert- sowie die 35Hz-horiz-Testgruppe weisen ebenfalls signifikante Unterschiede zur SHAM-Kontrollgruppe in Bezug auf die Dichte des Gesamtgewebes auf (Abb. 36, Tab. 14).

#### 3.5.2 Messparameter der Kortikalis

#### 3.5.2.1 Mittlere Dichte Kortikalis



#### 3.5.2.2 Volumen Kortikalis



Abbildung 37: Darstellung des Messparameters mittlere Dichte Kortikalis; <sup>1</sup> = signifikant gegenüber SHAM, <sup>5</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-horiz, \*= p < 0,05 = signifikant

**Abbildung 38: Darstellung des Messparameters Volumen Kortikalis;** <sup>1</sup> = signifikant gegenüber SHAM, \* = p < 0,05 = signifikant

Bei den die Kortikalis betreffenden Messparametern fällt bei der mittleren Dichte ein signifikanter Unterschied zwischen der 35Hz-horiz-Testgruppe und der SHAM-Kontrollgruppe auf. Die 70Hz-horiz-Testgruppe unterscheidet sich ebenfalls signifikant von der 35Hz-horiz-Testgruppe in Bezug auf die mittlere Dichte der Kortikalis (Abb. 37, Tab. 14).

Das Volumen der Kortikalis weist bei der 35Hz-horiz-Testgruppe signifikant niedrigere Ergebnisse als bei der SHAM-Kontrollgruppe auf (Abb. 38, Tab. 14). Die übrigen Testgruppen haben ebenfalls niedrigere Werte als die SHAM-Kontrollgruppe.

## 3.5.2.3 Dichte Kortikalis



**Abbildung 39: Darstellung des Messparameters Dichte Kortikalis;** <sup>1</sup> = signifikant gegenüber SHAM, <sup>5</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-horiz, \*= p < 0,05 = signifikant

Die Kortikalisdichte ist bei der 35Hz-horiz-Testgruppe signifikant niedriger als bei der SHAM-Kontrollgruppe. Die 70Hz-horiz-Testgruppe unterscheidet sich zusätzlich signifikant von der 35Hz-horiz-Testgruppe (Abb. 39, Tab. 14).

## 3.5.3 Messparameter des spongiösen Gewebes

Als spongiöses Gewebe wird das Gesamtgewebe ohne Kortikalis bezeichnet. Der Kallus ist darin enthalten.



3.5.3.2 Volumen spongiöses Gewebe





Abbildung 40: Darstellung des Messparameters mittlere Dichte spongiöses Gewebe; <sup>1</sup> = signifikant gegenüber SHAM, \* = p < 0,05 = signifikant

Abbildung 41: Darstellung des Messparameters Volumen spongiöses Gewebe

3.5.3.3 Dichte spongiöses Gewebe



**Abbildung 42: Darstellung des Messparameters Dichte spongiöses Gewebe;** <sup>1</sup> = signifikant gegenüber SHAM, \* = p < 0,05 = signifikant

Bei Betrachtung der mittleren Dichte des spongiösen Gewebes fallen zwischen der OVX-Testgruppe und der SHAM-Kontrollgruppe signifikant niedrigere Messergebnisse auf. Die 70Hz-vert- und die 35Hz-horiz-Testgruppe weisen ebenfalls signifikante Unterschiede zur SHAM-Kontrollgruppe auf (Abb. 40, Tab. 14).

In Bezug auf das Volumen des spongiösen Gewebes sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar. Jedoch tendieren die 35Hz-vert-, 70Hz-vert- und 35Hz-horiz-Testgruppe zu höheren Volumina (Abb. 41, Tab 14).

Die Dichte des spongiösen Gewebes ist bei der OVX-Testgruppe gegenüber der SHAM-Kontrollgruppe signifikant vermindert. Die Dichten des spongiösen Gewebes der OVX-, der 70Hz-vert- und der 35Hz-horiz-Versuchsgruppe sind signifikant gegenüber der SHAM-Kontrollgruppe verringert (Abb. 42, Tab. 14).

Messpara- meter	SHAM	OVX	35Hz vert	70Hz vert	35Hz horiz	70Hz horiz
BV/TV [%]	39,05±13,8 3	28,32±9,84	29,24±19,9 1	25,00±10,9 8	20,03±9,17 (*1)	29,70±10,0 1
Mittlere Dichte Ge- samtgewebe [GVal]	1393±119, 40	1182±111, 40 (*1)	1215±135, 30 (*1)	215±135, 1170±120, 1186±69,6 50 8 *1) (*1) (*1)		1269±122, 10
Volumen Gesamtge- webe [mm <sup>3</sup> ]	74,12±23,5 1	79,01±21,1 7	87,26±28,6 8	91,97±25,4 2	100,10±22, 80	78,46±22,1 4
Dichte Ge- samtgewebe [mg/cm <sup>3</sup> ]	338,40±31, 58	282,60±29, 47 (*1)	291,30±35, 79 (*1)	279,30±31, 89 (*1)	279,30±31, 283,70±18, 89 44 (*1) (*1)	
Mittlere Dichte Kor- tikalis [GVal]	3563±64,1 2	3456±142, 30	3441±162, 00	3451±125, 30	3330±125, 90 (*1)	3478±103, 80 (* <sup>5</sup> )
Volumen Kortikalis [mm³]	26,10±4,61	20,79±3,55	22,24±7,62	20,82±3,21	18,70±5,56 (*1)	21,72±4,83
Dichte Kor- tikalis [mg/cm³]	912,60±16, 97	884,20±37, 64	880,40±42, 85	882,90±33, 16	850,90±33, 31 (*1)	890,20±27, 46 (* <sup>5</sup> )
Mittlere Dichte spongiöses Gewebe [GVal]	1988±209, 50	1662±239, 40 (*1)	1714±317, 40	1614±234, 50 (*1)	1540±179, 20 (*1)	1764±221, 80
Volumen spongiöses Gewebe [mm <sup>3</sup> ]	100,20±21, 13	99,83±20,5 5	109,70±23, 75	112,80±24, 62	118,80±22, 90	100,20±22, 66
Dichte spongiöses Gewebe [mg/cm <sup>3</sup> ]	495,70±55, 44	409,50±63, 34 (*1)	423,30±83, 98	396,90±62, 04 (*1)	377,20±47, 42 (*1)	436,50±58, 70

# Tabelle 14: Zusammenfassung der Mittelwerte ± Standardabweichung derMessergebnisse der MikroCT-Untersuchung

## 3.6 Mikroradiographie

In diesem Abschnitt werden die einzelnen Ergebnisse der Mikroradiographie-Untersuchung zunächst in Säulendiagrammen (Abb. 43–53) und im Anschluss in einer zusammenfassenden Tabelle (Tab. 15) dargestellt.

#### 3.6.1 Messparameter der Kortikalis

3.6.1.1 Kortikalisdicke distal ventral 3.



Abbildung 43: Darstellung des Messparameters Kortikalisdicke distal ventral; <sup>1</sup> = signifikant gegenüber SHAM, <sup>2</sup> = signifikant gegenüber OVX, \* = p < 0,05 = signifikant

3.6.1.2 Kortikalisdicke distal dorsal



Abbildung 44: Darstellung des Messparameters Kortikalisdicke distal dorsal

# 3.6.1.3 Knochendichte Kortikalis distal ventral



Abbildung 45: Darstellung des Messparameters Knochendichte Kortikalis distal ventral; <sup>1</sup> = signifikant gegenüber SHAM, <sup>2</sup> = signifikant gegenüber OVX, <sup>3</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-vert, <sup>4</sup> = signifikant gegenüber 70Hz-vert, <sup>5</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-horiz \* = p < 0,05 = signifikant

## 3.6.1.4 Knochendichte Kortikalis distal dorsal



Abbildung 46: Darstellung des Messparameters Knochendichte Kortikalis distal dorsal

In Bezug auf die distale ventrale Kortikalisdicke zeigen die 70Hz-vert-, die 70Hzhoriz- und die 35Hz-horiz-Testgruppe signifikant höhere Werte als die SHAM-Kontrollgruppe. Die 70Hz-vert-Versuchsgruppe weist eine signifikant dickere Kortikalis als die OVX-Testgruppe auf. Ebenso verhält es sich bei der 70Hz-horiz-Testgruppe (Abb. 43, Tab. 15).

Betrachtet man die distale dorsale Kortikalisdicke, sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Testgruppen erkennbar. Die Knochendichte der distalen ventralen Kortikalis ist bei der 70Hz-horiz-Testgruppe mit einem Mittelwert von 97,49% signifikant niedriger als bei allen anderen Testgruppen (Abb. 45, Tab. 15).

Die Knochendiche der distalen dorsalen Kortikalis weist wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Testgruppen auf.

3.6.2.2

#### 3.6.2 Messparameter der Knochendurchmesser

3.6.2.1 Knochendurchmesser proximal



**Abbildung 47: Darstellung des Messparameters Knochendurchmesser proximal;** <sup>2</sup> = signifikant gegenüber OVX, <sup>5</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-horiz, \*= p < 0,01 = signifikant



Knochendurchmesser distal

Abbildung 48: Darstellung des Messparameters Knochendurchmesser distal

Bei den Messparametern, die den Knochendurchmesser betreffen, sind nur auf der proximalen Seite Signifikanzen erkennbar. Die 70Hz-horiz-Testgruppe weist gegenüber der OVX-Testgruppe und gegenüber der 35Hz-horiz-Testgruppe einen signifikant größeren proximalen Knochendurchmesser auf (Abb. 47, Tab. 15).

In Bezug auf den distalen Knochendurchmesser sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Testgruppen erkennbar, jedoch ergeben sich ähnliche Tendenzen wie bei dem proximalen: Die 35Hz-vert- und die 70Hz-horiz-Testgruppe weisen eine Tendenz in Richtung eines höheren Durchmessers auf (Abb. 48, Tab. 15). Die hohen Standardabweichungen sind zu beachten.

## 3.6.3 Messparameter des Kallus

#### 3.6.3.1 Kallusdicke ventral



#### 3.6.3.2 Kallusdicke dorsal



Abbildung 49: Darstellung des Messparameters Kallusdicke ventral;  $^2$  = signifikant gegenüber OVX, \* = p < 0,05 = signifikant

Abbildung 50: Darstellung des Messparameters Kallusdicke dorsal

Die Kallusdicke zeigt sich ventral bei der 70Hz-horiz Versuchsgruppe mit 1,0 mm signifikant gegenüber der OVX-Testgruppe erhöht (Abb. 49, Tab. 15). In Bezug auf die dorsale Kallusdicke sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Testgruppen erkennbar (Abb. 50, Tab. 15).

#### 3.6.3.3 Knochendichte Kallus ventral



**Abbildung 51: Darstellung des Messparameters Knochendichte Kallus ventral;** <sup>1</sup> = signifikant gegenüber SHAM, \* = p < 0,05 = signifikant

## 3.6.3.4 Knochendichte Kallus dorsal



Abbildung 52: Darstellung des Messparameters Knochendichte Kallus dorsal; <sup>1</sup> = signifikant gegenüber SHAM<sup>,2</sup> = signifikant gegenüber OVX, \* = p < 0,05 = signifikant

#### 3.6.3.5 Knochendichte Kallus endostal



**Abbildung 53: Darstellung des Messparameters Knochendichte Kallus endostal;** <sup>1</sup> = signifikant gegenüber SHAM, <sup>2</sup> = signifikant gegenüber OVX, <sup>3</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-vert, \* = p < 0,05 = signifikant

Alle Testgruppen mit Ganzkörpervibration weisen signifikante höhere Knochendichtewerte des ventralen Kallus im Vergleich zur SHAM-Kontrollgruppe auf (Abb. 51, Tab. 15). Die beiden horizontalen WBV-Versuchsgruppen zeigen einen Trend zur Zunahme der Kallusdichte auch gegenüber OVX.

Bei Betrachtung des dorsalen Kallus zeigt die 70Hz-horiz-Testgruppe gegenüber der SHAM-Kontrollgruppe und der OVX-Testgruppe einen signifikant höheren Knochendichtewert (Abb. 52, Tab 15).

Die Knochendichtewerte des endostalen Kallus sind bei der 70Hz-vert-, der 35Hzhoriz- und der 70Hz-horiz-Testgruppe signifikant höher als bei der SHAM-Kontrollgruppe. Zusätzlich unterscheidet sich der Knochendichtewert des endostalen Kallus der 70Hz-vert-Testgruppe signifikant von dem der 35Hz-vert-Testgruppe. Die 70Hz-horiz-Testgruppe weist außerdem signifikant höhere Knochendichtewerte des endostalen Kallus als die OVX und die 35Hz-vert-Testgruppe auf (Abb. 53, Tab. 15).

