Aus der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie

(Prof. Dr. med. W. Lehmann)

der medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# Evaluation der Ganzkörpervibration verschiedener Frequenzen in horizontaler und vertikaler Form im Osteoporose-Modell der Ratte

## INAUGRAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hauke Jörn Rüther

aus Bonn

Göttingen 2020

## Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Referent: Prof. Dr. Mohammad Tezval

Ko-Referent: Prof. Dr. Dr. Karl Günter Wiese

Drittreferent: Prof. Dr. Ralf Dressel

Tag der mündlichen Prüfung:03.08.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel " Evaluation der Ganzkörpervibration verschiedener Frequenzen in horizontaler und vertikaler Form im Osteoporose-Modell der Ratte" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....

(Unterschrift)

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis III			
Ta	abellenve	rzeichnis	v
A	bkürzung	sverzeichnis	VI
1	Einleit	ung	1
	1.1 Oste	oporose	1
	1.1.1	Prävalenz	2
	1.1.2	Klinik der Osteoporose und ihre Risikofaktoren	3
	1.1.3	Messverfahren	4
	1.1.4	Manifestation der Osteoporose	5
	1.1.5	Basisdiagnostik	6
	1.2 Ther	apie der Osteoporose	7
	1.2.1	Frakturprophylaxe und Risikoabschätzung	7
	1.2.2	Basistherapie	7
	1.2.3	Spezifische medikamentöse Therapie	7
	1.3 Who	le-Body-Vibration	10
	1.4 Die H	Ratte als Osteoporosemodell	
	1.5 Ziels	etzung	13
2	Mater	ial und Methoden	14
	2.1 Vers	uchsprotokoll	
	2.1.1	Versuchstiere und ihre Haltung	
	2.1.2	Ovarektomie und Anästhesie	
	2.1.3	Osteotomie und Osteosynthese	
	2.1.4	Whole-Body-Vibration	
	2.1.5	Dekapitation, Probengewinnung und Präparation der Femora	
	2.2 Bruc	htest	
	2.2.1	Messgrößen	
	2.2.1	1 Maximalkraft F <sub>max</sub>	19
	2.2.1	2 Steigung	19
	2.2.2	Korrelation der Maximalkraft und Steigung mit dem Gewicht der Tiere	20
	2.2.3	Validierung	20
	2.3 Mikr	oradiographie	20
	2.3.1	1 Histomorphometrie	22
	2.3.1	2 Messung der medialen Kortikalisdichte	23

	2.3.1.3	3 Messung der Trabekelfläche und -anzahl	
2.3.2 Messpo 2.3.3 Validie		Messparameter	
		Validierung der Messungen	
2.4	Veras	chung	
2.5	Statis	tik	
Er	gebn	isse	27
3.1	Gewi	cht der Versuchstiere und Uteri	
3.2	Ausw	ertung des Bruchtestes	
3.2	2.1	Maximalkraft F <sub>max</sub>	
3.2	2.2	Steifigkeit	
3.3	Ausw	ertung der Mikroradiographie	
3.3	3.1	Trabekelfläche	
3.3	<i>3.2</i>	Mittlere Trabekeldicke	
3.3	3.3	Dichte der Trabekelkreuzungen	
3.3.4 Trab 3.3.5 Knoo		Trabekelkreuzungen absolut	
		Knochendichte im Trabekelbereich	
3.3	3.6	Knochendichte Kortikalis medial	
3.4	Ausw	ertung der Veraschung	
<b>3.</b> 4	4.1	Masse Organisch	
3.4	4.2	Masse Anorganisch	
3.5	Ausw	ertung der Serummarker	
Di	skus	sion	
4.1	Analy	ze des Körper- und Uterusgewichts	
4.2	Analy	ze des Bruchtestes	
<ul> <li>4.3 Analyse der Mikroradiographie</li> <li>4.4 Analyse der Veraschung</li> <li>4.5 Analyse der Serummarker</li> </ul>			
4.6	Schlu	ssfolgerung	
Ζι	Isam	menfassung	
Literaturverzeichnis			
	2.3 2.4 2.5 Er 3.1 3.2 3.2 3.3 3.2 3.3 3.3 3.3 3.3 3.3 3.3	2.3.1.3 2.3.2 2.3.3 2.4 Veras 2.5 Statis <b>Ergebn</b> 3.1 Gewie 3.2 Ausw 3.2.1 3.2.2 3.3 Ausw 3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.3.4 3.3.5 3.3.6 3.4 Ausw 3.4.1 3.4.2 3.5 Ausw <b>Diskuss</b> 4.1 Analy 4.2 Analy 4.2 Analy 4.3 Analy 4.3 Analy 4.4 Analy 4.5 Analy 4.5 Schlu	2.3.1.3       Messung der Trabekelfläche und -anzahl

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiel einer fortschreitenden Osteoporose an Röntgenbildern e	ines
proximaten remuts enter Ratte in Langsschnitt	Z
Abbildung 2: Modifizierter Vibrationstisch	17
Abbildung 3: Halterung für den Bruchtest von oben betrachtet	18
Abbildung 4: Femur in die Bruchtestmaschine eingespannt	19
Abbildung 5: Einlesen und Ausrichten des Schnittes	22
Abbildung 6: Graudetektion	22
Abbildung 7: Markierung der medialen Kortikalis	23
Abbildung 8: Markierung des Trabekelbereichs	24
Abbildung 9: Auswertung der Tiergewichte	27
Abbildung 10: Tiergewichte im Versuchsverlauf	28
Abbildung 11: Auswertung des Gewichtes der Uteri	29
Abbildung 12: Auswertung der Maximalkraft F <sub>max</sub>	30
Abbildung 13: Auswertung der Maximalkraft $F_{max}$ in Bezug zum Gewicht der Tiere	31
Abbildung 14: Auswertung der Steifigkeit	32
Abbildung 15: Auswertung der Steifigkeit in Korrelation zum Gewicht	32
Abbildung 16: Auswertung der Fläche des Trabekelbereiches	33
Abbildung 17: Auswertung der mittleren Trabekeldicke	34
Abbildung 18: Auswertung der Dichte der Trabekelkreuzungen	35
Abbildung 19: Absolute Anzahl der Trabekelkreuzungen	36
Abbildung 20: Auswertung der Knochendichte im Trabekelbereich	37
Abbildung 21: Auswertung Knochendichte der medialen Kortikalis	37

Abbildung 22: Auswertung der organischen Masse	39
Abbildung 23: Auswertung der anorganischen Masse	40

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Risikofaktoren für die Osteoporose
Tabelle 2: Parameter des Osteoporosebasislabors
Tabelle 3: Zuordnung der Tiere zu Versuchsgruppen15
Tabelle 4: Messparameter der Histomorphometrie und ihre Definition
Tabelle 5: Tiergewichte im Versuchsverlauf
Tabelle 6: Durchschnittsgewichte der Versuchstiere und Uteri    29
Tabelle 7: Durschnittswerte des Bruchtestes    32
Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der Histomorphometrie
Tabelle 9: Durchschnittswerte der Veraschung40
Tabelle 10: Durchschnittswerte der Serummarker41

# Abkürzungsverzeichnis

35-Hz-h	=	Kontrollgruppe mit Vibration bei 35 Hertz horizontal
35-Hz-v	=	Kontrollgruppe mit Vibration bei 35 Hertz vertikal
70-Hz-h	=	Kontrollgruppe mit Vibration bei 70 Hertz horizontal
70-Hz-v	=	Kontrollgruppe mit Vibration bei 70 Hertz vertikal
ALP	=	Alkalische Phosphatase
BMD	=	Bone Mineral Density
BW	=	Bodyweight, Körpergewicht
DVO	=	Dachverband für Osteologie
DXA	=	Dual Energy X-ray Absorptiometry
F <sub>max</sub>	=	Maximalkraft
HA	=	Hydroxylapatit
KG	=	Körpergewicht
LWS	=	Lendenwirbelsäule
OC	=	Osteocalcin
OPG	=	Osteoprotegerin
OVX	=	Ovarektomierte Versuchsgruppe
РТН	=	Parathormon
QCT	=	Quantitative Computertomographie
RANK	=	Receptor Activator of NF-κB
RANKL	=	Receptor Activator of NF-κB Ligand
SHAM	=	Scheinoperierte Kontrollgruppe
WBV	=	Whole-Body-Vibration
ZTE	=	Zentrale tierexperimentelle Einrichtung

## 1.1 Osteoporose

Die Osteoporose ist die häufigste generalisierte Knochenerkrankung und damit eine der großen "Volkskrankheiten" unserer Zeit. Eine Hochrechnung aus einer Datenbankerhebung der Techniker Krankenkasse ergab, dass Stand 2009 ca. 6,3 Millionen Menschen allein in Deutschland an Osteoporose leiden (Häussler et al. 2006; Hadji et al. 2013). Die durch sie bedingten Frakturen führten in England zu mehr Krankenhausaufenthalten der Patienten als durch Krankheiten wie Diabetes mellitus, Myokardinfarkte oder Brustkrebs verursacht wurden (Kanis et al. 1997). Vergleicht man die Osteoporose mit einzelnen Malignomen in Hinblick auf Morbidität und Mortalität, so wird sie lediglich von den Lungenkarzinomen übertroffen (Kanis et al. 2017). Die initial stumme Erkrankung führt über einen langsam beginnenden Schmerz zu zunehmender Immobilisation und damit einhergehend einer enormen Lebenseinschränkung. Neben der menschlichen und sozialen Komponente führt dies auch zu einem erheblichen volkswirtschaftlichen Schaden. So entstanden im Jahre 2003 Kosten in Höhe von 5,4 Milliarden Euro durch Diagnostik, Therapie und Versorgung der Patienten mit deutlich steigender Tendenz (Häussler et al. 2006). Aus den genannten Gründen ist die Optimierung der Therapie und Erforschung weiterer Behandlungsmöglichkeiten notwendig. Im Jahre 2017 wurde in der Leitlinie des Dachverbandes Osteologie (DVO) die Osteoporose wie folgt definiert:

"Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine mikroarchitektonische Verschlechterung des Knochengewebes charakterisiert ist, mit einem konsekutiven Anstieg der Knochenfragilität und der Neigung zu Frakturen. Sind bereits Frakturen als Folge der Osteoporose aufgetreten, liegt eine manifeste Osteoporose vor." (DVO 2017)

Die WHO (World Health Organization) legte im Jahre 1994 bereits eine Definition fest. Auf Grundlage einer Knochendichtemessung, der sogenannten *Dual Energy X-ray Absorptiometry* (DXA), an der Lendenwirbelsäule (LWS) und/oder des proximalen Femurs wurde eine Osteoporose ab einer Abweichung von -2,5 Standardabweichungen vom Mittelwert einer 20- bis 29-jährigen Frau festgelegt. Von einer Osteopenie spricht man im Bereich -1,5 bis -2,5 (Kanis 2002). Diese Abweichung wird als T-Wert benannt. Das Modell ist auf

Männer mit entsprechendem Vergleichskollektiv ebenfalls anzuwenden, wobei bei beiden Geschlechtern diese Definition nur gilt, wenn andere Erkrankungen wie ein Tumorleiden oder z. B. ein Morbus Paget ausgeschlossen wurden (Leslie et al. 2006).



Abbildung 1: Beispiel einer fortschreitenden Osteoporose an Röntgenbildern eines proximalen Femurs einer Ratte im Längsschnitt. Links im Bild ein Normbefund eines proximalen Femurs. Das rechte Bild zeigt die ausgedünnte Spongiosa bei osteoporotischem Femur.

Die Osteoporose kann das gesamte Skelett betreffen, jedoch sind die Hauptmanifestationen im Bereich der Wirbelkörper (Vertebrae), der Hüfte (Femur), des Oberarms (Humerus) und des distalen Radius. Die Osteoporose betrifft vor allem den trabekulären Knochen (Abbildung 1). Symptomatisch werden die Patienten meistens erst durch die erste Fraktur, wobei ca. 4 % der an Osteoporose Erkrankten mindestens eine Fraktur in ihrer Krankengeschichte vorzuweisen haben. Diese Patienten verursachen ca. 60 % der Kosten und damit im Schnitt 9,962 Euro für einen Patienten mit einer osteoporosebedingten Fraktur (Häussler et al. 2006). Patienten mit Femurfrakturen haben im Durchschnitt die höchsten Behandlungskosten (Häussler et al. 2006). So lagen hier die Ausgaben für den stationären Aufenthalt zwischen 7109 und 9375 Euro mit zusätzlichen Kosten für eine Rehabilitation in Höhe von 2622 bis 2913 Euro. Die durchschnittlich aufgebrachte Summe für einen Patienten ohne Fraktur lag 2003 bei 281 Euro (Häussler et al. 2006).

## 1.1.1 Prävalenz

Es besteht eine mit dem Alter ansteigende Prävalenz der Osteoporose sowohl bei Männern wie auch Frauen. Bei den Frauen ist ein entscheidender Faktor die Menopause. In der EPOS-/EVOS-Studie konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg der Prävalenz von 15 % bei den 50-60 Jahre alten Frauen auf 45 % bei den 70-Jährigen erfolgt, während bei den Männern mit 50-60 Jahren eine Prävalenz von 2,4 % vorliegt, die auf 17 % bei den 70-Jährigen ansteigt (Felsenberg et al. 1998; O'Neill et al. 2009). Die Arbeit von Häussler et

al. (2006) ergab eine Prävalenz von 14 % (24 % Frauen bei 6 % Männern). Hochgerechnet auf die deutsche Gesamtbevölkerung würde dies (stand 2009) 6,3 Millionen Osteoporosepatienten ergeben.

## 1.1.2 Klinik der Osteoporose und ihre Risikofaktoren

Die Osteoporose ist eine zunächst "stumme" Erkrankung. Symptomatisch wird Sie häufig erst durch die entstehenden Frakturen, welche dann zu akuten und chronischen Schmerzen führen. Die Lebensqualität nimmt durch die Frakturen deutlich ab bei gleichzeitigem Anstieg der Mortalität. Das Maximum erreichen diese Folgen innerhalb des ersten Jahres nach dem Frakturereignis (Borgström et al. 2006; Haentjens 2010). Man unterscheidet verschiede Formen der Osteoporose. Die häufigste stellt die postmenopausale Form dar (Typ I). Sie ist ein Resultat des Östrogenmangels nach der Menopause (Pacifici 1998). Dahingegen gibt es verschiedene sekundäre Formen, wie die senile Osteoporose (Typ 2), die durch das "normale Altern" der Knochen auftritt, die idiopathische oder die medikamenteninduzierte Osteoporose (Riggs 1979; Heshmati und Khosla 1998; Mirza und Canalis 2015). Laut Leitlinie Osteoporose der DVO (2017) gehört zu den allgemeinen Risiken für die Entstehung einer Osteoporose ein hohes Lebensalter, das weibliche Geschlecht und eine in der Familie bekannte proximale Femurfraktur. Durch Untergewicht (BMI < 20) nimmt die Knochendichte ab und das Frakturrisiko steigt, jedoch schützt Übergewicht (BMI > 25) im Umkehrschluss nicht vor Frakturen. In Tabelle 1 sind weitere allgemeine Risikofaktoren der Osteoporose aufgeführt.

Allgemeine Risiken für	Grunderkrankungen mit	Medikamentöse Thera-
Osteoporose	Risiko für Osteoporose	pien mit Risiko für Oste-
		oporose
Vitamin-D-Mangel	Cushing-Syndrom	Hormonablative Therapie
Kalziummangel	Zöliakie	Aromatasehemmer
Hyponatriämie	Wachstumshormonmangel	Glukokortikoide
	Diabetes Mellitus Typ I und II	Protonenpumpeninhibitoren
	Rheumatoide Erkrankungen	
	Primärer Hyperparathyreoidis-	
	mus	

#### Tabelle 1: Risikofaktoren für die Osteoporose

#### 1.1.3 Messverfahren

In der Literatur und dem klinischen Alltag sind verschiedene Messverfahren älteren und neueren Ursprungs beschrieben, welche mehr oder weniger praktikabel und zielführend sind. Diese sollen in der Folge vorgestellt werden, wobei zu beachten ist, dass die einzige leitliniengerechte und zur Indikationsstellung zulässige Diagnostik die DXA darstellt. Bei dieser werden zwei Energiestrahlen unterschiedlicher Energiestrahlung und Wellenlänge durch den Körper geschickt. Dies erfolgt in den meisten Fällen im Bereich der LWS und des proximalen Femurs. Das Gerät stellt dann die Absorption der Strahlung durch den Körper bzw. den Knochen fest und subtrahiert die Absorption durch die Weichteile. Im Anschluss wird die Knochendichte pro Fläche (g/cm<sup>2</sup>) und letztendlich hieraus der sogenannte T-Score bestimmt (Bartl 2011). Das Prinzip der quantitativen Ultraschallmessung ist dem der DXA ähnlich. Es werden Ultraschallwellen von einem Sender zu einem hinter dem zu untersuchenden Areal liegendem Empfänger geschickt. Der Detektor misst zum einem die Absorption der Ultraschallwellen, aber auch deren Geschwindigkeit und errechnet aus den Daten ebenfalls einen T-Score. Das Verfahren ist derzeit bei fehlender Genauigkeit noch nicht zugelassen, wird aber auf Grund der fehlenden Strahlenbelastung und der schnellen Anwendbarkeit bereits häufig als Screeningmethode benutzt und bei Auffälligkeiten um eine DXA ergänzt (Bartl 2011). Bei der quantitativen Computertomographie (QCT) wird eine Bestimmung des trabekulären Knochens im Bereich der Wirbelsäule durchgeführt. Die Anwendung am Femur ist derzeit technisch nicht möglich. Anhand der Messung wird die Masse an Hydroxylapatit (HA) bestimmt und mit dieser die Osteoporose diagnostiziert. Über 120 mg HA/cm<sup>3</sup> ist der Normbereich. Unter 80 mg besteht eine Osteoporose. Der Zwischenbereich umfasst die Osteopenie. Die quantitative Computertomographie stellt die genaueste Diagnostik dar, jedoch ist sie sehr zeitaufwendig (20 min) und geht mit einer wesentlich höheren Strahlenbelastung einher. Ein T-Score lässt sich ebenfalls nicht bestimmen, so dass zum jetzigen Zeitpunkt die QCT noch nicht als Standard etabliert werden kann. In mehreren Studien wurde versucht verschiedenste biochemische Umbauparameter des Knochenstoffwechsels als Marker für die Osteoporose zu etablieren. Da die Datenlage hier jedoch zu inkonsistent und nicht signifikant ist, kann derzeit kein Marker standardisiert bestimmt werden (DVO 2017). Gleiches gilt zum jetzigen Zeitpunkt für die Erforschung genetischer Ursachen für die Osteoporose. Zwar ist bekannt, dass eine stattgehabte pertrochantäre Femurfraktur der Eltern mit einem erhöhten Risiko einer Fraktur des Kindes einhergeht (Kanis et al. 2004),

jedoch konnte die genetische Komponente der Osteoporose bisher nicht sicher nachgewiesen werden.

