

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

**Der Einfluss von Baicalein auf die metaphysäre
Frakturheilung im Osteoporosemodell
der Ratte**

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

vorgelegt von
Marie Weber
aus
Trier

Göttingen 2018

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

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

II. Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. H. Jarry

III. Drittreferent/in: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. K. G. Wiese

Datum der mündlichen Prüfung: 16.07.2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Der Einfluss von Baicalein auf die metaphysäre Frakturheilung im Osteoporosemodell der Ratte“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Einführung in das Thema und Fragestellung	1
1.2 Knochen.....	2
1.2.1 Knochenzellen	3
1.2.2 Knochenumbau.....	4
1.3 Osteoporose	5
1.3.1 Definition Osteoporose.....	5
1.3.2 Einteilung der Osteoporose	5
1.3.4 Ätiologie und Pathogenese der primären Osteoporose	6
1.3.5 Risikofaktoren für Osteoporose und osteoporotische Frakturen	7
1.3.6 Klinik der Osteoporose.....	9
1.3.7 Diagnostik der Osteoporose	10
1.3.8 Therapie der Osteoporose.....	10
1.4 Fraktur und Frakturheilung	14
1.4.1 Frakturmechanismen	14
1.4.2 Die osteoporotische Fraktur	14
1.4.3 Formen der Frakturheilung.....	15
1.4.4 Frakturheilung und Osteoporose	15
1.4.5 Frakturheilung im metaphysären Osteotomie-Modell	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Versuchsablauf	17
2.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	19
2.3 Ovariectomie	20
2.4 Osteotomie und Osteosynthese	21
2.5 Obduktion und Präparation	23
2.6 Biomechanischer Test	23
2.6.1 Prinzip des biomechanischen Tests	23
2.6.2 Validierung.....	23

2.6.3	Versuchsdurchführung	24
2.6.4	Auswertung der Kraft-Weg-Diagramme	25
2.6.5	Messparameter	25
2.7	Mikro-Computertomographie	26
2.7.1	Durchführung des Scans	26
2.7.2	Auswertung	27
2.7.3	Messparameter	32
2.8	Mikroradiographie	33
2.8.1	Anfertigung der histologischen Schnitte und der Mikroradiographien	33
2.8.2	Auswertung der Mikroradiographien	33
2.8.3	Messparameter	35
2.9	Prinzip der polychromen Sequenzmarkierung	37
2.9.1	Fluorochrome	37
2.9.2	Auswertung	38
2.9.3	Zeitpunkt der frühesten Überbrückung des Frakturspalts	40
2.9.4	Messparameter	40
2.10	Statistik	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Körpergewicht der Tiere im Verlauf	44
3.2	Uterusgewicht	45
3.3	Ergebnisse des biomechanischen Tests	45
3.3.1	Elastizität	45
3.3.2	Streckgrenze und Maximalkraft	46
3.4	Ergebnisse der Mikrocomputertomographie	47
3.4.1	Weichteilparameter	47
3.4.2	Kortikalisparameter	48
3.4.3	Kallusparameter	49
3.4.4	Parameter, die den gesamten Knochen betreffen	51
3.4.5	Parameter, die das gesamte Gewebe betreffen	52
3.4.6	BV/TV	53
3.5	Ergebnisse der Mikroradiographie	53
3.5.1	Repräsentative Mikroradiographien	54
3.5.2	Kortikalis	55

3.5.3	Kallus.....	57
3.6	Ergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung	60
3.6.1	Zeitpunkt der frühesten Überbrückung des Frakturspalts	60
3.6.2	Repräsentative Bilder der polychromen Sequenzmarkierung	61
3.6.3	Kallus plattennah	62
3.6.4	Kallus plattenfern	64
3.6.5	Kallus endostal	66
3.6.6	Gesamtfläche kompletter Kallus	67
4	Diskussion.....	69
4.1	Die ovariectomierte Ratte als Osteoporosemodell und das metaphysäre Frakturmodell	70
4.2	Biomechanischer Kompressionstest.....	71
4.3	Mikro-Computertomographie	72
4.4	Mikroradiographie.....	74
4.5	Polychrome Sequenzmarkierung.....	76
4.6	Schlussfolgerungen	78
5	Zusammenfassung.....	80
6	Anhang	82
6.1	Körpergewicht der Tiere im Verlauf.....	82
6.2	Uterusgewicht.....	83
6.3	Ergebnisse des biomechanischen Tests	83
6.4	Ergebnisse der Mikro-Computertomographie.....	84
6.5	Ergebnisse der Mikroradiographie	86
6.6	Ergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung	87
7	Literaturverzeichnis.....	90

Tabellenverzeichnis

Im Text:

Tabelle 1: Darstellung der Gruppen und der Behandlung der Ratten, Anzahl der Versuchstiere zum Zeitpunkt nach Versuchsende	19
Tabelle 2: Scanparameter des Scanprotokolls	26
Tabelle 3: Darstellung der Messparameter der Auswertung mit Einheit und Bedeutung	32
Tabelle 4: Messparameter gesamter Knochen, Einheit und Berechnung	35
Tabelle 5: Messparameter Kortikalis, Einheit und Berechnung	36
Tabelle 6: Messparameter Kallus, Einheit und Berechnung.....	36
Tabelle 7: Darstellung der Applikationszeitpunkte, Anfärbungszeiträume und Dosierungen der verschiedenen Fluorochrome	37
Tabelle 8: Messparameter Kallus plattennah, Einheit und Berechnung	40
Tabelle 9: Messparameter Kallus plattenfern, Einheit und Berechnung	41
Tabelle 10: Messparameter Kallus endostal, Einheit und Berechnung	41
Tabelle 11: Messparameter Kallus komplett, Einheit und Berechnung	41

Im Anhang:

Tabelle 1: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Körpergewichte der Tiere über die Versuchswochen in Gramm	82
Tabelle 2: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Uterusgewichte jeder Versuchsgruppe am Tag der Obduktion	83
Tabelle 3: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des biomechanischen Tests	83
Tabelle 4: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen der Weichteile	84
Tabelle 5: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen der Kortikalis	84
Tabelle 6: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des Kallus	84
Tabelle 7: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des gesamten Knochens	85

Tabelle 8: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des gesamten Gewebes	85
Tabelle 9: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Kortikalismessgrößen	86
Tabelle 10: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Kallusmessgrößen	87
Tabelle 11: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des plattennahen Kallus	87
Tabelle 12: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des plattenfernen Kallus	88
Tabelle 13: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des endostalen Kallus	88
Tabelle 14: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgröße für den gesamten Kallus	89

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung des Versuchsablaufes ab Zeitpunkt der Ovariectomie	18
Abb. 2: Dokumentation der Ovariectomie und der Anbringung der Osteosyntheseplatte im Zuge der Osteotomie	22
Abb. 3: Darstellung der Lage der Osteosyntheseplatte auf der Tibia im 3D-Bild des Micro-CT	22
Abb. 4: Positionierung der Tibia auf der Trägerplatte in der Werkstoffprüfmaschine	24
Abb. 5: Optimal adaptierter Kontrast im 2D-Bild des Micro-CT	28
Abb. 6: Entsprechendes Grauwert histogramm mit optimal adaptiertem Kontrast	28
Abb. 7: Optimal adaptierte Transparenz mittels Opacity Function im 3D-Bild	28
Abb. 8: Entsprechendes Grauwert histogramm mit optimal adaptierter Transparenz ..	28
Abb. 9: Darstellung der Phantom-Dichtewerte im Grauwert histogramm und Density Mapping	29
Abb. 10: Positionierung des Messrahmens über der Osteotomielinie	30
Abb. 11: Eingrenzung eines Grauwertbereiches am Beispiel des Weichteilbereiches	31
Abb. 12: Visualisierung des Kallusbereiches im 2D-Bild	32
Abb. 13: Eingrenzung eines Grauwertbereiches am Beispiel des Kallusbereiches	32
Abb. 14: Position des histologischen Schnittes unter dem Mikroradioskop	34
Abb. 15: Flächendefinition unter dem Fluoreszenzmikroskop	39
Abb. 16: Schematische Darstellung der Frakturüberbrückung durch die Fluorochrom-Markierung	40
Abb. 17: Darstellung des mittleren Körpergewichts der Tiere jeder Gruppe pro Versuchswoche vom Beginn bis zum Ende des Versuchs	44
Abb. 18: Darstellung des mittleren Uterusgewichtes der Tiere jeder Versuchsgruppe am Tag der Obduktion	45
Abb. 19: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Elastizität	46
Abb. 20: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Streckgrenze	46
Abb. 21: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Maximalkraft	46
Abb. 22: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Weichteil-Dichte	47
Abb. 23: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Weichteil-Volumen	48
Abb. 24: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalis-BMD	48
Abb. 25: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalis-Volumen	49

Abb. 26: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallus-BMD	49
Abb. 27: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallus-Volumen	50
Abb. 28: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Knochen-BMD	51
Abb. 29: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Knochen-Volumen	51
Abb. 30: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters gesamtes Gewebe Dichte	52
Abb. 31: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters gesamtes Gewebe Volumen.....	52
Abb. 32: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Bone Volume/ Tissue Volume.....	53
Abb. 33: NON OVX; repräsentative Mikroradiographie	54
Abb. 34: OVX; repräsentative Mikroradiographie	54
Abb. 35: 1 mg Baicalein; repräsentative Mikroradiographie.....	54
Abb. 36: 10 mg Baicalein; repräsentative Mikroradiographie.....	54
Abb. 37: 100 mg Baicalein; repräsentative Mikroradiographie.....	54
Abb. 38: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalis-Dicke distal plattennah.....	55
Abb. 39: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalis-Dicke distal plattenfern	55
Abb. 40: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalis-Dichte distal plattennah.....	56
Abb. 41: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalis-Dichte distal plattenfern	56
Abb. 42: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallus-Dicke plattennah..	57
Abb. 43: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallus-Dicke plattenfern .	57
Abb. 44: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallus-Dichte plattennah.	58
Abb. 45: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallus-Dichte plattenfern	59
Abb. 46: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallus-Dichte endostal	59
Abb. 47: NON OVX; repräsentative polychrome Sequenzmarkierung.....	61
Abb. 48: OVX; repräsentative polychrome Sequenzmarkierung	61
Abb. 49: 1 mg Baicalein; repräsentative polychrome Sequenzmarkierung.....	61
Abb. 50: 10 mg Baicalein; repräsentative polychrome Sequenzmarkierung.....	61
Abb. 51: 100 mg Baicalein; repräsentative polychrome Sequenzmarkierung.....	61
Abb. 52: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Gesamtfläche Kallus	

plattennah.....	62
Abb. 53: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße CG-Kallus-Fläche plattennah...	63
Abb. 54: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße AK-Kallus-Fläche plattennah ..	63
Abb. 55: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Gesamtkallus-Fläche plattenfern	64
Abb. 56: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße CG- Kallus-Fläche plattenfern.	64
Abb. 57: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße AK-Kallus-Fläche plattenfern..	65
Abb. 58: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Gesamtfläche Kallus endostal..	66
Abb. 59: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße CG-Kallus-Fläche endostal.....	66
Abb. 60: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße AK-Kallus-Fläche endostal.....	67
Abb. 61: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Gesamtfläche kompletter Kallus	67

Abkürzungsverzeichnis

AK	Alizarinkomplexon
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Aktenzeichen
BAP	Bone Alkaline Phosphatase
BMD	Bone Mineral Density
BMI	Body Mass Index
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMU	Basic Multicellular Unit
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CG	Calcein-Grün
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COX	Cyclooxygenase
CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DVO	Dachverband Osteologie
DXA	Dual-X-ray-Absorptiometrie
FBP	Filtered Back Projection
FGF	Fibroblast Growth Factor
FRAX®	Fracture Risk Assessment Tool
FOV	Field of View
g-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GVal	GValue
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoffion
hs-CRP	Hochsensitives C-reaktives Peptid
HU	Hounsfield Unit
IE	Internationale Einheit
IGF	Insuline-like Growth Factor
IgG2	Imunnglobulin G; Subklasse 2

IL	Interleukin
Konz.	Konzentration
kVp	Kilovoltpeak
Max.	Maximum
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
mGy	Milligray
μ A	Mikroampere
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NIH	National Institutes of Health
NON OVX	Nicht-ovarektomiert
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
Osteo	Osteotomie
OVX	Ovarektomie
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
pH	potentia hydrogenii
PTH	Parathormon
QCT	Quantitative Computertomographie
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
rhPTH	Rekombinantes humanes Parathormon
s.c.	subcutan
SERM	selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator
SOTI	Spinal Osteoporosis Therapeutic Intervention
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAP	Tartrate-resistant Acid Phosphatase
TROPOS	Treatment of Peripheral Osteoporosis
WHO	World Health Organisation
XO	Xylenolorange

1 Einleitung

1.1 Einführung in das Thema und Fragestellung

Osteoporose kann mittlerweile als globale Herausforderung im medizinischen und gesundheitsökonomischen Sektor betrachtet werden. Im Rahmen des „*WHO Scientific Group Technical Report*“ wird die Zahl der von Osteoporose Betroffenen auf 200 Millionen weltweit geschätzt [Kanis 2007], wovon sich 49 Millionen in Industriestaaten befinden [Wade et al. 2014]. Es ist anzunehmen, dass 40% aller Frauen in ihrem Leben einmal eine Fragilitäts-Fraktur auf Grund osteoporotischer Veränderungen erleiden werden [Chapurlat 2008]. Damit ist das Risiko einer 50-Jährigen, eine Osteoporose-induzierte Fraktur zu erleiden, höher, als das Risiko, eine atherosklerotische kardiovaskuläre Erkrankung (4,1%- 30,7% abhängig vom Risikoprofil) oder Brustkrebs (etwa 11%) zu entwickeln [Bleibler et al. 2014]. Patienten sehen sich nach einem Frakturereignis mit einer deutlichen Mobilitätseinschränkung, verminderter gesundheitsbezogener Lebensqualität und erhöhter Mortalität konfrontiert. Als Konsequenz des progredienten demographischen Wandels in Deutschland wird auch die sozioökonomische Belastung im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild Osteoporose steigen. Im Jahr 2010 wurde die Zahl der osteoporotischen Frakturen unter Frauen ab 50 Jahren in Deutschland auf 349.560 geschätzt. Mit einem prognostizierten Bevölkerungswachstum von 13,1 % bis 2020 ginge folglich eine Steigerung der Fraktur-Rate um 15,2 % einher [Gauthier et al. 2012]. Für eine 50-jährige Osteoporose-Patientin sind die lebenslangen Kosten einer Frakturbehandlung 3,3-mal so hoch wie die Frakturkosten einer gesunden, gleichaltrigen Frau [Bleibler et al. 2014]. Diese Daten demonstrieren die immense Bedeutung einer effektiven Therapie Osteoporose-assoziiierter Frakturen. Der Fokus aktueller Studien liegt allerdings vorrangig auf der Prävention dieser Frakturereignisse. Verschiedene therapeutische Ansätze zur Optimierung der Frakturheilung sehen die Applikation von rekombinanten Wachstumsfaktoren wie PDGF [Hollinger et al. 2008], oder die Gen-Therapie [Egermann et al. 2005] vor. Einige dieser Strategien scheitern allerdings im klinischen Gebrauch an Produktions-Problemen und mangelhafter Kosteneffektivität. Daher gilt es, neue Methoden zur kostenwirksamen und nachhaltigen Verbesserung der Frakturheilung von Osteoporose-Patienten zu etablieren.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Lipoxigenase-Inhibitor Baicalein als neue Therapieoption zu evaluieren. Es wird der Effekt auf die metaphysäre Frakturheilung der Tibia an ovariectomierten Ratten untersucht. Für das Flavonoid Baicalein ist bereits eine anti-inflammatorische sowie anti-kanzerogene Wirkung bestätigt [Chen et al. 2013; Gandhi 2013; Zhang et al. 2013]. Die

Applikation von Baicalein im Rattenmodell wird als reproduzierbar und wirkungsvoll eingestuft, da der Metabolismus des Medikaments und seiner Metabolite experimentell detailliert untersucht wurde [Akao et al. 2013; Tong et al. 2012; Wang et al. 2012].

1.2 Knochen

Der Knochen als Stützgewebe des Körpers zeichnet sich durch verschiedene essenzielle Eigenschaften aus: Druckfestigkeit, erreicht durch einen hohen Anteil an Kalzium-Phosphat-Kristallen (Hydroxylapatit), und Elastizität, ermöglicht durch ein trajektionell strukturiertes System aus Kollagenfibrillen. Als das größte Reservoir für Mineralien bildet die Knochenmatrix einen Speicher für nahezu das gesamte Kalzium im menschlichen Körper, welches sich abhängig von der Körpergröße auf 1-2 kg beläuft [Welsch 2010], 85% des Phosphats und 50% des Magnesiums [Bartl 2011].

Die Knochensubstanz besteht zu 45% aus Mineralien, zu 30% aus organischem Material und zu 25% aus Wasser [Lüllmann-Rauch 2012]. Die Zusammensetzung der Knochenmatrix ist stark von hormonalen, nutritiven und metabolischen Faktoren abhängig.

Die Makrostruktur des Knochens richtet sich nach der Zugehörigkeit zum appendikulären Skelett der langen Röhrenknochen in den Extremitäten beziehungsweise zum axialen Skelett der Wirbelsäule, des proximalen Femurs, der Rippen und des Beckens. Die Röhrenknochen setzen sich aus dem Schaft (Diaphyse), den Enden (Epiphysen) und den Abschnitten dazwischen (Metaphysen) zusammen.

Im Allgemeinen differenziert man zwischen Lamellenknochen, welcher bei Erwachsenen überwiegt und Geflechtknochen. Die Außenschicht (Kortikalis) des Lamellenknochens wird durch die Substantia compacta gebildet, welche einen soliden Gewebeverband darstellt. Meist beläuft sich die Kortikalisdicke auf 0,5-3 mm, sie kann aber gegebenenfalls auch 15 mm ausmachen (Femur) [Drenckhahn und Kugler 2008]. Der so genannte spongiöse Knochen (Substantia spongiosa) beschränkt sich auf das Knocheninnere und bildet ein gitterartiges Trabekelgerüst mit einer mittleren Dicke von 0,2 mm [Drenckhahn und Kugler 2008]. Das Endost kleidet die große Oberfläche der Spongiosa aus, während die Kortikalis von Periost überzogen ist. Die Kompakta ist in Knochenlamellen organisiert.

Im Gegensatz zum Lamellenknochen wird der Geflechtknochen vor allem während der Knochenentstehung und der Frakturheilung gebildet. Statt einer Lamellenstruktur besteht der Geflechtknochen aus unstrukturiert verflochtenen Kollagenfasern. Im adulten Organismus findet man diese Knochendifferenzierung nur noch im Felsenbein, in bestimmten Bereichen der Schädelknochen und im neu gebildeten Kallus im Falle einer sekundären Frakturheilung (vgl. 1.4.3.2).

1.2.1 Knochenzellen

1.2.1.1 Osteozyten

Osteozyten sind endgültig ausdifferenzierte, von mineralisierter Knochenmatrix umgebene Osteoblasten, die sich von multipotenten mesenchymalen Stammzellen des Knochenstromas ableiten [Bartl 2011]. Die noch unvollständig geklärte Aufgabe der Osteozyten scheint in der Erhaltung der Knochenmatrix zu liegen. Außerdem fungieren sie als Mechanosensoren, welche durch mechanische Beanspruchung ausgelöst werden und über eine Signalkaskade mit den Osteoblasten an der Oberfläche des Knochens in Verbindung stehen [Lüllmann-Rauch 2011]. Weiterhin wurde beschrieben, dass das durch Osteozyten produzierte Glykoprotein 130 für die Parathormon-induzierte Osteoblasten-Differenzierung benötigt wird [Standal et al. 2014]. Ferner können Osteozyten eine unterstützende Funktion bei der Knochenheilung einnehmen, da sie die Rekrutierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen am Ort des Umbaus induzieren [Wu et al. 2014].

1.2.1.2 Osteoblasten

Die mesenchymalen Osteoblasten fungieren als Knochenbildner sowohl in wachsenden als auch in reifen Knochen. Die Zellen sezernieren aktiv Kollagen, Proteoglykane, Osteocalcin, Osteonectin, BMP und weitere Proteine sowie Wachstumsfaktoren. Stimuliert wird die Knochenproduktion mittels IGFs, TGF- β , FGFs, PDGF, BMPs, Prostaglandinen, Fluoriden, Statinen, Strontium und Parathormon, während Leptin die Osteoblasten hemmt [Bartl 2011]. Die durch Osteoblasten produzierte, zunächst unverkalkte Matrix wird als Osteoid bezeichnet und bedeckt 10-15% der Oberfläche eines adulten Knochens [Welsch 2010]. Die Anlagerung des Osteoids erfolgt appositionell, also an die vollständig mineralisierte Matrix, entweder im Inneren des Knochens oder unter dem Periost. Dabei stellt die alkalische Phosphatase anorganisches Phosphat bereit und spaltet gleichzeitig Pyrophosphat, welches hemmend auf die Mineralisation wirken würde [Lüllmann-Rauch 2012]. Weiterhin sind Osteoblasten unabdingbar für die Aktivierung der Osteoklasten, induziert durch Parathormon, und damit des Knochenabbaus. Im Folgenden gehen die Osteoblasten entweder apoptotisch zu Grunde oder differenzieren sich zu Osteozyten im Ruhezustand, so genannten *bone-lining cells*.

1.2.1.3 Osteoklasten

Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die sich von den Monozyten des Knochenmarks ableiten. Es entstehen zunächst einkernige Osteoklastenvorläuferzellen, welche unter Einfluss von Vitamin D₃, RANKL sowie IL 1 und IL 6 zu den reifen Osteoklasten fusionieren. Deren Funktion besteht vor allem im Abbau der mineralisierten Knochenmatrix. Abschließend erfolgt

die Endozytose der Matrix-Fragmente. Sämtliche Funktionen sowie Proliferation, Differenzierung und Überleben der Osteoklasten werden durch M-CSF gesteuert, welches als essenzieller Induktor für RANK fungiert [Boyce 2013]. Osteoklasten weisen unterschiedliche Aktivitätszyklen auf und gehen zumeist nach 2-wöchiger Tätigkeit apoptotisch zugrunde [Lüllmann-Rauch 2012].

1.2.2 Knochenumbau

Das *bone remodelling* findet das gesamte Leben lang statt. Ausgelöst wird es durch die mechanosensitiven Osteozyten, die eine Belastungsänderung wahrnehmen. Jährlich findet ein Umsatz von 18% des gesamten Skelettkalziums statt [Welsch 2010]. Der Knochenumbau läuft in Zyklen von etwa 120 Tagen ab [Bartl 2011] und dient mehreren Zielen: der Bereitstellung von Kalzium, Reparatur von Mikroschäden, Adaptierung der Kompakta- und Spongiosa-Architektur an aktuelle Belastungen sowie der Vorbeugung der Materialermüdung. Den Umbau führt eine Einheit von Osteoblasten und Osteoklasten aus (*basic multicellular unit*), die im Sinne eines Bohrkopfes voranschreiten. Die Zusammenkunft dieser Einheiten wird durch viele Faktoren, wie Sphingosin-1-Phosphat, Ephrine und IL-6, gesteuert [Sims et al. 2013]. In der Kompakta entspricht der durch die Osteoklasten gefressene Bohrkanal den zukünftigen Osteonen. Jährlich werden ungefähr 25% des spongiösen Knochens umgebaut, während nur 2,5% des kortikalen Knochenanteils einem Remodelling unterliegen. Ein Knochenschwund, der aus einer negativen Bilanz zwischen Knochenabbau und Aufbau resultiert, konzentriert sich demnach vorerst auf Knochen mit einem hohen Spongiosaanteil, wie die Lendenwirbelsäule und das proximale Femur [Bartl 2011].

1.2.2.1 Regulierung des Knochenumbaus

Die Koordination von Osteoblasten und Osteoklasten unterliegt einer komplexen Interaktion verschiedener Faktoren. Eine zentrale Rolle spielt das RANKL-Osteoprotegerin-Zytokinsystem [Bartl 2011]. Osteoprotegerin, ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie, sezerniert durch Osteoblasten, inhibiert die Differenzierung der Osteoklasten aus Progenitorzellen und hemmt damit die Knochenresorption. Der *Receptor Activator of NF- κ B-Ligand* (RANKL), ein membranständiges Protein der Osteoblasten, stimuliert über seinen zellulären Rezeptor (RANK) die Osteoklastendifferenzierung. Osteoprotegerin fungiert als Köder-Rezeptor für RANKL und verhindert damit seine Bindung an RANK. Während Parathormon und Glukokortikoide zu einer erhöhten RANKL- und einer verminderten OPG-Produktion führen, bewirken TGF- β und Östrogen eine forcierte OPG-Produktion. Auch Vitamin D3 verstärkt die Herstellung von RANKL [Leibbrandt et al. 2008]. Im Falle eines

Ungleichgewichtes zwischen aktivierend und inhibierend wirkenden Faktoren im RANKL-OPG-Zytokinsystem kann es, zum Beispiel durch Östrogenmangel, zu einer negativen Bilanz des Knochenumsatzes und dadurch zu einer Abnahme der Knochemasse kommen [Lüllmann-Rauch 2012].

1.3 Osteoporose

1.3.1 Definition Osteoporose

Die weithin anerkannte Definition der Osteoporose wurde durch das *NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis* im Jahr 2001 formuliert: „Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist, mit der Folge vermehrter Knochenbrüchigkeit.“ [Bartl 2011].

Bezieht man sich auf die WHO Kriterien ist die Osteoporose definiert als eine Knochenmineraldichte (*bone mineral density* (BMD)) die 2,5 Standardabweichungen oder mehr unter dem statistischen Mittelwert für junge gesunde Frauen liegt. Diese Einteilung bezeichnet man als *T-Score*. Die BMD wird dabei unter Zuhilfenahme des *Dual Energy X-ray Absorptiometry* (DXA) gemessen (DXA-Methode). Die WHO empfiehlt den *T-Score* sowohl als Kriterium für die pharmazeutische Intervention als auch als Eintrittsbeschränkung in therapeutische Studien [WHO 2004].

1.3.2 Einteilung der Osteoporose

Die Osteoporose lässt sich in zwei große Formkreise differenzieren. Zur Primären Osteoporose zählen sowohl die juvenile und die postmenopausale als auch die Altersosteoporose. Andere Ausprägungen, wie die Steroid- und Inaktivitätsosteoporose, und die durch Hyperthyreose, Hypogonadismus, Thyreoidektomie, Magenresektion und Medikamente verursachte Osteoporose werden als sekundäre Osteoporose definiert.

Die postmenopausale Osteoporose stellt dabei wahrscheinlich die häufigste Erkrankung des skelettalen Systems dar und ist vorrangig bei Frauen jenseits des 50.-60.-Lebensjahres zu finden. Ab dem 60. Lebensjahr ist etwa jede fünfte Frau von der Krankheit betroffen [Moch et al. 2008]. Während die postklimakterische Osteoporose meist als *Typ I* definiert wird, wird die altersbedingte oder senile Involutionsosteoporose als *Typ II* bezeichnet.

Sie sekundären Osteoporoseformen haben meist gemischte Ursachen und machen lediglich 5% der Osteoporosefälle aus [Bartl 2011].

1.3.3 Epidemiologie

Die Einstufung der Osteoporose als eine der 10 wichtigsten Volkskrankheiten durch die WHO verdeutlicht das globale Ausmaß dieser Erkrankung [Bartl 2011]. Weltweit sind 200 Millionen Menschen an Osteoporose erkrankt [Kanis 2007]. In Europa sind Schätzungen zufolge 22 Millionen Frauen und 5,5 Millionen Männer von Osteoporose betroffen [Hernlund et al 2013]. Vor dem Hintergrund der WHO-Definition der Osteoporose mithilfe einer erniedrigten Knochenmineraldichte (DXA T-Score < -2,5) liegt laut dem Entwurf der aktuellen DVO-Leitlinien bei etwa 15% der postmenopausalen Frauen im Alter von 50-60 Jahren Osteoporose vor. In der Altersgruppe der über 70-jährigen Frauen sind 45% von Osteoporose betroffen, während 2,4% der Männer zwischen 50 und 60 Jahren und 17% der Männer über 70 Jahren an osteoporotischen Veränderungen im Schenkelhals leiden [DVO 2014]. Bereits jede 2. Frau und jeder 5. Mann erleiden im Leben eine Fraktur, die auf Osteoporose zurückzuführen ist [Kampmann 2008]. Im Durchschnitt treten erste Wirbelbrüche bei Frauen 5-10 Jahre nach Beginn der Menopause auf [Scharf et al. 2011].

In der Altersgruppe der über 50-Jährigen in Deutschland liegt die Osteoporose Inzidenz insgesamt bei 2.1%. Die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland beläuft sich laut der *Bone Evaluation Study* auf 885 000 jährlich, während 6,3 Millionen Menschen im Jahr 2009 bereits erkrankt waren [Hadji et al. 2009].

1.3.4 Ätiologie und Pathogenese der primären Osteoporose

1.3.4.1 Postmenopausale Osteoporose (Typ I)

Diese Form der Osteoporose ist die häufigste und tritt bereits perimenopausal auf. Daher sind vorrangig Frauen ab dem 50.-60. Lebensjahr betroffen [Moch et al. 2008]. Der Abbau des kortikalen Knochens findet bei postklimakterischen Frauen mit einer Rate von 2-3% jährlich statt. Dieser Abbau tritt zusätzlich zu einer ohnehin altersabhängig einsetzenden sukzessiven Knochenreduktion von 0,3-0,5% im Jahr nach Überschreiten des 50. Lebensjahres ein. Bereits altersbedingt erfolgt ein Verlust der Knochenmasse von ungefähr 50% im Vergleich zum Knochenstatus im 3. Lebensjahrzehnt. Der 5-10 Jahre früher beginnende Abbau von spongiosen Knochen beläuft sich postmenopausal auf 4-8%. Diese Vorgänge in beiden Knochenteilen kommen aber nach 5-10 Jahren zum Ende [Niethard et al. 2009].

Der Östrogenausfall führt bei den Betroffenen zur Vermehrung von Zytokinen wie IL-6 und infolgedessen zu gesteigerter Osteoklasten-Aktivität und -Rekrutierung. Zusätzlich steigt die Sensibilität für das resorptiv wirkende Parathormon [Bartl 2011]. Kommt es dann auf Grund der Nettoresorptionserhöhung zu einer negativen Knochenbilanz, entsteht Osteoporose.

Messungen zeigen, dass die RANKL-RANK-OPG Achse eine übergeordnete Rolle in der Pathogenese der Osteoporose spielt (vgl. 1.2.2.1). Sowohl die Biomarker RANKL, RANK und Osteoprotegerin, als auch IL-6 sind bei Osteoporose Patientinnen signifikant erhöht [Jabbar et al. 2011]. Diese Zytokine können also als Indikatoren für eine verringerte BMD verwendet werden.

Der konsekutive Knochenschwund macht sich vorerst als Spongiosaverlust bemerkbar, der vor allem im spongiosareichen Wirbelkörper und im Oberschenkelknochen eine Neigung zu Frakturen auch ohne adäquates Trauma hervorruft.

Gegenüber Männern kommen bei Frauen verstärkende Faktoren, wie eine generell geringere Konzentration des aktiven Vitamin D (1,25(OH)₂-Vitamin-D₃) durch verringerte renale Synthese und eine reduzierte Kalziumresorption im Gastrointestinal Trakt hinzu [Enderle et al. 2003].

1.3.4.2 Senile Involutionsosteoporose (Typ II)

Diese Art der Osteoporose ist vergleichbar mit der altersbedingten Atrophie verschiedener Organe. Pathogenetisch kommt es zu einer verringerten Osteoblastenaktivität. Auf Grund der verminderten Neubildung von Knochenmasse kommt es langfristig zu einem Knochenschwund. Ursächlich zeigen sich bei dieser Altersosteoporose vor allem die Immobilität und ein sekundärer Hyperparathyreoidismus, als Folge der verschlechterten Nierenfunktion und dem daraus resultierenden tubulären Kalzium-Verlust, sowie der verringerten enteralen Kalzium-Resorption. Diese Vorgänge beruhen auf der verminderten Vitamin-D-Hydroxylierung in der Niere [Moch et al. 2008]. Die Typ II-Osteoporose tritt bei Frauen doppelt so häufig auf wie bei Männern und beginnt ab dem 70. Lebensjahr [Bartl 2011].

