

**Aus der Abteilung Unfallchirurgie, Plastische und
Wiederherstellungschirurgie**

(Prof. Dr. med. K . M. Stürmer)

**Im Zentrum Chirurgie der Medizinischen Fakultät
der Universität Göttingen**

**Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Wirkung von
Östrogen, Alendronat, Raloxifen und Cimicifuga auf die
Knochenheilung der ovariectomierten Ratte**

**Eine Untersuchung nach Osteotomie und Osteosynthese
im Bereich der proximalen Tibia**

Inaugural - Dissertation

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

vorgelegt von

Eliane Wenda

aus

Frankfurt am Main

Göttingen 2009

Dekan:
Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. K. M. Stürmer

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis:

I. Einleitung

I.1.	Osteoporose und Fragilitätsfrakturen	6
I.2.	Frakturheilung	7
I.3.	Was ist Osteoporose?	8
I.3.1.	Definition	8
I.3.2.	Pathophysiologie	9
I.3.3.	Klinische Manifestation der Osteoporose und ihre Auswirkungen	11
I.3.4.	Diagnostik	12
I.3.5.	Therapie	12
I.3.6.	Pharmakotherapie der Osteoporose	13
I.4.	Präparate	14
I.4.1.	Alendronat	14
I.4.2.	Raloxifen	14
I.4.3.	Phytohormone	15
I.4.4.	Hormonersatztherapie	15
I.4.5.	Soja	15
I.4.6.	Cimicifuga Racemosa	16
I.5.	Fluoreszenzentstehung	16
I.6.	Polychrome Sequenzmarkierung	17
I.7.	Die ovariectomierte Ratte als Modell für die postmenopausale Osteoporose	18
I.8.	Ziel der Arbeit	19

II. Material und Methoden

II.1.	Versuchstiere und Haltung	21
II.1.1.	Versuchstiere	21
II.1.2.	Futter	21
II.1.3.	Gruppeneinteilung	21
II.2.	Frakturmodell	22
II.2.1.	Operative Technik	22
II.3.	Polychrome Sequenzmarkierung	25
II.4.	Präparation	26
II.5.	Präparate	26
II.6.	Fluoreszenzmikroskopie	27
II.7.	Datenanalyse	28
II.7.1.	Messung der Längsschnitte	29
II.7.2.	Datenverarbeitung	30
II.7.3.	Deskriptive Statistik	31
II.7.4.	Beurteilende Statistik	31

III.	Ergebnisse	
III.1.	Zusammenfassung Gruppeneinteilung	32
III.2.	Zeitlicher Verlauf Frakturheilung	33
III.3	Auswertung	34
III.3.1.	Werte für Callus plattennah gesamt	34
III.3.2.	Graphik für Callus plattennah gesamt	35
III.3.3.	Werte für Calceingrün plattennah	36
III.3.4.	Graphik für Calceingrün plattennah	37
III.3.5.	Werte für Alizarinkomplex plattennah	38
III.3.6.	Graphik für Alizarinkomplex plattennah	39
III.3.7.	Werte für Tetracyclin plattennah	40
III.3.8.	Graphik für Tetracyclin plattennah	41
III.3.9.	Werte für Callus plattenfern gesamt	42
III.3.10.	Graphik für Callus plattenfern gesamt	43
III.3.11.	Werte für Calceingrün plattenfern	44
III.3.12.	Graphik für Calceingrün plattenfern	45
III.3.13.	Werte für Alizarinkomplex plattenfern	46
III.3.14.	Graphik für Alizarinkomplex plattenfern	47
III.3.15.	Werte für Tetracyclin plattenfern	48
III.3.16.	Graphik für Tetracyclin plattenfern	49
III.3.17.	Werte für Callus endostal gesamt	50
III.3.18.	Graphik für Callus endostal gesamt	51
III.3.19.	Werte für Calceingrün endostal	52
III.3.20.	Graphik für Calceingrün endostal	53
III.3.21.	Werte für Alizarinkomplex endostal	54
III.3.22.	Graphik für Alizarinkomplex endostal	55
III.3.23.	Werte für Tetracyclin endostal	56
III.3.24.	Graphik für Tetracyclin endostal	57
IV.	Diskussion	58
V.	Zusammenfassung	63
VI.	Literaturverzeichnis	64

I. Einleitung

I.1 Osteoporose und Fragilitätsfrakturen

Osteoporose ist eine der folgenreichsten Erkrankungen der Haltungs- und Bewegungsorgane und wird von der WHO zu den wichtigsten Erkrankungen der Menschheit gezählt. Ohne adäquate Behandlung bedingt Osteoporose schwere Funktionseinbußen bis hin zur Invalidität und eine substantielle Minderung der Lebensqualität der Betroffenen (Morris und Masaud 2001).

Folgen einer zuvor unerkannten und unbehandelten Osteoporose sind häufig Frakturen nach einem inadäquaten Trauma und betreffen etwa die Hälfte aller Frauen sowie ein Drittel aller Männer über 50 (Ross 1996, Kanis et. al 2000, Cummings 2002).

Das Lebenszeitrisiko, eine Fragilitätsfraktur gleich welcher Lokalisation zu erleiden, beträgt etwa 50% bei Frauen und 30% bei Männern, d.h., dass voraussichtlich jede zweite Frau und jeder dritte Mann ohne Behandlung im Verlauf seines Lebens eine symptomatische Fragilitätsfraktur erleiden wird (Kanis et al. 2000, Nguyen et al. 1996). Durch die demographische Gesellschaftsentwicklung kann man im Laufe der nächsten Jahrzehnte von einem deutlichen Anstieg dieses Risikos ausgehen.

Patienten mit Osteoporose, die bereits eine Fraktur erlitten haben, sind einem deutlich erhöhten Risiko für weitere Frakturen ausgesetzt (Cummings und Melton 2002). Diese Erkenntnisse zeigen die zentrale Bedeutung einer adäquaten Diagnostik und Therapie der Osteoporose.

Bis zu 95% aller Personen, die eine Fraktur erleiden, werden im Rahmen ihrer ambulanten oder stationären Behandlung nicht bezüglich einer Osteoporose evaluiert ,was zur Folge hat, dass diese Diagnose weder gestellt noch ausgeschlossen wird (Freedman et al. 2000). Weiterhin wird nur ein sehr geringer Anteil der Patienten, bei denen die Diagnose Osteoporose gestellt wurde, medikamentös behandelt, obwohl der Nutzen einer solchen Therapie zweifelsfrei belegt ist (Hajcsar et al. 2000, Bellantonio et al. 2001).

Bei einer Erkrankung mit einer derartigen Häufigkeit sollten nachgewiesenen effektive therapeutische Konzepte rasch umgesetzt werden. Die adäquate osteologische Versorgung setzt Kenntnisse über das Krankheitsbild Osteoporose, die erforderliche Diagnostik und die breite Palette möglicher Präventionsmaßnahmen voraus.

Für eine industrielle Gesellschaft wie die Bundesrepublik Deutschland erwächst aus den Folgen der Osteoporose wie Frakturen, Folgemorbidität, Pflegebedürftigkeit und erhöhter Mortalität. Im Zuge der Überalterung der Gesellschaft eine sozioökonomische Herausforderung, deren Kosten auf 10 Milliarden Euro geschätzt werden.

Mehr Aufmerksamkeit gegenüber dem gesamten Krankheitsbild Osteoporose und deren Therapie ist also erstrebenswert.

I.2 Frakturheilung

Es werden zwei Arten der Frakturheilung unterschieden, die primäre oder auch direkte und die sekundäre oder auch indirekte Knochenheilung.

Der Begriff primäre Frakturheilung beschreibt die callusfreie direkte Durchbauung des Frakturspaltes ohne Resorption der Fragmentenden, die nur nach osteosynthetischer Versorgung mit absoluter Ruhigstellung des Frakturspaltes vorkommt. Die Voraussetzung für diese Art der Knochenheilung ist die genaue Adaptation und Ruhigstellung der Frakturzone. Diese wird durch klassische Plattenosteosynthesen mit Zugschrauben und die dadurch erzielte Kompression erreicht. Weiterhin muss die Vitalität der Fragmente erhalten sein. Die Fragmentenden lassen sich nicht immer perfekt adaptieren, so dass häufig kleine Spalten vorhanden sind. Diese werden durch Lamellenknochen direkt aufgefüllt. Man spricht von Spaltheilung im Gegensatz zur Kontaktheilung, bei der direkt adaptierte Fragmentenden durch Osteone überbrückt werden. Bei der Kontaktheilung schneiden Osteoklasten sogenannte Bohrkanäle longitudinal von einem Fragment durch die Fraktur in das andere. Kapillaren sprossen ein und Osteoblasten füllen diesen entstandenen Kanal konzentrisch mit Lamellenknochen wieder auf.

Bei der Spaltheilung sprossen Kapillaren in den Spalt ein und Osteoblasten bauen Lamellenknochen oder bei etwas größeren Spalten Faserknochen auf, der dann zu Lamellenknochen umgebaut wird.

Die sekundäre oder indirekte Frakturheilung ist die natürliche Knochenheilung, die bei Ruhigstellung einer Fraktur im Gips statt findet. Sie erfolgt bei sogenannter relativer Stabilität. Diese biomechanische Situation ist definiert als eine Ruhigstellung mit begrenzten Relativbewegungen der Fragmente, die für eine knöcherne Heilung über Callus ausreicht. Dabei entsteht ausgehend vom Periost frakturfern der Callus, der aufeinander zu wächst und die Fraktur zunächst bindegewebig überbrückt. Parallel werden im Bereich der Fraktur

entstandene avitale Knochenareale resorbiert und durch Faserknochen ersetzt. Im letzten Schritt wird die Corticalis durchbaut und es entsteht wieder lamellärer Knochen. Während des Knochenumbaus (Remodelling) erlangt der Knochen wieder Steifigkeit und Festigkeit.

Bis die alte Knochenstruktur vollständig wiederhergestellt ist vergehen Jahre.

Nach Marknagelung und modernen überbrückenden Plattenosteosynthesen erfolgt die Knochenheilung ebenfalls unter relativer Stabilität über Callus. Die Phasen der indirekten Knochenheilung und Überbrückung der Fraktur durch Callus lassen sich im Tierversuch mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sehr gut untersuchen (Rahn et al. 1971). Zu bestimmten Zeitpunkten injizierte Farbstoffe reichern sich in jeweils in dieser Zeit entstandenen Arealen des Callus an, so dass die Callusbildung und die knöcherne Heilung mit dem Fluoreszenzmikroskop genau beobachtet werden können. Die Überbrückung einer Fraktur über Callus dauert etwa 5-8 Wochen.

1.3 Was ist Osteoporose?

1.3.1. Definition

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine reduzierte Knochenmasse und eine Veränderung der knöchernen Mikroarchitektur gekennzeichnet ist und konsekutiv zu einer Schwächung und damit einer verminderten Bruchfestigkeit führt (DVO 2006).

Die Ätiologie der Osteoporose ist multifaktoriell. Man kennt diverse Risikofaktoren, die größtenteils für beide Geschlechter gelten. Dazu gehören unter anderem zunehmendes Alter, Rassenzugehörigkeit, weibliches Geschlecht, niedriges Körpergewicht (BMI unter 20), Gewichtsverlust, extreme körperliche Inaktivität, Rauchen, geringe oder fehlende Sonnenexposition, Anamnese einer proximalen Femurfraktur bei den Eltern, chirurgische oder natürliche vorzeitige Menopause, späte Menarche, niedrige endogene Östrogenexposition, calciumarme Ernährung und rheumatoide Arthritis (Scheidt-Nave et al. 2003). Klinisch und therapeutisch wichtig ist die Einteilung in die primäre und die sekundäre Osteoporose.

Die primäre Osteoporose wird entsprechend dem Verteilungsmuster von Alter und Geschlecht in die postmenopausale und die Altersosteoporose unterteilt. Die postmenopausale Osteoporose ist durch einen Anstieg der Frakturrate durch ein inadäquates Trauma, einige

Jahre nach Eintritt der Menopause gekennzeichnet (Cummings und Melton 2002). Von der Altersosteoporose sind überwiegend Menschen über 75 Jahren betroffen, Frauen etwa doppelt so häufig wie Männer (DVO 2006).

Bei der sekundären Osteoporose entsteht diese als Folge einer Grunderkrankung, auch die sekundäre Osteoporose führt zu einem erhöhten Frakturrisiko. Die glukokortikoidinduzierte Osteoporose nimmt hierbei eine zentrale Rolle ein (Fitzpatrick 2002). Weitere Grunderkrankungen sind unter anderem Hyperthyreose, Hypogonadismus, Hyperparathyreodismus, Diabetes mellitus I und Anorexia nervosa (DVO 2006).

I.3.2 Pathophysiologie

Der Knochen besteht aus Supportzellen (Osteoblasten und Osteozyten), organischer Matrix aus Kollagen und Glykosaminoglykanen (Osteoid), anorganischen Mineralien, die in diese Matrix eingelagert werden und Zellen für den Umbau (Osteoklasten).

Knochen ist ein plastisches, dynamisches Gewebe, das ständig unter hormoneller Kontrolle und körperlicher Belastung auf und abgebaut wird. Er besteht aus einer äußeren Kortikalis und einer inneren Spongiosa mit Knochenbälkchen. Die Kortikalis bildet eine feste äußere Schale, die Verformungen widersteht, während das innere trabekuläre Maschenwerk durch eine Leichtbauweise aus inneren Verstrebungen Festigkeit gewinnt. In den Maschen zwischen den Knochen trabekeln liegt das Knochenmark.

Knochenzellen:

Folgende Zellen tragen zur Bildung, dem Erhalt und dem Umbau des Osteoids bei:

Knochen vorläuferzellen, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten.

Knochen vorläuferzellen stammen von Mesenchymzellen ab und bilden eine Stammzellpopulation, die sich zu stärker spezialisierten knochenbildenden Osteoblasten und Osteozyten differenzieren kann.

Osteoblasten synthetisieren den organischen Teil der Knochematrix, das Osteoid. Dieses besteht aus Typ-I-Kollagen, Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen. Nach dem Einbau der Osteoblasten in die Knochenmatrix spricht man von Osteozyten.

Osteozyten sind also inaktive, im mineralisierten Knochen eingeschlossene Osteoblasten.

Osteoklasten sind Riesenzellen, die für die Knochenresorption zuständig sind. Mit ihrem Bürstensaum umfassen sie eine Knochenzone, die sie durch Säure und Enzyme auflösen.

Die Knochenresorption durch Osteoklasten wird durch Parathormon, das in Abhängigkeit des Calcium-Ionen-Spiegels im Blut in der Nebenschilddrüse gebildet wird, stimuliert und durch Kalzitinin inhibiert. Dieses stammt aus den C-Zellen der Thyroidea und wird bei zu hohem Serumkalziumspiegel sezerniert (Stevens Lowe 1997).

Im gesunden, normalen Knochen halten sich die Osteoblasten - und Osteoklastentätigkeit die Waage, so dass die Knochenmasse konstant bleibt.

Modifiziert werden dies Vorgänge durch die Lebensweise, genetische Einflüsse, die Zufuhr der Knochenaufbaustoffe und den Einfluss der Sexualhormone. Diese spielen beim Erhalt der Knochenmasse eine ganz wesentliche Rolle. Zum Zeitpunkt der Pubertät wird das Skelettsystem für die Sexualhormone sensibel. Bei gleicher physikalischer Krafteinwirkung wird in Anwesenheit dieser Hormone mehr Knochen aufgebaut als ohne. Dadurch entsteht eine Art zusätzliches Kompartiment, das mit dem Ausfall der Keimdrüsenhormone wieder verloren geht. Beim weiblichen Geschlecht ist die Aufgabe dieses Zusatzknochens folgende: Während der Schwangerschaft muss der Fötus versorgt werden und das auch, wenn nur wenig Calcium in der Nahrung vorhanden ist. Mit der Infertilität während der Menopause entfällt diese Zusatzaufgabe, und der in der Pubertät hinzugewonnene Knochen geht etwa während eines Jahrzehnts verloren.

Die Steigerung der Skelettresorption bewirkt eine Calciumfreisetzung ins Blut. Dieser Anstieg vermindert die Ausschüttung von Parathormon in den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüse. Dies wirkt sich in doppelter Hinsicht auf die Niere aus. Die Calciumreabsorption wird schwächer, d.h. die Kalziurie nimmt zu. Außerdem wird in der Niere bei niedrigem PTH-Spiegel weniger Calcitriol aus Calcidiol gebildet und daher bei gleichem Calciumangebot weniger resorbiert.

Somit addieren sich zur postmenopausalen Negativierung der Calciumbilanz sowohl der verstärkte renale Verlust als auch die verminderte intestinale Absorption. Aus mehrjährigen negativen Calciumbilanzen und verstärkter Osteolyse resultiert schließlich eine verminderte Knochenmasse mit zunehmendem Osteoporoserisiko (Siegenthaler 2001).

