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

Wirkung von Baicalein auf die Lendenwirbelsäule der osteoporotischen Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Stephan-Andre Gleitz

aus

Hannover

Göttingen 2022

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent:	Prof. Dr. Stephan Sehmisch
Ko-Referent:	Prof. Dr. Dr. Karl Günter Wiese

Datum der mündlichen Prüfung: 15.06.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Wirkung von Baicalein auf die Lendenwirbelsäule der osteoporotischen Ratte" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

(Unterschrift)

.....

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Saul D, **Gleitz S**, Nguyen HH, Kosinsky RL, Sehmisch S, Hoffmann DB, Wassmann M, Menger B, Komrakova M (2017): Effect of the lipoxygenase-inhibitors baicalein and zileuton on the vertebra in ovariectomized rats. Bone <u>101</u>, 134–144

Inhaltsverzeichnis

Abkürzu	ngsverzeichnis	VI
1 Einl	eitung	1
1.1	Zielsetzung	1
1.2	Knochenaufbau	1
1.3	Knochenzellen	2
1.3.1	Osteoblasten	2
1.3.2	Osteozyten	
1.3.3	Osteoklasten	
1.4	Frakturen	2
1.5	Osteoporose	
1.5.1	Definition	
1.5.2	Epidemiologie	
1.5.3	Die Entstehung der Osteoporose und Knochenremodelling	(
1.5.4	Einflussfaktoren und verschiedene Ursachen	
1.	5.4.1 Östrogenmangel in der Peri- und Postmenopause	
1.	5.4.2 Vitamin-D- und Kalziummetabolismus	
1.	5.4.3 Glukokortikoide	
1.5.5	Osteodensitometrie (Knochendichtemessung)	10
1.5.6	Prävention und Therapie	1
1.	5.6.1 Allgemeine Ziele	11
1.	5.6.2 Vitamin-D- und Kalzium-Supplementierung	12
1.	5.6.3 Körperliche Aktivität	13
1.	5.6.4 Medikamentöse Therapiemöglichkeiten	13
1.6	Baicalein	1!
2 Mat	erial und Methoden	18
2.1	Die Versuchstiere	18
2.2	Aufbau der Versuchsgruppen	18
2.3	Versuchsablauf	19
2.3.1	Ovariektomie	19
2.3.2	Osteotomie	20
2.3.3	Baicalein-Applikation	20
2.3.4	Versuchsende und Freipräparation der Wirbelkörper	20
2.4	Biomechanischer Kompressionstest	2
2.4.1	Validierung des Testverfahrens	22
2.4.2	Versuchsdurchführung	2
2.4.3	Die Messparameter	22
2.4	4.3.1 Die Maximalkraft (fmax)	22
2.4	4.3.2 Die Streckgrenze (Yield Load)	22
2.4	4.3.3 Die Steigung	22

	2.5	Vera	schungstest	23
	2.5.1	Ве	stimmung der organischen und anorganischen Knochensubstanz	23
	2.5.2	Be	stimmung des Kalziums und des Phosphats	24
	2.	.5.2.1	Herstellung des Säureaufschlusses und Verdünnung	24
	2.	.5.2.2	Phosphatbestimmung	25
	2.	.5.2.3	Kalziumbestimmung	25
	2.6	Mikr	co-CT-Analyse	26
	2.6.1	Dı	urchführung der Wirbelkörper-Scans	26
	2.6.2	Di	e 3D-Auswertung	26
	2.	.6.2.1	Das 3D-Bildbearbeitungsprogramm	26
	2.	.6.2.2	Bestimmung der Messparameter der 3D-Darstellung	27
	2.6.3	Di	e 2D-Auswertung	31
	2.	.6.3.1	Bestimmung der Messparameter der 2D-Darstellung	31
	2.	.6.3.2	Die Graudetektion	32
	2.	.6.3.3	Messung der Gesamtfläche	32
	2.	.6.3.4	Trennung von Kortikalis- und Trabekelfläche	33
	2.	.6.3.5	Bestimmung der ventralen und dorsalen Kortikalisdicke	34
	2.	.6.3.6	Messparameter der 2D-Auswertung	35
	2.7	Die s	statistische Auswertung	36
3	Erg	ebnis	se	37
	3.1	Körp	ergewichte der Versuchstiere	37
	3.2	Uter	usgewichte der Versuchstiere	38
	3.3	Erge	bnisse des biomechanischen Kompressionstests	39
	3.3.1	Er	gebnisse der Maximalkraft(fmax)-Testung	39
	3.3.2	Er	gebnisse der Steigung	40
	3.3.3	Er	gebnisse der Streckgrenze(Yield Load)-Testung	41
	3.3.4	- Zu	isammenfassung der Ergebnisse der biomechanischen Kompression	41
	3.4	Erge	bnisse des Veraschungstests	42
	3.4.1	Er	gebnisse der Bestimmung der organischen Knochensubstanz	42
	3.4.2	Er	gebnisse der Bestimmung der anorganischen Knochensubstanz	42
	3.4.3	Er	gebnisse der Kalziumgehaltberechnung	43
	3.4.4	- Er	gebnisse der Phosphatgehaltberechnung	44
	3.4.5	v Ve	erhältnis Kalzium/Phosphat (Ca/PO4)	45
	3.4.6	, Zu	isammenfassung der Ergebnisse der Veraschung	45
	3.5	Erge	bnisse der Mikro-CT-3D-Analyse	46
	3.5.1	Er	gebnisse der Analyse der Wirbelkörpervolumina	46
	3.	.5.1.1	Total-Volumina	46
	3.	.5.1.2	Weichteil-Volumina	46
	3.	.5.1.3	Kortikalis-Volumina	47
	3.	.5.1.4	Trabekel-Volumina	48
	3.	.5.1.5	Bone Volume/Total Volume (BV/TV)	49
	3.	.5.1.6	Zusammentassung der Wirbelkörpervolumina-Analyse	50
	3.5.2	Er.	gebnisse der Knochenmineraldichte-(BMD)-Messung	50
	3.	.5.2.1	Gesamt-BMD	50

	3.5.2.2	Weichteiledichte	51
	3.5.2.3	Kortikalis-BMD	51
	3.5.2.4	Trabekel-BMD	52
	3.5.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der Knochenmineraldichtemessung	53
3.6	Erge	bnisse der Mikro-CT-2D-Analyse	53
3.0	5.1 Ar	zahl der Trabekelkreuzungen	53
3.0	5.2 Di	chte der Trabekelkreuzungen	54
3.0	5.3 Ko	ortikalisdicke dorsal	55
3.0	5.4 Ko	ortikalisdicke ventral	56
3.0	5.5 Mi	ttlere Trabekeldicke	56
3.0	5.6 Ko	ortikalisfläche	57
3.0	5.7 Tr	abekelfläche	58
3.0	5.8 Zu	sammenfassung der Ergebnisse der Mikro-CT-2D-Untersuchungen	59
4 D	iskussio	on	60
4.1	Ovar	iektomierte Ratte als Osteoporose Modell	60
4.2	Bion	nechanischer Kompressionstest	61
4.3	4.3 Veraschungstest		63
4.4	Mikr	o-CT-Analysen	65
4.5	Schlu	ussfolgerung	67
5 Z	usamm	enfassung	69
6 A	nhang _		71
7 L	iteratur	verzeichnis	82

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Aktivator-Protein-1
ATP	Adenosintriphosphat
BMD	Knochenmineraldichte
BV	Bone Volume
DMSO	Dimethylsufoxid
DVO	Dachverband Osteologie e.V.
DXA	Dual Energy X-ray Absorptiometry
FGF 23	Fibroblastic Growth Factor 23
fmax	Maximalkraft
fpVCT	flat planel volumetric computed tomography
IE	Internationale Einheit
IGF-1	Insulin Growth Factor-1
KI	Konfidenzintervall
LWK	Lendenwirbelkörper
MCSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
mn	nach der Veraschung
mv	vor der Veraschung
NON OVX	nicht ovariektomierte Versuchsgruppe
OPG	Osteoprotegerin
OR	Odds Ratio
OVX	ovariektomierte Versuchsgruppe
РТН	Parathormon
RANK	Rezeptoraktivator von NF-kB
s.c.	sub cutanem
SERMs	selective Östrogenrezeptormodulatoren
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

TV	Total Volume
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WNT-Signalweg	Wingless und Int-1-Signalweg

1 Einleitung

1.1 Zielsetzung

Die postmenopausal bedingte Osteoporose ist eine Volkskrankheit, deren Folgen zu schweren körperlichen und seelischen Einbußen führen können und darüber hinaus die Lebensqualität der betroffenen Frauen stark einschränkt (Breitenbach et al. 2016).

Osteoporotische Wirbelkörperfrakturen betreffen ca. 117 von 100 000 Personen weltweit (Melton und Kallmes 2006), was zu einem ca. zweifach höheren Mortalitätsrisiko gegenüber Personen ohne Fraktur führt (Galibert et al. 1987). Die osteoporosebedingten Frakturkosten beliefen sich im Jahr 2009 in Deutschland auf ca. 860 Millionen Euro (Bleiber et al. 2014). Daher sind die Prävention der Osteoporoseentwicklung und die Minimierung von Risikofaktoren in vielerlei Hinsicht von zentraler Bedeutung und folglich Hauptgegenstände der aktuellen Forschung.

Klein et al. (2004) entdeckten an transgenen Mäusen mit besonders niedriger Knochendichte eine 20-fach erhöhte Lipoxygenaseaktivität gegenüber ihren gesunden Artgenossen. Eine daraufhin getestete Therapie mit einem oralen Lipoxygenaseinhibitor konnte zu einem signifikanten Anstieg der Knochendichte und der biomechanischen Stabilität führen und so aufzeigen, dass eine medikamentöse Lipoxygenaseinhibition ein vielversprechender Ansatz in der Osteoporoseprävention sein kann (Klein et al. 2004). Saul et al. (2016) und Kling (2016) untersuchten als weiteren Teil dieser Studie die Wirkung von Baicalein am Muskel der ovariektomierten Ratte mit vielversprechenden Resultaten.

Ziel dieser Studie ist es nun, die Wirkung des Lipoxygenaseinhibitors Baicalein in unterschiedlicher Dosierung auf den Lendenwirbelkörper der osteoporotischen Ratte zu untersuchen und im Kontext der Literatur zu betrachten. Hierfür werden die Lendenwirbelkörper verschiedenen analytischen Verfahren zur Ermittlung der biomechanischen Stabilität, Knochenmineraldichte und Feinstrukturen (Trabekel- und Kortikalisanalyse) des Knochens unterzogen.

1.2 Knochenaufbau

Der Knochen ist ein einzigartiges Gewebe, das als spezialisiertes Bindegewebe mit seinen Stütz- und Skelettfunktionen ein wichtiger Bestandteil des Bewegungsapparates ist. Außerdem werden diverse andere Aufgaben wie die Blutbildung und verschiedene metabolische Funktionen (Speicherung von Kalzium-, Phosphor- und Natrium-Ionen) vom Knochengewebe übernommen. Der Knochen besitzt neben einer gewissen Elastizität eine hohe Zug- und Druckfestigkeit, die ihn sehr widerstandsfähig gegenüber äußeren Belastungen macht. Verletzungen heilen durch den hohen Stoffumsatz, die gute Durchblutung und den ständigen Umbau schnell. Das Knochengewebe besteht neben der verkalkten Knochenmatrix auch aus Knochenzellen und Mineralien (Welsch 2010).

Das knöcherne Skelett besteht aus 210 verschiedenen Knochen, die sich entsprechend ihrer funktionellen Anforderungen unterscheiden.

Die Extremitäten bestehen aus langen Röhrenknochen. Sie bestehen aus dem Schaft (Diaphyse), den sich verbreiternden Enden (Epiphysen) und den mit Knorpel überzogenen Gelenkflächen. Zwischen Dia- und Epiphyse befinden sich die Metaphyse und die Epiphysenfuge, welche aus Knorpel bestehen und erst nach Abschluss des Längenwachstums verknöchern. Von außen wird der Knochen von der Knochenhaut (Periost) bedeckt, die sich in eine innere zellreiche Schicht (Stratum osteogenicum) und in eine bindegewebsreiche äußere Schicht aufteilt. Das Periost ist durch von ihm ausgehende Kollagenfibrillen fest mit dem Knochen verwachsen.

Die Knochenstruktur lässt sich in kompakte und spongiöse Knochen einteilen, die ohne scharfe Grenze ineinander übergehen. Die Kompakta ist eine solide, feste Masse, die sich vor allem in der Peripherie der Knochen des Skeletts befindet. Die Spongiosa besteht aus feinen, dreidimensionalen, sich verzweigenden Knochenbälkchen, den sogenannten Trabekeln. Zwischen den einzelnen Trabekeln, die sich im Inneren des Knochens befinden, liegen weite Räume, die als rotes Knochenmark der Blutbildung und als gelbes der Fettspeicherung dienen. Die Trabekel dienen auch dem Schutz vor mechanischer Belastung, indem sie sich parallel zur Druckbeanspruchung, wie z. B. im Wirbelkörper, oder zur Biegebeanspruchung, wie z. B. im proximalen Femurende, ausrichten. Die histologische Struktur ist sowohl in der Kompakta als auch in der Spongiosa gleich (Welsch 2010).

Der Knochen ist Zeit seines Lebens ständigen Umbauprozessen unterworfen. Entwicklungsphysiologisch entsteht zuerst der Geflechtknochen, aus dem sich dann der reife Lamellenknochen entwickelt. Jedoch werden selbst aus dieser definitiven Form des Knochens ca. zehn Prozent pro Jahr umgebaut (Welsch 2010).

1.3 Knochenzellen

1.3.1 Osteoblasten

Osteoblasten sind kubische bis prismatische, ca. 20 µm große Zellen, die wichtige Aufgaben beim Knochenauf- und -abbau übernehmen. Bei aktivem Wachstum liegen sie über Nexus verbunden in epithelähnlicher Anordnung an dem Knochen an und produzieren die zunächst noch unverkalkte und unmineralisierte Knochenmatrix (Osteoid). Osteoblasten sezernieren u. a. Proteoglykane, Osteokalzin, Osteopontin, Osteonektin und andere für den Knochenstoffwechsel wichtige Proteine. Sie erfüllen zusätzlich wichtige Aufgaben im Hormonhaushalt, indem sie para- und autokrin Wachstumsfaktoren sezernieren und Rezeptoren für Hormone und Vitamine exprimieren. Eines dieser Hormone ist das Parathormon, das den Blutkalziumspiegel anhebt, wenn dieser unter den Normalwert sinkt, und eine wichtige Rolle beim Knochenabbau spielt. Nach Bindung an osteoblastäre Rezeptoren bewirkt es die Bildung osteoidabbauender Enzyme und osteoklastenstimulierender Zytokine. Letztere aktivieren die Osteoklasten, welche dann die verkalkte Knochenmatrix resorbieren (Welsch 2010). Der Regulation der Osteoblastendifferenzierung kommt eine zentrale Rolle sowohl in der Frakturheilung als auch in der Knochenneubildung zu, worauf verschiedene Transkriptionsfaktoren und Signalwege entscheidenden Einfluss nehmen. Neben dem bereits 1997 von Ducy et al. für die Osteoblastendifferenzierung entdeckten "Mastergen" RUNX2 spielt auch der WNT(Wingless und Int-1)-Signalweg eine große Rolle. Der WNT-Signalweg beinhaltet mehrere WNT-Proteine und sorgt über Aktivierung und Inaktivierung verschiedener WNT-Rezeptoren für die Regulation der osteoblastären Differenzierung – insbesondere während der Frakturheilung. In einer experimentellen Studie von Babij et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass eine Blockierung eines wichtigen WNT-Rezeptors zur Abnahme der Knochendichte führt.

1.3.2 Osteozyten

Osteozyten sind inaktive Osteoblasten und der häufigste Zelltyp des reifen Knochens. Sie entwickeln sich aus durch Apoptose untergegangenen Osteoblasten.

Ihre Zellleiber liegen in ca. $35 \times 10 \,\mu\text{m}$ großen Knochenlakunen, welche über Zellfortsätze in den Canaliculi durch Nexus verbunden sind. Diese architektonische Struktur garantiert einen hohen Informationsaustausch zwischen den einzelnen Osteozyten (Beninghoff und Drenckhahn 2008). Die Aufgabe der Osteozyten ist wohl noch nicht abschließend geklärt – vermutlich sind sie am langsamen Umbau und der Signalweiterleitung über den Zustand der Knochenmatrix beteiligt und gehen Verbindungen mit anderen regulatorischen Knochenzellen ein, um die Struktur und Leistung des Knochens zu überwachen.

1.3.3 Osteoklasten

Osteoklasten sind ca. 150 µm große, vielkernige Zellen. Ihr Zytoplasma ist reich an Mitochondrien und Lysosomen, und ihre Hauptaufgabe ist der Abbau der verkalkten Knochenmatrix. Sie befinden sich an der Oberfläche des Knochengewebes in Höhlun-

gen, den sogenannten Howship-Lakunen (auch subosteoklastisches Kompartiment). Die aktive Zelloberfläche, die an den Howship-Lakunen anliegt, bildet den Faltensaum, der aus zahlreichen, dicht aneinander liegenden schmalen Falten besteht. In diesem Bereich befinden sich besonders viele Aktinfilamente und ein besonderes Integrin (Osteopontin), mit dessen Hilfe die Zelle an der verkalkten Knochenmatrix anhaftet, sodass letztendlich eine gürtelförmige Versiegelungszone entsteht. Sie grenzt den Raum unterhalb des Faltensaums (subosteoklastisches Kompartiment), in dem die Matrixresorption stattfindet, funktionell ab. Durch Absonderung von Protonen in das subosteoklastische Kompartiment wird die Resorption der verkalkten Knochenmatrix vorangetrieben. Hierfür besitzen die Osteoklasten eine Carboanhydrase und eine ATP-abhängige Protonenpumpe in ihrer Faltenmembran. Die sezernierten Protonen bewirken eine Auflösung der Kalziumsalze und ein saures Milieu, das die sauren Hydrolasen benötigen um die organische Matrix abzubauen. Die Stimulation und die Regulation der Osteoklasten unterliegen verschiedenen Zytokinen. So entwickeln sie sich unter Beeinflussung des Macrophage Colony Stimulating Factor (MCSF) und des Rezeptorantagonisten des NF-KB-Liganden (RANKL) aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, welche mit Vorläuferzellen der Monozyten und Makrophagen verwandt sind (Hofbauer 2006).

1.4 Frakturen

Unter einer Fraktur versteht man die Unterbrechung der Kontinuität des Knochens mit Bildung einer oder mehrerer Fragmente. Durch den osteoporosebedingten Verlust an Knochenmasse und die Störung der Mikroarchitektur des Knochens kommt es zu einem erhöhten Risiko für pathologische Frakturen, die ohne vorangegangenes adäquates Trauma auftreten. Am häufigsten findet man osteoporosebedingte Frakturen an der Wirbelsäule, gefolgt vom proximalen Femur und proximalen Humerus (Cooper 2010).

Der Großteil der Osteoporoseerkrankungen ist altersbedingt und tritt postmenopausal auf. Postmenopausal ist der erhöhte Östrogenabfall der Hauptgrund für das erhöhte Osteoporose-Frakturrisiko. Für eine ca. 50-jährige Frau besteht ein Lebenszeitrisiko, eine osteoporosebedingte Fraktur davonzutragen, von 40–50 % (Lippuner et al. 2009), wobei sich ab dem fünfzigsten Lebensjahr das Risiko für Frakturen alle sieben bis acht Jahre verdoppelt. Der Großteil der Frakturen tritt nach dem 75. Lebensjahr auf (Melton et al. 1992). Vertebrale Frakturen treten im Durchschnitt hierbei früher auf als Hüftfrakturen (Melton et al. 1997). Dies zeigt, dass die Frakturprävention mit steigendem Alter an Bedeutung deutlich zunimmt, da es dem Organismus dann schwerer fällt, die beanspruchte Knochenstruktur zu heilen. Neurologische, kognitive, stoffwechselbedingte oder auch arteriosklerotisch bedingte Erkrankungen nehmen im Alter zu und sorgen für einen beschleunigten Knochenabbau (Jakob et al. 2014). Die Mikroarchitektur, die erhöhte Steifigkeit der Wirbelsäule und der generelle Knochendichteverlust im Alter begünstigen die Entstehung von Wirbelfrakturen. So stellte Riem (2013) fest, dass die Prävalenz von Wirbelkörperfrakturen mit dem Alter ansteigt, wobei Frauen gegenüber Männern ein doppelt so hohes relatives Risiko vorweisen. Dieses zeigt, dass die Kombination aus hohem Alter und postmenopausalem Zustand ein großes Risiko für pathologische Frakturen nach sich zieht.

1.5 Osteoporose

1.5.1 Definition

Die Osteoporose ist ein metabolisch-systemisch bedingtes Missverhältnis zwischen Knochenmatrix und Mineralsalzgehalt. Dieser Umstand führt zu einer Verminderung der Knochenfestigkeit, welche letztendlich zu einem erhöhten Frakturrisiko führt. Laut WHO-Definition besteht eine Osteoporose ab einer Knochendichte von mehr als 2,5 Standardabweichungen im T-Score unter dem Mittelwert eines Kollektivs gleichen Geschlechtes und gleicher Rasse (Felsenberg und Bock 2012). Liegen zusätzlich bereits osteoporotische Frakturen vor, spricht man von einer klinisch manifesten Osteoporose.

1.5.2 Epidemiologie

Die Osteoporose hat erhebliche medizinische und soziale Konsequenzen, da mit ihr das Frakturrisiko steigt und so eine enorme wirtschaftliche Belastung des Gesundheitssystems entsteht. In einer Studie von Bleiber et al. (2014), in der die durch Osteoporose bedingten Krankenhauskosten von Frakturen an 16 Skelettregionen (Frakturtypen) für das Jahr 2009 in Deutschland berechnet wurden, ergaben sich stationäre Kosten von ca. 860 Mio. Euro. Hierbei fielen die größten Kostenanteile auf Frauen, die das fünfundsiebzigste Lebensjahr bereits überschritten haben.

Laut einer retroperspektiven Studie einer gesetzlichen Krankenkasse im Zeitraum 2006–2009 liegt die Prävalenz der Osteoporose geschlechtsunabhängig ab dem fünfzigsten Lebensjahr bei ca. 19,5 % (Hadji et al. 2013); bei Frauen wird sie sogar ab dem fünfzigsten Lebensjahr auf 39 % geschätzt, wobei Frauen ab dem fünfundsiebzigsten Lebensjahr den größten Anteil stellen (Häussler et al. 2007). Auffallend ist die deutliche Zunahme der Prävalenz bei Frauen ab dem fünfundsechzigsten Lebensjahr (siehe Abbildung 1). Andere Studien belegen eine Verdopplung der Frakturinzidenz ab dem sechszigsten Lebensjahr (Bagger et al. 2006).



Abbildung 1: Prävalenz der Osteoporose bei Frauen in Abhängigkeit vom Lebensalter in Deutschland 2003 (eigene Abbildung nach Häussler et al. 2007)

1.5.3 Die Entstehung der Osteoporose und Knochenremodelling

Elementar für das Verständnis der Entstehung der Osteoporose sind das altersabhängige Knochenremodelling sowie die Kenntnis über die verschiedenen Einflussfaktoren auf den Knochenstoffwechsel.