1.3.5 Risikofaktoren für Osteoporose und osteoporotische Frakturen

1.3.5.1 Nicht modifizierbare Risikofaktoren

Der typische Risikopatient entspricht wohl einer schlanken, hellhäutigen Frau mit geringer körperlicher Aktivität und wenig Sonnenexposition. Die Patientin ernährt sich Kalzium- und Vitamin-D-arm, raucht und hat mehrere Kinder gestillt.

Wie bereits beschrieben, spielen sowohl das Geschlecht, als auch das Alter eine entscheidende Rolle bei der Abschätzung des Risikos einer Osteoporose (vgl. 1.3.4.1 und 1.3.4.2). Der vorrangige Risikofaktor bei Frauen besteht im Östrogenmangel nach den Wechseljahren. Im Alter kommen Kalzium-Verlust in Niere und Darm sowie Immobilität hinzu.

Abgesehen davon bestimmen genetische Faktoren das Osteoporose-Risiko in großem Ausmaß. Daher wird eine proximale Femur Fraktur in der Anamnese der Eltern als prognostisch

relevante Größe für das Osteoporose-Risiko angesehen [Bartl 2011]. Basierend auf Zwillings- und Familienstudien wurde die Aussage getroffen, dass die interindividuell variierende BMD in 50-85% der Fälle durch genetische Faktoren determiniert ist [Sobieszczanska et al. 2013]. Relevant sind auch die Allele für Gene des Östrogenrezeptors, des Vitamin D und solche, die den Kollagenstoffwechsel steuern [Seebach und Marzi 2011]. Die Aberrationen sind auf etwa 20 Millionen bisher bekannte Polymorphismen im menschlichen Genom zurückzuführen [Ralston et al. 2010]. Tatsächliche Folge einer Mutation in einem einzigen Gen sind allerdings nur die seltenen und schweren Formen der Osteoporose wie Osteogenesis imperfecta, Osteopetrose, Sclerosteose und Knochenschwund ausgelöst durch eine Östrogen-Rezeptor-Defizienz.

Als weitere nicht beeinflussbare Risikofaktoren sind Gravität und Stillzeit zu erwähnen. Während der Laktationszeit verliert die Mutter circa 300-400 mg Kalzium pro Tag. Ein Großteil dieser Menge wird nach dem Abstillen wieder zurückgewonnen. Wird die Stillzeit eines Kindes über ein Jahr hinaus verlängert, steigt das Osteoporose-Risiko allerdings signifikant an [Okuy et al. 2013]. Zusätzlich dazu erhöht die in der Schwangerschaft zuletzt unvermeidbare Immobilität den Knochenabbau.

1.3.5.2 Modifizierbare Risikofaktoren

Zu den multiplen beeinflussbaren Größen, die eine Osteoporose forcieren können, gehört zweifellos das Körpergewicht. Es wurde gezeigt, dass untergewichtige Frauen (BMI <20) ein gesteigertes Risiko für osteoporotische Frakturen haben. Bei Patientinnen die an Anorexia Nervosa leiden, kann eine signifikante Veränderung des Östrogen-Spiegels und Hypogonadismus nachgewiesen werden [Nachtigall et al. 2013]. Dies hat einen ähnlichen Effekt auf den Knochen wie die Stoffwechsellumstellung postmenopausaler Frauen. In einer Studie wurden Frauen ab dem 40. Lebensjahr untersucht. Während 52,1% der untergewichtigen Frauen an einem osteoporotisch veränderten Femurhals litten, belief sich diese Zahl unter den Normalgewichtigen nur auf 20,3% und unter den Übergewichtigen lediglich auf 15,7%. Unter den adipösen Patientinnen betrug der Prozentsatz nur 9,4% [Rithirangsiroj et al. 2012].

Des Weiteren stellt chronischer Bewegungsmangel einen großen Risikofaktor für Osteoporose dar. Sportliche Aktivität führt bei präpubertären Kindern zu einem Zuwachs an Knochenmasse von 4-5% [Nachtigall et al. 2013]. Der knochenaufbauende Osteoblastenreiz durch Komprimierung der Trabekel fällt bei fehlender Bewegung weg und hat dadurch eine negative Knochenbilanz zur Folge [Seebach und Marzi 2011].

Die Ernährung nimmt ebenfalls eine große Rolle in der Beeinflussung des Knochenstoffwechsels ein. Sowohl der Kalzium-, als auch der Vitamin-D-Spiegel sind oft zu

niedrig bei Frauen aller Altersgruppen. In einer Studie wurde ermittelt, dass 84% der Patienten in Deutschland insuffiziente (20-30 ng/ml) Vitamin-D-Spiegel aufweisen. Außerdem ist eine Hypovitaminose D unter Patienten mit Fettleibigkeit, Bluthochdruck und Osteoporose wahrscheinlicher [Maier et al. 2013]. Dies führt zur Mobilisierung von Kalzium aus dem Knochenspeicher mittels Parathormon und damit zu einem Abbau der Knochensubstanz.

Die DVO sieht Nikotinkonsum und COPD ebenfalls als Risikofaktoren für Osteoporose an [DVO 2014; Ogura-Tomomatsu et al. 2012]. Während das Risiko für eine Hüftfraktur bei Raucherinnen im 50. Lebensjahr noch dem der Nicht-Raucherinnen entspricht, steigt deren Risiko gegenüber dem der nicht-rauchenden Frauen im 60. Lebensjahr auf 17% und mit dem 80. Lebensjahr sogar auf 71% [Law et al. 1997].

Die DVO-Leitlinien von 2014 beschreiben weitere Risikofaktoren wie Homozystein-, Folsäure- und Vitamin B₁₂-Mangel, das hochsensitive C-reaktive Peptid (hs-CRP) als Marker für niedrigtraumatische Frakturen, sowie eine hohe Kadmiumzufuhr [DVO 2014].

1.3.6 Klinik der Osteoporose

Das Leitsymptom der Osteoporose ist der akute Rückenschmerz, welcher sich meist im Zusammenhang mit einer Fraktur oder Wirbelkörpersinterung mit subperiostaler Einblutung zeigt. Dieser akute Schmerz tritt meist auf Höhe der Wirbel Th 11-12 auf, während chronische Schmerzen sich eher auf die Lendenwirbelsäule beschränken.

Die osteoporotisch bedingten Hauptfrakturen sind Wirbelkörperfrakturen, proximale Femurfrakturen, distale Radiusfrakturen und Humerusfrakturen. Die Inzidenz der nicht vertebrealen Frakturen in Deutschland liegt in der Altersgruppe von 50-79 bei 1,9% für Frauen und 0,7% für Männer. Vertebreal Frakturen kommen mit einer Häufigkeit von 1% bei Frauen und 0,6% bei Männern vor [DVO 2014].

Im Zuge der Hyperkyphose und Hyperlordose, die durch die osteoporotische Deformierung der Wirbelsäule entsteht, kann man das so genannte „Tannenbaumphänomen“ beobachten, da schräg vom Rücken zu den Flanken verlaufende Hautfalten auftreten [Grifka und Kuster 2011]. Weiterhin zeigt sich ein hervorstehender Bauch durch Ausweichen des Abdomens als Folge der Reduktion der Körpergröße [Niethard et al. 2009]. Als *kissing spine* bzw. *Baastrup-Zeichen* wird das schmerzhaft Berühren der Processus spinosi der Wirbelkörper bezeichnet [Bartl 2011]. Mit diesen anatomischen Veränderungen geht auch die Verschlechterung der pulmonalen Vitalparameter einher [Dimai 2009].

Ein weiteres klinisches Zeichen für Osteoporose können Zahnschmerz und Zahnausfall bedingt durch die degenerativen Veränderungen des Alveolarknochens sein [Bartl 2011].

1.3.7 Diagnostik der Osteoporose

Die grundlegende Diagnostik der Osteoporose stützt sich auf die folgenden fünf Säulen. Zu diesen gehört vorerst die Anamnese in Begleitung mit der Risikoerfassung, weiterhin die klinische Untersuchung und ein konventionelles Röntgen der Brust- und Lendenwirbelsäule, eine Knochendichtemessung mittels DXA-Methode und ferner eine Laboruntersuchung.

Im Zuge der Anamnese werden Risikofaktoren wie ein fortgeschrittenes Alter und das Erreichen der Wechseljahre sowie der Ernährungsstatus und das Körpergewicht, die Einnahme Osteoporose-begünstigender Medikamente (Glitazone, Aromatasehemmer, Protonenpumpenhemmer) und Grunderkrankungen (Morbus Cushing) erfasst.

In der Osteoporose-Diagnostik hat ein Werkzeug zur Abschätzung des 10-Jahres-Frakturrisikos einen besonderen Stellenwert eingenommen, welches auf den individuellen Risikofaktoren und den Frakturinzidenz-Daten der eigenen Bevölkerungsgruppe basiert [Dimai 2009]. FRAX® ist ein computergestützter Algorithmus, der durch die WHO eingeführt wurde, um die Therapieentscheidung eines Osteoporose Patienten nicht alleine auf Grund der BMD treffen zu müssen [Silverman et al. 2014].

Die Knochendichtemessung (Osteodensitometrie) wird mit Hilfe der Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DXA) vorgenommen, die zur klaren Abgrenzung unterschiedlicher Gewebeformen geeignet ist und als Goldstandard gilt [Blake und Fogelman 2009].

Die Röntgenuntersuchung gibt Aufschluss über eine Wirbelkörperfraktur, welche mit einer Abnahme der Vorder-, Mittel-, oder Hinterkante eines Wirbels von mindestens 20% einhergeht. Da bei 50% der Wirbelkörperfrakturen eine BMD vorliegt, die definitionsgemäß nicht einer Osteoporose entspricht, ist eine konventionelle Röntgenaufnahme unabdingbar [Dimai 2009].

Im Zuge der Laboruntersuchung sollen hauptsächlich sekundäre Ursachen der Osteoporose ausgeschlossen werden.

1.3.8 Therapie der Osteoporose

Therapiebedarf besteht, wenn eine Osteoporose-induzierte Fraktur, ein T-Score von -2,0 oder weniger oder mindestens ein Risikofaktor zusammen mit einem T-Score von -1,5 oder weniger vorliegt [Scharf 2011].

1.3.8.1 Basistherapie

Grundsätzlich wird die Reduktion bzw. Vermeidung von Risikofaktoren im Rahmen einer Osteoporosetherapie empfohlen. Dementsprechend werden Einflussfaktoren wie Nikotin, Alkohol und körperliche Inaktivität verringert und protektive Größen, wie eine suffiziente

Kalziumzufuhr mit der Nahrung (1000-1500 mg/Tag) und die Supplementierung von Vitamin D (800-1000 IE/Tag) unterstützt [DVO 2014].

Ein gutes Schmerzmanagement bei Osteoporose-Patienten ist von äußerster Wichtigkeit, da jegliche Bewegungseinschränkung eine zusätzliche Inaktivitätsosteoporose begünstigt [Nachtigall et al. 2013].

1.3.8.2 Spezifische Therapie

Die Therapieindikation für eine spezielle Pharmakotherapie der Osteoporose wird durch die DVO-Leitlinie 2014 folgendermaßen definiert:

Eine Therapie sei angezeigt in Folge einer „[...] inadäquaten singulären Wirbelkörperfraktur 2. oder 3. Grades nach Genant (25-40% bzw. >40% Höhenminderung) [...] oder multiplen Wirbelkörperfrakturen 1. bis 3. Grades [...]“ [DVO 2014, Seite 114]. Außerdem als Konsequenz peritrochantärer Hüftfrakturen und Frakturen des Femurhalses bei gleichzeitigem T-Score von -2,0 oder weniger.

Im Zuge einer prophylaktischen Therapie ohne vorangegangenes Frakturereignis, wird „[...] ein geschätztes 10-Jahresfrakturrisiko von durchschnittlich ca. 30% und mehr für Hüftfrakturen und vertebrale Frakturen [...]“ als Therapieindikation akzeptiert [DVO 2014, Seite 116].

Im Rahmen der Therapie postklimakterischer Patientinnen ist die fraktursenkende Wirkung dieser Medikamente am besten belegt: Alendronat, Bazedoxifen, Denosumab, Ibandronat, Östrogene, Teriparatid (rhPTH 1-34), Parathormon (PTH 1-84), Raloxifen, Risedronat, Strontiumranelat sowie Zoledronat [DVO 2014].

Daher werden diese Präparate im Folgenden kurz erläutert.

a) Osteoanabole Substanzen

Zu dieser Gruppe von Präparaten gehören Fluoride und Parathormon.

Fluoride unterstützen die Synthese der Knochenmatrix und die Aktivierungsfrequenz der BMUs [Dupuis et al 1994]. Die Belastbarkeit des entstandenen Knochengewebes ist allerdings mangelhaft und der Einsatz von Fluoriden umstritten [Meunier et al. 1998].

Parathormon wirkt durch Stimulierung der Osteoblasten anabol und verbessert sowohl die vertebrale, als auch die femorale BMD [Henriksen et al 2013].

b) Bisphosphonate (Alendronat, Risedronat, Zoledronat, Ibandronat)

Bisphosphonate stellen die am häufigsten verschriebene Substanzklasse in der Osteoporosetherapie dar [Eriksen et al. 2014]. Diese Präparate inhibieren die Knochenresorption durch Hemmung der Aktivierung von BMUs und Osteoklasten.

Bisphosphonate verbessern die BMD bei gleichzeitig reduziertem Risiko für vertebrale und nicht-vertebrale Frakturen [Eriksen et al. 2014]. Allerdings haben sich Bisphosphonate bei der Fraktur-Heilung als kontraproduktiv erwiesen [Savaridas et al. 2013].

c) Sexualhormonersatztherapie

Diese Therapieoption ist gut etabliert bei der Prophylaxe Osteoporose-induzierter Frakturen, ist aber wegen des erhöhten Risikos für Thrombembolien und die Ausbildung eines Mamma-Karzinoms auf das Patientenkollektiv perimenopausaler Frauen beschränkt [Scharf 2011; Gurney et al. 2014].

d) Selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM)

Zu dieser Stoffgruppe zählen Bazedoxifen und Raloxifen. Es handelt sich um Östrogenrezeptoragonisten am Knochen und im Lipidstoffwechsel, welche allerdings eine antagonistische Wirkung auf Brustgewebe und Gebärmutter haben. Damit wird die Erhöhung des IL-6 in Folge des Wegfalls von Östrogen nach der Menopause gestoppt und damit einhergehend auch der konsekutive Knochenschwund [Keck 2003].

e) Kalzitinin

Kalzitinin wird, in rekombinanter Form, vor allem wegen des schnellen Ansprechens bei Knochenschmerzen nach Wirbelkörperfrakturen eingesetzt [Binkley et al. 2012]. Das Hormon wird aus den C-Zellen der Schilddrüse sekretiert und hemmt die Osteoklastenaktivität.

f) Strontiumranelat

Strontiumranelat hat eine sowohl knochenbildende, als auch resorptionshemmende Wirkung [Grifka und Kuster 2011]. Untersuchungen im Zuge der Studien SOTI und TROPOS haben eine Reduktion des Risikos für Hüft- und Wirbelkörperfrakturen bei postmenopausalen Frauen bestätigt und eine langfristige Strontiumranelat-Therapie der chronischen Osteoporose als effektiv erwiesen [Cianferotti et al. 2013; Reginster et al. 2012].

g) RANKL-Antikörper

Denosumab ist ein humaner monoklonaler IgG₂-Antikörper, der den RANK-Liganden hemmt [Grifka und Kuster 2011]. Durch die antiresorptiv wirkende Osteoklasten-Hemmung kommt es zur Erhöhung der BMD, Verbesserung der kortikalen und trabekulären Knochenstärke und einer signifikanten Reduktion des Frakturrisikos [Josse et al. 2013; Scotland et al. 2011].

1.3.8.3. Baicalein

Die Therapie postmenopausaler Osteoporose-Patientinnen mittels Lipoxygenase-Inhibitoren repräsentiert einen neuen Ansatz in der Osteoporose Behandlung. Lipoxygenasen sind Bestandteil des Eikosanoidstoffwechsels und katalysieren die Umsetzung von Arachidonsäure in Leukotriene. Diese Mediatoren wirken bronchokonstriktorisch und chemotaktisch auf Leukozyten.

Die Lipoxygenasen 5, 12 und 15 werden im Zuge einer Entzündungsreaktion vermehrt exprimiert und forcieren in der Folge die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α [Wen et al. 2007]. Die Konsequenz besteht in einer Abnahme der Knochendichte (vgl. 1.3.4) [Krönke et al. 2009]. Im Verlauf kommt es zu einer gesteigerten adipozytären Differenzierung der mesenchymalen Osteoblasten-Vorläuferzellen und weiterhin zu einer Induktion der Osteoklasten. Dies resultiert in einer deutlichen Reduktion der Knochenmasse [Manolagas und Jilka 1995; Krönke et al. 2009]. Bei postmenopausalen Frauen kommt es nach Abnahme des Östrogenspiegels zur Erhöhung der Zytokinexpression und folglich zu einer Verminderung der BMD [Zhao 2012]. Es wurde gezeigt, dass eine signifikante Korrelation zwischen verschiedenen Polymorphismen der 12/15-Lipoxygenase-Allele und sowohl postklimakterischer Osteopenie als auch dem Frakturrisiko und Adipositas besteht [Harsløf et al. 2011; Xiao et al. 2012]. Auf Grund des gesicherten Zusammenhangs zwischen den 5-Lipoxygenasen und einer verschlechterten Frakturheilung, vermittelt durch RANKL induzierte Osteoklasten-Formierung, ist ein osteoanaboler Einfluss von Lipoxygenase-Inhibitoren auf die BMD anzunehmen [Lee et al. 2012].

Baicalein gehört zu einer Gruppe von Phytochemikalien und ist ein Flavonoid des Baikalhalmkrautes (*Scutellaria baicalensis*). Für diesen selektiven 12/15-Lipoxygenase-Inhibitor wurde eine anti-inflammatorische sowie eine anti-kanzerogene Wirkung nachgewiesen [Chen et al. 2013]. Weiterhin weist das Flavonoid antioxidative und neuroprotektive Eigenschaften auf [Ghandi 2013]. Mit Hilfe des Wnt/beta-Catenin-Signalweges wird außerdem die In-Vitro Differenzierung von Osteoblasten induziert [Kim et al. 2012].

Der Effekt selektiver Lipoxygenase-Inhibitoren auf eine manifeste Osteoporose ist hingegen nicht ausreichend geklärt.

1.4 Fraktur und Frakturheilung

Da die Frakturheilung unter der Therapie mit dem Lipoxygenase-Inhibitor Baicalein im Mittelpunkt dieser Dissertation steht, werden die Grundlagen der Frakturlehre mit Fokussierung auf die osteoporotische Fraktur im Folgenden erörtert.

Eine Fraktur ist definiert als eine vollständige Unterbrechung der Kontinuität eines Knochens auf Grund einer Belastung, welche die spezifische Elastizitätsgrenze übersteigt. Demgegenüber handelt es sich bei einer Fissur lediglich um eine unvollständige Kontinuitätsunterbrechung [Niethard et al. 2009].

1.4.1 Frakturmechanismen

Vier verschiedene Mechanismen der Frakturentstehung können voneinander abgegrenzt werden.

Direkte Frakturen entstehen als Folge einer äußeren Gewalteinwirkung auf den Knochen, welcher exakt am Ort der Krafteinwirkung frakturiert.

Indirekte Frakturen sind Konsequenz interner Hebelkräfte durch Drehung, Biegung, Stauchung bzw. Abriss, so dass die Fraktur entfernt vom Bereich der primären Gewalteinwirkung auftritt.

Ermüdungs- bzw. Stressfrakturen entstehen nach persistenter mechanischer Überlastung des Knochens zum Beispiel als Folge von sportlicher Überbeanspruchung.

Pathologische Frakturen resultieren aus der krankhaften Veränderung des Knochens nach meist inadäquater äußerer Gewalteinwirkung. Diese pathologischen Veränderungen können durch lokale Knochentumoren oder –metastasen bedingt sein oder Ergebnis einer generalisierten Skelettsystemerkrankung sein. Zu letzterer gehört auch die Osteoporose.

1.4.2 Die osteoporotische Fraktur

Die Osteoporose-induzierte Fraktur hat multiple Ursachen, die nicht auf die solitäre Verminderung der Knochendichte zu reduzieren sind. Über die BMD hinaus sind auch die Kontaktpunkte der Spongiosatrabekel deutlich reduziert. Weiterhin steht das Verhältnis von kompaktem und spongiösem Knochen im Ungleichgewicht. Außerdem kommt es durch die resorptive Tätigkeit der Osteoklasten zur Perforation der Trabekel und damit zu Mikrofrakturen, die der osteoporotischen Fraktur vorausgehen. Ferner bedingt ein insuffizienter Aufbau der Knochensubstanz durch sowohl mangelhafte Mineralisation der Knochenmatrix als auch unzureichende Reparaturmechanismen und fehlerhafte Kollagenproduktion ein qualitativ schlechtes Knochengewebe, was letztlich in der osteoporotischen Fraktur mündet [Bartl 2011]. Die häufigsten von Osteoporose-induzierten

Frakturen betroffenen Knochen sind die Wirbelkörper, das proximale Femur, der distale Radius sowie der Humerus (vgl. 1.3.6).

1.4.3 Formen der Frakturheilung

Generell unterscheidet man zwischen einer osteonalen und nichtosteonalen Frakturheilung. Letztere ist durch eine überschießende Kallusbildung gekennzeichnet, während eine primäre Kortikalisheilung ausbleibt. Typisch ist ein langsamer Knochenumbau bei meist großem Frakturspalt. Dem steht die osteonale Frakturheilung gegenüber, die primär oder sekundär verlaufen kann.

1.4.3.1 Direkte/primäre Frakturheilung

Im Zuge dieser Frakturheilung migrieren Osteone durch den Frakturspalt direkt in das andere Fragmentende und lassen so eine Frakturheilung ohne Kallusbildung und Knochenumbau zu. Diese Kontaktheilung wird durch eine operative Osteosynthese angestrebt und benötigt eine Adaptation der Frakturenden von weniger als 1mm [Lüllmann-Rauch 2012]. Außerdem ist eine vollständige Ruhigstellung der Fragmentenden und eine genaue Reposition der Bruchfragmente vonnöten. Der Prozess streckt sich über 1-1,5 Jahre hin und resultiert in einer der wiederhergestellten Belastbarkeit des Knochens.

1.4.3.2 Indirekte/sekundäre Frakturheilung

Zu einer sekundären Frakturheilung kommt es bei Vorliegen eines breiteren Frakturspalts. Sie erfolgt in mehreren Phasen und ist durch die Ausbildung eines zunächst bindegewebigen Kallus charakterisiert, worauf eine osteonale Frakturheilung folgt.

1.4.4 Frakturheilung und Osteoporose

Die Heilung und Behandlung einer Osteoporose-induzierten Fraktur geht mit wesentlich größeren Herausforderungen einher, als die Wiederherstellung der Integrität eines grundsätzlich gesunden Knochens. Neben der verminderten Knochenqualität erschweren auch die Minderperfusion des Knochens und seines Weichteilmantels sowie die Fragilität der Knochenfragmente die Frakturversorgung [Bartl 2011]. Weiterhin können insuffiziente biomechanische Bedingungen der osteoporotischen Knochensubstanz ebenso wie systemische Entzündungen die Frakturheilung beeinträchtigen [Claes et al. 2012]. Es wurde gezeigt, dass die erste Phase der Knochenheilung bei Osteoporose zwar größtenteils mit dem Beginn des Heilungsprozesses im normalen Knochen übereinstimmt, der entstandene Kallus allerdings schlechter mineralisiert ist und mangelhafte biomechanische Eigenschaften aufweist [Augat et al. 2005]. Die BMD im Bereich des Kallus fällt bei ovariectomierten Ratten um 23% geringer

aus, als in der Kontrollgruppe [Namkung-Matthai et al. 2001]. Im experimentellen Versuch an ovariectomierten Schafen wurde nach der Osteotomie der Tibia eine Abnahme der Biegesteifigkeit am Kallus von 20% nachgewiesen [Lill et al. 2003]. Weiterhin scheinen auch Alterationen in Bezug auf Wachstumsfaktoren die Heilung des osteoporotischen Knochens zu obstruieren. In der Umgebung der Trabekel am Frakturort wurde eine reduzierte Expression des Faktors TGF- β (vgl. 1.2.1.2) verglichen mit dem gesunden Knochen festgestellt [Xu et al. 2004]. Die Unterschiede in der Frakturheilung können durch die signifikant veränderten Marker des Knochenumsatzes erklärt werden. Es fällt auf, dass sowohl osteokatabole Marker wie die 5-Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP-5b), die eine Rolle in der Osteoklasten-Migration spielt, als auch osteoanabole Marker, wie die knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP), bei Fraktur-Patienten mit niedriger BMD deutlich abweichen. Während der BAP-Spiegel bei Patienten mit geringerer Knochendichte konstant ansteigt, anstatt wie bei Knochen mit normaler Dichte stetig abzufallen, liegt der TRAP-5b-Wert signifikant unter dem der Patienten mit normaler BMD [Wöfl et al. 2014]. Aus dem offenbar verminderten resorptiven Prozess zu Beginn der Frakturheilung ist die erschwerte Wiederherstellung der Integrität osteoporotischer Knochen ableitbar

1.4.5 Frakturheilung im metaphysären Osteotomie-Modell

Die ovariectomierte Ratte ist ein weithin anerkanntes Osteopenie-Modell. Im Zuge dieser Arbeit wurde die Frakturheilung an der Metaphyse der Tibia überprüft, da sich bisherige Forschungen oft auf die diaphysäre Knochenheilung beschränkt haben [Stürmer et al. 2010a; 2010b]. Ein Großteil Osteoporose-induzierter Frakturen tritt allerdings im Bereich der Metaphysen der Röhrenknochen auf (vgl. 1.3.6). Darüber hinaus unterscheiden sich die osteoporotischen Veränderungen in Diaphyse und Metaphyse stark. Die Kortikalis im Bereich der Diaphyse wird zwar zunehmend dünner, doch eine Zunahme des Durchmessers erhält die Stabilität am Knochenschaft. Daher kann es dazu kommen, dass Messungen die Diaphyse betreffend verfälscht werden [Danielsen et al. 1993; Peng et al. 1994]. Im Zuge der vorgenommenen Osteotomie 7 mm unterhalb des Knies wurde ein Osteotomie-Spalt von etwa 0,5 mm erzeugt und die Frakturrenden mit einer Titan-Platte stabilisiert. Um die Effektivität des im Laufe des Versuches applizierten Baicaleins untersuchen zu können, wurde der Frakturspalt als definierter Bereich für diese Evaluation gewählt. Außerdem kann an der Metaphyse mit einer geringeren periostalen Kallusbildung gerechnet werden, als in der Region der Diaphyse. Dieses Modell eignet sich daher zur Beobachtung der Auswirkung von Pharmazeutika auf die osteoporotische Frakturheilung besonders gut [Stürmer et al. 2010a; 2010b].

2 Material und Methoden

Die Durchführung der folgenden Versuche ist durch die Bezirksregierung Braunschweig nach §8a des Tierschutzgesetzes genehmigt (AZ 33.9-42502-04-14/1530).

2.1 Versuchsablauf

Das im Folgenden beschriebene Projekt wurde durch Fördermittel der Elsbeth-Bonhoff-Stiftung, Berlin (Projektnummer: 114) unterstützt.

Der Versuchszeitraum betrug 12 Wochen ab dem Tag des ersten operativen Eingriffes bis zum letzten Tag der Obduktion. Das Versuchskollektiv bestand aus 60 weiblichen Ratten des Stammes Sprague-Dawley im Alter von 3 Monaten bei Ovariectomie und wurde gleichermaßen in 5 Gruppen aufgeteilt (siehe Tabelle 1). Während die Kontrollgruppe (Gruppe 1) vorerst unbehandelt blieb, wurden die Gruppen 2-5 einer Ovariectomie unterzogen. Der folgende Östrogenmangel sollte bei den ovariectomierten Tieren eine manifeste Osteoporose induzieren. Es ist wissenschaftlich bewiesen, dass das Modell der ovariectomierten Ratte vergleichbar ist mit dem Östrogenmangelzustand bei postmenopausalen Frauen [Kalu 1991]. Statistisch signifikante Veränderungen der Knochenmasse können in der Metaphyse der Tibia bereits nach 14 Tagen nachgewiesen werden, während sie bei lumbalen Wirbelkörpern erst nach 60 Tagen nachweisbar sind [Lelovas et al. 2008]. Nach 8 Wochen, während derer kein Baicalein appliziert wurde, wurden alle Versuchstiere einer Osteotomie im Bereich der Metaphyse der Tibia und folgend einer Platten-Ostesynthese unterzogen. Die gruppenspezifische Behandlung mit DMSO bzw. Baicalein begann ab dem Tag nach der Osteotomie. Die Größe des Versuchskollektivs wurde auf Grund von Unverträglichkeiten der Narkose bei den operativen Eingriffen und dem folgenden Versterben der betroffenen Ratten auf 50 Tiere reduziert. Die Kontrollgruppe wurde aufgeteilt in 2 Gruppen zu 5 Tiere, von der eine überhaupt keinen Wirkstoff erhielt und die andere das als Lösungsmittel verwendete DMSO. Es wirkt als Penetrationsverstärker für andere Arzneimittel und wurde wegen der optimierten Applizierbarkeit dem Wirkstoff Baicalein zugemischt. Da DMSO anti-inflammatorische Eigenschaften aufweist [Hollebeeck et al. 2011], sollte eine Verfälschung der Ergebnisse des Lipoxygenase-Inhibitors ausgeschlossen werden. Daher wurde die erwähnte Kontrollgruppe lediglich mit dem Lösungsmittel DMSO (s.c.) behandelt. Innerhalb des Kollektivs ovariectomierter Ratten blieben ebenfalls 5 Tiere unbehandelt, 5 weiteren wurde DMSO subkutan injiziert. Unter den restlichen Versuchstieren wurden 10 mit dem Wirkstoff Baicalein (gelöst in DMSO) in einer Konzentration von 1 mg/kg Körpergewicht, eine weitere Gruppe aus 10 Tieren mit Baicalein in der Konzentration 10 mg/kg Körpergewicht und die übrigen 10

Ratten mit 100 mg Baicalein pro kg Körpergewicht (s.c.) behandelt. Die jeweilige Applikation der Wirkstoffe erfolgte täglich.

Da das Voranschreiten der Umbauvorgänge während der Frakturheilung im Zuge der Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden sollte, wurden den Tieren nach dem Prinzip der polychromen Sequenzmarkierung zu spezifischen Zeitpunkten Fluorochrome subkutan gespritzt. Auf die bereits beschriebenen Maßnahmen folgte 4 Wochen nach Osteotomie die Obduktion der Versuchstiere (Abb. 1). Im weiteren Verlauf wurden die gründlich präparierten Tibiae biomechanischen und morphologischen Analysen unterzogen. In der folgenden Tabelle wurden die mit DMSO behandelten Tiere nicht von den unbehandelten abgegrenzt aufgelistet, da keine signifikanten Unterschiede feststellbar waren, dies gilt auch für die Präsentation im Ergebnisteil.

