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

Der Einfluss von Therapie und Prophylaxe mit Strontiumranelat auf das proximale Femur osteoporotischer Ratten

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

vorgelegt von

Felix Köstner aus Bonn

Göttingen 2018

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer
Referent	PD Dr. med. Mohammad Tezval
Korreferentin:	PD Dr. med. Dana Seidlova-Wuttke
Drittreferent:	Prof. Dr. med. Martin Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 28.01.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Der Einfluss von Therapie und Prophylaxe mit Strontiumranelat auf das proximale Femur osteoporotischer Ratten" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

Inhaltsverzeichnis

Tabelle	nverzeichnis	IV
Abbildu	Ingsverzeichnis	VI
Abkürz	ungsverzeichnis	VIII
1 Einle	eitung	1
1.1 Ein	führung in das Thema und Fragestellung	1
1.2 The	eoretische Grundlagen	2
1.2.1	Knochenmatrix	3
1.3 Zel	luläre Bestandteile des Knochens	4
1.3.1	Osteoblasten	4
1.3.2	Osteozyten	4
1.3.3	Osteoklasten	4
1.4 Kno	ochenumbau	5
1.5 Ost	teoporose	6
1.5.1	Epidemiologie	7
1.5.2	Einteilung	8
1.5.3	Östrogen und sein Einfluss auf die Osteoporose	11
1.5.4	Risikofaktoren	12
1.6 Dia	agnostik	13
1.6.1	Anamnese	14
1.6.2	Klinische Untersuchung	14
1.6.3	Labordiagnostik	16
1.6.4	Konventionelles Skelettröntgen	17
1.7 Mö	glichkeiten weiterer bildgebender Verfahren	17
1.7.1	Knochendichtemessung	17
1.7.2	DXA-Messung	18
1.7.3	Quantitative Computertomographie (QCT)	18
1.8 The	erapie	19
1.8.1	Basismaßnahmen und Prophylaxe	19
1.8.2	Medikamentöse Therapie	20
1.8.3	Hormonersatztherapie	21
1.8.4	Östrogen-Rezeptor-Antagonisten/ -Agonisten	22
1.8.5	Bisphosphonate	23
1.8.6	Parathormon	24
1.8.7	Strontiumranelat	25

1.9	1.9 Tiermodell und angewandte Auswertungsmethoden		
2	Mate	erial und Methoden	29
2.1	Ver	suchsablauf	29
2.2	Ver	suchstiere	31
2.3	Ova	ariektomie	32
2.4	Ost	teotomie und Osteosynthese	
2.5	Ver	suchsende, Obduktion und Präparation	34
2.6	Bio	mechanischer Bruchtest	34
2.	6.1	Methode	34
2.	6.2	Versuchsaufbau und -ablauf	35
2.	6.3	Bedeutung des Kraft-Weg-Diagramms	
2.	6.4	Biomechanische Messparameter des Bruchtests	
2.	6.5	Validierung	
2.7	Mik	roradiographie	
2.	7.1	Histologische Aufarbeitung der Knochenschnitte und Erstellung der	
М	ikror	adiographie	
2.	7.2	Digitalisierung der Mikroradiographien	
2.	7.3	Abfolge der Arbeitsschritte der digitalen morphometrischen Auswertung	
2.8	Ver	aschung	42
2.	8.1	Zielsetzung und Ablauf	42
2.	8.2	Bestimmung der organischen und anorganischen Knochensubstanz	42
2.	8.3	Bestimmung des Kalzium- und Phosphatgehaltes der Knochensubstanz	43
2.	8.4	Bestimmung des Phosphatgehaltes	44
2.	8.5	Bestimmung des Kalziumgehaltes	45
2.	8.6	Bestimmung des Strontiumgehaltes	45
2.	8.7	Berechnung und Bedeutung des Kalzium/ Phosphat-Verhältnisses	46
2.	8.8	Berechnung und Bedeutung des Kalzium/ Strontium-Verhältnisses	46
2.9	Sta	tistik	47
3 E	Erge	ebnisse	48
3.1			48
	Kör	pergewicht	
3.2	Kör Täg	pergewicht gliche Futteraufnahme pro Tier im Verlauf	
3.2 3.3	Kör Täg Ute	pergewicht gliche Futteraufnahme pro Tier im Verlauf erusgewicht	
3.2 3.3 3.4	Kör Täg Ute Erg	pergewicht gliche Futteraufnahme pro Tier im Verlauf erusgewicht jebnisse der biomechanischen Testung	51 52 53
3.2 3.3 3.4 3.4	Kör Täg Ute Erg 4.1	pergewicht gliche Futteraufnahme pro Tier im Verlauf erusgewicht jebnisse der biomechanischen Testung Elastizität	51 52 53 53
3.2 3.3 3.4 3.4 3.4	Kör Täg Ute Erg 4.1 4.2	pergewicht gliche Futteraufnahme pro Tier im Verlauf erusgewicht jebnisse der biomechanischen Testung Elastizität Maximalkraft	51 52 53 53 53
3.2 3.3 3.4 3. 3. 3.5	Kör Täç Ute Erg 4.1 4.2 Erg	pergewicht gliche Futteraufnahme pro Tier im Verlauf erusgewicht jebnisse der biomechanischen Testung Elastizität Maximalkraft jebnisse der Mikroradiographie	

3.5.2	Trabekuläre Knochendichte am Femurhals	56
3.5.3	Anzahl der Trabekelkreuzungen	57
3.5.4	Dichte der Trabekelkreuzungen	58
3.5.5	Mittlere Trabekeldicke	59
3.5.6	Mittlere Fläche des Trabekelbereiches	60
6 Er	gebnisse der Veraschung	61
3.6.1	Anteil an organischer und anorganischer Masse	61
3.6.2	Anteil an Phosphat und Kalzium am anorganischen Knochen	63
3.6.3	Verhältnis von Kalzium zu Phosphat	64
3.6.4	Anteil an eingelagertem Strontium	65
3.6.5	Verhältnis von Kalzium zu Strontium	66
Dis	kussion	67
Die	e ovariektomierte Ratte als Osteoporosemodell	67
2 Kö	rpergewicht und tägliche Futteraufnahme im Versuchsverlauf	69
B Di	skussion der Ergebnisse des biomechanischen Tests	70
l Di	skussion der Ergebnisse der Mikroradiographie	72
5 Di	skussion der Ergebnisse der Veraschungsanalyse	76
6 Sc	hlussfolgerung	78
Zus	ammenfassung	
Lite	raturverzeichnis	
	3.5.2 3.5.3 3.5.4 3.5.5 3.5.6 3.5.6 3.6.1 3.6.2 3.6.3 3.6.4 3.6.5 Disl 1 Die 2 Kö 3 Dis 4 Dis 5 Dis 5 Dis 5 Dis 5 Dis 5 Sc Zus Lite	 3.5.2 Trabekuläre Knochendichte am Femurhals

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Risikofaktoren der primären Osteoporose (Jerosch et al. 2002)	8
Tabelle 2:	Risikofaktoren der sekundären Osteoporose (Jerosch et al. 2002, Classe et 2003)	al. 9
Tabelle 3:	Einteilung der Osteoporose nach Schweregrad (Bartl 2010)	11
Tabelle 4:	Risikofaktoren für Osteoporose (Bartl 2010)	12
Tabelle 5:	Empfehlung für die Durchführung einer Basisdiagnostik (Pfeilschifter 2006).	14
Tabelle 6:	Screeningparameter der Osteoporose (Leitlinie Osteoporose 2017)	16
Tabelle 7:	Graduierung Wirbelkörperfraktur (Genant et al. 1993)	17
Tabelle 8:	Entscheidungsgrundlage für eine medikamentöse Therapie bei 10-Jahres-	
	Frakturrisiko > 30 % (Leitlinie Osteoporose 2017)	21
Tabelle 9:	Auflistung der in der Klinik verwendeten Bisphosphonate (Bartl 2010)	23
Tabelle 10:	Gruppenaufteilung der einzelnen Tiere mit Bezeichnung und	
	gruppenspezifischer Behandlung	30
Tabelle 11:	Zusammensetzung des Phosphat-Reagenzes	45
Tabelle 12:	Auflistung der Mittelwerte ± Standardabweichungen der Körpergewichte je	
	Gruppe bei Ankunft, bei Osteotomie und bei Tötung in Gramm	50
Tabelle 13:	Auflistung der Mittelwerte ± Standardabweichungen der Körpergewichte je	
	Gruppe pro Versuchswoche in Gramm	50
Tabelle 14:	Auflistung der Mittelwerte ± Standardabweichungen der Futtermenge je	
	Gruppe pro Versuchswoche in Gramm	52
Tabelle 15:	Mittelwert und Standardabweichung der Uterusgewichte jeder	
	Versuchsgruppe am Tag der Obduktion	53
Tabelle 16:	Mittelwerte und Standardabweichungen der Elastizität aller Gruppen	
	gemessen in N/mm	53
Tabelle 17:	Mittelwerte und Standardabweichungen der Maximalkraft aller Gruppen	
	gemessen in Newton	54
Tabelle 18:	Mittelwerte und Standardabweichungen der kortikalen Knochendichte aller	
	Gruppen in Prozent	55
Tabelle 19:	Mittelwerte und Standardabweichungen der trabekulären Knochendichte alle	ər
	Gruppen in Prozent	56
Tabelle 20:	Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl an Trabekelkreuzungen	
	am Femurhals	57
Tabelle 21:	Mittelwerte und Standardabweichungen der Dichte der Trabekelkreuzungen	in
	n/mm²	58
Tabelle 22:	Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren Trabekeldicke in μ m	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 23:	Mittelwerte und Standardabweichungen der Fläche des Trabekelbereiches in	
	mm ² 6	0
Tabelle 24:	Anteil der organischen und anorganischen Knochensubstanz der rechten	
	Femora in Gramm6	1
Tabelle 25:	Anteil der organischen und anorganischen Knochensubstanz der rechten	
	Femora in Prozent6	2
Tabelle 26:	Anteile von Phosphat und Kalzium am anorganischen Anteil der rechten	
	Femora in Prozent6	3
Tabelle 27:	Mittelwerte und Standardabweichungen des Molverhältnisses von Kalzium zu	
	Phosphat6	4
Tabelle 28:	Mittelwerte und Standardabweichungen des prozentualen Anteils an Strontiur	n
		5
Tabelle 29:	Mittelwerte und Standardabweichungen des Molverhältnisses von Kalzium zu	
	Strontium6	6

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Klinische Tests zur Diagnostik einer Plattenimpressionsfraktur	. 15
Abbildung 2:	Darstellung der korrekten Position der Osteotomie und der	
	Osteosyntheseplatte	. 33
Abbildung 3:	Lagerung des Femur in der Aluminiumbruchvorrichtung	.35
Abbildung 4:	Radiographie eines proximalen Rattenfemur nach biomechanischer	
	Kompressionstestung mit pertrochantärer Fraktur	. 36
Abbildung 5:	Beispiel für ein Kraft-Weg-Diagramm während der biomechanischen	
	Kompressionstestung	.37
Abbildung 6:	Markierungsfenster des zu untersuchenden Bereiches	.40
Abbildung 7:	Ausrichtung anhand Epiphysenfuge	.40
Abbildung 8:	Graudetektion	.40
Abbildung 9:	Markierung des Femurhalses	.41
Abbildung 10:	Markierung der medialen Kortikalis	.41
Abbildung 11:	Markierung der lateralen Kortikalis	.41
Abbildung 12:	Endberechnung der kortikalen Fläche des Femurhalses	.41
Abbildung 13:	Mittleres Körpergewicht der Tiere je Gruppe im Verlauf pro Versuchswoche	
	von Versuchsbeginn bis zum Versuchsende	.48
Abbildung 14:	Mittleres Körpergewicht der Tiere je Gruppe bei Ankunft (Woche 0)	.49
Abbildung 15:	Mittleres Körpergewicht je Gruppe nach 8 Wochen, vor Osteotomie	.49
Abbildung 16:	Mittleres Körpergewicht je Gruppe nach 13 Wochen, bei Tötung	.49
Abbildung 17:	Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichungen der Futtermenge je	
	Gruppe pro Versuchswoche	.51
Abbildung 18:	Mittleres Uterusgewicht der Tiere jeder Versuchsgruppe am Tag der	
	Obduktion	. 52
Abbildung 19:	Mittelwert und Standardabweichung der Elastizität aller Gruppen	.53
Abbildung 20:	Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der Maximalkraft aller	
	Gruppen	. 54
Abbildung 21:	Mittelwert und Standardabweichung der kortikalen Knochendichte aller	
	Gruppen	.55
Abbildung 22:	Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der trabekulären	
	Knochendichte aller Gruppen	. 56
Abbildung 23:	Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der Anzahl an	
	Trabekelkreuzungen am Femurhals	. 57
Abbildung 24:	Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der Dichte der	
	Trabekelkreuzungen	. 58

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 25:	Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der mittleren
	Trabekeldicke
Abbildung 26:	Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der Fläche des
	Trabekelbereiches60
Abbildung 27:	Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der organischen Masse
Abbildung 28:	Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der anorganischen
	Masse
Abbildung 29:	Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der organischen Anteile
Abbildung 30:	Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der anorganischen
	Anteile
Abbildung 31:	Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der prozentualen Anteile
	an Phosphat von anorganischem Knochen63
Abbildung 32:	Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der prozentualen Anteile
	an Kalzium von anorganischem Knochen63
Abbildung 33:	Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung des Molverhältnisses von
	Kalzium zu Phosphat64
Abbildung 34:	Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung des prozentualen Anteils
	an Strontium65
Abbildung 35:	Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung des Molverhältnisses von
	Kalzium zu Strontium

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ANOVA	analysis of variance
BMD	bone mineral density
BMI	Body Mass Index
BMP	bone morphogenic protein
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
С	Konzentration
CRP	C-reaktives Protein
CRPS	complex regional pain syndrome
СТ	Computertomographie
СТХ	C-Cross-link-Telopeptide
d	day
DNA	deoxyribonucleic acid
DVO	Deutscher Dachverband Osteologie
DXA	Dual-X-Ray-Absorptiometrie
EMA	European Medicin Agency
GT	Glutamyltransferase
НА	Hydroxylapatit
HRT	hormon replacement therapy
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IU	Internationale Einheiten
К	Kelvin
L	Lendenwirbelkörper
LWS	Lendenwirbelsäule
m	Masse
М.	Morbus
MMP	Matrix Metalloproteinase
MORE	multiple outcomes of raloxifen evaluation
NTX	N-Cross-link-Telopeptide
OVX	Ovariektomie
PBM	peak bone mass
ph	potentia Hydrogenii
PINP	Prokollagen Typ I N-terminale Propeptid

pr	Prophylaxe
prox	proximal
PTH	Parathormon
PTHrP	parathyroid hormone-related protein
QCT	Quantitative Computertomographie
QUS	quantitativ ultrasound
RANKL	receptor activator of NF-кВ ligand
SD	Standardabweichung
SERM	selective estrogen receptor modulators
SOTI	spinal osteoporosis therapeutic intervention
SR	Strontiumranelat
TGF-β	transforming growth factor beta
th	Therapie
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAP	Tartratresistente Saure Phosphatase
TROPOS	treatment of peripheral osteoporosis
TRPV	transient receptor potential channels
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
Vit.	Vitamin
WHI	Womans Healt Initiative
WHO	World Health Organisation
XRD	X-ray diffraction
XRF	X-ray fluorescence spectroscopy
ZTE	Zentrale Tierexperimentellen Einrichtung
α	alpha
β	beta

1.1 Einführung in das Thema und Fragestellung

Aufgrund des demographischen Wandels und der steigenden Lebenserwartung gewinnen Erkrankungen des "höheren Lebensalters" in den letzten Jahrzehnten deutlich an Bedeutung. Die häufigste Todesursache der westlichen Bevölkerung findet sich in Erkrankungen des Herzkreislaufsystems, des Nervensystems oder in durch Neoplasien verursachten Erkrankungen wieder. Seit Jahren steigt die Anzahl der an altersbedingten Erkrankungen leidenden Menschen. Die Osteoporose als chronische Multisystemerkrankung zählt hier in besonderem Maße dazu. Sie verzeichnet stetig ansteigende Fallzahlen: Im Jahr 2003 waren in Deutschland 7,8 Millionen Menschen von Osteoporose betroffen (Häussler et al. 2006). Durch diese Erkrankung kommt es nicht nur zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität, sondern auch –behandlungsbedingt – zu einer deutlichen sozioökonomischen Belastung. Der steigende klinische Stellenwert führt zu einem gesteigerten wissenschaftlichen Interesse. Mehrere Arbeitsgruppen und Studien haben sich zur Aufgabe gemacht, die Erkrankung und ihre möglichen Therapien besser kennenzulernen.

Die Osteoporose zeichnet sich durch einen oft schleichenden und symptomlosen Verlauf aus, bei dem es zu einem stetigen Verlust der Knochenmasse kommt. Betroffen sind vor allem trabekuläre Knochenstrukturen, unter deren Verlust die biomechanische Festigkeit des gesamten Knochenskelettes abnimmt. Veränderungen lassen sich durch die Messung der Knochenmineralisierungsdichte (engl. *bone mineral density*, BMD) feststellen. Aufgrund der abgeschwächten Mikroarchitektur kommt es zu einem erhöhten Frakturrisiko, das sich durch steigende Fallzahlen auch klinisch nachweisen lässt.

In der Vergangenheit wurden mehrere Konzepte verfolgt, um dem osteoporose-bedingten Knochenraub und damit einhergehenden Stabilitätsverlusten entgegenzuwirken. Hierzu zählen sowohl prophylaktische als auch therapeutische medikamentöse Therapien. Unter den zugelassenen Substanzen finden sich Medikamente mit osteoanaboler oder antiresorptiver Wirkung am Knochengerüst. Experimentell werden auch einzelne Substanzen in Verbindung mit Ganzkörpervibration untersucht (Döll 2011, Eimer 2015, Neuerburg 2015). Bereits seit 1996 ist jedoch auch ein Medikament bekannt, welches die osteoanabole und antiresorptive Wirkung miteinander vereint. Hierbei handelt es sich um das seit 2014 beschränkt zugelassene Strontiumranelat (Canalis et al. 1996, Brun et al. 2014). Nachweislich lässt sich hiermit der krankhafte Prozess des Knochenumbaus reduzieren und eine bei der Osteoporose typische Resorption des trabekulären Knochens verhindern. Zusätzlich wurde auch ein positiver Einfluss auf die Knochenheilung festgestellt (Marie et al. 2001, Komrakova et al. 2015). Bisherige Studien konnten den Effekt von Strontiumranelat bestätigen. Die therapeutische Handhabung, bezogen auf prophylaktische und therapeutische Wirkungszeiträume, ist jedoch weitgehend unbekannt. Zudem können nur wenige Studien eine Aussage über die Langzeitwirkung einer Therapie treffen. Ziel unserer Studie war es daher, den Einfluss von Strontiumranelat auf Eigenschaften des osteoporotischen Knochens in Abhängigkeit von unterschiedlicher Therapiedauer zu beleuchten. Hierbei war neben der biomechanischen Festigkeit auch die Mikroarchitektur des Knochens und der Stoff- und Mineralgehalt von entscheidender Bedeutung. Bisherige Daten lassen vermuten, dass auch nach Therapieende ein Teil des Wirkstoffes im Knochengerüst enthalten bleibt und so einen langanhaltenden osteoprotektiven Effekt ausüben kann.

1.2 Theoretische Grundlagen

Der menschliche Knochen ist eine für die Beanspruchung des Körpers bestens geeignete Struktur, welche alle nötigen Eigenschaften vereint: Knochen ist sehr druck- und biegestabil, jedoch gleichzeitig auch elastisch; das Gewicht ist durch eine ausgeklügelte Struktur niedrig gehalten, ohne dass in der Stabilität Einbußen zu erkennen sind. Die Elastizität des Knochens wird durch ein Netzwerk aus Kollagenmolekülen ermöglicht, welche lamellenartig aneinander gelagert sind und so das Grundgerüst darstellen. Kollagen allein ist elastisch und kann keine große Belastung aufnehmen. Um dennoch die nötige Stabilität zu gewähren, werden Phosphat und Kalzium in kristalliner Form in das Kollagengrundgerüst eingelagert und verfestigt. Spurenelemente, Wasser und Mukopolysaccharide dienen als Leim, der die Proteinseile mit den Mineralkristallen fest verbindet. Diese Architektur des Knochens wird als Knochenmatrix bezeichnet und stellt sich erst im Röntgenbild genauer dar (Bartl 2010).

Grundsätzlich bestehen Knochen aus einer dichten Knochenrinde, der Substantia corticalis, welche den äußeren Anteil darstellt. Der innere Teil des Knochens wird von einem dünnwandigen engen Trabekelnetz durchzogen, sodass sich im Knocheninneren viele Hohlräume befinden. Das Trabekelnetz wird als Knochenbälkchen oder Substantia spongiosa bezeichnet. Die Gesamtmasse des normalen Skelettes beträgt ca.

10 kg, wobei 8 kg auf den kompakten Knochen (Substantia corticalis) und 2 kg auf das Trabekelnetz (Substantia spongiosa) entfallen (Bartl 2010). Zu berücksichtigen ist natürlich, dass es hierbei von Mensch zu Mensch individuelle Unterschiede gibt. Die Anordnung des Trabekelnetzes folgt hierbei der biomechanischen Belastung, der der Knochen ausgesetzt ist. Es bilden sich sogenannte Trajektionslinien. Schon 1892 beschrieb der Berliner Anatom und Chirurg Julius D. Wolff in seinem Buch "Das Gesetz der Transformation der Knochen" den dynamischen Umbau des Knochengewebes in Abhängigkeit von seiner Belastung. Durch das "Wolffsche Gesetz" beschreibt er, dass durch belastungsabhängige Anpassung der Substantia spongiosa die maximale Stabilität des Knochens ermöglicht wird. Bei fehlender oder unzureichender regelmäßiger Belastung baut sich der Knochen hingegen langsam ab (Wolff 1892).

In longitudinaler Ausrichtung werden lange Röhrenknochen anatomisch in die drei Zonen Meta-, Dia- und Epiphyse unterteilt. Alle drei Zonen haben gerade im Wachstum verschiedene Bedeutungen. Diese aufwändige Architektur des Knochens wird in ständigem Umbau den gegebenen Beanspruchungen angepasst. Auf zellularer Ebene sind dafür hauptsächlich drei Zellreihen verantwortlich, nämlich Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten.

1.2.1 Knochenmatrix

Die reine, unverkalkte Knochenmatrix wird als Osteoid bezeichnet. Die Knochenmatrix besteht zu 30 % aus organischen und zu 70 % aus anorganischen Anteilen (Mineralien).

Die organischen Komponenten setzen sich aus Kollagen Typ 1 (90 %) und verschiedenen anderen Proteinen (10 %) wie Osteokalzin, Osteonektin, Kollagen Typ 5 und *bone morphogenic protein* (BMP) zusammen. Kollagen Typ 1 bildet typische Fibrillen mit hoch geordnetem Verlaufsmuster. Sie sorgen für Zugfestigkeit und Elastizität des Knochens. Das zu den Matrixproteinen gehörende Kollagen Typ 5 reguliert die Bildung und Vernetzung der Fibrillen aus Kollagen Typ 1. Die Druckstabilität wird durch das eingelagerte Kalziumhydoxylapatit erreicht, welches 95 % der anorganischen Knochenmasse ausmacht. Knochengewebe ist der größte Kalziumspeicher des Menschen. Neben dem schwer löslichen Hydoxylapatit kommt das gut wasserlösliche Carbonat bzw. Kalziumhydrogencarbonat vor (Jastrow 2015).

1.3 Zelluläre Bestandteile des Knochens

1.3.1 Osteoblasten

Osteoblasten gehören zu den knochenaufbauenden mesenchymalen Zellen. Ihre Hauptaufgabe ist der Aufbau von Knochenmatrix. Die Zellen benötigen dazu vier Wochen. Bei der desmalen Osteogenese wird ein sogenanter Bindegewebsknochen ausgebildet. Aus Osteoprogenitorzellen entstehen im Bindegewebsknochen Osteoblasten, diese setzen sich an die Knochenoberfläche und sezernieren dort die Vorstufe der Kollagen-Typ-1-Fibrillen. Diese noch nicht mineralisierte Knochenvorstufe nennt man Osteoid. Im Knochen bilden sich Osteoid-Bälkchen, in denen sich Osteoblasten durch vermehrte Knochenbildung einmauern und langsam zu Knochenzellen, Osteozyten, werden.

1.3.2 Osteozyten

Osteozyten sind von mineralisiertem Knochen umgeben und zählen zu den knochenüberwachenden Zellen. Sie liegen in Lakunen und sind durch verzweigte Kanälchen (Canaliculi) untereinander verbunden. Zwischen den Lakunen verlaufen Kapillaren, sodass ein Stoffaustausch von organischen und anorganischen Substanzen erfolgen kann. Die Funktion der Osteozyten ist nicht abschließend geklärt, bekannt ist jedoch, dass sie für die Ernährung des Knochens sowie die Steuerung der biomechanischen Umbauprozesse der Trajektionslinien maßgeblich sind. Die mechanischen Kräfte, welche durch am Knochen ansetzende Muskulatur auf den Knochen wirken, können wahrscheinlich von Osteozyten aufgenommen und registriert werden. Diese Signale werden dann ebenso wahrscheinlich auf die an der Knochenoberfläche befindlichen Baueinheiten weitergegeben.

Osteozyten können das Alter der Knochensubstanz registrieren und den Umbau einleiten. Eine gewisse eigenständige Fähigkeit, Knochen auf- und abzubauen, konnte in geringem Maße gezeigt werden. Somit obliegt den Osteozyten die Kontrolle und Regulation des Knochenumbaus. Die Menge der Osteozyten hat einen Einfluss auf die Knochendichte; eine Abnahme der Osteozytenanzahl im Alter geht daher unweigerlich mit einer Verschlechterung der Knochenqualität einher (Bartl 2010).

1.3.3 Osteoklasten

Osteoklasten gehören zu den knochenabbauenden Zellen, die alten oder schwach

mineralisierten Knochen in nur wenigen Tagen abbauen können. Histologisch lassen sie sich als mehrkernige Riesenzellen erkennen. Sie leiten sich von den Monozyten des Knochenmarks ab und gehören zu den Zellen der hämatopoetischen Zellreihe. Zellverwandt sind ihnen die Makrophagen; beide teilen viele Charakteristiken wie zum Beispiel die Möglichkeit der Phagozytose. Auf der Knochenoberfläche treten Osteoklasten mit der Knochenmatrix in Kontakt und können dort das Knochenmaterial auflösen. Hierzu besitzen sie eine typische, stark gefaltete Membranoberfläche, die sogenannte ruffled border, an deren Oberfläche H⁺/ K⁺- Protonenpumpen durch ein saures Millieu die Knochenmatrix arrodieren. Große Mengen von proteolytischen Enzymen wie die tartratresistente saure Phosphatase (TRAP) oder Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) werden sezerniert, die dann in einem weiteren Schritt die sich lösenden Matrixbestandteile zersetzen. Die kombinierte Wirkung von Ph- Absenkung und der Nutzen von lysosomalen Enzymen ermöglichen den Abbau des Knochens. Die Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten kann durch mechanische Reize oder hormonell beeinflusst werden. Von besonderer Bedeutung sind hierbei: Parathormon, Östrogen, Leptin und Schilddrüsenhormone (Bartl 2010). An der Oberfläche der Osteoklasten liegende Östrogenrezeptoren können den sogenannten Fas-Ligand Kanal aktivieren und hierrüber die Apoptose der Osteoklasten initiieren (Nakamura et al. 2007). Osteoklasten lassen sich von den verwandten Makrophagen durch einige Unterschiede differenzieren. Makrophagen sind im Gegensatz zu Osteoklasten nicht in der Lage, Knochenstrukturen aufzulösen. Es fehlt ihnen die hierfür charakteristische und wichtige ruffled border; außerdem reagieren sie nicht auf Calcitonin und andere hormonelle Einflüsse des Knochenstoffwechsels (Rubin und Greenfield 2005).