Der Anstieg der Sexualhormone in der Pubertät initiiert den Beginn der Skelettreifung. Die größte Knochenmasse findet man im jungen Erwachsenenalter; dieser Punkt wird PEAK BONE MASS genannt. Frauen im fertilen Alter weisen im Verhältnis zur Muskelmasse 15–20 % mehr Knochenmasse als Männer auf und verlieren diese wieder periund postmenopausal. Dieser Überschuss vor der Menopause dient vor allem als Kalziumreserve für Schwangerschaft und Laktation.

Verschiedene Gene kontrollieren das Knochenwachstum, u. a. Vitamin-D-Rezeptoren, Typ-I-Kollagen, Östrogenrezeptoren, Interleukin-6 sowie Insulin-like-Growth-Faktor. Trotz der Tatsache, dass Menschen die hinsichtlich Osteoporose eine positive Familienanamnese vorweisen, häufig eine geringere Knochenmasse besitzen, gibt es bisher keine eindeutige Assoziation zwischen den oben genannten Genen und dem vermehrten Auftreten von Osteoporose (Felsenberg und Bock 2012). Insbesondere die ersten Mitteilungen über Assoziationen von Polymorphismen im Gen für den Vitamin-D-Rezeptor, der eine zentrale Rolle in der Kalziumhomöostase einnimmt, machten Hoffnung auf zukünftige molekulargenetische Testungen bezüglich eines erhöhten Osteoporoserisikos. Allerdings ergaben sich in unterschiedlichen Publikationen teils widersprüchliche Ergebnisse (Langenbeck 2005).

Beim Erwachsenen ist das Knochenremodelling, also der physiologische Knochenumbau durch Osteoblasten und Osteoklasten, der dominante Faktor bei der Entstehung der Osteoporose. Die Hauptaufgaben des Remodellings sind die Reparatur von Schäden am Knochen, die Anpassung an neue Belastungsanforderungen und die Bereitstellung von Kalzium zur Aufrechterhaltung des Kalziumserumspiegels. Das Knochenremodelling besteht aus den folgenden vier Phasen: Aktivierung von Osteoblasten, osteoblastäre Resorptionsphase, Umschaltphase und die osteoblastäre Knochenneuformation (Priemel et al. 2006). Das Remodelling benötigt für einen kompletten Zyklus ca. 120 Tage. Der Knochenabbau über die Osteoklasten dauert lediglich drei Wochen an; die Neubildung von Knochensubstanz kann jedoch Monate benötigen.

Das Remodelling wird überwiegend hormonell gesteuert, endokrin u. a. durch Östrogene, Vitamin D, Androgene sowie Parathormon und parakrin u. a. durch IGF-1 (Insulinlike-growth-factor-1) sowie Prostaglandine. Die Kommunikation zwischen Osteoblasten, Osteoklasten und anderen Knochenzellen wird durch den RANK-Ligand (Rezeptoraktivator von NF-kB-Ligand), RANK (Rezeptoraktivator von NF-kB) und Osteoprotegerin (OPG) gesteuert. Alle drei sind Mitglieder der TNF (Tumor-Nekrose-Faktor)und TNF-Rezeptor-Superfamilie. Der RANK-Ligand aktiviert über einen RANK-Rezeptor Osteoklasten, welche die Knochenmatrix resorbieren. Durch Aktivierung und Inaktivierung dieser sogenannten Remodelling-Einheiten entsteht zeitlebens ein Gleichgewicht zwischen osteoblastärer Formation und osteoklastärer Resorption und somit zwischen Knochenauf- und -abbau. Osteoprotegerin (OPG) ist ein löslicher Rezeptor, der durch Bindung an RANKL/RANK diesen Signalweg blockieren kann. Dieses Gleichgewicht wird bei der Osteoporose durch verschiedene Einflüsse gestört (siehe Kapitel 1.5.4) (Felsenberg und Bock 2012). Ein Experiment an transgenen Mäusen zeigte beispielsweise, dass eine Deletion von OPG zu der Entwicklung einer Osteoporose führt (Bucay et al. 1998).

Im Rahmen der Osteoporose kommt es durch osteoklastäre Aktivität zu Trabekelkontinuitätsunterbrechungen, den sog. Perforationen. Diese Perforationen sind im Alter der skelettalen Reifung noch physiologisch und zwingend notwendig. Bei der Osteoporose fehlt durch die Kontinuitätsunterbrechung die strukturelle Leitschiene für einen osteoblastären Wiederaufbau. Dies führt zu meist irreversiblen Knochenmasseverlusten und im schlimmsten Fall zu osteoporosebedingten Frakturen (Priemel et al. 2006).

1.5.4 Einflussfaktoren und verschiedene Ursachen

1.5.4.1 Östrogenmangel in der Peri- und Postmenopause

Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO 1994) ist die natürliche Menopause definiert "als das permanente Ausbleiben der Menstruation, resultierend aus dem Erlöschen der ovariellen Follikelaktivität. Sie ist charakterisiert als Zeitpunkt der letzten Regelblutung, der einer Zeitspanne von zwölf zusammenhängenden Monaten der Amenorrhö folgt und aus diesem Grund nur retrospektiv festzustellen ist" (Oppelt und Beckmann 2001).

Durchschnittlich beginnt die Menopause bei europäischen Frauen mit ca. fünfzig Jahren, wobei insbesondere bei Raucherinnen ein früherer Eintritt in die Menopause beobachtet wurde (Cramer und Xu 1996). Als Ursache hierfür wird neben einer verringerten Estradiolproduktion durch das Rauchen auch eine erhöhte hepatische Clearance durch einen veränderten Metabolismus (Michnovicz et al. 1986) und eine verringerte Durchblutung der A. ovarica und A. uterina vermutet.

Durch den Östrogenverlust in der Postmenopause werden vermehrt Zytokine von östrogenprogressiven Makrophagen gebildet, welche den Knochenabbau beschleunigen. Es kommt zu einer gesteigerten Apoptose von Osteozyten und einer Verkürzung der Lebensdauer von Osteoblasten. Durch den postmenopausalen Progesteronmangel kommt es durch die abnehmende zentralnervöse Atemstimulation zu einer respiratorischen Azidose und folglich zu einer erhöhten Kalziumausscheidung über die Nieren (Siggelkow 2015).

Das Risiko für osteoporotische Frakturen nimmt zu, und die Heilungstendenz des Knochens nimmt ab. In einer über neun Jahre durchgeführten longitudinalen Beobachtungsstudie von prä-, peri- und postmenopausalen Frauen konnte im peri- und postmenopausalen Kollektiv eine dreifach erhöhte Frakturinzidenz (35,5 % und 36,4 %) gegenüber dem prämenopausalen Kollektiv (12,5 %) bei signifikant erniedrigter trabekulärer Knochendichte von postmenopausalen Frauen mit begleitender Fraktur gegenüber postmenopausalen Frauen ohne Fraktur nachgewiesen werden (Fillenberg 2009).

1.5.4.2 Vitamin-D- und Kalziummetabolismus

Der normale Kalziumspiegel im Plasma beträgt 2,5 mmol/l, wobei 1,25 mmol/l als Kalziumionen vorliegen. Die tägliche durchschnittliche Aufnahme beim Menschen beträgt 20 mmol durch die Nahrung. Davon werden ca. zehn Prozent enteral resorbiert, und der größte Teil wird über den Stuhl wieder ausgeschieden. Sowohl eine zu geringe Kalziumresorption als auch eine mangelnde Kalziumzufuhr über die Nahrung führen zu einem sekundären Hyperparathyreoidismus, was folglich ein gesteigertes Knochenremodelling zur Folge hat und letztendlich über einen erhöhten Knochenabbau zu einer sekundären Osteoporoseentwicklung führt. Um den Kalziumspiegel im Serum aufrechtzuerhalten, wird vermehrt Parathormon aus den Nebenschilddrüsen sezerniert, was die Hydroxylierung von Vitamin-D in der Niere anregt. Folglich steigt der Plasmaspiegel von 1,25-Dihydroxyvitamin-D, und die enterale Kalziumresorption nimmt zu.

Bereits eine verminderte Kalziumzufuhr von unter 400 mg pro Tag kann das Skelett nachhaltig schädigen. Die empfohlene Tagesdosis Kalzium beträgt laut der "Deutschen Gesellschaft für Ernährung" 1000–1200 mg (Felsenbeg und Bock 2012).

Ein weiterer zentraler Baustein im Kalziumstoffwechsel ist das Vitamin-D. Der im Körper physiologisch wichtigste Vertreter ist das Vitamin-D3 (Cholecalciferol), welches über die Nahrung und UV-Licht aufgenommen und in der Leber über die 25-Hydroxylase in 25-OH-Vitamin-D3 (Calcifediol, Calcidiol) überführt wird. Calcidiol wird dann im nächsten Schritt über das Blut zur Niere transportiert, wo die Überführung in 1,25-(OH)2-Vitamin-D3 durch die Calcidiol-1-alpha-Hydroxylase in den proximalen Nierentubuli stattfindet. Reguliert wird die 1-alpha-Hydroxylase durch den Kalzium-und Phosphatspiegel, das in den Nebenschilddrüsen gebildete Parathormon und den FGF-23-Serumspiegel (fibroblast growht factor 23). Laut einem allgemein anerkannten Expertengremium seien die Normwerte für 25-OH-Vitamin-D zu niedrig angesetzt. Es wird ein Spiegel von über 75 nmol/l empfohlen (Felsenberg und Bock 2012).

Insbesondere Menschen mit Niereninsuffizienz, fortgeschrittenen Leberschäden, mangelnder UV-Exposition und im fortgeschrittenen Lebensalter sind stärker von einem 25-OH-Vitamin-D-Mangel bedroht. Ein gehäuftes Vorkommen von niedrigen 25-OH-Vitamin-D-Spiegeln in Kombination mit sekundär erhöhten Parathormonkonzentrationen konnte überwiegend bei älteren Patienten mit Schenkelhals- und Wirbelkörperfrakturen festgestellt werden. In anderen Studien wurden auch bei noch gesunden Patienten im mittleren Lebensalter signifikante Assoziationen zwischen verringerten 25-OH-Vitamin-D3- bzw. sekundär erniedrigten Parathormonspiegeln und einer verminderten Knochenmasse festgestellt. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass bereits ein subklinischer Vitamin-D-Mangel einen Risikofaktor für die Entstehung einer manifesten Osteoporose darstellt (Scharla und Ziegler 1994).

1.5.4.3 Glukokortikoide

Eine große Anzahl von Medikamenten kann das Skelett schädigen und damit die Entstehung einer Osteoporose bewirken. Am häufigsten werden die Glukokortikoide genannt, wenn es um die Entstehung arzneimittelbedingter Osteopenien geht. Die Glukokortikoid-Langzeittherapie ist die häufigste Ursache für eine sekundäre Osteoporose und beim jungen Erwachsenen die häufigste Ursache einer Osteoporose überhaupt (Krasselt und Baerwald 2016). Auch wenn nur 5 % aller Osteoporosefälle glukokortikoid-induziert sind, verursachen sie dennoch ca. 20 % aller osteoporotisch bedingten Frakturen. Ein Grund hierfür ist sicherlich die mangelhafte Osteoporoseprävention bei Patienten unter Steroidtherapie. Laut US-amerikanischen Untersuchungen bekamen nur 9–30 % der Patienten eine Kalzium- und Vitamin-D-Supplementation, und nur bei 9– 42 % der Patienten wurde anschließend die Knochendichte gemessen (Lange und Müller-Ladner 2007). Eine Abnahme der Knochendichte kann bereits in den ersten drei Monaten einer Langzeittherapie beginnen und ist im ersten Jahr mit ca. 15 % am höchsten (van Staa et al. 2002).

Glukokortikoide bewirken eine vermehrte Expression von RANK-Ligand in den Osteoblasten, was einen verminderten Knochenaufbau zur Folge hat. Gleichzeitig werden Osteoklasten aktiviert und deren Apoptose wird gehemmt, was letztendlich zu einer gesteigerten Knochenresorption führt. Die durch Glukokortikoide gehemmte intestinale Kalziumresorption spielt wohl eine untergeordnete Rolle (Krasselt und Baerwald 2016).

1.5.5 Osteodensitometrie (Knochendichtemessung)

Als Osteodensitometrie werden verschiedene nicht invasive, medizinisch-technische Untersuchungsverfahren bezeichnet, die die Knochenmasse und -dichte messen.

Das bekannteste und in vielen Einrichtungen das Standarduntersuchungsverfahren ist die Dual Energy X-ray Apsortiometry (DXA). Bei deren Durchführung werden zwei Röntgenaufnahmen mit unterschiedlicher Röntgenenergie angefertigt, sodass die Masse des Knochenminerals bestimmt und anschließend durch die ermittelte Fläche des mineralisierten Gewebes dividiert werden kann. Abschließend müssen die ermittelten Messwerte noch an die jeweilige Körpergröße angepasst werden (Felsenberg und Bock 2012).

Die Messung wird zur Osteoporosediagnostik an der Lendenwirbelsäule (meist LWK 1-4) und Hüfte (meist proximaler Femur) verwendet und in g/cm² angegeben. Wirbelkörper, deren Dichte durch Frakturen oder andere degenerative Prozesse verändert sind, dürfen nicht zur Messung herangezogen werden (Scholz et al 2010). Da die verschiedenen Messmethoden und apparativen Untersuchungsverfahren zur Bestimmung der Knochendichte nicht ohne Weiteres untereinander vergleichbar sind und dazu noch geschlechts- und altersspezifische Abweichungen existieren, müssen die Messwerte auf Normwerte bezogen und als T-Score angegeben werden. "Der T-Score gibt das Vielfache der Standardabweichung vom Mittelwert der Knochendichte (,bone mineral density', BMD) junger Erwachsener an" (Scholz et al 2010). Somit werden die individuellen Messergebnisse in Relation zu einer jungen Population gleicher Rasse und gleichen Geschlechts gesetzt.

Anhand des ermittelten T-Wertes und der Anzahl von Frakturen lässt sich die Osteoporose nach WHO Kriterien in verschiedene Stadien einteilen: Grad 0: Osteopenie: verminderter Knochenmineralgehalt (T-Wert -1,0 bis -2,5), ohne Frakturen.

Grad 1: Osteoporose: stark verminderter Knochenmineralgehalt (T-Wert < -2,5), ohne Frakturen.

Grad 2: manifeste Osteoporose: sehr stark verminderter Knochenmineralgehalt (T-Wert < -2,5), 1–3 Wirbelkörperfrakturen ohne vorangegangenen Unfall

Grad 3: fortgeschrittene Osteoporose: Der Knochenmineralgehalt ist stärker vermindert (T-Wert < -2,5), mehrfache Wirbelkörperbrüche, häufig auch Frakturen anderer Knochen

Um die individuellen Messergebnisse nicht nur in Relation mit einer Population gleichen Geschlechts und Rasse zu setzen, muss man zusätzlich den Z-Score heranziehen. Dadurch lässt sich das Messresultat mit einer Population gleichen Geschlechts vergleichen. So kann es sein, dass beispielsweise eine 58-jährige Frau im T-Score 2,5 Standardabweichung unter dem Mittelwert einer jungen Kontrollgruppe, aber im Z-Score lediglich 1,0 Standardabweichungen unter dem Mittelwert einer gleichaltrigen Kontrollgruppe liegt. Aufgrund der Strahlenbelastung wird nicht für jeden Patienten eine DXA (Dual Energy X-ray Absorpiometry) empfohlen.

Die Osteoporose-Basisdiagnostik besteht neben der DXA noch aus einer ausführlichen Anamnese, einer klinischen Untersuchung, einem Osteoporosebasislabor und ggf. aus einem Röntgen der Wirbelsäule. Eine vollständige Osteoporose-Basisdiagnostik wird laut DVO- (Dachverband Osteologie e.V.)-Leitlinie von 2014 empfohlen bei niedrigtraumatischen Frakturen, bei einem Zehn-Jahres-Frakturrisiko von > 20 % für radiografische Wirbelkörper- und proximale Femurfrakturen sowie für Krankheiten, für welche die Einschätzung des Frakturrisikos unmittelbare therapeutische Konsequenzen hat.

In den DVO-Leitlinien von 2014 werden zusätzlich spezifische Risikofragebögen berücksichtigt, sodass ein patientenspezifisches Risikoprofil erstellt werden kann. Unter Berücksichtigung des jeweiligen Risikoprofils und der relevanten patientenspezifischen Klinik kann auch eine Osteoporosetherapie ohne vorherige Knochendichtemessung eingeleitet werden (Neuerburg et al. 2015).

1.5.6 Prävention und Therapie

1.5.6.1 Allgemeine Ziele

Das folgende Unterkapitel umfasst sowohl prophylaktische Maßnahmen zur Vorbeugung der Entstehung einer klinisch manifesten Osteoporose als auch Maßnahmen zur Vermeidung osteoporosebedingter Frakturen. Als Osteoporoseprävention wird eine Vorbeugung des Absinkens des T-Scores unter eine SD von 2,5 bezeichnet. Abzugrenzen sind hierbei die primäre, sekundäre und tertiäre Osteoporoseprävention. Das Ziel der Primärprävention ist der Aufbau einer gesunden und ausreichenden Knochenmasse im Kinder- und Jugendalter. Die Sekundärprävention dient dem Ziel der Vorbeugung des raschen Knochenabbaus in der zweiten Lebenshälfte bzw. nach der Menopause. Die Tertiärprävention hat das Ziel der Verhinderung von Folgeerscheinungen und Komplikationen bei bereits vorliegender Osteoporose, z. B. Frakturen (Wildner 2001).

Gemeinsame Ansatzpunkte aller Präventionsmaßnahmen sind: Vermeidung von Alkohol und Nikotin, körperliche Aktivität, Verringerung des Sturzrisikos und Aufrechterhaltung eines gesunden Knochenstoffwechsels (Ziller 2013).

1.5.6.2 Vitamin-D- und Kalzium-Supplementierung

Kalzium- und Vitamin-D-Supplementierungen werden generell als Basistherapie zur Osteoporoseprophylaxe empfohlen. Bereits am Anfang der 1990er-Jahre wurde von Chapury et al. 1994 eine placebokontrollierte Studie an 3800 in Pflegeheimen wohnenden Frauen durchgeführt. Eine Gruppe bekam ein Placebopräparat, die andere Gruppe eine Kalzium- und Vitamin-D-Supplementierung. Bereits nach 18 und 36 Monaten zeigte sich in der Verumgruppe eine signifikant reduzierte Anzahl von Hüft- und Wirbelkörperfrakturen (Hüftfrakturen: Odds Ratio (OR)= 0,70, 95-%-Konfidenzintervall (KI)= [0,62, 0,78]; nichtvertebrale Frakturen: OR= 0,70, 95-%-[KI 0,51–0,91]) (Chapury et al. 1994). Die tägliche Supplementierungsmenge wird allerdings sehr kontrovers diskutiert. Sie ist aktuell maßgeblich abhängig von der individuellen Kalziumzufuhr und der Vitamin-D-Eigensynthese. Eine übermäßige Supplementierung wird derzeit nicht empfohlen, da es in den letzten Jahren einige Hinweise gab, dass es unter einer jahrelangen Kalzium-Supplementierung zu einer kardiovaskulären Risikoerhöhung kommen kann. So konnte in einer neuseeländischen Studie aus dem Jahr 2008 ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko nach Kalziumeinnahme bei gesunden Frauen beschrieben werden (Ringe 2012), welche in einer durchgeführten Metaanalyse nochmal bestätigt werden konnten (Bolland et al. 2008). Diese Studien führten zum teilweise kompletten Rückgang der verschriebenen Kalziummengen. Allerdings existieren auch Studien, die keine Hinweise auf ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko unter Kalziumsubstitution zeigen. In einer randomisierten Kontrollstudie über fünf Jahre mit weiteren vier bis fünf Jahren Follow-up konnte kein erhöhtes Risiko festgestellt werden – ganz im Gegenteil fanden sich sogar Hinweise, die für eine generell geringere Mortalität unter Kalziumsubstitution sprechen (Young et al. 2011). Aktuell werden eine Kalziumzufuhr von 1000-1500 mg und eine Vitamin-D-Einnahme von 800–2000 IE/Tag empfohlen (Ringe und Windler 2015).

1.5.6.3 Körperliche Aktivität

Körperliche Inaktivität führt unweigerlich zum Abbau von Muskel- und Knochenmasse, während körperliche Aktivität v. a. im Wachstumsalter bzw. vor dem Ende der Pubertät zu einer erhöhten Knochendichte führt. Kraftsportler haben eine erhöhte Knochenmasse, während Ausdauersportler im Vergleich weniger Knochenmasse vorweisen (Felsenberg und Bock 2012). Beim Erwachsenen ist der Stimulus auf die Knochendichte durch körperliche Aktivität deutlich geringer ausgeprägt als bei Jugendlichen. Dennoch konnte in einer sechzehn Jahre andauernden Follow-up-Studie von Kemmler et al. (2015), in der sich 86 früh-postmenopausale Frauen mit Osteopenie regelmäßig einem körperlichen Training im Fitnessraum unterzogen haben (51 in der Kontrollgruppe), ein signifikant niedrigeres Frakturrisiko für die Verumgruppe gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Knochendichte sank zwar in beiden Gruppen ab, der Verlust war in der Kontrollgruppe jedoch höher (Kemmler et al. 2015).

Auch in weiteren Studien konnte Bewegungsmangel als Risikofaktor für osteoporotisch bedingte Frakturen herausgestellt werden. So konnte in einer prospektiv epidemiologischen Studie von Gregg et al. (2000) ein um 20–40 % geringeres Hüftfrakturrisiko bei körperlich aktiven Personen gegenüber inaktiven nachgewiesen werden.

Als vielversprechende Methode zur Simulierung körperlicher Aktivität und Stimulation des Knochens ergab sich die Vibrationstherapie. Untersuchungen zeigten, dass menschliche Knochen sehr empfindlich auf mechanische Vibrationen reagieren (Rubin et al. 2003). Auch an Tiermodellen wurde der Einfluss mechanischer Vibration auf den Knochen bereits erfolgreich untersucht. So konnte Fürst in seiner medizinischen Dissertation aus dem Jahr 2014 den Nutzen der horizontalen und vertikalen Ganzkörpervibration als nicht-medikamentöse Therapiemöglichkeit auf den osteoporotischen Knochen am Rattentiermodell belegen.

1.5.6.4 Medikamentöse Therapiemöglichkeiten

Die Einleitung einer spezifischen medikamentösen Therapie dient v. a. der Verminderung des Frakturrisikos. Da die Osteoporose eine chronische Erkrankung ist, sind medikamentöse Therapieoptionen generell Langzeittherapien, deren Erfolg maßgeblich von der Compliance des Patienten abhängt. Aktuellen Studien zufolge soll mindestens jede zweite Frau ihr verordnetes Medikament wieder absetzen oder nicht regelmäßig einnehmen (Kyvernitakis und Hadji 2016). Der Beginn einer medikamentösen Therapie wird bei einem Zehn-Jahres-Frakturrisiko für Wirbelkörper- und/oder Hüftfrakturen empfohlen. Eine individuelle Nutzen/Risiko-Abwägung ist jedoch zu berücksichtigen (Harbeck und Lehnert 2016).