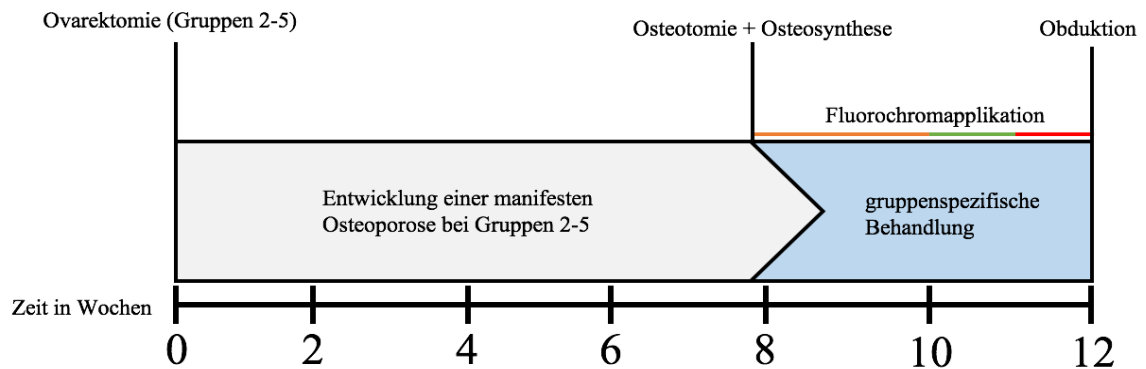


Abb. 1: Darstellung des Versuchsablaufes ab Zeitpunkt der Ovariectomie

Tabelle 1: Darstellung der Gruppen und der Behandlung der Ratten, Anzahl der Versuchstiere bezieht sich auf den Zeitpunkt nach Versuchsende

Gruppennummer	Gruppebezeichnung	Behandlung	Anzahl der Versuchstiere
1	NON OVX	a) Osteotomie	5
		b) Osteotomie + DMSO ab Osteotomie	5
2	OVX	1) Ovariectomie + Osteotomie	5
		2) Ovariectomie + Osteotomie + DMSO ab Osteotomie	5
3	OVX + 1 mg Baicalein/ kg Körpergewicht	Ovariectomie + Osteotomie + Baicaleininjektion (Konz. 1) ab Osteotomie	10
4	OVX + 10 mg Baicalein/ kg Körpergewicht	Ovariectomie + Osteotomie + Baicaleininjektion (Konz. 2) ab Osteotomie	10
5	OVX + 100 mg Baicalein/ kg Körpergewicht	Ovariectomie + Osteotomie + Baicaleininjektion (Konz. 3) ab Osteotomie	10

2.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Zur Durchführung der experimentellen Untersuchungen wurden 60 weibliche Ratten der Rasse Sprague-Dawley (Zuchtanstalt Fa. Winkelmann, Borken, Deutschland) im Alter von 3 Monaten in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung im Universitätsklinikum Göttingen gehalten. Das Körpergewicht bei Versuchsbeginn betrug im Mittel $275,4 \pm 15$ g. Gruppen von 3-5 Tieren wurden in Makrolon®- Käfigen vom Typ IV gehalten und professionell von Tierpflegern und Veterinärmedizinern versorgt. Das sojafreie Futter (ssniff SM R/M, 10 mm-Pellets; ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland) wurde nach Bedarf bereitgestellt und dessen Verbrauch zweimaleinmal pro Woche ermittelt, indem das Restfutter gewogen und auf 1500 g wieder aufgefüllt wurde. Wasser stand ebenfalls zur freien Verfügung. Darüber hinaus wurde alle drei Tage einmal pro Woche eine Reinigung der Käfige veranlasst. Die Raumtemperatur

lag bei 20 °C, während die relative Luftfeuchtigkeit 55% betrug. Die Beleuchtungszyklen alternierten im 12-Stunden-Takt angepasst an Tag- (beleuchtet) und Nachtverhältnisse (unbeleuchtet).

2.3 Ovariectomie

Die Ovariectomie wurde durchgeführt, um im Sinne einer Nachahmung des Hormonhaushaltes einer postklimakterischen Patientin eine Osteoporose zu erzeugen. Es ist gesichert, dass das Modell der ovariectomierten Ratte einen realistischen Ansatz zur Nachempfindung der postmenopausalen Stoffwechsellage bietet [Lelovas et al. 2008]. Zu diesem Zweck wurden die Ovarien von 50 Tieren operativ entfernt.

Während der OP-Vorbereitung wurden die Tiere mit CO₂ sediert und mit einem Ketamin-Medetomidinhydrochlorid-Gemisch im Verhältnis 3:1 intraperitoneal narkotisiert. Sowohl 60 mg Ketamin (Hostaket®, Firma Hoechst, Bad Soden, Deutschland) als auch 10 mg Medetomidinhydrochlorid (Domitor®, Firma Orion Pharma, Espoo, Finnland) pro kg Körpergewicht wurden verabreicht. Daraufhin wurde das entsprechende Gebiet zu beiden Seiten für den operativen Eingriff vorbereitet. Das folgende Vorgehen wurde kontralateral in gleicher Weise wiederholt. Paravertebral erfolgte eine Inzision in die zuvor rasierte und desinfizierte Haut. Nach tieferer Präparation bis zum Peritoneum erfolgte die Eröffnung der Bauchhöhle. Nach Darstellung des Ovars und anschließender Ligatur der Tuba uterina folgte die Ablösung des Ovars (Abb. 2 A). Mit Hilfe von 4.0 Vicrylfäden (Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) wurden sowohl die Adaptierung des Peritoneums als auch das Aneinandernähen der Muskeln vorgenommen, wohingegen der Hautverschluss mit Hilfe von Klammern erfolgte (Michel woundbrackets 7,5 x 1,75 mm, Gebrüder Martin GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland). Weiterhin versah man die Ratten mit einem Transponder im subkutanen Fettgewebe der Nackenfalte (Uno Micro-Id-System, Iso-Transponder (12 mm), UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Niederlande) mit dem Ziel der Qualitätssicherung und eindeutigen Identifikation eines jeden Versuchstieres. Nach subkutaner Injektion von 3 ml isotoner Kochsalzlösung wurden die Tiere postoperativ zur weiteren Beobachtung in beheizte Käfige gelegt.

2.4 Osteotomie und Osteosynthese

Die Osteotomie wurde nach Manifestierung der Osteoporose im Abstand von 8 Wochen zur vorangegangenen Ovariectomie durchgeführt [Stürmer et al. 2010a; 2010b]. Nach Einleitung der Narkose, die nach dem bereits in Kapitel 2.3 beschriebenen Procedere ausgeführt wurde, erfolgte die Vorbereitung des OP-Gebietes durch Rasur und Desinfektion der Hinterbeine. Auf der kontralateralen Seite wurde ebenso verfahren, wie folgend beschrieben. Im weiteren Verlauf setzte man einen etwa 3 cm messenden Hautschnitt auf der medio-ventralen Seite der Tibia. Die Muskulatur wurde durchtrennt und von der Margo anterior bis zur Tuberositas tibiae freipräpariert. Dabei wurde die Beugemuskulatur abgelöst, während das Periost geschont wurde. Der vorher festgelegte Ort der Osteotomie sollte sich 7 mm distal des Tibiaplateaus befinden. Dort wurde die Osteotomielinie unter Zuhilfenahme einer Schablone mit einem Skalpell markiert. Für die Osteosynthese kam eine 5-Loch-Leibinger-Platte aus Titan (57-05140 XS-Titan-Fixationsplatte T-Form 90°, Stryker Trauma, Selzach, Schweiz) zum Einsatz. Diese wurde so auf den Knochen gelegt, dass die proximalen Plattenlöcher auf Höhe der Epiphysen zu liegen kamen, und die Strecke von der Osteotomie-Linie sowohl zu den proximalen als auch zu den distalen Bohrlöchern die gleiche Entfernung hatte (Abb. 3). Um ein Verrutschen der Platte zu unterbinden, hat man zunächst vier Bohrungen unter Auslassung des Loches über der Osteotomielinie vorgenommen und ein proximales Plattenloch mit dem Bohrkanal verschraubt. Zur Durchführung der Osteotomie wurde die Leibinger-Platte vorübergehend aus dem Bereich der Osteotomielinie entfernt und die Tibia mittels gepulstem Ultraschall (OT 7 Piezosurgery®, Mectron Medical Technology, Carasco, Italien) durchtrennt. Währenddessen blieben die Weichteile unverletzt. Es folgte die vollständige Fixierung der Osteosynthese-Platte, indem proximal zwei 7 mm lange und distal eine 4 mm sowie eine 5 mm messende Schraube (Stryker Trauma, Selzach, Schweiz) angebracht wurden (Abb. 2 B). Auf Grund der vorab determinierten Bohrkanäle wird bei dieser Methode gezielt ein Osteotomiespalt von 0,5 mm erzeugt, welcher mit der standardmäßigen Dicke des eingesetzten OT 7 Piezosurgery®-Sägeblattes kongruent ist. Unter Einsatz von 4.0 Vicryl-Nahtmaterial (Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) wurde die Beugemuskulatur aneinandergenäht, während die Haut mittels Wundklammerung (Michel woundbrackets 7 x 1,75 mm, Gebrüder Martin GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) readaptiert wurde. Der Eingriff wurde mit einer Wunddesinfektion (Braunovidon®, Bayer, Leverkusen) und dem Transport der Ratten in vorgewärmte Käfige beendet. Bis zum Erwachen aus der Allgemeinanästhesie standen die Tiere unter Beobachtung.

Postoperativ wurde singular Decentan (s.c.) (5 mg/kg KG, Merck, Darmstadt, Deutschland) und 3 ml isotone Kochsalz-Lösung injiziert. Im Rahmen der Schmerzmedikation wurde am Tag der Osteotomie einmal und an den folgenden zwei postoperativen Tagen zweimal am Tag Rimadyl (4 mg/kg KG, Pfizer, Karlsruhe, Germany) subkutan appliziert.

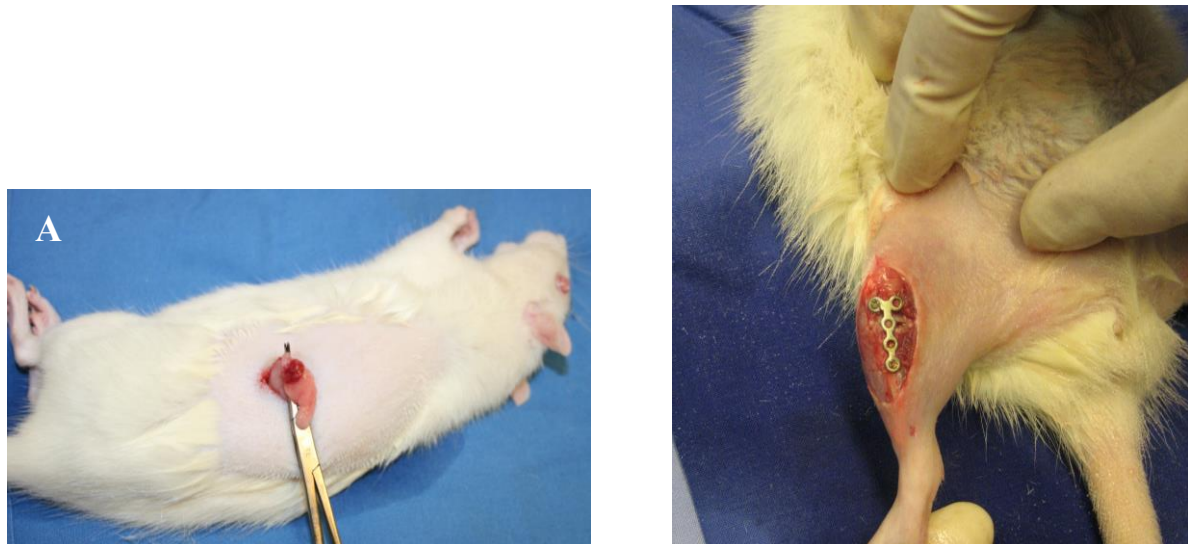


Abb. 2: Dokumentation der Ovariectomie und der Anbringung der Osteosyntheseplatte im Zuge der Osteotomie; A= Präpariertes Ovar wird abgeklemmt, B= Osteosyntheseplatte wird über der osteotomierten Tibia angebracht (Komrakova et al. 2010); zur Verfügung gestellt von Marc Zimmermann



Abb. 3: Darstellung der Lage der Osteosyntheseplatte auf der Tibia im 3D-Bild des Micro-CT

2.5 Obduktion und Präparation

12 Wochen nach Versuchsbeginn, beziehungsweise 4 Wochen nach der Osteotomie, wurde der Versuch im Zuge der Obduktion der Versuchstiere abgeschlossen. Vorerst wurde die Sedierung der Tiere mittels CO₂ herbeigeführt, im Anschluss erfolgte die Dekapitation. Im Verlauf der Obduktion wurde eine der randomisiert ausgewählten Tibiae zusammen mit der assoziierten Fibula sorgfältig herauspräpariert. Dazu wurde sie im Knie- sowie im Sprunggelenk exartikuliert und nach Entfernung der Osteosynthesematerialien oberflächlich von ihrem Wichteilmantel befreit. Bei einigen Tibiae blieb die Osteosynthese-Platte bewusst bestehen, um ihre Position im Zuge des später durchgeführten Mikro-CT Verfahrens überprüfen zu können. Eine umfangreiche Präparation der Knochen erfolgte erst nach Beendigung des Eingriffes. Zum Zwecke der Erhaltung der mechanischen Eigenschaften der Tibiae wurden sie bei -20 °C aufbewahrt. Unterdessen wurde die jeweils kontralaterale Tibia bei -80 °C gelagert, um den Kallus im Zuge der molekularbiologischen Untersuchungen einer Genanalyse unterziehen zu können. Ferner wurden Teile der Muskulatur sowie der Lendenwirbelsäule und die Femora der Ratten herauspräpariert und im Verlauf anderer Arbeiten ausgewertet.

2.6 Biomechanischer Test

2.6.1 Prinzip des biomechanischen Tests

Mit Hilfe dieser durch Komrakova et al. (2015) durchgeführten Methode sollen die mechanischen Parameter der Kallushärtung und Knochenstabilität gemessen werden. Entscheidend sind dabei die Elastizität und Widerstandsfähigkeit des neu entstandenen Gewebes. Im Zuge dessen wird die Tibia 1 mm unterhalb der Osteotomielinie mit einer orthogonal zur Längsachse verlaufenden Kraft belastet. Diese Aufgabe übernimmt eine Werkstoffprüfmaschine (Typ 145660 Z020/TND Zwick/Roell, Ulm, Deutschland), welche mit Hilfe der entsprechenden Software "testXpert®" (Zwick/Roell, Ulm, Deutschland) ein Kraft-/Weg-Diagramm für den jeweiligen Knochen aufzeichnet. Die Fibula wurde für diesen Versuch entfernt.

2.6.2 Validierung

Der Durchführung des eigentlichen Versuches vorangestellt wurde eine Überprüfung der fachgerechten Bedienung der Werkstoffprüfmaschine sowie der gewissenhaften Auswertung der Messparameter. Dies sollte die Validität des Tests sichern. Im Rahmen der Validierung erfolgte eine Einweisung in die Untersuchungsmethode anhand von 20 Knochen aus 10 ähnlich gewichtigen Ratten. Die Durchführung des Versuches erfolgte wie nachfolgend beschrieben, allerdings mit beiden Tibiae eines Versuchstieres. Unter den einzelnen Ratten sowie unter den

Knochen eines Tieres durfte keine Deviation der Messwerte von mehr als 10% bestehen. Dies wurde von einer qualifizierten Fachkraft der Arbeitsgruppe überprüft. Sobald diese Voraussetzung erfüllt war, wurde der Test mit den tatsächlich zu untersuchenden Knochen durchgeführt.

2.6.3 Versuchsdurchführung

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach der Methodik von Komrakova et al. (2015).

Diese Methodik basiert auf der Befestigung der Tibia in einer speziellen Metallhalterung, welche ein Verrutschen verhindern und die Reproduzierbarkeit der Knochenposition gewährleisten soll. Der Knochen sollte sowohl am Ort der ehemaligen distalen Synostose zwischen Fibula und Tibia als auch auf den Kondylen auf dem Träger aufliegen. Die Kraftausübung erfolgte durch einen metallenen Stempel, an dessen Ende sich ein zylindrisches Metallstück befand, welches langsam über der Osteotomielinie positioniert wurde (Abb. 4). Im Anschluss an diese Vorbereitungen wurde der Stempel der Werkstoffprüfmaschine mit 50 mm/Minute heruntergefahren. Es folgte der Start der Krafteinwirkung, die stetig zunahm, indem der Stempel konstant auf die Frakturstelle an der Tibia drückte. Die Kraft wurde von der Software in Newton registriert und jeweils nach einer Strecke von 0,1 mm im Kraft-/Weg-Diagramm dargestellt. Mit einer Aberration der Kurvenlinearität von über 2 mm oder einem Absinken der Kraft um mehr als 2 N erfolgte die sofortige Beendigung des Versuchs. In gleicher Weise wurde mit allen Tibiae verfahren.

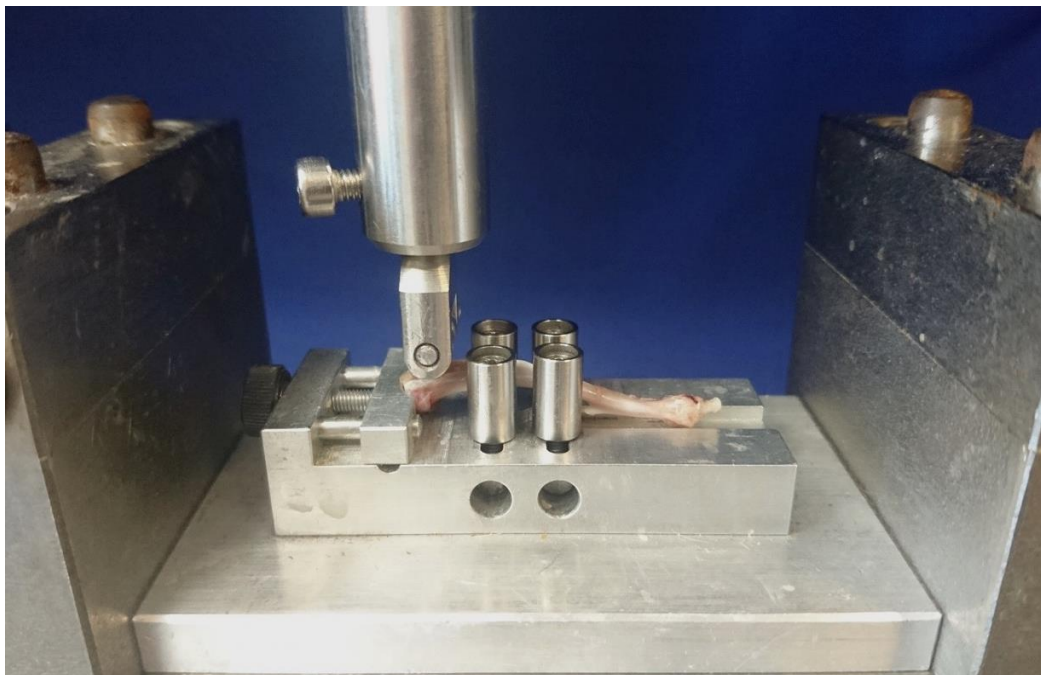


Abb. 4: Positionierung der Tibia auf der Trägerplatte in der Werkstoffprüfmaschine

2.6.4 Auswertung der Kraft-Weg-Diagramme

Das während des biomechanischen Tests entstandene Diagramm ist in drei charakteristische Phasen differenzierbar, die bereits von Stürmer et al. im Jahr 2006 dargestellt wurden. Im Anfangsteil folgt die Kurve einem linearen Verlauf, was der elastischen, reversiblen Deformierung des Knochens entspricht. Während der zweiten Phase verringert sich die Steigung, bis F_{\max} und damit der höchste Punkt des Graphen erreicht ist. Sobald diese Phase der plastischen Deformation endet, treten Mikrofrakturierungen im trabekulären Knochenanteil auf, sodass die Kurvenlinearität nicht mehr gegeben ist [Komrakova et al. 2014]. Der Bereich vor dem Maximum der Krafteinwirkung, in welchem die Mikrofrakturen auftreten, wird als *yield load* bezeichnet. Während der finalen Phase kommt es zu multiplen Frakturen, bis auch der kortikale Knochenanteil nachgibt [Komrakova et al. 2015; Stürmer et al. 2014]. In diesem Bereich fällt die Kurve, bis die Maschine den Test selbständig beendet, da eine vollständige Fraktur unerwünscht war.

2.6.5 Messparameter

2.6.5.1 Elastizität

Dieser Parameter ist während der Phase der elastischen Deformation im linearen Kurventeil messbar, indem der Quotient aus der Differenz zweier Werte auf der Kraftachse ($F_2 - F_1$) und der Differenz assoziierter Werte auf der Wegachse ($s_2 - s_1$) berechnet wird. Dieser Steigungswert wird in N/mm angegeben.

2.6.5.2 Streckgrenze (Yield Load)

Dieser Messwert markiert die Grenze zwischen reversibler und irreversibler Verformung des Knochens. Dementsprechend befindet sich an dieser Stelle gleichsam der Übergang von elastischer zu plastischer Deformation. Die *yield load* steht am Ende des linearen Kurventeils und repräsentiert den maximalen Dehnungswert der Kollagenfasern. Kommt es zu einem Steigungsabfall um mehr als zwei Standardabweichungen, stellt der erreichte Wert die Streckgrenze dar, welche die Einheit N trägt. Die Standardabweichung wird anhand der Regressionsgeraden des linearen Kurvenabschnittes definiert [Stürmer et al. 2006].

2.6.5.3 Maximalkraft (F_{\max})

F_{\max} ist am höchsten Punkt des Graphen erreicht und wird in N gemessen. Sie ist das Äquivalent der größten Belastung, bei welcher der Knochen bestehen kann, ohne eine Fraktur zu erleiden. Auf den Punkt der Maximalkraft folgt der Abfall der Kurve [Stürmer et al. 2006].

2.7 Mikro-Computertomographie

Im Zuge der computertomographischen Untersuchung wurde ein Low Dose In-Vivo-Mikro-CT des Herstellers Rigaku Micro CT Technology verwendet. Das verwendete Modell *Quantum FX* wird durch PerkinElmer Health Sciences Inc. vertrieben und benötigt nur geringe Strahlendosen von durchschnittlich 15 mGy pro Scan. Das Gerät arbeitet mit einem Bildverstärkersystem, welches auf der Verwendung einer Bildkette mit entsprechender Optik, Kamera und Monitor basiert. Dabei wird Röntgenstrahlung mittels einer Szintillatorschicht in sichtbares Licht umgewandelt und nach einer Verstärkung durch Elektronenoptik auf einem Monitor in Echtzeit mit Hilfe einer Digitalkamera abgebildet.

Die Untersuchung wurde mit jedem der Knochen anhand definierter Scanparameter (Tab. 2) durchgeführt und anschließend mit der dafür entwickelten Software 3D Osteoanalyse v 1.000.4 ausgewertet.

Tabelle 2: Scanparameter des Scanprotokolls

Scanparameter	Wert + Einheit
Röhrenspannung	70 kVp
Röhrenstrom	200 μ A
Anzahl der Projektionen (360° Scan)	3600
Scanzeit	2 Minuten
Scanmode	Vollrotation 360°
FOV (Field of View)	20 x 20 mm ²
Effektive „Voxel“- Größe	40 x 40 x 40 μ m ³
Detektor Frame Rate	30 Hz
Bildmatrix	512 x 512
Datenrepräsentation	16 bit

2.7.1 Durchführung des Scans

Die Durchführung erfolgte in mehreren Arbeitsschritten.

Arbeitsschritt 1: Vorbereitung der Probe auf den Scan

Die Tibiae wurden mit Hilfe einer angepassten Schaumstoffvorrichtung auf einem Plastikeinsatz fixiert. Dies sollte ein Verrutschen und eine exakte, reproduzierbare Positionierung ermöglichen. Der Knochen wurde, wenn möglich, auf die Kondylen und die

distale tibiofibuläre Synostose aufgelegt. Vor die proximale Seite der Tibia wurde ein Kalibrierungsphantom platziert, welches 5 Hydroxylapatit-Einschlüsse verschiedener Dichte enthält. Anhand dieser normierten Dichte-Werte sollte die Übertragbarkeit der Grauwerte des angefertigten Scans in Bone Mineral Density (g/cm^3) ermöglicht werden. Abschließend wurde der Plastikeinsatz so ausgerichtet, dass sowohl das Phantom als auch die metaphysale Tibia optimal dargestellt werden konnten. Dies wurde am Bildschirm überprüft.

Arbeitsschritt 2: Scannen

Während der Messung wird die Probe anders als im konventionellen Computertomographen nicht vorwärtsbewegt. Mit Hilfe der Längsausdrehung des Detektors kann die dritte Dimension dargestellt werden, sodass letztlich das gesamte Volumen in transversaler, sagittaler und frontaler Ebene aus Schnittbildern rekonstruiert werden kann. Während eines einzelnen Scans wurden 3600 Aufnahmen getätigt.

Arbeitsschritt 3: Rekonstruktion

Für die 3D Rekonstruktion wurde ein klassischer „filtered back projection“ (FBP)-Algorithmus eingesetzt, welcher in die zugehörige Software des Systems integriert ist.

Nach Erfassung der Grauwerte des Phantoms konnten die Tibiae im zwei- und dreidimensionalen Bild rekonstruiert werden.

2.7.2 Auswertung

Unter Verwendung der Software 3D Osteoanalyse v 1.000.4 konnten die Volumina der Bereiche Weichteil, Kallus, Kortikalis und des gesamten Knochengewebes erfasst werden. Darüber hinaus wurde die jeweilige Gewebedichte in BMD ermittelt. Außerdem war es möglich, die Positionierung einiger Osteosynthese-Platten im dreidimensionalen Bild darzustellen. Diese wurden zur Determinierung der Knochendichte allerdings vor dem erneuten Scan entfernt, da die Metall-Platten Bildartefakte hervorrufen.

Arbeitsschritte der Auswertung

Arbeitsschritt 1: Anpassung der Transparenz und des Kontrasts

Zuerst wurde der ausgewählte Knochen in zwei-, sowie in dreidimensionaler Ansicht abgebildet. Es folgte die Adjustierung der Bilddarstellung, um sicherzustellen, dass jeder Knochen mit dem gleichen Modus Operandi angezeigt und ausgewertet wird. Dazu wurde die so genannte *opacity function* (Abb. 7, Abb. 8) angewählt, um den optimalen Transparenzwert zu adaptieren. Dies sichert die homogene und vergleichbare Bilddarstellung der einzelnen

Tibiae und folglich eine standardisierte Auswertung. Unterdessen wurde die Kontrastierung der zweidimensionalen Aufnahmen wie in Abbildung 5 und 6 beschrieben justiert, bis eine bestmögliche Visualisierung der Weichteile erreicht war.

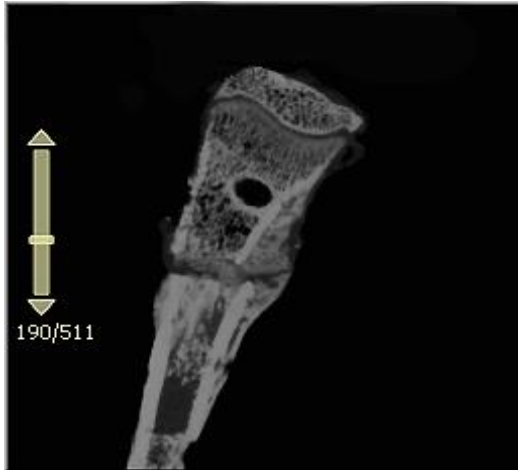


Abb. 5: optimal adaptierter Kontrast im 2D-Bild; Versuchsgruppe 1 mg Baicalein

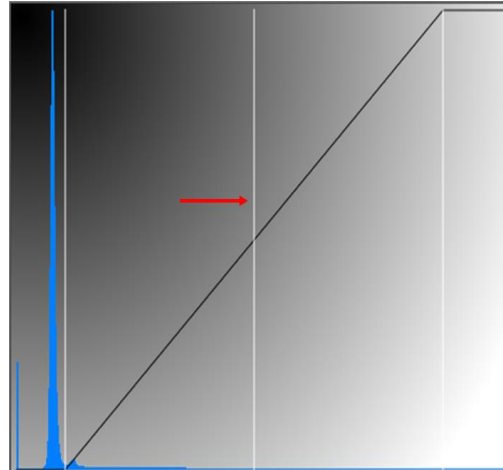


Abb. 6: entsprechendes Grauwert-histogramm mit optimal adaptiertem Kontrast: Pfeil markiert verschiebbare Linie; Versuchsgruppe 1 mg Baicalein

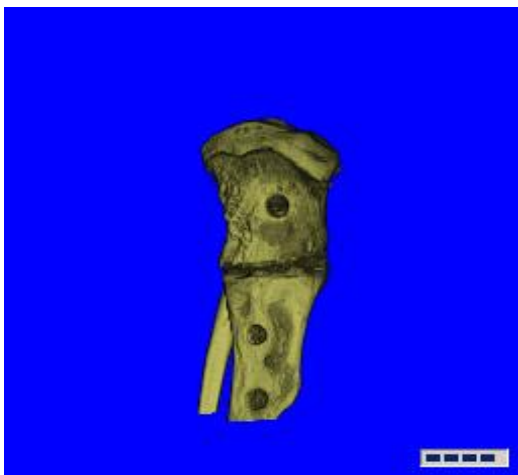


Abb. 7: optimal adaptierte Transparenz mittels Opacity Function im 3D-Bild; Versuchsgruppe 1 mg Baicalein

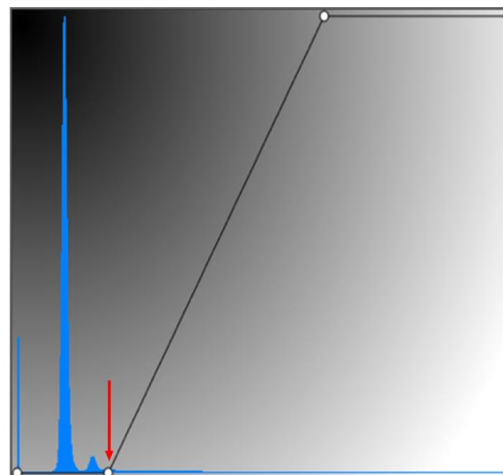


Abb. 8: entsprechendes Grauwert-histogramm mit optimal adaptierter Transparenz: Pfeil markiert verschiebbaren Punkt; Versuchsgruppe 1 mg Baicalein

Arbeitsschritt 2: Auswertung des Phantoms

Das Registrieren der Phantom-Dichte ermöglicht die Erfassung der BMD der Tibiae. Vor der eigentlichen Knochenanalyse wurden die 5 Dichte-Werte des Phantoms in Hounsfield-Einheiten umgerechnet. Zu diesem Zweck wurde die Funktion *cut outside* gewählt, um den Bereich außerhalb des Phantoms temporär zu entfernen. Nachfolgend konnten im Histogramm die Dichte-Werte der Phantom-Einschlüsse als 5 „Peaks“ angezeigt werden (Abb. 9 A). Anschließend erfolgte eine Kalibrierung, während derer die Hounsfield-Werte aus dem Histogramm abgelesen und in einer Tabelle eingetragen wurden. Mit Hilfe des sogenannten *Density Mapping* wurden die Grauwerte und analoge Hounsfield-Einheiten sowie die entsprechende BMD gespeichert (Abb. 9 B). Abschließend wurde das gesamte Bild wiederhergestellt und mit der Auswertung des Knochens begonnen.

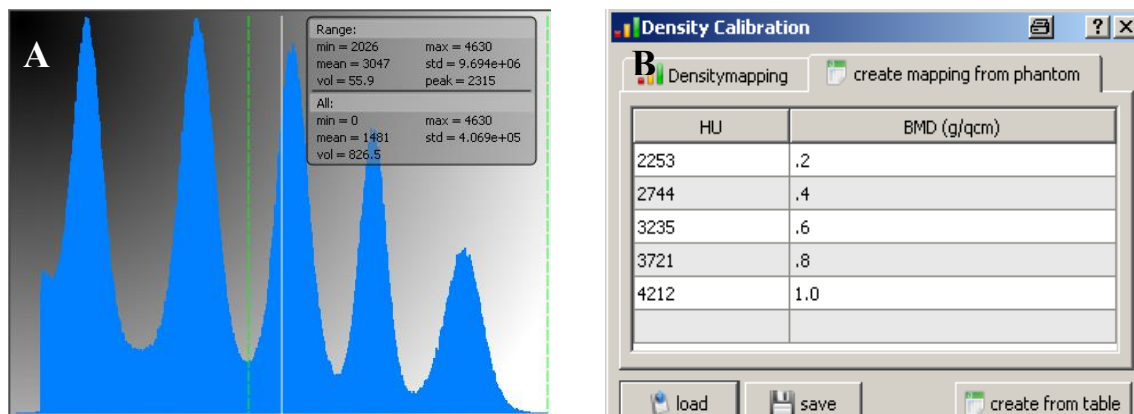


Abb. 9: Darstellung der Phantom-Dichtewerte im Grauerthistogramm und Density Mapping; A= Phantom-Dichte dargestellt als 5 Peaks im Histogramm, B= Tabellarische Darstellung der Hounsfield-Einheiten (HU) mit entsprechender Knochendichte (BMD)

Arbeitsschritt 3: Erstellung des Messrahmens

Da im Zuge dieser Arbeit nur die Volumen- und Knochendichtebestimmungen im Bereich des Frakturspaltes der Tibiae von Interesse waren, wurde ein Messrahmen um das relevante Gebiet erstellt. Vorab wurden die Cursor innerhalb der zweidimensionalen Aufnahmen so positioniert, dass die Achsen unmittelbar durch den Frakturspalt verliefen. Der jeweils 3 mm oberhalb und unterhalb der Mittellinie und 10 mm in der Länge messende Quader wurde an die Position der Cursor dirigiert, um proximal und distal der Osteotomielinie das gleiche Volumen in die Messung einzubeziehen. Abschließend wurden die restlichen Knochenteile entfernt (Abb. 10).