#### 3.6.4 Messparameter des trabekulären Netzwerkes

- 3.6.4.1 Knochendichte der Trabekel distal
- 3.6.4.2 Anzahl Trabekelkreuzungen absolut



Abbildung 54: Darstellung des Messparameters Knochendichte der Trabekel distal



Abbildung 55: Darstellung des Messparameters Anzahl Trabekelkreuzungen absolut

### 3.6.4.3 Dichte der





## 3.6.4.4 Mittlere Trabekeldichte



**Abbildung 56: Darstellung des Messparameters Dichte der Trabekelkreuzungen;** <sup>2</sup> = signifikant gegenüber OVX, <sup>3</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-vert, <sup>5</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-horiz, \* = p < 0,05 = signifikant

Abbildung 57: Darstellung des Messparameters mittlere Trabekeldichte

Bedingt durch die doch sehr hohen Standardabweichungen finden sich vergleichsweise wenig signifikante Unterschiede, obwohl deutliche Trends zu identifizieren sind. Die 70Hz-vert-Testgruppe weist bei allen trabekulären Messwerten die höchsten Mittelwerte auf (Abb. 54, 55 und 57, Tab. 15). Tendenziell ist die 70Hz-vert-Testgruppe in Bezug auf die Knochendichte der Trabekel gegenüber der SHAM-Kontrollgruppe mit höheren Messwerten auffällig. Die Trabekelkreuzungen sind tendenziell bei allen Testgruppen außer der 70Hz-vert-Gruppe.

Betrachtet man die Dichte der Trabekelkreuzungen, fällt eine signifikant höhere Dichte der 70Hz-vert-Testgruppe im Vergleich zu der OVX-Testgruppe, der 35Hzvert- sowie der 35Hz-horiz-Testgruppe auf (Abb. 56, Tab. 15).

Tabelle 15: Zusammenfassung der Mittelwerte ± Standardabweichung der
Messergebnisse der Mikoradiographie

Messparameter	SHAM	OVX	35Hz vert	70Hz vert	35Hz horiz	70Hz horiz
Kortikalisdicke distal ventral [mm]	0,73±0,12	0,74±0,15	0,90±0,29	0,99±0,28 (*1); (*2)	0,89±0,13 (*1)	0,99±0,29 (*1); (*2)
Kortikalisdicke distal dorsal [mm]	0,97±0,23	1,01±0.36	1,09±0,36	1,05±0,38	1,04±0,29	1,15±0,24
Knochendichte Kortikalis distal ventral [%]	99,25±0,8 7	99,43±1,1 2	99,53±0,7 3	99,50±0,7 8	98,81±1,2 3	97,49±2,5 1 (*1); (*2); (*3); (*4); (*5)
Knochendichte Kortikalis distal dorsal [%]	99,40±1,4 3	99,69±0,6 3	99,62±0,8 8	99,92±0,1 3	99,58±1,0 8	99,41±1,2 2
Knochendurch- messer proximal [mm]	4,79±1,11	3,93±1,15	4,82±1,52	4,69±1,58	3,92±1,41	5,05±1,33 (*²); (* <sup>5</sup> )
Knochendurch- messer distal [mm]	3,79±1,06	3,68±1,11	4,62±1,08	3,87±1,38	3,71±1,20	4,65±1,22
Kallusdicke ven- tral [mm]	0,87±0,36	0,69±0,22	0,89±0,40	0,98±0,47	0,98±0,50	1,0±0,59 (*²)
Kallusdicke dorsal [mm]	1,54±0,53	1,32±0,63	1,30±0,47	1,65±0,53	1,49±0,77	1,44±0,47
Knochendichte Kallus ventral [%]	68,12±15, 48	74,56±15, 42	78,93±16, 29 (*1)	83,85±9,5 7 (*1)	81,76±12, 71 (*1)	83,05±9,7 8 (*1)
Knochendichte Kallus dorsal [%]	69,30±13, 36	69,61±18, 68	76,14±14, 87	71,57±15, 08	78.68±13, 03	81,29±9,4 7 (* <sup>2</sup> )
Knochendichte Kallus endostal [%]	62,70±15, 98	66,96±18, 99	63,76±24, 87	77,97±19, 86 (*1); (*3)	77,13± 18,54 (*1)	82,43±13, 31 (*1); (*2); (*3)
Knochendichte der Trabekel distal [%]	16,19±10, 03	16,31±11, 43	13,17±10, 53	20,48±11, 14	16,40±9,9 1	16,62±11, 26
Anzahl Trabekel- kreuzungen abso- lut	8,18± 8,80	5,80± 5,87	7,40± 6,37	8,74± 8,38	6,61± 5,30	7,11± 7,93
Dichte der Trabe- kelkreuzungen [mm²]	1,19± 1,19	0,94±0,86	0,76±0,77	1,81± 1,84 (* <sup>2</sup> ); (* <sup>3</sup> ); (* <sup>5</sup> )	0,92±0,69	1,01± 1,18
Mittlere Trabekel- dichte [µm]	3,78± 0,94	3,89±1,19	3,99± 1,38	4,20± 1,15	3,66± 0,98	3,88± 1,06

## 3.7 Polychrome Sequenzmarkierung

Im Folgenden sind die Ergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung in Form von Balkendiagrammen dargestellt (Abb. 58–69). Tabelle 16 und Abbildung 70 im Anschluss fassen die Ergebnisse zusammen.

## 3.7.1 Ventrale Messparameter

3.7.1.1 Gesamte Kallusfläche ventral 3.7.1.

3.7.1.2 CG-Kallusfläche ventral



Abbildung 58: Darstellung des Messparameters gesamte Kallusfläche ventral



Abbildung 59: Darstellung des Messparameters CG-Kallusfläche ventral

#### 3.7.1.3 AK-Kallusfläche ventral



Abbildung 60: Darstellung des Messparameters AK-Kallusfläche ventral

#### 3.7.1.4 TC-Kallusfläche ventral



**Abbildung 61: Darstellung des Messparameters TC-Kallusfläche ventral;** <sup>1</sup> = signifikant gegenüber SHAM, <sup>2</sup> = signifikant gegenüber OVX, <sup>3</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-vert, \* = p < 0,05 = signifikant

Ventral weist lediglich die Tetracyclin-markierte, späte Kallusbildung signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Die OVX-Testgruppe zeigt hier eine signifikant geringere Kallusneubildung im Vergleich zur SHAM-Kontrollgruppe. Die 35Hz-horiz-Testgruppe unterscheidet sich ebenfalls signifikant von der OVX-Testgruppe und der 35Hz-vert-Testgruppe (Abb. 61, Tab. 16). Die hohe Standardabweichung der 35Hz-horiz-Testgruppe ist dabei zu beachten.

Betrachtet man die gesamte ventrale Kallusfläche (Abb. 58), so ist sie am größten bei der SHAM-Kontrollgruppe und der 35Hz-horiz-Testgruppe und bei der OVX-Gruppe erwartungsgemäß am geringsten. Die ventrale AK-Kallusfläche, die CG-Kallusfläche sowie die gesamte Kallusfläche weisen keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen auf (Abb. 58–60, Tab. 16).

#### 3.7.2 Dorsale Messparameter

3.7.2.1 Gesamte Kallusfläche dorsal



Abbildung 62: Darstellung des Messparameters gesamte Kallusfläche dorsal; <sup>1</sup> = signifikant gegenüber SHAM, <sup>3</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-vert, \* = p < 0,05 = signifikant



35Ht.vert

10HI.vert

35Ht horit

70HI Porti

04

## 3.7.2.3 AK-Kallusfläche dorsal



Abbildung 64: Darstellung des Messparameters AK-Kallusfläche dorsal; <sup>2</sup> = signifikant gegenüber OVX, <sup>3</sup> = signifikant gegenüber 35Hzvert, <sup>5</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-horiz, \* = p < 0,05 = signifikant

3.7.2.4 TC-Kallusfläche dorsal



**Abbildung 65: Darstellung des Messparameters TC-Kallusfläche dorsal**; <sup>3</sup> = signifikant gegenüber 35Hz-vert, \* = p < 0,05 = signifikant

Die gesamte dorsale Kallusfläche weist bei der 35Hz-vert-Testgruppe eine signifikant kleinere Fläche als die SHAM-Kontrollgruppe auf. Die Testgruppe 35Hz-vert

3.7.2.2 CG-Kallusfläche dorsal

3

2

SHAM

mm<sup>2</sup>

\*1

\*1

unterscheidet sich zudem signifikant von der 70Hz-horiz-Testgruppe (Abb. 62, Tab. 16).

Die dorsale CG-Kallusfläche weist bei der 70Hz-vert- und bei der 70Hz-horiz-Testgruppe eine signifikant kleinere Fläche als die SHAM-Kontrollgruppe auf (Abb. 63, Tab. 16). Insgesamt ist die dorsale Kallusneubildung in dieser frühen Phase am stärksten.

Betrachtet man die dorsale AK-Kallusfläche, so fällt eine signifikant größere Kallusneubildung der 70Hz-horiz- als bei der OVX-Testgruppe auf. Die 35Hz-vert- unterscheidet sich signifikant von der 70Hz-horiz-Testgruppe. Die 35Hz-horiz- sowie die 70Hz-horiz-Testgruppe unterscheiden sich ebenfalls signifikant voneinander (Abb. 64, Tab 16).

Bei Betrachtung der dorsalen TC-Kallusfläche weisen die 35Hz-horiz- und 70Hzhoriz- eine signifikant größere Fläche als die 35Hz-vert-Testgruppe auf (Abb. 65, Tab. 16).

3.7.3.2

#### 3.7.3 Endostale Messparameter

3.7.3.1 Gesamte endostale Kallusfläche



Abbildung 66: Darstellung des Messparameters gesamte endostale Kallusfläche



CG-Kallusfläche endostal

Abbildung 67: Darstellung des Messparameters CG-Kallusfläche endostal; <sup>1</sup> = signifikant gegenüber SHAM, <sup>2</sup> = signifikant gegenüber OVX, \* = p < 0,05 = signifikant

#### 3.7.3.3 AK-Kallusfläche endostal





Abbildung 68: Darstellung des Messparameters AK-Kallusfläche endostal

Abbildung 69: Darstellung des Messparameters TC-Kallusfläche endostal

Endostal weist lediglich die CG-Kallusfläche signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Die OVX-Testgruppe zeigt hier eine signifikant höhere Kallusneubildung im Vergleich zur 70Hz-vert-Testgruppe. Alle Versuchsgruppen, die eine Ganzkörpervibration erhielten, zeigen eine signifikant niedrigere CG-Kallusfläche (Abb. 67, Tab. 16) gegenüber der SHAM-Gruppe.

Die endostale gesamte Kallusfläche, die AK-Kallusfläche sowie die TC-Kallusfläche weisen keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen auf (Abb. 66, 68 und 69, Tab. 16). Die endostale Kallusbildung ist in dieser späten Phase am stärksten.