Bisphosphonate werden weltweit zur Prophylaxe und Therapie der Osteoporose eingesetzt. Osteoklasten nehmen Bisphosphonate im Rahmen der Knochenresorption durch Phagozytose auf und ihre Lebensdauer wird so verkürzt. Die Folge ist eine verringerte Knochenresorption mit daraus folgender höherer Knochendichte. Die Wirksamkeit von Bisphosphonaten konnte in mehreren Studien belegt werden: Bereits Liberman et al. (1995) belegten, dass die regelmäßige Einnahme von Alendronat zu einer signifikanten Erhöhung der Knochendichte führt. Die Erhöhung der Knochendichte ist jedoch kein zwingend vorauszusetzender Indikator für das Ansprechen auf eine Bisphosphonat-Therapie, da auch Patientinnen, bei denen die Knochendichte unter Therapie gleichbleibt oder sogar abnimmt, ein geringeres Frakturrisiko gegenüber Patientinnen ohne Bisphosphonat-Einnahme zeigen (Seeman 2007). Trotz der bewiesenen Wirksamkeit der Bisphosphonate gibt es auch unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen. In letzter Zeit treten häufiger Mitteilungen über das gehäufte Aufkommen von atypischen Femurfrakturen unter Bisphosphonat-Substitution auf. So beschrieben Ballaschk et al. (2015) in ihrer Publikation das Auftreten atypischer Femurfrakturen unter Bisphosphonat-Therapie bei drei in ihrer Notfallambulanz aufgenommenen Patientinnen.

Die effektivste Therapie der postmenopausalen Osteoporose ist bis heute die Hormontherapie mit Sexualsteroiden. Bereits zu Beginn der 1990er-Jahre analysierten Grady et al. (1992) die damals bekannten epidemiologischen Studien zur Östrogen- und Gestagentherapie. Sie schlussfolgerten letztendlich, dass eine alleinige Östrogentherapie bei postmenopausalen hysterektomierten Frauen und bei Patientinnen mit Herz-Gefäß-Erkrankungen die Anzahl von Hüftfrakturen verringern und das Leben verlängern kann. Jedoch wurde bereits in dieser Auswertung auf das Risiko für die Entstehung von Endometriumkarzinomen bei nicht-hysterektomierten Frauen unter Hormontherapie verwiesen (Grady et al. 1992). Auch Jick et al. (1993) konnten in einer Fall-Kontrollstudie ein erhöhtes relatives Risiko für die Entstehung eines Endometriumkarzinoms unter alleiniger Östrogentherapie bei nicht-hysterektomierten Frauen gegenüber einer kombinierten Östrogen-/Gestagen-Einnahme nachweisen. Daher wird ein Gestagenzusatz für mindestens zehn Tage pro Behandlungsmonat empfohlen (Ortmann et al. 2010). Die zunächst in Betracht gezogene generelle Empfehlung, Hormonersatzpräparate auch bei symptomfreien postmenopausalen Frauen einzusetzen, wurde schnell wieder aufgegeben, da in mehreren Studien ein erhöhtes Risiko für Thromboembolien, Herzinfarkte, Schlaganfälle und Brustkrebs nachgewiesen wurden (Seiffert-Klauss und Schumm-Draeger 2003). In der aktuellen S3-Leitlinie der DVO wird eine Hormonersatztherapie nur bei Frauen mit hohem postmenopausalen Risiko und Unverträglichkeit oder Kontraindikationen gegenüber anderen für die Osteoporose zugelassenen Medikamenten empfohlen (Pfeilschifter 2006).

Eine weitere medikamentöse Therapiemöglichkeit ist der Einsatz selektiver Östrogenrezeptor-modulatoren (SERMs). Sie haben heutzutage ihren festen Platz in der Prävention und Therapie der postmenopausalen Osteoporose. Ziel der SERMs ist es, über die Aktivierung der östrogenrezeptorspezifischen Signalkaskade eine östrogenagonistische Wirkung, insbesondere am Knochen, hervorzurufen. Moderne, in Europa zugelassene Östrogenrezeptormodulatoren (u.a. Raloxifen, Lasoxifen und Bazedoxifen) verringern nachweislich bei postmenopausalen Frauen das Risiko für vertebrale Frakturen (Birkhäuser 2012). Das bereits 1998 für die Therapie der Osteoporose zugelassene Raloxifen senkt den postmenopausalen Knochenmasseverlust und führt über eine Hemmung der Osteoklasten zu einer erhöhten Knochenmineraldichte an Wirbelsäule und Schenkelhals (Fedelesova et al. 2000). In der MORE-Studie von 1999 konnte eine Senkung des Risikos für klinische Wirbelkörperfrakturen unter Raloxifen-Therapie gegenüber einer Kontrollgruppe gezeigt werden (Siris et al. 2002).

Eine weitere medikamentöse Therapiemöglichkeit sind Peptide der Parathormonfamilie (PTH-Peptide) und Strontiumranelat. Erstere werden täglich *sub cutanem* verabreicht, besitzen einen osteoanabolen Effekt und sollen die Osteoblastenanzahl erhöhen. Strontiumranelat soll den osteoklastischen Knochenabbau hemmen und die Aktivität der Osteoblasten fördern. Sowohl Strontiumranelat als auch Peptide der Parathormonfamilie senken das Risiko für vertebrale und nicht-vertebrale Frakturen signifikant. PTH-Peptide steigern zudem die Knochenmineraldichte (Reginster et al. 2005; Neer et al. 2001). Auch die Kombinationstherapie von PTH-Peptiden und Bisphosphonaten scheint die Knochenmineraldichte positiv zu beeinflussen. So konnten Black et al. (2005) eine Steigerung der Knochenmineraldichte bei Patienten nachweisen, die ein Jahr mit PTH behandelt wurden und eine anschließende Bisphosphonat-Substitution bekamen.

Ein Angriffspunkt für die Entwicklung neuerer Medikamente ist die Inhibition der von den Osteoklasten exprimierten Cysteinprotease Cathepsin K, welche nachweislich kollagenolytische Wirkung besitzt (Kafienah et al. 1998) und so eine zentrale Rolle im enzymatischen Knochenabbau einnimmt. Die Wirkung mehrerer Cathepsin-K-Inhibitoren (u. a. Balicatib, Relacatib, Odanacatib) wurde bereits in mehreren Forschungsstudien untersucht (Nagase et al. 2012; Bone et al. 2010; Falgueyret et al. 2005). Odanacatib ist der derzeit am genauesten in mehreren klinischen Forschungen untersuchte Cathepsin-K-Inhibitor. So konnten Eisman et al. (2011) in einer dreijährigen Studie eine nachweisliche Steigerung der Knochenmineraldichte bei postmenopausalen Frauen unter Odanacatib-Therapie aufzeigen.

1.6 Baicalein

Baicalein gehört zu den Flavonoiden und kommt in den Wurzeln der chinesischen Heilpflanze Scutellaria baicalensis georgi vor. Als Baikal-Helmkraut wird es insbesondere in asiatischen Ländern als traditionelles Naturheilmittel genutzt. Das Grundgerüst der Flavonoide stellt das Flavan (2-Phenylchroman) (Abbildung 2).

Es besteht aus zwei aromatischen Ringen, die durch einen Tetrahydropyran-Ring verbunden sind.



Abbildung 2: Chemische Strukturformeln von Flavan und Baicalein, eigene Zeichnung

Dem Baicalein sind zahlreiche Wirkungen nachgewiesen, u. a. belegten Shao et al. (2002) am Küken-Kardiomyozyten-Modell eine antioxidative Wirkung nach und Hong et al. (2002) konnten eine anti-entzündliche Wirkung am Mäusemodell beweisen. Baicalein wirkt positiv auf ein gestörtes Zellwachstum; so zeigten Chen et al. (2013) in einer neueren Studie eine signifikante Wirkung auf die Proliferation und Lebensfähigkeit von ovariellen Tumorzellen. Aussagekräftige Studien, die die Effekte von Baicalein auf den Knochen untersuchen, gibt es bisher nur sehr wenige. Kim et al. (2008) untersuchten die Wirkung von Baicalein auf die Osteoblastendifferenzierung über die Aktivierung von MAP-Kinasen (MAP-K) und Transkriptionsfaktoren (NF-kB und Aktivator Protein 1 (AP-1)). Sie kamen zu dem Ergebnis, dass Baicalein die Differenzierung und Mineralisation der Osteoblasten stimuliert, die Lebensfähigkeit jedoch nicht beeinflusst. Ferner können Extrakte aus der Scutellaria immobilitätsbedingtem Knochenschwund vorbeugen. Erstmals wurde dieser Effekt 2013 in einem Rattenmodell beschrieben, in dem die Versuchstiere einer mechanischen Inaktivität ausgesetzt und mit Scutellaria-Wurzelextrakt präventiv behandelt wurden (Chen et al. 2013). Durch nachgewiesene antiinflammatorische Eigenschaften und die daraus erzielte Hemmung von Entzündungsmediatoren sind auch positive Effekte auf degenerative Knochen- und Gelenkerkrankungen wie die rheumatoide Arthritis beschrieben (Chen 2011). Diese Hemmung von Entzündungsmediatoren, welche u. a. auch den Knochenaufbau beeinflussen, stellen neue Therapiemöglichkeiten für die Osteoporose dar. Eine entscheidende Eigenschaft des Baicaleins ist außerdem die Inhibition der 12-Lipoxygenase, die u. a. eine entscheidende Rolle im Arachidonsäurestoffwechsel der Säugetiere hat, und somit eine anti-entzündliche Wirkung besitzt. Klein et al. (2004) untersuchten in einer Studie einen speziellen Mäusestamm, der eine niedrige Knochendichte aufweist. Sie konnten bei den Mäusen auf Chromosom 11 ein spezielles Gen (Alox15-Gen) entdecken, welches für eine 12/15-Lipoxygenase codiert. Die an Osteopenie leidenden Mäuse produzierten ca. 20 Mal so viel von dieser Lipoxygenase wie ihre gesunden Artgenossen. Daher war

davon auszugehen, dass mit steigender 12/15-Lipoxygenaseaktivität die Differenzierungsfähigkeit der Osteoblasten gehemmt wird (Klein et al. 2004).

Außerdem konnte Kling (2016) in einer experimentellen Studie an drei verschiedenen Muskeln von osteoporotischen Ratten nachweisen, dass Baicalein einen positiven Effekt auf die Muskulatur hat.

2 Material und Methoden

2.1 Die Versuchstiere

Der Versuch bestand aus 60 bei Ovariektomie drei Monate alten weiblichen Sprague-Dawley-Ratten der Firma Winkelmann (Borchen, Deutschland). Jedes Versuchstier verfügte über einen in den Nacken implantierten Transponder, sodass jederzeit über eine individuelle Kennnummer eine Identifikation möglich war. Die Ratten wurden über die komplette Versuchsdauer in Käfigen des Typs Makrolon IV in der Zentralen tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universität Göttingen untergebracht. Wie schon von Kling (2016) beschrieben, wurde bei einer stabilen Raumtemperatur von 20°C und einer Luftfeuchtigkeit von ca. 55 % auf eine jeweils zwölfstündige Hell-Dunkel-Rhythmik geachtet. Einmal wöchentlich wurden die Tiere gewogen. Die Fütterung der Tiere erfolgte einmal wöchentlich unter Auffüllung einer 1500 g sojafreien Futtermenge. Die Menge des verbliebenen Restfutters wurde jede Woche gewogen, damit die verzehrte Futtermenge bestimmt werden konnte. Die für die Käfige vorgesehenen Trinkwasserspender wurden regelmäßig mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt.

2.2 Aufbau der Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden in fünf Gruppen zu je zwölf Ratten aufgeteilt (Tabelle 1).

Versuchsgruppe	Käfiganzahl	Tieranzahl/Käfig
NON OVX	3	4
OVX	3	4
1 mg	3	4
10 mg	3	4
100 mg	3	4

Tabelle 1: Versuchsgruppenaufteilung präoperativ:

Durch OP (Ovariektomie und Osteotomie) und Narkosekomplikation starben zehn Versuchstiere, sodass für die Wirbelauswertung 50 Tiere übrigblieben (siehe Tabelle 2).

Versuchsgruppe	Käfiganzahl	Tieranzahl/Käfig
NON OVX	2	5
OVX	2	5
1 mg	3	2 Käfige à 3 1 Käfig à 4
10 mg	3	2 Käfige à 3 1 Käfig à 4
100 mg	3	2 Käfige à 3 1 Käfig à 4

Tabelle 2: Versuchsgruppenaufteilung nach der Osteotomie:

2.3 Versuchsablauf

Nach Aufteilung der Versuchstiere in die o. g. Versuchsgruppen (siehe Tabelle 1) wurden die Gruppen 2–5 eine Woche nach Ankunft beidseitig ovariektomiert (siehe 2.3.1), damit sie eine Osteoporose entwickeln. Acht Wochen später wurde eine Osteotomie mit Plattenosteosynthese der metaphysären Tibia durchgeführt (siehe 2.3.2). Während der Operationen starben zehn Versuchstiere, sodass 50 Ratten übrigblieben, die in die in der Tabelle 2 gezeigten Gruppen eingeteilt wurden. Acht Wochen nach der Ovariektomie – bzw. am ersten Tag nach der Osteotomie – wurde mit der täglichen Baicalein-s.c.-Applikation begonnen (die jeweiligen Verabreichungsmengen sind unter 2.3.3 beschrieben). Außerdem bekamen die Versuchstiere zu bestimmten Zeiten unterschiedliche Farbstoffe verabreicht, damit die Knochenheilung nach Versuchsende besser beurteilt werden konnte. Am 15. Tag nach der Osteotomie wurde den Ratten 90 mg/kg vom Farbstoff Xylenol Orange (XO) gespritzt, am 20. Tag 10 mg/kg Calcein Grün (CG) und am 29. Tag der Farbstoff Alizarin Komplexon (AK) in einer Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht.

Am 28. Tag nach der Osteotomie wurden die Tiere mittels Dekapitation getötet und die für diesen Versuch benötigten Wirbelkörper freipräpariert (siehe Kapitel 2.2.4). Außerdem wurden für weitere Studien Muskeln, die Tibia und der Femur entnommen (Kling 2016).

2.3.1 Ovariektomie

48 der 60 Versuchstiere (Versuchsgruppen OVX, Baicalein 1 mg, Baicalein 10 mg und Baicalein 100 mg) wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen beidseitig ovariektomiert.

Die Anästhesie der zu operierenden Tiere erfolgte nach vorangegangener Rasur des OP-Gebietes durch CO₂-Inhalation und anschließender intraperitonealer Injektion von Ketamin-Dormitor 0,1 ml/100 g Körpergewicht in einem Mischverhältnis von 3:1. Die Bauchhöhle und das Peritoneum wurden mit dem Skalpell eröffnet. Die Adnexe wurden aufgesucht und die Ovarien beidseits abgetrennt. Die Tuba uterina wurde legiert. Anschließend wurden das Peritoneum und die Bauchhöhle mittels Vicrylnaht und Klammerung wieder verschlossen. Um eine mögliche Dehydratation zu verhindern, wurde den Versuchstieren ein Depot von 3 ml NaCl s.c. verabreicht. Für die anschließende Analgesierung der Versuchstiere wurde Rimadyl 4 mg/kg verabreicht. Die Tiere wurden bis zum Ende der Narkose überwacht (Kling 2016).

2.3.2 Osteotomie

Im Rahmen einer anderen Studie wurden die Auswirkungen des Baicaleins auf die Frakturheilung untersucht und ausgewertet. Hierfür wurden alle Ratten acht Wochen nach der Ovariektomie einer beidseitigen Osteotomie mit plattenosteosynthetischer Versorgung der metaphysären Tibia unterzogen. Dieses Versuchsmodel wurde bereits von Stuermer et al. (2010) beschrieben.

2.3.3 Baicalein-Applikation

Mit der Baicalein-(Firma Sigma-Aldrich, Bornem, Belgien)-Applikation der Versuchsgruppen 3–5 wurde am nächsten Tag nach der Osteotomie begonnen. Die Substanz wurde in 100 % Dimethylsufoxid (DMSO) gelöst und mit 1 ml-Spritzen Omnifix® und Sterican®-Kanüle 0,45 mm x 25 mm in die Glutealregion s.c. gespritzt. Pro Ratte entsprach die Konzentration bezogen auf das Körpergewicht einem Volumen von 0,6 ml Baicaleinlösung (Kling 2016). Die Durchführung erfolgte zu zweit: Eine Person nahm das Versuchstier aus dem Käfig und fixierte es, und die andere injizierte den Wirkstoff. Die bereits versorgten Ratten wurden in einen weiteren Käfig platziert, bis alle Versuchstiere eines Käfigs behandelt worden waren. Die anderen Käfige wurden mit einem Tuch abgedeckt, um so unnötigen Stress für die Tiere zu vermeiden. Um den vermuteten Effekt des Baicaleins auf den Knochen zu untersuchen, erhielten Versuchsgruppe 3 1 mg/kg Körpergewicht, Versuchsgruppe 4 10 mg/kg Körpergewicht und Versuchsgruppe 5 100 mg/kg Körpergewicht Baicalein s.c. für eine Dauer von vier Wochen. Bei den Versuchsgruppen 1 und 2 erfolgte eine alleinige DMSO-Applikation.

2.3.4 Versuchsende und Freipräparation der Wirbelkörper

Nach Durchführung der Baicalein-Applikation über vier Wochen wurden die Tiere unter CO₂-Narkose durch Dekapitation mittels einer Guillotine getötet. Nach der Tötung wurden die Lendenwirbelkörper herauspräpariert und für weitere Untersuchungen verwendet. Die Freipräparation der Lendenwirbelkörper wurde bereits in vorangegangenen Studie beschrieben (Döll 2010; Fürst 2014). Dazu wurden zunächst mit einer scharfen Schere die Haut und die paravertebrale Rückenmuskulatur entlang der Processi spinosi durchtrennt. Nach Freilegung der Lendenwirbelsäule wurde ein Ende durch Aufsuchen des Os sacrum und das andere durch Aufsuchen des Rippenbogens ertastet.

Durch Abzählen konnten die ersten bis sechsten Lendenwirbelkörper identifiziert und mittels einer Zange von der restlichen Wirbelsäule abgetrennt werden. Im Anschluss wurden die einzelnen Lendenwirbelkörper mittels Skalpell auf Höhe der Bandscheiben voneinander getrennt. Die Wirbelkörper wurden zur genauen Darstellung mittels eines scharfen Löffels von überschüssigen Weichteilresten befreit. Im Anschluss wurden die Lendenwirbelkörper in beschrifteten Laborröhrchen gelagert und bei -20 °C aufbewahrt. In dieser Studie wurden die zweiten, dritten und vierten Lendenwirbelkörper verwendet.

2.4 Biomechanischer Kompressionstest

Für diesen Versuch wurde der vierte Lendenwirbelkörper verwendet. Durch den biomechanischen Kompressionstest soll die Stabilität der Wirbelkörper hinsichtlich einer axialen Krafteinwirkung getestet werden. Diese Testart wurde bereits in mehreren Studien beschrieben (Döll 2010; Fürst 2014; Zimmermann 2017).

2.4.1 Validierung des Testverfahrens

Da die Ergebnisse im unter 2.4.2 beschriebenen Testverfahren stark untersucherabhängig sind, wurde das Verfahren vor dem eigentlichen Versuch einer Validierung unterzogen. Hierfür wurden die Lendenwirbelkörper vier und fünf von zehn vergleichbar großen Ratten verwendet. Abweichungen von 15 % (+/- 3 %) zwischen Wirbelkörper vier und fünf werden als physiologisch gewertet (Fisk und Baigent 1975; Budsberg et al. 1993; Döll 2010; Fürst 2014).

2.4.2 Versuchsdurchführung

Zum Zeitpunkt des Versuches wurden die vierten Lendenwirbelkörper unter Beigabe von 0,9 %iger Kochsalzlösung bei Raumluft aufgetaut. Der Wirbelkörper wurde, wie schon in einer ähnlichen Studie von Sehmisch et al. (2009a) beschrieben, in ein Kompressionsgerät (Typ 145660 Z020/TND Zwick/Roell, Ulm, Deutschland) eingebracht. Der Wirbelkörper wurde mit nach oben zeigender Bodenplatte auf eine extra für ihn entwickelte Aluminiumplatte eingespannt, welche ein Abrutschen während der Kompression verhindern soll. Nach Einspannen des Wirbelkörpers wurde ein Metallstempel mit einer um 45° abgeflachten Fläche zur Simulation der axialen Kraft auf das kaudale Ende des Wirbelkörpers in vertikaler Richtung aufgebracht. Zunächst wurde mit einer Kraft von 1 N vorgegangen, sodass eine exakte Positionierung des Test-Wirbelkörpers vorgenommen werden konnte. Nach exakter Positionierung des Wirbelkörpers wurde der Stempel automatisch mit einer Kraft von 2 bis 500 N und einer Geschwindigkeit von 50 mm/min abgesenkt. Die testXpert-Maschine zeichnete die erzielten Werte kontinuierlich auf. Der Vorgang stoppte automatisch, wenn die maximale Kraft von 500 N erreicht wurde oder bei Einbrechen des Wirbelkörpers von 5 mm. Die relative Messgenauigkeit betrug 0,2–0,4 %. Die Messung der auf den Wirbelkörper ausgeübten Kraft erfolgte pro 0,1 mm zurückgelegter Wegstrecke.

2.4.3 Die Messparameter

Die Messwerte des biomechanischen Kompressionstests wurden in ein Kraft-Weg-Diagramm übertragen (Abbildung 3) und die Maximalkraft (fmax), die Steigung und das Yield Load gemessen.

2.4.3.1 Die Maximalkraft (fmax)

Die Maximalkraft beschreibt den Wert, der zum Zeitpunkt des Einbrechens der Grundplatte in den spongiösen Wirbelkörper erreicht wurde.

2.4.3.2 Die Streckgrenze (Yield Load)

Im Kraft-Weg-Diagramm verläuft die Steigung bis zu einem bestimmten Punkt linear. Hier entsteht der Übergang von der reversiblen, elastischen zur irreversiblen, plastischen Verformung des Wirbelkörpers. Dieser Punkt wird als Streckgrenze (Yield Load) bezeichnet. (Sehmisch et al. 2009a). Zur Berechnung der Streckgrenze wurden aus dem linear ansteigenden Bereich des Graphen die Regressionsgrade und deren Standardabweichung berechnet.

2.4.3.3 Die Steigung

Die Steigung entspricht der Elastizität des Wirbelkörpers. Sie wird im linear verlaufenden Bereich des Graphen während der elastischen Verformung gemessen.



Abbildung 3: Kraft-Weg-Diagramm des biomechanischen Kompressionstests

2.5 Veraschungstest

Die Veraschung der Wirbelkörper fand in den Laboren der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie, Akkreditiertes Trinkwasser- und Hygienelabor der Universität Göttingen statt.