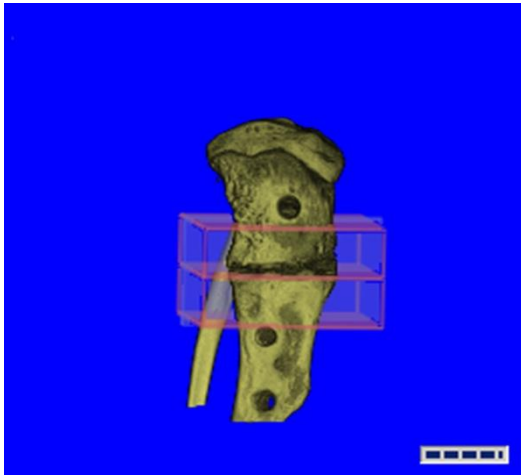


Abb. 10: Positionierung des Messrahmens über der Osteotomielinie; Versuchsgruppe 1 mg Baicalein

Arbeitsschritt 4: Erstellen eines Grauwertistogramms

Anders als die herkömmliche CT-Untersuchung zeigt der Mikro-CT Scan keine direkten Hounsfield-Werte an, sondern Grauwerte, welche keine unmittelbaren Rückschlüsse auf die Knochenqualität zulassen. Da Hounsfield-Einheiten allerdings ein standardisiertes Schema bieten, Röntgen-Schwächungswerte zu skalieren, ist es obligatorisch, die Grauwerte in Bezug zu den linearen Schwächungskoeffizienten der Phantom-Einschlüsse zu setzen. Das Grauwertistogramm wurde selbständig durch 3D-Osteoanalyse v 1.000.4 erstellt. Dieses Histogramm stellt die Häufigkeitsverteilung der Grauwerte eines Bildes und damit die Anzahl der Pixel, die den entsprechenden Grauwert tragen dar. Dabei werden die linearen Röntgenschwächungswerte und dementsprechend Helligkeitswerte auf der x-Achse gegen die Anzahl der Bildpunkte des zugehörigen Grauwertbereiches auf der y-Achse aufgetragen. Es ist eine lineare Beziehung erkennbar. Zu beachten ist, dass die Röntgenschwächungswerte nicht in direkten Bezug zur Massendichte eines Gewebes gesetzt werden können, da sie lediglich ein Maß für die relative Elektronendichte eines Materials darstellen. Doch durch die Bestimmung der Hounsfield-Einheiten für die bereits bekannte Dichte der Referenzmaterialien im Phantom (siehe 2.7.2, Arbeitsschritt 2) konnte auf Grundlage eines Vergleiches mit den GValues des Knochens eine Messung der BMD erfolgen. Das Grauwertistogramm stellte vier charakteristische Peaks für die jeweilige Dichte von Luft, Weichteil, Kallus und Kortikalis dar. Nach dem Ausschließen der Wertekurve für Luft konnte die Auswertung der restlichen Gewebeteile beginnen (Abb. 11).

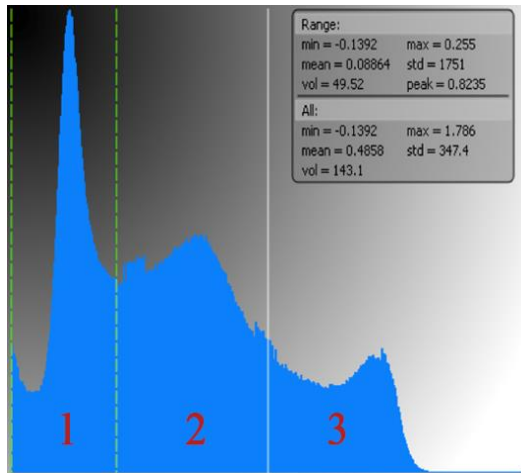


Abb. 11: Eingrenzung eines Grauwertbereiches am Beispiel des Weichteilbereiches;

1= Weichteil, 2= Kallus, 3= Kortikalis;

Versuchsgruppe 1 mg Baicalein

Arbeitsschritt 5: Auswertung der Knochenanteile

Die im Grauwert-Histogramm angezeigten Peaks konnten den einzelnen Knochenanteilen zugeordnet und entsprechend eingegrenzt werden (siehe 2.7.2. Arbeitsschritt 4). Mit der Determinierung eines bestimmten Bereiches war es möglich, die Volumen- und Knochendichtegrößen zu speichern, und darüber hinaus in eine Excel-Tabelle zu transferieren. Im Rahmen dieser Methode wurde die maximale Dichte des Weichteils in Knochendichtewerten zugleich als Minimalwert für die Abgrenzung des Kallus verwendet (Abb. 13). Analog entsprach das Maximum der BMD des Kallus der unteren Begrenzung des Kortikalisbereiches. Die Datenkurve ergab letztlich Werte der mittleren Knochendichte und des Volumens der Weichteil-, Kallus- und Kortikalisregion, sowie für den gesamten Knochen und das vollständige Gewebe. Während der manuellen Festlegung der Schwellenwerte wurden die individuell ausfallenden Peaks der Knochenanteile als Orientierungshilfe genutzt und der entsprechende Bereich im zweidimensionalen Bild als grüne Markierung visualisiert (Abb. 12). Somit erfolgte für jeden Knochen eine spezifische Überprüfung der Schwellenwerte einer jeweils einzugrenzenden Region.

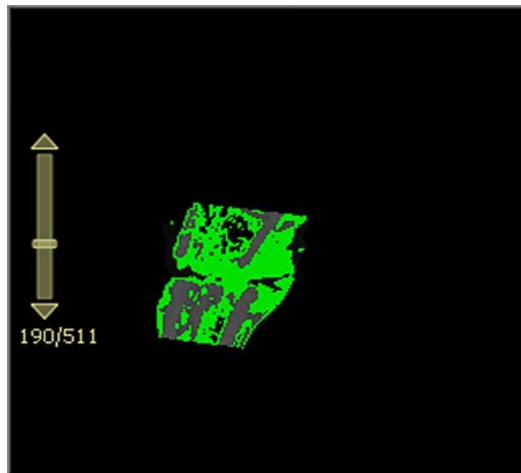


Abb. 12: Visualisierung des Kallusbereiches im 2D-Bild;
Versuchsgruppe 1 mg Baicalein

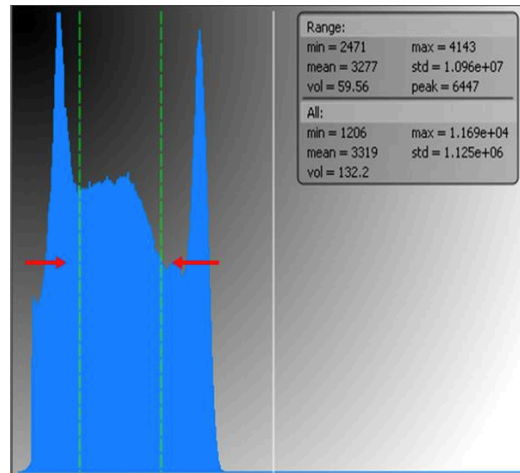


Abb. 13: Eingrenzung eines Grauwertbereiches am Beispiel des Kallusbereiches; linker Pfeil= minimaler Schwellenwert, rechter Pfeil= maximaler Schwellenwert; Versuchsgruppe 1 mg Baicalein

2.7.3 Messparameter

Tabelle 3: Darstellung der Messparameter der Auswertung mit Einheit und Bedeutung

Messparameter	Einheit	Bedeutung
Mittlere Kortikalisdichte	g/cm ³	Mittelwert der kalkulierten Dichtewerte im ermittelten Kortikalisisbereich
Kortikalisisvolumen	mm ³	Volumen im ermittelten Kortikalisisbereich
Mittlere Dichte gesamter Kallus	g/cm ³	Mittelwert der kalkulierten Dichtewerte ermittelten im Kallusbereich
Volumen gesamter Kallus	mm ³	Volumen im ermittelten Kallusbereich
Mittlere Dichte total	g/cm ³	Mittelwert der kalkulierten Dichtewerte für alle ermittelten Bereiche
Volumen total	mm ³	Volumen aller ermittelten Bereiche

2.8 Mikroradiographie

2.8.1 Anfertigung der histologischen Schnitte und der Mikroradiographien

Nach der computertomographischen Analyse der Tibiae erfolgte die histologische Aufarbeitung und Herstellung der Gewebeschnitte. Vorerst wurden die Tibiae mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und entfettet. Darauf folgte die Einbettung in reinem Methylmethacrylat für weitere 3 Tage. In einem Gemisch aus 29 g Benzoylperoxid, 200 ml Dibutylphthalat und 1000 ml Methylmethacrylat wurden die Tibiae in einzelnen Gefäßen über 3 Wochen ausgehärtet. An die Aushärtungsphase schloss sich die Herstellung der 150 µm dicken Gewebeschnitte an. Dabei diente die ehemalige Schraubenebene als Orientierungshilfe für die sagittalen Schnitte, welche aus der Mitte der Knochen gefertigt wurden. Die Bildgebung von je drei Schnitten pro Tibia wurde mit Hilfe eines Fraxitron Röntgengerätes (Modell-Nr. 43855A, Faxitron X-ray system, Hewlett-Packard, San Diego, USA) auf einem Kodak Professional Film festgehalten (INDUSTREX SR45 Film ISO 9002, Rochester, New York).

2.8.2 Auswertung der Mikroradiographien

2.8.2.1 Software und Geräte

Die morphometrische Beurteilung wurde nach der bereits durch Weidemann (2013) durchgeführten Methodik an einem Stereomakroskop (Leica MZ 7-5, Bensheim, Deutschland) vorgenommen. Unter Verwendung einer im Makroskop integrierten Kamera (Leica DFC 490; Bensheim; Deutschland) und der MetaMorph Basic Acquisition Software (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH; Wetzlar; Deutschland) wurden die Bilder in Verbindung mit einem Computer (Intel Pentium 4, 2.6 GHz) digitalisiert und anschließend mittels eines standardisierten Algorithmus ausgewertet. Die Vergrößerung des Bildes wurde durch ein 1,0er Objektiv am Stereomakroskop erzielt. Die Lichtquelle des Makroskops (Kaltlichtquelle Leica KL 1500 LCD, Bensheim, Deutschland) konnte durch eine mechanische Blendeneinstellung so modifiziert werden, dass ein mäßiger Lichteinfall ermöglicht wurde.

2.8.2.2 Arbeitsschritte der histomorphometrischen Auswertung

Arbeitsschritt I: Feststellung der Auswertbarkeit und Positionierung der Mikroradiographien

Es wurde zunächst eine Selektion der Schnitte vorgenommen, da einige Knochen durch suboptimale Heilung sowie die Beschädigung durch den vorangegangenen biomechanischen Test morphologisch deutlich von anderen Tibiae abwichen, was zu einer Verzerrung der Ergebnisse geführt hätte. Die vorrangigen Kriterien waren hierbei die Abgrenzung der Kortikalis vom Kallus und den Trabekeln sowie ein nicht zu breiter Bruchspalt.

Bei der Positionierung der drei Schnitte unter dem Makroskop sollten der proximale Teil oben, der distale Teil unten und die ventrale plattennahe Seite links, sowie die dorsale, Kallus reichere Tibiaseite rechts platziert werden (Abb. 12). Nach der korrekten Platzierung wurde eine Aufnahme des Bildes gemacht und am Bildschirm des Computers im Bearbeitungsprogramm der bereits erwähnten Software angezeigt. Die distale Osteotomielinie wurde dann auf eine angezeigte Linie verschoben, sodass der Bruchspalt im vorgesehenen Messrahmen von 4 mm (vertikal) mal 5 mm (horizontal) lag.

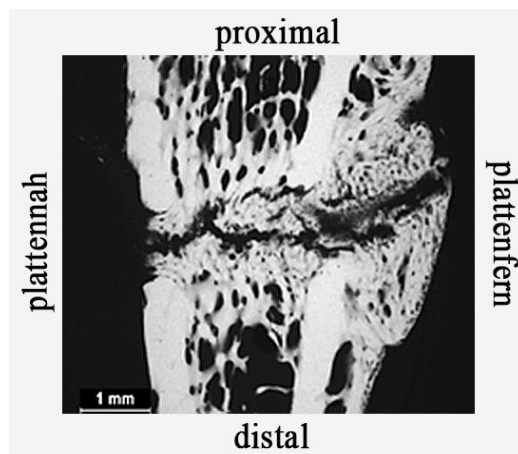


Abb. 14: Position des histologischen Schnittes unter dem Mikroradioskop;
Versuchsgruppe NON OVX

Arbeitsschritt II: Graudetektion

Im nächsten Schritt erfolgte eine computergesteuerte Detektion, sodass die sichtbaren Knochenanteile durch die Software erfasst werden konnten.

Arbeitsschritt III: Flächendefinition

Durch manuelles Umfahren der jeweiligen Flächen mit der Maus, konnten die entsprechenden Areale abgegrenzt werden. Die Flächen wurden in nachstehender Abfolge, der Methode von Weidemann (2013) entsprechend, definiert:

- 1) gesamter Knochen inklusive Kallus;
- 2) proximale, plattennahe Kortikalis;
- 3) proximale, plattenferne Kortikalis;
- 4) distale, plattennahe Kortikalis;
- 5) distale, plattenferne Kortikalis;
- 6) plattennaher Kallus;
- 7) plattenferner Kallus;
- 8) endostaler Kallus.

Arbeitsschritt IV: Definition der Kortikalis-, Knochen- und Kallusdicke

Dieser Arbeitsschritt beinhaltete die Festlegung von orthogonal zur Längsachse gelegenen Vektoren, welche etwas über die jeweilige Fläche hinausreichen sollten.

Die tatsächliche Kallus- bzw. Kortikalisdicke wurde dann durch die oben genannte Software berechnet. Die folgenden Parameter wurden auf diese Weise ermittelt:

- 1) distale, plattennahe Kortikalisdicke;
- 2) distale, plattenferne Kortikalisdicke;
- 3) proximale Knochendicke;
- 4) distale Knochendicke;
- 5) plattennahe Kallusdicke;
- 6) plattenferne Kallusdicke.

2.8.3 Messparameter**2.8.3.1 Gesamter Knochen****Tabelle 4: Messparameter gesamter Knochen, Einheit und Berechnung**

Messparameter	Einheit	Berechnung
Knochendicke proximal	mm	Arithmetisches Mittel der in Arbeitsschritt IV.3 vorgenommenen Vektormessungen
Knochendicke distal	mm	Arithmetisches Mittel der in Arbeitsschritt IV.4 vorgenommenen Vektormessungen

2.8.3.2 Kortikalis

Tabelle 5: Messparameter Kortikalis, Einheit und Berechnung

Messparameter	Einheit	Berechnung
Kortikalisdicke distal plattennah	mm	Arithmetisches Mittel der in Arbeitsschritt IV.1 vorgenommenen 5 Vektorenmessungen
Kortikalisdicke distal plattenfern	mm	Arithmetisches Mittel der in Arbeitsschritt IV.2 vorgenommenen 5 Vektorenmessungen
Kortikalisdicke distal plattennah	%	Prozentualer Anteil der in Schritt III.4 festgelegten Fläche an mineralisierter Knochenmatrix
Kortikalisdicke distal plattenfern	%	Prozentualer Anteil der in Schritt III.5 festgelegten Fläche an mineralisierter Knochenmatrix

2.8.3.3 Kallus

Tabelle 6: Messparameter Kallus, Einheit und Berechnung

Messparameter	Einheit	Berechnung
Kallusdicke plattennah	mm	Arithmetisches Mittel der in Arbeitsschritt IV.5 vorgenommenen Vektorenmessungen
Kallusdicke plattenfern	mm	Arithmetisches Mittel der in Arbeitsschritt IV.6 vorgenommenen Vektorenmessungen
Kallusdicke plattennah	%	Prozentualer Anteil der in Schritt III.6 festgelegten Fläche an mineralisierter Knochenmatrix
Kallusdicke plattenfern	%	Prozentualer Anteil der in Schritt III.7 festgelegten Fläche an mineralisierter Knochenmatrix
Kallusdicke endostal	%	Prozentualer Anteil der in Schritt III.8 festgelegten Fläche an mineralisierter Knochenmatrix

2.9 Prinzip der polychromen Sequenzmarkierung

Die polychrome Sequenzmarkierung ist ein Verfahren zur Markierung des neu gebildeten Knochengewebes, sodass eine Darstellung der dynamischen Veränderungen während der Frakturheilung erfolgt. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Momentaufnahmen der bildgebenden Verfahren kann diese Methode das zeitliche und räumliche Ausmaß der Kallusbildung protokollieren. Vorab wurden den Tieren intravital drei Fluorochrome mit verschiedener Farbe appliziert. Dies erfolgte zu bestimmten, zuvor festgelegten Zeitpunkten. Die Substanzen werden in den Knochen inkorporiert und bilden Komplexe mit den Mineralsalzen des biologisch aktiven Knochens aus. Die Chelatkomplexe aus Kalzium und dem jeweiligen Fluorochrom lagern sich entlang der Mineralisationsfronten ein. So entsteht in der folgenden quantitativen fluoreszenzmikroskopischen Darstellung eine farbliche Kodierung des Mineralisationszeitraumes durch die entsprechend fluoreszierende Bande. Auffällig ist dabei die verstärkte Markierung des Frakturkallus, der durch eine signifikant höhere Umbauaktivität gekennzeichnet ist.

2.9.1 Fluorochrome

Die polychrome Sequenzmarkierung wurde unter Verwendung der Fluorochrome Xylenolorange-Tetranatriumsalz (XO), Calcein-Grün (CG) und Alizarinkomplexon (AK) (alle: Merck, Darmstadt, Deutschland), wie durch B. Rahn 1976 etabliert, nach der Methodik von Komrakova et al. (2010) durchgeführt. Die subkutane Injektion erfolgte, nach Lösung der Fluorochrome in destilliertem Wasser (Tab. 7). Zu beachten ist, dass einerseits lediglich die bis zum Injektionszeitpunkt vorangeschrittene Knochenmineralisation und andererseits nur die bisher durch andere Fluorochrome ungefärbte Substanz markiert wird. Die farbliche Kodierung in der Blaufluoreszenz ist in Tabelle 7 unter dem spezifischen Fluorochrom aufgeführt.

Tabelle 7: Darstellung der Applikationszeitpunkte, Anfärbungszeiträume und Dosierungen der verschiedenen Fluorochrome

Fluorochrom und Farbe	Applikationszeitpunkt [Tag nach Osteotomie]	Markierungszeitraum [Tag nach Osteotomie]	Dosierung in mg/kg Körpergewicht	Dosierung in ml
XO; orange	15	0-15	90	0,5
CG; grün	20	16-20	10	0,3
AK; rot	28	21-28	30	0,5

2.9.2 Auswertung

2.9.2.1 Apparaturen und Software

Die histologischen Schnitte wurden nach dem bereits unter 2.8.1 beschriebenen Prinzip angefertigt und zur Auswertung auf Objektträgern (52 x 76 mm) mit Eukitt® (Fa. Kindler, Freiburg, Deutschland) eingedeckt.

Durch das Auflicht-Fluoreszenz-Stereomakroskop (Leica Stereomakroskop MZ 7-5 mit FluoCombi III, Bensheim, Deutschland) erfolgte die Beurteilung der histologischen Präparate in Blaufluoreszenz. Unter Einsatz eines Anregungsfilters für den Wellenlängenbereich von 450-490 nm, wurde die durch blaues Licht erzeugte Fluorochromanregung erreicht. Die Lichtquelle des Makroskops bestand aus einer Quecksilberhöchstdrucklampe mit einer Leistung von 100 Watt. Durch die integrierte Kamera (Leica DC 300F, Bensheim, Deutschland) und die bereits für die Mikroradiographie verwendete Software (MetaMorph Basic Acquisition Software; Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH; Wetzlar; Deutschland) wurden die Bilder auf den Computer übertragen.

Die Untersuchungseinstellungen wurden entsprechend der optimierten Konfigurationen vorangegangener Versuche gewählt. Mit Hilfe eines 1,6er Objektivs am Makroskop wurde eine 16-fache Vergrößerung erzielt. Durch die Software konnte die Belichtungszeit auf 111 Sekunden festgelegt werden. Zur Verbesserung der Lichtverhältnisse wurde der Raum zusätzlich abgedunkelt.

2.9.2.2 Arbeitsschritte

Arbeitsschritt I: Feststellung der Auswertbarkeit und Positionierung der Präparate

Analog zur unter 2.8.2.2 (S.39, Arbeitsschritt I) erläuterten Vorgehensweise bei den Mikroradiographien wurde auch bei der Evaluierung und Positionierung der fluoreszenzmikroskopischen Schnitte verfahren.

Arbeitsschritt II: Flächendefinition

Auch die im Folgenden aufgeführten Flächen wurden nach dem unter 2.8.2.2 (S. 40, Arbeitsschritt III) angewendeten Prinzip festgelegt:

- 1) gesamter Knochen inklusive Kallus;
- 2) proximale, plattennahe Kortikalis;
- 3) proximale, plattenferne Kortikalis;
- 4) distale, plattennahe Kortikalis;
- 5) distale, plattenferne Kortikalis;
- 6) plattennaher Kallus;
- 7) plattenferner Kallus;
- 8) endostaler Kallus.

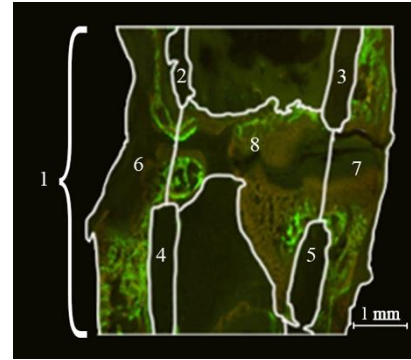


Abb. 15: Flächendefinition unter dem Fluoreszenzmikroskop; Versuchsgruppe 100 mg Baicalein

Die Abbildung 15 verdeutlicht die obenstehenden Flächenabgrenzungen am Beispiel eines fluoreszenzmikroskopischen Bildes.

Arbeitsschritt III: Zuordnung der Knochenflächen und Fluorochrome

Unter Beachtung lediglich dreier der bereits genannten Flächen konnten die in gleicher Weise fluoreszierenden Areale umfahren und dem jeweiligen Fluorochrom zugeordnet werden. Nur die plattennahen, plattenfernen und endostalen Kallusbereiche wurden hierbei berücksichtigt.

1) XO-Fläche:

Diese Knochenflächen stellten sich orange dar. Da die durch das zuerst applizierte Xylenolorange-Tetranatriumsalz markierten Bereiche so klein waren, dass sie nur unter hoher Auflösung zu sehen waren, stellte sich ihre Abgrenzung als problematisch heraus. Daher erfolgte ihre Auswertung gemeinsam mit den umliegenden CG-Flächen.

2) CG-Fläche:

In unmittelbarer Umgebung der Trabekel war eine grüne Knochenfläche entsprechend der Calcein-Grün-Einfärbung zu erkennen.

3) AK-Fläche:

Die rot eingefärbte Alizarinkomplexon-Fläche konnte als ein dem Osteotomiespalt am nächsten liegender Bereich identifiziert werden. Da die Applikation dieses Fluorochroms zu einem späteren Zeitpunkt stattgefunden hatte, wurde das markierte Areal durch das früher verabreichte CG von den Trabekeln abgegrenzt.

2.9.3 Zeitpunkt der frühesten Überbrückung des Frakturspalts

Im Rahmen der Frakturheilung wurde der zeitliche Verlauf der knöchernen Zusammenfügung der Osteotomieenden innerhalb der Versuchsgruppen untersucht und verglichen. Der früheste Zeitpunkt der Frakturüberbrückung konnte anhand von Markierungen der zu bestimmten Zeitpunkten applizierten Fluorochrome determiniert werden. Die Anreicherung der verschiedenen Farben sowie deren Lokalisation ermöglichte unter Betrachtung von 11 verschiedenen Schnitten eines Knochens die Beurteilung der zuerst entstandenen Kallusbrücke. Es fluoreszierte dabei immer der Gewebeteil in der entsprechenden Farbe, der sich bis zum Zeitpunkt der Applikation gebildet hatte. Die Fluorochrome reichert sich allerdings nur in bisher nicht markierten Bereichen an. Unter Beurteilung der Farbe der Kallusbrücke (eine rote Brücke entspricht der Frakturüberbrückung im Zeitraum der AK-Anreicherung (Tag 21-28)) und deren Dicke (eine größere Fluorochrom Ausdehnung ist konform mit einer früheren Überbrückung, während eine schmale Brücke für eine spätere Frakturheilung spricht), wurden die Überbrückungszeitpunkte und deren Mittelwerte erhoben.

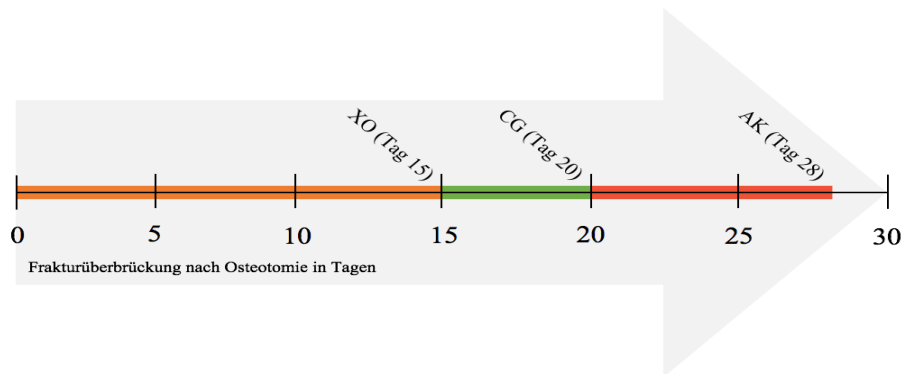


Abb. 16: Schematische Darstellung der Frakturüberbrückung durch die Fluorochrom-Markierung

2.9.4 Messparameter

2.9.4.1 Kallus plattennah

Tabelle 8: Messparameter Kallus plattennah, Einheit und Berechnung

Kallusfläche plattennah	Einheit	Bedeutung
Gesamtfläche plattennaher Kallus	mm ²	absolute Fläche des gesamten plattennahen Kallus
CG- Fläche	mm ²	absolute Fläche des CG-markierten plattennahen Kallus
AK- Fläche	mm ²	absolute Fläche des AK-markierten plattennahen Kallus

2.9.4.2 Kallus plattenfern

Tabelle 9: Messparameter Kallus plattenfern, Einheit und Berechnung

Kallusfläche plattenfern	Einheit	Bedeutung
Gesamtfläche plattenferner Kallus	mm ²	absolute Fläche des gesamten plattenfernen Kallus
CG- Fläche	mm ²	absolute Fläche des CG-markierten plattenfernen Kallus
AK- Fläche	mm ²	absolute Fläche des AK-markierten plattenfernen Kallus

2.9.4.3 Kallus endostal

Tabelle 10: Messparameter Kallus endostal, Einheit und Berechnung

Kallus endostal	Einheit	Bedeutung
Gesamtfläche endostaler Kallus	mm ²	absolute Fläche des gesamten endostalen Kallus
CG- Fläche	mm ²	absolute Fläche des CG-markierten endostalen Kallus
AK- Fläche	mm ²	absolute Fläche des AK-markierten endostalen Kallus

2.9.4.4 Kompletter Kallus

Tabelle 11: Messparameter Kallus komplett, Einheit und Berechnung

Kompletter Kallus	Einheit	Bedeutung
Gesamtfläche kompletter Kallus	mm ²	Summe aus der Gesamtfläche des plattennahen, plattenfernen und endostalen Kallus

2.10 Statistik

Für alle Versuchsgruppen und Methoden wurde die statistische Auswertung mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 5.0, GraphPad Software, San Diego, USA) vorgenommen. Unter Feststellung der Normalverteilung wurden im Rahmen der Ergebnisevaluation Mittelwert und Standardabweichung der jeweils erhobenen Daten ermittelt. Signifikante Unterschiede unter den Versuchstiergruppen konnten durch den gekoppelten Einsatz der Varianzanalyse one-way ANOVA und den Tukey-Kramer post-hoc-Test analysiert werden. Alle Ergebnisse $p < 0,05$ wurden als signifikant definiert.

3 Ergebnisse

Die nachstehend präsentierten Resultate der Ermittlung von Körpergewicht und Futteraufnahme der Versuchstiere, des biomechanischen Tests, der Mikro-Computertomographie, sowie der Mikroradiographie und der polychromen Sequenzmarkierung werden nach einem identischen Schema veranschaulicht. Die Ergebnisse werden zunächst mit Hilfe von Diagrammen graphisch visualisiert und nach schriftlicher Darlegung tabellarisch zusammengefasst. Dabei erfolgt eine Darstellung der jeweiligen Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung und Signifikanzen. Während das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt ist, werden bei der Ergebnispräsentation $p < 0,05$ als signifikant, $p < 0,01$ als hoch signifikant und $p < 0,001$ als höchst signifikant definiert. Die Signifikanzen werden mit Hilfe dieser Symbole gekennzeichnet:

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

*** = $p < 0,001$

α = signifikant zu allen anderen Gruppen

β = signifikant zu NON OVX

γ = signifikant zu OVX

δ = signifikant zu 1 mg Baicalein /kg Körpergewicht

ϵ = signifikant zu 10 mg Baicalein /kg Körpergewicht

λ = signifikant zu 100 mg Baicalein /kg Körpergewicht

3.1 Körpergewicht der Tiere im Verlauf

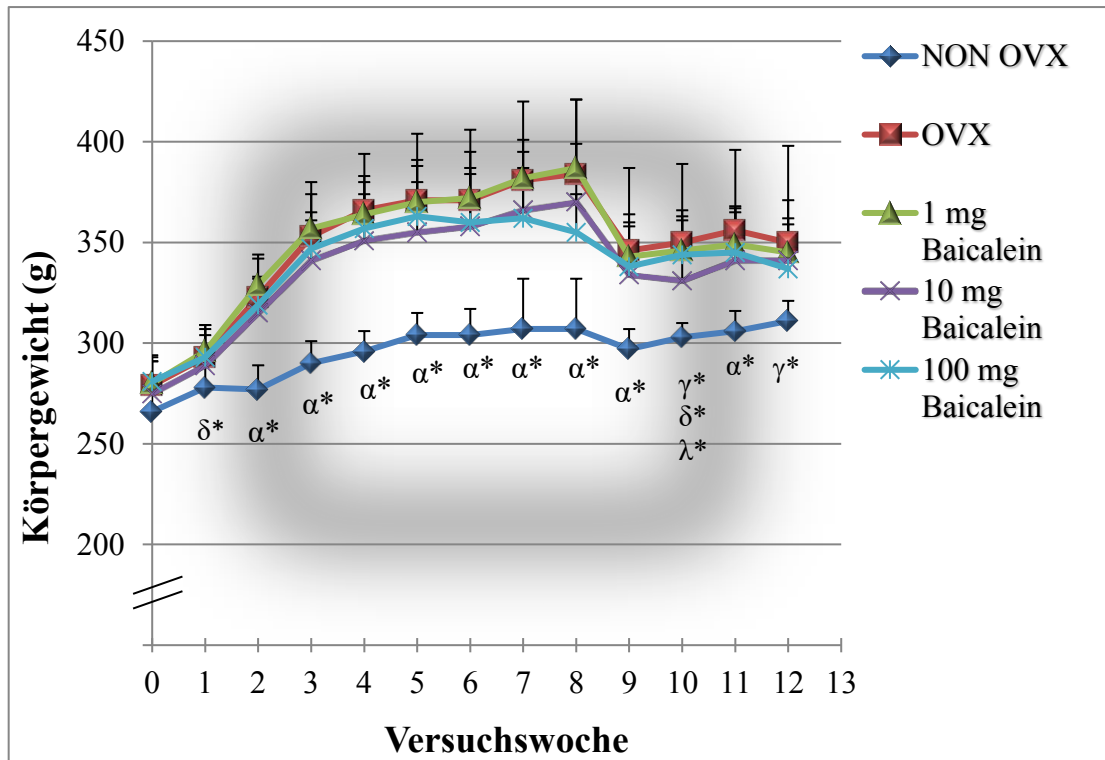


Abb. 17: Darstellung des mittleren Körpergewichts der Tiere jeder Gruppe pro Versuchswoche vom Beginn (Versuchswoche 0) bis zum Ende (Versuchswoche 12) des Versuchs; α = signifikant zu allen anderen Gruppen, γ = signifikant zu OVX, δ = signifikant zu 1 mg Baicalein, λ = signifikant zu 100 mg Baicalein, * = $p < 0,05$

(Analyse durch One-way ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc-Test)

Zunächst ist bei der Auswertung der Körpergewichte augenscheinlich, dass sich die Ausgangsgewichte in den Gruppen nur unwesentlich unterscheiden. Weiterhin ist auffällig, dass das gesamte Versuchskollektiv über den Versuchszeitraum eine kontinuierliche Gewichtszunahme aufweist (Abb. 17). Dabei ist zu beachten, dass das Körpergewicht der ovariectomierten Ratten signifikant schneller steigt, als das Gewicht nicht operierter Tiere. Diese Differenz blieb bis zum Versuchsende bestehen. Während alle ovariectomierten Gruppen auch in der Woche der Osteotomie (Woche 8) signifikant mehr wogen als die Gruppe NON OVX, nahm das Gewicht in der folgenden Woche bei den mit Baicalein behandelten Tieren ab. Die starke Gewichtszunahme blieb nur in der ovariectomierten, nicht mit Baicalein behandelten Versuchsgruppe bestehen. In der letzten Versuchswoche waren die Körpergewichte innerhalb des ovariectomierten

Kollektivs teilweise sogar rückläufig, so dass lediglich die ovariectomierten Tiere, bei denen kein Baicalein appliziert wurde, ein signifikant höheres Gewicht aufwiesen, als die nicht ovariectomierte Gruppe.