1.4 Knochenumbau

Das Knochengewebe unterliegt zeitlebens ständigen Umbauvorgängen, welche u. a. eine Adaptation der Knochenstruktur an mechanische Belastung ermöglichen. Im Kindes- und Jugendalter ist ein starker Knochenaufbau festzustellen, wohingegen im höheren Lebensalter ausschließlich Knochenumbau (sog. Turnover) im Rahmen des Remodelings erfolgt. Knochenaufbau und Knochenabbau stehen im fein abgestimmten Verhältnis zueinander. Bei Kindern überwiegt der Aufbau und der Knochenturnover ist deutlich höher als bei Erwachsenen. Beim Erwachsenen werden pro Jahr immer noch etwa 10 % der Knochenmasse ersetzt. Physiologischerweise stellt sich das Verhältnis von Auf- und Abbau des Knochens zwischen dem 20. und 30.

Lebensjahr in ein Gleichgewicht. Kurz darauf wird im Alter zwischen 33 und 37 Jahren die maximale Knochendichte erreicht, man spricht dann von der *peak bone mass* (PBM), an die sich ein Abfall der Knochenmasse um ca. 1 % pro Jahr anschließt (Rodin et al. 1990). Durch die ständigen Umbauvorgänge wird die Materialerneuerung des Knochens gewährleistet, kleine Risse oder Störungen der Knochenstruktur können so permanent ausgeglichen werden.

Wird die Balance durch Überwiegen des Abbaus gestört, kommt es besonders im hohen Lebensalter zur Osteoporose. Einflussfaktoren, die den Knochenumbau triggern können, sind neben mechanischer Belastung auch Hormone, wie Östrogen, Parathormon, Kalzitonin, Insulin und Wachstumshormone (Benninghoff und Drenckhahn 2008).

Je nach Knochenstruktur ist ein unterschiedliches Umbaumuster zu erwarten: Kortikaler Knochen ist sehr dicht, stark kalzifiziert und zeigt ein niedriges Oberflächen-Volumen-Verhältnis. Er bietet somit keine gute Angriffsfläche für Osteoklasten und Osteoblasten. Der Umbau zeigt sich hier folglich langsam und träge.

Spongiöse Knochen bieten durch ihre große Oberfläche und feingliedrigere Anordnung eine wesentlich bessere Angriffsfläche, somit ist ein wesentlich schnellerer Umbau möglich. Jährlich werden 25 % des spongiösen, aber nur 2,5 % des kortikalen Knochens umgebaut (Bartl 2010).

1.5 Osteoporose

Die Definition der Osteoporose beruht auf einem Konsens, welcher auf der International Consensus Development Conference on Osteoporosis im April 1993 in Hong Kong getroffen wurde:

Die Osteoporose wird definiert als eine systemische Skeletterkrankung, welche durch Verlust der Knochenmasse und eine Verminderung der Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist. Als Folge kann der Knochen seine Stabilität nicht aufrechterhalten und Patienten neigen schon bei leichten Traumata zu Frakturen (Consensus Development Conference 1993).

Von einer manifesten Osteoporose wird beim Vorliegen von mindestens einer Osteoporose-bedingten Fraktur gesprochen (Consensus Development Conference 1993, Leitlinie Osteoporose 2017).

Der Zusammenhang von Knochendichte und Frakturrisiko wurde inzwischen durch eine Reihe prospektiver Studien belegt. Gemäß der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird die Osteoporose der Frau daher nach den Werten der Knochendichtemessung festgelegt (WHO 1994).

Definition der Osteoporose nach der DXA-Methode (Dual-X-Ray-Absorptiometrie; Kap. 1.7.2) und dem *T-Score*:

"Eine Osteoporose liegt vor, wenn die Konchenmineraldichte (DXA-Methode) um 2,5 Standardabweichungen (SD) unter dem statistischen Mittelwert gesunder prämenopausaler Frauen liegt (= T-Score)" (Bartl 2010, S.21).

Liegt die Standardabweichung zwischen -1 und -2,5 spricht man von einer Osteopenie. Die für die messtechnische Definition genutzten Werte gelten für die Osteoporose bei Frauen (s.o.). Für Männer kann die Definition ab dem 50. Lebensjahr jedoch übernommen werden (Leitlinie Osteoporose 2017).

1.5.1 Epidemiologie

Osteoporose ist seit langem Gegenstand der Forschung, mittlerweile liegt eine breite Datenbasis vor, die zu einer klaren Definition der Erkrankung beiträgt. In mehreren Studien wurden die hohen Patientenzahlen und die Kosten für das Gesundheitssystem aufgezeigt. Nach der BoneEVA-Studie lag im Jahr 2003 in Deutschland die Prävalenz der Erkrankung im Alter von 50 Jahren oder älter bei 26 %. Die Prävalenz der Frauen liegt mit 39 % deutlich höher als die der Männer mit 9,7 % (6,5 versus 1,3 Millionen Betroffene) und steigt bei beiden Geschlechtern im Alter stark an. Im Jahre 2003 beliefen sich die direkt durch Osteoporose entstandenen Kosten in der Bundesrepublik Deutschland auf rund 5,4 Milliarden Euro pro Jahr (Häussler et al. 2006). In Deutschland waren nach Hochrechnungen der Techniker Krankenkasse im Jahr 2009 mehr als 6 Millionen Menschen an Osteoporose erkrankt (Hadji et al. 2013). Insgesamt können 9 Millionen Frakturen weltweit und davon 34,8 % in Europa auf Osteoporose zurückgeführt werden (Johnell und Kanis 2006). Das Lebenszeitrisiko einer Becken-, Wirbelsäulen- oder Handgelenksfraktur durch Osteoporose liegt in den entwickelten Ländern bei 30 bis 40 % und ist damit dort ähnlich hoch wie das Lebenszeitrisiko für eine Koronare Herzerkrankung (WHO 2004). Eine von der Europäischen Union eingesetzte Expertenrunde konnte 1998 einen Report aufstellen, der nach Analyse der Falldaten in Europa eine deutliche Zunahme der Frakturen bedingt durch Osteoporose bis 2050 voraussagt. Die Anzahl der Hüftfrakturen soll sich von 2000 bis 2050 um 135 % erhöhen (Compston et al. 1998).

Aufgrund der hohen Morbidität und der weltweit starken Kosten dieser Erkrankung hat

es sich die World Health Organization bereits seit 1994 zur Aufgabe gemacht, Prävention, Therapie und Management der Erkrankung in einer weltweiten Strategie zu formulieren. Eine Scientific Group der WHO wurde erstmals eingerichtet.

1.5.2 Einteilung

Die Osteoporose lässt sich an verschiedenen Anhaltspunkten unterteilen:

1.5.2.1 Einteilung nach der Ätiologie:

Hier geht es um die Abgrenzung von primären Formen zu durch bestimmte Grunderkrankung ausgelösten sekundären Formen.

Primäre (idiopathische) Osteoporose:

Osteoporose ohne Grunderkrankung und erkennbar eindeutige Ursache. Hierzu zählen vor allem die postmenopausale (Typ I; häufigste Form) und die senile Form (Typ II). Hinzu kommen die juvenile und adulte Osteoporose. Hierbei ergeben sich jedoch oft Überschneidungen zur sekundären Form, da die Risikofaktoren oft mit der Pathogenese in Zusammenhang stehen können (Bartl 2010). Wichtige Risikofaktoren der primären Osteoporose sind im Folgenden tabellarisch aufgeführt:

Tabelle 1: Risikofaktoren der primären Osteoporose (Jerosch et al. 2002)

höheres Lebensalter postmenopausaler Östrogenmangel im Alter verminderte enterale Kalziumresorption körperliche Inaktivität (Lebensgewohnheit) schlanke Statur Osteoporose in Familie vorbekannt

Sekundäre Osteoporose:

Osteoporose, die als Begleiterscheinung bei einer Vielzahl anderer Grunderkrankungen auftritt. Die Häufigkeit einer sekundären Osteoporose im Patientenkollektiv wird in Studien teilweise stark differierend angegeben. Eine Knochendichtemessung sollte daher im Rahmen einer Erkrankung als Teil der Diagnostik durchgeführt werden (Stupphann und Pietschmann 2008). Männer sind häufiger von sekundärer Osteoporose betroffen als Frauen (Fitzpatrick 2002). Eine der häufigsten sekundären Formen

entsteht iatrogen durch langanhaltende Cortison-Therapie (Walsh et al. 1996), weitere Formen können durch verschiedene Ursachen ausgelöst werden, die im Folgenden tabellarisch aufgeführt werden:

Ursachen	Beispiele
Endokrine Erkrankungen	Cushing-Syndrom
	Hyperparathyreoidismus
	Hypogonadismus
	Hyper- bzw. Hypothyreose
	Diabetes mellitus
	Anorexia nervosa
Hämatologische Erkrankungen und Ma-	Multiples Myelom
lignome	Lymphome, Leukämien
	Systemische Mastozytose
	Malignome mit paraneoplastischer Sekre-
	tion (PTHrP, RANKL)
Gastrointestinale Erkrankungen und Er-	Entzündliche Darmerkrankungen
nährung	Malnutrition
	Gastrektomie
	Zöliakie
	Laktoseintoleranz
	Malabsorption
	Chronische Lebererkrankungen
	Alkoholabusus
Rheumatische Erkrankungen/ Medika-	Rheumatoide Arthritis
mente	Morbus Bechterew
	Glukokortikoide
	Cyclosporine
	Heparin
	Antiepileptika
Sonderform	Lokale Osteoporose bei M. Sudeck/ CRPS

Tabelle 2: Risikofaktoren der sekundären Osteoporose (Jerosch et al. 2002, Classe et al. 2003)

1.5.2.2 Einteilung nach der metabolischen Charakteristik:

Zur Unterscheidung weiterer Formen der Osteoporose wird hier der Knochenumsatz als sogenannter Turnover zur Einteilung bestimmt. Physiologisch stehen Knochenaufund -abbau in einem Gleichgewicht.

High-turnover-Osteoporose:

Kommt es zu einem Überwiegen der Osteoklasten bei normaler Aktivität der Osteoblasten, entsteht eine *fast-loser*-Situation. Diese tritt besonders in den ersten 10 Jahren postmenopausal auf. In dieser frühen Menopause spricht man von einer *high-turnover*-Osteoporose. Bei diesen Patienten kann es zu einem Verlust der trabekulären Knochenmasse von über 3,5 % pro Jahr kommen (Fürderer und Eysel 2004). Low-turnover-Osteoporose:

Eine *low-turnover*-Osteoporose ist gekennzeichnet durch eine verminderte Knochenneubildung bei gleichbleibendem Knochenabbau. Ein solcher langsamer Knochenumbau wird als *slow-loser-Situation* bezeichnet. Dieser langsame Verlust der trabekulären Knochenmasse tritt bei seniler Osteoporose (Typ II, Involutionsosteoporose) oder in der späten postmenopausalen Osteoporose (mehr als 10 Jahre nach Menopause) auf. Meist liegt der Verlust der trabekulären Knochenmasse unter 3,5 % pro Jahr (Fürderer und Eysel 2004, Bruch und Trenz 2005).

Biochemische Knochenmarker oder eine in besonderen Fällen durchgeführte Knochenbiopsie lassen genauere Ausmaße erkennen. Solange *low-turnover*-Formen im Frühstadium erkannt werden, können sie mit Bisphosphonaten behandelt werden. Je nach Stärke des Turnovers sind teils vermehrte Kontrollen nötig.

1.5.2.3 Einteilung nach Schweregrad:

Bei der Osteoporose kommt es zu einer Zerstörung der Knochenarchitektur und damit zu einem hohen Frakturrisiko. Bei der Osteopenie hingegen ist die makroskopische und mikroskopische Knochenstruktur noch intakt. Die Schweregradeinteilung wird anhand der Knochendichte bestimmt (Tabelle 3). Eine weitere Einteilung nach Werten der Knochendichtemessung in Verbindung mit dem klinischen Bild wurde 1995 von Minne veröffentlicht. Hier werden Schweregrad 0-3 unterschieden (Minne 1995, Bartl 2010).

Tabelle 3: Einteilung der Osteoporose nach Schweregrad (Bartl 2010)

Normale Knochendichte: Die Knochendichte weicht weniger als eine Standardabweichung (SD) vom Mittelwert der maximalen Knochendichte ab.

Osteopenie: Die Knochendichte weicht negativ um mehr als 1 und weniger als 2,5 SD vom Mittelwert der maximalen Knochendichte ab.

Präklinische Osteoporose

Manifeste, schwere Osteoporose

1.5.3 Östrogen und sein Einfluss auf die Osteoporose

Schon an der Epidemiologie der Erkrankung (Kap. 1.5.1) lässt sich erkennen, dass es gerade bei postmenopausalen Frauen häufig zu Osteoporose kommt. Ein starker Zusammenhang von Osteoporose und niedrigen Östrogenspiegeln ließ sich bereits in mehreren Studien darstellen. Dieser Zusammenhang lässt sich darauf zurückführen, dass Östrogen eine komplexe Wirkung auf Knochen, enterale Resorption und den Hormonhaushalt hat und somit mehrere Angriffspunkte zur Regulation des Knochenumbaus umfasst.

Wichtig für die regelmäßige Erneuerung des Knochens ist der Kalziumgehalt im Blut, welcher durch die enterale Resorption erhöht werden kann. Östrogen steigert die Ausbildung von Ca⁺- Kanälen im Gastrointestinaltrakt (TRPV6 und TRPV5) und kann auf diesem Weg indirekt die Bildung von stabiler Knochenmatrix positiv beeinflussen (Diaz de Barboza et al. 2015).

Östrogen fördert die Freisetzung der Zytokine (Interleukin -1, -6) und des Wachstumsfaktors TGF-β. Dieser induziert die Apoptose der Osteoklasten und verschiebt so die Gesamtbilanz des Knochens in Richtung Zunahme der Knochenmasse (Pacifici 1998, Riggs 2000). Frauen haben somit in der östrogenreichen prä-Menopausalen Lebensphase einen gewissen Anteil an "Zusatzknochen" im Vergleich zu Männern aufbauen können. Diese Reserve steht in Schwangerschaften dem Fetus zur Verfügung, um eine beständige Kalzium- Versorgung zu gewährleisten. In der Menopause kommt es durch den Östrogenabfall nicht nur zum Abfall von TGF-β, sondern auch zur Zunahme der T-Lympohzyten im Knochenmark. Diese vermitteln eine vermehrte TNF-α-Sekretion. TNF-α hat gegenteilige Wirkung und aktiviert die Osteoklasten, somit wird der Knochenabbau gefördert (Ziegler und Nawroth 2006).

1.5.4 Risikofaktoren

Erstes Anzeichen einer Osteoporose ist oft erst eine Fraktur. Gerade bevor diagnostische Möglichkeiten etabliert wurden, manifestierte sich die Osteoporose oftmals rein klinisch. Heute können wir durch große Studien zeigen, dass es multiple Risikofaktoren gibt, die zu einer primären oder sekundären Osteoporose führen können. Hierzu zählen die in der Tabelle aufgeführten Risikofaktoren (Tabelle 4).

Beeinflussbare Risikofaktoren		
Lebensstil:	Bewegungsmangel	
	ungenügende Ca⁺- Zufuhr	
	Vitamin-D-Mangel	
	Nikotinabusus	
	übermäßiger Alkoholkonsum	
	niedriger BMI	
	übermäßige sportliche Aktivität	
Nicht beeinflussbare Risikofaktoren		
Genetische Faktoren:	weibliches Geschlecht	
	Elternteil mit osteoporosebedingter prox.	
	Femurfraktur	
Lebensalter		
Frakturen nach dem 45. Lebensjahr		
Hormonelle Veränderungen:	Nullipara	
	Östrogenmangel	
	Testosteronmangel	
	Amenorrhoe	
	späte Menarche und frühe Menopause	

Tabelle 4: Risikofaktoren für Osteoporose (Bartl 2010)

Das Lebenszeitrisiko einer osteoporosebedingten Fraktur liegt bei 47,3 % für Frauen und etwa 23,8 % für Männer, unabhängig davon, welcher Knochen betroffen ist (Nguyen et al. 1996, Kanis et al. 2000). Das Risiko einer Fraktur in Abhängigkeit von der Knochendichte konnte in mehreren Studien gezeigt werden. Die Kombination aus Knochendichtemessung und Anamnese der möglichen weiteren Risikofaktoren kann daher eine sehr genaue Fraktur-Risikoeinschätzung ermöglichen (Bartl 2010). Viele der Risikofaktoren sind genetisch bedingt oder durch den hormonellen Status nicht sonderlich beeinflussbar. Auf der anderen Seite zeigt die Tabelle auch Faktoren, die sich durchaus durch den Patienten beeinflussen lassen. Bei 90 % der untersuchten Patienten im Alter von 70 Jahren ist ein Vitamin-D-Mangel festzustellen (< 30 ng/ml). Dies kann mit mangelnder Vitamin-D-Zufuhr oder oft auch mangelnder Sonnenexposition in Zusammenhang gebracht werden (Breysse et al. 2015). Weitere beeinflussbare Größen beziehen sich auf den Ernährungszustand. Ein BMI unter 20 erhöht das relative Risiko einer proximalen Femurfraktur um den Faktor zwei (Baum und Peters 2008).

1.6 Diagnostik

Aktuelle Versorgungszahlen zeigen eine starke Unter- bzw. Fehlversorgung der Osteoporose. Der deutsche Dachverband Osteologie (DVO) hat sich daher zur Aufgabe gemacht, eine Leitlinie zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie für Frauen ab der Menopause und für Männer ab dem 60. Lebensjahr zu erstellen. Eine weiterführende Diagnostik der Osteoporose sollte immer entweder nach niedrigtraumatischen Frakturen oder bei solchen Krankheiten erfolgen, bei denen die Evaluation des Frakturrisikos eine therapeutische Konsequenz hat. Ansonsten sollte die Diagnostik nach der DVO Leitlinie erst ab einer 10-Jahres-Fraktur-Wahrscheinlichkeit von > 20 % erfolgen, die auf Grundlage klinischer Risikofaktoren nach dem DVO-Risikomodell 2006 abgeschätzt wird. Die Tabelle 5 stellt Konstellationen dar, bei denen dieser Wert erreicht wird. Die Diagnostik umfasst neben der Anamnese auch klinische Untersuchung, DXA-Knochendichtemessung, konventionelles Röntgen von Brust- und Lendenwirbelsäule und eine Labordiagnostik (Leitlinie Osteoporose 2017).

Alter (Jahre)		Risikoprofil, bei dem eine Basisdiagnostik empfohlen	
Frau	Mann	(sind)	
50-60	60-70	Wirbelkörperfraktur	
		periphere Fraktur als Einzelfallentscheidung	
60-70 70-80		Wirbelkörperfraktur	
		periphere Fraktur	
		proximale Femurfraktur eines Elternteils	
		(Untergewicht, Nikotinkonsum, multiple Stürze, Immobilität)	
> 70	> 80	Lebensalter als Risiko ausreichend	

Tabelle 5: Empfehlung für die Durchführung einer Basisdiagnostik (Pfeilschifter 2006)

1.6.1 Anamnese

Die Anamnese ist der erste Schritt zur Diagnostik der Osteoporose. Ziel ist es, Informationen über vorliegende Risikofaktoren, Beschwerden, Erkrankungen und eine eventuelle aktuelle Medikation zu erlangen, die mit einer Osteoporose in Zusammenhang stehen könnten. Weiter muss auf familiäre Vorbelastungen und andere Anzeichen geachtet werden, die auf eine genetische Komponente schließen lassen. Weitere Aspekte sind Alter, Gewicht- und Körpergrößenentwicklung sowie zurückliegende Frakturen und Stürze. Um bei älteren Menschen einen Vergleichswert zur aktuellen Körpergröße zu erhalten, kann man beispielsweise die Körpergröße um das 25. Lebensjahr erfragen. Sofern dies nicht erinnerlich ist, lässt es sich evtl. auf alten Dokumenten wie dem Führerschein ablesen. Studien haben gezeigt, dass es eine Korrelation zwischen niedriger BMD und einem Körpergrößenverlust von mehr als 4 cm gibt (Sanila et al. 1994). Auf Basis der gewonnenen Informationen wird die Indikation zur weiterführenden Diagnostik gestellt (Bartl 2010).

1.6.2 Klinische Untersuchung

Ziel der klinischen Untersuchung ist der Ausschluss von Frakturen bzw. Funktionseinschränkungen, die zum Beispiel durch eine seit längerem bestehende Fraktur zustande gekommen sein könnten.

Im fortgeschrittenen Stadium kann es zu Wirbelkörperfrakturen kommen, welche oft durch Rückenschmerzen und eine Höhenminderung von mehr als 4 cm klinisch auffällig werden. Der massive Höhenverlust ist durch Sinterung der Wirbelsäule bedingt.

Der Scheitel-Sohlen-Abstand als Wert für die Körpergröße ist bei der Osteoporose vermindert, wohingegen die Armspannweite, die normalerweise der Körpergröße entspricht, hier unverändert bleibt. Durch Sinterung der Wirbelsäule wird das Abdomen gestaucht und der Abstand vom unteren Rippenbogen zum Beckenkamm vermindert sich (Abbildung 1, B). Dies zeigt sich charakteristisch durch Hautfalten vom Rücken zu den Flanken, welche tannenbaumartig auslaufen. Die teils eingesunkenen Wirbelkörper berühren sich an den Dornfortsätzen, man spricht vom Baastrup-Syndrom oder sog. *kissing spine*. Klinisch kommt es zu einer Verlagerung des Körperschwerpunktes nach vorne, der Gang wird kleinschrittig und unsicher, was mit erhöhter Fallneigung einhergeht. Die Patienten zeigen bei Einbruch der Wirbelkörper einen Rundrücken der klinisch mit gesteigertem Wand-Hinterhaupt-Abstand auffällig wird (Abbildung 1, A). Um Koordination sowie Muskelkraft und das damit verbundene Sturzrisiko weiter einschätzen zu können, werden von der DVO-Leitlinie zusätzlich weitere Tests wie der Up&Go-Test oder der Chair-rising-Test empfohlen (Baum und Peters 2008, Bartl 2010, Leitlinie Osteoporose 2017).



Abbildung 1: Klinische Tests zur Diagnostik einer Plattenimpressionsfraktur: A= Test zur Bestimmung des Wand-Hinterhaupt Abstandes. Dieser ist positiv, sobald der Abstand > 0 cm entspricht. B= Rippen-Beckenkamm-Abstands-Test. Dieser ist positiv, wenn in den dazwischenliegenden Spalt nur noch zwei oder weniger Finger passen (Green et al. 2004) mit freundlicher Genehmigung durch JAMA

1.6.3 Labordiagnostik

Zur Abgrenzung zwischen primärer und sekundärer Osteoporose ist die Kontrolle spezifischer Laborparameter erforderlich. Bei der primären Osteoporose liegen die zu kontrollierenden Laborparameter im Normbereich, allenfalls frische Frakturen können kurzfristige Laborwertveränderungen hervorrufen. Die genaue Labordiagnostik ist bei der sekundären Osteoporose unentbehrliches Instrument, um die verschiedenen Unterformen voneinander abzugrenzen und eine eindeutige Ursache der sekundären Osteoporose festzustellen. Bei Verdacht auf Osteoporose sollte ein regelmäßiges Screening mit den folgenden Parametern durchgeführt werden (Tabelle 6).

Tabelle 6: Screeningparameter der Osteoporose (Leitlinie Osteoporose 2017)

Blutkörpersenkungsgeschwindigkeit (BSG) und CRP Kleines Blutbild Kalzium und Phosphat, Natrium fakultativ (Serum) Alkalische Phosphatase (Serum) Glukose (Serum) Transaminasen und Gamma-GT (Serum) Kreatinin (Serum), bei erhöhten Werten Kreatinin-Clearance TSH

In Einzelfällen können 25-Hydroxyvitamin D3, Testosteron beim Mann und Knochenumbaumarker bestimmt werden. Der Knochenstoffwechsel lässt sich durch verschiedene Marker für Knochen-Auf- und -Abbau untersuchen. Die durch Osteoblasten synthetisierte alkalische Phosphatase und das Osteokalcin sprechen für eine erhöhte Knochensynthese, genau wie das Prokollagen Typ I N-terminale Propeptid (PINP). Als Zeichen eines erhöhten Knochenabbaus sprechen Kollagenbausteine und Kollagen-Quervernetzungsprodukte (*cross links*), die bei Knochanabbau erhöht im Blut festzustellen sind. Hierzu zählen Desoxypyridinolin und Pyridinolin, welche im Urin bestimmt werden. Die C- und N-terminalen Cross-link-Telopeptide (CTX und NTX) können sowohl in Urin als auch in Serum festgestellt werden (Garnero und Delmas 2004). Die Knochenmarker werden vor Allem zur Kontrolle des Therapierfolges mit Bisphosphonaten oder Hormonen genutzt. Bei einer Reduktion der Marker des Knochenabbaus um min. 30 % gegenüber dem Ausgangswert spricht man von einem Therapieerfolg und Ansprechen (*response*) der Therapie (Bartl 2010).

1.6.4 Konventionelles Skelettröntgen

Röntgenaufnahmen des Skelettes sind für die Auffindung bereits abgelaufener stummer Frakturen oder Einbrüche sehr wertvoll. Da sich osteoporotisch veränderter Knochen erst bei Verlust von mehr als 30 - 40 % der Knochenmasse radiologisch auffällig zeigt, ist eine Frühdiagnose so nicht durchführbar. Radiologische Zeichen einer Osteoporose sind eine auffällige Rahmenstruktur des Wirbelkörpers, die durch Verlust des trabekulären Knochens bei noch erhaltener äußerer Substantia corticalis entsteht. Der Knochen sieht aus *"wie mit dem Bleistift gezeichnet"* (Bartl 2010, S.79). Typisch können sich Sinterungsfrakturen sowie Fisch- und Keilwirbel mit einer Höhenminderung von mehr als 20 % bilden (Green et al. 2004).

Das konventionelle Röntgen ist zur Abklärung unklarer Rückenschmerzen unentbehrlich. Nur so können auch Differenzialdiagnosen wie Osteomalazie, maligne Knochenläsionen oder entzündliche Gelenkveränderungen ausgeschlossen werden.

