Aus dem Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Steffen Ruchholtz des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Radiologische Analyse eines Knochendefektmodells zur Lokalapplikation von Medikamenten am osteoporotisch induzierten Rattenfemur

Eine Pilotstudie

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Elisabeth Anne Vackiner

aus Frankenberg (Eder)

Marburg, 2022

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 13.09.2022 Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. med. Steffen Ruchholtz

> 1. Korreferent: Prof. Dr. med. Heiko Alfke

Meinen Eltern

"Das Geheimnis des Erfolges ist die Beständigkeit des Ziels."

Benjamin Disraeli (Erster Earl of Beaconsfield, 1804-1881)

Inhaltsverzeichnis

Ab	bildu	ingsve	erzeichnis	VII		
Та	belle	nverze	eichnis	IX		
Ab	okürz	ungsve	erzeichnis	X		
1	Einl	eitung		1		
	1.1	1 Thematische Einführung				
	1.2	Knoch	nenstoffwechsel	3		
		1.2.1	Aufbau des Knochens	3		
		1.2.2	Knochenphysiologie	6		
	1.3	Krank	heitskomplex Osteoporose	13		
		1.3.1	Definition	13		
		1.3.2	Ursache und Einteilung	15		
		1.3.3	Diagnostik	18		
		1.3.4	Frakturversorgung bei Osteoporose	24		
2	Ziels	setzun	g	26		
3	Mate	erial ur	nd Methoden	27		
	3.1	1 Versuchsbeschreibung				
	3.2 Tierversuchsgenehmigung					
3.3 Versuchsvorbereitung		chsvorbereitung	29			
		3.3.1	Fixateur externe	29		
		3.3.2	Trägermatrix Spongostan [®]	31		
	3.4	Opera	ation	31		
		3.4.1	Vorbereitung und Narkoseverfahren	31		
		3.4.2	Intraperitoneale (i. p.) Injektion			
		3.4.3	Operationsverfahren			
	3.5	Postoperative Versorgung				
3.6 Euthanasie der Versuchstiere3.7 Nativ-Röntgenuntersuchungen3.8 Aufarbeitung der Femurknochen		Eutha	nasie der Versuchstiere	35		
		Röntgenuntersuchungen	35			
		beitung der Femurknochen				
		3.8.1	Entwässerung und Entfettung des Knochens			
		3.8.2	Kunststoffeinbettung			
		3.8.3	Zuschneiden der Präparate			
	3.9	Radio	logische Auswertungen			
		3.9.1	Auswertung mit dem pQCT			
		3.9.2	Auswertung mit dem µCT	40		
3.10 Herstellung und Auswertung der histologischen Präparate				41		

	3.10.1 Toluidinblau-Färbung4			
	3.10.2 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung			. 42
	3.11	Statist	ische Analysen	.44
4	Erge	ebnisse	.	. 46
	4.1	Verlau	ıf des Versuchs – Komplikationen	.46
	4.2	Radio	logische Ergebnisse	.48
		4.2.1	Ergebnisse der Nativ-Röntgenuntersuchung	.48
		4.2.2	Ergebnisse der µCT-Untersuchungen	. 48
		4.2.3	Ergebnisse der pQCT-Untersuchungen	. 52
	4.3 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen			
		4.3.1	Histologische Präparate der OV-OPG-Gruppe (Toluidinblau)	. 57
		4.3.2	Histologische Präparate der OV+OPG-Gruppe (Toluidinblau)	. 64
		4.3.3	Histologische Präparate der OV+OPG-Gruppe (Masson-Goldner- Trichom-Färbung)	69
-	D:-1			. 00
5	DISK		1	. 75
	5.1	Diskus		. 75
		5.1.1		. 75
		5.1.Z	Verwendung von Spongostan [®]	. 70
		5.1.4	Eignung der radiologischen Methoden zur Analyse der Wachstums-	.00
			/Heilungsprozesse des Knochens	. 84
		5.1.5	Eignung der histologischen Methoden zur Analyse der Wachstums- und Heilungsprozesse des Knochens	. 89
		5.1.6	Limitationen des Versuchsaufbaus	.91
	5.2	Einflus	ss von OPG auf das Knochenwachstum und den Heilungsprozess	. 92
5.3 Schlussfolgerungen und Ausblick		ssfolgerungen und Ausblick	. 94	
6	Zusammenfassung			.96
	6.1	Summ	ary	. 97
7	Lite	raturve	rzeichnis	. 99
8	Dan	keanu		120
0				
S Enrenwortliche Erklarung				
10 verzeichnis der akademischen Lehrer				
11	11 Lebenslauf			

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Zeichnung des anatomischen Aufbaus eines Röhrenknochens (Femur; links) (Schatz o. J) und Querschnitte eines Femurs (rechts) (Med Library.com 2013)4
Abbildung 2:	Schematischer Querschnitt der Diaphyse eines Röhrenknochen (variiert nach National Cancer Institute SEER Training Modules (o. J.))
Abbildung 3:	Altersabhängiger Verlauf der Knochenmasse (Hahn 2016)8
Abbildung 4:	Mechanismus des Knochenab- und -aufbaus (links, Ott 1996), und schematische Darstellung der Umbauphasen am trabekulären Knochen (rechts, Bartl 2010)
Abbildung 5:	A: Knochen-abbauende (resorptive) und -aufbauende (calzitrope) Faktoren; B: Knochen-aufbauende (anabole) und antiosteoklastische (Knochenabbau-hemmende) Faktoren (Boyle et al. 2003)
Abbildung 6:	Fixateur externe mit Abmessungen (angelehnt an Claes et al. 2009) 29
Abbildung 7:	Grafische Darstellung des Fixateurs mit Abmessungen (Willie et al. 2009)
Abbildung 8:	Zugeschnittenes Spongostan® (eigenes Bild)
Abbildung 9:	Darstellung des Operationsverfahrens
Abbildung 10:	Femurknochen mit externem Fixateur fixiert in Technovit 9100 New [®] ; Zuschnitt mittels Diamantrotations-Säge
Abbildung 11:	XCT Research SA+ der NOVOTEC Medical GmbH/ STRATEC Medizintechnik GmbH, Pforzheim
Abbildung 12:	Ratte mit externem Fixateur46
Abbildung 13:	Native Röntgenbilder der drei Versuchsgruppen (exemplarisch)48
Abbildung 14:	Mikro-Computertomografie-(µCT)-Aufnahmen eines Rattenfemurs mit Fixateur externe aus der Kontrollgruppe (nicht ovarektomierte Tiere ohne Osteoprotegerin-(OPG)-Gabe)
Abbildung 15:	Mikro-Computertomografie-(µCT)-Aufnahmen eines Rattenfemurs mit Fixateur externe aus der OV-OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte ohne Osteoprotegerin-(OPG)-Gabe)
Abbildung 16:	Mikro-Computertomografie-(µCT)-Aufnahmen eines Rattenfemurs mit Fixateur externe aus der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit Osteoprotegerin-(OPG)-Gabe)
Abbildung 17:	Knochendichte (BMD) (oben), -fläche (Mitte) und -masse (unten) in den drei Versuchsgruppen (Gesamtwerte für ROI II)
Abbildung 18:	Übersichtsaufnahme (Durchlicht) – mit Toluidinblau gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV- OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte ohne OPG-Gabe) vier Wochen nach der OP

Abbildung 19:	Frakturspalt im Bereich der knöchernen Spange	58
Abbildung 20:	Mitte des Frakturspaltes	59
Abbildung 21:	Frakturspalt	60
Abbildung 22:	Bone lining cells und mineralisiertes Knochengewebe	61
Abbildung 23:	Markraum	62
Abbildung 24:	Markraum	63
Abbildung 25:	Übersichtsaufnahme (Durchlicht) – mit Toluidinblau gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit OPG-Gabe) vier Wochen nach der OP.	64
Abbildung 26:	Frakturspalt im Bereich der knöchernen Spange	65
Abbildung 27:	Mitte des Frakturspalts im Bereich der knöchernen Spange	66
Abbildung 28:	Markraum	67
Abbildung 29:	Markraum	68
Abbildung 30:	Übersichtsaufnahme (Durchlicht) – mit Masson-Goldner-Trichom- Technik gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit OPG- Gabe) drei Wochen nach der OP	69
Abbildung 31:	Mitte des Frakturspaltes	70
Abbildung 32:	Bereich distal lateral des Frakturspaltes	71
Abbildung 33:	Anschnitt eines Röhrenknochens mit Markraum	72
Abbildung 34:	Anschnitt eines Röhrenknochens mit Markraum	73
Abbildung 35:	Übersichtsaufnahme (Durchlicht) – mit Masson-Goldner-Trichom- Technik gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit OPG- Gabe) wenige Stunden bis Tage nach der OP	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Formen und Ursachen der generalisierten Osteoporose (variiert nach Seibel und Kraenzlin 1995)	. 16
Tabelle 2:	Anzahl der Versuchstiere und Gruppeneinteilung	. 27
Tabelle 3:	Präoperatives Gewicht (g) der Tiere in den Versuchsgruppen	. 27
Tabelle 4:	Narkosemedikamente	. 32
Tabelle 5:	Zusammensetzung verschiedener Gebrauchslösungen aus Technovit 9100 New [®]	. 37
Tabelle 6:	Komplikationen des Narkoseverfahrens	. 47
Tabelle 7:	Gewicht (g) der Ratten der drei Versuchsgruppen (Mittelwerte ± SD)	. 52
Tabelle 8:	Knochendichte (BMD – TOT: mg/mm, CRTSUB: mg/cm ³ , TRAB: mg/cm ³ , CRT: mg/cm ³) der Ratten der drei Versuchsgruppen (Mittelwerte ± SD)	. 53
Tabelle 9:	Knochenfläche (TOT: mm², CRTSUB: mm², TRAB: mm, CRT: mm) der Ratten der drei Versuchsgruppen (Mittelwerte ± SD)	. 54
Tabelle 10:	Knochenmasse (TOT: mg/mm, CRTSUB: mg/cm ³ , TRAB: mg/cm ³ , CRT: mg/cm ³) der Ratten der drei Versuchsgruppen (Mittelwerte ± SD)	. 54

Abkürzungsverzeichnis

BMC	Knochen-(mineral)-gehalt (engl. bone mineral content)
BMD	Knochen-(mineral)-dichte (engl. bone mineral density)
BMU	Basic Multicellular Units
DEXA	Dual Energy X-ray Absorptiometry
DVO	Dachverband der deutschsprachigen wissenschaftlichen
	Gesellschaft für Osteologie
HU	Hounsfield Einheiten
IFM	interfragmentäre Bewegung (engl. interfragmentary mov-
	ments)
i. m.	intramuskulär
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
KG	Körpergewicht
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
QCT	Quantitative Computertomografie
OV-OPG	ovarektomierte Ratten ohne OPG
OV+OPG	ovarektomiere Ratten mit OPG
PMMA	Polymethylmethacrylat
pQCT	periphere quantitative Computertomografie
PTH	Parathormon
RANK	Receptor activator of nuclear factor-kB
RANKL	Receptor activator of nuclear factor-kB ligand
ROI	Region of interest
SD	Standardabweichung
WHO	World Health Organization
μCT	Mikro-Computertomografie
3D	dreidimensional

1 Einleitung

1.1 Thematische Einführung

In einer Gesellschaft, in der die Lebenserwartung und damit der Anteil der älteren Bevölkerung stetig zunimmt, gewinnen altersbezogene Erkrankungen an sozialmedizinischer und sozioökonomischer Bedeutung (Dimai et al. 2012; Bleibler et al. 2013; Hadji et al. 2013; DVO 2014; DVO 2017). Zu diesen altersbezogenen Erkrankungen zählen auch chronische Erkrankungen des Bewegungsapparates wie die Osteoporose.

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine Verminderung der Knochenmasse und eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist (DVO 2014; DVO 2017). Der mit der Demineralisierung einhergehende Strukturverlust des Knochens führt durch ein Missverhältnis zwischen Belastung und Belastbarkeit zu einem konsekutiven Anstieg der Knochenfragilität sowie der Frakturneigung (Pollähne und Minne 2001; DVO 2014).

Die Osteoporose ist keine Erkrankung der Neuzeit. Obwohl sie erst seit den frühen 1980er Jahren im medizinischen Sprachgebrauch auftaucht, existiert sie deutlich länger (Fujita 1997). Seit dem Mittelalter wird sie im Volksmund als "Knochenschwund" bezeichnet. Eine berühmte Osteoporose-Patientin, ist die Märchen-Hexe. Obwohl das Krankheitsbild der Osteoporose nie direkt umschrieben wurde, zeigt die Hexe auf alten Scherenschnitten einen gebeugten Rücken und alle charakteristischen Symptome.

Die Osteoporose ist heute ein volkswirtschaftliches Gesundheitsproblem; weltweit sind Menschen – überwiegend postmenopausale Frauen – in dreistelliger Millionenhöhe (Ström et al. 2011; Si et al. 2014) und damit etwa 10 % der Bevölkerung betroffen (Bartl 2010). Die World Health Organization (WHO) hat die Osteoporose aufgrund der Krankheitsfolgen sowie Diagnose- und Therapiekosten in die Liste der weltweit zehn wichtigsten Volkskrankheiten aufgenommen (Bartl 2010). Laut Schätzungen erleidet global jede dritte Frau und jeder fünfte Mann ab einem Alter von 50 Jahren im weiteren Leben eine osteoporotisch bedingte Fraktur, wobei das Risiko altersabhängig weiter ansteigt (Ström et al. 2011). Ab einem Alter von 75 Jahren beträgt das 10-Jahres-Frakturrisiko für Schenkelhalsfrakturen ohne weitere Risikofaktoren über 20 % (Herold 2017).

In Deutschland leiden laut Hochrechnungen ca. 6,3 Millionen Menschen an Osteoporose (Hadji et al. 2013). Die Prävalenz ist bei Frauen deutlich höher als bei Männern (5,2 vs. 1,1 Millionen) und steigt bei beiden Geschlechtern im Alter stark an. Die Anzahl der jährlichen Neuerkrankungen wird auf 885.000 geschätzt (Hadji et al. 2013).

Die Osteoporose wird auch als die "stille Epidemie" bezeichnet, da die Erkrankung zunächst unmerklich und ohne Symptome, verläuft, bis schließlich bei bereits leichter Krafteinwirkung oder spontan eine Fraktur auftritt. Die erhöhte Frakturanfälligkeit kann das ganze Skelett betreffen, jedoch treten Frakturen gehäuft am proximalen Femur, an den Wirbelkörpern und am distalen Radius auf (Hernlund et al. 2013).

Die individuellen Folgen der Frakturen können insbesondere bei älteren Menschen nachhaltig und mit einer hohen Krankheitsbelastung verbunden sein. Ein durch Schmerzen geprägter Alltag bei herabgesetzter Mobilität bis hin zur dauerhaften Immobilisierung und Pflegebedürftigkeit führt zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Lebensqualität und Alltagsfähigkeit der Betroffenen (Lips und van Schoor 2005). Die Konsequenz ist der Verlust der Selbständigkeit mit nachfolgender gesellschaftlicher Isolierung (DVO 2014). Nach einer Osteoporose-bedingten Fraktur können 76 % der Patienten schlechter gehen als zuvor, etwa 25 % sind hilfsbedürftig und 22 % dauerhaft pflegebedürftig (North American Menopause Society 2002; Hadji et al. 2013).

Risikofaktoren wie Schmerzen, Bewegungseinschränkungen und Bettlägerigkeit führen zu einem weiteren Verlust der Knochen-(mineral)-dichte (engl. bone mineral density, BMD) und erhöhen das Risiko für erneute Frakturen. Die Wahrscheinlichkeit, nach einer osteoporotisch bedingten Fraktur innerhalb eines Jahres eine weitere Fraktur zu erleiden, beträgt etwa 20 %. Der entstehende Teufelskreis führt nicht selten durch Folgeer-krankungen (z. B. Lungenentzündung, Beinvenenthrombose, Lungenembolie) zu lebensbedrohlichen Zuständen. Daher stehen sowohl Schenkelhals- als auch Wirbelkörperfrakturen mit einer erhöhten Sterblichkeitsrate in Zusammenhang. Die 1-Jahres Mortalitätsrate nach stattgehabter Schenkelhalsfraktur beträgt bis zu 20 % (Ismail et al. 1998; North American Menopause Society 2002; Kanis et al. 2003; Johnell et al. 2004; Abrahamsen et al. 2009; Ioannidis et al. 2009; Haentjens et al. 2010; Hadji et al. 2013; Melton et al. 2013; DVO 2014; DVO 2017; Herold 2017).

Der finanzielle Aufwand für das deutsche Gesundheitssystem inklusive Akutversorgung, Rehabilitation und eventuelle Pflege (Heimversorgung, familiäre Wiedereingliederung) wird in dem auf das Frakturereignis folgenden Jahr auf durchschnittlich 20.000 Euro pro Fall geschätzt, was sich in Deutschland auf jährlich 5,4 Milliarden Euro hochrechnen lässt (Häussler et al. 2007; Bartl 2010).

Durch die demografische Bevölkerungsentwicklung, den Anstieg der durchschnittlichen Lebenserwartung sowie die Veränderung der Lebensgewohnheiten wird die Inzidenz der Osteoporose und damit der Osteoporose-bedingten Frakturen in den kommenden Jahren weiter ansteigen (Gullberg et al. 1997; Cooper et al. 1992; Compston et al. 1998; Cooper 1999; Meier und Kraenzlin 2013; DVO 2014). Der Dachverband der deutschsprachigen wissenschaftlichen Gesellschaft für Osteologie (DVO) prognostiziert eine Verdoppelung der Anzahl an Erkrankten in Deutschland bis 2050 (DVO 2014). Eine Steigerung der Kosten um 25 % wird bereits bis 2025 erwartet (Hernlund et al. 2013). Damit zählt die Osteoporose zu den gesundheitlichen und volkswirtschaftlichen Herausforderungen des 21. Jahrhunderts. In diesem Sinne gilt es gleichermaßen unter ökonomischen wie humanitären Gesichtspunkten die Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose weiter zu verbessern.

1.2 Knochenstoffwechsel

1.2.1 Aufbau des Knochens

"Die Knochen sind das tragende Gerüst des Körpers und bilden den Hebel, an denen die Muskulatur ansetzt." (Grifka und Kuster 2011). Als Organ hat der Knochen drei wesentliche Aufgaben:

- Stütze und Schutzfunktion
- Hämatopoese
- Mineraldepot: 99 % des Kalziums, 85 % des Phosphats und 50 % des Magnesiums des Körpers sind im Knochen gespeichert.

Das Skelett eines Erwachsenen besteht aus 220 Knochen und macht mit einem Gewicht von ungefähr 10 kg etwa 15 % des idealen Körpergewichtes (KG) aus. Die Architektur des Knochens richtet sich nach der lokalen Beanspruchung. Die für die Stützfunktion erforderliche hohe Belastbarkeit und Elastizität bei minimiertem Materialaufwand und Gewicht (Clark et al. 1975) wird durch die lamelläre Struktur des Knochengewebes erreicht (Böcker et al. 2004). Bei der Knochenneubildung im Rahmen der Entwicklung oder Frakturheilung entsteht primär Geflechtknochen. Die kreuz und quer miteinander verflochtenen Kollagenbündel werden erst sekundär durch Ausdifferenzierung und später durch Remodeling (s. Kap. 1.2.2) durch stabileren und regelmäßig geschichteten Lamellenknochen ersetzt. Makroskopisch werden Knochen in folgende Gruppen unterteilt:

Lange Röhrenknochen sind typisch für die Extremitäten (Femur, Humerus, Tibia).
 Sie gliedern sich in Diaphyse (Knochenmittelteil), Metaphysen (Knochenzwischenteile) und Epiphysen (Knochenenden). Die Diaphyse ist charakterisiert durch eine dicke oberflächliche Kortikalis und eine gering ausgeprägte Spongiosa. Hierdurch entsteht im Knocheninneren eine zusammenhängende Knochenhöhle. Die Metaphysen

und Epiphysen sind im Wachstumsalter durch die Wachstumsfugen (Epiphysenfugen) voneinander getrennt und bestehen aus Spongiosa. Beim Erwachsenen bezeichnen die Metaphysen den Übergang zwischen Diaphyse und Epiphyse. Das Innere der Epiphysen wird durch Knochenbälkchen ausgefüllt. Ihre Kortikalis ist vergleichsweise dünn. Sie sind teilweise von Knorpel überzogen und tragen Gelenke (s. Abb. 1).

- **Kurze Röhrenknochen** (z. B. Wirbelkörper) besitzen eine dünne Kortikalis und eine ausfüllende Spongiosa.
- Plattenknochen (Skapula, Neurokranium): Bei den Plattenknochen sind beide Schichten nur sehr gering ausgeprägt.
- Lufthaltige Knochen (Kieferknochen) sind im Inneren von einer Schleimhaut ausgekleidet.



Abbildung 1: Schematische Zeichnung des anatomischen Aufbaus eines Röhrenknochens (Femur; links) (Schatz o. J) und Querschnitte eines Femurs (rechts) (Med Library.com 2013) Nach der Morphologie des Knochengewebes lassen sich von außen nach innen folgende Schichten unterscheiden (s. Abb. 2):

- Periost: Der Knochen wird an seinen Außenflächen von einer eng anliegenden Bindegewebshaut (Periost) umgeben. Gut durchblutet und innerviert schützt und ernährt diese Hülle die äußere Knochenschicht (Kortikalis).
- Kortikalis: Diese Schicht befindet sich unterhalb des Periosts im Rindenbereich des Knochens und besteht aus der Substantia compacta, welche nach innen vom Endost umgeben ist.
- Spongiosa oder Substantia spongiosa: Weiter innen geht die Kortikalis in ein schwammartiges Gerüst aus feinen Knochenbälkchen (Knochentrabekeln) über. Die Hohlräume der Spongiosa stehen in offener Verbindung mit der Markhöhle im Inneren des Knochens.
- Markhöhle (Cavum medullare): Hier befindet sich das Knochenmark, das mit zunehmendem Lebensalter in den meisten Knochen durch gelbes Fettmark ersetzt wird.
 Die Schichten sind je nach Knochenart verschieden stark ausgeprägt. Nach dem Bauprinzip der "2-Phasen-Komponente" besteht der Lamellenknochen aus einer elastischen Knochenmatrix, in der Kollagenbündel in parallelen Schichten angeordnet sind, und dem kristallin eingelagerten Kalzium und Phosphat. Die entstehenden Lamellen breiten sich in der Spongiosa flächig und parallel zur Oberfläche aus, während sie in der Kompakta vor allem konzentrisch als Osteone angeordnet sind.

Die kleinste Baueinheit des kortikalen Knochens sind zylindrisch geformte Osteone (s. Abb. 2). Ein Osteon besteht aus einem zentralen Havers-Kanal, der Blutgefäße und Nerven führt, und konzentrisch um diesen Kanal angeordnete Knochenlamellen mit dazwischenliegenden Osteozyten. Die Osteozyten kommunizieren untereinander über Kanalikuli. Querverlaufende Verbindungen (Volkmann-Kanäle) verbinden die Havers-Kanäle. Zwischen den Osteonen liegen häufig Reste älterer, umgebauter Osteone, die sogenannten Schaltlamellen. Zum Periost bzw. Endost hin richten sich die Lamellen zunehmend parallel zur Knochenoberfläche aus und bilden die äußere bzw. innere Grenzlamelle (Grifka und Kuster 2011).



Abbildung 2: Schematischer Querschnitt der Diaphyse eines Röhrenknochen (variiert nach National Cancer Institute SEER Training Modules (o. J.))

1.2.2 Knochenphysiologie

Der Knochen ist ein dynamisches Organ mit hoher Durchblutung und Stoffwechselaktivität. Er ist zeitlebens mechanischen und biologischen Veränderungen ausgesetzt. Die Anpassung an wechselnde Bedürfnisse macht einen stetigen Umbau des Knochengewebes erforderlich. Dabei entscheidet der Aktivitätsgrad der Knochenzellen über den Zustand des lokalen Stoffwechsels und letztlich über die Form und Statik des menschlichen Körpers. Im Laufe des Lebens kommt es zunächst zu einer BMD-Zunahme, die um das dreißigste Lebensjahr in einem Maximum (Peak-bone-mass) gipfelt, um im zunehmenden Alter kontinuierlich abzufallen.

Entscheidend für die maximale BMD ist ein gesundes Skelettwachstum in der Kindheit und Jugend, das von verschiedenen Faktoren abhängt. Neben einer genetischen Komponente haben eine kalziumreiche Ernährung, regelmäßige Bewegung, eine ungestörte Zunahme an Gewicht und Körpergröße sowie eine normale Geschlechtsentwicklung Einfluss auf die Knochenmasse und damit auch auf das Osteoporose-Risiko im Alter. Der Knochen wächst während der Kindheit hormonunabhängig und wird mit dem Anstieg der Geschlechtshormone in der Pubertät zum hormonabhängigen Organ. Das Knochenwachstum ("Modeling") endet in der Pubertät mit der Verknöcherung der Wachstumsfugen (Bartl 2010). Die Peak-bone-mass wird beim Schenkelhals vor dem 20. Lebensjahr erreicht (Rodin et al. 1990), bei der Wirbelsäule dagegen erst zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr (Rico et al. 1993). Sie bleibt über zwei bis drei Dekaden konstant. Im Erwachsenenalter findet durch ständigen Abbau und Wiederaufbau ("Remodeling") eine regelmäßige Materialerneuerung des Knochengewebes statt. Dieser Materialaustausch dient folgenden Aufgaben:

- Kalzium-Mobilisation im Rahmen der Kalzium-Homöostase,
- Adaption an neue Belastungsanforderungen,
- Ersatz des alten Knochengewebes: Die alternde Knochensubstanz verliert durch Mineralverlust und Matrixalterung an Festigkeit und Elastizität und bricht leichter. Die gesamte Knochensubstanz wird daher in regelmäßigen Abständen ausgetauscht.
- Reparatur beschädigten Knochens: "Dabei geht es nicht nur um Reparaturen und Heilung von Brüchen ganzer Knochen, sondern auch um die vielen mikroskopisch kleinen Perforationsbrüche (Mikrofrakturen) der Knochenbälkchen, die neben der BMD das Frakturrisiko bestimmen." (Bartl 2010).

Beim Remodeling wird der resorbierte Knochen durch die gleiche Menge an neuem Knochengewebe ersetzt. In der zweiten Lebenshälfte kommt es jedoch durch ein Ungleichgewicht zwischen auf- und abbauenden Prozessen zu einer negativen Knochenbilanz. Diese hängt von der Ausgangslage (Peak-bone-mass), der Lokalisation, dem Geschlecht, eventuellen Krankheiten und von Lebenswandel-bedingten Risikofaktoren (z B. Ernährung, Sport) ab.

Das Knochengerüst bei Frauen ist im Vergleich zu Männern genetisch bedingt im Mittel zierlicher gestaltet. Östrogen erzeugt einen geringeren Knochenzuwachs als Testosteron, so dass die Peak-bone-mass bei Männern durchschnittlich höher liegt als bei Frauen.

Physiologisch nimmt die BMD in der zweiten Lebenshälfte unabhängig vom Geschlecht kontinuierlich um 0,5–1 % pro Jahr ab (s. Abb. 3). Dieser altersabhängige Knochenschwund ist genetisch vorprogrammiert. Er verläuft in allen Skelettarealen annähernd gleich mit einer leichten Betonung im Bereich der Wirbelsäule und des proximalen Oberschenkels.