3.2 Uterusgewicht

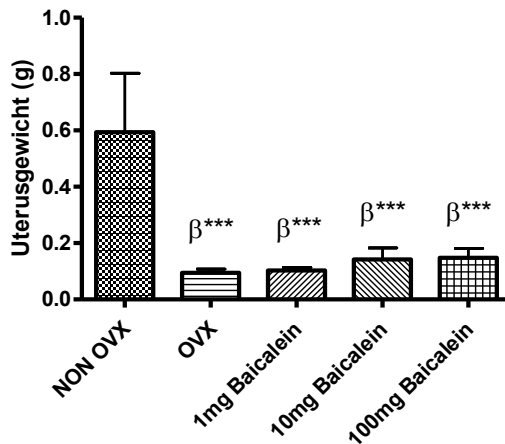


Abb. 18: Darstellung des mittleren Uterusgewichtes der Tiere jeder Versuchsgruppe am Tag der Obduktion; β=signifikant zu NON OVX, * = $p < 0,001$**

(Analyse durch One-way ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc Test)

Alle Tiere, die einer Ovariectomie unterzogen wurden, weisen mit höchster Signifikanz geringere Uterusgewichte auf, als die nicht ovariectomierten Ratten (Abb. 18).

3.3 Ergebnisse des biomechanischen Tests

3.3.1 Elastizität

Trotz einer deutlichen Tendenz der Knochen in der nicht ovariectomierten Kontrollgruppe zu höherer Elastizität war kein signifikanter Unterschied zu den anderen Versuchsgruppen nachweisbar (Abb. 19). Ebenfalls ohne Signifikanz zeigt sich eine gesteigerte Elastizität der Knochen der mit 100 mg Baicalein pro Kilogramm Körpergewicht behandelten Tiere gegenüber dem restlichen ovariectomierten Kollektiv.

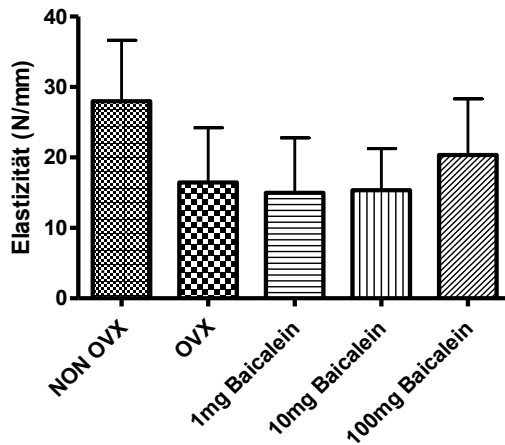


Abb. 19: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Elastizität

3.3.2 Streckgrenze und Maximalkraft

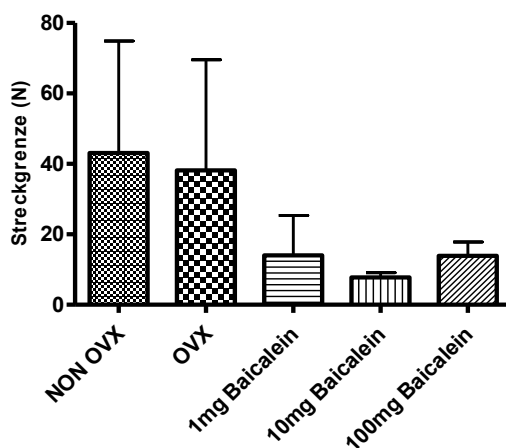


Abb. 20: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Streckgrenze

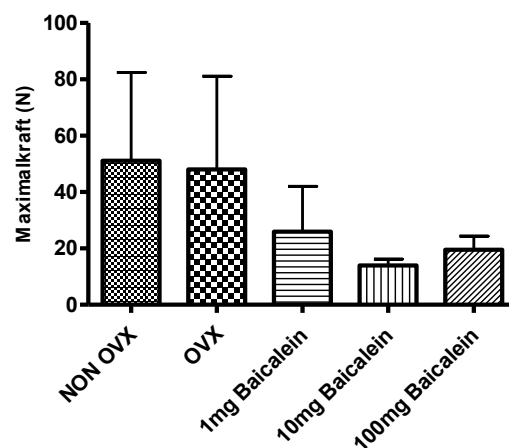


Abb. 21: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Maximalkraft

Sowohl die Messung der Streckgrenze (*Yield Load*) als auch der Maximalkraft zeigten in keiner Gruppe eine signifikante Differenz (Abb. 20 und 21). Vor allem in den Gruppen NON OVX und OVX ist allerdings auf die hohen Standardabweichungen bei beiden Parametern zu verweisen. Auffällig ist eine nicht signifikante Erhöhung der Streckgrenze sowie Maximalkraft bei den nicht mit Baicalein behandelten Tieren (NON OVX, OVX), verglichen mit den behandelten Gruppen.

3.4 Ergebnisse der Mikrocomputertomographie

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Mikro-Computertomographie-Untersuchung zunächst graphisch und anschließend tabellarisch zusammengefasst dargestellt. Die Erörterung erfolgt getrennt für die gemessenen Parameter (Knochen-)dichte und Volumen für die Bereiche Weichteil, Kortikalis, Kallus, gesamter Knochen und das gesamte Gewebe. Darüber hinaus wird die Messung des Knochenvolumens (*Bone Volume*) im Verhältnis zum Gewebevolumen (*Tissue Volume*) präsentiert und erläutert.

3.4.1 Weichteilparameter

3.4.1.1 Weichteil-Dichte

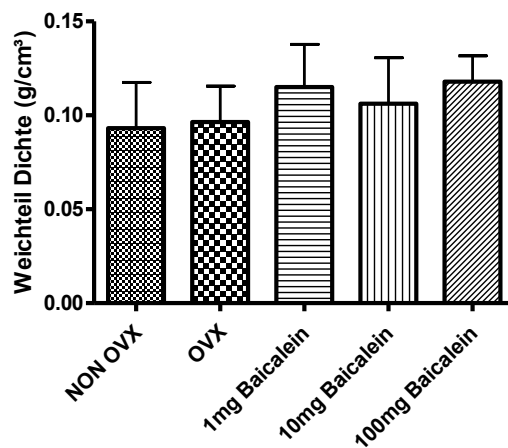


Abb. 22: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Weichteil-Dichte

In Bezug auf die Weichteildichte zeigten sich bei der Untersuchung keine signifikanten Differenzen unter den Versuchsgruppen (Abb. 22). Es bleibt darauf hinzuweisen, dass die mit Baicalein behandelten Tiere eine Tendenz zu höherer Weichteil-Dichte zeigen.

3.4.1.2 Weichteil-Volumen

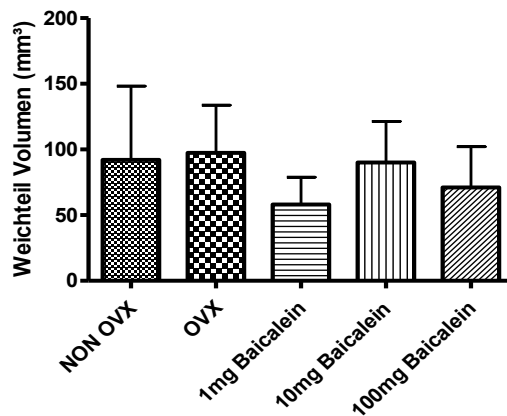


Abb. 23: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Weichteil-Volumen

Auch das Weichteil-Volumen unterscheidet sich nicht signifikant im Gruppen-Vergleich. Zu beachten sind bei dieser Messung die hohen Standardabweichungen (Abb. 23).

3.4.2 Kortikalisparameter

3.4.2.1 Kortikalis-BMD

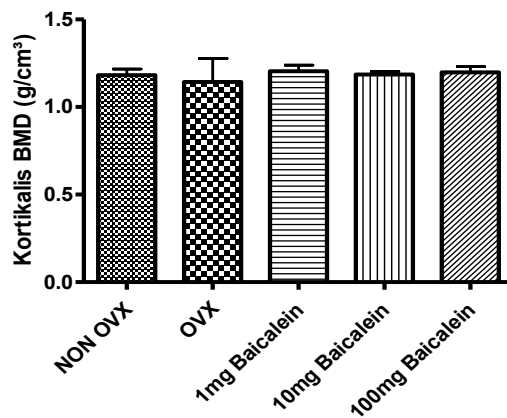


Abb. 24: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalis-BMD

Die *Bone Mineral Density* der Kortikalis ist innerhalb des gesamten Versuchskollektivs vergleichbar und weist keine signifikanten Differenzen auf (Abb. 24).

3.4.2.2 Kortikalis-Volumen

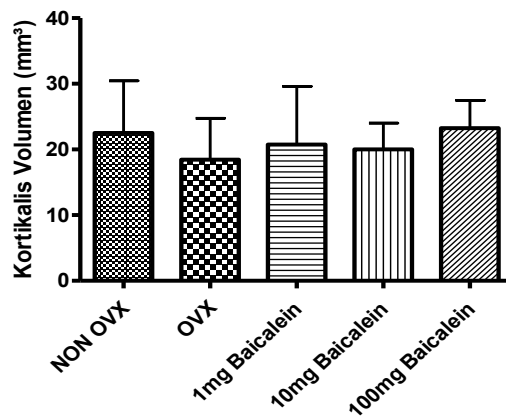


Abb. 25: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalis-Volumen

Das Kortikalis-Volumen weicht unter den Versuchsgruppen leicht voneinander ab. Eine Signifikanz ist dennoch nicht erkennbar (Abb. 25). Unter den ovariectomierten Ratten zeigt sich ein höheres Kortikalisvolumen der Baicalein-Behandlungsgruppe, gegenüber den unbehandelten Tieren.

3.4.3 Kallusparameter

3.4.3.1 Kallus-BMD

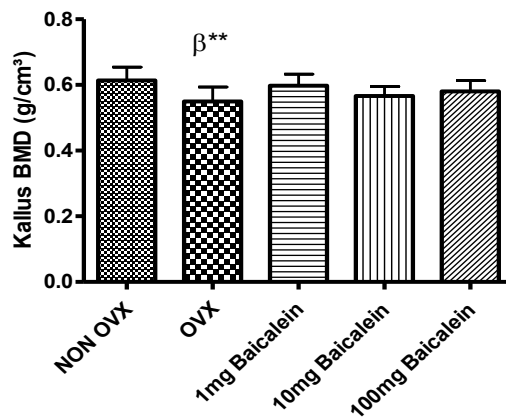


Abb. 26: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallus-BMD; β = signifikant zu NON OVX, ** = $p < 0,01$

(Analyse durch One-way ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc-Test)

Bezüglich der Kallus-Dichte ist auf eine hoch signifikante Verminderung bei den ovariectomierten, nicht mit Baicalein behandelten Tieren, verglichen mit der Gruppe NON OVX hinzuweisen (Abb. 26). Währenddessen sind die Dichtewerte der anderen Gruppen vergleichbar und weisen keine signifikanten Abweichungen auf.

3.4.3.2 Kallus-Volumen

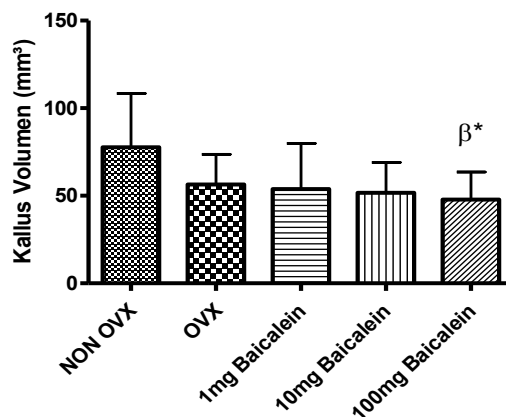


Abb. 27: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallus-Volumen; β =signifikant zu NON OVX, * = $p < 0,05$

(Analyse durch One-way ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc-Test)

Hinsichtlich des Parameters Kallus-Volumen fällt eine signifikante Volumenverminderung bei den Tieren auf, bei denen die höchste Konzentration Baicalein appliziert wurde, verglichen mit dem nicht ovariectomierten Versuchskollektiv (Abb. 27). Darüber hinaus ist ein Trend der Gruppe NON OVX zu mehr Kallusvolumen bei Gegenüberstellung mit anderen Gruppen erkennbar. Dieser bleibt allerdings ohne Signifikanz.

3.4.4 Parameter, die den gesamten Knochen betreffen

3.4.4.1 Knochen-BMD

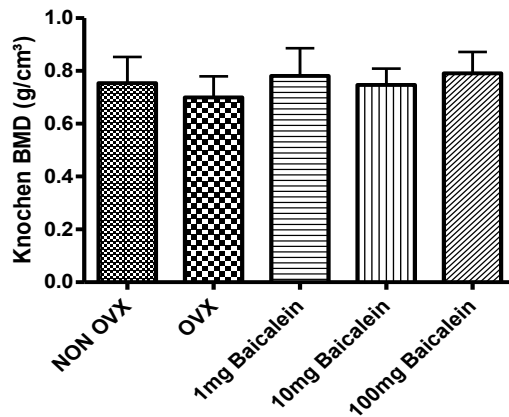


Abb. 28: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Knochen-BMD

Betreffend der Bone Mineral Density konnte kein signifikanter Unterschied unter den Versuchsgruppen ermittelt werden (Abb. 28).

3.4.4.2 Knochen-Volumen

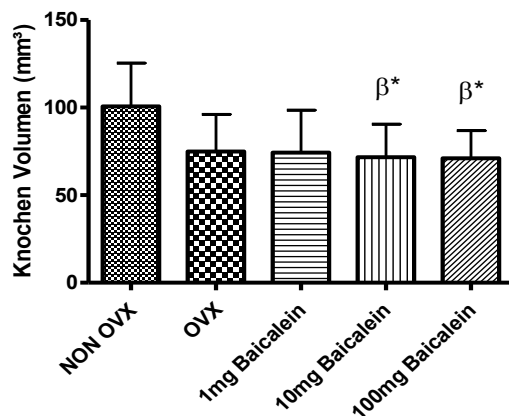


Abb. 29: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Knochen-Volumen; β = signifikant zu NON OVX, $^* = p < 0,05$

(Analyse durch One-way ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc-Test)

Im Hinblick auf das Knochen-Volumen stellen sich signifikante Unterschiede im Kollektiv der Baicalein-Behandlungsgruppe zu den nicht ovariectomierten Tieren dar (Abb. 29). Sowohl die mit 10 mg als auch die mit 100 mg Baicalein pro Kilogramm Körpergewicht behandelten Tiere weisen ein niedrigeres Knochen-volumen auf.

Wiederum ist ein Trend der Gruppe NON OVX zu mehr Volumen erkennbar. Dieser ist weist indessen keine Signifikanz auf.

3.4.5 Parameter, die das gesamte Gewebe betreffen

3.4.5.1 Gesamtes Gewebe Dichte

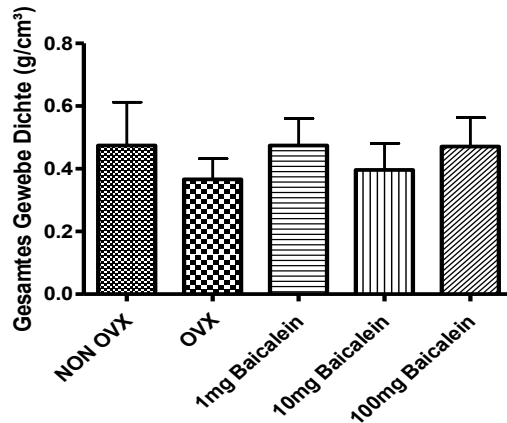


Abb. 30: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters gesamtes Gewebe Dichte

Die Dichte des gesamten Gewebes variiert zwischen allen Gruppen, unterscheidet sich dennoch in keinem Fall signifikant (Abb. 30).

3.4.5.2 Gesamtes Gewebe Volumen

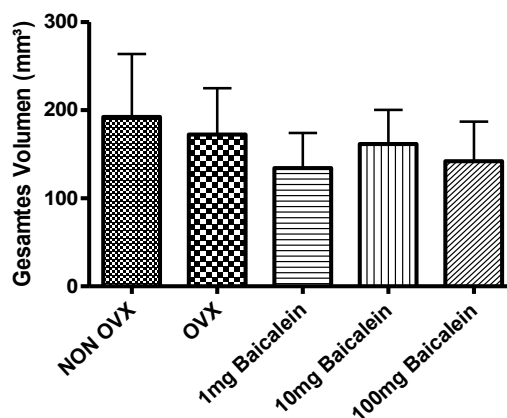


Abb. 31: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters gesamtes Gewebe Volumen

Bezüglich des gesamten Volumens sind keine Signifikanzen erkennbar (Abb. 31). Lediglich eine geringe Tendenz der nicht ovariectomierten Gruppe zu einem höheren Gesamtvolumen deutet sich an.

3.4.6 BV/TV

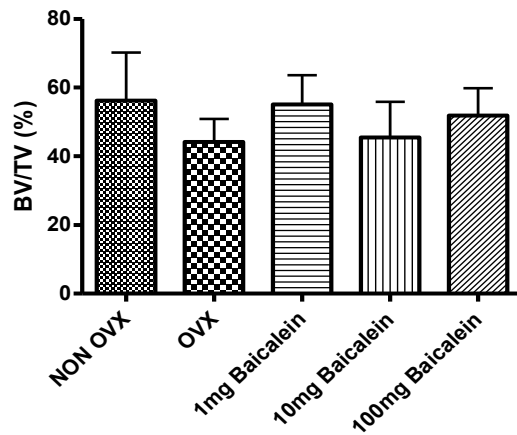


Abb. 32: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Bone Volume/ Tissue Volume

Hinsichtlich der Messgrößen des Knochenvolumens (BV) im Verhältnis zum Gewebevolumen (TV) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede unter den Versuchsgruppen (Abb. 32).

3.5 Ergebnisse der Mikroradiographie

In den Abbildungen 33 bis 37 werden zunächst repräsentative mikroradiographische Aufnahmen jeder Versuchsgruppe dargestellt und im Folgenden die jeweiligen Ergebnisse, zunächst in Form von Diagrammen und abschließend in einer tabellarischen Übersicht, dargestellt.

Während der näheren Begutachtung der Mikroradiographien war allgemein erkennbar, dass bei einem überwiegenden Teil jeder Testgruppe eine deutliche Kallusbildung stattgefunden hatte. Ein augenscheinlicher Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen war nicht auszumachen, da es in jeder Gruppe Tiere gab, bei denen deutliche Kortikalisdefekte sowie ein übermäßiges oder gar fehlendes Kalluswachstum vorlagen. Allerdings fiel bei jeder Versuchsgruppe auf, dass es am hinteren plattenfernen Bereich der Tibiae zu offensichtlich ausgeprägterem Kalluswachstum kam als an der ventralen Lokalisation der Osteosynthese Platte. In der Gruppe NON OVX war der endostale Kallus im Vergleich zu den behandelten Tieren vermehrt ausgebildet (Abb. 33). Eine vollständige Überbrückung des Frakturspalts lag dennoch in keiner Gruppe bei allen Tieren vor.

3.5.1 Repräsentative Mikroradiographien

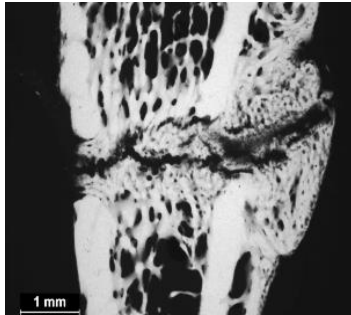


Abb. 33: NON OVX;
repräsentative
Mikroradiographie

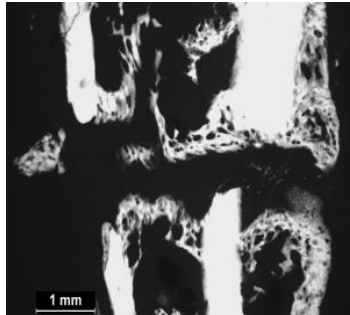


Abb. 34: OVX;
repräsentative
Mikroradiographie

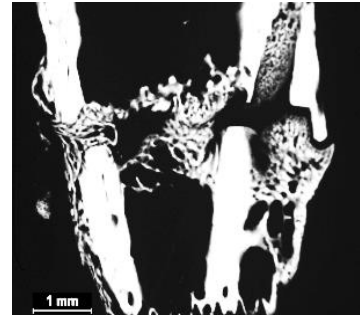
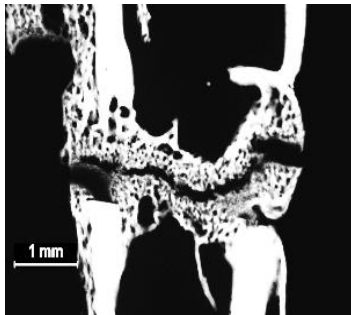


Abb. 35: 1 mg Baicalein;
repräsentative
Mikroradiographie



**Abb. 36: 10 mg
Baicalein;** repräsentative
Mikroradiographie



**Abb. 37: 100 mg
Baicalein;** repräsentative
Mikroradiographie

3.5.2 Kortikalis

3.5.2.1 Kortikalis-Dicke distal plattennah

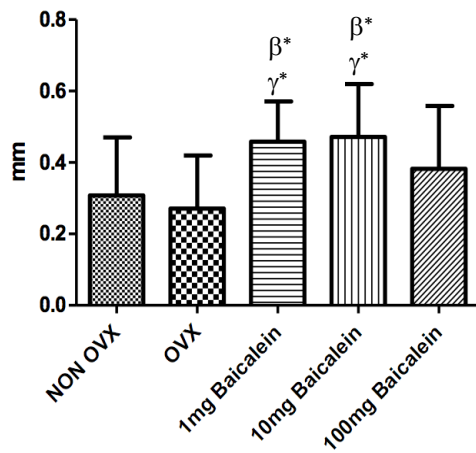


Abb. 38: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalis-Dicke distal plattennah; β = signifikant zu NON OVX, γ = signifikant zu OVX, $*$ = $p < 0,05$

(Analyse durch One-way ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc-Test)

Die plattennahe Kortikalis-Dicke erwies sich bei den nicht ovariectomierten Tieren als signifikant geringer gegenüber den mit 1 mg und 10 mg Baicalein behandelten Ratten (Abb. 38). Ebenso konnte auch für die Gruppe OVX eine signifikant geringere Kortikalis-Dicke im Vergleich zu den oben genannten mit Baicalein behandelten Versuchstieren gemessen werden. Die mit 100 mg Baicalein behandelte Fraktion dagegen weist keine Signifikanzen in Relation zum restlichen Versuchskollektiv auf.

3.5.2.2 Kortikalis-Dicke distal plattenfern

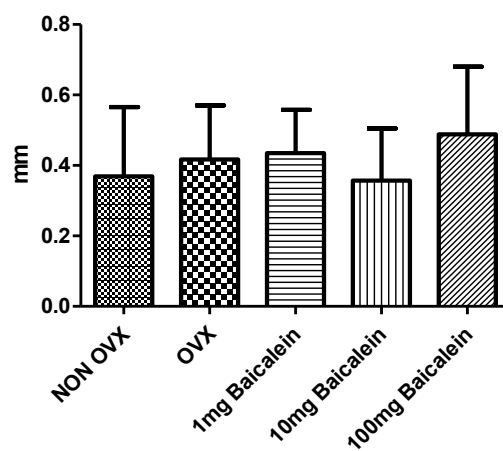


Abb. 39: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalis-Dicke distal plattenfern

Die Kortikalis-Dicke auf der gegenüberliegenden Seite der Osteotomieplatte unterschied sich unter keiner der Gruppen signifikant voneinander. Zwar wurden für die geringste und die höchste Konzentration Baicalein die größte Dicke gemessen, doch die Werte weichen nur leicht von den anderen ab (Abb. 39). Allgemein liegen die Messergebnisse aller Gruppen in einem ähnlichen Bereich.

3.5.2.3 Kortikalis-Dichte distal plattennah

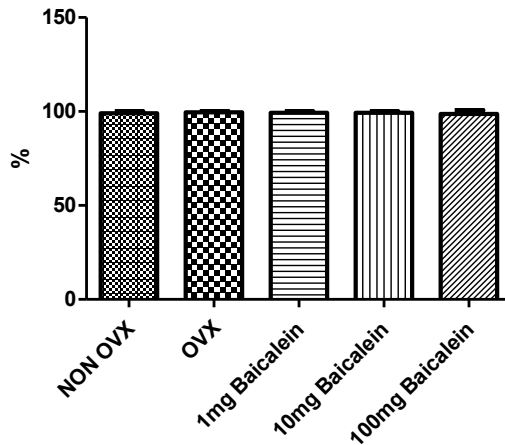


Abb. 40: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalis-Dichte distal plattennah

Die Dichte der Kortikalis unterschied sich unter den jeweiligen Versuchstieren nur minimal und beläuft sich in jeder Behandlungsgruppe auf fast 100 % (Abb. 40).

3.5.2.4 Kortikalis-Dichte distal plattenfern

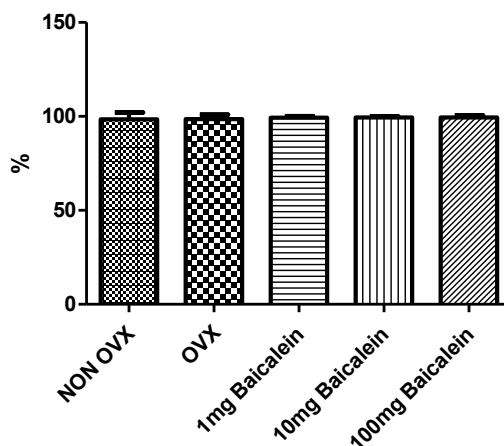


Abb. 41: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kortikalis-Dichte distal plattenfern

Die Ergebnisse bezüglich der plattenfernen Kortikalis-dichte befinden sich auf einem annähernd identischen Niveau wie die Resultate der plattennahen Kortikalis-Dichte (Abb. 41) (vgl. 3.5.2.3).

3.5.3 Kallus

3.5.3.1 Kallus-Dicke plattennah

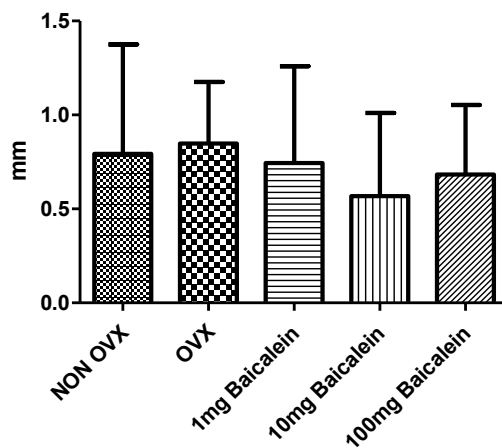


Abb. 42: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallus-Dicke plattennah

Die Werte in Bezug auf die plattennahe Kallus-Dicke zeigen keine signifikanten Unterschiede. Die nicht mit Baicalein behandelten Gruppen NON OVX und OVX weisen mit 0,79 mm und 0,85 mm die größte Kallusdicke auf (Abb. 42).

3.5.3.2 Kallus-Dicke plattenfern

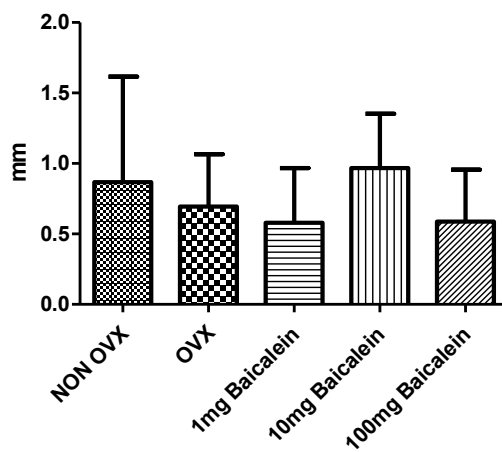


Abb. 43: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallus-Dicke plattenfern

Die Dicke des plattenfern gelegenen Kallusanteils weicht bei keinem Kollektiv signifikant von den anderen Versuchsgruppen ab (Abb. 43). Die größte Kallus-Dicke von 0,97 mm konnte allerdings bei den mit 10 mg behandelten Tieren ermittelt werden.

3.5.3.3 Kallus-Dichte plattennah

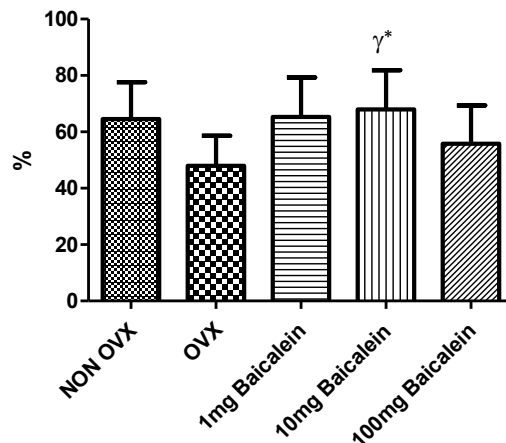


Abb. 44: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallus-Dichte plattennah; γ = signifikant zu OVX, $*=p < 0,05$

(Analyse durch One-way ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc-Test)

Die Dichte des plattennahen Kallus betreffend konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den ovariectomierten, unbehandelten Tieren und der 10-mg-Baicalein-Gruppe festgestellt werden. Die Kallus-Dichte der mit 10 mg Baicalein behandelten Tiere lag im Mittel bei 68 %, während sie in der Gruppe OVX nur 48 % betrug (Abb. 44). Die anderen Messwerte unterschieden sich nicht signifikant.