1.7 Möglichkeiten weiterer bildgebender Verfahren

Unter Auswertung von Röntgenbildern der Brust- und Lendenwirbelsäule mittels automatisierter Konturfindungsprogramme können bereits kleine Formveränderungen der Wirbelkörper gefunden werden. Zur Auswertung wird bei allen gebräuchlichen Verfahren die anteriore, mediale und posteriore Wirbelkörperhöhe gemessen. Bei Reduktion von > 15 % bzw. > 4 mm Höhe spricht man von einem Wirbelkörpereinbruch. Die DVO-Leitlinie empfiehlt mit der Graduierung der Wirbelkörperfrakturen nach Genant eine Einschätzungsmöglichkeit für das Risiko weiterer osteoporotischer Frakturen. Nach Genant werden die Frakturen in drei Stufen eingeteilt (Genant et al. 1993):

Tabelle 7: Graduierung Wirbelkörperfraktur (Genant et al. 1993)

Grad 1: = < 25 % Höhenminderung Grad 2: = 25 - 40 % Höhenminderung Grad 3: = > 40 % Höhenminderung

1.7.1 Knochendichtemessung

Mittels der Knochendichtemessung (Osteodensitometrie) lässt sich primär überprüfen, ob eine Osteoporose nach der operativen Definition der WHO vorliegt (T-Score < -2,5).

Nur durch die direkte Messung der Knochendichte (BMD) kann eine frühzeitige Diagnose der Osteoporose erfolgen. Schon ein Verlust von 10 % der Knochendichte lässt das Risiko einer Fraktur der Lendenwirbelsäule verdoppeln und eine Fraktur des Femurs verdreifachen. Die alleinige Messung der Knochendichte zur Ermittlung des Frakturrisikos hat sich jedoch als ungeeignet herausgestellt. Studien haben gezeigt, dass in weniger als 20 % der Fälle osteoporotische Frakturen allein auf eine verringerte Knochendichte zurückzuführen waren. Die Knochendichtemessung sollte daher immer mit gleichzeitiger Beachtung weiterer Risikofaktoren erfolgen (Watts et al. 2005, Bartl 2010).

1.7.2 DXA-Messung

Als sehr geeignetes und ausgereiftes Verfahren zur Messung der Knochendichte wird von der DVO-Leitlinie die DXA-Messung "Dual-X-Ray-Absorptiometrie" empfohlen. Hierbei wird der Mineralgehalt des Knochens mittels zweier Energiestrahlen berechnet, die in unterschiedlicher Intensität durch das Skelett gegeben werden und in abgeschwächter Form zurück zu einem Detektor gelangen. Die Messung erfolgt am proximalen Femur sowie an den Lendenwirbelkörpern (L1-L4). Das Prinzip beruht auf Minderung der Intensität der Röntgenstrahlung bei Durchtritt durch das Knochengewebe. So kann indirekt ein Rückschluss auf die Knochendichte erfolgen. Durch Vergleich beider Messungen kann der weichteilbedingte Absorptionsanteil ermittelt und eliminiert werden. Ein errechneter Mineralgehalt des Skelettes kann dann als Dichte bezogen auf die Fläche (g/cm²) angegeben werden.

Vorteile dieser Messmethode liegen in der schnellen Zugänglichkeit, den geringen Kosten (etwa 30 € für Messung von LWS und Hüfte) und der nicht invasiven Methodik. Die Strahlenbelastung ist mit 1-3 mRem etwa 1-10 % geringer als bei einer normalen Röntgenaufnahme. Aufgrund vieler weiterer Vorteile ist die DXA-Messung die einzige von der WHO anerkannte Standardmethode zur Definition der Osteoporose und einer möglichen Therapieindikation (Bartl 2010).

1.7.3 Quantitative Computertomographie (QCT)

Die quantitative Computertomographie erlaubt eine Unterscheidung zwischen spongiösem und kompaktem Knochen. Frühe Verluste des trabekulären Knochens lassen sich durch die QCT deutlich besser erkennen. Zur Messung kann ein normaler CT- Scanner genutzt werden. Lediglich ein externes Knochenmineral-Phantom muss zur Kalibrierung vorhanden sein (Genant et al. 1996). Für diese genaue Bildgebung ist eine höhere Strahlenbelastung (100-300 mRem) erforderlich. Hinzu kommt eine Untersuchungsdauer von ungefähr 20 Minuten. Für Verlaufskontrollen stellt diese Methode daher keine gute Grundlage dar. Aufgrund der Abhängigkeit der Ergebnisse vom Untersucher und der begrenzten CT-Verfügbarkeit konnte sich das QCT bisher nicht gegen das Standardverfahren der DXA-Messung durchsetzen. Die bei der QCT-Methode angefertigte Bildgebung gliedert sich in zwei Aufnahmen. Eine erste seitliche digitale Radiogramm-Aufnahme der LWS ermöglicht die Festlegung der Schichtebene (L1-L3), in der dann die Messung erfolgen soll. Die gemessenen und mit einem Kalibrierphantom verglichenen Werte werden hier als Masse an Hydroxylapatit (HA) pro Volumeneinheit berechnet. Die ermittelten T-Werte der QCT-Messung sind also nicht mit den T-Werten der DXA-Messung zu vergleichen.

1.8 Therapie

Die im Folgenden aufgeführten Therapievorschläge orientieren sich an der Leitlinie des Dachverbandes Osteologie von 2017. Es werden Basismaßnahmen und spezifische medikamentöse Therapieformen aus aktuellen Studien zur Behandlung der Osteoporose vorgestellt.

1.8.1 Basismaßnahmen und Prophylaxe

Die Umsetzung von Basismaßnahmen kann schon bei Patienten mit geringem Risikoprofil und unabhängig von einer spezifischen medikamentösen Therapie die Rate an Frakturen senken. Neben medikamentösen Maßnahmen stehen hier auch die Aufklärung und Schulung von Patienten, Familienmitgliedern und Pflegeeinrichtungen im Vordergrund. Trotz hohen Fallzahlen konnte gezeigt werden, dass Verständnis und Wissen im Umgang mit Patienten, die an Osteoporose leiden, oftmals noch fehlen (Alamri et al. 2015).

Ziel der Basismaßnahmen ist es, der Osteoporose vorzubeugen und das Frakturrisiko zu senken. In Studien hat sich gezeigt, dass über 90 % der Hüftfrakturen durch einen Sturz verursacht werden. Die Basismaßnahmen sollten daher auch eine effektive Sturzprophylaxe beinhalten. Sowohl Hüftpolsterung als auch Rückenorthesen können einfache Schutzmaßnahmen darstellen, jedoch hat ein Review mehrerer Studien

gezeigt, dass sich bei Hüftpolsterung oft kein effektiver Rückgang der Frakturzahlen feststellen lässt. Zudem kann es zu Nebenwirkungen wie Hautreizungen kommen (Santesso et al. 2014). Eine Sturzanamnese kann Aufschluss liefern, welche Tätigkeiten und Barrieren im häuslichen Umfeld einen Sturz provozieren können. Gleichzeitig sollte ein sicherer Gang, beispielsweise mit Gehilfen in Verbindung mit körperlicher Aktivität, trainiert werden, um dem Knochenschwund im Rahmen der Osteoporose durch fehlende Belastung vorzubeugen. Medikamente, die orthostatisch oder sedierend wirksam sind, sollten nur unter strenger Indikationsstellung weiter verabreicht werden.

Die Supplementierung von Vitamin-D (300-1100 IU/d) und Kalzium (500-1200 mg/d) konnte bei Mangelzuständen in mehreren Studien als effektive Maßnahme zur Reduktion von Knochenabbau und Senkung des Frakturrisikos bei älteren Menschen festgestellt werden (Chung et al. 2011). Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass 75 % aller Erwachsenen weltweilt einen Serum-Vitamin-D-Spiegel von < 30 ng/ml vorweisen (Reddy und Edwards 2017). Gerade bei älteren Menschen ohne regelmäßige Sonnenexposition, Farbigen und Bewohnern der nördlichen Hemisphären ist ein Vitamin-D-Mangel zu erwarten. Hier muss eine regelmäßige Substitution erfolgen. Die National Osteoporosis Foundation empfiehlt eine tägliche Vitamin-D-Zufuhr von 800- bis 1000 IU pro Tag ab dem 50. Lebensjahr (Cosman et al. 2014). Kalzium sollte bei Mangel-zuständen mit 1000 mg täglich substituiert werden.

Sollte es bereits zu einer osteoporotischen Fraktur gekommen sein, empfiehlt die DVO-Leitlinie die Schmerztherapie nach WHO-Stufenschema, um neben der Schmerzreduktion auch eine frühe Mobilisation zu ermöglichen. Eine psychosoziale Betreuung sowie Rehabilitationsmaßnahmen, Physiotherapie und Funktionstraining in Kombination mit einer antiosteoporotischen Pharmakotherapie sollten eingeleitet werden (Leitlinie Osteoporose 2017).

1.8.2 Medikamentöse Therapie

Die Indikation zur medikamentösen Therapie kann nach der DVO-Leitlinie zum einen anhand des T-Score (< -2,5) bei manifester Fraktur und zum anderen nach dem 10-Jahres-Frakturrisiko gestellt werden.

Die Evidenz der antiosteoporotischen medikamentösen Therapie wurde in den meisten Studien für postmenopausale Frauen mit einem T-Score von < -2,5 nachgewiesen. Ab einem T-Score Wert von > -2,0 ist die Wirksamkeit einer medikamentösen Therapie nicht belegt. Die Datenlage zur Therapieeffizienz ist aktuell noch zu niedrig. Trotzdem kann eine Therapie bei manifester Fraktur der Lendenwirbelsäule oder des proximalen Femur in jedem Fall bei DXA T-Score < -2,0 und individuell auch bei T-Score > -2,0 erfolgen.

Abweichend gibt die Leitlinie eine Therapieempfehlung bei Konstellationen, in denen das 10-Jahres-Frakturrisiko bei mindestens 30 % liegt. Die Wahrscheinlichkeit wird anhand verschiedener Risikofaktoren (Kap. 1.5.4) in Kombination mit dem T-Score bestimmt. In der nachfolgenden Tabelle sind einige solche Konstellationen aufgeführt:

Tabelle 8: Entscheidungsgrundlage für eine medikamentöse Therapie bei 10-Jahres-Frakturrisiko > 30 % (Leitlinie Osteoporose 2017)

T-Score Mittelwert L1-L4, Femurhals oder Gesamtfemur				

1.8.3 Hormonersatztherapie

Im Rahmen der Menopause kommt es bei Frauen zum Abfall des Östrogenspiegels. Dies bringt neben klimakterischen Beschwerden auch einen gesteigerten Knochenabbau mit sich (Kap. 1.5.3), der postmenopausal einen entscheidenden Faktor für die Entstehung von Osteoporose darstellt. Eine Therapiemöglichkeit ist in der Östrogenbzw. Östrogen-Gestagen-Substitution zu sehen. Man spricht dann von *hormone replacement therapy* (HRT). Mit dieser Therapie können klimakterische Beschwerden vermindert und der Knochenabbau gebremst werden. Schon Jahre vor der Menopause führt der absinkende Östrogenspiegel zum Verlust der Knochenmasse; eine oft zitierte Studie von Chapuy et al. beschreibt einen postmenopausalen jährlichen Knochenverlust von 3 % bei ausbleibender Östrogensubstitution (Chapuy et al. 1992).

Zur Langzeituntersuchung der Wirkung einer HRT und deren Einfluss auf den Knochen sowie zur Feststellung von Nebenwirkungen wurden mehrere große Studien begonnen. Die Women's Health Initiative (WHI) führte über fünf Jahre eine randomisierte

Studie an 161.809 postmenopausalen Frauen im Alter von 50-79 Jahren durch, bei der die Wirkung von Östrogen und Kombinationspräparaten untersucht wurde. Die hieraus publizierten Daten zeigten eine signifikante Senkung des Frakturrisikos unter einer HRT (Rossouw et al. 2002). Dies konnte auch in einem Review weiterer Studien von Torgerson und Bell-Syer bestätigt werden. Hier zeigte sich eine um 33 % abgesenkte Inzidenz für vertebrale Frakturen bei Langzeit-HRT (Torgerson und Bell-Syer 2001). Weiter wurden jedoch in der WHI-Studie auch erhebliche Nebenwirkungen der Therapie mit einem Östrogen-Gestagen-Präparat festgestellt, zu denen ein erhöhtes Risiko für Mammakarzinom, koronare Herzerkrankung, Apoplex und Lungenembolie zählte. Die Studie wurde daraufhin vorzeitig abgebrochen.

Als Nebenwirkung eines reinen Östrogenersatzes wurde eine signifikante Steigerung des Risikos für ein Ovarialkarzinom festgestellt (Lacey et al. 2002), auch das Risiko für ein Endometriumkarzinom ist bei Monotherapie erhöht.

Die Monotherapie wird aufgrund dieser Erkenntnisse nur bei hysterektomierten Frauen empfohlen, ansonsten kann das Risiko durch eine HRT mittels Östrogen-Gestagen-Kombinationspräparat sowohl für Ovarial- als auch Endometriumkarzinom gesenkt werden (Beral et al. 2005). Eine Therapie wird aufgrund der erheblichen Nebenwirkungen heute jedoch nur noch selten eingesetzt.

1.8.4 Östrogen-Rezeptor-Antagonisten/ -Agonisten

Diese Medikamentengruppe der sog. SERM's (*selective estrogen receptor modulators*) wirkt in verschiedenen Geweben direkt an den Östrogenrezeptoren ER-α und ER-β. Dabei wirken sie nur analog zum körpereigenen Östrogen, stellen aber selbst kein Steroidhormon dar. Bekannte Vertreter dieser Stoffgruppe sind Tamoxifen und das draus weiterentwickelte Raloxifen. Tamoxifen wird zur Behandlung von Brustkrebs eingesetzt. Es wirkt als Antiöstrogen auf Brustgewebe, jedoch wie Östrogen positiv auf den Knochenaufbau. Die reine positive Wirkung auf den Knochen wurde durch das neuere Präparat Raloxifen weiterentwickelt, wohingegen die Wirkung auf das Brustgewebe wegfällt. Somit konnten ungewollte Nebenwirkungen wie Brustspannen, unregelmäßige Blutungen und Wassereinlagerung vermieden werden. Am Knochen werden auf zellulärer Ebene die Osteoklasten gehemmt.

Die Wirkung von Raloxifen wurde in der MORE-Studie (*multiple outcomes of raloxifen evaluation*) genauer untersucht. Unter Therapie ließ sich in der Studiengruppe das Risiko vertebraler Frakturen um 50 % senken (Agnusdei und Iori 2000). Ein weiterer

positiver Effekt in einer Therapie mit Raloxifen ist darin zu sehen, dass das Risiko, an Mammakarzinom zu erkranken, bei Östrogen-Rezeptor-positivem Brustkrebs um 55 % sinkt. Ein Nachteil ist in der Steigerung des Risikos einer tiefen Beinvenenthrombose und eines Apoplex zu sehen. Eine negative Wirkung auf das Risiko einer koronaren Herzerkrankung wurde nicht festgestellt (Barrett-Connor et al. 2006).

1.8.5 Bisphosphonate

Bisphosphonate gehören zu den antiresorptiven Substanzen. In den 1980er-Jahren wurden Bisphosphonate für die Behandlung von Knochenerkrankungen entdeckt. In Deutschland sind sie für die Behandlung der Osteoporose, aber auch beispielsweise bei der Tumor-assoziierten Hyperkalzämie zugelassen. Eines der ersten Präparate war Etidronat. Das heutige, stark weiterentwickelte Zoledronat hat eine 20.000-fach stärkere Potenz, dazwischen gibt es mehrere Präparate in unterschiedlich starker Wirkung, welche in der folgenden Tabelle aufgeführt werden (Tabelle 9).

Bisphosphonate		relative Potenz
Substanz	Handelsname	
Etindronat	Didronel	1
Clodronat	Ostac, Bonefos	10
Pamidronat	Aredia	100
Alendronat	Fosamax, Fosavance	1000
Risedronat	Actonel	5000
Ibandronat	Bonviva, Bondronat	10.000
Zoledronat	Aclasta, Zometa	20.000

Tabelle 9: Auflistung der in der Klinik verwendeten Bisphosphonate (Bartl 2010, S.147)

Bisphosphonate haben eine hohe Affinität zur Knochenoberfläche, und zwar verstärkt zur arrodierten Knochenoberfläche unter den Osteoklasten. Hier können die Osteoklasten effektiv gehemmt werden, zusätzlich kommt es zu einer Reaktivierung der supprimierten Osteoblasten. Es überwiegt der Knochenaufbau durch die Osteoblasten, daraus resultiert eine positive Bilanz der Knochenmasse. Es kommt zwar zur Verlangsamung des Knochenumsatzes, jedoch nie zur Stagnation. Bisphosphonate werden im Zuge des Knochenumbaus in den Knochen eingelagert und können dort mehrere Jahre nachgewiesen werden.

In mehreren Studien wurden Wirkung und Effekt der verschiedenen Präparate genauer untersucht. Die TRIO-Studie von Paggiosi et al. verglich 2014 die Wirkung von Alendronat, Ibandronat und Risedronat. In einer randomisierten Kohorte von 172 postmenopausalen Frauen mit einem T-Score < -2,5 wurden Untergruppen gebildet, die über zwei Jahre mit jeweils einem der drei genannten Präparate behandelt wurden. Es zeigte sich, dass alle Präparate einen positiven Effekt auf die BMD haben, dabei war der stärkste Effekt auf die Lendenwirbelsäule und die totale BMD bei Ibandronat und Alendronat festzustellen (Paggiosi et al. 2014). Aktuelle Studien konnten zeigen, dass die Bisphosphonat-Therapie auch einen protektiven Effekt auf das Brustkrebsrisiko hat (Ebert et al. 2014). Sollten dabei Knochenmetastasen vorliegen, können Bisphosphonate hier einen signifikanten Rückgang der Metastasen bewirken (Kremer et al. 2014). Als Nebenwirkung der Bisphosphonate sind bei oraler Einnahme Beschwerden des Gastrointestinal-Traktes wie Bauchschmerzen, Erbrechen und Durchfall bekannt. Durch Komplexbildung mit im gastrointestinalen Trakt befindlichen Kalziumionen können Hypokalzämien vorkommen. Um Schleimhautreizungen bei Reflux in die Speiseröhre zu vermeiden, sollte die Einnahme immer vor dem Essen in aufrechter Körperposition erfolgen. Eine seit 2003 bekannte Nebenwirkung kann die Bisphosphonatassoziierte Osteonekrose des Kiefers sein (Filleul et al. 2010). Eine Studie konnte zeigen, dass diese Nebenwirkung vor allem bei Patienten mit Multiplem Myelom und skelettalen Metastasen auftreten (94 % der beschriebenen Fälle) (Woo et al. 2006).

1.8.6 Parathormon

Parathormon (PTH) wird in der Nebenschilddrüse gebildet und auch gespeichert. Es dient der Regulation unseres Kalziumhaushaltes. Bei Absinken des extrazellulären Kalziums wird PTH in das Blut freigesetzt, um den Kalziumspiegel zu erhöhen und die Konzentration von Phosphat zu senken. Dies geschieht mit Hilfe der Niere. Hier stimuliert PTH die vermehrte Rückresorption von Kalzium aus dem Primärharn. Parallel wird Kalzium auch vermehrt aus dem Knochen freigesetzt und die Synthese von Calzitriol angetrieben. Phosphat wird parallel über die Niere ausgeschwemmt. Physiologischerweise wird Parathormon kontinuierlich dem Blutkreislauf zugeführt, so wirkt es osteolytisch. Um Parathormon als osteoanaboles Hormon nutzen zu können, muss die Applikation jedoch pulsatil erfolgen. Aus noch ungeklärten Gründen kann so die Osteoblastenapoptose reduziert werden. Durch längere Überlebenszeit wird die Kollagenproduktion dann erhöht (Canalis et al. 2007).
Einleitung

In einer Studie konnte 2007 die Wirkung von rekombinantem humanen Parathormon (1-84) (PTH) auf die *bone mineral density* (BMD) und das relative Risiko von vertebralen Frakturen gezeigt werden. Dazu wurden 2532 postmenopausale Frauen randomisiert und doppelblind mit einer BMD von 3.0 SD oder mehr (T-Score < -3,0) über einen Zeitraum von 18 Monaten täglich mit 100 µg rekombinantes PTH oder Placebo behandelt. Das Risiko einer neuen bzw. verschlechterten vertebralen Fraktur konnte in der PTH Gruppe um 58 % gesenkt werden. Die Knochendichte (BMD) veränderte sich ab dem 12. und 18. Monat signifikant zwischen Behandlungs- und Placebo Gruppe um 6,9 % vertebral und 2,5 % femoral (Greenspan et al. 2007).

1.8.7 Strontiumranelat

Eine seit 2004 in Deutschland zugelassene Substanz zur Behandlung der Osteoporose ist das Strontiumranelat. Chemisch ähnelt das enthaltene Strontium als Erdalkalimetall sehr dem Kalzium und gehört damit zu den knochenaffinen Elementen; zur Steigerung der Resorption wurde es an Ranelicsäure gebunden. Strontium wird in die Hydroxylapatit-Kristalle des Knochengewebes eingebaut. Über Kationsensing-Rezeptoren entfaltet es durch Aktivierung von Prä-Osteoblasten eine osteoanabole Wirkung und bremst zugleich die Knochenresorption durch Hemmung der Osteoklasten und Prä-Osteoklasten. Somit kommt es zur Vermehrung der Knochenmatrix. Die Festigkeit des Knochens ist unter Strontiumranelat erhöht, da die Substantia compacta an Dicke zunimmt. Auch Dicke und Anzahl des trabekulären Knochens erhöht sich (Bain et al. 2009).

Die Wirkung von Strontiumranelat konnte sowohl für das periphere als auch für das zentrale Skelett in zwei großen Studien belegt werden.

Die im Jahr 2005 veröffentlichte TROPOS-Studie (*treatment of peripheral osteoporosis*) zeigt auf, dass bei fünfjähriger Therapie mit Strontiumranelat eine Reduktion von peripheren Frakturen erzielt werden kann. Hierzu wurden 5091 postmenopausale Osteoporosepatientinnen randomisiert entweder mit einer täglichen Dosis von 2 g Strontiumranelat oder einem Placebo behandelt. In der High-Risk Subgruppe (T-Score Hüftkopf < -3) konnte unter Therapie eine Reduktion des relativen Risikos einer prox. Femurfraktur um 36 % festgestellt werden. Auch das relative Risiko einer vertebralen Fraktur konnte um 39 % (bei Therapie über drei Jahre) oder 45 % (bei früher Therapie direkt postmenopausal) gesenkt werden (Reginster et al. 2005). Einen ähnlichen Effekt auf das relative Risiko vertebraler Frakturen konnte zuvor mit der SOTI-Studie 2004 (*spinal osteoporosis therapeutic intervention*) belegt werden (Meunier et al. 2004). Die European Medicine Agency (EMA) hat 2014 in einer Veröffentlichung vor möglichen Nebenwirkungen einer Therapie mit Strontiumranelat gewarnt. Nach Studienlage kann Strontiumranelat gerade bei Patienten mit chronischer Herzerkrankung oder Gerinnungsstörung zu kardiovaskulären Nebenwirkungen führen. Ein positiver Effekt zur Vorbeugung von Frakturen ist laut EMA unumstritten, die Therapie wird aufgrund der Nebenwirkungen jedoch ausschließlich restriktiv empfohlen. Patienten ohne kardiale Vorerkrankung oder fehlende medikamentöse Alternative können weiterhin behandelt werden (EMA 2014).

1.9 Tiermodell und angewandte Auswertungsmethoden

Die Implementierung neuer antiosteoporotischer Pharmaka bedarf mehrerer tierexperimenteller Studien. Hierzu lassen sich in der Literatur verschiedene Tiermodelle finden. Je nach Fragestellung sind Modelle mit Schafen, Mäusen, Hasen oder Ratten geeignet (Turner et al. 2001, Baofeng et al. 2010, Oheim et al. 2012, Oheim et al. 2017, Dias et al. 2018, Wanderman et al. 2018). Kein Tiermodell kann dabei exakt die Hormonmangelsituation der postmenopausalen Osteoporose nachahmen. Dennoch gibt es hierzu gravierende Ähnlichkeiten, die eine Vergleichbarkeit zulassen. Bereits seit mehreren Jahrzenten wird das Tiermodell der ovariektomierten Ratte zur Erforschung der Osteoporose genutzt (Saville 1969, Gürkan et al. 1986). Eine Vielzahl an Studien konnte die Vergleichbarkeit des Rattenmodells zur postmenopausalen Osteoporose belegen. Bei Beiden kommt es ausgelöst durch den Östrogenmangel zu den charakteristischen Knochenverlusten. Auch das therapeutische Ansprechen auf antiosteoporotische Pharmaka erscheint in bisherigen Studien sehr ähnlich (Kalu 1991). Aufgrund der langjährigen Erfahrung, der breiten Datenbasis und der einfachen Verfügbarkeit war das Tiermodell der ovariektomierten Ratte für diese Studie besonders geeignet.

In diesem Versuch wurden insgesamt drei Methoden genutzt, um die Frage zu beantworten, welchen Einfluss eine Behandlung mit Strontiumranelat auf das osteoporotische proximale Rattenfemur in Abhängigkeit unterschiedlicher Behandlungszeiträumen hat. Hierbei sollte eine prophylaktische und eine therapeutische Behandlung mit Strontiumranelat untersucht werden, zudem wollten wir die Auswirkung einer Kombination von Beiden über einen längeren Zeitraum untersuchen. Einleitung

Mikroradiographie: Der negative Einfluss der Osteoporose auf die kortikale bzw. trabekuläre Knochendichte ist hinreichend bekannt (Wronski et al. 1986, Rodin et al. 1990, Riggs 1991). Eine etablierte Methode zur genaueren Beurteilung dieser Strukturen findet sich in der Anfertigung und Auswertung von Mikroradiographien (Döll 2011, Eimer 2015). Hierrüber lässt sich nicht nur unser Tiermodell überprüfen, sondern auch ein möglicher antiosteoporotischer Effekt von Strontiumranelat auf die Knochenstruktur darstellen und mittels Software genau bemessen. In bisherigen Studien werden zur Beurteilung der Knochenmorphologie im Tiermodell der ovariektomierten Ratte mehrere Messparameter genutzt. Hierzu zählen die kortikale und trabekuläre Knochendichte (%), die mittlere Trabekeldicke (µm), die Anzahl der Trabekelkreuzungen (absolut), die Dichte der Trabekelkreuzungen (n/mm²) oder auch die mittlere Fläche des Trabekelbereiches (mm²) (Marie et al. 1993, Sehmisch et al. 2009, Eimer 2015, Komrakova et al. 2015, Li et al. 2015, Neuerburg 2015). Aufgrund der breiten Datenbases dieser Methode und der Möglichkeit, einen antiosteoporotischen Effekt auch Knochenmorphologischen darzustellen, haben wir uns für diese Methode und zur Bestimmung der genannten Parameter in unserem Versuch entschlossen.