#### 1.1.4 Manifestation der Osteoporose

Der Knochen unterteilt sich in die Kortikalis und Spongiosa, welche aus dem gleichen Material bzw. der gleichen Zusammensetzung der Knochenmatrix bestehen. Jedoch unterscheiden sie sich deutlich zugunsten der Kortikalis in ihrer Dichte. Die Spongiosa weißt einen deutlich höheren Trabekelanteil auf und ist daher vor allem von der Osteoporose betroffen (Buckwalter et al. 1995). Der Knochenumbau findet während des gesamten Lebens statt. Je nach Körperregion und Ort im Knochen ist er mehr oder weniger ausgeprägt. Das Verhältnis des kortikalen zum spongiösen Knochen beträgt 80 % im Körper, der kortikale Knochen ist zu 90 % kalzifiziert und bietet kaum Oberfläche. Der spongiöse Knochen hingegen hat durch seine starke Vernetzung und feine Struktur ein sehr hohes Oberflächen-Volumenverhältnis und ist damit Hauptort des Umbaus. Im Vergleich werden ca. 25 % des spongiösen und 2,5 % des kortikalen Knochens erneuert. Für den Knochenumbau essentiell sind die Vitamine D, K, C, B12, B6 und A, sowie Kalzium, Phosphat, Magnesium und Natrium. In den Auf- und Abbauprozessen spielen eine Vielzahl von Zytokinen und Hormonen eine Rolle, jedoch hat sich in den letzten Jahren als entscheidend für die Regulation das sogenannte RANKL-Osteoprotegerin-System gezeigt. Die Gegenspieler sind RANK (Receptor Activator of NF-kB) und sein Ligand RANKL (Receptor Activator of NF-kB Ligand). RANKL wird von Osteoblasten und T-Lymphozyten produziert, ist der Hauptstimulus der Osteoklastenreifung und deren Erhalt. Er bindet an den RANK, der sich auf dendritischen Zellen, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Osteoklastenvorläuferzellen befindet. Letztgenannte werden dadurch zur Bildung von Osteoklasten aktiviert (Suda et al. 1999). Hierdurch kommt es zu einer Steigerung des Knochenabbaus (Boyle et al. 2003). Als Gegenregulator wirkt das Osteoprotegerin (OPG). Es stammt aus der Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren und blockiert, von Osteoblasten produziert, die Differenzierung von Osteoklasten aus Vorläuferzellen, indem es ebenfalls an RANK bindet und somit die Wirkung von RANKL inhibiert (Simonet et al. 1997). So werden je nach Aktivierungskaskade über multiple Hormone und Zytokine OPG bzw. RANKL gehemmt oder verstärkt, so dass ein geregelter Knochenumbau stattfinden kann. Die komplexen Abläufe sind hier noch nicht endgültig erforscht (Browner et al. 2001; Hofbauer et al. 2000, 2004). Bei der postmenopausalen Osteoporose kommt es durch eine mit dem Östrogenmangel einhergehende Dysregulation im RANKL-/RANK-/OPG-System zu einer Störung der

Umbauprozesse des Knochens im Körper (Yasuda 2013). Dies führt zu einer Verschiebung der Knochenhomöostase zu Gunsten des Knochenabbaus. Auf Grund des hohen Knochenumbaus im spongiösen Knochen manifestiert sich die Osteoporose zum Großteil hier und lässt sich daher auch dort am validesten Messen (Bartl 2011).

## 1.1.5 Basisdiagnostik

Laut DVO-Leitlinie (2017) besteht allgemein die Indikation zur Basisdiagnostik einer Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und Männern ab dem 60. Lebensjahr, wenn eine niedrigtraumatische Fraktur vorliegt oder das 10-Jahres-Risiko einer Hüft- oder Wirbelkörperfraktur über 20 % liegt (Berechnet z. B. mittels FRAX-Tools). Eine genauere Aufschlüsselung der Indikation zur Basisdiagnostik in verschiedenen Konstellationen, z. B. Vorerkrankungen, bietet die aktuelle DVO-Leitlinie von 2017. Es sollten zunächst eine ausführliche Anamnese und klinische Untersuchung erfolgen, inklusive *Timed-up-and-go-*, sowie *Chair-rising-* und *Tandemstand-Test*. Des Weiteren gehören die DXA und ein Basislabor zur Untersuchung. Das Labor besteht aus Parametern zur Prüfung der laborchemisch erfassbaren Risikofaktoren, sekundären Osteoporosen und als Differentialdiagnose in Frage kommende weitere Erkrankungen (siehe Tabelle 2).

Serum-Kalzium	Kreatinin-Clearence	In Einzelfällen
Serum-Phosphat	CRP und BSG	
Serum-Natrium	Blutbild	Testosteron
Alkalische Phospha-	Serum-Eiweißelektropho-	25-Hydroxy-Vitamin D3
tase	rese	
yGT	TSH	Knochenresorptionsparame-
		ter

#### Tabelle 2: Parameter des Osteoporosebasislabors

## 1.2 Therapie der Osteoporose

## 1.2.1 Frakturprophylaxe und Risikoabschätzung

Auf Grund von Bagatelltraumata entstehen bei der Osteoporose häufig Frakturen, so dass ein Stützpfeiler der Prophylaxe die Vermeidung bzw. die Milderung von Stürzen ist. Hierzu sollte die Muskulatur gestärkt bzw. eine Immobilisation vermieden werden. Des Weiteren ist von entscheidender Bedeutung, dass eine möglichst gute Aufrechterhaltung der Koordination erfolgt und Stürze abgefangen werden. Bei entsprechender Einschränkung empfiehlt es sich ebenfalls den Einsatz von Hilfsmitteln zu erwägen. Im Weiteren sollte bei entsprechender Risikogruppe eine Supplementierung von Kalzium und Vitamin D3 erfolgen. Dies dient zur Vermeidung der Osteoporose an sich, jedoch führt auch ein Vitamin-D-Defizit zu einer Sturzneigung. Ebenso gehört eine Abklärung von sturzfördernden Medikamenten, sowie die Evaluation der Ernährung und des Lebensstils zur Risikoabwägung und Prophylaxe. Zur Bestimmung des Risikos stehen verschiedene Tools zur Verfügung, wobei das sogenannte FRAX-Rechentool das in Deutschland verbreitetste darstellt (Kanis et al. 2010). Hierbei erfolgt an Hand von verschiedenen anamnestisch erhobenen Daten eine 10-Jahresfrakturrisikoabschätzung und damit bei entsprechend erhöhten Werten eine Empfehlung zur weiterführenden Diagnostik. Weitere Hilfsmittel sind der in Großbritannien genutzte Q-Fracture-Score (Hippisley-Cox und Coupland 2009) und das DVO-Risikomodell (DVO 2017).

## 1.2.2 Basistherapie

Die Basistherapie umfasst zunächst die Vermeidung bzw. Vorbeugung der unter 1.3.5. aufgeführten Risikofaktoren inklusive der regelmäßigen Risiko-/Nutzenabwägung von Medikamenten. Des Weiteren wird jedem Osteoporosepatienten empfohlen 1000 mg Kalzium über die Nahrung zuzuführen. Nur wenn dies nicht gelingt, sollte Kalzium substituiert werden. Ebenfalls sollte eine Einnahme von 800 bis 1000 IE Vitamin D3 pro Tag erfolgen (DVO 2017).

## 1.2.3 Spezifische medikamentöse Therapie

Die allgemeine Indikation zur spezifischen Osteoporosetherapie war bisher ab einem T-Score kleiner -2,5 gegeben. Neuere Studien zeigen jedoch bereits einen positiven Einfluss im Bereich zwischen -2 und -2,5 (Quandt et al. 2005), so dass in der DVO-Leitlinie von 2017 die Schwelle auf einen T-Score ab kleiner -2 hinaufgesetzt wurde. In einzelnen Fällen, wie zum Beispiel unter laufender Glukokortikoidtherapie auch schon bei höheren

Werten. Zur Therapie stehen in der heutigen Zeit viele Präparate mit verschiedenen Vorund Nachteilen mit differierenden Konzepten zur Verfügung. Zugelassen sind die Hormonersatztherapie, sowie weitere Medikamente, die man in antiresorptive und osteoanabole unterteilen kann. Für die Hormonersatztherapie konnte eine deutliche Reduktion der postmenopausalen, osteoporosebedingten Frakturen gezeigt werden (Gartlehner et al. 2017). Da der Einsatz von Östrogenen alleine oder in Kombination mit Progestinen zu einer erhöhten Inzidenz von Mammakarzinomen und kardiovaskulären Ereignissen führte, wird sie heute jedoch nur noch als Reservemedikation genutzt (Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators 2002; Anderson 2004). Dahingegen sind die antiresorptiven Bisphosphonate zum Goldstandard der spezifischen Therapie geworden. Sie haben eine hemmende Wirkung auf die Osteoklasten und wirken somit antiresorptiv (Nardone et al. 2014). Lange Zeit wurde diskutiert, ob durch ihre Anwendung die Knochenqualität abnimmt. Da jedoch weiterhin ein Basisumbau stattfindet, konnte dies zum Teil widerlegt werden. Als Präparate sind Alendronat, Risedronat, Ibandronat, und Zolendronat in der klinischen Anwendung, die sich vor allem in der Art der Applikation und deren Frequenz unterscheiden. Allen gemeinsam ist, dass die Empfehlung für eine Therapie, abhängig von der Knochendichte, zwischen drei bis fünf Jahren besteht und sie derzeit die First-Line-Präparate auf dem Markt darstellen (Nardone et al. 2014). Das antiresorptiv und osteoanabol wirkende Strontium-Ranelat wurde auf Grund von Komplikationen und damit folgender fehlender Nachfrage 2017 vom Markt genommen (Red MWW 2017). Eine Alternative zu den Bisphosphonaten ist das antiresorptive Raloxifen. Es ist ein sogenannter Selective-Estrogen-Receptor-Modulator (SERM), der keine Wirkung auf die Geschlechtsorgane hat. Es wirkt agonistisch am Östrogenrezeptor der Osteoklasten, damit hemmend auf selbige und antiresorptiv, so dass es zu einer Erhöhung der BMD (Bone mineral density) kommt. Ebenfalls wird die Proliferation von Präosteoklasten gehemmt (D'Amelio und Isaia 2013). Bekannte Nebenwirkung sind Hitzewallungen (D'Amelio und Isaia 2013) und ein Anstieg der Inzidenz für venöse Thrombosen (Ettinger 1999). Des Weiteren nimmt das Risiko an Brustkrebs zu erkranken unter der Therapie ab, so dass die Indikation vor allem bei erhöhtem Mammakarzinomrisiko oder stattgehabtem Mammakarzinom besteht. Zugelassen ist das Medikament zur Prävention und Therapie der postmenopausalen Osteoporose (Nardone et al. 2014). Zeigt sich unter Bisphosphonattherapie eine persistente manifeste Osteoporose, ist Parathormon (PTH) bzw. Teriparatid zugelassen. Die Wirkstoffe führen zum einen zu einer gezielten Hemmung der osteoklastischen Knochenresorption, zum anderen haben sie - bei intermittierender

Gabe - unter allen Medikamenten den stärksten osteoanabolen Effekt (Li et al. 2012; Tsuchie et al. 2013; Ellegaard et al. 2013). Sie wirken über verschiedene Signalkaskaden sowohl am kortikalen wie auch dem trabekulären Knochen antiresorptiv und anabol (Neer et al. 2001; Aspenberg 2013). Neer et al. (2001) und weitere Studien konnten zeigen, dass es durch PTH zu einer Reduktion von osteoporotischen Frakturen am Wirbelkörper und übrigen Skelett kommt (Fahrleitner-Pammer et al. 2011; Jakob et al. 2012). Die Anwendung ist auf Grund der hohen Kosten und der Komplikationsrate bei Langzeitanwendung limitiert auf eine Anwendungsdauer von 24 Monaten (Vahle et al. 2002; Vestergaard 2014). **Denosumab** ist ein neueres Präparat. Es handelt sich hierbei um einen humanen monoklonalen Antikörper zum RANKL, so dass selbiger nicht an RANK binden kann. Hierdurch kommt es zu einer Minderung der Entwicklung und Aktivität von Osteoklasten und konsekutiv zu einer verringerten Knochenresorption und steigenden Knochendichte. Neuere Studien wie die FREEDOM-Studie zeigen hier vielversprechende Ergebnisse (Cummings et al. 2009; Papapoulos et al. 2015). Insbesondere konnten hier auch deutliche osteoanabole Effekte über acht Jahre der Therapie gezeigt werden (Papapoulos et al. 2015). Die genauen Mechanismen sind noch ungeklärt und müssen zukünftig weiter erforscht werden (Bone et al. 2013). Neben den positiven Daten zeigen neuere Studien, wie z. B. die von Popp et al. (2016), dass es nach Beendigung der Therapie zu einem Reboundeffekt mit erneuten niedrigtraumatischen Frakturen kommen kann. Dies erschwert die Steuerung der Therapie und sollte in neuen Studien und der Therapie Beachtung erfahren. **Romosozumab** ist das neueste auf dem Markt befindliche Präparat. Es ist ebenfalls ein humaner monoklonaler Antikörper. Es bindet und inhibiert Sclerostin, ein körpereigenes Glykoprotein. Sclerostin hemmt die Osteogenese. So führt Romosozumab zu einer steigenden Knochendichte und verringerten Resorption (Cosman et al. 2016). Erste Studien konnten hier vielversprechende Ergebnisse zeigen (Padhi et al. 2011; McClung et al. 2014). Cosman et al. (2016) beschreiben eine deutliche Reduktion der Wirbelkörperfrakturen ein Jahr nach Therapie mit Romosozumab.

#### 1.3 Whole-Body-Vibration

Neben der Prophylaxe und medikamentösen Therapie der Osteoporose werden immer wieder verschiedene neue nichtmedikamentöse Ansätze zur Therapie erforscht. Eine dieser Therapieoptionen ist die Whole-Body-Vibration (WBV) oder Ganzkörpervibration. Der Patient steht hierbei mit den Füßen auf einer vibrierenden Plattform, deren Frequenz und Amplitude variiert werden kann. Grundgedanke ist, dass durch die Vibration eine Anregung der Muskulatur und des Knochens zum Aufbau bzw. Umbau erfolgen soll (Rubin et al. 2006). Diese Annahme beruht auf dem Wollfschen Gesetz. Der deutsche Anatom Wolff beschrieb schon 1892 das heute bekannte Modelling und Remodelling. Er ging davon aus, dass durch eine Belastung der Muskulatur und der Knochen ein Aufbau derselbigen bzw. eine Festigung stattfindet. Bei fehlender Belastung würde ein Abbau stattfinden. Diese Erkenntnis erlangte er durch Untersuchungen an Femurpräparaten, in denen er u. a. eine Ausrichtung der Trabekel entlang der Belastung und eine entsprechende Degeneration nach Entlastung fand (Wolff 1892). Diese Erkenntnisse wurden von Harold Frost in seinem Mechanostat-Modell 1960 aufgegriffen und bis in die frühen 2000er überarbeitet (Frost 2000). Frost fand heraus, dass es auf Grund einer elastischen Verformung zu Umbauprozessen am Knochen kommt. Die elastische Verformung selber würde über eine Belastung und/oder einen Zug (*strain*) entstehen, deren Einheit er als µStrain angab. Eine Belastung mit 1000 µStrain entspricht dabei einer Längenänderung um 0,1 %. Gründe der Belastung seien direkt auf den Knochen wirkende Kräfte, aber auch über die Muskulatur einwirkende Zug- und Druckkräfte. Hierdurch kommt es je nach Größe selbiger zu vier Stadien der elastischen Verformung. Als die geringste Belastung legte Frost das Stadium des *disuse* fest. Dies ist definiert als < 800 µStrain. Durch die geringe Belastung kommt es hier zum Abbau des Knochens. Das folgende Stadium ist der sogenannte adapted state. Es ist definiert zwischen 800 und 1500 µStrain. Hier kommt es zu einem geregelten Knochenaufbau und -abbau, so dass ein steady state (Gleichgewicht) entsteht. Kommt es zu höheren Belastungen > 1500 µStrain überwiegt der Knochenaufbau und es wird das sogenannte Overloadstadium erreicht. Letztlich gibt Frost eine Belastung > 15000 µStrain als Obergrenze an, die zum Bruch des Knochens führt. Die Grenze sinkt je nach Knochen bzw. Körperregion (Frost 2000) und die Umbauprozesse finden ein Leben lang statt. Hierdurch ist auch erklärbar, warum z. B. bei Astronauten nach entsprechendem Training nach Rückkehr auf die Erde eine im Weltall entstehende Osteopenie reversibel ist (Frost 1987). Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurde in der Vergangenheit

die WBV zunehmend als nichtpharmakologische Antiosteoporosetherapie erforscht (Rubin et al. 2006). Durch die Vibrationsplattform werden die Schwingungen über die Füße auf die Muskulatur und von da auf die Knochen übertragen (Rubin et al. 2003; Kiiski et al. 2008). Bezüglich des nun eintretenden Effektes werden in der Literatur zwei Hypothesen aufgestellt. Zum einen wird angenommen, dass die durch die WBV aktivierte Muskulatur zu einer Mechanotransduktion der Vibrationskräfte auf den Knochen führt; zum anderen, dass die WBV mit hoher Frequenz und niedriger Belastung Knochenzellen, die als Mechanosensoren fungieren, aktiviert (Fritton et al. 2000; Rubin et al. 2006). In verschiedenen Studien konnte im Tierversuch durch WBV ein anaboler Effekt am Knochen und Muskel gezeigt werden (Rubin et al. 2002; Judex et al. 2007). Slatkovska et al. (2010) konnten dann den Transfer der Tierversuche zum Menschen durchführen und zeigten moderate Effekte der WBV auf die Knochendichte in postmenopausalen Frauen. Die Studienlage zeigt aber eine deutliche Heterogenität in Bezug auf die Art der Applikation. Unklar ist die optimale Dauer der WBV pro Tag bzw. pro Woche sowie die optimale Art und Richtung der Vibrationsbehandlung. (Rubin et al. 2002; Sehmisch et al. 2009; Tezval et al. 2011; Komrakova et al. 2013).