I.3.3 Klinische Manifestation der Osteoporose und ihre Auswirkungen

Die Veränderung der knöchernen Mikroarchitektur und die reduzierte Knochenmasse bleiben zunächst symptomlos. Auch im weiteren Verlauf sind Symptome der Osteoporose, die Frakturereignissen vorausgehen, selten. Biomechanisch kommt es dann zu einer Fraktur, wenn die am Knochen auftretenden Kräfte seine mechanische Widerstandskraft überschreiten. Am stärksten betrifft dies Wirbelkörper, proximales Femur und distalen Radius, also Areale mit spongiosen, trabekulärem Knochen (Bartl et al. 2003). Die Diagnose einer Osteoporose wird allerdings nicht nur klinisch, also anhand der Fraktur, gestellt. Die empfohlene Basisdiagnostik besteht aus Anamnese, klinischem Befund, einer DXA-Knochendichtemessung und ggf. einem Basislabor und einer Röntgenuntersuchung der Brust- und Lendenwirbelsäule (DVO-Leitlinien 2006).

Die Inzidenz peripherer Fragilitätsfrakturen in der Gruppe der 50 bis 79-jährigen Patienten wird mit 19% bei Frauen und 7,3% bei Männern angegeben (Ismail et al. 2002). Distale Radiusfrakturen betreffen überwiegend Frauen über 65 Jahren und sind bei Frauen etwa viermal häufiger als bei Männern (WHO 2003). Proximale Humerusfrakturen finden sich in ca. 80% bei über 35-jährigen Personen und sind ebenso bei Frauen etwa viermal häufiger (Kanis et al. 2001). Die Inzidenz osteoporotischer Veränderungen der Wirbelsäule beträgt in einem europäischen Kollektiv 50 bis 79-jähriger Personen 10,7 pro 1000 Personenjahren bei Frauen und 5,7 pro 1000 Personenjahren bei Männern (EPOS 2002).

Fragilitätsfrakturen ziehen auf Grund der zahlreichen Komplikationen einer durch den Klinikaufenthalt bedingten Immobilität und der häufig notwendigen Anschlussbehandlung nicht unwesentliche sozio-ökonomische Folgen nach sich. Auf Grund von Komplikationen wie Pneumonien, Harnwegsinfekten, Depressionen und Druckulzerationen ist die Hüftfraktur die Fragilitätsfraktur mit der höchsten assoziierten Morbidität (Riggs und Melton 1995, Cree et al. 2000). Thorakale Wirbelfrakturen können durch eine resultierende Deformierung des Brustkorbs eine Einschränkung der Lungenfunktion nach sich ziehen (Schlaich et al. 1998).

In der Bundesrepublik Deutschland werden laut ökonomischen Schätzungen jährlich etwa 2,3 bis 3 Milliarden Euro für die Behandlung der Osteoporose ausgegeben. Besonders bemerkenswert ist hierbei, dass der Großteil dieses Geldes für die Versorgung der Fragilitätsfrakturen, also des Folgezustands der Osteoporose, ausgegeben wird, der deutlich geringere Anteil für die medikamentöse Therapie der Grunderkrankung (Krappweis et al. 1999, Scheidt- Nave 2001). Der gezieltere Einsatz medikamentöser Therapie und bessere

Erkenntnisse über eine prophylaktische Wirksamkeit antiresorptiver Substanzen, könnten also sowohl therapeutisch als auch ökonomisch zu erheblichen Fortschritten führen.

I.3.4. Diagnostik

Zur von der DVO empfohlenen Basisdiagnostik gehören, neben der Anamnese und dem klinischen Befund, eine DXA-Knochendichtemessung, ein Basislabor (BSG, CRP, Calcium in Serum und Urin) und eine Röntgenuntersuchung der Brust- und Lendenwirbelsäule.

Die Knochendichtemessung erfolgt in der Doppel-Röntgen-Energie-Absorptiometrie-Technik (dual-energy-X-ray absorptiometry, DXA). Gemessen wird hierbei der Kalzium-Hydroxylapatit-Gehalt des Knochens, z.B. des Wirbelkörpers oder Schenkelhalses.

Eine niedrige Knochendichte (T-Wert $< -2,0$) stellt die Grundlage für eine Definition der Osteoporose und einer spezifischen medikamentöse Therapie dar. Weiterhin können das Ausmaß der Knochendichteeinminderung erfasst, anhand von Referenzwerten das Frakturrisiko abgeschätzt und therapeutische Empfehlungen abgeleitet werden (DVO 2006).

Die Basislabordiagnostik dient hauptsächlich dem Ausschluss einer sekundären Osteoporose, also vor allem von Stoffwechselerkrankungen.

Das Röntgen der Wirbelsäule dient dem Nachweis von osteoporotischen Sinterungsfrakturen bzw. der differentialdiagnostischen Abklärung von Rückenschmerzen. Der DVO empfiehlt die Röntgenuntersuchung der Lenden- und Brustwirbelsäule bei akut aufgetretenen, starken und/oder unverändert über Tage anhaltenden umschriebenen Rückenschmerzen, außerdem bei chronischen Rückenschmerzen die bisher nicht abgeklärt wurden.

I.3.5 Therapie

Die folgenden Ausführungen basieren auf der Leitlinie des Dachverbandes Osteologie (DVO). Die aktualisierte Version von 2006 umfasst Empfehlungen zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der primären Osteoporose bei Frauen ab der Menopause und bei Männern ab dem 60. Lebensjahr.

I.3.1 Basismaßnahmen Prophylaxe

Im Mittelpunkt der Basismaßnahmen steht unter anderem die Sturzprophylaxe. Hierfür werden zunächst v.a. regelmäßige körperliche Aktivität im Sinne von Kraft –und Koordinationstraining

empfohlen. Außerdem ist die Möglichkeit einer Medikamentenrevision zu überprüfen sowie ein Vitamin-D-Mangel zu vermeiden. Schließlich kann auch die Nutzung von Hilfsmitteln wie z.B. Hüftprotektoren in Betracht gezogen werden.

Ein weiterer wichtiger Pfeiler der Basismaßnahmen ist die Optimierung des Ernährungs- und Lebensstils. Hierbei ist besonders auf eine kalziumreiche Ernährung (1200-1500 mg pro Tag), ausreichende Sonnenlichtexposition zur Bildung von Vitamin D, ggf. Supplementierung (800 Einheiten pro Tag), und den Verzicht auf Nikotin zu achten.

Schließlich sollte noch das Nutzen- Risikoverhältnis der Applikation von Sturz -und Osteoporose- fördernder Medikamente, wie z. B. Antiepileptika, Antidepressiva und orale Glukokortikoide, überprüft werden.

I.3.6 Pharmakotheapie der Osteoporose

Das zentrale Ziel der spezifischen Osteoporosetherapie besteht in der Vermeidung von Folgefrakturen. Sie wird bei allen Personen im Anschluss an eine osteoporotische Fraktur empfohlen. Wichtig ist hierbei ein rascher Therapiebeginn, da das Folgerisiko für Frakturen, nach osteoporotischen Frakturen hoch ist. Außerdem empfiehlt die DVO eine spezifische osteoporotische Therapie bei Personen mit T-Werten der DXA-Knochedichtemessung <-0.2 , an Wirbelsäule oder proximalem Femur.

Empfehlung für eine spezifische medikamentöse Therapie						
ohne WK-Fraktur Bei Lebensalter (Jahre)		T-Score (nur anwendbar auf DXA-Werte)				
<i>Frau</i>	<i>Mann</i>	-2,0 bis -2,5	-2,5 bis -3,0	-3,0 bis - 3,5	-3,5 bis -4,0	<-4,0
50-60	60-70	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja
60-65	70-75	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja
65-70	75-80	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja
70-75	80-85	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
>75	>85	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
mit WK-Fraktur		Ja				

Tab. 1: Empfehlungen für spezielle medikamentöse Osteoporosetherapie (aus den DVO-Leitlinien 2006)

I.4 Präparate

Die Wirksamkeit einer medikamentösen Therapie in Abhängigkeit von Messverfahren, wie der DXA-Knochendichtemessung, ist nicht belegt. Allerdings ist die Wirksamkeit, in Bezug auf das Frakturrisiko bei postmenopausalen Frauen, von antiresorptiven Substanzen belegt. Hierzu gehören: Alendronat, Östrogen, Ibandronat, Raloxifen, Risedronat, Stronium Ranelat und Teriparatid.

Alle vermindern nachweislich Wirbelkörperfrakturen nach 3 Jahren. Alle, außer Raloxifen und Ibandronat, vermindern nachweislich periphere Frakturen.

I.4.1 Alendronat

Alendronat gehört zur Gruppe der Bisphosphonate. Sie werden von Osteoklasten aufgenommen und hemmen deren Knochenresorption (Leu et al.2006). Es wirkt also vor allem dort, wo die Osteoklastenaktivität gerade hoch ist. Seine Wirksamkeit, bei postmenopausaler Osteoporose, wurde im Fracture Intervention Trial (FIT) mit 6457 Patienten bewiesen. Alendronat senkt die Häufigkeit von Wirbelfrakturen sowie Frakturen an Hüfte und Radius und steigert außerdem Knochendichte (Black et al. 1996, Cummings und Melton 2002).

I.4.2 Raloxifen

Bei Raloxifen handelt es sich um ein antiresorptives Medikament. Raloxifen ist ein selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator (SERM) und wirkt über direkte Interaktion mit den Östrogenrezeptoren (ER α und ER β). Die Wirkung des Raloxifens ist jedoch nicht immer mit der Östrogen-Wirkung agonistisch, dies ist gewebeabhängig. Östrogenidentische Wirkungen finden sich beim Knochen- und Lipidstoffwechsel, neutrale oder östrogenantagonistische Wirkungen an Mamma und Uterus. Die Tauglichkeit von Raloxifen für die Osteoporosetherapie wurde in der Studie „Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE)“ bewiesen. Es nahmen 7705 Frauen teil. Raloxifen konnte in dieser Studie die Knochendichte der Wirbelsäule und des Oberschenkelhalses erhöhen und das Risiko für Wirbelkörperfrakturen reduzieren (Ettinger et al. 1999).

I.4.3 Hormonersatztherapie

2002 veröffentlichte die „Women’s Health Initiative“ aus den USA eine für die Pharmakotherapie der Osteoporose wichtige Studie. 16.608 postmenopausale Frauen zwischen 50 und 79 sollten über 8,5 Jahre entweder mit Östrogen und Progesteron oder mit einem Placebo behandelt werden. Zwar senkte die Hormonersatztherapie das Risiko für Hüftfrakturen, steigerte allerdings gleichzeitig das Risiko für Mammakarzinom, KHK, Schlaganfall und Lungenembolie, sodass die Studie schließlich nach 5,2 Jahren abgebrochen wurde (Rossouw et al.2007). Die Indikation zur Einnahme dieser Präparate sollte also nicht leichtfertig gestellt werden. Die genaue Abwägung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses wird derzeit in zahlreichen Studien evaluiert. So empfiehlt der Dachverband Osteologie (DVO) in ihren aktuellen Leitlinien die Östrogeneinnahme bei postmenopausalen Frauen „in der Regel nur, wenn vasomotorische Beschwerden der Haupteinnahmegrund sind“.

I.4.4 Phytohormone

Phytoöstrogene gehören chemisch zu den Polyphenolen. Sie finden sich in über 300 Pflanzen, vor allem in den äußeren Schichten der Pflanzenorgane, und dienen als sekundäre Schutzstoffe. Alle Phytoöstrogene können im Wesentlichen 3 Strukturklassen zugeordnet werden: den Isoflavonen, den Lignanen oder den Coumestanen. Allen gemeinsam ist eine östrogene Aktivität. Im menschlichen Körper interagieren Phytoöstrogene wie das weibliche Sexualhormon mit den Östrogenrezeptoren (ER), da ihre chemische Struktur dem 17 β -Estradiol ähnelt. Sie entfalten Ihre Wirkung über die Bindung an Östrogenrezeptorer alpha (ER) und Östrogenrezeptoren beta (ER β), die beide von Osteoblasten exprimiert werden. Über die Bindung an einen oder beide dieser Östrogenrezeptoren entfalten die Phytoöstrogene eine dem endogenen Östrogen agonistische oder auch antagonistische Wirkung. Damit werden sie der Gruppe der SERMs zugeordnet (Brzezinski und Debi 1999).

I.4.5 Soja

Die Sojabohne gehört zur Familie der Hülsenfruchtartigen (Leguminosae) und enthält die Isoflavone Genistein, Daidzein und Glycitein. Diese Inhaltsstoffe binden sowohl an ER α als auch an ER β (Kuiper et al. 1998).

Soja soll im Alterungsprozess protektiv wirken, u.a. bei der Entstehung von Mamma- und Prostatakarzinomen, bei klimakterischen Beschwerden, Osteoporose, Arteriosklerose und positive Effekte hinsichtlich der Erhaltung der kognitiven Funktion haben. Zum Beweis dieser Vermutungen existieren viele Studien, die aber zum Teil sehr widersprüchliche Ergebnisse liefern. In einem Review diverser Studien und eigener Ergebnisse schreiben Wuttke et al., dass Sojapräparate in den meisten klinischen Studien klimakterische Beschwerden nicht verbessern konnten, jedoch einen leichten osteoprotektiven Effekt zu haben scheinen (Wuttke et al. 2003 c).

I.4.6 Cimicifuga racemosa (CR)

Die Traubensilberkerze (syn. Frauenwurz) stammt aus der Familie der Ranunculaceae (Hahnenfußgewächse). Verwendet wird der getrocknete Wurzelstock (Rhizoma), der Triterpenglykoside (z.B. Actein), Flavonoide und andere Inhaltsstoffe enthält. Der CR-Extrakt BNO 1055 besitzt teils östrogenagonistische, teils östrogenantagonistische Wirkungen. Welche Inhaltsstoffe für diese Wirkungen verantwortlich sind, konnte bisher nicht ermittelt werden. Auch interagiert CR nicht mit ER α oder ER β , sondern mit bisher nicht bekannten Bindungsstellen (Jarry et al. 2003). Der CR-Extrakt suprimiert die LH-Sekretion und kann an den Tibiae ovariectomierter Ratten den Verlust metaphysärer Knochenmasse teilweise verhindern (gemessen im pQCT). Eine Wirkung auf den Uterus zeigte sich nicht (Seidlova-Wuttke et al. 2003 a). Cimicifuga racemosa ist als Arzneifertigpräparat erhältlich und kann bei Dysmenorrhoe und PMS eingesetzt werden. Zudem ist CR eine immer beliebtere Alternative zur Hormonersatztherapie bei klimakterischen Beschwerden. In einer randomisierten, doppelblinden klinischen Studie bewies der CR-Extrakt BNO 1055 den konjugierten Östrogenen entsprechende Effekte in Bezug auf Knochenstoffwechsel und klimakterische Beschwerden, jedoch nicht auf den Uterus (Seidlova-Wuttke et al.2003).

I.5. Fluoreszenzentstehung

Bei der Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge, dem so genannten Anregungslicht, ist bei verschiedenen Molekülen eine gleichzeitige Emission von Licht größerer Wellenlänge zu beobachten. Dieses Verhalten, also die Absorption von kurzwelligem Licht bei Emission von längerwelligem Licht, wird Fluoreszenz genannt. Der Name leitet sich vom Fluorit ab, da es dessen Eigenschaft aufweist. Elektronen der fluoreszierenden Moleküle absorbieren dabei Photonen und gelangen dadurch auf ein höheres Energieniveau. Die Elektronen können sich allerdings nicht auf diesem hohen Energieniveau halten und fallen praktisch augenblicklich auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Dabei setzen sie die zuvor aufgenommene Energie wieder frei. Dies geschieht durch die Emission von Fluoreszenzlicht. Da die Energie nicht nur in Form von Licht freigegeben wird ist das emittierte Licht etwas energieärmer als das Anregungslicht. Energieärmere Lichtstrahlung besitzt eine größere Wellenlänge und eine andere Lichtfarbe als energiereichere Lichtstrahlung.

Diese Eigenschaft der Absorption von kurzwelligem Licht und der Emission von längerwelligem Licht wird auch als Stokes-Regel bezeichnet. Die Differenz der Wellenlänge beider Lichtarten wird als Stokes-Differenz bezeichnet und beträgt meist etwa 20-50 μm .

Eine Reihe von organischen und anorganischen Stoffen wie auch Knochen zeigen von Natur aus eine Eigenfluoreszenz, eine so genannte Primärfluoreszenz. Lagert man Substanzen die fluoreszieren, so genannte Fluorochrome, an Strukturen an und bringt sie dadurch zu leuchten, nennt man dies Fluorchromierung oder Sekundärfluoreszenz. Die Sekundärfluoreszenz am Knochen ist deutlich stärker als dessen Primärfluoreszenz.

Die besondere Affinität der Fluorochrome zu Knochengewebe erklärt sich durch die Bildung von Calcium-Fluochrom-Chelaten und der festen Bindung an Calciumphosphatdihydroxid, d.h. einer Einlagerung in mineralisierten Knochen.

I.6. Polychrome Sequenzmarkierung

Bei der polychromen Sequenzmarkierung werden unterschiedliche Farbstoffe in bestimmten Zeitabständen hintereinander verabreicht. Sie werden während der Mineralisationsphase der Knochenbildung in den Knochen eingelagert. Durch Untersuchung der Fluoreszenz kann, nach Abschluss der Versuche, im Knochen der geopferten Tiere genau beurteilt werden

welche Knochenneubildung in welcher Phase entstanden ist. Auf diese Weise kann der zeitliche Ablauf der Knochenheilung verfolgt werden.