Biomechanischer Bruchtest: Da eine erhöhte mikroradiographische Knochendichte allein nicht unbedingt zu einer erhöhten biomechanischen Knochenfestigkeit führt, ist ein Stabilitätstest zur Beurteilung eines antiosteoporotischen Effektes unumgänglich (Akhter et al. 2004). Frühere Studien nutzen hierzu die axiale Kompressionstestung. Durch Tezval et al. wurde jedoch ein Bruchtest etabliert, bei dem es durch laterale Krafteinwirkung auf das proximale Femur osteoporotischer Ratten zu einer pertrochantären Fraktur kommt (Tezval et al. 2010). Da diese Versuchsanordnung auch den realen Umständen einer Hüftfraktur z.B. nach seitlichem Sturz auf das proximale Femur sehr ähnelt, haben wir uns für diese Methode entschieden. Im Vergleich zur axialen Kompressionstestung zeigte sich die laterale Bruchtestung für die Evaluation einer antiosteoporotischen Therapie sogar als sensitivere Methode (Zhang G et al. 2005). Anhand der in dem Test gemessenen Parameter lässt sich die Widerstandskraft der Femora feststellen und in einem weiteren Schritt untereinander vergleichen. Hierzu wurde nach dem für Bruchtests standardisierten Verfahren nach Stürmer et al. die maximale Krafteinwirkung (N) sowie die Elastizität (N/mm) der Femora einzeln bestimmt (Stürmer et al. 2006, Tezval et al. 2010).

Einleitung

Veraschung und photometrische Stoffmengenbestimmung: Um die in der Bruchtestung und in der Mikroradiographie gewonnenen Daten dem in diesem Versuch applizierten Strontiumranelat zuordnen zu können, bedarf es eines chemischen Nachweises aus den untersuchten Knochen. Zudem sollte der Effekt der Ovariektomie und der einhergehende Verlust des Mineralsalzgehaltes an den Femora aus unserem Tiermodell bestätigt werden. Hierfür wurde eine Veraschung der zu messenden Knochen durchgeführt, um den organischen und anorganischen Anteil der Knochen bestimmen zu können. Mehrere Studien zuvor nutzen hierzu diese Methode (Teófilo et al. 2003, Sehmisch et al. 2009). In einem weiteren Schritt lassen sich nun mittels Säureaufschluss und photometrischer Messung Kalzium, Phosphat und das eingesetzte Medikament Strontiumranelat bestimmen. Auch hier gehen wir analog zu bisherigen Studien vor (Marie et al. 1993, Rude et al. 2006). Die gemessenen Parameter wurden absolut, in prozentualen Anteilen sowie in deren Verhältnis zueinander ausgewertet.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsablauf

Die Versuchsdauer betrug 13 Wochen. Insgesamt beinhaltet der Versuch 60 weibliche Ratten des Stammes Sprague-Dawley, welche in fünf Gruppen zu je zwölf Tieren eingeteilt wurden (siehe auch Tabelle 10). Zu Beginn wurden die drei Monate alten Ratten der entsprechenden Gruppen ovariektomiert, um eine Osteoporose zu induzieren. Acht Wochen später folgte eine operative metaphysäre Osteotomie der Tibia mit anschließender Osteosynthese. Nach weiteren fünf Wochen endete der Versuch. Die Tiere wurden in CO₂-Narkose durch Dekapitation getötet. Knochen, Muskeln und Blut wurden während der Obduktion entnommen. Während der gesamten Versuchszeit wurden die Tiere mit einer Standarddiät in Form von sojafreiem Futter (ssniff SM R/M, 10 mm-Pellets; sniff Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland) gefüttert. Einige Tiere erhielten gruppenspezifisch eine Spezialdiät, bei der Strontiumranelat als Zusatzstoff verabreicht wurde. Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden sowohl das Tiergewicht als auch die Futteraufnahme einmal pro Woche registriert. Die genaue Gruppenaufteilung ist in Tabelle 10 zu erkennen und wird auch in der Arbeit von Weidemann 2014 aus unserer Arbeitsgruppe beschrieben. Die erste Gruppe mit zwölf Tieren diente als Kontrollgruppe. Diese Tiere wurden zu Beginn von den restlichen Tieren separiert und scheinovariektomiert, somit konnte sich keine Osteoporose ausbilden. Genau wie die restlichen Gruppen erhielten die Tiere jedoch acht Wochen nach Versuchsbeginn eine Osteotomie der Tibiametaphyse. Die zweite Gruppe (OVX) wurde ovariektomiert und osteotomiert, ohne jedoch eine medikamentöse Therapie zu erhalten. Die dritte Gruppe (SR th) wurde sowohl ovariektomiert als auch osteotomiert und erhielt für die verbleibenden fünf Wochen nach Osteotomie Strontiumranelat bis zum Ende des Versuches. Die vierte Gruppe (SR pr) wurde ovariektomiert und osteotomiert, der Zeitraum zwischen Ovariektomie und Osteotomie betrug acht Wochen. Die Tiere wurden ausschließlich für diese Zeit mit Strontiumranelat behandelt, danach wurde das Medikament über die verbleibenden fünf Wochen abgesetzt. Die Gruppe (SR pr + th) erhielt Strontiumranelat als Zusatzstoff ab der Ovariektomie, dann über den Zeitraum der Osteotomie weiter bis zum Versuchsende (Weidemann 2014). Nach der Obduktion aller Tiere wurde das jeweils linke Femur vollständig freipräpariert und biomechanisch untersucht. Im Anschluss wurde zusätzlich der Mineralgehalt bestimmt. Aus dem jeweils rechten Femur wurden histologische Schnitte angefertigt und diese zur Mikroradiographie genutzt. Mit den entstandenen Bildern konnten anschließend histomorphometrische Analysen durchgeführt werden.

Die im Rahmen dieses Versuches durchgeführten Tierversuche wurden gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes von der Bezirksregierung Braunschweig ab dem 14.09.2011 genehmigt (G 11.560). Gefördert wurde dieses Projekt durch die Elsbeth-Bonhoff-Stiftung mit dem Zuwendungsbescheid Nr. 70 vom 24.02.2011.

Gruppe	Tiernummer	Bezeichnung	Behandlung
1	1-12	Kontrolle	Keine Ovariektomie + Osteotomie
2	13-24	OVX	Ovariektomie + Osteotomie
3	25-36	SR th	Ovariektomie + Osteotomie + Strontiumra- nelat zwischen Osteotomie und Obduktion (5 Wochen)
4	37-48	SR pr	Ovariektomie + Osteotomie + Strontiumra- nelat zwischen Ovariektomie und Osteoto- mie (8 Wochen)
5	49-60	SR pr+th	Ovariektomie + Osteotomie + Strontiumra- nelat zwischen Ovariektomie und Obduk- tion (13 Wochen)

Tabelle 10: Gruppenaufteilung der einzelnen Tiere mit Bezeichnung und gruppenspezifischer Behandlung

2.2 Versuchstiere

Für das Projekt nutzten wir 64 weibliche drei Monate alte Sprague-Dawley-Ratten (Zuchtanstalt Fa. Winkelmann, Borken, Deutschland). Davon starben insgesamt fünf Tiere während des Versuches, nämlich ein Tier während der Ovariektomie und vier Tiere während der Osteotomie, vermutlich infolge der Narkose (Tabelle 10, Tiernummer: 29, 47, 48, 59, 60). Da sich bei drei Tieren nach der Obduktion ein zu hohes Uterusgewicht zeigte, war eine erfolgreiche Ovariektomie hier fraglich. Die Messergebnisse dieser Tiere wurden daher von der Wertung ausgeschlossen (Tabelle 10: 14, 25, 32) (Weidemann 2014).

Bei Versuchsbeginn betrug das durchschnittliche Körpergewicht 264 g ± 24 g.

Die Tiere wurden alle in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen gehalten, wobei durch das dort angestellte Fachpersonal und unsere Arbeitsgruppe eine artgerechte Haltung gewährleistet wurde.

Die Versuchstiere wurden in Käfigen vom Typ Makrolon[®] IV zu je vier Tieren pro Käfig gehalten und alle drei Tage in frisch desinfizierte Käfige umgesetzt. In der Tierhaltung wurde eine permanente Umgebungstemperatur von konstant 20 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 % ermöglicht und eine Hell-Dunkel-Periodik von jeweils zwölf Stunden eingehalten.

Zur täglichen Versorgung wurden Haltungsfutter (ssniff SM R/M, 10mm-Pellets, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser ad libitum bereitgestellt. Den Futterzusatzstoff Strontiumranelat erhielten die entsprechenden Tiergruppen im nach Versuchsaufbau vorgesehenen gruppenspezifischen Zeitraum (Tabelle 10).

Die Herstellung des mit Strontiumranelat angereicherten Futters wurde von der Firma Ssniff Spezialdiäten GmbH aus Soest durchgeführt. Als Grundlage diente das normale Sojafreie Haltungsfutter (ssniff SM R/M, 10mm-Pellets, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) welches jedoch zusätzlich mit 10,52 g Strontiumranelat (Protelos, Servier, France) pro kg Futter vermengt wurde. Die tägliche Aufnahme an SR pro Ratte wurde durch Auswiegen des Restfutters berechnet und ergab 654 mg/kg/Tag in unserem Versuch (Weidemann 2014). Diese Dosierung entspricht einer Strontiumranelat-Blut-konzentration bei der Ratte, wie sie auch annähernd beim Menschen nach Einnahme von 2 g/Tag Strontiumranelat vorkommen würde. Dies zeigte sich in mehreren Studien (Habermann et al. 2010, Li et al. 2010).

2.3 Ovariektomie

Um bei den Versuchstieren Osteoporose auszulösen, bedarf es eines entsprechenden Hormonmangelzustandes. Die Ovariektomie der Ratte ist dabei eine der geläufigsten Methoden, um Mangelzustände des Knochens zu erreichen, die der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen ähneln (Turner et al. 2001, Lelovas et al. 2008). Bei Versuchsbeginn wurden 48 der Versuchstiere ovariektomiert, ausgeschlossen wurden die zwölf Tiere der Kontrollgruppe. Die perioperative Versorgung der Tiere sowie die Assistenz während der OP erfolgte durch mich und durch alle an dieser Studie teilnehmenden Doktoranden mit Unterstützung der MTAs aus unserer Arbeitsgruppe.

Die Operation erfolgte unter einer leichten CO₂-Sedierung und anschließender intraperitonealen Anästhesie mit Ketamin (90 mg/kg KG, Hostaket[®], Firma Hoechst, Bad Soden) und Xylazin (7,5 mg/kg KG, Rompun[®], Firma Bayer, Leverkusen). Zur Vorbereitung wurden zuerst die Haare im Operationsgebiet vom unteren Rippenbogen bis zu den Hinterläufen entfernt und die Bauchdecke desinfiziert. Die Laparotomie erfolgte durch einen etwa 1,5 cm langen Schnitt von paravertebral bis dorsokaudal des Rippenbogens. Man präparierte in die Tiefe und durchtrennte das Peritoneum. Das Ovar wurde mit seinen angrenzenden Strukturen genauer dargestellt. Tuba Uterina und die zuführenden Gefäße band man mit einem sterilen, resorbierbaren Faden ab (Vicryl-Ethicon[®]). Die Exstipation des Eierstockes wurde dann mit Hilfe eines Skalpells durchgeführt. Zuletzt erfolgten die Rückverlagerung und der Verschluss des Peritoneums, sowie der Muskelverschluss mit 4.0 Vicrylfäden (Ethicon[®], Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland). Die Bauchhaut wurde mit Klammern verschlossen (Michel wound brackets 7,5 x 1,75 mm, Gebrüder Martin GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland). Mit der kontralateralen Seite wurde analog zu dem oben beschriebenen Operationsablauf verfahren. Zur postoperativen Überwachung lagerten wir die Ratten auf einer Wärmeplatte, bis sie aus der Narkose erwachten. Zur Stabilisierung des Flüssigkeitshaushaltes verabreichten wir 3 ml NaCl 0,9 % subkutan.

Während der Operation wurde zusätzlich ein Chip im subkutanen Fettgewebe des Nackens platziert, der eine Nummerierung und Identifikation der einzelnen Tiere während der Versuchszeit ermöglicht.

Während der Ovariektomie verstarb ein Versuchstier aus der Gruppe Strontiumranelat nach Osteotomie (SR th). Der Versuch wurde dann mit noch 59 Tieren weitergeführt (Weidemann 2014).

2.4 Osteotomie und Osteosynthese

Acht Wochen nach der Ovariektomie sollte nun durch Osteotomie der Tibia eine Fraktur simuliert werden, deren Frakturheilungsprozess in den verschiedenen Gruppen genauer untersucht werden kann. Die Daten zur Frakturheilung wurden in einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe ausgewertet (Weidemann 2014). Die Tiere wurden osteotomiert und anschließend mit einer Osteosynthese versorgt. Hierbei wurden auch die zuvor bei der Ovariektomie ausgelassenen Tiere der Kontrollgruppe nun mit behandelt. Die perioperative Versorgung der Tiere sowie die Assistenz während der OP erfolgte durch mich und alle an dieser Studie teilnehmenden Doktoranden mit Unterstützung der MTAs aus unserer Arbeitsgruppe.

Bei den Versuchstieren wurde eine beidseitige Transversal-Osteotomie der metaphysären Tibia durchgeführt. Auch hier erhielten die Tiere analog zur Ovariektomie (Kap. 2.3) eine Anästhesie bestehend aus Ketamin und Xylazin. Die genauen Operationsschritte sind dem Kapitel 2.4 aus der Arbeit von Weidemann sowie der Publikation von Komrakova et al. zu entnehmen (Weidemann 2014, Komrakova et al. 2015).



Abbildung 2: Darstellung der korrekten Position der Osteotomie und der Osteosyntheseplatte; A= Osteosyntheseplatte von der Seite, B= Osteosyntheseplatte von vorne. Pfeil= Osteotomie, Pfeilspitze= Osteosyntheseplatte (Komrakova et al. 2010) mit freundlicher Genehmigung durch Elsevier

Bei der Osteotomie starben zwei Tiere aus der Gruppe SR th (Strontiumranelat nach Osteotomie) und zwei Tiere aus der Gruppe pr + th (Strontiumranelat vor und nach Osteotomie). Der Versuch wurde mit den überlebenden 55 Ratten fortgesetzt (Weidemann 2014).

2.5 Versuchsende, Obduktion und Präparation

Fünf Wochen nach Osteotomie wurde der Versuch, dessen Verlaufsdauer insgesamt 13 Wochen betrug, durch Tötung der Tiere beendet. Die Tiere wurden einzeln in eine CO₂-Narkose versetzt und anschließend mittels Dekapitation getötet. Im direkten Anschluss wurde eine Serumprobe entnommen und die Obduktion der Ratten durchgeführt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Femora jedes Tieres durch mich entnommen. Für die Präparation der Femora wurden die Hinterläufe aus dem jeweiligen Hüftgelenk mit dem Skalpell scharf ausgelöst. Nach grober Entfernung von Haut, Muskulatur, Sehnen und Ablösen der Tibia aus dem Kniegelenk konnten die einzelnen Femora grob gereinigt bei -20 °C einzeln in Plastikröhrchen eingelagert werden. Eine Ablösung der noch bestehenden Muskelfasern sowie eine feine Säuberung erfolgte am Folgetag nach der Obduktion, um möglichst gewebefreie Femora zu erhalten. Auch nach vollständiger Reinigung wurden die Femora einzeln in Plastikröhrchen bei -20 °C eingelagert. Anschließend wurden an den Femora biomechanische und histologische Analysen durchgeführt, zudem erfolgte die Veraschung und Photometrische Bestimmung einzelner Knochenbestandteile. Diese Analysen wurden von mir durchgeführt. Zur weiteren Analyse, auch für andere Fragstellungen die nicht im Rahmen dieser Dissertation untersucht wurden, entnahm unsere Arbeitsgruppe Uterus, Wirbelkörper, Tibiae und Muskelpräparate jeder einzelnen Ratten (Weidemann 2014, Saul et al. 2018).

2.6 Biomechanischer Bruchtest

2.6.1 Methode

Um die Steifigkeit und maximale Festigkeit der Femora in den einzelnen Gruppen miteinander zu vergleichen, führten wir eine standardisierte pertrochantäre Femur- Bruchtestung nach Tezval et al. durch (Tezval et al. 2010). Dazu nutzten wir eine ZWICK-Werkstoffprüfmaschine, Typ 145660 Z020/TND (Zwick/Roell, Ulm, Germany), die eine senkrechte Kraft auf den Knochen ausübt, während mittels Software ("testXpert"-Programm, Zwick/Roell, Ulm, Deutschland) ein Kraft-Weg-Diagramm den Verlauf der Messung aufzeichnet. Der Verlauf des Diagramms lässt Rückschlüsse über die elastische und plastische Deformation zu und gibt Aufschluss über die mögliche maximale Krafteinwirkung des Knochens, bis es zum Bruch kommt. Die für diese Methode erforderliche Vorbereitung der Proben sowie die Durchführung und Auswertung des Bruchtestes wurden vollständig durch mich durchgeführt.

2.6.2 Versuchsaufbau und -ablauf

Zur Untersuchung wurde das jeweils linke Femur einer Ratte genutzt. Die Versuchs-Femora waren einzeln im Plastikröhrchen jeweils für 15 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Im Anschluss nahm man das Femur aus seinem Behältnis und lagerte es auf einem feuchten Tuch; auch während des Bruchtestes wurde das Femur ständig feuchtgehalten.

Die präparierten Femora wurden in eine Bruchvorrichtung eingelegt (Abbildung 3). Die Grundlage des Systems besteht aus einer für das Femur speziell angepassten 44 x 18 mm großen Aluminiumplatte, zwei drehbaren Aluminium Zylindern und einer Block-Erhöhung am Ende. Das System ist in Studien von Tezval et al. validiert worden (Tezval et al. 2010).



Abbildung 3: Lagerung des Femur in der Aluminiumbruchvorrichtung; (Felix Köstner)

Zur Befestigung wurde der Femurkopf in eine 2 mm tiefe Mulde gelegt, welche in das System eingefräst ist. Die seitliche Abstützung des Femurschaftes erfolgte dynamisch zwischen zwei Zylindern, die dem Einspannen des Knochen dienten. Der distale Knochenteil wurde auf den am Kopfteil des Systems befindlichen Aluminiumblock aufgelegt, sodass der Winkel vom Femurschaft zur Horizontallinie annähernd null Grad betrug.

Die Krafteinwirkung erfolgte vertikal auf den Trochanter major und wurde durch einen Druckstempel mit zirkulärer Nut ausgeübt. Sinn dieser speziellen Vorrichtung ist, dass der Knochen während der Kraftausübung in einer dynamisch longitudinalen Richtung frei beweglich bleibt.

Um die Festigkeit des Knochens zu beurteilen, wurde der Druckstempel nun auf den Knochen heruntergefahren, bis es zum pertrochantären Bruch kam:

Der Druckstempel wird manuell mit einer Geschwindigkeit von 50 mm/min bis kurz vor Kontakt mit dem Trochanter Major gefahren. Die genaue Position des Knochens wird durch Verschieben des Aluminiumsystems korrigiert und dann mit Hilfe von Spanneinrichtungen fixiert. Der Stempel wird weiter manuell heruntergefahren bis eine Vorspannung von 1 N erreicht ist. Danach startet das Programm die eigentliche Elastizitätsmessung von 2 N bis zu einer Grenze von 400 N (Range 2-400 N). Der Druckstempel senkt sich, bis es zum Bruch des Femurs kommt. Während der Messung wird ein Kraft-Weg-Diagramm am Bildschirm dargestellt. Die Kraft wird alle 0,1 mm aufgezeichnet. Der Test wird bei Abfallen der Kraft von mehr als 20 N automatisch abgebrochen. Somit kann eine komplette pertrochantäre Fraktur gewährleistet werden (Tezval et al. 2010).



Abbildung 4: Radiographie eines proximalen Rattenfemur nach biomechanischer Kompressionstestung mit pertrochantärer Fraktur; a= Aufnahme anterior-posterior; b= Aufnahme lateral (https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00198-009-0941-y)

2.6.3 Bedeutung des Kraft-Weg-Diagramms

Absinken (x-Achse Weg in mm) und Druckaufbau (y-Achse in N) werden permanent durch die testXpert Software (Zwick/Roell) aufgezeichnet, während die größte Krafteinwirkung (F-max) und die Steifigkeit (Steigung des linearen Bereiches der Kurve) durch ein Tabellenkalkulationsprogramm (Excel, MS Office 2010) kalkuliert werden. F-max ist die stärkste Kraft, die der Knochen aushalten kann. Im Kraft-Weg-Diagramm lässt sich ein nahezu linearer Anstieg erkennen (Abbildung 5, Phase a), man spricht hier von der elastischen Deformität, bei der es zur reversiblen Dehnung einzelner Kollagenfasern kommt. Die Spitze des Graphen beschreibt die Maximalkraft, die der Femur aushalten kann, direkt nach dem Punkt F-max kommt es zum Abfall des Graphen, bedingt durch den vollständigen Bruch (Abbildung 5, Phase b).



Abbildung 5: Beispiel für ein Kraft-Weg-Diagramm während der biomechanischen Kompressionstestung; a= elastische Deformität; b= Bruch (Felix Köstner)

2.6.4 Biomechanische Messparameter des Bruchtests

Maximalkraft:

Die größte Kraft (F-max), die während des Kompressionstests aufgebracht werden konnte, entspricht der Maximalkraft. Sie entsteht, kurz bevor es zu einer pertrochantären Fraktur kommt.

Steifigkeit:

Der Graph im Kraft-Weg-Diagramm weist während der elastischen Verformung eine nahezu lineare Steigung auf. Diese trägt die Einheit N/mm und ist Maß für die Steifig-keit des zu untersuchenden Femurs.

2.6.5 Validierung

Um einen sicheren Umgang zu gewährleisten und Messfehler zu vermeiden, wurde vor dem eigentlichen Test eine Validierung durchgeführt. Hierbei wurden 20 Femora aus zehn Testratten, die in Größe und Gewicht den Versuchstieren ähnelten, auf Steifigkeit und Maximalkraft im direkten Seitenvergleich untersucht. Die Einweisung wurde dabei von einem erfahrenen Mitglied der Arbeitsgruppe übernommen. Nur wenn die Abweichung der Ergebnisse des linken und rechten Femurs nicht größer als 10 % war, wurde der Test mit den Femora der Versuchstieren durchgeführt (Neuerburg 2015).

2.7 Mikroradiographie

2.7.1 Histologische Aufarbeitung der Knochenschnitte und Erstellung der Mikroradiographie

Die präparierten rechten Femora der Versuchstiere wurden in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und entfettet. Dazu wurden die Knochen zweimal für drei Tage in 40 % Ethanol und darauffolgend sechs Tage in 80 % Ethanol sowie zwei Tage in 96 % Ethanol eingelegt. Im Anschluss folgte eine zweitägige Lagerung in einem Ethanolund Methylmetacrylat-Gemisch im Verhältnis 1:1, daraufhin zwei weitere Tage in reinem Methylmetacrylat. Nach Durchlaufen dieser Alkoholreihe wurden die Femora einzeln in ein Gemisch aus Methylmetacrylat (1000 ml), Dibutylphthalat (200 ml) und Benzoylperoxid (29 g) eingebettet und zum Aushärten für ca. 3-5 Wochen trockengestellt. Mit Hilfe einer Innenlochsäge (Leica SP 1600 Diamantsäge, Leica Instruments GmbH, Nussloch) wurden dann aus jedem Femurblock zehn Sagittalschnitte mit einer Dicke von 100 μ m (+/-20 μ m) gesägt.

Drei ausgewählte (mittlere) Schnitte wurden auf einem langsamen Industriefilm geröntgt, dazu wurde ein Faxitron Röntgengerät (Hewlett Packard, San Diego, USA, Model-Nummer 43855A) genutzt, die Belichtungszeit betrug sechs Minuten bei einer Röhrenspannung von 40 kV und einer Stromstärke von 0,3 mA. Die hergestellten Filme wurden dann fixiert, getrocknet und archiviert, um für weitere Messungen zur Verfügung zu stehen (Neuerburg 2015). Bei der Erstellung dieser Proben waren die MTAs unserer Arbeitsgruppe unterstützend tätig.

2.7.2 Digitalisierung der Mikroradiographien

Jeweils drei Sagittalschnitte pro Femur wurden zusammen unter dem Makroskop (Leica Stereomakroskop MZ 7-5, Leica Instruments GmbH, Nussloch) digitalisiert. Die

einzustellende Helligkeit wurde gemäß Erfahrungen aus vorherigen Messungen mit dem Wahlschalter auf "mäßige Helligkeit", gleichbedeutend mit Stufe "B" eingestellt (A: geringste Helligkeit, E: maximale Helligkeit). Aus technischen Gründen variierte die Dicke der einzelnen Schnitte und lag zwischen 80-120 µm. Die Helligkeit der einzelnen Aufnahmen war dadurch trotz gleichbleibender Einstellung etwas unterschiedlich. Durch feine Einstellung der Halogenlampe konnten die Helligkeitsunterschiede ausgeglichen werden. Die Lampentemperatur lag dabei stets zwischen 2800-3000 K. Die Femora wurden einzeln unter dem Makroskop anhand einer Hilfslinie positioniert und über eine mit dem Computer (Intel Pentium 4, 2.4 GHz) verbundene Kamera (Leica DC 300F) eingelesen. Die einzelnen Schnitte wurden dann bei angepasster Belichtungszeit mit dem 1,0-Objektiv auf dem Monitor abgebildet. So konnten alle zur Messung relevanten Abschnitte gut betrachtet werden. Nur eine von drei Aufnahmen eines Femurs wurde zur Bestimmung der Messgrößen genutzt, dazu wurde die qualitativ beste Aufnahme ausgewählt. Zur Bildbearbeitung und weiteren Auswertung nutzten wir die Software Leica Quantimet Qwin 2003 (Neuerburg 2015). Diese Digitalisierung samt Auswertung wurde vollständig durch mich durchgeführt.

2.7.3 Abfolge der Arbeitsschritte der digitalen morphometrischen Auswertung

Zur digitalen morphometrischen Auswertung wurde die Software Leica Quantimet QWin 2003 genutzt. Die genaue Reihenfolge der Arbeitsschritte wurde in einem eigens für diesen Zweck entwickelten standardisierten Algorithmus festgelegt. Die Auswertung der Mikroradiographien erfolgte "blind", dem Untersucher war zu keinem Zeitpunkt der Messung eine Gruppenzugehörigkeit des Präparates bekannt. Die Abläufe wurden bereits in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe beschrieben (Neuerburg 2015).

Arbeitsschritt 1: Einlesen der Mikroradiographie

Das Präparat wurde auf einen Objektträger gelegt und mit der oben angegebenen Optik auf den Bildschirm übertragen. Anhand einer horizontalen Hilfslinie konnte das Femur entlang der Trochanteren ausgerichtet werden. So wurde gewährleistet, dass der vom Programm vorgegebene Messrahmen (2 x 5 mm²; vertikal x horizontal) stets gleich positioniert wurde (Abbildung 6/ Abbildung 7).



Abbildung 6: Markierungsfenster des zu untersuchenden Bereiches



Abbildung 7: Ausrichtung anhand Epiphysenfuge

Arbeitsschritt 2: Graudetektion

Die Software erfasst mittels Graudetektion alle sichtbaren Knochenanteile. Der Untersucher hat dann in einem weiteren Schritt die Möglichkeit, den von der Software definierten Bereich manuell genauer anzupassen, um Fehlinterpretationen des Bildes in Form von Über- oder Unterdetektion auszugleichen (Abbildung 8).



Abbildung 8: Graudetektion

Arbeitsschritt 3: Flächendefiniton

Die Fläche des Femurhalses muss mit Hilfe der Software zugeordnet werden. Dazu wurde manuell durch den Untersucher entlang des äußeren Randes der Kortikalis eine Linie gezogen und die ausgewählte Fläche dann im Software-Algorithmus als Gesamt-fläche zugeordnet. Die Epiphysenfuge entsprach dabei der kaudalen Begrenzung zum Femurkopf (Abbildung 9). Ein Pixel hatte dabei eine Länge von 6,73 µm.