Ziele des Versuches waren die Bestimmung des organischen und anorganischen Knochenanteils sowie die Messung des Kalzium- und Phosphatanteils. Hierzu wurde der zweite Lendenwirbelkörper verwendet, welcher ca. 30 Minuten bei Raumluft aufgetaut wurde. Der Veraschungsversuch wurde bereits von Fürst (2014) und Döll (2010) beschrieben.

2.5.1 Bestimmung der organischen und anorganischen Knochensubstanz

Um die organische und die anorganische Knochensubstanz zu bestimmen, wurden kleine Porzellantiegel mit Nummern beschriftet, auf einer Waage analytisch gewogen und das Gewicht in g als Tara verwendet. Hierbei war wichtig, dass die Fenster und Türen im Raum verschlossen waren, da bereits der kleinste Luftzug die sensible Gewichtsmessung beeinflussen konnte. Jeder einzelne Wirbelkörper wurde anschließend in den Porzellantiegel gegeben und zusammen mit ihm gewogen. Das exakte Gewicht wurde jeweils notiert. Die Masse des Wirbelkörpers vor der Veraschung (mv) ergab sich dann folgendermaßen:

mv = Gesamtmasse - tara

Zur Erzeugung eines Glührückstandes wurde der Porzellantiegel mit dem Wirbelkörper nach vorangegangener einstündiger Aufheizphase über ein Zeitintervall von ca. zwei Stunden in einem Muffelofen einer Temperatur von 750 °C ausgesetzt. Insgesamt hatten sechs Tiegel im Ofen Platz.

Anschließend wurde der Glührückstand im Exsikkator über Kieselgel auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Durch erneutes analytisches Wiegen erfolgte dann die Bestimmung der Gesamtmasse nach Veraschung (mn) wie folgt:

mn = Gesamtmasse - tara

Anhand mv und mn wurden nun die organische und die anorganische Substanz wie folgt berechnet:

Berechnung des Anteils organischer Substanz:

% organische Substanz = ((mv-mn) * 100) / mv

Berechnung des Anteils anorganischer Substanz:

% anorganische Substanz = 100-% organische Substanz

2.5.2 Bestimmung des Kalziums und des Phosphats

Für die folgenden Bestimmungsmethoden zur Ermittlung des Kalzium- und Phosphatgehaltes wurde der Glührückstand, der durch die Veraschung entstand, verwendet. Zunächst musste dieser jedoch in eine wasserlösliche Substanz überführt werden.

2.5.2.1 Herstellung des Säureaufschlusses und Verdünnung

Unter einem Säureaufschluss versteht man einen Vorgang in der anorganischchemischen Analytik, in dem eine nur schwer wasserlösliche Substanz in eine wasseroder säurelösliche überführt wird. In diesem Versuch wurde der Säureaufschluss des Rückstandes mit 10% iger Salpetersäure (NH₃) hergestellt. Zur Herstellung des Säureaufschlusses wurde der Glührückstand der Knochenproben zunächst in einem Mörser mit einem Pistill fein homogenisiert, wovon 50 mg analytisch genau unter Protokollierung des Messwertes ausgewogen wurden. Anschließend wurde diese Menge in einen 250-ml-Rundkolben gefüllt und mit 100 ml 10% iger Salpetersäure versetzt. Nach Aufsetzen eines Rückflusskühlers wurde die Lösung im Kolben durch eine Heizhaube zum Sieden erhitzt und unter Rückfluss 30 Minuten sieden gelassen. Die Lösung musste nach dem Aufschluss klar sein und durfte keine Opaleszenz zeigen. Die nun hergestellte Aufschlusslösung wurde nun in einen 1000-ml-Messkolben gefüllt. Anschließend wurde der 250-ml-Rundkolben dreimal mit 100 ml destilliertem Wasser nachgespült und der Messkolben auf 1000 ml aufgefüllt. Diese Lösung konnte nun bei 4°C aufbewahrt werden. Anschließend erfolgte eine Verdünnung um den Faktor 20, sodass die erwartete Konzentration im Vertrauensbereich des Messverfahrens lag. Hierzu wurden 5 ml der Aufschlusslösung aus dem 1000-ml-Messkolben in einen 100-ml-Messkolben überführt und anschließend auf 100 ml aufgefüllt. Die verdünnte Lösung konnte nun direkt zur Kalzium- und Phosphatbestimmung eingesetzt werden.

2.5.2.2 Phosphatbestimmung

Die Phosphatbestimmung erfolgte durch Photometrie des Phosphat-Molybdänblau-Komplexes. Zuerst erfolgte die Pipettierung von 10 ml der 1:20 verdünnten, wässrigen Probe nach Säureaufschluss in ein Kunststoffröhrchen. Nach Hinzugabe von 2 ml Phosphatreagenz (Zusammensetzung siehe Tabelle 3) erfolgte nach einer Reaktionszeit von etwa 10 Minuten die photometrische Messung der Extinktion in einer Küvette der Schichtdicke 10 mm gegen eine Blindprobe, die anstelle der Probe destilliertes Wasser enthielt. Die Messwellenlänge betrug 690 nm. Anschließend wurde, ähnlich wie bereits von Döll (2010) und Fürst (2014) beschrieben, eine Abgleichgerade durch Untersuchung und Feststellung der Extinktion einer Verdünnungsreihe im Konzentrationsintervall 0,1–4 mg/l unter Bezug auf eine Phosphat-Standardlösung erzeugt. Der Phosphatgehalt wurde anschließend in mg/l notiert.

Menge in ml	Substanz
25,0	Schwefelsäure (w = 25 %)
7,5	Ammoniummolybdat-Lösung (w = 4 %)
15,0	Ascorbinsäure-Lösung (w = 0,17 %)
2,5	Kaliumantimonoxidtartrat-Lösung (w = 0,27 %)

Tabelle 3:	Reaktions	gemisch ((Phosphat-	Reagenz)
------------	-----------	-----------	------------	----------

2.5.2.3 Kalziumbestimmung

Die Kalziumbestimmung erfolgte durch Flammatomabsorptionsspektroskopie der Lösung nach Zugabe von Lanthanchlorid als Matrix-Modifier zur Maskierung des in der Lösung vorhandenen Phosphats mit Luft-Acetylen-Flamme. Zunächst wurden 5 ml der unter 2.5.2.1 hergestellten Probenlösung in das Autosampler-Rack des AAS-Gerätes (Atomabsorptionsspektroskop FIAS Perkin-Elmer, Rodgau, Deutschland) gegeben.

Das Gemisch wurde nun stetig über einen Zerstäuber in eine aus einem Acetylen-Luft-Gemisch bestehende Flamme eingebracht, sodass sich das in der Probe befindliche Kalzium in der Flamme verfärbte. Zuvor wurde eine monochromatische Strahlung durch die Flamme geschickt, welche durch das in ihr eingebrachte Kalzium abgeschwächt wurde. Die Messung der Extinktion erfolgte an einer Kalziumemissionsbande und wurde zuvor gegen eine Verdünnungsreihe im Konzentrationsintervall von 0,1 bis 5 mg/l nach Vorgaben des akkreditierten Verfahrensprozesses kalibriert. Zur Beurteilung wurde zusätzlich eine nicht durch die Flamme abgeschwächte Strahlung erzeugt und die dort entstandene Extinktion mit der durch das Kalzium der Flamme abgeschwächten Extinktion verglichen. Anschließend wurde der Kalziumgehalt in mg/l und der Quotient aus Kalzium/Phosphat notiert.

2.6 Mikro-CT-Analyse

Für die Mikro-CT-Analyse wurde der dritte Lendenwirbelkörper verwendet. Die erzeugten Schnittbilder wurden anschließend, wie bereits von Zimmermann (2017) am osteoporotischen Femur der Ratte beschrieben, in einem Bildbearbeitungsprogramm ausgewertet und die Messparameter berechnet.

2.6.1 Durchführung der Wirbelkörper-Scans

Die Wirbelkörperscans wurden mit dem Quantum FX Micro-CT (Caliper Scienes, Hopkinton, MA, USA) angefertigt.

Es wurden 3600 Bilder bei einem 360°-Projektionsbild pro Wirbelkörper mit einer isotropen Auflösung von 40 µm pro Voxel durchgeführt. Bei einer Röhrenspannung von 70 kVp und einer Stromstärke von 200 µA betrug die Belichtungszeit zwei Minuten (Saul et al. 2017); das Gesichtsfeld maß 20 x 20 mm². Der Wirbelkörper wurde mit einem Knochendichte-Phantom in einer Kunststoffröhre platziert, um so ein Verrutschen durch eine Schaumstoffsicherung zu verhindern. Das Phantom bestand aus fünf Hydroxilapatit-Elementen unterschiedlicher Dichte und wurde zur Dichtebestimmung mit jedem Wirbelkörper gescannt. Anschließend wurde der Scanvorgang gestartet, und die Daten wurden auf einen angeschlossenen Computer übertragen.

2.6.2 Die 3D-Auswertung

Die Auswertung und Bestimmung der Messparameter (siehe 2.6.2.2) der Wirbelkörper-Scans erfolgte mit dem in 2.6.2.1 beschriebenen Bildbearbeitungsprogramm

2.6.2.1 Das 3D-Bildbearbeitungsprogramm

Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm 3D OsteoAnalyze. Zuerst wurde das im Wirbelkörperscan erzeugte Bild in das Programm geladen. Die Darstellung der Wirbelkörper erfolgte durch das Programm sowohl als 2D- als auch als 3D-Modell. Da die Daten zunächst in gray values vorlagen, wurden diese zunächst durch nachträgliche Kalibrierung des unter 2.6.1 erwähnten Dichtephantoms in Hounsfield-Einheiten (HU) umgerechnet. Hierfür musste das Knochendichte-Phantom zunächst ausgeschnitten werden (Abbildungen 4 und 5). Nach der Kalibrierung konnte die Bestimmung der Messparameter beginnen.



Abbildung 4: Ausschneiden des Phantoms



Abbildung 5: Ausgeschnittenes Phantom

2.6.2.2 Bestimmung der Messparameter der 3D-Darstellung

Folgende Parameter wurden bestimmt:

Tabelle 4: Messparameter der 3D-Darstellung

Messparameter	Erklärung
Total-Volume (TV) in mm ³ (bestehend aus Bone Volume + Weichteilvolumen)	beinhaltet den mineralisierten Knochen, das Osteoid, das Knochenmark und das Weichteilgewebe
Bone-Volume (BV) in mm ³ (bestehend aus Kortikalis- und Trabekelvolumen)	beinhaltet das Osteoid und den minerali- sierten Knochen
Messparameter	Erklärung
--	---
Bone-Volume/Total-Volume (BV/TV) in %	entspricht dem Anteil von Osteoid und mineralisiertem Knochen am Gesamtvo- lume
Gesamt-BMD in g/mm ³	bestehend aus Bone-BMD und Weichteil- dichte
Bone-BMD in g/mm ³	bestehend aus Trabekel- und Kortikalis- BMD

Da zur Bestimmung der o. g. Messparameter nur der Corpus vertebrae verwendet wurde, musste bei jedem Scan der Processus spinosi entfernt werden (Abbildung 6). Zur anschließenden Dichte- und Voluminamessung wurde nun das Gesamtdichteverteilungshistogramm betrachtet. Durch Einstellen eines minimalen und eines maximalen Schwellenwertes konnte der zu betrachtende Bereich für jeden zu messenden Parameter eingestellt werden. Diese Schwellenwerte wurden vor dem eigentlichen Versuch für die zu bestimmenden Messbereiche (Weichteile, Kortikalis und Trabekel) durch Auswerten von drei intakten und drei osteoporotischen Lendenwirbelkörpern nach Optik und anschließender Berechnung der jeweiligen Mittelwerte bestimmt. Es ergaben sich folgende Mittelwerte: Weichteile: -0,1 g/mm³, Trabekel: 0,28 g/mm³, Kortikalis: 0,86 g/mm³.

Zur Bestimmung der Gesamt-BMD wurden die Schwellenwerte im Dichteverteilungshistogramm so eingestellt, dass der Minimalwert dem Schwellenwert der Weichteile und der Maximalwert dem maximal möglichen Schwellenwert des Scans entsprach. Der Wirbelkörper war in der 2D-Betrachtung vollständig grün gefärbt (siehe Abbildung 7). Dieser Bereich entsprach dem Total-Volume (TV). In den nächsten Schritten wurden die Minimal- und die Maximalwerte so eingestellt, dass sich der jeweils zu betrachtende Messbereich darstellen ließ. Für das Bone Volume (BV) und die Bone- BMD wurde der Minimalwert auf den Schwellenwert der Trabekel gesetzt und der Maximalwert komplett nach rechts gesetzt (= maximal möglicher Schwellenwert). Das entsprechende 2D-Bild ist auf Abbildung 8 zu sehen. Die 2D-Bilder für die Weichteile, Trabekel und Kortikalis sind auf den Abbildungen 9–11 zu sehen. Die jeweiligen Dichten (Gesamt-BMD, Kortikalis-BMD, Trabekel-BMD und Weichteildichte) und Volumina (Total-Volume, Kortikalis-, Trabekel- und Weichteilvolumen) errechnete das Programm anschließend über einen bestimmten Algorithmus. Abschließend wurde noch der prozentuale Anteil vom Bone-Volume (BV) am Total-Volume (TV) berechnet.



Abbildung 6: Ausschneiden des Corpus vertebrae



Abbildung 7: Total Volume in der 2D-Darstellung



Abbildung 8: Bone-Volume in der 2D-Darstellung



Abbildung 9: Weichteilvolumen in der 2D-Darstellung



Abbildung 10: Trabekelvolumen in der 2D-Darstellung



Abbildung 11: Kortikalisvolumen in der 2D-Darstellung

2.6.3 Die 2D-Auswertung

2.6.3.1 Bestimmung der Messparameter der 2D-Darstellung

Die 2D-Darstellung der Wirbelkörper erfolgte mit der MetaMorph Basic Acquisition Software (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany).

Zuvor wurde im o. g. 3D-Bildbearbeitungsprogramm mittels eines sagittalen Schnitts durch den Corpus vertebrae ein zweidimensionales Bild erstellt und anschließend in die MetaMorph Basic Acquisition Software geladen. Die Abbildung 12 zeigt die zweidimensionale Darstellung eines Wirbelkörpers. Der Dornfortsatz wurde zur Berechnung der o. g. Parameter nicht benutzt. Zur Bestimmung der Messparameter waren analog zu einer früheren Studie von Döll (2010) folgende Schritte notwendig: Graudetektion, Messung der Gesamtfläche, Differenzierung zwischen Kortikalis- und Trabekelfläche und Bestimmung der ventralen und dorsalen Kortikalisdicke.



Abbildung 12: 2D-Bild eines Wirbelkörpers

2.6.3.2 Die Graudetektion

Die verwendete Software markierte nun alle von ihr erkannten knöchernen Strukturen blau. Da es jedoch kleinere Bereiche gab, die nicht erkannt wurden, mussten diese durch den Untersucher manuell nachjustiert werden, sodass letztendlich alle knöchernen Strukturen blau angefärbt waren.

2.6.3.3 Messung der Gesamtfläche

Die Berechnung der Gesamtfläche erfolgte ohne Miteinbeziehung der Dornfortsätze. Zur Messung wurde eine Linie unter Aussparung der Epiphysenfugen am Außenrand der Kortikalis einmal um den Knochen herumgezogen (Abbildung 13). Die Software konnte nun sowohl die Wirbelkörpergesamtfläche als auch die knöcherne Gesamtfläche ermitteln.



Abbildung 13: Eingerahmte Gesamtknochenfläche des Wirbelkörpers

2.6.3.4 Trennung von Kortikalis- und Trabekelfläche

Zur Differenzierung zwischen trabekulärer und kortikaler Fläche wurde eine weitere Linie an der Innenseite der Kortikalis gezogen (grüne Linie in Abbildung 14). Das kraniale und das kaudale Ende bildeten die ausgesparten Epiphysenfugen. Die Fläche zwischen den beiden Innenseiten der Kortikalis bildet nun das Endost und wird der trabekulären Fläche zugeschrieben. Die Kortikalisfläche entsprach dem Bereich zwischen Innen- und Außenseite der Kortikalis.



Abbildung 14: Trennung zwischen kortikaler und trabekulärer Knochenfläche

2.6.3.5 Bestimmung der ventralen und dorsalen Kortikalisdicke

Zur Bestimmung der Kortikalisdicke wurden dorsal (orangefarbene Pfeile in Abbildung 15) und ventral (orangefarbene Pfeile in Abbildung 16) zehn Vektoren senkrecht über die Kortikalisfläche gezogen. Die Enden der Vektoren überragten diese hierbei. Das Programm konnte nun mithilfe der zuvor berechneten Kortikalisfläche die Vektoren so zurechtschneiden, dass sie genau mit den jeweiligen Kortikalisenden abschließen. Die ventrale und die dorsale Kortikalisdicke wurden nachfolgend aus dem arithmetischen Mittel der Länge der gekürzten zehn Vektoren ermittelt.



Abbildung 15: Vektoren zur Berechnung der dorsalen Kortikalisdicke



Abbildung 16: Vektoren zur Berechnung der ventralen Kortikalisdicke

2.6.3.6 Messparameter der 2D-Auswertung

Folgende Messparameter wurden bestimmt:

Messparameter	Erklärung
Gesamtfläche in mm ²	beinhaltet die kortikale und die trabekuläre Flä- che sowie nichtknöcherne Anteile
Gesamt Knochenfläche in mm ²	beinhaltet die kortikale und die trabekuläre Flä- che ohne nichtknöcherne Anteile
Endostale Gesamtfläche in mm ²	beinhaltet die Gesamtfläche innerhalb des En- dosts sowie enthaltener nicht knöcherner Anteile
Kortikale Knochenfläche in mm ²	beinhaltet die kortikale Gesamtfläche
Trabekuläre Knochenfläche in mm ²	beinhaltet die trabekuläre Gesamtfläche
Ventrale Kortikalisdicke in mm	berechnet aus dem arithmetischen Mittel der ge- kürzten Länge der zehn Vektoren durch die vent- rale Kortikalis
Dorsale Kortikalisdicke in mm	berechnet aus dem arithmetischen Mittel der ge- kürzten Länge der zehn Vektoren durch die dor- sale Kortikalis

Tabelle 5: Messparameter der 2D-Auswertung

	Γ
Messparameter	Erklärung
Mittlere Trabekeldicke in mm	beinhaltet die mittlere Dicke aller Trabekel eines Sagittalschnitts
Anzahl der Trabekelkreuzungen	Anzahl der Trabekelkreuzungen innerhalb der Trabekelfläche
Dichte der Trabekelkreuzungen in n/mm ²	beinhaltet die Anzahl der Trabekelkreuzungen pro mm ² innerhalb der trabekulären Knochenflä- che

2.7 Die statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism (Version 4.00, Graph Pad Software Inc., San Diego, USA), wobei die Werte sowohl als Säulendiagramm als auch in tabellarischer Form erfasst wurden.

Auf Grundlage der Ergebnisse der jeweiligen Versuche wurden für jede Versuchsgruppe das Minimum und das Maximum, der Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler berechnet. Anschließend wurde, um signifikante Unterschiede festzustellen, eine Varianzanalyse (one-way-Anova) und ein Turkey-Kramer-post-hoc-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag jeweils bei p < 0,05.

3 Ergebnisse

3.1 Körpergewichte der Versuchstiere

Die Körpergewichte der Versuchstiere wurden wöchentlich gemessen und notiert (siehe Tabelle A1 mit den Mittelwerten der Körpergewichte in Gramm zu drei Zeitpunkten des Versuches mit jeweiliger Standardabweichung). Die Auswertung der Körpergewichte, so wie sie für diese Studie angewendet wurde, wurde bereits in weiteren Publikationen beschrieben (Saul et al. 2016; Kling 2016; Saul et al. 2017).

Die statistische Auswertung zeigt zu Versuchsbeginn keine signifikanten Unterschiede zwischen OVX- vs. NON-OVX-Gruppe (Abbildung 17). Zum Zeitpunkt der Osteotomie bestand ein signifikanter Unterschied zwischen NON OVX und den ovariektomierten Versuchsgruppen, wobei die NON OVX die niedrigsten Körpergewichte aufwiesen. (Abbildung 18). Zu Versuchsende, also vor der Tötung der Tiere, bestand ein signifikanter Unterschied zwischen NON OVX und OVX. Gegenüber den Baicalein-Gruppen zeigte die NON-OVX-Gruppe zwar weiterhin niedrigere Körpergewichte, jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr (Abbildung 19).



Abbildung 17: Körpergewichte in g zu Versuchsbeginn



signifikant vs. alle übrigen Gruppen





signifikant vs. NON OVX

Abbildung 19: Körpergewichte in g zu Versuchsende

3.2 Uterusgewichte der Versuchstiere

Die Uteri der Versuchstiere wurden nach der Tötung gewogen. Die jeweiligen Gewichte sind in Tabelle A2 im Tabellenteil zu sehen. In der statistischen Analyse zeigte sich ein signifikant höheres Uterusgewicht der NON-OVX- gegenüber den OVX-Gruppen (Abbildung 20). Das genaue Vorgehen zur Auswertung der Uterusgewichte für diese Studie wurde bereits von Saul et al. (2016), Kling (2016) und Saul et al. (2017) beschrieben.



[#] signifikant vs. alle übrigen Gruppen

Abbildung 20: Uterusgewichte in g nach Tötung

3.3 Ergebnisse des biomechanischen Kompressionstests

3.3.1 Ergebnisse der Maximalkraft(fmax)-Testung

Die gemessene Maximalkraft (fmax) in N (Tabelle A3 und Abbildung 21) ist in der NON-OVX-Gruppe mit 152,7 N signifikant höher als in der OVX-Gruppe (118 N), 1mg-Baicalein-Gruppe (120,6 N) und 100-mg-Baicalein-Gruppe (108,3 N). Gegenüber der 10-mg-Baicalein-Gruppe ergibt sich zwar auch ein höherer Wert, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Der Unterschied zwischen der NON-OVX- und der 100-mg-Baicalein-Gruppe ist am größten. Die höchste Maximalkraft zeigt die NON-OVX-Gruppe, während die 100-mg-Baicalein-Gruppe den geringsten Wert aufweist. Keine Signifikanz ergibt sich unter den ovariektomierten Gruppen.



signifikant vs. OVX, 1 mg und 100 mgAbbildung 21: Maximalkraft (fmax) in N

3.3.2 Ergebnisse der Steigung

Die ermittelte Steigung in N/mm (Tabelle A4 und Abbildung 22) zeigt in der NON-OVX- gegenüber der OVX-Gruppe zwar einen höheren Wert, dieser ist jedoch nicht signifikant. Gegenüber den Baicalein-Gruppen ergibt sich in der NON-OVX-Gruppe eine signifikant höhere durchschnittliche Steigung. Innerhalb der ovariektomierten Gruppen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.



signifikant vs. 1 mg, 10 mg und 100 mg

Abbildung 22: Steigung in N/mm

3.3.3 Ergebnisse der Streckgrenze(Yield Load)-Testung

Die ermittelte Streckgrenze (Yield Load) in N (Tabelle A5 und Abbildung 23) zeigt einen signifikant höheren Wert in der NON-OVX-Gruppe (151,4 N) gegenüber den Gruppen OVX (116,8 N), 1 mg (119,1) und 100 mg (107,2 N). Gegenüber der 10-mg-Gruppe (134 N) besteht zwar auch ein höherer Wert, jedoch keine Signifikanz. Den höchsten Yield Load weist die NON-OVX-Gruppe vor, während die 100 mg den geringsten Wert misst. Innerhalb der ovariektomierten Gruppen ergeben sich keine Signifikanzen. Hier zeigt die 10-mg-Gruppe den höchsten Wert.



signifikant vs. OVX, 1 mg und 100 mg

Abbildung 23: Streckgrenze (Yield Load) in N

3.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der biomechanischen Kompression

Zusammenfassend zeigen sich bei allen drei gemessenen Parametern höhere Werte in der NON-OVX-Gruppe gegenüber den vier ovariektomierten Gruppen. Innerhalb der ovariektomierten Gruppen zeigen sich bei keinem der gemessenen Parameter Signifikanzen, wobei die 100-mg-Baicalein-Gruppe regelmäßig den kleinsten gemessenen Wert zeigt. Bei der Maximalkraft und der Streckgrenze innerhalb der ovariektomierten Ratten zeigt die 10-mg-Baicalein-Gruppe die höchsten Werte, während die größte Steigung in der Gruppe ohne Baicalein-Substitution vorliegt.