#### **1.4** Die Ratte als Osteoporosemodell

In dieser Versuchsreihe wurden weibliche, sogenannte *mature rats* vom Typ Sprague Dawley im Alter von drei Monaten verwendet (Kalu 1991). Die Ratte ist ein vielseitig erforschtes und diskutiertes Modell der postmenopausalen Osteoporose. Bei postmenopausalen Frauen kommt es typischerweise auf Grund des Östrogenmangels zu einem raschen Abfall der Knochendichte innerhalb der ersten zehn Jahre zu deutlichen Ungunsten des spongiösen gegenüber dem kortikalen Knochen. Dieser Phase folgt ein geringer Knochenverlust. Der Prozess wird auf einen höheren Knochenumbau mit vermehrter Osteoklastenaktivität zurückgeführt (Johnston et al. 1985; Štěpán et al. 1987). Ein adäquates Tiermodell sollte also diese Kriterien erfüllen. Die ersten Versuche mit einem Rattenmodell der postmenopausalen Osteoporose gehen auf Saville et al. (1969) zurück. Die Gruppe fand heraus, dass in ovarektomierten Ratten im Vergleich zur gesunden Gruppe weniger Calcium im Knochen eingebaut war. Diese Erkenntnis wurde im Verlauf mehrfach belegt und erweitert. Die Lebensspanne einer Ratte liegt abhängig von der Belastung bei drei bis vier Jahren. Sehr junge Tiere im Alter von einigen Wochen zeigten das Problem eines sehr hohen Knochenumsatzes, während alte Tiere ab ca. zwei Jahren nahezu postmenopausal waren, so dass es in der Folge zur Definition zweier Rattenmodelle kam (Kalu 1991).

Diese beiden Modelle sind das Aged-Rat-Modell und das Mature-Rat-Modell. Kalu et al. (1989) fanden heraus, dass ein erhöhter Knochenumsatz im Alter von ein bis drei Monaten bei der Ratte stattfindet. Ab sechs Monaten sind nur noch minimale Veränderungen beschrieben, die mit zwölf Monaten ein Plateau erreichen. Sie beschrieben weiterhin einen nahezu Steady-state-Zustand zwischen 6 bis 24 Monaten und legten den optimalen Zeitpunkt für Untersuchungen mit ca. zwölf Monaten fest – das sogenannte Aged-Rat-Modell. Problem dieses Modells waren die hohen Kosten. Effekte der Ovariektomie traten zudem erst verhältnismäßig spät auf. Es konnte in dieser Studie ein Verlust der Knochendichte nach zwei Monaten im Femur, Ilium und der lumbalen Wirbelsäule festgestellt werden (Kalu 1991). Im Vergleich hierzu gibt es bei ca. drei Monate alten Tieren eine hohe Verfügbarkeit, weniger Kosten für die Zucht und die osteokatabolen Effekte konnten weniger als einen Monat nach Ovarektomie abgebildet werden. Der Verlauf des "Knochenschwundes" war ähnlich dem der postmenopausalen Frau und dem Aged-Rat-Modell. Dieses Modell wurde als Mature-Rat-Modell beschrieben, wobei mature nur die Zeugungsfähigkeit beschreibt und die Tiere somit auf ein Fehlen von Sexualhormonen ansprechen (Kalu 1991). Wronski et al. (1985) fanden heraus, dass bis zum Alter von sechs Monaten der spongiöse Knochen konstant blieb. In der ovarektomierten Gruppe zeigte sich im Bereich der proximalen Tibia eine deutliche Abnahme des Knochens. Diese war nach zwei Wochen signifikant und deutlich ausgeprägt nach einem Monat. Kalu et al. (1989) konnten zeigen, dass es, ähnlich dem Menschen, zu einem Verlust mit mehr Abbau im Bereich der Wirbelsäule im Vergleich zum Femur kam. Im Mature-Rat-Modell kam es zu einem höheren Knochenumbau mit deutlichem Überwiegen der Knochenresorption (Wronski et al. 1989). Dies war gleichzusetzen mit dem Aged-Rat-Modell und der postmenopausalen Frau. Probleme des Rattenmodells sind, dass die drei Monate alten Ratten ein Restwachstum haben, so dass in Versuchen immer ein Kollektiv zu Versuchsbeginn getötet werden muss, um eine sogenannte baseline zu erhalten. Zudem wurde häufig beschrieben, dass ein Havers-Kanal-System in der Ratte fehlte und somit das Knochenwachstum mit humanen Modellen nicht zu vergleichen wäre (Bagi et al. 1997a). Jee et al. (1990) konnten jedoch zeigen, dass die Ratte andere Prinzipien des Knochenwachstums besitzt und somit vergleichbar ist. Eine entwickelte Osteoporose in der Ratte führt im Gegensatz zur Osteoporose beim Menschen nicht zu vermehrten Brüchen. Dies mag an der stärkeren Ausprägung des kortikalen Knochens im Verhältnis zur Spongiosa liegen. Um die Osteoporose und den Einfluss von Stoffen bzw. Methoden zu überprüfen, sind Frakturen jedoch nicht notwendig, so dass auch dies keine Kontraindikation zum Modell darstellt. Somit ist

belegt, dass das in unserer Arbeit angewandte Rattenmodell aussagekräftig ist. Wir entschieden uns für die Verwendung des proximalen Femurs als *region of interest*. Neben der lumbalen Wirbelsäule findet die Ausprägung der Osteoporose im Bereich des proximalen Femurs beim Menschen am stärksten statt. Frakturen hier sind die zweithäufigsten. Wie zuvor beschrieben beschäftigen sich viele Versuchsreihen bereits mit der Wirbelsäule und der proximalen Tibia, wobei selbige Areale ein hohes Maß an Spongiosa bei kaum vorhandener Kompakta aufweisen. Das Femur bietet den Vorteil der simultanen Betrachtung von kortikalem und spongiösem Knochen in einem Präparat. Des Weiteren setzen im Bereich der Trochanteren und des Schenkelhalses Muskeln an, was diese Regionen z. B. für die WBV sensitiviert. Die Anwendbarkeit des zuvor beschriebenen Rattenmodels beschrieb u. a. die Gruppe um Bagi (1997a; 1997b), die das Femur mindestens als gleichwertig bzw. eher überlegen im Hinblick auf die anatomischen Gegebenheiten im Vergleich zu anderen Körperregionen sehen.

## 1.5 Zielsetzung

Wie schon Vorarbeiten gezeigt haben, kann durch Ganzkörpervibration (WBV) mit einer geringen Belastung *(strain)* aber hoher Frequenz der Vibration die Knochenbildungsrate gesteigert werden (Judex et al. 2007; Slatkovska et al. 2010; Pasqualini et al. 2013). Unklar ist jedoch der optimale Frequenzbereich, die Häufigkeit und Dauer der Vibration sowie die Schwingungsrichtung. Hierzu wurden in unserem Versuch verschiedene Behandlungsgruppen gebildet. Es wurden Ratten bei zwei verschiedenen Frequenzen, 35 und 70 Hertz, jeweils in horizontaler und vertikaler Richtung zweimal pro Tag vibriert. Da wie zuvor beschrieben die osteoporosebedingte Femurfraktur eine der häufigsten Frakturen darstellt, wurde der Versuch am Rattenfemur, als ein etabliertes Osteoporosetiermodell, durchgeführt (Kalu 1991). Ein biomechanischer Test sollte hierbei Aufschluss über die Stabilität des Knochens geben. Die anschließend durchgeführte Veraschung sollte dabei den anorganischen Anteil der einzelnen Versuchsgruppen zeigen und letztlich durch eine histomorphometrische Messung von Schnitten der kontralateralen Femora die Trabekeldichte, -dicke und –anzahl, sowie die Dichte der Kortikalis bestimmt werden. Aus diesen Werten sollte dann die optimale Frequenzart und Vibrationsrichtung identifiziert werden.

## 2.1 Versuchsprotokoll

Alle Versuche und Versuchsprotokolle wurden durch die lokale Ethikkommission nach dem deutschen Tierschutzgesetz genehmigt (AZ 011/07, Bezirksregierung Braunschweig, Deutschland). Der Versuch wurde mit 90 Ratten vom Typ Sprague Dawley (Fa. Winkelmann, Borken, Deutschland) im Alter von drei Monaten durchgeführt. Es erfolgte eine Einteilung in sechs Versuchsgruppen mit jeweils 15 Tieren (Tabelle 1). Um die Osteoporose zu induzieren, wurde eine beidseitige Ovarektomie bei fünf Gruppen durchgeführt, die sechste Gruppe wurde scheinovarektomiert und fungierte als Kontrollgruppe (SHAM). Während des Versuches wurden die Tiere für eine andere Doktorarbeit acht Wochen nach der Ovarektomie im Bereich der proximalen Tibia osteotomiert und mit einer Plattenosteosynthese versorgt (Bösch 2016). Wir begannen fünf Tage nach dieser Operation, dem 61. Tag, die Whole-Body-Vibration. Diese erfolgte zweimal täglich für jeweils 15 Minuten sieben Tage die Woche für 30 Tage, wobei in den einzelnen Versuchsgruppen Frequenzen von 35 und 70 Hertz sowohl in horizontaler wie auch vertikaler Richtung verwendet wurden (Tabelle 3). Den Tieren wurde dann für die Untersuchung von Bösch (2016) zur polychromen Sequenzmarkierung der Knochenneubildung vier fluoreszierende Farbstoffe verabreicht. Es erfolgte die subkutane Injektion von 90 mg/kg KG Xylenol-Orange am 13. Tag nach der Osteotomie, 10 mg/kg KG Calcein-Grün am 18. Tag, 30 mg/kg KG Alizarin-Komplexon am 24. Tag sowie am 26. Tag und 25 mg/kg KG Tetrazyklin am 35. Tag, dem Versuchsende (Rahn 1976; Bösch 2016). Drei Monate nach der Ovarektomie wurden die Tiere durch Dekapitation euthanasiert. Hierbei wurde das Blut zur Bestimmung der Parameter alkalische Phosphatase (ALP) und Osteocalcin (OC) aufgefangen und die Knochen für jede Versuchsgruppe freipräpariert und vom Weichteilgewebe befreit.

Versuchsgruppe	Anzahl Tiere	Anzahl Tiere	Therapie
	Versuchsbeginn	Versuchsende	
1	15	13	SHAM
2	15	14	OVX
3	15	14	OVX + 35-Hz-v
4	15	14	0VX + 70-Hz-v
5	15	14	0VX + 35-Hz-h
6	15	14	OVX + 70-Hz-h

#### Tabelle 3: Zuordnung der Tiere zu Versuchsgruppen

Legende: SHAM = scheinoperiert, OVX = ovarektomiert, Hz = Hertz, v = vertikal, h = horizontal

## 2.1.1 Versuchstiere und ihre Haltung

Die Versuchstiere wurden in 4er- bis 5er-Gruppen über den gesamten Zeitraum im Bereich der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen in Käfigen vom Typ Makrolon® IV gehalten. Stets wurde eine Einhaltung des Tag-/Nacht-Zyklus von zwölf Stunden durch eine Zeitschaltuhr in einem geschlossenen Raum gewährleistet. In diesem wurde eine konstante Raumtemperatur von 22 ± 1 °C bei 55 % Luftfeuchtigkeit eingehalten. Die Reinigung der Käfige erfolgte wöchentlich. Während der gesamten Versuchszeit hatten die Tiere freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Die Tiere erhielten einmal wöchentlich 1500 g sojafreies Haltungsfutter (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland), wobei die Restmenge der Vorwoche stets abgewogen und so die Nahrungsaufnahme der einzelnen Käfige dokumentiert werden konnte. Eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr wurde gewährleistet. Die Tiere wurden wöchentlich gewogen (Sehmisch et al. 2009; Tezval et al. 2010).

## 2.1.2 Ovarektomie und Anästhesie

Im Alter von zwölf Wochen erfolgte bei fünf Gruppen die Ovarektomie. Eine Gruppe wurde SHAM-operiert. Zur Ovarektomie wurden die Tiere narkotisiert. Die Einleitung wurde mit CO<sub>2</sub> durchgeführt und im Weiteren mit einem Gemisch aus Ketamin (Medistar, Holzwickede, Deutschland) und Xylazin (Riemser, Greifswald-Insel Riems, Deutschland) im Verhältnis 3:1 gewichtsadaptiert 0,1 ml/100 g KG aufrechterhalten. Dann wurden die Ratten im Bereich des Unterbauches rasiert und desinfiziert (Braunovidon®, Bayer, Leverkusen, Deutschland). Zunächst erfolgte ein Schnitt der Haut mit anschließender

Freipräparation der Ovarien mitsamt den Adnexen. Durch Ligatur der Tubae uterinae und anschließendem Absetzen wurde die Ovarektomie durchgeführt. Der Wundverschluss erfolgte mit Vicrylnaht® (Eticon Norderstedt, Johnson & Johnson, Deutschland) und Adaptation der Wundränder durch Klammern (Michel wound brackets 12 x 3 mm, Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Um einem Flüssigkeitsverlust vorzubeugen, wurde den Tieren ein Depot NaCl subkutan appliziert. Während dieser OP wurde den Tieren ebenfalls am Nacken subkutan ein Transponder appliziert, der die spätere Identifizierung während des Versuches gewährleistete (Sehmisch et al. 2009; Tezval et al. 2010). Bis zum Aufwachen wurden die Käfige mit Versuchstieren zur Kompensation des Wärmeverlustes auf Wärmeplatten gestellt und beobachtet.

## 2.1.3 Osteotomie und Osteosynthese

In einer zweiten Operation acht Wochen nach Versuchsbeginn erfolgte eine bilaterale Osteotomie der metaphysären Tibia mit anschließender Plattenosteosynthese. Diese diente dazu den Einfluss der WBV auf die Frakturheilung zu überprüfen, was im Rahmen einer weiteren Abhandlung diskutiert wurde (Komrakova et al. 2013; Bösch 2016). Die Anästhesie erfolgte analog zur Ovarektomie.

## 2.1.4 Whole-Body-Vibration

Fünf Tage nach der Osteotomie begann die WBV. Diese wurde zweimal täglich für jeweils 15 Minuten durchgeführt. Es gab vier Versuchsgruppen, die bei 35 Hertz oder 70 Hertz, horizontal oder vertikal mit einer Amplitude von 0,47 mm und 0,15 – 0,48 g Beschleunigung, gemessen mit Hilfe des Geräts SWM 3000 (REO Elektronik, Berlin, Deutschland), vibriert wurden. Als Vibrationstische dienten zwei Plastikkäfige, die mit Schaumstoff bzw. Plastik gepolstert wurden (50 x 50 x 25 cm<sup>3</sup>). Diese waren auf einer Plattform befestigt, an dessen Boden sich zwei Motoren befanden, die von ursprünglichen Zementmixern modifiziert wurden (Vibra Drehstrom-Vibrationsmotor Typ HVL/HVE; Schultheis, Offenbach, Deutschland; Abbildung 2). Ein an diesem angeschlossener Kraftwandler erlaubte die Einstellung und Kontrolle der exakten Frequenz vor und während der Vibration. Die Tiere, ca. vier bis acht gleichzeitig, konnten sich zu jeder Zeit frei in dieser Apparatur bewegen, wobei während der Vibrationszeit genau darauf geachtet wurde, dass die Ratten mit allen vier Extremitäten auf dem Boden und isoliert standen. Die WBV erfolgte insgesamt für 30 Tage.

Material und Methoden



**Abbildung 2: Modifizierter Vibrationstisch für horizontale (1) und vertikale (2) Vibration.** Dargestellt jeweils zwei Motoren (a) und der Vibrationskäfig (b) ((Komrakova et al. 2017); CC BY NC ND)

## 2.1.5 Dekapitation, Probengewinnung und Präparation der Femora

Nach Abschluss der Vibration 91 Tage nach Versuchsbeginn erfolgte die Tötung der Tiere. Hierzu wurden sie durch eine CO<sub>2</sub>-Narkose betäubt und dekapitiert. Blutproben wurden mit einem Auffangtrichter gewonnen, zentrifugiert und bei -20 °C aufbewahrt bis die Bestimmung von ALP und OC durchgeführt werden konnte. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines automatischen Analysegerätes (Roche/Hitachi Modular) in der Abteilung für klinische Chemie der Universität Göttingen. Im Anschluss wurden die Femora im Hüft- sowie im Kniegelenk exartikuliert und von Muskeln, Sehnen und sonstigem Gewebe gereinigt. Die Knochen wurden dann in Plastikröhrchen bei -20 °C aufbewahrt, um für die im Folgenden beschriebenen Versuche aufbereitet und genutzt zu werden. Für weitere Studien wurden ebenfalls Tibiae, Lendenwirbelkörper und Muskeln entnommen (Fürst 2014; Bösch 2016; Komrakova u. a. 2017).

## 2.2 Bruchtest

Um die mechanische Stabilität der Trochanterregion zu testen wurde ein standardisierter Test verwandt (Tezval et al. 2010). Zunächst wurden die Knochen jeweils für 30 Minuten aufgetaut. Dann wurde das rechte Femur locker in eine Vorrichtung eingespannt. Der Femurkopf wurde in einer 4 mm Vertiefung fixiert und das distale Ende lag locker der Plattform auf. Seitlich erfolgte die Stabilisierung des Schaftes durch zwei bewegliche Metallzylinder. In dieser Konstruktion erhielt der Trochanter minor keinen Kontakt zur Plattform und es wurde ein Winkel zwischen horizontaler Linie und dem Femurschaft von nahezu 0 ° eingehalten (Abbildung 3, Abbildung 4).



Abbildung 3: Halterung für den Bruchtest von oben betrachtet

Um nun eine vertikale Kraft auf den Trochanter major zu applizieren, wurde die ZWICK-Test-Maschine genutzt (Typ 145660 Z020/TND, Zwick/Roell, Ulm, Deutschland; siehe Abbildung 4). Zur Durchführung der Kompression wurde das Programm "testXpert" genutzt. Das Femur wurde wie zuvor beschrieben positioniert und der Stempel senkte sich ab bis ein Kontakt und eine Vorspannung von einem Newton (N) erreicht werden konnte. Zu diesem Zeitpunkt pausierte die Software und es bestand die Möglichkeit die Position des Femurs zu korrigieren oder den Versuch komplett zu beenden. Nach der Kontrolle und der Bestätigung startete der eigentliche Test. Der Stempel fuhr mit einer Geschwindigkeit von 50 mm/min weiter hinunter und übte so kontinuierlichen Druck auf die Trochanter-major-Region des Femurs aus. Parallel wurde vom Gerät so die Kraft

aufgezeichnet, die pro 0,1 mm Weg benötigt wurde. Da der Femurschaft und das distale Ende des Knochens nur dynamisch fixiert wurden, war eine longitudinale Beweglichkeit zu jeder Zeit gegeben. Der Messbereich lag zwischen 2 bis 400 N bei einer relativen Genauigkeit von 0,2 bis 0,4 %. Der Bruchtest wurde nach Bruch des Femurs und begleitendem deutlichem Abfall der Kraft-/Weg-Kurve beendet. Durch diese Art des Versuchsaufbaus kam es zu einer rückwärts verlaufenden intertrochanteren Femurfraktur, die nach AO-Klassifikation einer 31-A3.1 Fraktur entsprach (Tezval et al. 2010; Neuerburg 2015).