Abbildung 9: Markierung des Femurhalses



Abbildung 10: Markierung der medialen Kortikalis

Arbeitsschritt 4: Festlegung der endostalen Gesamtfläche und Messung der Trabekelfläche am medialen und lateralen Femurhals

Die knöchernen und nicht knöchernen Anteile werden in der endostalen Gesamtfläche zusammengefasst und in mm² angegeben. Um die trabekuläre und die kortikale Fläche voneinander unterscheiden zu können, muss diese manuell mit einer weiteren Trennlinie voneinander abgegrenzt werden. Die Linie wurde entlang des Endosts an der Innenseite der Kortikalis bis zur Epiphysenfuge gezogen. Die Epiphysenfuge fungierte dabei als kaudale Begrenzung des Femurkopfes. In Abbildung 10 ist exemplarisch die Zuordnung des medialen Femurhalses dargestellt, analog wurde auch an der lateralen Seite verfahren (Abbildung 11).



Abbildung 11: Markierung der lateralen Kortikalis



Abbildung 12: Endberechnung der kortikalen Fläche des Femurhalses

Die Software hat nun den Bereich innerhalb des Endosts zur trabekulären Fläche hinzugerechnet (Abbildung 12). Die trabekuläre Gesamtfläche wird dann abzüglich der nicht-knöchernen Anteile in mm² berechnet. Die Fläche zwischen der Begrenzungslinie der endostalen Kortikalis und der Linie der Gesamtfläche wurde als Kortikalis bestimmt. Zur statistischen Auswertung wurden nun verschiedene Parameter bestimmt. Hierzu zählte: Die mittlere Trabekeldicke (µm pro Sagittalschnitt), die Anzahl der Trabekelkreuzungen (absolut) und die Dichte der Trabekelkreuzungen (mittlere Anzahl der Trabekelkreuzungen pro Fläche in mm²).

2.8 Veraschung

2.8.1 Zielsetzung und Ablauf

Die chemische Zusammensetzung des Knochens gibt Aufschluss über die Knochensubstanz und die Mineralisierung, gleichzeitig lässt sich prüfen, ob es in unserem Experiment zur Einlagerung von Strontium in den Knochen kam. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Allgemeine Hygiene und Umweltmedizin Göttingen unter Betreuung von Dr. U. Schmelz durchgeführt. Dabei wurde nach den institutsüblichen streng kontrollierten Verfahren des Europäischen Komitees für Standardisierung vorgegangen (CEN 2000, CEN 2004).

Für den Versuch wurden die linken Femora genutzt, die zuvor im Bruchtest auf ihre biomechanische Festigkeit überprüft wurden.

Zur Bestimmung von organischen und anorganischen Anteilen wurden die einzelnen Femora ausgewogen und dann in einem Muffelofen erhitzt, um einen Glührückstand zu erzeugen. Aus der Differenz der analytischen Gewichtsmessung vor und nach Veraschung konnte dann die organische und anorganische Masse bestimmt werden.

Mit dem entstandenen Glührückstand konnten in einem weiteren Schritt durch einen Säureaufschluss und Denaturierung der Knochensubstanz photometrische Messungen zur Bestimmung von Phosphat, Kalzium und Strontium durchgeführt werden. Nach Einarbeitung in die technischen Abläufe wurden sämtliche Aufgaben zur Erstellung des Glührückstandes sowie zur Herstellung und Bestimmung der einzelnen Stoffmengenanteile durch mich am Institut für Krankenhaushygiene und Infektiologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

2.8.2 Bestimmung der organischen und anorganischen Knochensubstanz

Die bereits aufgetauten und getrockneten Femora wurden zur Bestimmung der organischen Masse analytisch gewogen. Hierzu wurde zu Anfang ein leerer Schmelztiegel ausgewogen und seine Masse als Tara bestimmt, welche dem Eigengewicht des Schmelztiegels entspricht. Danach wurde ein Femur in den Schmelztiegel gegeben und die Gesamtmasse beider analytisch gewogen. Die so erhaltene Gesamtmasse (m _{Knochen und Tiegel}) kann abzüglich der Eigenmasse des Schmelztiegels (m _{Tiegel}) dann das organische Gewicht des Femurs (m _{vor Veraschung}) bestimmen. Organisches Gewicht vor Veraschung (m _{vor Veraschung}) ist gleich (m _{Knochen und Tiegel} - m _{Tiegel}).

Der Schmelztiegel wurde mit feuerfester Farbe nummeriert, um sicherzustellen, dass es unter den bereits ausgemessenen Schmelztiegeln mit den darin befindlichen Femora zu keiner Verwechslung kommen kann. Schließlich wurde für jeden Schmelztiegel eine eigene Tara bestimmt.

Immer neun nummerierte Femora wurden mit dem jeweiligen Schmelztiegel in einem Ofen bei 750 °C für 30 Minuten gleichzeitig erhitzt. Der entstandene Glührückstand wurde zum Abkühlen in einen geschlossenen Exsikkator gestellt, an dessen Boden sich Kieselgel befand, um die Luftfeuchtigkeit und eventuell entstandenes Kondensat im Exsikkator aufzunehmen. Nach 15-minütiger Abkühlung konnten die Schmelztiegel mit darin befindlichen Glührückständen zur Bestimmung der anorganischen Masse erneut analytisch ausgewogen werden.

Die nun nach Veraschung gemessene Gesamtmasse (m _{Glührückstand und Tiegel}) bestimmt durch Subtraktion der zuvor bestimmten Tara des Schmelztiegels (m _{Tiegel}) die Masse der Knochenprobe nach Veraschung (m _{nach Veraschung}). Organisches Gewicht nach Veraschung (m _{nach Veraschung}) ist gleich (m _{Glührückstand und Tiegel} - m _{Tiegel}).

Der prozentuale Anteil organischer Substanz an der Knochenmasse errechnet sich nach folgender Formel:

% organische Substanz = ((m vor Veraschung - m nach Veraschung)*100) / m vor Veraschung

Die Formel für die Berechnung der Anteile anorganischer Substanz lautet:

% anorganische Substanz = 100 - % organische Substanz

2.8.3 Bestimmung des Kalzium- und Phosphatgehaltes der Knochensubstanz

Zur Bestimmung des Anteils von Kalzium und Phosphat in der Knochensubstanz wurde ein Säureaufschluss des entstandenen Glührückstandes durchgeführt. Hierzu nutzten wir 10 %-Salpetersäure.

Der Glührückstand wurde für den Säureaufschluss mittels eines Mörsers homogenisiert. Aus dem entstandenen Granulat entnahmen wir 50 mg der Gesamtmasse und überführten die Probe in einen Rundkolben. Zu der abgewogenen Masse kamen anschließend 200 ml 10 %-Salpetersäure. Die entstandene Lösung wurde im Rundkolben, mit einem Rückflusskühler versehen, für eine halbe Stunde auf Siedetemperatur erhitzt. Nach wenigen Minuten entstand eine klare Lösung, welche anschließend in einen Messkolben überführt und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt wurde (Lösung A).

Vor der eigentlichen Bestimmung der Kalzium- und Phosphatwerte verdünnten wir Lösung A im Verhältnis 1:20 mit Wasser, um eine Konzentration zu erhalten, welche im Vertrauensbereich des Messverfahrens liegt (Lösung B) (Döll 2011, Eimer 2015).

2.8.4 Bestimmung des Phosphatgehaltes

Die Phosphatgehalt-Bestimmung erfolgte mittels photometrischer Messung des Phosphat-Molybdänblau-Komplexes (DIN EN ISO 6878:2004).

Das für die Bestimmung benötigte Reaktionsreagenz (Phosphatreagenz) besteht aus verschiedenen Stoffanteilen und enthält 25 ml Schwefelsäure, 7,5 ml Ammoniummolybdat-Lösung, 15 ml Ascorbinsäure-Lösung und 2,5 ml Kaliumantimonoxidtartrat. Es bildet in unserem Versuch mit Phosphat einen Komplex, der zur Stoffmengenbestimmung genutzt werden kann. Um Ungenauigkeiten durch überschüssiges Kalzium zu vermeiden, wurde der Messprobe (Lösung B) Citronensäure-Monohydrat zugesetzt, welches das Kalzium komplexiert.

Für die Messung wurden 10 ml der durch den Säureaufschluss entstandenen Flüssigkeit (Lösung B) in einem Messkolben mit 2 ml Phosphatreagenz versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten konnte die Extinktion in einer Küvette der Schichtdicke 10 mm photometrisch mit einer Messwellenlänge von 690 nm bestimmt werden. Zum Vergleich wurde zusätzlich eine Blindprobe mit destilliertem Wasser in gleichem Versuchsaufbau gemessen.

Durch Messung der Extinktion einer Phosphat-Standardlösung in einer Verdünnungsreihe (Konzentrationsintervall 0,25 bis 2,0 mg/l) wurde eine Abgleichgerade erzeugt, anhand derer der Phosphatgehalt jeder Probe bestimmt werden konnte (Döll 2011, Eimer 2015). Die im Kapitel 3.6.2 dargestellten Messergebnisse werden in Prozent zum Ausgangsgewicht der Knochenprobe (ca. 50 mg) angegeben.

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

Tabelle 11: Zusammensetzung des Phosphat-Reagenzes

2.8.5 Bestimmung des Kalziumgehaltes

Um den Kalziumgehalt im Knochen messen zu können, nutzten wir das Verfahren der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) (DIN EN ISO 7980:2000).

Wir nahmen Lanthanchlorid als Matrix-Modifier zur Maskierung des in der zu analysierenden Lösung B noch befindlichen Phosphates. Im Anschluss wurden 5 ml der zu analysierenden Lösung B in das Autosampler-Rack des AAS-Geräts (FIAS 4100, Perkin-Elmer, Rodgau, Deutschland) pipettiert. Die gelöste Probe wurde kontinuierlich durch einen Zerstäuber in die Flamme des AAS, bestehend aus einem Acetylen-Luft-Gemisch, gebracht und darin atomisiert. Durch die Flamme wird eine monochromatische Strahlung geschickt, die von einer Hohlkathodenlampe emittiert wird. Die Kathode der Lampe besteht aus dem jeweils zu analysierenden Element bzw. muss für die Bestimmung des jeweiligen Elements geeignet sein. Die Extinktion der durch Kalzium verursachten Färbung der Flamme wurde an der Kalzium-Emissionsbande von 422,8 nm bestimmt. Die Werte konnten mit einer Kalzium-Standardlösung (Konzentrationsintervall 0,15 bis 5,9 mg/l) in einer Verdünnungsreihe kalibriert werden (Döll 2011, Eimer 2015). Die in Kapitel 3.6.2 dargestellten Messergebnisse werden in Prozent zum Ausgangsgewicht der Knochenprobe (ca. 50 mg) angegeben.

2.8.6 Bestimmung des Strontiumgehaltes

Die Bestimmung des Strontiumgehaltes wurde anhand der ersten Lösung A mit 50 mg Glührückstand in 200 ml 10 %-Salpetersäure und 1000 ml destilliertem Wasser durchgeführt. Zur Extinktionsbestimmung wurde Lanthanchlorid hinzugegeben und die Lösung dann mit der Flamm-Atomabsorptionsspektroskopie (AAS-Geräts, FIAS 4100, Perkin-Elmer, Rodgau, Deutschland) auf den Strontiumgehalt untersucht. Hierzu wurde die Lösung analog zur Bestimmung des Kalziumgehaltes mit einem Zerstäuber der Flamme des AAS-Gerätes zugeführt. Bei der Verbrennung entsteht eine Flammenfärbung, die zur Extinktionsbestimmung genutzt werden kann. Die Extinktion kann dann an der Strontium-Emissionsbande von 460,7 nm abgelesen werden. Verglichen wurden die Werte an einer Strontiumranelat-Standardlösung mit dem Konzentrationsintervall von 0,1 bis 5,0 mg/l (Eimer 2015). Die in Kapitel 3.6.4 dargestellten Messergebnisse werden in Prozent zum Ausgangsgewicht der Knochenprobe (ca. 50 mg) angegeben.

2.8.7 Berechnung und Bedeutung des Kalzium/ Phosphat-Verhältnisses

Nach Bestimmung der Kalzium- und Phosphatanteile im Femur, wie in Kapitel 2.8.5 und 2.8.4 beschrieben, werden die gewonnenen Daten zur Berechnung des Kalziumund Phosphat-Verhältnisses benötigt. Die aus den Messungen berechnete Stoffmengenkonzentration von Kalzium (c (Ca) mol/m) bzw. von Phosphat (c (PO₄) mol/m) ergibt sich wie folgt:

Stoffmengenkonzentration (c (Ca) $_{mol/m}$) = (m (Ca) $_{mg}$ / 1000) / 40,078 Stoffmengenkonzentration (c (PO₄) $_{mol/m}$) = (m (PO₄) $_{mg}$ / 1000) / 94,97

Das Kalzium- / Phosphatverhältnis ergibt sich dann aus c (Ca) mol/m) / c (PO₄) mol/m. Da die Stoffmengenkonzentration von Kalzium im Zähler dieser Rechnung steht, kann bei hohem Betrag des Verhältnisses von einer im Vergleich zu Phosphat höheren Kalzium-Konzentration im Knochen ausgegangen werden. Analog dazu steht ein kleiner Betrag für höhere Phosphat-Konzentration im Vergleich zur Kalziumkonzentration im Knochengewebe.

2.8.8 Berechnung und Bedeutung des Kalzium/ Strontium-Verhältnisses

Nach Bestimmung der Kalzium- und Strontium-Anteile im Femur, wie in Kapitel 2.8.5 und 2.8.6 beschrieben, werden die gewonnenen Daten zur Berechnung des Kalziumund Strontium-Verhältnisses benötigt. Die aus den Messungen berechnete Stoffmengenkonzentration von Kalzium (c (Ca) $_{mol/m}$) bzw. von Strontium (c (Sr) $_{mol/m}$) ergibt sich wie folgt: Stoffmengenkonzentration (c (Ca) $_{mol/m}$) = (m (Ca) $_{mg}$ / 1000) / 40,078 Stoffmengenkonzentration (c (Sr) $_{mol/m}$) = (m (Sr) $_{mg}$ / 1000) / 87,62

Das Kalzium- / Strontium-Verhältnis ergibt sich aus c (Ca) mol/m / c (Sr) mol/m. Da die Stoffmengenkonzentration von Kalzium im Zähler dieser Rechnung steht, kann bei hohem Betrag des Verhältnisses von einer im Vergleich zu Strontium höheren Kalzium-Konzentration im Knochen ausgegangen werden. Analog dazu steht ein kleiner Betrag für höhere Strontium-Konzentration im Vergleich zur Kalziumkonzentration am Femur.

2.9 Statistik

Zur statistischen Auswertung sowie zur Erstellung der in dieser Arbeit vorkommenden Darstellungen wurde die Software GraphPad Prism (Version 4.0a, Mai 2003, Graph-Pad Software, San Diego, USA) für jede Methode genutzt. Alle Messparameter wurden hinsichtlich Mittelwert und Standardabweichung zwischen den einzelnen Gruppen verglichen. Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den beobachteten Gruppen nutzten wir eine *one-way analysis of variance* (one-way-ANOVA) Technik. In einem weiteren Schritt wurde die genaue Differenzierung der gemessenen Unterschiede mittels eines Tukey-Kramer-*post-hoc* Testes gemessen. Das Signifikanzniveau wurde mit p-Wert alpha (α) < 0,05 festgelegt.

Signifikanzen zu den einzelnen Gruppen werden mit den folgenden Buchstaben und Symbolen kenntlich gemacht:

a = signifikant zur Kontrollgruppe b = signifikant zur Gruppe OVX c = signifikant zur Gruppe SR th d = signifikant zur Gruppe SR pr e = signifikant zur Gruppe SR pr+th f = signifikant zu allen anderen Gruppen * = p < 0,05 *** = p < 0,01 **** = p < 0,001

3 Ergebnisse

Im folgenden Teil werden alle Ergebnisse präsentiert, die zur Kontrolle des Versuchs erhoben wurden. Hierzu gehören Werte des Körpergewichtes, der täglichen Futteraufnahme und das Uterusgewicht nach der Tötung. Die Ergebnisse werden als Säulenoder Liniendiagramm für jede Gruppe einzeln abgebildet. Dabei enthalten die Diagramme sowohl Mittelwert als auch Standardabweichung der einzelnen Messpunkte.

3.1 Körpergewicht

Zu Beginn der Versuchsreihe betrug das durchschnittliche Körpergewicht der Versuchstiere 263 g. Die Tiere wurden wöchentlich ausgewogen, dabei wurden die Werte der einzelnen Gruppen miteinander auf signifikante Unterschiede verglichen. Die relevanten Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt. Der Versuch begann mit der Ovariektomie aller Versuchsgruppen bis auf die Kontrollgruppe.



Abbildung 13: Mittleres Körpergewicht der Tiere je Gruppe im Verlauf pro Versuchswoche von Versuchsbeginn bis zum Versuchsende; f= signifikant zu allen anderen Gruppen; *** = p < 0,001. Diese Daten wurden bereits in Studien unserer Arbeitsgruppe von Weidemann (2014) veröffentlicht

Kurz nach der Operation nahmen die Versuchsgruppen gleichermaßen stark an Gewicht zu (Abbildung 13, Tabelle 13). In der zweiten Versuchswoche ergab sich dann ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen OVX, SR th, SR pr, SR pr+th und der Kontrollgruppe und führte sich bis zum Versuchsende weiter fort. Die Tiere der Kontrollgruppe waren im Durchschnitt bei Tötung 56,92 g \pm 35,33 g leichter als die Tiere aus den Gruppen bei denen eine Ovariektomie durchgeführt wurde. Die nach der achten Versuchswoche durchgeführte Osteotomie löste innerhalb einer Woche bei allen Gruppen einen Gewichtsverlust von durchschnittlich -11,02 g \pm 12,2 g pro Tier aus.



Abbildung 14: Mittleres Körpergewicht der Tiere je Gruppe bei Ankunft (Woche 0)



Abbildung 15: Mittleres Körpergewicht je Gruppe nach 8 Wochen, vor Osteotomie; f= signifikant zu allen anderen Gruppen; *** = p < 0,001



Abbildung 16: Mittleres Körpergewicht je Gruppe nach 13 Wochen, bei Tötung; f= signifikant zu allen anderen Gruppen; *** = p < 0,001

Tabelle 12: Auflistung der Mittelwerte ± Standardabweichungen der Körpergewichte je Gruppe bei Ankunft, bei Osteotomie und bei Tötung in Gramm. Diese Daten wurden bereits in Studien unserer Arbeitsgruppe von Weidemann (2014) veröffentlicht

Versuchsgruppe	Woche 0	SD	Woche 8	SD	Woche 13	SD
Kontrollgruppe	260,8	7,63	314,8 (f***)	12,37	323 (f***)	16,26
OVX	269,9	10,71	365,6	26,2	379,9	29,22
SR th	263,7	13,12	391,6	38,81	410,1	50,58
SR pr	254,7	24,38	368,3	22,38	376	21,78
SR pr+th	270,1	9,34	368,5	24,91	380,6	29,76

f= signifikant zu allen anderen Gruppen; *** = p < 0,001

Tabelle 13: Auflistung der Mittelwerte ± Standardabweichungen der Körpergewichte je Gruppe pro Versuchswoche in Gramm. Diese Daten wurden bereits in Studien unserer Arbeitsgruppe von Weidemann (2014) veröffentlicht

Versuchs- wochen	Kontrollgruppe	ονχ	SR th	SR pr	SR pr+th
Ankunft	261±8	270±11	264±13	255±24	270±9
1	273±9	283±8	279±14	280±9	276±13
2	285±7 (f***)	314±10	317±19	313±11	310±14
3	294±9 (f***)	338±19	345±25	340±12	336±16
4	303±13 (f***)	353±21	364±28	355±15	352±17
5	306±8 (f***)	353±24	368±31	355±20	352±17
6	314±9 (f***)	365±25	383±34	364±19	364±18
7	314±11 (f***)	369±28	389±37	370±21	371±22
8	315±12 (f***)	366±26	392±39	368±22	368±25
9	312±12 (f***)	355±26	374±53	354±21	360±26
10	306±14 (f***)	360±26	386±46	356±23	362±26
11	315±18 (f***)	368±29	397±49	366±21	373±26
12	323±17 (f***)	371±28	403±47	371±21	380±27
13	323±16 (f***)	380±29	410±51	376±22	381±30

f= signifikant zu allen anderen Gruppen; *** = p < 0,001



3.2 Tägliche Futteraufnahme pro Tier im Verlauf

Abbildung 17: Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichungen der Futtermenge je Gruppe pro Versuchswoche; a= signifikant zur Kontrollgruppe; d= signifikant zur Gruppe SR pr; f= signifikant zu allen anderen Gruppen; * = p < 0,05; ** = p < 0,01. Diese Daten wurden bereits in Studien unserer Arbeitsgruppe von Weidemann (2014) veröffentlicht

Die tägliche Futteraufnahme stieg in den ersten zwei Wochen in allen Gruppen an. In der dritten Woche wurde die maximale Futterzunahme pro Tier und Tag mit durchschnittlich 25,55 g \pm 2,82 g gemessen. Die Kontrollgruppe nahm ab der zweiten Woche signifikant weniger Futter zu sich als die Gruppe OVX (Abbildung 17, Tabelle 14). Zum Zeitpunkt der Osteotomie war die tägliche Futteraufnahme in allen Gruppen kurzzeitig rückgängig auf 14,12 g \pm 0,42 g, nahm dann aber in der ersten postoperativen Woche wieder zu. Die Tiere der Strontiumranelat-Gruppen konnten im Durchschnitt täglich Strontium in einer Dosierung von 654 \pm 132 mg/kg/Tag aufnehmen. Durch schwankende Werte der durchschnittlichen Futteraufnahme pro Tag kam es zu schwankenden Dosierungen. Der Minimalwert betrug dabei 295 mg/kg/Tag und das Maximum wurde mit 948 mg/kg/Tag erreicht.

Tabelle 14: Auflistung der Mittelwerte ± Standardabweichungen der Futtermenge je Gruppe pro Versuchswoche in Gramm. Diese Daten wurden bereits in Studien unserer Arbeitsgruppe von Weidemann (2014) veröffentlicht

Versuchs- wochen	Kontrollgruppe	ονχ	SR th	SR pr	SR pr + th
1	20,20±4,96	15,62±0,61	13,76±1,02	16,52±5,41	13,38±0,82
2	23,79±5,85	24,04±1,09	26,88±0,18	24,75±0,05	26,40±1,98
3	20,96±1,06 (f**)	26,10±1,43	26,71±2,15	27,33±0,47	27,26±1,45
4	22,80±4,28	24,12±1,42	25,89±1,39	24,61±0,25	25,48±1,10
5	23,38±2,75	24,38±1,60	26,12±1,19	25,14±0,73	24,71±0,77
6	22,45±2,43	24,10±1,40	25,26±0,66	25,80±1,43	23,35±0,51
7	21,51±1,35	22,95±0,86	24,32±0,37	23,74±1,65	24,15±1,97
8	21,33±0,75	21,63±0,58	23,16±0,47	21,82±1,41	23,05±1,42
9	14,38±0,42	14,00±1,50	14,72±4,88	13,73±0,53	13,79±0,52
10	19,43±1,21	19,26±0,14	20,05±2,33	19,52±1,36	19,57±0,61
11	19,99±1,80	20,68±1,31	22,31±1,88	20,25±0,29	20,99±0,32
12	20,89±1,21	18,26±1,60	22,63±1,55 (a*,d*)	19,57±1,02	22,06±1,31
13	24,21±1,00	21,88±1,86	24,67±1,04 (d*)	21,02±1,00	23,75±1,10

a= signifikant zur Kontrollgruppe; d= signifikant zur Gruppe SR pr; f= signifikant zu allen anderen Gruppen; * = p < 0.05; ** = p < 0.01

3.3 Uterusgewicht

Bei der Obduktion wurde der Uterus eines jeden Tieres herauspräpariert und gewogen. Zu diesem Zeitpunkt wogen die Uteri der ovariektomierten Tiere signifikant weniger als die Uteri der Kontrollgruppe (Abbildung 18, Tabelle 15).



Abbildung 18: Mittleres Uterusgewicht der Tiere jeder Versuchsgruppe am Tag der Obduktion; f= signifikant zu allen anderen Gruppen; *** = p < 0,001. Teile dieser Daten wurden bereits in Studien unserer Arbeitsgruppe von Weidemann (2014) veröffentlicht

Tabelle 15: Mittelwert und Standardabweichung der Uterusgewichte jeder Versuchsgruppe am Tag der Obduktion. Teile dieser Daten wurden bereits in Studien unserer Arbeitsgruppe von Weidemann (2014) veröffentlicht

Messgroße M	Controligruppe	OVX	SR th	SR pr	SR pr+th
Gewicht (g) 0	0,64±0,21 (f ***)	0,13±0,03	0,13±0,03	0,14±0,02	0,12±0,02

f= signifikant zu allen anderen Gruppen; *** = p < 0,001

3.4 Ergebnisse der biomechanischen Testung

3.4.1 Elastizität

Die Elastizität der Kontrollgruppe war in unseren Messungen höher als die der Tiere aus OVX (Abbildung 19, Tabelle 16). Im Vergleich zwischen OVX und den Behandlungsgruppen (SR th, SR pr, SR pr+th) ließen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen.



Abbildung 19: Mittelwert und Standardabweichung der Elastizität aller Gruppen

Tabelle 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der Elastizität aller Gruppen gemessen in N/mm

Messgröße	Kontrollgruppe	ονχ	SR th	SR pr	SR pr+th
N/mm	328±73,99	280,5±60,38	268,5±60,14	269,4±51,13	272,3±35,97

3.4.2 Maximalkraft

Die gemessene Maximalkraft zeigte sich in den einzelnen Gruppen ohne wesentliche Unterschiede (Abbildung 20, Tabelle 17). Die Femora der Kontrollgruppe waren auch in diesem Test mit einer höheren Maximalkraft etwas stabiler als die Knochen der Gruppe OVX. Die mit Strontiumranelat behandelten Tiere der Gruppen SR th und SR pr tendieren zu höheren Werten als die OVX-Gruppe. Die Ergebnisse waren hier jedoch statistisch nicht signifikant.



Abbildung 20: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der Maximalkraft aller Gruppen

Tabelle 17	7: Mittelwerte und	Standardabweichungen d	er Maximalkraft aller	Gruppen gemessen in Newton
------------	--------------------	------------------------	-----------------------	----------------------------

Messgröße	Kontroll- gruppe	ονχ	SR th	SR pr	SR pr+th
Ν	189,5±27,99	166,2±23,44	174,0±19,92	180,3±25,74	167,9±30,12

3.5 Ergebnisse der Mikroradiographie

3.5.1 Kortikale Knochendichte am medialen und lateralen Femurhals

Im Bereich des kortikalen Knochens ließen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen. In allen Gruppen zeigte sich eine berechnete Kortikalisdichte von annähernd 100 % (Abbildung 21, Tabelle 18).