3.4 Ergebnisse des Veraschungstests

3.4.1 Ergebnisse der Bestimmung der organischen Knochensubstanz

Bezüglich des Anteils der organischen Knochensubstanz an der Gesamtmasse zeigt die NON-OVX-Gruppe signifikant niedrigere Werte gegenüber den ovariektomierten Versuchsgruppen (Tabelle A6 und Abbildung 24). Innerhalb der ovariektomierten Versuchsgruppen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Hier hat die 100-mg-Gruppe mit 66,11 % den höchsten Anteil und die 1-mg-Gruppe mit 64,71 % den niedrigsten.



signifikant vs. alle übrigen Gruppen

Abbildung 24: Organische Knochensubstanz in %

3.4.2 Ergebnisse der Bestimmung der anorganischen Knochensubstanz

Die NON-OVX-Gruppe weist gegenüber allen ovariektomierten Versuchsgruppen signifikant höhere Werte auf (Tabelle A7 und Abbildung 25). Innerhalb der ovariektomierten Versuchsgruppen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Hier hat die 10-mg-Gruppe mit 35,29 % den höchsten Wert und die 100-mg-Gruppe mit 33,89 % den niedrigsten Wert.



signifikant vs. alle übrigen Gruppen

Abbildung 25: Anorganische Knochensubstanz in %

3.4.3 Ergebnisse der Kalziumgehaltberechnung

Es ergeben sich weder zwischen OVX- und NON-OVX-Gruppe noch innerhalb der ovariektomierten Versuchsgruppen signifikante Unterschiede bezüglich des Kalziumgehaltes des Knochens (Tabelle A8 und Abbildung 26). Die OVX-Gruppe ohne Baicalein-Substitution (0,5114 mg/l) weist gegenüber der NON-OVX-Gruppe (0,5089 mg/l) geringfügig höhere Werte auf. Die 100-mg-Baicalein-Gruppe hat mit 0,5464 mg/l den höchsten Wert und die 1-mg-Gruppe (0,5020 mg/l) den niedrigsten.



Abbildung 26: Kalziumgehalt in mg/l

3.4.4 Ergebnisse der Phosphatgehaltberechnung

Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Phosphatgehaltes des Knochens (Tabelle A9 und Abbildung 27). Die OVX-Gruppe (1,332 mg/l) hat gegenüber der NON-OVX-Gruppe (1,345 mg/l) geringfügig niedrigere Werte. Die NON-OVX-Gruppe weist mit 1,345 mg/l die dritthöchste Phosphatmenge auf, während die 100-mg-Baicalein-Gruppe mit 1,412 mg/l den höchsten und die 1-mg-Baicalein-Gruppe (1,317 mg/l) den niedrigsten Wert hat.



Abbildung 27: Phosphatgehalt in mg/l

3.4.5 Verhältnis Kalzium/Phosphat (Ca/PO₄)

Bezüglich des Verhältnisses von Kalzium- zu Phosphatanteil ergeben sich weder zwischen ovariektomierten und nicht-ovariektomierten Ratten noch innerhalb der ovariektomierten Versuchsgruppen Signifikanzen (Tabelle A10 und Abbildung 28). Die NON-OVX-Versuchsgruppe (0,898) weist den vierthöchsten Wert auf, während die 100-mg-Gruppe mit 0,916 den höchsten Wert aufweist. Die 10-mg-Baicalein-Gruppe (0,8963) hat den niedrigsten Wert.



Abbildung 28: Kalzium/Phosphat (Ca/PO₄)

3.4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der Veraschung

Bezüglich des Kalzium- und Phosphatgehaltes der Wirbelkörper ergeben sich zwischen keinen Versuchsgruppen signifikante Unterschiede. Die 100-mg-Baicalein-Gruppe hat sowohl beim Kalzium als auch beim Phosphat und bei der Verhältnisberechnung von Kalzium- zu Phosphatanteil die höchsten Werte. Bezüglich der prozentualen Verteilung zwischen organischer vs. anorganischer Knochensubstanz zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen ovariektomierten und nicht-ovariektomierten Ratten, jedoch nicht innerhalb der Baicalein-Gruppen.

3.5 Ergebnisse der Mikro-CT-3D-Analyse

3.5.1 Ergebnisse der Analyse der Wirbelkörpervolumina

3.5.1.1 Total-Volumina

Bezüglich der Total-Volumina der Wirbelkörper ergeben sich weder zwischen ovariektomierten und nicht-ovariektomierten Ratten noch innerhalb der Baicalein-Versuchsgruppen signifikante Unterschiede (Tabelle A11 und Abbildung 29). Die NON-OVX-Versuchsgruppe hat mit 217,6 mm³ das niedrigste Gesamtvolumen. Innerhalb der ovariektomierten Ratten hat die OVX-Gruppe mit 244 mm³ das größte Gesamtvolumen. Innerhalb der Baicalein-Gruppen hat die 1-mg-Gruppe das höchste Volumen, während die 10-mg-Gruppe das geringste hat.



Abbildung 29: Total-Volumina in mm³

3.5.1.2 Weichteil-Volumina

Die NON-OVX-Versuchsgruppe weist signifikant niedrigere Werte gegenüber der ovariektomierten Gruppe ohne Substitution, gegenüber der 1-mg-Baicalein-Gruppe und gegenüber der 100-mg-Baicalein-Gruppe auf (Tabelle A12 und Abbildung 30). Gegenüber der 10-mg-Baicalein-Gruppe besteht zwar auch ein niedrigeres Weichteilvolumen, jedoch keine Signifikanz. Bei den ovariektomierten Ratten ergeben sich keine signifikanten Unterschiede, hier hat die nicht Baicalein-substituierte Gruppe höhere Weichteilvolumina als die substituierten Gruppen. Bei den substituierten Ratten hat die 100mg-Gruppe die höchsten Werte, gefolgt von der 1-mg- und der 10-mg-Gruppe.



signifikant vs. OVX, 1 mg und 100 mgAbbildung 30: Weichteil-Volumina in mm³

3.5.1.3 Kortikalis-Volumina

Bezüglich der Kortikalis-Volumina ergeben sich signifikant höhere Werte in der NON-OVX-Gruppe (56,58 mm³) gegenüber der ovariektomierten ohne Baicalein-Substitution (42,18 mm³) und der 100-mg-Baicalein-Gruppe (43,9 mm³) (Tabelle A13 und Abbildung 31). Gegenüber der 1-mg- (47,89 mm³) und 10-mg-Gruppe (45,70 mm³) ergeben sich zwar höhere Kortikalis-Volumina, jedoch keine Signifikanzen. Innerhalb der ovariektomierten Versuchsgruppen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Die 1-mg-Baicalein-Gruppe hat das höchste Kortikalis-Volumen, während die Gruppe ohne Substitution den niedrigsten Wert hat.



signifikant vs. OVX und 100 mg

Abbildung 31: Kortikalis-Volumina in mm³

3.5.1.4 Trabekel-Volumina

Bezüglich der Trabekel-Volumina ergeben sich zwischen ovariektomierten und NON-OVX-Tieren keine signifikanten Unterschiede (Tabelle A14 und Abbildung 32), auch nicht innerhalb der ovariektomierten Versuchsgruppen. Das höchste Trabekelvolumen weist die OVX-Gruppe ohne Baicalein-Substitution mit 83,14 mm³ auf, gefolgt von der 1-mg- (82,97 mm³) und der 100-mg-Baicalein-Gruppe (79,87 mm³). Die NON-OVX-Gruppe (78,55 mm³) liegt vor der 10-mg-Baicalein-Gruppe (75,94 mm³) an vierter Stelle.



Abbildung 32: Trabekel-Volumina in mm³

3.5.1.5 Bone Volume/Total Volume (BV/TV)

Bezüglich des prozentualen Anteils des Knochenvolumens am Gesamtvolumen zeigt die NON-OVX-Versuchsgruppe signifikant höhere Werte gegenüber den OVX-Gruppen (siehe Tabelle A15 und Abbildung 33). Innerhalb der ovariektomierten Tiere ergeben sich keine Signifikanzen. Auch die Baicalein-Gruppen untereinander zeigen keine signifikanten Unterschiede. Innerhalb der ovariektomierten Ratten hat die 1-mg-Baicalein-Gruppe (54,88 %) den höchsten prozentualen Knochenanteil am Gesamtvolumen, gefolgt von der 10-mg- (54,41 %) und der 100-mg-Gruppe (52,25 %). Den niedrigsten Knochenanteil hat mit 51,49 % die ovariektomierte Gruppe ohne Substitution.



signifikant vs. alle übrigen Gruppen

Abbildung 33: Bone Volume/Total Volume in %

3.5.1.6 Zusammenfassung der Wirbelkörpervolumina-Analyse

Bezüglich des Gesamtvolumens der Wirbelkörper weist die NON-OVX-Versuchsgruppe gegenüber den ovariektomierten Versuchsgruppen niedrigere Werte auf und bezüglich des Kortikalisvolumens höhere. Signifikante Unterschiede liegen jedoch nur bezüglich des Kortikalisvolumens vor.

Der prozentuale Knochenanteil am Gesamtvolumen ist in der NON-OVX-Versuchsgruppe signifikant höher bei den ovariektomierten Tieren. Bezüglich der Weichteilvolumina ergeben sich signifikant niedrigere Werte der NON-OVX-Gruppe gegenüber den ovariektomierten Ratten. Innerhalb der ovariektomierten Tiere bestehen bei keinem der ermittelten Parameter signifikante Unterschiede. Die nicht-baicaleinsubstituierte Versuchsgruppe weist das größte Gesamtvolumen auf, hat aber den geringsten prozentualen Knochenanteil am Gesamtvolumen. Innerhalb der Baicalein-Gruppen hat die 1-mg-Gruppe das höchste Gesamt-, Kortikalis- und Trabekelvolumen. Auch der prozentuale Knochenanteil am Gesamtvolumen ist in der 1-mg-Gruppe am höchsten.

3.5.2 Ergebnisse der Knochenmineraldichte-(BMD)-Messung

3.5.2.1 Gesamt-BMD

Bezüglich der Gesamt-Knochenmineraldichte zeigen sich signifikant höhere Werte in der NON-OVX-Versuchsgruppe (0,5150 g/mm³) gegenüber allen anderen Gruppen. (siehe Tabelle A16 und Abbildung 34). Sowohl innerhalb der ovariektomierten als auch innerhalb der Baicalein-Gruppen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Die 1-mg-Baicalein-Gruppe (0,4381 g/mm³) hat hier im Durchschnitt die höchste Mineraldichte, während die nicht Baicalein-substituierte Gruppe den niedrigsten Wert hat (0,4069 g/mm³).



signifikant vs. alle übrigen Gruppe

Abbildung 34: Gesamt-BMD in g/mm³

3.5.2.2 Weichteiledichte

Die OVX-Gruppe ohne Baicalein-Substitution (0,06914 g/mm³) zeigt signifikant höhere Werte gegenüber den NON-OVX-Tieren (0,05358 g/mm³). Gegenüber den Baicalein-Gruppen zeigt die NON-OVX-Versuchsgruppe zwar auch niedrigere Werte, jedoch keine Signifikanzen (siehe Tabelle A17 und Abbildung 35). Innerhalb der ovariektomierten Ratten zeigt die Gruppe ohne Substitution signifikant höhere Werte gegenüber den 10-mg- (0,05397 g/mm³) und 100-mg-(0,05895 g/mm³)-Versuchsgruppen. Gegenüber der 1-mg-Gruppe (0,06047 g/mm³) liegt keine signifikante Erhöhung vor. Die Baicalein-Gruppen untereinander zeigen keine signifikanten Unterschiede.



[#] signifikant vs. OVX

signifikant vs. 10 mg und 100 mg

Abbildung 35: Weichteiledichte in g/mm³

3.5.2.3 Kortikalis-BMD

Die NON-OVX-Versuchsgruppe besitzt eine signifikant höhere Kortikalis-Knochenmineraldichte (1,092 g/mm³) als die ovariektomierte Gruppe ohne Substitution (1,061 g/mm³). Gegenüber den Baicalein-Gruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle A18 und Abbildung 36). Jedoch besitzen die 10-mg- und die 100-mg-Gruppe (jeweils 1,1 g/mm³) eine höhere Kortikalis-BMD als die OVX-Gruppe. Die ovariektomierte Versuchsgruppe ohne Baicalein-Substitution zeigt gegenüber den Baicalein-Gruppen signifikant niedrigere Werte. Innerhalb der Baicalein-Gruppen gibt es keine Signifikanzen. Hier hat die 1-mg-Gruppe (1,061 g/mm³) den niedrigsten Wert.



signifikant vs. OVX

signifikant vs. 1 mg, 10 mg und 100 mg

Abbildung 36: Kortikalis-BMD in g/mm³

3.5.2.4 Trabekel-BMD

Die NON-OVX-Versuchsgruppe hat signifikant höhere Werte als alle übrigen Gruppen. Innerhalb der ovariektomierten Gruppen zeigen die Gruppe ohne Baicalein-Substitution (0,5539 g/mm³) und die 1-mg-Baicalein-Gruppe (0,5545 g/mm³) gegenüber der 100mg-Gruppe (0,5407 g/mm³) signifikant höhere Werte (Tabelle A19 und Abbildung 37). Die 10-mg-Baicalein-Gruppe (0,5518 g/mm³) weist zwar auch eine höhere Trabekel-BMD gegenüber der 100-mg-Gruppe auf, jedoch keine Signifikanz.



signifikant vs. alle übrigen Gruppen
signifikant vs. OVX und 1 mg
Abbildung 37: Trabekel-BMD in g/mm³

3.5.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Knochenmineraldichtemessung

Zusammenfassend zeigt sich sowohl eine signifikant höhere Gesamt- als auch Trabekel-Knochenmineraldichte in der NON-OVX- gegenüber den ovariektomierten Versuchsgruppen. Bezüglich der Weichteil- und Kortikalis-BMD zeigt die NON-OVX-Gruppe lediglich gegenüber der OVX-Versuchsgruppe signifikante Unterschiede. Gegenüber den Baicalein-Gruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede. Innerhalb der ovariektomierten Versuchsgruppen liegen bezüglich der Gesamt-BMD keine Signifikanzen vor. Sowohl bei der Kortikalis- als auch der Weichteil-BMD-Messung zeigt die OVX-Gruppe signifikante Unterschiede zu den Baicalein-Gruppen (Ausnahme OVX vs. 1-mg-Baicalein-Gruppe bei der Weichteil-BMD). Innerhalb der Baicalein-Gruppen zeigen sich lediglich bei der Trabekel-BMD signifikante Unterschiede zwischen der 1-mgund 100-mg-Gruppe.

3.6 Ergebnisse der Mikro-CT-2D-Analyse

3.6.1 Anzahl der Trabekelkreuzungen

Bezüglich der Anzahl der Trabekelkreuzungen zeigt die NON-OVX-Gruppe eine signifikant höhere Anzahl gegenüber den nicht-ovariektomierten Versuchsgruppen (Abbildung 38). Die genauen Werte sind im Tabellenverzeichnis in Tabelle A20 aufgeführt. Innerhalb der ovariektomierten Tiere ergeben sich keine signifikanten Unterschiede: Hier hat die 10-mg-Gruppe die höchsten Werte, während die 100-mg-Gruppe die niedrigsten aufweist.



[#] signifikant vs. alle übrigen Gruppen

Abbildung 38: Anzahl der Trabekelkreuzungen in n

3.6.2 Dichte der Trabekelkreuzungen

Die NON-OVX-Gruppe besitzt eine signifikant höhere Dichte an Trabekelkreuzungen gegenüber den restlichen Versuchsgruppen. Unter den ovariektomierten Ratten weist die OVX-Gruppe ohne Baicalein-Substitution die höchsten Werte auf. Sowohl die OVX-Gruppe ohne Substitution als auch die 10-mg-Baicalein-Gruppe weisen signifikant höhere Werte gegenüber der 100-mg-Gruppe vor (siehe Abbildung 39). Die 10-mg-Gruppe besitzt zwar auch eine höhere Dichte als die 100-mg-Gruppe, jedoch bestehen hier keine signifikanten Unterschiede. Die genauen Werte sind im Tabellenteil in Tabelle A21 aufgeführt.



signifikant vs. alle übrigen Gruppen
signifikant vs. OVX und 10 mg
Abbildung 39: Dichte der Trabekelkreuzungen in n/mm²

3.6.3 Kortikalisdicke dorsal

Bezüglich der Kortikalisdicke dorsal ergeben sich zwischen den Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 40). Die NON-OVX-Gruppe hat die geringste Dicke (0,1626 mm). Innerhalb der ovariektomierten Tiere haben die Baicaleingruppen höhere Dicken als die nicht substituierte Gruppe. Hier hat die 10-mg-Gruppe den höchsten Wert und die 1-mg-Gruppe den niedrigsten (Tabelle A22).



Abbildung 40: Kortikalisdicke dorsal in mm

3.6.4 Kortikalisdicke ventral

Die NON-OVX-Versuchsgruppe zeigt eine signifikant höhere Kortikalisdicke ventral gegenüber den restlichen Versuchsgruppen (Abbildung 41). Innerhalb der ovariektomierten Versuchsgruppen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Hier weist die 10-mg-Gruppe die höchsten Werte, während die 1-mg-Gruppe die niedrigste Kortikalisdicke ventral besitzt. Die genauen Werte sind in Tabelle A23 aufgelistet.



signifikant vs. alle übrigen Gruppen

Abbildung 41: Kortikalisdicke ventral in mm

3.6.5 Mittlere Trabekeldicke

Die NON-OVX-Gruppe besitzt eine signifikant höhere mittlere Trabekeldicke gegenüber den restlichen Versuchsgruppen (Abbildung 42). Innerhalb der ovariektomierten Versuchsgruppen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Hier besitzt die 10-mg-Baicalein-Gruppe die höchsten Werte, während die 100-mg-Gruppe die niedrigste mittlere Trabekeldicke besitzt. Die OVX-Gruppe besitzt die zweithöchste mittlere Trabekeldicke unter den ovariektomierten Ratten. Die genauen Werte mit Standardabweichung befinden sich in Tabelle A24.



signifikant vs. alle übrigen GruppenAbbildung 42: Mittlere Trabekeldicke in mm

3.6.6 Kortikalisfläche

Die NON-OVX-Gruppe besitzt die höchste Kortikalisfläche. Gegenüber der OVX-, der 1-mg- und der 100-mg-Gruppe zeigen sich signifikant höhere Werte, während sich gegenüber der 10-mg-Gruppe keine signifikanten Unterschiede zeigen (Abbildung 43). Innerhalb der ovariektomierten Tiere zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Hier besitzt die 10-mg-Gruppe die höchste Fläche, gefolgt von der 100-mg-Gruppe. Die OVX-Gruppe besitzt die niedrigste Kortikalisfläche. Die genauen Werte mit Standardabweichungen befinden sich in Tabelle A25.



signifikant vs. OVX, 1 mg und 100 mg

Abbildung 43: Kortikalisfläche in mm²

3.6.7 Trabekelfläche

Die NON-OVX-Gruppe zeigt eine signifikant höhere Trabekelfläche gegenüber den restlichen Versuchsgruppen (Abbildung 44). Innerhalb der ovariektomierten Gruppen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Hier besitzt die 10-mg-Gruppe die höchste Fläche, während die nicht substituierten Ratten die niedrigsten Werte zeigen. Die genauen Werte mit Standardabweichungen befinden sich in Tabelle A26.



signifikant vs. alle übrigen Gruppen

Abbildung 44: Trabekelfläche in mm²

3.6.8 Zusammenfassung der Ergebnisse der Mikro-CT-2D-Untersuchungen

Bezüglich der Mikro-CT-2D-Untersuchungen zeigten sich bei allen oben angeführten Messparametern signifikante Unterschiede zwischen der NON-OVX-Gruppe und allen übrigen Gruppen. Einzig bei der Messung der Kortikalisdicke dorsal konnten keine signifikanten Unterschiede erzielt werden. Bezüglich der Dichte der Trabekelkreuzungen zeigten sich neben signifikanten Unterschieden zwischen OVX- und NON-OVX-Gruppen auch signifikante Unterschiede innerhalb der ovariektomierten Versuchsgruppen. Bei allen oben genannten Messparametern weist die 10-mg-Baicalein-Gruppe innerhalb der ovariektomierten Gruppen die höchsten Werte auf.

4 Diskussion

4.1 Ovariektomierte Ratte als Osteoporose Modell

Das Modell der ovariektomierten Ratte ist in der Osteoporose-Forschung etabliert und wurde bereits in vielen Studien angewendet (Fürst 2014; Ikeda et al. 2001; Ke et al. 1998). Durch eine bilaterale Ovariektomie kommt es bei weiblichen Ratten aufgrund des Östrogenmangels zu einem progedienten Verlust an trabekulärer und kortikaler Knochendichte (Kalu 1991), was sich simultan bei an Osteoporose erkrankten Menschen in einer erhöhten Wirbelkörperfrakturrate durch verstärkte Knochenumbauprozesse mit gesteigerter Osteoklastenaktivität widerspiegelt (Xu et al. 2011). Die Verwendung weiblicher, ausgewachsener Ratten wurde bereits in mehreren Osteoporose-Studien sehr erfolgreich angewendet (Mosekilde et al. 1993). Es zeigten sich osteoporotische Veränderungen durch gesteigerte Knochenumbauprozesse in Ratten wesentlich schneller als bei größeren Tieren (Frost und Jee 1992). Bei Hunden oder Primaten können ovariektomie-induzierte osteoporotische Knochenumbauprozesse bis zu zwei Jahre dauern (Kimmel und Jee 1982). Im vorliegenden Versuch konnten osteoporosebedingte Knochenstrukturveränderungen bereits zwölf Wochen nach Ovariektomie beobachtet werden, was den Vorteil hat, dass die Studiendauer relativ kurzgehalten werden konnte und so höhere Kosten vermieden werden konnten. Die Ratten waren zum Zeitpunkt der Ovariektomie drei Monate alt. Dieses als "mature rat model" bekannte Modell bietet unterschiedliche Vorteile gegenüber dem ebenfalls bekannten "aged rat model" (zwölf Monate alte Ratten) (Mosekilde et al. 1993). Zum einen scheint der durch die bilaterale Ovariektomie bedingte Ostrogenmangel bei drei Monate alten Ratten ein höheres Ansprechen hinsichtlich einer Osteoporose-Entwicklung zu haben (Thompson et al. 1995); zum anderen sind jüngere Ratten kostengünstiger, verfügbarer und gesünder als ältere (Kalu 1991).