#### 3.7.3.4 TC-Kallusfläche endostal

Tabelle 16: Zusammenfassung der Mittelwerte ± Standardabweichung der
Messergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung

Messparameter	SHAM	OVX	35Hz vert	70Hz vert	35Hz horiz	70Hz horiz
gesamte Kallusflä- che ventral [mm²]	1,25±0,75	0,79±0,51	0,86±0,80	1,08±0,82	1,29±1,06	1,05±0,99
CG-Kallusfläche ventral [mm²]	0,30±0,31	0,27±0,24	0,23±0,29	0,27±0,35	0,27±0,26	0,21±0,30
AK-Kallusfläche ventral [mm²]	0,35±0,28	0,24±0,23	0,29±0,33	0,35±0,31	0,36±0,31	0,38±0,40
TC-Kallusfläche ventral [mm²]	0,57±0,47	0,25±0,21 (*1)	0,32±0,36	0,43±0,36	0,64±0,66 (*²); (*³)	0,44±0,39
gesamte Kallusflä- che dorsal [mm²]	3,04±1,52	2,42±1,13	2,03±1,09 (*1)	2,39±1,21	2,68±1,50	3,02±1,16 (* <sup>3</sup> )
CG-Kallus-fläche dorsal [mm²]	1,26±0,50	1,02±0,76	0,89±0,52	0,77±0,55 (*1)	0,97±0,58	0,84±0,55 (*1)
AK-Kallusfläche dorsal [mm²]	0,82±0,54	0,67±0,38	0,63±0,45	0,83±0,47	0,76±0,44	1,11±0,50 (**²); (*³); (* <sup>5</sup> )
TC-Kallusfläche dor- sal [mm²]	0,83±0,67	0,76±0,56	0,46±0,40	0,73±0,45	0,92±0,72 (* <sup>3</sup> )	0,95±0,72 (*³)
Gesamte endostale Kallusfläche [mm²]	3,70±1,54	3,16±0,96	3,32±1,64	2,87±1,52	3,29±1,36	3,26±1,36
CG-Kallus-fläche endostal [mm²]	1,42±0,81	1,01±0,69	0,76±0,52 (*1)	0,60±0,52 (*1); (*2)	0,70±0,56 (*1)	0,72±0,53 (*1)
AK-Kallusfläche endostal [mm²]	1,05±0,67	0,82±0,52	0,90±0,57	0,75±0,51	1,04±0,59	1,11±0,74
TC-Kallus-fläche endostal [mm²]	1,14±0,69	1,30±0,50	1,51±0,90	1,44±1,00	1,51±0,64	1,42±0,84

Abbildung 70 fasst noch einmal die zeitlichen Zusammenhänge, die durch die polychrome Sequenzmarkierung ermittelt wurden, unabhängig von der Lokalisation des Kalluswachstums zusammen (Abb. 70). Es wurden jeweils die betreffenden CG-, AK- und TC-Messwerte addiert.



Abbildung 70: Darstellung der Messergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung unabhängig von der Lokalisation in mm<sup>2</sup>

## 3.8 Zusammenfassung aller Ergebnisse

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse aller Untersuchungen (Kap. 3.4–3.7) der vorliegenden Arbeit als Tendenzen in Bezug auf die gesunde SHAM-Kontrollgruppe und in Tabelle 18 bezogen auf die osteoporotische Testgruppe OVX dargestellt. Sie soll die positive wie auch negative Wirkung der WBV auf die osteoporotische Tibiafrakturheilung herausstellen:

Der biomechanische Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. In der Zusammenschau aller untersuchten Messparameter der Mikrocomputertomographie zeigten sich ausschließlich signifikant niedrigere Ergebnisse im Vergleich zur SHAM-Kontrollgruppe. In der mikroradiographischen Untersuchung fanden sich ventral bei den Kortikalis- und Kallus-Messparametern und beim endostalen Kallus signifikant höhere Messwerte. Die polychrome Sequenzmarkierung zeigte ein Mischbild der beiden vorhergehenden Untersuchungen. So ist die endostale CG-Kallusfläche signifikant niedriger, ebenso teilweise die dorsalen TC-Kallusfläche und die gesamte Kallusfläche. Die CG-Kallusfläche ist dorsal hingegen wieder signifikant höher als die der SHAM-Kontrollgruppe.

In Tabelle 17 und 18 wurden zur Verdeutlichung der Ergebnisse folgende Symbole verwendet:

- $\Leftrightarrow$  = keine signifikanten Unterschiede
- $\Psi$  = signifikant niedriger
- $\clubsuit$  = signifikant höher

## Tabelle 17: Zusammenfassung aller signifikanten Unterschiede zur SHAM-Gruppe

Messparameter	SHAM	ovx	35Hz vert	70Hz vert	35Hz horiz	70Hz horiz
Gewicht der Versuchstiere im Verlauf	⇔	↑	↑	↑	<b>↑</b>	↑
Futteraufnahme im Verlauf	₿	<b>^</b>	↑	^	<b>↑</b>	<b>↑</b>
Uterusgewicht	¢	¥	¥	¥	¥	¥
Steigung (N/mm)	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔
Yield Load (N)	$\Leftrightarrow$	$\Leftrightarrow$	⇔	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔
BV/TV	⇔	⇔	¥	≎	€	⇔
Mittlere Dichte Gesamtgewebe	$\Leftrightarrow$	$\mathbf{\Psi}$	¥	¥	¥	$\mathbf{A}$
Volumen Gesamtgewebe	$\Leftrightarrow$	⇔	€	⇔	⇔	¢
Dichte Gesamtgewebe	⇔	¥	¥	¥	¥	≎
Mittlere Dichte Kortikalis	⇔	⇔	€	⇔	¥	\$
Volumen Kortikalis	$\Leftrightarrow$	⇔	¢	♦	¥	¢
Dichte Kortikalis	$\Leftrightarrow$	⇔	€	⇔	¥	4
Mittlere Dichte spongiöses Gewebe	$\Leftrightarrow$	¥	€	¥	¥	\$
Volumen spongiöses Gewebe	⇔	⇔	€	⇔	⇔	\$
Dichte spongiöses Gewebe	⇔	¥	$\Leftrightarrow$	¥	¥	$\Leftrightarrow$
Kortikalisdicke distal ventral	⇔	⇔	€	^	<b>↑</b>	<b>↑</b>
Kortikalisdicke distal dorsal	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔
Knochendichte Kortikalis dist. ventral	⇔	⇔	≎	≎	⇔	<b>↑</b>
Knochendichte Kortikalis dist. dorsal	⇔	⇔	Ŷ	Ŷ	¢	¢
Knochendurchmesser proximal	⇔	⇔	⇔	⇔	¢	¢
Knochendurchmesser distal	⇔	≎	¢	¢	¢	¢
Kallusdicke ventral	$\Leftrightarrow$	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔	¢	€
Kallusdicke dorsal	$\Leftrightarrow$	$\Leftrightarrow$	⇔	$\Leftrightarrow$	¢	¢
Knochendichte Kallus ventral	$\Leftrightarrow$	$\Leftrightarrow$	<b>↑</b>	<b>↑</b>	<b>↑</b>	<b>^</b>

Knochendichte Kallus dorsal	⇔	⇔	⇔	⇔	¢	⇔
Knochendichte Kallus endostal	¢	⇔	⇔	<b>↑</b>	<b></b>	<b>←</b>
Knochendichte der Trabekel distal	⇔	⇔	$\Leftrightarrow$	¢	¢	≎
Anzahl Trabekelkreuzungen abs.	⇔	⇔	⇔	≎	¢	¢
Dichte der Trabekelkreuzungen	€	⇔	⇔	≎	¢	¢
Mittlere Trabekeldichte	⇔	⇔	⇔	⇔	€	≎
gesamte Kallusfläche ventral	⇔	⇔	♦	€	⇔	€
CG-Kallusfläche ventral	⇔	€	⇔	≎	¢	¢
AK-Kallusfläche ventral	€	⇔	⇔	≎	¢	¢
TC-Kallusfläche ventral	⇔	¥	⇔	⇔	€	⇔
gesamte Kallusfläche dorsal	⇔	⇔	¥	⇔	€	⇔
CG-Kallusfläche dorsal	⇔	⇔	⇔	¥	€	¥
AK-Kallusfläche dorsal	⇔	⇔	$\Leftrightarrow$	♦	≎	⇔
TC-Kallusfläche dorsal	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔	⇔	\$	♦
gesamte endostale Kallusfläche	⇔	⇔	$\Leftrightarrow$	¢	¢	≎
CG-Kallusfläche endostal	⇔	⇔	$\mathbf{\Psi}$	¥	♦	¥
AK-Kallusfläche endostal	$\Leftrightarrow$	⇔	$\Leftrightarrow$	⇔	€	¢
TC-Kallusfläche endostal	$\Leftrightarrow$	⇔	$\Leftrightarrow$	⇔	€	₽

Messparameter	SHAM	ovx	35Hz vert	70Hz vert	35Hz horiz	70Hz horiz
Gewicht der Versuchstiere im Verlauf	⇔	⇔	⇔	€	⇔	⇔
Futteraufnahme im Verlauf	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔
Uterusgewicht	\$	⇔	⇔	€	⇔	⇔
Steigung (N/mm)	⇔	⇔	⇔	€	⇔	⇔
Yield Load (N)	⇔	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔	⇔	\$
BV/TV	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔	€
Mittlere Dichte Gesamtgewebe	$\Leftrightarrow$	⇔	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔	⇔
Volumen Gesamtgewebe	$\Leftrightarrow$	⇔	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔	⇔
Dichte Gesamtgewebe	$\Leftrightarrow$	⇔	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔	€
Mittlere Dichte Kortikalis	$\Leftrightarrow$	$\Leftrightarrow$	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔	⇔
Volumen Kortikalis	$\Leftrightarrow$	⇔	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔	⇔
Dichte Kortikalis	$\Leftrightarrow$	⇔	$\Leftrightarrow$	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔
Mittlere Dichte spongiöses Gewebe	$\Leftrightarrow$	⇔	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔	⇔
Volumen spongiöses Gewebe	$\Leftrightarrow$	⇔	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔	⇔
Dichte spongiöses Gewebe	$\Leftrightarrow$	$\Leftrightarrow$	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔	⇔
Kortikalisdicke distal ventral	⇔	⇔	⇔	↑	⇔	<b>↑</b>
Kortikalisdicke distal dorsal	$\Leftrightarrow$	⇔	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔	⇔
Knochendichte Kortikalis dist. ventral	⇔	⇔	⇔	≎	⇔	<b>↑</b>
Knochendichte Kortikalis dist. dorsal	⇔	⇔	⇔	≎	�	≎
Knochendurchmesser proximal	$\Leftrightarrow$	$\Leftrightarrow$	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔	<b>↑</b>
Knochendurchmesser distal	$\Leftrightarrow$	⇔	$\Leftrightarrow$	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔
Kallusdicke ventral	$\Leftrightarrow$	$\Leftrightarrow$	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔	<b>↑</b>
Kallusdicke dorsal	$\Leftrightarrow$	⇔	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔	€
Knochendichte Kallus ventral	$\Leftrightarrow$	$\Leftrightarrow$	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔	⇔
Knochendichte Kallus dorsal	$\Leftrightarrow$	⇔	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔	<b>↑</b>
Knochendichte Kallus endostal	⇔	⇔	$\Leftrightarrow$	$\Leftrightarrow$	⇔	↑
Knochendichte der Trabekel distal	⇔	⇔	$\Leftrightarrow$	⇔	⇔	⇔
Anzahl Trabekelkreuzungen abs.	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔	€
Dichte der Trabekelkreuzungen	⇔	⇔	⇔	↑	⇔	⇔
Mittlere Trabekeldichte		⇔	⇔	⇔	$\Leftrightarrow$	⇔

Tabelle 18: Zusammenfassung aller signifikanten Unterschiede zur OVX-Gruppe

gesamte Kallusfläche ventral	€	€	€	€	⇔	⇔
CG-Kallusfläche ventral	≎	€	⇔	⇔	⇔	⇔
AK-Kallusfläche ventral	€	€	⇔	€	⇔	⇔
TC-Kallusfläche ventral	≎	€	⇔	⇔	<b>↑</b>	⇔
gesamte Kallusfläche dorsal	€	€	⇔	€	⇔	⇔
CG-Kallusfläche dorsal	≎	≎	⇔	⇔	⇔	⇔
AK-Kallusfläche dorsal	€	€	⇔	€	⇔	↑
TC-Kallusfläche dorsal	€	¢	⇔	⇔	⇔	⇔
gesamte endostale Kallusfläche	€	€	€	⇔	⇔	⇔
CG-Kallusfläche endostal	⇔	€	⇔	$\mathbf{+}$	⇔	⇔
AK-Kallusfläche endostal	€	€	€	⇔	⇔	⇔
TC-Kallusfläche endostal	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔

## 4 Diskussion

## 4.1 Modell für die osteoporotische Frakturheilung

Neben weiteren Tiermodellen hat sich die weibliche ovarektomierte Ratte seit Jahrzehnten als das Modell zur Untersuchung der postmenopausalen Osteoporose etabliert (Wronski et al. 1985; Kalu 1991). Die Ovarektomie führt nach wenigen Wochen zur einem signifikanten Verlust an Knochendichte. Der BMD-Verlust in diesem Modell entspricht in den relevanten Parametern dem verstärkten Knochenumbau und Spongiosa-Verlust der postmenopausalen Osteoporose der Frau. Die Osteoporose der ovarektomierten Ratte reagiert sehr ähnlich auf medikamentöse Therapie, zum Beispiel mit Parathormon, Östrogen oder Bisphosphonaten (Kalu 1991). Die Skelettabschnitte mit der größten Ähnlichkeit zur postmenopausalen Frau stellen in diesem Rattenmodell die proximale Tibia, das distale Femur und die Lendenwirbelsäule dar (Thompson et al. 1995). Einen wesentlichen Unterschied beschrieben Miller und Wronski 1993. Sie untersuchten in einem Versuch an zwölf osteoporotischen Ratten über 540 Tage das Auftreten von Spontanfrakturen. Es konnte jedoch keine erhöhte Inzidenz im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden, während Spontanfrakturen, zum Beispiel an Wirbelkörpern, einen wesentlichen Faktor in der Klinik der postmenopausalen Osteoporose der Frau darstellen. Die verminderten trabekulären Verbindungen bei Rattenknochen des OVX-Modells wurden bereits früher im spongiösen Knochen bei älteren Menschen beschrieben (Arnold et al. 1966; Compston et al. 1987).