An die Substanzen zur Fluorochrommarkierung müssen verschiedene Anforderungen gestellt werden. Die Fluoreszenz soll scharf begrenzt sein und sich von den anderen verwendeten Substanzen möglichst deutlich unterscheiden, der Einfluss auf den Knochenmetabolismus soll möglichst gering sein, außerdem sollte die Substanz allgemein gut verträglich sein. Weiterhin sollte die Substanz weder durch die histologischen Weiterverarbeitung beeinträchtigt werden noch durch die Anregung mit ultraviolettem Licht.

Bereits 1958 wurde beschrieben, dass Tertrazykline sich in verkalkendem Knochen einlagern und in ultraviolettem Licht als gelbe Fluoreszenz sichtbar werden (Milch et al. 1958).

Neue Fluorochrome wie Calceingrün, Alizarinkomplexon, Calceinblau und Xylenolorange wurden entdeckt, wodurch die polychrome Sequenzmarkierung möglich wurde (Rahn et al 1971). Diese Farben erfüllen das generelle Gebot, keine lokale oder generalisierte Toxizität zu besitzen, die die Knochenbildung und somit den Versuch beeinflussen könnten. Sie werden weiterhin nicht durch die Fixierung und die Einbettung in Methylmethacrylat verändert. Dadurch können intravital markierte Knochen auch mit anderen histologischen Färbungen versehen werden (Rahn et al. 1980).

I.7. Die ovariectomierte Ratte als Modell für die postmenopausale Osteoporose

Das zentrale Ziel bei der Auswahl von Versuchstieren sollte sein ein Tier mit möglichst großer Ähnlichkeit zum Menschen, sowohl hinsichtlich des Stoffwechsels als auch dessen Reaktion auf äußere Einflüsse, zu finden. In Bezug auf die postmenopausale Osteoporose der Frau sollte also ein Tier verwendet werden welches auf ein ovarielles Hormondefizit, sei dieses spontan oder induziert, mit Knochenverlust reagiert.

Eines der hierfür am häufigsten verwendeten Tiere ist die ovariectomierte Ratte. Zahlreiche Untersuchungen wurden vor allem in Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Osteopenie ovariectomierter Ratten mit der postmenopausalen Osteoporose der Frau durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass der durch die Ovariectomie induzierte Knochenverlust der Ratte in vielen Punkten den Folgen des Knochenverlusts im menschlichen Klimakterium gleicht (Kalu 1991).

Sowohl bei der Frau als auch bei der Ratte kommt es unter Östrogenmangel zu einem erhöhten Knochenumbau, wobei die Knochenresorption die Knochenneubildung übertrifft. Nach einer frühen schnellen Phase des Knochenverlusts folgt eine deutlich langsamere Phase (Wronski und Yen 1991). Eine weitere wichtige Gemeinsamkeit ist, dass postmenopausale Knochentherapeutika, vor allem Bisphosphonate, auch bei ovariectomierten Ratten knochenprotektiv wirken (Fleisch 1997).

Li et al. zeigten 1991 außerdem, dass das Längenwachstum der proximalen Tibia von weiblichen Sprague-Dawley Ratten bis zum Alter von 6 Monaten schnell ansteigt, sich dann verringert, um im Alter von 12 Monaten unbedeutend zu werden und mit 18 Monaten durch Verknöcherung der Epiphysenfuge vollständig beendet ist. Nach Kalu werden daher zwei Studienmodelle unterschieden. Das „aged rat model“ beschreibt 6 bis 24 Monate alte Tiere mit vollständig ausgereiftem Skelettsystem. Das „mature rat model“ beschreibt 3 bis 6 Monate alte Tiere mit nahezu ausgereiftem Skelettsystem.

Die Zyklusdauer einer weiblichen Ratte beträgt 4 bis 5 Tage. Daher reagiert die Ratte sehr rasch auf hormonelle Veränderungen. Im Gegensatz zu anderen Tiermodellen lassen sich also bei der Ratte Effekte auf den Knochen in kürzester Zeit darstellen. Der Zeitpunkt zwischen Ovariectomie und Ausbildung einer massiven Osteopenie beträgt 10-12 Wochen.

Die ovariectomierte Ratte wird zurzeit von der WHO als Tiermodell empfohlen um den durch den Östrogenmangel verursachten Knochenverlust zu untersuchen (WHO Guidelines 1998). Auch die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) empfiehlt die ovariectomierte Ratte für die präklinische Testung von Medikamenten für die Prophylaxe und Therapie der postmenopausalen Osteoporose (Thompson et al. 1995).

1.8 Ziel der Arbeit

Wie die vorausgegangenen Ausführungen zeigen liegt die Schwierigkeit im Umgang mit Osteoporose nicht in den Erkenntnissen über den Pathomechanismus oder in den diagnostischen Möglichkeiten, sondern in der rechtzeitigen Therapie der Erkrankung.

Mit Therapeutika, die den osteoporotischen Knochenverlust frühzeitig verlangsamen, oder gar verhindern, könnte das Auftreten von Folgefrakturen und deren weit reichende Folgen deutlich verringert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es Pharmaka, deren antiresorptive Wirkung und prophylaktische Wirkung in Bezug auf ein verringertes Frakturrisiko im osteoporotischen Knochen schon in

zahlreichen Studien belegt wurde, auf deren Wirkung auf die Knochenheilung nach Fraktur und Osteosynthese in einem Tiermodell zu untersuchen.

Dafür wurde die Frakturheilung in einem neuen Tiermodell nach Osteotomie und Osteosynthese im Bereich der proximalen Tibia an ovariectomierten Ratten zu einem frühen Zeitpunkt der Osteoporoseentwicklung mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie beobachtet.

Beantwortet werden soll die Frage, ob die Knochenheilung unter den Bedingungen einer sich entwickelnden Osteoporose durch die untersuchten Medikamente positiv beeinflusst werden kann.

II. Material und Methoden

II.1 Versuchstiere und Haltung

II.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 72 weibliche, 3 Monate alte Sprague- Dawley- Ratten. Ihr durchschnittliches Gewicht betrug ca. 240g.

II.1.2 Futter

Die Tiere erhielten in rationierter Fütterung sojafreie Futterpellets. Diese bestehen aus Kohlenhydraten, Protein, Fett, Getreide und Mineralstoffen.

Leitungswasser aus Nippelflaschen stand ihnen ständig zur Verfügung.

Die Tiere wurden nach den gesetzlichen Vorgaben gehalten. Die Studie wurde mit der Genehmigung der Bezirksregierung Braunschweig und nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Erlaubnis 12.05.2003, AZ 509.4250/01-53.03 Bezirksregierung Braunschweig).

II.1.3. Die Gruppeneinteilung

Die 72 Ratten wurden in sechs Gruppen aufgeteilt, denen je 12 Tiere angehörten und die zu sechs Tieren pro Käfig gehalten wurden.

Die Tierhaltung erfolgte in der Tierexperimentellen Abteilung der Universität zu Göttingen.

Sowohl die Kontrollgruppe als auch eine ovariectomierte Gruppe erhielt sojafreies Futter.

Die restlichen Gruppen wurden nach Futter eingeteilt in die Östrogen -Alendronat- Raloxifen- und Cimicifugagruppe.

Gruppe (je 12 Tiere)	Ovarektomie	Plattenostheosynthese	Futter
1	Nein	ja	sojafrei
2	Ja	ja	sojafrei
3	Ja	ja	Alendronat (10mg/kg Futter)
4	Ja	ja	Raloxifen (166,5mg/kg Futter)
5	Ja	ja	Cimicifuga (1,66g/kg Futter)
6	Ja	ja	Estrogen (17,4 mg/kg Futter)

Tab. 2: Gruppeneinteilung

Die Futterpellets enthielten zusätzlich zum Wirkstoff Kohlenhydrate, Protein, Fett, Getreide und Mineralstoffen und wurden täglich gefüttert

II.2 Frakturmodell

Als Frakturmodell diente die proximale Tibia der Ratte.

II.2.1 Operative Technik

Die Tiere wurden einer Ovarektomie unterzogen, um sie in die gewünschte Stoffwechsellage zu versetzen. Dafür wurden die, mit Ketamin und Xylazin anästhesierten Ratten, zunächst gewogen und im Lendenbereich rasiert.

Darauf folgte ein 2-3 cm lange Hautschnitt, die darunter liegende Muskulatur wurde durchtrennt und mit einer anatomischen Pinzette eine Öffnung zur Bauchhöhle präpariert. Durch diese Öffnung wurde das Ovar vorsichtig frei präpariert und entfernt.

Die Hautwunde wurde mit Verschlussklammern wieder verschlossen. Anschliessend erfolgte die Ovariectomie auf der anderen Seite.

60 der 72 Tiere wurden diesem Procedere unterzogen, die restlichen 12 gehörten der Kontrollgruppe an.

Bei allen 60 Tieren folgte in gleicher Narkose beidseits eine Osteotomie im metaphysären Bereich der proximalen Tibia. Bei 12 zusätzlichen Tieren wurde keine Ovariectomie und lediglich die Osteotomie und Osteosynthese durchgeführt.

Über einen anteromedialen Zugang von der Mitte des Femur bis zur Mitte der Tibia erfolgte die Präparation der proximalen Tibia, unter Schonung der Muskulatur. Eine Kanüle markierte die tibiale Gelenkfläche des Kniegelenks um die regelrechte Achse der Osteotomie sicherzustellen.

Es erfolgte die Anlage einer 5-Loch –Leibinger T-Platte aus Titan (57-05140, Stryker Trauma, Selzach, Schweiz), die leicht vorgebogen wurde. Die Fixierung erfolgte mit 2 proximalen und 2 distalen 1,2 mm Schrauben an der antero-medialen Tibiafläche. Zur Durchführung der Osteotomie wurde die Platte wieder entfernt. Die Osteotomie erfolgte 7 mm distal der tibialen Gelenkfläche mit einer Ultraschallsäge (Piezosurgery ®, Mectron Medical Technology, Carasco, Italien). Diese schneidet ausschließlich hartes Material und ermöglicht so die Schonung der unliegenden Muskulatur, Gefäße und Nerven.



Abbildung 1: Durchführung der Osteotomie

Nach durchgeführter Osteotomie erfolgte die erneute Anlage der Platte in der vorbereiteten Position. Der Osteotomiespalt berug 1mm. Die Muskelfaszie wurde wieder verschlossen mit Vicryl ® 4.0 (Eticon Noerderstedt, Johnson & Johnson, Germany). Nach Desinfektion erfolgte der Wundverschluss mit Klammern (Michel Wundklammern 12 x 3 mm, Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Gemany).



Abbildung 2: Durchführung der Osteosynthese

Es folgte die Lagerung der Ratten auf Wärmeplatten und prophylaktische Single-shot-Antibiose mit Langzeitpenicillin und Dihydrostreptomycin® mit Depotwirkung.

Die postoperative Analgesie erfolgte durch eine Kombination aus Temgesic 0,0625 , Rimadyl (2ml Lsg.) und Decantan (0,125 ml)

II.3. Die Polychrome Sequenzmarkierung

Während der Frakturheilung erfolgte die subcutane Injektion mit vier Fluochromen (Merck, Darmstadt, Germany) um den Knochenumbau zu markieren.

Die Markierung startete am 13. Tag postop mit Xylenolorange Tetranatriumsalz (XO).

Es folgte Calceingrün (CG) am 18. Tag. Am 24.Tag und am 26. Tag wurde mit Alizarinkomplex (AK) markiert. Zuletzt folgte die Applikation von Tetracyclinhydrochloride (TC) am 31. und 35. Tag.

Die Fluochrome befanden sich in Lösungen, die zusammen mit der jeweiligen Dosierung in der folgenden Tabelle aufgeführt ist.

Fluochrom	Lösung	Dosierung	Applikation
Xylenolorange	3g/100 ml aqua dest.	90 mg/ kg	13. Tag
Calceingrün (CG)	9g/100 ml aqua dest.	10 mg/kg	18.Tag
Alizarinkomplex (AZ)	3g/100 ml aqua dest.	30 mg/kg	24. - 26. Tag
Tetracycline (TC)	2,5g/100 ml aqua dest.	25 mg/kg	31.- 35. Tag

Tab. 3: Zeitpunkt der Fluochrominjektionen

II.4. Präparation

Am 35. Tag, folgte 2 Stunden nach der TC –Applikation, die Dekapitation unter Anästhesie, und die Präparation der Tibiae incl. Plattenentfernung. (Röntgen erwähnen, mit allen Details) Dieser Zeitpunkt wurde gewählt um Fehlerquellen durch beginnende Resorption von bereits gebildetem Callus zu verhindern.

Zunächst wurden Haut, Muskeln, Sehnen und Weichteilgewebe von den Tibiae entfernt. Dann wurde das einliegende Osteosynthesematerial entfernt und hierbei die Stabilität der Schrauben untersucht.

II.5. Präparate

Im Anschluss an die Präparation wurden die Tibiae umgehend bei -20°C gelagert. Darauf wurden sie in Ethanollösung aufsteigender Konzentration eingelegt (40%-100%), um sie zu entwässern und zu entfetten.

Danach wurden sie in eine 1:1 Ethanol- Methylmethacrylsäure (MMA) eingelegt. Schließlich wurden sie in einem Gemisch aus 1000 ml MMA, 200 ml Dibutylphthalat und 29 g Benzoylperoxid eingebettet. Aufbewahrt wurden die Tibiae in Rollrandflaschen, die nach dem Aushärten zerschlagen wurden.

Diese ausgehärteten Blöcke wurden mit dem LEICA Sägemikrotom 1600 in 150 Mikrometer dicke Längsschnitte gesägt. Ausgewählte Schnitte, nämlich die drei pro Tibia in Folge die die beste Heilung auswiesen, wurden geröntgt.

Es wurden also 3 Längsschnitte pro Tibia bemessen. Als Ergebnis verwendet wurde der daraus errechnete Mittelwert.

II.6. Die Fluoreszenzmikroskopie

Die Präparate wurden mit der Methode der Auflichtmikroskopie untersucht. Das Erregerlicht fällt dabei im 45° - Winkel auf das Präparat. Im Vergleich zur Durchlichtmikroskopie ist so die Lichtausbeute bei der Fluoreszenzmikroskopie besser, da das Emissionslicht nicht durch das Präparat selber gefiltert wird und ein Sperrfilter mit geringer Absorption gewählt werden kann.

Als Lichtquelle wurde der Quecksilberhöchstdruckbrenner HBO 50 verwendet.

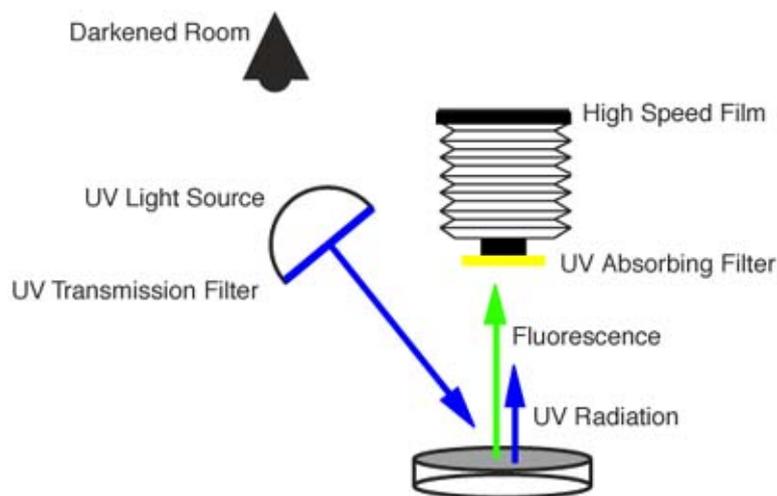


Abbildung 3: Prinzip der Auflichtfluoreszenzmikroskopie

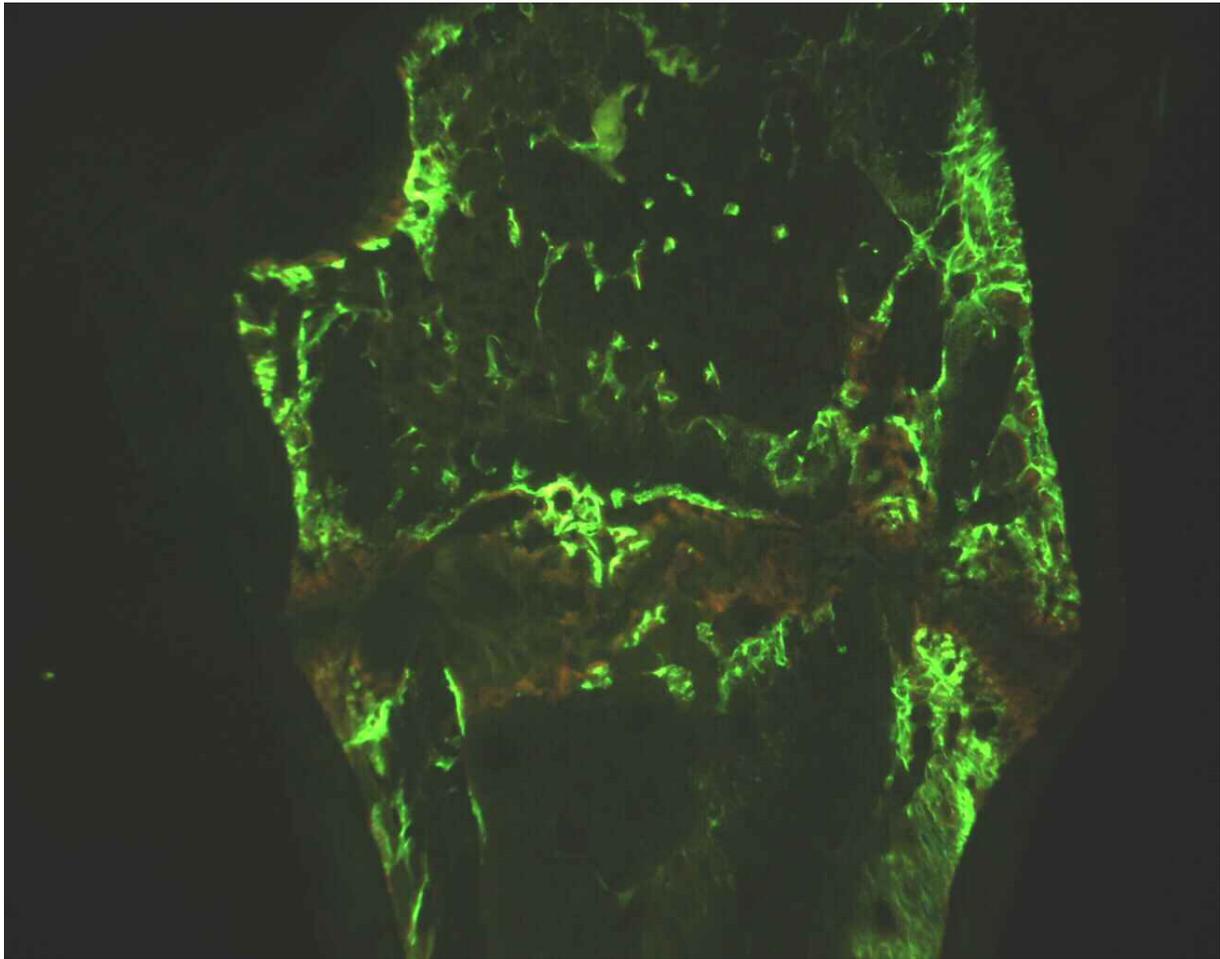


Abbildung 4: Ansicht eines Längsschnittes im Fluoreszenzmikroskop

II.7. Datenanalyse

Die Quantifizierung des zum jeweiligen Zeitpunkt gebildeten Callus erfolgte wie folgt:

Die Ansicht der Präparate durch das Fluoreszenzmikroskop wurde durch eine Kamera (Leica) aufgenommen und in das Auswertungsprogramm übertragen.

Alle Aufnahmen wurden in der gleichen Weise ausgerichtet, sodass der Osteotomiespalt immer genau in der Mitte des in die Bemessung eingehenden Bildausschnittes war.

Der Vergrößerungsfaktor durch die Kamera wurde konstant gehalten.

II.7.1 Messung der Längsschnitte

Von den Längspräparaten wurde jeweils ein Ausschnitt fotografiert, der quer zur Längsachse der Tibiae lag. Dadurch wurde gewährleistet, dass die gesamte Breite des Knochens, die durch unterschiedliche Knochendicke und Kallusbildung variierte, im Bild enthalten war. Die Größe des Bildausschnittes war festgelegt, wobei genau mittig immer der Osteomiespalt lag. Für alle Präparate wurde dadurch gewährleistet, dass die Vergrößerungen durch das Fotografieren identisch waren.

Zunächst wurde die gesamte Knochen/-Kallusfläche im festgelegten Bildausschnitt umfahren und berechnet. Diese Gesamtfläche wurde in 3 Abschnitte unterteilt: Plattennah, Endostal, Plattenfern.

Orientiert wurde sich hierfür an der Kortikalis. Die Fläche innerhalb der plattennahen und der plattenfernen Kortikalis entspricht dem endostal gebildeten Kallus.

Die Flächen außerhalb der Kortikalis ergaben jeweils die Fläche für plattennah und plattenfern gebildeten Kallus.

Die Kortikalisfläche selbst ging nicht mit in die Berechnungen ein.

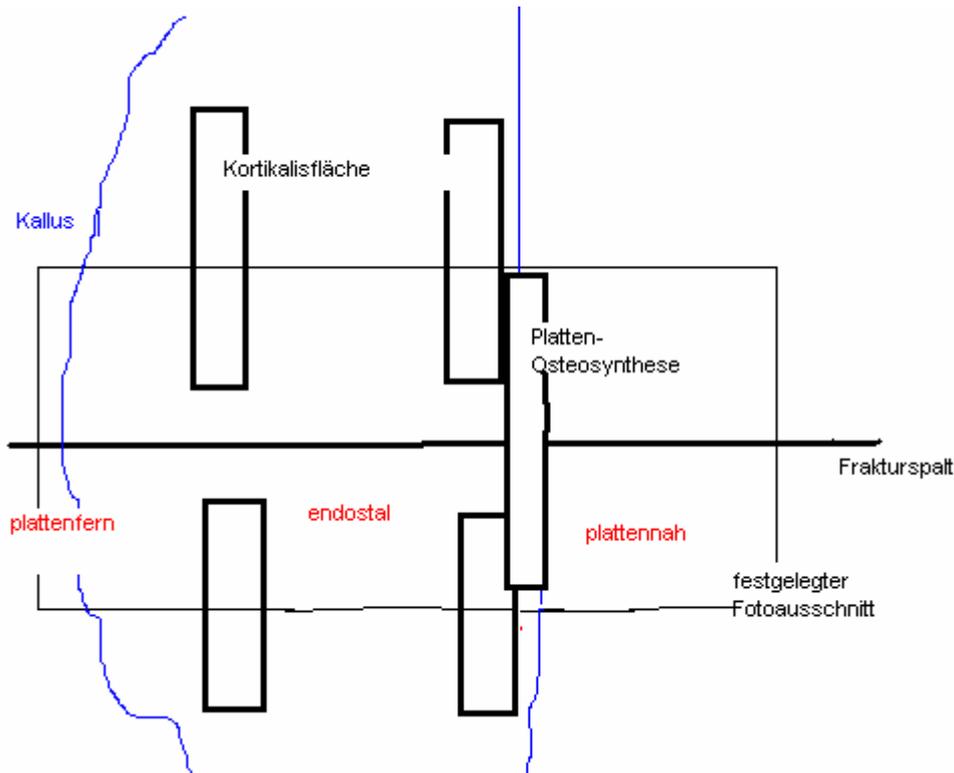


Abbildung 5 : Schematische Darstellung der Längsschnitte

II.7.2 Datenverarbeitung

Innerhalb eines Bildes ergaben sich folgende Flächen:

Callus gesamt entspricht dem kompletten untersuchten Zeitraum Tag 1-35

Calceingrün entspricht (inclusive Xenylorange) dem 1.-24. postoperativen Tag

Alizarinkomplex entspricht dem 24.-31. postoperativen Tag

Tetracyclin entspricht dem 31.-35. postoperativen Tag.

Diese 4 Flächen wurden jeweils für die Unterabschnitte plattennah, endostal und plattentfern gemessen und je Tibia wurden 3 Schnitte gemessen.

II.7.3 Deskriptive Statistik

Für die Berechnung und Darstellung der Messwerte in den Graphiken wurde das Programm Excel 4.0 der Microsoft Cop. verwendet.

Die Darstellung der Werte erfolgte zunächst in einer Einzelwertdarstellung für alle Daten. Da es pro Tibia bzw. Tier jeweils drei Längsschnitte gab wurden diese Werte gemittelt.

Es ergaben sich also Mittelwerte für die Flächen die mit dem jeweiligen Fluochrom markiert waren und so in einen zeitlichen Zusammenhang mit der Callusbildung gestellt werden konnten. Die Farben Calceingrün und Xenylorange wurden, aus oben genannten Gründen nicht getrennt dargestellt.

II.7.4 Beurteilende Statistik

Die weitere Bearbeitung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm Graph Pad Prsm 4.0.

Die Mittelwerte der berechneten Callusflächen von allen Tieren einer Gruppe wurden addiert. Die Summe ergab die in die Graphen eingehende gesamte gebildete Callusfläche zum jeweiligen Zeitraum, dann bezogen auf die jeweilige Gruppe bzw. das jeweilige Pharmakon.

Die in der Graphik dargestellte Fläche setzt sich also zusammen aus den Mittelwerten der pro Tier 3 mal gemessenen Fläche und dies jeweils für alle 12 Tiere pro Gruppe/Pharmakon.

III. Ergebnisse

III.1 Zusammenfassung Gruppeneinteilung

Insgesamt gingen, wie im Methodenteil dargestellt, von 72 Rattentibiae je 3 Schnitte in die Auswertung ein.

60 ovariectomierte Tiere erhielten in Gruppen von 12 Tieren Alendronat, Raloxifen, Cimicifuga und Östrogen bzw. keine Hormonersatztherapie. Als Vergleichsgruppe dienten 12 osteosynthetisierte aber nicht ovariectomierte Tiere.

Farbstoffe wurden zur Vorbereitung der Fluoreszenzmikroskopie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Osteotomie und Plattenosteosynthese verabreicht:

Xylenolorange am 13.Tag

Calceingrün am 18.Tag

Alizarin-Komplex am 24.Tag

Tetracyclin am 35.Tag

Der Emissionsbereich von Xylenolorange überschneidet sich mit dem von Calceingrün sodaß bei der Messung von Calceingrün ein Anteil von Xylenolorange mitgemessen wird. Dadurch entsteht ein systematischer Fehler. Daher sind Calceingrün und Xylenolorange nur für eine gemeinsame quantitative Auswertung geeignet. Daraus ergibt sich zu den einzelnen Fluochromen folgender zeitliche Zusammenhang zur Frakturheilung:

Calceingrün beschreibt also den Zeitraum von 1.-24. postoperativen Tag.

Alizarinkomplex beschreibt den Zeitraum vom 24.-31. postoperativen Tag.

Tetracyclin beschreibt den Zeitraum vom 31.- 35. postoperativen Tag.

III.2. Zeitlicher Verlauf Frakturheilung

Auf der plattennahen Seite zeigte sich wenig Callus.

Endostal war die Callusbildung deutliche ausgeprägt und gut zu validieren.

Am meißten Callus bildete sich im plattenfernen Bereich, sowohl interfragmentär als auch periostal.

Im zeitlichen Verlauf zeigte sich zu Beginn der Knochenheilung ähnliche Werte in den Gruppen. Deutliche Unterschiede zeigten sich vor allem im weiteren Verlauf also zu etwas späteren Zeitpunkten der Knochenheilung.

In ersten frühen gemessenen Zeitfenster (Calceingrün Tag 1-24) wurde in allen Gruppen recht ausgeprägt Callus gebildet. Besondere Aufmerksamkeit wurde auf die zum späteren Zeitpunkt gebildete Callusmenge gerichtet. Die Zeitfenster sind daher für die späteren Zeitpunkte deutlich kürzer gewählt.

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung und planimetrische Vermessung des plattenfernen, plattennahen und endostalen Callus nach Osteotomie im Bereich der proximalen Tibia und Plattenosteosynthese standen insgesamt 1728 Flächenwerte des Callus zur Verfügung.

Die planimetrisch erfasste Callusmenge in Quadratmillimeter ist im folgenden tabellarisch und graphisch dargestellt.

III.3 Auswertung

III.3.1. Werte für Callus plattennah gesamt

Parameter	Value			
Table Analyzed				
Callus plattennah				
One-way analysis of variance				
P value	0,1375			
Are means signif. different? (P < 0.05)	No			
Number of groups	6			
F	1,758			
R squared	0,1423			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	14,91			
P value	0,0107			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	2,286	5	0,4572	
Residual (within columns)	13,78	53	0,26	
Total	16,07	58		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
intakt vs ovx	0,06663	0,4022	P > 0.05	-0.6270 to 0.7603
intakt vs alendronat	-0,02504	0,1553	P > 0.05	-0.7002 to 0.6501
intakt vs raloxifen	-0,4777	2,884	P > 0.05	-1.171 to 0.2160
intakt vs cimicifuga	0,00176	0,01092	P > 0.05	-0.6734 to 0.6769
intakt vs estrogen	0,1563	0,9923	P > 0.05	-0.5033 to 0.8160
ovx vs alendronat	-0,09167	0,5533	P > 0.05	-0.7853 to 0.6020
ovx vs raloxifen	-0,5443	3,203	P > 0.05	-1.256 to 0.1673
ovx vs cimicifuga	-0,06487	0,3916	P > 0.05	-0.7585 to 0.6288
ovx vs estrogen	0,0897	0,5535	P > 0.05	-0.5889 to 0.7683
alendronat vs raloxifen	-0,4527	2,732	P > 0.05	-1.146 to 0.2410
alendronat vs cimicifuga	0,0268	0,1662	P > 0.05	-0.6484 to 0.7020
alendronat vs estrogen	0,1814	1,151	P > 0.05	-0.4783 to 0.8410
raloxifen vs cimicifuga	0,4795	2,894	P > 0.05	-0.2142 to 1.173
raloxifen vs estrogen	0,634	3,912	P > 0.05	-0.04453 to 1.313
cimicifuga vs estrogen	0,1546	0,9811	P > 0.05	-0.5051 to 0.8142

Tabelle 4 : Statistische Auswertung Callus plattennah

III.3.2. Graphik für Callus plattennah gesamt

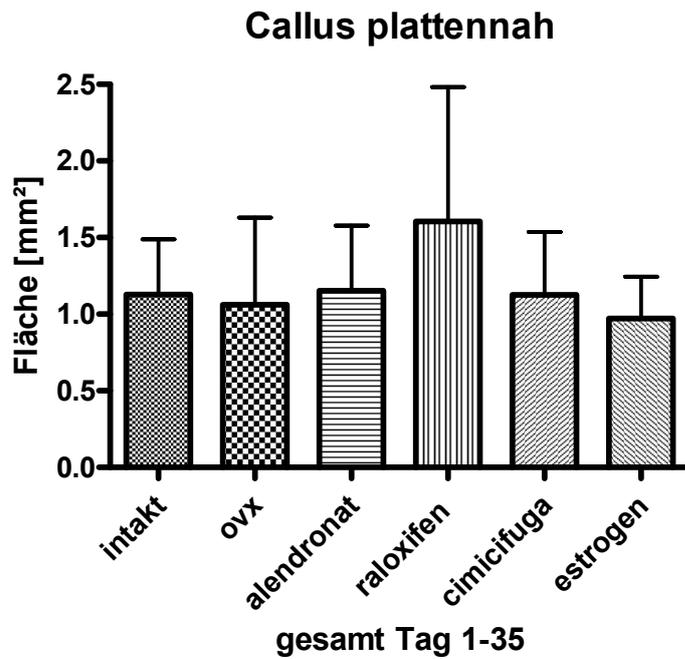


Abbildung 6 : Graphische Darstellung Callus plattennah

Die gesamte plattennahe Callusbildung vom 1 bis 35. postoperativen Tag ergab keine signifikanten Unterschiede der einzelnen Gruppen gegeneinander.

II.3.3 Werte für Calceingrün plattennah

Parameter	Value			
Table Analyzed				
CG Callus plattennah				
One-way analysis of variance				
P value	0,1592			
Are means signif. different? (P < 0.05)	No			
Number of groups	6			
F	1,665			
R squared	0,1358			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	10,66			
P value	0,0587			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	0,9096	5	0,1819	
Residual (within columns)	5,79	53	0,1092	
Total	6,7	58		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
intakt vs ovx	-0,03062	0,2851	P > 0.05	-0.4803 to 0.4190
intakt vs alendronat	0,07784	0,7447	P > 0.05	-0.3598 to 0.5155
intakt vs raloxifen	-0,2127	1,981	P > 0.05	-0.6624 to 0.2369
intakt vs cimicifuga	0,1019	0,9753	P > 0.05	-0.3357 to 0.5396
intakt vs estrogen	0,1846	1,808	P > 0.05	-0.2430 to 0.6122
ovx vs alendronat	0,1085	1,01	P > 0.05	-0.3412 to 0.5581
ovx vs raloxifen	-0,1821	1,653	P > 0.05	-0.6434 to 0.2792
ovx vs cimicifuga	0,1326	1,234	P > 0.05	-0.3171 to 0.5822
ovx vs estrogen	0,2152	2,049	P > 0.05	-0.2246 to 0.6551
alendronat vs raloxifen	-0,2906	2,706	P > 0.05	-0.7402 to 0.1591
alendronat vs cimicifuga	0,0241	0,2306	P > 0.05	-0.4135 to 0.4617
alendronat vs estrogen	0,1068	1,046	P > 0.05	-0.3208 to 0.5344
raloxifen vs cimicifuga	0,3147	2,93	P > 0.05	-0.1350 to 0.7643
raloxifen vs estrogen	0,3973	3,782	P > 0.05	-0.04251 to 0.8372
cimicifuga vs estrogen	0,08267	0,8096	P > 0.05	-0.3449 to 0.5103

Tabelle 5: statistische Auswertung CG plattennah

III.3.4. Graphik für Calceingrün plattennah

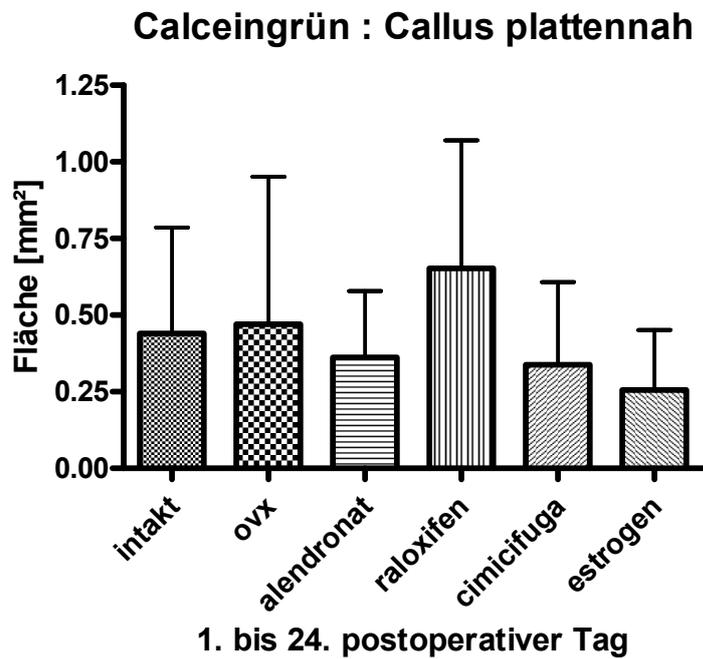


Abbildung 7: graphische Darstellung Calceingrün plattennah

Die plattennahe Calusbildung bis zum 24. postoperativen Tag zeigte keine signifikanten Unterschiede der Gruppen untereinander.