Abbildung 4: Femur in die Bruchtestmaschine eingespannt

## 2.2.1 Messgrößen

## 2.2.1.1 Maximalkraft Fmax

Der höchste Kraftwert, der letztlich zum Bruch des Femurs im Bereich der Trochanteren führt, wird auch als Maximalkraft (F<sub>max</sub>) bezeichnet. Dieser wird durch den höchsten Punkt im Kraft-/Weg-Diagramm angegeben (Tezval et al. 2010; Neuerburg 2015).

## 2.2.1.2 Steigung

Ein weiterer Wert, der dem Kraft-/Weg-Diagramm entnommen werden kann ist die Steigung bis zum Bruch (N/mm). Diese stellt die Steifigkeit des Knochens und damit dessen Elastizität dar (Tezval et al. 2010; Neuerburg 2015).

## 2.2.2 Korrelation der Maximalkraft und Steigung mit dem Gewicht der Tiere

Das Wachstum, Körpergewicht und die Größe der Knochen unterscheidet sich zwischen ovarektomierten und SHAM-Tieren, so dass wir zur weiteren Auswertung die erhobenen Ergebnisse auch in Bezug zum Gewicht der einzelnen Tiere setzten und somit einen neuen Wert erhielten. Dies ist notwendig, da die Stabilität der Knochen durch Volumen und Konstitution beeinflusst wird. So ist davon auszugehen, dass größere Femora bei größeren Tieren primär stabiler sind als bei kleineren Vergleichstieren (Ruyssen-Witrand et al. 2007) und zur Vergleichbarkeit der Tiere der Bezug zum Gewicht der Ratten notwendig ist.

## 2.2.3 Validierung

Bevor der Bruchtest durchgeführt wurde, fand eine Validierung des Untersuchers statt. Hierzu wurden jeweils das rechte und das linke Femur von zehn Ratten, die den Versuchsratten vergleichbar waren, verwendet. Mit diesen wurde der oben beschriebene Test durchgeführt und in der Auswertung darauf geachtet, dass zwischen linkem und rechtem Femur der Unterschied im Bereich der Maximalkraft und der Steigung nicht größer als 15 % (± 3 %) war. Diese Grenze stellt, wie in anderen Publikationen beschrieben (Fisk und Baigent 1975; Budsberg et al. 1993), den physiologischen Unterschied im Rechts-Links-Vergleich bei Tieren dar.

## 2.3 Mikroradiographie

Es wurde eine Mikroradiographie der Oberschenkelknochen durchgeführt. Die Femora wurden zunächst für die anstehende Mikroradiographie aufbereitet. Dieses diente der Entwässerung und Entfettung der Knochen. So wurden die Knochen über einen Zeitraum von 46 Tagen in verschiedene Flüssigkeiten eingelegt. Zunächst zweimal an drei aufeinander folgenden Tagen in 40 %iger, dann zweimal fünf Tage in 70 %iger, dann fünf Tage in 80 %iger und zuletzt zwei Tage in 96 %iger Ethanollösung. Diesem Prozedere folgten zwei Tage in einer 1:1 Mixtur aus Methylmethacrylat und 96 % Ethanol und zwei Tage in reinem Methylmethacrylat. Zum Abschluss wurden die Femora durch eine Einbettung über 21 Tage in ein Gemisch aus 1000 ml Methylmethacrylat, 200 ml Dibutylphtalat und 29 g Benzoylperoxid zu Kunststoffblöcken ausgehärtet. Aus diesen Blöcken wurde dann mit Hilfe einer diamantenbesetzten Innenlochsäge (Sägemikrotom 1600; Leica, Nussloch, Deutschland) 150 µm Dicke coronare Schnitte hergestellt. Die Schnittdicke wurde mit einem Messgerät der Firma Leica kontrolliert (Leica, Bensheim, Deutschland). Die

Mikroradiografien erfolgten in einem Faxitron Röntgengerät (Hewlett-Packard, 50 µm Xray beam output; model 43855A; IL 60089, San Diego, USA) mit speziellem, hochauflösendem Kodak Industriefilm (Typ SR 45, 100 NIF, Kodak, Paris, Frankreich). Bei einer Belichtungszeit von sechs Minuten betrug die Röhrenspannung 40 kV und die Stromstärke 0,3 mA. So entstanden Bilder mit einer Auflösung von 0,5 µm (Tezval et al. 2010). Um Messungen der Schnitte durchführen zu können wurden die Schnitte digitalisiert. Hierzu diente ein Makroskop der Firma Leica (Leica-System MZ 7-5, Bensheim, Deutschland). Die für die Femora optimale Belichtung wurde bereits in Vorversuchen bestätigt und dann durch die Einstellung D der mechanischen Blende, wobei A die geringste Beleuchtung und E die größte Beleuchtung bezeichnet, bei 3000K Temperatur erreicht. Es wurde eine Vergrößerung von 1,0 gewählt. Zur Erfassung diente eine Kamera (Leica DC 300 F, Bensheim, Deutschland), die an einen Computer (2,84 GHz, 3 GB Ram, Intel Core 2 Quad CPU; Windows XP Professionell 2002 SP 3) angeschlossen wurde. Das Programm Leica Quantimet QWin 2003 mit einer eigens für das Femur programmierten Routine diente letztlich der Erfassung der Bilder und Bestimmung einzelner Parameter. Die Kennzeichnung und Markierung der einzelnen Bereiche auf den eingelesenen Daten erfolgte mit Hilfe eines Digitalisierungspads (Wacom Intuos 3 Tablet mit Grip Pen, Wacom Europe GmbH, Krefeld, Deutschland). Die Schnitte wurden in einer eigens angefertigten Schablone abgelegt, die eine genaue Positionierung unter der Kamera ermöglichte. Die Epiphysenfuge des Femurkopfes lag am oberen Rand des Untersuchungsbereiches an, der Schenkelhals stand senkrecht und die mediale Kompakta war rechts auf dem Bild zu finden. Die distale Begrenzung des zu untersuchenden Bereichs wurde durch die Basis des Trochanter majors bestimmt. Die richtige Position und Belichtung konnte in einer Bildvorschau am PC überprüft werden.



Abbildung 5: Einlesen und Ausrichten des Schnittes

## 2.3.1.1 Histomorphometrie

Für die histomorphometrische Messung war eine möglichst genaue Erfassung aller knöchernen Strukturen, d. h. Trabekel- sowie Kortikalisbereich, wichtig. Durch die Kamera wurden diese grau vor schwarzem Hintergrund dargestellt. Diesen Prozess bezeichnet man als Graudetektion (Abbildung 5, Abbildung 6). Durch die so erfasste Unterscheidung zwischen Knochen und übrigen Flächen konnten spätere Messungen durchgeführt werden.



Abbildung 6: Graudetektion

## 2.3.1.2 Messung der medialen Kortikalisdichte

Zunächst wurde mit Hilfe des zuvor beschriebenen Pens die mediale Kortikalisdichte bestimmt. Hierzu wurde diese umfahren und so gekennzeichnet. Das distale Messende stellte die Basis des Trochanter majors dar. Von diesem ausgehend wurde die Kortikalis auf der Seite des Markraums (endostal) und von außen (periostal) umfahren, wobei die proximale Begrenzung durch die Epiphysenfuge des Femurkopfes gegeben war (Abbildung 7).



Abbildung 7: Markierung der medialen Kortikalis

## 2.3.1.3 Messung der Trabekelfläche und -anzahl

Um die Trabekelfläche zu bestimmen wurde nun der endostale Raum eingegrenzt. Auch hier war das distale Ende eine auf Höhe der Basis des Trochanter majors gezogene Linie und das proximale Ende durch die Epiphysenfuge vorgegeben. Als seitliche Begrenzung dienten auf beiden Seiten entlang der inneren Kortikalis gezogene Linien. Durch die vorher erfolgte Graudetektierung konnte das Programm nun die knöchernen Strukturen, sprich die Trabekel, und deren Fläche bestimmen (Abbildung 8).



Abbildung 8: Markierung des Trabekelbereichs

## 2.3.2 Messparameter

#### Tabelle 4: Messparameter der Histomorphometrie und ihre Definition

Parameter	Definition und Einheit
Knochendichte Kortikalis medial	Dichte der medialen Kortikalis in %
Trabekelkreuzungen absolut	Absolute Anzahl der Trabekelkreuzungen innerhalb der tra- bekulären Knochenfläche
Dichte Trabekelkreuzungen	Anzahl der Trabekelkreuzungen pro mm², gemessen inner- halb der trabekulären Knochenfläche (pro mm²)
Mittlere Trabekeldicke	Mittlere Dicke aller Trabekel eines Sagittalschnittes in $\mu m$
Fläche Trabekelbereich	Gesamtfläche des Trabekelbereiches in mm²
Knochendichte Trabekelbereich	Anzahl der Trabekel bezogen auf die gemessene Gesamtflä- che

## 2.3.3 Validierung der Messungen

Vor Beginn der eigentlichen Messungen erfolgte eine Validierung des Untersuchers. Hierzu wurden bei drei verschiedenen Schnitten jeweils fünf Messungen nach oben beschriebenem Prozedere durchgeführt. Bei der Auswertung wurde dann darauf geachtet, dass die Varianz unter ± 10 % lag. So wurde sichergestellt, dass Fehler, die durch die manuellen Fähigkeiten des Untersuchers entstehen, im angebrachten Rahmen verblieben.

## 2.4 Veraschung

Zur Bestimmung des Anteils an organischer und anorganischer Knochensubstanz der Femora der Ratten wurde durch Veraschung ein Glührückstand erzeugt. Zunächst wurde ein hitzebeständiger Porzellantiegel, der später zur Veraschung genutzt werden sollte, analytisch gewogen. Das Ergebnis wurde als Tara bezeichnet. Dann wurde das entsprechende Femur in diesem Porzellantiegel analytisch gewogen. Von dem hierbei erhobenen Ergebnis, der Gesamtmasse, wurde in der Folge die Tara subtrahiert. So wurde die Masse m vor der Veraschung bestimmt. Nun wurde dieser Tiegel mitsamt dem Femur für 30 Minuten in einem auf 750 °C vorgeheizten Muffelofen platziert. Zum Abkühlen des Glührückstandes auf Raumtemperatur diente im Anschluss ein Exsikkator mit Kieselgel. Durch ein erneutes analytisches Wiegen des Tiegels mit dem Femur erhielt man nun die Gesamtmasse nach Veraschung. Hiervon wurde erneut die Tara abgezogen, so dass die Masse m nach Veraschung bestimmt werden konnte (Tezval et al. 2010; Fürst 2014).

Für die Bestimmung des Anteils organischer Substanzen galt die folgende Formel:

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

Zur Bestimmung des Anteils anorganischer Substanz:

% anorganische Substanz = 100 - % organische Substanz

## 2.5 Statistik

Zur Auswertung der Versuchsdaten wurde das Programm Graphpad Prism (Version 4, GraphPad Software, San Diego, USA) genutzt. Alle gewonnenen Daten wurden zunächst zwischen den einzelnen Versuchsgruppen mit Hilfe einer *one-way ANOVA* auf Signifikanzen verglichen und diese mit einem *Tukey-Kramer-post-hoc-Test* genauer bestätigt. Das Signifikanzniveau wurde hierbei auf p<0,05 festgelegt.

Die Konfidenzintervalle der Gruppen wurden immer als \*=p<0,05, \*\*=p<0,01, \*\*\*=p<0,001 und \*\*\*\*=p<0,0001 definiert und so in den Tabellen und Graphiken gekennzeichnet. Fehlt eine Markierung liegt keine Signifikanz vor (p>0,05). Im Weiteren wurden zur genaueren Veranschaulichung in den Tabellen die Mittelwerte mit der Standardabweichung (SD) angegeben. Die Graphen zeigen die Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

## Ergebnisse

## 3 Ergebnisse

Nach Versuchsbeginn verstarb eine Ratte an der Narkose. Für eine andere Studie wurde in der Folge nach acht Wochen eine erneute Operation durchgeführt. Hierbei erfolgte eine Osteotomie der Tibia mit anschließender Plattenosteosynthese im Bereich der Metaphyse. Auch hier verstarben drei Tiere bei der Anästhesie. Im weiteren Verlauf verstarben zwei Tiere wegen postoperativer Komplikationen. Nachdem später ein Tier auf Grund einer Erkrankung getötet werden musste, blieb für die späteren Untersuchungen ein Versuchskontingent von 83 Tieren. Hierbei hatte die SHAM-Gruppe noch 13 Tiere und die übrigen Gruppen 14 Tiere für die Untersuchungen.



**Abbildung 9: Auswertung der Tiergewichte bei Versuchsbeginn (A) und bei Versuchsende (B).** Keine signifikanten Unterschiede bei Versuchsbeginn. Signifikante Unterschiede der SHAM-Gruppe zu allen ovarektomierten und therapierten Gruppen (p<0,0001)

## 3.1 Gewicht der Versuchstiere und Uteri

Am Tag der Ovarektomie wogen die 90 Ratten im Durchschnitt 246,7 g (224-277,7 g). Das Körpergewicht (Bodyweight = BW) der Versuchstiere zeigte zu Versuchsbeginn keinen signifikanten Unterschied (p>0,05; Abbildung 9a). Im Versuchsverlauf kam es zu einer signifikanten Zunahme des BW bei den ovarektomierten Tieren im Vergleich zu den SHAM-Tieren (p<0,05, Abbildung 9b). Im Mittel war das Gewicht der ovarektomierten Tiere bei 341,1 g ( $\pm$  23 g), während das Gewicht der SHAM-Gruppe 278,9 g ( $\pm$  9,4 g) signifikant niedriger war. Alle WBV-Tiere zeigten ebenfalls einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur SHAM-Gruppe. Der Vergleich des Gewichtsverlaufes zwischen therapierten und ovarektomierten Tieren zeigte keinen signifikanten Unterschied. Die einzelnen
Gewichtsverläufe zeigt Abbildung 10 und Tabelle 5. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls für die Auswertung der Arbeiten von Bösch (2016) und Fürst (2014) verwand.

Wo-												
che	SHA	М	OV	K	35-Hz-v		70-Hz-v		35-Hz-h		70-Hz-h	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean SD		Mean	SD	Mean	SD
Beginn	250,27	13,5	247,06	13,6	249,08	11,8	246,37	11,1	243	13	244,2	10,5
1	253,27	7,59	262,2	11,9	262,73	7,69	258,6	9,01	257,07	9,47	255,8	5,41
2	257,67	10,4	296,13	11,7	298,93	10,4	290,87	11,1	291,71	9,79	284,27	9,27
3	264,13	10,9	323	13,5	326	12,9	317,4	12,2	321,86	11,3	313,47	12,6
4	265,2	14,4	334,4	15,7	334,27	13,5	329,3	15,5	333,71	14,1	329,47	14,1
5	262,47	9,96	339,4	14,4	341,67	14,6	333,3	14,5	339,64	15,4	334,13	12,3
6	270,93	12,6	346,8	16,3	349,8	14,9	341,93	18,7	348,36	16,9	340,13	13,6
7	272,67	9,59	352,87	16,6	355,33	16,1	345,33	18,9	354,21	17,1	344,53	15,2
8	275,21	10,7	353,13	18,8	354,21	16,5	347	17,8	351,86	16,2	342,53	14,4
9	267,43	18	335,86	16,9	336,71	23,5	326,43	13,9	336,36	15,8	325,57	16,1
10	265,23	12,5	325,71	18,3	324,79	19,7	309,07	13,5	320,71	17	311,86	15,1
11	272,77	11,5	321,14	29,7	329,5	21,2	310,57	18,8	326	18,6	312,64	15,6
12	277,62	9,22	335,93	21,9	334,93	20	320,64	16,7	337,93	22,4	318,79	17,6
13	278,93	9,44	341,07	23,4	340,86	20,4	327,79	16,6	337,5	22,5	327,43	19,8

#### **Tabelle 5: Tiergewichte im Versuchsverlauf**



Abbildung 10: Tiergewichte im Versuchsverlauf

Das Uterusgewicht der gesamten ovarektomierten Tiere war signifikant niedriger als das der SHAM-Gruppe (p<0,0001, Abbildung 11) (Fürst 2014; Bösch 2016). Die Durchschnittsgewichte sind in Tabelle 6 aufgeführt. Hierbei zeigt sich ein mittleres Uterusgewicht von 627 g ( $\pm$  166 g) in der SHAM-Gruppe mit der größten Gewichtsabnahme auf 120 g ( $\pm$  22 g) in der horizontal mit 70 Hertz behandelten Gruppe.



**Abbildung 11: Auswertung des Gewichtes der Uteri.** Nach Ovarektomie zeigt sich eine signifikante Abnahme des Uterusgewichtes im Vergleich aller Gruppen zur SHAM-Gruppe (\*\*\*\* = p<0,0001)

							70-Hz-verti-		35-Hz-horizon-		70-Hz-hori-	
Parameter	SHAM		Ονχ		35-Hz-vertikal		kal		tal		zontal	
	Mean SD		Mean	SD	Mean SD		Mean SD		Mean	SD	Mean	SD
Gewicht												
Körpergewicht												
initial (g)	250	13	247	14	249	12	246	11	243	13	244	10
Körpergewicht												
final (g)	279	9	341 <sup>a****</sup>	23	341 <sup>a****</sup>	2	328 <sup>a****</sup>	17	338 <sup>a****</sup>	23	327 <sup>a****</sup>	20
Uterusgewicht												
(mg)	627	166	121 <sup>a****</sup>	19	132 <sup>a****</sup>	55	126 <sup>a****</sup>	41	125 <sup>a****</sup>	25	120 <sup>a****</sup>	22

Tabelle 6: Durchschnittsgewichte der Versuchstiere und Uteri

Legende: a signifikant gegenüber SHAM (\*\*\*\* p<0,0001) (Fürst 2014; Bösch 2016)

## 3.2 Auswertung des Bruchtestes

Im Rahmen des zuvor beschriebenen Bruchtestes wurden sowohl die  $F_{max}$  der Femora, sowie die Steifigkeit anhand der Steigung der Bruchkurve bestimmt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt Tabelle 7.

## 3.2.1 Maximalkraft F<sub>max</sub>

Die Maximalkraft war bei den SHAM-Tieren im Vergleich zu den ovarektomierten und therapierten Gruppen nicht signifikant (Abbildung 12). Wird  $F_{max}$  in das Verhältnis zum Körpergewicht der Tiere gesetzt, ergibt sich eine signifikante Abnahme der  $F_{max}$  bis zum Bruch in allen mit der SHAM-Gruppe verglichenen Gruppen (35-Hz-v + 70-Hz-h p<0,05; OVX + 70-Hz-v p<0,01; 35-Hz-h p<0,001). Im Vergleich der ovarektomierten zu den vibrierten Tieren zeigten sich keine Signifikanzen (Abbildung 13).



Abbildung 12: Auswertung der Maximalkraft  $F_{max}$ . Im Bruchtest zeigt sich für die bestimmte  $F_{max}$  keine signifikante Zunahme im Vergleich der vier Gruppen mit WBV zu der ovarektomierten Gruppe (p>0,05).