Abbildung 21: Mittelwert und Standardabweichung der kortikalen Knochendichte aller Gruppen

Tabelle 18: Mittelwerte und Standardabweichungen der kortikalen Knochendichte aller Gruppen in Prozent

Messgröße	Kontrollgruppe	ονχ	SR th	SR pr	SR pr+th
Prozent	99,71±0,36	99,34±1,05	99,98±0,07	99,89±0,13	99,71±0,37

3.5.2 Trabekuläre Knochendichte am Femurhals

Die Tiere der Gruppe OVX erzielten niedrigere Werte als die Kontrollgruppe. Auch in den Gruppen SR th und SR pr ließ sich diese Tendenz erkennen, die gemessenen Werte zur trabekulären Knochendichte waren im Vergleich zur Kontrollgruppe hier signifikant niedriger (p < 0,05; Abbildung 22, Tabelle 19). Zu beachten ist die Gruppe SR pr+th, da diese unter den mit Strontiumranelat behandelten Gruppen die höchste trabekuläre Knochendichte aufweist. Gegenüber der Gruppe OVX zeigten die drei Behandlungsgruppen (SR th, SR pr, SR pr+th) statistisch keine signifikanten Unterschiede.



Abbildung 22: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der trabekulären Knochendichte aller Gruppen; a=signifikant zur Kontrollgruppe; * = p < 0,05

Tabelle 19: Mittelwerte und Standardabweichungen der trabekulären Knochendichte aller Gruppen in Prozent

Messgröße	Kontrollgruppe	ονχ	SR th	SR pr	SR pr+th		
Prozent	76,90±8,65	63,04±15,68	61,69±14,46 (a*)	62,35±11,33 (a*)	69,83±5,51		
- aignifikant zur Kantrollaruppa * $-$ n < 0.05							

a= signifikant zur Kontrollgruppe; * = p < 0,05

3.5.3 Anzahl der Trabekelkreuzungen

Die Anzahl der Trabekelkreuzungen war in der Gruppe OVX signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe zu beobachten. Beim Vergleich zwischen der Gruppe OVX und den mit Strontiumranelat behandelten Gruppen (SR th, SR pr, SR pr+th) erzielten die Behandlungsgruppen höhere Werte. Innerhalb der Behandlungsgruppen war die absolute Anzahl von SR th über SR pr bis SR pr+th gleichmäßig ansteigend (Abbildung 23, Tabelle 20). Gegenüber der OVX Gruppe zeigten die drei Behandlungsgruppen (SR th, SR pr, SR pr+th) jedoch statistisch keine signifikanten Unterschiede.



Abbildung 23: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der Anzahl an Trabekelkreuzungen am Femurhals; b= signifikant zur Gruppe OVX; ** = p < 0,01

Tabelle 20: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl an Trabekelkreuzungen am Femurhals

Messgröße	Kontrollgruppe	ονχ	SR th	SR pr	SR pr+th
Anzahl	118,3±57,53 (b**)	64,45±15,76	73,33±23,23	85,70±25,79	103,3±26,6

b= signifikant zur Gruppe OVX; ** = p < 0,01

3.5.4 Dichte der Trabekelkreuzungen

Die Tiere der Kontrollgruppe zeigten eine im Vergleich zu OVX signifikant höhere Dichte der Trabekelkeuzungen pro mm² (Abbildung 24, Tabelle 21). Unter den Behandlungsgruppen (SR th, SR pr, SR pr+th) konnte nur die Gruppe SR pr+th eine signifikant höhere Dichte der Trabekelkreuzungen gegenüber der Gruppe OVX erzielen.



Abbildung 24: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der Dichte der Trabekelkreuzungen; a= signifikant zu Kontrollgruppe; b= signifikant zu Gruppe OVX; * = p < 0.05; ** = p < 0.01; *** = p < 0.001

Tabelle 21: Mittelwerte und Standardabweichungen d	ler Dichte der	Trabekelkreuzungei	າ in n/mm²
--	----------------	--------------------	------------

n/mm ² 33,92±10	0,07 19,27±3,4	42 20,79±5,0	02 23,07±3,97	7 27,99±5,96
	(a***)	(a***)	(a**)	(b*)

a= signifikant zu Kontrollgruppe; b= signifikant zur Gruppe OVX; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001

3.5.5 Mittlere Trabekeldicke

Der Vergleich der mittleren Trabekeldicke erbrachte keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 25, Tabelle 22).



Abbildung 25: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der mittleren Trabekeldicke

Tabelle 22: Mittelwerte und Standardabweic	hungen der mittleren Trabekeldicke in μm
--	--

Messgröße	Kontrollgruppe	ονχ	SR th	SR pr	SR pr+th
μm	9,61±2,11	10,10±2,66	9,41±1,69	9,05±1,37	9,51±0,59

3.5.6 Mittlere Fläche des Trabekelbereiches

Die Vergleichsanalyse der Fläche des Trabekelbereiches zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 26, Tabelle 23). Die Behandlungsgruppen (SR th, SR pr, SR pr+th) zeigen zwar tendenziell höhere Flächenwerte als OVX, die höchste Fläche mit $3,68 \text{ mm}^2 \pm 0,37 \text{ mm}^2$ zeigte die Gruppe SR pr+th. Statistisch waren die Werte jedoch nicht signifikant.



Abbildung 26: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der Fläche des Trabekelbereiches

Tabelle 23: Mittelwerte und Standardabweichungen	der Fläche des	Trabekelbereiches in mm ²
--	----------------	--------------------------------------

Messgröße	Kontrollgruppe	ονχ	SR th	SR pr	SR pr+th
mm ²	3,33±0,79	3,34±0,57	3,5±0,61	3,35±0,77	3,68±0,37
3.6 Ergebnisse der Veraschung

3.6.1 Anteil an organischer und anorganischer Masse

Um eine Aussage über den Mineralgehalt des Knochens treffen zu können, wurde unter anderem der Anteil der organischen und anorganischen Masse bestimmt und sowohl absolut in Gramm (Abbildung 27, Abbildung 28) als auch in Prozent in Bezug zur Gesamtmasse angegeben (Abbildung 29, Abbildung 30).

0.8

0.6

0.4

0.2

0.0

Kontrolle

Masse anorganisch in [g]



Abbildung 27: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der organischen Masse

Abbildung 28: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der anorganischen Masse

5Rth

out

5R Prtth

5R DI

Tabelle 24: Anteil der organischen und anorganischen Knochensubstanz der rechten Femora in Gramm (SD = Standardabweichung)

Versuchsgruppe	Mittelwert organisch	SD	Mittelwert anorga- nisch	SD
Kontrollgruppe	0,54	0,06	0,41	0,03
OVX	0,55	0,07	0,39	0,03
SR th	0,57	0,06	0,44	0,05
SR pr	0,55	0,06	0,41	0,03
SR pr+th	0,56	0,03	0,43	0,03





Abbildung 29: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der organischen Anteile

Abbildung 30: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der anorganischen Anteile

 Tabelle 25: Anteil der organischen und anorganischen Knochensubstanz der rechten Femora in Prozent (SD = Standardabweichung)

Versuchsgruppe	Mittelwert organisch	SD	Mittelwert anorga- nisch	SD
Kontrollgruppe	56,7	2,49	43,3	2,49
OVX	58,16	2,98	41,84	2,98
SR th	56,94	1,91	43,06	1,91
SR pr	57,47	1,59	42,53	1,59
SR pr+th	57,07	0,91	42,93	0,91

3.6.2 Anteil an Phosphat und Kalzium am anorganischen Knochen

In allen Gruppen ist der Phosphatgehalt im Femur ähnlich. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Der Anteil von Phosphat beträgt im Durchschnitt über alle Gruppen 52,46 % (Abbildung 31, Tabelle 26). Der gemessene Anteil an Kalzium war in allen Gruppen annähernd gleich hoch (Abbildung 32, Tabelle 26).





Abbildung 31: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der prozentualen Anteile an Phosphat von anorganischem Knochen

Abbildung 32: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der prozentualen Anteile an Kalzium von anorganischem Knochen

 Tabelle 26: Anteile von Phosphat und Kalzium am anorganischen Anteil der rechten Femora in Prozent (SD = Standardabweichung)

Versuchsgruppe	Mittelwert Phos- phat	SD	Mittelwert Kalzium	SD
Kontrollgruppe	53,07	2,67	31,20	1,69
OVX	49,99	6,77	29,97	3,97
SR th	53,65	2,08	31,69	0,72
SR pr	52,52	3,68	30,29	2,09
SR pr+th	53,08	2,24	30,43	1,21

3.6.3 Verhältnis von Kalzium zu Phosphat

Bei dem Molverhältnis von Kalzium und Phosphat konnten signifikante Unterschiede zwischen OVX und den Behandlungsgruppen gefunden werden. Signifikant zeigte sich das höhere Verhältnis von der Gruppe OVX zu der Gruppe SR pr+th. Auch das Verhältnis von OVX im Vergleich zu SR pr zeigte sich signifikant höher (Abbildung 33, Tabelle 27). Unter den Behandlungsgruppen zeigt sich SR pr+th signifikant niedriger im Vergleich zu SR th.



Abbildung 33: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung des Molverhältnisses von Kalzium zu Phosphat; b= signifikant zu OVX; c= signifikant zu SR th; * = p < 0.05; ** = p < 0.01; *** = p < 0.001

Tabelle 27: Mittelwerte und Standardabweichungen des Molverhältnisses von Kalzium zu Phosphat

Messgröße	Kontrollgruppe	ονχ	SR th	SR pr	SR pr+th
Molverhältnis	1,39±0,02	1,42±0,03	1,40±0,06	1,37±0,01 (b**)	1,36±0,09 (b***,c*)

b= signifikant zu OVX; c= signifikant zu SR th; * = p < 0.05; ** = p < 0.01; *** = p < 0.001

3.6.4 Anteil an eingelagertem Strontium

Die Behandlungsgruppen (SR th, SR pr, SR pr+th) zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Versuchsgruppen (Kontrollgruppe und OVX) (Abbildung 34, Tabelle 28). Innerhalb der Behandlungsgruppen ergeben sich zusätzlich signifikante Unterschiede.



Abbildung 34: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung des prozentualen Anteils an Strontium; b= signifikant zur Gruppe OVX; c= signifikant zur Gruppe SR th; d= signifikant zur Gruppe SR pr; e= signifikant zur Gruppe SR pr+th; ** = p < 0.01; *** = p < 0.001

Tabelle 28: Mittelwerte und Standardabweichunger	n des prozentualen Anteils an Strontium
--	---

Messgröße	Kontroll- gruppe	OVX	SR th	SR pr	SR pr+th
Prozent	0,06±0,07	0,06±0,04	1,81±0,91 (b***,d***,e***)	4,27±0,92 (b***,c***,e**)	5,79±1,39 (b***,c***,d***)

b= signifikant zur Gruppe OVX; c= signifikant zur Gruppe SR th; d= signifikant zur Gruppe SR pr; e= signifikant zur Gruppe SR pr+th; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001

3.6.5 Verhältnis von Kalzium zu Strontium

In den mit Strontiumranelat versorgten Tiergruppen ist ein niedrigeres Verhältnis zwischen Kalzium und Strontium zu erkennen als in den unbehandelten Gruppen (Kontrollgruppe und OVX). Die Behandlungsgruppen SR th, SR pr und SR pr+th zeigen jeweils ein signifikant niedrigeres Verhältnis von Ca zu Sr als die Kontrollgruppe und die Gruppe OVX. Innerhalb der Behandlungsgruppen hat die Gruppe SR pr+th mit im Mittelwert 239,7 das geringste Verhältnis zwischen Ca und Sr vorzuweisen (Abbildung 35, Tabelle 29).



Abbildung 35: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung des Molverhältnisses von Kalzium zu Strontium; a= signifikant zur Kontrollgruppe; b= signifikant zur Gruppe OVX; *** = p < 0,001

Tabelle 29: Mittelwerte und Standardabweichungen des Molverhältnisses von Kalzium zu Strontium

Messgröße	Kontrollgruppe	ονχ	SR th	SR pr	SR pr+th
Molverhältnis	32705±8808	27718±9767	1002±637,4 (a***,b***)	321,2±62,84 (a***,b***)	239,7±48,02 (a***,b***)

a= signifikant zur Kontrollgruppe; b= signifikant zur Gruppe OVX; *** = p < 0,001

In Europa wurde Strontiumranelat in den letzten Jahrzehnten zur Behandlung von Osteoporose untersucht. Mehrere Studien haben bewiesen, dass Strontiumranelat das Risiko osteoporotischer Frakturen senken kann. Hierzu zählen namhafte Arbeiten wie die TROPOS-Studie (Reginster et al. 2005) oder Studien von Meunier et al. (Meunier et al. 2004) und einige weitere. Die Wirkung von Strontiumranelat zeigt sich nicht nur in dem antiresorptiven Effekt auf den Knochenumbau, es hat auch eine anabole Wirkung auf das Knochengerüst (Nardone et al. 2014). Trotz der positiven Wirkung auf den Knochen ließ sich ein höheres Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Hepatitis und Hautreaktionen nachweisen, weshalb der Einsatz von Strontiumranelat seit 2014 auf einige therapeutische Ausnahmen beschränkt wurde (EMA 2014). Um weitere mögliche Nebenwirkungen oder neue Therapiekonzepte erkennen zu können, war die Evaluation von Strontiumranelat zur Therapie der Osteoporose gefordert, was uns Anlass zu dieser Studie gegeben hat.

4.1 Die ovariektomierte Ratte als Osteoporosemodell

Es gibt kaum ein Tiermodell, das einen Hormonhaushalt aufweist, der einer physiologischen Menopause eines Menschen ähnelt. Wichtig war es daher, ein Tiermodell zu finden, bei dem durch Ovariektomie eine rasche Menopause und damit verbundene Östrogenmangelsituation zu erzeugen ist (Kalu 1991). Bereits seit vielen Jahrzehnten bekannt ist das Modell der bilateral ovariektomierten Ratte, bei der es durch den iatrogen verursachten Östrogenmangel innerhalb weniger Wochen zu starken Verlusten am trabekulären Knochen im gesamten Skelett kommt (Saville 1969). Endokrinologisch zeigt der Östrogenmangel bei Mensch und Tier ähnliche Wirkung. Es kommt bei beiden zur Gewichtszunahme und knochenmorphologischen Veränderungen (Wronski et al. 1987). Durch die frappierende Ähnlichkeit der knochenmorphologischen Auswirkungen ist das Modell der ovariektomierten Ratte zur Evaluation von antiosteoporotischer Behandlung etabliert (Kharode et al. 2008). Die US Food and Drug Administration veröffentlichte 1995 eine Leitlinie zur Erforschung von postmenopausaler Osteoporose. Hier empfiehlt sie das Modell der ovariektomierten Ratte, da es die klinische Charakteristik der postmenopausalen Osteoporose nachahmen und simulieren kann (Thompson et al. 1995). Seidlova-Wuttke et al. konnten das Tiermodell auf Ausbildung einer Osteoporose validieren. Innerhalb von drei Monaten nach Ovariektomie reduzierte sich die Knochenmasse an der Tibiametaphyse um mehr als 50 % (Seidlova-Wuttke et al. 2003). Auch kürzere Versuchsanordnungen, so beispielsweise nach fünf Wochen bei Wronski et al., zeigten trabekuläre Knochenverluste nach Ovariektomie (Wronski et al. 1985). In Studien bezogen auf das Femur ergaben sich nach acht bis zwölf Wochen erste Spongiosaverluste und ein Abfall der BMD (Zhu et al. 2014).

Bonjour et al. konnten in einem Review zeigen, dass sich im Rattenmodell nach verschiedenen Behandlungsversuchen ein ähnliches Therapieansprechen auf die BMD wie bei klinischen Studien an postmenopausalen Frauen simulieren lässt. Auch ein vergleichbarer Effekt von Bisphosphonaten und anderen antiresorptiven Medikamenten konnte die Wichtigkeit von Tiermodellen unterstreichen (Bonjour et al. 1999).

Zusätzlich stellt das Rattenmodell eine günstige und gut handhabbare Alternative dar, und es existiert durch intensive Forschung eine breite Datenbasis der histomorphologischen Eigenschaften des Knochens. Für unseren Versuch, in dem Spongiosaverluste in Bezug zu antiosteoporotischer Therapie am osteoporotischen Knochen untersucht werden sollten, bot das Rattenmodell daher ideale Voraussetzungen.

Um zusätzlich eine Frakturheilung unter osteoporotischen Bedingungen und Einsatz von Strontiumranelat untersuchen zu können, wurden die Tiere in unserem Versuch acht Wochen nach Ovariektomie an der Tibiametaphyse osteotomiert. Studien zeigten, dass es an der Tibia 30 bis 60 Tage nach Ovariektomie zu einem Spongiosaverlust kommt. Unsere Wartezeit von acht Wochen war somit ausreichend, um Untersuchungen an der osteoporotischen Tibia durchzuführen (Jee und Yao 2001). Ergebnisse dieser Studie wurden bereits durch unsere Arbeitsgruppe veröffentlich (Weidemann 2014, Komrakova et al. 2015).

Grundlage der postmenopausalen Hormonsituation im Rattenmodell war die erfolgreiche Ovariektomie. Um diese zu prüfen, wurde der Uterus jedes Tieres entnommen und das Gewicht der einzelnen Uteri dann zwischen gesunden und ovariektomierten Tieren verglichen. Östrogen induziert über den Östrogen-Rezeptor am Uterus die Freisetzung von *insulin-like growth factor-1* (IGF-1). So wird über IGF-1 die DNA-Synthese im Uterusepithel angetrieben, und es kommt zu gesteigertem Uterus-Wachstum (Ghahary et al. 1990, Klotz et al. 2002). Nach Ovariektomie fehlt die hormonelle Stimulation und es kommt zur Atrophie des Uterusgewebes (Saruhan et al. 2004).

In diesem Versuch sollte die Wirkung von Strontiumranelat auf den osteoporotischen Knochen untersucht werden. Entscheidend war es, den Ratten Strontiumranelat als

Testsubstanz schonend zu verabreichen. Die Ratten der entsprechenden Testgruppen haben die Testsubstanz daher oral als Futterzusatzstoff im vorgesehenen Zeitraum erhalten. So konnte der Wirkstoff schmerzfrei und unkompliziert appliziert werden. Die Dosierung von SR in 1 kg Futter betrug 10,52 g, wodurch die Tiere durchschnittlich 654 mg/kg/Tag aufnahmen. Bei adulten Ratten zeigte sich bereits bei einer Dosierung von 625 mg/kg/Tag eine höhere Belastbarkeit und Festigkeit im Biomechanischen Test (F-max) der Wirbelkörper von mehr als 25 % (Bain et al. 2009), somit war unsere Dosierung nach Studienlage als hinreichend hoch anzusehen und entspricht den Erfahrungen in der Literatur.

Strontiumranelat soll in Prophylaxe und Therapie zur Behandlung der Osteoporose am proximalen Femur untersucht werden. Die hier oftmals entstehenden pertrochantären Frakturen gehören zu den häufigsten osteoporotischen Frakturen und haben somit bedeutende klinische Relevanz. Ein Vorteil für unsere Studie stellt die Knochenarchitektur an dieser Stelle dar, denn neben dem kortikalen Knochen, wie er besonders am Femurschaft zu finden ist, besteht das proximale Femur hauptsächlich aus trabekulärem Knochen. Ein biomechanischer Effekt – nach antiosteoporotischer Behandlung mit Strontiumranelat – lässt sich hier also besonders gut darstellen.

4.2 Körpergewicht und tägliche Futteraufnahme im Versuchsverlauf

Die von uns verwendeten drei Monate alten Sprague-Dawley-Ratten konnten während des gesamten Versuchs kontinuierlich an Gewicht zunehmen. Die Futteraufnahme war im Verlauf ansteigend, was mit einem generellen Wachstum zu vereinbaren ist. Ein ähnliches Wachstum für Tiere in diesem Alter wurde bereits mehrfach beschrieben (Berg und Harmison 1957). Ab der zweiten Versuchswoche (zwei Wochen nach Ovariektomie) konnte ein erster signifikanter Gewichtsunterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die Kontrollgruppe nahm im Vergleich zu den ovariektomierten Gruppen signifikant (p < 0,001) weniger Gewicht zu. Dies ist am ehesten durch den Östrogenmangel zu erklären, der für eine Einlagerung von Wasser und die Umstellung des Stoffwechsels verantwortlich sein kann und somit eine weitere Gewichtszunahme der ovariektomierten Tiere erklärt. Dieser Zusammenhang ist seit längerem bekannt und wurde bereits 1973 in Arbeiten von Tarttelin und Gorski beschrieben (Tarttelin und Gorski 1973). Auch die Tatsache, dass eine Zunahme der Futtermenge der ovariektomierten Ratten gegenüber der Kontrollgruppe erst nach der dritten Versuchswoche zu beobachten war, lässt darauf schließen, dass hormonelle Veränderungen als Ursache

der Gewichtszunahme zu sehen sind (Yu et al. 2011). Bei einem Östrogenmangel sind weitere Effekte bekannt, die zu einer Gewichtszunahme führen:

Östrogen hat einen hohen Einfluss auf den zirkadianen Rhythmus der Ratten und führt zur Reduktion der körperlichen Aktivität (Albers et al. 1981). Zusätzlich konnte beispielsweise durch Toth et al. beobachtet werden, dass es durch den Östrogenmangel als Folge der Ovariektomie zur Zunahme der fettfreien Masse der Ratte kam. Es wurden mehr Muskelproteine gebildet, was insgesamt zur Erhöhung der Muskelmasse führt (Toth et al. 2001). Auch so könnte die höhere Gewichtszunahme bei den ovariektomierten Tieren erklärt werden. Nach der Osteotomie ließ sich in allen Gruppen ein kurzzeitiger Gewichtsabfall feststellen. Wie auch schon bei anderen Studien dieser Art beobachtet wurde, scheint die Narkose sowie die postoperative Schmerzsituation zu einem vorübergehenden Abfall der Futteraufnahme zu führen (Komrakova et al. 2009).

4.3 Diskussion der Ergebnisse des biomechanischen Tests

Durch den biomechanischen Bruchtest sollte eine pertrochantäre Fraktur des Knochens provoziert werden (Tezval et al. 2010). Dieser Frakturtyp stellt einen der häufigsten osteoporose bedingten Frakturen beim Menschen dar. Mehrere Studien zeigten, dass eine antiosteoporotische Therapie anhand vertebraler und non-vertrebraler Frakturtypen auf ihre Wirksamkeit untersucht werden können (Neer et al. 2001, Meier und Kraenzlin 2005). Die Datenlage zur Wirksamkeit am Femurhals und im speziellen an pertrochantären Frakturen ist jedoch gering.

In unserem Versuchsmodell wurden biomechanische Eigenschaften in Form von Steifigkeit (Elastizität) und maximaler Festigkeit geprüft, um einen Qualitätseindruck des Knochens zu erhalten. Anerkannt ist, dass die Osteoporose einen negativen Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften des Knochens zeigt, weshalb sich dieser Test zur Untersuchung eignet (Xing et al. 2003, McCann et al. 2008). Als prognostischer und prädiktiver Faktor zur Einschätzung einer Osteoporose kann auch der Knochenmineralsalzgehalt genutzt werden. Zu beachten ist jedoch, dass sich hieraus keine direkte Aussage über die biomechanische Belastbarkeit des Knochens ergibt. Eine Studie zum Vergleich von Knochenmineraldichte und trabekulärer Knochenstruktur an Patienten mit osteoporotischen Frakturen konnte <u>keine</u> Korrelation dieser beider Parameter nachweisen (Legrand et al. 2000). Schließlich ist bekannt, dass die mit der Osteoporose einhergehenden Stabilitätsverluste des Knochens unter anderem durch

Einbußen der Mikroarchitektur des Knochens begründet sind. Es kommt zum Rückgang der Trabekelknotenpunkte und zu einer Minderung der Trabekeldicke in Verbindung mit einer Minderung der Knochenmineraldichte (Weinstein und Majumdar 1994). Auch in unseren Untersuchungen konnte sich eine verminderte Mikroarchitektur des osteoporotischen Knochens darstellen.

Eine biomechanische Testung zur Beurteilung der Knochenstabilität scheint unumgänglich, denn die reine Bestimmung der BMD allein kann keine direkte Aussage über die Knochenstabilität treffen (Bouxsein 2006). Zur Prüfung nutzen wir in dieser Studie eine von Tezval et al. etablierte Methode, um eine pertrochantäre Fraktur des Femurs zu erzeugen und eine Aussage über die Steifigkeit und die maximale Festigkeit des Knochens zu erhalten (Tezval et al. 2010).

Das proximale Femur ist durch seine Funktion im Hüftgelenk starken Hebelkräften ausgesetzt, da es das axiale Körpergewicht gegenüber der Schwerkraft tragen muss. Gerade bei Stürzen ist neben der maximalen Festigkeit auch die Elastizität des Knochens ein ausschlaggebender Faktor, von dem eine mögliche Fraktur abhängig ist. Osteoporotischer Knochen wird im Vergleich zu gesundem Knochen schneller porös und ist weniger elastisch. Durch die reduzierte Verformbarkeit kann er starke Krafteinwirkungen, wie sie bei einem Sturz vorkommen, nur noch in geringem Maße aufnehmen und es kommt vermehrt zu Frakturen (Turner 2002). Die biomechanische Festigkeit eines Knochens ließ sich in unserer Versuchsanordnung anhand des Graphen, welcher bei der Bruchtestung aufgezeichnet wird, erkennen. Je steiler die Kurve bei Krafteinwirkung, desto höher ist die Steifigkeit und es kommt zu einer hohen maximalen Krafteinwirkung, welche durch die Spitze des Graphen dargestellt wird. Die Fläche unter der Kurve wird als *work to failure* bezeichnet und meint die Kraft, die ein Knochen bis zum Bruch aufnehmen kann.

Bei der biomechanischen Testung wiesen die Tiere der ovariektomierten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine tendenziell niedrigere maximale Festigkeit auf. Im Vergleich konnte Strontiumranelat bei unseren Versuchen jedoch keine Verbesserung der Knochenfestigkeit erreichen. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits bei weiteren Studien unserer Arbeitsgruppe festgestellt (Eimer 2015).

Durch mehrere Studien ließ sich der positive Effekt von Strontiumranelat auf die biomechanische Festigkeit des Knochens feststellen. Die Ergebnisse wurden in mehreren Versuchsanordnungen erzeugt. Teils wurden die Femora oder die Wirbelkörper der Ratte miteinander verglichen (Ammann et al. 2004, Bain et al. 2009, Chen et al. 2013). Unsere Versuchsergebnisse erscheinen abweichend zu bisherigen Studien. Im Vergleich der genutzten Methoden zeigt sich der Versuchsaufbau früheren Studien ähnlich zu unserem. Sowohl Versuchsdauer (min. 12 Wochen max. 104 Wochen), Dosierung des Stontiumranelat (min. 500 mg/kgKG/d max. 625 mg/kgKG/d) als auch Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe (min. 10 Tiere max. 20 Tiere) zeigten keine Unterschiede, die für abweichende Ergebnisse verantwortlich sein könnten. Lediglich die biomechanische Testung wurde in unserem Versuch anhand einer pertrochantären Fraktur des Femurs und nicht wie in den zum Vergleich herangezogenen Studien mittels Dreipunkt-Testes der Femur-Diaphyse durchgeführt.