III.3.5. Werte für Alizarinkomplex plattennah:

Parameter	Value			
Table Analyzed				
AK Callus plattennah				
One-way analysis of variance				
P value	0,3894			
Are means signif. different? (P < 0.05)	No			
Number of groups	6			
F	1,065			
R squared	0,08685			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	12,68			
P value	0,0266			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	0,1547	5	0,03093	
Residual (within columns)	1,626	56	0,02904	
Total	1,781	61		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
intakt vs ovx	0,0285	0,5289	P > 0.05	-0.1966 to 0.2536
intakt vs alendronat	-0,1017	1,932	P > 0.05	-0.3216 to 0.1182
intakt vs raloxifen	-0,0929	1,724	P > 0.05	-0.3180 to 0.1322
intakt vs cimicifuga	0,0049	0,09093	P > 0.05	-0.2202 to 0.2300
intakt vs estrogen	-0,01305	0,248	P > 0.05	-0.2330 to 0.2068
ovx vs alendronat	-0,1302	2,473	P > 0.05	-0.3501 to 0.08971
ovx vs raloxifen	-0,1214	2,253	P > 0.05	-0.3465 to 0.1037
ovx vs cimicifuga	-0,0236	0,438	P > 0.05	-0.2487 to 0.2015
ovx vs estrogen	-0,04155	0,7893	P > 0.05	-0.2615 to 0.1783
alendronat vs raloxifen	0,008791	0,167	P > 0.05	-0.2111 to 0.2287
alendronat vs cimicifuga	0,1066	2,025	P > 0.05	-0.1133 to 0.3265
alendronat vs estrogen	0,08864	1,725	P > 0.05	-0.1260 to 0.3032
raloxifen vs cimicifuga	0,0978	1,815	P > 0.05	-0.1273 to 0.3229
raloxifen vs estrogen	0,07985	1,517	P > 0.05	-0.1401 to 0.2997
cimicifuga vs estrogen	-0,01795	0,341	P > 0.05	-0.2379 to 0.2019

Tabelle 6: statistische Auswertung Alizarinkomplex plattennah

III.3.6. Graphik für Alizarinkomplex plattennah

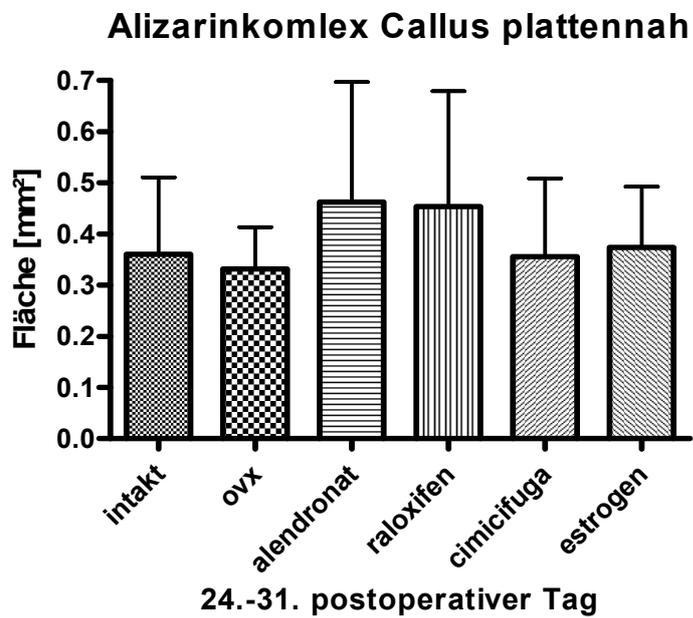


Abbildung 8 : graphische Auswertung Alizarinkomplex plattennah

Die plattennahe Callusbildung von 24.-31. postoperativen Tag zeigte keine signifikanten Unterschiede der Gruppen untereinander.

III.3.7. Werte für Tetracyclin plattennah

Parameter	Value			
Table Analyzed				
TC Callus plattennah				
One-way analysis of variance				
P value	0,0276			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	6			
F	2,756			
R squared	0,2064			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	10,72			
P value	0,0572			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	0,534	5	0,1068	
Residual (within columns)	2,054	53	0,03875	
Total	2,588	58		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
intakt vs ovx	-0,089	1,356	P > 0.05	-0.3638 to 0.1858
intakt vs alendronat	0,09766	1,527	P > 0.05	-0.1701 to 0.3655
intakt vs raloxifen	-0,1347	2,152	P > 0.05	-0.3966 to 0.1273
intakt vs cimicifuga	-0,2004	3,055	P > 0.05	-0.4752 to 0.07431
intakt vs estrogen	-0,03539	0,5657	P > 0.05	-0.2974 to 0.2266
ovx vs alendronat	0,1867	2,919	P > 0.05	-0.08113 to 0.4545
ovx vs raloxifen	-0,04567	0,7299	P > 0.05	-0.3076 to 0.2163
ovx vs cimicifuga	-0,1114	1,698	P > 0.05	-0.3862 to 0.1633
ovx vs estrogen	0,05361	0,8568	P > 0.05	-0.2084 to 0.3156
alendronat vs raloxifen	-0,2323	3,82	P > 0.05	-0.4870 to 0.02233
alendronat vs cimicifuga	-0,2981	4,661	P < 0.05	-0.5659 to -0.03031
alendronat vs estrogen	-0,1331	2,188	P > 0.05	-0.3877 to 0.1216
raloxifen vs cimicifuga	-0,06578	1,051	P > 0.05	-0.3277 to 0.1962
raloxifen vs estrogen	0,09927	1,673	P > 0.05	-0.1493 to 0.3478
cimicifuga vs estrogen	0,1651	2,638	P > 0.05	-0.09692 to 0.4270

Tabelle 7: statistische Auswertung Tetracyclin plattennah

III.3.8. Graphik für Tetracyclin plattennah

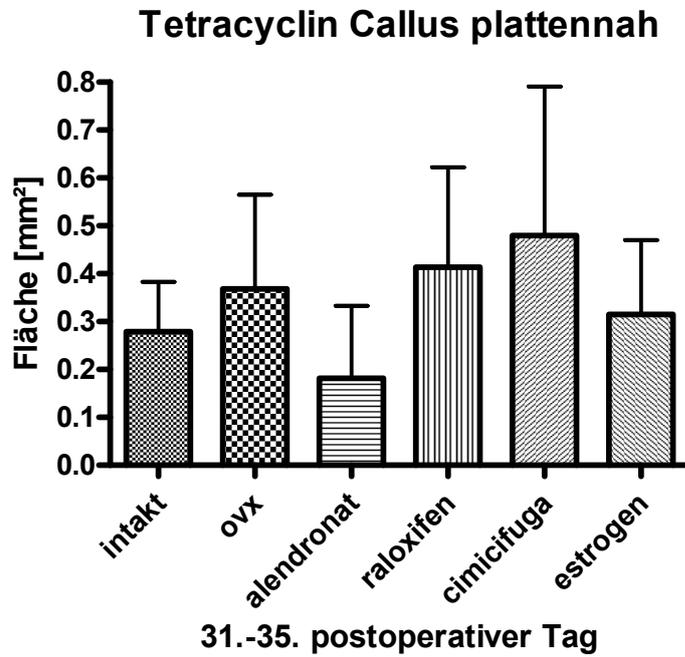


Abbildung 9: graphische Auswertung Tetracyclin plattennah

Die plattennahe Callusbildung von 31.-35. postoperativen Tag zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen Alendronat und Cimicifuga ($P < 0,05$). Die Callusbildung unter Cimicifuga war zu diesem späten Zeitpunkt deutlich höher als in der Gruppe, die Bisphosphonat erhielt.

III.3.9. Werte für Callus plattenfern gesamt

Parameter	Value			
Table Analyzed				
Callus plattenfern				
One-way analysis of variance				
P value	0,1293			
Are means signif. different? (P < 0.05)	No			
Number of groups	6			
F	1,799			
R squared	0,1475			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	5,1			
P value	0,4038			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	6,329	5	1,266	
Residual (within columns)	36,58	52	0,7035	
Total	42,91	57		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
intakt vs ovx	-0,1607	0,5898	P > 0.05	-1.303 to 0.9812
intakt vs alendronat	-0,009011	0,03307	P > 0.05	-1.151 to 1.133
intakt vs raloxifen	-0,614	2,253	P > 0.05	-1.756 to 0.5279
intakt vs cimicifuga	-0,9186	3,286	P > 0.05	-2.090 to 0.2530
intakt vs estrogen	-0,2206	0,8096	P > 0.05	-1.363 to 0.9213
ovx vs alendronat	0,1517	0,572	P > 0.05	-0.9598 to 1.263
ovx vs raloxifen	-0,4533	1,709	P > 0.05	-1.565 to 0.6582
ovx vs cimicifuga	-0,7578	2,781	P > 0.05	-1.900 to 0.3841
ovx vs estrogen	-0,0599	0,2258	P > 0.05	-1.171 to 1.052
alendronat vs raloxifen	-0,605	2,281	P > 0.05	-1.716 to 0.5065
alendronat vs cimicifuga	-0,9095	3,338	P > 0.05	-2.051 to 0.2324
alendronat vs estrogen	-0,2116	0,7978	P > 0.05	-1.323 to 0.8999
raloxifen vs cimicifuga	-0,3045	1,118	P > 0.05	-1.446 to 0.8374
raloxifen vs estrogen	0,3934	1,483	P > 0.05	-0.7181 to 1.505
cimicifuga vs estrogen	0,6979	2,561	P > 0.05	-0.4440 to 1.840

Tabelle 8: statistische Auswertung Kallus plattenfern

III.3.10 Graphik für Callus plattenfern gesamt

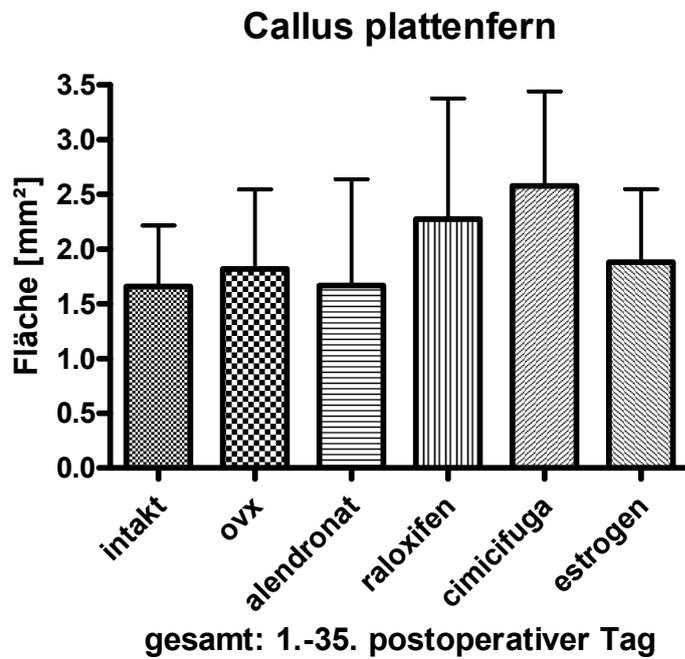


Abbildung 10: graphische Darstellung Callus plattenfern gesamt

Die plattenferne Callusbildung zeigte insgesamt keine signifikanten Unterschiede der Gruppen untereinander.

III.3.11. Werte für Calceingrün plattenfern

Parameter	Value			
Table Analyzed				
CG Callus plattenfern				
One-way analysis of variance				
P value	0,2036			
Are means signif. different? (P < 0.05)	No			
Number of groups	6			
F	1,507			
R squared	0,1266			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	5,915			
P value	0,3146			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	1,306	5	0,2613	
Residual (within columns)	9,013	52	0,1733	
Total	10,32	57		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
intakt vs ovx	-0,2333	1,725	P > 0.05	-0.8001 to 0.3336
intakt vs alendronat	-0,1418	1,048	P > 0.05	-0.7086 to 0.4251
intakt vs raloxifen	-0,4641	3,431	P > 0.05	-1.031 to 0.1028
intakt vs cimicifuga	-0,3809	2,745	P > 0.05	-0.9624 to 0.2007
intakt vs estrogen	-0,2846	2,104	P > 0.05	-0.8514 to 0.2823
ovx vs alendronat	0,0915	0,695	P > 0.05	-0.4602 to 0.6432
ovx vs raloxifen	-0,2308	1,753	P > 0.05	-0.7825 to 0.3209
ovx vs cimicifuga	-0,1476	1,091	P > 0.05	-0.7144 to 0.4192
ovx vs estrogen	-0,0513	0,3897	P > 0.05	-0.6030 to 0.5004
alendronat vs raloxifen	-0,3223	2,448	P > 0.05	-0.8740 to 0.2294
alendronat vs cimicifuga	-0,2391	1,768	P > 0.05	-0.8059 to 0.3277
alendronat vs estrogen	-0,1428	1,085	P > 0.05	-0.6945 to 0.4089
raloxifen vs cimicifuga	0,08319	0,615	P > 0.05	-0.4836 to 0.6500
raloxifen vs estrogen	0,1795	1,363	P > 0.05	-0.3722 to 0.7312
cimicifuga vs estrogen	0,09631	0,712	P > 0.05	-0.4705 to 0.6631

Tabelle 9: Statistische Auswertung Calceingrün plattenfern

III.3.12. Graphik für Calceingrün plattenfern

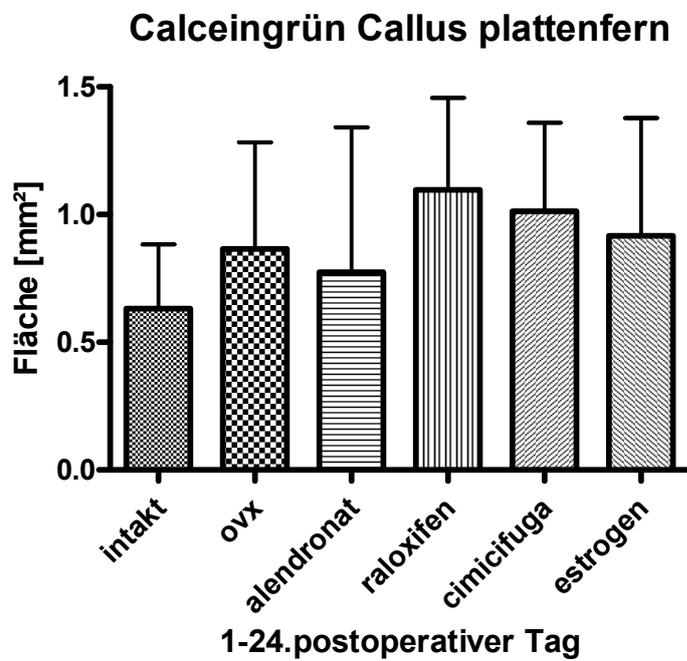


Abbildung 11: graphische Auswertung Calceingrün plattenfern

Die plattenferne Callusbildung vom 1-24. postoperativen Tag zeigte keine signifikanten Unterschiede der Gruppen untereinander.

