

Aus der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie
(Prof. Dr. med. W. Lehmann)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Intermittierende PTH-Applikation zur Osteopenie-Therapie im
weiblichen Rattentiermodell**

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

vorgelegt von

Barbara Simon

aus

Nürnberg

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

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

Ko-Referent/in: Prof. Dr. Dr. K. G. Wiese

Drittreferent/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 14.03.2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	<i>Aufbau des Lamellenknochens</i>	8
1.1.1	Kortikalis	9
1.1.2	Spongiosa	10
1.1.3	Periost und Endost	11
1.1.4	Osteoblasten	12
1.1.5	Osteozyten	13
1.1.6	Osteoklasten	14
1.1.7	Knochenmatrix	15
1.2	<i>Steuerung des Knochenumbaus</i>	15
1.2.1	Exogene Einflüsse	16
1.2.2	Elektrolyte und Hormonkopplung	16
1.2.2.1	PTH im menschlichen Körper	19
1.2.2.2	Wirkweise von Östrogen auf den Knochen	20
1.3	<i>Osteoporose - ein pathologischer Umbauprozess des Knochens</i>	21
1.4	<i>Medikamentöse Therapie der Osteoporose</i>	22
1.5	<i>PTH</i>	24
1.5.1	Geschichtlicher Hintergrund	24
1.5.2	Therapeutische Anwendung	25
1.6	<i>Versuchstier ovariectomierte Ratte</i>	26
1.7	<i>Zielsetzung</i>	27
2	Material und Methoden	28
2.1	<i>Versuchstiere</i>	28
2.2	<i>Ovariectomie</i>	28
2.3	<i>PTH-Substitution</i>	29
2.4	<i>Gewinnung der Präparate</i>	30
2.5	<i>Versuchsdurchführung mit LWK 3</i>	32
2.5.1	Volumenbestimmung	32
2.5.2	Veraschung	33
2.5.3	Bestimmung der mineralisierten Knochendichte	33
2.5.4	Bestimmung des Anteils organischer und anorganischer Knochensubstanz	34
2.6	<i>Biomechanischer Test des LWK 4</i>	34
2.6.1	Messparameter des biomechanischen Bruchtests	35
2.6.1.1	Yield Load	35
2.6.1.2	Steigung	36

2.6.1.3	Maximalkraft.....	36
2.7	<i>Mikroradiographie des LWK 1</i>	37
2.7.1	Vorbereitung der Wirbelkörper.....	37
2.7.2	Erstellen des Digitalisates der Mikroradiographien.....	37
2.7.3	Auswertung der Mikroradiographien.....	38
2.7.3.1	Graudetektion.....	39
2.7.3.2	Ermittlung der Knochendichte gesamt.....	40
2.7.3.3	Trabekelkreuzungen und Trabekelfläche.....	40
2.7.3.4	Ermittlung der dorsalen Kortikalisdicke.....	41
2.7.3.5	Messparameter der Mikroradiographie.....	42
2.8	<i>Statistik</i>	43
3	Ergebnisse	44
3.1	<i>Gewichtsverlauf der Versuchstiere</i>	45
3.2	<i>Volumina der LWK 3</i>	46
3.3	<i>Veraschung der LWK 3</i>	47
3.3.1	Gewichte vor Veraschung.....	47
3.3.2	Gewichte nach Veraschung.....	48
3.3.3	Mineralisierte Knochendichte.....	49
3.3.4	Organische Masse in Prozent an der Knochenmasse der Wirbelkörper.....	50
3.3.5	Anorganische Masse in Prozent an der Knochenmasse der Wirbelkörper.....	51
3.4	<i>Ergebnisse des biomechanischen Kompressionstests</i>	52
3.4.1	Yield Load.....	52
3.4.2	Steigung.....	53
3.4.3	Maximalkraft.....	54
3.5	<i>Mikroradiographische Auswertung</i>	55
3.5.1	Dorsale Kortikalisdicke.....	55
3.5.2	Kortikaler Knochenanteil.....	56
3.5.3	Dichte der Trabekelkreuzungen.....	57
3.5.4	Anzahl der Trabekelkreuzungen absolut.....	58
3.5.5	Mittlere Trabekeldicke.....	59
3.5.6	Trabekelfläche absolut.....	60
3.5.7	Knochenfläche der Trabekel absolut.....	61
3.5.8	Mittlere Trabekellänge.....	62
4	Diskussion	63
4.1	<i>Perspektiven der PTH-Therapie</i>	71
5	Zusammenfassung	74
6	Anhang	77
6.1	<i>Ergebnistabellen</i>	77

6.2 Tabellenverzeichnis 87

7 Literaturverzeichnis 88

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ASBMR	<i>The American Society for Bone and Mineral Research</i>
BMD	<i>bone mineral density</i>
BMF	<i>bone marrow fat</i>
BMI	<i>body mass index</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
Cbf1	<i>centromere binding factor 1</i>
CO ₂	Kohlendioxid
C-PTHr	Rezeptor für das C-Fragment von PTH
CT	Computertomograph
DVO	Dachverband Osteologie
DNA	Englisch: <i>deoxyribonucleic acid</i> ; deutsch: DNS Desoxyribonukleinsäure
DXA	digitale Röntgen-Absorptiometrie
E	englisch: <i>estrogen</i> ; deutsch: Östrogen
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
fpVCT	<i>flat panel volume computertomograph</i>
GHz	GigaHertz
h	Höhe
K	Kelvin
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt
LWK	Lendenwirbelkörper
M-CSF	<i>monocyte colony stimulating factor</i>
M	Masse
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
NIH	<i>National Institutes of Health</i>

Ob	Osteoblast
ODF	<i>osteoclast differentiating factor</i>
Ok	Osteoklast
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerin-Ligand
OST	Osteotomie
OVX	Ovariektomie
pQCT	periphere quantitative Computertomographie
PTH	Parathormon
PTHr	Parathormonrezeptor
PTHrP	<i>PTH-related protein</i>
qod	<i>every other day</i> ; deutsch: an jedem zweiten Tag
r ²	Quadrat des Radius
RANK	<i>receptor activator of NF Kappa B</i>
RANKL	<i>receptor activator of NF Kappa B ligand</i>
SD	Englisch: <i>standard deviation</i> ; deutsch: Standardabweichung
SERM	<i>selective estrogen reuptake modulators</i>
SHAM	Englisch: <i>imitation</i>
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Thyroxin
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>
TNF-α	<i>tumor necrosis factor α</i>
V	Volumen
Wnt	Wnt-Signalweg
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung

1 Einleitung

1.1 Aufbau des Lamellenknochens

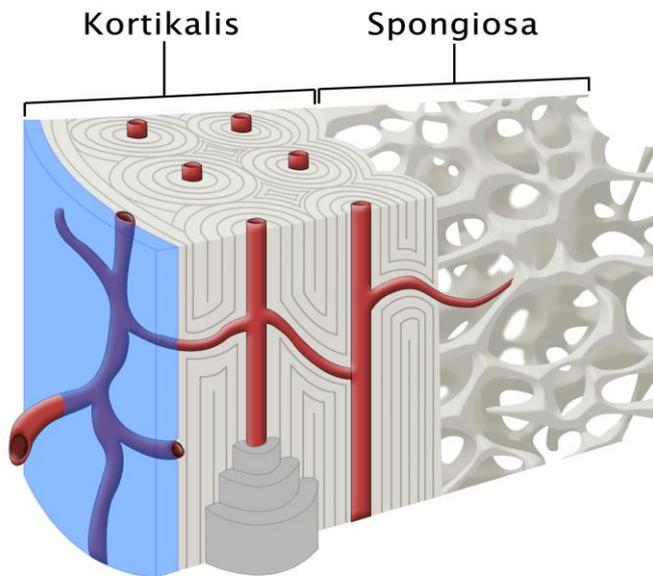


Abbildung 1: Skizze eines angeschnittenen Lamellenknochens. Darstellung von Kortikalis und Spongiosa. Die Kortikalis zeigt einen Aufbau durch Osteone, dichtes, zirkulär angeordnetes Knochenmaterial. Die Spongiosa zeigt eine trabekuläre, netzartige Anordnung der Lamellen. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von B. Andrae, Medizinischer Illustrator.

Der Lamellenknochen stellt die häufigste Knochenart bei Säugetieren und Menschen dar (Weiner et al. 1999). Lange Röhrenknochen und Wirbelkörper sind nach diesem Prinzip aufgebaut (Rho et al. 1998).

Hierbei handelt es sich um festes Stützgewebe, das sich aus Zellverbänden von Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten zusammensetzt und durch Knochenmatrix fixiert ist (Boron und Boulpaep 2005). Die Festigkeit dieses Gewebes wird durch einen hohen Mineralgehalt aus schwer löslichen Salzen wie Kalzium und Phosphat sowie Karbonat und Fluorid erzielt. Hierbei liegen die Kalziumsalze vor allem in Form von Kalziumphosphat und Kalziumkarbonat vor. Diese Mineralien machen zu zwei Drittel das Gewicht des gesamten Skeletts aus und binden 99 % des vorhandenen Körperkalziums sowie 86 % des Gesamtphosphatgehalts des Körpers (Schmidt et al. 2010; Boron und Boulpaep 2005).

1.1.1 Kortikalis

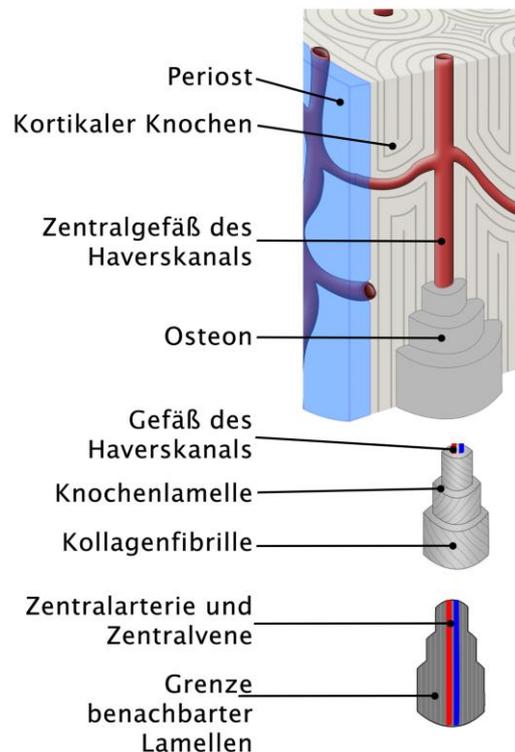


Abbildung 2: Darstellung eines Ausschnittes der Kortikalis und des Aufbaus eines Osteons. Die Kollagenfibrillen zeigen einen gegensätzlichen spiraligen und schichtweisen Aufbau. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von B. Andreae, Medizinischer Illustrator.

Als Kortikalis wird das Knochengewebe bezeichnet, das die Spongiosa umgibt (Boron und Boulpaep 2005). Sie kann bei dem Lendenwirbelkörper im Querschnitt bereits makroskopisch aufgrund homogener Beschaffenheit und höherer Dichte von spongiösem Knochen unterschieden werden (siehe Abbildung 1). Ihr Anteil an der gesamten Knochenmasse des Menschen beträgt 80 % (Spinas et al. 2011).

Die Baueinheit dieser Rindenschicht bei Lamellenknochen ist das konzentrische Osteon. Es besteht aus dem mittigen Haverskanal mit seinen Versorgungsgefäßen und den ihm konzentrisch angelagerten Knochenlamellen (Abbildung 2). Das Haverssystem steht über quer verlaufende Volkmannkanäle mit benachbarten Osteonen, dem Periost und dem Markraum in Verbindung.

Mikroskopisch lassen sich neben dem konzentrischen Haverssystemen Schalt- und Generallamellen unterscheiden. Schaltlamellen stellen Reste alter Osteone dar, die dem expandierenden Wachstum neuer Osteone weichen müssen. Generallamellen sind Lamellen, die unmittelbar unter dem Periost liegen. Im Gegensatz zu den Lamellen eines Osteons besitzen diese keinen Haverskanal als Mittelpunkt, sondern umschließen den Markraum zirkulär (Junqueira und Carneiro 2005; Lüllman-Rauch 2009).

1.1.2 Spongiosa

Die Spongiosa entspricht ca. 20 % der gesamten Knochenmasse des Menschen, ist ebenso aus Lamellenknochen aufgebaut und wird besonders im Knochen von Wirbelkörpern ausgebildet. Sie befindet sich im Knocheninneren, unterhalb der Kortikalis gelegen, wo sie durch Quervernetzungen vieler Knochenbälkchen ein feines Gitternetzwerk bildet. In den Zwischenräumen dieser sogenannten Trabekel liegt das Knochenmark (Spinas et al. 2011).

Die Trabekel besitzen keine direkte Gefäßversorgung, sondern werden durch Diffusion indirekt über Gefäße des Knochenmarks versorgt. Ihre Dicke beträgt im Mittel 300 µm bis höchstens 400 µm. Die Lamellen eines Trabekels ordnen sich im Gegensatz zu denen der Kortikalis parallel zur Bälkchenoberfläche an. Die Ausrichtung der einzelnen Knochenbälkchen erfolgt entlang sogenannter Traktionslinien. Diese stellen eine Anpassung an äußere Krafteinwirkungen dar, welche für den permanenten Umbau der Spongiosa verantwortlich sind. Laut des Wolff'schen Gesetzes von 1892 ist diese den Traktionslinien folgende Bauweise ursächlich für die Stabilität des Knochens (Wolff 1892). Traktionslinien zeichnen sich durch ihren verdichteten Trabekelaufbau und die Zunahme der Trabekeldicke aus. Die Spongiosa besitzt aufgrund ihrer mechanischen Anpassung eine vielfach höhere Knochenumbaurate verglichen mit der Kortikalis (Lüllmann-Rauch 2009; Boron und Boulpaep 2005).

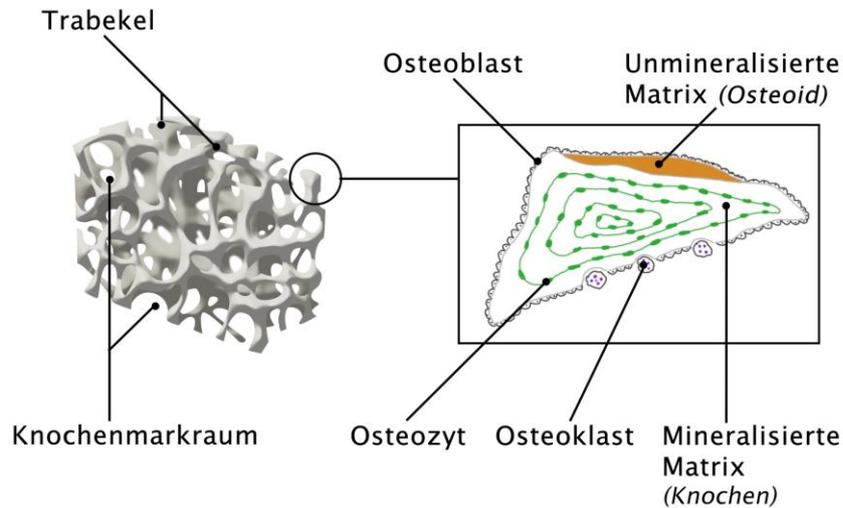


Abbildung 3: Links: *pars spongiosa* eines Knochens. Das Trabekelnetz und der zwischen den Knochenbälkchen liegende Markraum sind erkennbar. Rechts: Trabekelquerschnitt. Der lamelläre Knochenaufbau mit mineralisierter und unmineralisierter Matrix wird deutlich. Ebenso sind Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten skizziert. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von B. Andreae, Medizinischer Illustrator.

1.1.3 Periost und Endost

Das Periost stellt die umhüllende Schutzschicht der Kortikalis dar, die den Knochen mit Ausnahme der Gelenkflächen umgibt.

Das Periost lässt sich in zwei unterschiedliche Schichten unterteilen, wobei die äußere Schicht als *stratum fibrosum* bezeichnet wird und durch sogenannte Sharpey-Fasern (Ausläufer des *stratum fibrosum*) mit der Kortikalis verbunden ist. Das *stratum osteogenicum* stellt die dem Knochen direkt aufliegende innere Schicht des Periosts dar. Darin verlaufen Nerven und Blutgefäße (Zhang et al. 2008).

Auch allen Oberflächen im Inneren des Knochens liegt das Endost auf und alle Trabekeloberflächen und Innenwände der Haverskanäle werden von dieser inneren Hüllschicht überzogen.

Periost und Endost stellen eine unmineralisierte, zellreiche Komponente der Baueinheit „Knochen“ dar. Sie sind von einer dünnen Zellschicht bedeckt, welche aus sogenannten *lining cells* besteht (mesenchymale Stammzellen, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten), die einer Kollagenschicht (Kollagen Typ-I) aufliegen. Diese Zellgruppen sind

für Knochenwachstum und Reparaturmaßnahmen an den Lamellen verantwortlich (Lüllmann-Rauch 2009; Colnot 2009).

1.1.4 Osteoblasten

Osteoblasten sind Zellen, die maßgeblich am Knochenauf- und -umbau beteiligt sind. Sie entwickeln sich über Osteoprogenitorzellen aus pluripotenten mesenchymalen Stammzellen (Lüllmann-Rauch 2009). Das Protein BMP (*bone morphogenetic protein*) ist hierbei für die Ausdifferenzierung zu reifen Osteoblasten verantwortlich. Es induziert eine Ausschüttung des DNA-bindenden Faktors Cb1 im Knochenmark, welches die Weiterentwicklung der Progenitorzellen zu Osteoblasten bewirkt (Yamaguchi et al. 2000).

Sie lagern sich einschichtig auf von ihnen produziertem, noch unmineralisiertem Kollagen, dem Osteoid, ab und gehören zu den bereits erwähnten *lining cells* (Lüllmann-Rauch 2009, Abbildung 3).

Osteoblasten bilden zahlenmäßig den größten Zellanteil im Knochen und haben im aktiven Zustand eine Lebensdauer von ca. 3 Monaten (Manolagas 2000). Sobald sie von einer neuen, durch andere Osteoblasten produzierten mineralisierten Matrix überzogen und eingemauert sind, werden sie als Osteozyten definiert (Lüllmann-Rauch 2009).

Osteoblasten besitzen anabole Aufgaben wie die Synthese von Proteinen, die dem Aufbau und der Aufrechterhaltung des Osteoids dienen (Schmidt et al. 2010) und sind für die Mineralisierung des Knochens verantwortlich.

Hierbei wird durch Osteoblasten in Vesikeln gespeichertes Kalzium und Phosphat in den Extrazellulärraum freigesetzt. Dort kommt es zu einer lokalen Überschreitung der Löslichkeitsgrenze für diese Salze, sodass sie entlang der Kollagenfibrillen der Knochenmatrix ausfallen. Das so entstandene Material entspricht der mineralisierten Knochensubstanz.

Osteoblasten besitzen zudem katabole Wirkung im Knochenstoffwechsel. Durch Expressierung von RANKL (*receptor activator of NF-Kappa B ligand*, RANK-Ligand) und Sezernierung von M-CSF (*monocyte colony stimulating factor*) fördern sie auch die Entstehung von Osteoklasten und deren Aktivierung. Somit wird durch die Zellen des

Knochen aufbauenden Systems gleichzeitig das abbauende angeregt. RANKL wird ebenso als ODF (*osteoclast differentiating factor*) bezeichnet werden, was dessen Funktion besser verdeutlicht (Fuller et al. 1998).

Als Regulationsmechanismus besitzen Osteoblasten zudem die Eigenschaft Osteoprotegerin (OPG), einen löslichen Rezeptor mit Bindung an den RANK-Ligand, zu sezernieren und die Aktivierung von Osteoklasten hierdurch zu hemmen (Kostenuik und Shalhoub 2001, Abbildung 4).

1.1.5 Osteozyten

Osteozyten entsprechen Osteoblasten, die nicht in Apoptose gehen, sobald sie von mineralisierter Knochenmatrix umschlossen sind. Sie sind in Lakunen zwischen den einzelnen Knochenlamellen lokalisiert (Abbildung 3). Sie besitzen Zellausläufer, die in winzigen Kanälchen liegen und untereinander vernetzt sind, wodurch zwischen den einzelnen Osteozyten Verbindungen hergestellt werden. Dieses Hohlräumssystem ist nicht vollständig durch Zellfortsätze und die Zellleiber der Osteozyten ausgefüllt, und somit werden die Zellen und deren Fortsätze von interstitieller Flüssigkeit umgeben. Da Osteozyten an kein Gefäßsystem angeschlossen sind, erfüllt die interstitielle Flüssigkeit nutritive Aufgaben und ermöglicht die Signalvermittlung durch Hormone oder Elektrolytverschiebungen. So bewirkt PTH über bestimmte Rezeptoren (PTHr) an der Zelloberfläche der Osteozyten eine Beeinflussung des Wnt-Signalweges und somit eine Zunahme an Osteoblasten. Auf diese Weise kann PTH über Osteozyten eine Knochen-bildende Wirkung vermitteln (Calvi et al. 2012; Burr und Allen 2013).

Ebenso werden Osteozyten durch äußere mechanische Kräfte beeinflusst, wobei diese protektiven Einfluss auf die Lebensdauer der Osteozyten und eine zunehmende Osteoblastendifferenzierung zur Folge haben (Burr und Allen 2013). Über Mechanorezeptoren stehen sie mit dem umliegenden Knochen in Verbindung und können durch externe Kräfte stimuliert werden. Je nach mechanischer Belastung schütten Osteozyten Mediatoren zur Stimulation oder Hemmung von Osteoblasten und -klasten aus (Turner et al. 2009).

1.1.6 Osteoklasten

Osteoklasten sind Zellen, die dem knochenabbauenden System angehören. Nach der Stimulierung durch M-CSF (*monocyte colony stimulating factor*) formieren sie sich durch Verbindung mehrerer mononukleärer Progenitorzellen zu vielzelligen Riesenzellen, die der Familie von Makrophagen und Monozyten angehören (Teitelbaum 2000). Sie können in einem Ruhezustand vorliegen oder einen aktivierten, Knochen resorbierenden Zustand einnehmen und haben eine Lebensdauer von ca. zwei Wochen (Manolagas 2000). Neben M-CSF spielt ein weiterer Faktor eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Osteoklasten. Dieser Faktor wird von Osteoblasten ausgebildet und als RANKL (RANK-Ligand) bezeichnet. Er ist ein Membranprotein, das an der Oberfläche von Osteoblasten ausgebildet wird und in der Literatur auch als ODF (*osteoclast differentiating factor*) oder OPGL (*osteoprotegerin ligand*) beschrieben wird (Suda et al. 2001). Dieser RANK-Ligand bewirkt über eine Bindung an den RANK-Rezeptor auf Osteoklastenoberflächen die Aktivierung des knochenabbauenden Zustandes des Osteoklasten. Hierbei kommt es zur Ausbildung der sogenannten *ruffled border*, auch Faltenbesatz genannt, an der dem Knochen zugewandten Seite (Boron und Boulpaep 2005). Hier finden die Vorgänge der Knochenresorption und des Knochenumbaus statt (Lüllmann-Rauch 2009).

Dieser Vorgang beginnt mit dem Anlagern stimulierter Osteoklasten an die Knochenmatrix. Mittels Protonenpumpen wird an der *ruffled border* ein saures Milieu mit einem pH-Wert von ca. 4,5 erzeugt. Der Knochen wird lysiert und Kalzium und Phosphat freigesetzt. Zusätzlich werden in dieser Resorptionszone mit Hilfe von Proteasen die Proteine der Knochenmatrix hydrolysiert (Boron und Boulpaep 2005). Um die Umgebung der Resorptionszone vor einer unkontrollierten Lyse zu schützen, bildet sich bei Anlagerung des Osteoklasten eine sogenannte *clear zone* aus, welche einen engen Zellkontakt zwischen dem Osteoklasten und dem Knochen ausgebildet (Teti et al. 1991). Auf diese Weise wird die Resorptionszone der Umgebung gegenüber abdichtet und eine Destruktion angrenzender Strukturen vermieden (Lüllmann-Rauch 2009; Junqueira und Carneiro 2005).

1.1.7 Knochenmatrix

Die Knochenmatrix ist ein Verbund aus organischen und anorganischen Komponenten, die durch Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten, Hormone, Wachstumsfaktoren, Elektrolyte und mechanische Faktoren moduliert wird. Sie besteht aus einem mineralisierten und unmineralisierten Anteil.

Die unmineralisierte Komponente besteht zu 90 % aus Kollagen Typ I, welches sich in Kollagenfibrillen organisiert sowie aus Proteoglykanen, Sialoproteinen und Hydroxylapatitkristallen (Boron und Boulpaep 2005; Lüllmann-Rauch 2009).

Der mineralisierte Teil der Knochenmatrix schafft mit der Einheit der Knochenlamelle die Voraussetzung zur Entstehung von mineralisiertem und organisiertem Knochenaufbau. Hierbei lagern sich Hydroxylapatitkristalle entlang der Längsachsen der oben erwähnten Kollagenfibrillen an, wobei die Fibrillen der jeweiligen Lamelle annähernd parallel zueinander verlaufen (siehe Abbildung 2). Wurde eine Schicht auf diese Weise mineralisiert, beginnt der Anbau einer neuen Knochenlamelle auf die darunter liegende. Die neusynthetisierten Kollagenfibrillen verlaufen hier zwar erneut parallel zueinander, ihre Ausrichtung orientiert sich aber in gegensätzlicher Richtung zur Grundschicht (siehe Abbildung 2). Auf diese Weise stehen die Fibrillen benachbarter Lamellen ungefähr im rechten Winkel zueinander. Die Glykoproteine Osteokalzin und Sialoprotein fördern bei diesem Vorgang die Bindung von Kalzium und sind eine wichtige Komponente bei der Entstehung von Knochen.

Durch die oben genannte Bauweise entsteht ein Verbund aus zugfestem Kollagen und druckfesten Bestandteilen (Hydroxylapatitkristallen), was die Ursache für die sogenannte Biegefestigkeit des Lamellenknochens ist (Lüllmann-Rauch 2009; Junqueira und Carneiro 2005).

1.2 Steuerung des Knochenumbaus

Der Knochen unterliegt permanenten Auf- und Abbauprozessen (*bone remodeling*) und ist als dynamisches Organ zu betrachten (Manolagas 2000). Dieser Knochenumbau dient dazu

Materialermüdung vorzubeugen, kleine Schäden auszubessern und sich äußeren mechanischen Ansprüchen anzupassen. Ebenso dient er der schnellen Bereitstellung von Kalzium im Elektrolythaushalt (Lüllmann-Rauch 2009).

Das *bone remodeling* hängt also von vielen inneren und äußeren Faktoren ab, welche das Zusammenspiel von Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten beeinflussen (Boron und Boulpaep 2005)

Gesteuert durch Elektrolythaushalt, Hormone, Vitamine, Zytokine und mechanische Beanspruchung des Organismus (Schmidt et al. 2010; Junqueira und Carneiro 2005) werden im Skelett eines Erwachsenen jährlich ca. 25 % an spongösem und ca. 3 % an kortikalem Knochen umgebaut (Spinas et al. 2011).

1.2.1 Exogene Einflüsse

Zu den exogenen Einflüssen zählen unter anderem Ernährungsfaktoren. So sind Kalzium und eine ausreichende Proteinzufuhr während der Wachstumsphase von großer Wichtigkeit für den Aufbau der Knochenmasse. Ein Kalziumdefizit würde die Ossifikation der Knochenmatrix und somit die *peak bone mass*, die maximale Knochenmasse nach Abschluss des Skelettwachstums (Bonjour et al. 1994), negativ beeinflussen. Ein Mangel an Proteinen kann die Kollagensynthese herabsetzen (Junqueira und Carneiro 2005).