Die altersbedingte Abnahme der BMD ist bei Frauen größer als bei Männern (Blunt et al. 1994). Nach der Menopause steigt bei Frauen mit sinkendem Östrogen-Spiegel der Knochenverlust rapide auf bis zu 4 % pro Jahr an (Bartl 2010). Daher verlieren Frauen zwischen dem 40. und 70. Lebensjahr im Durchschnitt ca. 40 % ihrer maximalen Knochenmasse, Männer hingegen nur etwa 12 % (Bartl 2010). Zahlreiche prospektive Studien belegen, dass mit dem Abfall der BMD das Frakturrisiko exponentiell zunimmt. Eine

BMD-Abnahme um 10–15 % verdoppelt das Frakturrisiko (Bartl 2010). Nach einem Substanzverlust von ca. 40 % der Peak-bone-mass kommt es bei mehr als der Hälfte aller Betroffenen schon nach einem inadäquaten Trauma zu Knochenbrüchen (Mazess et al. 1989). "Die maximale Knochenmasse des jungen Erwachsenen stellt daher ein Kapital dar, das in jungen Jahren aufgebaut und später gepflegt werden muss". (Bartl 2010).



Abbildung 3: Altersabhängiger Verlauf der Knochenmasse (Hahn 2016)

Für die ständigen Reparaturen und Anpassungen verfügt das Knochengewebe über spezialisierte Zellsysteme (Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten) mit unterschiedlichen Aufgaben. Dieses zelluläre Kompartiment umfasst lediglich ca. 2 % der organischen Phase des Knochens (Einhorn 1996).

Osteoblasten – knochenaufbauende Zellen

Osteoblasten stammen von mesenchymalen Vorläuferzellen ab. Sie sind vergleichsweise kleine Zellen, die der mineralisierten Knochengrundsubstanz schichtartig aufliegen und untereinander durch feine Zellfortsätze in Verbindung stehen. Ihre Hauptfunktion ist die Synthese der kollagenen Knochenmatrix (unmineralisiertes Osteoid), welche die organische Grundsubstanz des Knochens darstellt, sowie deren Mineralisation. Die Knochenmatrix besteht zu 90 % aus Kollagen Typ I und zu 10 % aus nicht-kollagenen Proteinen. Hierzu zählen Osteocalzin und Osteonektin, die eine hohe Affinität zu Kalzium besitzen, Bone Sialoprotein (BSP), Bone Morphogenic Protein (BNP), Proteoglykane sowie die alkalische Phosphatase, welche die Mineralisation des Knochens steuert (Woitge und Seibel 2000; Bartl 2010). Die Anordnung des gebildeten Kollagens ist typisch für die resultierende Knochenstruktur (Schenk 1978). Durch die ca. zehn Tage später beginnende Einlagerung von Hydroxylapatit-Kristallen (Verkalkung) wird die Knochenmatrix verstärkt und mechanisch stabilisiert (Komori et al. 1997; Otto et al. 1997). Bei der Knochenbildung mauert sich etwa jeder zehnte auf der Knochenoberfläche liegende Osteoblast in das neu gebildete Osteoid ein, wobei ein feines System von Kanälen (Kanalikuli) entsteht. In diesem deutlich weniger stoffwechselaktiven Zustand werden die Osteoblasten als Osteozyten bezeichnet.

Osteozyten – knochenüberwachende Zellen

Diese in Lakunen liegenden, ruhenden Zellen stehen über gap junctions der Zellfortsätze innerhalb der Knochenkanalikuli miteinander und mit der Oberfläche in Kontakt und bilden so ein Netzwerk in dem neu gebildeten Knochen. Im Rahmen des physiologischen Remodelings, bei krankhaftem Knochenverlust oder nach Frakturen können die Osteozyten wieder aktiviert werden (Bord et al. 1996; Wüster und Ziegler 1999). Als mechanosensorische Zellen registrieren sie das Alter der Knochensubstanz sowie den Muskelzug am Knochen und leiten Signale an die auf der Knochenoberfläche liegenden Baueinheiten weiter. Osteozyten sind für die funktionelle Adaption des Knochens, den Erhalt der Knochenmatrix und für die Kalzium-Homöostase unverzichtbar.

Osteoklasten – knochenabbauende Zellen

Gegenspieler der Osteoblasten sind die Osteoklasten. Diese beweglichen, mehrkernigen Riesenzellen entstehen durch die Fusion von monozytären Vorläuferzellen. Osteoklasten sind für den Abbau des nicht mehr verwendbaren Knochens verantwortlich. Sie gelangen über den Blutkreislauf oder durch direkte Migration aus dem Knochenmark in die Resorptionszonen des Knochens. Osteoklasten enthalten Mitochondrien und Lysosomen mit Kollagenasen und sauren Phosphatasen. Charakteristisch sind zahlreiche Einfaltungen der Zellmembran (ruffled border) an der dem Knochen zugewandten Seite, wo während der Knochenresorption Wasserstoff-Ionen und proteolytische Enzyme sezerniert werden, die das umgebende Mineral auflösen und die organische Matrix abbauen. Die restliche organische Matrix wird phagozytiert und im Zytoplasma verdaut. Die frei werdenden Mineralbestandteile werden in die Blutbahn abgegeben. Die durch die Osteoklasten entstehenden Vertiefungen im Knochen werden als Howship'sche Lakunen bezeichnet.

Zyklus des Knochenumbaus (Remodeling)

Jährlich werden bei gesunden Menschen etwa 10 % des Skeletts umgebaut, so dass innerhalb von zehn Jahren das Äquivalent der gesamten Knochenmasse einmal abgebaut und neu synthetisiert wird. Der nur teilweise verstandene Knochenumbau läuft in Zyklen von ungefähr 120 Tagen ab. Während die Resorptionsphase lediglich zwei bis drei Wochen in Anspruch nimmt, ist die Formationsphase (Knochenaufbau) erst drei Monate später abgeschlossen. Beide Prozesse verlaufen parallel nebeneinander, um den Erhalt der Masse zu gewährleisten (s. Abb. 4).

Der Zyklus des Knochenaufbaus wird von Basic Multicellular Units (BMU) gesteuert, die aus Gruppen von Osteoklasten und Osteoblasten bestehen. Im kortikalen Knochen durchdringen die BMUs das Gewebe, wohingegen sie sich im trabekulären Knochen an der Oberfläche bewegen. Die Knochensaumzellen (Bone Lining Cells) liegen als schützender Belag auf der Knochenoberfläche. Folgende Knochenumbauphasen werden unterschieden:

- Aktivierungsphase (Abb. 4A–B links; Abb. 4.1 rechts): Das durch die Kontraktion der Bone Lining Cells freigelegte Kollagen zieht Präosteoklasten aus dem Knochenmark an. Die Osteoklasten bewegen sich hinter den BMUs auf der Knochenoberfläche mit einer Geschwindigkeit von 10 µm/d voran. Osteoklasten fusionieren zu multinukleären Zellen, die durch Resorption eine Howship'sche Lakune erzeugen. Präosteoblasten werden zur Proliferation angeregt.
- Resorptionsphase (Abb. 4B–F links; Abb. 4.2 rechts): Die Resorption wird durch die Osteoklasten fortgesetzt.
- Umschaltphase (Abb. 4C links; Abb. 4.3 rechts): Nach Erreichen einer definierten Resorptionstiefe erfolgt die Glättung der Lakune. Die Osteoklasten ziehen weiter hinter den BMUs her. Am Boden der Lakune formieren sich Osteoblasten.
- Anbauphase mit Osteoid-Produktion (Abb. 4C–F links; Abb. 4.4 rechts): Die Osteoblasten füllen den entstandenen Defekt durch Sekretion der Knochengrundsubstanz (Osteoid) wieder auf (Abb. 4C–F links, schwarze Linie).
- Anbauphase mit Osteoid-Mineralisation (Abb. 4D–F links; Abb. 4.5 rechts): Das Osteoid beginnt zu mineralisieren (Abb. 4D, horizontale Streifen) und zu verknöchern. Die Osteoblasten flachen ab (Abb. 4E) und differenzieren an der Oberfläche zu Bone Lining Cells. Alle Zellen verringern ihre Syntheseleistung.
- **Ruhephase** (Abb. 4F links): Lokal ist der Remodeling-Zyklus nun abgeschlossen (Abb. 4F, linker Rand), die BMU zieht jedoch weiter voran (Abb. 4F, rechter Rand).





Regulation des Knochenumbaus

Das Zusammenspiel der Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten sichert die Belastbarkeit der Knochenstruktur. Als stimulierende und hemmende Regulatoren wirken Zytokine (z. B. Tumornekrosefaktor-(TNF)-alpha, Interferon-(IFN)-gamma, Interleukin-(IL)-1 und -6), Hormone (z. B. Parathormon (PTH), PTH related Protein (PTHrP), 1,25(OH)2-Vitamin-D3, Östrogene, Androgene) und Wachstumsfaktoren (z. B. Fibroblast-growthfactor (FGF), Plateled-derived-growth-factor (PDGF), Insulin-like-growth-factor (IGF), Transforming-growth-factor-(TGF)-beta). Die Über- oder Unterproduktion dieser Substanzen führt zu klinisch sichtbaren sowie laborchemisch und radiologisch messbaren Veränderungen am Kochen.

Die Osteoklasten- und Osteoblasten-Aktivität bildet ein sensibles Gleichgewicht, das durch einen Signalweg bestehend aus dem Liganden "Receptor activator of nuclear factor-**k**B ligand" (RANKL) (Lacey et al. 1998), seinem Rezeptor "Receptor activator of nuclear factor-**k**B" (RANK) und dem löslichen Rezeptorantagonisten Osteoprotegerin (OPG) kontrolliert wird (Simonet et al. 1997), Der RANKL/RANK/OPG-Signalweg (s. Abb. 5) spielt eine Schlüsselrolle bei der Steuerung der Knochenumbauvorgänge (Takahashi et al. 1988; Simonet et al. 1997; Bucay et al. 1998; Suda et al. 1999; Kostenuik et al. 2001; Flick et al. 2003).



Abbildung 5: A: Knochen-abbauende (resorptive) und -aufbauende (calzitrope) Faktoren; B: Knochen-aufbauende (anabole) und antiosteoklastische (Knochenabbau-hemmende) Faktoren (Boyle et al. 2003)

CFU-GM = Colony-forming unit granulocyte/macrophage, M-CSF = Macrophage-colony stimulating-factor, RANKL=Receptor activator of nuclear factor-kB; PTH = Parathormon; PTHrP = Parathormon related Protein, PGE2 = Prostaglandin E2; TNF = Tumornekrose-faktor; LIF = Leukemia inhibitory factor; TPO = Thrombospondin; PDGF = Platelet-de-rived growth factor; OPG-L = Osteoprotegerin-ligand; IL= Interleukin; TGF = Transform-ing growth factor)

RANKL (s. Abb. 5A) fördert die Knochenresorption durch die Steigerung der Anzahl, der Aktivität und der Lebensdauer funktionsfähiger Osteoklasten. Die Expression von RANKL wird von Osteoblasten, aktivierten T-Lymphozyten, synovialen Fibroblasten und Knochenmark-Zellen über knochenresorptiv wirkende Faktoren (z. B. PTH) induziert. Durch Bindung aktiviert RANKL den RANK auf der Oberfläche der Osteoklasten (Li et al. 2000) und Präosteoklasten und leitet die Knochenresorption ein. OPG bindet an RANKL, so dass dieser nicht mehr an RANK auf der Oberfläche der Präosteoklasten (s. Abb. 5B) binden kann (Simonet et al. 1997). Dadurch wird die Osteoklastogenese gehemmt und die Lebensdauer und Aktivität vorhandener Osteoklasten vermindert. Die OPG-Expression wird von Faktoren gefördert, die den Knochenabbau hemmen und damit die aufbauenden (anabolen) Effekte unterstützen. Dazu zählt Östradiol, auf dessen besondere Stellung in diesem Zusammenhang im Folgenden speziell eingegangen wird (s. Kap. 1.3.2). Weitere OPG-sezernierende Gewebe sind Haut, Leber, Magen, Lunge, Niere und Plazenta.

1.3 Krankheitskomplex Osteoporose

1.3.1 Definition

Die Internationale Consensus Development Conference on Osteoporosis erarbeitete 1993 in Hongkong die heute gültige Definition der Osteoporose:

"Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, charakterisiert durch eine Verminderung der Knochenmasse und Umbau der Mikroarchitektur des Knochengewebes mit reduzierter Festigkeit und erhöhter Frakturanfälligkeit" (Consensus development conference 1993; Kanis 1994).

Der Zusammenhang von BMD und Frakturrisiko wurde durch zahlreiche prospektive Studien belegt (Marshall et al. 1996; Schuit et al. 2004; Johnell und Kanis 2005). Die Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie ergänzte diese Definition durch die Untergliederung in Osteoporose-Formen mit hohem bzw. niedrigem Knochenumsatz (high / low turnover; s. Kap. 1.3.2).

Auf der Grundlage dieser Definition erstellte die WHO 1994 eine Klassifizierung des Schweregrades der Osteoporose, die auf der BMD bzw. dem Knochenmineralgehalt (Bone Mineral Content, BMC) und dem Frakturstatus basiert. Die Werte werden hierbei durch die Dual-Energy X-ray-Absorptiometry (DEXA) erhoben (s. Kap. 1.3.3).

Die individuelle BMD einer Person wird verglichen mit dem Mittelwert eines Normalkollektives, bestehend aus gesunden Erwachsenen des gleichen Geschlechts im Alter zwischen 20 und 40 Jahren, dem Zeitpunkt der Peak-bone-mass. Die Abweichung der BMD vom statistischen Mittelwert (Normwert) wird in Standardabweichungen (SD) zu diesem angegeben und als T-Score bezeichnet. Dieser Wert hat sich zur Beschreibung der BMD, der Ausprägung des Knochenschwundes und der vermuteten Knochenqualität etabliert.

Eine Osteoporose liegt vor, wenn die gemessene BMD um mehr als 2,5 SD unter dem Normwert liegt. Eine Fraktur ohne adäquates Trauma belegt ebenfalls unabhängig von der BMD-Messung eine schwere bzw. klinisch manifeste Osteoporose. Basierend auf den T-Scores wird die Osteoporose in folgende Schweregrade eingeteilt:

- Normalbefund:

Die BMD oder der BMC weicht um weniger als eine SD vom Mittelwert der maximalen BMD (Normwert) ab, T-Score < 1 SD

- Schweregrad 0: Osteopenie:

T-Score von -1,0 bis -2,5 SD

- Schweregrad 1: präklinische (latente) Osteoporose (ohne Frakturen):
 BMC: T-Score < -2,5 SD; "messtechnische Osteoporose", noch keine Frakturen
- Schweregrad 2: manifeste Osteoporose (mit Fraktur(en)):
 T-Score < -2,5 SD und Fraktur(en) der Wirbelkörper ohne adäguates Trauma
- Schweregrad 3: schwere manifeste Osteoporose (mit Frakturen):

T-Score < -2,5 SD und Frakturen der Wirbelkörper ohne adäquates Trauma und zusätzlich extravertebrale Frakturen (z. B. Oberschenkelhals, Unterarm)

Um diese Einteilung dem alterstypischen Zustand des Skelettsystems anzupassen – ältere Menschen haben physiologischerweise eine niedrigere BMD – wurde der Z-Score eingeführt. Dieser bezieht sich anders als der T-Score auf den statistischen BMD-Mittelwert einer alters- und geschlechtsgleichen, knochengesunden Vergleichspopulation.

Die Einteilung in die Osteoporose-Schweregrade gilt derzeit als Richtlinie für die Diagnosestellung einer Osteoporose. Das Vorgehen, den T- und Z-Score zur alleinigen Diagnosestellung und zur Therapieentscheidung heranzuziehen, wird kontrovers diskutiert. Der Nutzen für epidemiologische Studien ist unbestritten, jedoch wird durch systematische Fehler der DXA-Messung die Zuverlässigkeit im Individualfall in Frage gestellt (Schneider und Reiners 1998; Dequeker und Luyten 2001; Schneider 2009). Die Diagnosestellung einer Osteoporose sollte somit unter Berücksichtigung des klinischen Kontexts erfolgen.

1.3.2 Ursache und Einteilung

Die Osteoporose ist eine multifaktorielle Erkrankung, wodurch eine Klassifizierung nach verschiedenen Gesichtspunkten möglich wird. Bewährt hat sich aber eine für den klinischen Alltag praktikable Einteilung (Franke et al. 1996). Nach dem Befallsmuster des Skeletts lassen sich lokalisierte und generalisierte (systemische) Osteoporosen unterscheiden. Ursachen für lokalen Osteoporosen sind beispielsweise die Immobilisation (Schienung) einer Extremität oder eine rheumatische Arthritis. Die häufigere generalisierte Osteoporose betrifft trotz ihres Namens nur selten homogen das gesamte Skelett, weist jedoch stets ein symmetrisches Muster auf. Die generalisierte Osteoporose lässt sich hinsichtlich ihrer Ursachen in primäre und sekundäre Osteoporosen einteilen (s. Tab. 1).

Primäre Osteoporosen (95 %)

Bei primären Osteoporosen sind weder auslösende Erkrankungen noch verursachende Mechanismen vorhanden. Als Ursachen gelten bestimmte Lebensumstände der Betroffenen, die in engem Zusammenhang mit dem Alter, der hormonellen Regulation und dem Kalzium-Stoffwechsel stehen. Dabei spielt der postmenopausale Östrogen-Abfall eine entscheidende Rolle (Böcker et al. 2004) (s. Kap. 1.2.2). Bei der primären Osteoporose werden folgende Formen unterschieden (Schmolke 2001):

- Idiopathische Osteoporose: Diese seltene Form tritt bei Kindern und jungen Erwachsenen beiderlei Geschlechts mit normaler Gonadenfunktion auf.
- Primäre Osteoporose Typ I (postmenopausale Osteoporose): Diese häufigste Form tritt bei Frauen nach der Menopause zwischen dem 51. und 75. Lebensjahr oder nach beidseitiger Ovarektomie auf (Bartl 2010). Als Folge des Östrogen-Defizits kommt es zu einem beschleunigten Verlust überwiegend des spongiösen (trabekulären) Knochens. Häufige Komplikationen sind Frakturen der Wirbelkörper, des distalen Radius und des Femurs nach Bagatelltraumata. Auch bei Männern kann infolge eines Testosteron-Mangels ein vergleichbarer Knochenschwund auftreten (Bartl 2010). Die postmenopausale Osteoporose geht stufenlos in die senile Osteoporose über.
- Primäre Osteoporose Typ II (senile Osteoporose): Von dieser Form sind meist Frauen und Männer jenseits des 70. Lebensjahres betroffen. Ursache sind Alterungsprozesse, die mit der Abnahme der Osteoblasten verbunden sind und sowohl den spongiösen (trabekulären) als auch den kortikalen Knochen betreffen. Die Folgen

sind Frakturen des Schenkelhalses, des proximalen Humerus, der proximalen Tibia und des Beckens.

Sekundäre Osteoporosen (5 %)

Sekundäre Osteoporose-Formen treten als Folge anderer Grunderkrankungen bzw. als unerwünschte Wirkung bestimmter Arzneimittel auf. Sie umfassen nur 5 % aller Osteoporosen, verursachen aber 20 % der Osteoporose-bedingten Frakturen (Bartl 2010). Die häufigste Ursache für sekundäre Osteoporosen ist eine langfristige Glukokortikoid-Medikation (Nordin 1987; Toth und Tulassay 2000), gefolgt von endokrinologischen Erkrankungen (s. Tab. 1). Aber auch andere mit der Störungen des Kalzium- und Knochenstoffwechsels einhergehende Erkrankungen führen zur Abnahme der Knochensubstanz. Im fortgeschrittenen Alter sind häufig Kombinationen aus verschiedenen Grunderkrankungen, Risikofaktoren und Medikamenten ursächlich.

Tabelle 1:	Formen und Ursachen der generalisierten Osteoporose (variiert nach Sei
bel und Krae	nzlin 1995)

Primäre	-	Idiopathische Osteoporose: juvenil, adult, prämenopausal, prä-		
Osteo-po-		senil		
rosen	-	Postmenopausale Osteoporose: Typ I		
	-	Senile Osteoporose: Typ II		
Sekundäre	-	Endokrin/metabolisch:		
Osteo-po-		Cushing Syndrom, Hyperthyreose, Hypogonadismus, Hyperpa-		
rosen		rathyreodismus, Akromegalie, Diabetes mellitus		
	-	latrogen/medikamentös:		
		Glukokortikoide, Heparine, Schilddrüsenhormone, LH-RH-Analoga,		
		Tamoxifen, Laxantien, Colestyramin, Zytostatika		
	-	Myelogen/onkologisch:		
		lymphoproliferative Erkrankungen, Multiples Myelom, diffuse Kno-		
		chenmarkkarzinose		
	-	Parainfektiös/immunogen: chronische Polyarthritis, Morbus Crohn		
	-	Immobilisation/Inaktivität: Bettruhe, Paraplegie, Hemiplegie,		
		Raumfahrt		
	-	komplexe Osteopathien: renale / intestinale Osteopathie		

Weitere Einteilungen werden im Folgenden kurz erläutert:

Einteilung nach dem Knochenumsatz:

- low-turnover-Osteoporose mit geringer Knochenabbaurate (slow-loser-Situation)
- high-turnover-Osteoporose mit schnellem Knochenabbau (fast-loser-Situation)
- very-high-turnover Osteoporosen mit besonders raschem Knochenverlust
- (fast-loser-Situation)

Diese Einteilung orientiert sich an dem Ausmaß (Geschwindigkeit/Dynamik) des Knochenumbaus im Rahmen des Remodelings. Halten sich Knochenaufbau und -abbau die Waage, befindet sich das Remodeling im Gleichgewicht. Der high-turnover-Osteoporose liegt eine exzessiv erhöhte Aktivität der Osteoklasten (Knochenabbau) bei normaler Osteoblasten-Aktivität (Knochenaufbau) zugrunde, während bei der low-turnover-Osteoporose die Knochenneubildung durch die Osteoblasten bei normaler Osteoklasten-Aktivität vermindert ist (s. Kap. 1.2.2; Nilas und Christiansen 1987; Pietschmann und Peterlik 1999). Aus beiden Situationen resultiert ein erhöhter Verlust der Knochenmasse. Treffen beide Faktoren – hohe Abbaurate und niedrige Aufbaurate – zusammen liegt eine "fastloser-Situation" vor.

Diese Unterscheidung der Osteoporose berücksichtigt die zugrundeliegende Pathophysiologie und hat daher auch Implikationen für die Wahl der Behandlungsstrategie. Antiresorptiv wirkende Medikamente minimieren eine erhöhte Knochenabbaurate. Durch osteoproduktive Medikamente lässt sich die Knochenaufbaurate zusätzlich stimulieren (s. Kap. 1.3.4).

Zur Unterscheidung der Stoffwechsellage dienen biochemische Knochenmarker (Knochenabbauprodukte wie Beta-Crosslaps im Blut oder Desoxypyridinolin im Urin) und seltener die Knochenbiopsie.

Einteilung nach dem Schweregrad (s. Kap. 1.3.1):

- normaler Knochen
- Osteopenie
- präklinische (latente) Osteoporose
- manifeste Osteoporose

Einteilung nach dem Auftreten von Folgen, bzw. osteoporotischer Frakturen:

- präklinische (latente) Osteoporose
- manifeste Osteoporose

Wird eine Osteoporose nur aufgrund einer erniedrigten BMD definiert (gemäß WHO-Definition), ohne dass bereits eine osteoporotisch bedingte Fraktur aufgetreten ist, spricht man von einer präklinischen Osteoporose. Diese Diagnose bezeichnet damit lediglich ein erhöhtes Frakturrisiko. Die Behandlungsbedürftigkeit der präklinischen Osteoporose hängt vor allem davon ab, ob eine erhöhte Knochenabbaurate vorliegt. Die Diagnose einer manifesten Osteoporose bezeichnet ein Krankheitsbild, das unabhängig von der BMD bereits zu osteoporotischen Frakturen geführt hat und somit in jedem Fall einer Behandlung bedarf (Daichendt o. J.).

1.3.3 Diagnostik

Bei der Diagnostik der Osteoporose wurden in den vergangenen Jahren erhebliche Fortschritte erzielt, wodurch Osteoporose-gefährdete Patienten besser erfasst werden können (Genant et al. 1998). Eine frühe Diagnosestellung ist neben dem Erkennen und Verhüten von Risikofaktoren entscheidend für die erfolgreiche Behandlung der Osteoporose. Die Diagnostik basiert auf einer Kombination aus Anamnese, körperlicher Untersuchung, Labor- und Röntgendiagnostik, ggf. einer internistischen Zusatzdiagnostik zur Detektion einer sekundären Osteoporose-Form sowie der meist am Ende der diagnostischen Kette stehenden BMD-Bestimmung. Im Folgenden werden die eingesetzten bildgebenden Verfahren beschrieben

Röntgendiagnostik

Konventionelle Röntgenaufnahmen des Skeletts sind zur Frühdiagnose einer Osteoporose nur unzureichend geeignet, da Knochensubstanzverluste erst ab 25–30 % zuverlässig erkannt werden (Andreassen et al. 1997; Bartl 2010). Einer radiologisch erkennbaren Osteoporose ist somit bereits ein substantieller Knochenverlust vorausgegangen (Haberkamp und Allolio 1992). Die Röntgendiagnostik ist jedoch bei der Abklärung von Differentialdiagnosen, sekundären Osteoporosen sowie unklarer Rückenschmerzen unentbehrlich und hilft stumme Frakturen oder Einbrüche zu lokalisieren. Zudem kann bei erschwerter BMD-Messung an der Wirbelsäule (z. B. bei Überlagerungen durch Aortenkalk) anhand der Röntgenmorphologie am proximalen Femur der Schweregrad einer Osteoporose mittels Singh-Index bestimmt werden. Eine verlässliche BMD-Messung ist jedoch mit einem Röntgenbild nicht möglich. Daher wurden verschiedene Verfahren zur Erfassung der Knochenmasse entwickelt.

Osteodensitometrie

Die BMD-Messung spielt nicht nur in der (Differential)-Diagnose der Osteoporose eine entscheidende Rolle, sondern auch bei therapeutischen Entscheidungen, der individuellen Frakturrisikoabschätzung und der Verlaufskontrolle. Für die Abschätzung des Frakturrisikos ist die BMD die wichtigste Determinante (Marshall et al. 1996; Schuit et al. 2004; Johnell und Kanis 2005). Eine BMD-Abnahme um 10–15 % geht mit einer Verdopplung des Frakturrisikos im Bereich der Wirbelsäule und einer Verdreifachung im Bereich des Oberschenkelhalses einher (Wuster et al. 1994; Marshall et al. 1996; Bartl 2010).

Mit Hilfe der Osteodensitometrie wird der BMD in g/cm, bzw. die BMC in g/cm² oder g/cm³ in verschiedenen Arealen des Skeletts gemessen. Hierzu stehen mehrere nichtinvasive Methoden zur Verfügung, wobei der DEXA eine zentrale Rolle zukommt.

Bei allen osteodensitometrischen Verfahren werden die Messergebnisse eines Individuums mit einer alters-, geschlechts- und rassenspezifischen Kontrollgruppe verglichen (s. Kap. 1.3.1) und die BMD als T- oder Z-Scores angegeben. Der T-Score bildet den Ist-Zustand. bzw. das momentane Osteoporose-Risiko eines Patienten ab und dient zudem der Beurteilung der Frage, ob eine Fraktur Osteoporose-assoziiert ist oder nicht. Mit Hilfe des Z-Scores lässt sich das prospektive Frakturrisiko vorhersagen (Wüster et al. 1998).