Fraglich ist, ob die unterschiedlichen Femur-Areale unter Therapie mit Strontiumranelat einen unterschiedlichen Einfluss erfahren und so abweichende biomechanische Eigenschaften entstehen können. Eventuell ergibt sich durch differierende Rezeptorverteilung am proximalen Femur im Vergleich zur Diaphyse ein heterogenes Ansprechen auf den Östrogenmangel und unsere Therapie mit Strontiumranelat. Die unterschiedliche Antwort verschiedener Skelettareale ist ein bekanntes Phänomen, das bei fast allen antiosteoporotischen Wirkstoffen beobachtet werden konnte. Auch eine unterschiedliche Knochen-Geometrie erschwert die Vergleichbarkeit dieser beiden Testmethoden.

4.4 Diskussion der Ergebnisse der Mikroradiographie

Mit Hilfe der Mikroradiographie konnten Veränderungen der Mikroarchitektur am osteoporotischen proximalen Femur genauer untersucht werden. Zusätzlich ließen sich Rückschlüsse über den Einfluss der Strontiumranelat-Therapie auf die Morphologie des Knochens überprüfen. Diese Methode ist durch vorherige Studien bereits vielfach erprobt und etabliert, wobei sie nur zweidimensionale Bilder liefert und somit nicht in der Lage ist, die ganze Komplexität der Mikroarchitektur abzubilden. Eine neuere Methode ist die Mikrocomputertomographie, welche in aktuellen Studien oft zur Anwendung kommt, um die Dichte des Knochens zu bestimmen (Komrakova et al. 2015, Li et al. 2015). Als dreidimensionales Verfahren können zwar genauere Daten erbracht werden, für die Analyse der trabekulären Strukturen am Femur ist die Auflösung mit unserem vorliegenden micro-CT aus technischen Gründen jedoch unzureichend. Die Mikroradiographie war in unserem Fall daher die besser geeignete Variante.

Die durch Ovariektomie erzeugte Hormonmangelsituation im Tiermodell führt ähnlich wie bei der postmenopausalen Frau zu einem Verlust des trabekulären Netzwerks der

Spongiosa sowie der kortikalen Hülle (He et al. 2011). Durch eine Strontiumranelat-Therapie konnte in der Vergangenheit bereits ein positiver Effekt auf die Mikroarchitektur des Knochen gezeigt werden (Rizzoli et al. 2011).

Bekannt ist, dass das Strontiumranelat den kortikalen Knochenanteil positiv beeinflusst. So konnte Boyd et al. nach 104-wöchiger Therapie an Ratten zeigen, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe die kortikale Knochendichte um 28 % und die trabekuläre Knochendichte um 40 % zunehmen konnte (Boyd et al. 2011). In unserem Versuchsmodell ergab die Messung der kortikalen Knochendichte in den mit Strontiumranelat behandelten Gruppen (SR th, SR pr, SR pr+th) im Vergleich zu allen anderen Gruppen (Kontrollgruppe und OVX) keine Unterschiede. Zu beachten ist jedoch, dass die Knochendichte bei der von uns genutzten Mikroradiographie als Flächendichte errechnet und nicht in Bezug zum Knochenvolumen gestellt wurde. Dies lässt teilweise die Unterschiede zu Boyd et al. erklären. Zusätzlich könnte sich der Versuchszeitraum als zu kurz erwiesen haben, um einen messbaren Effekt am kortikalen Knochen erzeugen zu können (104 Wochen bei Boyd et al. vs. 13 Wochen in unserem Versuchsmodell).

Dass die Therapiedauer einen Effekt auf die unterschiedliche Zunahme der kortilaken bzw. trabekulären Knochendichte hat, ließ sich durch aktuelle Studien nachweisen. Durch die Nutzung von Röntgendiffraktometrie XRD (engl. *X-ray diffraction*) in Verbindung mit Röntgenfluoreszenzanalsysen XRF (engl. *X-ray fluorescence spectroscopy*) können Effekte der Therapie räumlich in der Knochenmatrix zwischen älterem und neu gebildetem Knochen unterschieden werden. In Studien von Li et al. zeigte sich an osteoporotischem Knochen postmenopausaler Frauen, die für 36 Monate mit Strontiumranelat therapiert wurden, dass ein erhöhter Strontium-Anteil vor allem in neu gebildeten Osteonen festzustellen war. Der Strontium-Anteil war dort höher als in älteren Osteonen (Li et al. 2010).

Nach Ovariektomie kommt es durch Östrogenmangel zu erhöhtem Knochenumbau (Wronski et al. 1986). Die Rate des trabekulären Knochenumbaus ist deutlich höher als die Rate des kortikalen Knochenumbaus. Zur Therapie genutztes Strontiumranelat kann daher gut in trabekulären Knochenanteilen eingelagert werden und dort eine bessere osteoanabole Wirkung entfalten.

Es gibt Studien, bei denen sich erst ab einer Therapiedauer von zwei Jahren eine dosisabhängige (0, 225, 450 und 900 mg/kg/d) Zunahme der kortikalen Knochenmasse des Femur im Rattenmodell nachweisen lässt (Ammann et al. 2004).

Typisch für die Osteoporose ließ sich auch bei unseren ovariektomierten Ratten der fehlende Östrogen-Stimulus in der Knochenarchitektur nachweisen. Alle ovariektomierten Gruppen wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe einen niedrigeren Anteil an trabekulären Knochen auf. Die Werte für Anzahl und Dichte der Trabekelkreuzungen am Femur waren bei den unbehandelten ovariektomierten Tieren (OVX) signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe, was als Beweis dafür gilt, dass die Ovariektomie erfolgreich verlief und allein der Östrogenmangel eine Auswirkung auf den trabekulären Knochen hatte. Diese Ergebnisse sind passend zu der allgemeinen Definition der Osteoporose als Krankheit mit verminderter Knochenmasse und Einbußen in der Mikroarchitektur des Knochens (NIH 2001).

In den mit Strontiumranelat Behandelten Gruppen ließ sich der Verlust des spongiösen Knochens jedoch verlangsamen. Es zeigte sich ein messbarer Unterschied der trabekulären Knochendichte: Die Gruppe SR pr + th, welche über einen Zeitraum von 13 Wochen mit Strontiumranelat behandelt wurde, hatte durchschnittlich einen leicht höheren Anteil an trabekulären Knochen im Vergleich zur nicht behandelten Gruppe OVX. In Bezug zur gemessenen Dichte der Trabekelkreuzungen zeigte die Gruppe SR pr + th signifikant höhere Werte als OVX (p < 0,05). Sowohl bei SR pr als auch SR th ließ sich im Vergleich zu OVX kein Effekt messen.

Strontiumranelat konnte auch in vorhergegangenen Studien den Trabekelverlust reduzieren und die Spongiosa im Sinne einer Osteoporoseprophylaxe damit vor weiterem Abbau schützen (Marie et al. 1993).

Fraglich scheint die optimale Applikationszeit und Dauer, um eine optimale Wirkung am trabekulären Knochen zu erzielen. Sowohl in prophylaktischer (Gruppe SR pr; 8 Wochen) als auch in therapeutischer Anwendung (Gruppe SR th; 5 Wochen) konnten nur leichte positive Effekte im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Lediglich die Applikation über 13 Wochen schien effektiv.

Sheng et al. konnten an 21 Ratten bereits nach 9 Wochen eine signifikant höhere Knochenmasse und Trabekeldicke von 17 % und 9 % im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen (Sheng et al. 2012). Selbst am intakten Knochen der ovariektomierten Ratte zeigte sich nach 52-wöchiger prophylaktischer Therapie eine Steigerung der Trabekelanzahl und der Trabekeldicke als positiver Effekt auf die Mikroarchitektur des Knochens (Bain et al. 2009).

Nach unseren Ergebnissen konnte eine Applikation von unter fünf Wochen (SR th) kaum einen Effekt auf den Knochen ausüben. Auch hier scheint die Applikationsdauer

als eine der Hauptursachen festzustehen. Schließlich zeigt Strontiumranelat vor allem in Abhängigkeit des Turnovers einen positiven Effekt und kann sich damit besonders im trabekulären Knochen gut einlagern und seine Wirkung entfalten.

Interessant war daher auch, das Ergebnis der Gruppe SR pr zu sehen. Nach acht Wochen Prophylaxe folgte eine Pause über fünf Wochen. Die besseren Ergebnisse dieser Gruppe in Anzahl und Dichte der Trabekelkreuzungen im Vergleich zur reinen Behandlungsgruppe SR th können damit erklärt werden, dass sich Strontium in den Knochen eingelagert hat und auch nach Absetzen der Therapie weiter und damit eine hier längere Wirkung im Knochen entfalten konnte. Nach Absetzen einer Therapie bleibt der positive Effekt somit über mehrere Wochen bestehen. In einer Studie an 32 Patientinnen mit Osteoporose wurde nach einer SR-Therapie über drei bis acht Jahren die BMD drei Monate und sechs Monate nach Absetzen gemessen. Zusätzlich wurde der SR-Anteil bestimmt. Es zeigte sich, dass die BMD bereits drei Monate nach Absetzen abfällt und der positive Effekt auf die Mikroarchitektur nur bedingt gehalten werden kann (Bärenholdt et al. 2009). Wie lange SR nach Therapieende im Knochen wirkt, ist also noch ungeklärt. Eine nachhaltende Wirkung ist jedoch unumstritten. Ein weiterer Grund für die in der Prophylaxe-Gruppe (SR pr) besseren Werte könnte jedoch auch der frühe resorptionshemmende Effekt des Strontiumranelats in der Hormonmangelsituation am Knochen sein. Eine Studie, in der Prävention und Behandlung von trabekulärer Knochenresorption an immobilisierten Ratten untersucht wurde, konnte eine um 30 % ansteigende Knochenresorption bereits zehn Tage nach Immobilisation feststellen. Eine Therapie mit Strontiumranelat konnte die erhöhte Knochenresorption jedoch wieder auf Normalwerte senken und einen größeren Knochenverlust somit verhindern. Dies ließ sich in Veraschung, Analyse der trabekulären Strukturen und der Knochendichtemessung feststellen (Ma et al. 1995, Marie et al. 2001).

Bei der Analyse der zusätzlich mit Strontiumranelat behandelten Gruppen lässt sich eine Korrelation zwischen Therapiedauer und Höhe der einzelnen Parameter vermuten. Die Gruppe SR pr + th, welche über insgesamt 13 Wochen therapiert wurde, ist mit allen Messgrößen zur Kontrollgruppe annähernd auf einem Niveau. Es ist zu vermuten, dass der Effekt durch eine Therapie über acht Wochen (SR pr) oder fünf Wochen (SR tr) noch zu gering ist.

4.5 Diskussion der Ergebnisse der Veraschungsanalyse

Bekannt ist, dass die Knochenstabilität maßgeblich von der Knochenmineraldichte (BMD) des Knochens abhängt, denn das Risiko einer osteoporotischen Fraktur steigt mit niedrigeren BMD-Werten. Ein Rückgang der Knochenmineraldichte ist somit als einer der Hauptfaktoren für das Auftreten von osteoporotischen Frakturen anzusehen (Kanis 2002). Die Knochenmineraldichte ergibt sich aus dem Anteil an Hydroxylapatit im Knochen. Es macht den größten Anteil der anorganischen Knochenmasse aus. Zudem kommt es bei Osteoporose durch den Abbau des trabekulären Knochens zu Fetteinlagerungen. Somit verändert sich auch der Anteil des organischen Knochens (Justesen et al. 2001, Verma et al. 2002, Schwartz 2015).

Um den Einfluss einer postmenopausalen Hormonmangelsituation auf die Knochenmineraldichte nachzuvollziehen, wurde eine genauere Analyse des Anteils von organischer und anorganischer Knochenmasse durchgeführt. Mittels einer Veraschung konnte die Zusammensetzung des Knochens untersucht werden, zusätzlich wurden die Massenanteile von Phosphat und Kalzium bestimmt. Auch Strontiumranelat als Medikament, welches sich in den Knochen einlagert, wurde nachgewiesen. Anhand der gewonnenen Daten konnte so ein möglicher medikamentöser Effekt auf die Knochenstabilität untersucht werden.

Hinsichtlich der organischen und anorganischen Knochenmasse ließen sich keine Unterschiede in den Gruppen darstellen. Der jeweilige Anteil an Phosphat und Kalzium variierte in den Versuchsgruppen nur marginal, wurde aber in der OVX-Gruppe am niedrigsten nachgewiesen. Die Ergebnisse passen zu der bisherigen Annahme, dass es am Knochen ovariektomierter Ratten zu einem Kalziumverlust kommt (Kalu 1991). Östrogene fördern die intestinale Kalziumaufnahme und steuern zusätzlich die renale Kalziumresorption, somit ist in der Hormonmangelsituation mit einem Kalziumverlust zu rechnen (Heaney et al. 1978).

Weiterhin ist bekannt, dass Östrogen einen großen Einfluss auf den Knochenumbau hat. Östrogenmangel ist assoziiert mit dem Anstieg mehrerer Cytokine (Interleukin -1,-6 und -11 sowie TNF). In Experimenten konnte gezeigt werden, dass hierdurch das Protein RANKL als Hauptregulator der Osteoklastendifferenzierung aktiviert und so der Prozess der Knochenresorption angetrieben wird (Jilka et al. 1992). Eine erhöhte Osteoklastenaktivität erklärt analog zu unseren Ergebnissen die Reduktion des Mineralsalzgehaltes im Knochen, da der Knochen stückweise abgebaut wird und Kalzium sowie Phosphat verloren gehen. Strontiumranelat wird als Kation ähnlich wie Kalzium in die Hydroxylapatit-Kristallstruktur eingebaut. Es kommt dabei zum Austausch einzelner Kalzium-Moleküle gegen Strontium, somit ersetzt Strontium einen kleinen Anteil des Kalziums aus dem Knochen. Die Konzentration des Strontiums ist an dem neu gebildeten Knochen dabei etwas höher, bis zu 0,5 von 10 Kalzium Molekülen werden dort gegen Strontium ausgetauscht (Li et al. 2010). Das Molverhältnis von Kalzium zu Phosphat (Ca/PO₄) kann <u>indirekt</u> Aufschluss über den Einbau von Strontium in die Knochenmatrix geben (Querido et al. 2014). Je kleiner der Zahlenwert, desto niedriger wird der Kalzium-Anteil im Knochen, ausgehend von annähernd gleichbleibenden Phosphat-Konzentrationen. Indirekt kann so überprüft werden, ob und wie stark Strontiumranelat Kalzium aus dem Knochen verdrängt.

Das Ca/PO₄ Molverhältnis war in den Gruppen SR pr und SR pr + th signifikant niedriger als in den unbehandelten Gruppen (Kontrollgruppe und OVX). Der größte Unterschied war mit dem Verhältnis von 1,36 (SR pr + th) zu 1,42 (OVX) festzustellen. Bezogen auf den Kalziumanteil von therapierten und nicht therapierten Knochen ergeben sich also nur marginale Unterschiede. Bezogen auf <u>fiktive</u> 30 mg Phosphat pro Femur ergaben sich in der Gruppe SR pr+th 40,8- und in der Gruppe OVX 42,6 mg Kalzium im Knochengerüst.

Einen <u>direkten</u> Nachweis über die Einlagerung von Strontium erbrachte das Molverhältnis von Kalzium zu Strontium (Ca/Sr), bei dem alle mit Strontiumranelat therapierten Gruppen ein signifikant niedrigeres Verhältnis aufwiesen als die Kontrollgruppen und die Gruppe OVX. Somit ist Strontium als knochenaffines Element zum Teil für Kalzium in den Knochen eingebaut worden.

Bei der direkten Messung des prozentualen Anteils an Strontium im Knochen zeigen die behandelten Gruppen signifikant höhere Werte abhängig vom Therapiezeitraum, in dem die Gruppen den Zusatzstoff erhalten haben: SR th (1,81 %), SR pr (4,27 %), SR pr + th (5,79 %). Strontium wird fast ausschließlich in neugebildeten Knochen eingelagert (Li et al. 2010). Bei einem längeren Behandlungszeitraum kommt es durch die normalen Knochenumbauvorgänge somit zu höherer Strontium-Einlagerung im Knochengerüst.

Die Datenlage zum Verbleib des Strontiumranelats im Knochen nach Beendigung einer Therapie ist niedrig. Die direkte Messung kann im Rahmen einer Veraschung nur einmalig erfolgen, sodass es hierzu keine weiteren Studien gibt. Zum Vergleich interessant sind jedoch Studien, in denen nach Therapie über einen längeren Zeitraum der Strontiumranelat-Anteil im Knochen indirekt mittels Röntgenspektroskopie gemessen wurde. In der Studie von Farlay et al. wurden Affen mit Strontiumranelat behandelt und im Verlauf die Knochendichte sowie der Strontiumranelat-Anteil festgestellt. Es wurden drei Gruppen miteinander verglichen: unbehandelte Tiere, Tiere mit SR-Therapie über 52 Wochen und Tiere zehn Wochen nach einer 52-wöchigen Therapie in gleicher Dosierung. Die Ergebnisse zeigten einen Abfall des SR-Anteils zehn Wochen nach Therapieende von 40-50 % im Knochengerüst. Dies war größtenteils auf Verluste in neu gebildetem Knochen zurückzuführen, ältere Knochen zeigten kaum Unterschiede (Farlay et al. 2005). Die Wirkdauer im Knochen ist weiterhin ungeklärt.

Die ovariektomierten Tiere (Gruppe OVX) zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe in den Veraschungsversuchen keinen signifikanten Abfall des Mineralsalzgehaltes. Dennoch wurde in den Ergebnissen der Kompressionstestung gezeigt, dass die Femora dieser Gruppe eine schlechte biomechanische Festigkeit aufweisen. Ursächlich hierfür scheint, dass der Abbau des Knochens in der Hormonmangelsituation vornehmlich am trabekulären Knochenteil beginnt, an dem ein erhöhter Turnover vorherrscht (Kalu 1991).

Studien von Boivin et al. konnten darstellen, dass der Grad der Knochenmineralisation in Abhängigkeit zum Knochenalter steht: Die im trabekulären Knochen oberflächlich gebildeten jungen Knochenanteile zeigen einen Mineralisationsgrad von 1.00 g/cm³, wohingegen älterer Knochen, wie er vor allem im kortikalen Bereich vorkommt, einen Mineralisationsgehalt von 1.40 g/cm³ aufweist (Boivin et al. 2009). In dem bei uns kurzen Versuchszeitraum von 13 Wochen war daher im Vergleich der Gruppen eine nur leichte Abnahme des Mineralsalzgehaltes zu erwarten. Die betroffenen trabekulären Strukturen verursachen jedoch durch Verluste in Anzahl und Dichte der Trabekelkreuzungen in unseren Untersuchungen eine verminderte biomechanische Festigkeit. Da die biomechanische Festigkeit u. a. von der Qualität und Mikroarchitektur des trabekulären Knochenanteils abhängig ist, zeigte die Ovariektomie einen messbaren negativen Einfluss auf die Stabilität.

4.6 Schlussfolgerung

Die auf Strontium basierende Osteoporosetherapie gibt Hinweise auf eine positive Beeinflussung der Mikroarchitektur des Knochens. In unserer Studie konnte eine Therapie über 13 Wochen die trabekuläre Knochendichte vor dem osteoporotischen Zerfall teilweise schützen. Die Qualität des Trabekelnetzes konnte durch Strontium

annähernd auf dem Niveau gesunder Tiere gehalten werden. Strontium ließ sich im Austausch mit Kalzium in den Knochen einlagern, unterschiedliche Anteile von organischen und anorganischen Knochen wurden nicht festgestellt. Die Therapie erbrachte keinen biomechanischen Vorteil.

Die rein prophylaktische Therapie über acht Wochen konnte einen positiven Effekt auf das Trabekelnetzwerk erzielen. Zu vermuten ist, dass Strontiumranelat auch noch nach Therapieende eine positive Wirkung auf den Knochen entfalten konnte. Wahrscheinlich ist der positive Effekt auch durch die gewisse resorptionshemmende Wirkung in den ersten Therapiewochen zustande gekommen. Strontiumranelat konnte bereits initial einen Knochenverlust verhindern, die Dauer der Nachwirkung sollte weitergehend untersucht werden. Sofern es durch das Nebenwirkungsprofil einer Strontiumranelat-Therapie erforderlich sein sollte, das Präparat abzusetzen, kann so eine Aussage über den Langzeiteffekt der bisherigen Therapie getroffen werden. Bei Absetzen einer bestehenden Therapie scheint Strontiumranelat auch wenige Wochen danach noch eine positive Wirkung im Knochen zu besitzen. Die niedrigste Wirkung zeigte die Strontiumranelat-Therapie in rein therapeutischer Form über einen Zeitraum von fünf Wochen. Sollte es bereits zu einer osteoporotischen Fraktur gekommen sein, scheint Strontiumranelat zur Therapie genutzt werden zu können, denn auch die Frakturheilung wird vermutlich durch Strontiumranelat positiv beeinflusst, wie sich an Daten aus unserer Arbeitsgruppe erkennen ließ (Weidemann 2014). Bei allen Applikationsvarianten ist das Nebenwirkungsprofil zu beachten und in Frage zu stellen. Seit 2014 ist die Therapieempfehlung von Strontiumranelat aufgrund zahlreicher kardiovaskulärer und thrombembolischer Nebenwirkungen eingeschränkt (EMA 2014).

Um einen genaueren Vergleich auch in Bezug zur BMD ermöglichen zu können, sollten die Untersuchungen noch durch weitere Analysen, wie z. B. mikro-CT, ergänzt werden.

5 Zusammenfassung

Osteoporose ist seit langem Gegenstand der Forschung, mittlerweile liegt eine breite Datenbasis vor, die zu einer klaren Definition der Erkrankung beiträgt. In mehreren Studien wurden die steigenden Patientenzahlen und hohen Kosten für das Gesundheitssystem aufgezeigt (Häussler et al. 2006). Zur Therapie sind aktuell mehrere Medikamente zugelassen. Strontiumranelat bezieht dabei eine Sonderstellung, da es nicht nur die Knochenbildung stimuliert sondern auch den Knochenabbau hemmt (Canalis et al. 2007).

Das Hauptziel dieser Studie war es, die Auswirkung einer Strontiumranelat-Therapie an ovariektomierten Ratten auf die Ausbildung einer Osteoporose am proximalen Femur zu analysieren. Mehrere Studien konnten zeigen, dass schon wenige Wochen nach Ovariektomie der Ratte mit einem osteoporotischen Knochengerüst zu rechnen ist. Unsere Fragestellung war, ob und wenn ja, ab wann eine Strontiumranelat-Prophylaxe eine hemmende Wirkung auf die Ausbildung einer Osteoporose am proximalen Femur der Ratte hat. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob bei bestehender Osteoporose eine mögliche Therapie mit Strontiumranelat in Erwägung zu ziehen ist, um einen Knochenabbau zu mindern.

Für den Versuch wurden drei Monate alte Sprague-Dawley-Ratten in zwei Gruppen aufgeteilt: 48 Tiere wurden ovariektomiert, zwölf Tiere blieben unbehandelt. Daraufhin entwickelten die ovariektomierten Tiere erwartungsgemäß eine Osteoporose, nach acht Wochen erhielten die zuvor operierten Tiere eine bilaterale transversale Osteotomie der Tibiametaphyse, welche danach osteosynthetisch versorgt wurde. Nach weiteren fünf Wochen wurde der Versuch durch Obduktion der Tiere beendet. Bereits zuvor wurden alle Tiere unterteilt (n= 12 pro Gruppe): 1) Kontrollgruppe, 2) OVX, 3) SR th (SR als Osteoporosetherapie), 4) SR pr (SR als Osteoporose Prophylaxe), 5) SR pr + th (SR als Prophylaxe und Therapie). Die Gruppen, bei denen eine Strontiumranelat-Therapie vorgesehen war, erhielten im entsprechenden Zeitraum Strontiumranelat als Futterzusatz in einer Dosierung von durchschnittlich 654 mg/kg/Tag. Nach Versuchsende wurden die Femora der Ratten freipräpariert und durch biomechanischen Kompressionstest, Mikroradiographie und Veraschung genauer analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte anhand einer Kombination aus einer one-way ANOVA und dem Tukey-Kramer-post-hoc-Test (p < 0,05).

Die Auswertung konnte keinen Effekt von Strontiumranelat auf die biomechanischen Parameter der osteoporotischen Femora nachweisen. Bei der Mikroradiographie fiel

Zusammenfassung

in Bezug auf die Mikroarchitektur des trabekulären Knochens ein positiver Effekt von Strontiumranelat auf den Knochen auf. Eine langanhaltende prophylaktische Behandlung (SR pr+th) über 13 Wochen konnte mehr trabekulären Knochen, einen höheren Wert für die Trabekelkreuzungen und die Trabekeldichte im Vergleich zur Gruppe OVX bewirken und dabei annähernd so gute Werte wie bei den Tieren der Kontrollgruppe erzielen. Eine prophylaktische Therapie über acht Wochen (SR pr) konnte die Knochenresorption ab Beginn der Hormonmangelsituation senken. Fraglich ist, wie langanhaltend der osteoanabole Effekt im Knochen nach Therapieende anhält. Auch die kurzfristige Therapie über fünf Wochen (SR th) ergab eine leichte Verbesserung der Mikroarchitektur der trabekulären Strukturen, ein klarer Effekt ist in dieser Dosierung und Therapiedauer jedoch nicht eindeutig bewiesen. Strontiumranelat ließ sich sowohl direkt als auch indirekt in allen Behandlungsgruppen im Knochen nachweisen. Der Anteil zeigte sich ansteigend in Abhängigkeit von der Applikationsdauer. Es ließ sich indirekt nachweisen, dass Strontium für Kalzium in den Knochen eingelagert wird, dabei kommt es aber zu keinem wesentlichen Kalziumverlust im Knochengewebe.