Auch die mechanische Belastung des Skeletts ist ein wichtiger exogener Faktor für die Strukturierung des Knochens. Bei längerer Immobilisation wird ein Rückgang von Knochenmasse im Sinne der sogenannten Inaktivitätsosteopenie beobachtet, während das Gegenteil bei sportlicher Aktivität der Fall ist (Junqueira und Carneiro 2005).

1.2.2 Elektrolyte und Hormonkopplung

Die Umbauprozesse des Knochens werden über Regelkreisläufe und Kopplungen zwischen Hormonen und Elektrolythaushalt reguliert.

Der Kalziumspiegel beeinflusst hierbei die Ausschüttung von PTH. Bei niedrigem Blutspiegel verursacht dieser eine Steigerung der PTH-Ausschüttung und löst über Rezeptoren an Osteoblasten eine Freisetzung von M-CSF (*monocyte colony stimulating factor*) und RANKL aus, was wiederum eine Stimulation von Osteoklasten zur Folge hat. Gleichzeitig wird über eine OPG-Ausschüttung eine überschießende Osteoklastenaktivierung verhindert (siehe jeweils Abbildung 4).

Da 99 % des im menschlichen Körper enthaltenen Kalziums im Knochen gebunden ist (Silbernagl und Despopoulos 2003), ermöglicht der oben genannte Mechanismus eine schnelle Bereitstellung dieses Elektrolytes im Falle eines Kalziummangels.

Ein weiterer Elektrolyt, der die Knochenbeschaffenheit beeinflusst, ist Phosphat, welches vor allem gebunden als Kalziumphosphat in der Knochensubstanz vorliegt (Silbernagl und Despopoulos 2003). Es macht ca. 1 % des Körpergewichtes eines Menschen aus und ist zu 85% im Knochen und den Zähnen gebunden. Mangel dieses Elektrolytes in der Wachstums- und Erwachsenenphase kann mit dem Erkrankungsbild der Osteomalazie einhergehen. Ebenso wie Kalzium kann es bei Mangelzuständen über einen PTH-induzierten Knochenabbau aus der gebundenen Knochenmatrix mobilisiert werden (Penido und Alon 2012).

Als weiteres wichtiges Hormon im Knochenstoffwechsel ist Kalzitriol zu nennen (Silbernagl und Despopoulos 2003). Es fördert eine vermehrte intestinale Kalziumaufnahme und wird bei erhöhten PTH-Spiegeln vermehrt freigesetzt. Kalzitriol nimmt ebenfalls Einfluss auf die Ausschüttung von M-CSF und RANKL aus den Osteoblasten und steigert dadurch wie PTH die Osteoklastenproliferation (Saito et al. 2013, siehe Abbildung 4).

Ein weiteres an den Elektrolythaushalt gekoppeltes Hormon stellt Kalzitinin dar. Dieses hemmt die Aktivität und die Entwicklung von Osteoklasten und induziert deren Apoptose (Manolagas 2000), siehe Abbildung 4. Seine Ausschüttung ist abhängig von hohen Serumkalziumkonzentrationen und bewirkt gegenläufig zu PTH und Kalzitriol eine vermehrte Aufnahme von Kalzium in die Knochensubstanz (Silbernagl und Despopoulos 2003).

Auch Östrogen ist ein wichtiges modulatorisches Hormon, welches eine knochenprotektive Wirkung zeigt (Riggs 2000; Manolagas 2000). Auf seine Wirkweise sowie die katabolen (Gao et al. 2008) und anabolen Eigenschaften von PTH (Jilka 2007) wird nachfolgend genauer eingegangen (siehe 1.2.2.1 und 1.2.2.2).

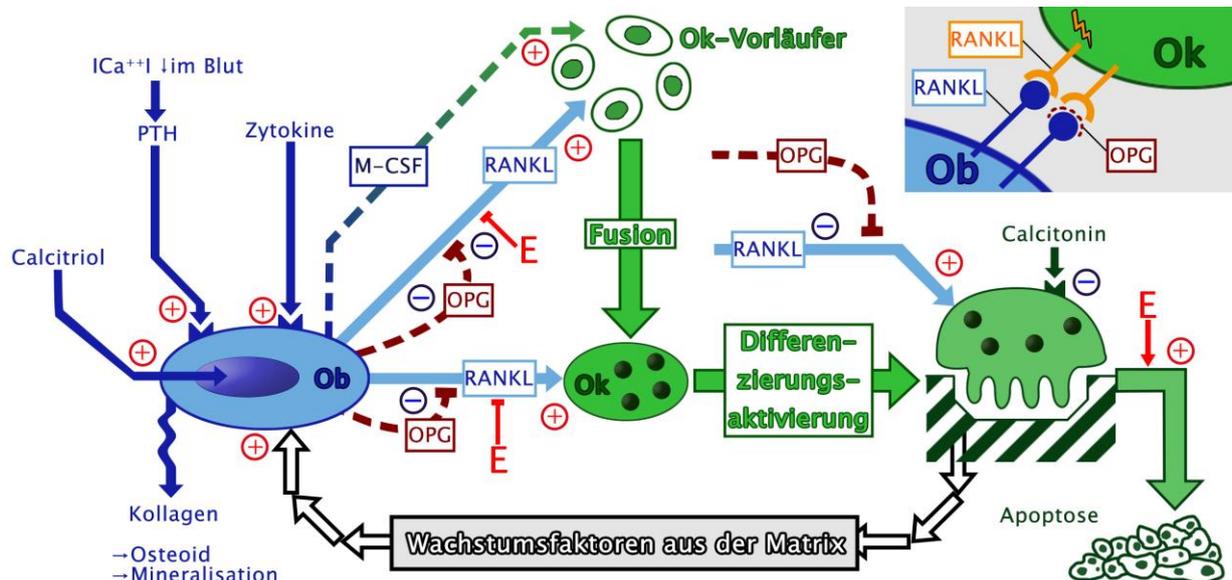


Abbildung 4: Koordination von Osteoklasten (Ok) und Osteoblasten (Ob) während des physiologischen Knochenbaus. + steht für stimulierenden Einfluss und – für den hemmenden Einfluss einer Zelle beziehungsweise einer Substanz. Osteoblasten schütten den *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) und Osteoprotegerin (OPG) aus. *Receptor activator of NF- κ B* (RANK) befindet sich auf der Oberfläche von Osteoklasten und stellt den Rezeptor für den RANK-Liganden (RANKL) dar, welcher ein membranständiges Molekül von Osteoblasten ist. Parathormon (PTH) nimmt über den Osteoblasten stimulierenden und hemmenden Einfluss auf den Osteoklasten. Estrogen (E) bewirkt an mehreren Ansatzpunkten eine Osteoklastenhemmung und Apoptoseinduktion. Kalzitinin (Calcitonin) hemmt Osteoklasten.

Oben rechts: Darstellung der Interaktion zwischen Osteoklasten (Ok) und Osteoblasten (Ob). Bei Osteoprotegerin (OPG) handelt es sich um einen löslichen Rezeptor, der in der Lage ist, an den RANK-Liganden (RANKL) des Osteoblasten zu binden und somit die Aktivierung des Osteoklasten über eine RANK-RANKL-Bindung zu verhindern. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von B.Andreae. Medizinischer Illustrator (Modifiziert nach Lüllman-Rauch 2009).

Abhängig von der Konzentration der oben genannten Faktoren wird das Gleichgewicht entweder in Richtung der Osteoklasten- oder Osteoblastenaktivität verschoben.

Befinden sich alle oben genannten Abläufe im Gleichgewicht, spricht man von physiologischem *bone remodeling*.

1.2.2.1 PTH im menschlichen Körper

Parathormon ist ein in den Nebenschilddrüsen produziertes Peptidhormon, das aus 84 Aminosäuren besteht. Seine Sekretion wird durch den Plasmaspiegel von Kalzium und Vitamin D₃ reguliert. Hierbei bewirken niedrige Blutspiegel eine positive Rückkopplung, also eine vermehrte Ausschüttung, während erhöhte Plasmaspiegel die PTH-Konzentration senken. Der durch PTH induzierte Regulationsmechanismus ist in der Lage binnen Sekunden auf einen Kalziummangel zu reagieren (Potts et al. 1980).

Die Wirkung von PTH wird durch rezeptorvermittelte Signalwege übertragen. Hierbei spielt der sogenannte PTH1-Rezeptor eine wichtige Rolle, welcher vor allem im Knochen und Nieren exprimiert wird (Gardella und Jüppner 2001). Neben diesem klassischen PTH1-Rezeptor für das N-terminale Ende von PTH existiert eine Gruppe von PTH-Rezeptoren (C-PTHRs) für das C-terminale Ende dieses Hormones. Diese zeigen eine deutliche Expression im Knochengewebe. Über diese scheint PTH einem Knochenabbau entgegenzuwirken. Gegenstand aktueller Forschung ist es, deren Einfluss auf den Kalziumstoffwechsel und Apoptoseinduktion von Osteozyten und Osteoklasten genauer zu untersuchen (Scillitani et al. 2011).

Die Steuerung des Kalziumspiegels wird durch die rezeptorvermittelte PTH-Wirkung auf Nieren und Knochen und über eine indirekte Beeinflussung der intestinalen Resorption bewirkt. Die indirekte Wirkung erreicht PTH durch die Anregung einer vermehrten Kalzitriolproduktion in den Nieren, welche wiederum zur vermehrten enteralen Kalziumabsorption beiträgt. Kalzitriol werden zudem PTH-ähnliche Eigenschaften wie Erhöhung der Kalziumreabsorption über die Nieren und Mobilisation von Kalzium aus dem Knochen zugesprochen (Lüllmann-Rauch 2009; Junqueira und Carneiro 2005).

Neben der Erhöhung von Kalzitriol ist die PTH-induzierte renale Reabsorption von Kalzium ein Effekt der erhöhten PTH-Ausschüttung. Bei diesem Vorgang verstärkt PTH die Reabsorption von Kalzium in der Niere, während es die Ausscheidung von Phosphat erhöht. Dieser Vorgang ist wichtig, da eine gleichzeitige Konzentrationserhöhung beider Mineralien eine Ausfällung von Kalziumphosphatkristallen im Plasma verursachen und zu Nierensteinen führen würde (Potts 2005).

Als weiteres wichtiges Zielgewebe von PTH ist der Knochen zu nennen. Hier äußert sich der physiologische PTH-Einfluss durch eine vermehrte Mobilisierung von Kalzium und Phosphat.

Dieser Prozess wird durch aktivierte Osteoklasten vermittelt. Da diese keinen eigenen Rezeptor für PTH besitzen, erfolgt ihre Stimulation indirekt über die Anregung von PTH-Rezeptor-tragenden Osteoblasten (Potts 2005).

Osteoblasten nehmen bei ihrer Stimulierung durch PTH auf zwei unterschiedlichen Wegen Einfluss auf die Aktivierung und Proliferation von Osteoklasten. So bewirkt PTH eine Freisetzung von M-CSF aus den Osteoblasten, welche die Differenzierung von Osteoklastenstammzellen anregt. Aus Vorläuferzellen entstehen auf diesem Weg die zur Knochenresorption fähigen multinukleären Osteoklasten.

Weiteres Glied der Aktivierungskette von Osteoklasten ist der RANK-Ligand. Dieser wird unter anderem durch eine Stimulation durch PTH aus Osteoblasten freigesetzt und nimmt über die Bindung an den RANK-Rezeptor aktivierenden Einfluss auf Osteoklasten (Boron und Boulpaep 2005; Schmidt et al. 2010).

Über die Freisetzung von OPG aus Osteoblasten nimmt PTH im physiologischen Gleichgewicht regulierenden, Osteoklasten-hemmenden Einfluss. Ebenso scheint PTH über sein C-terminales Ende und das Binden an den C-PTHr einem Knochenabbau entgegenzuwirken (Scillitani et al. 2011).

1.2.2.2 Wirkweise von Östrogen auf den Knochen

Östrogen wirkt protektiv auf den Knochen und hat bei normalem Östrogenspiegel die Eigenschaft, RANKL über OPG zu binden, bevor dieser über den RANK-Rezeptor Osteoklasten stimulieren kann (Kearns et al. 2008). Stellt sich ein Mangel an Östrogen ein, so scheint die Expressierung von RANKL hochreguliert zu werden und so über das RANK/RANKL-System eine vermehrte Osteoklastenaktivität zu bewirken (Eghbali-Fatourehchi et al. 2003). Da das Hormon Östrogen in seiner physiologischen Wirkweise eine Steigerung der OPG-Produktion bewirkt und ebenso für eine verminderte Sekretion des M-CSF verantwortlich zu sein scheint, wird hierdurch der vermehrte Knochenabbau bei Östrogenmangel erklärt (Riggs 2000).

Östrogen steuert den Knochenumbau auch durch Modulation verschiedener Zytokinkonzentrationen. So nimmt es durch die Herunterregulierung von TNF- α hemmenden

Einfluss auf die Osteoklastenausdifferenzierung. Über TGF- β findet eine Beeinflussung des OPG/RANKL/RANK-Systems statt und eine Einflussnahme auf die Osteoklastenaktivität und deren Apoptose (Riggs 2000).

Die Fähigkeit von Östrogen, diese proinflammatorischen Zytokine zu blockieren, die physiologischerweise die Osteoklastenzahl und deren Überlebensdauer steigern, stellt eine Ursache des postmenopausal gesteigerten Knochenabbaus dar (Lüllmann-Rauch 2003; Pacifici 1998; Junqueira und Carneiro 2005).

Es wurde gezeigt, dass Östrogenmangel eine überwiegende Stimulation der Osteoklastogenese zur Folge hat und eine Verlängerung der Überlebenszeit von Osteoklasten bei gleichzeitiger Überlebensverkürzung von Osteoblasten und Osteozyten bewirkt (Manolagas 2000).

1.3 Osteoporose - ein pathologischer Umbauprozess des Knochens

Die Osteoporose ist ein pathologischer Abbaumechanismus von Knochensubstanz, der eine Abnahme der Knochenstabilität und eine konsekutive Steigerung des Frakturrisikos zur Folge hat (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy 2001).

Diese Erkrankung des Skelettsystems tritt vor allem bei postmenopausalen Frauen durch ein Absinken des Östrogenspiegels auf (Kearns et al. 2008). Dies führt vor allem zu einer Abnahme der spongiösen Knochenbestandteile (Riggs et al. 1998). Aber auch Männer sind im höheren Lebensalter (75 Jahre) annähernd gleichermaßen von dieser Erkrankung betroffen, was auf den sinkenden Testosteronspiegel zurückgeführt wird (Kudlacek und Willvonseder 2003).

Die Erkrankung Osteoporose betraf im Jahr 2003 insgesamt ca. 7,8 Millionen Deutsche (Geburtsjahr 1950 oder früher), davon 6,5 Millionen Frauen (83 % der erkrankten Patienten). Von allen Betroffenen erlitten 4,3 % mindestens eine klinisch in Erscheinung getretene Fraktur. Die direkten Kosten für das Gesundheitssystem, die allein auf die Folgen von Osteoporose zurückzuführen waren, beliefen sich im beobachteten Zeitraum der Studie auf

5,4 Milliarden Euro. Zudem zeigte sich, dass postmenopausale Frauen um das Alter von 75 Jahren die größten Kosten verursachten und Frakturen hierbei die höchste finanzielle Belastung des Gesundheitssystems darstellten (Haeussler et al. 2007). Die häufigsten Frakturen stellen in diesem Zusammenhang Wirbelkörperfrakturen, hüftgelenksnahe Femurfrakturen sowie Radius- und Beckenfrakturen dar (Kudlacek und Willvonseder 2003). Die direkten und indirekten Folgekosten von Hüft- und Wirbelkörperfrakturen verursachten hierbei die größte Belastung des Gesundheitssystems (Lips und van Schoor 2005). So sind bei hüftgelenksnahen Frakturen lange stationäre Krankenhausaufenthalte, intensive poststationäre Betreuung und eine dreifach erhöhte Mortalität verglichen mit der gleichaltrigen Gesamtbevölkerung verbunden (Panula et al. 2011). Neben den körperlichen Folgen ist auch die psychische Belastung bei chronischen Krankheitsverläufen häufig ein therapiebedürftiges Begleitsymptom (Silverman 2005). Aufgrund des steigenden Alters der Bevölkerung und somit konsekutiv zunehmender Osteoporoseprävalenz in diesen Altersgruppen stellt die Osteoporose und ihre Komorbiditäten eine große Belastung des Gesundheitssystems dar (Raschke und Lang 2009). Für den Betroffenen bedeutet diese Erkrankung erhöhte Frakturnraten und eine deutliche Einschränkung der Lebensqualität durch chronische Schmerzen und folglich Mobilitätseinschränkung (Silvermann 2005; Haeussler et al. 2007).

1.4 Medikamentöse Therapie der Osteoporose

Die Therapie der Osteoporose besteht vor allem in einer medikamentösen Therapie bei der unterschiedliche Wirkstoffe zum Einsatz kommen, wobei eine Heilung dieser Erkrankung bislang nicht möglich ist.

Therapien mit antiresorptiven Substanzen wie Bisphosphonaten (z.B. Alendronat) und SERMs (z.B. Raloxifen) stellen hierbei die leitliniengerechte Standardtherapie dar. Über eine Herunterregulierung der Osteoklastenaktivität entfalten Bisphosphonate ihre antiosteoporotische Wirkung (Hodsman et al. 2005) und führen zu einer signifikanten Reduzierung der Frakturnraten (Black et al. 2000; Harris et al. 1999).

Ebenso bewirkt die Behandlung mit sogenannten SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators) wie Raloxifen eine verminderte Osteoklastenaktivität und zudem eine Reduktion Osteoklasten-aktivierender Zytokine (Hodsman et al. 2005; Ettinger et al. 1999).

Auch neuere Antiresorptiva wie der monoklonale Antikörper Desonumab gegen RANKL stehen mittlerweile zur Verfügung, sind aber lediglich als Reservemedikation der zweiten Wahl empfohlen (DVO-Leitlinie 2014). Wie bei anderen antiresorptiv wirksamen Therapeutika konnte unter Desonumab-Therapie eine Zunahme des *Bone Mass Index* (BMI) und eine Abnahme der Frakturaten gezeigt werden (Cummings et al. 2009; Boonen et al. 2011).

Ein weiteres, streng reglementiertes, antiresorptives Reservemedikament stellt Kalzitonin dar. Über eine intravenöse oder intramuskuläre Applikation kann es Frakturaten der Wirbelsäule bei Osteoporose in der Postmenopause signifikant heruntersetzen. Die ebenfalls wirksame, nasale Applikation (Chesnut et al. 2000; Hodsman et al. 2005) zeigte in einer Untersuchung der Langzeittherapie verglichen mit den anderen Applikationsformen ein deutlich erhöhtes Krebsrisiko und wird in Europa daher nicht mehr zur Osteoporosetherapie empfohlen. Lediglich bei Therapieversagen und speziellen klinischen Konstellationen ist eine Kalzitonintherapie intravenös oder intramuskulär noch zulässig (EMA 2012).

Als kombiniert antiresorptiv und anabol wirkende Substanz ist Strontiumranelat zur Therapie der schweren postmenopausalen und männlichen Osteoporose zugelassen (Meunier et al. 2009). Jedoch handelt sich es auch hierbei um ein Reservemedikament bei Therapieversagen unter SERMs oder Bisphosphonaten bzw. bei Kontraindikationen gegen die erwähnten Präparate (Reginster et al. 2010).

Als einziges osteoanabol wirkendes Medikament steht bei hoch frakturgefährdeten Patienten PTH zur Verfügung. Die antiosteoporotische Wirkung wird hierbei durch eine direkte Zunahme der Knochenmasse (Neer et al. 2001; Greenspan et al. 2007) erreicht. Diese Therapieoption ist in Europa seit 2003 für die subcutane Gabe von humanem PTH als fragmentiertes PTH 1-34 (Forsteo®) und in den USA seit 2005 zusätzlich als vollständiges PTH

1-84 (PreOs®) zugelassen. Eine Zulassung für das Analogprodukt von Preos®, das sogenannte Preotact®, wurde im Juli für den europäischen Markt 2014 revidiert, bevor es auf dem europäischen Markt angewendet werden konnte (EMA 2014). PTH stellt kein Therapeutikum der ersten Wahl dar und ist nach der DVO-Leitlinie als Reservetherapeutikum bei schwerer Osteoporose oder Therapieversagen bei herkömmlicher Therapie anzuwenden (DVO-Leitlinie 2014).

1.5 PTH

1.5.1 Geschichtlicher Hintergrund

Die Entdeckung des Hormons PTH und die Erforschung der Knochen-aufbauenden Wirkung blicken auf eine fast hundertjährige Geschichte zurück (Potts 2005).

Ende des 19. Jahrhunderts wurden die Nebenschilddrüsen als eigenständiges Organ entdeckt, wobei ihre Funktion noch unbekannt blieb. Die erste Spur zur Bedeutung der Drüsen fand sich, als tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, dass Hunde und Katzen an Tetanie verstarben, sobald ihnen die Nebenschilddrüsen entfernt wurde (Potts 2005). 1904 und 1906 belegte der Pathologe Jacob Erdheim den Zusammenhang zwischen Tetanie und fehlenden Nebenschilddrüsen. Nachdem dies ursächlich auf eine Hypokalzämie zurückgeführt werden konnte, war die maßgebliche Rolle der Nebenschilddrüsen am Kalziumstoffwechsel bewiesen (Potts 2005; MacCallum und Vogel 1913).

Im Jahr 1925 gelang es die endokrinologische Funktion der Nebenschilddrüse nach erfolgreicher Gewinnung von PTH zu belegen (Potts 2005).

In den darauffolgenden Jahren wurden bis 1950 die Auswirkungen von Über- und Untersekretion von PTH erforscht und die bis heute etablierten Ausdrücke Hyper- und Hypoparathyreoidismus etabliert.

Erste Hinweise auf das Potential einer paradoxen, knochenbauenden Wirkung von PTH ergaben sich, als eine Knochenmassenzunahme bei PTH-substituierten Ratten beobachtet werden konnte (Bauer et al. 1929), wobei erst in den 1970er Jahren die Hormonstruktur entschlüsselt und seine künstliche Herstellung möglich wurde.

Anhand vieler tierexperimenteller Studien wurden diese Ergebnisse reproduziert und eine Zunahme der Knochensubstanz an kleinen Säugetieren, z.B. Ratten und Kaninchen, unter PTH-Therapie belegt.

So wurde am osteopenen Ratten- und Kaninchenmodell in vielen Arbeiten (Banu und Kalu 2002; Fox et al. 2006; Sehmisch et al. 2009b; Aleksyniene et al. 2009) unter einer PTH-Therapie eine Zunahme der BMD (*bone mineral density*) verzeichnet. Diese dient als medizinische Einheit für das mineralisierte (verknöcherte) Gewebe pro cm² und wird zur Beurteilung der Knochentextur und somit als Messparameter der Wirksamkeit einer PTH-Therapie herangezogen.

Auch in Untersuchungen an größeren Säugetieren wie zum Beispiel an Affen (Fox et al. 2008) und anhand von Patientenstudien in England und den USA wurde eine Zunahme der BMD unter PTH-Therapie (Greenspan et al. 2007) verzeichnet.

In vielen Jahren der klinischen Forschung konnte der knochenaufbauende Effekt von PTH bei intermittierender Gabe somit nachgewiesen werden (Harada und Rodan 2003; Rodan und Martin 2000; Potts 2005). Im Jahr 2001 gelang es, den positiven Effekt von PTH in der klinischen Anwendung zu etablieren und seine anabole Wirkung auf den Knochen therapeutisch zu nutzen (Potts 2005).

1.5.2 Therapeutische Anwendung

PTH stellt das erste anabol wirkende Medikament in der Osteoporosetherapie dar. Es zeichnet sich dadurch aus, dass es in der Lage ist bereits verlorengegangene Knochenmasse zu erneuern und somit Frakturraten signifikant zu senken (Neer et al. 2001; Harada und Rodan 2003; Rodan und Martin 2000).

Die therapeutischen Eigenschaften von PTH sind an eine intermittierende Gabe gekoppelt (Neer et al. 2001; Reeve et al. 1980). Bereits einer PTH-Gabe, die eine Dauer von zwei Stunden täglich überschreitet, kann eine zunehmend knochenabbauende Wirkung dieses Hormons zur Folge haben (Dobnig und Turner 1997; Potts 2005).

Die Behandlung mit Teriparatid (1-34) und PTH (1-84) findet heute eine maximale Anwendung von 18 bis 24 Monaten, wobei sich in Studien sowohl die tägliche subkutane

Applikation als auch die wöchentliche Anwendung im Vergleich mit der Placebogruppe als wirksam erwies (www.uptodate.com 2011 und 2014). Da bis jetzt nur Studien für eine maximale Behandlungsdauer von ca. zwei Jahren vorliegen, werden derzeit längere Therapien nicht empfohlen (Hodsman et al. 2005).

In Europa ist das Aminosäure-Fragment Teriparatid 1-34 (Handelsname Forsteo®) und in Amerika Parathormon 1-84 (Handelsname PreOs®) zur Monotherapie schwerer Osteoporose zugelassen (www.uptodate.com 2011 und 2014). Die detaillierten Abläufe der knochenaufbauenden Wirkung von PTH konnten bei erwiesenen positiven Effekten bis heute noch nicht endgültig geklärt werden. Vermutungen zufolge ist die direkte Stimulation von Osteoblasten über deren PTH-Rezeptor für eine erhöhte Überlebenszeit dieser Zellgruppe verantwortlich, was wiederum den PTH-induzierten Prozess des Knochenerhaltes und -aufbaues vermittelt. Es wird zudem angenommen, dass diese rezeptorvermittelte Wirkung auf Osteoblasten schneller eintritt als die Aktivierung der Osteoklasten. Diese ist von stimulierten Osteoblasten abhängig und somit in der logischen zeitlichen Reihenfolge einer Osteoblastenstimulation durch PTH nachgeschaltet. Dieser physiologische Aktivierungsweg könnte somit zur Folge haben, dass bei therapeutisch intermittierender PTH-Gabe die Anregung von Osteoblasten erfolgt, während die Stimulierung der Osteoklasten gerade noch nicht stattgefunden hat (Potts 2005).

1.6 Versuchstier ovariektomierte Ratte

Die Ratte stellt ein viel eingesetztes Tierversuchsobjekt dar (Lelovas et al. 2008). Im speziellen ist das Modell der ovariektomierten Ratte für Untersuchungen des osteopenen Knochens geeignet.

Genauere Zeitpläne hinsichtlich der Entwicklung einer Osteoporose, die der postmenopausalen Osteoporose des Menschen ähnelt, ermöglichen präzises und erfolgreiches Arbeiten mit diesem Versuchstier und versprechen zumeist gut einschätzbare Ergebnisse (Lelovas et al. 2008; Turner et al. 1989). Zuverlässige Protokolle zur Induktion und Einsatz von Osteopenie bei ovariektomierten Ratten (Lelovas et al. 2008; Wronski et al. 1989) sind folglich ein Grund für die Anwendung dieses Tierversuchsmodells.

Detailliertes Wissen über die Eigenschaften des Rattenskeletts und bewährte Methoden gleichen die inkomplette Übereinstimmung zwischen menschlichem Skelett und dem der Ratte aus.

Die Ähnlichkeit mit der das Rattenskelett und das Menschenskelett auf verschiedene Manipulationen durch Östrogen, Tamoxifen, Bisphosphonate und PTH reagieren, qualifiziert die Ratte für endokrinologische Untersuchungen (Kalu 1991).

So empfehlen die FDA-Guidelines Osteoporosestudien zuerst anhand des Rattenmodells durchzuführen. Erst anschließend ist die Untersuchung an größeren Tieren empfohlen (Thompson et al. 1995).

1.7 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll die Wirkung von Teriparatid (PTH (1-34)) auf den Knochen der Wirbelkörper von osteopenen, ovariectomierten Ratten untersucht werden.