Die Osteoporose manifestiert sich bei OVX-Ratten innerhalb von acht bis zehn Wochen und führt zu einem signifikanten BMD-Verlust (Jee und Yao 2001), nach 6 Monaten kann dieser sogar bis zu 50% betragen (Wronski et al. 1985; Thompson et al. 1995). Yamaura et al. beschrieben 1996, dass es bereits wenige Tage nach der Ovarektomie zu einer steigenden Anzahl an Osteoklasten kommt, was im weiteren Verlauf zu einer geringeren Dicke der Trabekel führt. Der Verlust an Spongiosa manifestiert sich in den langen Röhrenknochen wie Femur und Tibia, besonders stark an der Metaphyse (Wronski et al. 1985; Yoshida et al. 1991). Dies ist darüber hinaus von klinischer Relevanz, da ein großer Prozentsatz der osteoporosebedingten Frakturen an der Metaphyse entsteht. Aus diesem Grund wurde im vorliegenden Versuch die Fraktur mittels standardisierter Osteotomie und anschließender Plattenosteosynthese metaphysär platziert. Viele vorhergehende Versuche zur osteoporotischen Frakturheilung beschäftigten sich hingegen mit der Diaphyse, die Manifestation der Osteoporose fällt dort jedoch deutlich geringer aus (Wolf et al. 1998; Kubo et al. 1999). Von Bedeutung ist auch, dass metaphysäre Frakturen mittels endostaler Überbrückung des Frakturspaltes heilen (Stuermer et al. 2010b), wohingegen Frakturen der Diaphyse in der Mehrzahl der Fälle über eine periostale Kallusbildung heilen. Die ventro-laterale Osteosynthese ermöglicht Mikrobewegungen im Frakturspalt, was zusätzlich zur endostalen Frakturheilung zur Ausbildung eines geringen periostalen Kallus führt (Daub 2010; Stuermer et al. 2010b).

Den Erfolg der Ovarektomie belegen die in Abschnitt 3.3 dargestellten Ergebnisse zu den Uterusgewichten. Im Vergleich mit der SHAM-Kontrollgruppe zeigen alle Versuchsgruppen signifikant niedrigere Uterusgewichte, was dem Östrogenmangel geschuldet ist.

### 4.2 Gewicht und Futteraufnahme

Das Gewicht der Versuchstiere stieg über den Verlauf des Tierversuches deutlich an. Ab der zweiten Versuchswoche wogen die Tiere der scheinoperierten Kontrollgruppe signifikant weniger als die der übrigen Versuchsgruppen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Publikationen (Fukushima et al. 2000, Stuermer et al. 2010a, Komrakova et al. 2009, 2013, 2014). Da die Tiere zu Beginn des Tierversuchs mit einem Alter von 3 Monaten nicht ausgewachsen waren, war die Gewichtszunahme zum Teil durch das Wachstum bedingt (Komrakova et al. 2009). Ein zusätzlicher Grund für die stärkere Gewichtszunahme der ovarektomierten gegenüber den scheinoperierten Tieren war eine durch Östrogenmangel bedingte vermehrte Fetteinlagerung (Notomi et al. 2003).

Zudem nahmen die ovarektomierten Versuchstiere bis zur Osteotomie deutlich mehr Futter zu sich. Im Anschluss an die Osteotomie war bei allen Versuchstieren eine erniedrigte Futteraufnahme zu beobachten, aufgrund derer es zu einem vorübergehenden Abfall der Gewichtszunahme kam. Dieser Sachverhalt wurde bereits bei vorangegangenen Tierversuchen aus dieser Arbeitsgruppe beschrieben und im Zusammenhang mit der Narkose und postoperativen Schmerzen gesehen, die trotz Schmerzmedikation aufgetreten sein können (Komrakova et al. 2009). Zum anderen wurde in älteren Veröffentlichungen beschrieben, dass die niedrigere Aktivität mit Atrophie der Muskeln (Machida und Booth 2004) sowie Knochensubstanzverlust (Smith und Gilligan 1991) und damit verbundenem Gewichtsverlust einherging. In Bezug auf das Körpergewicht der Versuchstiere (Abb. 28), die Uterusgewichte (Abb. 30) und die Futtermenge (Abb. 29) wird auch auf die Ergebnisse der weiteren Dissertationen zu Wirbelkörpern (Fürst 2014), Muskeln (Dissertation in Vorbereitung<sup>9</sup>) und Femora (Dissertation in Vorbereitung<sup>10</sup>) verwiesen.

## 4.3 Analyse des biomechanischen Tests

Der biomechanische Test stellt zum einen eine Überprüfung der Qualität der Frakturheilung dar und untersucht zum anderen den Einfluss der Vibration auf die Stabilität des Knochens. Bei osteoporotischen Knochen wird eine niedrigere Elastizität aufgrund eines früheren Eintretens von Mikrofrakturen im Vergleich zu gesunden Knochen erwartet (Stuermer et al. 2006). Der biomechanische Test wurde durch die Software jedoch unterbrochen, bevor Frakturen entstanden, da ansonsten irreversible Verformungen der Knochen verursacht worden wären. Dies hätte die weiterführenden Untersuchungen beeinflusst. Eine gesteigerte Steifigkeit des Knochens (engl.: *stiffness*) wäre vorteilhaft für die Stabilität des Knochens.

Es konnte in diversen Studien ein positiver Einfluss durch die WBV auf den Knochen aufgezeigt werden. Zum Beispiel zeigten Flieger et al. 1998, dass eine tägliche 30-minütige WBV von 50 Hz mit einer vertikalen Beschleunigung von 2 g bei zwölfwöchiger Versuchsdauer die Osteoporose bei OVX-Ratten nahezu aufheben konnte. Die durch Osteoporose bedingte Verschlechterung der Knochendichte konnte auch in einem weiteren Versuch bei ovarektomierten Ratten durch WBV über 90 Tage verbessert werden. Die Ratten erhielten hierzu täglich eine WBV bei 45 Hz und 1,0 mm Amplitude (Oxlund et al. 2003). In diesem Versuch zeigte die ovarektomierte Testgruppe, die keine WBV erhielt, signifikant niedrigere Messparameter als die SHAM-Kontrollgruppe in der biomechanischen Untersuchung. Die osteoporotische Gruppe, die zusätzlich eine Ganzkörpervibration erhielt, verbesserte sich signifikant sowohl gegenüber der SHAM- als auch der OVX-Gruppe.

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> Mit freundlicher Genehmigung des Verfassers

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> Mit freundlicher Genehmigung des Verfassers

Leung et al. konnten 2009 durch Vibrationstherapie bei 35 Hz für 20 Minuten pro Tag an fünf Tagen in der Woche die biomechanische Stabilität des Kallus einer standardisierten Femurschaftfraktur signifikant verbessern (Leung et al. 2009). Allerdings wurden in dieser Versuchsanordnung die Ratten nicht ovarektomiert und waren somit nicht osteoporotisch. Die Osteosynthese unterschied sich ebenfalls von der in unserem Versuch. Es wurde eine intramedulläre Marknagelung mittels Kirschner-Drähten und keine Plattenosteosynthese verwendet. Somit lag während der Frakturheilung eine andere biomechanische Situation mit mehr Bewegungen im Frakturspalt vor als in dem Versuch, der dieser Arbeit zugrunde liegt. Im Jahr 2010 konnte dieselbe Forschungsgruppe mit dem gleichen Versuchsaufbau und zusätzlicher Ovarektomie einen signifikanten Vorteil zwischen osteoporotischen Versuchsgruppen mit und ohne Vibrationstherapie in Bezug auf die Bruchkraft des Knochens im biomechanischem Test nachweisen (Shi et al. 2010). Die anderen Ergebnisse fielen allerdings weniger deutlich, d.h. signifikant aus, da hier die Osteoporose an der Diaphyse, die bekanntermaßen erheblich geringer ausgeprägt ist als die an der Metaphyse, fokussiert wurde.

In unserem Versuch konnten alle WBV-Versuchsgruppen durch die Vibrationstherapie höhere Messergebnisse in Bezug auf die Steifigkeit des Knochens als die beiden Kontrollgruppen erzielen. Das Signifikanzniveau wurde jedoch bei keiner Gruppe erreicht. Die osteoporotische Kontrollgruppe hatte erwartungsgemäß die niedrigsten Messwerte. Die Streckgrenze (yield load) stellt die maximale Belastbarkeit des Knochens dar; sie ist der Endpunkt der elastischen Verformung, bevor erste (Mikro-)Frakturen als Zeichen plastischer Verformung auftreten. Die Gruppe mit vertikaler WBV bei 35 Hz zeigte eine verringerte Streckgrenze; die übrigen Testgruppen mit WBV zeigten eine größere Belastbarkeit als die SHAM- und die OVX-Gruppe. Allerdings waren die Unterschiede auch in Bezug auf die Streckgrenze aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht signifikant. Es konnte somit in der vorliegenden Arbeit durch den biomechanischen Test keine signifikante Verbesserung hinsichtlich der Qualität des Kallus durch horizontale oder vertikale Vibration bewiesen werden. Sollte eine Wertung vorgenommen werden, so zeigt sich allenfalls eine tendenzartige Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften bei 70 Hz. In weiteren Versuchen dieser Arbeitsgruppe konnten ebenfalls keine signifikanten Einflüsse der Vibration auf die biomechanische Stabilität des Kallus nachgewiesen werden (Komrakova et al. 2013). Eine signifikante Verschlechterung der biomechanischen Eigenschaften durch die Osteoporose, wie zu erwarten gewesen wäre, konnte jedoch ebenfalls bei dieser Versuchsdauer nicht identifiziert werden. Auch dies ist auf die hohen Standardabweichungen zurückzuführen, die bereits in früheren Arbeiten beschrieben wurden und als Problem des biomechanischen Tests sowohl im Ratten- als auch im analogen Mäusemodell gesehen werden (Manigrasso und O'Connor 2004). Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, weiterführende Untersuchungen mit anderen Methoden durchzuführen.

## 4.4 Analyse der Ergebnisse der Mikrocomputertomographie (μCT) und der Mikroradiographie

Die µCT ist eine relativ neue Methode zur Untersuchung der Knochenheilung im Kleintiermodell und wurde in Publikationen dieser Arbeitsgruppe bereits mehrfach verwendet (Stuermer et al. 2013; Komrakova et al. 2013). Es handelt sich um eine Untersuchungsmethode, die quantitative Aussagen über die Mikrostruktur des Knochens sowie über die Beziehung zwischen kortikalen und trabekulären Strukturen ermöglicht (Graichen et a. 1999). Man kann die Knochen-, Kallus- und Kortikalisdichte sowie das Knochenvolumen und den Anteil des mineralisierten Knochens Gesamtvolumen (BV/TV)am messen. Die Dichtebestimmung ist mit dieser Methode deutlich differenzierter möglich, die Durchführung der Scanvorgänge ist jedoch sehr zeitintensiv. Die Abgrenzung von Trabekelstrukturen und Kallus ist mit dieser Methode allerdings schlechter möglich als mit länger etablierten Untersuchungsmethoden wie der Mikroradiographie oder der polychromen Sequenzmakierung der in Histomorphometrie. Die Mikroradiographie liefert Erkenntnisse über die kortikalen Strukturen sowie über die feinen trabekulären Strukturen des Knochens. Die Trabekelanalyse ist deutlich genauer möglich, allerdings erfordert diese Methode einen hohen Personal- und Arbeitsaufwand zur Anfertigung der Mikroradiographien. Es handelt sich um ein etabliertes Untersuchungsverfahren, das bereits in diversen Studien mit Mäusen, Ratten und Schafen zum Einsatz kam. Jedoch ist diese Untersuchungsmethode nur zweidimensional. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Analyse beide Untersuchungsmethoden durchgeführt, um die gesamte Komplexität der untersuchten Strukturen dreidimensional
Durch die standardisierte Osteotomie, die stets einen Frakturspalt gleicher Breite erzeugt, und die ebenfalls standardisierte Plattenosteosynthese (vgl. Kap. 2.1.5) konnte die Überbrückung des Frakturspaltes genau analysiert werden. In der  $\mu$ CT-Untersuchung, der Mikroradiographie und der polychromen Sequenzmarkierung wurde stets nur der relevante Abschnitt des Knochens bis 2,5 mm ober- und unterhalb der Osteotomie (vgl. Kap. 2.3.3, Kap. 2.4.3, Kap. 2.5.4) analysiert.