**Abbildung 13: Auswertung der Maximalkraft F**<sub>max</sub> in Bezug zum Gewicht der Tiere. Es zeigt sich eine signifikant höhere  $F_{max}$  für die SHAM-Gruppe im Vergleich zur ovarektomierten und zu allen WBV-Gruppen (N/g =Newton/Gramm; \* p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,001)

### 3.2.2 Steifigkeit

In der Auswertung der Steifigkeit wurde die Kraft in Newton pro 1 mm Weg in Bezug gesetzt. Während die Steifigkeit im Vergleich SHAM- zu OVX-Gruppe von 241,5 N/mm (± 61,6 N/mm) auf 231,2 N/mm (± 66,8 N/mm) abnahm, zeigte sich eine Zunahme der Steifigkeit in den mit 35 Hertz vertikal und horizontal und mit 70 Hertz horizontal behandelten Gruppen. Der Größte Anstieg war hier in der Gruppe mit 35 Hertz vertikal auf 255,1 N/mm (± 64,7 N/mm). Es zeigten sich im Vergleich aller Gruppen jedoch keine statistischen Signifikanzen (Abbildung 14). Auch nachdem die Steifigkeit der Knochen in Bezug zum Gewicht der Tiere gesetzt wurde, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 15).



Abbildung 14: Auswertung der Steifigkeit. Im Vergleich der SHAM-Gruppe zur ovarektomierten Gruppe zeigt sich eine Abnahme der Steifigkeit. In den beiden 70 Hertz Gruppen und der 35 Hertz vertikal behandelten Gruppe zeigen sich Zunahmen der Steifigkeit, jedoch ohne Signifikanz (p>0,05). Die Steifigkeit der Gruppe mit horizontaler Vibration bei 35 Hertz zeigte eine nicht signifikante Abnahme im Vergleich zur ovarektomierten Gruppe



**Abbildung 15: Auswertung der Steifigkeit in Korrelation zum Gewicht.** Auch nach Bezugnahme der Steifigkeit zum Gewicht der Tiere zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (p>0,05) (N x g/mm = Newton x Gramm / Millimeter)

Tabelle 7: Durschnittswerte des Bruchteste	S
--	---

							70-Hz-verti-		70-Hz-verti-		70-Hz-verti-		35-Hz-hori-		70-Hz-hori-	
Parameter	SHAM		Ονχ		35-Hz-vertikal		kal		zontal		zontal					
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD				
Bruchtest																
F <sub>max</sub> (N)	165	37,7	158,6	22,4	165,2	35,3	149,4	15,4	151,4	23,8	156,4	15,6				
Steifigkeit (N/mm)	241,5	61,6	231,2	66,8	255,1	64,7	233,4	41,4	225	34,5	238,3	53,7				

## 3.3 Auswertung der Mikroradiographie

## 3.3.1 Trabekelfläche

Bei der Trabekelfläche zeigte sich keine signifikante Änderung im Vergleich aller sechs Gruppen untereinander. Hierbei beträgt die durchschnittliche Trabekelfläche in der SHAM-Guppe 5,17 mm<sup>2</sup> (± 0,6 mm<sup>2</sup>). Sowohl die OVX-Gruppe mit 5,56 mm<sup>2</sup> (± 0,91 mm<sup>2</sup>) als auch die mit WBV behandelten Gruppen zeigten eine Zunahme der Trabekelfläche unter Signifikanzniveau. Den höchsten Wert mit 5,85 mm<sup>2</sup> (± 0,69 mm<sup>2</sup>) erreichte hierbei die mit 70 Hertz horizontal behandelte Gruppe. Ein Unterschied zwischen den therapierten Gruppen im Vergleich zur ovarektomierten Gruppe bzw. der 35 Hertz Gruppen zu den 70 Hertz Gruppen zeigt sich nicht (Abbildung 16).



Abbildung 16: Auswertung der Fläche des Trabekelbereiches. Keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der ovarektomierten Gruppe zu der SHAM-Gruppe und zu den mit WBV behandelten Gruppen. Ebenfalls keine Signifikanz im Vergleich aller mit WBV therapierten Gruppen zur SHAM-Gruppe

## 3.3.2 Mittlere Trabekeldicke

Die Trabekeldicke zeigte sich im Vergleich der ovarektomierten zur SHAM-Gruppe nicht signifikant gemindert (Abbildung 17). Im Durchschnitt zeigt hierbei die SHAM-Gruppe einen Wert von 5,05  $\mu$ m (±0,61  $\mu$ m), während eine Abnahme des Wertes der ovarektomierten Gruppe auf 4,59  $\mu$ m (±0,58  $\mu$ m) festzustellen ist. Drei Gruppen mit WBV zeigten im Vergleich zur OVX-Gruppe eine signifikante Zunahme der Trabekeldicke. Bei horizontaler WBV mit 70 Hertz lag ein Wert von 5,53  $\mu$ m (±0,62  $\mu$ m) (p<0,001) vor. Die Gruppe mit

horizontaler WBV bei 35 Hertz zeigte einen Wert von 5,32  $\mu$ m (±0,66  $\mu$ m) (p<0,05). Die größte Signifikanz bestand bei vertikaler WBV mit 70 Hertz mit einem Wert von 5,65  $\mu$ m (±0,62  $\mu$ m) (p<0,001). Die Therapie mit vertikaler WBV bei 35 Hertz erbrachte lediglich eine tendenzielle Zunahme.



**Abbildung 17: Auswertung der mittleren Trabekeldicke.** Durch die WBV kam es zu einer signifikanten Zunahme der mittleren Trabekeldicke bei der Gruppe mit vertikaler WBV mit 70 Hertz (p<0.001), sowie bei den Gruppe mit 35 Hertz (p<0.05) und 70 Hertz horizontaler WBV (p<0.01) im Vergleich zu den ovarektomierten Tieren.

### 3.3.3 Dichte der Trabekelkreuzungen

Die Dichte der Trabekelkreuzungen wurde in Anzahl Kreuzungen pro mm<sup>2</sup> bestimmt (Abbildung 18). Die höchste Dichte wurde mit 17,8 ( $\pm$ 3,27) pro mm<sup>2</sup> in der SHAM-Gruppe gemessen. Nach Ovarektomie kam es zu einem signifikanten Abfall auf 7,94 ( $\pm$ 2,04) pro mm<sup>2</sup> (p<0,0001). Im Vergleich zur SHAM-Gruppe wurde bei allen ovarektomierten Tieren (sowohl therapiert als auch nicht therapiert) eine deutlich statistisch signifikante Abnahme der Dichte der Trabekelkreuzungen beobachtet. Von diesen Werten ausgehend zeigt der Vergleich zwischen der ovarektomierten und der horizontal mit 70Hertz behandelten Gruppe eine signifikante Zunahme der Dichte der Trabekelkreuzungen (p<0,05) von 7,94 ( $\pm$ 2,04) pro mm<sup>2</sup> auf 10,9 ( $\pm$ 2,28) pro mm<sup>2</sup>.



**Abbildung 18: Auswertung der Dichte der Trabekelkreuzungen.** Nach Ovarektomie kommt es zu einem signifikanten Abfall der Dichte der Trabekelkreuzungen im Vergleich aller Gruppen zur SHAM-Gruppe (p<0,0001). Unter WBV kommt es zu einer Zunahme der Dichte in allen Gruppen. Die mit 70 Hertz horizontal therapierte Gruppe erreicht hierbei Signifikanzniveau (p<0,05).

### 3.3.4 Trabekelkreuzungen absolut

Die Trabekelkreuzungen wurden als Absolutwert bestimmt (Abbildung 19). Die SHAM-Gruppe zeigt einen Wert von 91 ( $\pm$ 12,8). Im Vergleich zu allen weiteren Gruppen konnte auf Grund der durchgeführten Ovarektomie eine signifikante Minderung der Absolutzahl der Trabekelkreuzungen nachgewiesen werden (p<0,0001). Hierbei war die Anzahl der Trabekelkreuzungen in der lediglich ovarektomierten Gruppe auf 43,9 ( $\pm$ 11,2) gemindert. Nach der WBV zeigte sich, wie zuvor bei der Dichte der Trabekelkreuzungen, eine Zunahme in allen Gruppen. Signifikanzniveau konnte auch hier mit 64,1 ( $\pm$ 16,1) in der mit 70 Hertz horizontal behandelten Gruppe gezeigt werden. (p<0,05).



**Abbildung 19: Absolute Anzahl der Trabekelkreuzungen**. Nach Ovarektomie kommt es zu einem signifikanten Abfall der Absolutzahl der Trabekelkreuzungen im Vergleich aller Gruppen zur SHAM-Gruppe (p<0,0001). Unter WBV kommt es zu einer Zunahme der Dichte in allen Gruppen. Die horizontal mit 70 Hertz therapierte Gruppe erreicht hierbei Signifikanzniveau (p<0,05).

### 3.3.5 Knochendichte im Trabekelbereich

Die Knochendichte im Trabekelbereich wurde in % bestimmt (Abbildung 20). Es zeigte sich ausgehend von einem Wert von 53,29 % (±8,3 %) in der SHAM-Gruppe eine signifikante Abnahme der Knochendichte im Trabekelbereich der ovarektomierten Gruppe auf 32,28 % (±5,22 %) (p<0,0001). Die vertikal mit 35 Hertz behandelte Gruppe zeigte eine Abnahme auf gleichem Signifikanzniveau (p<0,0001). Auch die horizontal mit 35 Hertz (p<0,001) und die vertikal mit 70 Hertz behandelten Gruppen (p<0,05) zeigten gegenüber der SHAM-Gruppe eine geminderte Knochendichte, diese jedoch mit 39,55 % (±9,3 %) für die horizontal mit 35 Hertz und 43,32 % (±7,24 %) für die vertikal mit 70 Hertz behandelte Gruppe bereits geringer ausgeprägt. Die horizontal mit 70 Hertz therapierte Gruppe zeigte mit 45 % (±7,44 %) keinen signifikanten Unterschied zur SHAM-Gruppe. Beide mit 70 Hertz behandelten Gruppen zeigten im Vergleich zur ovarektomierten Gruppe einen signifikanten Anstieg der Knochendichte. Hier kam es bei der vertikal mit 70 Hertz behandelten Gruppe zu einem signifikanten Anstieg auf 43,32 % (±7,24 %) (p<0,01) und bei der horizontal mit 70 Hertz therapierten Gruppen auf 45% (±7,44 %) (p<0,0001) ausgehend von 32,28 % (±5,22 %) in der rein ovarektomierten Gruppe.



Abbildung 20: Auswertung der Knochendichte im Trabekelbereich. Nach Ovarektomie kommt es zu einem signifikanten Abfall der Knochendichte im Trabekelbereich, der sich auf gleichem Signifikanzniveau in der 35-Hz-vertikalen Gruppe zeigt (p<0,0001). Dieser Abfall zeigt sich auch in der 35-Hz-horizontal Gruppe, jedoch leicht gemindert (p<0,001). Der positive Effekt der WBV zeigt sich in den mit 70 Hertz behandelten Gruppen. Die vertikal mit 70 Hertz therapierte Gruppe zeigt lediglich eine gering verbliebene Minderung der Knochendichte (p<0,05) im Vergleich zur SHAM-Gruppe bei einer signifikanten Zunahme im Vergleich zur ovarektomierten Gruppe (p<0,01). Bei der horizontal mit 70 Hertz behandelten Gruppe zeigt sich keine signifikante Abnahme im Vergleich zur SHAM-Gruppe bei deutlich signifikanter Zunahme im Vergleich zur ovarektomierten Gruppe (p<0,001).

### 3.3.6 Knochendichte Kortikalis medial

Die Knochendichte der medialen Kortikalis der Femora wurde in % bestimmt (Abbildung 21). Ausgehend von einem Wert der SHAM-Gruppe von 94,63 % (±1,47 %) zeigten sich im Vergleich der einzelnen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 21: Auswertung Knochendichte der medialen Kortikalis.** Keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der medialen Kortikalis der einzelnen Gruppen (p>0,05).

Parameter	SHA	M	Ovx		35-Hz-vei	35-Hz-vertikal		tikal	35-Hz-hor	izontal	70-Hz-horizontal	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Mikroradi-												
ographie												
Fläche												
Trabekel-												
bereich												
(mm²)	5,17	0,6	5,56	0,91	5,63	0,76	5,53	0,84	5,67	0,7	5,85	0,69
Mittlere												
Trabekel-												
dicke (µm)	5,05	0,61	4,59	0,58	5,06	0,72	5,65 <sup>b***</sup>	0,62	5,32 <sup>b*</sup>	0,66	5,53 <sup>b**</sup>	0,62
Dichte												
Trabekel-												
kreuzun-												
gen (pro												
mm²)	17,8	3,27	7,94ª****	2,04	8,91 <sup>a****</sup>	1,98	9,97 <sup>a****</sup>	2,27	9,06 <sup>a****</sup>	2,85	10,9 <sup>a****b*</sup>	2,28
Trabekel-												
kreuzun-												
gen abso-							****		****		****	
lut	91	12,8	43,9****	11,2	49,8ª****	11,6	54,1ª****	10,9	50,9 <sup>a</sup>	16,9	64,1 <sup>a****b*</sup>	16,1
Knochen-												
dichte Ira-												
bekelbe-	52.20	0.2	22 20:****	F 22	<b>77</b> ****	7.00	40 00-*h**	7.24		0.2	a = b * * *	7 4 4
reich (%)	53,29	8,3	32,28	5,22	3/4	7,66	43,32	7,24	39,55	9,3	45 <sup>0</sup>	7,44
Knochen-												
dichte												
KORTIKALIS	04.62	1 47	02 72	4.42	02.07	2 05	05.01	2.20	04.09	1 70	04 77	1.05
medial (%)	94,63	1,47	92,72	4,43	93,07	3,85	95,01	2,38	94,98	1,78	94,77	1,05

### Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der Histomorphometrie

Legende: a Signifikant gegenüber SHAM, b Signifikant gegenüber Ovx (\* p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001)

## 3.4 Auswertung der Veraschung

Im Rahmen der Veraschung wurde die organische Masse und nach der Veraschung die anorganische Masse bestimmt.

## 3.4.1 Masse Organisch

Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der organischen Masse von 471 mg (±31,7 mg) auf 521 mg (±49,4 mg) im Vergleich der SHAM-Tiere zu der ovarektomierten Gruppe (p<0,01) entsprechend einem Anstieg von 55,5 % (±1,6 %) auf 58,7 % (±2,4 %). Eine signifikante Zunahme auf 500,1 mg (±50,9 mg) (58,4 % (±3,0 %)) im Vergleich zur SHAM-Gruppe zeigt sich ebenfalls in der mit 35 Hertz horizontal behandelten Gruppe (p<0,05). Diese Zunahme war in den anderen therapierten Gruppen nicht mehr signifikant (Abbildung 22).



Abbildung 22: Auswertung der organischen Masse. Durch die Ovarektomie kam es zu einer signifikanten Zunahme der organischen Masse im Vergleich zur SHAM-Gruppe (p<0,01). Diese Zunahme zeigt auch die mit 35 Hertz horizontal behandelte Gruppe (p<0,05). Die übrigen Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede.

### 3.4.2 Masse Anorganisch

Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der anorganischen Masse von 376,7 mg (±16,9 mg) auf 364,2 mg (±27,3 mg) im Vergleich der SHAM- zu der ovarektomierten Gruppe (p<0,01) entsprechend einem Abfall von 44,5 % (±1,5 %) auf 41,2 % (±2,3 %). Eine signifikante Abnahme auf 356,6 mg (±15,7 mg) (41,7 % (±2,9 %)) im Vergleich zur SHAM-Gruppe zeigt sich ebenfalls in der mit 35 Hertz horizontal behandelten Gruppe (p<0,05). Diese Abnahme war in den anderen therapierten Gruppen nicht mehr signifikant (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Auswertung der anorganischen Masse.** Durch die Ovarektomie kam es zu einer signifikanten Abnahme der anorganischen Masse im Vergleich zur SHAM-Gruppe (p<0,01). Diese Abnahme zeigt auch die mit 35 Hertz horizontal behandelte Gruppe (p<0,05). Die übrigen Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede.

					35-Hz-verti-		70-Hz-verti-		35-Hz-hori-		70-Hz- hori-	
Parameter	SHAM		Ovx		kal		kal		zontal		zontal	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Veraschung												
Masse orga-												
nisch (mg)	471	31,7	521 <sup>a**</sup>	49,4	499,5	27,4	473,5	50,4	500,1 <sup>ª*</sup>	50,9	485	42,3
Masse orga-												
nisch (%)	55,5	1,6	58,7 <sup>a**</sup>	2,4	57,2	2,4	57,6	1,8	58,4 <sup>a*</sup>	3,0	57,2	2,1
Masse anorga-												
nisch (mg)	376,7	16,9	364,2 <sup>ª**</sup>	27,3	371,3	31,8	349,5	34,8	356,6ª*	15,7	357,3	22,3
Masse anorga-												
nisch (%)	44,5	1,5	41,2 <sup>a**</sup>	2,3	42,6	2,4	42,5	1,8	41,7 <sup>a*</sup>	2,9	42,5	2,3

Tabelle 9: Durchschnittswerte der Veraschung

Legende: a signifikant gegenüber SHAM (\* p<0,05, \*\* p<0,01)

## 3.5 Auswertung der Serummarker

Nach der Dekapitation wurden den Versuchstieren Blutproben entnommen und aus diesen die alkalische Phosphatase und das Osteocalcin bestimmt. Ausgehend von einem ALP-Wert von 69,2 U/L (±12,1 U/L) in der SHAM-Gruppe war bei allen Gruppen nach Ovarektomie und WBV der Wert erhöht. Dies war bis auf die vertikal mit 70 Hertz therapierte Gruppe in allen Fällen signifikant (p<0,05). Das OC war in allen ovarektomierten Gruppen verglichen mit der SHAM-Gruppe nicht verändert (Tabelle 10).