Zur Darstellung des Einflusses von PTH auf die Beschaffenheit und mechanische Belastbarkeit des Knochens werden PTH-substituierte Tiere mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Ebenso erfolgt eine Kontrolle der erfolgreich induzierten Osteopenie mittels einer nicht ovariectomierten Vergleichsgruppe.

Zur Feststellung möglicher signifikanter Behandlungserfolge werden die Wirbelkörper auf mechanische Belastbarkeit, mikroradiographisch sichtbare Unterschiede und Differenzen in der mineralisierten Knochendichte der Wirbelkörper untersucht

Des Weiteren sollen mit Hilfe verschiedener Spritzintervalle unterschiedliche Applikationszeitpunkte- und Dauern hinsichtlich der Wirksamkeit von PTH untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Es wurde mit 81 weiblichen Tieren des Rattenstammes Sprague Dawley der Firma Winkelmann gearbeitet, deren Anfangsgewicht bei Lieferung im Mittel 250 g betrug. Aufgrund der Narkosebegleitung der chirurgischen Eingriffe verstarben neun von den anfangs 90 Tieren. Zu Beginn wurden die 12 Wochen alten Versuchstiere in Gruppen von drei bis vier Tieren pro Käfig (Typ Makrolon® aufgeteilt). Zur Akklimatisierung verbrachten die Tiere 5-6 Tage vor Ovariectomie ohne Durchführung von Versuchen. Gefüttert wurde ab diesem Zeitpunkt sojafreies Futter (ssniff SM R/M, 10mm Pelletts, ssniff Spezialitäten GmbH, Soest), wobei ihnen Futter und Wasser zur freien Verfügung stand. Der Futterverbrauch wurde während des Versuchs protokolliert und in einem Intervall von 3 Tagen für einen regelmäßigen Käfig-, Trinkflaschen- und Streuwechsel gesorgt. Das Raumklima in dem die Versuchstiere gehalten wurden, betrug bei einer Luftfeuchtigkeit von 55 % konstante 20°C. Mit Hilfe einer zwölfstündigen Hell-/ Dunkel- Periodik wurde zusätzlich auf den zirkadianen Rhythmus der Ratten Rücksicht genommen. Um den Gesundheitszustand und den Erfolg der Ovariectomie zu verfolgen, wurden die Ratten einmal wöchentlich am selben Wochentag gewogen. Ebenso wurde einmal wöchentlich das Gewicht des Restfutters bestimmt. Für die Versuchsdurchführung im Rahmen des Osteopeniemodells bei weiblichen Ratten lag eine Genehmigung durch das Bezirksgericht Braunschweig vor (AZ 33.42 502-04-011/07).

2.2 Ovariectomie

Grundvoraussetzung für die Versuchsdurchführung war die Induktion von Osteopenie bei den Versuchstieren. Dieser Zustand wurde künstlich durch Ovariectomie bei 62 Versuchstieren herbeigeführt. Der Eingriff erfolgte am 5. bis 6. Tag nach Lieferung. Zur Einleitung der Narkose diente CO₂, während die Aufrechterhaltung anschließend durch eine intraperitoneale Injektion eines 5:3 Gemisches aus Ketamin (90 mg/ kg KG) und

Xylazin (7,5 mg/ kg KG) erfolgte. Die Dosierung des Gemisches entsprach hierbei einer Menge von 0,001 ml/g KG, also im Mittel 0,35 ml pro Tier je Narkose. Nachdem die Ratten zwischen Rippenbogen und Hinterläufen rasiert und desinfiziert wurden, begann der Eingriff mit einer Hautinzision und der Präparation des Peritoneums. Bei der anschließenden Eröffnung der Bauchhöhle wurden die Ovarien nacheinander auf beiden Seiten freigelegt, durch Ligaturen von den Tuben getrennt, abgesetzt und anschließend entfernt. Der Wundverschluss erfolgte schichtweise mittels Vicryl-Naht der Muskeln und Klammernaht der Haut. Um einem Flüssigkeitsverlust durch die Operation vorzubeugen, wurde jedem Versuchstier ein NaCl-Depot von 3 ml subkutan gespritzt. Bis zum Abklingen der Narkose wurden die Ratten beaufsichtigt und um ein Absinken der Körpertemperatur zu vermeiden wurden die postoperativen Tiere in Käfige auf Wärmeplatten (39°C) gelegt. Für die Kontrollgruppe schloss man einige Tiere von der Ovariectomie aus und führte sie zunächst unter dem gemeinsamen Namen SHAM weiter. Bei diesen Tieren wurde ebenso eine Narkose durchgeführt, jedoch ohne anschließende Operation. Die Narkose wurde bei allen Versuchstieren dazu genutzt, um subkutane Transponder im Nackenbereich zu implantieren. Somit wurde die sichere Identifikation der Tiere während des Versuchs gewährleistet. An diesen Eingriff schloss sich eine achtwöchige versuchsfreie Phase an, in der sich osteopore Knochen entwickelten.

Im Rahmen des Versuchs wurden alle Ratten einer Osteotomie beider Tibiae und anschließender Osteosynthese unterzogen. Beide Eingriffe erfolgten innerhalb einer Operationssitzung in der 8. Woche nach Ovariectomie am bereits osteoporotischen Knochen. Diese Ergebnisse wurden in vorliegender Arbeit nicht untersucht, sondern waren Gegenstand anderer Doktorarbeiten, welche durch Komrakova et. al (2010) veröffentlicht wurden.

2.3 PTH-Substitution

Nach der Osteotomie wurden die Ratten in 7 Vergleichsgruppen zu jeweils 10 bis 13 Tieren aufgeteilt. Den Tieren wurde in den folgenden Wochen, unter Ausnahme einer Gruppe der

SHAM- Ratten und einer OVX- Gruppe, in unterschiedlichem Intervall Parathormon (PTH) in Form von Teriparatid (PTH (1-34)) subkutan gespritzt. Die PTH-Dosierung betrug hierbei 0,014 mg PTH/ 0,2 ml NaCl pro Tier pro Injektion bzw. 40 µg/ kg KG. Die entspricht einem Vielfachen der klinisch angewandten Dosierung bei Menschen für Teriparatid, welche zwischen 20 µg und 40 µg beträgt (Komrakova et al. 2010). Hierzu wurden die Versuchstiere vor Beginn der Hormonsubstitution in verschiedene Gruppen aufgeteilt. Der Beginn der PTH-Anwendung erfolgte frühestens am 7. Tag nach Osteotomie bis längstens zum 35. Tag nach Osteotomie. Die Gruppen waren aufgeteilt in SHAM-Tiere ohne Ovariectomie und ovariectomierte OVX-Tiere. Die Behandlung erfolgte ausschließlich mit PTH, wobei die jeweiligen Kontrolltiere keine Medikation erhielten. Die Darreichung erfolgte in den jeweiligen Gruppen im Intervall vom 7.-35. Tag (7.-35. d), 14.-35. Tag (14.-35. d) und 14.-28. Tag (14.-28. d). Bei der Häufigkeit der Darreichung wurden die Intervalle fünfmal pro Woche (5 x/w), qod (jeder 2. Tag) und nicht stattfindende Darreichung gewählt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Dosierungsschema der PTH-Substitution in Tagen nach Osteotomie

	Gruppe	Medikation	Häufigkeit der Darreichung	Dauer der Darreichung	Anzahl der Versuchstiere
1	SHAM	Keine	-	-	10
2	SHAM	PTH	5 x/w	7. - 35. d	11
3	OVX	Keine	-	-	12
4	OVX	PTH	5 x/w	7. - 35. d	13
5	OVX	PTH	qod	7. - 35. d	12
6	OVX	PTH	5 x/w	14. - 35. d	12
7	OVX	PTH	5 x/w	14. - 28. d	11

2.4 Gewinnung der Präparate

Die Tiere wurden in der 14. Woche nach Ovariectomie unter CO₂-Narkose durch Dekapitation getötet. Im Anschluss wurden beide Femora, Tibiae und Blutproben

entnommen, die zum Teil in anderen Studien und Doktorarbeiten untersucht wurden (siehe auch Komrakova et al. 2009 und Tezval et al. 2011). Für die Präparation der Lendenwirbelsäule (LWK 1 - LWK 6) wurde zunächst mit einem Skalpell über den *Processus spinosi* ein Hautschnitt gesetzt und im nächsten Schritt die Sehnenansätze und Muskelfasern der Wirbelkörper entfernt. Um die Lendenwirbelsäule unbeschadet aus dem Skelett herauslösen zu können, wurde die Wirbelsäule proximal auf Höhe des Rippenbogens abgesetzt, wobei darauf zu achten war, dass die letzte Rippe für die spätere Orientierung erkennbar blieb. Distal wurde der Beckenknochen oberhalb des Hüftgelenks durchtrennt. Zudem wurde der Schwanz der Ratte auf Höhe der Sakralwirbel entfernt (siehe Abbildung 5). Der nächste Schritt umfasste die möglichst gründliche Entfernung aller Muskel- und Sehnenansätze. Die so gewonnenen Rattenwirbelkörper wurden anschließend nummeriert und bei einer Temperatur von -20°C aufbewahrt.

Bevor die einzelnen Wirbel im Anschluss präpariert werden konnten, wurden die Lendenwirbelsäulen als Ganzes in einem Computertomographen für experimentelle Zwecke der Universitätsklinik gescannt. Die Ergebnisse der CT-Untersuchung sind Gegenstand anderer Arbeiten.

Im nächsten Schritt erfolgte nun die Ablösung der einzelnen Lendenwirbelkörper aus der Wirbelsäule. Hierzu diente ein Skalpell und scharfe Löffel in verschiedenen Größen. Als erstes wurden durch manuelles Auszählen die Wirbelkörper 1, 3 und 4 ermittelt, da es sich hierbei um die festgelegten Versuchsobjekte handelte. Bei diesem Vorgang konnte man sich am letzten Rippenansatz und an den Sakralwirbeln orientieren. Die Wirbelkörper wurden im Anschluss mit dem Skalpell voneinander gelöst. Sehnen- und Muskelansätze wurden möglichst gründlich mit Hilfe scharfer Löffel entfernt. Nach diesem Vorgang wurden die einzelnen LWK nummeriert und bis zum Beginn der jeweiligen Versuchsreihen einzeln in 5ml Schraubverschlussröhrchen bei -20°C gelagert.

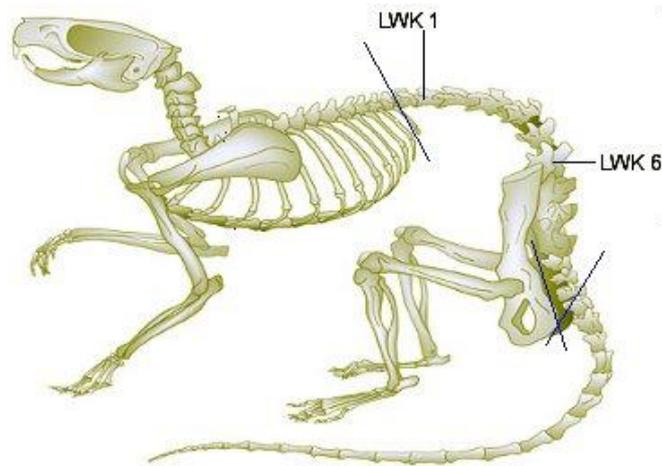


Abbildung 5: Lendenwirbelsäule LWK 1 bis LWK 6 und Absetzungsråder während der Präparation (blaue Linien). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Samantha Elmhurst, *equine and medical illustrator and designer*; modifiziert nach www.livingart.org.uk (2011).

2.5 Versuchsdurchführung mit LWK 3

2.5.1 Volumenbestimmung

Mit Hilfe einer Schieblehre wurde manuell die Höhe der Lendenwirbel bestimmt und der Durchmesser der Deck- und Bodenplatten gemessen. Aus den Werten der Deck- und Bodenplatten wurde jeweils der Mittelwert bestimmt. Die so ermittelten Werte dienten der Volumenberechnung anhand der mathematischen Formel für Zylindervolumina:

$$V [\text{mm}^3] = \pi r^2 [\text{mm}^2] \times h [\text{mm}]$$

V= Volumen; r = Radius; h = Höhe

Die einzelnen Volumina wurden zur Bestimmung der mineralisierten Knochendichte weiterverwendet, geben aber keine Auskunft über den exakten Volumenwert der Wirbelkörper, sondern entsprechen Näherungswerten der Volumina.

2.5.2 Veraschung

Die Veraschung fand im Anschluss der Volumenermittlung im Institut für allgemeine Hygiene und Umweltmedizin der Universität Göttingen (Prof. Dr. med. Dunkelberg) statt. Hierbei wurden maximal 9 Wirbelkörper gleichzeitig in einem Muffelofen in feuerfesten Porzellantiegeln bei 750°C über 48 Stunden verascht und anschließend in einem mit Silikatgel gefüllten Exsikkator platziert. So konnte während der Abkühlphase die Bildung von Kondenswasser verhindert werden, was für die anschließende Gewichtsermittlung von Bedeutung war. Die Bestimmung des Gewichts erfolgte vor und nach der Veraschung. Hierzu wurden die Werte bis auf vier Stellen nach dem Komma bestimmt. Die Erfassung des Gewichtes vor Veraschung erfolgte, indem zuerst das Leergewicht des Porzellantiegels ermittelt und dies als Einwaage (Tara) bestimmt wurde. Anschließend wurde der LWK in den Tiegel gelegt, gewogen und dessen eigentliches Gesamtgewicht bestimmt. Das Gewicht nach Veraschung wurde bestimmt indem der Tiegelinhalt direkt auf die Waage gegeben und gewogen wurde. Hierbei wurde vor dem Wiegen eines jeden neuen Wirbels das Tara - Gewicht bestimmt, um das Aufaddieren kleiner Konkremete auf der Wiegefläche zu verhindern.

2.5.3 Bestimmung der mineralisierten Knochendichte

Aufbauend auf dem Versuchsabschnitt der Veraschung wurde die mineralisierte Knochendichte pro Wirbelkörper bestimmt. Hierzu diente das zuvor errechnete Volumen der LWK und deren Gewicht nach erfolgter Veraschung. Da es sich bei der mineralisierten Knochendichte per definitionem um die Masse pro Volumen handelt, wurden die Werte mittels folgender Formel ermittelt:

$$\text{Mineralisierte Knochendichte [g/mm}^3\text{]} = m \text{ nach Veraschung [g]} \div V \text{ [mm}^3\text{]}$$

m= Masse; V = Volumen

2.5.4 Bestimmung des Anteils organischer und anorganischer Knochensubstanz

Zur Ermittlung der organischen und anorganischen Masse (m) in Prozent (%) an der Knochenmasse der Wirbelkörper dienten folgende Formeln:

1. % (organische Substanz) = $\left[(m \text{ vor Veraschung} - m \text{ nach Veraschung}) \right] \times 100 / m \text{ vor Veraschung}$
2. % (anorganische Substanz) = $100 - \% \text{ (organische Substanz)}$

2.6 Biomechanischer Test des LWK 4

Um die nötige Bruchkraft bis zum Deckplatteneinbruch der Wirbelkörper zu messen, wurde eine dafür ausgerichtete Apparatur verwendet. Diese Methode wurde eigens für Versuche an Rattenwirbelkörpern in einer vorangegangenen Doktorarbeit entwickelt (Erren 2008) und in weiteren nachgeschalteten Versuchsreihen erprobt (Sehmisch et al. 2009b). Sie besteht aus einer Basis, in der der zu untersuchende LWK eingespannt wird (siehe Abbildung 6 bis 8). Somit kann ein dorsales, wie ventrales Verrutschen während der axialen Kompression verhindert werden, ohne dass der Knochen selbst eine Stabilisierung erfährt. Auch die laterale Mobilität wurde durch das Einspannen des Dornfortsatzes unterbunden. Vor der Testung der eigentlich zu untersuchenden Wirbel wurde anhand übriggebliebener Wirbelkörper aus vorangegangenen Versuchen der Umgang mit der Vorrichtung einige Male erprobt, um technische Fehler bei den Versuchspräparaten zu vermeiden.

Nach dem Einspannen des LWK fuhr ein dafür speziell angepasster Stempel auf die Bodenplatte herab, bis er diese berührte und eine Vorkraft von 1 N erreichte. Dies repräsentierte die Startposition des Bruchtestes, wobei zu diesem Zeitpunkt noch Korrekturen an der Positionierung des Wirbelkörpers und Stempels möglich waren. Nach dieser Kontrolle konnte der Test gestartet werden. Im Folgenden komprimierte die Zwick-Testmaschine den Wirbelkörper mit gleichbleibender Geschwindigkeit von 50 mm/min. Hierbei wurde alle 0,1 mm, die der Stempel den *corpus vertebrae* stauchte, die dafür benötigte Kraft bestimmt und anhand der "testXpert"-Software auf den Computer

übertragen. Die so gewonnenen Messparameter konnten anschließend in Kraft-/ Weg-Diagrammen veranschaulicht werden (siehe Abbildung 9).



Abbildung 6: Basisvorrichtung

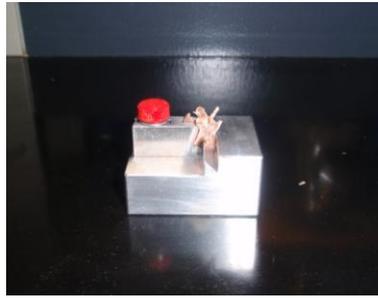


Abbildung 7: Basisvorrichtung mit eingespanntem LWK

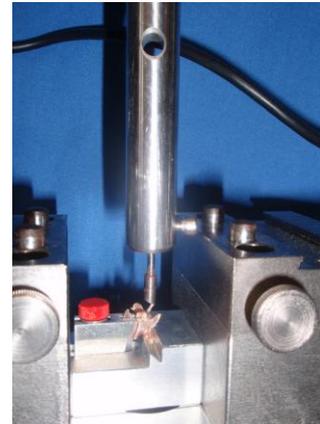


Abbildung 8: Zwick-Testmaschine vor dem Kompressionsvorgang

2.6.1 Messparameter des biomechanischen Bruchtests

2.6.1.1 Yield Load

Der *Yield Load* bezeichnet den Zeitpunkt, an dem sich das Knochenmaterial nicht mehr nur elastisch, sondern auch plastisch zu verformen beginnt (Stürmer et al. 2006). Graphisch lässt sich dieses Ereignis darstellen, indem man die Steigung im Kraft-/ Weg-Diagramm bis zum Verlust ihrer Linearität verfolgt. Der Punkt, an dem also die Werte der Steigung abzunehmen beginnen, wird als *Yield Load* bezeichnet (Abbildung 9). Dessen Bestimmung erfolgt dadurch, dass aus den Daten der noch ansteigenden Kurve die Regressionsgerade und die Standardabweichung der Punkte im Vergleich zum linearen Teil der Bruchkurve berechnet werden. So wird der *Yield Load* in der Arbeit von Stürmer et al. (2006) als Punkt definiert, an dem die Kurve den Bereich der doppelten Standardabweichung der Regressionsgeraden überschreitet.

2.6.1.2 Steigung

Zu Beginn des Kompressionsversuchs lässt sich dieser Messparameter anhand einer linearen Steigung im Graphen darstellen (Abbildung 9). Er repräsentiert die gleichbleibende elastische Verformung des LWK vor Beginn der plastischen Kompression (Stürmer et al. 2006).

2.6.1.3 Maximalkraft

Die Maximalkraft entspricht der größten Kraft, der die Deckplatte des Wirbelkörpers während des Kompressionstests noch standhalten kann, also dem höchsten Punkt des Graphen (Stürmer et al. 2006).

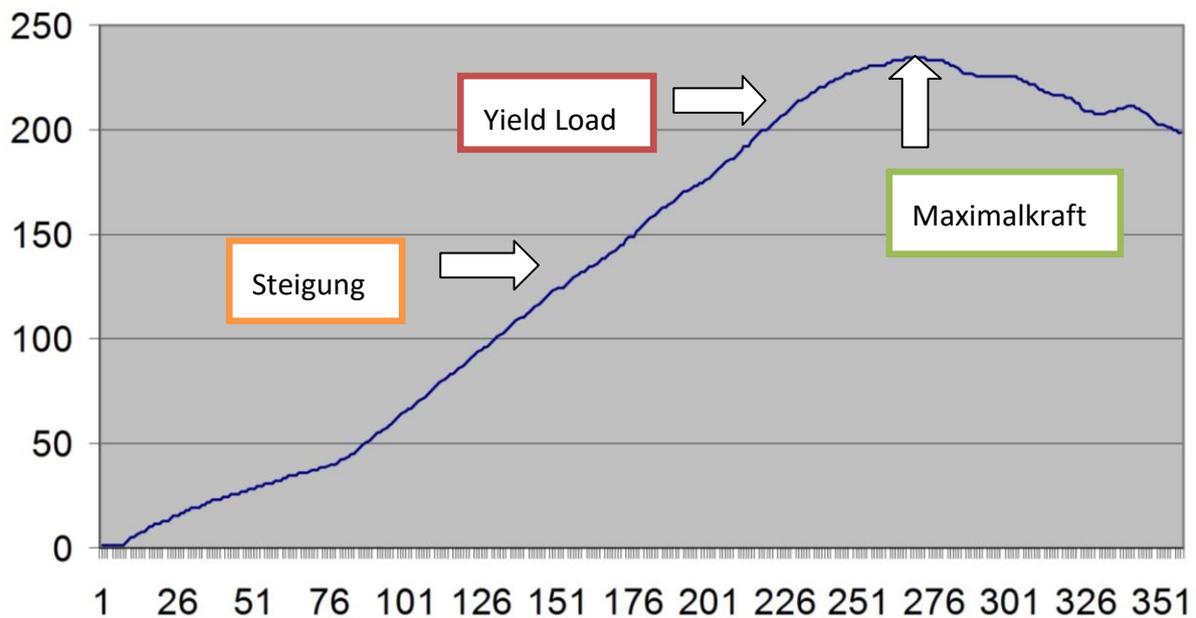


Abbildung 9: Darstellung des Kraft-/ Weg-Diagrammes eines Bruchversuchs, x-Achse Weg in μm / y- Achse Kraft in N

2.7 Mikroradiographie des LWK 1

2.7.1 Vorbereitung der Wirbelkörper

Die LWK 1 wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und entfettet. Dies erfolgte, indem die Wirbel zweimal drei Tage in 40- prozentigem, zweimal sechs Tage in 70- prozentigem, sechs Tage in 80- prozentigem und zwei Tage in 96- prozentigem Ethanol lagerten. Danach wurden sie für zwei Tage in ein 1:1 Gemisch bestehend aus 96-prozentigem Ethanol und Methylmethacrylat gelegt und darauf folgend für weitere zwei Tage in reinem Methylmethacrylat aufbewahrt. Im Anschluss erfolgte die Einbettung der einzelnen Wirbel in einem Gemisch aus insgesamt 1000 ml Methylmethacrylat, 200 ml Dibutylphthalat und 29 g Benzoylperoxid. Zur Aushärtung benötigten die so hergestellten Kunststoffblöcke drei bis vier Wochen.

Der anschließende Arbeitsschritt umfasste das Sägen und Röntgen der gewonnenen Präparate. Hierzu wurden mit einer speziellen Innenlochsäge (Leica SP 1600 Diamantsäge, Leica Instruments GmbH, Nussloch) pro Wirbelkörper neun bis zehn 150 μm (+/-20 μm) dicke Sagittalschnitte erzeugt und die mittleren vier Schnitte mit einem Faxitron Röntgengerät (Hewlett Packard San Diego, USA, Model- Nummer 43855°) auf langsamen Industriefilm (Kodak SR Typ 45) geröntgt. Die Röhrenspannung belief sich auf 10 kV und die Stromstärke auf 0,3 mA bei einer Belichtungszeit von drei Minuten. Abschließend wurden die Röntgenfilme fixiert und getrocknet.

2.7.2 Erstellen des Digitalisates der Mikroradiographien

Um am Computerbildschirm mit den Mikroradiographien arbeiten zu können, mussten diese zunächst digitalisiert werden. Dies geschah mit Hilfe eines Makroskopes (Leica Stereomakroskop MZ 7-5). Die vier zentralen Sagittalschnitte der Wirbelkörper wurden hierzu unter dem Makroskop positioniert. Hierbei war es wichtig die Schnitte so zu positionieren, dass die kaudalen und kranialen Enden des Wirbelkörpers im Bildschirm entweder nach links oder nach rechts zeigten. Nun wurden sie bei mäßiger Helligkeit der Lichtquelle betrachtet (Kaltlichtquelle: Leica KL 1500 LCD). Dies entsprach der konstanten

Schalterposition „C“, wobei „A“ minimale Helligkeit und „E“ maximale Helligkeit darstellte. Da sich die Schnittdicken der Wirbel um $\pm 20 \mu\text{m}$ bei durchschnittlichen $150 \mu\text{m}$ unterschieden, und somit die Helligkeit der einzelnen Mikroradiographien beeinflusst wurde, musste die Temperatur der Halogenlampe dem jeweiligen Wirbel angepasst werden, wobei der Bereich der Lichttemperatur von 2800 K bis 3000 K nicht verlassen wurde. Das Einlesen der Bilder auf den Computer erfolgte mittels einer Leica DC 300 F- Kamera, die mit dem Makroskop und dem Computer verbunden war. Um diesen Vorgang standardisieren zu können, wurde stets das 1,0er Objektiv verwendet. So wurde das Bild des Sagittalschnittes in optimaler Arbeitsgröße auf dem Bildschirm wiedergegeben. Ebenso wurde die Belichtungszeit in einem Bereich von 350 ms bis 460 ms gehalten. Um das digitalisierte Bild weiter bearbeiten und auswerten zu können, wurde eine spezielle Software genutzt (Leica Quantiment QWin 2003). Die anschließende Bearbeitung erfolgte anhand des hierzu konzipierten Algorithmus nach den erprobten Methoden der Arbeitsgruppe Sehmisch et al (Sehmisch et al. 2009a).

2.7.3 Auswertung der Mikroradiographien

Die Auswertung erfolgte mittels eines speziell für die Sagittalschnitte von Rattenwirbelkörpern erarbeiteten Programms. Dies ermöglichte eine standardisierte und benutzerunabhängige digitale Auswertung. Um die Messung der Parameter möglichst unbeeinflusst durchführen zu können, waren dem Untersucher sowohl die Reihenfolge als auch die jeweiligen Gruppen der Mikroradiographien unbekannt. Zusätzlich erfolgte vor Auswertungsbeginn eine Eichung der Versuchsergebnisse. Hierzu wurden fünf Wirbelkörper an drei aufeinander folgenden Tagen vom Untersucher bearbeitet. Die so erhaltenen Ergebnisse durften pro Wirbel nicht mehr als $\pm 5\%$ voneinander abweichen.

Die Auswertung der Mikroradiographien erfolgte durch Bearbeitung der vier zentralen Knochenanteile der Wirbelkörper ohne Dorn- und Querfortsätze.

Dieser Arbeitsschritt lässt sich in einen manuellen und einen automatisierten Teil unterteilen. Der manuelle Teil stellt hierbei die Grundlage des softwaregesteuerten Abschnittes dar und umfasst in gleichbleibender Reihenfolge: 1. Graudetektion; 2.

Bestimmung der Gesamtfläche des Sagittalschnittes; 3. Bestimmung der Trabekelfläche; 4. Bestimmung der Kortikalisdicke dorsal. Alle Schritte der manuellen Bearbeitung wurden mit Hilfe eines Grafiktablets und zugehörigem Pen (Intuos® 3, Graphic Tablet, Wacom Co, Ltd.) durchgeführt.

Der automatisierte Teil errechnete programmgesteuert aus beiden Schritten die erwünschten Messparameter.