3.5.3.4 Kallus-Dichte plattenfern

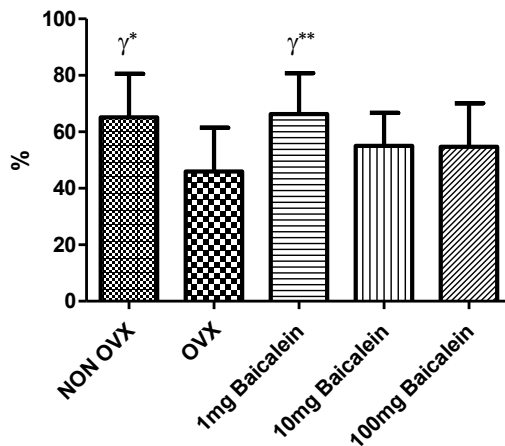


Abb. 45: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallus-Dichte plattenfern; γ = signifikant zu OVX, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$

(Analyse durch One-way ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc-Test)

Ein hoch signifikanter Unterschied der plattenfernen Kallus-Dichte konnte für die Gruppen OVX und 1 mg Baicalein nachgewiesen werden. Die mit Baicalein behandelte Versuchsgruppe zeigte eine im Mittel 20 % höhere Kallus-Dichte als die lediglich ovariectomierten Tiere (Abb. 45). Auch die nicht ovariectomierten Ratten wiesen eine signifikant höhere Kallus-Dichte auf als die OVX Gruppe.

3.5.3.5 Kallus-Dichte endostal

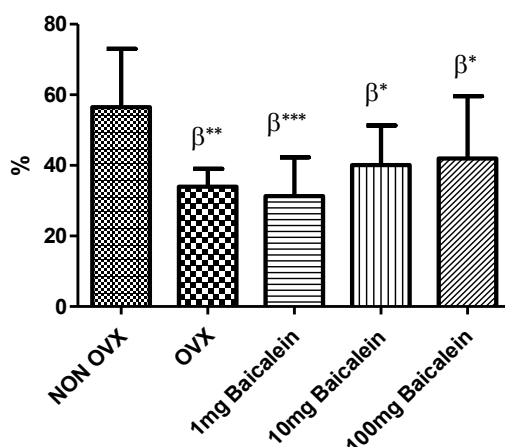


Abb. 46: Darstellung der Ergebnisse des Messparameters Kallus-Dichte endostal; β = signifikant zu NON OVX, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$

(Analyse durch One-way ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc-Test)

Hinsichtlich der Dichte des endostalen Kallus fielen signifikante Unterschiede jeder Gruppe im Vergleich zum nicht ovariectomierten Versuchskollektiv auf, welches die höchste Kallus-Dichte aufwies (Abb. 46). Während die ovariectomierten Ratten eine hoch signifikant geringere Kallus-Dichte zeigten, wick die Dichte der mit 1 mg Baicalein behandelten Tiere sogar höchst signifikant von der NON OVX Gruppe ab. Die Versuchstiere, denen höhere Baicalein Konzentrationen verabreicht wurden, hatten jeweils eine signifikant geringere Kallus-Dichte.

3.6 Ergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung

Vorerst werden die ermittelten Zeitpunkte der Überbrückung des Frakturspalts tabellarisch veranschaulicht. Folgend werden repräsentativ fluoreszenzmikroskopische Bilder der jeweiligen Versuchsgruppe dargestellt. Nachstehend erfolgt die statistische Ergebnispräsentation in Form von Säulendiagrammen und als tabellarische Übersicht.

3.6.1 Zeitpunkt der frühesten Überbrückung des Frakturspalts

Tabelle 12: Darstellung der Zeitpunkte der frühesten Frakturüberbrückung in Tagen;

Ø= es hat keine Frakturüberbrückung stattgefunden

Ratte	NON OVX	OVX	1 mg Baicalein	10 mg Baicalein	100 mg Baicalein
1	28	Ø	Ø	28	Ø
2	20	Ø	29	27	Ø
3	Ø	Ø	28	25	Ø
4	Ø	26	Ø	20	26
5	10	29	19	Ø	28
6	Ø	Ø	Ø	28	19
7	26	29	23	28	Ø
8	21	Ø			26
9	20	27			Ø
10					Ø
	Mittelwert NON OVX	Mittelwert OVX	Mittelwert 1 mg Baicalein	Mittelwert 10 mg Baicalein	Mittelwert 100 mg Baicalein
	21	28	25	26	25

Die Überbrückung des Frakturspalts fand bei den nicht ovariectomierten Ratten im Mittel 21 Tage nach der Osteotomie und dementsprechend mindestens 4 Tage vor den mit Baicalein behandelten Tieren statt (Tab. 12). Allerdings erfolgte die Frakturüberbrückung in der Versuchsgruppe OVX im Mittel erst an Tag 28 der Frakturheilung und damit mindestens 2 Tage verspätet in Relation zu den Gruppen, denen Baicalein gespritzt wurde. Außerdem kam es bei einigen Tieren zu keiner Frakturüberbrückung. In der Gruppe der nicht ovariectomierten Ratten wurde der Frakturspalt in 67% der Fälle überbrückt. Bezüglich der OVX Tiere fand lediglich bei 44% eine Überbrückung statt. Dagegen erfolgte die Frakturüberbrückung bei 57% der mit 1 mg Baicalein behandelten Versuchstiere, bei 86% der 10-mg-Baicalein-Gruppe, sowie bei 60% der Ratten, denen 100 mg Baicalein appliziert wurden.

3.6.2 Repräsentative Bilder der polychromen Sequenzmarkierung

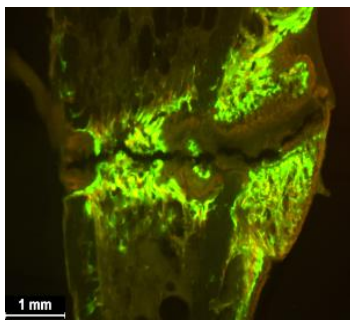


Abb. 47: NON OVX;
repräsentative polychrome
Sequenzmarkierung

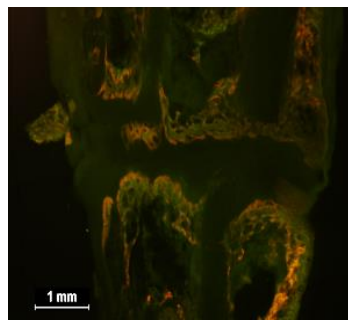


Abb. 48: OVX;
repräsentative polychrome
Sequenzmarkierung

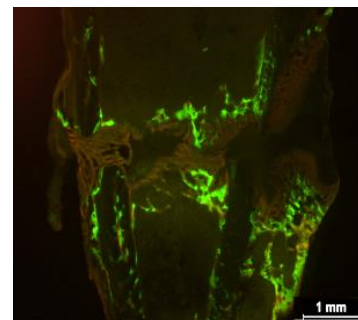


Abb. 49: 1 mg Baicalein;
repräsentative polychrome
Sequenzmarkierung



Abb. 50: 10 mg Baicalein;
repräsentative polychrome
Sequenzmarkierung

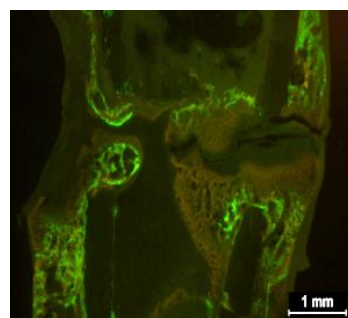


Abb. 51: 100 mg Baicalein;
repräsentative polychrome
Sequenzmarkierung

Die repräsentativen Darstellungen der polychromen Sequenzmarkierung untermauern die ausgewerteten Daten. Die Gruppe NON OVX zeigte fluoreszenzmikroskopisch sowohl eine deutlich vorangeschrittenere Überbrückung des Frakturspaltes, als auch eine vermehrte Calcein-Grün Anreicherung im endostalen Kallusbereich (Abb. 47). Auffällig ist auch die offensichtlich schwächere Fluorochrommarkierung der Tibia aus der Gruppe OVX, sowie die weiter auseinanderstehenden Frakturrenden (Abb. 48).

3.6.3 Kallus plattennah

3.6.3.1 Gesamtfläche Kallus plattennah

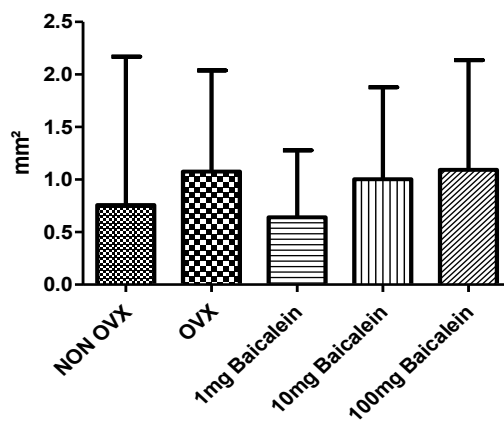


Abb. 52: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Gesamtfläche Kallus plattennah

Die gesamte plattennahe Kallus-Fläche unterschied sich hinsichtlich keiner der Gruppen signifikant (Abb. 52). Es fiel lediglich auf, dass die Versuchstiere der 1-mg-Baicalein-Gruppe die geringste Fläche aufwiesen, während die Ratten der höchsten Baicalein-Konzentration die größte Gesamtkallus-Fläche zeigten.

3.6.3.2 CG-Fläche

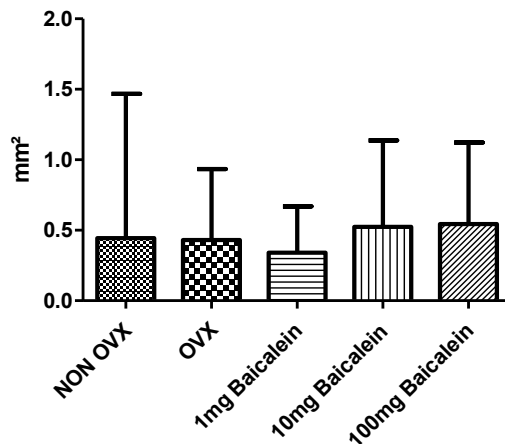


Abb. 53: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße CG-Kallus-Fläche plattennah

In Bezug auf die CG-markierte Fläche des plattennahen Kallusanteils wichen die Ergebnisse der Versuchsgruppen nicht signifikant voneinander ab (Abb. 53). Die größte Kallus-Fläche wurde für die Tiere ermittelt, denen die höchste Baicalein-Konzentration appliziert worden war. Auffällig waren dahingegen hohe Standardabweichungen.

3.6.3.3 AK-Fläche

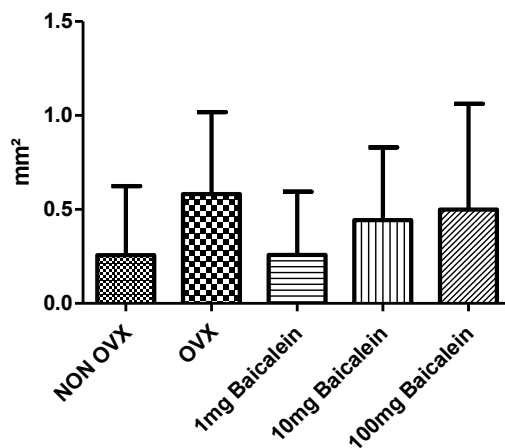


Abb. 54: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße AK-Kallusfläche plattennah

Bezüglich der plattennahen AK-Kallus-Fläche konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (Abb. 54).

3.6.4 Kallus plattenfern

3.6.4.1 Gesamtfläche Kallus plattenfern

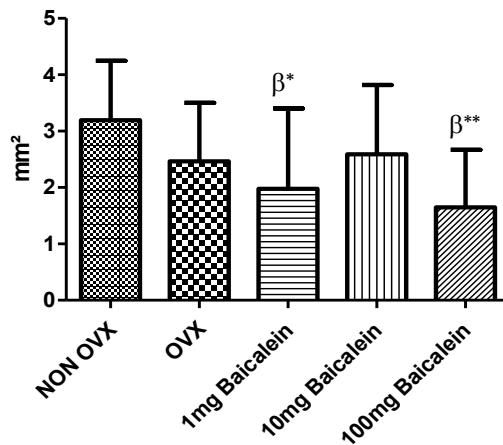


Abb. 55: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Gesamt-Kallus-Fläche plattenfern;

β= signifikant zu NON OVX, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$

(Analyse durch One-way ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc-Test)

Für die Versuchsgruppe NON OVX konnten signifikant höhere Werte im Vergleich zur Gruppe 1 mg Baicalein, sowie eine hoch signifikant größere Kallus-Fläche als bei der Gruppe 100 mg Baicalein festgestellt werden (Abb. 55).

3.6.4.2 CG-Fläche

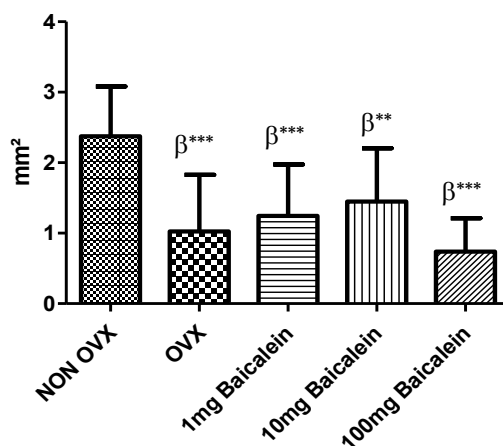


Abb. 56: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße CG-Kallus-Fläche plattenfern; β=

signifikant zu NON OVX, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$

(Analyse durch One-way ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc-Test)

Auch hinsichtlich der CG-markierten plattenfernen Kallus-Fläche konnten signifikant größere Flächen der nicht ovariectomierten Tiere erhoben werden (Abb. 56). In Bezug auf die Versuchsgruppen OVX, 1 mg und 100 mg Baicalein wurde eine höchst signifikant und im Vergleich mit der 10 mg Baicalein eine hoch signifikant größere Kallus-Fläche erfasst.

3.6.4.3 AK- Fläche

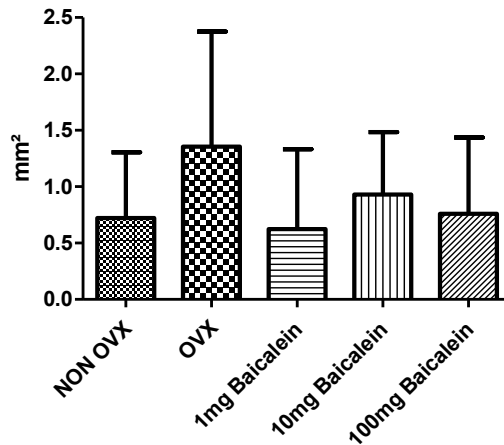


Abb. 57: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße AK-Kallus-Fläche plattenfern

Im Hinblick auf den durch AK markierten plattenfernen Kallusanteil wurden keine Signifikanzen ermittelt (Abb. 57).

3.6.5 Kallus endostal

3.6.5.1 Gesamtfläche Kallus endostal

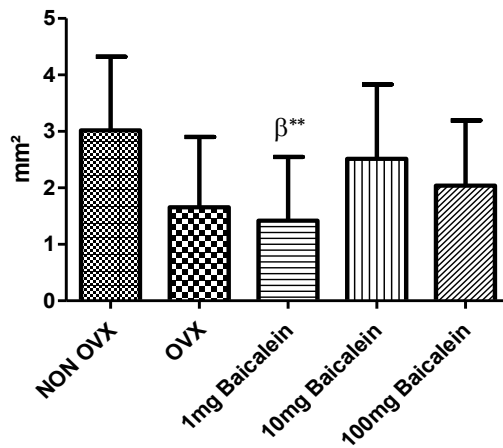


Abb. 58: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Gesamtfläche Kallus endostal; β = signifikant zu NON OVX, **= $p < 0,01$

(Analyse durch One-way ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc-Test)

Bei Auswertung der gesamten endostalen Kallus-Fläche konnte in Relation zur nicht ovariectomierten Gruppe eine hoch signifikant geringere Kallus-Fläche für die mit 1 mg Baicalein behandelten Tiere festgestellt werden (Abb. 58).

3.6.5.2 CG-Fläche

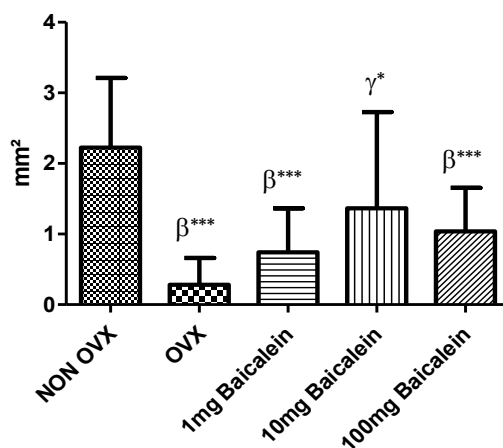


Abb. 59: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße CG-Kallus-Fläche endostal; β = signifikant zu NON OVX, γ = signifikant zu OVX, *= $p < 0,05$, ***= $p < 0,001$

(Analyse durch One-way ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc-Test)

Bezüglich der durch CG markierten endostalen Kallus-Fläche fielen höchst signifikant geringere Werte der Versuchsgruppen OVX, 1 mg und 100 mg Baicalein im Vergleich zum nicht ovariectomierten Versuchskollektiv auf (Abb. 59). Allerdings konnte für die mit 10 mg Baicalein behandelten Tiere eine signifikant größere Fläche in Bezug auf die Gruppe OVX ermittelt werden.

3.6.5.3 AK-Fläche

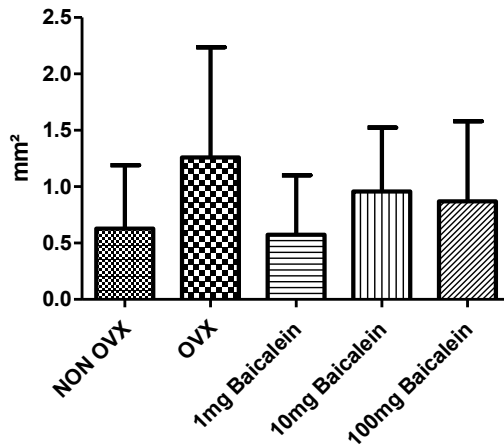


Abb. 60: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße AK-Kallus-Fläche endostal

Für die AK-markierte endostale Kallus-Fläche konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden (Abb. 60).

3.6.6 Gesamtfläche kompletter Kallus

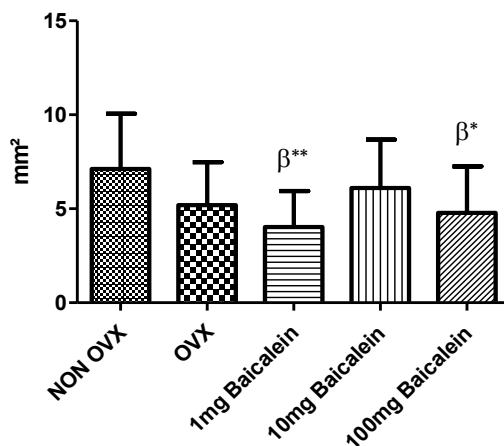


Abb. 61: Darstellung der Ergebnisse der Messgröße Gesamtfläche kompletter Kallus; β= signifikant zu NON OVX, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$

(Analyse durch One-way ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc-Test)

Auch für den kompletten Kallus zeigte sich die größte Gesamtfläche in der Versuchsgruppe NON OVX (Abb. 61). Unterdessen wiesen sowohl die Ratten der 1-mg-Baicalein-Gruppe eine hoch signifikant als auch die Tiere der 100-mg-Baicalein-Gruppe eine signifikant geringere Gesamtkallus-Fläche auf.

4 Diskussion

Im Zentrum dieser wissenschaftlichen Arbeit steht die Verbesserung der verminderten Knochenqualität osteoporotischer Knochen durch die pflanzliche Substanz Baicalein vor dem Hintergrund der problematischen Heilung Osteoporose-induzierter Frakturen. Grundlage der unverkennbar erschwerten Frakturheilung sind die signifikant verschlechterten Parameter der Knocheneigenschaften [Tarantino et al. 2013]. So ist ein osteoporotischer Knochen minderperfundiert und der bei einer Fraktur gebildete Kallus weist eine mangelhafte Mineralisation auf [Augat et al. 2005]. Darüber hinaus stellt sich der Knochenumsatz nach einer Fraktur als deutlich eingeschränkt dar, sodass der initial verringerte resorptive Prozess zu einer erschwerten Wiederherstellung der Integrität eines osteoporotisch veränderten Knochens führt [Wölf et al. 2014]. Es resultieren Schwierigkeiten in der medizinischen Versorgung, da es sich oft um Splitterbrüche handelt und übliche Implantate auf Grund der geringen Stabilität nicht in den Knochen eingebracht werden können [Kammerlander et al. 2013]. Die beschriebene Problematik bildet den Ansatzpunkt für das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Präparat Baicalein. Das Flavonoid des Baikal-Helmkrautes (*Scutellaria baicalensis*), welches seit geraumer Zeit in der traditionellen asiatischen Medizin eingesetzt wird, hat bereits einige biologische Effekte gezeigt. Berichtet wurde sowohl von seiner anti-viralen, anti-inflammatorischen und anti-hepatotoxischen als auch von seiner anti-kanzerogenen Wirkung [Wang et al. 2015; Jang et al. 2014]. Baicalein ist ein selektiver Inhibitor verschiedener Lipoxygenasen, die im Zuge einer Entzündungsreaktion vermehrt exprimiert werden [Deschamps et al. 2006] und mittels Osteoklasten-Stimulation zu einem katabolen Knochestoffwechsel führen [Lee et al. 2012]. Folglich wurde die Hypothese aufgestellt, dass Baicalein durch einen osteoanabolen Effekt, welcher bereits an intakten Mäuseknochen gezeigt werden konnte [Kim et al. 2008], zu einer verbesserten Frakturheilung führen würde. Ungeklärt sind bisher die Auswirkungen von Baicalein auf den Knochenstoffwechsel und die Frakturheilung bei manifester Osteoporose, so dass diese Fragestellung im Rahmen dieser Studie untersucht wurde.

4.1 Die ovariectomierte Ratte als Osteoporosemodell und das metaphysäre Frakturmodell

Das dieser Arbeit zu Grunde liegende Osteoporosemodell der ovariectomierten Ratte war bereits Gegenstand einer großen Anzahl wissenschaftlicher Studien, so dass sowohl der Effekt des Lebensalters als auch der Nahrung auf den Knochenstoffwechsel der Tiere hinlänglich dokumentiert sind [Thorndike und Turner 1998]. Überdies reagieren Rattenknochen auf mechanische Einflüsse, Hormone und Medikamente analog zur menschlichen Knochenstruktur [Frost und Jee 1992]. Die Ovariectomie der Ratten hat innerhalb von 8 bis 10 Wochen einen signifikanten Rückgang der spongiösen Knochenmasse zur Folge [Miller und Wronski 1993]. Unterdessen ist die Knochenmineraldichte der Tibia schon nach 14 Tagen nachweislich beeinträchtigt [Lelovas et al. 2008]. Zwar zeigte sich der Kalzium-Verlust ovariectomierter Ratten geringer, als der Kalzium-Verlust postmenopausaler Frauen [Kalu 1991], und der basale multizelluläre Knochenumbau scheint im Fall von Rattenknochen limitiert zu sein [Thorndike und Turner 1998], doch stimmen wesentliche Charakteristika, wie der initial erhöhte Knochenstoffwechsel, der stärkere Verlust von spongiösem gegenüber kortikalem Knochen und die Reaktion auf verschiedene Therapieformen überein [Kalu 1991]. So können die zentralen Aspekte des Knochenmasseverlustes postmenopausaler Frauen durch das Rattenmodell reproduziert werden.

Die erfolgreiche Ovariectomie wurde in diesem Versuch durch die Entwicklung der Körper- und Uterusgewichte der Versuchstiere untermauert. Bereits in der zweiten postoperativen Woche kam es zu einem signifikanten Anstieg des Körpergewichts aller ovariectomierten Ratten im Vergleich zur NON OVX-Gruppe (vgl. 3.1, S. 51). Darüber hinaus sprachen auch, entsprechend dem abfallenden Östrogenspiegel und Uterusgewicht in der Postmenopause, die höchst signifikant geringeren Uterusgewichte aller ovariectomierten Tiere (vgl. 3.2, S.52) für verringerte Östrogenwerte.

Ein Großteil der Osteoporose-induzierten Frakturen tritt im Bereich der Metaphysen der Röhrenknochen auf, was durch die deutliche Reduktion der spongiösen Knochendichte begründet ist, die sich im Bereich der proximalen Tibia auf bis zu 50% innerhalb von 3 Monaten belaufen kann [Jee und Yao 2001]. Ungeachtet dieser Erkenntnisse behandelt eine Vielzahl von Studien lediglich die Frakturheilung der Diaphyse [Cao et al. 2002; Hatano et al. 2004; Kubo et al. 1999; Li et al 2001; Nakajima et al. 2002]. Doch osteoporotische Veränderungen treten in deutlich geringerem Maße

am diaphysären Knochen auf, und biomechanische Eigenschaften divergieren vom eigentlichen Grad der Osteoporose, da durch die Zunahme des Durchmessers der Knochenmarkshöhle die Stabilität trotz dünnerer Kortikalis aufrechterhalten werden kann [Aerssens et al. 1996; Peng et al. 1994]. Diese Verzerrung wurde im Zuge dieser Arbeit durch die Wahl des etablierten metaphysären Frakturmodells nach Stürmer et al. [2010a; 2010b] vermieden.

4.2 Biomechanischer Kompressionstest

Um Unterschiede bezüglich der mechanischen Eigenschaften wie der Stärke des Frakturkallus und der Elastizität der Tibiae zu dokumentieren, wurde ein von Stürmer et al. [2006] entwickelter Drei-Punkt-Biegetest durchgeführt. Diese Methode hat sich bereits in einigen anderen Studien bewährt [Ibrahim et al. 2014; Chen et al. 2014; Kaczmarczyk-Sedlak 2013; Komrakova et al. 2013] und wurde daher zur Revision der Frakturheilung eingesetzt. Bekannt ist bereits, dass sich die osteoporotischen Veränderungen im biomechanischen Test im Bereich der Metaphyse als verminderte Elastizität und reduzierte maximale Belastung niederschlagen, während keine statistisch signifikanten Abweichungen an der diaphysalen Tibia nachweisbar sind [Chen et al. 2008]. Tatsächlich beeinflusst Osteoporose unverkennbar vor allem die frühe Phase der Frakturheilung, was in deutlich verminderter Kallus- und Knochenstabilität resultiert und sich sowohl durch die reduzierte BMD, als auch die begrenzte Ausbildung reifen Knochengewebes ausdrückt [Namkung-Matthai et al. 2001]. Weiterhin wird auch die späte Phase der Frakturheilung beeinflusst, verursacht durch eine prolongierte Kalzifikation des endochondralen Knochens, gesteigerte Osteoklasteaktivität und irreguläres sowie verstreutes Trabekelwachstum [Xu et al. 2004, Wang et al. 2005].

Unbekannt war bisher allerdings der Effekt von Lipoxygenasehemmern wie Baicalein auf die biomechanischen Eigenschaften und die Frakturheilung osteoporotischer Knochen. Für diverse Phytohormone konnte bereits ein positiver Effekt auf die Kallusqualität und die trabekuläre Knochenformation nachgewiesen werden [Kolios et al. 2010; Sehmisch et al. 2010]. Im Kontrast dazu können die Ergebnisse des biomechanischen Tests dieser Arbeit keine Verbesserung der Kallusfestigkeit und -elastizität für die mit Baicalein behandelten Gruppen erkennen lassen. Die Knochen der mit 100 mg Baicalein pro Kilogramm Körpergewicht behandelten Tiere zeigen lediglich eine nicht signifikant gesteigerte Elastizität gegenüber dem restlichen

ovarektomierten Kollektiv. Dennoch wäre eine Verbesserung der Knochenstabilität durch die optimierte Verteilung des Lipoxigenasehemmers im Gewebe in Folge der Darreichung mit dem Futter denkbar. Die Möglichkeit der oralen Metabolisierung des Lipoxigenaseinhibitors wurde bereits im Rattenmodell untersucht und bestätigt [Akao et al. 2013]. Der schnellere Entzündungsrückgang und die verbesserte Defektheilung könnten so in einem stabileren Frakturkallus resultieren.

4.3 Mikro-Computertomographie

Entwicklungen im Bereich der Mikro-Computertomographie lassen mittlerweile eine In-vivo-Bildgebung bei Kleintiermodellen mit hoher räumlicher Auflösung zu, so dass eine Beurteilung der quantitativen und qualitativen Knochenarchitektur ohne Schädigung des Tieres erfolgen kann [Waarsing et al. 2004]. Darüber hinaus kann eine Quantifizierung des subchondralen Knochengewebes im Zeitverlauf an demselben Tier erfolgen und innerhalb eines longitudinalen Studiendesigns analysiert werden [Boyd et al. 2006; Perilli et al. 2010]. Das in dieser Studie verwendete *Quantum GX microCT* der Firma *PerkinElmer*® ist ein jüngst entwickeltes System, das mit Hilfe einer großen Anzahl an Schnittbildern eine 3D-Rekonstruktion von Geweben oder gesamten Organismen erlaubt. Die dreidimensionale Darstellung ist der zweidimensionalen Histomorphometrie von Dünnschnitten insofern überlegen, als dass topologische Parameter wie die Vernetzung der Knochenstruktur evaluiert werden können [Engelke et al. 1999]. Zwar wurden in dieser Arbeit keine lebenden Tiere, sondern lediglich die entnommenen Tibiae einer Bildgebung unterzogen, doch kamen hier das hohe Auflösungsvermögen (4,5 µm Voxel Größe) sowie die niedrige Strahlendosis (durchschnittlich 15mGy pro Scan) während einer äußerst kurzen Scan-Zeit (längste Scan-Zeit: 2 Minuten) zum Tragen. Damit wurden ein zentraler Nachteil der bisherigen Mikro-CT Technologien, die langen Scan-Zeiten von bis zu mehreren Stunden, behoben [Engelke et al. 1999; Yajima 2007]. Essenziell ist bei dieser neu etablierten Methode, dass die niedrige Strahlendosis die Gefahr der Schädigung der osteoporotischen Rattenknochen minimiert, welche bei früheren In-vivo-Mikro-CT Analysen zu einer Reduktion des Trabekelvolumens geführt hat [Klinck et al. 2008]. Die hohe räumliche Auflösung ermöglichte eine genaue Evaluierung der kortikalen Mikrostruktur, welche als fundamental für die Interpretation der biomechanischen Eigenschaften eines osteoporotischen Knochens gilt [Genant et al. 2007; Ito 2011].

Die Annahme, dass Baicalein, welches durch Inhibition von Lipoxygenasen [Deschamps et al. 2006], die durch Osteoklasten-Stimulation einen katabolen Knochenstoffwechsel bedingen [Lee et al. 2012], einen osteoanabolen Effekt haben könnte, wurde durch diesen Versuch nicht vollständig bestätigt. Trotz des bereits nachgewiesenen osteoanabolen Effektes bei intakten Mäuseknochen [Kim et al. 2008], konnten weder beim Kortikalisvolumen, noch der BMD der Kortikalis signifikante Differenzen nachgewiesen werden. Das Kortikalisvolumen der mit Baicalein behandelten Gruppen lag allerdings leicht über dem der ovariectomierten, unbehandelten Gruppe (NON OVX: $22,51 \pm 7,95 \text{ mm}^3$; OVX: $18,45 \pm 6,31 \text{ mm}^3$; 1 mg Baicalein: $20,74 \pm 8,89 \text{ mm}^3$; 10 mg Baicalein: $20,01 \pm 4,01 \text{ mm}^3$; 100 mg Baicalein: $23,26 \pm 4,23 \text{ mm}^3$). In Bezug auf die Kallusdichte ist eine hoch signifikante Verminderung bei den ovariectomierten, nicht mit Baicalein behandelten Tieren, verglichen mit der Gruppe NON OVX zu verzeichnen, während die Werte aller anderen Versuchsgruppen auf nahezu gleichem Niveau sind. Dies spricht zumindest für eine Annäherung der Kallusdichte der mit Baicalein behandelten Gruppen an die nicht ovariectomierten und damit nicht von Osteoporose betroffenen Tiere. Dem gegenüber steht allerdings, dass das Kallusvolumen der Ratten, bei denen die höchste Konzentration Baicalein appliziert wurde (100 mg pro Kilogramm Körpergewicht), signifikant unter dem der Gruppe NON OVX liegt. Dieses Ergebnis ist womöglich auf die Osteoklasten-Inhibition durch Baicalein zurückzuführen. Osteoklasten stellen jedoch einen obligaten Faktor bezüglich der Kallusresorption und nicht zuletzt der Knochenheilung dar [Marsell et al. 2011]. Hinsichtlich des Knochenvolumens stellen sich signifikante Unterschiede im Kollektiv der Baicalein-Behandlungsgruppe gegenüber den nicht ovariectomierten Tieren dar. Sowohl die mit 10 mg, als auch die mit 100 mg Baicalein behandelten Tiere wiesen ein signifikant niedrigeres Knochenvolumen auf.