Die osteoporotische Kontrollgruppe erzielte im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe SHAM signifikant niedrigere Messergebnisse in Bezug auf die Dichte des Gesamtgewebes und des spongiösen Gewebes, das den weichen und den harten Kallus beinhaltet. Dies bestätigt die zu erwartende Abnahme der Knochenqualität durch die Ovarektomie-induzierte Osteoporose. Die Dichte des Gesamtgewebes sank erwartungsgemäß bei allen osteoporotischen Testgruppen mit und ohne Vibrationstherapie im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Die Gruppe mit horizontaler 70 Hz-Therapie war die einzige, bei der diese Dichteabnahme nicht signifikant war. Die Gruppe mit vertikaler 35 Hz-Therapie und die beiden Gruppen mit horizontaler Vibration erreichten höhere Messwerte als die osteoporotische Kontrollgruppe. Dies kann bereits als Teilerfolg angesehen werden.

Es wäre in der mikroradiographischen Untersuchung ebenfalls zu erwarten gewesen, dass die Messparameter der osteoporotischen Kontrollgruppe signifikant unter denen der gesunden Kontrollgruppe liegen. Dies ist jedoch nicht der Fall, was unter anderem der Standardabweichung geschuldet ist, die bei den Messparametern Knochendichte des ventralen, des dorsalen und des endostalen Kallus besonders hoch ausfiel.

Die vertikale Vibration bei 35 Hz beeinflusste diverse Parameter im Vergleich zur osteoporotischen Kontrollgruppe positiv: den Anteil des mineralisierten Knochens am Gesamtvolumen (BV/TV), das Volumen des Gesamtgewebes, die Dichte des Gesamtgewebes, das Volumen der Kortikalis und des spongiösen Gewebes sowie die Dichte des spongiösen Gewebes. Interessanterweise war die Dichte des Gesamtgewebes signifikant niedriger als bei der gesunden Kontrollgruppe. Das deutlich erhöhte Volumen des Gesamtgewebes in Verbindung mit den signifikant niedrigeren Dichtewerten der Kortikalis im Vergleich zur nicht osteoporotischen Kontrollgruppe lässt den Schluss zu, dass das Wachstum hier zwar angeregt wird, die Qualität des entstandenen Gewebes jedoch geringer als die von gesundem Gewebe ist. Die Dichte des spongiösen Gewebes nahm allerdings im Vergleich zur osteoporotischen Kontrollgruppe zu, die signifikant niedrigere Messwerte als die gesunde Kontrollgruppe aufwies. Dies zeigt eine positive Beeinflussung durch vertikale 35 Hz-Therapie.

In der mikroradiographischen Untersuchung erzielte die Gruppe mit vertikaler WBV bei 35 Hz zwar bereits in einem Großteil der Messparameter höhere Werte als die osteoporotische Kontrollgruppe, jedoch weniger als die übrigen Versuchsgruppen mit WBV. In Bezug auf die Knochendichte des ventralen Kallus konnte, wie bei allen WBV-Testgruppen, ein signifikant höherer Messwert im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erzielt werden. Diese Versuchsgruppe erzielte die zweitbesten Ergebnisse in der  $\mu$ CT. In der mikroradiographischen Untersuchung konnte dieser Trend nicht bestätigt werden, die vertikale Vibration bei 35 Hz zeigte sich den anderen WBV-Versuchsgruppen sogar teils signifikant unterlegen.

Die vertikale Vibration bei 70 Hz beeinflusste in der µCT-Untersuchung das Volumen des Gesamtgewebes, das Volumen der Kortikalis und das Volumen des spongiösen Gewebes positiv im Vergleich zur osteoporotischen Kontrollgruppe. Die Dichte des Gesamtgewebes und des spongiösen Gewebes waren wiederum signifikant niedriger als bei der gesunden Kontrollgruppe.

In der mikroradiographischen Untersuchung wies diese Gruppe in ausnahmslos allen Messparametern eine positive Tendenz im Vergleich zur osteoporotischen Kontrollgruppe auf. Die ventrale distale Kortikalisdicke und die Dichte der Trabekelkreuzungen nahmen sogar signifikant gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe zu. Die Dichte der Trabekelkreuzungen zeigte sich auch der Gruppe mit vertikaler 35 Hz-Therapie und der Gruppe mit horizontaler WBV bei 35 Hz signifikant überlegen. Der endostale Kallus erreichte Signifikanzniveau gegenüber der gesunden Kontrollgruppe und der Gruppe mit vertikaler 35 Hz-Therapie. Vergleicht man den Einfluss der beiden Testgruppen mit vertikaler Vibration, so scheint sich ein geringer Vorteil für 70 Hz zu ergeben. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Flieger und Oxlund (Flieger et al. 1998; Oxlund et al. 2003).

Die Vibration bei 35 Hz in horizontaler Richtung ergab in der µCT-Untersuchung im Vergleich zur osteoporotischen Kontrollgruppe eine positive Beeinflussung des Volumens des Gesamtgewebes, der Dichte des Gesamtgewebes und des spongiösen Gewebevolumens. Die Dichte des Gesamtgewebes und des spongiösen Gewebes war jedoch abermals signifikant niedriger als bei der gesunden Kontrollgruppe.

In der mikroradiographischen Untersuchung zeigte diese Versuchsgruppe zwar die wenigsten positiven Tendenzen im Vergleich zur osteoporotischen Kontrollgruppe, das Signifikanzniveau wurde jedoch gegenüber der gesunden Gruppe in drei Messparametern erreicht. Vergleicht man die Ergebnisse mit denen der anderen WBV-Versuchsgruppen, so sind die der Gruppe, die eine horizontale 35 Hz-Therapie erhielt bis auf wenige Ausnahmen niedriger. Diese Frequenz scheint sich also im Vergleich der Vibrationsregime am wenigsten zu eignen.

Die horizontale Vibration bei 70 Hz ergab die mit Abstand positivste Beeinflussung der Messparameter der  $\mu$ CT-Untersuchung im Vergleich zur ovarektomierten Kontrollgruppe. Der Anteil des mineralisierten Knochens am Gesamtvolumen (BV/TV), die Dichte des Gesamtgewebes, das Volumen der Kortikalis, die Dichte der Kortikalis, das Volumen des spongiösen Gewebes sowie die Dichte des spongiösen Gewebes waren höher als bei der osteoporotischen Kontrollgruppe. Besonders vorteilhaft im Vergleich zu den anderen WBV-Versuchsgruppen, wenn auch nicht signifikant, beeinflusste dieses Vibrationsregime die Dichte des Gesamtgewebes. Die horizontale Vibration bei 70 Hz induzierte hier als einzige Frequenz eine höhere Dichte als die osteoporotische Kontrollgruppe. Die Dichte der Kortikalis manifestierte sich zusätzlich noch signifikant größer als bei der Gruppe mit horizontaler 35 Hz-Therapie.

Auch in der mikroradiographischen Untersuchung verbesserte diese Versuchsgruppe diverse Parameter signifikant gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe. Die Knochendichte des Kallus (ventral, dorsal und endostal) erzielte hier die höchsten Messwerte aller Versuchsgruppen.

Es konnten durch die horizontale Vibration bei 70 Hz sogar signifikante Steigerungen über das Niveau der gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden: Die distale ventrale Kortikalisdicke, die Knochendichte des Kallus ventral und die Knochendichte des Kallus endostal zeigten Signifikanzniveau im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

Der Knochendurchmesser proximal zeigte sich zusätzlich noch signifikant gegenüber der Gruppe mit horizontaler 35 Hz-Therapie gesteigert. Der endostale Kallus zeigte gegenüber der Gruppe mit vertikaler WBV bei 35Hz eine gesteigerte Knochendichte.

Es konnte kein Parameter durch die  $\mu$ CT-Untersuchung identifiziert werden, der eine signifikante Steigerung der Messwerte gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe aufzeigte. Die Gruppe mit horizontaler 70 Hz-Therapie und die Gruppe mit vertikaler 35 Hz-Therapie zeigten hier am häufigsten positive Tendenzen. Die horizontale Vibration bei 70 Hz zeigte sich in einem Messparameter, der Dichte der Kortikalis, signifikant der Gruppe mit horizontaler Vibration bei 35 Hz überlegen.

Komrakova et al. publizierten 2013 eine Arbeit an osteoporotischen und osteotomierten Ratten mit vertikaler WBV (35, 50, 75 und 90 Hz) im Vergleich zu horizontaler WBV (35, 50, 75 und 90 Hz), in der nach dem günstigsten Vibrationsregime gesucht wurde. Der Vergleich konnte einen positiven Einfluss der vertikalen Ganzkörpervibrationstherapie bei 35 und 50 Hz in Bezug auf das BV/TV darstellen. Bei diesen Frequenzen konnte das BV/TV-Niveau auf das der gesunden Kontrollgruppe angehoben werden.

In der mikroradiographischen Untersuchung fällt auf, dass die Gruppe mit horizontaler 70 Hz-Therapie gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe in vielen Messparametern signifikant bessere Ergebnisse zeigt. Andere Autoren berichten hingegen von einem eher nachteiligen Einfluss der horizontalen Vibration (Komrakova et al. 2013) und einem vorteilhaften der vertikalen Vibration (Sarmiento et al. 1977; Goodship und Kenwright 1985). Die vertikale Vibration entspricht der Belastung der Rattentibia in vivo beim Laufen oder Springen, was mit den Ergebnissen dieses Versuches zu vereinen ist, da die Gruppe mit vertikaler WBV bei 70 Hz in Bezug auf alle Messparameter positiv beeinflusst wurde. Zusätzlich steht dies mit den weiteren Ergebnissen dieser Forschungsgruppe in Einklang (Komrakova et al. 2013; Trautmann 2014): Bei vertikaler Vibration mit verschiedenen vertikalen Frequenzen (35, 50, 70, 90 Hz) resultieren die besten Ergebnisse bei osteoporotischer Frakturheilung nach WBV mit hoher Frequenz.

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen den positiven Einfluss der WBV auf die Knochenbruchheilung durch hohe horizontale und vertikale Frequenzen.

Die Ergebnisse der mikroradiographischen Untersuchung korrelieren nicht mit den Ergebnissen der  $\mu$ CT-Untersuchungen und sind sogar teilweise konträr. In den  $\mu$ CT-Untersuchungen stellt sich die vertikale 35 Hz-Therapie gut dar und erzielt gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe Verbesserungen, ebenso gut scheint die horizontale 70 Hz-Therapie. In der Mikroradiographie zeigt sich eine deutliche Tendenz zu den beiden höheren Frequenzen. Die vertikale 35 Hz-Therapie kann hier die positiven Ergebnisse nicht bestätigen. Darüber hinaus können die unterschiedlichen Ergebnisse auch dadurch bedingt sein, dass in der Mikroradiographie nur eine Flächendichte und keine Volumendichte wie beim  $\mu$ CT berechnet werden kann.

#### 4.5 Analyse der polychromen Sequenzmarkierung

Die polychrome Sequenzmarkierung wurde zum Zweck der zeitlichen Beurteilung der Frakturheilung vorgenommen. Durch die unterschiedlichen Fluorochrome war es möglich, genau zu bestimmen, zu welchem Zeitpunkt welches Gewebe neu gebildet wurde. Frühere Untersuchungen zeigten bereits, dass die frühe Phase der osteoporotischen Frakturheilung qualitativ negativ beeinträchtigt ist und zeitlich in Rückstand gerät (Namkung-Matthai et al. 2001). Auch die späte Phase der Frakturheilung unterscheidet sich bei Osteoporose negativ von der im Gesunden (Kubo et al. 1999).