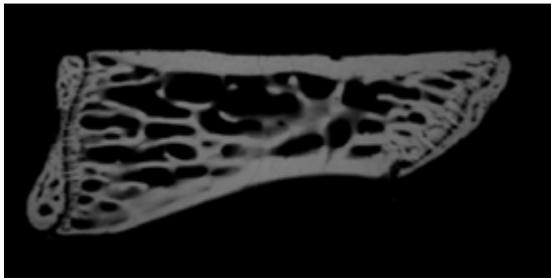


Abbildung 10: Mikroradiographie unter dem Mikroskop (noch unbearbeitet).

2.7.3.1 Graudetektion

Um der Software die Unterscheidung von knochenenthaltenden und knochenfreien Strukturen zu ermöglichen, erfolgte die Graudetektion. Hierbei wurden alle durch das Programm erkannten Knochenanteile blau gefärbt. Um die Knochenstrukturen optimal erfassen zu können, erfolgte die manuelle Korrektur, bis alle sichtbaren weiß bis dunkelgrauen Knochenanteile blau überdeckt waren. Bei diesem Vorgang wurde eher eine Über- als eine Unterdetektion akzeptiert.

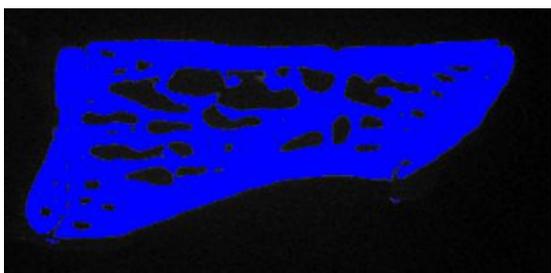


Abbildung 11: Graudetektion

2.7.3.2 Ermittlung der Knochendichte gesamt

Nach der Graudetektion folgte die Ermittlung der gesamten Knochendichte des *corpus vertebrae*. Hierzu wurde mit Hilfe des Grafiktablets und des zugehörigen Pens der gesamte Wirbelkörper einschließlich der Epiphysenfuge umrandet. Diese Einrahmung erfolgte möglichst genau entlang des Periosts. Auf diese Weise wurde eine Fläche geschaffen in der das Programm anhand der zuvor erfolgten Graudetektion die Knochenanteile der vorliegenden Mikroradiographie erkennen konnte. So erfolgte die Unterscheidung von Nichtknochen und Knochen bezogen auf die zuvor definierte Fläche.

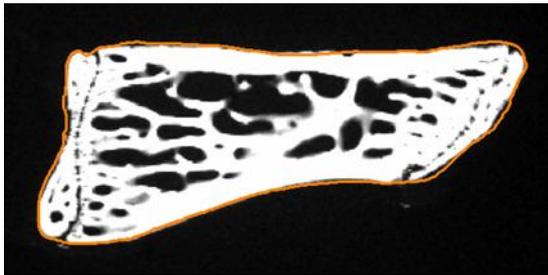


Abbildung 12: Ermittlung gesamte Knochendichte durch Umrandung des Periosts

2.7.3.3 Trabekelkreuzungen und Trabekelfläche

Nach Feststellung der Gesamtknochendichte wurde die endostale Knochenfläche des Sagittalschnittes definiert. Die Linien wurden hierbei wie folgt eingezeichnet:

Die kaudale Begrenzung (im Bezug auf den Wirbelkörper) der Trabekelfläche erfolgte anhand der Linienführung direkt durch die Epiphysenfuge, da hier die Grenze zwischen Spongiosa und Kompakta mit bloßem Auge nicht zuverlässig erkennbar war. Bei der Ermittlung der kranialen Flächengrenze konnte man hingegen die Spongiosa abgrenzen und somit erfolgte die Linienführung hier knapp vor der Epiphysenfuge. Auf diese Weise wurden von Hand die trabekelenthaltenden von den übrigen Knochenflächen abgegrenzt. Anhand der zuvor erfolgten Graudetektion und Erfassung der gesamten Knochendichte konnte die Software nun die Daten zur Trabekelfläche und den Trabekelkreuzungen ermitteln.

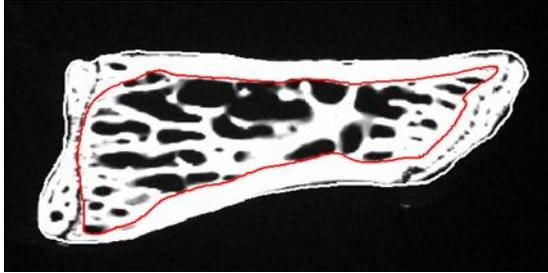


Abbildung 13: Linienführung bei Ermittlung der Trabekelfläche

2.7.3.4 Ermittlung der dorsalen Kortikalisdicke

Mit Hilfe der vorangegangenen Arbeitsschritte wurde im folgenden Schritt die Kortikalisdicke erfasst. Bei diesem Versuch wurde sich auf die Bestimmung der dorsalen Kortikalis beschränkt. Um hierbei die durchschnittliche Dicke bestimmen zu können, wurden manuell Vektoren in etwa lotrecht zum Kortikalisniveau eingezeichnet. Dies erfolgte indem zehn Linien in möglichst gleichem Abstand eingezeichnet wurden. Hierbei war darauf zu achten, dass die Kortikalis von den Vektoren deutlich überschritten wurde. Da die Fläche der Kortikalis bereits durch die vorangegangenen Arbeitsschritte ermittelt wurde, konnte die Software die Linien genau auf das Niveau der Kortikalisdicke kürzen und den Mittelwert der dorsalen Dicke jedes Schnittes bestimmen.

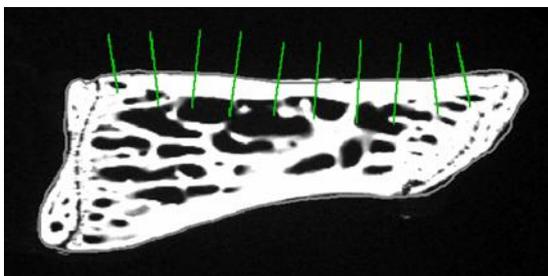


Abbildung 14: Kortikalisbearbeitung dorsal

2.7.3.5 Messparameter der Mikroradiographie

Nomenklatur und Einheiten wurden nach den ASBMR Kriterien definiert (Parfitt et al. 1987) und die Knocheneigenschaften wie folgt bezeichnet.

Tabelle 2: Messparameter zur Auswertung der Mikroradiographien

Messparameter	Erläuterung	Einheit
Kortikalisdicke dorsal	entspricht dem arithmetischen Mittel der 10 Vektoren, die durch die dorsale Kortikalis gelegt wurden	mm
Kortikaler Knochenanteil	gibt Auskunft über den Anteil des kortikalen Knochens (dorsal und ventral zusammen) am gesamten detektierten Knochen des untersuchten Sagittalschnittes	%
Dichte der Trabekelkreuzungen	repräsentiert die Anzahl der gemessenen Trabekelkreuzungen pro Fläche	Absolutwert pro mm ²
Anzahl der Trabekelkreuzungen absolut	stellt die gesamte Anzahl der Trabekelkreuzungen innerhalb der detektierten Trabekelfläche dar	Absolutwert
Mittlere Trabekeldicke	entspricht der durchschnittlichen Dicke der erkannten Trabekel	µm
Trabekelfläche absolut	stellt die gesamte endostal gelegene Fläche dar, in der sowohl knöcherne als auch nicht-knöcherne Anteile enthalten sind	mm ²
Knochenfläche der Trabekel absolut	repräsentiert die rein knöchernen Anteile der Trabekelfläche	mm ²
Mittlere Trabekellänge	bezeichnet die durchschnittliche Länge der Trabekel	µm

2.8 Statistik

Die statistische und graphische Auswertung der Messparameter der Mikroradiographien erfolgte mit Hilfe von Graph Pad Prism 4 (Version 4.00a, April 2003, GraphPad Software Inc, San Diego, USA) und Graph Pad Prism 7 Demo (Freeware), ebenso die Auswertung der Ergebnisse des Bruchtests und der Veraschung. Zur Ermittlung von Signifikanzen wurden die Gruppen mittels einer one-way ANOVA analysiert und anschließend mittels eines Tukey-Kramer post-hoc Tests genauer dargestellt. Hierbei wurde als Signifikanzniveau $\alpha \leq 0,05$ gewählt.

Die Berechnung der Volumina, der mineralisierten Knochendichte und der Biomechanik erfolgte anhand Microsoft Excel 2003.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden für die sieben Versuchsgruppen anhand von Balkendiagrammen veranschaulicht. Die jeweiligen Mittelwerte (M) und deren Standardabweichungen (SD) sind zusätzlich in den Tabellen 4 - 21 im Anhang unter Ergebnistabellen aufgelistet.

Tabelle 3: Versuchsgruppen und Stichprobenumfang (n) pro Gruppe

1	SHAM	n = 10
2	SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d	n = 11
3	OVX	n = 12
4	OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d	n = 13
5	OVX PTH qod 7. - 35. d	n = 12
6	OVX PTH 5 x/w 14. - 35. d	n = 12
7	OVX PTH 5 x/w 14. - 28. d	n = 11

Die Kennzeichnung von Signifikanzen erfolgte durch die Kleinbuchstaben a bis e:

a : signifikant gegenüber SHAM

b : signifikant gegenüber OVX

c : signifikant gegenüber SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d

d : signifikant gegenüber OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d

e: signifikant gegenüber OVX PTH qod 7. - 35. d

3.1 Gewichtsverlauf der Versuchstiere

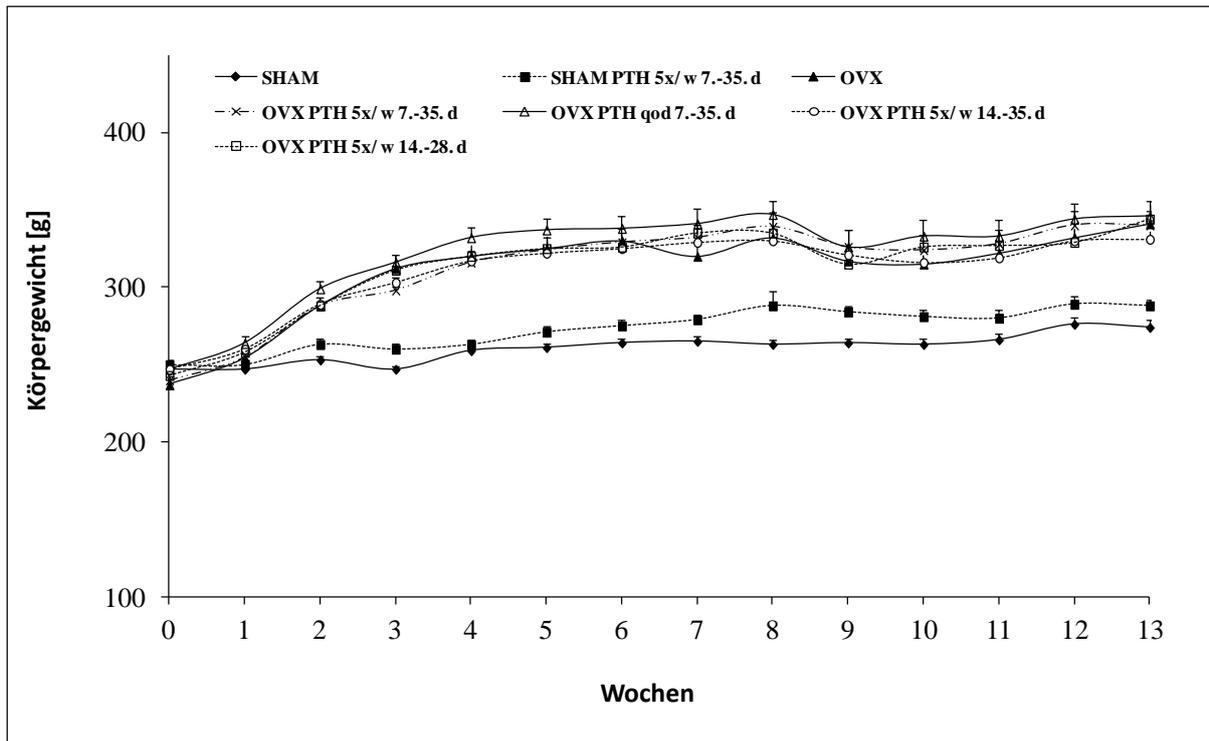


Abbildung 15: Gewichtsverlauf der Versuchsgruppen aufgezeichnet ab Ovariectomie (Woche 0) bis Tötung (Woche 13). Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) der jeweiligen Gruppen ($10 \leq n \leq 13$).

Bei Betrachtung des Gewichtsverlaufs der Versuchstiere (Abbildung 15, Anhang Tabelle 4) ließ sich bei allen Ratten eine Gewichtszunahme bis zum Ende des Versuches verzeichnen. Diese Entwicklung wurde für alle Gruppen als positiver Gesundheitsindikator gewertet. Hierbei zeigten OVX-Tiere eine deutlichere Gewichtszunahme als SHAM-Tiere, was der höheren Gewichtszunahme ovariectomierter Ratten zu Grunde lag und dem Beleg für eine erfolgreiche Ovariectomie entsprach. Ab Woche 2 waren diese Unterschiede signifikant. Nach der Tibia-Osteotomie, deren Ergebnisse in einer anderen Arbeit ausgewertet wurden (Komrakova et al. 2010), zeichnete sich bei Woche 8 ein Knick der Gewichtskurven nach unten ab, welcher sich im Verlauf erholte.

3.2 Volumina der LWK 3

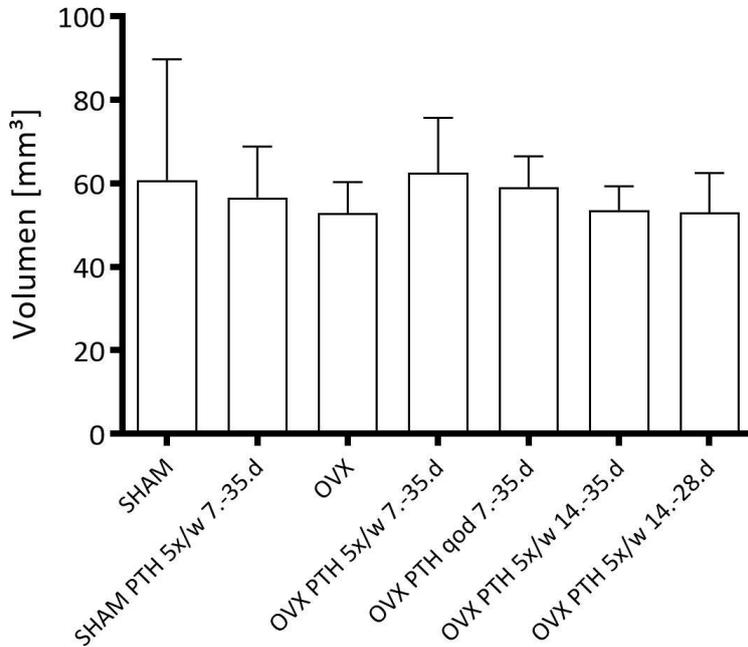


Abbildung 16: Mittelwerte und Standardabweichung der Volumina der jeweiligen Gruppen ($10 \leq n \leq 13$).

Ein signifikanter Einfluss auf die Wirbelkörpergröße konnte durch eine PTH-Gabe nicht gezeigt werden (Abb. 16, Anhang Tabelle 5). Die maximale Steigerung der Volumina wurde bei den Tieren der Gruppe OVX PTH 5x/w 7. – 35. d verglichen mit der unbehandelten OVX-Gruppe (plus ca. 18,2 %) verzeichnet. Alle anderen PTH-gespritzten OVX-Tiere wiesen kleinere Werte und somit einen geringeren PTH-Effekt auf. Behandelte SHAM-Tiere zeigten keinen Effekt einer PTH-Gabe im Sinne einer Volumenzunahme.

3.3 Veraschung der LWK 3

3.3.1 Gewichte vor Veraschung

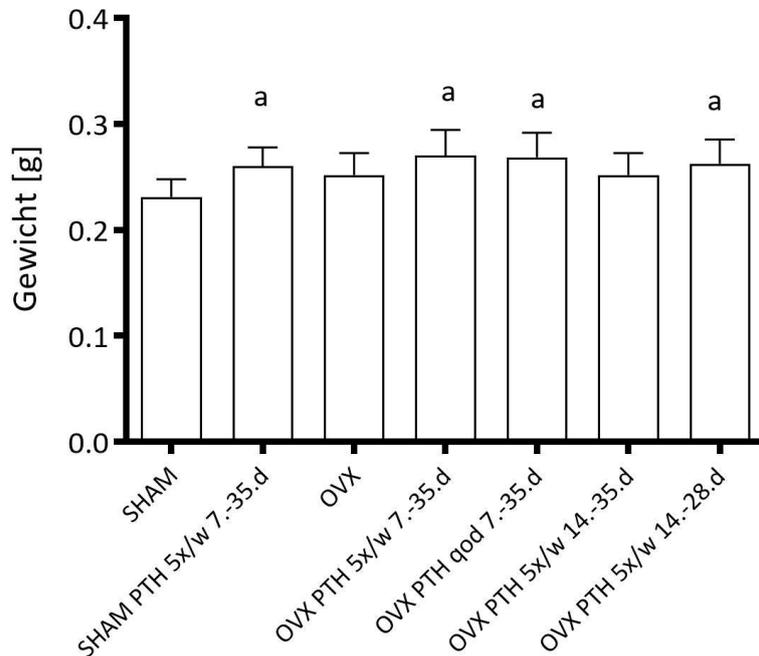


Abbildung 17: Mittelwerte und Standardabweichungen der Wirbelkörpergewichte der jeweiligen Gruppen (10 ≤ n ≤ 13). a entspricht einem signifikanten Unterschied gegenüber der Gruppe SHAM.

Die in Abbildung 17 (Anhang Tabelle 6) gekennzeichneten Gruppen wiesen vor der Veraschung signifikant höhere LWK-Gewichte im Vergleich mit SHAM auf. Dies zeigte sich sowohl bei der gespritzten Gruppe SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d im Vergleich mit der unbehandelten SHAM-Gruppe (13 % mehr Gewicht) als auch bei den gespritzten OVX-Gruppen (Ausnahme OVX PTH 5x/w 14. - 35.) im Vergleich mit der Gruppe SHAM (8,7 % - 17,4 % mehr Gewicht). Eine PTH-Wirkung auf das Wirbelkörpergewicht konnte somit sowohl für ovarintakte Tiere als auch für ovariectomierte Tiere beobachtet werden. Beim Vergleich zwischen gespritzten, ovariectomierten Tieren und der unbehandelten OVX-Gruppe zeigten drei der vier Gruppen tendenziell höhere Werte als die Vergleichsgruppe OVX (4 % - 8 % mehr Gewicht). Die Ausnahme stellte die Gruppe OVX PTH 5 x/w 14. – 35. d. dar.

3.3.2 Gewichte nach Veraschung

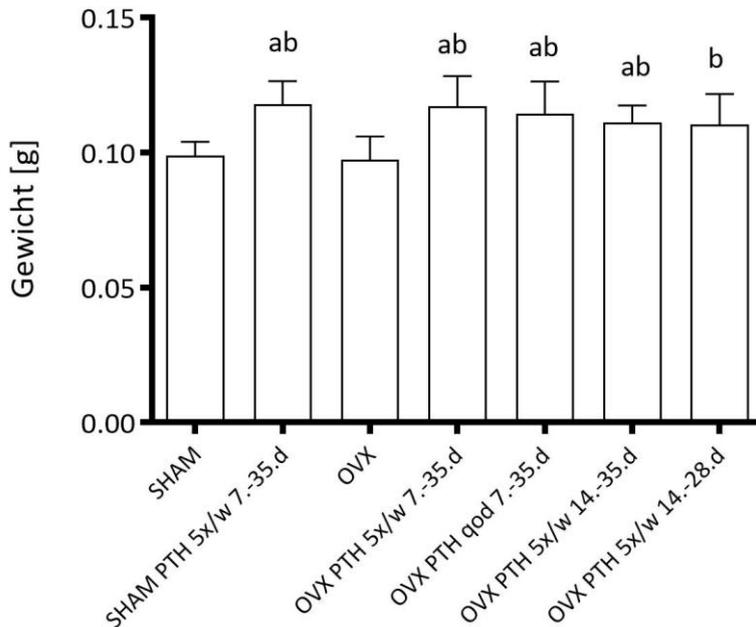


Abbildung 18: Mittelwerte und Standardabweichungen der Wirbelkörpergewichte der jeweiligen Gruppen ($10 \leq n \leq 13$). Signifikante Gewichtsunterschiede gegenüber der Gruppe SHAM sind mit a, gegenüber der Gruppe OVX mit b gekennzeichnet.

Bei Abbildung 18 (Anhang Tabelle 7) zeigten sich nach dem Vorgang der Veraschung bei allen PTH-gespritzten Gruppen höhere Gewichte des gewonnenen Aschesubstrates verglichen mit den jeweiligen Vergleichsgruppen SHAM und OVX. Alle ovariectomierten PTH-Gruppen zeigten hierbei einen signifikanten Effekt der PTH-Gabe im Vergleich mit der OVX-Kontrollgruppe (Steigerungen von 14 % - 20 %) und mit Ausnahme von OVX PTH 5x/w 14.-28. d auch im Vergleich mit der SHAM-Kontrollgruppe (12 % - 18 % Gewichtssteigerung). Die deutlichsten Unterschiede zeigten sich bei SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d gegenüber SHAM (Steigerung um 19,2 %) und bei OVX PTH 7. - 35. d gegenüber OVX (Steigerung um 20 %).

3.3.3 Mineralisierte Knochendichte

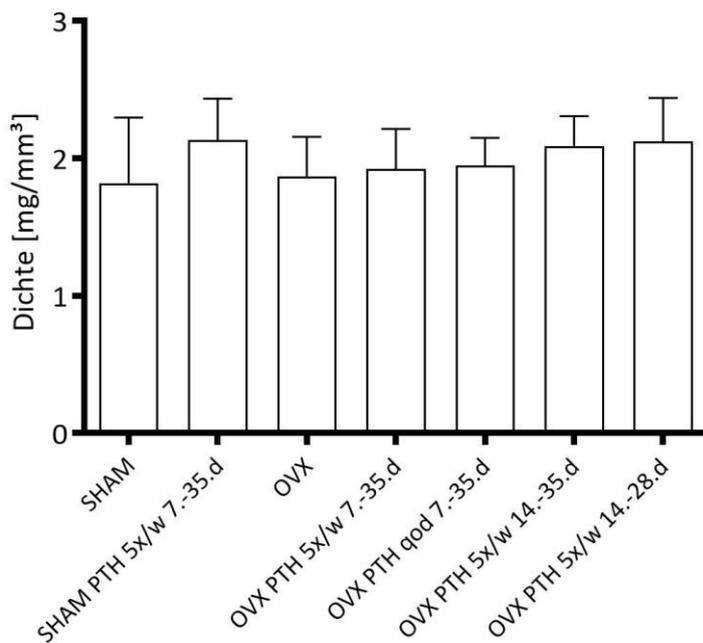


Abbildung 19: Mittelwerte und Standardabweichungen der mineralisierten Knochendichte der jeweiligen Gruppen ($10 \leq n \leq 13$).

Bei der Bestimmung der mineralisierten Knochendichte zeigte sich in Abbildung 19 (Anhang Tabelle 8) ein geringfügiger Effekt von PTH auf den oben genannten Untersuchungsparameter, welcher am deutlichsten bei der Gruppe SHAM PTH 5x/w 7. - 35. d im Vergleich mit SHAM verzeichnet wurde (plus 17 %). Ebenso wurden geringe Steigerungen der mineralisierten Knochendichte in den PTH-Gruppen im Vergleich mit der unbehandelten OVX-Gruppe beobachtet, wobei dies am deutlichsten bei PTH OVX 5 x/w 14. - 35. d und OVX PTH 5 x/w 14. - 28. d dokumentiert wurde (um 12,3 % - 13,9 %).

3.3.4 Organische Masse in Prozent an der Knochenmasse der Wirbelkörper

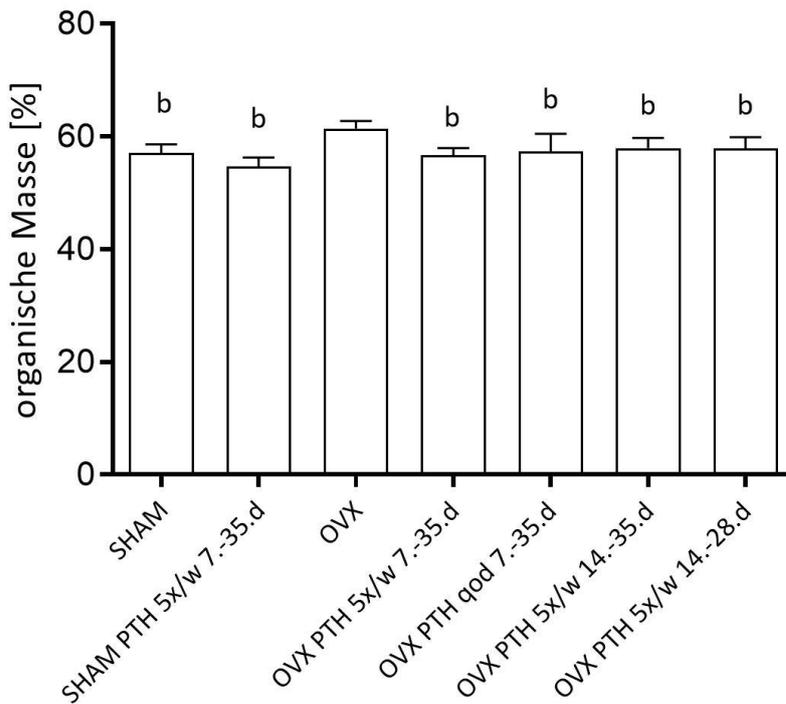


Abbildung 20: Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Gruppen ($10 \leq n \leq 13$) für organische Masse in % an der Knochenmasse der Wirbelkörper. b entspricht einem signifikanten Unterschied gegenüber der Gruppe OVX.

In Abbildung 20 (Anhang Tabelle 9) wies die Gruppe OVX im gesamten Gruppenvergleich den signifikant größten organischen Anteil an der Knochenmasse eines Wirbelkörpers auf. Zudem wurde im Bezug auf die PTH-Gruppen der ovariectomierten Tiere gezeigt, dass die organischen Bestandteile des Wirbelkörpers unter einer PTH-Gabe signifikant geringer (minus 9,8 % - 12 %) im Vergleich mit der Gruppe OVX ausfielen und sich in etwa auf dem Niveau ovarintakter Tiere (SHAM) befand. Beim Fehlen der PTH-Gabe in der Gruppe OVX zeigte sich ein höherer Anteil von organischem Gewicht an der Knochenmasse pro Wirbelkörper. Auch bei den beiden SHAM-Gruppen zeigte sich diesbezüglich ein geringer Unterschied zwischen der PTH-Gruppe und der ungespritzten Kontrollgruppe mit ca. 4,3 % kleineren Werte von SHAM PTH 5 x/w 7. - 35.d im Vergleich mit SHAM.