Dual-Energy X-ray-Absorptiometry (DEXA)

Die in den 1980er Jahren entwickelte DEXA-Methode hat sich weltweit als Goldstandard der BMD-Bestimmung etabliert (Delmas 1995; Andreassen et al. 1997; Kanis 1997; Minne et al. 2002). Die Methode wird von der WHO und dem DVO zur Diagnosestellung der Osteoporose und zur Stellung der Therapieindikation empfohlen (s. Kap. 1.3.1) (WHO Study Group 1994; Bartl 2010).

Die DEXA-Methode verwendet einen Ganzkörperscanner, der durch einen beweglichen Detektor mittels zwei energetisch unterschiedlicher (40 und 80 Elektronenvolt (keV) Röntgenstrahlen den Körper geradlinig scannt. Die verschiedenen Gewebedichten weisen je nach Energiestufe der Röntgenstrahlen unterschiedliche Schwächungscharakteristika auf (Kalender 2005). Während die Hochenergiekomponente kaum Unterschiede in der Abschwächung zeigt, wird die Niedrigenergiekomponente an Knochen stark und in Weichteilgewebe wenig abgeschwächt. Auf der Basis dieser Messwerte wird der weichteilbedingte Absorptionsanteil rechnerisch eliminiert sowie der BMC bzw. BMD bestimmt (Bröll und Dambacher 1996). Da es sich bei der DEXA-Methode um ein planares, zweidimensionales Verfahren handelt, ist der Begriff der BMD-Messung streng genommen nicht korrekt. Das Verfahren misst keine BMD in g/cm³, sondern eine Knochenmasse pro Längen- (BMC in g/cm) bzw. Flächeneinheit (BMD in g/cm²) (Bröll und Dambacher 1996).

Standardisierte Messorte sind mit der Lendenwirbelsäule (L1–L4) und dem Hüftgelenk (bzw. dem proximalen Femur) die beiden Osteoporose-bedingt frakturgefährdetsten Skelettareale. Die International Society of Clinical Densitometry (ISCD) empfiehlt für eine ausreichende Messgenauigkeit und zur Vorbeugung von Messfehlern die Analyse von mindestens zwei Skelettarealen (Schneider und Reiners 1998; DVO 2014). Die DEXA-Methode misst mit einer Richtigkeit von 2–6 % und einer Präzision von 1–3 % (Variationskoeffizient) sehr genau und eignet sich daher ideal für Kontrollmessungen (Watts 2004; Bartl 2010; DVO 2014). Die Strahlenbelastung ist gering und liegt je nach Gerät, Körperteil und Dauer der Messung unter 5–30 μ Sv/Areal. Dies entspricht 1/10 bis 1/100 einer normalen Röntgenaufnahme und ist mit der natürlichen Hintergrundstrahlung vergleichbar (UNSCEAR 2001; Pandey et al. 2011; Sato 2016).

Weitere Vorteile der DEXA-Methode sind der geringe Zeitbedarf (Sekunden bis wenige Minuten) sowie die relativ geringen Kosten (40–50 Euro). Paradoxerweise wird in Deutschland eine BMD-Bestimmung von den gesetzlichen Krankenkassen erst beim Auftreten einer Fraktur bezahlt. Dies ist nicht nur aus sozioökonomischer Sicht, vor dem Hintergrund der hohen Behandlungskosten für Osteoporose-induzierte Frakturen, sondern auch aus medizinischer Sicht als fragwürdig zu erachten.

Der Nachteil der DEXA ist, dass aufgrund der integralen Messung des zu untersuchenden Skelettareals mittels posterior-anteriorem Strahlengang an der Lendenwirbelsäule kalkhaltige Strukturen oder andere absorbierende Substanzen erfasst werden. Daher können degenerative Kalzifikationen an Wirbeln, Gelenken und Bändern, ebenso wie eine verkalkte Aorta, verkalkte mesenteriale Lymphknoten, Metallverschlüsse oder Knochenzement, zu falsch erhöhten BMD-Werten führen (Seeman und Martin 1989; Grampp et al. 1997; Grampp et al. 1999; Bartl 2010). Zudem können Skoliosen und Distorsionen der skelettalen Architektur, Wirbelkörperfrakturen sowie metallische Osteosynthesen die Genauigkeit der Wirbelkörpermessungen beeinträchtigen. Eine vorausgehende Röntgenaufnahme der Lendenwirbelsäule kann hier helfen. Neue Geräte messen in seitlicher Projektion und stellen durch eine höhere Bildauflösung die Struktur der Wirbelkörper und der Hüfte detailliert dar (Bartl 2010). Am Femur stellen Prothesen und Bewegungseinschränkungen (Innenrotation des Beins um 25°) weitere Ursachen für Messfehler dar.

Quantitative Computertomografie (QCT / periphere QCT (pQCT))

Die QCT ist eine Röntgenschichtaufnahme, die eine überlagerungsfreie, dreidimensionale (3D) BMD-Bestimmung ermöglicht. Sie ist neben der DEXA ein etabliertes Verfahren der Osteodensitometrie.

Die QCT wird an zentralen und peripheren Messorten durchgeführt. Gemessen wird meist zentral am 1.- 3. Lendenwirbelkörper und am proximalen Femur. Zu den peripheren Messorten gehört der distale Radius und seltener die Tibia oder die Ferse. Während QCT-Systeme als Ganzkörperscanner ausgelegt sind, kommen für pQCT-Messungen kompakte und preisgünstigere Scanner zur Anwendung. Je nach Messort dauert die QCT/pQCT-Messung bis zu 20 min. Mit Hilfe eines Übersichtsscans werden an standardisierten Positionen die darzustellenden Spongiosa-Bereiche ausgewählt. Nach der Aufnahme des CT-Scans werden automatisch "Regions of interest" (ROI) in die trabekulären und kortikalen Anteile des zu untersuchenden Knochens gelegt. Die gemessenen Schwächungskoeffizienten des Gewebes (Dichtewerte) werden mit dem von Wasser in Beziehung gesetzt und als Hounsfield Einheiten (HU) angegeben (Wasser = 0 HU). Bei jeder Messung wird ein BMD-Phantom aus Hydroxylapatit-Äguivalenten zur internen Kalibrierung mitgescannt (Cann und Genant 1989; Kalender und Suess 1987; Krestan und Gruber 2013). Darüber wird bei der Berechnung der Dichtewerte eine mögliche geräteabhängige Drift korrigiert (Kalender 2005). Die Messwerte werden mit den Referenzwerten des Phantoms verglichen und in BMD-Werte umgerechnet. Durch die Bildung eines Mittelwerts werden extraossäre Verkalkungen aus dem Messbereich eliminiert. Das Ergebnis wird in einer Grafik mit vorgegebener oberer und unterer Normgrenze eingezeichnet. Diese echte physikalische Dichtemessung wird in mg/cm³ (Masse pro Volumen) ausgedrückt (Sievanen et al. 1998).

Das Prinzip des T- und Z-Scores (s. Kap. 1.3.1) wird auch für die QCT verwendet. Allerdings sind die T-Werte der QCT-Messung nicht mit denen der DEXA-Messung vergleichbar und werden daher nicht bei der WHO-Definition der Osteoporose verwendet (Kanis 1994; Faulkner et al 1999). Unterschiedliche Scantechniken (DEXA, QCT) und Messorte führen zwangsläufig zu unterschiedlichen Ergebnissen. Es wurden BMD-Absolutwerte für die QCT eingeführt, angegeben als Masse an Hydroxylapatit pro Volumeneinheit (Felsenberg und Gowin 1999; Bartl 2010):

Osteopenie	Normal	Osteoporose
80–120 mg/cm³	> 120 mg/cm ³	< 80 mg/cm³

Der Vorteil des QCT/pQCT-Verfahrens besteht darin, dass der BMC der Kortikalis und Spongiosa separat analysiert wird, wodurch pathologische Veränderungen in der stoffwechselaktiveren Spongiosa früher und präziser dargestellt werden als mit dem DEXA-Verfahren (Schneider et al. 1992; Takada et al. 1996). Eine Osteoporose kann folglich zu einem früheren Zeitpunkt erkannt werden. Neben der BMD wird bei dem QCT/pQCT-Verfahren zudem die Knochengeometrie im Querschnitt erfasst, wodurch Aussagen zur Knochenstruktur und -qualität möglich sind. Aus der Kombination von Materialeigenschaften (z. B. Dichte), Materialverteilung (Struktureigenschaften) und Richtung der Krafteinwirkung über den Querschnitt lassen sich mechanische Parameter (z. B. Knochenfestigkeit, Biegefestigkeit (Stress-Strain-Index (SSI)) berechnen (Schießl und Willnecker 1997; Jamsa et al. 1998; Schießl et al. 1998; Lang et al. 1999; Flohr et al. 2002; Guglielmi und Lang 2002; Bousson et al. 2006; Krestan und Gruber 2013).

Die Methode ist außerdem weniger anfällig gegenüber Messfehlern, die beispielsweise durch degenerative Veränderungen des Knochens bzw. Überlagerungen (z. B. Aortensklerose) hervorgerufen werden. Sie ist auch bei Metallimplantaten anwendbar (Yu et al. 1995b; Flohr et al. 2002; Guglielmi und Lang 2002; Guglielmi et al. 2006; Krestan und Gruber 2013). Der Fettfehler durch die Steigerung des Fettgehalts im Knochen mit zunehmendem Alter kann analog zur DEXA durch die Doppelenergietechnik (Dual-Energy-QCT) um den Faktor 4 reduziert und durch pQCT-Verfahren nahezu eliminiert werden (Genant und Boyd 1977; Goodsitt et al. 1991; Link et al. 1993; Engelke 2002; Krestan und Gruber 2013).

Die QCT geht aber mit einer höheren Strahlenbelastung einher, ist technisch aufwändiger und wesentlich teurer als die DEXA (effektive Strahlendosis – DEXA: ca. 20 μ Sv; 2D-QCT: 50–60 μ Sv; 3D-Volumen-QCT: 2 mSv (Njeh et al. 1999; Brenner und Elliston 2004; Krestan und Gruber 2013). Die Genauigkeit für die QCT liegt bei 5–15 % (Glüer und Genant 1989; Krestan und Gruber 2013; Novotec Medical GmbH 2016). Die Reproduzierbarkeit bzw. die Präzision der QCT hängt von der Ausbildung und der Motivation des technischen Personals ab (Boutroy et al. 2005; Krestan und Gruber 2013), was die Messvarianz von 1–5 % erklärt.

Die pQCT weist hingegen nur eine Strahlenbelastung von 1 µSv auf (Braun et al. 1998). Die Untersuchungspräzision ist mit 0,3–0,7 % größer als die für zentrale Messorte, was für Verlaufskontrollen relevant ist (Glüer et al. 1995; Braun et al. 1998; Engelke et al. 2009; Bartl 2010; Novotec Medical GmbH 2016). Die pQCT ist präziser als die DEXA, kann jedoch nicht die BMD des gesamten Körpers erfassen. Lokale, durch pQCT gewonnene Messergebnisse dürfen nicht unkritisch auf das Gesamtskelett übertragen werden.

Weitere Gründe, weshalb sich das QCT-Verfahren bislang nicht gegenüber der DEXA durchsetzen konnte, sind die limitierte Anzahl an longitudinalen QCT-Studien zur Analyse der Vorhersagekraft von osteoporotischen Frakturen, die geringe Erfahrung mit der therapeutischen Nutzung der Messwerte und nicht zuletzt die WHO-Definition, die ausschließlich auf DEXA-Messungen beruht. Die pQCT wird derzeit vorwiegend in der klinischen Forschung eingesetzt und ist eine vielversprechender Methode zur Analyse der Genese und des Verlaufs metabolischer Osteopathien (Krestan und Gruber 2013).

Um einzelne Trabekel der Größendimension 50–200 µm darzustellen, bedarf es jedoch der Mikro-Computertomografie (µCT) (s. Kap. 1.3.3). Hochauflösende CTs mit einer maximalen Ortsauflösung von ca. 230 µm und einer Schichtdicke von 500 µm liefern lediglich ein Summationsbild der Trabekelstruktur. Dennoch konnten hohe Korrelationen der mittels CT in vitro erhobenen Daten mit den wahren Strukturparametern gezeigt werden (Link et al. 2003).

Mikro-Computertomografie (µCT)

Durch die hohe Ortsauflösung von bis zu 5 μ m ist die μ CT in der Lage, die 3D-Struktur des Trabekelnetzwerkes adäquat darzustellen und isotrope 3D-Datensätze zu erzeugen (Ito et al. 1998; Engelke et al. 1999). Art und Ausmaß krankheitsbedingter Spongiosa-Veränderungen können hierdurch erfasst werden. Die meisten μ CT können jedoch nur in vitro für kleine Gewebeproben angewendet werden.

Gegenüber der Histomorphometrie, die sehr zeitaufwendig eine 3D-Rekonstruktion aus histologischen Schnitten entwickelt, kommt die μ CT auch für Routineuntersuchungen der Knochenstruktur in Knochenbiopsien in Betracht. Die Probe wird hierbei nicht zerstört und es entstehen keine Schnittartefakte (Delling et al. 1995). Bei einer zu erzielenden Auflösung von 10 µm ist die maximale Probengröße auf etwa 1 cm begrenzt. Die Scanzeiten variieren je nach Auflösung und liegen im Bereich von Minuten bis Stunden (Engelke et al. 1999). Die vergleichsweise langen Messzeiten ergeben sich daraus, dass die Bildqualität durch die Auflösung des Detektors begrenz wird. Bei kleinen Proben werden die besten Ergebnisse erzielt, indem sie möglichst nah an der Strahlungsquelle positioniert werden (Feldkamp et al. 1989). Die hieraus entstehende Fokusverkleinerung führt zu einer Reduzierung der Strahlungsintensität und folglich zu einer Verlängerung der Messzeiten (Engelke et al. 1999).

Bei der μ CT dient ein Synchrotronstrahler, oder eine Mikrofokusröntgenröhre als Strahlungsquelle. Diese ist im Gegensatz zum Ganzkörpertomografen fixiert und scannt ein rotierendes Objekt. Für die adäquate Umsetzung der erhaltenen Daten, wird der Übergang vom Knochen zur Luft / zum Mark durch mindestens einen festgelegten Schwellenwert dargestellt (Feldkamp et al. 1989). Die wenigen bisher existierenden Studien zur Reproduzierbarkeit des Verfahrens belegen eine hohe Präzision für die μ CT (Balto et al. 2000; Nägele et al. 2004).

1.3.4 Frakturversorgung bei Osteoporose

Der optimale Zeitpunkt der Frakturversorgung wird in der Alterstraumatologie kontrovers diskutiert. Letztlich sollte eine Frakturversorgung in Abhängigkeit vom Allgemeinzustand des Patienten, der betroffenen anatomischen Region und dem Einfluss der Fraktur auf die Mobilität so früh wie möglich erfolgen. Eine operative Versorgung einer proximalen Femurfraktur innerhalb von 24 Stunden senkt die hohe Ein-Jahres-Mortalitätsrate (20– 25 %).

Das Ziel einer Frakturversorgung ist durch das rasche Erreichen einer Belastungs- bzw. Übungsstabilität die Mobilität und Lebensqualität des Patienten wiederherzustellen und Komorbiditäten zu verhindern. Grundvoraussetzung hierfür ist ein schneller Heilungsprozess. Voraussetzungen für die Frakturheilung sind genügend reaktionsfähige knöcherne Substanz im Frakturbereich, eine gute Durchblutung und biomechanische Kriterien (z. B. Adaptation der Frakturenden). Für die Frakturversorgung am osteoporotischen Knochen stellen diese Bedingungen jedoch eine Herausforderung dar. Die reduzierte Knochenmasse und -qualität erhöht nicht nur das Frakturrisiko, sondern beeinträchtigt möglicherweise auch die Frakturheilung. Ein weiteres Problem bei der Reposition und Stabilisierung osteoporotischer Knochenfragmente ist die knöcherne Verankerung der Osteosynthesen, die nicht selten unkonventionelle Metallanordnungen (z. B. Doppelplattenosteosynthesen) oder prothetische Sondermodelle erfordert. Die erhöhte Komplikationsrate bei der operativen Versorgung osteoporotischer Frakturen gilt es bei der Therapieplanung zu berücksichtigen.

Aufgrund dieser Problematik gewinnt die technische Weiterentwicklung stabilisierender Verfahren und der Einsatz von Medikamenten in der osteoporotischen Frakturbehandlung zunehmend an Bedeutung. Intramedulläre Kraftträger, winkelstabile Platten-/Schraubensysteme, Knochenzementaugmentation (z. B. Vertebroplastie/Kyphoplastie) sowie minimalinvasive Zugänge erhöhen die Stabilität, schonen das Periost, die Blutversorgung und das umliegende Gewebe und führen folglich zu einer verbesserten Knochenheilung (Bartl 2010). Experimentelle und erste klinischen Studien belegen das Potenzial der zusätzlichen Applikation von Präparaten zur Förderung der Knochenheilung (z. B. Kalzium, Vitamin D, Bisphosphonate, Kalzitonin, Hormonersatz-Präparate) (Bartl 2010).

Der regulierende Einfluss des RANK/RANKL/OPG-Systems auf die postmenopausäre Osteoporose wurde bereits nachgewiesen (Takahashi et al. 1988; Simonet et al. 1997; Bucay et al. 1998; Kostenuik et al. 2001; Flick et al. 2003; s. Kap. 1.2.2). Das von den Osteoblasten sezernierte OPG hemmt durch Bindung an RANKL dessen Interaktion mit RANK und damit die Knochenresorption. Systemisch mit OPG behandelte Tiere zeigten einen erhöhten trabekulären Knochenanteil (Kostenuik et al. 2001). Für den klinischen Gebrauch wurde ein humaner monoklonale RANKL-Antikörper AMG-162 (Denosumab) entwickelt, der mit hoher Affinität an RANKL bindet und so die Knochenresorption hemmt. In einer Phase-III-Studie zeigten osteoporotische Patientinnen (n=7868) unter systemischer Applikation von Denosumab einen hohen BMD-Zuwachs, sowie eine statistisch hochsignifikante Risikosenkung für Frakturen in der gesamten Studienpopulation (Cummings et al. 2009). Weitere Studien bestätigten diese Ergebnisse (Bekker et al. 2004; Takahashi und Ozawa 2005; McClung et al. 2006) und demonstrierten zudem eine Überlegenheit von Denosumab gegenüber Alendronat bezüglich dem BMD-Zuwachs nach 12 Monaten (Brown et al. 2009; Kendler et al. 2010; Reid et al. 2010). Der signifikant höhere Anstieg der BMD korrelierte dabei mit der schnelleren und stärkeren Hemmung des Knochenumbaus. Der Grund hierfür könnte auf den unterschiedlichen Wirkmechanismus von Denosumab und Alendronat zurückzuführen sein. Während Alendronat zuerst von aktiven Osteoklasten aufgenommen werden muss, inhibiert Denosumab direkt durch Blockierung von RANKL die Ausreifung, die Aktivierung und das Überleben der Osteoklasten (Brown et al. 2009; Kendler et al. 2010). Seit 2010 ist der RANKL-Antikörper Denosumab unter dem Handelsnamen Prolia[®] als 60 mg Injektionslösung in einer Fertigspritze zugelassen. Er muss alle sechs Monate subkutan injiziert werden. Denosumab findet Anwendung in der Behandlung der postmenopausalen Osteoporose, in der Begleitbehandlung bei Frauen mit Mammakarzinom unter adjuvanter Behandlung mit Aromatasehemmern sowie bei der Behandlung von Knochenschwund in Zusammenhang mit einer Hormonablation bei Männern mit Prostatakarzinom mit erhöhtem Frakturrisiko (Ignatoski et al. 2008).

2 Zielsetzung

Die systemische Wirksamkeit von OPG wurde in Tierversuchen (Kostenuik et al. 2001) und an osteoporotischen Patientinnen (Bekker et al. 2004; McClung et al. 2006) nachgewiesen. Bislang fehlen jedoch Studien mit einer lokalen OPG-Applikation in den Frakturspalt. In der vorliegenden Arbeit wird erstmalig der Effekt einer lokalen OPG-Applikation auf den Knochen im Frakturgebiet und auf die Frakturheilung analysiert. Die Untersuchungen erfolgen an dem etablierten Frakturmodell der osteoporotischen Ratte. Drei Versuchstiergruppen werden verglichen:

- ovarektomierte Ratten ohne OPG (OV-OPG)
- ovarektomierte Ratten mit OPG (OV+OPG)
- nicht ovarektomierte Ratten ohne OPG (Kontrollgruppe)

Die Frakturbereiche werden post mortem mittels osteodensitometrischer (pQCT), morphologisch bildgebender (Nativ-Röntgen, μ CT) und histologischer (Toluidinblau-, Masson-Goldner-Trichrom-Färbung) Verfahren analysiert. Im Rahmen des Projektes werden folgende Aspekte untersucht:

Eignung der Methodik

- Durchführbarkeit der korrekten Platzierung des Spongostans® in den Osteotomiespalt
- Stabilität der verwendeten Osteosynthese + Folgen eventueller Instabilitäten
- Abbildung der Wachstums-/Heilungsprozesse des Knochens mit den angewandten Untersuchungstechniken

Einfluss von OPG auf das Knochenwachstum und die Heilungsprozesse

- Einfluss des lokal applizierten OPG auf das Knochengerüst bzw. die Trabekelstruktur
- Einfluss des lokal applizierten OPG auf die BMD / Knochenfläche / Knochenmasse
- Nachweis von Kalzifizierungen (und Zellen)
- Charakteristika des Einwachsverhaltens
- Charakteristika der Gewebsreaktionen
- Auftreten von Gefäßproliferationen und zentralen Nekrosen
3 Material und Methoden

3.1 Versuchsbeschreibung

Für die vorliegende Versuchsreihe wurden 30 weibliche Wistar-Hannover-Ratten verwendet, von denen 20 Tiere zur Osteoporose-Induktion ovarektomiert waren. Weitere zehn Tiere dienten als Kontrollgruppe. Die Ratten wurden in drei Gruppen aufgeteilt (s. Tab. 2).

 Tabelle 2:
 Anzahl der Versuchstiere und Gruppeneinteilung

Versuchsgruppe	Anzahl der Tiere
ovarektomierte Tiere ohne OPG-Gabe (OV-OPG)	n = 10
ovarektomierte Tiere mit OPG-Gabe (OV+OPG)	n = 10
nicht ovarektomierte Tiere ohne OPG-Gabe (Kontrolle)	n = 10

OPG = Osteoprotegerin

Das Alter der Tiere betrug zum Operations-(OP)-Zeitpunkt 8 Wochen. Die Tiere wurden präoperativ gewogen (s. Tab. 3).

Versuchsgruppe						
OV	-OPG	OV+C	OPG	Kontroll	gruppe	
Tier	Gewicht	Tier	Gewicht	Tier	Gewicht	
Nummer	präoperativ	Nummer	präopertiv	Nummer	präoperativ	
1	398	11	382	21	266	
2	409	12	359	22	297	
3	388	13	411	23	311	
4	400	14	344	24	312	
5	398	15	382	25	257	
6	395	16	365	26	264	
7	397	17	383	27	286	
8	366	18	402	28	286	
9	363	19	366	29	274	
10	394	20	413	30	299	

 Tabelle 3:
 Präoperatives Gewicht (g) der Tiere in den Versuchsgruppen

OPG = Osteoprotegerin, OV-OPG = ovarektomierte Tiere ohne OPG; OV+OPG = ovarektomierte Tiere mit OPG; Kontrollgruppe = nicht-ovarektomierte Tiere ohne OPG Die Unterbringung der Tiere erfolgte in Einzelkäfigen (Macrolon Typ III, Bodenfläche ca. 900 cm²) im Tierstall des Universitätsklinikums. Gemäß den europäischen Richtlinien zur Haltung von Versuchstieren wurden die Tiere in einem zwölf Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus bei einer Raumtemperatur von 21°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 % gehalten. Nahrung und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Der OP-Zeitpunkt lag vier Wochen nach der Ovarektomie der OV-OPG- und OV+OPG-Gruppe. Nach der Ovarektomie wurden die Tiere unter den beschriebenen Bedingungen untergebracht, um eine Eingewöhnung zu gewährleisten.

Bei der standardisierten Osteotomie wurde im mittleren Drittel des rechten Femurs ein Osteotomiespalt von 1 mm Größe gesetzt. Die Stabilisierung des Femurs erfolgte durch einen speziell angefertigten Fixateur externe mittels vier Gewindedrähten (s. Kap. 3.3.1). Das OPG wurde über eine Trägermatrix (Spongostan[®]) in den Frakturspalt eingebracht. Die Tiere wurden innerhalb einer Woche operiert und nach einer Versuchsdauer von 30 Tagen gemäß Tierethikantrag euthanasiert.

Die operierten Femura wurden für die radiologischen Messungen und die histologische Aufarbeitung mitsamt Fixateur externe in kalkhaltigem Kunststoff (Technivit 9100 New) eingebettet. Die radiologische Analyse der Präparate wurde mittels Röntgengerät, pQCT und μ CT durchgeführt. Anschließend erfolgte die histologische Aufarbeitung und Auswertung.

3.2 Tierversuchsgenehmigung

Gemäß §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes wurde durch den Regierungspräsidenten der Stadt Gießen am 21. Oktober 2009 eine Tierversuchsgenehmigung zur Durchführung von wissenschaftlichen Versuchen erteilt. Sie trägt das Aktenzeichen MR 20/17 Nr. 56/2009.

3.3 Versuchsvorbereitung

3.3.1 Fixateur externe

Zur Osteosynthese wurde eine Modifikation der etablierten Fixateur externe Konstruktion der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. L. Claes des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm (Helmholtzstraße 14, 89081 Ulm) verwendet. Die operative Einarbeitung (Claes et al. 1979; 1980; 2009; Willie et al. 2009) erfolgte mit freundlicher Unterstützung der Mitarbeiter der Arbeitsgruppe. Der Fixateur externe wurde durch die Medizintechnik der Philipps Universität Marburg nachgebaut (s. Abb. 6 + 7).

Die Grundkonfiguration des unilateralen / eindimensionalen Fixateur externe bestand aus:

- vier Titan-Pins mit einem apikalen Gewinde,
- **zwei Klemmbacken** aus jeweils einem Edelstahl- und einem Aluminium-Balken mit Aussparungen zum Einspannen der Pins,
- vier Schrauben zum Zusammenziehen der Klemmbacken und der Fixierung der Pins.

Der Fixateur externe war 28 mm lang, 5 mm breit und ca. 19,5 mm (durch individuelle Pin-Länge minimal abweichend) hoch. Die Höhe ab Hautniveau betrug ca. 13,5 mm.



Abbildung 6: Fixateur externe mit Abmessungen (angelehnt an Claes et al. 2009)



Abbildung 7: Grafische Darstellung des Fixateurs mit Abmessungen (Willie et al. 2009)

links: Klemmbacke bestehend aus 2 Balken (UP-upper plate: oberer Balken; LP-lower plate: unterer Balken) und zwei Schrauben; Mitte oben: Aufsicht auf UP, unten: Frontsicht auf UP; rechts oben: Aufsicht auf LP, unten: Frontsicht auf UP; Größenverhältnisse des Fixateurdesigns f3 in mm als Buchstaben A–F; offset: Anlage der Klemmbacken, Abstände (mm) zwischen der lateralen Oberfläche des Femurs und der Innenseite der Klemmbacke; AL: Aluminium; SS: Edelstahl; Ti: Titan

Als Pins wurden vier 10 cm lange Titan-K-Drähte mit 1,2 mm Außen- und 0,65 mm Innendurchmesser verwendet. Das apikale Ende der Pins wies ein 10 mm langes Gewinde zur besseren Fixierung im Knochen auf (Fa. M. Jagel, Bad Blankenburg, Germany). Die beiden Klemmbacken des Fixateurs setzten sich aus jeweils zwei Balken zusammen. Die vorderen Balken mit einer Stärke von 3 mm bestanden aus Aluminium-Edelstahl, die 2 mm dicken hinteren Komponenten aus Edelstahl. Zur Aufnahme der Pins enthielt der vordere Balken vier Bohrungen im Abstand von 8 mm. Die Kontaktflächen der beiden Backen lagen plan aufeinander und wurden mit zwei Senkkopfschrauben (M 2,5 x 10 mm, Sechskant) zusammengezogen, wodurch ein festes Einspannen der Pins möglich war. Hierzu enthielten die beiden Schraubenlöcher der hinteren Backe ein Gewinde. Die vordere Backe nahm die Schraubenköpfe auf.