Parameter	SHAM		Ονχ		35-Hz-verti- kal		70-Hz-verti- kal		35-Hz-hori- zontal		70-Hz-horizon- tal	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Serum												
Alp (U/L)	69,2	12,1	84,3 <sup>a</sup> *	13,9	87,1 <sup>ª*</sup>	16,7	81,7	13,2	86,7ª*	17,4	86,6ª*	16,5
Oc (µg/L)	16,7	2,7	21,4	4,3	19,3	3,3	18,3	4,1	17	3,8	17,3	4,1

Tabelle 10: Durchschnittswerte der Serummarker

Legende: a signifikant gegenüber SHAM (\*p<0,05)

Auf Grund der ausgeprägten akuten und langfristigen Folgen der Osteoporose ist in den letzten Jahren parallel zu medikamentösen Behandlungsoptionen auch das Interesse an einer nichtpharmakologischen Therapie zunehmend gestiegen (Mundy 2001; Liu et al. 2008; Fratini et al. 2016). Für diese Arbeit wurde das etablierte Rattenmodell genutzt, da sich die Prozesse der Osteoporose bei der postmenopausalen Frau und die Auswirkungen ihrer Therapie nachstellen lassen (Kalu 1991; Inada et al. 2011; Bonucci und Ballanti 2014). Mit Hilfe dieses Modells konnten vorhergehende Studien zeigen, dass die WBV mit hoher Frequenz und niedriger Belastung osteoanabol wirkt (Rubin et al. 2002; Judex et al. 2007; Aleyaasin und Harrigan 2008; Leung et al. 2009). In diesen Arbeiten wurden jedoch uneinheitliche Frequenzen verwand bzw. andere Körperregionen untersucht (u. a. die Tibia). In den genannten Arbeiten bzw. der uns bekannten Literatur wurde zudem nur einmal pro Tag therapiert. Wir wählten daher in unserer Versuchsreihe die WBV mit niedriger Belastung, sprich einer Beschleunigung von 0,15 – 0,48 g (Komrakova et al. 2017), und hoher Frequenz. In Anlehnung an die Vorarbeiten unserer Gruppe wurden die Schwingfrequenzen mit 35 Hertz und 70 Hertz bei einer Amplitude von 0,47 mm mit den vermuteten besten Wirkungen gewählt. Die Applikation erfolgte jeweils in einer Versuchsgruppe horizontal und in einer vertikal. Hierbei wurde zum ersten Mal zweimal täglich die WBV durchgeführt und somit im Vergleich zu unseren Vorversuchen gesteigert (Komrakova et al. 2013). Für die Analyse der Auswirkung der WBV auf den Knochen wurde die Trochanterregion des proximalen Rattenfemur genutzt. Neben der lumbalen Wirbelsäule findet die Ausprägung der Osteoporose im Bereich des proximalen Femurs beim Menschen am stärksten statt (Bagi et al. 1997a). Hüftgelenksnahe Frakturen des Femurs (Schenkelhals- und Trochanterregion) sind die zweithäufigsten osteoporosebedingten Brüche bei Menschen. Vorrangehende Studien analysierten bereits die Wirbelsäule (Holguin et al. 2011; Wehrle et al. 2014) und die proximale Tibia (Judex et al. 2007). Diese Knochenareale weisen einen hohen Spongiosaanteil auf. Die Trochanterregion des Femurs bietet den Vorteil der simultanen Betrachtung von kortikalem und spongiösem Knochen in einem Präparat. Des Weiteren setzen im Bereich der Trochanteren Muskeln an, was das proximale Femur für die WBV prädestiniert (Bagi et al. 1997a). Die Anwendbarkeit des zuvor beschriebenen Rattenmodells, insbesondere im Bereich des Femurs, beschrieb u. a. die Gruppe um Bagi et al. (1997a; 1997b). Sie zeigten aber, dass sich das grundsätzliche Verhältnis von spongiösem und kortikalem Knochen im Vergleich zum

Menschen deutlich verändert. Genauer beträgt der Anteil des kortikalen Knochens im proximalen Femur bei Menschen ca. 12,5 %, wobei dieser bei der Ratte ca. 72,5 % beträgt. Jedoch greifen die grundsätzlichen Mechanismen der Osteoporose auch im Bereich des proximalen Femurs. Es gilt daher zu berücksichtigen, dass die erhobenen Ergebnisse nicht direkt übertragen, sondern gegebenenfalls angepasst werden müssen. Bagi et al. (1997a; 1997b) beschrieben im Weiteren, dass das Femur mindestens gleichwertig, wenn nicht überlegen im Hinblick auf die anatomischen Gegebenheiten im Vergleich zu anderen Körperregionen ist.

## 4.1 Analyse des Körper- und Uterusgewichts

Das Körpergewicht stieg auf Grund des normalen Wachstums in allen Gruppen während des Versuches an. Nach Ovarektomie zeigte sich durch die typischen Veränderungen des Metabolismus ein signifikanter Gewichtsunterschied aller ovarektomierten Gruppen im Vergleich zur SHAM-Gruppe. Dies wurde u. a. von Kalu et al. (1991) beschrieben. Nach ca. acht Wochen kam es zu einem Abfall des Gewichts und im Anschluss daran zu einem erneuten Anstieg. Dies ist auf die durchgeführte Operation im Sinne einer Osteotomie der Tibia in der achten Woche zurückzuführen. Nach dem Eingriff kommt es bei den Tieren zu einer verminderten Futteraufnahme. Im Verlauf erholen sie sich hiervon und die Gewichtszunahme beginnt wieder. Dies wurde auch schon in Vorversuchen beschrieben (Thompson et al. 1995; Komrakova et al. 2017). Im Weiteren wurde nach Versuchsende das Nassgewicht der Uteri bestimmt. Hier zeigte sich eine signifikante Minderung des Gewichts aller Gruppen gegenüber der SHAM-Gruppe. Das Fehlen des Östrogens führt zu einer Atrophie der Uteri, so dass diese Ergebnisse die Intaktheit (Validität) des Modells zeigen (Kaufmann et al. 2006).

### 4.2 Analyse des Bruchtestes

Unser Versuch konnte bei Maximalkraft und Steifigkeit keine Verbesserungen durch Vibration gegenüber nicht therapierten ovarektomierten Ratten zeigen. Da sich, wie zuvor beim Körpergewicht beschrieben, das Wachstum, Körpergewicht und die Größe der Knochen zwischen ovarektomierten und SHAM-Tieren unterscheidet, setzten wir zur genaueren Bestimmung die erhobenen Ergebnisse auch in Bezug zum Gewicht der Tiere, um

einen individuellen Wert für jedes Tier zu bestimmen. Dies ist notwendig, da die Stabilität der Knochen durch Volumen und Konstitution beeinflusst wird. So ist davon auszugehen, dass größere Femora bei größeren Tieren primär stabiler sind als bei kleineren Vergleichstieren (Ruyssen-Witrand et al. 2007) und zur Vergleichbarkeit der Tiere der Bezug zum Gewicht der Ratten notwendig ist. Die Ergebnisse zeigen signifikant, dass die F<sub>max</sub> und Steifigkeit bei ovarektomierten Tieren abnimmt, jedoch liegen auch hier nur Tendenzen bzgl. einer Besserung nach Vibration vor. Diese Ergebnisse zeigen somit Hinweise auf eine Verbesserung der Stabilität bzw. Steifigkeit durch die Vibration, die sich mit den Ergebnissen der Gruppe um Leung et al. (2009) decken. Hier wurden die Ratten bei 35 Hertz und 0,3 g 20 Minuten pro Tag für fünf Tage pro Woche über einen Zeitraum von vier Wochen therapiert. Es zeigte sich im Bruchtest der Femora eine Zunahme der Maximalkraft um 50 % und der Steifigkeit um 67 % im Vergleich der therapierten Gruppe zur nicht vibrierten Gruppe. Untersucht wurde hier im Gegensatz zu unserer Arbeit eine Femurschaftfraktur (Leung et al. 2009). Der Schaft des Femurs enthält jedoch anders als das proximale Femur keine Spongiosa und zeigt somit andere biomechanische Eigenschaften. Hoffmann et al. (2016, 2017) zeigten keine signifikanten Effekte der WBV bei den von uns verwendeten Frequenzen mit gleichem Versuchsaufbau und Versuchstieren. Allerdings wurde hier die Therapie noch um eine Parathormon-, Östrogen- bzw. 8-Prenylnaringeningabe ergänzt und mit zehn Wochen war die Versuchsdauer doppelt so lang. Es wurde jedoch nur einmal pro Tag therapiert, so dass die Erhöhung der täglichen Behandlungen in unserer Gruppe die Tendenzen unserer Ergebnisse erklären kann. Widersprüchlich zu den aus unserer Versuchsgruppe zuvor erhobenen Ergebnisse ist, dass in unserem Versuch die größte Tendenz bei den mit 35 Hertz behandelten Tieren, insbesondere bei vertikaler Vibration lag. Sehmisch et al. (2009) und Tezval et al. (2011) zeigten zuvor, dass bei vertikaler WBV mit 90 Hertz eine Zunahme der F<sub>max</sub> und Steifigkeit im Vergleich zur nicht vibrierten ovarektomierten Gruppe auftrat. In diesen Versuchen wurde eine Subgruppe einmal täglich bei 90 Hertz therapiert, während die andere Gruppe ovarektomiert aber nicht therapiert wurde. Es konnte hier gezeigt werden, dass die WBV mit hoher Frequenz und wenig Belastung sowohl bei ovarektomierten als auch bei SHAM-operierten Ratten einen positiven Effekt hatte (Tezval et al. 2011). Sehmisch et al. (2009) erforschten die vermehrte Bruchfestigkeit und Steifigkeit an der Wirbelsäule. Hier liegt auch bei der Ratte ein deutliches Überwiegen der Spongiosa gegenüber dem kortikalen Knochen vor (Kalu 1991). Des Weiteren leiden osteoporotische Ratten im Vergleich zum Menschen nicht an Brüchen (Kalu 1991). Dies scheint an dem ausgeprägten kortikalen Knochen zu

liegen. Bagi et al. (1997a) zeigten, dass im Bereich des proximalen Femurs der Ratte 75 % des Knochens aus Kompakta besteht. Wie die Gruppe um Rubin et al. (2002) an Schafen und wir in unseren Ergebnissen zeigen konnten, wird jedoch die Kompakta kaum bzw. eher bei niedrigen Frequenzen durch Vibration beeinflusst, so dass sich womöglich hiermit die fehlenden Unterschiede für die F<sub>max</sub> und die Steifigkeit erklären lassen, bzw. warum die marginalen Unterschiede durch die alleinige Vibration und deren Benefit auf den spongiösen Knochen nicht zu einer signifikanten Änderung von F<sub>max</sub> und Steifigkeit im Bereich des proximalen Femurs führen. Diese Tatsache besteht, obwohl die Osteoporose an sich schnell und mit starker Ausprägung im Bereich des proximalen Femurs auftritt (Kalu et al. 1989; Chen et al. 2013). Da die Maximalkraft aber hauptsächlich durch den kortikalen Knochen bestimmt wird, sind die marginalen Unterschiede erklärbar, und die Steifigkeit wird so durch den allgemein geringen Prozentsatz spongiösen Knochen kaum beeinflusst. Ein anderer Grund kann die kurze Therapiezeit sein. Die vorangegangen Versuchsreihen therapierten mindestens 35 Tage (Sehmisch et al. 2009; Tezval et al. 2010). Die vertikale Vibration war im Hinblick auf eine Verbesserung der F<sub>max</sub> und der Steifigkeit die überlegene. In unserem Versuch wurden auch die Wirbelkörper im Rahmen einer weiteren Dissertation untersucht (Fürst 2014). Hier konnte im Bereich des Bruchtestes eine Verbesserung der F<sub>max</sub> in der vertikal mit 35 Hertz behandelten Gruppe gesehen werden, während die horizontal mit 70 Hertz therapierte Gruppe eine Verschlechterung zeigte. Dies wurde auf den verbesserten Einfluss der niedrigen Frequenzen auf den kortikalen Knochen zurückgeführt, welcher bei der Ratte für F<sub>max</sub> und die Steifigkeit maßgeblich scheint, wie auch schon zuvor beschrieben (Fürst 2014). Diese Vermutung deckt sich mit unseren Erkenntnissen und denen von Warden und Turner (2004). Diese Arbeit untersuchte den Einfluss der Mechanotransduktion an der Ulna von Mäusen mit 1, 5, 10, 20 und 30 Hz bei 1, 1,5, 1,6 und 2 N axialer Krafteinleitung. Es zeigte sich ein signifikanter Effekt auf den kortikalen Knochen mit steigenden Werten im Bereich von 5 – 10 Hz und einem Plateau des Benefits ab 10 Hz. Eine Therapie mit 1 Hz zeigte keinen Einfluss. Unabhängig von der Richtung, konnte durch den Bruchtest kein signifikanter Nachweis der Verbesserung durch WBV erbracht werden.

## 4.3 Analyse der Mikroradiographie

Wie bereits erwähnt hat das proximale Femur die Eigenschaft, dass auf engem Raum die spongiöse und die kortikale Knochenstruktur beurteilt werden können. Der Trabekelbereich, in mm<sup>2</sup> gemessen, ist der in diesem Teilversuch verwendete Messbereich. Hier

zeigen sich keine signifikanten Unterschiede, so dass die in diesem Bereich erhobenen Parameter miteinander vergleichbar sind und dies für die Messgenauigkeit spricht. Ebenfalls deckt sich dies mit den Daten von Kalu et al. (1991) und spiegelt somit den Verlauf der Osteoporose bei der postmenopausalen Frau wieder. Die Osteoporose führt nicht zu einer ausgeprägten Abnahme der Trabekelfläche und damit sind durch eine adäquate Therapie auch keine signifikanten Veränderungen dieser zu erwarten. Somit ist eine Konstanz der Parameter ein zu erwartendes Ergebnis. Ähnliches konnten die Gruppen um Kalu et al. (1991) und Ishihara et al. (1999) zeigen. Es zeigte sich in der weiteren Auswertung eine Abnahme der mittleren Trabekeldicke der ovarektomierten gegenüber der SHAM-Gruppe. Nach Vibration war sowohl bei den vertikal und horizontal mit 70 Hertz therapierten als auch bei den horizontal mit 35 Hertz behandelten Gruppen eine signifikante Zunahme der Trabekeldicke im Vergleich zur ovarektomierten Gruppe zu erkennen. Die vertikal mit 35 Hertz behandelte Gruppe wies lediglich gleichgerichtete Tendenzen auf. Ähnliches zeigte sich bei den weiter bestimmten Parametern der Knochendichte des Trabekelbereichs, der Anzahl der Trabekelkreuzungen und der Dichte der Trabekelkreuzungen. Jeweils mit besseren Ergebnissen für die bei 70 Hertz therapierten Gruppen. Dies konnten ebenfalls die Arbeiten von Sehmisch et al. (2009) und Tezval et al. (2011) aus der eigenen Arbeitsgruppe nachweisen. Diese Ergebnisse decken sich mit dem schon in der Einleitung beschriebenem Wolffschen Gesetz. Hiernach kommt es wie beschrieben durch eine entsprechende Belastung zu Umbauprozessen und Stärkung des Knochens. Die Belastung (Strain) darf einen gewissen Punkt nicht überschreiten, aber bis nah an diesen ist eine stetige Zunahme der Knochenstabilität zu erwarten (Frost 2000). So lässt sich erklären, dass eine größere Zunahme der Knochendichte im Vergleich der 35-Hertz- zu den 70-Hertz-Gruppen stattfindet. Judex et al. (2007) zeigten ebenfalls eine Zunahme der trabekulären Dicke und des Volumens bei den mit 90 Hertz vertikal vibrierten Ratten, während die mit 45 Hertz vertikal behandelte Gruppe ohne Effekt blieb. Dies wurde auf die hohe Anzahl an Zyklen pro Zeiteinheit und die damit verbundene Induktion eines anabolen Knochenstoffwechsels zurückgeführt. Das Fehlen eines signifikanten Effektes bei 45 Hertz zeigte ebenfalls die Studie von Runge et al. (2018). Hier wurde bei 45 Hertz die Amplitude zwischen 0,3 und 1,2 g variiert. Dies deckt sich ebenfalls mit den Daten von Xie et al. (2006a; 2006b), die bei adoleszenten Mäusen den gleichen Effekt nachweisen konnten und belegten, dass bei niedriger Belastung die Länge der Pausen zwischen den einzelnen Behandlungen keine signifikante Rolle spielt. In der Arbeitsgruppe um Pasqualini (2013) konnte im Vergleich 8 Hz, 52 Hz bzw. 90 Hz an männlichen Ratten gezeigt werden,

dass eine Zunahme des spongiösen Knochens bei 90 Hz stattfindet. Hier wurde im Kontrast zu den anderen Arbeiten sogar eine Abnahme bei den niedrigen Frequenzen von 8 Hz festgestellt. Die neuste Studie von Minematsu (2019) verglich bei männlichen Ratten Frequenzen von 15, 30, 45, 60 und 90 Hz mit einer Belastung von 0,5 g 15 Minuten pro Tag über fünf Tage pro Woche über acht Wochen. Hier zeigte sich entgegen den zuvor genannten Studien und unseren Daten eine Zunahme der trabekulären Dicke und Dichte im Bereich des proximalen Femurs bei der Gruppe mit 15 Hertz. In allen genannten Studien wurde die WBV in vertikaler Richtung durchgeführt. Unser Versuchsaufbau beinhaltete ebenfalls die horizontale WBV und zeigte in der Mikroradiographie die deutlich besseren Ergebnisse im Vergleich zur vertikalen WBV mit gleicher Frequenz. Dies steht im Kontrast zu der Arbeit von Komrakova et al. (2013), in der kein Effekt bei horizontaler im Vergleich zu vertikaler WBV gefunden wurde. Diese Arbeit untersuchte jedoch die Wirbelsäule. Des Weiteren zeigten Amling et al. (1996), Ritzel et al. (1997) und Chen et al. (2013), dass es möglicherweise im Rahmen der Osteoporose in unterschiedlichen Arealen des knöchernen Skeletts zu differenten Veränderungen kommt. Nicht alle Regionen sind mit gleicher Ausprägung von der Osteoporose betroffen (Chen et al. 2013). Ebenso konnten verschiedene Effekte von antiosteoporotischen Maßnahmen im Vergleich zwischen Femur und Wirbelsäule gezeigt werden (Kavuncu et al. 2003). Gegebenenfalls führen diese Mechanismen am Femur dazu, dass horizontale Vibration wirksamer ist. Eine eindeutige Erklärung hierfür findet sich in der Literatur bisher nicht. Zwei Theorien der Reaktion des Körpers auf WBV könnten dies begründen: Fritton et al. (2000) und Rubin et al. (2006) beschrieben als Hypothese, dass die Muskulatur aktiviert und zu einem Wachstumsreiz am Knochen führt. Eine andere Theorie ist, dass eine Subgruppe der Knochenzellen als Mechanosensoren fungiert und so aktiviert wird (Fritton et al. 2000; Rubin et al. 2006). Gegebenenfalls funktioniert dies bei horizontaler WBV besser und sollte in weiteren Studien untersucht werden. Der Vergleich mit der Literatur wird dadurch erschwert, dass im Bereich der WBV zwar viele Studien bestehen, jedoch das Studiendesign sehr heterogen und somit nicht standardisiert ist. In nahezu allen Studien differieren die Frequenzen, die Zeiten und die Belastung sowie der verwendete Knochen (Femur, Tibia, Wirbelkörper, etc.) (Slatkovska et al. 2010; Oliveira et al. 2016). Die Knochendichte der medialen Kortikalis zeigte keinen Unterschied zwischen SHAM- und OVX- bzw. den WBV-Gruppen, sowohl im Vergleich mit SHAM als auch OVX. Dies zeigt den verzögerten Einfluss der Osteoporose auf den kortikalen Knochen. Dieser hat eine deutlich kleinere Oberfläche im Vergleich zum spongiösen Knochen (auch die biologischen Umbauprozesse sind

unterschiedlich schnell). Hierdurch ist der Effekt des veränderten Knochenumbaus durch die Osteoporose wesentlich geringer und es kommt zu einem deutlich geringeren Substanzverlust. Man geht im Bereich des kortikalen Knochens von ca. zwei Prozent pro Jahr entgegen ca. zehn Prozent im spongiösen Bereich aus (Gallagher 1990; Chen et al. 2013). Folglich zeigt sich auch kein bzw. kaum Effekt der WBV auf den kortikalen Knochen. Die in diesem Versuchsaufbau für eine andere Arbeit erhobenen Daten im Bereich der Wirbelsäule wurden mittels Mikro-CT gewonnen. Dieses hat eine geringere Auflösung, ist aber für die Strukturen der Ratte geeignet. Die Ergebnisse konnten zeigen, dass es durch niedrige Frequenzen eher zur Stärkung des kortikalen Knochens kommt. Hier zeigten sich in der Mikroradiographie des Femurs keine Unterschiede. Tendenziell zeigte sich wie zuvor beim Bruchtest eine Verbesserung im Bereich der vertikal mit 35 Hertz behandelten Gruppe. Im Bereich des Femurs ergaben sich somit anders gerichtete Ergebnisse. Hier zeigten sich Tendenzen bzw. Signifikanzen für die höheren Frequenzen bzw. die horizontalen Vibrationsgruppen. Dies lässt sich durch die veränderte Biomechanik erklären, da die Wirbelsäule eher durch axiale Krafteinwirkung (Turner 2002) und die Femora durch Zug- und Druckkräfte beeinflusst werden (Bagi et al. 1997a). Im Weiteren zeigen Slatkovska et al. (2010) in einer Metaanalyse eine gering signifikante Zunahme der BMD bei postmenopausalen Frauen, Kindern und Adoleszenten vergleichbar mit der Supplementierung von Vitamin D und Calcium, während eine Verbesserung beim jungen Erwachsenen ausblieb. Diese Gruppe äußerte Hinweise, dass die WBV eine bessere Wirkung zeigt je schlechter die initiale BMD ist. Die Gruppe um Xie et al. (2016) zeigte dahingegen, ähnlich den Ermüdungsbrüchen, einen negativen Einfluss der langfristigen, chronischen WBV über vier Monate bei einmal täglicher Applikation. Somit konnten in der Mikroradiographie signifikante Verbesserungen durch die WBV gezeigt werden. Überlegen waren hier die höheren Frequenzen und die horizontale Vibration.