3.3.5 Anorganische Masse in Prozent an der Knochenmasse der Wirbelkörper

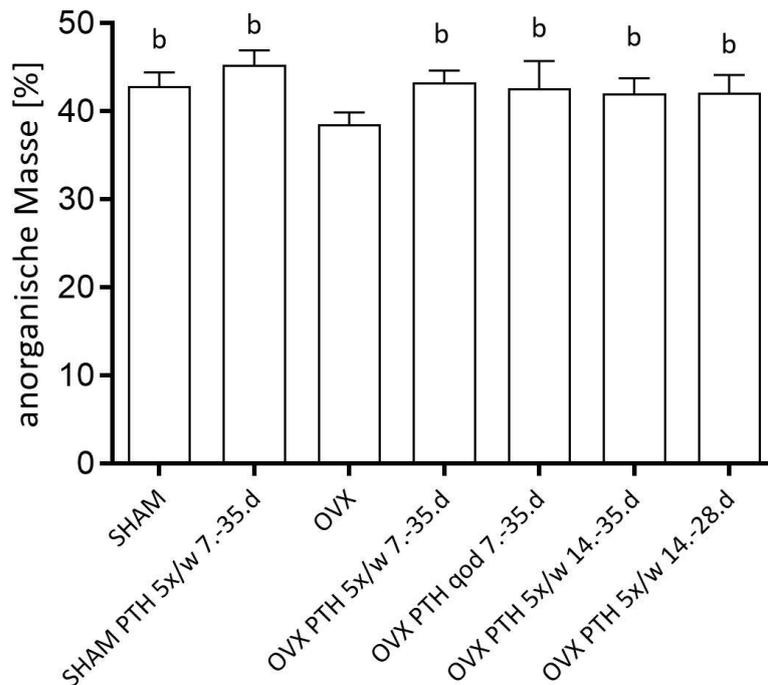


Abbildung 21: Mittelwerte und Standardabweichungen der Gruppen ($10 \leq n \leq 13$) für anorganisches Gewicht in % an der Knochenmasse der Wirbelkörper.

Es ließ sich ein signifikanter PTH-Effekt auf die Einheit der anorganische Masse dokumentieren (Abbildung 21, Anhang Tabelle 10). Ein höherer anorganischer Anteil an der Knochenmasse pro Wirbelkörper bei PTH-gespritzten Tieren wurde bei allen ovariectomierten Tieren dokumentiert. PTH-gespritzte OVX-Tiere erreichten hierbei ca. 17,7 % - 21,4 % höhere Werte als die Kontrollgruppe OVX und verzeichneten somit ähnliche Werte wie die unbehandelten, ovarintakten Tiere (SHAM). Eine geringe PTH-Wirkung (5,7 % Steigerung) auf ovarintakte Tiere konnte zudem bei dem Vergleich von SHAM PTH 5 x/w 7. - 35.d mit der ovarintakten Gruppe SHAM dokumentiert werden. Die höchsten Werte unter PTH-Gabe wurden in den Gruppen SHAM PTH 7. - 35. d und bei OVX PTH 7. - 35. d gemessen.

3.4 Ergebnisse des biomechanischen Kompressionstests

3.4.1 Yield Load

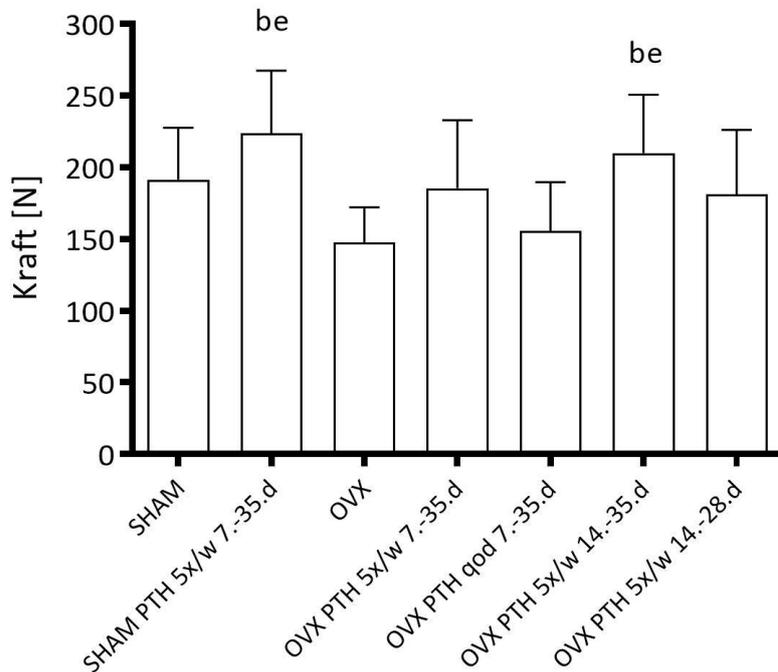


Abbildung 22: Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Gruppen ($10 \leq n \leq 13$) für den Messparameter Yield Load. b kennzeichnet eine Signifikanz gegenüber der OVX-Gruppe, e gegenüber der Gruppe OVX PTH qod 7. - 35.d.

Bei der Bestimmung des Yield Load (Abbildung 22, Anhang Tabelle 11) zeigte sich ein geringer Vorteil der gespritzten SHAM-Gruppe (SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d) gegenüber der unbehandelten Gruppe SHAM-Gruppe (Steigerung um 17 %). Im Gruppenvergleich der OVX-Tiere konnte eine Steigerung des Yield Load in allen Gruppen unter PTH-Gabe dokumentiert werden (5,4 % - 42,3 %), wobei in der Gruppe OVX PTH 5 x/w 14. - 35. d (42,3 %) das Signifikanzniveau erreicht wurde. Die in der Abbildung 22 aufgeführten Signifikanzen der Gruppen SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d und OVX PTH 5 x/w 14. - 35. d zeigten dies in deutlichem Ausmaß verglichen mit den zwei Gruppen OVX und OVX PTH qod 7. - 35. d.

3.4.2 Steigung

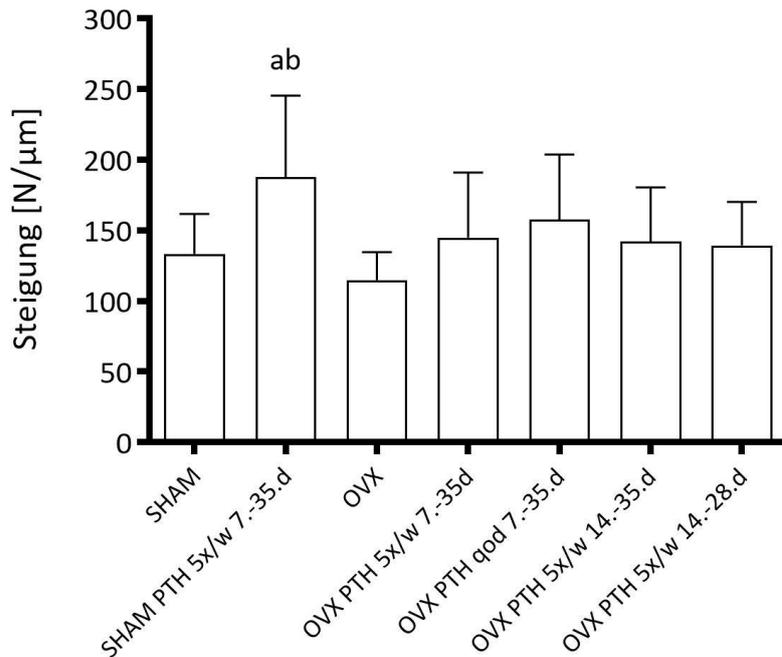


Abbildung 23: Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Gruppen ($10 \leq n \leq 13$) für den Messparameter Steigung. a kennzeichnet den signifikanten Unterschied gegenüber der Gruppe SHAM, b gegenüber der Gruppe OVX.

Es erreichten alle PTH-behandelten, ovariectomierten OVX-Tieren höhere Steigungswerte im Vergleich mit der Gruppe OVX (Abbildung 23, Anhang Tabelle 12). Dies wurde am deutlichsten bei der Gruppe OVX PTH qod 7. - 35. d, gefolgt von der Gruppe OVX PTH 5x/w 7. - 35. d anhand höherer Steigungswerte (plus 26,1 % und 37,2 %) gezeigt. Ca. 21,2 % und 23,7 % höhere Werte erreichten die anderen ovariectomierten PTH-Tiere. Auch bei den ovarintakten Tieren konnte ein Effekt der PTH-Gabe auf die gemessene Steigung verzeichnet werden, wobei hier das Signifikanzniveau erreicht wurde (plus 40,7 %). Signifikant höhere Werte zeigte auch die Gruppe SHAM PTH 5x/w 7. - 35. d im Vergleich mit der Gruppe OVX.

3.4.3 Maximalkraft

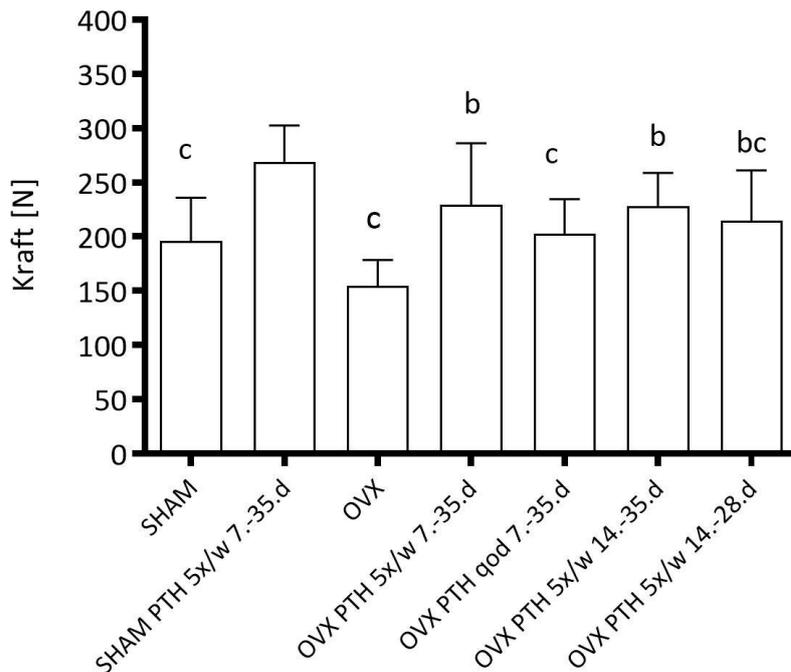


Abbildung 24: Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Gruppen ($10 \leq n \leq 13$) der Maximalkraft. b zeigt eine Signifikanz gegenüber OVX, c gegenüber SHAM (PTH 5x/w 7. - 35. d).

Bei der Untersuchung der benötigten Maximalkraft (Abbildung 24, Anhang Tabelle 13) bis zum Deckplatteneinbruch des Wirbelkörpers zeigte sich bei allen OVX-Gruppen, die mit PTH behandelt wurden eine Verbesserung der Stabilität im Vergleich mit OVX. Die größte Widerstandskraft bei ovariektomierten Tieren wurde hierbei in der Gruppe OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d, gefolgt von den Gruppen OVX PTH 14. - 35. d und OVX PTH 5 x/w 14. - 28. d erzielt. Die Werte der genannten Gruppen erreichten hierbei das Signifikanzniveau, wobei sich die Steigerungen zwischen 38,8 % und 48 % beliefen. Eine geringere Stabilitätsverbesserung zeigte sich in der Gruppe OVX PTH qod 7. - 35. d, wobei eine Steigerung von 31 % verzeichnet wurde. Die höchste Stabilität wies die ovarintakte Gruppe SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d auf. Dies zeigte sich sowohl im Vergleich mit der unbehandelten SHAM-Gruppe (plus ca. 37,3 %) als auch im Vergleich mit den PTH-Gruppen der ovariektomierten Gruppen, wobei ein signifikanter Unterschied im Vergleich mit den Gruppen OVX PTH qod 7. - 35. d und der Gruppe OVX PTH 5 x/w 14. - 28. d. verzeichnet wurde.

3.5 Mikroradiographische Auswertung

3.5.1 Dorsale Kortikalisdicke

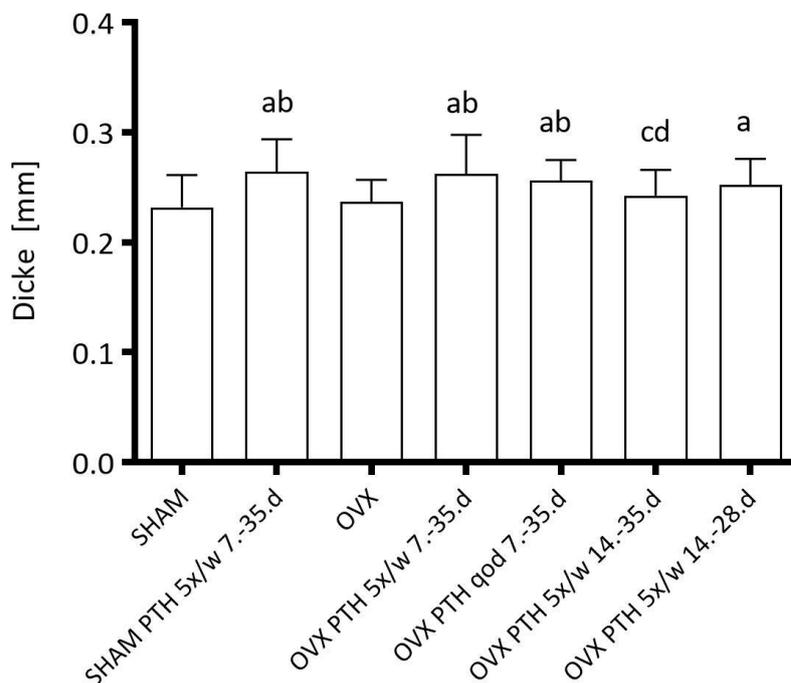


Abbildung 25: Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Gruppen ($10 \leq n \leq 13$) bei Bestimmung der dorsalen Kortikalisdicke. a bezeichnet Signifikanzen gegenüber SHAM, b gegenüber OVX, c gegenüber SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d, d gegenüber OVX PTH 5 x/w 7. - 35 d.

Bei der Bestimmung der Kortikalisdicke in Abbildung 25 (Anhang Tabelle 14) konnte eine Diczunahme der Trabekel unter PTH-Gabe in fast allen Gruppen verzeichnet werden. Im Vergleich mit der ovariektomierten, nicht gespritzten Gruppe (OVX) zeigte sich dies in signifikantem Maße bei den Gruppen OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d und bei OVX PTH qod 5 x/w 7. - 35. d (jeweils plus 8 %). Zudem wurde gezeigt, dass eine PTH-Gabe bei ovariektomierten Tieren eine signifikante Zunahme der Kortikalisdicke auch im Vergleich mit der ovarintakten Vergleichsgruppe SHAM erzielte. Hierbei wurde das Signifikanzniveau in allen Gruppen (plus 8 % - 13%) mit Ausnahme der Gruppe OVX PTH 5 x/w 14. - 35. d erreicht, welche die kleinsten Werte bei den ovariektomierten Tieren aufwies und sich nicht von der unbehandelten Kontrollgruppen (OVX) unterschied. Auch bei ovarintakten Tieren wurde

unter PTH-Gabe ein Zugewinn an Kortikalisdicke in der Gruppe SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d im Vergleich mit SHAM bewirkt (plus 13 %).

3.5.2 Kortikaler Knochenanteil

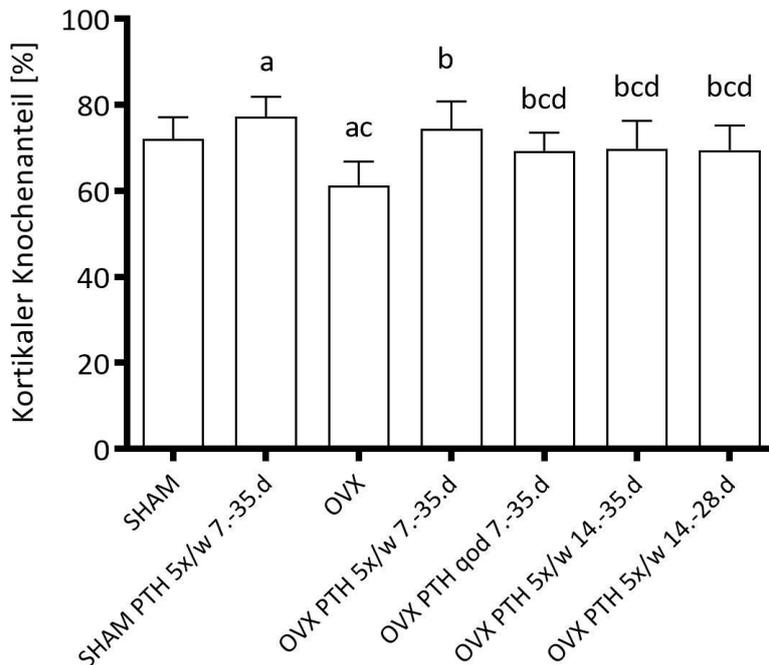


Abbildung 26: Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Gruppen ($10 \leq n \leq 13$) bei der Bestimmung des kortikalen Knochenanteils pro Gesamtknochen der untersuchten Präparate. Buchstabe a bezeichnet Signifikanz gegenüber SHAM, b gegenüber OVX, c gegenüber SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d, d gegenüber OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d.

Bei der Ermittlung des kortikalen Knochenanteiles im Wirbelkörper zeigte sich in Abbildung 26 (Anhang Tabelle 15) unter PTH-Gabe eine Steigerung des oben genannten Parameters. Es wurde dokumentiert, dass alle behandelten OVX-Gruppen mehr kortikalen Knochen als die Gruppe OVX ohne PTH-Gabe aufbauten, wobei bei allen das Signifikanzniveau erreicht wurde. Bei dem Vergleich der ovariectomierten, PTH-gespritzten Tiere untereinander zeigte sich der deutlichste PTH-Effekt in der Gruppe OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d., welche eine Steigerung um 21,4 % im Vergleich mit den unbehandelten OVX-Tieren aufwies und die ovarigesunden Tiere (SHAM) um 3,3 % übertraf. Die anderen OVX-Gruppen mit PTH-Therapie blieben gering (3,2 % - 3,8 %) hinter der ovarintakten SHAM-Gruppe zurück. Die kleinsten

Werte wurden in der nicht behandelten OVX-Gruppe dokumentiert, welche 15 % weniger betragen als die Werte in der unbehandelten SHAM-Gruppe. Die höchsten Werte zeigte die Gruppe SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d.

3.5.3 Dichte der Trabekelkreuzungen

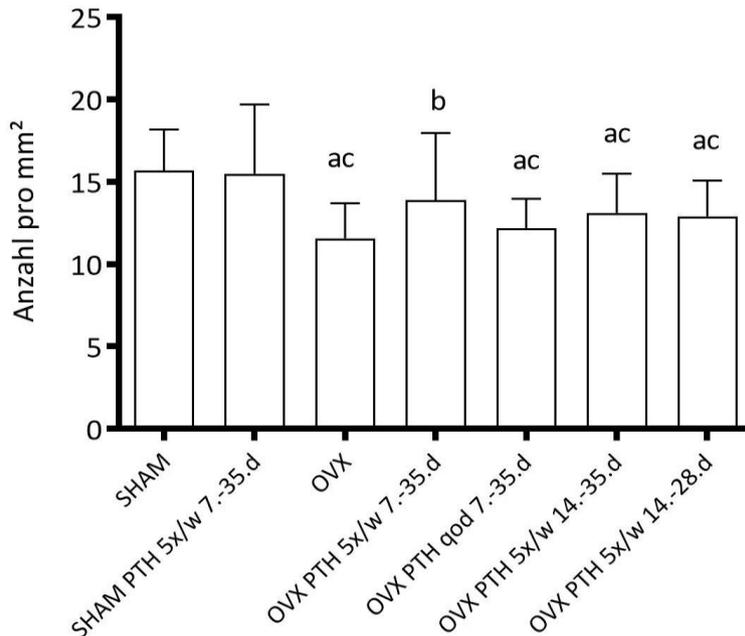


Abbildung 27: Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Gruppen ($10 \leq n \leq 13$) für die Dichte der Trabekelkreuzungen. a bezeichnet Signifikanz gegenüber SHAM, b gegenüber OVX, c gegenüber SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d.

Bei der Anzahl der Trabekelkreuzungen in Abbildung 27 (Anhang Tabelle 16) erzielte die Gruppe OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d die höchsten Werte unter den OVX- Tieren. Das zeigte eine signifikante Steigerung des Messparameters um ca. 20 % gegenüber der OVX-Kontrollgruppe. Eine geringere Steigerung zeigte sich bei den anderen OVX-Gruppen unter PTH-Gabe (plus 5,4 % bis 13,4 %). Die PTH-Gabe bei OVX-Tieren konnte die Werte nicht bis auf das Niveau der ovarigesunden SHAM-Tiere steigern. Alle ovariektomierten Gruppen, mit Ausnahme von OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d, verzeichneten weiterhin eine signifikant geringere Anzahl an Trabekelkreuzungen im Vergleich mit SHAM (minus 11,4 % - 18,4 %).

3.5.4 Anzahl der Trabekelkreuzungen absolut

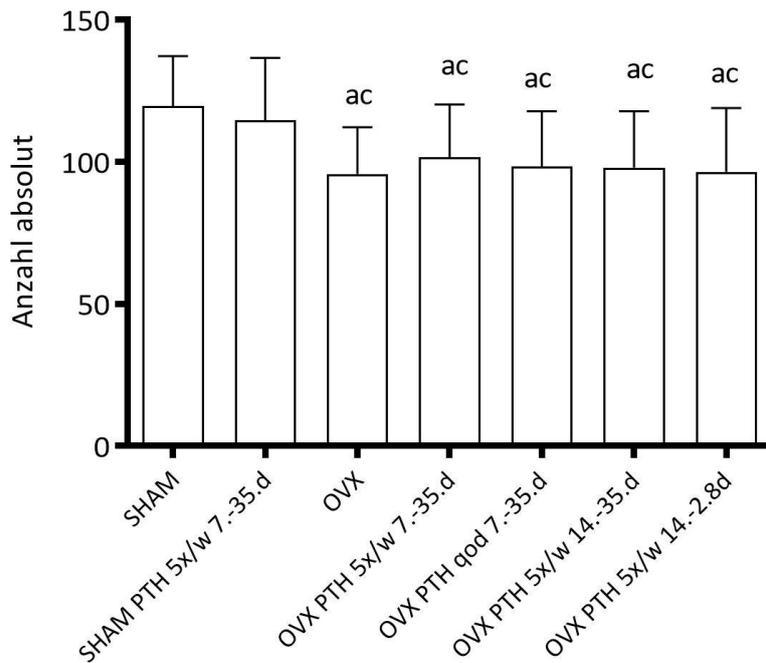


Abbildung 28: Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Gruppen ($10 \leq n \leq 13$) für die Anzahl der Trabekelkreuzungen absolut. a steht für signifikanten Unterschied bezogen auf die SHAM-Gruppe, c bezogen auf SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d.

Abbildung 28 (Anhang Tabelle 17) dokumentiert eine signifikant kleinere Anzahl der Trabekelkreuzungen bei unbehandelten OVX-Tieren als bei ovarintakten Tieren der Gruppe SHAM. Die PTH-Gabe bewirkte bei den OVX-Gruppen eine geringe Steigerung der Trabekelkreuzungen (0,8 % - 6,2 %), wobei das Signifikanzniveau jeweils nicht erreicht wurde und sich der deutlichste Effekt in der Gruppe OVX PTH 5 x/w 7. - 35 d zeigte. In der ovarintakten SHAM-Gruppe bewirkte die PTH-Gabe keine Anzahlvermehrung der Trabekelkreuzungen.

3.5.5 Mittlere Trabekeldicke

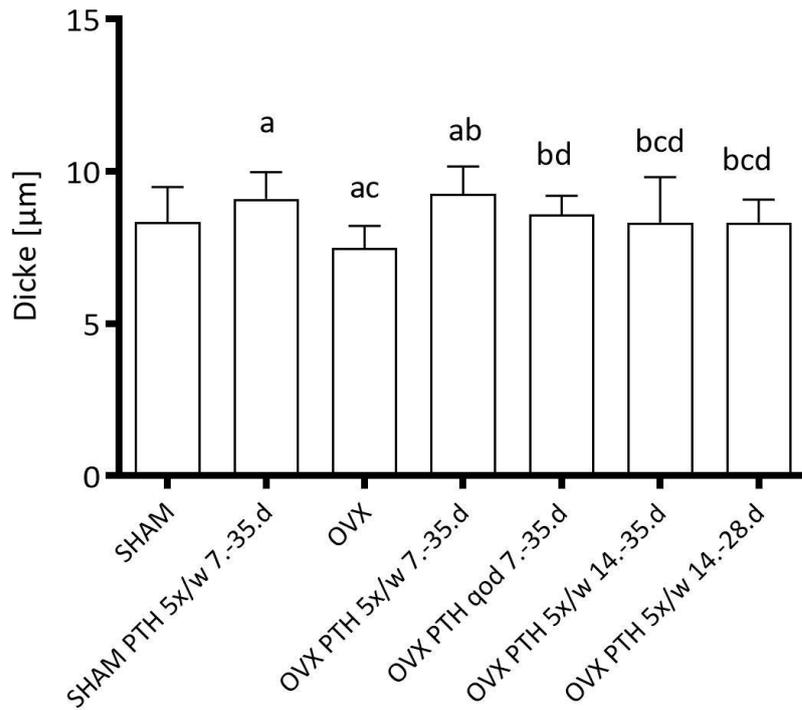


Abbildung 29: Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Gruppen ($10 \leq n \leq 13$) für die Bestimmung der mittleren Trabekeldicke. a zeigt signifikanten Unterschied gegenüber SHAM, b gegenüber OVX, c gegenüber SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d, d gegenüber OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d.

Abbildung 29 (Anhang Tabelle 18) zeigt, dass alle Gruppen, die einer PTH-Gabe unterzogen wurden einen signifikanten Zuwachs an Trabekeldicke im Vergleich mit ihrer jeweiligen, unbehandelten Kontrollgruppe SHAM beziehungsweise OVX aufwiesen. Der deutlichste Effekt von PTH konnte in der Gruppe OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d dokumentiert werden. Hier übertrafen die Werte die ovarigesunde Kontrollgruppe (SHAM) um 11 % und die ovariectomierte Gruppe (OVX) um 23,7 %. Auch die anderen gespritzten OVX-Tiere steigerten die Trabekeldicke im Vergleich mit der OVX-Kontrollgruppe signifikant, nämlich um 11 % - 14 %, und wiesen vergleichbare Werte wie die ovarintakten SHAM-Tieren auf.

3.5.6 Trabekelfläche absolut

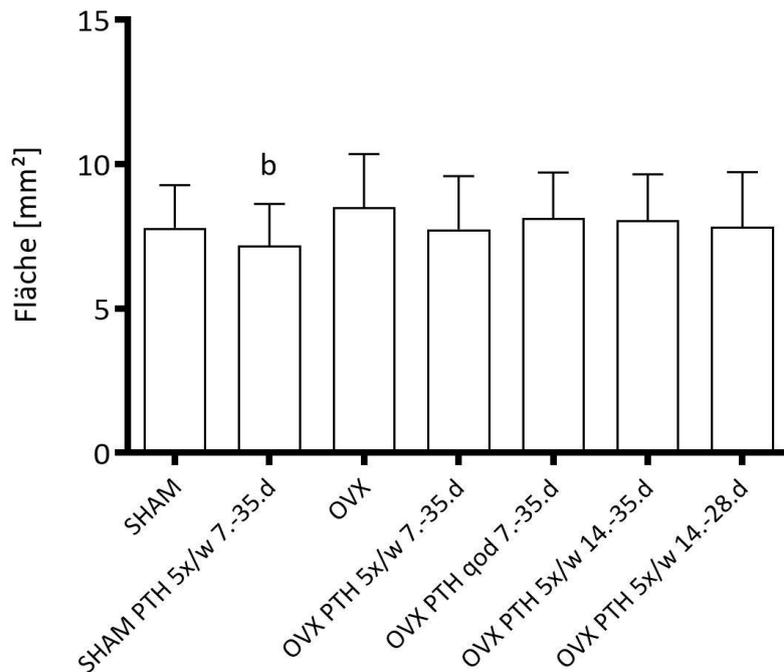


Abbildung 30: Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Gruppen ($10 \leq n \leq 13$) für die Trabekelfläche absolut. b bezeichnet Signifikanz gegenüber OVX.