Die Kalzium- und Phosphat-Bestimmung im Knochen zeigte in der Gruppe OVX einen tendenziellen Verlust des Mineralsalzgehaltes im Sinne der entstandenen Osteoporose. Die Behandlungsgruppen zeigten diesbezüglich jedoch keine wesentlichen Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

6 Literaturverzeichnis

- Agnusdei D, Iori N (2000): Raloxifene: results from the MORE study. J Musculoskelet Neuronal Interact <u>1</u>, 127-132
- Akhter MP, Otero JK, Iwaniec UT, Cullen DM, Haynatzki GR, Recker RR (2004): Differences in vertebral structure and strength of inbred female mouse strains. J Musculoskelet Neuronal Interact <u>4</u>, 33-40
- Alamri SH, Kennedy CC, Marr S, Lohfeld L, Skidmore CJ, Papaioannou A (2015): Strategies to overcome barriers to implementing osteoporosis and fracture prevention guidelines in long-term care: a qualitative analysis of action plans suggested by front line staff in Ontario, Canada. BMC Geriatrics <u>15</u>, 94
- Albers HE, Gerall AA, Axelson JF (1981): Effect of reproductive state on circadian periodicity in the rat. Physiol Behav <u>26</u>, 21-25
- Ammann P, Shen V, Robin B, Mauras Y, Bonjour J-P, Rizzoli R (2004): Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. J Bone Miner Res <u>19</u>, 2012-2020
- Bain SD, Jerome C, Shen V, Dupin-Roger I, Ammann P (2009): Strontium ranelate improves bone strength in ovariectomized rat by positively influencing bone resistance determinants. Osteoporosis Int <u>20</u>, 1417-1428
- Baofeng L, Zhi Y, Bei C, Guolin M, Qingshui Y, Jian L (2010): Characterization of a rabbit osteoporosis model induced by ovariectomy and glucocorticoid. Acta Orthop <u>81</u>, 396-401
- Bärenholdt O, Kolthoff N, Nielsen S (2009): Effect of long-term treatment with strontium ranelate on bone strontium content. Bone <u>45</u>, 200-206
- Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, McNabb MA, Wenger NK (2006): Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. N Engl J Med <u>355</u>, 125-137
- Bartl R: Osteoporose: Prävention Diagnostik Therapie. 4. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2010
- Baum E, Peters KM (2008): The diagnosis and treatment of primary osteoporosis according to current guidelines. Dtsch Arztebl <u>105</u>, 573-582
- Benninghoff A, Drenckhahn D: Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Bd.1. Hrsg. v. Drenckhahn D, 17. Aufl.; Urban & Fischer Verlag in Elsevier, München 2008
- Beral V, Bull D, Reeves G, Collaborators M (2005): Endometrial cancer and hormonereplacement therapy in the Million Women Study. Lancet <u>365</u>, 1543-1551

- Berg BN, Harmison CR (1957): Growth, disease, and aging in the rat. J Gerontol <u>12</u>, 370-377
- Boivin G, Farlay D, Bala Y, Doublier A, Meunier PJ, Delmas PD (2009): Influence of remodeling on the mineralization of bone tissue. Osteoporosis Int <u>20</u>, 1023-1026
- Bonjour JP, Ammann P, Rizzoli R (1999): Importance of Preclinical Studies in the Development of Drugs for Treatment of Osteoporosis: A Review Related to the 1998 WHO Guidelines. Osteoporosis Int <u>9</u>, 379-393
- Bouxsein ML (2006): Biomechanics of osteoporotic fractures. Clin Rev Bone Miner Metab <u>4</u>, 143-153
- Boyd SK, Szabo E, Ammann P (2011): Increased bone strength is associated with improved bone microarchitecture in intact female rats treated with strontium ranelate: a finite element analysis study. Bone <u>48</u>, 1109-1116
- Breysse C, Guillot P, Berrut G (2015): Study of vitamin D supplementation in people over 65 years in primary care. Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil <u>13</u>, 123-132
- Bruch HP, Trenz O: Berchtold Chirurgie. Urban & Fischer Verlag in Elsevier, München 2005
- Brun LR, Galich AM, Vega E, Salerni H, Maffei L, Premrou V, Costanzo PR, Sarli MA, Rey P, Larroudé MS (2014): Strontium ranelate effect on bone mineral density is modified by previous bisphosphonate treatment. Springerplus <u>3</u>, 676
- Canalis E, Hott M, Deloffre P, Tsouderos Y, Marie PJ (1996): The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. Bone 18, 517-523
- Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP (2007): Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. N Engl J Med <u>357</u>, 905-916
- CEN (2000): European Committee for Standardization: Determination of Calcium and Magnesium. Atomic absorption spectrometric method. DIN EN ISO 7980: 2000 <u>7</u>, 1–9
- CEN (2004): European Committee for Standarization: Determination of Orthophosphate. Ammonium molybdate spectrometric method. DIN EN ISO 6878: 2004 <u>9</u>, 1-29
- Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F, Brun J (1992): Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in elderly women. N Engl J Med <u>327</u>, 1637-1642
- Chen B, Li Y, Yang X, Xie D (2013): Comparable effects of alendronate and strontium ranelate on femur in ovariectomized rats. Calcif Tissue Int <u>93</u>, 481-486
- Chung M, Lee J, Terasawa T, Lau J, Trikalinos TA (2011): Vitamin D with or without calcium supplementation for prevention of cancer and fractures: an updated meta-analysis for the U.S. Preventive Services Task Force. Ann Intern Med <u>155</u>, 827-838

- Classe M, Diehl V, Kochsiek K: Innere Medizin. 5. Auflage; Urban & Fischer Verlag in Elsevier, München 2003
- Compston JE, Papapoulos SE, Blanchard F (1998): Report on Osteoporosis in the European Community: Current Status and Recommendations for the Future. Osteoporos Int <u>8</u>, 531-534
- Consensus development conference [no authors listed] (1993): Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. Am J Med <u>94</u>, 646-650
- Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, Lindsay R (2014): Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. Osteoporos Int <u>25</u>, 2359-2381
- Dias IR, Camassa JA, Bordelo JA, Babo PS, Viegas CA, Dourado N, Reis RL, Gomes ME (2018): Preclinical and Translational Studies in Small Ruminants (Sheep and Goat) as Models for Osteoporosis Research. Curr Osteoporos Rep <u>16</u>, 182-197
- Diaz de Barboza G, Guizzardi S, Tolosa de Talamoni N (2015): Molecular aspects of intestinal calcium absorption. World J Gastroenterol <u>21</u>, 7142-7154
- Döll CJ: Einfluss der vertikalen Ganzkörpervibration unterschiedlicher Frequenz auf den osteoporotischen Lendenwirbelkörper der Ratte. Med. Diss. Göttingen 2011
- DVO-Leitlinie 2017 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und bei Männern, Quelle: <u>http://www.dv-osteologie.org</u> [Zugriff am 20.05.2018]
- Ebert R, Meissner-Weigl J, Zeck S, Määttä J, Auriola S, de Sousa S, Mentrup B, Graser S, Rachner TD, Hofbauer LC (2014): Probenecid as a sensitizer of bisphosphonate-mediated effects in breast cancer cells. Mol Cancer <u>13</u>, 265
- Eimer C: Einfluss der vertikalen Ganzkörpervibration in Kombination mit Strontiumranelat und Parathormon auf das osteoporotische Rattenfemur. Med. Diss. Göttingen 2015
- EMA (2014): European Medicines Agency recommends that Protelos/Osseor remain available but with further restrictions. EMA/ 84749. Quelle: <u>http://www.ema.europa.eu</u> [Zugriff am 01.10.2015]
- Farlay D, Boivin G, Panczer G, Lalande A, Meunier P (2005): Long Term Strontium Ranelate Administration in Monkeys Preserves Characteristics of Bone Mineral Crystals and Degree of Mineralization of Bone. J Bone Miner Res <u>20</u>, 1569-1578
- Filleul O, Crompot E, Saussez S (2010): Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a review of 2,400 patient cases. J Cancer Res Clin Oncol <u>136</u>, 1117-1124

- Fitzpatrick LA (2002): Secondary Causes of Osteoporosis. Mayo Clin Proc <u>77</u>, 453-468
- Fürderer S, Eysel P: Kyphosen. In: Krämer J (Hrsg.): Orthopädie und Orthopädische Chirurgie. Teil: Wirbelsäule und Thorax. Thieme-Verlag, Stuttgart 2004, 105-158
- 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 Musculoskel Neuron Interact <u>4</u>, 50-63
- Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, Nevitt MC (1993): Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. J Bone Miner Res <u>8</u>, 1137-1148
- Genant HK, Engelke K, Fuerst T, Glüer CC, Grampp S, Harris ST, Jergas M, Lang T, Lu Y, Majumdar S (1996): Noninvasive assessment of bone mineral and structure: State of the art. J Bone Miner Res <u>11</u>, 707-730
- Ghahary A, Chakrabarti S, Murphy LJ (1990): Localization of the sites of synthesis and action of insulin-like growth factor-I in the rat uterus. Mol Endocrinol <u>4</u>, 191-195
- Green AD, Colón-Emeric CS, Bastian L, Drake MT, Lyles KW (2004): Does this woman have osteoporosis? JAMA 292, 2890-2900
- Greenspan SL, Bone HG, Ettinger MP, Hanley DA, Lindsay R, Zanchetta JR, Blosch CM, Mathisen AL, Morris SA, Marriott TB (2007): Effect of recombinant human parathyroid hormone (1-84) on vertebral fracture and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis: a randomized trial. Ann Intern Med <u>146</u>, 326-339
- Gürkan L, Ekeland A, Gautvik KM, Langeland N, Rønningen H, Solheim LF (1986): Bone changes after castration in rats. A model for osteoporosis. Acta Orthop Scand <u>57</u>, 67-70
- Habermann B, Kafchitsas K, Olender G, Augat P, Kurth A (2010): Strontium ranelate enhances callus strength more than PTH 1-34 in an osteoporotic rat model of fracture healing. Calcif Tissue Int <u>86</u>, 82-89
- Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, Steinle T, Verheyen F, Linder R (2013): The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. Dtsch Arztebl Int <u>110</u>, 52-57
- Häussler B, Gothe H, Göl D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D (2006): Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany—the BoneEVA Study. Osteoporos Int <u>18</u>, 77-84
- He Y-X, Zhang G, Pan X-H, Liu Z, Zheng L-z, Chan C-W, Lee K-M, Cao Y-P, Li G, Wei L (2011): Impaired bone healing pattern in mice with ovariectomy-induced osteoporosis: A drill-hole defect model. Bone <u>48</u>, 1388-1400
- Heaney RP, Recker RR, Saville PD (1978): Menopausal changes in calcium balance performance. J Lab Clin Med <u>92</u>, 953-963

- Jastrow H (2015): Elektronenmikroskopischer Atlas von Zellen, Gewebe und Organen im Internet. Workshops Anatomie fürs Internet Quelle: <u>http://www.uni-</u> <u>mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMKnochen.html</u> [Zugriff am 20.08.2015]
- Jee WS, Yao W (2001): Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. J Musculoskel Neuron Interact <u>1</u>, 193-207
- Jerosch J, Bader A, Uhr G: Knochen: Curasan-Taschenatlas spezial. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2002
- Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC (1992): Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. Science <u>257</u>, 88-91
- Johnell O, Kanis JA (2006): An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. Osteoporos Int <u>17</u>, 1726-1733
- Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M (2001): Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. Biogerontology <u>2</u>, 165-171
- Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner <u>15</u>, 175-191
- Kanis JA, Johnell O, Oden A, Sembo I, Redlund-Johnell I, Dawson A, De Laet C, Jonsson B (2000): Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmö. Osteoporos Int <u>11</u>, 669-674
- Kanis JA (2002): Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. Lancet <u>359</u>, 1929-1936
- Kharode YP, Sharp MC, Bodine PV (2008): Utility of the ovariectomized rat as a model for human osteoporosis in drug discovery. Methods Mol Biol <u>455</u>, 111-124
- Klotz DM, Hewitt SC, Ciana P, Raviscioni M, Lindzey JK, Foley J, Maggi A, DiAugustine RP, Korach KS (2002): Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk. J Biol Chem <u>277</u>, 8531-8537
- Komrakova M, Werner C, Wicke M, Nguyen BT, Sehmisch S, Tezval M, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Effect of daidzein, 4-methylbenzylidene camphor or estrogen on gastrocnemius muscle of osteoporotic rats undergoing tibia healing period. J Endocrinol <u>201</u>, 253-262
- Komrakova M, Stuermer EK, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, Tezval M, Daub F, Martens T, Witzenhausen P (2010): Effect of human parathyroid hormone hPTH (1-34) applied at different regimes on fracture healing and muscle in ovariectomized and healthy rats. Bone <u>47</u>, 480-492
- 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 <u>97</u>, 391-401

- Kremer R, Gagnon B, Meguerditchian AN, Nadeau L, Mayo N (2014): Effect of oral bisphosphonates for osteoporosis on development of skeletal metastases in women with breast cancer: results from a pharmaco-epidemiological study. J Natl Cancer Inst <u>106</u>, pii: dju264
- Lacey JV, Mink PJ, Lubin JH, Sherman ME, Troisi R, Hartge P, Schatzkin A, Schairer C (2002): Menopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer. JAMA <u>288</u>, 334-341
- Legrand E, Chappard D, Pascaretti C, Duquenne M, Krebs S, Rohmer V, Basle MF, Audran M (2000): Trabecular bone microarchitecture, bone mineral density, and vertebral fractures in male osteoporosis. J Bone Miner Res <u>15</u>, 13-19
- Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA (2008): The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. Comp Med <u>58</u>, 424-430
- Li C, Paris O, Siegel S, Roschger P, Paschalis EP, Klaushofer K, Fratzl P (2010): Strontium is incorporated into mineral crystals only in newly formed bone during strontium ranelate treatment. J Bone Miner Res <u>25</u>, 968-975
- Li YF, Luo E, Feng G, Zhu SS, Li JH, Hu J (2010): Systemic treatment with strontium ranelate promotes tibial fracture healing in ovariectomized rats. Osteoporos Int 21, 1889-1897
- Li Y, Luo E, Zhu S, Li J, Zhang L, Hu J (2015): Cancellous bone response to strontiumdoped hydroxyapatite in osteoporotic rats. J Appl Biomater Funct Mater <u>13</u>, 28-34
- Ma YF, Ferretti JL, Capozza RF, Cointry G, Alippi R, Zanchetta J, Jee WSS (1995): Effects of on/off anabolic hPTH and remodelling inhibitors on metaphyseal bone of immobilized rat femurs. Tomographical (pQCT) description and correlation with histomorphometric changes in tibial cancellous bone. Bone <u>17</u>, 321-327
- Marie PJ, Ammann P, Boivin G, Rey C (2001): Mechanisms of Action and Therapeutic Potential of Strontium in Bone. Calcif Tissue Int <u>69</u>, 121-129
- Marie PJ, Hott M, Modrowski D, De Pollak C, Guillemain J, Deloffre P, Tsouderos Y (1993): An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogendeficient rats. J Bone Miner Res <u>8</u>, 607-615
- McCann RM, Colleary G, Geddis C, Clarke SA, Jordan GR, Dickson GR, Marsh D (2008): Effect of osteoporosis on bone mineral density and fracture repair in a rat femoral fracture model. J Orthop Res <u>26</u>, 384-393
- Meier C, Kraenzlin ME (2005): Diagnostik und Therapie der Osteoporose. Z Allg Med 81, 289-302
- Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD, Cannata J, Balogh A, Lemmel E-MM, Pors-Nielsen S (2004): The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. N Engl J Med <u>350</u>, 459-468

- Minne HW (1995): Einteilung der Osteoporose nach Schweregraden. Therapiewoche <u>4</u>, 236-239
- Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y (2007): Estrogen Prevents Bone Loss via Estrogen Receptor α and Induction of Fas Ligand in Osteoclasts. Cell <u>130</u>, 811-823
- Nardone V, D'Asta F, Brandi ML (2014): Pharmacological management of osteogenesis. Clinics (Sao Paulo) <u>69</u>, 438-446
- Neer RN, Arnaud CD, Zanchetta JR, Price R, Gaich GA, Regnister J-Y, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK (2001): Effect of Parathyroid Hormone (1-34) on Fractures and Bone Mineral Density in postmenopausal Women with Osteoporosis. N Engl J Med <u>344</u>, 1434-1441
- Neuerburg TEA: Wirkung von kurzzeitiger vertikaler Ganzkörpervibration mit Frequenzen unter 90 Hz auf das Femur ovarektomierter Ratten. Med. Diss. Göttingen 2015
- Nguyen TV, Eisman JA, Kelly PJ, Sambrook PN (1996): Risk factors for osteoporotic fractures in elderly men. Am J Epidemiol <u>144</u>, 255-263
- NIH (2001): National Institute of Health Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7-29, 2000: highlights of the conference. South Med J <u>94</u>, 569-573
- Oheim R, Amling M, Ignatius A, Pogoda P (2012): Large animal model for osteoporosis in humans: the ewe. European cells & materials <u>24</u>, 372-385
- Oheim R, Simon MJK, Steiner M, Vettorazzi E, Barvencik F, Ignatius A, Amling M, Clarke IJ, Pogoda P, Beil FT (2017): Sheep model for osteoporosis: The effects of peripheral hormone therapy on centrally induced systemic bone loss in an osteoporotic sheep model. Injury <u>48</u>, 841-848
- Pacifici R (1998): Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis the second decade. Endocrinology <u>139</u>, 2659-2661
- Paggiosi MA, Peel N, McCloskey E, Walsh JS, Eastell R (2014): Comparison of the effects of three oral bisphosphonate therapies on the peripheral skeleton in postmenopausal osteoporosis: the TRIO study. Osteoporos Int <u>25</u>, 2729-2741
- Pfeilschifter J (2006): 2006 DVO-guideline for prevention, diagnosis, and therapy of osteoporosis for women after menopause, for men after age 60 executive summary guidelines. Exp Clin Endocrinol Diabetes <u>114</u>, 611-620
- Querido W, Campos APC, Ferreira EH, Gil RAS, Rossi AM, Farina M (2014): Strontium ranelate changes the composition and crystal structure of the biological bone-like apatite produced in osteoblast cell cultures. Cell Tissue Res <u>357</u>, 793-801
- Reddy P, Edwards LR (2017): Magnesium Supplementation in Vitamin D Deficiency. Am J Ther doi: 10.1097/MJT.000000000000538. [Epub ahead of print],1-9

- Reginster JY, Seeman E, Vernejoul DMC, Adami S, Compston J, Phenekos C, Devogelaer JP, Curiel DM, Sawicki A, Goemaere S (2005): Strontium Ranelate Reduces the Risk of Nonvertebral Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) Study. J Clin Endocrinol Metab <u>90</u>, 2816-2822
- Riggs BL (1991): Overview of osteoporosis. The Western journal of medicine <u>154</u>, 63-77
- Riggs BL (2000): The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. J Clin Invest <u>106</u>, 1203-1204
- Rizzoli R, Chapurlat RD, Laroche JM, Krieg MA, Thomas T, Frieling I, Boutroy S, Laib A, Bock O, Felsenberg D (2011): Effects of strontium ranelate and alendronate on bone microstructure in women with osteoporosis. Osteoporos Int <u>23</u>, 305-315
- Rodin A, Murby B, Smith MA, Caleffi M, Fentiman I, Chapman MG, Fogelman I (1990): Premenopausal bone loss in the lumbar spine and neck of femur: a study of 225 Caucasian women. Bone <u>11</u>, 1-5
- Rossouw J, Anderson G, Prentice R, LaCroix A, Kooperberg C, Stefanick M, Jackson R, Beresford S, Howard B, Johnson K (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized contolled trial. JAMA <u>288</u>, 321-333
- Rubin J, Greenfield EM: Osteoclast: Origin and Differentiation. In: Bronner F, Farach-Carson M.C., Rubin J (Hrsg.): Bone Resorption. (Topics in Bone Biology. Band 2), Springer Verlag, London 2005, 1-23
- Rude RK, Gruber HE, Norton HJ, Wei LY, Frausto A, Kilburn J (2006): Reduction of dietary magnesium by only 50% in the rat disrupts bone and mineral metabolism. Osteoporos Int <u>17</u>, 1022-1032
- Sanila M, Kotaniemi A, Viikari J, Isomäki H (1994): Height loss rate as a marker of osteoporosis in postmenopausal women with rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol <u>13</u>, 256-260
- Santesso N, Carrasco Labra A, Brignardello Petersen R (2014): Hip protectors for preventing hip fractures in older people. Cochrane Database Syst Rev CD001255
- Saruhan B, Ozbag D, Ozdemir N, Gumusalan Y: Comparative effects of ovariectomy and flutamide on body-uterus weight and uterine histology in the ovariectomized rat model. VI International Symposium of Clinical Anatomy, Varna, 2004
- Saul D, Harlas B, Ahrabi A, Kosinsky RL, Hoffmann DB, Wassmann M, Wigger R, Böker KO, Sehmisch S, Komrakova M (2018): Effect of Strontium Ranelate on the Muscle and Vertebrae of Ovariectomized Rats. Calcif Tissue Int <u>102</u>, 705-719
- Saville PD (1969): Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rat; a model of osteoporosis. J Am Geriatr Soc <u>17</u>, 155-166

- Schwartz AV (2015): Marrow Fat and Bone: Review of Clinical Findings. Front Endocrinol (Lausanne) <u>6</u>, 40
- Sehmisch S, Erren M, Rack T, Tezval M, Seidlova-Wuttke D, Richter J, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Short-term effects of parathyroid hormone on rat lumbar vertebrae. Spine (Phila Pa 1976) <u>34</u>, 2014-2021
- Sehmisch S, Galal R, Kolios L, Tezval M, Dullin C, Zimmer S, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Effects of low-magnitude, high-frequency mechanical stimulation in the rat osteopenia model. Osteoporos Int <u>20</u>, 1999-2008
- Seidlova-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T, Wuttke W (2003): Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (Cimicifuga racemosa) extract: comparison with estradiol-17beta. Eur J Endocrinol <u>149</u>, 351-362
- Sheng ZF, Ma YL, Tong D, Fang DY, Liang QC, Liu LH, Zhang J, Liao EY (2012): Strontium Ranelate Prevents Bone Loss in a Rat Model of Localized Muscle Paralysis. Ann Biomed Eng <u>40</u>, 657-665
- Stupphann D, Pietschmann P (2008): Sekundäre Osteoporose-Abgrenzung zur primären Osteoporose. J Miner Stoffwechs <u>15</u>, 2-5
- Stürmer EK, Seidlová-Wuttke D, Sehmisch S, Rack T, Wille J, Frosch KH, Wuttke W, Stürmer KM (2006): Standardized bending and breaking test for the normal and osteoporotic metaphyseal tibias of the rat: effect of estradiol, testosterone, and raloxifene. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research <u>21</u>, 89-96
- Tarttelin MF, Gorski RA (1973): The effects of ovarian steroids on food and water intake and body weight in the female rat. Acta Endocronol (Copenh) <u>72</u>, 551-568
- Teófilo JM, Azevedo AC, Petenusci SO, Mazaro R, Lamano-Carvalho TL (2003): Comparison between two experimental protocols to promote osteoporosis in the maxilla and proximal tibia of female rats. Pesqui Odontol Bras <u>17</u>, 302-306
- Tezval M, Stuermer EK, Sehmisch S, Rack T, Stary A, Stebener M, Konietschke F, Stuermer KM (2010): Improvement of trochanteric bone quality in an osteoporosis model after short-term treatment with parathyroid hormone: a new mechanical test for trochanteric region of rat femur. Osteoporos Int <u>21</u>, 251-261
- Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ (1995): FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. Bone <u>17</u>, 125-133
- Torgerson DJ, Bell-Syer SE (2001): Hormone replacement therapy and prevention of vertebral fractures: a meta-analysis of randomised trials. BMC musculoskeletal disorders <u>2</u>, 7
- Toth MJ, Poehlman ET, Matthews DE, Tchernof A, MacCoss MJ (2001): Effects of estradiol and progesterone on body composition, protein synthesis, and lipoprotein lipase in rats. Am J Physiol Endocrinol Metab <u>280</u>, 496-501

- Turner CH (2002): Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. Osteoporos Int <u>13</u>, 97-104
- Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, Sibonga JD (2001): Animal Models for Osteoporosis. Rev Endocr Metab Disord <u>2</u>, 117-127
- Verma S, Rajaratnam JH, Denton J, Hoyland JA, Byers RJ (2002): Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. J Clin Pathol <u>55</u>, 693-698
- Walsh LJ, Wong CA, Pringle M, Tattersfield AE (1996): Use of oral corticosteroids in the community and the prevent ion of secondary osteoporosis: a cross sectional study. BMJ <u>313</u>, 344-346
- Wanderman NR, Mallet C, Giambini H, Bao N, Zhao C, An KN, Freedman BA, Nassr A (2018): An Ovariectomy-Induced Rabbit Osteoporotic Model: A New Perspective. Asian Spine J <u>12</u>, 12-17
- Watts NB, Geusens P, Barton IP, Felsenberg D (2005): Relationship between changes in BMD and nonvertebral fracture incidence associated with risedronate: reduction in risk of nonvertebral fracture is not related to change in BMD. J Bone Miner Res <u>20</u>, 2097-2104
- Weidemann A: Der Einfluss von Strontiumranelat auf die Frakturheilung osteopener Ratten. Med. Diss. Göttingen 2014
- Weinstein RS, Majumdar S (1994): Fractal geometry and vertebral compression fractures. J Bone Miner Res <u>9</u>, 1797-1802
- WHO (1994): Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser <u>843</u>, 1-129
- WHO (2004): WHO Scientific Group on the assessment of osteoporosis at primary health care level. Summary Meeting Report Brussels. Quelle: <u>http://www.who.int/chp/topics/Osteoporosis.pdf</u> [Zugriff 01.11.2015]
- Wolff J: Das Gesetz der Transformation der Knochen. Verlag von August Hirschwald, Berlin 1892
- Woo S-BB, Hellstein JW, Kalmar JR (2006): Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. Ann Intern Med <u>144</u>, 753-761
- Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA (1985): Skeletal alterations in ovariectomized rats. Calcif Tissue Int <u>37</u>, 324-328
- Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA (1986): Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. Bone <u>7</u>, 119-123
- Wronski TJ, Schenk PA, Cintrón M, Walsh CC (1987): Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. Calcif Tissue Int <u>40</u>, 155-159

- Xing X-pP, Xia W-bB, Meng X-wW, Zhou X-yY, Hu Y-yY, Liu H-cC (2003): [Evaluation of bone architecture and biomechanic properties by peripheral quantitative computed tomography in rats]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi <u>83</u>, 791-795
- Yu Z, Geary N, Corwin RL (2011): Individual effects of estradiol and progesterone on food intake and body weight in ovariectomized binge rats. Physiol Behav <u>104</u>, 687-693
- Zhang G, Qin L, Shi Y, Leung K (2005): A comparative study between axial compression and lateral fall configuration tested in a rat proximal femur model. Clin Biomech (Bristol, Avon) <u>20</u>, 729-735
- Zhu L, Zhao X-YY, Qiu X (2014): [Relationship between changes of bone mineral density and bone marrow pathology in ovariectomized rats]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi <u>22</u>, 617-622
- Ziegler R, Nawroth PP: Calcium- und Knochenstoffwechsel. In: Siegenthaler W, Blum HE (Hrsg.): Klinische Pathophysiologie. 9. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006, 291-325

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise auf dem Deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2013) 22.10. - 25.10.2013 in Berlin präsentiert:

M. Komrakova, M. Tezval, A. Weidemann, F. Köstner, K.M. Stürmer, S. Sehmisch Titel: Wirkung von Strontiumranelat bei der Prophylaxe und Therapie auf den intakten und osteotomierten Knochen der ovariektomierten Ratte.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Doktorarbeit in jeglicher Weise unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt dabei dem Abteilungsleiter Herrn Prof. Dr. med. Klaus Michael Stürmer, der mir dieses wissenschaftliche Projekt ermöglicht hat.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. med. Mohammad Tezval für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und dafür, dass er mir dieses Forschungsprojekt anvertraut hat. Vor allem aber danke ich ihm für die Unterstützung und Hilfestellung während des gesamten Projektes sowie für die Korrektur dieser Arbeit.

Einen großen Anteil meiner Arbeit habe ich dem Team des Forschungslabors zu verdanken. Für die durchweg angenehme, nette Atmosphäre und Hilfsbereitschaft bei der Durchführung von Operationen, Experimenten und Probenauswertungen, aber auch die mentale Unterstützung bedanke ich mich besonders bei meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Marina Komrakova und den MTAs Annette Witt und Ramona Castro-Machguth. Ihre Ratschläge und konstruktive Kritik haben wesentlich zum Gelingen beigetragen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Dipl.-Chem. Ulrich Schmelz und dem Team des Trinkwasser- und Hygienelabors Göttingen für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Analysegeräte.