Die gesamte Kallusfläche zeigte eine Zunahme von ventral über dorsal nach endostal. Die Kallusflächen der WBV-behandelten Versuchsgruppen und der osteoporotischen Kontrollgruppe lagen ventral, dorsal und endostal sämtlich unter dem Niveau der gesunden Kontrollgruppe. Die WBV-behandelten Versuchsgruppen konnten ventral jedoch alle eine gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe erhöhte Gesamtkallusfläche erzielen, die osteoporotische Kontrollgruppe selbst erzielte deutlich niedrigere Werte als die gesunde Kontrollgruppe. Dorsal wurde die Gesamtkallusfläche durch die vertikale Vibration bei 35 Hz und 70 Hz allerdings eher negativ beeinflusst: Hier war die Kallusfläche im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erniedrigt und sogar geringer als die der osteoporotischen Kontrollgruppe. Die Versuchsgruppen mit horizontaler WBV erzielten dorsal eine größere Fläche als die osteoporotische Kontrollgruppe. Die Gruppe mit horizontaler 70 Hz-Therapie erzielte hier signifikant höhere Werte als die Gruppe mit vertikaler 35 Hz-Therapie. Endostal erreichten alle WBV Versuchsgruppen größere Gesamtkallusflächen als die OVX-Gruppe, die wiederum selbst deutlich niedrigere Werte als die gesunde Kontrollgruppe erzielte, die Ausnahme bildete die Gruppe mit vertikaler 70 Hz-Therapie.

Abbildung 70 verdeutlicht für die einzelnen Versuchsgruppen die addierte Kallusfläche (ventral + dorsal + endostal), die in dem entsprechenden Zeitraum (CG, AK oder TC) entstanden ist (vgl. Abb. 70).

Diese Arbeit zeigte in der polychromen Sequenzmarkierung, dass in der frühen Phase des Frakturheilungsprozesses, also innerhalb der ersten 18 Tage, gekennzeichnet durch das Fluorochrom "CG", in allen Testgruppen mit WBV signifikant weniger Kallus endostal gebildet wurde als bei der gesunden Kontrollgruppe. Die Gruppe mit vertikaler 35 Hz-Therapie erzielte im ersten Messzeitraum an allen gemessenen Flächen niedrigere Werte als die osteoporotische Kontrollgruppe. Die beiden Gruppen mit horizontaler Vibration konnten lediglich dorsal bessere Ergebnisse als die osteoporotische Kontrollgruppe erzielen. Die frühe Phase der Frakturheilung konnte also durch die Ganzkörpervibration nicht vorteilhaft beeinflusst werden. Dies ist dadurch bedingt, dass die Phase der enchondralen Ossifikation bei der osteoporotischen Frakturheilung verlängert ist, was zu einer verzögerten Kallusbildung führt (Islam et al. 2005). In ihr werden mehr Osteoklasten und Osteoblasten rekrutiert (Hao et al. 2007). Zusätzlich zu der verzögerten enchondralen Ossifikation wiesen Xu et al. 2004 eine größere Anzahl von Osteoklasten an den Trabekeln und unregelmäßiger angeordnete Trabekel im Kallus nach. 4 Diskussion

Im Markierungszeitraum für das Fluorochrom "AK" wurde der Zeitraum zwischen dem 19. und dem 26. Tag nach der Osteotomie untersucht. Die Gruppe mit vertikaler 35 Hz-Therapie erzielte im zweiten Messzeitraum ventral und endostal höhere Werte als die osteoporotische Kontrollgruppe, dorsal niedrigere. Die Gruppe mit vertikaler WBV bei 70 Hz erreichte ventral und dorsal bessere Ergebnisse als die osteoporotische Kontrollgruppe, endostal wiederum schlechtere. Die beiden Gruppen mit horizontaler Vibration wiesen an allen Messpunkten signifikante oder deutlich bessere Ergebnisse als die osteoporotische Kontrollgruppe auf, wobei hier 70 Hz noch der 35 Hz überlegen war. In Summe bildeten alle Gruppen mit WBV-Therapie in dieser Phase mehr Kallus als die osteoporotische Kontrollgruppe (vgl. Abb. 70).

Das Ende des Untersuchungszeitraumes zwischen dem 27. und 35. Tag wurde durch das Fluorochrom "TC" markiert. In diesem Zeitraum stellten sich die beiden vertikalen Vibrationsfrequenzen wiederum schlechter dar als die beiden horizontalen. Die Gruppen mit vertikaler Therapie zeigten ventral und endostal eine größere Fläche als die osteoporotische Kontrollgruppe, jedoch dorsal eine niedrigere. Sie übertrafen zwar das Niveau der osteoporotischen Kontrollgruppe, lagen aber deutlich hinter der Kallusneubildung der WBV-Versuchsgruppen mit horizontaler Vibration. Diese erzielten überall deutlich höhere Werte als die osteoporotische Kontrollgruppe und übertrafen sogar das Niveau der gesunden Kontrollgruppe (vgl. Abb. 70). In dieser späten Phase der Kallusbildung war allerdings die horizontale 35 Hz- der 70 Hz-Therapie überlegen. Ventral zeigte sich diese Frequenz der osteoporotischen Kontrollgruppe und der vertikalen Vibration bei 35 Hz signifikant überlegen. Dorsal konnte in beiden horizontalen WBV-Versuchsgruppen signifikant mehr Wachstum als in der Gruppe mit vertikaler 35 Hz-Therapie induziert werden.

Komrakova et al. verglichen 2013 ebenfalls den Einfluss von horizontaler und vertikaler WBV auf die Frakturheilung im osteoporotischen Rattenmodell. Auch sie fanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kallusflächen. Allerdings konnte ein gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe vergrößerter endostaler Kallus durch horizontale Vibration identifiziert werden. Hier war das Kalluswachstum in der dritten Woche am stärksten (Komrakova et al. 2013). Stürmer et al. zeigten 2014 einen negativen Effekt auf die endostale Frakturheilung in der frühen Phase sowie einen positiven auf die spätere. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Bezug auf alle Frequenzen. Sämtliche untersuchte Frequenzen zeigten endostal im CG-Intervall niedrigere Messwerte als die osteoporotische Kontrollgruppe und signifikant niedrigere gegenüber der gesunden Kontrollgruppe. Im TC-Intervall (26.–35. Tag) zeigten sämtliche Messparameter, mit Ausnahme des dorsalen Kallus bei vertikalen Frequenzen, gesteigerte Werte gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe. Die Gesamtkallusflächen wurden durch die horizontalen Frequenzen tendenziell positiv gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe beeinflusst, wobei 70 Hz 35 Hz überlegen waren. Die vertikalen Frequenzen wirkten sich nur punktuell positiv aus, endostal zeigte nur die Testgruppe mit vertikaler WBV bei 35 Hz eine positive Tendenz gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe.

#### 4.6 Fazit

Insgesamt zeigten die hohen Frequenzen eine stärker positive Beeinflussung der osteoporotischen Frakturheilung an der Tibiametaphyse der Ratte als die niedrigen Frequenzen – unabhängig von der Ausrichtung. Die horizontale Vibration bei 70 Hz erzeugte die positivsten Tendenzen und zeigte in mehreren Messparametern sogar signifikante Steigerungen gegenüber der osteoporotischen und auch der gesunden Kontrollgruppe. Zu bemerken ist jedoch, dass die µCT-Untersuchung häufiger negative Tendenzen und sogar teilweise signifikante Abnahmen des Knochenvolumens gegenüber der gesunden Kontrollgruppe ergab. Die polychrome Sequenzmarkierung zur zeitlichen Analyse des Heilungsverlaufes bestätigte dies nochmals: Auch hier zeigte sich ein deutlicher Vorteil durch horizontale WBV, insbesondere bei 70 Hz, und zwar mit signifikanten Steigerungen gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe sowie auch gegenüber den beiden Versuchsgruppen, die eine 35 Hz-Therapie erhielten. In Bezug auf die teilweise vorteilhafte Beeinflussung durch hohe vertikale Frequenzen stehen die Ergebnisse dieser Arbeit in Einklang mit denen von Trautmann (Komrakova et al. 2013; Trautmann 2014). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in dem gewählten Versuchsaufbau die horizontale Vibration bei 70 Hz der vertikalen bei 70 Hz überlegen ist.

Übereinstimmend mit diversen vorangegangenen Untersuchungen (Rubin et al. 2001b; Flieger et al. 1998; Oxlund et al. 2003; Sehmisch et al. 2009; Stuermer et al.

2010a; Stuermer et al. 2010b), zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Forschungsergebnisse, dass eine WBV unter anderem in der Osteoporose-Therapie sinnvoll sein kann. Im Einzelfall kann sie auch bei Kontraindikationen einer medikamentösen Therapie oder zu deren Ergänzung eingesetzt werden. Dies belegten Stürmer et al. in einem Tierversuch an ovarektomierten Ratten, die zusätzlich zu einer zweimal täglichen WBV bei 70 Hz entweder Raloxifen oder Östrogen erhielten. Aus den Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass zu den positiven Einflüssen der WBV-Therapie eine zusätzliche Verbesserung der Knochenbruchheilung durch Raloxifen oder Östrogen erreicht werden kann (Stuermer et al. 2014). Die Untersuchungen der Lendenwirbelkörper derselben Versuchstiere ergab - in völligem Kontrast zu den Ergebnissen für die Frakturheilung – die besten Resultate durch vertikale Vibration bei 35 Hz (Komrakova 2014, Fürst 2014). Daraus ergibt sich, dass der Einsatz der WBV gezielt im Hinblick auf das Krankheitsbild variiert werden muss: Der intakte (osteoporotische) Knochen bedarf einer anderen Therapie hinsichtlich Frequenz, Amplitude, Ausrichtung und Häufigkeit des Einsatzes als die Fraktur. Somit besteht weiterer Forschungsbedarf damit die einzelnen Parameter einer Ganzkörpervibrationstherapie auf jeden Patienten und sein Krankheitsbild angepasst werden können. Da dieser Arbeit ein Tierversuch am osteoporotischen Rattenmodell zugrunde liegt, besteht die Notwendigkeit, in weiteren Studien zunächst an größeren Tiermodellen und später auch an Menschen eindeutige Erkenntnisse über den Nutzen zu erlangen.

## **5** Zusammenfassung

Osteoporose ist eine Krankheit, die weltweit Millionen Menschen betrifft und in Anbetracht der überalternden Gesellschaft in Zukunft weiter an Relevanz gewinnen wird. Dass sich eine Ganzkörpervibration vorteilhaft auf Osteoporose auswirken kann, wurde schon in vorausgegangenen Studien belegt (Rubin et al. 2001b; Flieger et al. 1998; Oxlund et al. 2003; Sehmisch et al. 2009; Stuermer et al. 2010a; Stuermer et al. 2010b). Jedoch konnte bisher keine Klarheit über die optimale Anwendung (Dauer, Häufigkeit, Frequenz, Ausrichtung, Amplitude) gewonnen werden. Die bisherigen Versuche unterschieden sich lediglich in den verwendeten Frequenzen und der Therapiedauer.

Um die unterschiedlichen Einflüsse von vertikaler und horizontaler Vibration auf die osteoporotische Frakturheilung zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Tierversuch mit 90 weiblichen Ratten durchgeführt. 15 wurden scheinoperiert und 75 wurden ovarektomiert. Innerhalb einer Latenzzeit von 8 Wochen entwickelten die ovarektomierten Versuchstiere eine Osteoporose. Im Folgenden wurden alle Tiere an der Tibiametaphyse standardisiert osteotomiert und mittels Plattenosteosynthese versorgt. Es wurden sechs Versuchsgruppen gebildet: Vier Gruppen wurden einer horizontalen bzw. vertikalen Ganzkörpervibration mit 35 Hz oder 70 Hz ausgesetzt (35Hz vert, 70Hz vert, 35Hz horiz und 70Hz horiz). Die übrigen zwei Gruppen erhielten keine Ganzkörpervibration, wobei eine Gruppe aus nicht ovarektomierten (SHAM) und die andere Gruppe aus Tieren nach Ovarektomie bestand (OVX). Die Ganzkörpervibration wurde zweimal täglich über einen Zeitraum von vier Wochen mit einer Amplitude von 0,5 mm durchgeführt. Nach Beendigung dieses Zeitraumes wurden die Tiere per Dekapitation getötet und die Tibiae entnommen. Anschließend wurden ein biomechanischer Test, eine µCT-Untersuchung, eine mikroradiographische Untersuchung sowie eine polychrome Sequenzmarkierung durchgeführt. Die ersten beiden Untersuchungen konnten am präparierten Knochen vorgenommen werden. Die letzteren erfolgten nach Einbettung der Knochen in Methylmetacrylat und der Anfertigung von ca. 120 µm dicken histologischen Schnitten.

Der biomechanische Test zeigte keine signifikante Veränderung der Elastizität oder der Streckgrenze in allen Gruppen zueinander. Die biomechanischen Eigenschaften des Kallus konnten nur tendenziell bei den hohen Frequenzen von 70 Hz vertikal und 70 Hz horizontal verbessert werden.