4.4 Mikroradiographie

Im Rahmen einer mikroradiographischen Untersuchung werden die Knochenbinnenstrukturen durch Erfassung der Unterschiede im Mineralgehalt der Gewebeanteile mit Hilfe von Röntgenstrahlung als zweidimensionales Bild dargestellt. Dieser Ansatz unterscheidet sich von der Mikro-Computertomographie insofern, als die dreidimensionale Visualisierung und Registrierung der Knochenvernetzung nicht möglich ist. Die Mikroradiographie ist dennoch eine lange etablierte und oft genutzte Methode, um Veränderungen der Knochenmineralisierung und Gewebeumbau feststellen zu können [Jowsey und Riggs 1972; Engström et al. 1955; Clemmons 1955]. Im Zuge der mikroradiographischen Analyse konnten bezüglich der distalen plattennahen Kortikalisdicke für die mit 1 mg und 10 mg Baicalein behandelten Versuchstiere signifikant größere Werte im Vergleich zu den Gruppen NON OVX und OVX ermittelt werden. Plattenfern wurden allerdings keine signifikante Abweichung der Kortikalis gefunden (vgl. Abb. 38 und 39, S. 55; Anh. Tab. 9, S. 86). Dieser Divergenz zwischen plattennaher und plattenferner Kortikalisdicke bedingt unter Umständen das Ergebnis der Mikro-Computertomographie. Hier konnten in Bezug auf die Knochenmineraldichte und das Volumen der Kortikalis keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (vgl. Abb. 24 und 25, S. 48/49; Anh. Tab. 5, S. 84). Die gute Korrelation zwischen den Methoden der zweidimensionalen und dreidimensionalen Bildgebung, welche durch Guggenbuhl et al. (2006) proklamiert wurde, ist daher aus diesen Ergebnissen nicht eindeutig ableitbar. Der alleinige Einsatz der Mikroradiographie könnte defizitär sein. Es scheint vielmehr zu einer Verbesserung der Validität zu kommen, wenn beide Untersuchungsmethoden kombiniert und kritisch gegeneinander abgewogen werden. Zu diesem Resultat kommen auch Gielkens et al. (2008) in ihrer Studie zum Vergleich der Mikro-CT, Mikroradiographie und Histomorphometrie, da hier sogar eine Überschätzung des Knochenaufbaus durch die Mikroradiographie detektiert werden konnte. Vor allem jedoch die Möglichkeit der BMD-Messung begründet in der Osteoporoseforschung die Überlegenheit der Mikro-Computertomographie, da die Knochenmineraldichte schon seit Jahren als starker Prädiktor für das Frakturrisiko postmenopausaler Frauen gilt [Garnero und Delmas 2004]. Die BMD-Ermittlung ist also ein entscheidender Schritt in der Übertragung dieser Studienergebnisse auf den klinischen Alltag. Gleichwohl kann die individuelle Differenzierung zwischen den plattennahen, plattenfernen und endostalen

Kallusanteilen wiederum als deutlicher Vorteil der mikroradiographischen Auswertung betrachtet werden. Diese ermöglicht unter anderem, den Stellenwert der mechanischen Einflüsse durch die Osteosyntheseplatte auf die Kallusbildung einzuschätzen.

Hinsichtlich der Kallusparameter konnte mikroradiographisch eine signifikant verstärkte endostale Kallusbildung der nicht ovariectomierten Ratten festgestellt werden (NON OVX: $56,50 \pm 16,51$ %; OVX: $33,96 \pm 5,10$ %; 1 mg Baicalein: $31,32 \pm 10,95$ %; 10 mg Baicalein: $40,08 \pm 11,23$ %; 100 mg Baicalein: $41,99 \pm 17,63$ %). Diese Ergebnisse decken sich mit der Mikro-CT Analyse, welche eine hoch signifikant höhere Kallus-BMD für NON OVX im Vergleich zu OVX sowie ein signifikant größeres Kallusvolumen des NON OVX-Kollektivs in Relation zur 100-mg-Baicalein-Gruppe ergab (vgl. Abb. 26 und 27, S. 49/50; Anh. Tab. 6, S. 84). Diese Resultate demonstrieren die überlegene Frakturheilung der nicht osteoporotischen Knochen, welche offenbar nur ansatzweise durch den Lipoxigenaseinhibitor Baicalein auszugleichen ist. Diese Ergebnisse stehen nicht vollständig im Einklang mit denen vergangener Studien, welche die deutliche osteoanabole und antiosteoporotische Wirkung des Baicaleins untermauern [Kim et al. 2008; Li et al. 2015]. Dies könnte in Zusammenhang mit dem Fazit von Somjen et al. (2008) stehen, welches Lipoxigenasemetabolite als Mediatoren des Parathormon-abhängigen Osteoblastenwachstums propagiert. PTH wird trotz seiner osteokatabolen Wirkung bei kontinuierlicher Gabe wiederum als eine Perspektive für die Osteoporosetherapie gesehen, da es bei intermittierender Applikation einen gegenteiligen Effekt erzielt [Esbrit und Alcaraz 2013; Morley et al. 2001]. Zu überprüfen wäre demnach, ob Lipoxigenaseinhibitoren möglicherweise vielmehr die Osteoblastenformation behindern als sie zu unterstützen. Auch die unter 4.3 erwähnte Behinderung des Osteoklastenwachstums durch Baicalein stellt ein Hindernis in der Frakturheilung dar. Die Osteoklastenhemmung, wenngleich sie sich positiv auf den gesunden Knochen auswirkt, ist bei der Knochenneuformation ein Nachteil.

Die in der Mikroradiographie signifikant niedrigere plattenferne Kallusdichte der ovariectomierten unbehandelten Ratten im Vergleich zu NON OVX und der niedrigsten Baicalein-Konzentration (vgl. Abb. 45, S. 59; Anh. Tab. 10, S. 87) lassen allerdings die gelungene Ovariectomie und nachfolgende Osteoporose sowie eine annähernde Heilungsverbesserung durch die Baicalein-Applikation erkennen. Im Hinblick auf die Kallusdicke konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (vgl. Abb. 42 und 43, S. 57; Anh. Tab. 10, S. 87). Dies könnte wiederum mit der

Osteoklasten-Inhibition durch Baicalein zusammenhängen, da von diesen Zellen die Formation des harten Kallus abhängt [Schindeler et al. 2008].

4.5 Polychrome Sequenzmarkierung

Die Ergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung weisen deutlich darauf hin, dass die Frakturheilung der nicht ovariectomierten Versuchstiere derjenigen der restlichen Gruppen überlegen ist. Im Hinblick auf den plattenfernen Kallusbereich konnte eine signifikant größere Fläche der NON OVX-Tiere im Vergleich zur 1-mg-Baicalein-Gruppe und eine hoch signifikant größere Fläche in Bezug auf die 100-mg-Baicalein-Gruppe ermittelt werden (vgl. Abb. 55, S. 64; Anh. Tab. 12, S. 88). Dieses mithilfe der Calcein-Grün-Markierung visualisierte Endergebnis, hatte sich bereits bis Tag 20 des Versuches herauskristallisiert. Zu diesem Zeitpunkt konnten für NON OVX schon hoch signifikant größere Werte als bei der 10 mg Baicalein Gruppe und eine höchst signifikant größere Fläche im Vergleich zu den restlichen Tieren gemessen werden (vgl. Abb. 56, S. 64; Anh. Tab. 12, S. 88).

Des Weiteren verdeutlicht die Analyse der frühesten Überbrückung des Frakturspalts, dass im Falle der nicht osteoporotischen Tibiae der NON OVX-Ratten eine schnellere Wiederangliederung der Frakturrenden stattfand. Bemerkenswert ist diesbezüglich gleichwohl die zwei bis drei Tage frühere Überbrückung der Frakturrenden bei allen Baicalein-Gruppen im Vergleich zu den ovariectomierten, unbehandelten Tieren. Hier könnte die den Flavonoiden, also auch Baicalein, inhärente Wirkung als Phytoöstrogen eine Rolle spielen [Choi et al. 2013]. Es wurde jedoch gezeigt, dass Baicalein die Osteoblasten-Differenzierung weniger durch seine Östrogen-ähnliche Wirkung, sondern über den Wnt-Signalweg initiiert [Guo et al. 2011]. Letzterer führt über Aktivierung des Strukturproteins beta-Catenin zur Transkription von Osteogenese-Genen und schließlich auch zu einer verbesserten Knochenmineralisierung. Dieser osteoanabole Effekt hat sich womöglich positiv auf die Frakturüberbrückung ausgewirkt.

Die schlechteren Resultate der ovariectomierten Ratten sind höchstwahrscheinlich auch auf die durch Osteoporose beeinträchtigte Angiogenese und Differenzierung mesenchymaler Zellen zurückführbar [Cheung et al. 2016; Chen et al. 2016; Pang et al. 2015].

Bezüglich des plattennahen Kallus konnten allerdings für keinen Versuchszeitraum signifikante Unterschiede festgestellt werden (vgl. Abb. 52, S. 62; Anh. Tab. 11, S. 87).

Auffällig ist unterdessen die in der Fluoreszenzmikroskopie gemessene endostale Kallusgesamtfläche in Relation zur in der Mikroradiographie erfassten endostalen Kallusdichte. Die Auswertung beider Parameter in der Versuchsgruppe NON OVX ergab, verglichen mit den anderen Versuchsgruppen, sowohl eine signifikant größere Fläche als auch eine deutlich höhere Dichte. Der endostale Kallus ist besonders wichtig für die Stabilisierung der Fraktur, während der periostal gebildete Spindel- oder Kugelkallus dabei eine untergeordnete Rolle spielt. Bereits innerhalb der ersten 20 Tage der Frakturheilung zeichnete sich ein deutlich gesteigertes endostales Kalluswachstum der nicht ovariectomierten Tiere ab (NON OVX höchst signifikant zu OVX, 1 mg Baicalein und 100 mg Baicalein). Von Tag 21 bis 29 ist diese Entwicklung allerdings rückläufig und es kam bei den Gruppen OVX, 10 mg Baicalein und 100 mg Baicalein zu einer größeren Kallusentwicklung als bei den unbehandelten NON OVX-Tieren (vgl. Abb. 58 und 59, S. 66; Anh. Tab. 13, S. 88). Dieser Trend wird auch im Falle des plattenfernen Kalluswachstums deutlich. Während in der späten Phase der Frakturheilung bei NON OVX nur 30% des vorher manifestierten Kallus entstanden, bildeten sich bei OVX 133 %, bei 1 mg Baicalein 50 %, bei 10 mg Baicalein 64 % und bei 100 mg Baicalein 103 % der zuvor entwickelten Kallusfläche (vgl. Abb. 55 und 56, S. 64; Anh. Tab. 12, S. 88).

Die negative Auswirkung der Osteoporose auf die frühe Periode der Frakturheilung ist bereits seit einigen Jahren bekannt [Xu et al. 2003]. Es wird mittlerweile angenommen, dass die protrahierte Kallusbildung der Ovariectomie-induzierten osteoporotischen Fraktur in Zusammenhang mit der verzögerten Expression der Östrogenrezeptoren alpha und beta steht [Chow et al. 2014]. Dies würde den Rückstand der Kallusentwicklung während der primären Heilungsphase erklären. Zweifelsohne stieg die Rate des Kalluswachstums später im Vergleich zu NON OVX, da in letzterer Gruppe bereits die Kallushärtung und die Entstehung von Geflechtknochen und somit kein Kalluswachstum mehr erfolgte. Dem gegenüber stehen jedoch Studien, welche größere Unterschiede der Frakturheilung zwischen ovariectomierten und nicht ovariectomierten Ratten nach 4 bis 6 Wochen beziehungsweise in der mittleren und späten Heilungsphase sehen [Oliver et al. 2013; Hao et al. 2007]. Auf Grund der frühzeitigen Beendigung des Versuches vor dem Hintergrund der ausgeprägten Nebenwirkungen des Baicaleins konnte der Heilungsverlauf leider nicht über eine Dauer von 4 Wochen hinaus beobachtet werden. Es bleibt also fraglich, wie das Kalluswachstum und die Kallushärtung bezüglich der ovariectomierten Tiere verlaufen

wäre. Tatsächlich konnten diese das Kalluswachstum der nicht ovariectomierten Ratten weder bezüglich der endostalen noch der plattenfernen Gesamtkallusfläche einholen. Somit ist auch die absolute Gesamtfläche des kompletten Kallus bei NON OVX signifikant größer als bei den mit Baicalein behandelten Versuchstieren (vgl. Abb. 61, S. 67; Anh. Tab. 14, S. 89). Dennoch scheint die mittlere Konzentration des Baicaleins einen vorteilhaften Einfluss auf die Kallusentwicklung gehabt zu haben. Die Tiere bildeten innerhalb der ersten 20 Tage eine signifikant größere endostale Kallusfläche im Vergleich zu OVX sowie eine größere Gesamtfläche des kompletten Kallus aus (vgl. Abb. 59, S. 66; Anh. Tab. 13, S. 88). Es ist demnach denkbar, dass die niedrigere Dosis Baicalein im subtherapeutischen Bereich lag, während die höchste Konzentration zu einer übermäßigen subkutanen Baicalein-Ausfällung geführt und damit die Entzündungsreaktion provoziert hat. Auch während des durch Li et al. (2015) durchgeführten Versuches, der die Induktion der Osteoblasten-Differenzierung durch Baicalein nachwies, wurde eine tägliche Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht gewählt. Hervorzuheben ist, dass der Heilungsmechanismus metaphysaler Knochen von dem der Diaphysen abweicht. Der schnellere Heilungsprozess, welcher vermutlich mit der großen Anzahl mesenchymaler Stammzellen im metaphysalen Knochenmark zusammenhängt, und die Entstehung des endostalen Kallus während der Trabekelheilung unterscheiden sich von der langsameren Regeneration diaphysaler Frakturen. Diese heilen unter Ausbildung eines externen periostalen Kallus mit Knorpelstehung [Sandberg et al. 2016]. Baicalein könnte also die Fähigkeit besitzen, genau diesen Mechanismus der endostalen Kallusbildung und Frakturstabilisierung zu fördern.

4.6 Schlussfolgerungen

Ein positiver Einfluss des Lipoxygenasehemmers Baicalein auf die metaphysäre Frakturheilung osteoporotischer Knochen konnte vor allem für die endostale Kallusbildung, sowie die Frakturüberbrückung gezeigt werden.

Aus den Ergebnissen des biomechanischen Belastungstests ließ sich jedoch keine Verbesserung der Kallusfestigkeit und –elastizität ableiten.

Auch das mit Hilfe der Mikro-Computertomographie ermittelte Kortikalisvolumen und deren BMD wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Dennoch hat sich während dieser Untersuchung herauskristallisiert, dass die ovariectomierten unbehandelten Tiere eine signifikant geringere Kallusdichte gegenüber den nicht ovariectomierten Ratten

aufwiesen, während für die Baicalein-Gruppen und NON OVX ähnliche Werte ermittelt wurden. Das Kallusvolumen der mit der höchsten Baicalein-Konzentration behandelten Tiere lag allerdings signifikant unter dem der nichtovarektomierten. Dieses Resultat könnte für eine bessere Wirksamkeit der niedrigeren Baicalein-Konzentrationen sprechen.

Die Annahme deckt sich mit der mikroradiographischen Analyse, die bezüglich der distalen plattennahen Kortikalisdicke für die mit 1 mg und 10 mg Baicalein behandelten Versuchstiere signifikant größere Werte im Vergleich zu den Gruppen NON OVX und OVX demonstrierte. Obwohl die Frakturheilung der nicht osteoporotischen Knochen überlegen war, kann eine Heilungsverbesserung durch Baicalein gegenüber einer unbehandelten osteoporotischen Fraktur angenommen werden.

Auch die im Zuge der polychromen Sequenzmarkierung untersuchte Überbrückung des Frakturspalts fand bei den mit Baicalein behandelten Versuchstieren zwei bis drei Tage früher statt als bei der unbehandelten ovariectomierten Gruppe. Dennoch wurden im Hinblick auf die nicht ovariectomierten Ratten in der frühen Phase der Frakturheilung ein signifikant größere plattenferne Kallusfläche und letztlich eine größere Gesamtfläche des endostalen Kallus ermittelt. Da die mit 10 mg Baicalein behandelten Ratten indessen innerhalb der ersten 20 Tage eine signifikant größere endostale Kallusfläche im Vergleich zu OVX ausbildeten, manifestiert sich in dieser Untersuchung erneut der Vorteil der Applikation der mittleren Baicalein-Konzentration in Relation zum lediglich ovariectomierten Kollektiv.

Unter Berücksichtigung, dass besonders der endostale Kallus zur Frakturstabilisierung beiträgt, könnte hier ein Ansatzpunkt für weitergehende Forschungsprojekte bestehen. Dabei wäre die Wahl einer veränderten Applikationsform des Baicaleins sinnvoll, um Spritzabszesse zu vermeiden und eine bessere Wirkstoffverteilung zu erzielen.

5 Zusammenfassung

Die systemische Skeletterkrankung Osteoporose zeichnet sich durch eine reduzierte Knochenmineraldichte und eine Schädigung der Mikroarchitektur des Knochengewebes aus. Die globale Rolle der Osteoporose bedingt ihre Einstufung durch die WHO als eine der 10 wichtigsten Volkskrankheiten [Bartl 2011]. Auch die Heilung der osteoporotischen Fraktur ist vor allem in der frühen Phase durch Minderperfusion sowie reduzierte Kallusformation und –qualität erschwert [Xu et al. 2003]. Die Therapie der metaphysären Fraktur des osteoporitischen Knochens durch Lipoxigenase-Hemmer stellt einen neuen Ansatz in der Osteoporose Behandlung dar. Schon länger wird, wegen der Auswirkung der 5-Lipoxigenasen auf die Frakturheilung, ein osteoanaboler Einfluss der Lipoxigenase-Inhibitoren angenommen [Lee et al 2012]. Der Effekt des selektiven 12/15-Lipoxigenase-Inhibitors Baicalein auf die manifeste Osteoporose wurde jedoch kaum untersucht. Für das Flavonoid des Baikalmkrautes (*Scutellaria baicalensis*) wurde bereits eine anti-inflammatorische sowie eine anti-kanzerogene Wirkung nachgewiesen [Chen et al 2013].

60 weibliche Sprague-Dawley-Ratten (drei Monate alt, im Durchschnitt $275,4 \pm 15$ g schwer) wurden randomisiert zu gleichen Teilen in 5 Gruppen zu jeweils 12 Tieren aufgeteilt. Die Gruppe NON OVX blieb ohne jegliche Behandlung, während die anderen Tiere einer Ovariectomie unterzogen wurden. Bis zur 8 Wochen später vorgenommenen bilateralen Osteotomie der Tibiae hatten die ovariectomierten Ratten eine manifeste Osteoporose entwickelt. Dabei wurde an jeder Tibia-Metaphyse ein transversaler Frakturspalt von 0,5 cm erzeugt und durch eine 5-Loch-Leibinger-Platte aus Titan und je vier Schrauben osteosynthetisch versorgt. Die Baicalein-Applikation erfolgte ab dem Tag nach der Osteotomie bei dreien der ovariectomierten Gruppen in den Konzentrationen 1 mg/kg Körpergewicht, 10 mg/kg Körpergewicht und 100 mg/kg Körpergewicht. An Tag 15, 20 und 28 nach Osteotomie wurden allen Tieren subkutan drei Fluorochrome gespritzt, um die Ergebnisse im Zuge der polychromen Sequenzmarkierung evaluieren zu können. Der Versuch wurde 4 Wochen nach Osteotomie mit der Obduktion der Ratten beendet. Die Tibiae wurden einem biomechanischen Belastungstest, einer Mikro-Computertomographie-Analyse sowie

einer mikroradiographischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung unterzogen. Die Ergebnisse wurden durch den gekoppelten Einsatz der Varianzanalyse one-way ANOVA und den Tukey-Kramer post-hoc-Test analysiert und das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt.

Der Einsatz des Lipoxigenasehemmers Baicalein zeigte positive Effekte auf die Frakturheilung im Vergleich zu den unbehandelten osteoporotischen Kochen. Die niedrigste und mittlere Baicalein-Konzentration resultierten in einer dickeren plattennahen Kortikalis als OVX und NON OVX. Weiterhin konnte für die mit 10 mg Baicalein behandelten Tiere eine größere endostale Kallusfläche in Relation zu OVX festgestellt werden. Hinzu kommt, dass die Frakturüberbrückung der OVX-Ratten bis zu drei Tage später stattfand als bei den Baicalein-Gruppen. Dennoch fielen die Werte der nicht osteoporotischen Knochen vor allem in Bezug auf die endostale Kallusdichte und -fläche sowie die gesamte Kallusfläche auch gegenüber den mit Baicalein behandelten Versuchsgruppen signifikant besser aus.

Abschließend sind die besseren Ergebnisse der niedrigeren Baicalein Konzentrationen herauszustellen. Die schlechte Löslichkeit des Wirkstoffes und die nachfolgende Abszess-Bildung dominierten besonders bei den Tieren, die mit der höchsten Konzentration Baicalein behandelt wurden. Die Baicalein-Applikation hat jedoch das Potential, die Heilung der metaphysären Fraktur bei manifester Osteoporose zu unterstützen und sowohl eine frühere Frakturüberbrückung als auch bessere biomechanische Ergebnisse zu erzielen. Während die weit verbreiteten Bisphosphonate und der RANK-L-Inhibitor Denosumab die Kallusreifung aufhalten [Hegde et al. 2016], scheint diese durch Baicalein beschleunigt zu werden. Allerdings bleiben die hier gelieferten Ansätze weiter zu untersuchen. Vor allem auch die phytoöstrogenen Eigenschaften und deren Relevanz für den antiosteoporotischen Einfluss des Flavonoids sind zu prüfen. Eine veränderte Darreichungsform könnte darüber hinaus die anti-inflammatorische und osteoanabole Wirkung des Lipoxigenasehemmers verstärken und genauere Erkenntnisse über den Effekt der Osteoklasteninhibition auf die Frakturheilung erbringen. Schließlich würde auch die Präzipitation des Baicaleins im Gewebe und damit die Abszessbildung vermieden werden, wenn die Darreichung beispielsweise mit dem Futter erfolgen würde.

6 Anhang

6.1 Körpergewicht der Tiere im Verlauf

Tabelle 1: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Körpergewichte der Tiere über die Versuchswochen in Gramm

Versuchswochen	NON OVX	OVX	1 mg Baicalein	10 mg Baicalein	100 mg Baicalein
0	266 \pm 17	278 \pm 16	282 \pm 16	274 \pm 16	277 \pm 11
1	278 \pm 13	292 \pm 14	298 \pm 15 (β^*)	289 \pm 15	291 \pm 13
2	277 \pm 12	324 \pm 21 (β^*)	334 \pm 20 (β^*)	315 \pm 17 (β^*)	316 \pm 13 (β^*)
3	290 \pm 11	355 \pm 26 (β^*)	364 \pm 26 (β^*)	341 \pm 19 (β^*)	344 \pm 18 (β^*)
4	296 \pm 10	367 \pm 28 (β^*)	371 \pm 29 (β^*)	351 \pm 22 (β^*)	351 \pm 25 (β^*)
5	304 \pm 11	371 \pm 32 (β^*)	377 \pm 31 (β^*)	356 \pm 24 (β^*)	361 \pm 25 (β^*)
6	304 \pm 13	372 \pm 33 (β^*)	379 \pm 32 (β^*)	358 \pm 27 (β^*)	357 \pm 23 (β^*)
7	307 \pm 25	381 \pm 35 (β^*)	390 \pm 34 (β^*)	366 \pm 28 (β^*)	361 \pm 23 (β^*)
8	307 \pm 25	378 \pm 39 (β^*)	383 \pm 20 (β^*)	367 \pm 29 (β^*)	365 \pm 24 (β^*)
9	297 \pm 10	346 \pm 39 (β^*)	343 \pm 15 (β^*)	334 \pm 30 (β^*)	338 \pm 22 (β^*)
10	303 \pm 7	350 \pm 39 (β^*)	346 \pm 17 (β^*)	331 \pm 30	344 \pm 22 (β^*)
11	306 \pm 10	356 \pm 40 (β^*)	349 \pm 16 (β^*)	341 \pm 27 (β^*)	345 \pm 22 (β^*)
12	311 \pm 10	350 \pm 48 (β^*)	345 \pm 17	341 \pm 30	336 \pm 22

β =signifikant zu NON OVX; *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$

6.2 Uterusgewicht

Tabelle 2: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Uterusgewichte jeder Versuchsgruppe am Tag der Obduktion

Messgröße	NON OVX	OVX	1 mg Baicalein	10 mg Baicalein	100 mg Baicalein
Uterus- gewicht (g)	0,64 \pm 0,17	0,11 \pm 0,02 (β^{***})	0,13 \pm 0,09 (β^{***})	0,14 \pm 0,04 (β^{***})	0,15 \pm 0,03 (β^{***})

β =signifikant zu NON OVX, ***= $p < 0,001$

6.3 Ergebnisse des biomechanischen Tests

Tabelle 3: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des biomechanischen Tests

Parameter	NON OVX	OVX	1 mg Baicalein	10 mg Baicalein	100 mg Baicalein
Elastizität (N/mm)	27,97 \pm 8,69	16,46 \pm 7,76	14,99 \pm 7,79	15,35 \pm 5,89	20,36 \pm 7,95
Streckgrenze (N)	43,09 \pm 31,78	38,13 \pm 31,46	14,03 \pm 11,36	7,76 \pm 1,34	13,90 \pm 3,91
Maximalkraft (N)	51,15 \pm 31,32	48,00 \pm 33,09	25,97 \pm 16,07	13,92 \pm 2,26	19,54 \pm 4,79

6.4 Ergebnisse der Mikrocomputertomographie

Tabelle 4: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen der Weichteile

Weichteil- parameter	NON OVX	OVX	1 mg Baicalein	10 mg Baicalein	100 mg Baicalein
Mittlere Dichte (g/cm ³)	0,093 \pm 0,024	0,096 \pm 0,019	0,115 \pm 0,023	0,106 \pm 0,025	0,118 \pm 0,014
Volumen (mm ³)	92,10 \pm 56,10	97,49 \pm 36,20	58,03 \pm 20,95	90,07 \pm 31,42	71,05 \pm 31,07

Tabelle 5: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen der Kortikalis

Kortikalis- parameter	NON OVX	OVX	1 mg Baicalein	10 mg Baicalein	100 mg Baicalein
Mittlere BMD (g/cm ³)	1,18 \pm 0,035	1,14 \pm 0,13	1,20 \pm 0,04	1,19 \pm 0,02	1,20 \pm 0,03
Volumen (mm ³)	22,51 \pm 7,95	18,45 \pm 6,31	20,74 \pm 8,89	20,01 \pm 4,01	23,26 \pm 4,23

Tabelle 6: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des Kallus

Kallus- parameter	NON OVX	OVX	1 mg Baicalein	10 mg Baicalein	100 mg Baicalein
Mittlere Dichte (g/cm ³)	0,61 \pm 0,04	0,55 \pm 0,04 (β^{**})	0,60 \pm 0,04	0,57 \pm 0,03	0,58 \pm 0,03
Volumen (mm ³)	77,70 \pm 30,75	56,44 \pm 17,24	53,84 \pm 26,03	51,70 \pm 17,41	47,75 \pm 15,77 (β^*)

β = signifikant zu NON OVX; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$

Tabelle 7: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des gesamten Knochens

Parameter	NON OVX	OVX	1 mg Baicalein	10 mg Baicalein	100 mg Baicalein
Mittlere BMD (g/cm ³)	0,75 \pm 0,10	0,70 \pm 0,08	0,78 \pm 0,10	0,75 \pm 0,06	0,79 \pm 0,08
Volumen (mm ³)	100,73 \pm 24,76	74,92 \pm 21,33	74,31 \pm 24,28	71,71 \pm 18,80 (β^*)	71,0 \pm 15,77 (β^*)

β = signifikant zu NON OVX; * = $p < 0,05$

Tabelle 8: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des gesamten Gewebes

Parameter	NON OVX	OVX	1 mg Baicalein	10 mg Baicalein	100 mg Baicalein
Mittlere BMD (g/cm ³)	0,47 \pm 0,14	0,37 \pm 0,07	0,47 \pm 0,09	0,40 \pm 0,08	0,43 \pm 0,13
Volumen (mm ³)	208,40 \pm 72,13	143,60 \pm 10,83	134,30 \pm 40,06	161,70 \pm 38,55	142,00 \pm 45,10
BV/TV (%)	56,25 \pm 13,97	44,17 \pm 6,74	55,07 \pm 8,55	45,47 \pm 10,44	51,87 \pm 7,95

6.5 Ergebnisse der Mikroradiographie

Tabelle 9: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Kortikalismessgrößen

Kortikalis- Parameter	NON OVX	OVX	1 mg Baicalein	10 mg Baicalein	100 mg Baicalein
Kortikalisdicke distal plattennah (mm)	0,31 \pm 0,16 (γ^*)	0,27 \pm 0,15	0,46 \pm 0,11 (β^*) (γ^*)	0,47 \pm 0,15 (β^*) (γ^*)	0,38 \pm 0,1 8
Kortikalisdicke distal plattenfern (mm)	0,37 \pm 0,20	0,42 \pm 0,15	0,44 \pm 0,12	0,36 \pm 0,15	0,49 \pm 0,1 9
Kortikalisdichte distal plattennah (%)	99,07 \pm 0,97	99,58 \pm 0,60	99,36 \pm 0,74	99,37 \pm 0,72	98,73 \pm 1,96
Kortikalisdichte distal plattenfern (%)	98,45 \pm 3,58	98,59 \pm 2,32	99,30 \pm 0,92	99,40 \pm 0,68	99,39 \pm 1,18

β = signifikant zu NON OVX, γ = signifikant zu OVX, *= $p < 0,05$

Tabelle 10: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Kallusmessgrößen

Kallus-Parameter	NON OVX	OVX	1 mg Baicalein	10 mg Baicalein	100 mg Baicalein
Kallusdicke plattennah (mm)	0,79 \pm 0,58	0,85 \pm 0,33	0,74 \pm 0,51	0,57 \pm 0,44	0,68 \pm 0,37
Kallusdicke plattenfern (mm)	0,87 \pm 0,75	0,69 \pm 0,37	0,58 \pm 0,39	0,97 \pm 0,39	0,59 \pm 0,37
Kallusdicke plattennah (%)	64,50 \pm 13,08	47,93 \pm 10,68	65,33 \pm 13,94	64,57 \pm 18,42	55,82 \pm 13,52
Kallusdicke plattenfern (%)	65,09 \pm 15,44 (γ^*)	45,97 \pm 15,49	66,31 \pm 14,46 (γ^{**})	55,01 \pm 11,69	52,98 \pm 17,04
Kallusdicke endostal (%)	56,50 \pm 16,51	33,96 \pm 5,10 (β^{**})	31,32 \pm 10,95 (β^{***})	40,08 \pm 11,23 (β^*)	41,99 \pm 17,63 (β^*)

β = signifikant zu NON OVX, γ = signifikant zu OVX, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$

6.6 Ergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung

Tabelle 11: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des plattennahen Kallus

Kallusfläche plattennah	NON OVX	OVX	1 mg Baicalein	10 mg Baicalein	100 mg Baicalein
Gesamtfläche (mm ²)	0,76 \pm 1,41	1,08 \pm 0,96	0,64 \pm 0,64	1,00 \pm 0,88	1,09 \pm 1,04
CG- Fläche (mm ²)	0,44 \pm 1,02	0,43 \pm 0,50	0,34 \pm 0,33	0,52 \pm 0,61	0,54 \pm 0,58
AK- Fläche (mm ²)	0,26 \pm 0,37	0,58 \pm 0,44	0,26 \pm 0,34	0,44 \pm 0,39	0,50 \pm 0,56

Tabelle 12: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des plattenfernen Kallus