## 4.4 Analyse der Veraschung

Der Zusammenhang zwischen anorganischer und organischer Masse sowie den biomechanischen Parametern ist gut validiert (Currey 1999; Vuong und Hellmich 2011). Änderungen im Verhältnis bzw. der Zusammensetzung der Massen können deutliche biomechanische Folgen haben und somit eine Schwächung bzw. Stärkung des Knochens bewirken. In unserer Versuchsreihe wurde wie zuvor beschrieben eine Veraschung zur Bestimmung des organischen und anorganischen Anteils des proximalen Femurs durchgeführt. Wie auch bereits durch Oxlund et al. (2003) und Komrakova et al. (2011) beschrieben,

zeigt sich in den Ergebnissen im Vergleich der SHAM-Gruppe zu den übrigen Gruppen ein niedrigerer organischer Anteil bzw. ein höherer anorganischer Anteil in der SHAM-Gruppe. Dies zeigt die bei der Osteoporose regelhaft stattfindende Abnahme des anorganischen Anteils des Knochens bei Abnahme der Knochendichte. Im Vergleich der ovarektomierten zu den vibrierten Gruppen konnten sowohl bei der anorganischen wie auch bei der organischen Masse keine aussagekräftigen Tendenzen oder Signifikanzen festgestellt werden. Dies deckt sich mit den Messungen von Flieger et al. (1998). Hier wurden keine Unterschiede zwischen ovarektomierten Ratten und vibrierten Tieren gefunden. Die Ratten wurden in diesem Versuchsaufbau mit 50 Hertz bei 2 g 30 Minuten pro Tag über zwölf Wochen behandelt. Dies steht im Kontrast zur Arbeit von Tezval et al. (2011) aus unserer Arbeitsgruppe, die bei mit vertikal 90 Hertz behandelten Ratten eine Zunahme des anorganischen Anteils am Femur und Sehmisch et al. (2009) an der Wirbelsäule zeigten. Zu erklären wäre dies mit der von uns verwandten niedrigeren Frequenz. Die Ergebnisse der Mikroradiographie zeigten die meisten Signifikanzen durch die WBV mit höheren Frequenzen. Eventuell waren die gewählten Frequenzen somit zu niedrig, um einen signifikanten Unterschied in der anorganischen Masse zu erreichen. Der zweite Ansatz stützt sich auf die bereits beim Bruchtest genannte Vermutung: Die in der Mikroradiographie gesehene Zunahme des trabekulären Knochens mag in manchem Bereich signifikant sein, jedoch beim Verhältnis Kompakta zu Spongiosa von 75 % zu 25 % so deutlich zu Ungunsten des spongiösen Bereiches, dass die Unterschiede in der Veraschung bzw. dem Auswiegen marginal ausfallen bzw. die Messung zu ungenau für diese minimalen Veränderungen ist. In den Untersuchungen der Wirbelsäulenpräparate in unserem Versuchsaufbau zeigte sich wie in unseren Ergebnissen kein signifikanter Unterschied zwischen SHAM- und ovarektomierter Gruppe, was wie zuvor beschrieben im Kontrast zur Literatur steht. In dieser Versuchsreihe konnte jedoch ein Unterschied im Mikro-CT gesehen werden, so dass vermutet wurde, dass eine höhere Genauigkeit der Mikro-CT-Messung gegenüber der Veraschung besteht (Fürst 2014). Dies deckt sich mit den Ergebnissen unserer Mikroradiographie.

## 4.5 Analyse der Serummarker

Beim Versuchsende wurden Blutproben gewonnen und aus diesen die alkalische Phosphatase und das Osteocalcin bestimmt. Es zeigten sich im Vergleich zur SHAM-Gruppe bei allen anderen Gruppen ein Anstieg der ALP. Dieser war, bis auf die horizontal mit 70 Hertz behandelte Gruppe, auch signifikant. Für das OC waren die Unterschiede zwischen allen

Gruppen statistisch nicht signifikant, zeigten aber im Vergleich zur SHAM-Gruppe eine leicht höhere Tendenz nach Ovarektomie. Einen signifikanten Unterschied zwischen der ovarektomierten Gruppe und den WBV-Gruppen zeigten beide Werte nicht. In unseren vorangegangenen Versuchsreihen mit lediglich einmal pro Tag durchgeführter WBV über 35 Tage zeigten die Werte keine Veränderung (Sehmisch et al. 2009; Tezval et al. 2010). So kann vermutet werden, dass eine mehrmals pro Tag durchgeführte WBV einen größeren Benefit hat. OC und ALP fungieren als Marker der Knochenneubildung und steigen bei vermehrtem Knochenneubau an. Die Ergebnisse in der Literatur weisen, wie auch unsere Ergebnisse, eine hohe Heterogenität der Werte auf (Hauschka 1989; Kalu 1991). Erschwerend kommt hinzu, dass besonders die genannten Laborparameter auch unter Einfluss von verschiedenen Faktoren stehen. So können auch unsere Ergebnisse lediglich als Hinweise verstanden werden und weitere Studien sind notwendig.

## 4.6 Schlussfolgerung

Im Versuchsaufbau konnte die Intaktheit des osteoporotischen Rattenmodells (Validität) an Hand des Gewichtsverlaufs und der Uterusgewichte gezeigt werden. Wie die Ergebnisse des Veraschungsversuches zeigten, kam es durch die stattgehabte Ovarektomie zu einer signifikanten Abnahme der anorganischen Masse im Vergleich der SHAM-Gruppe gegenüber der ovarektomierten Gruppe und der ovarektomiert und therapierten Gruppen. Ein Einfluss der Ganzkörpervibration auf die anorganische Masse konnte nicht gezeigt werden. Im Bereich des Bruchtestes zeigten sich Tendenzen zu Gunsten der niedrigen Frequenzen, was auf die Stärkung der Kompakta durch die niedrigen Frequenzen zurückgeführt wurde. Dieser Bereich des Knochens ist maßgeblich verantwortlich für die Stabilität des Knochens und wird durch eine entstehende Osteoporose kaum beeinflusst. Die Ergebnisse der Mikroradiographie zeigen einen signifikanten positiven Einfluss bei den horizontal und vertikal mit 70 Hertz behandelten Gruppen und der horizontalen gegenüber der vertikalen WBV auf Trabekelparameter im Vergleich zur ovarektomierten Gruppe. Die bisherige Literatur spricht eher von einem Effekt durch vertikale Belastung, wobei sich gerade in der Mikroradiographie eine höhere Signifikanz in Richtung positivem Effekt bei den horizontal vibrierten Tieren zeigte. Dies führen wir auf die anatomischen Gegebenheiten und damit Sensitivität des proximalen Femurs auf horizontale WBV zurück. Weiterhin unklar bleibt bei der Varianz der Ergebnisse zwischen den verschiedenen Literaturquellen, in welcher Form die WBV den bestmöglichen Einfluss auf die Osteoporose und als supportive oder alleinige Therapie bei Osteoporose eine positive Auswirkung auf den Knochen hat. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen Hinweise auf einen Benefit bei der mittelfristigen WBV bei höheren Frequenzen und einer zweimal täglichen Applikation mit niedriger Belastung. Hierbei erscheint vor allem in der Mikroradiographie die höherfrequente WBV mit 70 Hertz in horizontaler Schwingung für den Femur geeigneter. Demgegenüber scheinen die niedrigeren Frequenzen in vertikaler Richtung eher eine Stärkung der Kompakta zu verursachen. Weitere Studien mit einheitlichem Studiendesign und gegebenenfalls die Erweiterung auf ein Großtiermodell sind notwendig, um diese Erkenntnisse zu festigen und zu belegen. Im Anschluss daran müssen die neueren Daten dann auch auf den Menschen und entsprechende klinische Studien transferiert werden, was neuere Studien bereits versuchen. Interessant scheint der Aspekt der mehrmals täglichen WBV.

# 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war es, den zweifelslos belegten Effekt der Whole-Body-Vibration im etablierten osteoporotischen Rattenmodell an Hand des proximalen Femurs (Trochanterregion) genauer zu untersuchen. Auf Grund der vorliegenden Heterogenität der Literatur war das Primärziel herauszufinden, welche Frequenz, welche Richtung, welche Dauer und Anzahl die besten Ergebnisse zeigt. Hierzu verwendeten wir 90 weibliche Ratten des Typs Sprague Dawley, von denen für die Untersuchungen am Versuchsende 83 Tiere zur Verfügung standen. Es erfolgte im Alter von drei Monaten eine Ovarektomie zur Induktion einer Osteopenie. Acht Wochen nach Ovarektomie wurde für 30 Tage die WBV zweimal täglich für 15 Minuten durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Vibrationsarten getestet. 35-Hz-h, 35-Hz-v, 70-Hz-h und 70-Hz-v. Als Kontrollgruppen wurden nichtovarektomierte, scheinoperierte Ratten (SHAM) und ovarektomierte Ratten ohne Therapie (OVX) genutzt. Erstmals in unserer Versuchsreihe wurde mehrmals täglich therapiert. Nach 30 Tagen wurden die Tiere getötet und es erfolgte die Entnahme der Femora für einen Bruchtest, einen Veraschungstest, eine Mikroradiographie und eine Serumanalyse. Der Bruchtest zeigte Tendenzen zu Gunsten der WBV. Den größten Benefit gab es hierbei in der 35-Hz-v- gefolgt von der 70-Hz-h-Gruppe. Dies führen wir auf eine Stärkung der Kompakta durch niedrigere Frequenzen zurück, wobei die Kompakta essentiell für die Stabilität des Femurs ist. In der Mikroradiographie konnte eine signifikante Zunahme aller trabekulären Werte bei den beiden 70-Hz-, sowie der 35-Hz-h-Gruppe gezeigt werden. Die höchste Signifikanz lag bei der 70-Hz-h- und 70-Hz-v-Gruppe. Die Kompakta zeigte sich unbeeinflusst. Die Ergebnisse im Bereich der Mikroradiographie stehen mit früheren Studien in Einklang und zeigen, dass die hohen Frequenzen mit niedriger Belastung zu präferieren sind. Eine Divergenz zeigt sich jedoch, da die horizontale WBV in Kontrast zu vorangegangenen Studien in unserer Arbeit auf Signifikanzniveau überlegen erscheint. In der Veraschungsanalyse konnten keine signifikanten Änderungen durch die WBV gezeigt werden. Lediglich die Intaktheit des Modells konnte durch einen signifikanten Unterschied der anorganischen Masse im Vergleich SHAM zu allen ovarektomierten Tieren gezeigt werden. Hier wäre kritisch zu hinterfragen, ob in einem erneuten Versuchsaufbau die additive Nutzung eines QCT sinnvoll wäre. Klare Empfehlungen können noch nicht festgehalten werden, jedoch wurden weitere Erkenntnisse für die Erforschung der WBV und gegebenenfalls therapeutische Nutzung in der Zukunft gewonnen. Folgende Studien sollten die höherfrequente WBV in horizontaler Richtung in Hinblick auf eine Zunahme

## Zusammenfassung

der Knochendichte im Bereich des Femurs untersuchen. So sollte das Ziel sein eine optimale Frequenz zu finden. Auch scheint die Häufigkeit der täglichen Therapie einen positiven Einfluss zu haben, wobei die Anzahl pro Tag unklar bleibt. Es sollte somit der Einfluss der mehrmaligen WBV Untersuchungsgegenstand weiterer Arbeiten sein. Diese Ergebnisse sollten im Weiteren dann auf ein Großtiermodell und in der Folge in klinischen Studien beim Menschen angewandt werden, um die WBV als nichtpharmakologische Osteoporosetherapie zu etablieren.

# 6 Literaturverzeichnis

Aleyaasin M, Harrigan JJ (2008): Vibration exercise for treatment of osteoporosis: A theoretical model. Proc. IMechE Part H: J. Engineering in Medicine <u>222</u>, 1161-1166

Amling M, Pösl M, Ritzel H, Hahn M, Vogel M, Wening VJ, Delling G (1996): Architecture and distribution of cancellous bone yield vertebral fracture clues: A histomorphometric analysis of the complete spinal column from 40 autopsy specimens. Arch Orthop Trauma Surg <u>115</u>, 262-269

Anderson GL (2004): Effects of Conjugated Equine Estrogen in Postmenopausal Women With Hysterectomy: The Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. JAMA <u>291</u>, 1701

Aspenberg P (2013): Annotation: Parathyroid hormone and fracture healing. Acta Orthopaedica <u>84</u>, 4-6

Bagi CM, Ammann P, Rizzoli R, Miller SC (1997a): Effect of Estrogen Deficiency on Cancellous and Cortical Bone Structure and Strength of the Femoral Neck in Rats. Calcif Tissue Int <u>61</u>, 336-344

Bagi CM, Wilkie D, Georgeles K, Williams D, Bertolini D (1997b): Morphological and structural characteristics of the proximal femur in human and rat. Bone <u>21</u>, 261-267

Bartl: Osteoporose Prävention, Diagnostik, Therapie. 4. Auflage; Thieme, Stuttgart 2011

Bone HG, Chapurlat R, Brandi ML, Brown JP, Czerwinski E, Krieg MA, Mellström D, Radominski SC, Reginster JY, Resch H et al. (2013): The Effect of Three or Six Years of Denosumab Exposure in Women With Postmenopausal Osteoporosis: Results From the FREEDOM Extension. J Clin Endocrinol Metab <u>98</u>, 4483–4492

Bonucci E, Ballanti P (2014): Osteoporosis - Bone Remodeling and Animal Models. Toxicol. Pathol <u>42</u>, 957–969

Borgström F, Zethraeus N, Johnell O, Lidgren L, Ponzer S, Svensson O, Abdon P, Ornstein E, Lunsjö K, Thorngren KG et al. (2006): Costs and quality of life associated with osteoporosis-related fractures in Sweden. Osteoporos Int <u>17</u>, 637–650

Bösch M: Comparative analysis of the effectiveness of horizontal and vertical whole body vibration on the osteoporotic tibia fracture healing in the rat model. Medizinische Dissertation Göttingen 2016

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003): Osteoclast differentiation and activation. Nature <u>423</u>, 337–342

Browner WS, Lui LY, Cummings SR (2001): Associations of Serum Osteoprotegerin Levels with Diabetes, Stroke, Bone Density, Fractures, and Mortality in Elderly Women. J Clin Endocrinol Metab <u>86</u>, 631–637

Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R (1995): Bone biology. J Bone Joint Surg Am <u>77</u>, 1256–1275

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

Chen H, Zhou X, Fujita H, Onozuka M, Kubo KY (2013): Age-Related Changes in Trabecular and Cortical Bone Microstructure. Int J Endocrinol <u>2013</u>, 1–9

Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, Binkley N, Czerwinski E, Ferrari S, Hofbauer LC, Lau E, Lewiecki EM, Miyauchi A et al. (2016): Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. N Engl J Med <u>375</u>, 1532–1543

Cummings SR, Martin JS, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A et al. (2009): Denosumab for Prevention of Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis. N Engl J Med <u>361</u>, 756–765

Currey JD (1999): The design of mineralised hard tissues for their mechanical functions. J Exp Biol <u>202</u>, 3285–3294

D'Amelio P, Isaia GC (2013): The use of raloxifene in osteoporosis treatment. Expert Opin Pharmacother <u>14</u>, 949–956

DVO (2017): Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen. S3-Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V. https://www.awmf.org/uploads/tx\_szleitlinien/183-001l\_S3\_Osteoporose-Prophylaxe-Diagnostik-Therapie\_2019-02.pdf; abgerufen am 19.07.2021

#### Literaturverzeichnis

Ellegaard M, Kringelbach T, Syberg S, Petersen S, Jensen JEB, Brüel A, Jorgensen NR, Schwarz P (2013): The effect of PTH (1-34) on fracture healing during different loading conditions. JBMR <u>28</u>, 2145–2155

Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR, Stakkestad J et al. (1999): Reduction of Vertebral Fracture Risk in Postmenopausal Women With Osteoporosis Treated With Raloxifene Results From a 3-Year Randomized Clinical Trial. JAMA <u>282</u>, 637-646

Felsenberg D, Wieland E, Hammermeister C, Armbrecht G, Gowin W, Raspe H, EVOS-Gruppe in Deutschland (1998): Prävalenz der vertebralen Wirbelkörperdeformationen bei Frauen und Männern in Deutschland. Med Klin <u>93</u>, 31–34