In der µCT-Untersuchung konnte weder durch horizontale noch durch vertikale Ganzkörpervibration ein signifikanter positiver Einfluss auf die Frakturheilung im Vergleich zur osteoporotischen Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Es zeigten sich jedoch positive Tendenzen durch die horizontale Vibration bei 70 Hz. Die mikroradiographische Untersuchung ergab einen positiven Einfluss der vertikalen und der horizontalen WBV bei 70 Hz. Die horizontale Vibration bei 70 Hz konnte im Vergleich zur osteoporotischen Kontrollgruppe die Kortikalisdicke distal ventral, den Knochendurchmesser proximal, die Kallusdicke ventral, die Knochendichte des ventralen und die des endostalen Kallus verbessern.

In der polychromen Sequenzmarkierung konnte insgesamt durch die WBV eine Verschlechterung der frühen und eine Verbesserung der mittleren und späten osteoporotischen Frakturheilung gezeigt werden. In der frühen Phase wirkten sich ventral sowie endostal alle Frequenzen nachteilig aus. In der mittleren Phase war die horizontale Vibration bei 70 Hz in Bezug auf die dorsale Kallusfläche signifikant vorteilhaft gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe. In der späten Phase erreichte die Gruppe mit horizontaler 35 Hz-Therapie in Bezug auf die ventrale Kallusfläche gegenüber der osteoporotischen Gruppe und der Gruppe mit vertikaler 35 Hz-Therapie signifikante Steigerungen. Dorsal zeigten beide horizontalen Frequenzen signifikant größere Kallusflächen als die Gruppe mit vertikaler 35 Hz-Therapie.

In der Zusammenschau aller durchgeführten Untersuchungen dieser Arbeit kristallisierte sich die horizontale Ganzkörpervibration bei 70 Hz als die vorteilhafteste Frequenz heraus, um die osteoporotische Frakturheilung an der Tibiametaphyse positiv zu beeinflussen.

### 6 Literaturverzeichnis

- Adler CP: Knochenkrankheiten: Diagnostik makroskopischer, histologischer und radiologischer Strukturveränderungen des Skeletts. 3. Auflage; Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg 2005
- Albrand G, Munoz F, Sornay-Rendu E, DuBoeuf F, Delmas PD (2003): Independent predictors of all osteoporosis-related fractures in healthy postmenopausal women: the OFELY study. Bone <u>32</u>, 78–85
- Albrektsson T, Jacobsson M, Turesson I (1985): Bone remodelling at implant sites after irradiation injury. Methodological approaches to study the effects of Co60 administered in a single dose of 15 Gy. Swed Dent J Suppl <u>28</u>, 193–203
- Arnold JS, Bartley MH, Tont SA, Jenkins DP (1966): Skeletal changes in aging and disease. Clin Orthop Relat Res <u>49</u>, 17–38
- 5. Bargel HJ, Cardinal P, Hilbrans H, Hübner KH, Wurzel G: Werkstoffkunde. 11. Auflage; Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg 2013
- 6. Bartl R: Osteoporose: Prävention, Diagnostik, Therapie. 4. Auflage; Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2011
- Bischoff-Ferrari HA, Kiel DP, Dawson-Hughes B, Orav JE, Li R, Spiegelman D, Dietrich T, Willett WC (2009): Dietary calcium and serum 25-hydroxyvitamin D status in relation to BMD among U.S. adults. J Bone Miner Res <u>24</u>, 935–942
- Bleibler F, Konnopka A, Benzinger P, Rapp K, König HH (2013): The health burden and costs of incident fractures attributable to osteoporosis from 2010 to 2050 in Germany--a demographic simulation model. Osteoporos Int <u>24</u>, 835–847
- 9. Bonewald LF (2011): The amazing osteocyte. J Bone Miner Res 26, 229-238
- Bruyere O, Reginster JY (2008): Vitamin D status and response to antiosteoporotic therapy. Womens Health (Lond Engl) <u>4</u>, 445–447
- 11. Cauley JA, Thompson DE, Ensrud KC, Scott JC, Black D (2000): Risk of mortality following clinical fractures. Osteoporos Int <u>11</u>, 556–561
- 12. Cesnjaj M, Stavljenić A, Vukicević S (1991): Decreased osteoinductive potential of bone matrix from ovariectomized rats. Acta Orthop Scand <u>62</u>, 471–475
- 13. Chambers TJ, Revell PA, Fuller K, Athanasou NA (1984): Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts. J Cell Sci <u>66</u>, 383–399
- 14. Chen GX, Zheng S, Qin S, Zhong ZM, Wu XH, Huang ZP, Li W, Ding RT, Yu H, Chen JT (2014): Effect of low-magnitude whole-body vibration combined with alendronate in ovariectomized rats: a random controlled osteoporosis prevention study. PLoS ONE <u>9</u>, e96181

- 15. Cohen A, Dempster DW, Müller R, Guo XE, Nickolas TL, Liu XS, Zhang XH, Wirth AJ, van Lenthe GH, Kohler T (2010): Assessment of trabecular and cortical architecture and mechanical competence of bone by high-resolution peripheral computed tomography: comparison with transiliac bone biopsy. Osteoporos Int <u>21</u>, 263–273
- 16. Compston JE, Mellish RW, Garrahan NJ (1987): Age-related changes in iliac crest trabecular microanatomic bone structure in man. Bone <u>8</u>, 289–292
- 17. Cranney A, Guyatt G, Griffith L, Wells G, Tugwell P, Rosen C (2002): Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. IX: Summary of meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. Endocr Rev <u>23</u>, 570–578
- 18. Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, Grady D, Powles TJ, Cauley JA, Norton L, Nickelsen T, Bjarnason NH, Morrow M (1999): The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. JAMA <u>281</u>, 2189–2197
- 19. Dalén N, Olsson KE (1974): Bone mineral content and physical activity. Acta Orthop Scand <u>45</u>, 170–174
- 20. Daub F: Kurzzeiteffekte von Estradiol, Raloxifen, Phytohormonen und Parathormon auf die metaphysäre Frakturheilung des manifest osteoporotischen Knochens der Ratte. Med. Diss. Göttingen 2010
- 21. de Koning L, Henne D, Hemmelgarn BR, Woods P, Naugler C (2013): Non-linear relationship between serum 25-hydroxyvitamin D concentration and subsequent hip fracture. Osteoporos Int <u>24</u>, 2061–2065
- Dresig H, Fidlin A: Schwingungen mechanischer Antriebssysteme: Modellbildung, Berechnung, Analyse, Synthese. 3. Auflage; Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg 2014
- 23. Flieger J, Karachalios T, Khaldi L, Raptou P, Lyritis G (1998): Mechanical stimulation in the form of vibration prevents postmenopausal bone loss in ovariectomized rats. Calcif Tissue Int <u>63</u>, 510–514
- Frost HM (1987): The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism of osteoporoses and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. Bone Miner <u>2</u>, 73–85
- 25. Frost HM (2003): Bone's mechanostat: a 2003 update. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol <u>275</u>, 1081–1101
- 26. Frost HM (1960): The Utah Paradigm of Skeletal Physiology. International Society of Musculoskeletal and Neuronal Interactions ISMNI <u>1960</u>
- 27. Fukushima T, Nitta T, Furuichi H, Izumo N, Fukuyama T, Nakamuta H, Koida M (2000): Bone anabolic effects of PTH(1-34) and salmon calcitonin in ovariectomy-

and ovariectomy-steroid-induced osteopenic rats: a histomorphometric and biomechanical study. Jpn J Pharmacol <u>82</u>, 240–246

- 28. Fulzele K, Krause DS, Panaroni C, Saini V, Barry KJ, Liu X, Lotinun S, Baron R, Bonewald L, Feng JQ (2013): Myelopoiesis is regulated by osteocytes through Gsαdependent signaling. Blood <u>121</u>, 930–939
- 29. Fürst BM: Einfluss der vertikalen und horizontalen Ganzkörpervibration mit verschiedenen Frequenzen auf die Lendenwirbelsäule im Rattentiermodell. Med. Diss. Göttingen 2014
- 30. Goodship AE, Kenwright J (1985): The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. J Bone Joint Surg Br <u>67</u>, 650–655
- Graichen H, Lochmüller EM, Wolf E, Langkabel B, Stammberger T, Haubner M, Renner-Müller I, Englmeier KH, Eckstein F (1999): A non-destructive technique for 3-D microstructural phenotypic characterisation of bones in genetically altered mice: preliminary data in growth hormone transgenic animals and normal controls. Anat Embryol <u>199</u>, 239–248
- 32. Gusi N, Raimundo A, Leal A (2006): Low-frequency vibratory exercise reduces the risk of bone fracture more than walking: a randomized controlled trial. BMC Musculoskelet Disord <u>7</u>, 92
- 33. Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, Steinle T, Verheyen F, Linder R (2013): The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. Dtsch Arztebl Int <u>110</u>, 52–57
- 34. Hao Y, Yingjie H, Zhang G, Ge Z, Wang Y, Yisheng W, Qin L, Ling Q, Hung WY, Leung K (2007): Changes of microstructure and mineralized tissue in the middle and late phase of osteoporotic fracture healing in rats. Bone <u>41</u>, 631–638
- 35. Hirner A, Weise K: Chirurgie. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2008
- 36. Hong H, Kim E-K, Lee JS (2013): Effects of calcium intake, milk and dairy product intake, and blood vitamin D level on osteoporosis risk in Korean adults: analysis of the 2008 and 2009 Korea National Health and Nutrition Examination Survey. Nutr Res Pract <u>7</u>, 409–417
- 37. Hooven FH, Adachi JD, Adami S, Boonen S, Compston J, Cooper C, Delmas P, Diez-Perez A, Gehlbach S, Greenspan SL (2009): The Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women (GLOW): rationale and study design. Osteoporos Int <u>20</u>, 1107– 1116
- 38. Hosfield DJ, Zhang Y, Dougan DR, Broun A, Tari LW, Swanson RV, Finn J (2004): Structural basis for bisphosphonate-mediated inhibition of isoprenoid biosynthesis. J Biol Chem <u>279</u>, 8526–8529

- 39. Iki M, Tamaki J, Kadowaki E, Sato Y, Dongmei N, Winzenrieth R, Kagamimori S, Kagawa Y, Yoneshima H (2014): Trabecular bone score (TBS) predicts vertebral fractures in Japanese women over 10 years independently of bone density and prevalent vertebral deformity: the Japanese Population-Based Osteoporosis (JPOS) cohort study. J Bone Miner Res <u>29</u>, 399–407
- 40. Islam AA, Rasubala L, Yoshikawa H, Shiratsuchi Y, Ohishi M (2005): Healing of fractures in osteoporotic rat mandible shown by the expression of bone morphogenetic protein-2 and tumour necrosis factor-alpha. Br J Oral Maxillofac Surg <u>43</u>, 383–391
- Jee WS, Yao W (2001): Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. J Musculoskelet Neuronal Interact <u>1</u>, 193–207
- 42. 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 <u>18</u>, 1932–1941
- 43. Junqueira LC, Carneiro J, Mayerhofer A, Wurziger LJ: Histologie. 6. Auflage; Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg 2004
- 44. Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner <u>15</u>, 175–191
- 45. Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW (1989): The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. Endocrinology <u>124</u>, 7–16
- 46. Kanis JA, Johnell O, Oden A, De Laet C, Jonsson B, Dawson A (2002): Ten-year risk of osteoporotic fracture and the effect of risk factors on screening strategies. Bone <u>30</u>, 251–258
- 47. Kanis JA, Oden A, Johnell O, De Laet C, Jonsson B (2004a): Excess mortality after hospitalisation for vertebral fracture. Osteoporos Int <u>15</u>, 108–112
- 48. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Borgstrom F, Zethraeus N, De Laet C, Jonsson B (2004b): The risk and burden of vertebral fractures in Sweden. Osteoporos Int <u>15</u>, 20–26
- 49. Karladani AH, Granhed H, Kärrholm J, Styf J (2001): The influence of fracture etiology and type on fracture healing: a review of 104 consecutive tibial shaft fractures. Arch Orthop Trauma Surg <u>121</u>, 325–328
- 50. Karow T, Lang-Roth R: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.20. Auflage; Thomas Karow (Verlag), Pulheim 2012
- 51. Komrakova M, Werner C, Wicke M, Nguyen BT, Sehmisch S, Tezval M, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Effect of daidzein, 4-methylbenzylidene camphor or estrogen on gastrocnemius muscle of osteoporotic rats undergoing tibia healing period. J Endocrinol <u>201</u>, 253–262