Die vier Gewinde-Pins wurden nach Vorbohrung unter Verwendung einer Bohrschablone in Abständen von 8 mm in den linken Femur des Versuchstieres eingebracht und mittels Klemmbacken des Fixateurs gesichert. Anschließend wurde eine Osteotomie durchgeführt. Durch die definierte Anlage der Klemmbacken in Abständen von 6 mm und 15 mm, gemessen zwischen der lateralen Oberfläche des Femurs und der Innenseite der Klemmbacke, entstand ein 1 mm großer Spalt (s. Kap. 3.4.3). Diese starre Fixierungs-Konstruktion mit zwei Längselementen gewährleistete eine axiale Steifigkeit von 74 N/mm bei einem Gesamtgewicht von ca. 5,4 g (Claes et al. 1979; 1980; 2009).

3.3.2 Trägermatrix Spongostan®

Zur Applikation von OPG in den Frakturspalt wurde als Trägermatrix Spongostan[®] (Fa. Johnson & Johnson MEDICAL GmbH) verwendet (s. Abb. 8). Spongostan[®] ist ein lokal anwendbares steriles Hämostyptikum, das seit Jahrzehnten klinische Anwendung findet und sich besonders in den chirurgischen Disziplinen bewährt hat (Light und Prentice 1945). Spongostan[®] wird aus gereinigter porciner Gelatine hergestellt. Die schwammartige Struktur mit gleichmäßiger Porosität erlaubt eine Flüssigkeitsaufnahme bis zum 45-Fachen des Eigengewichts (Johnson & Johnson Medical o. J.; Pinkernell 2010).



Abbildung 8: Zugeschnittenes Spongostan[®] (eigenes Bild)

3.4 Operation

Die OPs wurden in einem Tierstall der Universität Marburg durchgeführt, in dem ein Raum funktionell zum OP-Saal umgebaut wurde. Alle OPs wurden am rechten Femurknochen der Tiere vorgenommen.

3.4.1 Vorbereitung und Narkoseverfahren

Vor dem operativen Eingriff wurden die Tiere gewogen. Hierzu erhielten sie eine kurze Inhalationsnarkose mittels Isofluran[®] (1,5–3 %). Das Gewicht, das Alter, die Erkennungsnummer und der Operateur wurden im OP-Protokoll dokumentiert. Die Tiere wurden anhand der Erkennungsnummer identifiziert.

Anschließend erfolgte zur Narkoseeinleitung gewichtsadaptiert die intramuskuläre (i. m.) Gabe von Ketanest[®] und Rompun[®] in die Nackenmuskulatur. Intraoperativ wurde bei Bedarf vorwiegend mit Ketanest[®] nachdosiert (s. Tab. 4). Zur Vermeidung von Wundinfektionen erhielten die Tiere präoperativ eine einmalige subkutane Injektion von 50 mg Ampicillin/kg KG. Nach Eintritt der Narkose wurde zum Schutz der Augen vor Austrocknung eine Augensalbe aufgetragen. Anschließend wurde das OP-Feld enthaart und mit der antiseptischen Lösung (Kodan[®] Tinktur forte, Schülke) desinfiziert.

Medikament	Wirkstoff	Dosierung	Dosierungs-Art
Isofluran [®]	Isofluran	titriert	inhalativ
Ketanest [®]	Ketaminhydrochlorid	100 mg/kg KG	intramuskulär/intra-
			peritoneal
Rompun [®]	Xylazinhydrochlorid	5 mg/kg KG	intramuskulär/intra-
			peritoneal
Ampicillin®	Ampicillin	50 mg/kg KG	intramuskulär

 Tabelle 4:
 Narkosemedikamente

KG = Körpergewicht

3.4.2 Intraperitoneale (i. p.) Injektion

Aufgrund der bei der i. m. Injektion aufgetretenen Komplikationen, wurde die Applikation der Narkosemedikamente auf eine i. p. Injektion umgestellt (s. Kap. 4.1). Die i. p. Injektion wurde durch zwei Personen durchgeführt. Das Tier erhielt eine kurze Inhalationsnarkose (Isofluran[®]), bevor es kopfüber in eine Hand genommen wurde. Die Organe der Ratte verlagerten sich dadurch der Schwerkraft folgend nach kranial Richtung Kopf. Die Injektion erfolgte schräg (von dextra kranial nach sinistra kaudal) in das Peritoneum des linken unteren Quadranten des Abdomens (Schulz 2010). Dabei wurde auf eine angepasste Eindringtiefe der Kanüle geachtet, um eine Perforation der Harnblase zu vermeiden. Appliziert wurde ein maximales Injektionsvolumen von 20 ml/kg KG (s. Tab. 4).

3.4.3 Operationsverfahren

Die Ratte wurde in Linksseitenlage auf dem OP-Tisch gelagert, so dass das rechte Femur gut zugänglich war. Das OP-Gebiet wurde großzügig mit antiseptischer Lösung (Kodan[®] Tinktur forte, Schülke) desinfiziert und die angrenzenden Regionen mit sterilen OP-Tüchern abgedeckt. Alle OP-Materialien, inklusive OP-Besteck und Osteosynthese-

Materialien, wurden nach jedem Eingriff im Universitätsklinikum industriell gereinigt und sterilisiert.

Der Zugang zum rechten Femur erfolgte von lateral durch einen 30 mm langen Hautschnitt auf einer Verbindungslinie zwischen Kniegelenk und dem Trochanter major (s. Abb. 9). Nach scharfer Eröffnung der Fascia lata folgte die stumpfe, schichtgerechte Präparation entlang der ventralen und dorsalen Muskelgruppe bis zum Periost. Das Femur wurde mit einer chirurgischen Pinzette von dorsal gefasst und durch eine Drehung um 30° leicht abduziert, wodurch er sich aus dem umgebenden Weichteilgewebe absetzte.

Nach Anlage des externen Fixateurs unter Einbringung von vier Pins erfolgte die Osteotomie. Hierzu wurde mittels Schablone der Verankerungspunkt des ersten Gewindedrahtes proximal zum Trochanter major gewählt und mittels einer Bohrhülse senkrecht zum Femur und in einem Winkel von 45° zur Sagittalebene vorgebohrt. Nach Befestigung des ersten Gewindedrahtes wurde der Fixateur aufgesteckt und über das distale Schraubenfutter das zweite Loch oberhalb des Kniegelenkes vorgebohrt. Nach der Verankerung des Fixateurs an dieser Stelle wurden die mittleren Gewindedrähte angebracht. Nach der sicheren Befestigung des Fixateurs und Einbringung eines gegenüberliegenden Hakens zur Weichteilprotektion wurde im mittleren Drittel des Femurs, zwischen den Gewindedrähten zwei und drei, eine Osteotomie gesetzt. Das Sägen des Osteotomie-Spaltes erfolgte mit zwei Trennscheiben, die auf einer Bohrmaschine in einem Abstand von 1 mm angebracht waren. Um ein Überhitzen des Sägeblattes und damit Verbrennungsnekrosen zu vermeiden, erfolgte der Sägevorgang unter ständiger Kühlung mit steriler isotonischer NaCl-Lösung. Das knöcherne Segment wurde aus dem OP-Gebiet entfernt und mit Formaldehyd (4 %) in einem beschrifteten Tube fixiert. Anschließend wurde das OP-Gebiet mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Zur Applikation von OPG wurde das schwammartige Trägermaterial Spongostan[®] zugeschnitten und in steriler OPG-NaCI-Lösung getränkt. Die zehn Tiere der OV-OPG-Gruppe bzw. Kontrollgruppe erhielten in NaCl getränktes Spongostan[®]. Die Muskelfaszien (Fascia lata) und das subkutane Gewebe wurden mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vigryl 3.0) vernäht. Die Adaption der Haut erfolgte mit Seralone 4.0 durch Einzelknopfnähte. Abschließend wurde die Wunde mit einem Sprühverband versorgt.



Abbildung 9: Darstellung des Operationsverfahrens

Obere Reihe: Entharrung des Femurs (links); freigelegtes Femur von lateral (Mitte); Einbringung der Gewindepins unter Verwendung der Bohrschablone (rechts)

Mittlere Reihe: eingebrachte Gewindepins mit entfernter Bohrschablone (links); vorläufige Anlage der Klemmbacken des Fixateurs zur Stabilisierung vor Setzen der Osteotomie (Mitte), Osteotomiespalt 1 mm stabilisiert durch Fixateur (rechts);

Untere Reihe: entferntes knöchernes Segment und zugeschnittenes Spongostan[®] zum Größenvergleich neben einer Klemmbacke und einem Skalpell (links); eingebrachtes Spongostan[®] in den Osteotomiespalt (links), definierte Anlage der Klemmbacken des externen Fixateurs; Adaption der Haut mit Einzelknopfnähten (rechts)

Die Ratte stammte aus einer anderen Versuchsreihe des Tierstalls und wurde zu Übungszwecken zur Verfügung gestellt. Auf eine sterile Abdeckung wurde verzichtet, da das Tier bereits tot war.

3.5 Postoperative Versorgung

Zur postoperativen Analgesie wurde den Tieren 20 mg/kg Tramal als Depot subkutan in die Nackenfalte injiziert. Weiter erhielten die Tiere über das Trinkwasser 25 mg/l Tramal bis zum Ende des Versuches. Zur Überwachung wurden regelmäßige Temperatur und Gewichtskontrollen durchgeführt. Die OP-Wunde jeder Ratte wurde täglich kontrolliert.

3.6 Euthanasie der Versuchstiere

In der vierten Woche post operationem wurden die Tiere durch eine durch CO₂ (80 %) ausgelöste Asphyxie aus dem Versuch genommen. Zuvor erhielten die Tiere eine Mischnarkose mit Ketanest[®] und Rompun[®].

Unmittelbar nach Eintritt des Todes wurden beide Femora des Tieres freipräpariert. Dabei wurde darauf geachtet, dass zum Schutz des neugebildeten Kallus genügend Muskelgewebe am operierten Femur verblieb. Um die Stabilität des Rattenfemurs und damit des Frakturspaltes auch nach der Entnahme zu gewährleisten, wurde das Femur inclusive Fixateur externe explantiert. Nach einer Inkubation in Formaldehydlösung (4 %) wurde das Femur durch eine Kunststoffeinbettung in Technovit 9100 New[®] dauerhaft fixiert. Beim Zuschneiden des Präparates (Kunststoffklotzes) wurde der Fixateur externe entfernt (s. Kap. 3.8).

3.7 Nativ-Röntgenuntersuchungen

Die geplante postoperative Röntgendiagnostik konnte aufgrund der räumlichen Gegebenheiten des Tierstalls sowie aufgrund von Kapazitätsproblemen nicht durchgeführt werden. Die postmortal explantierten Femura wurden in Petrischalen verpackt und in der Abteilung für Strahlendiagnostik des Universitätsklinikums Marburg nativ in anteriorposterior-Projektion geröntgt. In Abb. 13 ist aus jeder Versuchsgruppe ein Röntgenbild exemplarisch dargestellt. Anschließend wurden die Femura der Vorbereitung für die Kunststoffeinbettung in Technovit 9100 New[®] zugeführt.

3.8 Aufarbeitung der Femurknochen

3.8.1 Entwässerung und Entfettung des Knochens

Zunächst wurden die Präparate zwölf Stunden unter fließendem Wasser gespült, um das zur vorübergehenden Fixation verwendete Formaldehyd auszuwaschen. Danach folgte die Entwässerung der Knochen mittels aufsteigender Alkoholverdünnungsreihe (jeweils 24 Stunden: Ethanol 70 %, Ethanol 80 %, Ethanol 90 %, 2 x Ethanol 100 %) und die Entfettung in Xylol (2 x 24 Stunden). Zur Vorbereitung auf die Einbettung wurden die Knochen weitere 2 x 24 Stunden in eine Xylol/Technovit[®]-Mischung eingelegt. Da eine sorgfältige Entwässerung und Entfettung die Grundvoraussetzung für eine gute Durchtränkung und Polymerisation darstellt, wurden alle Lösungen in regelmäßigen Ab-

Durchtränkung und Polymerisation darstellt, wurden alle Lösungen in regelmäßigen Abständen neu angesetzt und unter Agitation auf einem Schüttler verwendet.

3.8.2 Kunststoffeinbettung

Nach Entwässerung und Entfettung erfolgte die Einbettung der zu untersuchenden Knochen in Technovit 9100 New[®] (Firma Kulzer). Hierbei handelt es sich um einen transparenten thermoplastischen Kunststoff aus Polymethylmethacrylat (PMMA). Der erste Schritt bestand darin, die Technovit 9100 New[®] Basislösung, die aus stabilisiertem Methylmethacrylat besteht, zu entstabilisieren, indem ihre Hydrophilie verbessert wurde. Dazu wurden 3–4 Liter Technovit 9100 New[®] Basislösung über eine mit 50 g Aluminiumoxid gefüllte Chromatografie-Säule gegeben. Diese Lösung wurde bei -4 °C aufbewahrt oder bei -15 bis -20 °C im Tiefkühlschrank gelagert. Aus der entstabilisierten Basislösung wurden alle Gebrauchslösungen hergestellt (s. Tab 5).

Tabelle 5:	Zusammensetzung	verschiedener	Gebrauchslösungen	aus	Technovit
9100 New®					

Bezeichnung	Basislö-	PMMA-	Härter 1	Härter 2	Regler
der Gebrauchs-	sung	Pulver			
lösungen					
Präinfiltration	200 ml		1 g		
Infiltration	ad 250 ml	20 g	1 g/2 g*		
Stammlösung A	ad 500 ml	3 g/4 g*			
Stammlösung B	ad 50 ml			4 ml	2 ml

*Bei Verwendung von stabilisierter Basislösung, PMMA = Polymethylmethacrylat

Vor der Einbettung wurden die Knochen jeweils 2 x 24 Stunden bei 4°C in Präinfiltrationsund Infiltrationsmedium inkubiert. Die Polymerisationslösung zur Einbettung wurde aus neun Teilen der Stammlösung A und einem Teil der Stammlösung B hergestellt. Die Lösung wurde mit einem Magnetrührer vermischt, bis sie schlierenfrei war. Die fertige Polymerisationslösung wurde über die Knochen in verschließbare Kunststoff-Petrischalen gegossen. Zur Entfernung von Luftblasen aus dem Gemisch wurden die Proben für 10 min im Exsikkator einem leichten Vakuum ausgesetzt. Danach wurden die Gefäße mit Polyethylen-Folie und dem Deckel luftdicht verschlossen und für die weiter Polymerisation bei -20°C für mehrere Tage gelagert.

3.8.3 Zuschneiden der Präparate

Für die radiologischen Messungen mussten die Präparate von Metallteilen befreit werden, um Artefakte zu vermeiden. Für die Herstellung histologischer Präparate ist es von Vorteil den überschüssigen Kunststoff abzutragen. Dadurch wird die zu schneidende Fläche und folglich die Abnutzung der Hartstahlmesser minimiert. Weiter erhöht sich die Präzision vor allem der durch die μ CT-Messung gewonnenen Daten durch die Verkleinerung der Probe.

Daher wurden die in Technovit 9100 New[®] eingebetteten Knochen in mehreren Schritten unter Verwendung einer Diamantrotations-Säge (Fa. Exakt, Norderstedt) auf eine akzeptable Größe zugeschnitten (s. Abb. 10). Die Säge wurde während des Schneidevorganges mit Wasser vor Überhitzung geschützt. Zu Beginn wurde der externe Fixateur entfernt, so dass nur die vier Schrauben im Knochen verblieben. Danach wurden die proximalen und distalen Teile des Femurs abgetrennt. Hierzu wurde die Säge direkt hinter dem zweiten und kurz vor dem dritten Gewindedraht angesetzt, so dass nur der diaphysäre Teil um den Osteotomiespalt in dem Präparat vorlag. Eventuell verbliebene Metallspäne wurden mit einem Skalpell entfernt. Die resultierenden Knochenblöcke hatten eine Größe von ca. 0,5 x 0,7 x 0,8 cm³.



Abbildung 10: Femurknochen mit externem Fixateur fixiert in Technovit 9100 New[®]; Zuschnitt mittels Diamantrotations-Säge

3.9 Radiologische Auswertungen

3.9.1 Auswertung mit dem pQCT

Bei dem verwendeten pQCT handelte es sich um ein vollautomatisches Gerät mit der Typenbezeichnung XCT Research SA+ der Firma STRATEC Medizintechnik GmbH (Pforzheim, Deutschland, s. Abb. 11). Die Messeinheit besteht aus dem pQCT und einem Computer, der über eine Schnittstelle die Messdaten erhält, mathematisch bearbeitet und auswertet. Das Prinzip des Messverfahrens beruht auf der gefilterten Rückresorption. Aus einer Röntgenröhre emittierte Photonen wurden nach Transmission des Rattenfemurs von zwölf Detektoren registriert, wobei Absorptionsprofile entstanden. Jedem Bildpunkt dieser Absorptionsprofile wurde ein Schwächungskoeffizient zugeordnet, um den Mineralanteil (BMD) des Knochens herauszufiltern. Hierzu wurde der Schwächungskoeffizient zuvor mit einem Hydroxylapatit-Phantom mit bekannter Konzentration kalibriert und mit Hilfe des speziellen Softwareprogramms in einen Dichtewert umgerechnet. Aus den gefilterten Absorptionsprofilen konnte durch mathematische Faltung ein Querschnittsbild generiert werden (s. Kap. 1.3.3). Die zwölf Detektoren waren in einem Winkelabstand von 1° zur Quelle angeordnet, wodurch 180 Winkelschnitt-Projektionen erzeugt wurden. Die Fokusgröße betrug 50 µ. Die Röntgenröhre arbeitete mit einer Spannung von 50,5 KV, einer Stromstärke von 0,272 mA und einer Leistung von 13,7 W. Bei einer Expositionszeit der Rattenfemur-Blöcke von 620 s entsprach die effektive Dosis 3,28 µSv. Laut Hersteller ist die Strahlenexposition für Außenstehende vernachlässigbar. Die pQCT-Messeinheit wurde alle 24 Stunden nach der letzten Messung sowie arbeitstäglich vor Beginn der Messungen einer Quality-Assurance (QA) unterzogen, indem ein Standard QA-Phantom vermessen wurde. Eine Sollwert-Messwert-Differenz unter 1 % wurde als Fehlermeldung registriert.

Als Objekthalter für die zugeschnittenen Knochenblöcke (s. Kap. 3.8.3) dienten Falcon-Tubes, die in das pQCT-Gerät eingespannt wurden. Die Femurblöcke wurden von distal nach proximal gescannt mit einem Vorschub von 0,3 mm Scan-Schritten. In einem initialen Übersichtsscan wurde zunächst ein Referenzpunkt festgelegt. Dieser wurde von der Mitte des Osteotomiespalts ausgehend 2,5 mm distal mit einer Cursorlinie markiert und diente als Bezugspunkt für den Messbereich im nachfolgenden Scan. Hierbei wurden drei ROI definiert:

- ROLL 2,5 mm distal von der Mitte des Osteotomiespaltes
- ROI II Mitte des Osteotomiespaltes
- ROI III 2,5 mm proximal von der Mitte des Osteotomiespaltes

Der Scanbereich wurde in ein virtuelles, 3D-Gitter eingeteilt, wodurch Gitterpunkte (Voxel) entstanden. Jedes Voxel wurde während des Messverfahrens ausgemessen. Die Voxelgröße betrug 0,07 mm (= 70 µm). Zur Zuordnung der virtuellen Voxel zu realem Gewebe verwendete die Auswertungssoftware Schwellenwerte. Die Berechnungen wurden mit dem CONTOUR-MODE und dem PEEL MODE durchgeführt. Der CONTOUR-MODE ermöglichte die Unterscheidung von Weichteilen und Knochen, wodurch die Gesamtknochenfläche (in mm²) berechnet werden konnte. Alle Voxel mit einer durchschnittlichen Dichte oberhalb dieses Schwellenwerts identifizierte das pQCT-Gerät als kortikale Knochenstrukturen, alle Voxel niedrigerer Dichte wurden als Weichteilgewebe definiert. Der PEEL-MODE dient zur Unterscheidung von Kortikalis und Spongiosa. Per definitionem wurden von der berechneten Gesamtknochenfläche konzentrisch die äußeren 55 % als Kortikalis und Subkortikalis definiert und die verbleibenden inneren 45 % als Spongiosa. Nach Festlegung dieser fiktiven Flächenverhältnisse erfolgte die reale Trennung in Kortikalis und Spongiosa anhand des inneren Schwellenwertes. In dieser Studie lag der innere Schwellenwert des Rattenfemurs bei 500 mg/cm³. Voxel mit Werten darüber (> 500 mg/ cm³) wurden als kortikale Knochenstruktur deklariert. Trabekuläre Knochenstrukturen (Spongiosa) entsprachen Werten von 280–500 mg/cm³. Für Weichteilgewebe lag der obere Schwellenwert bei 280 mg/cm³. Kortikale und trabekuläre Strukturen bildeten zusammen die Grundlage für die Knochenmasse (in g).

In dieser Arbeit wurden in den drei Schnittebenen (ROI I, ROI II, ROI III) die Knochenstatusparameter BMD (in mg/cm³), Knochenfläche (in mm²) und Knochenmasse (in g) jeweils kortikal, trabekulär und gesamt gemessen.



Abbildung 11: XCT Research SA+ der NOVOTEC Medical GmbH/ STRATEC Medizintechnik GmbH, Pforzheim

3.9.2 Auswertung mit dem μ CT

Es wurden exemplarisch für jede Versuchsgruppe μCT-Aufnahmen von drei Knochen, angefertigt. Hierzu wurde das "Skyscan-1172 High-resolution 3D X-ray Microscopy" (Firma Bruker) der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. L. Claes des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm (Helmholtzstraße 14, 89081 Ulm) genutzt. Das Gerät arbeitete mit einer Spannung der Röntgenröhre von 50 kV und einer Stromstärke von 200 mA. Die isotrope Voxelauflösung betrug 8 μm.

3.10 Herstellung und Auswertung der histologischen Präparate

Dank geeigneter Einbettungs-Kunststoffe ist es möglich, histologische Präparate aus kalkhaltigem Knochen herzustellen. Wie beschrieben (s. Kap. 3.8.3) wurde der überschüssige Kunststoff der Präparate abgetragen, um die zu schneidende Fläche zu minimieren. Nach Durchführung der radiologischen Analysen (s. Kap. 3.9) wurden mit dem Hartstahlmesser eines Mikrotoms Schnitte in frontaler Schnittebene mit einer Schichtdicke von 5 µm angefertigt. Zur Beurteilung des Knocheneinwachsverhaltens wurden die Schnitte mit Toluidinblau und der Masson-Goldner-Trichrom-Methode gefärbt. Die gewonnenen histologischen Präparate wurden mit einem Leica DMRX-Mikroskop DC 300 (Heerburg) ausgewertet. Dabei wurden die Schnitte unter Auflicht, Durchlicht und polarisiertem Licht betrachtet.

3.10.1 Toluidinblau-Färbung

Die Toluidinblau-Färbung ist einfach und schnell durchführbar. Obwohl nur ein Farbstoff verwendet wird, zeigt die Färbung aufgrund metachromatischer Farbeffekte eine gute Gewebsdifferenzierung (Revell 1983). Mineralisiertes Hartgewebe stellt sich blassblau bis ungefärbt dar. Weichgewebe (z. B. Zellen, Zellkerne, Osteoidsäume, Kollagenfasern) erscheint in verschiedenen Blautönen. Unverkalkte Knorpelmatrix, Mastzellengranula und Wundheilungsareale färben sich metachromatisch rot-violett und verkalkte Kno-chenmatrix dunkelblau. Die Färbelösung wurde als Stammlösung angesetzt.

Toluidinblau-Stammlösung

- 1 g Toluidinblau
- 2,54 g Natriumhydrogencarbonat
- 100 ml Aqua dest.

Für die Gebrauchslösung wurde die Stammlösung im Verhältnis 1:4 mit Aqua dest. verdünnt. Bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss gelagert ist die Gebrauchslösung mehrere Jahre haltbar.

Färbevorgang

- 1. 1 min baden in Toluidin-Gebrauchslösung
- 2. spülen unter fließendem Leitungswasser, bis keine Farbauswaschung mehr sichtbar ist
- 3. Differenzierung in 70 % und absolutem Ethanol-Bad
- 4. trocknen der Präparate bei 30 °C im Brutschrank (Cave: bei höheren Temperaturen entstehen Trocknungsartefakte)
- 5. 3 x jeweils 2 min in Xylol baden

Die Beschichtung der Präparate erfolgte mit dem automatischen Eindeckgerät Coveraid (Fa. Vogel GmbH & Co KG, Gießen). Die gefärbten und eingedeckten Präparate wurden für zwei Stunden bei 30°C im Trockenschrank gelagert, wobei das restliche Xylol verdampfte. Anschließend wurden störende Farbrückstände mittels 2 %iger Natronlauge entfernt.

3.10.2 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung ist in der Knochenhistologie von großer Bedeutung. Durch ihren deutlichen Farbkontrast ist sie für morphometrische Untersuchungen gut geeignet. Durch die variable Mischung der Farbstoffe – Eisenhämatoxylin, Säurefuchsin-Ponceau-Azophloxin und Lichtgrün – lassen sich Zellen unterschiedlich anfärben. Die Färbung lässt sich folglich in Abhängigkeit von der Fragestellung zielorientiert einsetzen.

Mit dieser Methode wurden Zellen und zelluläre Strukturen folgendermaßen angefärbt:

-	Zellkerne	braun-schwarz
-	Zytoplasma	rot
-	Erythrozyten, Muskeln, Osteoid	leuchtend rot
-	mineralisierter Knochen, Bindegewebe (Kollagenfasern)	blau bis grün
-	elastische Fasern	tiefviolett

Weigerts-Eisenhämatoxylin-Kernfärbungslösung

Lösung A:

- 1 g Hämatoxylin
- 100 ml 96 %igen Ethanol

Lösung B:

- 1,16 g Eisen(III)Chlorid
- 98 ml Aqua dest.
- 1 ml 25 %ige Salzsäure

Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurden beide Stammlösungen zu gleichen Anteilen gemischt. Während beide Stammlösungen bei Raumtemperatur lange haltbar sind, muss die Gebrauchslösung nach acht Tagen verworfen werden.

Masson-Lösung

- 1 g Ponceau de Xylidine
- 0,5 g Säurefuchsin
- 100 ml Aqua dest.
- 0,2 ml Eisessig

Phosphorwolframsäure-Orange G

- 2 g Phosphorwolframsäure
- 1 g Orange G
- 200 ml Aqua dest.