Bei der Bestimmung der absoluten Trabekelfläche in Abbildung 30 (Anhang Tabelle 19) wurden gering kleinere Werte bei ovariektomierten, PTH-gespritzten Tieren verglichen mit der ovariektomierten Kontrollgruppe OVX (minus 4,5 % - 9 %) dokumentiert. Auch zeigten sich kleinere Werte bei PTH-gespritzten, ovarintakten Tieren (SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d) verglichen mit der Kontrollgruppe SHAM, wobei die PTH-Gabe eine Verringerung der oben genannten Fläche um 8 % bewirkte. Das Signifikanzniveau wurde beim Vergleich der Ergebnisse der Gruppe SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d mit denen der ovariektomierten Gruppe OVX erreicht, wobei die SHAM-Gruppe ca. 18% kleinere Werte verzeichnete.

3.5.7 Knochenfläche der Trabekel absolut

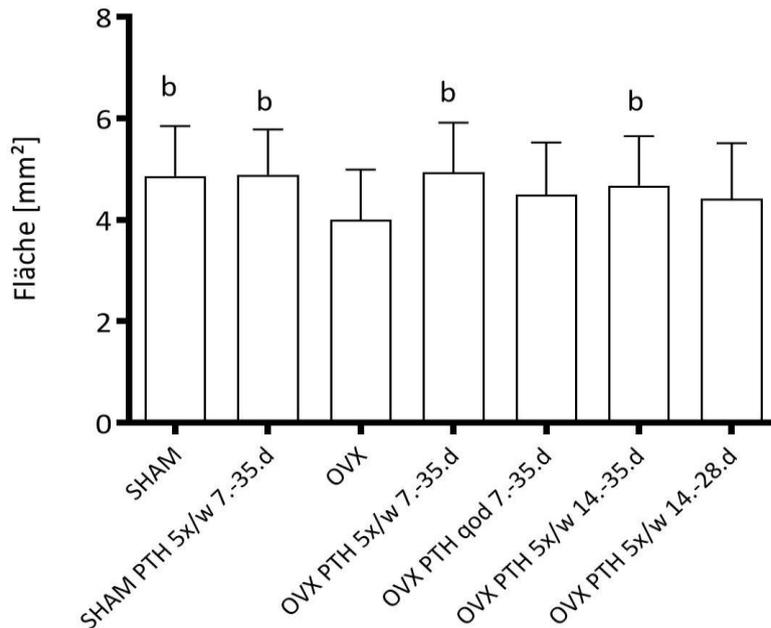


Abbildung 31: Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Gruppen ($10 \leq n \leq 13$) für die Bestimmung der Knochenfläche der Trabekel absolut. b zeigt Signifikanz gegenüber der Gruppe OVX.

Es konnte in Abbildung 31 (Anhang Tabelle 20) ein Zuwachs der Knochenfläche der detektierten Trabekel bei allen OVX-Gruppen, die mit PTH behandelt wurden, verzeichnet werden. Den deutlichsten Effekt von PTH zeigten hierbei die Gruppen OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d und OVX PTH 5 x/w 14. - 35. d (23,2 % und 17,2 % Zuwachs) im Vergleich mit OVX, wobei das Signifikanzniveau erreicht wurde. Einen geringeren Zuwachs (10 % - 12,2 %) erreichten die anderen gespritzten Gruppen der ovariektomierten Tiere.

In der Gruppe OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d konnten im Vergleich mit ovarintakten Tieren der Gruppe SHAM annähernd gleiche Werte erzielt werden (plus 1 %). Beim Vergleich der Ergebnisse von gespritzten und ungespritzten SHAM-Gruppen wurde kein PTH-Effekt dokumentiert.

3.5.8 Mittlere Trabekellänge

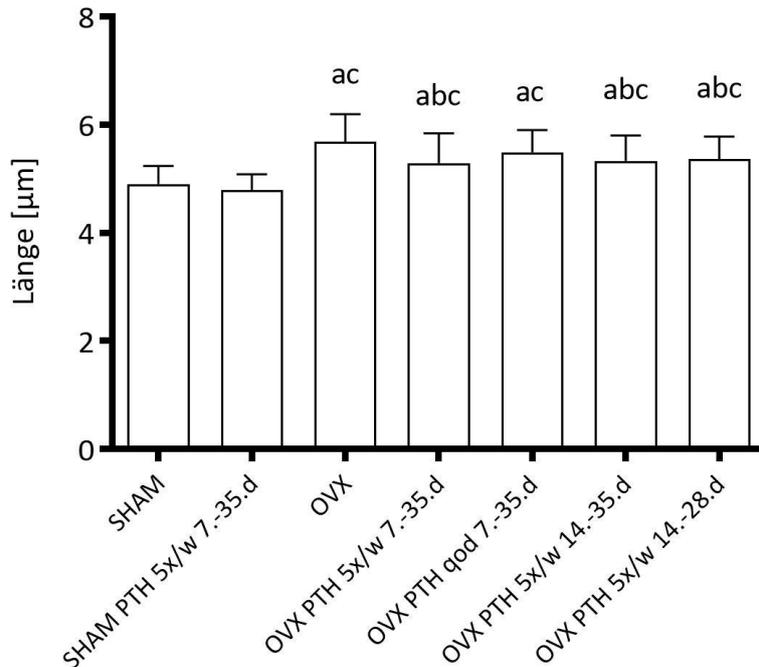


Abbildung 32: Mittelwerte und Standardabweichungen ($10 \leq n \leq 13$) für die mittlere Trabekellänge. a stellt Signifikanz gegenüber SHAM, b gegenüber OVX und c gegenüber SHAM PTH 5x/w 7. - 35. d dar.

Bei der Auswertung der mittleren Trabekellänge in Abbildung 32 (Anhang Tabelle 21) zeigten alle OVX-Gruppen, unabhängig von einer PTH-Gabe, signifikant längere Trabekel im Vergleich mit beiden SHAM-Gruppen. Eine PTH-Gabe bewirkte beim Vergleich der beiden SHAM-Gruppen keinen wesentlichen Unterschied, wobei die Gruppe SHAM PTH 5x/w 7. - 35. d um ca. 2 % kleinere Werte verzeichnete. Beim Vergleich der gespritzten OVX-Tiere mit der Kontrollgruppe (OVX) wurden in allen OVX-Gruppen unter PTH-Therapie kürzere Trabekel gemessen und desweiteren Unterschiede zwischen den PTH-Spritzintervallen verzeichnet. Ein signifikanter Effekt der PTH-Gabe zeigte sich in der Gruppe OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d und in beiden ab Tag 14 gespritzten Gruppen anhand kleinerer Trabekellängen verglichen mit OVX (5,9 %, beziehungsweise 5,2 % und 4,6 % kürzer). Eine geringere Wirkung wurde auch bei den übrigen OVX-Gruppen erzielt, wobei das Signifikanzniveau im Vergleich mit der OVX-Gruppe nicht erreicht wurde.

4 Diskussion

Eine vollständige Heilung der Osteoporose ist bislang noch nicht möglich, jedoch ist eine effektive Therapie in der Lage, osteopeniebedingte Frakturen und somit Kosten für das Gesundheitssystem zu reduzieren sowie die Lebensqualität der betroffenen Patienten zu verbessern (Lips und van Schoor 2005; Silverman 2005). Deshalb ist es essentiell, dass neue Behandlungsmethoden Einzug in die Klinik halten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Effektivität einer PTH (1-34)-Gabe (Teriparatid) in unterschiedlichen Verabreichungsintervallen am etablierten Model der ovariectomierten Ratte (Bagi et al. 1997) nachzuvollziehen. Die Lendenwirbelkörper wurden im Bezug auf die BMD, organische und anorganische Masse, das Wirbelkörpergewicht, Spongiosaparameter, Kortikalisparameter und Stabilitätseigenschaften untersucht.

Nicht nur an Wirbelkörpern wurden die Knochen ab- und aufbauenden Prozesse in dieser Versuchsreihe untersucht. Auch die Femora und Tibiae der Versuchstiere waren Gegenstand anderer Arbeiten (Komrakova et al. 2010; Tezval et al. 2011).

Die biomechanischen Eigenschaften und die Mikroarchitektur der LWK wurden nach PTH-Gabe in Bezug auf trabekuläre und kortikale Veränderungen analysiert.

Die deutlichste knochenanabole PTH-Wirkung zeigte sich bei der Auswertung der Spongiosaparameter, was auch mit mehreren anderen Studien korreliert (Lindsay et al. 2007; Dempster 2001).

Vor allem konnte eine signifikante Zunahme der Trabekeldicke, -dichte und Trabekelvernetzungen verzeichnet werden. Diese Veränderungen der Wirbelkörperspongiosa verbesserten die biomechanische Widerstandsfähigkeit der PTH-therapierten Wirbelkörper signifikant (siehe auch Erren 2008; Sehmisch et al. 2009b).

Die Tatsache, dass PTH vor allem die Mikroarchitektur der Spongiosa beeinflusst, ist seit mehreren Jahren erwiesen und Grundlage vieler Forschungsarbeiten (z.B. Tsuchida et al. 2001). Dies konnten verschiedene Untersuchungen anhand der mechanischen Belastbarkeit von Knochenzylindern aus Rattenwirbelkörpern und nach zylindrischer Einförmung von LWK anhand von Kompressionstests (Ejersted et al. 1995; Shahnazari et al. 2011) belegen.

Mittlerweile wurde diese Wirkung auch am menschlichen Skelett belegt, wobei in Europa das therapeutisch genutzte Teriparatid (fragmentiertes PTH 1-34; Forsteo[®]) untersucht wurde und sein Potential am Wiederaufbau der Trabekelstruktur im Vordergrund stand (Greenspan et al. 2007; Neer et al. 2001). Bei der sogenannten Forsteo-Studie aus dem Jahr 2012 profitierten die behandelten Patienten signifikant von einer PTH-Therapie in Bezug auf reduzierte Frakturraten bei Wirbelkörper- und Beckenfrakturen sowie gelenknahen Frakturen. Auch unsere Arbeit konnte eine signifikante Stabilitätsverbesserung bei Wirbelkörpern unter der Gabe von Teriparatid verzeichnen.

Zusätzlich muss davon ausgegangen werden, dass auch der weniger ausgeprägte PTH-Einfluss auf den Knochenzuwachs der Kortikalis maßgeblich an einer verbesserten Wirbelkörperstabilität bei menschlichem Knochen beteiligt ist.

Dass sich ein Effekt auf kortikales Wachstum einstellt, zeigten die in dieser Arbeit gewonnenen Daten anhand signifikanter Unterschiede bei den Kortikalisparametern therapierter und nicht therapierter Tiere. Die Wirksamkeit auf diese Baueinheit des Knochens unter PTH-Therapie verursachte eine Zunahme der kortikalen Knochendichte und der Kortikalisdicke. Vergleicht man die Ergebnisse mit einer methodisch ähnlich aufgebauten Arbeit von Matthias Erren an Rattenwirbelkörpern, zeigt sich diesbezüglich ein reproduzierbarer Effekt (Erren 2008). Hier zeigte sich unter PTH-Anwendung verglichen mit der unbehandelten Vergleichsgruppe und anders therapierten Gruppen (mittels Östrogen, Raloxifen, Phytohormonen) eine signifikante Zunahme der kortikalen Knochendicke.

Ein weiterer reproduzierbarer interessanter Zusammenhang zeigte sich zwischen Kortikalisparametern und der endostalen Fläche der LWK. Eine Verkleinerung der endostalen Fläche bei therapierten Tieren korrelierte mit gleichzeitig größeren Kortikalisdicken. Dies wurde auch bei anderen Versuchsreihen an LWK, Tibiae und Femora der osteopenen Ratte aufgezeigt (Sehmisch et al. 2009b und Tezval et al. 2011). Die vorwiegend endostal stattfindenden kortikalen Wachstumsvorgänge verkleinerten die endostale Fläche somit durch eine Diczunahme der Kortikalis nach „innen“. Kortikales Wachstum unter PTH-Therapie korrelierte folglich nicht mit einer Volumenzunahme der Wirbelkörper (Erren 2008).

Dass die kortikalen Veränderungen neben Spongiosaveränderungen bei der Erkrankung Osteoporose ein nicht zu vernachlässigender Faktor zur Erhaltung der Frakturresistenz sind, zeigten unter anderem eine Dissertation von August (2012) und eine Arbeit von Sjøgaard (1991) bei Untersuchungen von Rattentibiae und Rattenfemora. Auch eine Arbeit von Mather et al. (2013) zeigte, dass die Kortikalisbeschaffenheit eine Aussage über eine möglicherweise vorliegende Osteoporose ermöglicht. So erwies sich die Ausmessung der Kortikalisdicke des menschlichen Humerus anhand konventioneller Röntgenbilder mit einem negativ prädiktiven Wert von 95% als gleichwertig zuverlässige Diagnosemöglichkeit der Osteopenie im Vergleich mit herkömmlichen Methoden der Knochendichtemessung z.B. der DXA (*dual energy X-ray absorptiometry*). Dass die Beschaffenheit der Kortikalis im Umkehrschluss beträchtlich zur Stabilität von Knochen beiträgt, wurde in mehreren Untersuchungen aufgezeigt (Fox et al. 2006; Wronski und Yen 1994). Eine Stabilitätssteigerung von langen Röhrenknochen durch verbesserte Kortikalisparameter bei Ratten wurde in mehreren Versuchsreihen an Rattentibiae (z.B. August 2012; Sehmisch et al. 2009b) und Untersuchungen an Rattenfemora (Sjøgaard et al. 1991) belegt. Eine klinische Studie der Arbeitsgruppe Chevalley et al. (2013) konnte diesen Zusammenhang zwischen Kortikalisdicke und Knochenstabilität in ihrer Untersuchung an distalen Radiusfrakturen beim Menschen beobachten. Höhere Frakturrisiken korrelierten in dieser Untersuchung mit niedrigen Kortikalisdicken.

Die Möglichkeit mit einer PTH-Therapie eine Verbesserung der trabekulären Mikroarchitektur und der Kortikalis zu erzielen, bietet somit eine gleichzeitige Therapieoption von osteopenen, vorwiegend spongiös aufgebauten Wirbelkörpern und von Röhrenknochen der Extremitäten, welche sich durch einen höheren kortikalen Knochenanteil auszeichnen (Sehmisch et al. 2009b; Mashiba et al. 2001).

Als weiterer Analyseparameter zur Bewertung der PTH-Wirkung diene der prozentuale Anteil organischer und anorganischer Masse des Ausgangsgewichtes der Wirbelkörper.

Hier zeigten sich deutlich niedrigere Werte der anorganischen Masse bei OVX-Tieren (OVX), im Vergleich mit den übrigen Gruppen. Umgekehrt wurde ein signifikant größerer Anteil der organischen Masse bei den LWK der OVX-Kontrollgruppe im Gruppenvergleich dokumentiert.

Diese Ergebnisse geben Auskunft über die signifikante Zunahme ossärer Strukturen der jeweiligen LWK unter PTH-Gabe, was sich auch anhand der gesteigerten Werte der Knochenfläche der Trabekel und der Kortikalisparameter nachvollziehen lässt, Zudem spiegeln sie den Verlust von Trabekel- und Kortikalisstrukturen sowie eine zunehmende Verfettung des Knochenmarkes der nicht gespritzten Tiere wider. Dass eine zunehmende organische Masse bzw. abnehmende anorganische Masse mit abnehmenden Stabilitätseigenschaften zusammenhängt, konnte anhand der OVX-Kontrollgruppe gezeigt werden. Diese erreichten die höchsten Werte für die organische Masse pro LWK, blieben bei der Analyse der Stabilitätseigenschaften aber hinter allen Gruppen zurück.

Dieser kombinierte Umbau aus Abnahme ossärer Strukturen und zunehmender Verfettung des Knochenmarkraumes ist typischerweise mit dem Krankheitsbild der Osteoporose vergesellschaftet und wurde bereits in anderen Studien beschrieben (Yeung et al. 2005) Da eine Verfettung des Knochenmarkes mit fortschreitender Osteopenie zunimmt (Tang et al. 2010), könnte die bildgebende Diagnostik der Osteoporose zukünftig auch durch die MRT-Diagnostik bereichert oder ersetzt werden. Somit könnte wiederum ein Rückgang des Gebrauches ionisierender Strahlen in der Medizin erreicht werden. In MRT-Studien konnten diese Erkenntnisse weiter erforscht werden und zum Beispiel eine Prävalenz für LWK-Frakturen bei zunehmender Verfettung des Knochenmarkes bei Trabekelverlust dokumentiert werden (Schwartz et al. 2013), sodass mittlerweile geeignete Verfahren zur Osteoporosediagnostik mittels MRT zur Verfügung stehen (Link et al. 2002).

Neben organischer und anorganischer Masse gibt auch die sogenannte mineralisierte Knochendichte (BMD) Aufschluss über den Osteoporosegrad oder die Auswirkung einer PTH-Gabe auf ossäre Strukturen. Das Signifikanzniveau konnte in Bezug auf die BMD in unserer Arbeit nicht erreicht werden, jedoch zeigten die zuvor ermittelten Wirbelkörpergewichte vor und nach Veraschung signifikant höhere Werte der PTH-Tiere im Vergleich mit den Kontrollgruppen OVX und SHAM.

Die Steigerung der BMD unter PTH-Therapie gilt mittlerweile als erwiesen und wurde in vielen anderen Arbeiten mit osteopenen Ratten, Kaninchen oder Affen belegt (Aleksyniene

2009, Jerome 2001), wobei dort meist auf andere, vornehmlich bildgebende Verfahren zur Ermittlung der BMD zurückgegriffen wurden. Zum Beispiel kamen hierbei die pQCT (Fox et al. 2006 und 2008) und die DXA (Banu und Kalu 2002) zum Einsatz. Diese stellen im Vergleich mit der in unserer Arbeit angewandten Methode der Volumenbestimmung (vor allem dem manuellen Bestimmen der Wirbelkörpermaße zur Errechnung der Volumina) wahrscheinlich die präziseren Methoden zur Bestimmung der BMD dar.

Gegenstand kontroverser Diskussionen ist die Frage, ob Übergewicht die BMD positiv beeinflussen kann (Cao 2011).

Ein positiver Zusammenhang zwischen höheren BMI-Werten und BMD wurde zum Beispiel bei Untersuchungen von Felson et al. (1993) vermutet, welche gewichtstragende Knochen postmenopausaler Frauen analysierten. Dies wurde unter anderem auf die erhöhte mechanische Belastung bei zunehmendem Körpergewicht zurückgeführt. Eine andere Studie (Harris et al. 1992) konnte einen positiven Zusammenhang bei marginal übergewichtigen Frauen zwischen Serum-Östrogen und der BMD des Schenkelhalses dokumentieren. Interessanterweise konnte diese Beobachtung in der gleichen Arbeit im Bezug auf stärker übergewichtige Frauen nicht gemacht werden.

Auch unsere Ergebnisse lassen keinen positiven Einfluss von hohem Körpergewicht auf ossäre Strukturen oder die Stabilitätseigenschaften der Wirbelkörper vermuten. Die höchsten Körpergewichte wurden bei den OVX-Tieren verzeichnet, wobei ab der 2. Woche nach Ovariectomie das Signifikanzniveau im Bezug auf das Körpergewicht erreicht wurde. Ein signifikanter Vorteil der schwereren Tiere bezogen auf eine Zunahme oder den Erhalt ossärer Strukturen zeigte sich nicht, was beispielsweise durch den Verlust trabekulärer und kortikaler Strukturen in der unbehandelten OVX-Kontrollgruppe gezeigt werden konnte. Somit wurden die oben genannten Thesen durch unsere Ergebnisse zum Teil widerlegt.

Auch andere Arbeiten konnten einen Negativeinfluss hoher BMI-Werte auf die BMD oder einen fehlenden positiven Einfluss dokumentieren. So wurde bei übergewichtigen Frauen eine verminderte Stabilität der Knochen und höhere Porosität der Kortikalis beobachtet (Cohen et al. 2013). Zusätzlich zeigte diese Untersuchung eine negative Auswirkung von hohem Bauchfettanteil und hohem BMF (*bone marrow fat*) auf die BMD. Ursächlich für den Stabilitätsverlust scheint vor allem eine zunehmende Verfettung des Knochenmarkes zu sein

(Sheu und Cauley 2011). Übereinstimmend zeigte sich dieser Zusammenhang bei den Tieren mit hohem Anteil organischer Masse und reduzierten Stabilitätseigenschaften der nicht gespritzten OVX- Tiere. Auch Schwartz et al. (2013) konnten bezogen auf diese Fragestellung zeigen, dass eine zunehmende BMF gleichzeitig mit einer Abnahme der trabekulären/ kortikalen Strukturen und einem zunehmenden Frakturrisiko bei Wirbelkörpern einhergeht.

Die Bestimmung der Körpergewichte im Versuchsverlauf diene in unserer Arbeit vorwiegend zur Dokumentation des Gesundheitsstatus der Versuchstiere. Da es bei Ratten nach Ovariectomie typischerweise zu einer Gewichtszunahme kommt (siehe auch Wegorzewska et al. 2008), wurden die signifikant höheren Gewichte der OVX-Gruppen verglichen mit den SHAM-Gruppen ab der 2. Versuchswoche auch zur indirekten Erfolgskontrolle der stattgehabten Ovariectomie herangezogen.

Neben der Analyse der oben genannten Parameter sollte in dieser Arbeit im Speziellen auch die Effektivität verschiedener Spritzintervalle untersucht werden. Da bei einer Therapie mit Teriparatid hohe Kosten verbunden sind (Deutsches Ärzteblatt 2007), ist es aus wirtschaftlicher Sicht wichtig den effektivsten Spritzintervall bzw. die kleinste wirksame Dosis zu ermitteln. Vergleicht man die Tagestherapiekosten von Teriparatid mit der von Bisphosphonaten (20,28 €/ Tag mit 0,56 €-1,70 €/ Tag), so ist die Anwendung von Teriparatid mit ca. 35-fach höheren Kosten aus ökonomischer Sicht kaum zur Rechtfertigung. Hieraus resultiert unter anderem die aktuelle Empfehlung Teriparatid als Reservetherapie bei Versagen der herkömmlichen Medikamente (zum Beispiel SERMs oder Bisphosphonate) anzuwenden. Eine weitere Empfehlung für Teriparatid bezieht sich derzeit auf die Therapie der glukokortikoidinduzierten Osteopenie, bei welcher Teriparatid gegenüber einer Therapie mit Bisphosphonaten überlegen zeigte (Deutsches Ärzteblatt 2010; Hodsman et al. 2006).

Neben ökonomischen Faktoren geben auch gesundheitliche Risiken bisher Anlass zur zeitlichen Anwendungsbeschränkung von Teriparatid. Gegenstand der Diskussion ist hier beispielsweise ein fraglicher Zusammenhang zwischen PTH-Gabe und dem Auftreten von Osteosarkomen beim Menschen. Dieser konnte mittlerweile in Langzeituntersuchungen an Ratten bei einer über 2 Jahre andauernden PTH-Therapie gezeigt werden. In dieser Studie

traten bei ca. 53 % der Versuchstiere Osteosarkome auf (Vahle et al. 2002). Diese Ergebnisse, die im Rattenversuchsmodell erhoben wurden, lassen sich jedoch nicht direkt auf eine Anwendung am Menschen übertragen. Die Therapiedauer von 2 Jahren entsprechen bei Ratten ca. 70 % - 80 % der gesamten Lebenszeit, während diese Zeitspanne umgerechnet auf ein Menschenleben nur ca. 2 % - 3 % der Lebenszeit entsprechen. Ebenso übersteigt die bei Rattenversuchen angewandte Dosis die beim Menschen zugelassene Dosierung zum Teil um bis zu ein 58-faches (Capriani et al. 2012).

Bei mittlerweile drei dokumentierten Osteosarkom-Neudiagnosen unter laufender PTH-Behandlung (Elraiyah et al. 2015), konnte bisher kein Kausalzusammenhang zwischen der stattgehabten Therapie und dem Auftreten eines Osteosarkoms beim Menschen belegt werden. Da dieser bislang noch nicht endgültig erforscht ist und Langzeitergebnisse beim Menschen fehlen, sind die erhobenen Daten im Tierversuch bisher ein Anlass für die Anwendungsbeschränkung von Teriparatid auf maximal 24 Monate. Auch werden sogenannte Risikopatienten (z.B. Patienten mit M. Paget, Patienten nach Radiatio und Kinder) unter anderem auf Grund des fraglich gesteigerten Osteosarkomrisikos von einer PTH-Therapie ausgeschlossen (Hodsman et al. 2006).

Bei der Betrachtung unterschiedlicher PTH-Intervalle im vorliegenden Versuch zeigte sich bei den meisten Gruppen bei kürzerer und seltenerer Anwendung ein geringerer Effekt der PTH-Therapie. Länger und kontinuierlich behandelte Tiere (z.B. PTH 5 x/w 7. - 35. d) zeigten im Gruppenvergleich eine deutliche Verbesserung der Wirbelkörperstabilität sowie der Kortikalis- und Spongiosaeigenschaften, während Gruppen, die ab der 2. Woche behandelt wurden etwas hinter den Ergebnissen der oben genannten Tiere zurückblieben. Dies wurde auch in anderen Arbeiten sowohl für kortikales als auch für spongiöses Wachstum beobachtet. So zeigten Mosekilde et al. (1997) in einer Arbeit mit Lang- und Kurzzeitanwendungen (PTH-Anwendung von 2 Wochen im Vergleich mit 12 Wochen) einen Vorteil der Langzeittiere im Bezug auf eine Zunahme der Kortikalisdicke. Sehmisch et al. (2009b) und Greenspan et al. (2007) zeigten unter anderem einer Verbesserung der Spongiosastruktur bei Untersuchungen an Ratten unter einer PTH-Langzeittherapie.

Eine Kontinuitätsunterbrechung der Therapie an jedem 2. Tag wirkte sich tendenziell negativ auf die gemessenen Knochenparameter und die Frakturresistenz aus. Jedoch konnte auch bei diesen Tieren ein signifikanter kortikaler und spongiöser Knochenzuwachs verglichen mit

der nicht behandelten OVX-Kontrollgruppe verzeichnet werden. Bei nachgewiesener Wirksamkeit von PTH in dieser Gruppe zeigte sich jedoch keinen signifikanter Vorteil im Bruchtest verglichen mit den anderen PTH-Tieren. Jedoch könnten derartige, deeskalierte Anwendungsintervalle beim Menschen eine Option zur Dosis- und Kostenreduktion darstellen oder eine risikoarme Verdoppelung der Therapiedauer von bisher 24 Monate auf beispielsweise 48 Monate ermöglichen.

Die regelmäßigste Anwendung von Teriparatid wie bei den OVX-Tieren (OVX PZH 5 x/w 7. - 35. d) erwies sich in dieser Arbeit, wie auch in vorangegangenen Studien als wirkungsvollste Therapieoption. Es ist jedoch anzunehmen, dass auch eine weniger intensive Therapie trotz geringer ausgeprägtem Knochenzuwachs eine noch ausreichende Wirkung bei der Frakturprophylaxe erzielen könnte.

Eine weitere interessante Beobachtung zeigte sich bei den ab Tag 14 gespritzten Tieren. Da das *bone remodeling* anderen Arbeiten zufolge in diesem Zeitraum bei der Frakturheilung den Höhepunkt erreicht (siehe August 2012), sollten auch Veränderungen der LWK in der Phase nach Tibiaosteotomie untersucht werden. Interessanterweise erreichten die Wirbelkörper der Gruppe OVX PTH 5 x/w 14. - 35. d nur marginal kleinere Werte bezüglich Maximalkraft verglichen mit gespritzten Tieren der Gruppe OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d. Auch im Bezug auf die Dichte der Trabekelkreuzungen und der absoluten Knochenfläche der Trabekel zeigte sich hier im Gruppenvergleich der OVX-Tiere unter PTH-Therapie ein geringer Vorteil der Gruppe OVX PTH 5 x/w 14. - 35. d.