Fahrleitner-Pammer A, Langdahl BL, Marin F, Jakob F, Karras D, Barrett A, Ljunggren Ö, Walsh JB, Rajzbaum G, Barker C, Lems WF (2011): Fracture rate and back pain during and after discontinuation of teriparatide: 36-month data from the European Forsteo Observational Study (EFOS). Osteoporos Int <u>22</u>, 2709–2719

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

Flieger J, Karachalios T, Khaldi L, Raptou P, Lyritis G (1998): Mechanical Stimulation in the Form of Vibration Prevents Postmenopausal Bone Loss in Ovariectomized Rats. Calcif Tissue Int <u>63</u>, 510–514

Fratini A, Bonci T, Bull AMJ (2016): Whole Body Vibration Treatments in Postmenopausal Women Can Improve Bone Mineral Density: Results of a Stimulus Focussed Meta-Analysis. Plos One <u>11</u>, e0166774

Fritton SP, McLeod KJ, Rubin CT (2000): Quantifying the strain history of bone: spatial uniformity and self-similarity of low-magnitude strains. J Biomech <u>33</u>, 317–325

Frost HM (1987): Bone, mass and the mechanostat: A proposal. Anat Rec 219, 1-9

Frost HM (2000): The Utah paradigm of skeletal physiology: an overview of its insights for bone, cartilage and collagenous tissue organs. J Bone Miner Metab <u>18</u>, 305–316

Fürst B: Influence of vertical and horizontal whole-body-vibration with different frequencies on the lumbar spine in the rat animal model. Medizinische Dissertation Göttingen 2014

### Literaturverzeichnis

Gallagher JC (1990): The pathogenesis of osteoporosis. Bone Miner 9, 215–227

Gartlehner G, Patel SV, Feltner C, Weber RP, Long R, Mullican K, Boland E, Lux L, Viswanathan M (2017): Hormone Therapy for the Primary Prevention of Chronic Conditions in Postmenopausal Women: Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. JAMA <u>318</u>, 2234

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

Haentjens P, Magaziner J, Colon-Emeric CS, Vanderschueren D, Milisen K, Velkeniers B, Boonen S (2010): Meta-analysis: Excess Mortality After Hip Fracture Among Older Women and Men. Ann Intern Med <u>152</u>, 380-390

Hauschka PV, Lian JB, Cole DEC, Gundberg CM (1989): Osteocalcin and Matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. Physiol Rev <u>69</u>, 990-1047

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

Heshmati HM, Khosla S (1998): Idiopathic osteoporosis: a heterogeneous entity. Ann Med Interne <u>149</u>, 77–81

Hippisley-Cox J, Coupland C (2009): Predicting risk of osteoporotic fracture in men and women in England and Wales: prospective derivation and validation of QFractureScores. BMJ 339, b4229

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL (2000): The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. J Bone Miner Res <u>15</u>, 2–12

Hofbauer LC, Kühne CA, Viereck V (2004): The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. J Musculoskel Neuron Interact <u>4</u>, 268-275

Hoffmann DB, Griesel MH, Brockhusen B, Tezval M, Komrakova M, Menger B, Wassmann M, Stuermer KM, Sehmisch S (2016): Effects of 8-Prenylnaringenin and Whole-Body Vibration Therapy on a Rat Model of Osteopenia. J Nutr Metab <u>2016</u>, 1–9 Hoffmann DB, Sehmisch S, Hofmann AM, Eimer C, Komrakova M, Saul D, Wassmann M, Stuermer KM, Tezval M (2017): Comparison of parathyroid hormone and strontium ranelate in combination with whole-body vibration in a rat model of osteoporosis. J Bone Miner Metab <u>35</u>, 31–39

Holguin N, Uzer G, Chiang FP, Rubin C, Judex S (2011): Brief daily exposure to low-intensity vibration mitigates the degradation of the intervertebral disc in a frequency-specific manner. J Appl Physiol <u>111</u>, 1846–1853

Inada M, Matsumoto C, Miyaura C (2011): Animal models for bone and joint disease. Ovariectomized and orchidectomized animals. Clin Calcium <u>21</u>, 164–170

Ishihara A, Sasaki T, Debari K, Fuyura R, Kawawa T, Ramamurthy NS, Golub LM (1999): Effects of ovariectomy on bone morphology in maxillae of mature rats. J Electron Microsc <u>48</u>, 465–469

Jakob F, Oertel H, Langdahl B, Ljunggren O, Barrett A, Karras D, Walsh JB, Fahleitner-Pammer A, Rajzbaum G, Barker C et al. (2012): Effects of teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis pre-treated with bisphosphonates: 36-month results from the European Forsteo Observational Study. Eur J Endocrinol <u>166</u>, 87–97

Jee WSS, Mori S, Li XJ, Chan S (1990): Prostaglandin E2 enhances cortical bone mass and activates intracortical bone remodeling in intact and ovariectomized female rats. Bone <u>11</u>, 253–266

Johnston CC, Hui SL, Witt RM, Appledorn R, Baker RS, Longcope C (1985): Early Menopausal Changes in Bone Mass and Sex Steroids. J Clin Endocrinol Metab <u>61</u>, 905–911

Judex S, Lei X, Han D, Rubin C (2007): Low-magnitude mechanical signals that stimulate bone formation in the ovariectomized rat are dependent on the applied frequency but not on the strain magnitude. J Biomech <u>40</u>, 1333–1339

Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Holli BW (1989): The Aged Rat Model of Ovarian Hormone Deficiency Bone Loss. Endocrinology <u>124</u>, 7–16

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

Kanis JA, Delmas P, Burckhardt P, Cooper C, Torgerson D (1997): Guidelines for diagnosis and management of osteoporosis. Osteoporos Int <u>7</u>, 390–406

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

Kanis JA, Johansson H, Oden A, Johnell O, DeLaet C, Eisman JA, McCloskey EV, Mellstrom D, Melton III LJ, Pols HAP (2004): A family history of fracture and fracture risk: a metaanalysis. Bone <u>35</u>, 1029–1037

Kanis JA, McCloskey EV, Johannson H, Oden A, Ström O, Borgström F (2010): Development and use of FRAX® in osteoporosis. Osteoporos Int <u>21</u>, 407–413

Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Abrahamsen B, Al-Daghri NM, Brandi ML, Cannata-Andia J, Cortet B, Dimai HP, Ferrari S et al. (2017): Identification and management of patients at increased risk of osteoporotic fracture: outcomes of an ESCEO expert consensus meeting. Osteoporos Int <u>28</u>, 2023–2034

Kaufmann M, Serban DC, Scharl A: Die Gynäkologie: mit 197 Tabellen. 2. Auflage; Springer Medizin, Heidelberg 2006

Kavuncu V, Sahin S, Baydas G, Ilhan N, Ozercan I, Yasar A, Pekkutucu I, Ilhan N, Ozercan R et al. (2003): A Comparison of Estrogen and Two Different Doses of Calcitonin in Ovariectomized Rats. Yonsei Med J <u>44</u>, 508

Kiiski J, Heinonen A, Järvinen TL, Kannus P, Sievänen H (2008): Transmission of Vertical Whole Body Vibration to the Human Body. J Bone Miner Res <u>23</u>, 1318–1325

Komrakova M, Sehmisch S, Tezval M, Schmelz U, Frauendorf H, Grueger T, Wessling T, Klein C, Birth M, Stuermer KM, Stuermer EK (2011): Impact of 4-methylbenzylidene camphor, daidzein, and estrogen on intact and osteotomized bone in osteopenic rats. J Endocrinol <u>211</u>, 157–168

Komrakova M, Sehmisch S, Tezval M, Ammon J, Lieberwirth P, Sauerhoff C, Trautmann L, Wicke M, Dullin C, Stuermer KM, Stuermer EK (2013): Identification of a Vibration Regime Favorable for Bone Healing and Muscle in Estrogen-Deficient Rats. Calcif Tissue Int <u>92</u>, 509–520

Komrakova M, Stuermer EK, Tezval M, Stuermer KM, Dullin C, Schmelz U, Doell C, Durkaya-Burchhardt N, Fuerst B, Genotte T, Sehmisch S (2017): Evaluation of twelve vibration regimes applied to improve spine properties in ovariectomized rats. Bone Rep <u>7</u>, 172–180 Leslie WD, Adler RA, Fuleihan GEH, Hodsman AB, Kendler DL, McClung M, Miller PD, Watts NB, (2006): Application of the 1994 WHO classification to populations other than postmenopausal Caucasian women: the 2005 ISCD Official Positions. J Clin Densitom <u>9</u>, 22–30

Leung KS, Shi HF, Cheung WH, Qin L, Ng WK, Tam KF, Tang N (2009): Low-magnitude high-frequency vibration accelerates callus formation, mineralization, and fracture healing in rats. J Orthop Res <u>27</u>, 458–465

Li YF, Zhou CC, Li JH, Luo E, Zhu SS, Feng G, Hu J (2012): The effects of combined human parathyroid hormone (1-34) and zoledronic acid treatment on fracture healing in osteoporotic rats. Osteoporos Int <u>23</u>, 1463–1474

Liu Y, Zhou J, Ye CQ, Bai GC (2008): Osteogenetic effect of mechanical vibration on bone. Zhongguo Gu Shang <u>21</u>, 400–402

McClung MR, Grauer A, Boonen S, Bolognese MA, Brown JP, Diez-Perez A, Langdahl BL, Reginster JY, Zanchetta JR, Wassermann SM et al. (2014): Romosozumab in Postmenopausal Women with Low Bone Mineral Density. N Engl J Med <u>370</u>, 412–420

Minematsu A, Nishii Y, Imagita H, Sakata S (2019): Whole body vibration at low-frequency can increase trabecular thickness and width in adult rats. J Musculoskelet Neuronal Interact <u>19</u>, 169–177

Mirza F, Canalis E (2015): Managment of endocrine disease: Secondary osteoporosis: pathophysiology and management. Eur J Endocrinol <u>173</u>, R131–R151

Mundy GR (2001) Osteoporosis: pathophysiology and non-pharmacological management. Best Pract Res Clin Rheumatol <u>15</u>, 727–745

Nardone V, D'Asta F, Brandi ML (2014): Pharmacological management of osteogenesis. Clinics <u>69</u>, 438–446

Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK et al. (2001): Effect of Parathyroid Hormone (1-34) on Fractures and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women with Osteoporosis. N Engl J Med <u>344</u>, 1434–1441

Neuerburg T: Effect of vertical, short-term whole-body vibration with frequencies under 90 Hz on the femur of ovariectomized rats. Medizinische Dissertation Göttingen 2015

Oliveira LC, Oliveira RG, Pires-Oliveira DAA (2016): Effects of whole body vibration on bone mineral density in postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis. Osteoporos Int <u>27</u>, 2913–2933

O'Neill TW, Felsenberg D, Varlow J, Cooper C, Kanis JA, Silman AJ and the european vertebral osteoporosis study group (2009): The prevalence of vertebral deformity in European men and women: The european vertebral osteoporosis study. J Bone Miner Res <u>11</u>, 1010–1018

Oxlund BS, Ortoft G, Andreassen (2003): Low-intensity, high-frequency vibration appears to prevent the decrease in strength of the femur and tibia associated with ovariectomy of adult rats. Bone <u>32</u>, 69–77

Pacifici R (1998): Editorial: Cytokines, Estrogen, and Postmenopausal Osteoporosis - The Second Decade. Endocrinol <u>139</u>, 2659–2661

Padhi D, Jang G (2011): Single-dose, placebo-controlled, randomized study of AMG 785, a sclerostin monoclonal antibody. J Bone Miner Res <u>26</u>, 19–26

Papapoulos S, Lippuner K, Roux C, Lin CJF, Kendler DL, Lewiecki EM, Brandi ML, Czerwinski E, Franek E, Lakatos P et al. (2015): The effect of 8 or 5 years of denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis: results from the FREEDOM Extension study. Osteoporos Int <u>26</u>, 2773–2783

Pasqualini M, Lavet C, Elbadaoui M, Vanden-Bossche A, Laroche N, Gnyubkin V, Vico L (2013): Skeletal site-specific effects of whole body vibration in mature rats: From deleterious to beneficial frequency-dependent effects. Bone <u>55</u>, 69–77

Popp AW, Zysset PK, Lippuner K (2016): Rebound-associated vertebral fractures after discontinuation of denosumab - from clinic and biomechanics. Osteoporos Int <u>27</u>, 1917–1921

Quandt SA, Thompson DE, Schneider DL, Nevitt MC, Black DM for the fracture (2005): Effect of Alendronate on Vertebral Fracture Risk in Women With Bone Mineral Density T Scores of -1.6 to -2.5 at the Femoral Neck: The Fracture Intervention Trial. Mayo Clin Proc <u>80</u>, 343-349

Rahn BA: Die polychrome Sequenzmarkierung: intravitale Zeitmarkierung zur tierexperimentellen Analyse der Knochen- und Dentinbildung. Medizinische Habilitationsschrift Freiburg 1976 Red MWW (2017): Einstellung der Produktion von Strontiumranelat. MMW Fortschr Med <u>159</u>, 72

Riggs BL (1979): Postmenopausal and senile osteoporosis: current concepts of etiology and treatment. Endocrinol Jpn <u>26</u>, 31–41

Ritzel H, AMling M, Pösl M, Hahn M, Delling G (1997): The Thickness of Human Vertebral Cortical Bone and its Changes in Aging and Osteoporosis: A Histomorphometric Analysis of the Complete Spinal Column from Thirty-Seven Autopsy Specimens. J Bone Miner Res <u>12</u>, 89–95

Rubin C, Turner AS, Mallinckrodt, Jerome C, McLeod, Bain S (2002): Mechanical strain, induced noninvasively in the high-frequency domain, is anabolic to cancellous bone, but not cortical bone. Bone <u>30</u>, 445–452

Rubin C, Pope M, Fritton C, Magnussen, Marianne (2003) Transmissibility of 15-Hertz to 35-Hertz Vibrations to the Human Hip and Lumbar Spine: Determining the Physiologic Feasibility of Delivering Low-Level Anabolic Mechanical Stimuli to Skeletal Regions at Greatest Risk of Fracture Because of Osteoporosis. Spine <u>28</u>, 2621–2627

Rubin C, Judex S, Qin YX (2006): Low-level mechanical signals and their potential as a non-pharmacological intervention for osteoporosis. Age Ageing <u>35</u>, ii32–ii36

Runge WO, Ruppert DS, Marcellin-Little DJ, Dahners LE, Harryson OLA, Weinhold PS (2018): Bone changes after short-term whole body vibration are confined to cancellous bone. J Musculoskeletal Neuronal Interact <u>18</u>, 485–492

Ruyssen-Witrand A, Gossec L, Kolta S, Dougados M,Roux C (2007): Vertebral dimensions as risk factor of vertebral fracture in osteoporotic patients: a systematic literature review. Osteoporos Int <u>18</u>, 1271–1278

Saville PD (1969): Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rat: a model of osteoporosis. J Am Ger Soc <u>17</u>, 155–166

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

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T (1997): Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. Cell <u>89</u>, 309–319

Slatkovska L, Alibhai SMH, Beyene J, Cheung AM (2010): Effect of whole-body vibration on BMD: a systematic review and meta-analysis. Osteoporos Int <u>21</u>, 1969–1980

Štěpán JJ, Pospichal J, Presl J, Pacovsky V (1987): Bone loss and biochemical indices of bone remodeling in surgically induced postmenopausal women. Bone <u>8</u>, 279–284

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ (1999): Modulation of Osteoclast Differentiation and Function by the New Members of the Tumor Necrosis Factor Receptor and Ligand Families. Endocr Rev <u>20</u>, 345–357

Tezval M, Stuermer EK, Sehmisch S, Rack T, Stary A, Stebener M, Konietschke F, Stuermer KV (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 21, 251–261

Tezval M, Biblis M, Sehmisch S, Schmelz U, Kolios L, Rack T, Stuermer KM, Stuermer EK (2011): Improvement of Femoral Bone Quality After Low-Magnitude, High-Frequency Mechanical Stimulation in the Ovariectomized Rat as an Osteopenia Model. Calcif Tissue Int <u>88</u>, 33–40

Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ (1995): FDA guidelines and animal models for osteoporosis. Bone <u>17</u>, S125–S133

Tsuchie H, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Aonuma H, Shimada Y (2013): Intermittent Administration of Human Parathyroid Hormone before Osteosynthesis Stimulates Cancellous Bone Union in Ovariectomized Rats. Tohoku J Exp Med <u>229</u>, 19–28

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

Vahle JL, Sato M, Long GG, Young, JK, Francis PC, (2002) Skeletal Changes in Rats Given Daily Subcutaneous Injections of Recombinant Human Parathyroid Hormone (1-34) for 2 Years and Relevance to Human Safety. Toxicol Pathol <u>30</u>, 312–321

Vestergaard P (2014): New strategies for osteoporosis patients previously managed with strontium ranelate. Ther Adv Musculoskeletal Dis <u>6</u>, 217–225
Vuong J, Hellmich C (2011): Bone fibrillogenesis and mineralization: Quantitative analysis and implications for tissue elasticity. J Theor Biol <u>287</u>, 115–130

Warden SJ, Turner CH (2004): Mechanotransduction in the cortical bone is most efficient at loading frequencies of 5–10 Hz. Bone <u>34</u>, 261–270

Wehrle E, Wehner T, Heilmann A, Vindl ronny Claes L, Jakob F (2014): Distinct frequency dependent effects of whole-body vibration on non-fractured bone and fracture healing in mice: Whole-Body-Vibration in fracture healing. J Orthop Res <u>32</u>, 1006–1013

Wolff J: Das Gesetz der Transformation der Knochen. 1. Aufl.; Pro Business, Berlin 1892

Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (2002): Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women: Principal Results From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. JAMA <u>288</u>, 321–333

Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski (1985): Skeletal alterations in ovariectomized rats. Calcif Tissue Int <u>37</u>, 324–328

Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintron M (1989): Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. Calcif Tissue Int <u>45</u>, 360–366

Xie LQ, Donahue L, Rubin X, Judex S (2006a): Doubling the bouts or acceleration magnitude may increase the efficacy of low level vibrations in the growing skeleton. Transactions of the 52nd Meeting of the Orthopaedic Research Society, Chicago, IL.

Xie LQ, Jacobson JM, Choi ES, Busa B, Donahue LR, Miller LM, Rubin CT, Judex S (2006b): Low-level mechanical vibrations can influence bone resorption and bone formation in the growing skeleton. Bone <u>39</u>, 1059–1066

Xie P, Tang Zhurong, Fangzhu Qing, Zhu Xiang (2016): Bone mineral density, microarchitectural and mechanical alterations of osteoporotic rat bone under long-term whole-body vibration therapy. J Mech Behav Biomedl Materials <u>53</u>, 341–349

Yasuda H (2013): RANKL, a necessary chance for clinical application to osteoporosis and cancer-related bone diseases. World J Orthop <u>4</u>, 207