- 52. Komrakova M, Sehmisch S, Tezval M, Ammon J, Lieberwirth P, Sauerhoff C, Trautmann L, Wicke M, Dullin C, Stuermer KM, Stuermer EK (2013): Identification of a vibration regime favorable for bone healing and muscle in estrogen-deficient rats. Calcif Tissue Int <u>92</u>, 509–520
- 53. Komrakova M, Stuermer EK, Tezval M, Stuermer KM, Dullin C, Schmelz U, Doell C, Durkaya-Burchhardt N, Fuerst B, Genotte T, Sehmisch S (2014): Evaluation of twelve vibration regimes applied to improve spine properties in ovariectomized rats. Bone Reports
- 54. Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshioka M, Honjo H, Urabe M, Kitajima I, Semba I, Hirasawa Y (1999): Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. J Steroid Biochem Mol Biol <u>68</u>, 197–202
- 55. Leitlinie DVO s. Pfeilschifter 2014
- 56. Leung KS, Shi HF, Cheung WH, Qin L, Ng WK, Tam KF, Tang N (2009): Lowmagnitude high-frequency vibration accelerates callus formation, mineralization, and fracture healing in rats. J Orthop Res <u>27</u>, 458–465
- 57. Lindsay R, Cosman F: Osteoporosis. In: Jameson JL: Harrison's Endocrinology. 2. Auflage; McGraw Hill Professional, New York 2010, 443-461
- 58. Lynch MA, Brodt MD, Stephens AL, Civitelli R, Silva MJ (2011): Low-magnitude whole-body vibration does not enhance the anabolic skeletal effects of intermittent PTH in adult mice. J Orthop Res <u>29</u>, 465–472
- 59. Machida S, Booth FW (2004): Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. Med Sci Sports Exerc <u>36</u>, 52–59
- 60. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004): Characterization of a closed femur fracture model in mice. J Orthop Trauma <u>18</u>, 687–695
- 61. Martino S, Cauley JA, Barrett-Connor E, Powles TJ, Mershon J, Disch D, Secrest RJ, Cummings SR (2004): Continuing outcomes relevant to Evista: breast cancer incidence in postmenopausal osteoporotic women in a randomized trial of raloxifene. J Natl Cancer Inst <u>96</u>, 1751–1761
- 62. Melton LJ, Achenbach SJ, Atkinson EJ, Therneau TM, Amin S (2013): Long-term mortality following fractures at different skeletal sites: a population-based cohort study. Osteoporos Int <u>24</u>, 1689–1696
- 63. Midgette AS, Baron JA (1990): Cigarette smoking and the risk of natural menopause. Epidemiology <u>1</u>, 474–480
- 64. Miller SC, Wronski TJ (1993): Long-term osteopenic changes in cancellous bone structure in ovariectomized rats. Anat Rec <u>236</u>, 433–441

- 65. Mu J, Shen B, Yang J, Li Y, Zhou Z, Kang P, Pei F (2010): [Changes of microarchitecture and biomechanical properties in callus during fracture healing in ovariectomized rats]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban <u>41</u>, 1016–1020
- 66. Muche R, Lanzinger S, Rau M: Medizinische Statistik mit R und Excel: Einführung in die RExcel- und R-Commander-Oberflächen zur statistischen Auswertung. 1. Auflage; Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg 2011
- 67. Muftic M, Selimovic EK, Miladinovic K (2013): Osteoporosis--comparative study between quantitative ultrasound of calcaneus and DXA. Med Arch <u>67</u>, 289–291
- 68. Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, Swain M, Mason RS, Murrell GA, Diwan AD, Diamond T (2001): Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. Bone <u>28</u>, 80–86
- 69. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman 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 <u>344</u>, 1434–1441
- 70. Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P: Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie.7. Auflage; Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2014
- No authors listed (2001): NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7-29, 2000: highlights of the conference. South Med J <u>94</u>, 569–573
- 72. Notomi T, Okimoto N, Okazaki Y, Nakamura T, Suzuki M (2003): Tower climbing exercise started 3 months after ovariectomy recovers bone strength of the femur and lumbar vertebrae in aged osteopenic rats. J Bone Miner Res <u>18</u>, 140–149
- 73. Orwoll ES, Scheele WH, Paul S, Adami S, Syversen U, Diez-Perez A, Kaufman JM, Clancy AD, Gaich GA (2003): The effect of teriparatide [human parathyroid hormone (1-34)] therapy on bone density in men with osteoporosis. J Bone Miner Res <u>18</u>, 9–17
- 74. Oxlund BS, Ørtoft G, Andreassen TT, Oxlund H (2003): Low-intensity, high-frequency vibration appears to prevent the decrease in strength of the femur and tibia associated with ovariectomy of adult rats. Bone <u>32</u>, 69–77
- 75. Pfeilschifter J: Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen. S3-Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e. V. 3. Auflage; Essen 2014
- 76. Popesko P, Rajtová V, Horák J: A Colour Atlas of the Anatomy of Small Laboratory Animals. Saunders, London 2002

- 77. Povacz F: Geschichte der Unfallchirurgie. 2. Auflage; Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg 2007
- 78. Rehn B, Lidström J, Skoglund J, Lindström B (2007): Effects on leg muscular performance from whole-body vibration exercise: a systematic review. Scand J Med Sci Sports <u>17</u>, 2–11
- 79. Reiche D: Roche Lexikon Medizin. 5. Auflage; Urban & Fischer Verlag, München 2006
- 80. Rittweger J, Felsenberg D: Resistive Vibration Exercise Prevents Bone Loss During 8 Weeks of Strict Bed Rest in Healthy Male Subjects: Results from the Berlin Bed Rest (BBR) Study (Presentation 1145). 26. jährliches Treffen der American Society for Bone and Mineral Research, Seattle 2004
- 81. Rittweger J, Beller G, Armbrecht G, Mulder E, Buehring B, Gast U, Dimeo F, Schubert H, de Haan A, Stegeman DF (2010): Prevention of bone loss during 56 days of strict bed rest by side-alternating resistive vibration exercise. Bone <u>46</u>, 137–147
- 82. Ross MH, Pawlina W: Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. 5. Auflage; Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, Philadelphia 2011
- 83. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA <u>288</u>, 321–333
- 84. Rubin C, Xu G, Judex S (2001a): The anabolic activity of bone tissue, suppressed by disuse, is normalized by brief exposure to extremely low-magnitude mechanical stimuli. FASEB J <u>15</u>, 2225–2229
- 85. Rubin CT, Sommerfeldt DW, Judex S, Qin YX (2001b): Inhibition of osteopenia by low magnitude, high-frequency mechanical stimuli. Drug Discov Today <u>6</u>, 848–858
- Runge M, Rehfeld G, Resnicek E (2000): Balance training and exercise in geriatric patients. J Musculoskelet Neuronal Interact <u>1</u>, 61–65
- 87. Sarmiento A, Schaeffer JF, Beckerman L, Latta LL, Enis JE (1977): Fracture healing in rat femora as affected by functional weight-bearing. J Bone Joint Surg Am <u>59</u>, 369–375
- 88. Schnabel M, Eser G, Ziller V, Mann D, Mann E, Hadji P (2005): [Bone mineral density in postmenopausal women with proximal femoral fractures--comparative study between quantitative ultrasonometry and gold standard DXA]. Zentralbl Chir <u>130</u>, 469–475

- 89. 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 <u>20</u>, 1999–2008
- 90. Shi HF, Cheung WH, Qin L, Leung AH, Leung KS (2010): Low-magnitude highfrequency vibration treatment augments fracture healing in ovariectomy-induced osteoporotic bone. Bone <u>46</u>, 1299–1305
- 91. Smith EL, Gilligan C (1991): Physical activity effects on bone metabolism. Calcif Tissue Int <u>49 Suppl</u>, S50-54
- 92. Stillman RJ, Lohman TG, Slaughter MH, Massey BH (1986): Physical activity and bone mineral content in women aged 30 to 85 years. Med Sci Sports Exerc <u>18</u>, 576– 580
- 93. Stuermer EK, Seidlová-Wuttke D, Sehmisch S, Rack T, Wille J, Frosch KH, Wuttke W, Stürmer KM (2006): Standardized bending and breaking test for the normal and osteoporotic metaphyseal tibias of the rat: effect of estradiol, testosterone, and raloxifene. J Bone Miner Res <u>21</u>, 89–96
- 94. Stuermer 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 <u>87</u>, 168–180
- 95. Stuermer 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 <u>395</u>, 163–172
- 96. Stuermer 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 <u>64</u>, 187–194
- 97. Szulc P, Chapuy MC, Meunier PJ, Delmas PD (1993): Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. J Clin Invest <u>91</u>, 1769–1774
- 98. Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, Ito M, Takeshita S, Ikeda K (2007): Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. Cell Metab <u>5</u>, 464–475
- 99. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ (1995): FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. Bone <u>17</u>, 125S–133S
- 100. Trautmann LM: Einfluss der vertikalen Ganzkörpervibration verschiedener Frequenzen auf die Frakturheilung der osteoporotischen Ratte. Med. Diss. Göttingen 2014

- 101. Tuna H, Birtane M, Ekuklu G, Cermik F, Tuna F, Kokino S (2008): Does quantitative tibial ultrasound predict low bone mineral density defined by dual energy Xray absorptiometry? Yonsei Med J <u>49</u>, 436–442
- 102. Turner CH, Warden SJ, Bellido T, Plotkin LI, Kumar N, Jasiuk I, Danzig J, Robling AG (2009): Mechanobiology of the skeleton. Sci Signal <u>2</u>, pt3
- 103. van den Bergh JP, Bours SPG, van Geel TA, Geusens PP (2011): Optimal use of vitamin D when treating osteoporosis. Curr Osteoporos Rep <u>9</u>, 36–42
- 104. Wang X, Sanyal A, Cawthon PM, Palermo L, Jekir M, Christensen J, Ensrud KE, Cummings SR, Orwoll E, Black DM (2012): Prediction of new clinical vertebral fractures in elderly men using finite element analysis of CT scans. J Bone Miner Res <u>27</u>, 808–816
- 105. Welsch U: Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. 2. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München 2006
- 106. Whedon GD, Deitrick JE, Shorr E (1949): Modification of the effects of immobilization upon metabolic and physiologic functions of normal men by the use of an oscillating bed. Am J Med <u>6</u>, 684–711
- 107. Wolf S, Janousek A, Pfeil J, Veith W, Haas F, Duda G, Claes L (1998): The effects of external mechanical stimulation on the healing of diaphyseal osteotomies fixed by flexible external fixation. Clin Biomech (Bristol, Avon) <u>13</u>, 359–364
- 108. Wolff J: Das Gesetz der Transformation der Knochen. August Hirschwald Verlag, Berlin 1892
- 109. Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA (1985): Skeletal alterations in ovariectomized rats. Calcif Tissue Int <u>37</u>, 324–328
- 110. Xu S, Wang J, Li W, Wang Y, Zhao G (2004): [Osteoporosis impairs fracture healing of tibia in a rat osteoporotic model]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi <u>84</u>, 1205– 1209
- 111. Yamaura M, Nakamura T, Tsurukami H, Hijioka A, Narusawa K, Ohnishi H, Ohta T, Hosoda K (1996): Local bone turnover in the metaphysis of the proximal tibia and the lumbar vertebra during the early periods after ovariectomy in rats. Calcif Tissue Int <u>58</u>, 52–59
- 112. Yoshida S, Yamamuro T, Okumura H, Takahashi H (1991): Microstructural changes of osteopenic trabeculae in the rat. Bone <u>12</u>, 185–194

# Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mich bei dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein herzlicher Dank gebührt Prof. Dr. Ewa Stürmer dafür, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses Thema zu bearbeiten und stets kurzfristig für methodische und fachliche Nachfragen zur Verfügung stand.

Ausdrücklich möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Marina Komrakova, Annette Witt und Ramona Castro-Machguth für die fachkundige Hilfe bei der Durchführung der Experimente, die vielen netten Ratschläge und die Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse bedanken.

Christian Dullin trug durch die Programmierung der Software *3D-OsteoAnalyze* zur Durchführung der Mikro-CT-Untersuchung bei. Ich bedanke mich auch für die geduldige Einführung in die Bedienung des Mikro-CT.

Das Programm zur Auswertung der mikroradiographischen Untersuchung wurde von dem verstorbenen Dr. med. Thomas Rack programmiert.

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgesellschaft gefördert (DFG STU 478/3-2).