Dies bekräftigt die Vermutung, dass Reparaturmechanismen an einem bestimmten Frakturareal (zum Beispiel der Extremitäten) auch systemische Vorgänge auslösen und sich auch auf das gesamte Skelettsystem eines Organismus auswirken. Dies beobachteten bereits Millett et al. (1996) in einer Untersuchung an nicht operierten Femora, deren Gegenseite mittels Marknagel versorgt wurde. Bei dieser Arbeit wurden gesteigerte BMD-Werte bei der Analyse der gesunden Oberschenkelknochen verzeichnet. Es wird angenommen, dass aus dem Frakturspalt ausgeschüttete Zytokine eine Zunahme des *bone remodeling* an multiplen Orten des Skelettsystems bewirken, was in unserer Arbeit möglicherweise durch die PTH-Gabe potenziert wurde. Somit ist die ebenfalls signifikant verbesserte Stabilität bei den ab dem

14. Tag gespritzten Tieren möglicherweise auch Folge dieser systemischen Reaktion auf die stattgehabte Tibiaosteotomie der Versuchstiere.

Um über diese Zusammenhänge genaue Aussagen zu treffen zu können und um beurteilen zu können, ob möglicherweise auch größere Spritzabstände eine ausreichende Reduktion von Frakturraten erzielen können, sind in Zukunft weitere Untersuchungen dieser Fragestellung nötig.

4.1 Perspektiven der PTH-Therapie

Da die osteoanabole Wirkung eines Medikamentes einen Schlüsselprozess der Osteoporosebehandlung darstellt, und außer durch PTH (1-34) auch durch neue Substanzen (z. B. Calcilytika, Inhibitoren des Wnt-Antagonisten, Sclerostin Antikörper oder Dickkopf-1 Antikörper) bewirkt werden kann (Rachner et al. 2011), ist anzunehmen, dass zukünftig modernere Wirkstoffe Einzug in die Klinik halten, die ebenfalls in diese Regelkreisläufe eingreifen. Aus diesem Grund ist es sinnvoll die PTH-Wirkung weiter zu untersuchen, um die Indikationen dieses bislang gut verträglichen Wirkstoffes (Deutsches Ärzteblatt 2010) auszuweiten.

Die Tatsache, dass PTH (1-34) seine osteoanabole Wirkung unabhängig von Östrogenmangel entfaltet, zeigt, dass PTH losgekoppelt von körpereigenen hormonellen Regelkreisläufen anabole Prozesse auch an nicht-osteopenem Knochen auslöst (siehe auch Komrakova et al. 2010, Chandra et al. 2013). Dieses Potential könnte somit bei primär nicht an Osteopenie leidenden Patienten ausgenutzt werden.

Die Anwendung bei Tumorpatienten vor oder während einer Bestrahlungstherapie könnte eine derartige Perspektive darstellen. Untersuchungen dieser Fragestellung zeigten in tierexperimentellen Versuchen eine PTH-vermittelte Stammzellprotektion während einer Bestrahlungstherapie (Chandra et al. 2013). Eine Prävention der strahleninduzierten Osteopenie könnte somit ermöglicht werden. Auch könnte Teriparatid durch o.g. Eigenschaften der sekundären Entstehung von Knochentumoren nach einer

Bestrahlungstherapie entgegenwirken. Dies stünde im Gegensatz zu der bisher vorherrschenden Meinung, dass PTH vor oder nach Bestrahlungstherapie das Osteosarkomrisiko erhöhen könnte.

Eine weitere Option könnte der regelmäßige präventive Einsatz bei der Fraktur- und Osteoporoseprävention vor dem Beginn einer Glukokortikoidtherapie oder als Begleittherapie derselben darstellen (Lane et al. 2000). So empfehlen Hodzman et al. (2006) den Teriparatideinsatz bei einer glukokortikoidinduzierten Osteopenie aufbauend auf einer kanadischen Studie. PTH erwies sich in dieser Untersuchung im Vergleich mit antiresorptiven Substanzen als wirksamere Therapie.

Neben der Therapie der Osteopenie ist der Einsatz von PTH (1 - 34) in der Orthopädie und Unfallchirurgie vielversprechend. Anhand mehrerer Arbeiten konnte ein positiver Effekt auf den Heilungsprozess von Frakturen und den klinischen Verlauf endoprothetischer Eingriffe dokumentiert werden. Bei der konservativen Frakturheilung erwies sich eine begleitende PTH-Gabe als heilungsfördernd. Dies zeigte zum Beispiel eine Untersuchung von osteopeniebedingten Beckenfrakturen bei postmenopausalen Frauen, in welcher deutlich kürzere Heilungszeiten in der Patientengruppe mit begleitender PTH-Therapie verzeichnet wurden als bei dem nicht substituierten Kontrollkollektiv (Peichel et al. 2011).

Auch das Problem der verzögerten Frakturheilung wurde in mehreren *Case-Reports* unter PTH-Gabe untersucht, und es konnte eine Beschleunigung der Frakturheilung und bessere Konsolidierungsraten unter PTH-Therapie verzeichnet werden (Oteo-Alvaro und Moreno 2010).

Es ist somit anzunehmen, dass die konservative Frakturheilung durch eine PTH-Gabe in vielen Fällen profitieren könnte. Bisher zumeist osteosynthetisch versorgte Frakturen könnten der konservativen Frakturheilung zugeführt werden. Vielversprechende Ergebnisse zeigten diesbezüglich bereits bei Resmini und Jolascon (2007) bei der konservativen Therapie der Humerusschaftfraktur, in welcher erfolgreiche knöcherne Durchbauungsraten unter begleitender Teriparatidgabe verzeichnet wurden. Auch bei Aspenberg et al. (2010) konnte dieser positive Effekt bei distalen Radiusfrakturen von postmenopausalen Frauen bestätigt werden.

Aber auch im Rahmen einer Begleittherapie bei osteosynthetischer Frakturversorgung (Andreassen et al. 1999) und im Fachgebiet der Endoprothetik (Daugaard et al. 2011)

bewirkte PTH einen positiven Einfluss im Sinne schnellerer Frakturheilung und früherer knöcherner Durchbauung des postoperativen periprothetischen Spaltes.

Neben oben erwähnten Optionen der PTH-Monotherapie zeigen klinische Kombinationsstudien mit anderen Wirkstoffen, dass der Effekt von PTH potenzierbar ist. Im Vergleich zur Monotherapie mit PTH/Teriparatid konnte die Knochendichte bei zusätzlicher Gabe von Denosumab oder durch eine anschließende Gabe von Bisphosphonaten weiter gesteigert werden. Diese Ergebnisse zeigten sich bislang bei Untersuchungen der BMD des Beckenskeletts und des proximalen Femur. Für die Knochendichte von Wirbelkörpern konnte in diesen Untersuchungen bisher keine Steigerung verzeichnet werden (Cosman 2014).

Die hier diskutierten Einsatz- und Kombinationsmöglichkeiten zeigen das breite Therapiepotential von PTH bzw. Teriparatid.

Aus diesem Grund sind sowohl auf dem Gebiet der Osteoporoseforschung als auch auf dem Gebiet der Prothetik und Unfallchirurgie weitere Studien nötig, um die hier greifenden Regulationsmechanismen genauer zu verstehen und das therapeutische Potential vollständig und ökonomisch sinnvoll auszuschöpfen.

5 Zusammenfassung

Die Wirbelkörperfraktur ist eine der häufigsten Frakturlokalisationen bei osteoporosekranken Menschen.

Aus diesem Grund sollte an Lendenwirbelkörpern die osteopenen Veränderungen der ovariectomierten Ratte untersucht werden. Des Weiteren sollte die Wirkung einer Teriparatid-Gabe (PTH (1-34)) und ihr Effekt bei unterschiedlichen Spritzintervallen untersucht werden.

In vorliegender Arbeit wurde mit weiblichen Ratten gearbeitet, bei denen durch Ovariectomie eine Osteoporose der Lendenwirbelkörper induziert wurde. Um Aussagen über diesen Knochen zu machen, wurde mit vollständigen Lendenwirbelkörpern der Ratte gearbeitet und diese als Ganzes einem etablierten Kompressionstest unterzogen. Andere Lendenwirbel wurden mittels Veraschung, Gewichts- und Volumenbestimmung sowie mikroradiographischer und biomechanischer Auswertung auf ihre Eigenschaften untersucht.

Die Tiere wurden vor Beginn der PTH-Therapie in sieben Gruppen eingeteilt. Die Kontrollgruppe für die nicht-ovariectomierten Tiere wurde als SHAM und die Kontrollgruppe für die ovariectomierten Tiere als OVX bezeichnet.

Die Gruppen, die mit PTH (1-34) behandelt wurden, erhielten „PTH“ als zusätzliche Gruppenbezeichnung und wurden in unterschiedlichen Intervallen gespritzt.

So standen folgende Gruppen zur Versuchsdurchführung zur Verfügung:

SHAM

SHAM PTH 7. - 35.Tag 5 x pro Woche (SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d).

OVX

OVX PTH 7. - 35.Tag 5 x pro Woche (OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d).

OVX PTH 14. - 28. Tag 5 x pro Woche (OVX PTH 5 x/w 14. - 28. d).

OVX PTH 7. - 35. Tag 5 x pro Woche (OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d).

OVX PTH an jedem zweiten Tag 7. - 35. Tag (OVX PTH qod 7. - 35. d).

Bei der Veraschung zeigten sich in den PTH-Gruppen höhere Wirbelkörpergewichte als in den Kontrollgruppen SHAM und OVX vor und nach Veraschung. Auch konnte ein höherer prozentualer Anteil anorganischer Knochenmasse der SHAM-Kontrollgruppe und aller PTH-gespritzten Tiere, verglichen mit der OVX- Kontrollgruppen verzeichnet werden.

Es zeigte sich im Kompressionstest eine Steigerung der Knochenstabilität, die anhand signifikanter Ergebnisse auf die Anwendung von PTH zurückgeführt werden konnte. Hierbei profitierten die Gruppen SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d, OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d und OVX PTH 5 x/w 14. - 35. d am deutlichsten von der PTH-Therapie, gefolgt von den anderen PTH-Gruppen.

Bei der mikroradiographischen Untersuchung wirkte sich PTH positiv auf die Kortikalisdicke und den kortikalen Knochenanteil aus. Bei den Gruppen SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d, OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d wurde der größte Effekt von PTH aufgezeigt, wobei auch bei den übrigen OVX- Gruppen die osteoanabole Wirkung von PTH nachgewiesen werden konnte.

Auch die Trabekelparameter wurden signifikant durch die Anwendung von PTH beeinflusst. Es zeigte sich eine Zunahme an Trabekelkreuzungen, der Trabekeldicke und der trabekulären Knochenfläche nach PTH-Therapie, wobei dies am deutlichsten in den Ergebnissen der Gruppen SHAM PTH 5 x/w 7. - 35. d und OVX PTH 5 x/w 7. - 35. d beobachtet werden konnte.

PTH erwies in dieser Arbeit somit als potentes Mittel, um die Stabilität und Struktur von Kortikalis und Spongiosa des osteopenen Knochens signifikant zu verbessern.

Bei zusammenfassender Betrachtung zeigte sich das Spritzintervall 5 x/w 7.- 35. d in den Gruppen SHAM und OVX am erfolgreichsten. Dies lässt den Rückschluss zu, dass eine hochdosierte frühzeitige Behandlung mit PTH die besten Ergebnisse hinsichtlich der Knochenstabilität erzielt.

Jedoch zeigten sich auch andere PTH-Intervalle in signifikantem Maße wirkungsvoll, sodass suffiziente PTH-Therapien möglicherweise durch eine weniger häufige Anwendung kosteneffektiver und risikoärmer gestaltet werden können.

Die Therapieoptionen scheinen mit der Behandlung der Osteoporose noch nicht ausgeschöpft zu sein, da sich vielversprechende Erfolge auf anderen Gebieten der Medizin wie zum Beispiel in der Begleittherapie der konservativen und osteosynthetischen Frakturbehandlung oder der Endoprothetik zeigten.

Ein potenzierbarer Effekt der anabolen PTH-Wirkung konnte in der Untersuchung von Kombinationstherapien mit dem Antikörper Denosumab oder bei Anschlusstherapien mit Bisphosphonaten erzielt werden. Eine Wirkverstärkung der bisher zugelassenen Monotherapie durch oben genannte Substanzen ist somit möglich und könnte je nach Schweregrad der Erkrankung in individuellen Therapieplänen einen sinnvollen Einsatz finden.

Um mögliche synergistische Zusammenhänge genauer zu verstehen und um das Potential von PTH auch auf andere Gebiete der Medizin ausdehnen zu können und ökonomisch sinnvoll einzusetzen, sind weitere Untersuchungen dieser komplexen Stoffwechselfvorgänge nötig.

6 Anhang

6.1 Ergebnistabellen

Tabelle 4: Mittelwerte (M), Standardabweichung (SD) und Stichprobenumfang (n) des Gewichtsverlaufes (g) der Versuchstiere

a: signifikant gegenüber SHAM

c: signifikant gegenüber SHAM (PTH 5x/w 7.-35. d)

Woche	SHAM	SHAM PTH 5 x/w 7.-35 d	OVX	OVX PTH 5 x/w 7.-35 d	OVX PTH qod 7.-35 d	OVX PTH 5 x/w 14.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-28. d
	n = 10	n = 11	n = 12	n = 13	n = 12	n = 12	n = 11
0	247 ± 3,54	250 ± 5,70	237 ± 27,55	247 ± 6,24	243 ± 5,44	247 ± 5,70	240 ± 1,35
1	247 ± 3,89	250 ± 18,38	254 ± 13,79	260 ± 4,74	258 ± 11,38	264 ± 18,38	255 ± 13,01
2	253 ± 7,42	263 ± 33,01	288 ^{ac} ± 20,86	289 ^{ac} ± 4,81	288 ^{ac} ± 17,61	299 ^{ac} ± 33,01	288 ^{ac} ± 24,47
3	247 ± 6,15	260 ± 18,81	312 ^{ac} ± 14,58	303 ^{ac} ± 5,78	311 ^{ac} ± 24,47	316 ^{ac} ± 18,81	298 ^{ac} ± 27,01
4	259 ± 3,54	263 ± 19,80	320 ^{ac} ± 16,97	317 ^{ac} ± 16,97	320 ^{ac} ± 34,65	332 ^{ac} ± 19,80	316 ^{ac} ± 27,58
5	261 ± 0,71	271 ± 26,16	325 ^{ac} ± 12,73	322 ^{ac} ± 17,68	325 ^{ac} ± 39,60	337 ^{ac} ± 26,16	324 ^{ac} ± 31,82
6	264 ± 0,92	275 ± 22,63	330 ^{ac} ± 14,42	325 ^{ac} ± 12,02	326 ^{ac} ± 47,38	338 ^{ac} ± 22,63	329 ^{ac} ± 35,36
7	265 ± 0,92	279 ± 20,65	320 ^{ac} ± 48,72	329 ^{ac} ± 9,19	335 ^{ac} ± 54,52	341 ^{ac} ± 20,65	332 ^{ac} ± 33,52
8	263 ± 9,12	288 ± 55,79	332 ^{ac} ± 17,18	330 ^{ac} ± 8,63	335 ^{ac} ± 47,38	347 ^{ac} ± 55,79	339 ^{ac} ± 25,24
9	264	284	317 ^{ac}	321 ^{ac}	315 ^{ac}	326 ^{ac}	326 ^{ac}

	± 11,53	± 22,77	± 14,35	± 11,95	± 50,42	± 22,77	± 21,43
10	263 ± 22,07	281 ± 19,37	315 ^{ac} ± 30,96	316 ^{ac} ± 19,70	326 ^{ac} ± 59,71	333 ^{ac} ± 19,37	324 ^{ac} ± 21,94
11	266 ± 19,33	280 ± 14,79	322 ^{ac} ± 25,20	319 ^{ac} ± 22,25	327 ^{ac} ± 59,44	333 ^{ac} ± 14,79	328 ^{ac} ± 24,03
12	276 ± 24,04	289 ± 9,40	332 ^{ac} ± 26,80	330 ^{ac} ± 27,29	329 ^{ac} ± 53,44	344 ^{ac} ± 9,40	340 ^{ac} ± 25,03
13	274 ± 27,86	288 ± 21,57	341 ^{ac} ± 28,00	331 ^{ac} ± 30,90	34 ^{ac} ± 51,76	346 ^{ac} ± 21,57	340 ^{ac} ± 17,96

Tabelle 5: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang der Wirbelkörpervolumina (mm³)

	SHAM	SHAM PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX	OVX PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX PTH qod 7.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-28. d
	n = 10	n = 11	n = 12	n = 13	n = 12	n = 12	n = 11
M	60,81	56,63	52,90	62,53	59,13	53,66	53,01
SD	± 28,90	± 12,15	± 7,37	± 13,16	± 7,29	± 5,60	± 9,44

Tabelle 6: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang der Gewichte vor Veraschung (g)

a: signifikant gegenüber SHAM

	SHAM	SHAM PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX	OVX PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX PTH qod 7.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-28. d
	n = 10	n = 11	n = 12	n = 13	n = 12	n = 12	n = 11
M	0,23	0,26 ^a	0,25	0,27 ^a	0,27 ^a	0,25	0,26 ^a
SD	± 0,02	± 0,02	± 0,02	± 0,03	± 0,02	± 0,02	± 0,02

Tabelle 7: Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobenumfang der Gewichte nach Veraschung (g)

a: signifikant gegenüber SHAM

b: signifikant gegenüber OVX

	SHAM	SHAM PTH 5 x/w 7.-35. D	OVX	OVX PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX PTH qod 7.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-28. d
	n = 10	n = 11	n = 12	n = 13	n = 12	n = 12	n = 11
M	0,099	0,118 ^{ab}	0,097	0,117 ^{ab}	0,114 ^{ab}	0,111 ^{ab}	0,111 ^b
SD	± 0,005	± 0,009	± 0,009	± 0,011	± 0,012	± 0,006	± 0,011

Tabelle 8: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang der mineralisierten Knochendichte (mg/mm³)

	SHAM	SHAM PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX	OVX PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX PTH qod 7.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-28. d
	n = 10	n = 11	n = 12	n = 13	n = 12	n = 12	n = 11
M	1,82	2,13	1,87	1,92	1,95	2,10	2,13
SD	± 0,48	± 0,30	± 0,29	± 0,29	± 0,20	± 0,22	± 0,31

Tabelle 9: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang der organischen Masse in Prozent an der Knochenmasse des Wirbelkörpers.

b: signifikant gegenüber OVX

	SHAM	SHAM PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX	OVX PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX PTH qod 7.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-28. d
	n = 10	n = 11	n = 12	n = 13	n = 12	n = 12	n = 11
M	57,12 ^b	54,69 ^b	64,32	56,67 ^b	57,39 ^b	57,99 ^b	57,90 ^b
SD	± 1,5	± 1,6	± 1,3	± 1,3	± 3,2	± 1,8	± 2,0

Tabelle 10: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang der anorganischen Masse in Prozent an der Knochenmasse des Wirbelkörpers

b: signifikant gegenüber OVX

	SHAM	SHAM PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX	OVX PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX PTH qod 7.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-28. d
	n = 10	n = 11	n = 12	n = 13	n = 12	n = 12	n = 11
M	42,88 ^b	45,31 ^b	35,68	43,33 ^b	42,61 ^b	42,01 ^b	42,10 ^b
SD	± 1,5	± 1,6	± 1,3	± 1,3	± 3,1	± 1,8	± 2,0

Tabelle 11: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang für den Yield Load (N)

b: signifikant gegenüber OVX

e: signifikant gegenüber OVX (PTH qod 7.-35. d)

	SHAM	SHAM PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX	OVX PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX PTH qod 7.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-28. d
	n = 10	n = 11	n = 12	n = 13	n = 12	n = 12	n = 11
M	191,3	223,9 ^{be}	147,6	185,5	155,5	210,0 ^{be}	181,2
SD	± 36,4	± 43,3	± 24,7	± 47,3	± 34,1	± 40,6	± 45,0

Tabelle 12: Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobenumfang der Steigung (N/ μm)

a: signifikant gegenüber SHAM

b: signifikant gegenüber OVX

	SHAM	SHAM PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX	OVX PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX PTH qod 7.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-28. d
	n = 10	n = 11	n = 12	n = 13	n = 12	n = 12	n = 11
M	133,4	187,7 ^{ab}	114,9	144,9	157,7	142,2	139,3
SD	$\pm 28,3$	$\pm 57,7$	$\pm 19,6$	$\pm 46,0$	$\pm 46,0$	$\pm 38,2$	$\pm 31,0$

Tabelle 13: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang der Maximalkraft (N)

b: signifikant gegenüber OVX

c: signifikant gegenüber SHAM (PTH 5x/w 7.-35. d)

	SHAM	SHAM PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX	OVX PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX PTH qod 7.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-28. d
	n = 10	n = 11	n = 12	n = 13	n = 12	n = 12	n = 11
M	196,1 ^c	269,3	154,7 ^c	229,0 ^b	202,6 ^c	227,7 ^b	214,8 ^{bc}
SD	$\pm 39,8$	$\pm 33,3$	$\pm 23,92$	$\pm 57,23$	$\pm 31,8$	$\pm 31,0$	$\pm 46,3$

Tabelle 14: Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobenumfang für den Messparameter der dorsalen Kortikalisdicke (mm)

a: signifikant gegenüber SHAM

b: signifikant gegenüber OVX

c: signifikant gegenüber SHAM (PTH 5 x/w 7.-35. d)

	SHAM	SHAM PTH 5 x/w 7.-35. D	OVX	OVX PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX PTH qod 7.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-28. d
	n = 10	n = 11	n = 12	n = 13	n = 12	n = 12	n = 11
M	0,23	0,26 ^{ab}	0,24	0,26 ^{ab}	0,26 ^{ab}	0,24 ^{cd}	0,25 ^a
SD	± 0,03	± 0,03	± 0,02	± 0,04	± 0,02	± 0,02	± 0,02

Tabelle 15 Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobenumfang für den kortikalen Knochenanteil (%)

a: signifikant gegenüber SHAM

b: signifikant gegenüber OVX

c: signifikant gegenüber SHAM (PTH 5 x/w 7.-35. d)

d: signifikant gegenüber OVX (PTH 5 x/w 7.-35. d)

	SHAM	SHAM PTH 5 x/w 7.-35. D	OVX	OVX PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX PTH qod 7.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-28. d
	n = 10	n = 11	n = 12	n = 13	n = 12	n = 12	n = 11
M	72,05	77,22 ^a	61,31 ^{ac}	74,44 ^b	69,31 ^{bcd}	69,76 ^{bcd}	69,46 ^{bcd}
SD	± 5,07	± 4,66	± 5,51	± 6,36	± 4,23	± 6,56	± 5,71

Tabelle 16: Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobenumfang für die Dichte der Trabekelkreuzungen (Anzahl/mm²)

a: signifikant gegenüber SHAM

b: signifikant gegenüber OVX

c: signifikant gegenüber SHAM (PTH 5 x/w 7.-35. d)

	SHAM	SHAM PTH 5 x/w 7.-35. D	OVX	OVX PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX PTH qod 7.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-28. d
	n = 10	n = 11	n = 12	n = 13	n = 12	n = 12	n = 11
M	15,68	15,48	11,56 ^{ac}	13,89 ^b	12,18 ^{ac}	13,11 ^{ac}	12,91 ^{ac}
SD	± 2,50	± 4,21	± 2,13	± 4,10	± 1,80	± 2,40	± 2,17

Tabelle 17: Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobenumfang für den Messparameter Anzahl der Trabekelkreuzungen (absolut)

a: signifikant gegenüber SHAM

c: signifikant gegenüber SHAM (PTH 5x/w 7.-35. d)

	SHAM	SHAM PTH 5 x/w 7.-35. D	OVX	OVX PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX PTH qod 7.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-28. d
	n = 10	n = 11	n = 12	n = 13	n = 12	n = 12	n = 11
M	119,7	114,7	95,7 ^{ac}	101,6 ^{ac}	98,3 ^{ac}	97,9 ^{ac}	96,5 ^{ac}
SD	± 17,4	± 21,9	± 16,5	± 18,6	± 19,5	± 19,9	± 22,5

Tabelle 18: Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobenumfang des Messparameters der mittleren Trabekeldicke (μm)

a: signifikant gegenüber SHAM

b: signifikant gegenüber OVX

c: signifikant gegenüber SHAM (PTH 5 x/w 7.-35. d)

d: signifikant gegenüber OVX (PTH 5 x/w 7.-35. d)

	SHAM	SHAM PTH 5 x/w 7.-35. D	OVX	OVX PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX PTH qod 7.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-28. d
	n = 10	n = 11	n = 12	n = 13	n = 12	n = 12	n = 11
M	8,33	9,09 ^a	7,48 ^{ac}	9,25 ^{ab}	8,58 ^{bd}	8,32 ^{bcd}	8,32 ^{bcd}
SD	$\pm 1,15$	$\pm 0,88$	$\pm 0,72$	$\pm 0,91$	$\pm 0,62$	$\pm 1,48$	$\pm 0,76$

Tabelle 19: Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobenumfang der absoluten Trabekelfläche (mm^2)

b: signifikant gegenüber OVX

	SHAM	SHAM PTH 5 x/w 7.-35. D	OVX	OVX PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX PTH qod 7.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-28. d
	n = 10	n = 11	n = 12	n = 13	n = 12	n = 12	n = 11
M	7,80	7,18 ^b	8,51	7,74	8,13	8,05	7,84
SD	$\pm 1,48$	$\pm 1,44$	$\pm 1,84$	$\pm 1,84$	$\pm 1,57$	$\pm 1,59$	$\pm 1,88$

Tabelle 20: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang der Knochenfläche der Trabekel (absolut)

b: signifikant gegenüber OVX

	SHAM	SHAM PTH 5 x/w 7.-35. D	OVX	OVX PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX PTH qod 7.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-28 d
	n = 10	n = 11	n = 12	n = 13	n = 12	n = 12	n = 11
M	4,87 ^b	4,89 ^b	4,01	4,94 ^b	4,50	4,70 ^b	4,42
SD	± 0,99	± 0,89	± 0,98	± 0,98	± 1,02	± 0,97	± 1,08

Tabelle 21: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang für die mittlere Trabekellänge (µm)

a: signifikant gegenüber SHAM

b: signifikant gegenüber OVX

c: signifikant gegenüber SHAM (PTH 5 x/w 7.-35. d)

	SHAM	SHAM PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX	OVX PTH 5 x/w 7.-35. d	OVX PTH qod 7.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-35. d	OVX PTH 5 x/w 14.-28. d
	n = 10	n = 11	n = 12	n = 13	n = 12	n = 12	n = 11
M	4,90	4,79	5,62 ^{ac}	5,29 ^{abc}	5,49 ^{ac}	5,33 ^{abc}	5,36 ^{abc}
SD	± 0,33	± 0,29	± 0,51	± 0,56	± 0,42	± 0,47	± 0,42