III.3.13. Werte für Alizarinkomplex plattenfern

Parameter	Value			
Table Analyzed				
AK Callus plattenfern				
One-way analysis of variance				
P value	0,0023			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	6			
F	4,287			
R squared	0,2804			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	5,443			
P value	0,3643			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	1,723	5	0,3447	
Residual (within columns)	4,422	55	0,0804	
Total	6,146	60		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
intakt vs ovx	0,2051	2,341	P > 0.05	-0.1612 to 0.5713
intakt vs alendronat	0,0025	0,02788	P > 0.05	-0.3723 to 0.3773
intakt vs raloxifen	-0,0146	0,1628	P > 0.05	-0.3894 to 0.3602
intakt vs cimicifuga	-0,3598	4,013	P > 0.05	-0.7346 to 0.01503
intakt vs estrogen	-0,0558	0,6223	P > 0.05	-0.4306 to 0.3190
ovx vs alendronat	-0,2026	2,312	P > 0.05	-0.5688 to 0.1637
ovx vs raloxifen	-0,2197	2,507	P > 0.05	-0.5859 to 0.1466
ovx vs cimicifuga	-0,5649	6,448	P < 0.001	-0.9311 to -0.1986
ovx vs estrogen	-0,2609	2,978	P > 0.05	-0.6271 to 0.1054
alendronat vs raloxifen	-0,0171	0,1907	P > 0.05	-0.3919 to 0.3577
alendronat vs cimicifuga	-0,3623	4,04	P > 0.05	-0.7371 to 0.01253
alendronat vs estrogen	-0,0583	0,6502	P > 0.05	-0.4331 to 0.3165
raloxifen vs cimicifuga	-0,3452	3,85	P > 0.05	-0.7200 to 0.02963
raloxifen vs estrogen	-0,0412	0,4595	P > 0.05	-0.4160 to 0.3336
cimicifuga vs estrogen	0,304	3,39	P > 0.05	-0.07083 to 0.6788

Tabelle 10: statistische Auswertung Alizarinkomple plattenfern

III.3.14. Graphik für Alizarinkomplex plattenfern

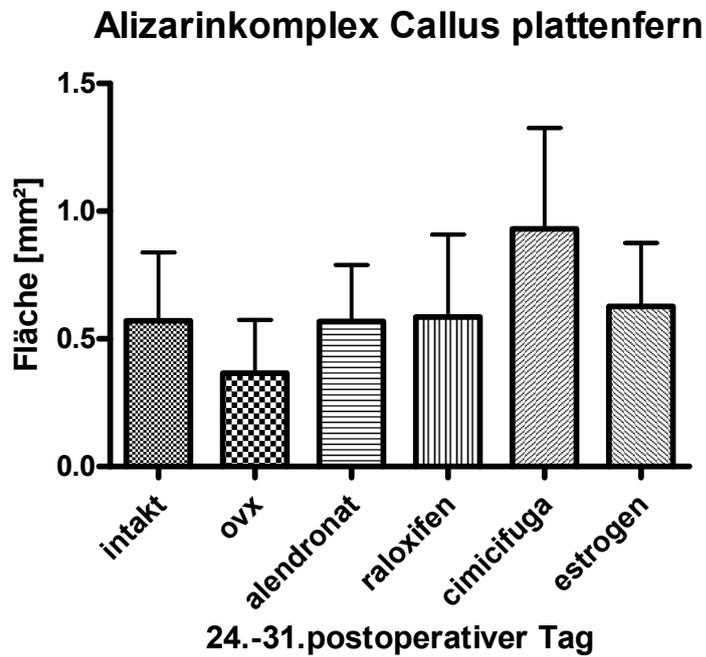


Abbildung 12: graphische Auswertung Alizarinkomplex plattenfern

Die plattenferne Callusbildung zwischen dem 24. und 31. postoperativen Tag, zeigte einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,01$) zwischen der ovariectomierten/sojafreien Gruppe und der Cimicifuga-Gruppe. Die Cimicifuga-Gruppe zeigt zu diesem Zeitpunkt plattenfern die höchste Callusbildung. Die anderen Futtergruppen können sich nicht signifikant gegen die hormonersatzmittelfreie Gruppe absetzen.

III.3.15. Werte für Tetracyclin plattenfern

Parameter	Value			
Table Analyzed				
TC Callus plattenfern				
One-way analysis of variance				
P value	0,0332			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	6			
F	2,647			
R squared	0,2029			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	32,45			
P value	P<0.0001			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	1,593	5	0,3186	
Residual (within columns)	6,259	52	0,1204	
Total	7,852	57		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
intakt vs ovx	0,1217	1,068	P > 0.05	-0.3560 to 0.5994
intakt vs alendronat	0,1032	0,8869	P > 0.05	-0.3844 to 0.5908
intakt vs raloxifen	-0,0383	0,3291	P > 0.05	-0.5259 to 0.4493
intakt vs cimicifuga	-0,2804	2,41	P > 0.05	-0.7680 to 0.2072
intakt vs estrogen	0,2489	2,088	P > 0.05	-0.2506 to 0.7484
ovx vs alendronat	-0,01854	0,1729	P > 0.05	-0.4677 to 0.4306
ovx vs raloxifen	-0,16	1,493	P > 0.05	-0.6092 to 0.2891
ovx vs cimicifuga	-0,4021	3,752	P > 0.05	-0.8513 to 0.04704
ovx vs estrogen	0,1272	1,153	P > 0.05	-0.3349 to 0.5892
alendronat vs raloxifen	-0,1415	1,29	P > 0.05	-0.6013 to 0.3183
alendronat vs cimicifuga	-0,3836	3,496	P > 0.05	-0.8434 to 0.07615
alendronat vs estrogen	0,1457	1,293	P > 0.05	-0.3267 to 0.6180
raloxifen vs cimicifuga	-0,2421	2,207	P > 0.05	-0.7019 to 0.2177
raloxifen vs estrogen	0,2872	2,548	P > 0.05	-0.1852 to 0.7595
cimicifuga vs estrogen	0,5293	4,696	P < 0.05	0.05694 to 1.002

Tabelle 11: statistische Auswertung Tetracyclin plattenfer

III.3.16 Graphik für Tetracyclin plattenfern

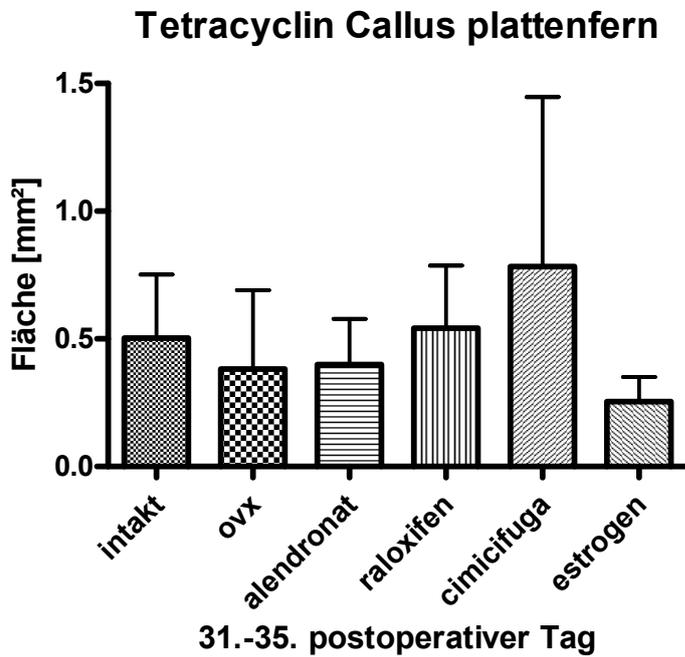


Abbildung 13: graphische Auswertung der Callusbildung in der Tetracyclin-Markierung plattenfern

Die plattenferne Callusbildung, vom 31. bis 35. postoperativen Tag, zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der Östrogen –und Cimicifuga –Gruppe ($p < 0,05$). Unter Cimicifugatherapie zeigt sich zu diesem späten Zeitpunkt die meiste Callusbildung.

III.3.17. Werte für Callus endostal gesamt

Parameter	Value			
Table Analyzed				
Callus endostal				
One-way analysis of variance				
P value	0,4743			
Are means signif. different? (P < 0.05)	No			
Number of groups	6			
F	0,9217			
R squared	0,08			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	11,43			
P value	0,0435			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	1,474	5	0,2949	
Residual (within columns)	16,96	53	0,3199	
Total	18,43	58		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
intakt vs ovx	0,3069	1,628	P > 0.05	-0.4826 to 1.096
intakt vs alendronat	0,2183	1,214	P > 0.05	-0.5344 to 0.9710
intakt vs raloxifen	-0,0797	0,4337	P > 0.05	-0.8492 to 0.6898
intakt vs cimicifuga	-0,1403	0,7635	P > 0.05	-0.9098 to 0.6292
intakt vs estrogen	0,1114	0,6062	P > 0.05	-0.6581 to 0.8809
ovx vs alendronat	-0,08862	0,493	P > 0.05	-0.8413 to 0.6641
ovx vs raloxifen	-0,3866	2,104	P > 0.05	-1.156 to 0.3829
ovx vs cimicifuga	-0,4472	2,433	P > 0.05	-1.217 to 0.3223
ovx vs estrogen	-0,1955	1,064	P > 0.05	-0.9649 to 0.5740
alendronat vs raloxifen	-0,298	1,705	P > 0.05	-1.030 to 0.4337
alendronat vs cimicifuga	-0,3586	2,052	P > 0.05	-1.090 to 0.3731
alendronat vs estrogen	-0,1069	0,6116	P > 0.05	-0.8386 to 0.6248
raloxifen vs cimicifuga	-0,0606	0,3388	P > 0.05	-0.8095 to 0.6883
raloxifen vs estrogen	0,1911	1,068	P > 0.05	-0.5578 to 0.9400
cimicifuga vs estrogen	0,2517	1,407	P > 0.05	-0.4972 to 1.001

Tabelle 12: statistische Auswertung Callus endostal gesamt

III.3.18. Graphik für Callus endostal gesamt

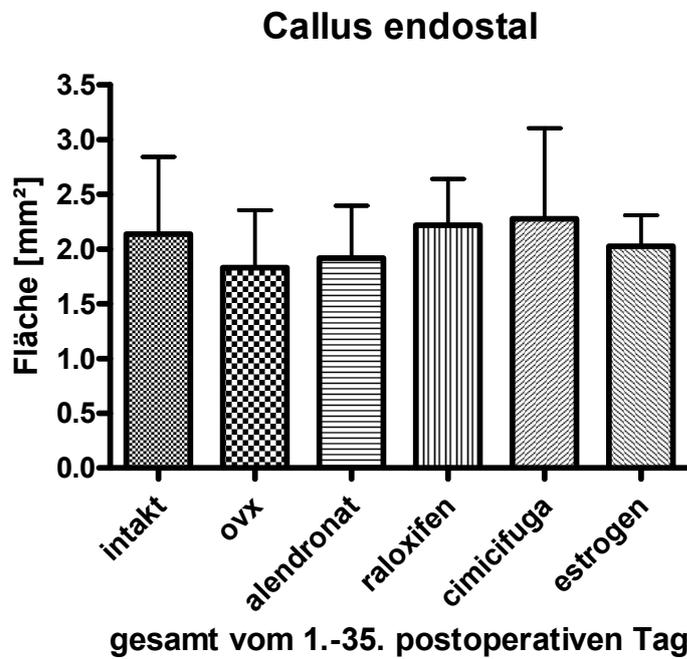


Abbildung 14: graphische Auswertung Callus endostal gesamt

Die gesamte endostale Callusbildung ergab keine signifikanten Unterschiede der Gruppen untereinander.

III.3.19. Werte für Calceingrün endostal

Parameter	Value			
Table Analyzed				
CG Callus endostal				
One-way analysis of variance				
P value	0,0003			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	6			
F	5,573			
R squared	0,3489			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	7,473			
P value	0,1878			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	1,911	5	0,3823	
Residual (within columns)	3,567	52	0,06859	
Total	5,478	57		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
intakt vs ovx	0,1997	2,347	P > 0.05	-0.1569 to 0.5562
intakt vs alendronat	0,4222	4,837	P < 0.05	0.05639 to 0.7881
intakt vs raloxifen	0,2195	2,579	P > 0.05	-0.1371 to 0.5760
intakt vs cimicifuga	0,3148	3,699	P > 0.05	-0.04180 to 0.6713
intakt vs estrogen	-0,1191	1,4	P > 0.05	-0.4757 to 0.2374
ovx vs alendronat	0,2226	2,616	P > 0.05	-0.1340 to 0.5791
ovx vs raloxifen	0,0198	0,2391	P > 0.05	-0.3273 to 0.3669
ovx vs cimicifuga	0,1151	1,39	P > 0.05	-0.2320 to 0.4622
ovx vs estrogen	-0,3188	3,849	P > 0.05	-0.6659 to 0.02826
alendronat vs raloxifen	-0,2028	2,383	P > 0.05	-0.5593 to 0.1538
alendronat vs cimicifuga	-0,1075	1,263	P > 0.05	-0.4640 to 0.2491
alendronat vs estrogen	-0,5414	6,362	P < 0.001	-0.8979 to -0.1848
raloxifen vs cimicifuga	0,0953	1,151	P > 0.05	-0.2518 to 0.4424
raloxifen vs estrogen	-0,3386	4,088	P > 0.05	-0.6857 to 0.008461
cimicifuga vs estrogen	-0,4339	5,239	P < 0.01	-0.7810 to -0.08684

Tabelle 13: statistische Auswertung Calceingrün endostal

III.3.20 Graphik für Calceingrün endostal

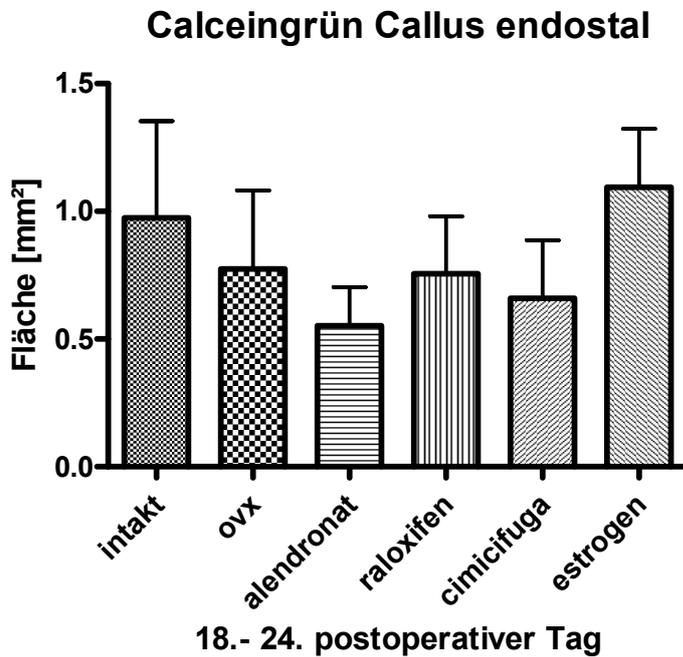


Abbildung 15: graphische Auswertung Calceingrün endostal

Zwischen dem 18. und 24. postoperativen Tag zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Alendronat-Gruppe ($p < 0,05$), zwischen der Alendronat und- Östrogen-Gruppe ($p < 0,01$) sowie zwischen der Cimicifuga- und Östrogen-Gruppe ($p < 0,01$). Zu diesem frühen Zeitpunkt zeigt sich also im endostalen Bereich eine Überlegenheit von Östrogen gegenüber Cimicifuga und Alendronat.

III.3.21. Werte für Alizarinkomplex endostal

Parameter	Value			
Table Analyzed				
AK Callus endostal				
One-way analysis of variance				
P value	0,0045			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	6			
F	3,872			
R squared	0,2603			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	9,337			
P value	0,0964			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	1,754	5	0,3507	
Residual (within columns)	4,982	55	0,09058	
Total	6,735	60		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
intakt vs ovx.	0,09433	0,9647	P > 0.05	-0.3144 to 0.5031
intakt vs alendronat	-0,4194	4,385	P < 0.05	-0.8192 to -0.01954
intakt vs raloxifen	-0,1969	2,059	P > 0.05	-0.5968 to 0.2029
intakt vs cimicifuga	-0,1641	1,678	P > 0.05	-0.5728 to 0.2447
intakt vs estrogen	-0,02187	0,2236	P > 0.05	-0.4306 to 0.3869
ovx. vs alendronat	-0,5137	5,525	P < 0.01	-0.9024 to -0.1250
ovx. vs raloxifen	-0,2913	3,132	P > 0.05	-0.6800 to 0.09743
ovx. vs cimicifuga	-0,2584	2,715	P > 0.05	-0.6562 to 0.1394
ovx. vs estrogen	-0,1162	1,221	P > 0.05	-0.5140 to 0.2816
alendronat vs raloxifen	0,2225	2,451	P > 0.05	-0.1569 to 0.6018
alendronat vs cimicifuga	0,2553	2,746	P > 0.05	-0.1334 to 0.6440
alendronat vs estrogen	0,3975	4,275	P < 0.05	0.008829 to 0.7862
raloxifen vs cimicifuga	0,03287	0,3535	P > 0.05	-0.3558 to 0.4216
raloxifen vs estrogen	0,1751	1,883	P > 0.05	-0.2136 to 0.5638
cimicifuga vs estrogen	0,1422	1,494	P > 0.05	-0.2556 to 0.5400

Tabelle 14: statistische Auswertung Alizarinkomplex endostal

II.3.22 Graphik für Alizarinkomplex endostal

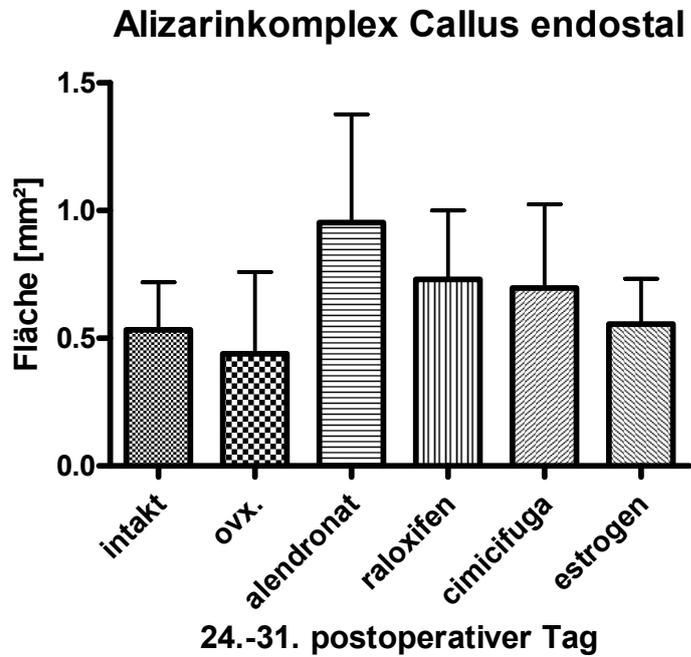


Abbildung 16: graphische Auswertung Alizarinkomplex endostal

Zwischen dem 24. und 31. postoperativen Tag zeigt sich endostal eine signifikant höhere Callusbildung nach Alendronat (Bisphosphonat) gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,05$), der ovariectomierten ($p < 0,01$) und gegenüber der Östrogengruppe ($p < 0,05$).