Lichtgrün

- 0,2 g Lichtgrün
- 100 ml Aqua dest.
- 0,2 ml Eisessig

Färbevorgang

- 1. 10 min baden in Weigerts-Eisenhämatoxylin
- 2. spülen unter fließendem Leitungswasser, bis keine Farbauswaschung mehr sichtbar ist
- 3. 7–10 min baden in Masson-Lösung
- 4. abspülen in 1 %iger Essigsäure
- 5. 7 min Differenzierung in Phosphorwolframsäure-Orange G
- 6. abspülen in 1 %iger Essigsäure
- 7. spülen mit Aqua dest.

- 8. 15 min baden in Lichtgrün
- 9. abspülen in 1 %iger Essigsäure
- 10. spülen mit Aqua dest.
- 11. eintauchen in aufsteigender Alkoholreihe (50 %, 70 %, absoluter Ethanol)
- 12. (Cave: Da der Alkohol das Lichtgrün wieder auswäscht, dürfen die Präparate nur 2– 3 x in die Ethanol-Bäder eingetaucht werden.)
- 13. 3 x 2 min baden in Xylol

Das Eindecken sowie die anschließende Trocknung der fertigen Präparate und deren Reinigung in Natronlauge erfolgte analog zur Toluidinblau-Färbung (siehe oben).

3.11 Statistische Analysen

Die statistische Analyse wurde mit der Statistiksoftware IBM SPSS Statistics in enger Zusammenarbeit mit einem Statistiker durchgeführt. Verglichen wurden das Gewicht der Ratten, die Mortalität, die BMD, die Knochenmasse und die Knochenfläche.

Bei der Mortalität handelt es sich um eine dichotome Variable, also um ein Merkmal, bei dem nur zwei Ausprägungen möglich sind, alle anderen Variablen weisen ein metrisches Messniveau auf. Für die BMD, Knochenmasse und -fläche lagen jeweils neun Werte vor, die sich aus der Kombination der drei Schnittebenen (ROI I, ROI II, ROI III) und der drei Messungen (kortikal, trabekulär und gesamt) ergaben. Zunächst wurde der Mittelwert und die SD der zu untersuchenden Variablen in den drei Versuchsgruppen ermittelt.

Zur Signifikanztestung potentieller Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden der Kruskal-Wallis-Test sowie der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Bei dem Gewicht handelte es sich um eine metrisch skalierte Zielvariable. Zum Gruppenvergleich dreier unabhängiger Stichproben kam somit eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) oder der Kruskal-Wallis-Test in Frage. Für die untersuchten Daten wurde größtenteils eine fehlende Normalverteilung festgestellt. Für den Kruskal-Wallis-Test ist als nicht-parametrischer Test keine Normalverteilung erforderlich. Weiter waren die Stichprobenumfänge der Gruppen (n = 7–8) gering, was ebenfalls für den Kruskal-Wallis-Test spricht, da bei kleinen Stichproben die Anwendung nicht-parametrischer Methoden empfohlen wird. Da der Kruskal-Wallis-Test nur eine Aussage darüber machte, ob sich die drei Gruppen signifikant unterschieden, nicht jedoch zwischen welchen Gruppen der Unterschied bestand, wurden die drei Gruppen zusätzlich paarweise mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen.

Potenzielle Unterschiede bei der postoperativen Letalität zwischen den drei Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test untersucht, da hier zwei Gruppen (überlebende und postoperativ verstorbene Ratten) hinsichtlich einer metrischen Variablen (Gewicht) verglichen wurden.

Die potenziell unterschiedliche Ausprägung der Variablen BMD, Knochenmasse und fläche in den drei Gruppen wurde für jede der neun Varianten mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert und mittels Boxplots dargestellt. Mit den Boxplots wurden die Kennwerte der Verteilung (Median, Interquartilbereich, Spannweite) visualisiert, so dass die drei Gruppen miteinander verglichen werden konnten. Bei allen statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von p < 0,05 festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Verlauf des Versuchs – Komplikationen

Die Tiere zeigten über den gesamten Versuchszeitraum hinweg ausnahmslos gute Wundverhältnisse und konnten bereits kurz nach Beendigung der Narkose das operierte Bein bei voller Beweglichkeit wieder belasten. Der Fixateur externe und die Einzelknopfnaht wurden gut toleriert und in die Fellpflege der Tiere miteinbezogen (s. Abb. 12). Während des laufenden Versuches auftretende Komplikationen beschränkten sich auf das Narkoseverfahren.



Abbildung 12: Ratte mit externem Fixateur

Aufgrund der Unterschiede im Gewicht der Tiere (264–413 g) wurde, wie im Tierethikantrag (Aktenzeichen MR 20/17, Nr. 56/2009) beschrieben, eine gewichtsadaptierte Narkose durchgeführt. Auf diese Weise sollte jedes Tier eine individuell angepasste Analgesie erhalten und eine Über- oder Unterdosierung der Narkotika verhindert werden. Dennoch verstarben sieben von 30 operierten Ratten nur wenige Stunden nach der OP (s. Tab. 6). Von diesen Tieren hatten fünf intraoperativ unter der Narkose eine schlechte Relaxation und Analgesie gezeigt und mussten mit geringen Dosen Ketanest[®] (0,15–0,3 mg/KG) und Rompun[®] (0,05–0,3 mg/KG) nachdosiert werden. Zwei weitere Ratten verstarben wenige Tage vor dem Versuchsende. Eine Ursache hierfür konnte nicht festgestellt werden.

	Tiernummer	Narkose- Komplikationen	Gewicht
Ovarektomiert	4	Ja	400 a
ohne OPG	5	0u	398 g
(OV-OPG-Gruppe)	6	Ja	395 g
	8	Ja	366 g
Ovaraktomiart	13	Ja	411 g
mit OPG (OV+OPG-Gruppe)	16	Ja	365 g
	18		402 g
	20		413 g
nicht ovarektomiert ohne OPG (Kontrollgruppe)	23		311 g

Tabelle 6:	Komplikationen des N	Varkoseverfahrens
------------	----------------------	--------------------------

OPG = Osteoprotegerin

Noch während des laufenden Versuches, nach dem Exitus der dritten Ratte, wurde der zuständige Veterinär der Tierversuchs-Ethik-Kommission für die Beaufsichtigung der Tierversuche an der Universität Marburg Herr Dr. med. vet. Schulz kontaktiert. Er führte Obduktionen an drei verstorbenen ovarektomierten Ratten durch. Auffällig war, dass die ovarektomierten Ratten im Vergleich zu den nicht-ovarektomierten Tieren eine deutliche Adipositas aufwiesen und dehydriert zu sein schienen. Eine Unterkühlung und Dehydratation konnte jedoch aufgrund der getroffenen Vorkehrungen (Lagerung der Tiere unter Wärmezufuhr bis zum Narkoseende und subkutane Applikation angewärmter Flüssigkeit mit NaCI) ausgeschlossen werden.

Nach ausführlicher Literaturrecherche wurde als mögliche Ursache die Applikationsart der Narkose (i. m. Gabe von Ketanest[®] und Rompun[®] in die Nackenmuskulatur) identifiziert (Wixson et al. 1987; Smiler et al. 1990; Flecknell 1993; Smith 1993; Arras et al. 2001; Flecknell et al. 2007; Longley 2008; Flecknell 2009; Henke und Erhardt 2012). Diese Überlegungen führten letztlich zur Umstellung der Applikationsart der Narkosemedikamente. Die folgenden Narkoseeinleitungen wurden unter i. p. Injektion (s. Kap. 3.4.2) der Medikamente durchgeführt und verliefen ohne Komplikationen.

4.2 Radiologische Ergebnisse

4.2.1 Ergebnisse der Nativ-Röntgenuntersuchung

Die direkt nach der Explantation der Femura erhobenen nativ-radiologischen Befunde zeigen die regelrechte Lage der externen Fixateure in einer Ebene (s. Abb. 13). Die Pins reichten mit ihrem apikalen Gewinde maximal zwei Windungen über die distale Kortikalis hinaus. Der Frakturspalt mit der unterbrochenen Kortikalis-Linie war deutlich erkennbar. Das Weichteilgewebe präsentierte sich als eine das Femur umgebende Verschattung. Die Petrischale zeichnete sich als kreisrunde Aufhellung ab.



Abbildung 13: Native Röntgenbilder der drei Versuchsgruppen (exemplarisch) links: ovarektomierte Ratten ohne Osteoprotegerin (OPG, OV-OPG-Gruppe), Mitte: ovarektomierte Ratten mit OPG (OV+OPG-Gruppe), rechts: Kontrollgruppe, nicht ovarektomierte Tiere ohne OPG-Gabe (rechts)

Größenvergleich: Querbalken Fixateur-externe 28 mm (s. Kap. 3.3.1)

4.2.2 Ergebnisse der µCT-Untersuchungen

Die für jede Untersuchungsgruppe exemplarisch dargestellten drei µCT-Aufnahmen zeigen die drei definierten ROIs (Querschnitt 2,5 mm proximal/distal des Frakturspalts, Längsschnitt mit der Schnittebene ventral der Pins, Längsschnitt auf Höhe der Pins, s. Abb. 14–16). Die Zentralisierungslinien im Längs- und Querschnitt sind farblich hervorgehoben und ermöglichen eine Zuordnung der drei Schnittbilder zueinander. Die mittleren Gewindepins des externen Fixateurs befinden sich in regelrechter Lage. Die Pins reichen mit ihrem apikalen Gewinde maximal zwei Windungen über die distale Kortikalis hinaus. Die Ausnahme bildet der Pin im Bereich der distalen Kortikalis (s. Abb. 15). In den beiden Längsschnitten erzeugen die Pins Metall-Artefakte. Bei den in Abbildung 14 dargestellten µCT-Aufnahmen eines Tieres der Kontrollgruppe ist der Frakturspalt noch nicht durchbaut. Es lässt sich jedoch röntgendichtes Material mit der Tendenz zur weiteren Verknöcherung an den Frakturenden erkennen. Zudem ist die Bildung einer Knochenspange im Bereich der proximalen Kortikalis des oberen Pins sowie der distalen Kortikalis des unteren Pins sichtbar. Das obere Bild zeigt trotz regelrechter Lage der Pins einen deutlichen Versatz der Kortikalis-Linien im Frakturspalt (s. Kap. 5.1.4).



Abbildung 14: Mikro-Computertomografie-(µCT)-Aufnahmen eines Rattenfemurs mit Fixateur externe aus der Kontrollgruppe (nicht ovarektomierte Tiere ohne Osteoprotege-rin-(OPG)-Gabe)

Längsschnitt mit Schnittebene ventral der Pins (oben), Querschnitt 2 mm proximal des Frakturspalts (unten links), Längsschnitt mit Schnittebene auf Höhe der Pins (unten rechts)

In den µCT-Aufnahmen eines Tieres der OV-OPG-Gruppe (s. Abb. 15) ist der Frakturspalt mit den unterbrochenen Kortikalis-Linien deutlich zu erkennen. Die Frakturenden stehen gut übereinander. Im Bereich der proximalen Kortikalis des oberen Pins hat sich eine Knochenspange gebildet und im Bereich der distalen Kortikalis des unteren Pins ein einseitiger Pseudokanal. Dieser Pin reicht mit seinem apikalen Gewinde fünf Windungen und folglich für eine korrekte Lage der Pins drei Windungen zu viel über die distale Kortikalis hinaus.



Abbildung 15: Mikro-Computertomografie-(µCT)-Aufnahmen eines Rattenfemurs mit Fixateur externe aus der OV-OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte ohne Osteoprotegerin-(OPG)-Gabe)

Längsschnitt mit Schnittebene ventral der Pins (oben), Querschnitt 2 mm distal des Frakturspalts (unten links), Längsschnitt mit Schnittebene auf Höhe der Pins (unten rechts) Die in Abbildung 16 dargestellten µCT-Aufnahmen eines ovarektomierten Tieres zeigen eine beginnende Durchbauung des mit OPG getränkten Spongostan[®] im Frakturspalt. Das Spongostan[®] ist korrekt im Frakturspalt positioniert und die Stellung der Frakturlinie ist regelrecht. Auffallend ist die Ausbildung von Knochenspangen im Bereich der proximalen und distalen Kortikalis des oberen Pins sowie einer Knochenspange, die die Frakturlinie der distalen Kortikalis überspannt.



Abbildung 16: Mikro-Computertomografie-(µCT)-Aufnahmen eines Rattenfemurs mit Fixateur externe aus der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit Osteoprotegerin-(OPG)-Gabe)

Längsschnitt mit Schnittebene ventral der Pins (oben), Querschnitt 2 mm proximal des Frakturspalts (unten links), Längsschnitt mit Schnittebene auf Höhe der Pins (unten rechts)

Die in den Abbildungen 14–16 dargestellten μ CT-Aufnahmen stehen exemplarisch für die drei Versuchsgruppen. Die Befunde der anderen Tiere der drei Gruppen waren jeweils vergleichbar.

4.2.3 Ergebnisse der pQCT-Untersuchungen

Die Analyse wurde anhand der Daten von 23 Ratten vorgenommen. In die Datenauswertung gingen auch zwei Ratten mit ein, die nur wenige Tage vor Beendigung des Versuchszeitraumes aus unerklärlichen Gründen gestorben sind. Von den 23 Ratten gehörten sieben Ratten (30,4 %) zur OV-OPG-Gruppe, acht Ratten (34,8 %) zur OV+OPG-Gruppe und weitere acht (34,8 %) zur Kontrollgruppe. Für die Analyse relevant waren das Gewicht der Ratten, die Mortalität, die BMD, die Knochenmasse und die Knochenfläche.

Die ovarektomierten Ratten (OV-OPG-Gruppe; OV+OPG-Gruppe) wiesen ein erhöhtes Gewicht auf (s. Tab. 7).

Tabelle 7:	Gewicht (g) der	Ratten der drei	Versuchsgruppen	(Mittelwerte ±	SD)
------------	-----------------	-----------------	-----------------	----------------	-----

	OV-OPG-	OV+OPG-		
	Gruppe	Gruppe	Kontrollgruppe	p*
Gewicht (g)	384,29 ± 14,48	385,25 ± 23,46	281,75 ± 19,42	0,001
OPG = Osteopi	rotegerin, p* Krusł	kal-Wallis-Test; O∖	<pre>/-OPG = ovarektor</pre>	nierte Tiere ohne

OPG = Osteoprotegenn, p Ruskal-Walls-Test, OV-OPG = Ovalektomiente Tiere onne OPG; OV+OPG = ovarektomierte Tiere mit OPG; Kontrollgruppe = nicht-ovarektomierte Tiere ohne OPG

Die potenzielle Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mittels Kruskal-Wallis-Test geprüft. Bei einem p = 0,001 ist von einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen auszugehen. Der Mann-Whitney-U-Test ergab jeweils einen signifikanten Unterschied zwischen der OV-OPG-Gruppe und OV+OPG-Gruppe bzw. Kontrollgruppe (p < 0,001, bzw. p = 0,002), nicht jedoch zwischen der OV-OPG-Gruppe und OV+OPG-Gruppe (p = 1,000). Somit lag das Gewicht in den beiden Osteoporose-Gruppe nsignifikant höher als in der Kontrollgruppe. Das Gewicht der Tiere in den beiden Osteoporose-Gruppe unterschied sich dagegen nicht signifikant voneinander.

Die ovarektomierten Ratten (OV-OPG, OV+OPG) mit dem höheren präoperativen Ausgangsgewicht wiesen eine erhöhte postoperative Letalität auf. Für die überlebenden Ratten lag das durchschnittliche Gewicht bei 377,50 \pm 16,16 g und bei den verstorbenen Ratten bei 393,14 \pm 19,88 g, d. h. die verstorbenen Ratten waren im Durchschnitt schwerer. Dieser Unterschied war jedoch mit einem p = 0,073 (Mann-Whitney-U-Test) statistisch nicht signifikant.

Ratten der OV+OPG-Gruppe wiesen im Vergleich zu Ratten der OV-OPG-Gruppe keine signifikanten Unterschiede in der BMD auf (s. Tab. 8).

Variable	OV-OPG-Gruppe	OV+OPG-Gruppe	Kontrollgruppe	р*
TOT – ROI I	582,50 ± 27,04	576,62 ± 76,41	627,17 ± 54,52	0,143
TOT – ROI II	610,97 ± 38,78	600,80 ± 84,93	652,59 ± 72,84	0,362
TOT – ROI III	629,46 ± 43,35	592,70 ± 86,63	646,86 ± 61,57	0,337
CTRSUB – ROI I	578,46 ± 53,85	564,93 ± 98,44	621,56 ± 56,49	0,272
CTRSUB – ROI II	615,21 ± 59,83	572,64 ± 110,48	664,71 ± 51,50	0,146
CTRSUB – ROI III	628,53 ± 69,55	582,70 ± 94,49	646,39 ± 53,77	0,434
TRAB – ROI I	587,64 ± 52,79	591,19 ± 70,45	634,11 ± 78,19	0,364
TRAB – ROI II	605,80 ± 101,38	635,54 ± 80,07	637,90 ± 129,54	0,781
TRAB – ROI III	630,57 ± 92,54	604,99 ± 103,22	647,38 ± 111,04	0,626

Tabelle 8:Knochendichte (BMD – TOT: mg/mm, CRTSUB: mg/cm³, TRAB: mg/cm³,CRT: mg/cm³) der Ratten der drei Versuchsgruppen (Mittelwerte ± SD)

ROI = Region of Interest, TOT = gesamt, CTRSUB = kortikal und subkortikal, TRAB = trabekulär, *Kruskal-Wallis-Test; OV-OPG = ovarektomierte Tiere ohne OPG; OV+OPG = ovarektomierte Tiere mit OPG; Kontrollgruppe = nicht-ovarektomierte Tiere ohne OPG

Die mittels Kruskal-Wallis-Test erhobenen p-Werte waren für alle BMD-Variablen größer als 0,05, d. h. es bestanden bei der BMD keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Die BMD-Variablen zeigten in der Kontrollgruppe die höchsten Werte. Zudem waren die Werte für die BMD-Variablen in der OV-OPG-Gruppe meist höher als in OV+OPG-Gruppe. Nur die trabekuläre BMD in den ROIs I und II lag in OV+OPG-Gruppe höher.

Ratten der OV+OPG-Gruppe wiesen im Vergleich zu den Ratten der OV-OPG-Gruppe eine größere Knochenfläche auf (s. Tab. 9).

	•			
Variable	OV-OPG-Gruppe	OV+OPG-Gruppe	Kontrollgruppe	p*
TOT – ROI I	12,38 ± 3,97	13,45 ± 5.01	17,02 ± 3,77	0,081
TOT – ROI II	12,66 ± 4,10	13,04 ± 4,85	17,23 ± 3,61	0,098
TOT – ROI III	12,52 ± 3,52	13,46 ± 4,66	17,19 ± 3,65	0,066
CTRSUB – ROI I	6,83 ± 2,19	7,42 ± 2,75	9,38 ± 2,08	0,081
CTRSUB – ROI II	6,98 ± 2,26	7,19 ± 2,67	9,49 ± 1,99	0,098
CTRSUB – ROI III	6,90 ± 1,94	7,42 ± 2,56	9,48 ± 2,01	0,066
TRAB – ROI I	5,55 ± 1,78	6,04 ± 2,26	7,64 ± 1,69	0,081
TRAB – ROI II	5,67 ± 1,84	5,85 ± 2,18	7,73 ± 1,63	0,097
TRAB – ROI III	5,62 ± 1,58	6,04 ± 2,09	7,71 ± 1,64	0,066

Tabelle 9: Knochenfläche (TOT: mm², CRTSUB: mm², TRAB: mm, CRT: mm) der Ratten der drei Versuchsgruppen (Mittelwerte ± SD)

ROI = Region of Interest, TOT = gesamt, CTRSUB = kortikal und subkortikal, TRAB = trabekulär, *Kruskal-Wallis-Test; OV-OPG = ovarektomierte Tiere ohne OPG; OV+OPG = ovarektomierte Tiere mit OPG; Kontrollgruppe = nicht-ovarektomierte Tiere ohne OPG

Die mittels Kruskal-Wallis-Test erhobenen p-Werte waren für alle Knochenfläche-Variablen größer als 0,05, d. h. es bestanden bei der Knochenfläche keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Allerdings lagen die p-Werte alle nur knapp über 0,05, was für einen Gruppeneffekt sprechen könnte (s. Kap. 5.1.4). Die Werte der Knochenfläche-Variablen waren im Durchschnitt bei den Kontrollen deutlich größer. Zudem lagen die Werte in der OV+OPG-Gruppe im Durchschnitt etwas höher als in der OV-OPG-Gruppe.

Ratten der OV+OPG-Gruppe wiesen im Vergleich zu Ratten der OV-OPG-Gruppe eine höhere Knochenmasse auf (s. Tab. 10).

Maniala la				
variable	Ov-OPG-Gruppe	Ov+OPG-Gruppe	Kontroligruppe	p^
TOT – ROI I	7,26 ± 2,50	7,93 ± 3,56	10,64 ± 2,35	0,063
TOT – ROI II	7,76 ± 2,56	8,07 ± 3,69	11,22 ± 2,54	0,086
TOT – ROI III	7,91 ± 2,32	8,18 ± 3,50	11,13 ± 2,65	0,059
CTRSUB – ROI I	4,03 ± 1,56	4,33 ± 2,03	5,83 ± 1,37	0,106
CTRSUB – ROI II	4,38 ± 1,69	4,31 ± 2,13	6,31 ± 1,36	0,058
CTRSUB – ROI III	4,40 ± 1,47	4,47 ± 1,98	6,16 ± 1,55	0,132
TRAB – ROI I	$3,24 \pm 0,98$	3,61 ± 1,55	4,81 ± 1,06	0,054
TRAB – ROI II	$3,38 \pm 0,98$	3,77 ± 1,58	4,91 ± 1,32	0,104
TRAB – ROI III	3,51 ± 0,96	3,71 ± 1,56	4,96 ± 1,22	0,062

Tabelle 10: Knochenmasse (TOT: mg/mm, CRTSUB: mg/cm³, TRAB: mg/cm³, CRT: mg/cm³) der Ratten der drei Versuchsgruppen (Mittelwerte ± SD)

ROI = Region of Interest, TOT = gesamt, CTRSUB = kortikal und subkortikal, TRAB = trabekulär, *Kruskal-Wallis-Test; OV-OPG = ovarektomierte Tiere ohne OPG; OV+OPG = ovarektomierte Tiere mit OPG; Kontrollgruppe = nicht-ovarektomierte Tiere ohne OPG

Die mittels Kruskal-Wallis-Test erhobenen p-Werte waren für alle Knochenmasse-Variablen größer als 0,05, d. h. es bestanden bei der Knochenmasse keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Allerdings lagen die p-Werte alle nur knapp über 0,05. Die Werte der Knochenmasse-Variablen waren bei den Kontrollen am höchsten. Tiere der OV+OPG-Gruppe zeigten bei den meisten Knochenmasse-Variablen höhere Werte als Tiere der OV+OPG-Gruppe. Eine Ausnahme bildete die kortikale Knochenmasse im ROI II.

Die Unterschiede hinsichtlich der BMD, Knochenfläche und -masse (Gesamtwerte für ROI II) werden in Abbildung 17 mittels Boxplots visualisiert. Erkennbar ist der große Unterschied zwischen den Kontrolltieren und Tieren der OV-OPG- bzw. OV+OPG-Gruppe. Der Unterschied zwischen den ovarektomierten Tieren mit und ohne OPG ist merklich kleiner, wobei die Werte in der OV+OPG-Gruppe tendenziell etwas höher liegen als in der OV-OPG-Gruppe. Die OV+OPG-Gruppe zeigt zudem eine größere Streuung.



Abbildung 17: Knochendichte (BMD) (oben), -fläche (Mitte) und -masse (unten) in den drei Versuchsgruppen (Gesamtwerte für ROI II)

Box-Plot mit Median (Strich in der Mitte der Box), Interquartilbereich (Box) und Spannweite der Werte (Whisker); Gruppe 1 = ovarektomierte Tiere ohne OPG; Gruppe 2 = ovarektomierte Tiere mit OPG; Gruppe 3 = Kontrollgruppe = nicht-ovarektomierte Tiere ohne OPG

4.3 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

Die vorliegende Arbeit dient als Pilotstudie der Grundlagenforschung und soll zur Methodenverbesserung beitragen. Nachfolgend sind exemplarisch für die OV-OPG- und OV+OPG-Gruppe Übersichtsaufnahmen und Detailansichten von Schnittbildern dargestellt.

4.3.1 Histologische Präparate der OV-OPG-Gruppe (Toluidinblau)

Abbildung 18 zeigt einen mit Toluidinblau gefärbten Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV-OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte ohne OPG-Gabe) vier Wochen nach der OP. In dieser Übersichtsaufnahme sind verschiedene Strukturen zu erkennen. Die Muskulatur am linken und rechten Bildrand ist kräftig blau eingefärbt. Daran anschließend sind Anschnitte der Hinterwand des Röhrenknochens sowie einer knöchernen Spange zu erkennen. Zurückzuführen ist dies auf eine schräge Schnittführung. Der Frakturspalt wird in seinem Verlauf durch farbige Umrandungen (gelb, grün, pink) markiert.



Abbildung 18: Übersichtsaufnahme (Durchlicht) – mit Toluidinblau gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV-OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte ohne OPG-Gabe) vier Wochen nach der OP

Vergrößerung: Lineal (unterer Bildrand), ein Kästchen entspricht 1 mm; farbige Rechtecke: Bereiche der folgenden Detailaufnahmen; *Anschnitte der Hinterwand des Röhrenknochens

Die Vergrößerung des Frakturspaltes im Bereich der knöchernen Spange (s. Abb. 19) zeigt dunkel lila eingefärbte Knorpelmatrix. Das mineralisierte Knochengewebe mit den perlschnurartig aneinander gereihten Osteoblasten stellt sich weiß dar. Die Aktivität der Osteoblasten lässt sich an dem hellblau eingefärbten Osteoid erkennen.



Abbildung 19: Frakturspalt im Bereich der knöchernen Spange

Detailaufnahme (Durchlicht) der Übersichtsaufnahme in Abbildung 18 – mit Toluidinblau gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV-OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte ohne OPG-Gabe) vier Wochen nach der OP oben: Vergrößerung 20 x; unten: Vergrößerung 40 x)

In Abbildung 20 ist die Mitte des Frakturspaltes vergrößert dargestellt. Deutlich zu sehen sind das mineralisierte Knochengewebe (ungefärbt weiß) und die perlschnurartig aneinander gereihten Osteoblasten (blau). Das Osteoid (hellblau) um die Osteoblasten kennzeichnet die Aktivität der Zellen. Auch Bone lining cells (blau) sind erkennbar. Neben aktiven Osteozyten (blau, mit Zellkernen) lassen sich Markraum-spezifische Vorläuferzellen (dunkel blau) erkennen.



Abbildung 20: Mitte des Frakturspaltes

Detailaufnahme (Durchlicht) der Übersichtsaufnahme in Abbildung 18 – mit Toluidinblau gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV-OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte ohne OPG-Gabe) vier Wochen nach der OP Vergrößerung 20 x

In der vergrößerten Aufnahme des Frakturspaltes in Abbildung 21 wiederholt sich das histologische Bild der Abbildung 20. Weiter lassen sich dunkel lila eingefärbte Knorpelzellen erkennen (vgl. Abb. 19).



Abbildung 21: Frakturspalt

Detailaufnahme (Durchlicht) der Übersichtsaufnahme in Abbildung 18 – mit Toluidinblau gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV-OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte ohne OPG-Gabe) vier Wochen nach der OP Vergrößerung 20 x

In Abbildung 22 sind u.a. abgeflachte und in Osteoid eingebettete Bone lining cells erkennbar (vgl. Abb. 20). Darüber liegen kubische Vorläuferzellen. In dem mineralisierten Knochengewebe (ungefärbt weiß) sind Osteozyten zu sehen.