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Dosierungsschema der PTH-Substitution in Tagen nach Osteotomie	30
Tabelle 2: Messparameter zur Auswertung der Mikroradiographien	42
Tabelle 3: Versuchsgruppen und Stichprobenumfang (n) pro Gruppe.....	44
Tabelle 4: Mittelwerte (M), Standardabweichung (SD) und Stichprobenumfang (n) des Gewichtsverlaufes (g) der Versuchstiere	77
Tabelle 5: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang der Wirbelkörpervolumina (mm ³)	78
Tabelle 6: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang der Gewichte vor Veraschung (g).....	79
Tabelle 7: Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobenumfang der Gewichte nach Veraschung (g).....	79
Tabelle 8: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang der mineralisierten Knochendichte (mg/mm ³)	80
Tabelle 9: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang der organischen Masse in Prozent an der Knochenmasse des Wirbelkörpers.	80
Tabelle 10: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang der anorganischen Masse in Prozent an der Knochenmasse des Wirbelkörpers.....	81
Tabelle 11: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang für den Yield Load (N)	81
Tabelle 12: Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobenumfang der Steigung (N/μm).....	82
Tabelle 13: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang der Maximalkraft (N)	82
Tabelle 14: Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobenumfang für den Messparameter der dorsalen Kortikalisdicke (mm).....	83
Tabelle 15 Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobenumfang für den kortikalen Knochenanteil (%)	83
Tabelle 16: Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobenumfang für die Dichte der Trabekelkreuzungen (Anzahl/mm ²)	84
Tabelle 17: Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobenumfang für den Messparameter Anzahl der Trabekelkreuzungen (absolut)	84
Tabelle 18: Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobenumfang des Messparameters der mittleren Trabekeldicke (μm)	85
Tabelle 19: Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobenumfang der absoluten Trabekelfläche (mm ²)	85
Tabelle 20: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang der Knochenfläche der Trabekel (absolut)	86
Tabelle 21: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang für die mittlere Trabekellänge (μm)	86

7 Literaturverzeichnis

Aleksyniene R, Thomsen JS, Eckardt H, Bundgaard KG, Lind M, Hvid I (2009): Parathyroid hormone PTH (1-34) increases the volume, mineral content, and mechanical properties of regenerated mineralizing tissue after distraction osteogenesis in rabbits. *Acta Orthop* 80(6), 716-723

Andreassen TT, Ejersted C, Oxlund H (1999): Intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing fractures. *J Bone Miner Res* 14(6), 960-968

Aspenberg P, Genant HK, Johansson T, Nino AJ, See K, Krohn K, Garcia-Hernandez PA, Recknor CP, Einhorn TA, Dalsky GP et al. (2010): Teriparatide for acceleration of fracture repair in humans: a prospective, randomized, double-blind study of 102 postmenopausal women with distal radial fractures. *J Bone Miner Res* 25(2), 404-414

August F: Einfluss von Parathormon auf die Frakturheilung der proximalen metaphysären Tibia im Rattentiermodell. Med. Diss. Göttingen 2012

Bagi CM, Ammann P, Rizzoli R, Miller SC (1997): Effect of estrogen deficiency on cancellous and cortical bone structure and strength of the femoral neck in rats. *Calcif Tissue Int* 61(4), 336-344

Banu J, Kalu DN (2002): Effects of cerivastatin and parathyroid hormone on the lumbar vertebra of aging male Sprague-Dawley rats. *Bone* 31(1), 173-179

Bauer W, Aub JC, Albright F (1929): studies of calcium and phosphorus metabolism: a study of the bone trabeculae as a readily available reserve supply of calcium. *J Exp Med* 49(1), 145-162

- Black DM, Thompson DE, Bauer DC, Ensrud K, Musliner T, Hochberg MC, Nevitt MC, Suryawanshi S, Cummings SR (2000): Fracture risk reduction with alendronate in women with osteoporosis: the Fracture Intervention Trial. FIT Research Group. *J Clin Endocrinol Metab* 85(11), 4118-4124
- Bonjour JP, Theintz G, Law F, Slosman D, Rizzoli R (1994): Peak bone mass. *Osteoporos Int* 4 Suppl 1, 7-13
- Boonen S, Adachi JD, Man Z, Cummings SR, Lippuner K, Torring O, Gallagher JC, Farrerons J, Wang A, Franchimont N et al. (2011): Treatment with denosumab reduces the incidence of new vertebral and hip fractures in postmenopausal women at high risk. *J Clin Endocrinol Metab* 96(6), 1727-1736
- Boron WF, Boulpaep EL: *Medical Physiology: a cellular approach*. Elsevier Inc., Philadelphia 2005
- Burr DB, Allen MR: *Basic and Applied Bone Biology*. Academic Press, Amsterdam 2013
- Calvi LM, Bromberg O, Rhee Y, Weber JM, Smith JN, Basil MJ, Frisch BJ, Bellido T (2012): Osteoblastic expansion induced by parathyroid hormone receptor signaling in murine osteocytes is not sufficient to increase hematopoietic stem cells. *Blood* 119(11), 2489-2499
- Cao JJ (2011): Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res* 6, 30
- Capriani C, Irani D, Bilezikian JP (2012): Safety of osteoanabolic therapy: a decade of experience. *Journal of bone and mineral Research* 27(12), 2419-2428

- Chandra A, Lan S, Zhu J, Lin T, Zhang X, Siclari VA, Altman AR, Cengel KA, Liu XS, Qin L (2013): PTH prevents adverse effects of focal radiation on bone architecture in young rats. *Bone* 55(2), 449-457
- Chesnut CH 3rd, Silverman S, Andriano K, Genant H, Gimona A, Harris S, Kiel D, LeBoff M, Maricic M, Miller P et al. (2000): A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the prevent recurrence of osteoporotic fractures study. PROOF Study Group. *Am J Med* 109(4), 267-276
- Chevalley T, Bonjour JP, van Rietbergen B, Ferrari S, Rizzoli R (2013): Fracture history of healthy premenopausal women is associated with a reduction of cortical microstructural components at the distal radius. *Bone* 55(2), 377-383
- Cohen A, Dempster DW, Recker RR, Lappe JM, Zhou H, Zwahlen A, Müller R, Zhao B, Guo X, Lang T et al. (2013): Abdominal fat is associated with lower bone formation and inferior bone quality in healthy premenopausal women: a transiliac bone biopsy study. *J Clin Endocrinol Metab* 98(6), 2562-2572
- Colnot C (2009): Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *J Bone Miner Res* 24(2), 274-282
- Cosman F (2014): Anabolic antiresorptive therapy for osteoporosis: combination and sequential approaches. *Curr Osteoporos Res* 12(4), 385-395
- Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A et al. (2009): Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 361(8), 756-765
- Daugaard H, Emengaard B, Andreassen T, Bechtold J, Lamberg A, Soballe K (2011): Parathyroid hormone treatment increases fixation of orthopedic implants with gap

healing: a biomechanical and histomorphometric canine study of porous coated titanium alloy implants in cancellous bone. *Calcif Tissue Int* 88(4), 294-303

Dempster DW, Cosman F, Kurland ES, Zhou H, Nieves J, Woelfert L, Shane E, Plavetic K, Müller R, Bilezikian J et al. (2001): Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone microarchitecture and turnover in patients with osteoporosis: a paired biopsy study. *J Bone Miner Res* 16(10), 1846-1853

Deutsches Ärzteblatt (2007): Therapiehinweis zu Teriparatid vom 21. November 2006: Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Arzneimittelrichtlinie/AMR in Anlage 4: Jg 104 (Heft 15), A1043-1046

Deutsches Ärzteblatt (2010): Osteoporose: Teriparatid bei hohem Frakturrisiko. Jg 107 (Heft 24), A1224

Dobnig H, Turner RT (1997): The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats. *Endocrinology* 138(11), 4607-4612

Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL (2003): Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 111(8), 1221-1230

Ejersted C, Andreassen TT, Hauge EM, Melsen F, Oxlund H (1995): Parathyroid hormone (1-34) increases vertebral bone mass, comprehensive strength, and quality in old rats. *Bone* 17 (6),507-511

Elraiyah T, Gionfriddo MR und Murad MH (2015): acting on black box warnings requires a grade evidence table and an implementation guide: the case of teriparatide. *Journal of clinical epidemiology* 68(6), 698-702

- EMA European medicines agency- Committee for medical products for human use (CHMP) (2012): Press release: European medicines agency recommends limiting long-term use of calcitonin medicines. Intranasal formulation for osteoporosis treatment to be withdrawn; new restriction to indication for injectable use in Paget's disease
- EMA European medicines agency- Human medicines development and evaluation (2014): Public statement on Preotact (PTH (parathyroid hormone)). Withdrawal of the marketing authorization in the European Union
- Erren M: Entwicklung eines biomechanischen Kompressionstests für den Lendenwirbelkörper der Ratte zur Untersuchung antiosteoporotischer Substanzen: Kurzzeiteffekte von Östrogen, Phytohormonen und Parathormon. Med. Diss. Göttingen 2008
- Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR, Stakkestad J et al. (1999): Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple outcomes of raloxifene evaluation (MORE) investigators. JAMA 282(7): 637-645
- Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Anderson JJ (1993): Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. J Bone Miner Res 8(5), 567-573
- Fox J, Miller MA, Newman MK, Metcalfe AF, Turner CH, Recker RR, Smith SY (2006): Daily treatment of aged ovariectomized rats with human parathyroid hormone (1-84) for 12 months reverses bone loss and enhances trabecular and cortical bone strength. Calcif Tissue Int 79(4), 262-272
- Fox J, Newman MK, Turner CH, Guldborg RE, Varela A, Smith SY (2008): Effects of treatment with parathyroid hormone 1-84 on quantity and biomechanical properties of thoracic

vertebral trabecular bone in ovariectomized rhesus monkeys. *Calcif Tissue Int* 82(3), 212-220

Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ (1998): TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 188(5), 997-1001

Gao Y, Wu X, Terauchi M, Li JY, Grassi F, Galley S, Yang X, Weitzmann MN Pacifici R (2008): T cells potentiate PTH-induced cortical bone loss through CD40L signaling. *Cell Metab* 8(2), 132-145

Gardella TJ, Jueppner H (2001): Molecular properties of the PTH/PTHrP receptor. *Trends Endocrinol Metab* 12(5), 210-217

Greenspan SL, Bone HG, Ettinger MP, Hanley DA, Lindsay R, Zanchetta JR, Blosch CM, Mathisen AL, Morris SA, Marriott TB (2007): Effect of recombinant human parathyroid hormone (1-84) on vertebral fracture and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 146(5), 326-339

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

Harada S, Rodan GA (2003): Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423(6937), 349-355

Harris ST, Dallal G, Dawson-Hughes B (1992): Influence of Body Weight on Rates of Change in Bone Density of the Spine, Hip and Radius in Postmenopausal Women. *Calcif Tissue Int* 50(1), 19-23

- Harris ST, Watts NB, Genant HK, McKeever CD, Hangartner T, Keller M, Chesnut CH 3rd, Brown J, Eriksen EF, Hoseney MS et al. (1999): Effects of risendronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. Vertebral Efficacy With Risedronate Therapy (VERT) Study Group. JAMA 282(14), 1344-1352
- Hodsman A, Bauer DC, Dempster DW, Dian L, Hanley DA, Harris ST, Kendler DL, McClung MR, Miller PD, Olszynski WP et al. (2005): Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. Endocr Rev 26(5), 688-703
- Hodsman A, Papaioannou A, Cranney A (2006): Clinical practice guidelines for the use of parathyroid hormone in the treatment of osteoporosis. CMAJ 175(1): 48
- Jerome CP, Burr DB, Van Bibber T, Hock JM, Brommage R (2001): Treatment with human parathyroid hormone (1-34) for 18 months increases cancellous bone volume and improves trabecular architecture in ovariectomized cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Bone 28(2), 150-159
- Jilka RL (2007): Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. Bone 40(6), 1434-1446
- Junqueira LC, Carneiro J, Gratzl M (Hrsg): Histologie (6.Aufl.); Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2005
- Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner 15(3), 175-191

Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ (2008): Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 29(2), 155-192

Kin K, Kushida K, Yamazaki K, Okamoto S, Inoue T (1991): Bone mineral density of the spine in normal Japanese subjects using dual-energy x-ray absorptiometry: Effect of obesity and menopausal status. *Calcif Tissue Int* 49(2), 101-106

Komrakova M, Werner C, Wicke M, Nguyen BT, Sehmisch S, Tezval M, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Effect of daidzein, 4-methylbenzylidene camphor or estrogen on gastrocnemius muscle of osteoporotic rats undergoing tibia healing period. *J Endocrinol* 201(2), 253-262

Komrakova M, Stuermer EK, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, Tezval M, Daub F, Martens T, Witzenhausen P et al. (2010) Effect of human parathyroid hormone hPTH (1-34) applied at different regimes on fracture healing and muscle in ovariectomized and healthy rats. *Bone* 47(3), 480-492

Kostenuik PJ, Shalhoub V (2001): Osteoprotegerin: a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption. *Curr Pharm Des* 7(8), 613-635

Kudlacek S, Willvonseder R (2003): Diagnose Osteoporose beim Mann. *Blickpunkt DER MANN*. 1(2), 17-19

Lane NE, Sanchez S, Modin GW, Genant HK, Pierini HK, Arnaud CD (2000): Bone mass continues to increase at the hip after parathyroid hormone treatment is discontinued in glucocorticoid-induced osteoporosis: results of a randomized controlled clinical trial. *J Bone Miner Res* 15(5), 944-951

Leitlinie Osteoporose s. Internetquellen, DVO-Leitlinie 2014

- Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA (2008): The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 58(5), 424-430
- Lindsay R, Zhou H, Cosman F, Nieves J, Dempster DW, Hodsman AB (2007): Effects of a one-month treatment with PTH (1-34) on bone formation on cancellous, endocortical and periosteal surfaces of the human ilium. *J Bone Miner Res* 22(4), 495-502
- Link, T, Vieth V, Matheis J, Newitt D, Lu Y, Rummeny E, Majumdar S: Bone structure of the distal radius and the calcaneus versus BMD of the spine and proximal femur in the prediction of osteoporotic spine fractures. *Eur. Radiol.* 12(2002), 401–408
- Lips P, van Schoor NM (2005): Quality of life in patients with osteoporosis. *Osteoporos Int* 16(5), 447-455
- Lüllmann-Rauch R: Taschenlehrbuch Histologie (3.Aufl.); Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2009
- Manolagas SC (2000): Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21(2), 115-137
- MacCallum WG, Vogel KM (1913): Further experimental studies in tetany. *J Exp Med* 18(6), 618-650
- Mashiba T, Burr DB, Turner CH, Sato M, Cain RL, Hock JM (2001): Effects of human parathyroid hormone (1-34), LY333334, on bone mass, remodeling, and mechanical properties of cortical bone during the first remodeling cycle in rabbits. *Bone* 28(5), 538-542

- Mather J, MacDermid JC, Faber KJ, Athwal GS (2013): Proximal humerus cortical bone thickness correlates with bone mineral density and can clinically rule out osteoporosis. *J Shoulder Elbow Surg* 22(6), 732-738
- Meunier PJ, Roux C, Ortolani S, Diaz-Curiel M, Compston J, Marquis P, Cormier C, Isaia G, Badurski J, Wark JD et al. (2009): Effects of long-term strontium ranelate treatment on vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis. *Osteoporos Int* 20(10), 1663-1673
- Millett PJ, Cohen B, Allen MJ, Rushton N (1996): Bone mineral density changes during fracture healing: a densitometric study in rats. Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Atlanta
- Mosekilde L, Thomsen JS, McOsker JE (1997): No loss of biomechanical effects after withdrawal of short-term PTH treatment in an aged, osteopenic, ovariectomized rat model. *Bone* 20(5), 429-437
- Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsmann AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK et al. (2001): Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 344(19), 1434-1441
- NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy (2001): Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 285(6), 785-795
- Oteo-Alvaro A, Moreno E (2010): Atrophic humeral shaft nonunion treated with teriparatide (rhPTH 1-34): a case report. *J Shoulder Elbow Surg* 19(7), e 22-e28
- Pacifici R (1998): Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. *Endocrinology* 139(6), 2659-2661

- Panula J, Pihlajamäki H, Mattila VM, Jaatinen P, Vahlberg T, Aarnio P, Kivelä SL (2011): Mortality and cause of death in hip fracture patients aged 65 or older: a population-based study. *BMC Musculoskelet Disord* 12, 105
- Parfitt AM, Chairman MD, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987): Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units: Report of the asbmr histomorphometry nomenclature committee. *Journal of Bone and Mineral Research* 2(6), 595-610
- Peichel P, Holzer LA, Maier R, Holzer G (2011): Parathyroid hormone 1-84 accelerates fracture healing in pubic bones of elderly osteoporotic women. *J Bone Joint Surg Am.* 93(17), 1583-1587
- Penido MG, Alon US (2012), Phosphate homeostasis and its role in bone health. *Pediatr Nephrol* 27(11): 2039-2048
- Potts JT (2005): Parathyroid hormone: past and present. *J Endocrinol* 187(3), 311-325
- Potts JT , Kronenberg HM, Habener JF, Rich A (1980): Biosynthesis of parathyroid hormone. *Ann N Y Acad Sci* 343, 38-55
- Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC (2011): Osteoporosis: now and the future. *Lancet* 377(9773), 1276-87
- Raschke MJ, Stange R (Hrsg): *Alterstraumatologie- Prophylaxe, Therapie und Rehabilitation.* 1.Aufl., Elsevier, Urban und Fischer Verlag, München, 2009
- Reeve J, Meunier PJ, Parsons JA, Bernat M, Bijvoet OL, Courpron P, Edouard C, Klenerman L, Neer RM, Renier JC et al. (1980): Anabolic effect of human parathyroid hormone

fragment on trabecular bone in involutional osteoporosis: a multicentre trial. Br Med J 280(6228), 1340-1344

Reginster JY, Hiligsmann M, Bruyere O (2010): Strontium ranelate: long-term-efficacy against vertebral, nonvertebral and hip fractures in patients with postmenopausal osteoporosis. Ther Adv Musculoskelet Dis 2(3), 133-143

Resmini G, Iolascon G (2007): 79-year old post-menopausal woman with humerus fracture during teripartide treatment. Aging Clin Exp Res 19(4 Suppl), 30-31

Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P (1998): Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. Med Eng Phys 20(2), 92-102

Riggs BL (2000): The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. J Clin Invest 106(10), 1203-1204

Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd (1998): A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. J Bone Miner Res 13(5), 763-773

Rodan GA, Martin TJ (2000): Therapeutic approaches to bone diseases. Science 289(5484), 1508-1514

Saito H, Takeda S, Amizuka N (2013): Eldecacitol and calcitriol stimulates 'bone minimodeling, focal bone formation without prior bone resorption, in rat trabecular bone. J Steroid Biochem Mol Biol 136, 178-182

Schmidt RF, Lang F, Heckmann M: Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 31. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2010

- Schwartz AV, Sigurdsson S, Hue TF, Lang TF, Harris TB, Rosen CJ, Vittinghoff E, Siggeirsdottir K, Oskarsdottir KS, Shet K, Palermo L, Gudnason V, Li X (2013): Vertebral Bone Marrow Fat Associated With Lower Trabecular BMD and Prevalent Vertebral Fracture in Older Adults. *J Clin Endocrinol Metab* 98(6), 2294-2300
- Scillitani A, Guarnieri V, Battista C, Chiodini I, Salcuni AS, Minisola S, Fancucci CM, Carnevale V (2011): Carboxyl-terminal parathyroid hormone fragments: biologic effects. *J Endocrinol Invest* 34(7 Suppl), 23-36
- Sehmisch S, Galal R, Kolios L, Tezval M, Dullin C, Zimmer S, Stuermer KM, Stuermer EK (2009a): Effects of low-magnitude, high-frequency mechanical stimulation in the rat osteopenia model. *Osteoporos Int* 20(12), 1999-2008
- Sehmisch S, Erren M, Rack T, Tezval M, Seidlova-Wuttke D, Richter J, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2009b): Short-term effects of parathyroid hormone on rat lumbar vertebrae. *Spine* 34(19), 2014-2021
- Shahnazari M, Yao W, Wang B, Panganiban B, Ritchie RO, Hagar Y, Lane NE (2011): Differential maintenance of cortical and cancellous bone strength following discontinuation of bone-active agents. *J Bone Miner Res* 26(3), 569-581
- Sheu Y and Cauley JA (2011): The role of bone marrow and visceral fat on bone metabolism. *Curr Osteoporos Rep* 9(2), 67-75
- Silbernagl S, Despopoulos A: Taschenatlas der Physiologie. 6. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003
- Silverman SL (2005): Quality-of-life issues in osteoporosis. *Curr Rheumatol Rep* 7(1), 39-45

Søgaard CH, Wronski TJ, McOsker JE, Mosekilde L (1994): The positive effect of parathyroid hormone on femoral neck bone strength in ovariectomized rats is more pronounced than that of estrogen or bisphosphonates. *Endocrinology* 134(2), 650-657

Spinas GA (Hrsg.), Fischli S (Hrsg.), Berneis K, Imthurn B, Kraenzlin ME: *Endokrinologie und Stoffwechsel kompakt*. 1. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2011

Stürmer EK, Seidlova-Wuttke D, Sehmisch S, Rack T, Wille J, Frosch KH, Wuttke W, Stürmer KM (2006): Standardized bending and breaking test for the normal and osteoporotic metaphyseal tibias of the rat: effect of estradiol, testosterone, and raloxifene. *J Bone Miner Res* 21(1), 89-96

Stürmer EK, Komrakova M, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, Tezval M, Utesch C, Mangal O, Zimmer S, et al. (2010): Musculoskeletal Response to Whole-Body Vibration During Fracture Healing in Intact and Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int* 87(2), 168-180

Suda T, Kobayashi K, Jimi E, Udagawa N, Takahashi N (2001): The molecular basis of osteoclast differentiation and activation. *Novartis Found Symp* 232: 235-247, discussion 247-250

Tang GY, Ly ZW, Tang RB, Liu Y, Peng YF, Li W, Chen YS (2010): Evaluation of MR spectroscopy and diffusion-weighted MRI in detecting bone marrow changes in postmenopausal women with osteoporosis. *Clin Radiol* 65(5), 377-381

Teitelbaum SL (2000): Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289(5484), 1504-1508

Teti A, Marchisio PC, Zallone AZ (1991): Clear zone in osteoclast function: role of podosomes in regulation of bone-resorbing activity. *Am J Physiol* 261(1Pt1):C1-C7

- Tezval M, Banhardt A, Sehmisch S, Kolios L, Schmelz U, Stuermer KM, Stuermer EK (2011): The effects of parathyroid hormone applied at different regimes on the trochanteric region of the femur in ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Osteoporos* 2011(2011), article ID 363617
- Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ (1995): FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 17(4 Suppl), 125-133
- Tsuchida T, Miyakoshi N, Kudo T, Tamura Y, Kasukawa Y, Suzuki K, Sato K (2001): Restoring effect of human parathyroid hormone (1-34) on trabecular connectivity in ovariectomized rats. *Tohoku J Exp Med* 194(4), 213-221
- Turner CH, Warden SJ, Bellido T, Plotkin LI, Kumar N, Jasiuk I, Danzig J, Robling AG (2009): Mechanobiology of the skeleton. *Sci Signal* 2(68), pt3
- Turner RT, Hannon KS, Demers LM, Buchanan J, Bell NH (1989): Differential effects of gonadal function on bone histomorphometry in male and female rats. *J Bone Miner Res* 4(4), 557-563
- Vahle JL, Sato M, Long GG, Young JK, Francis PC, Engelhardt JA, Westmore MS, Yanfei L, Nold JB (2002): Skeletal changes in rats given daily subcutaneous injections of recombinant human parathyroid hormone (1-34) for 2 years and relevance to human safety. *Toxicologic Pathology* 30(3), 312-321
- Wegorzewska IN, Walters K, Weiser MJ, Cruthirds DF, Ewell E, Larco DO, Handa RJ, Wu TJ (2008): Postovarectomy weight gain in female rats is reversed by estrogen receptor alpha agonist, propylpyrazoletriol. *Am J Obstet Gynecol* 199(1), 67.e1-e5
- Weiner S, Traub W, Wagner HD (1999): Lamellar bone: structure-function relations. *J Struct Biol*. 126(3), 241-255

Wolff J : Das Gesetz der Transformation der Knochen. Hirschwald, Berlin 1892

Wronski TJ, Yen CF (1994): Anabolic effects of parathyroid hormone on cortical bone in ovariectomized rats. *Bone* 15(1), 51-58

Wronski TJ, Dann LM, Horner SL (1989): Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 10(4), 295-301

Yamaguchi A, Komori T, Suda T (2000): Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 21(4), 393-411

Yeung DK, Griffith JF, Antonio GE, Lee FK, Woo J, Leung PC (2005): Osteoporosis is associated with increased marrow fat content and decreased marrow fat unsaturation: a proton MR spectroscopy study. *J Magn Reson Imaging* 22(2), 279-285

Zhang X, Awad HA, O'Keefe RJ, Guldberg RE, Schwarz EM (2008): A perspective: engineering periosteum for structural bone graft healing. *Clin Orthop Relat Res* 466(8), 1777-1787

Internetquellen:

http://www.dv-osteologie.org/dvo_leitlinien/osteoporose-leitlinie-2014 (2014):

„Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen“. <http://www.dv-osteologie.org/uploads/Leitlinie%202014/DVO-Leitlinie%20Osteoporose%202014%20Kurzfassung%20und%20Langfassung%20Version%201a%2012%2001%202016.pdf>

<http://www.uptodate.com> (2011) „Parathyroid hormone therapy for osteoporosis“. Zugriff am 05.12.2011 von: http://www.uptodate.com/contents/parathyroid-hormone-therapy-for-osteoporosis?source=search_result&selectedTitle=5~150#H31

<http://www.uptodate.com> (2014) "Parathyroid hormone therapy for osteoporosis". Zugriff am 09.10.2014 von: http://www.uptodate.com/contents/parathyroid-hormone-therapy-for-osteoporosis?source=search_result&search=parathyroid+hormone&selectedTitle=3~150

Danksagung

Dem ehemaligen Abteilungsleiter Herrn Prof. Dr. med. Klaus Micheal Stürmer danke ich für die freundliche Überlassung des interessanten Themas.

Frau PD Dr. med. Ewa Stürmer danke ich für die wertvolle Unterstützung während der intensiven experimentellen Arbeitsphase.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Stephan Sehmisch. Jederzeit gewährte er mir sachkundige und unverzügliche Unterstützung. Seine wegweisenden und kreativen Ideen haben im Wesentlichen zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen.

Für die unermüdliche und professionelle Unterstützung im Labor und für ihre zahlreichen Tipps bis zur Fertigstellung der Arbeit bedanke ich mich vor allem bei Frau Dr. rer. nat. Marina Komrakova und Frau Annette Witt sowie bei Frau Ramona Castro-Machgut.

Lebenslauf

Barbara Simon

Ich wurde am 11.11.1983 in Nürnberg geboren. Während meiner Kindergartenzeit und Schulzeit lebte ich in Neumarkt in der Oberpfalz. Meine Einschulung erfolgte in der Grundschule Hasenheide in Neumarkt, welche ich von 1991-1994 bis zum Abschluss der 4. Klasse besuchte. Im Anschluss besuchte ich bis zur 13. Klasse von 1994-2003 das Ostendorfer Gymnasium in Neumarkt. Die allgemeine Hochschulreife erwarb ich im Juni 2003. Im April 2004 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen, welches ich im November 2011 erfolgreich abschloss. Seither habe ich an meiner Promotion mit dem Titel: „Intermittierende PTH-Applikation zur Osteopenie-Therapie im weiblichen Rattenmodell“ gearbeitet. Seit Februar 2011 nahm ich als Honorarärztin regelmäßig an Tag- und Nachtdiensten an der psychiatrischen Klinik St. Ansgar in Twistringen teil. Vom 15.01.2012 bis zum 31.12.2013 arbeitete ich als Assistenzärztin für Chirurgie am Evangelischen Krankenhaus Ludwigsfelde/ Teltow und bin seit dem 01.01.2014 als Assistenzärztin für Radiologie am Unfallkrankenhaus in Berlin angestellt.