Eine durch einen Östrogenmangel bedingte signifikante Gewichtszunahme gegenüber der NON-OVX-Gruppe konnte sogar bereits zum Zeitpunkt der Osteotomie (acht Wochen nach Ovariektomie) ermittelt werden, was zum einen für eine erfolgreiche Ovariektomie (Thompson et al. 1995) und zum anderem für den Einsatz des "mature rat model" als erfolgsversprechendes Osteoporosemodell spricht (Kalu 1991). Allerdings sollte eine alleinige Betrachtung der Gewichtszunahme als Indiz für die zu bevorzugende Verwendung des "mature rat model" vermieden werden (Kalu 1991). Die postmenopausale Gewichtszunahme ist überwiegend durch Zunahme des Gesamtkörperfettes begründet, wie sie für ovariektomierte Ratten und postmenopausale Frauen hinlänglich bekannt ist (Jung et al. 2014). Wie bereits in der Literatur von Li et al. (2011) beschrieben, sorgte auch in diesem Versuch der postmenopausale Östrogenmangel für eine signifikante Abnahme der Feuchtgewichte der Uteri der ovariektomierten Ratten gegenüber denen der Kontrollgruppe. Hegele-Hartung et al. (2004) beschrieben in ihrer Studie an hypophysektomierten und GnRH-antagonisierten Ratten eine stimulierende Wirkung von Östradiol auf das Uterusgewicht. Dies geht einher mit der auch in dieser Studie beobachteten postmenopausalen, atrophiebedingten Uterus-Gewichtsabnahme. Eine etwaige Baicalein-Wirkung konnte in diesem Versuch bezüglich der Betrachtung der Uterusfeuchtgewichte nicht gezeigt werden. Die 1-mg-Baicalein-Gruppe lag knapp unter der OVX-Gruppe; die beiden anderen Dosierungen lagen knapp über der nur ovariektomierten Gruppe.

Als schwieriger erwies sich die Betrachtung und Beurteilung der Baicalein-Wirkung auf die Körpergewichte der ovariektomierten Ratten. Bezüglich der Entwicklung der Körpergewichte zeigen alle drei Baicalein-Gruppen am Ende des Versuches niedrigere Werte gegenüber der OVX-Gruppe, was vermuten lässt, dass Baicalein eine Wirkung auf den postmenopausal bedingten Anstieg der Körperfettmasse hat. Auch eine Wirkung auf die bereits in einer weiteren Studie bewiesene hemmende Wirkung auf die Adipozyten Differenzierung ist denkbar (Cha et al. 2006).

Sowohl Baicalein als auch DMSO wurden in dieser Studie *sub cutanem* gespritzt, was, wie schon in der Publikation von Saul et al. (2017) erwähnt wurde, zu lokalen Nekrosen an den Einspritzstellen der Ratten führte. Auffällig war hierbei, dass die nekrotischen Veränderungen bei den Ratten, welche mit Baicalein und DMSO behandelt wurden, größer waren als bei den Tieren, welche nur mit DMSO gespritzt wurden. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die Kombination aus Baicalein und DMSO zu lokalen Unverträglichkeiten führt, was jedoch zuvor in der Literatur nicht beschrieben wurde (Saul et al. 2017).

Insgesamt lässt sich sagen, dass ein wie in der Literatur beschriebener Mangel an Östrogen, wie es nach Ovariektomie der Versuchstiere der Fall war, sich auf die Uterusfeuchtgewichte und Körpergewichte der Ratten signifikant auswirkt. Eine Baicalein-Substitution führte zu keinen signifikanten Ergebnissen. Das Modell der ovariektomierten Ratte als Osteoporosemodell zeigte sich wie bereits in einigen anderen Studien als vielversprechendes Verfahren zur Untersuchung therapeutischer Ansätze in der Osteoporoseforschung.

4.2 Biomechanischer Kompressionstest

Aufgrund alters- und osteoporosebedingter Knochenumbauprozesse kommt es zur Abnahme der kortikalen und trabekulären Knochenmasse (Antonacci et al. 1997), was sich in einer abnehmenden biomechanischen Belastbarkeit und letztendlich in einer erhöhten Frakturrisikorate widerspiegelt (Wolschendorf et al. 1994). Dieser Prozess betrifft größtenteils analog zum Rattenmodel auch beim Menschen die Wirbelkörper der Lendenwirbelsäule (Kalu 1991). Die biomechanische Belastbarkeit der Wirbelsäule nimmt mit verringertem Volumen ab, und die daraus resultierende verringerte Kraftaufnahme führt zu Sinterungsfrakturen (Josten und Bühren 2013). Ob die osteoporotisch bedingte Knochenvolumenabnahme allein ausschlaggebender Faktor für eine abnehmende biomechanische Belastbarkeit der Wirbelsäule ist, wird teilweise kontrovers diskutiert. In einer MR-Studie an dreizehn menschlichen Lendenwirbelkörpern wurde festgestellt, dass der Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen (BV/TV) ein starker Faktor für die biomechanische Belastbarkeit ist (Pothuaud et al. 2002). In mehreren Studien konnte jedoch auch belegt werden, dass nicht nur die alleinige Knochenmasse ausschlaggebend für die biomechanische Belastbarkeit der Wirbelkörper ist, sondern auch Parameter wie Knochengröße, Knochenmineralisation und Trabekel-Architektur eine entscheidende Rolle spielen (Duan et al. 1999; Bell et al. 1967).

Ein erfolgversprechendes Verfahren zur Analyse der biomechanischen Stabilität der Wirbelkörper hinsichtlich einer axialen Krafteinwirkung stellt der biomechanische Kompressionstest dar (Wang et al. 2007; Sehmisch et al. 2009a). Ältere Tests (wie der three-point bending oder four-point bending test) konnten nur für lange Röhrenknochen angewendet werden. Da aber osteoporotische Prozesse auch in den Wirbelkörpern und insbesondere an den Rändern dieser lokalisiert sind, mussten neue Testverfahren eingesetzt werden (Lelovas et al. 2008). Hierfür wurde von Sehmisch et al. (2009a) ein speziell für die Kompression der Wirbelkörper weiterentwickelter und den strukturellen und biomechanischen Eigenschaften des Wirbelkörpers angepasster Test eingesetzt.

Ein osteoporotischer Wirbelkörper besitzt eine geringere elastische Verformbarkeit als ein gesunder und kann daher axialen Krafteinwirkungen weniger standhalten (Turner 2002), was auch in dieser Studie dargestellt werden sollte.

Die gemessene Maximalkraft (fmax) war in der NON-OVX-Gruppe höher als in den ovariektomierten Versuchsgruppen; signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen NON-OVX- und OVX-, Baicalein-1-mg und 100-mg-Gruppen, jedoch nicht gegenüber der 10-mg-Gruppe, die innerhalb der OVX-Gruppen die höchste Maximalkraft aufwies und so am widerstandsfähigsten gegenüber axialen Krafteinwirkungen war. Ein Signifikanzniveau konnte jedoch innerhalb der ovariektomierten Gruppen nicht erreicht werden. Der Übergang im Kraft-Weg-Diagramm zwischen reversibler elastischer und irreversibler plastischer Verformung bezeichnet das Yield Load (Sehmisch et al. 2009a). Die erzielten Werte bezüglich des Yield Loads verhielten sich analog zur gemessenen Maximalkraft, was den in der Literatur beschriebenen Zusammenhang zwischen Widerstandsfähigkeit gegenüber axialen Krafteinwirkungen und verringerter elastischer Verformbarkeit in osteoporotischen, porösen Wirbelkörpern wiedergibt (Turner 2002).

Die signifikant höhere Maximalkraft (fmax) und Yield Load der Kontrollgruppe gegenüber den ovariektomierten Ratten deckt sich mit den Ergebnissen in früheren Studien (Fürst 2014; Döll 2011; Comelekoglu et al. 2007; Mosekilde et al. 1993). Klein et al. (2004) konnten an transgenen Mäusen, die eine vermehrte Expression eines Gens (Alox15) besitzen, das für eine Lipoxygenase codiert, durch eine gezielte orale medikamentöse Inhibition der 12/15 Lipoxygenase eine signifikante Reduktion des Knochenmasseverlustes und damit eine Steigerung der biomechanischen Widerstandsfähigkeit gegenüber axialen Krafteinflüssen erreichen. Dieser Effekt eines Lipoxygenaseinhibitors konnte in dieser Studie nicht gänzlich bestätigt werden. Zwar zeigte die 10mg-Gruppe insgesamt höhere Werte als die OVX-Gruppe – ein Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht. Dieses kann einerseits daran liegen, dass die an dieser Studie beteiligten Ratten keine erhöhte Expression des Alox15-Gens hatten und andererseits an der in dieser Studie erstmals verwendeten Applikationsform sub cutanem. Die aus dem Kraft-Weg-Diagramm errechnete Steigung entspricht der elastischen Verformbarkeit des Wirbelkörpers und ist bei einem osteoporotisch veränderten Wirbelkörper niedriger als bei einem gesunden (Turner 2002). Erwartungsgemäß weist daher die NON-OVX-Gruppe höhere Werte gegenüber den ovariektomierten Versuchsgruppen auf. Ein Signifikanzniveau wurde bei den Baicalein-Gruppen erreicht, gegenüber der OVX-Gruppe jedoch nicht. Dies lässt vermuten, dass die Baicalein-Applikation einen negativen Einfluss der OVX auf die elastische Verformbarkeit der porösen Wirbelkörper erhöht hatte.

Letztendlich konnte mittels des in dieser Studie angewendeten biomechanischen Kompressionstests zwischen ovariektomierten und nicht-ovariektomierten Ratten unterschieden werden. Eine positive Wirkung des Baicaleins in der 10-mg-Dosierung auf die biomechanischen Eigenschaften Maximalkraft und Yield Load des osteoporotischen Wirbelkörpers konnte dargestellt werden, während die elastische Verformbarkeit (Steigung) des Wirbelkörpers durch eine Baicalein-Substitution nicht positiv beeinflusst werden konnte. Biomechanische Tests sind ohne Frage ein adäquates Mittel zur Detektion biomechanischer Eigenschaften, insbesondere der osteoporotischen Wirbelkörper. Sie sollten jedoch nie als alleinige Indikatoren für die Beurteilung der Knochenqualität herangezogen, sondern durch weitere Untersuchungen ergänzt werden (Mosekilde 1995).

4.3 Veraschungstest

Der Veraschungsversuch diente der analytischen Untersuchung der Knochenmatrix der Lendenwirbelkörper und sollte Hinweise auf osteoporotisch bedingte Umbauvorgänge liefern. Die Knochenmatrix besteht aus einem festen anorganischen und einem organischen Anteil. Das Verhältnis dieser beiden Matrizen zueinander bestimmt die Festigkeit des Knochens (Schmolke 2001). Der anorganische Anteil besteht zum größten Teil aus
kristallisiertem Hydroxylapatit, welches aus der Zusammenlagerung von Kalzium und Phosphat entsteht und bezogen auf das gemessene Volumen der Wirbelkörper die Knochenmineraldichte ergibt (Fürst 2014). Der organische Anteil besteht zu 90 % aus Typ-I-Kollagen. Die restlichen 10 % sind Proteoglykane und andere nicht kollagene Proteine wie Osteopontin, Osteonectin und Osteocalcin (Schmolke 2001). Der Einfluss der Osteoporose auf Umbauvorgänge in der Knochenmatrix ist in der Literatur häufig beschrieben (Delmas 1993; Watts 1999). Es kommt zu einem gestörten Verhältnis zwischen Knochenauf- und -abbau, was durch gesteigerte osteoklastäre Aktivität zur Abnahme anorganischer Anteile der Knochenmatrix führt und damit zur Abnahme der Knochenmineraldichte (Boivin und Meunier 2003). Kanis et al. (2000) beschrieben einen direkten Zusammenhang zwischen der Abnahme der Knochenmasse, der Knochenmineraldichte und der daraus folgenden erhöhten Gefahr, osteoporotisch bedingte Frakturen zu erleiden.

In dieser Studie wiesen sowohl die OVX- als auch alle Baicalein-Gruppen eine signifikant niedrigere anorganische bzw. eine höhere organische Knochensubstanz gegenüber ihren nicht operierten Artgenossen auf. Die Ergebnisse spiegeln den Einfluss der Osteoporose auf die Knochenmatrix wider. Döll (2010) wies in ihrer Studie über den Einfluss von Ganzkörpervibrationen an ovariektomierten Ratten ebenfalls einen signifikant höheren Anteil an anorganischer und einen signifikant niedrigeren Anteil an organischer Knochensubstanz bei den nicht ovariektomierten Ratten gegenüber den operierten Tieren nach. Sehmisch et al. (2009b) zeigten an ovariektomierten Ratten eine signifikant niedrigere anorganische Knochensubstanz gegenüber dem gesunden Kollektiv. Eine Baicalein-Wirkung auf die Knochenmatrix konnte in dieser Studie nicht belegt werden. Innerhalb der ovariektomierten Versuchsgruppen ergaben sich nur sehr geringe Unterschiede, die Baicalein-1-mg-Gruppe zeigte hier mit 35,29 % den höchsten Anteil. Eindeutige Unterschiede zwischen OVX- und NON-OVX-Gruppe bezüglich des Verhältnisses von Kalzium zu Phosphat (Ca/PO4) konnten in dieser Studie ähnlich wie bei Komrakova et al. (2017) nicht belegt werden.

Die Knochenmineraldichte wurde in dieser Studie nicht wie bei Fürst (2014) und Döll (2010) aus der gemessenen anorganischen Knochensubstanz ermittelt, sondern über die Auswertung der Wirbelkörperscans im Mikro CT berechnet. Ein Vergleich der Ergebnisse des Veraschungstests mit anderen Studien ist daher schwierig, aber immerhin bedingt möglich, da sich die Knochenmineraldichte aus der anorganischen Knochensubstanz auf das Volumen bezogen ergibt. Eine Diskussion der Ergebnisse der Knochenmineraldichtemessung folgt in Kapitel 4.4.

4.4 Mikro-CT-Analysen

Die Osteoporose wird über die Messung der Knochenmineraldichte (BMD) diagnostiziert und klassifiziert (Richards et al. 2008). Die Knochendichte ist definiert als das Verhältnis von mineralisierter Knochensubstanz zu einem bestimmten Knochenvolumen und nimmt infolge der osteoporosebedingten Knochenumbauprozesse ab. Die Gefahr von Frakturen nimmt mit sinkender Knochenmineraldichte signifikant zu (Kanis et al. 1994).

Durch die im Mikro CT ermöglichten dreidimensionalen Betrachtungen der Wirbelkörper lassen sich der Einfluss von osteoporotischen Umbauprozessen und die Wirkung des Baicaleins auf das Knochenvolumen, die Knochenmineraldichte und die Trabekel analysieren (Bagi et al. 2006). Insbesondere Messungen der Knochenmineraldichte (BMD) rücken zunehmend in den Bereich der Mikro-CT-3D-Analyse. So konnten bereits Sehmisch et al. 2009b in einer Studie den Einfluss einer Estradiol-Substitution an ovariektomierten Ratten auf die BMD mittels *flat planel volumetric computed tomography* (*fpVCT*) darstellen. Ferner stellten sie eine höhere Korrelation zwischen den Ergebnissen der BMD-Messung im fpVCT und den Ergebnissen der biomechanischen Testungen im Vergleich zu den Messungen des Veraschungsversuches und denen der biomechanischen Testungen fest. Eine hohe Korrelation zwischen den erhobenen Daten in der Mikro-CT-Untersuchung und den Ergebnissen der biomechanischen Testungen konnte bereits in einer früheren Studie festgestellt werden (Bagi et al. 2006), was schlussfolgern lässt, dass die im Mikro-CT erhobenen Daten ein hoher Prädiktor für die Knochenstärke und -stabilität sind.

In dieser Studie wurden neben der Gesamt-Knochenmineraldichte (BMD) auch die Weichteil-, Kortikalis- und Trabekelmineraldichte mittels Mikro-CT gemessen, welche in der herkömmlichen DXA-Messung nicht möglich sind und neben der besseren räumlichen Strukturanalyse einen weiteren Vorteil gegenüber 2D-Knochenbetrachtungen liefert (Issever und Link 2010). Die ermittelte BMD zeigte analog zur Bestimmung der anorganischen Knochensubstanz im Veraschungsversuch signifikant höhere Werte in der NON-OVX-Gruppe gegenüber den ovariektomierten Gruppen, was den in der Literatur beschriebenen osteoporotisch bedingten Abnahmeprozess der mineralisierten Knochensubstanz wiedergibt (Kanis 2002). Innerhalb der Baicalein-Gruppen zeigte die 1-mg-Dosierung höhere BMD-Werte als die 10-mg- und die 100-mg-Gruppen. Alle drei Gruppen haben eine höhere BMD als die nicht-substituierte Gruppe. Ein Signifikanzniveau wie in ähnlichen Studien (Klein et al. 2004) wurde zwar nicht erreicht, aber ein positiver Effekt des Baicaleins auf die Knochenmineraldichte ist dennoch erkennbar. Durch osteoporotische Umbauprozesse kommt es zur Abnahme der trabekulären und kortikalen BMD (Kanis 2002). Eine höhere trabekuläre und kortikale BMD in der NON-OVX-Gruppen gegenüber der OVX-Gruppe konnte auch in dieser Studie gezeigt werden. Ein signifikanter Unterschied gegenüber allen restlichen Gruppen zeigte sich bei der Messung der Trabekel-BMD. Bezüglich der kortikalen BMD zeigten alle Baicalein-Gruppen signifikant höhere Werte gegenüber der OVX-Gruppe, was einen starken Effekt des Baicaleins auf die kortikale BMD zeigt. Klein et al. (2004) beschrieben zwar bereits einen positiven Effekt eines Lipoxygenaseinhibitors auf die Knochenmineraldichte von ovariektomierten Mäusen; eine spezielle Wirkung auf die kortikale Knochenmineraldichte ist bisher aber in der Literatur nicht beschrieben. Insgesamt zeigten sich postmenopausal bedingte Dichteverluste stärker an spongiösen (trabekulären) Knochenstrukturen (NON-OVX-Gruppe signifikant vs. alle übrigen Gruppen) als an kompakten (kortikalen) Strukturen. Woggan et al. (1994) beschrieben ebenfalls einen stärkeren postmenopausalen spongiösen als kompakten Knochendichteverlust gegenüber anderen Osteopathien.

Der in dieser Studie gemessene Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen (BV/TV) ist mit durchschnittlich 62,23 % erwartungsgemäß signifikant höher in der NON-OVX-Gruppe gegenüber den ovariektomierten Versuchsgruppen. Damit konnte ein Einfluss der Osteoporose auf das Knochenvolumen belegt werden. Innerhalb der ovariektomierten Versuchsgruppen wiesen alle Baicalein-Gruppen eine prozentual höhere BV/TV auf als die NON-OVX-Gruppe, was auf einen positiven Effekt der Baicalein-Applikation auf das Knochenvolumen schließen lässt. Die 1-mg-Gruppe zeigt hier analog zur Knochenmineraldichtemessung mit 54,88 % den höchsten Wert und die 100-mg-Gruppe den niedrigsten, was vermuten lässt, dass niedrigere Baicaleindosierungen wirksamer bezüglich Knochenvolumen- und -mineraldichte sind und außerdem eine hohe Korrelation zwischen den Ergebnissen der Volumenmessung und denen der Dichtemessung belegen.

Die Messung der BMD und des Knochenvolumens ist ohne Frage ein etabliertes Verfahren zur Klassifizierung der Osteoporose. Und obwohl es ältere Studien gibt, die eine signifikante Frakturrisiko-Zunahme mit sinkenden BMD belegen (Kanis et al. 1994), haben neuere Studien gezeigt, dass eine alleinige BMD-Bestimmung nicht ausreicht, um Patienten mit Fraktur von denen ohne Fraktur zu unterscheiden (Schuit et al. 2004). Da außerdem der postmenopausal bedingte Dichteverlust in der Spongiosa größer ist als in der Kompakta (Dören und Schneider 1996), rückt die Trabekelstrukturanalyse als bildgebendes Verfahren zunehmend in den Vordergrund. Die Bruchfestigkeit und Stabilität des Knochens ist stark von der Anordnung und Struktur seines Trabekel- und Kortikalisaufbaus abhängig (Engelke et al. 1999). Obwohl 3D-Datensätze die Struktur und die Veränderungen im Trabekelnetzwerk allgemein besser wiedergeben (Engelke et al. 1999), konnten in dieser Studie nur unbefriedigende Ergebnisse in der 3D-Analyse geliefert werden. Daher wurde die Trabekel- und Kortikalisanalyse über eine 2D-Darstellung vorgenommen. Dies mag evtl. an der ähnlich wie in einer Studie von Sehmisch et al. (2009b) zu hohen Auflösung der in dieser Studie verwendeten MikroCT Scans gelegen haben. Engelke et al. (1999) empfahlen eine Auflösung im Bereich von 20–30 μ m pro Voxel. Das hier verwendete Quantum FX Micro-CT kam jedoch auf eine Auflösung von 40 μ m pro Voxel und übertraf damit die empfohlene Auflösung leicht.

In der 2D-Auswertung wurden die Anzahl und die Dichte der Trabekelkreuzungen, die Kortikalis- und Trabekelfläche und die Kortikalis- und Trabekeldicke gemessen.