Kallusfläche plattenfern	NON OVX	OVX	1 mg Baicalein	10 mg Baicalein	100 mg Baicalein
Gesamtfläche (mm ²)	3,20 \pm 1,05	2,46 \pm 1,04	1,98 \pm 1,43 (β^*)	2,59 \pm 1,23	1,65 \pm 1,02 (β^{**})
CG- Fläche (mm ²)	2,38 \pm 0,71	1,02 \pm 0,81 (β^{***})	1,24 \pm 0,73 (β^{***})	1,45 \pm 0,76 (β^{**})	0,74 \pm 0,47 (β^{***})
AK- Fläche (mm ²)	0,72 \pm 0,58	1,36 \pm 1,02	0,62 \pm 0,71	0,93 \pm 0,56	0,76 \pm 0,68

β = signifikant zu NON OVX, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$

Tabelle 13: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgrößen des endostalen Kallus

Kallusfläche endostal	NON OVX	OVX	1 mg Baicalein	10 mg Baicalein	100 mg Baicalein
Gesamtfläche (mm ²)	3,02 \pm 1,30	1,66 \pm 1,24	1,42 \pm 1,13 (β^{**})	2,51 \pm 1,32	2,04 \pm 1,15
CG- Fläche (mm ²)	2,23 \pm 0,99	0,28 \pm 0,38 (β^{***})	0,74 \pm 0,62 (β^{***})	1,37 \pm 1,36 (γ^*)	1,04 \pm 0,62 (β^{***})
AK- Fläche (mm ²)	0,63 \pm 0,56	1,26 \pm 0,98	0,57 \pm 0,53	0,96 \pm 0,57	0,87 \pm 0,71

β = signifikant zu NON OVX, γ = signifikant zu OVX, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$

Tabelle 14: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messgröße für den gesamten Kallus

Kallusfläche komplett	NON OVX	OVX	1 mg Baicalein	10 mg Baicalein	100 mg Baicalein
Gesamtfläche kompletter Kallus	7,12 \pm 2,93	5,20 \pm 2,28	4,04 \pm 1,90 (β^{**})	6,10 \pm 2,58	4,78 \pm 2,48 (β^*)

β = signifikant zu NON OVX, *=p

7 Literaturverzeichnis

- Aerssens J, van Audekercke R, Talalaj M, Geusens P, Bramm E, Dequeker J (1996): Effect of 1alpha-vitamin D3 and estrogen therapy on cortical bone mechanical properties in the ovariectomized rat model. *Endocrinology* 137 (4), 1358–1364
- Akao T, Sato K, He J, Ma C, Hattori M (2013): Baicalein 6-O-beta-D-glucopyranuronoside is a main metabolite in the plasma after oral administration of baicalin, a flavone glucuronide of scutellariae radix, to rats. *Biol Pharm Bull* 36 (5), 748–753
- Augat, P, Simon U, Liedert A, Claes L (2005): Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporos Int* 16 (2), 43
- Bartl R: Osteoporose. Prävention, Diagnostik, Therapie. Unter Mitarbeit von Christoph Bartl. 4. Aufl.; Georg Thieme Verlag. Stuttgart 2011
- Binkley N, Bolognese M, Sidorowicz-Bialynicka A, Vally T, Trout R, Miller C, Buben CE, Gilligan JP, Krause DS (2012): A phase 3 trial of the efficacy and safety of oral recombinant calcitonin: the Oral Calcitonin in Postmenopausal Osteoporosis (ORACAL) trial. *J Bone Miner Res* 27 (8), 1821–1829
- Blake GM, Fogelman I (2009): The clinical role of dual energy X-ray absorptiometry. *Eur J Radiol* 71 (3), 406–414
- Bleibler F, Rapp K, Jaensch A, Becker C, König HH (2014): Expected lifetime numbers and costs of fractures in postmenopausal women with and without osteoporosis in Germany: a discrete event simulation model. *BMC Health Serv Res* 14, 284
- Boyce BF (2013): Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res* 92 (10), 860–867
- Boyd SK, Davison P, Muller R, Gasser JA (2006): Monitoring individual morphological changes over time in ovariectomized rats by in vivo micro-computed tomography. *Bone* 39 (4), 854–862
- Buck J: Radiologie Träger des Fortschritts. Festschrift für Friedrich H.W, Heuck. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1996
- Cao Y, Mori S, Mashiba T, Westmore MS, Ma L, Sato M et al. (2002): Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 17 (12), 2237–2246
- Chapurlat R (2008): Epidémiologie de l'ostéoporose. *J Soc Biol* 202 (4), 251–255
- Chen GX, Zheng S, Qin S, Zhong ZM, Wu XH, Huang ZP, Li W, Ding RT, Yu H, Chen JT (2014): Effect of low-magnitude whole-body vibration combined with alendronate in ovariectomized rats: a random controlled osteoporosis prevention study. *PloS one* 9 (5), e96181
- Chen L; Yang L, Yao M, Cui XJ, Xue CC, Wang YJ, Shu B (2016): Biomechanical Characteristics of Osteoporotic Fracture Healing in Ovariectomized Rats: A Systematic Review. *PloS one* 11 (4), e0153120

- Chen T, Chen M, Yao X, Long W, Chen H, Li L (2008): A new three-point bending test for bone biomechanical properties of rat's tibia. *J Biomech Eng* 25 (2), 341–345
- Chen YJ, Wu CS, Shieh JJ, Wu JH, Chen HY, Chung TW, Chen YK, Lin CC (2013): Baicalein Triggers Mitochondria-Mediated Apoptosis and Enhances the Antileukemic Effect of Vincristine in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia CCRF-CEM Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, 19
- Cheung WH, Miclau T, Chow SKH, Yang FF, Alt V (2016): Fracture healing in osteoporotic bone. *Injury* 47, 21-26
- Choi RCY, Zhu JTT, Yung AWY, Lee PSC, Xu, Sherry L, Guo AJY, Zhu KY, Dong TT, Tsim KW (2013): Synergistic Action of Flavonoids, Baicalein, and Daidzein in Estrogenic and Neuroprotective Effects: A Development of Potential Health Products and Therapeutic Drugs against Alzheimer's Disease. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, 635694
- Chow SK, Leung KS, Qin L, Wei F, Cheung WH (2014): Callus formation is related to the expression ratios of estrogen receptors-alpha and -beta in ovariectomy-induced osteoporotic fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 134 (10), 1405–1416
- Cianferotti L, D'Asta F, Brandi ML (2013): A review on strontium ranelate long-term antifracture efficacy in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 5 (3), 127–139
- Claes L, Recknagel S, Ignatius A (2012): Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol* 8 (3), 133–143
- Clemmons JJ (1955): Procedures and errors in quantitative autoradiography. *Biochim Biophys Acta* 17, 297–321
- DVO: Dachverband Osteologie e.V. (Hg.) (2014): Entwurf zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen. S3-Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V.
- Danielsen CC, Mosekilde L, Svenstrup B (1993): Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. *Calcif Tissue Int* 52 (1), 26–33.
- Deschamps JD, Kenyon VA, Holman TR (2006): Baicalein is a potent in vitro inhibitor against both reticulocyte 15-human and platelet 12-human lipoxygenases. *Bioorg Med Chem* 14 (12), 4295–4301
- Dimai, HP (2009): Diagnostik der Osteoporose. *Wien Med Wochenschr* 159 (9-10), 241–246
- Drenckhahn D, Kugler P: Knochengewebe: Mikrostruktur des Knochens. In: Drenckhahn D (Hg.): Benninghoff Drenckhahn Anatomie. Bd: 1: Mikroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München 2008, 135
- Dupuis J, Meunier PJ (1994): Treatment of Vertebral Osteoporosis with Fluoride Salts. Schiff I, Lorrain J, Plouffe L, Ravnkar VA, Speroff L, Watts NB (Hg.): Comprehensive Management of Menopause. *Clinical Perspectives in Obstetrics and Gynecology*. Springer, New York (NY) 1994, 185–192

- Egermann M, Schneider E, Evans CH, Baltzer AW (2005): The potential of gene therapy for fracture healing in osteoporosis. *Osteoporos Int* 16 (2), 8
- Enderle A, Forst R, Grimm T, Ingenhorst A, Lauen J, Mortier W: Orthopädie und Orthopädische Chirurgie: Systemerkrankungen. In: L. Zichner und C. J. Wirth (Hg.): Orthopädie und Orthopädische Chirurgie. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 2003, 169.
- Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W (1999): Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure. *Radiologe* 39 (3), 203–212
- Engstrom A, Bellman S, Engfeldt B (1955): Microradiography. I. Microradiography: a review. *Br J Radiol* 28 (334), 517–532
- Eriksen EF, Díez-Pérez A, Boonen S (2014): Update on long-term treatment with bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis: a systematic review. *Bone* 58, 126–135
- Esbrit P, Alcaraz MJ (2013): Current perspectives on parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) as bone anabolic therapies. *Biochem pharmacol* 85 (10), 1417–1423
- Frost HM, Jee WS (1992): On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner* 18 (3), 227–236
- Gandhi NM (2013): Baicalein protects mice against radiation-induced DNA damages and genotoxicity. *Mol. Cell. Biochem.* 379 (1-2), 277–281
- Garnero P, Delmas PD (2004): Contribution of bone mineral density and bone turnover markers to the estimation of risk of osteoporotic fracture in postmenopausal women. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 4 (1), 50–63
- Gauthier A, Kanis JA, Jiang Y, Dreinhöfer K, Martin M, Compston J, Borgström F, Cooper C, McCloskey E (2012): Burden of postmenopausal osteoporosis in Germany: estimations from a disease model. *Arch Osteoporos* 7 (1-2), 209–218
- Genant HK, Delmas PD, Chen P, Jiang Y, Eriksen EF, Dalsky GP, Marcus R, San Martin J (2007): Severity of vertebral fracture reflects deterioration of bone microarchitecture. *Osteoporosis Int* 18 (1), 69–76
- Gielkens PFM, Schortinghuis J, Jong JR, Huysmans MCDNJM, van Leeuwen MBM, Raghoobar GM, Bos RR, Stegenga B (2008): A comparison of micro-CT, microradiography and histomorphometry in bone research. *Arch Oral Biol* 53 (6), 558–566
- Grifka J, Kuster M: Systemerkrankungen: Skelettsystemerkrankungen des Erwachsenen. In: Grifka J, Kuster M (Hrsg.): Orthopädie und Unfallchirurgie. Für Praxis, Klinik und Facharztprüfung. 1. Auflage; Springer Berlin, Heidelberg 2011, 171–173
- Guggenbuhl P, Bodic F, Hamel L, Basle MF, Chappard D (2006): Texture analysis of X-ray radiographs of iliac bone is correlated with bone micro-CT. *Osteoporosis Int* 17 (3), 447–454
- Guo AJY, Choi RCY, Cheung AWH, Chen VP, Xu SL, Dong TTX et al. (2011): Baicalin, a flavone, induces the differentiation of cultured osteoblasts: an action via the Wnt/beta-catenin signaling pathway. In: *J Biol Chem* 286 (32), S. 27882–27893. DOI: 10.1074/jbc.M111.236281.

- Gurney EP, Nachtigall MJ, Nachtigall LE, Naftolin F (2014): The Women's Health Initiative trial and related studies: 10 years later: a clinician's view. In: *J Steroid Biochem Mol Biol* **142**, S. 4–11. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2013.10.009.
- Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, Steinle T, Verheyen F, Linder R (2013): The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. *Dtsch Arztebl Int* **110** (4), 52–57
- Hao YJ, Zhang G, Wang YS, Qin L, Hung WY, Leung K, Pei FX (2007): Changes of microstructure and mineralized tissue in the middle and late phase of osteoporotic fracture healing in rats. In: *Bone* **41** (4), S. 631–638. DOI: 10.1016/j.bone.2007.06.006.
- Harsløf, T, Husted LB, Nyegaard M, Carstens M, Stenkjær L, Brixen K, Eiken P, Jensen JE, Børglum AD, Mosekilde L et al. (2011): Polymorphisms in the ALOX12 gene and osteoporosis. *Osteoporos Int* **22** (8), 2249–2259
- Hatano H, Siegel HJ, Yamagiwa H, Bronk JT, Turner RT, Bolander ME, Sarkar G (2004): Identification of estrogen-regulated genes during fracture healing, using DNA microarray. *J Bone Miner Metab* **22** (3), 224–235
- Hegde V, Jo JE, Andreopoulou P, Lane J M (2016): Effect of osteoporosis medications on fracture healing. *Osteoporos Int* **27** (3), 861–871
- Henriksen K, Andersen JR, Riis BJ, Mehta N, Tavakkol R, Alexandersen P, Byrjalsen I, Valter I, Nedergaard BS, Teglbjærg CS et al. (2013): Evaluation of the efficacy, safety and pharmacokinetic profile of oral recombinant human parathyroid hormone [rhPTH(1-31)NH(2)] in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone* **53** (1), 160–166
- Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA (2013): Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos* **8** (1-2), 136
- Hollebeeck S, Raas T, Piront N, Schneider YJ, Toussaint O, Larondelle Y, During A (2011): Dimethyl sulfoxide (DMSO) attenuates the inflammatory response in the in vitro intestinal Caco-2 cell model. *Toxicol Lett* **206** (3), 268–275
- Hollinger JO, Onikepe AO, MacKrell J, Einhorn T, Bradica G, Lynch S, Hart CE (2008): Accelerated fracture healing in the geriatric, osteoporotic rat with recombinant human platelet-derived growth factor-BB and an injectable beta-tricalcium phosphate/collagen matrix. *J Orthop Res* **26** (1), 83–90
- Ibrahim NI, Khamis MF, Mod Y, Mohd F, Abdullah S, Mohamed N, Shuid AN (2014): Targeted delivery of lovastatin and tocotrienol to fracture site promotes fracture healing in osteoporosis model: micro-computed tomography and biomechanical evaluation. *PloS one* **9** (12), e115595
- Ito M (2011): Recent progression in assessment of bone microstructure. *Nihon Rinsho* **69** (7), 1233–1238
- Jabbar S, Drury J, Fordham JN, Datta HK, Francis RM, Tuck SP (2011): Osteoprotegerin, RANKL and bone turnover in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Pathol* **64** (4), 354–357

- Jang EJ, Cha SM, Choi SM, Cha JD (2014): Combination effects of baicalein with antibiotics against oral pathogens. *Arch Oral Biol* 59 (11), 1233–1241
- Jee WS, Yao W (2001): Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1 (3), 193–207
- Josse R, Khan A, Ngui D, Shapiro M (2013): Denosumab, a new pharmacotherapy option for postmenopausal osteoporosis. *Curr Med Res Opin* 29 (3), 205–216
- Jowsey J, Riggs BL (1972): Assessment of bone turnover by microradiography and autoradiography. *Semin Nucl Med* 2 (1), 3–17
- Kaczmarczyk-Sedlak I, Wojnar W, Zych M, Ozimina-Kaminska E, Taranowicz J, Siwek A (2013): Effect of formononetin on mechanical properties and chemical composition of bones in rats with ovariectomy-induced osteoporosis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, 457052
- Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *J Bone Miner Res* 15 (3), S. 175–191
- Kammerlander C, Erhart S, Doshi H, Gosch M, Blauth M (2013): Principles of osteoporotic fracture treatment. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 27 (6), 757–769
- Kampmann P: Untersuchung zur Osteoporoseprävalenz und Versorgungswirklichkeit von Patienten mit osteoporosebedingten Frakturen in der deutschen Unfallchirurgie. *Med. Diss. München* 2008
- Kanis JA (2007): Assessment of Osteoporosis at the Primary Health Care Level. WHO Scientific Group Technical Report, World Health Organization Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases, Sheffield 2008
- Keck E (2003): Therapie der postmenopausalen Osteoporose. *Orthopäde* 32 (12), 1104–1109
- 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* 104 (5), 1906–1917
- Kim MH, Ryu SY, Bae MA, Choi JS, Min YK, Kim SH (2008): Baicalein inhibits osteoclast differentiation and induces mature osteoclast apoptosis. *Food Chem Toxicol* 46 (11), 3375–3382
- Kim SJ, Kim HJ, Kim HR, Lee SH, Cho SD, Choi CS, Nam JS, Jung JY (2012): Antitumor actions of baicalein and wogonin in HT-29 human colorectal cancer cells. *Mol Med Rep* 6 (6), 1443–1449
- Klinck RJ, Campbell GM, Boyd SK (2008): Radiation effects on bone architecture in mice and rats resulting from in vivo micro-computed tomography scanning. *Med Eng Phys* 30 (7), 888–895
- Kolios L, Daub F, Sehmisch S, Frosch KH, Tezval M, Stuermer KM, Wuttke W, Stuermer EK (2010): Absence of positive effect of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) on fracture healing in osteopenic rodent model. *Phytother Res* 24 (12), 1796–1806
- Komrakova M, Sehmisch S, Tezval M, Ammon J, Lieberwirth P, Sauerhoff C, Trautmann L, Wicke M, Dullin C, Stuermer KM, Stuermer EK (2013): Identification of a vibration regime favorable for bone healing and muscle in estrogen-deficient rats. *Calcif Tissue Int* 92 (6), 509–520

- Komrakova M, Stuermer EK, Tezval M, Stuermer KM, Dullin C, Schmelz U, Doell C, Durkaya-Burchhardt N, Fuerst B, Genotte T et al. (2014): Evaluation of twelve vibration regimes applied to improve spine properties in ovariectomized rats. *Bone Rep* 7, 172–180
- Komrakova M, Weidemann A, Dullin C, Ebert J, Tezval M, Stuermer KM, Sehmisch S (2015): The Impact of Strontium Ranelate on Metaphyseal Bone Healing in Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int* 97 (4), 391–401
- Krönke G, Uderhardt S, Katzenbeisser J, Schett G (2009): The 12/15-lipoxygenase pathway promotes osteoclast development and differentiation. *Autoimmunity* 42 (4), 383–385
- Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshioka M, Honjo H, Urabe M, Kitajima I, Semba I, Hirasawa Y (1999): Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. In: *J Steroid Biochem Mol Biol* 68 (5-6), 197–202
- Law MR, Hackshaw AK (1997): A meta-analysis of cigarette smoking, bone mineral density and risk of hip fracture: recognition of a major effect. *BMJ* 315 (7112), 841–846
- Lee JM, Park H, Noh ALSM, Kang JH, Chen L, Zheng T, Lee J, Ji SY, Jang CY, Shin CS et al. (2012): 5-Lipoxygenase mediates RANKL-induced osteoclast formation via the cysteinyl leukotriene receptor 1. *J Immunol* 189 (11), 5284–5292
- Leibbrandt A, Penninger JM (2008): RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci* 1143, 123–150
- Leitlinie Osteoporose s. DVO-Leitlinie 2014
- Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA (2008): The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 58 (5), 424–430
- Li C, Mori S, Li J, Kaji Y, Akiyama T, Kawanishi J, Norimatsu H (2001): Long-term effect of incadronate disodium (YM-175) on fracture healing of femoral shaft in growing rats. *J Bone Miner Res* 16 (3), 429–436
- Li SF, Tang JJ, Chen J, Zhang P, Wang T, Chen TY, Yan B1, Huang B1, Wang L1, Huang MJ1 et al. (2015): Regulation of bone formation by baicalein via the mTORC1 pathway. *Drug Des Devel Ther* 9, 5169–5183
- Lill CA, Hesseln J, Schlegel, U Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E (2003): Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. *J Orthop Res* 21 (5), 836–842
- Lüllmann-Rauch R: Histologie. Unter Mitarbeit von Paulsen F. 4. Auflage, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 2012
- Maier GS, Jakobs P, Roth KE, Kurth AA, Maus U (2013): Is there an epidemic vitamin D deficiency in German orthopaedic patients? *Clin Orthop Relat Res* 471 (9), 3029–3035
- Manolagas SC, Jilka RL (1995): Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 332 (5), 305–311
- Marsell R, Einhorn TA (2011): The biology of fracture healing. *Injury* 42 (6), 551–555

- Marshall D, Johnell O, Wedel H (1996): Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ* 312 (7041), 1254–1259
- Meunier PJ, Sebert JL, Reginster JY, Briancon D, Appelboom T, Netter P, Loeb G, Rouillon A, Barry S, Evreux JC et al. (1998): Fluoride salts are no better at preventing new vertebral fractures than calcium-vitamin D in postmenopausal osteoporosis: the FAVOStudy. *Osteoporos Int* 8 (1), 4–12
- Miller SC, Wronski TJ (1993): Long-term osteopenic changes in cancellous bone structure in ovariectomized rats. *Anatomic Rec* 236 (3), 433–441
- Moch H, Komminoth P, Zimmermann DR, Odermatt B, Probst-Hensch N, Bopp M: Pathologie: Aufgaben und Methoden. In: Böcker W, Denk H, Heitz U, Moch H (Hg.): Pathologie. 4. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer Verlag. München 2008, 3-34
- Morley P, Whitfield JF, Willick GE (2001): Parathyroid hormone: an anabolic treatment for osteoporosis. *Curr Pharm Des* 7 (8), 671–687
- Nachtigall MJ, Nazem TG, Nachtigall RH, Goldstein SR (2013): Osteoporosis risk factors and early life-style modifications to decrease disease burden in women. *Clin Obstet Gynecol* 56 (4), 650–653
- Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, Shimizu S, Moriya H, Einhorn TA, Yamazaki M (2002): Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34). *J Bone Miner Res* 17 (11), 2038–2047
- Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, Swain M, Mason RS, Murrell GA, Diwan AD, Diamond T (2001): Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone* 28 (1), 80–86
- Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P: Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie. 6. Auflage; Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 2009
- Ogura-Tomomatsu H, Asano K, Tomomatsu K, Miyata J, Ohmori N, Kodama M, Ueda S, Takihara T, Tanaka K, Kamiishi N et al. (2012): Predictors of osteoporosis and vertebral fractures in patients presenting with moderate-to-severe chronic obstructive lung disease. *COPD* 9 (4), 332–337
- Okuyay DO, Okuyay E, Dogan E, Kurtulmus S, Acet F, Taner CE (2013): Prolonged breast-feeding is an independent risk factor for postmenopausal osteoporosis. *Maturitas* 74 (3), 270–275
- Oliver RA, Yu Y, Yee G, Low AK, Diwan AD, Walsh WR (2013): Poor histological healing of a femoral fracture following 12 months of oestrogen deficiency in rats. *Osteoporos Int* 24 (10), 2581–2589
- Pang J, Guo HL, Ding DF, Wu YY, Zhao YF, Gu XF, Zheng, YX (2015): Changes of mesenchymal stromal cells mobilization and bone turnover in an experimental bone fracture model in ovariectomized mice. *Int J Clin Exp Pathol* 8 (9), 10228–10238
- Peng Z, Tuukkanen J, Zhang H, Jamsa T, Vaananen HK (1994): The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. *Bone* 15 (5), 523–532

- Perilli E, Le V, Ma B, Salmon P, Reynolds K, Fazzalari NL (2010): Detecting early bone changes using in vivo micro-CT in ovariectomized, zoledronic acid-treated, and sham-operated rats. *Osteoporos Int* 21 (8), 1371–1382
- Ralston SH (2010): Genetics of osteoporosis. *Ann N Y Acad Sci* 1192, 181–189
- Reginster JY, Kaufman JM, Goemaere S, Devogelaer JP, Benhamou CL, Felsenberg D, Diaz-Curiel M, Brandi ML, Badurski J, Wark J et al. (2012): Maintenance of antifracture efficacy over 10 years with strontium ranelate in postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 23 (3), 1115–1122
- Rithirangsiroj K, Panyakhamlerd K, Chaikittisilpa S, Chaiwatanarat T, Taechakraichana N (2012): Osteoporosis in different age-groups and various body mass index (BMI) ranges in women undergoing bone mass measurement at King Chulalongkorn Memorial Hospital. *J Med Assoc Thai* 95 (5), 644–649
- Sandberg O, Bernhardsson M, Aspenberg P (2016): Earlier effect of alendronate in mouse metaphyseal versus diaphyseal bone healing. *J Orthop Res* 35 (4), 793–799
- Savaridas T, Wallace RJ, Salter DM, Simpson AHRW (2013): Do bisphosphonates inhibit direct fracture healing? A laboratory investigation using an animal model. *Bone Joint J* 95-B (9), 1263–1268
- Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG (2008): Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 19 (5), 459–466
- Scotland G, Waugh N, Royle P, McNamee P, Henderson R, Hollick R (2011): Denosumab for the prevention of osteoporotic fractures in post-menopausal women: a NICE single technology appraisal. *Pharmacoeconomics* 29 (11), 951–961
- Seebach C und Marzi I: Pathophysiologie des Knochens: Osteoporose. In: Scharf HP, Rüter A, Pohlemann T, Marzi I, Kohn D, Günther KP (Hg.): *Orthopädie und Unfallchirurgie. Facharztwissen nach der neuen Weiterbildungsordnung. 2. Aufl.*; Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München 2011, 39-47
- Sehmisch S, Dullin C, Zaroban A, Tezval M, Rack T, Schmelz U, Seidlova-Wuttke D, Dunkelberg H, Wuttke W, Marten K et al. (2009): The use of flat panel volumetric computed tomography (fpVCT) in osteoporosis research. *Acad Radiol* 16 (4), 394–400
- Sehmisch S, Erren M, Kolios L, Tezval M, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2010): Effects of isoflavones equol and genistein on bone quality in a rat osteopenia model. *Phytother Res* 24 (2), 74
- Silverman SL, Komm BS, Mirkin S (2014): Use of FRAX(®)-based fracture risk assessments to identify patients who will benefit from osteoporosis therapy. *Maturitas* 79 (3), 241-247
- Sims NA, Martin TJ (2014): Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep* 3, 481
- Sobieszczanska M, Jonkisz J, Tabin M, Laszki-Szczachor K (2013): Osteoporosis: genetic determinants and relationship with cardiovascular disease. *Adv Clin Exp Med* 22 (1), 119–124
- Standal T, Johnson R, McGregor N, Poulton I, Ho P, Martin TJ, Sims NA (2014): gp130 in late osteoblasts and osteocytes is required for PTH-induced osteoblast differentiation. *J Endocrinol* 223 (2), 181-190

- Stürmer EK, Seidlova-Wuttke D, Sehmisch S, Rack T, Wille J, Frosch KH, Wuttke W, Stürmer KM (2006): Standardized bending and breaking test for the normal and osteoporotic metaphyseal tibias of the rat: effect of estradiol, testosterone, and raloxifene. *J Bone Miner Res* 21 (1), 89–96
- Stürmer EK, Sehmisch S, Rack T, Wenda E, Seidlova-Wuttke D, Tezval M, Wuttke W, Frosch KH, Stürmer KM (2010a): Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in the early phase of osteoporosis. A new fracture-healing model at the tibia in rat. *Langenbecks Arch Surg* 395 (2), 163–172
- Stürmer EK, Komrakova M, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, Tezval M, Utesch C, Mangal O et al. (2010b): Musculoskeletal response to whole-body vibration during fracture healing in intact and ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 87 (2), 168–180
- Stürmer EK, Komrakova M, Sehmisch S, Tezval M, Dullin C, Schaefer N, Hallecker J, Stürmer KM (2014): Whole body vibration during fracture healing intensifies the effects of estradiol and raloxifene in estrogen-deficient rats. *Bone* 64, 187–194
- Tarantino U, Saturnino L, Scialdoni A, Feola M, Liuni FM, Tempesta V, Pistillo P (2013): Fracture healing in elderly patients: new challenges for antiosteoporotic drugs. *Aging Clin Exp Res* 25 (1), 8
- Thorndike EA, Turner AS (1998): In search of an animal model for postmenopausal diseases. *Front Biosci* 3, 26
- Tong L, Wan M, Zhang L, Zhu Y, Sun H, Bi K (2012): Simultaneous determination of baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, oroxylin A and chrysin of *Radix scutellariae* extract in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 70, 6–12
- Waarsing JH, Day JS, van der Linden JC, Ederveen AG, Spanjers C, De Clerck N, Sasov A, Verhaar JA, Weinans H (2004): Detecting and tracking local changes in the tibiae of individual rats: a novel method to analyse longitudinal in vivo micro-CT data. *Bone* 34 (1), 163–169
- Wade SW, Strader C, Fitzpatrick LA, Anthony MS, O'Malley CD (2014): Estimating prevalence of osteoporosis: examples from industrialized countries. *Arch Osteoporos* 9, 182
- Wang JW, Li Wei, Xu SW, Yang DS, Wang Y, Lin M, Zhao GF (2005): Osteoporosis influences the middle and late periods of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Chin J Traumatol* 8 (2), 111–116
- Wang Y, Yang J, Li X, Wang J (2012): The metabolism of baicalin in rat and the biological activities of the metabolites. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012, 404529
- Wang Y, Han E, Xing Q, Yan J, Arrington A, Wang C, Tully D, Kowolik CM, Lu DM, Frankel PH et al. (2015): Baicalein upregulates DDIT4 expression which mediates mTOR inhibition and growth inhibition in cancer cells. *Cancer Lett* 358 (2), 170–179
- Welsch U: *Lehrbuch Histologie*. Unter Mitarbeit von Deller T. 3. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München 2010

Wen Y, Gu J, Chakrabarti SK, Aylor K, Marshall J, Takahashi Y, Yoshimoto T, Nadler JL (2007): The role of 12/15-lipoxygenase in the expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in macrophages. *Endocrinology* 148 (3), 1313–1322

Wöfl C, Schweppenhäuser D, Gühring T, Takur C, Höner B, Kneser U, Grützner PA, Kolios L (2014): Characteristics of bone turnover in the long bone metaphysis fractured patients with normal or low Bone Mineral Density (BMD). *PLoS ONE* 9 (5), e96058

World Health Organization (2004): WHO Scientific Group on the Assessment of Osteoporosis at Primary Health Care Level. Summary Meeting Report 5-7 May 2004. WHO. Genf, Brüssel 2004

Xiao WJ, Ke YH, He JW, Zhang H, Yu JB, Hu WW, Gu JM, Gao G, Yue H, Wang C et al. (2012): Polymorphisms in the human ALOX12 and ALOX15 genes are associated with peak bone mineral density in Chinese nuclear families. *Osteoporos Int* 23 (7), 1889–1897

Xu SW, Yu Ren, Zhao GF, Wang JW (2003): Early period of fracture healing in ovariectomized rats. *Chin J Trauma* 6 (3), 160–166

Xu SW, Wang JW, Li W, Wang Y, Zhao GF (2004): Osteoporosis impairs fracture healing of tibia in a rat osteoporotic model. *Chin Med J (Eng)* 84 (14), 1205–1209

Zhang Y, Song L, Cai L, Wei R, Hu Hao, Jin Wei (2013): Effects of baicalein on apoptosis, cell cycle arrest, migration and invasion of osteosarcoma cells. *Food Chem Toxicol* 53, 325–333

Zhao R (2012): Immune regulation of osteoclast function in postmenopausal osteoporosis: a critical interdisciplinary perspective. *Int J Med Sci* 9 (9), 825–832

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Prof. Dr. med. Klaus Michael Stürmer, unter dessen Leitung ich meine Doktorarbeit begonnen habe, und weiterhin dem aktuellen Abteilungsleiter der Unfallchirurgie an der Universitätsmedizin Göttingen Prof. Dr. med. Wolfgang Lehmann für die weitere Förderung dieses Projekts.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Stephan Sehmisch bedanken, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und mir damit die Durchführung einer spannenden und lehrreichen experimentellen Doktorarbeit ermöglicht hat. Dankbar bin ich auch für die schnelle und gründliche Korrektur meiner Dissertation.

Besonders dankbar bin ich meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Marina Komrakova für ihre tolle Unterstützung und fachkundigen Ratschläge, die mich immer wieder vorangebracht haben. Durch ihre Präsenz, Geduld und Professionalität im Rahmen dieser Arbeit konnten Fragen zügig geklärt und Änderungen schnell umgesetzt werden. Nicht zuletzt ihre Erfahrung als Betreuerin und Wissenschaftlerin hat die Grundlage für das Gelingen dieser Arbeit gelegt.

Auch möchte ich mich sehr herzlich bei den im Labor tätigen MTAs Frau Ramona Castro Machguth und Frau Annette Witt bedanken, die mir ebenfalls mit Rat und Tat zu Seite gestanden und durch eine umfassende Einführung in die Thematik und Methodik dieses Projektes dessen Durchführung sehr erleichtert haben.

Herrn Christian Dullin gebührt mein Dank für die Unterweisung im Umgang mit dem verwendeten Mikro-CT und den entsprechenden Programmen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei der Elsbeth-Bonhoff-Stiftung Berlin, durch deren Fördermittel dieses Projekt (Projektnummer 114) finanziert und somit realisiert werden konnte.