Abbildung 22: Bone lining cells und mineralisiertes Knochengewebe Detailaufnahme (Durchlicht) der Übersichtsaufnahme in Abbildung 18 – mit Toluidinblau gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV-OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte ohne OPG-Gabe) vier Wochen nach der OP Vergrößerung 80 x Zusätzlich zu den in Abbildung 19 gezeigten Strukturen zeigt Abbildung 23 einen Markraum-Ausschnitt mit Markraum-spezifischen Vorläuferzellen (hämatopoetische Stammzellen, dunkelblau) und Erythrozyten (blau). Auffallend sind die vielen Entzündungszellen (hellblau).



Abbildung 23: Markraum

Detailaufnahme (Durchlicht) der Übersichtsaufnahme in Abbildung 18 – mit Toluidinblau gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV-OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte ohne OPG-Gabe) vier Wochen nach der OP Vergrößerung 20 x
Abbildung 24 zeigt ebenfalls einen Markraum (vgl. Abb. 18). Im rechten oberen und linken unteren Bildrand sind Knochengewebe (ungefärbt, weiß) sowie Bone lining cells und Osteoid erkennbar. Am rechten oberen Bildrand liegen ein großer Granulozyt und Fettzellen.



Abbildung 24: Markraum

Detailaufnahme (Durchlicht) der Übersichtsaufnahme in Abbildung 18 – mit Toluidinblau gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV-OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte ohne OPG-Gabe) vier Wochen nach der OP Vergrößerung 80 x

4.3.2 Histologische Präparate der OV+OPG-Gruppe (Toluidinblau)

Abbildung 25 zeigt einen mit Toluidinblau gefärbten Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit OPG-Gabe), 4 Wochen nach der OP. In dieser Übersichtsaufnahme sind verschiedene Strukturen zu erkennen. Die Muskulatur am linken und rechten Bildrand ist kräftig blau eingefärbt. Daran anschließend sind Anschnitte einer knöchernen Spange zu sehen. Der Frakturspalt wird in seinem Verlauf durch farbigen Umrandungen (gelb, pink, grün) dargestellt.



Abbildung 25: Übersichtsaufnahme (Durchlicht) – mit Toluidinblau gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit OPG-Gabe) vier Wochen nach der OP

Vergrößerung: Lineal (unterer Bildrand), ein Kästchen entspricht 1 mm; farbige Rechtecke: Bereiche der folgenden Detailaufnahmen

Ergebnisse

Die Vergrößerung des Frakturspaltes im Bereich der knöchernen Spange (s. Abb. 26) zeigt dunkel lila eingefärbte Knorpelmatrix. Ungefärbt weiß stellt sich das mineralisierte Knochengewebe dar mit den perlschnurartig aneinander gereihten Osteoblasten. Die Aktivität dieser Zellen lässt sich an dem hellblau eingefärbten Osteoid erkennen.



Abbildung 26: Frakturspalt im Bereich der knöchernen Spange

Detailaufnahme (Durchlicht) der Übersichtsaufnahme in Abbildung 25 – mit Toluidinblau gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit OPG-Gabe) vier Wochen nach der OP Vergrößerung 20 x

In Abbildung 27 ist die Mitte des Frakturspaltes vergrößert dargestellt. Im oberen Teil der Abbildung sind das mineralisierte Knochengewebe (ungefärbt weiß), die perlschnurartig aneinander gereihten Osteoblasten (blau), das umgebende Osteoid (hellblau) als Zeichen für die Aktivität der Osteoblasten und Bone lining cells (blau) erkennbar. Neben aktiven Osteozyten (blau, mit Zellkernen) lassen sich auch Markraum-spezifische Vorläuferzellen (dunkel blau) erkennen. Im unteren Teil der Abbildung liegen am rechten Bildrand dunkel lila eingefärbte Chondrozyten. Das verknöcherte Knorpelgewebe stellt sich weiß bis hell lila dar.



Abbildung 27: Mitte des Frakturspalts im Bereich der knöchernen Spange

Detailaufnahme (Durchlicht) der Übersichtsaufnahme in Abbildung 25 – mit Toluidinblau gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit OPG-Gabe) vier Wochen nach der OP a (oben), b (unten): Vergrößerung 40 x

Das histologische Bild in Abbildung 28 gleicht den Strukturen in Abbildung 26 und 27. Auffallend ist die Vielzahl an Zellen (Leukozyten, Mastzellen und Makrophagen) besonders im unteren Bereich der Abbildung bei geringerer Ausbildung von Knochengewebe. Im linken Bildrand ist der Anschnitt eines Blutgefäßes mit Erythrozyten erkennbar.



Abbildung 28: Markraum

Detailaufnahme (Durchlicht) der Übersichtsaufnahme in Abbildung 25 – mit Toluidinblau gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit OPG-Gabe) vier Wochen nach der OP Vergrößerung 20 x

Die histologischen Charakteristika in Abbildung 29 sind mit denen in Abbildung 28 vergleichbar. Im linken oberen Bildrand ist ein Gefäß-Anschnitt mit Erythrozyten erkennbar. Die braune Färbung ist am ehesten auf den Metall-Abrieb der zur Osteosynthese verwandten Pins zurückzuführen (vgl. Abb. 28 oberer Bildrand).



Abbildung 29: Markraum

Detailaufnahme (Durchlicht) der Übersichtsaufnahme in Abbildung 25 – mit Toluidinblau gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit OPG-Gabe) vier Wochen nach der OP Vergrößerung 40 x

4.3.3 Histologische Präparate der OV+OPG-Gruppe (Masson-Goldner-Trichom-Färbung)

Beispiel 1

Abbildung 30 zeigt einen in Masson-Goldner-Trichom-Technik gefärbten Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit OPG-Gabe), drei Wochen nach der OP. In dieser Übersichtsaufnahme ist die Muskulatur am linken und rechten Bildrand leuchtend rot eingefärbt. Der Frakturspalt wird in seinem Verlauf durch farbige Umrandungen (gelb, pink) dargestellt.



Abbildung 30: Übersichtsaufnahme (Durchlicht) – mit Masson-Goldner-Trichom-Technik gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit OPG-Gabe) drei Wochen nach der OP Vergrößerung: Lineal (unterer Bildrand), ein Kästchen entspricht 1 mm; farbige Rechtecke: Bereiche der folgenden Detailaufnahmen

In Abbildung 31 ist die Mitte des Frakturspaltes vergrößert dargestellt. Im oberen Bild ist das mineralisierte Knochengewebe (blau bis grün) zu sehen, das den Faserknorpel, der sich zentral im Frakturspalt gebildet hat, umgibt. Bei größerer Vergrößerung (unten) lassen sich die faserige Struktur der Osteoidbälkchen und die in ihnen eingemauerten Osteozyten erkennen. Vereinzelt liegen Osteoklasten (mehrkernige Riesenzellen) den frisch gebildeten Knochenbälkchen auf. Zwischen den primären Knochenbälkchen liegt

das gefäßreiche Mesenchym, aus dem sich das blutbildende Knochenmark entwickelt. Weiter sind Gefäßanschnitte (rot) und mesenchymale Stammzellen zu sehen. In der unteren Bildhälfte liegen Osteochondroblasten und eingemauerte blasige Osteochondrozyten mit kleinen blau-violette gefärbten Zellkernen und auffällig hellem Zytoplasma in der von ihnen sezernierten, grün gefärbte Knorpelgrundsubstanz.



Abbildung 31: Mitte des Frakturspaltes

Detailaufnahme (Durchlicht) der Übersichtsaufnahme in Abbildung 30 – in Masson-Goldner-Trichom-Technik gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit OPG-Gabe) drei Wochen nach der OP Vergrößerung 20 x, (oben), 40 x, (unten) In Abbildung 32 ist am linken Bildrand deutlich das mineralisierte Knochengewebe eines Röhrenknochens (blau bis grün) mit den typischen, konzentrisch geschichteten Speziallamellen, den zentralen Kanalisierungen (Osteone), dem Gefäßsystem und den Schaltlamellen sowie den eingemauerten Osteozyten zu erkennen. Vereinzelt treten Osteoklasten (mehrkernige Riesenzellen) auf. Daran schließen sich nach rechts perlschnurartig aneinander gereihte Osteoblasten (grau-lila), Osteoide (blau bis grün; Anzeichen für die Aktivität der Osteoblasten) und Bone lining cells (grau-lila) an. Die schwarz-braune Färbung ist am ehesten auf den Metall-Abrieb der zur Osteosynthese verwandten Pins zurückzuführen (vgl. Abb. 28 und 29). Weiter rechts liegen Gefäßanschnitte mit Erythrozyten. Diese kommen auch vereinzelt in den anderen Schichten vor. Die anschließende Bindegewebs-Schicht weist zahlreiche mesenchymale Zellen und Fettzellen auf. Am rechten Bildrand ist deutlich das typische Muster der quergestreiften Muskulatur zu erkennen.



Abbildung 32: Bereich distal lateral des Frakturspaltes

Detailaufnahme (Durchlicht) der Übersichtsaufnahme in Abbildung 30 – in Masson-Goldner-Trichom-Technik gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit OPG-Gabe) drei Wochen nach der OP Vergrößerung 40 x

Abbildung 33 zeigt die in Abbildung 32 beschriebene Histologie des mineralisierten Knochengewebes eines Röhrenknochens (blau bis grün). In dem Anschnitt des Markraums lassen sich eine Vielzahl von Erythrozyten, hämatopoetischen Stammzellen und Fettzellen erkennen. Weiter präsentieren sind am unteren Bildrand Bone lining cells (grau-lila) und zwei Osteoklasten (mehrkernige Riesenzellen, dunkles Zytoplasma) mit Resorptions-Lakunen.



Abbildung 33: Anschnitt eines Röhrenknochens mit Markraum Detailaufnahme (Durchlicht) der Übersichtsaufnahme in Abbildung 30 – in Masson-Goldner-Trichom-Technik gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit OPG-Gabe) drei Wochen nach der OP Vergrößerung 40 x

Abbildung 34 zeigt wie Abbildung 32 und 33 mineralisiertes Knochengewebe des Röhrenknochens (blau bis grün), eine Bindegewebsschicht (rechter Bildrand) sowie einen großflächigen Anschnitt des Markraums. Im roten Knochenmark sind eine Vielzahl an hämatopoetischen Stammzellen, Erythrozyten und Fettzellen sowie Anschnitte großer Blutgefäße zu erkennen.



Abbildung 34: Anschnitt eines Röhrenknochens mit Markraum

Detailaufnahme (Durchlicht) der Übersichtsaufnahme in Abbildung 30 – in Masson-Goldner-Trichom-Technik gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit OPG-Gabe) drei Wochen nach der OP Vergrößerung 40 x

Beispiel 2

Abbildung 35 zeigt einen in Masson-Goldner-Trichom-Technik gefärbten Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit OPG-Gabe), wenige Stunden bis Tage nach der OP (Vergrößerung (130 µm /1 cm). In der Übersichtsaufnahme mit einem Ausschnitt des Frakturspaltes (Abb. 35 oben) lässt sich am oberen linken Bildrand die typische Histologie eines Röhrenknochens (blau bis grün) erkennen (vgl. Abb. 33 und 34). Am rechten oberen Bildrand (Abb. 35 oben und Mitte) liegt rotes Knochenmark mit einer Vielzahl an hämatopoetischen Stammzellen, Erythrozyten und Fettzellen sowie Anschnitten von Blutgefäßen. Daran anschließend sind am rechten Bildrand zahlreiche Erythrozyten zu erkennen, die auf ein Hämatom hinweisen. In der unteren Hälfte des Bildes ist deutlich die Struktur des Spongostans[®] dargestellt. In der schwammartigen Struktur lassen sich verschiedene Blutzellen wie Erythrozyten und Monozyten erkennen (Abb. 35 oben und unten).



Abbildung 35: Übersichtsaufnahme (Durchlicht) – mit Masson-Goldner-Trichom-Technik gefärbter Längsschnitt in frontaler Ebene durch einen Rattenfemur der OV+OPG-Gruppe (ovarektomierte Ratte mit OPG-Gabe) wenige Stunden bis Tage nach der OP Oben: Übersichtsaufnahme (Durchlicht) Vergrößerung 20 x, Mitte und unten: Vergrößerungen (Durchlicht) 40 x

5 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde die Wirksamkeit einer lokalen Applikation von OPG in den Frakturspalt an dem etablierten Frakturmodell der osteoporotischen Ratte überprüft. Dazu wurden drei Versuchstiergruppen miteinander verglichen:

- ovarektomierte Ratten ohne OPG (OV-OPG-Gruppe)
- ovarektomierte Ratten mit OPG (OV+OPG-Gruppe)
- nicht ovarektomierte Ratten ohne OPG (Kontrollgruppe)

Die Frakturbereiche wurden mittels osteodensitometrischer (pQCT), morphologisch bildgebender (Nativ-Röntgen, µCT) und histologischer (Toluidinblau- und Masson-Goldner-Trichrom-Färbung) Verfahren analysiert.

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Tiermodell

In der orthopädischen und traumatologischen Forschung werden häufig in vivo Tiermodelle eingesetzt. Aus ethischen Gründen wird versucht, Tiermodelle durch in vitro Systeme (Organ- und Gewebekulturen) zu ersetzen. Limitiert werden diese Bestrebungen dadurch, dass in vitro Systeme kaum dynamische Zelleigenschaften und -interaktionen bei physiologischer Belastung abbilden können. Daher sind Tiermodelle für die Untersuchung der Gewebsreaktion, der Biokompatibilität und mechanischer Eigenschaften von Implantatmaterialien unerlässlich (Pearce et al. 2007; Sommer et al. 2019).

Bei der Auswahl eines geeigneten Versuchstiers sind grundlegende Anforderungen zu berücksichtigten. Dazu zählen neben der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen, die Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit der Analysen. Ebenso wichtig ist die Datenlage bezüglich der Anatomie, Mikroarchitektur, Physiologie, Biomechanik und der Wundheilung des Knochens bei dem Versuchstier. Zudem werden die Verfügbarkeit und die Kosten des Tiermodells berücksichtigt. Laut Sommer et al. (2019) erfüllt keines der für die orthopädische und traumatologische Forschung verwendeten Tiermodelle (Maus, Ratte, Schaf, Hund) der Osteoporose alle Anforderungen. Das für den Einzelfall am besten geeignete Tiermodell hängt von der Forschungsfrage und dem Studiendesign ab. In den vorliegenden Versuchen wurden für die Lokalapplikation von OPG am osteoporotischen Femurknochen weibliche Wistar-Hannover-Ratten gewählt. Dieses Frakturmodell hat sich bei ähnlichen Fragestellungen aufgrund geringer Kosten, einfacher Handhabbarkeit und Gemeinsamkeiten mit der menschlichen Knochenbiologie etabliert (Claes et al. 1979; 1980; Yamazaki und Yamaguchi 1989; Dempster et al. 1995; Bagi et al. 1996; Hofbauer et al. 2004; Claes et al. 2008; Sommer et al. 2019). In der Osteoporose-Forschung wird das Rattenmodell vor allem zur Analyse der postmenopausalen Osteoporose eingesetzt (Sommer et al. 2019). Die knöchernen Strukturen der Rattenhüfte, die Histologie des Gelenkknorpels, der Muskulatur und der Kapselanhaftungen sind den entsprechenden Parametern des Menschen ähnlich (Bagi et al. 1996). Rattenknochen besitzen jedoch eine aktive Wachstumsfuge, die sich wenn überhaupt, erst zum Lebensende hin schließt (Bagi et al. 1996; Wolfensohn und Lloyd 2013). Das gut vaskularisierte Periost, das den intrakapsulären Teil des Oberschenkelhalses abdeckt, unterscheidet sich zudem von dem des erwachsenen Menschen (Bagi et al. 1996).

Bagi et al. (1996) und Dempster et al. (1995) bestätigten die Reaktion des proximalen Oberschenkelknochens bei Ratten auf einen durch Ovarektomie induzierten Hormonmangel. Die Veränderungen des Rattenskeletts, insbesondere an der endokortischen Oberfläche und im trabekulären Knochen, weisen eine hohe Ähnlichkeit mit den Veränderungen am proximalen Femurknochen osteoporotischer Frauen auf. Darüber hinaus sind die Beeinträchtigungen der biomechanischen Eigenschaften am Oberschenkelhals der Ratte mit denen bei postmenopausalen Frauen vergleichbar.

5.1.2 Operation und Osteosynthese

Narkoseverfahren

Als Allgemeinanästhesie (Narkose) wird ein medikamentös induzierter reversibler Schlafzustand des Organismus bezeichnet, in dem chirurgische, diagnostische oder therapeutische Eingriffe ohne Schmerzempfindung oder Abwehrreaktion durchführbar sind. In der Forschung müssen gemäß Tierschutzgesetz Versuchstiere für viele Verfahren in leichte Sedation oder in Narkose versetzt werden, um Schmerzen, Belastungen und Schäden zu minimieren. Bei schmerzhaften Prozessen ist zudem die Gabe von Analgetika vorgeschrieben. Neben dem ethischen Aspekt erhöht dies auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, da die Eingriffe bei allen Tieren einer Untersuchungsreihe standardisiert durchführbar sind und individuelle Stressoren (z. B. beim Handling) minimiert werden (Sharp und Villano 2012; Wolfensohn und Lloyd 2013). Die Auswahl des Narkotikums richtet sich nach der Tierart, dem geplanten Eingriff und der Testmethodik. Häufig wird für die Sedation, Muskelrelaxation und Analgesie eine Kombination verschiedener Narkotika eingesetzt. Diese sollen zuverlässig und reproduzierbar wirksam sein, ohne die Physiologie des Tieres zu beeinträchtigen oder mit dem Forschungsziel zu interferieren. Laut Wolfensohn und Lloyd (2013) ist zudem ein schnelles Einschlafen und Aufwachen der Tiere wünschenswert, um das Exzitationsstadium –gekennzeichnet durch motorische Unruhe und erhöhten Muskeltonus – schnellstmöglich zu durchlaufen und Stress zu vermindern.

Eine Allgemeinanästhesie kann als Injektions-, oder als Inhalationsnarkose durchgeführt werden. Die Inhalationsanästhesie hat bei Ratten den Vorteil der besseren Steuerbarkeit der Narkosetiefe. Bei hoher Effektivität zeigen sich kaum Interaktionen mit den Stoffwechselprozessen der Tiere, woraus eine kürzere Regenerationszeit und eine fehlende Beeinträchtigung der Experimente resultieren. Die Ausfallrate durch Narkosezwischenfälle ist laut Sharp and Villano (2012) deutlich geringer. Daher wird die Inhalationsanästhesie von vielen Autoren als bevorzugte Narkosemethode empfohlen (Wixson und Smiler 1997; Flecknell 2009; Henke und Erhardt 2012; Sharp und Villano 2012; Wolfensohn und Lloyd 2013).

Nach Deckardt et al. (2007) ist kein volatiles Anästhetikum frei von Nachteilen. Zu diesen zählen Vasodilatation, starke Hypotension, Depression der Herzkraft, Atemdepression, Übelkeit, Erbrechen, Ileus und Arrhythmien (Lukasik und Gillies 2003). Ein weiterer Nachteil ist die mangelhafte analgetische Potenz. Laut Henke et al. (2012) soll das Schmerzmittel idealerweise 30 min vor Setzen des ersten Schmerzreizes verabreicht werden. Weiter besteht ein potentielles Gesundheitsrisiko für den Untersucher durch Einatmung volatiler Anästhetika. Aufgrund der hohen Spontanabortrate bei Schwangeren (Hoerauf et al. 1999; Karibiyik et al. 2001; Zou et al. 2011; Wronska-Nofer 2012) spricht sich Flecknell (2009) für die Verwendung von speziellen Narkosegas-Absaugvorrichtungen aus. Folglich wird im Vergleich zur Injektionsanästhesie mehr Equipment (Narkosegasverdampfer, Sauerstoffzufuhr, Induktionskammer) benötigt.

Bei Ratten und anderen Kleinsäugern wird üblicherweise Isofluran® mit Sauerstoff als Trägergas verwendet (Henke und Erhard 2012). Dieses Inhaltationsanästhetikum wird auch bei wiederholter Anwendung gut vertragen (Henke und Erhardt 2012). Isofluran® ist ein nicht brennbares, schnell an-und abflutendes Gas mit hoher Wirkpotenz und geringer Toxizität (Soma 1983; Löscher 2010), wirkt aber nur schwach analgetisch (Schulte am Esch et al. 2000), so dass je nach Eingriff an eine zusätzliche Analgesie notwendig wird (Longley 2008). Bei wenig schmerzhaften Prozessen führt es aber zu einer akzeptablen Analgesie, Relaxation und Narkosetiefe.

Injektionsanästhetika wie Barbiturate, Ketamin und Propofol werden parenteral, also intravenös (i. v.), i. p. oder i. m., appliziert und wirken mit steigender Dosis sedativ, hypnotisch bis narkotisch (Löscher 2010). Aufgrund des geringen finanziellen und apparativen Aufwands (Henke und Erhardt 2012) ist die Injektionsanästhesie für wissenschaftliche Forschungen interessant (Jang et al. 2009; Stokes et al. 2009). Die Venenpunktion mit Anlage einer Venenverweilkanüle ist bei Nagern aufgrund ihrer geringen Größe mit Schwierigkeiten verbunden und bedarf einer gewissen Erfahrung. I. m. Injektionen sind schmerzhaft (Flecknell 2009) und führen nach Smiler et al. (1990) häufig zu einer Myositis. Dennoch wird sie von Henke und Erhardt (2012) für Ratten empfohlen. Allgemein wird bei Ratten die i. p. Applikation bevorzugt (Flecknell 1993; Flecknell et al. 2007; Longley 2008), obgleich vor Fehlinjektionen gewarnt wird, die Organverletzungen (GV-SOLAS 2017) oder einen verzögerten Wirkeintritt zur Folge haben können (Flecknell 2009). Laut Hu et al. (1992) zeichnet sich die i. p. Applikation durch einen geringen Distress für die Ratten sowie durch eine schnelle Resorption der Medikamente aufgrund des gut durchbluteten Bauchfells aus.

Laut Wolfensohn und Lloyd (2013) kann es bei der Narkoseaufrechterhaltung im Rahmen einer Injektionsanästhesie ohne Perfusor oder Spritzenpumpe zu einer ungleichmäßigen Narkosetiefe kommen. Während eine i. v. Injektionsnarkose schrittweise nach Wirkung appliziert wird und mit einem raschen Wirkeintritt mit sofortiger Bewusstseinsausschaltung des Tieres verbunden ist, wird die berechnete Dosis bei i. m. oder i. p. Injektionsnarkosen einmal vollständig als Bolus injiziert (Flecknell 2009). Dieses Vorgehen führt vom Stoffwechsel des Tieres abhängig zu individuellen Schwankungen beim Wirkeintritt und bei der Wirkdauer (Wolfensohn und Lloyd 2013). Die meisten Injektionsanästhetika werden nach der Metabolisierung in der Leber über die Niere ausgeschieden, wodurch es zu individuell verlängerten Aufwachzeiten kommen kann (Smith 1993), während denen das Tier für eine Hypothermie, respiratorische Depression und Exzikkose anfällig bleibt (Flecknell 1993). Hier ist eine Antagonisierung des Anästhetikums vorteilhaft. Diese Antagonisten werden bei Notfallsituationen durch Überdosierung oder zur gezielten Beendigung der Anästhesie eingesetzt. Trotz Gabe eines Antagonisten lässt sich eine applizierte Dosis aber nicht vollständig eliminieren. Um dieser Gefahr vorzubeugen, sollten bei Kleinsäuger Injektionsanästhetika mit einer großen therapeutischen Breite gewählt werden (Sharp und Villano 2012). Die exakte Dosierung sollte nach Erfassung des aktuellen Gewichts erfolgen (Wixson und Smiler 1997). Weiter sollten bei allen Applikationsformen (i. v., i. m., i. p.) die empfohlenen Maximalvolumina per Injektionsstelle beachtet werden (Longley 2008).

Die Frage, ob eine Kombination oder die Einzelgabe von Anästhetika bei einer Injektionsnarkose die besten Erfolge erzielt, wird kontrovers diskutiert. Henke et al. (2012) und Wolfensohn und Lloyd (2013) empfehlen eine Kombination, da kein Injektionsanästhetikum für alle gewünschten Wirkungen (Bewusstlosigkeit, Relaxation/Immobilisation, Analgesie) optimal geeignet ist. Kombinationen erbringen in der Summe die erwünschten Wirkungen, potenzieren sich gegenseitig in ihrer Wirkstärke und kompensieren wechselseitig negative Nebenwirkungen (Henke und Erhardt 2012). Nach Henke und Erhardt (2012) und Wolfensohn und Lloyd (2013) soll eine Aufrechterhaltung der Narkose mittels Inhalationsanästhesie als balancierte Anästhesie erfolgen. Dagegen sind Antognini et al. (2005) und Flecknell (2009) der Ansicht, dass ein Anästhetikum allein in ausreichend hoher Dosis alle essentiellen Bestandteile der Allgemeinanästhesie abdecken kann, obgleich auch die nachteiligen Effekte zunehmen. Laut Shafer und Stanski (2008) ist eine ausreichend tiefe Anästhesie mit Ausbleiben hämodynamischer Reaktionen nur bei Verwendung eines Hypnotikums in Kombination mit einem Analgetikum (Opioid oder Stickoxydul) möglich. Aufgrund der bei parenteral verabreichten Anästhetika erschwerten Steuerbarkeit (Henke und Erhardt 2012) sollten Kombinationen mit einer großen Sicherheitsbreite verwendet werden (Flecknell et al. 2007; Flecknell 2009). Ketamin-Xylazin-Narkosen werden aktuell am häufigsten eingesetzt. Ohne stärkere Beeinträchtigung des Atem- und Kreislaufsystems wird aber nur das Hypnosestadium (III/1) erreicht. Ein tieferes Anästhesiestadium führt zu einer massiven Depression des Herz-Kreislauf- und Atemsystems (Henke und Erhardt 2012). Wixson et al. (1987) beschreiben Mortalitätsraten von bis 33 % unter dieser etablierten Kombinationsnarkose. Aufgrund der extrem langen Nachschlafdauer (2-4 h) wird diese Narkose nur bedingt empfohlen.

Nach Arras et al. (2001) sind Injektionsanästhesien in Tiermodellen nie vollständig sicher und effektiv. Inhalationsanästhesien werden laut Jang et al. (2009) wegen der geringen Mortalität auch bei Labornagern immer populärer, sind jedoch aktuell nicht universell durchführbar, da in vielen Laboratorien die technischen Voraussetzungen fehlen. Zudem sind Inhalationsnarkosen für bestimmte Eingriffe wie stereotaktische OPs nur bedingt anwendbar (Ullmann 2012).

Aufgrund der technischen Gegebenheiten wurden in der vorliegenden Arbeit Inhalationsnarkosen mit Isofluran® nur für die Gewichtsmessungen sowie zur Sedierung der Ratten unmittelbar vor dem Eingriff bzw. vor der i. m. / i. p. Injektion des Narkotikums durchgeführt. Ein negativer Effekt der Herz- und Lungenfunktion mit nachfolgendem Blutdruckabfall wurde bei keinem Tier festgestellt. Als Injektionsnarkotika für den chirurgischen Eingriff dienten Ketanest® und Rompun®. Das präoperativ applizierte Ampicillin® wirkte Wundheilungsstörungen, aber auch Myositiden entgegen.