Die wie bereits oben beschriebene Tatsache, dass vor allem spongiöse Knochenstrukturen von osteoporotischen Umbauprozessen betroffen sind, zeigte sich auch in der Kortikalis- und Trabekelanalyse. Die Trabekeldicke zeigte in der NON-OVX-Gruppe signifikant höhere Werte als in den übrigen Versuchsgruppen, während die dorsale Kortikalisdicke wie schon in einer Studie von Komrakova et al. (2013) an den Tibiae ovariektomierter Ratten keine signifikanten Veränderungen zeigten. Ein Einfluss des Baicaleins auf die Trabekeldicke konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden, denn alle ovariektomierten Gruppen zeigten nur geringe Unterschiede. Bezüglich der Anzahl und Dichte der Trabekelkreuzungen zeigte die NON-OVX-Gruppe signifikant höhere Werte gegenüber den nicht ovariektomierten Versuchsgruppen. Ahnlich wie bei den Ergebnissen der Trabekeldickemessung konnten bei der Anzahl der Trabekelkreuzungen keine signifikanten Unterschiede innerhalb der ovariektomierten Gruppen erzielt werden. Die 10-mg-Gruppe zeigt hier die höchste Anzahl, während die 100-mg-Gruppe die niedrigste hat. Bezüglich der Dichte der Trabekelkreuzungen hatten die OVX- und 10-mg-Baicalein-Gruppen signifikant höhere Werte gegenüber der 100-mg-Gruppe. Da auch bezüglich der Trabekel-BMD und der Anzahl der Trabekelkreuzungen die 100-mg-Gruppe die niedrigsten Werte hatte, lässt sich vermuten, dass eine zu hohe Baicalein-Dosierung eher einen negativen Effekt auf die Trabekelstruktur hat. Der Effekt des Baicaleins auf Trabekeldicke und Trabekelkreuzungen ist in der Literatur leider noch nicht beschrieben und wurde in Studien über ähnliche Lipoxygenaseinhibitoren nicht gemessen. In dieser Studie ergab sich kein belegbarer Effekt auf die Trabekelstruktur der Wirbelkörper. Da osteoporotische Prozesse vor allem spongiöse Knochenstrukturen betreffen, ist jedoch nach einer Studie von Klein et al. (2004), die eine positive Wirkung einer oralen Lipoxygenaseinhibition an Mäusen mit hoher Lipoxygenaseaktivität auf die biomechanische Stabilität und Knochenmineraldichte erzielten, davon auszugehen, dass eine Therapie mit Lipoxygenaseinhibitoren prinzipiell positive Auswirkungen auf die Trabekelstruktur osteoporotischer Knochen hat.

4.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch BMD-Messung, Volumenbestimmung und Trabekelstrukturanalyse mittels Mikro-CT-Scans die ovariektomierten Ratten in dieser Studie von den nicht-ovariektomierten Tieren unterschieden werden konnten. Osteoporotische Veränderungen führten analog zu den biomechanischen Testungen (Maximalkraft, Steigung) und zur Bestimmung der anorganischen bzw. organischen Knochenmasse im Veraschungsversuch zu signifikanten Unterschieden zwischen NON-OVX- und ovariektomierten Ratten. Letztlich gibt dies die schlechtere bzw. geringere Knochenqualität der ovariektomierten Ratten wieder. Auch die bereits in der Studie von Komrakova et al. (2013) festgestellte Tatsache, dass osteoporotische Umbauprozesse mehr die spongiösen als die kortikalen Knochenanteile betreffen, konnte mittels 2D-Trabekelanalyse bestätigt werden. Eine etwaige Baicalein-Wirkung auf den osteoporotischen Wirbelkörper der Ratten konnte in dieser Studie nicht gänzlich belegt werden. Interessanterweise zeigte sich in einer weiteren Studie, dass Baicalein insbesondere in der maximalen Dosierung von 100 mg einen deutlich positiven Effekt auf die Angiogenese im Muskel der ovariektomierten Ratte besitzt und so die in der Literatur häufig beschriebene, durch östrogenmangel-induzierte Dekapillarisierung und Atrophie der Muskelfasern signifikant zu hemmen scheint (Kling 2016, Saul et al. 2016). Einen deutlich positiven Effekt scheint Baicalein auf die kortikale BMD zu haben: Alle Baicalein-Gruppen wiesen signifikant höhere Werte gegenüber der OVX-Gruppe auf. Die 1-mgund 10-mg-Baicalein-Gruppen konnten zwar gleich in mehreren Parametern (fmax, Anteil anorganischer Knochensubstanz und BV/TV) höhere Werte vorweisen als die OVX-Gruppe – ein Signifikanzniveau konnte in diesen Parametern im Gegensatz zur Studie von Klein et al. (2004) mit einem oralen Lipoxygenaseinhibitor, aber nicht erreicht werden. Dies mag einerseits an der begrenzten Studiendauer und andererseits an der Applikationsform sub cutanem gelegen haben. In einer Studie, in welcher Ratten sowohl intravenös als auch oral Baicalein verabreicht wurde, konnte gezeigt werden, dass bereits kurz nach intravenöser Applikation 75 % des Baicaleins in seiner konjugierten Form vorlag (Lai et al. 2003). Aktuell arbeitet die Arbeitsgruppe Sehmisch et al. an einer vielversprechenden Studie mit dem Lipoxygenase-Inhibitor Zileuton, welcher den Ratten über das Futter verabreicht wird. Die 100-mg-Baicalein-Gruppe zeigte sowohl in den biomechanischen Tests als auch bei der Messung der Knochenmineraldichte die niedrigsten Werte innerhalb der ovariektomierten Gruppen. Auch in der Trabekelstrukturanalyse erzielte die 100-mg-Gruppe bezüglich Trabekeldicke und Anzahl und Dichte der Trabekelkreuzungen niedrigere Werte gegenüber den übrigen ovariektomierten Ratten. Bezüglich der Dichte der Trabekelkreuzungen zeigte die 100-mg-Gruppe sogar signifikant niedrigere Werte gegenüber der OVX- und der 10-mg-Gruppe. Dieses lässt schlussfolgern, dass eine Baicalein-Dosierung von 100 mg im Gegensatz zu der von Kling (2016) und Saul et al. (2016) beschriebenen Wirkung auf den Muskel der ovariektomierten Ratte einen eher negativen Effekt auf die osteoporotischen Wirbelkörper hat, wohingegen eine Dosierung von 1 bis 10 mg sich durchaus positiv auf die biomechanische Stabilität, Knochenmineraldichte und Knochenvolumen der Wirbelkörper auswirken kann.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss unterschiedlicher Dosierungen von Baicalein auf die Lendenwirbelsäule der ovariektomierten Ratte zu untersuchen. Hierfür wurden 60 bei Ovariektomie drei Monate alte Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Am Ende des Versuches blieben 50 Ratten übrig. Von diesen bildeten jeweils zehn Ratten die nichtovariektomierte NON-OVX-Gruppe, die ovariektomierte Versuchsgruppe OVX ohne Baicalein-Substitution, die 1-mg-Baicalein-Gruppe, die 10-mg-Baicalein-Gruppe und die 100-mg-Baicalein-Gruppe. Acht Wochen nach der Ovariektomie wurde mit der Baicalein-Applikation *sub cutanem* für einen Zeitraum von vier Wochen begonnen. Nach dieser Zeit wurden die Tiere durch Dekapitation getötet und die zu untersuchenden Lendenwirbelkörper freipräpariert.

Die biomechanischen Eigenschaften (fmax, Yield Load und Steigung) des vierten Lendenwirbelkörpers wurden in einem biomechanischen Kompressionstest ermittelt. Die organische und die anorganische Knochensubstanz wurden durch Veraschung der zweiten Lendenwirbelkörper bestimmt. Die Bestimmung der Kalzium- und Phosphatmenge erfolgte über eine Flammenabsorptionsspektroskopie. Das Knochenvolumen, die Knochenmineraldichte sowie das Verhältnis von Knochen- zu Gesamtvolumen des dritten Lendenwirbelkörpers wurde in einer 3D-Mikro-CT-Analyse ermittelt. Die Trabekelund Kortikalisstruktur wurde mittels 2D-Mikro-CT-Analyse untersucht.

In dieser Studie führte der negative Einfluss des durch die Ovariektomie induzierten Östrogenmangels zu signifikant niedrigeren Werten bezüglich der Körpergewichte, Uterusfeuchtgewichte, biomechanischen Stabilität, anorganischen Knochensubstanz, Knochenmineraldichte, Knochenvolumen und Anzahl und Dichte der Trabekel in der OVX-Versuchsgruppen gegenüber der NON-OVX-Versuchsgruppe. Damit konnte gezeigt werden, dass das Osteoporose-Modell der ovariektomierten Ratte ein erfolgversprechendes Modell zur Untersuchung und Analyse osteoporoseinduzierter Knochenveränderungen ist.

Eine positive Baicalein-Wirkung auf den osteoporotischen Lendenwirbelkörper der Ratte konnte bezüglich der kortikalen BMD belegt werden. Alle Baicalein-Gruppen zeigten hier signifikant höhere Werte gegenüber der OVX-Gruppe. Die 1-mg- und 10-mg-Baicalein-Gruppen zeigten bezüglich Maximalkraft, Anteil anorganischer Knochensubstanz und BV/TV zwar höhere Werte gegenüber der OVX-Gruppe, ein Signifikanzniveau konnte jedoch nicht erreicht werden. Eine positive Wirkung der Baicalein-Applikation auf die Trabekelstruktur konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden. Die 100-mg-Dosierung zeigte insgesamt die schlechtesten Werte und lag bei den biomechanischen Tests, der Knochenmineraldichtemessung und der Trabekelstrukturanalyse sogar unter der OVX-Gruppe. Bezüglich der Dichte der Trabekelkreuzungen wurde sogar das Signifikanzniveau erreicht.

Insgesamt zeigte sich, dass eine Baicalein-Dosierung von 1 bis 10 mg einen positiven Effekt auf den osteoporotischen Lendenwirbelkörper haben kann, wohingegen eine Dosierung von 100 mg eher negative Effekte zeigte.

Die vielversprechenden Ergebnisse von Kling (2016) und Saul et al. (2016) bezüglich der Baicalein-Wirkung auf den Muskel der ovariektomierten Ratte und der in dieser Studie beschriebenen positiven Baicalein-Wirkung auf die kortikale BMD geben neue Ansatzpunkte für Folgestudien. So könnte die Kombination von Baicalein mit einem Anti-Osteoporose-Medikament wie Bisphosphonaten zu vielversprechenden Ergebnissen führen. Weitere Variationen in der Dosierung oder eine veränderte Applikationsform könnten weitere neue Ansatzpunkte sein.

6 Anhang

Tabellenteil

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Versuchs-	265,1	273,9	272,5	261,2	265,2
beginn					
SD	16,5	18,6	11,1	13,7	14,6
Osteotomie	306,5#	383,5	387,1	370,0	355,0
SD	25,4	36,5	34,1	28,7	19,4
Tötung	311,1	349,7##	344,6	340,9	336,4
SD	10,4	47,8	17,0	30,0	22,3

Tabelle A1: Körpergewichte zu Versuchsbeginn, bei Osteotomie und Tötung in g

signifikant vs. alle übrigen Gruppen

signifikant vs. NON OVX

Tabelle A2: U	Uterusfeuchtgewichte	in	g
---------------	----------------------	----	---

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Uterus- gewicht	0,64#	0,11	0,10	0,14	0,15
SD	0,16	0,02	0,01	0,04	0,03

signifikant vs. alle übrigen Gruppen

Tabelle A3: Maximalkraft (fmax) in N

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Maximal- kraft	152,7#	118,0	120,6	134,8	108,3
SD	40,30	26,53	17,57	16,52	13,24

signifikant vs. OVX, Baicalein 1 und Baicalein 100

Tabelle A4: Steigung in N/mm

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Steigung	133,5#	113,5	102,0	109,5	100,7
SD	14,94	12,81	17,84	20,23	18,72

signifikant vs. Baicalein 1, Baicalein 10 und Baicalein 100

Tabelle A5: Yield Load in N

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Yield Load	151,4#	116,8	119,1	134,0	107,2
SD	39,90	26,26	15,92	16,49	13,68

signifikant vs. OVX, Baicalein 1 und Baicalein 100

Tabelle A6: Organische Knochensubstanz in %

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Organische Substanz	57,89#	65,74	64,71	65,04	66,11
SD	2,223	1,705	1,808	2,089	2,327

signifikant vs. alle übrige Gruppen

Tabelle A7: Anorganische Knochensubstanz in %

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Anorganische Substanz	42,11#	34,26	35,29	34,96	33,89
SD	2,223	1,705	1,808	2,089	2,327

signifikant vs. alle übrigen Gruppen

Tabelle A8: Kalzium in mg/l

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Kalzium	0,5089	0,5114	0,5020	0,5331	0,5464
SD	0,03710	0,07835	0,04448	0,02884	0,04078

Tabelle A9: Phosphat in mg/l

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Phosphat	1,345	1,332	1,317	1,411	1,412
SD	0,1175	0,1391	0,1233	0,08168	0,04096

Tabelle A10: Kalzium/Phosphat

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Kalzium/ Phosphat	0,8980	0,9078	0,9040	0,8963	0,9160
SD	0,04590	0,06815	0,02989	0,04658	0,06753

Tabelle A11: Total-Volumina in mm³

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Total- Volumina	217,6	244,0	238,5	224,1	237,0
SD	25,03	43,83	22,12	32,80	22,68

Tabelle A12: Weichteil-Volumina in mm³

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Weichteil- Volumina	82,6#	118,8	107,5	102,5	113,6
SD	14,24	24,63	13,51	18,15	12,38

signifikant vs. OVX, Baicalein 1 und Baicalein 100

Tabelle A13: Kortikalis-Volumina in mm³

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Kortikalis- Volumina	56,58#	42,18	47,89	45,70	43,90
SD	13,56	7,906	9,236	8,082	4,874

signifikant vs. OVX und Baicalein 100

Tabelle A14: Trabekel-Volumina in mm³

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Trabekel- Volumina	78,55	83,14	82,97	75,94	79,87
SD	11,76	14,74	7,344	9,238	8,546

Tabelle A15: BV/TV in %

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
BV/TV	62,23#	51,49	54,88	54,41	52,25
SD	3,757	2,834	3,722	2,478	1,761

signifikant vs. alle übrigen Gruppen

Tabelle A16: Gesamt-BMD in g/mm³

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Gesamt- BMD	0,5150#	0,4069	0,4381	0,4364	0,4143
SD	0,05398	0,02875	0,03782	0,02505	0,01994

signifikant vs. alle übrigen Gruppen

Tabelle A17:	Weichteiledichte	in g/mm	3
		0'	

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Weichteile- Dichte	0,05358#	0,06914##	0,06047	0,05397	0,05895
SD	0,005904	0,004564	0,009899	0,004704	0,006684

signifikant vs. OVX

signifikant vs. Baicalein 10 und Baicalein 100

Tabelle A18:	Kortikalis-BMD	in g/mm ³
--------------	----------------	----------------------

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Kortikalis- BMD	1,092#	1,061##	1,085	1,100	1,100
SD	0,02024	0,01394	0,01786	0,01068	0,008478

signifikant vs. OVX

signifikant vs. alle Baicalein-Gruppen

Tabelle A19: Trabekel-BMD in g/mm³

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Trabekel- BMD	0,5795#	0,5539	0,5545	0,5518	0,5407##
SD	0,01414	0,009253	0,01178	0,002785	0,004157

signifikant vs. alle übrigen Gruppen

signifikant vs. OVX und Baicalein 1

Tabelle A20: Anzahl der Trabekelkreuzungen in n

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Trabekel- kreuzungen	33,10#	14,00	12,75	15,04	10,23
SD	9,155	10,20	7,098	4,457	5,148

signifikant vs. alle übrigen Gruppen

Tabelle A21: Dichte der Trabekelkreuzungen	in	n/mm ²
--	----	-------------------

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Dichte Trabekelkr.	9,378#	7,690	6,731	7,397	5,812##
SD	1,843	2,457	2,446	1,377	1,790

signifikant vs. alle übrigen Gruppen

signifikant vs. OVX und Baicalein 10

Tabelle A22: Kortikalisdicke dorsal in mm

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Kortikalisdicke dorsal	0,1626	0,1750	0,1757	0,1780	0,1761
SD	0,02880	0,02066	0,01807	0,02704	0,02251

Tabelle A23: Kortikalisdicke ventral in mm

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Kortikalisdicke	0,2797#	0,2007	0,1944	0,2224	0,2079
ventral					
SD	0,04384	0,04074	0,03490	0,04089	0,04134

signifikant vs. alle übrigen Gruppen

Tabelle A24: Mittlere Trabekeldicke in mm

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Mittlere Trabekeldicke	0,1216#	0,07198	0,06665	0,07369	0,06306
SD	0,04227	0,02407	0,01275	0,01406	0,007954

signifikant vs. alle übrigen Gruppen

Tabelle A25: Kortikalisfläche in mm²

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Kortikalis- Fläche	2,375#	2,031	2,061	2,238	2,097
SD	0,3230	0,2326	0,1895	0,3227	0,2573

signifikant vs. OVX, Baicalein 1 und Baicalein 100

Tabelle A26: Trabekelfläche in mm²

	NON OVX	OVX	Baicalein 1	Baicalein 10	Baicalein 100
Trabekel- Fläche	3,517#	1,669	1,740	2,025	1,713
SD	0,5979	0,8591	0,7500	0,3823	0,4873

signifikant vs. alle übrigen Gruppen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prävalenz der Osteoporose bei Frauen in Abhängigkeit vom Lebensalter
in Deutschland 2003 (eigene Abbildung nach Häussler et al. 2006)6
Abbildung 2: Chemische Strukturformeln von Flavan und Baicalein, eigene
Zeichnung16
Abbildung 3: Kraft-Weg-Diagramm des biomechanischen Kompressionstests
Abbildung 4: Ausschneiden des Phantoms
Abbildung 5: Ausgeschnittenes Phantom
Abbildung 6: Ausschneiden des Corpus vertebrae
Abbildung 7: Total Volume in der 2D-Darstellung
Abbildung 8: Bone Volume in der 2D-Darstellung
Abbildung 9: Weichteilvolumen in der 2D-Darstellung
Abbildung 10: Trabekelvolumen in der 2D-Darstellung
Abbildung 11: Kortikalis Volumen in der 2D-Darstellung
Abbildung 12: 2D-Bild eines Wirbelkörpers
Abbildung 13: Eingerahmte Gesamtknochenfläche des Wirbelkörpers
Abbildung 14: Trennung zwischen kortikaler und trabekulärer Knochenfläche
Abbildung 15: Vektoren zur Berechnung der dorsalen Kortikalisdicke
Abbildung 16: Vektoren zur Berechnung der ventralen Kortikalisdicke
Abbildung 17: Körpergewichte in g zu Versuchsbeginn
Abbildung 18: Körpergewichte in g bei Osteotomie
Abbildung 19: Körpergewichte in g zu Versuchsende
Abbildung 20: Uterusgewichte in g nach Tötung
Abbildung 21: Maximalkraft (fmax) in N
Abbildung 22: Steigung in N/mm
Abbildung 23: Streckgrenze (Yield Load) in N
Abbildung 24: Organische Knochensubstanz in %
Abbildung 25: Anorganische Knochensubstanz in %
Abbildung 26: Kalziumgehalt in mg/l 44
Abbildung 27: Phosphatgehalt in mg/l

Abbildung 28: Kalzium/Phosphat (Ca/PO ₄)	45
Abbildung 29: Total-Volumina in mm ³	46
Abbildung 30: Weichteil-Volumina in mm ³	47
Abbildung 31: Kortikalis-Volumina in mm ³	48
Abbildung 32: Trabekel-Volumina in mm ³	49
Abbildung 33: Bone Volume/Total Volume in %	49
Abbildung 34: Gesamt-BMD in g/mm ³	51
Abbildung 35: Weichteiledichte in g/mm ³	51
Abbildung 36: Kortikalis-BMD in g/mm ³	52
Abbildung 37: Trabekel-BMD in g/mm ³	53
Abbildung 38: Anzahl der Trabekelkreuzungen in n	54
Abbildung 39: Dichte der Trabekelkreuzungen in n/mm ²	55
Abbildung 40: Kortikalisdicke dorsal in mm	55
Abbildung 41: Kortikalisdicke ventral in mm	56
Abbildung 42: Mittlere Trabekeldicke in mm	57
Abbildung 43: Kortikalisfläche in mm ²	58
Abbildung 44: Trabekelfläche in mm ²	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchsgruppenaufteilung präoperativ:	18
Tabelle 2: Versuchsgruppenaufteilung nach der Osteotomie:	19
Tabelle 3: Reaktionsgemisch (Phosphat-Reagenz)	25
Tabelle 4: Messparameter der 3D-Darstellung	27
Tabelle 5: Messparameter der 2D-Auswertung	35
Tabelle A1: Körpergewichte zu Versuchsbeginn, bei Osteotomie und Tötung in g	71
Tabelle A2: Uterusfeuchtgewichte in g	71
Tabelle A3: Maximalkraft (fmax) in N	71
Tabelle A4: Steigung in N/mm	72
Tabelle A5: Yield Load in N	72
Tabelle A6: Organische Knochensubstanz in %	72
Tabelle A7: Anorganische Knochensubstanz in %	72
Tabelle A8: Kalzium in mg/l	72
Tabelle A9: Phosphat in mg/l	73
Tabelle A10: Kalzium/Phosphat	73
Tabelle A11: Total Volumen in mm ³	73
Tabelle A12: Weichteilvolumen in mm ³	73
Tabelle A13: Kortikalis Volumen in mm ³	73
Tabelle A14: Trabekelvolumen in mm ³	74
Tabelle A15: BV/TV in %	74
Tabelle A16: Gesamt BMD in g/mm ³	74
Tabelle A17: Weichteiledichte in g/mm ³	74
Tabelle A18: Kortikalis BMD in g/mm ³	75
Tabelle A19: Trabekel BMD in g/mm ³	75
Tabelle A20: Anzahl der Trabekelkreuzungen in n	75
Tabelle A21: Dichte der Trabekelkreuzungen in n/mm ²	75
Tabelle A22: Kortikalisdicke dorsal in mm	76
Tabelle A23: Kortikalisdicke ventral in mm	76

Tabelle A24: Mittlere Trabekeldicke in mm	76
Tabelle A25: Kortikalisfläche in mm ²	76
Tabelle A26: Trabekelfläche in mm ²	77

7 Literaturverzeichnis

Antonacci MD, Hanson DS, Leblanc A, Heggeness MH (1997): Regional variation in vertebral bone density and trabecular architecture are onfluenced by Osteoarthritic change and osteoporosis. Spine <u>22</u>, 2393–2401

Babij P, Zhao W, Small C, Kharode Y, Yaworsky PJ, Bouxsein ML, Reddy PS, Bodine PV, Robinson JA, Bhat B et al. (2003): High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 Gene. J Bone Miner Res <u>18</u>, 960–974

Bagger YZ, Tankó LB, Alexandersen P, Hansen HB, Qin G, Christiansen C (2006): The long-term predictive value of bone mineral density measurements for fracture risk is independent of the site of measurement and the age at diagnosis: results from the Prospective Epidemiological Risk Factors study. Osteoporos Int <u>17</u>, 471–477

Bagi CM, Hanson N, Andresen C, Pero R, Lariviere R, Turner CH, Laib A (2006): The use of micro-CT to evaluate cortical bone geometry and strength in nude rats: Correlation with mechanical testing, pQCT and DXA. Bone <u>38</u>, 136–144

Ballaschk A, Kalaitzis N, Röpke M, Piatek S (2015): Atypical femoral fractures in bisphophonate therapy. Unfallchirurg <u>118</u>, 88–91

Bell GH, Dunbar O, Beck JR, Gibb A (1967) Variations in strength of vertebrae with age and their relation to osteoporosis. Calcif Tissue Res <u>1</u>, 75–86

Benninghoff A, Drenckhahn D (Hrsg.): Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie Band 1. 17. Auflage; Elsevier Urban & Fischer, München 2008

Birkhäuser M (2012): Selektive Östrogen-Rezeptormodulatoren (SERMs) zur Prävention und Therapie der postmenopausalen Osteoporose. Ther Umsch <u>69</u>, 163–172