III.3.23. Werte für Tetracyclin endostal

Parameter	Value			
Table Analyzed				
TC Callus endostal				
One-way analysis of variance				
P value	0,0063			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	6			
F	3,644			
R squared	0,2422			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	11,12			
P value	0,0491			
P value summary				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	2,514	5	0,5029	
Residual (within columns)	7,867	57	0,138	
Total	10,38	62		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
intakt vs ovx	0,0859	0,7312	P > 0.05	-0.4044 to 0.5762
intakt vs alendronat	-0,06352	0,5534	P > 0.05	-0.5425 to 0.4155
intakt vs raloxifen	-0,1387	1,208	P > 0.05	-0.6177 to 0.3403
intakt vs cimicifuga	-0,5373	4,573	P < 0.05	-1.028 to -0.04701
intakt vs estrogen	0,007636	0,06653	P > 0.05	-0.4714 to 0.4867
ovx vs alendronat	-0,1494	1,302	P > 0.05	-0.6284 to 0.3296
ovx vs raloxifen	-0,2246	1,957	P > 0.05	-0.7036 to 0.2544
ovx vs cimicifuga	-0,6232	5,305	P < 0.01	-1.113 to -0.1329
ovx vs estrogen	-0,07826	0,6819	P > 0.05	-0.5573 to 0.4008
alendronat vs raloxifen	-0,07516	0,671	P > 0.05	-0.5426 to 0.3923
alendronat vs cimicifuga	-0,4738	4,128	P > 0.05	-0.9528 to 0.005240
alendronat vs estrogen	0,07115	0,6352	P > 0.05	-0.3963 to 0.5386
raloxifen vs cimicifuga	-0,3986	3,473	P > 0.05	-0.8776 to 0.08040
raloxifen vs estrogen	0,1463	1,306	P > 0.05	-0.3212 to 0.6138
cimicifuga vs estrogen	0,5449	4,748	P < 0.05	0.06591 to 1.024

Tabelle 15: statistisch Auswertugn Tetracyclin endostal

II.3.24. Graphik für Tetracyclin endostal

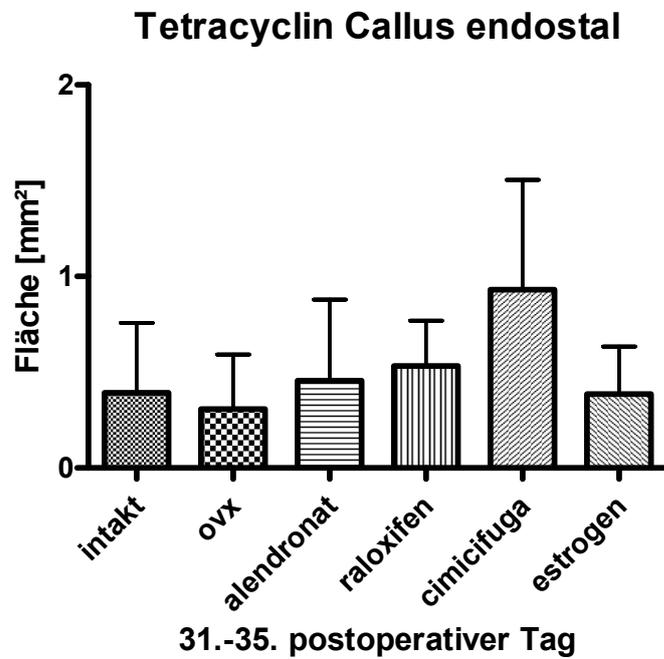


Abbildung 17: graphische Auswertung Callus endostal

Auch endostal zeigt sich, wie auch plattenfern und zu Teilen auch plattennah, zum späten Zeitpunkt eine Überlegenheit von Cimicifuga. Die Callusbildung der Cimicifugagruppe ist hier signifikant höher als die der Kontrollgruppe (nicht ovariectomiert) ($p < 0,05$), der ovariectomierten/sojafreien Gruppe ($p < 0,01$) und gegenüber der Östrogen-Gruppe ($p < 0,05$).

IV. Diskussion

Die klinische und sozioökonomische Bedeutung der Osteoporose ist vielfach belegt und in der Einleitung ausführlich dargestellt.

Wissenschaftlich ist es hochinteressant, Substanzen zu finden, die die Knochenheilung insbesondere bei Patienten mit Osteoporose positiv beeinflussen. Für die Untersuchungen wurde das nachgewiesenermaßen die Knochendichte erhöhende und das Risiko osteoporotischer Wirbelfrakturen vermindernde Bisphosphonat Alendronat (Hochberg et al. 1999), der Östrogenrezeptor-Modulator Raloxifen, der die Inzidenz von osteoporotischen Wirbelfrakturen ebenfalls nachweislich senkt (Ettinger et al. 1999), das Phytohormon Cimicifuga und eine Östrogensubstitution gewählt. Cimicifuga ist ein Phytoestrogen, das in den Focus der Forschung im Bereich der Therapie klimakterischer Beschwerden mit unterschiedlichen Ergebnissen gerückt ist (Amato P und Marcus DM 2003), nachdem große Studien das Risiko kardiovaskulärer Komplikationen durch die Östrogentherapie herausgearbeitet hatten und die Studien deshalb abgebrochen wurden (Penckofer et al. 2003). Cimicifuga ist deshalb besonders interessant, weil die Möglichkeit besteht, dass osteotrope Effekte ohne negative Wirkungen auf den Uterus und eine eventuelle Carcinogenese erreicht werden können. In Untersuchungen von Phytoöstrogen konnten (Peng et al. 2008) sowohl eine Stimulation von Knochenformationen als auch eine Hemmung der Knochenresorption und einen positiven Effekt auf die trabekuläre Knochenmasse an der ovariectomierten Ratte nachweisen.

In der Literatur finden sich verschiedene Osteoporosemodelle. Lill et al. (2002) fanden eine um 30% verminderte Knochendichte beim Schaf nach Ovariectomie und Cortisongabe im Bereich der distalen Tibia. Die meisten Untersuchungen der Callusbildung und Knochenheilung erfolgten an ovariectomierten Ratten, jeweils im Vergleich zu scheinoperierten Tieren.

Untersuchungen von Namkung-Matthal et al. (2001) ergaben eine beeinträchtigte Knochenheilung 3 Monate nach Ovariectomie in einem Frakturmodell im Bereich des Femurschaftes an der Ratte. Die Parameter Callusmenge, Steifigkeit und notwendige Last bis zur plastischen Verformung waren bei den ovariectomierten osteoporotischen Ratten signifikant niedriger. Ebenfalls 3 Monate nach Ovariectomie und damit bei manifester Osteoporose untersuchten Xu et al. (2003) die Callusbildung am Femurschaft der Ratte und konnten eine quantitativ und qualitativ beeinträchtigte Callusbildung nachweisen. In einer

weiteren Arbeit fanden Xu et al. (2004) im gleichen Osteoporosemodell auch in einem Frakturmodell mit Tibiafrakturen in Schaftmitte eine verminderte Knochenmineraldichte des Callus und ein frühzeitigeres Versagen bei mechanischer Testung.

Alle bisher bekannten Untersuchungen der Knochenheilung im Osteoporosemodell der ovariectomierten Ratte erfolgten im Schaftbereich.

Klinisch sind jedoch die meisten osteoporotischen Frakturen metaphysär lokalisiert (proximaler Humerus, distaler Radius, proximales Femur, supracondylärer Bereich des Femurs, Tibiakopf und distale Tibia). Im metaphysären Bereich findet sich vorwiegend trabekulärer und im Schaftbereich nur corticaler Knochen, so dass die Heilungsmuster unterschiedlich sein können.

Dementsprechend wurde der Einfluss der untersuchten Substanzen in der vorliegenden Arbeit in einem neuen metaphysären Osteotomie-Modell im Bereich der proximalen Tibia mit anschließender Plattenosteosynthese an der ovariectomierten Ratte fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die ovariectomierte Ratte ist ein fest etabliertes Osteoporosemodell in der Literatur (Li et al. 1991, Wronski und Yen 1991, Frost und Jee 1992).

Die vorgestellte Operationstechnik und anschließende fluoreszenzmikroskopische Untersuchung nach Verabreichung von Xylenolorange (12.Tag), Calceingrün (18.Tag), Alizarinkomplex (24 - 26.Tag) und Tetracyclinen (31. und 35.Tag) erlaubt die Untersuchung der metaphysären Knochenheilung. Die Fluoreszenzmikroskopie nach Rahn (1976) ist in der Literatur fest etabliert. Wesentlicher Parameter ist die phasenabhängig erfasste Callusbildung. Durch Flächenbestimmung des Callus im Fluoreszenzmikroskop mit Licht verschiedener Wellenlänge kann bestimmt werden, in welcher Phase nach der Osteosynthese wieviel Callus gebildet wurde. Die Callusmenge wurde endostal, plattenfern und plattennah untersucht. Die Callusmengen wurden nach der Gabe von Alendronat, Raloxifen, Cimicifuga und Östrogen in einem neuen Tiermodell nach proximaler Tibiaosteotomie und Osteosynthese an der Ratte untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Fülle von Daten über die Callusbildung nach Gabe von Alendronat, Raloxifen, dem Phytoöstrogen Cimicifuga, scheinoperierten und östrogensubstituierten nach Osteotomie und osteosynthetischer Stabilisierung im Bereich der proximalen Tibia erhoben. Im Bereich der proximalen Tibia nimmt die Knochenmasse bei ovariectomierten Ratten über einen Zeitraum von 4 Monaten um 60% ab (Gasser und Green 2002) . Sie benutzten das Tiermodell zum Nachweis der antiresorptiven Wirkung der Bisphosphonate Alendronat (Handelsname Fosamax) und Zoledronsäure (Handelsname Aclasta).

Fanti et al. (1998) konnten ebenfalls eine dramatische Reduktion des trabekulären Knochenvolumens bei ovariectomierten Ratten zeigen. Genistein verminderte den Knochenverlust signifikant durch Stimulation der Knochenformation und nicht durch Blockade der Knochenresorption.

In den eigenen Untersuchungen wurden Ratten in einer Narkose ovariectomiert, osteotomiert und osteosynthetisiert.

Damit zeigen die Ergebnisse zwar nicht den Verlauf der Knochenheilung bei manifester Osteoporose, die erst nach einem längeren Zeitraum nach Ovariectomie eintritt, sie erlauben aber die Untersuchung der metaphysären Callusbildung nach Osteotomie und Osteosynthese ohne Östrogeneinfluss bei der ovariectomierten Ratte.

In den vorliegenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen fanden sich bei den mit Xylenorange (Gabe am 12. Tag) und Calceingrün (Gabe am 18. Tag) fluoreszierenden Callusmengen keine Signifikanzen. Offensichtlich ist der Zeitraum bis zum 18. Tag zu kurz für den Nachweis unterschiedlicher Callusbildung. Plattennah ergaben sich bei allen Untersuchungen ebenfalls keine Signifikanzen. Dies entspricht der klinischen Erfahrung, dass die Callusbildung nach überbrückenden Plattenosteosynthesen im Wesentlichen plattenfern erfolgt. Von besonderem Interesse war dementsprechend die nachgewiesene fluoreszierende Callusmenge in der Untersuchung von Callus mit Alizarinkomplex (Gabe am 25. Tag) und Tetracyclin (Gabe am 33. Tag) plattenfern und endostal. Nach Gabe von Cimicifuga war die Callusmenge im Alizarinkomplex enthaltenden Callus plattenfern hochsignifikant größer als bei den ovariectomierten Ratten, endostal war die Callusmenge im Tetracyclin enthaltenden Callus nach Cimicifuga hochsignifikant gegenüber den ovariectomierten Tieren und signifikant gegenüber den Östrogen substituierten und sogar auch gegenüber den scheinoperierten Tieren erhöht. Damit war im späteren Verlauf vom 25. – 33. Tag nach Ovariectomie, Osteotomie und Osteosynthese die Mehrzahl der gebildeten Callusmengen nach Cimicifuga signifikant erhöht. Der dadurch belegte positive Effekt von Cimicifuga ist das wesentliche Ergebnis der vorgelegten Untersuchungen.

Alendronat war im Alizarinkomplex enthaltenden Callus endostal gegenüber den ovariectomierten Tieren hochsignifikant und gegenüber den Östrogen substituierten und den scheinoperierten Tieren signifikant erhöht. Ein Effekt von Alendronat lässt sich dementsprechend am 25. Tag nachweisen. Von den untersuchten Substanzen Raloxifen, Alendronat und Cimicifuga liess sich zusammenfassend ein positiver Effekt auf die Callusbildung durch Alendronat zu einem der beiden späteren Zeitpunkte und nach Gabe von Cimicifuga an beiden späteren Zeitpunkten nachweisen.

Damit konnte im neuen Tiermodell der Plattenosteosynthese nach Osteotomie im Bereich der proximalen Tibia der Ratte der positive Effekt des Phytohormones Cimicifuga nachgewiesen werden. Das Ergebnis entspricht Untersuchungen von Fanti et al. (1998), der einen positiven Einfluss eines anderen Phytoöstrogens - Genistein ebenfalls an der ovariectomierten Ratte zeigen konnte.

In den vorliegenden Untersuchungen fand sich in der Frühphase nach Ovariectomie (12. -18.Tag) keine signifikant verlangsamte Callusbildung zwischen den scheinoperierten und den ovariectomierten Tieren. Allerdings waren die Callusmengen in der späteren Phase des untersuchten Zeitraumes (25 und 33 Tage) bei den ovariectomierten Tieren durchweg niedriger als in der scheinoperierten Gruppe, jedoch nicht signifikant. Die in anderen Arbeiten (Namkung-Matthai H et al. 2001, Fanti P et al. 1998, Xu et al. 2003) nachgewiesene verminderte Callusbildung nach Ovariectomie zeigte sich in der vorliegenden Arbeit nur als Trend. Allerdings erfolgte die Untersuchung der Callusbildung in diesen Arbeiten zu einem späteren Zeitpunkt nach Ovariectomie. In Zusammenschau mit den vielfältigen Befunden in der Literatur, die eine verlangsamte Callusbildung bei manifester Osteoporose zeigen, kann geschlossen werden, dass Östrogenmangel durch die Ovariectomie die Callusbildung nur berengt beeinträchtigt, solange die Knochenmasse nicht deutlich vermindert ist. Erst eine im längeren Verlauf nach Ovariectomie eingetretene Osteoporose führt zu Bedingungen, in denen die Callusbildung drastisch beeinträchtigt ist.

Spekulativ kann man die Ergebnisse dahingehend interpretieren, dass bei Knochenmasseverlust auch weniger Potential für die Callusbildung vorhanden ist. Östrogen scheint hingegen nicht für die Callusbildung erforderlich zu sein. Auf Grund der Untersuchungen muss davon ausgegangen werden, dass der Knochenmasseverlust das Problem der verzögerten Callusbildung und Knochenheilung darstellt.

Die Knochenheilung ist bei Osteoporose deshalb langsamer, weil weniger Knochensubstanz und auch weniger Osteocyten vorhanden sind.

Das Problem ist die geringere Knochenmasse, denkbare Mechanismen sind auch eine verminderte Sensibilität von Osteoblasten gegenüber cyclischen Belastungen oder eine verminderte Zahl von Precursorzellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein die Callusbildung fördernder Effekt von Cimicifuga nach Ovariectomie, Osteotomie und Osteosynthese in einer Narkose im Bereich des 25. – 33. Tages nachgewiesen werden. Alendronat zeigte einen Effekt auf die Callusbildung um den 25. Tag.