In der vorliegenden Studie verstarben sieben von 30 operierten Ratten nur wenige Stunden nach der OP (s. Tab. 6). Von diesen Tieren hatten fünf intraoperativ unter der Narkose eine schlechte Relaxation und Analgesie gezeigt. Nach ausführlicher Literaturrecherche wurde als mögliche Ursache die Applikationsart der Narkose (i. m. Gabe von Ketanest[®] und Rompun[®] in die Nackenmuskulatur) identifiziert (Wixson et al. 1987; Smiler et al. 1990; Flecknell 1993; Smith 1993; Arras et al. 2001; Flecknell et al. 2007; Longley 2008; Flecknell 2009; Henke und Erhardt 2012). Da hauptsächlich ovarektomierte Tiere (Tiere der OV+OPG-Gruppe oder OV-OPG-Gruppe) verstarben (sieben von neun Tieren), lag die Vermutung nahe, dass die Problematik in der Verstoffwechselung der Narkosemedikamente bestand. Möglicherweise wurden die i. m. verabreichten Medikamente aufgrund des höheren Körperfettanteils von ovarektomierten Ratten langsamer verstoffwechselt als von den nicht-ovarektomierten Ratten. Diese Hypothese könnte auch erklären, weshalb bei den ovarektomierten Tieren während der OP oftmals Ketanest[®] und Rompun[®] nachdosiert werden musste. Vermutlich starben die Tiere an einer Atemdepression aufgrund eines Überhanges an Narkosemedikamenten.

Bestimmend für die Wirkdauer eines Anästhetikums sind durchblutungsabhängige Umverteilungsvorgänge. Nach der Applikation flutet das Medikament rasch in das gut durchblutete Gehirn an. Die anschließende Umverteilung in die peripheren Kompartimente (innere Organe, Muskulatur, Fettgewebe) beendet die analgetische Wirkung. Die Plasma-Halbwertszeit ist jedoch viel länger als die analgetische Wirkzeit, da der Ausstrom aus den gesättigten peripheren Kompartimenten zurück ins Blut sehr langsam verläuft. Von dort flutet das Medikament wieder im Gehirn an, erreicht allerdings nicht mehr den initialen Wirkspiegel. Bei wiederholten Injektionen ist Folgendes zu beachten: Nach der ersten Gabe des Anästhetikums lässt dessen Wirkung relativ schnell nach (Abstrom aus dem Gehirn), obwohl die Konzentration im Körper noch hoch ist (Umverteilung in die peripheren Kompartimente). Bei einer Nachinjektion werden die peripheren Speicher relativ stark aufgesättigt, folglich verlängert sich die Wirkzeit des Anästhetikums, da es einerseits nicht mehr so schnell aus dem Gehirn abfluten kann (geringeres Diffusionsgefälle) und andererseits verstärkt aus dem gesättigten Speichern ins Blut und damit ins Gehirn rückverteilt wird. Dadurch ist die Gefahr einer Atemdepression aufgrund eines Überhanges an Narkosemedikamenten gegeben.

Die Umverteilungsvorgänge bei Ratten mit höherem Körperfettanteil sind eine unberechenbare Größe. Um damit einhergehende Komplikation in zukünftigen Versuchen zu vermeiden, empfiehlt es sich, wie in den vorliegenden Versuchen, das Narkoseverfahren auf eine i. p. Injektion umzustellen.

Eine weitere Überlegung ist die Durchführung der OP in Intubationsnarkose. Aufgrund des schmalen und schwer zugänglichen Larynx bei Nagern ist laut Flecknell (2009) eine Intubation jedoch nur schwer durchführbar, bei Ratten aber tendenziell einfacher als bei Mäusen und Hamstern. Dem Vorteil einer längeren postoperativen Atemwegssicherung steht aber eine fragliche Toleranz der Tiere ohne zusätzliche Gabe eines Sedativums gegenüber.

Osteosynthese

Laut klinischen und experimentellen Studien nehmen die Blutzufuhr, die Größe des Frakturspaltes und mechanische Faktoren Einfluss auf den Frakturheilungsprozess (Aro und Chao 1993; Claes et al. 1997; Augat et al. 1998; Claes et al. 2003; Willie et al. 2009). Claes et al. (1997) wiesen nach, dass die Versteifung einer Fraktur über fünf Wochen zu einer besseren Knochenheilung führt als deren frühe Dynamisierung durch eine reduzierte Versteifung des Fixateurs. Eine gute Durchblutung, ein schmaler Frakturspalt und eine stabile Fixierung der Knochenenden zueinander fördern den Heilungsprozess (Markel et al. 1994; Claes et al. 1997; Harrison et al. 2003).

Die wichtigsten mechanischen Faktoren sind axiale Bewegungen (Claes et al. 1997; Augat et al. 1998) und Scherbewegungen (Augat et al. 1998; Schell et al. 2005) innerhalb des Frakturspaltes (interfragmentäre Bewegung = interfragmentary movements, IFMs). Scher-IFMs stören die Frakturheilung stärker als axiale-IFMs. Diese Bewegungen werden durch die auf den Fixateur externe einwirkende Belastung sowie durch dessen Stabilität und Tragkraft beeinflusst (Wu et al. 1984; Williams at al. 1987; Goodship et al. 1993; Claes et al. 1997; Duda et al. 2002). Mit Fixateur externe Konstruktionen mit bekannter Mechanik lassen sich nach Kalkulation der Stabilität und der Frakturfixierung in vivo Studien zum Frakturheilungsprozess durchführen (Willie et al. 2009). Durch kontrollierte Manipulationen der Achsen im Frakturspalt ist eine flexible bzw. rigide Fixierung möglich. Flexiblere Fixateure stimulieren die Kallus-Bildung sowie die endochondrale Ossifikation, während stabilere Fixateure mit limitierten IFMs zu einer eher mäßigen Kallus-Formation führen (McKibbin 1978; Goodship und Kenwright 1985; Goodship et al. 1993; Claes et al. 1997; Schell et al. 2005). Willie et al. (2009) verglichen drei externe Fixateurmodelle für die Anwendung am frakturierten Rattenfemur. Der Abstand, der Durchmesser und das Material der verwendeten Pins hatte einen maßgeblichen Anteil an der Festigkeit des Fixateur externe. Die Stabilität des Fixateurs erhöhte sich mit der Abnahme des Abstands und der Zunahme des Durchmessers der Pins. Zugleich kam es seltener zu Ermüdungsbrüchen des Materials (Mark et al. 2003). Weiter wiesen Edelstahl-Pins verglichen mit Titan-Pins der gleichen Bauart eine signifikant höhere axiale Stabilität auf. In in vitro Kompressionstests erzielte ein starres Fixierungsdesign mit zwei Längselementen eine axiale Steifigkeit von 74 N/mm, die flexiblere Variante mit einem Längselement dagegen lediglich einen Wert von 10 N/mm. Der Körper und die Länge des Fixateurs spielten eine untergeordnete Rolle für die Festigkeit des Konstrukts.

Nach Schoen et al. (2008) und Willie et al. (2009) zeigen externe Fixateure eine wesentlich höhere axiale und Torsions-Stabilität als das Osteosyntheseverfahren der intramedullären Knochennagelung.

Für die vorliegende Studie kam eine intramedulläre Knochennagelung zur Stabilisierung der Femurfraktur nicht in Frage, weil bei diesem Verfahren eine Einbringung von Spongostan[®] in den Frakturspalt nicht durchführbar gewesen wäre. Der externe Fixateur sollte die Beweglichkeit innerhalb des Frakturspaltes minimieren, um bestmögliche Voraussetzungen für eine dauerhafte korrekte Platzierung des Spongostans[®] und dessen Durchbauung zu gewährleisten. Aufgrund der positiven mechanischen Eigenschaften wurde das externe Fixateurmodell f3 von Claes et al. (2009) verwendet (s. Kap. 3.3.1). Zur Reduzierung des Gesamtgewichts des Fixateur externe bei gleichzeitigem Erhalt der Stabilität wurde eine Aluminium- mit einer Edelstahl-Backe kombiniert.

Die intraoperative Anlage des externen Fixateurs und die Platzierung des Spongostans[®] in den Osteotomiespalt verlief problemlos. Die Ratten zeigten gegenüber der Osteosynthese eine bemerkenswerte Akzeptanz. Postoperativ wurde die Konstruktion durch das Gewicht des Tieres – im Vierbein- und Zweibeinstand – sowie durch Manipulationen im Rahmen der Fellpflege belastet. Von 30 Ratten zeigten lediglich drei (Ratte Nr. 10, 13, 30) einen Versatz der Kortikalis aufgrund einer Verschiebung der Frakturenden bei ungenügender Fixierung. Ob diese Verschiebungen intraoperativ oder postoperativ entstanden sind, ließ sich nicht eindeutig klären. Auf die negativen Folgen einer Osteosynthese-Instabilität wird ausführlich in Kapitel 5.1.5 eingegangen. Zur Detektion des Zeitpunktes der Verschiebung wären regelmäßige Kontroll-Röntgenuntersuchungen erforderlich gewesen (s. Kap. 5.1.4).

5.1.3 Verwendung von Spongostan®

Spongostan[®] findet seit Jahrzehnten klinische Anwendung und hat sich in den chirurgischen Disziplinen bewährt (Light und Prentice 1945). Da es zu einer schnellen und effektiven Hämostase führt, wird es zur Versorgung von venösen und sickernden Blutungen (z. B. aus Spongiosa und Gewebe) eingesetzt. Spongostan[®] besitzt auch geeignete Eigenschaften für die Funktion als Trägermatrix. Es ist bei geringen Kosten in steriler Form kommerziell erhältlich, einfach in der klinischen Anwendung, individuell zuschneidbar, vollständig in drei bis fünf Wochen resorbierbar sowie biokompatibel und löst keine Fremdkörperreaktion aus (Langnickel et al. 1978; Paganelli et al. 2006; Johnson & Johnson Medical o. J.). Die schwammartige Struktur des Spongostans[®] ermöglicht eine hohe Flüssigkeitsaufnahme um bis zum 45-Fachen des Eigengewichts (Pinkernell 2010; Johnson & Johnson Medical o. J.). Da Knochendefekte in der modernen Unfall- und Tumorchirurgie nach wie vor ein großes Problem darstellen, besitzt die Etablierung alternativer Knochenersatzmaterialien einen zentralen Stellenwert. Als Alternative für den autologen Knochenersatz hat sich Spongostan® in mehreren Studien sowohl als geeignete Trägermatrix als auch als Ersatzmaterial zur Auffüllung von kleineren Knochendefekten bewährt (Schneider et al. 1998; Ponticiello et al. 2000; Kos et al. 2003; Paganelli et al. 2006; Charlesworth et al. 2012).

Neben dem Spongostan[®] der Firma Johnson & Johnson Medical existieren weitere Gelatine-Schwämme mit ähnlichen Eigenschaften. Aufgrund der guten Studienlage und den positiven Eigenschaften wurde in der vorliegenden Studie Spongostan[®] als OPG-Trägermatrix gewählt.

Paganelli et al. (2006) fanden während eines Versuchszeitraumes von vier Wochen eine sichtbare Schrumpfung der verwendeten Gelatine-Schwämme bis hin zur vollständigen Durchbauung mit einem parallelen Verschwinden ihrer typischen Struktur. Die Autoren erklären diese Befunde mit einem Abbau / Zerfall des Gelatine-Gerüsts durch die Aufnahme des verwendeten Mediums. Riegels-Nielsen et al. (1986) beschreiben in einer Studie an Ratten die vollständige Resorption von Spongostan[®] bereits nach 14 Tagen. Diese Beobachtungen werden durch die Befunde der vorliegenden Studie bestätigt. Nach dem Versuchszeitraum von vier Wochen war das Spongostan[®] nicht mehr histologisch darstellbar.

Neben der Stabilisierung der Fraktur mittels eines Fixateur externe und Spongostan[®] als OPG-Trägermatrix wäre alternativ auch eine intermedulläre Osteosynthese mit be-

schichtetem Trägerstoff denkbar gewesen. Die Vorteile der vorliegenden Methodik liegen darin, dass von einer geringeren Anzahl an Komplikationen sowie von einer kostengünstigeren Umsetzung auszugehen ist. Der Fixateur externe ermöglicht die komplette Durchbauung des Spongostans[®] im Frakturspalt ohne dem Einliegen von Osteosynthesematerialien. Nach erfolgter Knochenheilung und Entfernung des Fixateur externe verbleiben durch die Pins lediglich geringfügige Knochendefekte zurück, die schnell durchbaut werden können. Der nach Entfernung einer intermedullären Osteosynthese verbleibende Knochendefekt ist deutlich größer und erstreckt sich über den gesamten Frakturspalt.

5.1.4 Eignung der radiologischen Methoden zur Analyse der Wachstums-/Heilungsprozesse des Knochens

Nativ-Röntgen

In der Orthopädie und Unfallchirurgie gehören Röntgenuntersuchungen zu den diagnostischen Standardverfahren. Bei konservativer und chirurgischer Versorgung von Frakturen sind Kontrolluntersuchungen zur Beurteilung des Heilungsprozesses (z. B. Stellung der Frakturenden zueinander, Fortschreiten der knöchernen Durchbauung des Frakturspaltes) in Intervallen von meist einer, drei und sechs Wochen nach Entstehung der Fraktur bzw. nach der Osteosynthese-Anlage üblich. Im OP-Saal werden zudem Nativ-Röntgen-Übersichtsaufnahmen der Fraktur mittels eines C-Bogen-Röntgengeräts prä-, intra- und postoperativ durchgeführt.

In der vorliegenden Studie wurden exemplarisch für jede Versuchsgruppe Nativ-Röntgenaufnahmen der frakturierten und mit Fixateur externe osteosynthetisch versorgten Femora nach der Explantation angefertigt. Die Aufnahmen zeigen die regelrechte Lage der externen Fixateure in einer Ebene (s. Abb. 13). Die Pins reichten mit ihrem apikalen Gewinde maximal zwei Windungen über die distale Kortikalis hinaus. Der deutlich erkennbare Frakturspalt mit den unterbrochenen Kortikalis-Linien belegt, dass der gewählte Versuchszeitraum von vier Wochen nicht für eine komplette Frakturheilung mit knöchernem Verschluss der Kortikalis ausgereicht hat. Die auftretende Unschärfe im Bereich des Frakturspaltes spricht für das Vorhandensein von Granulationsgewebe. Genauere Aussagen zum Heilungsprozess innerhalb des Frakturspaltes waren jedoch mittels dieser Technik nicht möglich und erforderten weiterführende radiologische Verfahren (z. B. µCT, pQCT) oder histologische Untersuchungen. Das Weichteilgewebe präsentierte sich als eine den Femur umgebende Verschattung.

Eine fehlerhafte Anlage der Osteosynthese (z. B. durch eine zu tiefe Anlage der Pins und eine damit einhergehende Weichteilverletzung) und / oder Instabilität beeinträchtigt den Heilungsprozess (s. Kap. 5.1.5). Durch regelmäßige intra- und postoperative Kontroll-Röntgenuntersuchungen zur Überprüfung der regelrechten Lage des Fixateur externe hätte eine Fehlstellung früher detektiert und ggf. korrigiert werden können. Eine Fehlstellung, wie in der μ CT in Abbildung 15 erkennbar, wäre so vermeidbar gewesen (s. Kap. 4.2.2). Aufgrund der örtlichen Gegebenheiten des Tierstalls war dies jedoch nicht möglich. Zur Durchführung radiologischer Kontrolluntersuchungen hätten die Tiere zu einer Röntgeneinrichtung gebracht werden müssen. Der Transport sowie die Untersuchung in Inhalationsnarkose hätte zu einem zusätzlichen Distress der Tiere geführt. Mit einem portablen Röntgengerät hätten die Untersuchungswege und die Belastung der Tiere verkürzt werden können.

Das Spektrum bildgebender Verfahren zur Diagnostik osteologischer Fragestellungen wurde in den vergangenen Jahren durch die µCT und pQCT erheblich erweitert. Diese Verfahren ermöglichen neben der nicht-destruktiven 3D-Darstellung der BMD auch die Beurteilung der qualitativen und quantitativen Knochenmikroarchitektur mit einer Auflösung im Mikromolaren-Bereich. Die Untersuchungsergebnisse sind reproduzierbar und können mit einer Spezial-Software weiterverarbeitet werden (s. Kap. 1.3.3; Patel et al. 2003; Barbe et al. 2014).

Mikro-Computertomografie (µCT)

Die µCT wird auch als 3D-Röntgen-Mikroskopie bezeichnet (Flannery et al. 1987; Bonse und Busch 1996; Clark und Badea 2014). Aufgrund ihres hohen Auflösungsvermögens von mineralisierten Gewebestrukturen gilt sie als Goldstandard zur Untersuchung der Knochenmorphologie. Nach Borah et al. (2001) ist sie ein geeignetes Werkzeug zur Entwicklung neuer Therapieansätze für die Osteoporose, da sie die Zusammenhänge zwischen Knochenmasse, 3D-Knochenarchitektur und Knochenfunktion darstellt. Daher können Remodelierungsprozesse (Bonse und Busch 1996), die Knochenresorption, der Knochenaufbau sowie Strukturparameter (z. B. Trabekeldichte) ebenso untersucht werden wie Heilungsprozesse im frakturierten Knochen (Freeman et al. 2009). Weiter lässt sich die Integration von Knochenersatzmaterialien (Tsukimura et al. 2009) und Implantaten (Gao et al. 2009) beurteilen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Frakturheilung im osteoporotischen exemplarisch für jede Versuchsgruppe an einem Tier mittels µCT evaluiert. Die Befunde waren jeweils repräsentativ für die Gruppe.

Im Gegensatz zu den nativ-radiologischen Aufnahmen stellten die hochauflösenden µCT-Aufnahmen das Gewebe im Frakturspalt detaillierter dar. Wie erwartet, zeigte das Rattenfemur der OV+OPG-Gruppe (s. Abb. 16) im Vergleich zu dem Rattenfemur der OV-OPG-Gruppe (s. Abb. 15) eine bessere Knochenwundheilung. So ist in Abbildung 16 deutlich eine beginnende Durchbauung des mit OPG getränkten Spongostans® im Frakturspalt zu erkennen, die aufgrund der Kalzifizierung radiologisch darstellbar war. Die µCT-Befunde entsprachen der vier Wochen nach der Fraktur zu erwartenden Granulationsphase (dritte Phase der sekundären Frakturheilung) (Einhorn 1991). Der primäre Bluterguss im Frakturspalt wird dabei durch Granulationsgewebe ersetzt. Dieser "weichen Kallus" dient der ersten Überbrückung der Frakturenden (Ashhurst et al. 1982; Yasui et al. 1997; Utvag und Reikeras 1998; Schmidmaier et al. 2004). In der sich anschließenden "primären Kallusreaktion" beginnt die Knochenneubildung im Bereich der Knochenhaut (Hadjiargyrou et al. 2002; s. Kap. 5.1.5), erkennbar an der Unschärfe und Verschattung in und um den Frakturspalt sowie an der Ausbildung von Knochenspangen, die die Frakturlinie der distalen Kortikalis überspannen. In Abbildung 15 sind diese Merkmale ebenfalls zu erkennen, jedoch weniger stark ausgeprägt. Hadjiargyrou et al. (2002) und Schmidmaier et al. (2004) beschreiben die Abfolge der Heilungsphasen im Rattenmodell und ein fast abgeschlossenes Kallusremodeling 21 Wochen nach dem Frakturereignis. Die Phasen der Heilung sind bei Mensch und Ratte vergleichbar, jedoch erfolgt der Heilungsverlauf bei der Ratte schneller. Beim Menschen wird die volle Stabilität des Knochens erst nach mehreren Monaten erreicht und die Umbauprozesse sind teilweise erst nach Jahren abgeschlossen (Konrads und Giebel 2012; Oryan et al. 2015). Im Vergleich zur OV-OPG-Gruppe (s. Abb. 15) zeigten die Tiere der nicht ovarektomierten Kontrollgruppe (s. Abb. 14) einen besseren Heilungsprozess, ähnlich dem der Tiere aus der OV+OPG-Gruppe. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da ohne Induzierung einer Osteoporose ein physiologischer Verlauf der Knochenheilung erfolgt.

Überraschenderweise wiesen die Tiere der OV+OPG-Gruppe bei einer vergleichbaren Durchbauung des Frakturspaltes (s. Abb. 16) wie bei den Tieren der Kontrollgruppe zusätzlich eine deutliche Ausbildung von Knochenspangen über die Frakturlinie auf. Die Ursache für das Fehlen solcher Spangen in Abbildung 14 könnte der Versatz der Frakturenden darstellen. Der am ehesten durch die mangelnde Fixierung der Osteosynthese entstandene horizontale Versatz führte zu einer größeren Entfernung zwischen der Kortikalis der Frakturenden. Dies kann eine Verlängerung des Heilungsprozesses zur Folge haben und zu einem schlechteren Heilungsergebnis führen (Hock et al. 1990; Court-Brown und Penning 1997; Littenberg et al. 1998; Bhandari et al. 2000; s. Kap. 5.1.5). Zur Spezifizierung des Gewebes im Frakturspalt erfolgte eine histologische Aufarbeitung (s. Kap. 5.1.5) sowie die Analyse des Knochenmaterials durch die pQCT-Messungen. Das μ CT hat sich in diesem Versuch als Methode zur Visualisierung der knöchernen Durchbauung des Frakturspaltes und als Parameter zur Beurteilung der Knochenheilung bewährt. Eine umfangreichere Erhebung der Daten aller 30 Ratten war aus Kapazitätsgründen durch die hohe Auslastung des verwendeten Gerätes mit weiteren Forschungsgruppen nicht möglich.

Für zukünftige Forschungsvorhaben wäre die Analyse nicht-ovarektomierter Ratten mit OPG-Gabe interessant, um den Einfluss einer lokalen OPG-Applikation in den Frakturspalt im nicht-osteoporotischen Knochen auf die Knochenheilung zu untersuchen.

Periphere quantitative Computertomografie (pQCT)

Der große Vorteil des pQCT gegenüber anderen Messmethoden liegt darin, dass sie zwischen kortikalem und trabekulärem Knochen unterscheiden kann. Der trabekuläre Knochen reagiert aufgrund seiner größeren Fläche schneller auf Änderungen des Knochenstoffwechsels als der kortikale Knochen. Folglich kann mit der pQCT früher und mit einer höheren Sensitivität ein Knochenabbau oder der Erfolg einer Therapie nachgewiesen werden (Schneider et al. 1992; Takada et al. 1996). Mit der Methode lassen sich sowohl Patienten mit einem erhöhten Frakturrisiko (Burghardt et al. 2010a; 2010b) als auch Patienten mit stattgehabten Frakturen detektieren (Yu et al. 1995a; Bergot et al. 2001; Boutroy et al 2005; Diederichs et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Knochenstatusparameter BMD (in mg/cm³), Knochenfläche (in mm²) und Knochenmasse (in g) in den Versuchsgruppen mittels pQCT evaluiert und in Bezug auf die Frakturheilung diskutiert. Die Messungen erfolgten kortikal, trabekulär und gesamt in den drei Schnittebenen (ROI I, ROI II, ROI III).

Die BMD (s. Tab. 8) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen, obgleich Tiere der nicht ovarektomierten Kontrollgruppe die höchsten Werte aufwiesen. Ein Unterschied zugunsten der Kontrollgruppe war zu erwarten, da ohne Induzierung einer Osteoporose ein physiologischer Verlauf der Knochenheilung erfolgt, der schneller zu einer höheren BMD führt. Die fehlende Signifikanz der Unterschiede der BMD zwischen den drei Versuchsgruppen sprechen für eine gute Wundheilung bei allen Tieren sowie für eine ausreichende Länge des Versuchszeitraumes. Gegenüber der OV-OPG-Gruppe zeigte die OV+OPG-Gruppe lediglich in der ROI I und II der trabekulären BMD höhere Werte. Aufgrund der OPG-Gabe wären höhere Werte in allen BMD-Variablen zu erwarten gewesen. Die höheren Werte der trabekulären BMD insbesondere in der ROI II (Frakturspalt) könnten jedoch für eine OPG-Wirkung sprechen, da der trabekuläre Knochen schneller auf Änderungen des Knochenstoffwechsels reagiert und diese folglich dort als erstes zu detektieren sind. Möglicherweise hätte eine Verlängerung des Versuchszeitraums über vier Wochen hinaus zu einem deutlicheren Ergebnis zugunsten der OV+OPG-Gruppe geführt.

Bei der Beurteilung der Knochenfläche (s. Tab. 9) zeigte die nicht ovarektomierte Kontrollgruppe wie erwartet deutlich höhere Werte im Vergleich zu den osteoporotischen Tieren der OV-OPG-Gruppe und OV+OPG-Gruppe. Zudem lagen die Knochenfläche-Werte in der OV+OPG-Gruppe im Durchschnitt etwas höher als in der OV-OPG-Gruppe was für eine positive OPG-Wirkung auf die Wundheilung mit Erhöhung der Knochenfläche spricht. Jedoch erreichten auch diese Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen keine Signifikanz, wobei die p-Werte nur knapp über 0,05 lagen. Der fehlende Gruppeneffekt könnte daher auf der geringen Stichprobengröße beruhen. Es ist zu erwarten, dass bei höherer Stichprobengröße (z. B. 10 pro Gruppe) signifikante Unterschiede detektiert worden wären.

Bei der Evaluierung der Knochenmasse wies die OV+OPG-Gruppe im Vergleich zur OV-OPG-Gruppe höhere Werte auf (s. Tab. 10). Eine Ausnahme bildete die kortikale Knochenmasse im ROI II, die in der OV-OPG-Gruppe geringfügig höher lag. Dies bestätigt die Annahme der positiven OPG-Wirkung auf die Wundheilung mit Erhöhung der Knochenmasse. Die nicht-ovarektomierte Kontrollgruppe zeigte, wie erwartet, bei der Knochenmasse deutlich höhere Werte im Verglich zu den osteoporotischen Tieren der OV-OPG-Gruppe und OV+OPG-Gruppe. Dennoch bestanden bei der Knochenmasse keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Die p-Werte lagen auch hier nur knapp über 0,05, was ein Indiz für das Vorliegen eines Gruppeneffekts sein könnte, der aufgrund der geringen Subgruppenbesetzung nicht als signifikant klassifiziert werden konnte.

Zusammenfassend sprechen die pQCT-Ergebnisse dafür, dass OPG bei Osteoporose die Knochenfläche und die Knochenmasse, nicht jedoch die BMD erhöhen kann. In weiteren Versuchen wäre eine BMD-Bestimmung vor Versuchsbeginn sinnvoll, um die osteoporotische Induktion des Knochens durch den Hormonmangel zu belegen. Zudem könnte der postoperative Zuwachs mit dem Ausgangswert der Aus pQCT-Parameter verglichen werden.

Eine Renaissance der CT-BMD-Messung könnte sich durch die Auswertung klinischer Routine-CT-Untersuchungen – als Nebenprodukt von Abdomen- bzw. Becken-CTs – ergeben, die in ihrer Häufigkeit weiterhin zunehmen werden (Ito et al. 1997; Budoff et al. 2010; Pickhardt et al. 2011; Krestan und Gruber 2013).

5.1.5 Eignung der histologischen Methoden zur Analyse der Wachstumsund Heilungsprozesse des Knochens

Die Histologie ist, seitdem die histologische Aufbereitung von nicht-entkalktem Knochen technisch möglich ist, ein unverzichtbarer Bestandteil der qualitativen Auswertung von Knochendefektmodellen. Einzig durch die histologische Untersuchung können Gewebe und zelluläre Strukturen sicher identifiziert und differenziert werden. Aus dem Vorkommen spezifischer Zellpopulationen im histologischen Schnitt lassen sich Rückschlüsse auf die biologische Aktivität im Frakturspalt sowie auf die Reaktion des Organismus auf das implantierte Fremdmaterial (z. B. Spongostan[®]) ziehen. Leukozyten, Makrophagen, oder Lymphozyten deuten auf eine Entzündungsreaktion hin. Das Auftreten von Chondrozyten kann als Beginn einer enchondralen Ossifikation gewertet werden, Osteoblasten und Osteoklasten kennzeichnen einen aktiven Knochenstoffwechsel. Gefäßanschnitte und Erythrozyten im Defektbereich bilden die Vaskularisierung ab.