Black DM, Bilezikian JP, Ensrud KE, Greenspan SL, Palermo L, Hue T, Lang TF, McGowan JA, Rosen CJ (2005): One year of alendronate after one year of parathyroid hormone (1–84) for osteoporosis. N Engl J Med <u>353</u>, 555–565

Bleibler F, Benzinger P, Lehnert T, Becker C, König HH (2014): Cost of Fractures in German Hospitals – What Role Does Osteoporosis Play? Gesundheitswesen <u>76</u>, 163–168

Boivin G, Meunier PJ (2003): The mineralization of bone tissue: a forgotten dimension in osteoporosis research. Osteoporos Int 14, 19–24

Bolland MJ, Barber PA, Doughty RN, Mason B, Horne A, Ames R, Gamble GD, Grey A, Reid IR (2008): Vascular events in healthy older women receiving calcium supplementation. BMJ <u>336</u>, 262–266

Bone HG, McClung MR, Roux C, Recker RR, Eisman JA, Verbruggen N, Hustad CM, DaSilva C, Santora AC, Ince BA (2010): Odanacatib, a cathepsin-K inhibitor for osteoporosis: a two-year study in postmenopausal women with low bone density. J Bone Miner Res <u>25</u>, 937–947

Breitenbach K, Kleinsorge F, Seifert-Klauss V (2016): Osteoporose-Prävention: warum und wie? Gynakologe <u>49</u>, 258–264

Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL et al. (1998): Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes Dev <u>12</u>, 1260–1268

Budsberg SC, Jevens DJ, Brown J, Foutz TL, DeCamp CE, Reece L (1993): Evaluation of limb symmetry indices, using ground reaction forces in healthy dogs. Am J Vet Res 54, 1569–1574

Cha MH, Kim IC, Lee BH, Yoon Y (2006): Baicalein Inhibits Adipocyte Differentiation by Enhancing COX-2 Expression. J Med Food <u>9</u>, 145–153

Chapury MC, Arlot ME, Delmas PD, Meunier PJ (1994): Effect of calcium and cholecalciferol treatment for three years on hip fractures in elderly women. BMJ <u>308</u>, 1081– 1082

Chen J, Li Z, Chen AY, Ye X, Luo H, Rankin GO, Chen YC (2013): Inhibitory Effect of Baicalin and Baicalein on Ovarian Cancer Cells. Int J Mol Sci <u>14</u>, 6012–6025

Chen RL, Guang WZ, Yin BN, Ya LP, Yuan KZ, Qui BM (2013): Antiosteoporosis effect of Radix Scutellariae Extract on density and microstructure of long bones in tailsuspended Sprague-Dawley Rats. Evid Based Complement Alternat Med <u>2013</u>, 753703

Chen S (2011): Natural products triggering biological targets – a review of the antiinflammatory phytochemicals targeting the arachidonic acid pathway in allergy asthma and rheumatoid arthritis. Curr Drug Targets <u>12</u>, 288–301 Comelekoglu U, Bagis S, Yalin S, Ogenler O, Yildiz A, Sahin NO, Oguz I, Hatungil R (2007): Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. Clin Rheumatol <u>26</u>, 380–384

Cooper C (2010): Osteoporosis: disease severity and consequent fracture management. Osteoporos Int <u>21</u>, 425–429

Cramer DW, Xu H (1996): Predicting age at menopause. Maturitas 23, 319-326

Delmas PD (1993): Biochemical markers of bone turnover. J Bone Miner Res <u>8</u>, 549–555

Döll C (2010): Einfluss der vertikalen Ganzkörpervibration unterschiedlicher Frequenz auf den osteoporotischen Lendenwirbelkörper der Ratte. Med. Diss. Göttingen 2010

Dören M, Schneider HPG (1996): Die postmenopausale Osteoporose aus gynäkologischer Sicht. Gynakologe <u>29</u>, 735–741

Duan Y, Parfitt M, Seeman E (1999) Vertebral bone mass, size and volumetric density in women with spinal fracture. J Bone Miner Res <u>14</u>, 1796–1802

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997): Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. Cell <u>89</u>, 747–754

Eisman JA, Bone HG, Hosking DJ, McClung MR, Reid IR, Rizzoli R, Resch H, Verbruggen N, Hustad CM, DaSilva C et al. (2011): Odanacatib in the treatment of postmenopausal women with low bone mineral density: three-year continued therapy and resolution of effect. J Bone Miner Res <u>26</u>, 242–251

Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W (1999): Mikro-CT. Technology and application for assessing bone structure. Radiologe <u>39</u>, 203–212

Falgueyret JP, Desmarais S, Oballa R, Black WC, Cromlish W, Khougaz K, Lamontagne S, Massé F, Riendeau D, Toulmond S, Percival MD (2005): Lysosomotropism of basic cathepsin K inhibitors contributes to increased cellular potencies against off-target cathepsins and reduced functional selectivity. J Med Chem <u>48</u>, 7535–7543

Fedelesova V, Chylova K, Dzurik (2000): Treatment of postmenopausal osteoprosis with raloxifene. Bratisl Lek Listy <u>101</u>, 527-528

Felsenberg D, Bock O: Osteoporose. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M (Hrsg.): Harrisons Innere Medizin Band 3. 18. Auflage; ABW Wissenschaftsverlag GmbH, Berlin 2012, 3368-3372 Fillenberg S (2009): Knochendichteverlust und Frakturraten bei prä-, peri- und postmenopausalen Frauen – Ergebnisse einer prospektiven Beobachtungsstudie über 9 Jahre. Med. Diss. München 2009

Fisk JW, Baigent ML (1975): Clinical and radiological assessment of leg length. N Z Med J <u>81</u>, 477–480

Frost HM, Jee WSS (1992): On the rat model of human osteopenias and osteoporosis. Bone Miner <u>18</u>, 227–236

Fürst B (2014): Einfluss der vertikalen und horizontalen Ganzkörpervibration mit verschiedenen Frequenzen auf die Lendenwirbelsäule im Rattentiermodell. Med. Diss. Göttingen 2014

Galibert P, Deramond H, Rosat P, Le Gars D (1987): Preliminary note on the treatment of vertebral angioma by percutaneous acrylic vertebroplasty. Neurochirurgie <u>33</u>, 166–168

Grady D, Rubin SM, Petitti DB, Fox CS, Black D, Ettinger B, Ernster VL, Cummings SR (1992): Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. Ann Intern Med <u>117</u>, 1016–1037

Gregg EW, Pereira MA, Caspersen CJ (2000): Physical activity, falls, and fractures among older adults: a review of the epidemiologic evidence. J Am Geriatr Soc <u>48</u>, 883–893

Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, Steinle T, Verheyen F, Linder R (2013): The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. Dtsch Arztebl Int <u>110</u>, 52–57

Harbeck B, Lehnert H (2016): Individualized treatment of osteoporosis. Internist (Berl) <u>57</u>, 638–645

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

Hegele-Hartung C, Siebel P, Peters O, Kosemund D, Müller G, Hillisch A, Walter A, Kraetzschmer J, Fritzemeier KH (2004): Impact of isotype-selective estrogen receptor agonists on ovarian function. Proc Natl Acad Sci USA <u>101</u>, 5129–5134

Hofbauer LC (2006): Pathophysiology of RANK ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG). Ann Endocrinol (Paris) <u>67</u>, 139–141

Hong T, Jin GB, Cho S, Cyong JC (2002): Evaluation of the anti-inflammatory effect of baicalein on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. Planta Med <u>68</u>, 268–271

Ikeda S, Tsurukami H, Ito M, Sakai A, Sakata T, Nishida S, Takeda S, Shiraishi A, Nakamura T (2001): Effect of trabecular bone contour on ultimate strength of lumbar vertebra after bilateral ovariectomy in rats. Bone <u>28</u>, 625–633

Issever AS, Link TM (2010): Radiological diagnosis of osteoporosis. Radiologe <u>50</u>, 471–481

Jakob F, Seefried L, Schwab M (2014): Age and osteoporosis. Effects of aging on osteoporosis, the diagnostics and therapy. Internist (Berl) <u>55</u>, 755–761

Jick SS, Walker AM, Jick H (1993): Estrogens, progesterone, and endometrial cancer. Epidemiology <u>4</u>, 20–24

Josten C, Bühren V (Hrsg.): Chirurgie der verletzten Wirbelsäule. Springer Verlag; Berlin-Heidelberg 2013

Jung SR, Kim SH, Ahn NY, Kim KJ (2014): Changes of bone metabolism based on the different interventions with exercise type or additional intake material in ovariectomized rats. J Exerc Nutrition Biochem <u>18</u>, 111–117

Kafienah W, Brömme D, Buttle DJ, Croucher LJ, Hollander AP (1998): Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. Biochem J <u>331</u>, 727–732

Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner <u>15</u>, 175–191

Kanis JA (2002): Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. Lancet, <u>359</u>, 1929–1936

Kanis JA, Melton III LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N (1994): The Diagnosis of Osteoporosis. J Bone Miner Res <u>9</u>, 1137–1141

Kanis JA, Johnell O, Oden A, Sembo I, Redlund-Johnell I, Dawson A, Laet C de, Jonsson B (2000): Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmö. Osteoporos Int 11, 669–674

Ke HZ, Shen VW, Qui H, Crawford DT, Wu DD, Liang XG, Chidsey-Frink KL, Pirie CM, Simmons HA, Thompson DD (1998): Prostaglandin E2 increases bone strength in intact rats and in ovariectomized rats with established osteopenia. Bone <u>23</u>, 249–255

Kemmler W, Bebenek M, Kohl M, von Stengel S (2015): Exercise and fractures in postmenopausal women. Final results of the controlled Erlangen Fitness and Osteoporosis Prevention Study (EFOPS). Osteoporos Int <u>26</u>, 2491-2499

Kim JM, Lee SU, Kim YS, Min YK, Kim SH, (2008): Baicalein stimulates osteoblast differentiation via coordinating activation of MAP kinases and transcription factors. J Cell Biochem <u>104</u>, 1906–1917

Kimmel DB, Jee WSS (1982): A quantitative histologic study of bone turnover in young adult beagles. Anat Rec <u>203</u>, 31–45

Klein RF, Allard J, Avnur Z, Nikolcheva T, Rotstein D, Carlos AS, Shea M, Waters RV, Belknap JK, Peltz G et al. (2004): Regulation of bone mass in mice by the lipoxygenase gene Alox15. Science <u>303</u>, 229–232

Kling JH (2016): Einfluss des Lipoxygenaseinhibitors Baicalein in unterschiedlicher Dosierung auf den Skelettmuskel der ovariektomierten Ratte. Med. Diss. Göttingen 2016

Komrakova M, Sehmisch S, Tezval M, Ammon J, Lieberwirth P, Sauerhoff C, Trautmann L, Wicke M, Dullin C, Stuermer KM et al. (2013): Identification of a vibration regime favorable for bone healing and muscle in estrogen-deficient rats. Calcif Tissue Int <u>92</u>, 509–520

Komrakova M, Stuermer EK, Tezval M, Stuermer KM, Dullin C, Schmelz U, Doell C, Durkava-Burchhardt N, Fuerst B, Genotte T et al. (2017): Evaluation of twelve vibration regimes applied to improve spine properties in ovariectomized rats. Bone Rep <u>7</u>, 172-180

Krasselt M, Baerwald C (2016): An update on glucocorticoid-induced osteoporosis. Dtsch Med Wochenschr <u>141</u>, 352–357

Kyvernitakis I, Hadji P (2016): Postmenopausale Osteoporose – Diagnostik und Therapie gemäß S3-Leitlinie. Gynakol Endokrinol <u>14</u>, 197–207

Lai MY, Hsiu SL, Tsai SY, Hou YC, Chao PDL (2003): Comparison of metabolic pharmacokinetics of baicalin and baicalein in rats. J Pharm Pharmacol <u>55</u>, 205–209

Lange U, Müller-Ladner U (2007): Glucocorticoid induced osteoporosis. Z Rheumatol <u>66</u>, 129-136

Langenbeck U (2005): Erb- und Umweltfaktoren in der Entstehung der Osteoporose: Wege zu Prädiktion und Prävention. Dtsch Arztebl <u>102</u>, 664–672 Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP,Dontas IA (2008): The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. Comp Med <u>58</u>, 424–430

Li X, Song QS, Wang JY, Leng HJ, Chen ZQ, Liu ZJ, Dang GT, Song CL (2011): Simvastatin induces estrogen receptor-alpha expression in bone, restores bone loss, and decreases ER α expression and uterine wet weight in ovariectomized rats. J Bone Miner Metab <u>29</u>, 396–403

Liberman UA, Weiss SR, Bröll J, Minne HW, Quan H, Bell NH, Rodriguez-Portales J, Downs RW, Dequeker J, Favus M (1995): Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. N Engl J Med <u>333</u>, 1437–1444

Lippuner K, Johansson H, Kanis JA, Rizzoli R (2009): Remaining lifetime and absolute 10-year probabilities of osteoporotic fracture in swiss men and women. Osteoporos Int 20, 1131–1140

Melton 3rd LJ, Kallmes DF (2006): Epidemiology of vertebral fractures: implications for vertebral augmentation. Acad Radiol <u>13</u>, 538–545

Melton 3rd LJ, Chrischilles EA, Cooper C, Lane AW, Riggs BL (1992): Perspective. How many women have osteoporosis? J Bone Miner Res <u>7</u>, 1005–1010

Melton 3rd LJ, Thamer M, Ray NF, Chan JK, Chesnut CH 3rd, Einhorn TA, Johnston CC, Raisz LG, Silverman SL, Siris ES (1997): Fractures attributable to osteoporosis: report from the National Osteoporosis Foundation. J Bone Miner Res <u>12</u>, 16–23

Michnovicz JJ, Hershcopf RJ, Naganuma H, Bradlow HL, Fishman J (1986): Increased 2-hydroxylation of estradiol as a possible mechanism for the anti-estrogenic effect of cigarette smoking. N Engl J Med <u>315</u>, 1305–1309

Mosekilde L (1995): Assessing bone quality — Animal models in preclinical osteoporosis research. Bone <u>17</u>, 343–352

Mosekilde L, Danielsen CC, Knudesen UB (1993): The effect of aging and ovariectomy on the vertebral bone mass andbiomechanical properties of mature rats. Bone <u>14</u>, 1–6

Nagase S, Hashimoto Y, Small M, Ohyama M, Kuwayama T, Deacon S (2012): Serum and urine bone resorption markers and pharmacokinetics of the cathepsin K inhibitor ONO-5334 after ascending single doses in post menopausal women. Br J Clin Pharmacol <u>74</u>, 959–970

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

Neuerburg C, Stumpf U, Schmidmaier R, Kammerlander C, Pfeilschifter J, Mutschler W, Böcker W (2015): New DVO guideline for osteoporosis management 2014 and its importance for trauma surgeons. Unfallchirurg <u>118</u>, 905–912

Oppelt PG, Beckmann MW (2001): Risikofaktoren und- beurteilung in der Menopause. Geburtshilfe Frauenheilkd <u>61</u>, 257–267

Ortmann O, Lattrich C, Diedrich K (2010): Hormontherapie (HT) in der Peri- und Postmenopause. Gynakologe <u>43</u>, 839–847

Pfeilschifter J (2006): 2006 DVO-guideline for prevention, diagnosis, and therapy of osteoporosis for women after menopause, for men after age 60 executive summary guidelines. Exp Clin Endocrinol Diabetes <u>114</u>, 611–620

Pothuaud L, Rietbergen BV, Mosekilde L, Beuf O, Levitz P, Benhamou CL, Majumdar S (2002) Combination of topological parameters and bone volume fraction better predicts the mechanical properties of trabecular bone. J Biomech <u>35</u>, 1091–1099

Priemel M, Münch C, Beil FT, Ritzel H, Amling M (2006): Pathophysiology and pathomorphology of osteoporosis. Radiologe <u>46</u>, 831–838

Reginster JY, Seeman E, De Vernejoul MC, Adami S, Compston J, Phenekos C, Devogelaer JP, Curiel MD, Sawicki A, Goemaere S et al. (2005): Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) stud. J Clin Endocrinol Metab <u>90</u>, 2816– 2822

Richards JB, Rivadeneira F, Inouye Y, Pastinen TM, Sorynzo N, Wilson SG, Andrew T, Falchi M, Gwilliam R, Ahmadi KR et al. (2008): Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. Lancet <u>371</u>, 1505–1512

Riem S (2013): Fractures in the elderly. OUP 2, 221-224

Ringe JD (2012): The effect of Vitamin D on falls and fractures. Scand J Clin Lab Invest Suppl <u>243</u>, 73–78

Ringe JD, Windler E (2015): Kalzium- und Vitamin-D-Substitution bei Osteoporose – Nutzen oder Risiko. Gynakol Endokrinol <u>13</u>, 11–15

Rubin C, Pope M, Fritton JC, Magnusson M, Hansson T, McLeod K (2003): Transmissibility of 15-hertz to 35-hertz vibrations to the human hip and lumbar spine: determining the physiologic feasibility of delivering low-level anabolic mechanical stimuli to skeletal regions at greatest risk of fracture because of osteoporosis. Spine (Phila Pa 1976) <u>28</u>, 2621–2627

Scholz R, Borte G, Salis Soglio G, Heyde CE (2010): Fehlermöglichkeiten und Interpretationsprobleme der Osteodensitometrie. Orthopade <u>39</u>, 361-370

Saul D, Kling JH, Kosinsky RL, Hoffmann DB, Komrakova M, Wicke M, Menger B, Sehmisch S (2016): Effect of the Lipoxygenase Inhibitor Baicalein on Muscles in Ovariectomized Rats. J Nutr Metab, 3703216

Saul D, Gleitz S, Nguyen HH, Kosinsky RL, Sehmisch S, Hoffmann DB, Wassmann M, Menger B, Komrakova M (2017): Effect of the lipoxygenase-inhibitors baicalein and zileuton on the vertebra in ovariectomized rats. Bone <u>101</u>, 134–144

Scharla SH, Ziegler R (1994): Bedeutung des Vitamin D und seiner Metaboliten in der Pathogenese und Therapie der Osteoporose. Dtsch Med Wochenschr <u>119</u>, 847–851

Schmolke B (2001): Laboratory diagnosis of osteoporosis. Orthopade 30, 425-436

Schuit SCE, van der Klift M, Weel AEAM, de Laet CEDH, Burger H, Seeman E, Hofman A, Uitterlinden AG, van Leeuwen JPTM, Pols HAP (2004): Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: the Rotterdam Study. Bone <u>34</u>, 195–202

Seeman E (2007): Is a change in bone mineral density a sensitive and specific surrogate of anti-fracture efficacy? Bone 41, 308–317

Sehmisch S, Erren M, Rack T, Tezval M, Seidlova- Wuttke D, Richter J, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2009a): Short term effects of parathyroid hormone on rat lumbar vertebrae. Spine (Phila Pa 1976) <u>34</u>, 2014–2021

Sehmisch S, Dullin C, Zaroban A, Tezval M, Rack T, Schmelz U, Seidlova-Wuttke D, Dunkelberg H, Wuttke W, Marten K et al. (2009b): The use of flat panel volumetric computed tomography (fpVCT) in osteoporosis research. Acad Radiol <u>16</u>, 394–400

Seiffert-Klauss V, Schumm-Draeger PM (2003): Hormontherapie um die Menopause. Internist (Berl) <u>44</u>, 1500–1507 Shao ZH, Vanden Hoek TL, Qin Y, Becker LB, Schumacker PT, Li CQ, Dey L, Barth E, Halpern H, Rosen GM et al. (2002): Baicalein attenuates oxidant stress in cardiomyocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol <u>282</u>, 999–1006

Siggelkow H (2015): Osteoporosis in women – well known but not treated. MMW Fortschr Med <u>157</u>, 73–80

Siris E, Adachi JD, Lu Y, Fuerst T, Crans GG, Wong M, Harper KD, Genant HK (2002): Effects of raloxifene on fracture severity in postmenopausal women with osteoporosis: results from the MORE study. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. Osteoporos Int <u>13</u>, 907–913

Staa TP, Leufkens HG, Cooper C (2002): The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. Osteoporos Int <u>13</u>, 777–787

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

Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ (1995): FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. Bone <u>17</u>, 125–133

Turner CH (2002): Biomechanics of Bone: Determinants of Skeletal Fragility and Bone Quality. Osteoporos Int <u>13</u>, 97–104

Wang ML, Massie J, Perry A, Garfin SR, Kim CW (2007): A rat osteoporotic spine model for the evaluation of bioresorbable bone cements. Spine J <u>7</u>, 466–474

Watts NB (1999): Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. Clin Chem <u>45</u>, 1359–1368

Welsch U (Hrsg.): Welsch Lehrbuch Histologie. 3. Auflage; Elsevier Urban & Fischer, München 2010

Wildner M (2001): Osteoporose. Dtsch Med Wochenschr 126, 1170-1172

Woggan KJ, Münchow M, Kruse HP: Relation von Kortikalis- zu Spongiosadichte bei generalisierten Osteopathien. In: Reiser M, Heuck A, Münzenberg KJ, Kummer B (Hrsg.): Osteologie aktuell VIII. Springer, Berlin Heidelberg 1994, 339–344

Wolschendorf K, Martens H, Niedermayer W, Grashuis JL, Trouerbach T: Knochenstrukturanalyse mit eindimensionaler Fouriertransformation. In: Reiser M, Heuck A, Münzenberg KJ, Kummer B (Hrsg.): Osteologie aktuell VIII. Springer, Berlin Heidelberg 1994, 385-388

Xu W, Perera S, Medich D, Fiorito G, Wagner J, Berger LK, Greenspan SL (2011): Height loss, vertebral fractures and the misclassification of osteoporosis. Bone <u>48</u>, 307–311

Young KA, Snell-Bergeon JK, Naik RG, Hokanson JE, Tarullo D, Gottlieb PA, Garg SK, Rewers M (2011): Vitamin D deficiency and coronary artery calcification in subjects with type 1 diabetes. Diabetes <u>34</u>, 454–458

Ziller V (2013): Osteoporose – Leitliniengerechte Diagnostik und Therapie. Gynakologe <u>46</u>, 225–231

Zimmermann MH (2017): Einfluss der selektiven Inhibition proinflammatorischer Lipoxygenase auf den osteoporotischen Knochen im Ovariektomiemodell der Ratte. Med. Diss. Göttingen 2017

Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Sehmisch sowohl für die Möglichkeit der Promotion in der Unfallchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen als auch für die besondere Mühe bei der Kontrolle und Korrektur meiner Dissertation.

Ein weiterer großer Dank geht an die Mitarbeiterinnen des Labors der Unfallchirurgie. Zu erwähnen ist Frau Anette Witt, welche immer für Fragen zu formellen Angelegenheiten der Dissertation zur Verfügung stand und meine Arbeit auf grammatikalische Richtigkeit überprüft hat. Frau Ramona Castro-Machguth will ich für ihre Hilfe und Ansprechbarkeit bezüglich der Durchführung der verschiedenen Experimente herzlich danken. Frau Dr. Marina Komrakova gilt ein besonderer Dank für die Geduld beim Korrekturlesen und die vielen Verbesserungsvorschläge.

Des Weiteren will ich mich bei Herrn Dr. Ulrich Schmelz für die Unterstützung während des Veraschungstest und bei Herrn Christian Dullin für die Einweisung in die Mikro CT Untersuchung bedanken.