Die vorgelegten Untersuchungen konnten einen Effekt von Cimicifuga im Tiermodell bei sich entwickelnder aber noch nicht manifester Osteoporose nachweisen. Die Ergebnisse der Gabe von Cimicifuga nach Osteosynthesen bei manifester Osteoporose können mit Spannung erwartet werden.

Darüberhinaus zeigen die Untersuchungen auch, dass das Potential der Knochenheilung bei Osteoporose auf Grund der geringeren Masse beeinträchtigt ist. Dadurch rückt die Notwendigkeit der Verbesserung der Osteosynthesetechniken – wie sie durch Plattensysteme mit winkelstabilen Schrauben erreicht wurde – vermehrt in den Mittelpunkt des Fortschrittes. Kurz und mittelfristig muss vor allem daran gearbeitet werden, die Osteosynthesetechniken dahingehend zu verbessern, dass sie der langsameren Knochenheilung Rechnung tragen, und stabile Verhältnisse schaffen, damit die langsamere Knochenheilung erfolgen kann.

V. Zusammenfassung

Der Effekt von Cimicifuga, Raloxifen und Alendronat wurde bei ovariectomierten Ratten im neuen Modell einer Plattenosteosynthese im metaphysären Bereich der proximalen Tibia fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Ovariectomie, Osteotomie und Osteosynthese erfolgten in einer Narkose. Die entstandenen Callusmengen wurden nach Verabreichung der fluoreszierenden Farbstoffe Xenylorange (12.Tag), Calceingrün (18.Tag), Alizarinkomplex (25.Tag) und Tetracyclin (33.Tag) nach Opferung der Tiere planimetrisch bestimmt.

Untersucht wurde die Callusmenge plattenfern, plattennah und endostal.

In der Frühphase (12. und 18.Tag) traten bei vielfältig untersuchten Parametern keine Signifikanzen auf.

Die um den 33.Tag gebildete endostale Callusbildung war nach Gabe von Cimicifuga in der spät untersuchten Phase (33.Tag) gegenüber ovariectomierten Tieren hochsignifikant ($p < 0,01$) und gegenüber östrogensubstituierten ($p < 0,05$) und nicht ovariectomierten Tieren ($p < 0,05$) signifikant erhöht.

Der um den 25.Tag gebildete plattenferne Callus war nach Gabe von Cimicifuga gegenüber ovariectomierten Tieren hochsignifikant erhöht ($p < 0,01$).

Damit zeigten mit Cimicifuga behandelte Tiere zwar nicht zu allen Zeitpunkten mehr Callusbildung, jedoch in der Spätphase der Versuche (25. – 33.Tag) plattenfern und endostal in drei von vier bestimmten Callusvolumina zweimal hochsignifikant und einmal signifikant höhere Werte als ovariectomierte Tiere. Das Phytohormon Cimicifuga steigerte im metaphysären Tiermodell an der proximalen Tibia nach Ovariectomie, Osteotomie und Osteosynthese die Callusbildung zwischen dem 25. und 33.Tag gegenüber ovariectomierten Ratten. Cimicifuga hat eine Callusbildung fördernde Wirkung und sollte weiter untersucht werden.

VI. Literaturverzeichnis

Amato P, Marcus DM (2003): Review of alternative therapies for treatment of menopausal symptoms. *Climacteric* 6 (4) : 265 -257

Assesment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1994; 843:1-129

Bartl R, Bartl C, Mutschler W. (Diagnosis and therapy of osteoporosis. Strategy for effective treatment after fragility fractures). *Unfallchirurg* 2003; 106(7):526-41

Bellantonio S, Fortinsky R, Prestwood K. How well are community living women treated for osteoporosis after hip fracture? *JAM Geriatr Soc* 2001; 49(9): 1197-204

Bestehorn K. Zink A. Dreher R Drug therapy in postmenopausal osteoporosis. An analysis of healthy service delivery. *Z Arztl Fortbild Qualitatssich* 2002; 96 (10): 699-704.

Black D.M., Cummings S.R., Karpf D.B., Cauley J.A., Thompson D.E. Nevitt M.C., Genat H.K. (1996): Randomized trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fracture. *Lancet* 1535-41

Brzezinski A. und Debi A. Phytoestrogens : the natural selective estrogen receptor modulators? *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 1999; 0301-2115

Campbell AJ, Borrie MJ, Spears GF. Risk factors for falls in a community- based prospective study of people 70 years and older. *J Gerontol* 1989; 44 (4): M112-7

Castel H, Bonnef D.Y., Sherf M, Liel Y. Awareness of osteoporosis and compliance with management guidelines in patients with newly diagnosed low-impact fractures. *Osteoporos Int* 2001; 12 (7) : 559-64

Cree M, Soskolone CL, Belesck E, et al. Mortality and institutionalization following hip fracture. *J Am Geriatr. Soc* 2000; 48(3):283-8

Cummings SR, Black DM, Nevitt MC, et al. Bone density at various sites for prediction of hip fractures. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet* 1993; 341 (8837) : 72-5

Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002; 359 (9319): 1761-7

DeLaet CE, Van Hout BA, Burger H, Weel AE, Hofman A, Pols HA. Hip fracture prediction in elderly men and women : validation in the Rotterdam study. *J Bone Miner Res* 1998; 341

Dreinhöfer KE, Anderson M, Feron JM, et al. Multinational Survey of osteoporotic fracture management . *Osteoporos Int.* 2004

Eastell R. Pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. In Favus MJ, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* Fifth Edition ed. Washington, D.C.: The American Society for Bone and Mineral Research; 2003:314-6

Ettinger B, Black DM, Mitlak BH (1999): Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. *Jama* 282 (7) : 637 - 45

Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, Maluche HH (1998): The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporosis Int.* 8 (3): 274-81

Fitzpatrick LA. Secondary causes of osteoporosis. *Mayo Clin Proc* 2002 ; 77 (5): 453-68

Fleisch H.A. Bisphosphonates: Preclinical Aspects and Use in Osteoporosis *Annals of Medicine* 1997; 55 – 62

Freedman KB, Kaplan FS, Bilker WB, Strom BL, Lowe RA. Treatment of osteoporosis: are physicians missing an opportunity? *J Bone Joint Surg Am* 2000; 82-A (8): 1063-70

Frost HM, Jee WSS (1992): On the rat model of human osteopenias and osteoporosis. *Bone Mineral* 18: 227 -236

Gasser JA, Green JR (2006): A single intravenous administration of zoledronic acid prevents the bone loss and mechanical compromise induced by aromatase inhibition in rats. *Bone* 39 (4) : 787 -95

George G. J. M. Kuiper, Josephine G. Lemmen, Bo Carlsson, J. Christopher Corton, Stephen H. Safe, Paul T. van der Saag, Bart van der Burg² and Jan-Åke Gustafsson Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β *The Endocrine Society* 1998; 10 4252-4263

Hajcsar EE, Hawker G, Bogch ER. Investigation and treatment of osteoporosis in patients with fragility fractures. *Cmaj* 2000; 163 (7): 819-22.

Hochberg MC, Ross PD, Black D (1999): Larger increases in bone mineral density during alendronate therapy are associated with a lower risk of new vertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis. *Arthritis Rheum* 42 (6): 1246 -54

Ismail AA, Pye SR, Cockerill WC, et.al. Incidence of limb fracture across Europe: Results from European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). *Osteoporos Int* 2002; 13(7): 565-71.

Jones G, Nguen T, Sambrook PN, Kelly PJ, Gilbert C, Eisman JA. Symptomatic fracture incidence in elderly men and women: the Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study (DOES). *Osteoporos Int* 1994; 4 (5): 277-82

Kahn SA, de Geus C, Holroyd B, Russell AS. Osteoporosis follow-up after wrist fractures following minor trauma. *Arch Intern Med* 2001; 161 (10): 1309-12.

Kamel HK, Hussain MS, Tariq S, Perry HM, Moreley JE. Failure to diagnose and treat osteoporosis in elderly patients hospitalized with hip fracture. *Am J Med* 2000; 109 (4): 326-8.

Kanis JA, Johnell O, Oden A, et al. Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmo. *Osteoporos Int*;11 (8): 669-74

Krappweis J, Rentsch A, Schwarz UI, Krobot KJ, Kirch W. Outpatient costs of osteoporosis in a national health insurance population. *Clin Ther* 1999; 21 (11): 2001-14.

Leitlinien zur Prävention, Diagnose und Therapie der Osteoporose;2003

Li XJ, Jee WSS, Ke HZ, Mori S, Akamine T (1991): Age related changes of cancellous and cortical bone histomorphometry in female Sprague-Dawley rats. *Cells Mater Suppl* 1: 25-35

Lill CA, Gerlach UV, Eckardt C, Goldhahn J, Schneider E (2002): Bone changes due to glucocorticoid application in an ovariectomized animal model for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporosis Int* 13: 407 – 414

Lill CA, Gluegel AK, Schneider E (2002): Effect of ovariectomy, malnutrition and glucocorticoid application on bone properties in sheep: a pilot study. *Osteoporos Int* 13: 480 - 486

Lin JT, Lane JM. Osteoporosis: a review. *Clin Orthop* 2004 (425)126-34.

Marshall D, Johnell O, Wedel H Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *Bmj* 1996; 321(7041): 1254-9

Marcus R. The nature of osteoporosis. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, eds. *Osteoporosis*. First Edition ed. San Diego: Academic Press; 1996: 647-60

Melton LJ, 3rd, Atkinson EJ, O'Conner MK, O'Fallon WM, Riggs BL. Determination of bone loss from the femoral neck in women of different ages. *J Bone Miner Res* 2000; 15:24-31

Melton LJ, 3rd, Chrischilles EA, Cooper, Lane AW, Riggs BL. Perspective. How many women have osteoporosis? *J Bone Miner Res* 1992; 1992; 7(9): 1005-10

Milch R.A., Rall D.P., and John E. T. Fluorescence of Tetracycline Antibiotics in Bone *Journal of Bone and Joint Surgery* 1958;40:897-910.

Morris R. Masaud T. Measuring quality of life in osteoporosis. *Age Ageing* 2001; 30(5):371-3

Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, Swain M, Mason RS, Murell GA, Diwan AD, Diamond T (2001): Osteoporosis influences the early period of fracture healing. *Bone* 28 (1) : 80 – 86

Nevitt MC, Cummings SR, Kidd S, Black D. Risk factors for recurrent nonsyncopal falls. A prospective study. *Jama* 1989;261 (18): 2663-8

Nguyen TV, Eisman JA, Kelly PJ, Sambrook PN. Risk factors for osteoporotic fractures in elderly men. *Am J Epidemiol* 1996; 144(3):255-63

Pal B, Morris J, Muddu B. The management of osteoporosis-related fractures: a survey of orthopaedic surgeons' practice. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16(1): 61-2.

Pal B. Questionnaire survey of advice given to patients with fractures. *Bmj* 1999; 318 (7182): 500-1.

Penckofer SM, Hackbarth D, Schwertz DW (2003): Estrogen plus progestin therapy: the cardiovascular risks exceeds the benefits. *J Cardiovasc Nurs* 18 (5) : 347 - 55

Peng S, Xia R, Fang H, Li F, Vhen A, Zhang G, Qin L (2008): Effect of epimedium –derived phytoestrogen on bone turnover and mikroarchitecture in OVX-induced osteoporotic rats. *J Huazhong Univ Sci Technoloq Med Sci* 28 (2) : 167 -70

Prudham D, Evans JG. Factors associated with falls in the elderly: a community study. *Age Ageing* 1981; 10 (3):141-6

Rahn BA Fluorochrome sequence labelling of the bone.1976

Nova acta Leopold 44: 249 – 255

Rahn BA Stephan M. Perren Xylenol Orange, A Fluorochrome Useful in Polychrome

Sequential Labeling of Calcifying Tissues Biotechnic and Histochemistry 1971 125 - 129

Reid IR. Menopause. In Favus MJ, ed. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. Fifth Edition ed. Washington, D.C. : The American Society for Bone and Mineral Research; 2003:86-9

Riggs BL, Melton LJ, 3rd. The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiologie. Bone 1995 (5 Suppl): 505S-11S

Riggs BL, Wahner HW, Seeman E, et al. Changes in the bone mineral density of the proximal femur and the spine with aging. Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes. J Clin Invest 1982; 70(4): 716-23

Rosier RN. Expanding the role og the orthopaedic surgeon in the treatment of osteoporosis. Clin Orthop 2001

Ross PD. Osteoporosis.Frqency, consequences, and risk factors. Arch Intern Med 1996; 156 (13): 1399-411.

Ross PD, Genant HK, Davis JW, Miller Pd, Warnich RD. Prediting vertebral fracture incidence from prevalent fractures and bone density among non-black, osteoporotic woman. Osteoporos Int 1993; 3(3): 120-6

Rossouw, Jacques E.; Prentice, Ross L.; Manson, JoAnn E.; Wu, LieLing; Barad, David; Barnabei, Vanessa M.; Ko, Marcia Postmenopausal Hormone Therapy and Risk of Cardiovascular Disease by Age and Years Since Menopause Obstetrical & Gynecological Survey 2007; 62(8):522-523

Rubenstein LZ, Josephson KR. The epidemiology of falls and syncope. Clin Geriatr Med 2002; 18(2):141-58

Scheidt- Nave C. Die sozioökonomische Bedeutung der Osteoporose. Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz. 2001; 44:41-51

Schlager H, Gensthaler G, Schwarz F, Gassner W, Bestehorn K. Untersuchung zur Versorgungssituation von Osteoporosepatienten in Bayern und Sachsen. Gesundheitsökonom Qual manag 2001; 6: 134-7.

Schlaich C, Minne Hw, Bruckner T. et. al. Reduced pulmonary function in patients with spinal osteoporotic fractures. Osteopros Int 1998; 8(3): 261-7

Seidlova-Wuttke D, Hesse O, Jarry, Christoffel V, Spengler B, Becker T, and Wuttke W. Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: comparison with estradiol-17beta, European Journal of Endocrinology 2003, 4 351-362

Seidlová-Wuttke, D., Jarry, H., Wuttke, W. Pure estrogenic effect of benzophenone-2 (BP2) but not of bisphenol A (BPA) and dibutylphthalate (DBP) in uterus, vagina and bone, Toxicology, 205: 103-112, 2004

Thompson D.D., Simmons H.A. , Pirie C.M. FDA guidelines and animal models for osteoporosis Elsevier Science Inc. 1995 10.1016/8756-3282 (95)00285-L

Torgerson DJ, Dolan P. Prescribing by general practitioners after an osteoporotic fracture. Ann Rheum Dis 1998; 57 (6): 378-9.

Tinetti ME, Speechley M, Ginter SF. Riskfactors for falls among elderly persons living in the community. N Engl J Med 1988; 319(26):1701-7

Tromp Am, Ooms Me, Popp-Snijders C, Roos JC, Lips P. Predictors of fractures in elderly women. Osteoporos Int 2000; 11 (2): 134-40

Wronski TJ, Yen CF (1991): The ovariectomized rat as an animal model for postmenopausal bone loss. *Cells Mater Suppl* 1: 69 -74

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

Xu SW, Wang JW, Li W, Wang Y, Zhao GF (2004): Osteoporosis impairs fracture healing of tibia in rat osteoporotic model. *Zhonghua Yi xXue Za Zhi* 2004 84 (14) 1205 - 9

Danksagungen

Ich möchte mich sehr bei Frau PD. Dr. med. Ewa Stürmer bedanken für ihre Anregungen, Hilfe und Tipps.

Herrn Dr. Stephan Sehmisch danke ich herzlich für viel Zeit, Unterstützung, Geduld und schöne Zusammenarbeit.

Großer Dank gilt auch Herrn Dr. Kauer, durch den die Untersuchung an so zahlreichen Präparaten überhaupt möglich war.

Besonderer Dank gilt meinem Vater für viel Ermutigung, Hilfe, Wurzeln und Flügel. Ich danke meiner ganzen tollen Familie und Olli für all die Unterstützung und Ermunterung!

Lebenslauf

Ich, Eliane Wenda wurde am 12.08.1980 in Frankfurt am Main geboren und besuchte von 1986 bis 2000 die Johannes Maas Grundschule und das Dilthey-Gymnasium in Wiesbaden. Ich begann das Studium der Medizin an der Universität Ulm 2000. Den klinischen Abschnitt absolvierte ich an der Universität Lübeck von 2002 bis 2007.

Famulaturen erfolgten in der der Abteilung für Neurochirurgie der Dr. Horst-Schmitt-Kliniken in Wiesbaden, in der Abteilung für Kardiologie des Universitätsklinikums SH Campus Lübeck sowie in der Abteilung für Unfallchirurgie, Plastische- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Göttingen.

Das Praktische Jahr verbrachte ich in der Royal Infirmary in Edinburgh und am Universitätsklinikum SH Campus Lübeck in den Abteilungen für Traumatologie, Kardiologie, Abdominalchirurgie und für Orthopädie.

Ich schloss am 28.06.2007 nach bestandenen 2. Staatsexamen das Studium ab.

Seit Juli 2007 arbeite ich als Assistenzärztin in der Klinik für Chirurgie des Stütz- und Bewegungsapparates, Sektion Orthopädie, am Universitätsklinikum SH Campus Lübeck.

Februar bis August 2008 arbeitete ich , im Rahmen der Grundausbildung, auf der Intensivstation der Abteilung für Allgemeinchirurgie.