In der vorliegenden Studie wurde anhand der histologischen Schnitte das Entstehen neuer Gefäße im Osteotomiespalt, der Abbau des Spongostan[®]-Gerüsts und der Ersatz von Knorpelgewebe durch Knochengewebe im Rahmen der sekundären Frakturheilung nachgewiesen.

Der Nachteil der histologischen Untersuchung besteht darin, dass die Proben für die Analyse eingebettet und zerschnitten werden müssen, wonach weitere Untersuchungen am gleichen Material kaum möglich sind. Laut Donath (1988) geht bei Verwendung der Trenn-Dünnschliff-Methode ein erheblicher Anteil der Probe als Abschliff verloren. Weiter ist die Methode technisch anspruchsvoll und inklusive der Probenaufbereitung zeitaufwändig. Die alternative Schnitt-Technik ist bei hartem Knochenmaterial mit hohen Verlustraten und Artefakten behaftet. Ein weiterer Nachteil der Histologie ist, dass die Schnitte die Verhältnisse lediglich zweidimensional erfassen. Um einen 3D-Eindruck der Frakturheilung zu gewinnen, müssen viele Schnitte angefertigt werden. Die Histomorphometrie ist nur an einzelnen Schnitten möglich, eine histologische Auswertung der gesamten Knochenprobe ist kaum durchführbar. Ergänzend sollten deshalb 3D-bildgebende Verfahren (in der vorliegenden Studie die µCT; s. Kap. 5.1.4) zur Anwendung kommen. Eine Erweiterung der histologischen Untersuchung, beispielsweise durch immunhistochemische Methoden zur Hervorhebung spezifischer Strukturen, ist jedoch möglich. Insgesamt gilt die Histologie als das Standardverfahren zur Evaluation zellulärer Reaktionen des Gewebes auf Frakturen und auf das Einbringen von Fremdmaterialien wie Spongostan[®] (An und Friedman 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frakturheilung am osteoporotischen Knochen exemplarisch für ein Tier der OV-OPG-Gruppe und der OV+OPG-Gruppe mittels histologischer Verfahren (Toluidinblau-Färbung und Masson-Goldner-Trichrom-Färbung) dargestellt. Diese Analyse hatte einen rein explorativen Charakter und diente der ersten Sichtung des Heilungsprozesses. Eine Osteosynthese-Instabilität geht, wie in Kap. 5.1.2 beschrieben, mit einem schlechteren Heilungsprozess der Fraktur einher. Weit auseinanderstehende, nicht-parallele Knochenenden und / eine Minderperfusion durch fehlende oder unzureichende Einsprossung von Kapillaren können zur Ausbildung eines minderwertigen Gewebes mit geringerer Festigkeit führen. Im schlechtesten Fall bildet sich eine zentrale Nekrose im Markraum.

Die Verwendung unterschiedlicher Farbstoffe bei der histologischen Färbung erlaubt die Anfärbung unterschiedlicher Gewebestrukturen und Details (Wiesner und Ribbeck 2000).

Die Toluidinblau-Färbung bietet einen Überblick über das gesamte Gewebe, dessen Strukturen, die Zellverteilung sowie die Kern-Plasma-Relationen (Lang 2006). An dem Längsschnitt in frontaler Ebene eines Rattenfemurs der OV-OSG-Gruppe (s. Abb. 18) lässt sich die Bedeutung einer geraden Ausrichtung des Knochens bei der Einbettung in Technovit®, bzw. beim Schneiden der Knochenblöcke erkennen. Eine Verkippung des Knochens führt zu schrägen Anschnitten mit dem Trenn-Dünnschliff-Tomografen und folglich zur Darstellung verschiedener Schnittebenen und einem verfälschten räumlichen Eindruck. Das ist in der Abbildung am Anschnitt der Hinterwand des Röhrenknochens erkennbar. Abgesehen von diesem Artefakt sind die Längsschnitte in frontaler Ebene des Rattenfemurs in der OV-OPG- und OV+OPG-Gruppe vergleichbar (s. Abb. 18 und 25). Nach dem histologischen Bild befanden sich beide Femura in der Granulations-

phase (3. Phase der sekundären Frakturheilung), was dem zeitlichen Ablauf der physiologischen Knochenheilung der Ratte vier Wochen nach dem Frakturereignis entspricht (Einhorn 1991; Hadjiargyrou et al. 2002).

Die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung gilt als Standardfärbung zur Darstellung der Knochenmorphometrie, da neben der Darstellung einzelner Zellen die mineralisierte und nicht-mineralisierte Knochenmatrix farblich klar gegen Kollagenfibrillen, Epithelgewebe und Muskelgewebe abgegrenzt werden kann (Romeis 1989; Lang 2006). In der vorliegenden Studie wurden zwei Schnitten der OV+OPG-Gruppe analysiert. Die Längsschnitte in frontaler Ebene der Rattenfemura zeigen die Frühphase der Granulationsphase (s. Abb. 30 und 35). In Abb. 30 ist noch der Faserknorpel zu sehen, der während der Knochenheilung durch die Einwanderung von aktivierten Osteoblasten allmählich verknöchert.

Für ein weiteres Versuchsvorhaben ist die histologische Untersuchung aller Knochenblöcke zur Evaluation der Gewebeheilung auf zellulärer Ebene dringend anzuraten, um über den Vergleich der Untersuchungsgruppen die Aussagekraft der Befunde zu erhöhen.

5.1.6 Limitationen des Versuchsaufbaus

Der bedeutendste imitierende Faktor dieser experimentellen Studie ist die geringe Anzahl an Versuchstieren. Von ursprünglich 30 Tieren (n = 10 pro Versuchsgruppe) verstarben neun Tiere im Versuchszeitraums. Die verbleibende Versuchsgruppengröße von sieben Ratten in der OV-OPG-Gruppe und jeweils acht Ratten in der OV+OPG-Gruppe und Kontrollgruppe macht eine valide statistische Erhebung kaum möglich. Da es sich bei dieser Studie um eine Pilotstudie handelte, sollen Analysen mit einer höheren Gruppenbesetzung (mindestens 40 Ratten pro Versuchsgruppe) folgen, um die Aussagekraft der Befunde hinsichtlich der OPG-Wirksamkeit zu erhöhen. Weiter war der Versuchszeitraum von vier Wochen eng bemessen, da bei der physiologischen Knochenheilung der Ratte zu diesem Zeitpunkt erst die Granulationsphase beendet ist (Einhorn 1991). Die Frakturenden sind in diesem Stadium teils durch Bindegewebe teils durch Knochen miteinander verbunden. Dieser weiche Kallus wird durch Mineralisation ausgehärtet und der entstandene Geflechtknochen nach und nach durch Lamellenknochen ersetzt (Ashhurst et al. 1982; Yasui et al. 1997; Utvag und Reikeras 1998; Schmidmaier et al. 2004). Nach ca. 84 Tagen gilt die Frakturheilung mit dem Kallusremodeling als abgeschlossen (Hadjiargyrou et al. 2002; Schmidmaier et al. 2004). Eine längere Laufzeit, idealerweise von zwölf Wochen, würde die Aussagekraft der Befunde zusätzlich stärken.

Wie in Kap. 5.1.4 beschrieben, sollten zukünftige Forschungsvorhaben weitere Versuchsgruppen inkludieren. Ein Vergleich von nicht-ovarektomierte Ratten mit und ohne OPG-Gabe könnte die Fragestellung adressieren, ob die lokale OPG-Gabe in den Frakturspalt im nicht-osteoporotischen Knochen die Knochenheilung fördert.

Zudem wäre in zukünftigen Studien die Durchführung einer BMD-Bestimmung vor Versuchsbeginn sinnvoll, um die osteoporotische Induktion des Knochens durch Hormonmangel zu belegen. Mithilfe von Ausgangsdaten der pQCT-Parameter ließe sich der postoperative Zuwachs zudem besser beurteilen.

Die regelmäßige Durchführung von intra- und postoperative Kontroll-Röntgenuntersuchungen zur Überprüfung der regelrechten Lage des Fixateur externe und Vermeidung von Fehlstellungen, waren durch die örtlichen Gegebenheiten des Tierstalls limitiert.

5.2 Einfluss von OPG auf das Knochenwachstum und den Heilungsprozess

Der regulierende Einfluss des RANK/RANKL/OPG-Systems auf die postmenopausäre Osteoporose wurde durch zahlreiche Studien belegt (Takahashi et al. 1988; Simonet et al. 1997; Bucay et al. 1998; Kostenuik et al. 2001; Flick et al. 2003; s. Kap. 1.2.2). Der humane monoklonale RANKL-Antikörper AMG-162 Denosumab (Handelsname Prolia®) bindet mit hoher Affinität an RANKL und hemmt so die Ausreifung, die Aktivierung und das Überleben der Osteoklasten und folglich die Knochenresorption (s. Kap. 1.3.4; Brown et al. 2009; Kendler et al. 2010). In der vorliegenden Studie wurde die Wirksamkeit einer lokalen OPG-Applikation in den Frakturspalt untersucht. OPG bindet ebenfalls an RANKL und unterbindet so dessen Effekt auf Osteoklasten.

Anhand der vorliegenden pQCT-Befunde entsteht der Eindruck, dass OPG bei einer Osteoporose die Knochenfläche und die Knochenmasse, nicht jedoch die BMD erhöhen kann (s. Kap. 5.1.4). Nach OPG-Gabe wären höhere Werte bei allen pQCT-Variablen zu erwarten gewesen. Die höheren Werte in der trabekulären BMD insbesondere im Frakturspalt (ROI II) in der OV+OPG-Gruppe könnten jedoch für eine OPG-Wirkung sprechen, da der trabekuläre Knochen schneller auf Änderungen des Knochenstoffwechsels reagiert, die möglicherweise bereits nach vier Wochen nachweisbar sind. Es ist davon auszugehen, dass durch eine Erhöhung der Anzahl an Versuchstieren sowie einer Verlängerung des Versuchszeitraums mit den angewandten Methoden die OPG-Wirksamkeit besser zu beurteilen ist.

Die in der radiologischen Auswertung beobachteten Wachstumsprozesse ließen sich in der Histologie unter Berücksichtigung der Limitierung dieser Studie (s. Kap. 5.1.6) bestätigen. Die histologische Analyse der Frakturheilung im osteoporotischen Knochen hatte aber einen rein explorativen Charakter und bildete den Heilungsprozess nur grob ab.

In einem frontalen Längsschnitt eines Rattenfemurs der OV+OPG-Gruppe (Abb. 35, wenige Stunden bis Tage nach der OP) war das Spongostan[®] mit seiner wabigen Struktur noch gut erhalten. Es ließen sich eine Vielzahl an hämatopoetischen Stammzellen, Erythrozyten und Monozyten sowie Gefäßanschnitte erkennen, die ein postoperatives Frakturhämatom kennzeichnen. Das Hämatom wird während der Entzündungsphase (2. Phase der Frakturheilung) durch Zellinfiltration, Zelldifferenzierung und Angiogenese zersetzt und umgebaut. In den Schnittbildern der anderen drei Tiere, die drei Wochen bzw. vier Wochen überlebt hatten, war das Spongostan[®] sichtbar abgebaut (s. Abb. 18, 25 und 30). Beim Einwachsverhalten des Spongostans[®] bestanden zwischen der OV-OPG- und OV+OPG-Gruppe keine Unterschiede.

In einem frontalen Längsschnitt eines Rattenfemurs der OV+OPG-Gruppe (Abb. 30, 3 Wochen nach der OP) war der Faserknorpel im Frakturspalt deutlich zu sehen. Seine Entstehung ließ sich zeitlich in die Frühphase der Granulationsphase (3. Phase der Frakturheilung) einordnen. Neben knorpelbildenden Zellen der Chondrogenese (Osteochondroblasten, Osteochondrozyten) waren einsprossende Kapillaren und Osteoblasten zu erkennen. Diese führen allmählich zur Durchbauung des Faserknorpels mit primärem Knochengewebe und zu dessen Aushärtung durch Mineralisierung.

In den frontalen Längsschnitten von Rattenfemura der OV-OPG- und OV+OPG-Gruppe (Abb. 18 und 25) war das Stadium des Heilungsprozesses vergleichbar. In beiden Fällen zeigte der histologische Befund die späte Granulationsphase (3. Phase der sekundären Frakturheilung), was sich mit dem physiologischen Ablauf bei der Knochenheilung der Ratte nach vier Wochen deckt (Einhorn 1991; Hadjiargyrou et al. 2002). Erkennbar waren eine ausgeprägte Zellmigration von Zellen der Osteogenese (Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten) sowie zahlreiche Blutgefäße. Die Durchbauung des Faserknorpels war deutlich vorangeschritten; Knorpelinseln kamen nur noch vereinzelt vor. Durch die Färbemethoden konnten aktive Osteoblasten mit dem sezernierten Osteoid ebenso dargestellt werden wie bereits kalzifiziertes mineralisiertes Knochengewebe. Die Durchbauung des Faserknorpels mit Osteoid hin zum Geflechtknochen beginnt diaphysär ausgehend vom Periost. Bei der "primären Kallusreaktion" kommt es zur Ausbildung von Knochenspangen, die die Frakturenden miteinander verbinden. Die Spangen traten in beiden Versuchsgruppen gleichermaßen auf, waren jedoch dem Versuchszeitraum entsprechend noch nicht voll ausgebildet und mineralisiert. Das Vorhandensein von Osteoklasten ließ auf den Abbau toter, nicht durchbluteter Knochensubstanz schließen. In den beiden Versuchsgruppen (OV-OPG- und OV+OPG-Gruppe) traten vier Wochen postoperativ gleichermaßen Gefäßbildungen auf. Zudem waren bei keinem Tier Nekrosen im Frakturspalt oder im einwachsenden Knochen erkennbar.

5.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Studie wurde erstmalig die Wirksamkeit einer lokalen OPG-Applikation auf die Frakturheilung untersucht. Die Studie diente zusätzlich als Pilotstudie zur Überprüfung der Eignung der Methodik für nachfolgende Versuche.

Zusammenfassend haben sich die verwendeten Methoden und Modelle bewährt. Dies galt sowohl für die eingesetzten Ratten (Wistar-Hannover) als auch für das Frakturmodell (Femurfraktur mit intraoperative Anlage des externen Fixateurs) und für die Platzierung des Spongostans® in den Osteotomiespalt. Die Ratten zeigten gegenüber der Osteosynthese eine gute Akzeptanz. Eine Verschiebung der Frakturenden aufgrund ungenügender Fixierung trat in lediglich 10 % der Fälle auf. Mit den angewandten radiologischen Untersuchungstechniken (Nativ-Röntgen, µCT, pQCT) sowie den histologischen Untersuchungstechniken (Trenn-Dünnschliff-Methode sowie Toluidinblau und Masson-Goldner-Trichrom-Färbung) konnten post mortem die Wachstums-/Heilungsprozesse in den Frakturbereichen umfassend analysiert werden. Die sich gegenseitig ergänzenden Verfahren ermöglichten eine Analyse auf mehreren Ebenen. Mittels der Nativ-Röntgenuntersuchung konnte eine fehlerhafte Anlage der Osteosynthese (z. B. Pin-Fehlstehlunge), die über Weichteilverletzungen und / oder Instabilitäten den Heilungsprozess potentiell beeinträchtigen, detektiert werden. Durch regelmäßige intra- und postoperative Kontroll-Röntgenuntersuchungen ließe sich eine Fehlstellung des Fixateur externe früher detektieren und ggf. korrigieren. Die hochauflösenden µCT-Aufnahmen stellten das Gewebe im Frakturspalt detaillierter dar. Zur Spezifizierung des Gewebes im Fraktur-

spalt erfolgte eine histologische Analyse sowie eine Analyse des Knochenmaterials mittels pQCT-Messungen. Die pQCT kann zwischen kortikalem und trabekulärem Knochen unterscheiden. Da der trabekuläre Knochen aufgrund seiner größeren Fläche schneller auf Änderungen des Knochenstoffwechsels reagiert als der kortikale Knochen, kann die pQCT früher und mit einer höheren Sensitivität einen Knochenabbau oder -neubildung nachweisen. Die vorliegenden pQCT-Befunde vermitteln den Eindruck, dass OPG bei Osteoporose die Knochenfläche und die Knochenmasse, nicht jedoch die BMD erhöhen kann. Bei der Interpretation der Befunde ist jedoch die geringe Subgruppenbesetzung sowie der enge Versuchszeitraum von vier Wochen zu berücksichtigen. Die in der radiologischen Auswertung beobachteten Wachstumsprozesse ließen sich in der Histologie bestätigen. Die histologischen Befunde bildeten die zeitliche Abfolge einer physiologischen Frakturheilung ab. Die Eignung des Spongostans[®] als Trägermatrix war an der Zellinfiltration, Zelldifferenzierung und Angiogenese im Frakturspalt mit einer Durchbauung und einem Abbau des Trägermaterials erkennbar. Eine vom Periost ausgehende Bildung von Knochengewebe war an der Kallusbildung in Form von Knochenspangen, die die Frakturenden überbrücken erkennbar. Nekrosen traten nicht auf.

Die vorliegende Studie bildet die Grundlage für weitere Analysen im Rahmen der Alterstraumatologie. Eine schnelle Frakturheilung durch knochenschonende Stabilisierungsverfahren (z. B. Fixateur externe) und die Knochenheilung fördernde Medikamente (z. B. OPG) tragen zu einer schnelleren Remobilisierung und damit zu einer reduzierten postoperativen Mortalität bei. In dem Hauptversuch, der dieser Pilotstudie nachfolgen soll, ist eine höhere Anzahl an Versuchstieren mit einer größeren Subgruppenbesetzung geplant.

Für valide Aussagen bezüglich der OPG-Wirksamkeit wären zudem Studien mit erweiterten Beobachtungszeiträumen sinnvoll. Zudem ist die Freisetzungskinetik und die Verfügbarkeit von OPG bei lokaler Gabe im Frakturspalt sowie die Auswirkung unterschiedlicher Dosen von OPG bisher kaum untersucht. Weiter wäre in zukünftigen Forschungsvorhaben der Vergleich von nicht-ovarektomierten Ratten mit und ohne OPG-Gabe sinnvoll, um die Effekte einer lokalen OPG-Gabe im nicht-osteoporotischen Knochen zu analysieren.

6 Zusammenfassung

Die Osteoporose gehört aufgrund ihrer Häufigkeit weltweit zu den Volkskrankheiten. Durch den Anstieg der Lebenserwartung wird die Inzidenz der Osteoporose und damit der Osteoporose-bedingten Frakturen in den kommenden Jahren weiter ansteigen. Daher zählt die Verbesserung der Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose zu den medizinischen Herausforderungen des 21. Jahrhunderts.

In der vorliegenden Studie wurde erstmals der Effekt einer lokalen Applikation von Osteoprotegerin (OPG) in den Knochenspalt bei der Frakturheilung im Modell der osteoporotischen Ratte (Wistar-Hannover) untersucht. Die Studie diente zusätzlich als Pilotstudie zur Überprüfung der Eignung der Methodik für den nachfolgenden Hauptversuch. Eingeschlossen wurden drei Versuchsgruppen (ovarektomierte Ratten ohne OPG (OV-OPG), ovarektomierte Ratten mit OPG (OV+OPG), nicht-ovarektomierte Ratten ohne OPG (Kontrollgruppe), jeweils n = 10). Den Ratten wurde im rechten Femur ein Osteotomiespalt (1 mm) gesetzt, in den das OPG über eine Trägermatrix (Spongostan[®]) implantiert wurde. Als Osteosynthese diente ein Fixateur externe. Nach vier Wochen wurden die Tiere euthanasiert. Die Frakturbereiche wurden post mortem mittels peripherer quantitativer Computertomografie (pQCT), bildgebenden Verfahren (Nativ-Röntgen, Mikro-Computertomografie (μ CT) und histologischer (Toluidinblau-, Masson-Goldner-Trichrom-Färbung) Verfahren analysiert.

Die Anlage des Fixateur externe und die Platzierung des Spongostans[®] in den Osteotomiespalt verlief problemlos. Die mehrheitlich bei ovarektomierten Rattten auftretenden Narkoseprobleme ließen sich am ehesten auf eine langsamere Verstoffwechselung der i. m. applizierten Narkoemedikamente bei höherem Körperfettanteil zurückführen. Ein bei 10 % der Tiere auftretender Versatz der Femurenden unterstreicht die Wichtigkeit von regelmäßigen Röntgenkontrollen der regelrechten Lage des Fixateur externe. Die hochauflösenden 3D µCT-Aufnahmen stellten das Gewebe im Frakturspalt detailliert dar. Eine deutlichere Durchbauung des Spongostans[®] und eine Ausbildung von Knochenspangen kennzeichneten die bessere Knochenwundheilung in der OV+OPG-Gruppe. Die pQCT-Befunde deuten an, dass OPG bei der Osteoporose die Knochenfläche und Knochenmasse, nicht jedoch die Knochendichte erhöht. Die histologische Analyse bestätigte die µCT-Befunde und erlaubte einen detaillierten Einblick in die Geschehnisse im Knochenspalt (Zellinfiltration, Angiogenese, Durchbau des Spongostans[®], Bildung von Knochengewebe und Knochenspangen, fehlende Nekrosen). Die geringe Subgruppenbesetzung sowie der enge Versuchszeitraum von vier Wochen limitierte die Aussagekraft der Pilotstudie. Vermutlich lassen sich die Aussagen zur Wirksamkeit des OPG in der geplanten Hauptstudie durch eine Erhöhung der Versuchstierzahl sowie einer Verlängerung des Versuchszeitraums validieren.

6.1 Summary

Osteoporosis belongs to the worldwide endemic diseases caused by the sheer number of incidences. Due to the increase of life expectancy, the occurrence of Osteoporosis and therefore the osteoporosis induced fractures will increase within the following years. Consequently, the improvement of the prophylaxis, diagnostic and therapy of Osteoporosis belongs to the medical challenges of the 21st century.

The outlined study examines for the first time the effect of a local application of Osteoprotegerin (OPG) into the fracture gap during fracture healing using the model of osteoporotic rats (Wistar-Hannover). Supplementary, the experiment serves as a pilot study to verify the suitability of the method being used of the following main attempt. Three attempt groups had been included (ovariectomized rats without OPG (OV-OPG), ovariectomized rats with OPG (OV+OPG), non-ovariectomized rats without OPG (controlgroup), each n = 10). The rats had been given an osteotomic gap within the right femur (1mm), in which the OPG was implanted using a carrier matrix (Spongostan®). An external fixator was used as osteosynthesis. After four weeks the rats had been euthanized. Post mortem the fracture areas had been analyzed by using quantitative computerized tomography (pQCT), imaging procedures (native x-rays, micro-computertomographie (μ CT) as well as histological procedures (Toluidinblue-, Masson-Goldner-Trichrom-coloration).

The plantation of the external fixator and the placing of the Spongostan® within the osteotomic gap were easily installed and conducted without problems. The anaesthesia problems which appeared predominantly by ovariectomized rats, could most likely be traced back to a more slowly metabolism of the i.m. applicated anesthetic drugs referring to higher body fat percentage. An offset of the femoral ends that were found by 10% of the animals underlines the importance of regular x-ray examinations in order to supervise the proper positioning of the external fixator. The highly defined 3D μ CT pictures enhances a detailed view on the fracture gap. A more resilient infiltration of the Spongostan® and a conformation of bone braces caused a better bone healing within the OV+OPG group. The pQCT results imply that OPG by osteoporosis increases the bone surface and bone mass rather than the bone density. The histological analysis certified the μ CT results and allowed an insight view on the proceeding within the bone fracture (cell infiltration, angiogenesis, infiltration of the Spongostan®, formation of bone tissue and bone braces, missing necrosis). The low occupation of sub-groups as well as the short test period of only four weeks limited the validity of the pilot study. Most likely, an increase in the test animal laboratory number as well as the duration of the main experiment will increase the efficiency of the OPG.
7 Literaturverzeichnis

Abrahamsen B, van Staa T, Ariely R, Olson M, Cooper C (2009) Excess mortality following hip fracture: a systematic epidemiological review. Osteoporos Int. 20(10):1633–50.

An YH, Friedman RJ (1998) Animal models in orthopaedic research. Boca Raton: CRC-Press.

Andreassen H, Rungby J, Dahlerup JF, Mosekilde L (1997) Inflammatory bowel disease and osteoporosis. Scand J Gastroenterol 32(12):1247–55.

Antognini JF, Barter L, Carstens E (2005) Overview movement as an index of anesthetic depth in humans and experimental animals. Comp Med. 55(5):413–8.

Aro HT, Chao EY (1993) Bone-healing patterns affected by loading, fracture fragment stability, fracture type, and fracture site compression. Clin Orthop Relat Res. (293):8–17.

Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rülicke T (2001) Optimization of intraperitoneal injection Anesthesia in mice: drugs, dosage, adverse effects, and anesthetic depth. Comp Med 51(5):443–56.

Ashhurst DE, Hogg J, Perren SM (1982) A method for making reproducible experimental fractures of the rabbit tibia. Injur. 14(3):236–42.

Augat P, Margevicius K, Simon J, Wolf S, Suger G, Claes L (1988) Local tissue properties in bone healing: influence of size and stability of the osteotomy gap. J Orthop Res 16(4):475–81.

Bagi CM, DeLeon E, Ammann P, Rizzoli R, Miller SC (1996) Histo-anatomy of the proximal femur in rats: impact of ovariectomy on bone mass, structure, and stiffness. Anat Rec. 245(4):633–44.

Balto K, Müller R, Carrington DC, Dobeck J, Stashenko P (2000) Quantification of periapical bone destruction in mice by micro-computed tomography. J Dent Res. 79(1):35– 40.

Barbe MF, Adiga R, Gordiienko O, Pleshko N, Selzer ME, Krynska B (2014) Micro-computed tomography assessment of vertebral column defects in retinoic acidInduced rat model of myelomeningocele. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 100(6):453–62.

Bartl R (2010) Osteoporose. Prävention, Diagnostik, Therapie. 4. vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme.

Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, Murphy R, Martin SW, Leese PT, Holmes GB, Dunstan CR, DePaoli AM (2004) A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. J Bone Miner Res. 20(12):2275–82.

Bergot C, Laval-Jeantet AM, Hutchinson K, Dautraix I, Caulin F, Genant HK (2001) A comparison of spinal quantitative computed tomography with dual energy X-ray absorptiometry in European women with vertebral and nonvertebral fractures. Calcif Tissue Int. 68(2):74–82.

Bhandari M, Guyatt GH, Tong D, Adili A, Shaughnessy SG (2000) Reamed versus nonreamed intramedullary nailing of lower extremity long bone fractures: a systematic overview and metaanalysis. J Orthop Trauma. 14(1): 2–9.

Bleibler F, Konnopka A, Benzinger P, Rapp K, König HH (2013) The health burden and costs of incident fractures attributable to osteoporosis from 2010 to 2050 in Germany--a demographic simulation model. Osteoporos Int. 24(3):835–47.

Blunt BA, Klauber MR, Barrett-Connor EL, Edelstein SL (1994) Sex differences in bone mineral density in 1653 men and women in the sixth through tenth decades of life: the Rancho Bernardo Study. J Bone Miner Res. 9(9):1333–8.

Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H, Höfler G, Kreipe H, Rintelen H (2004) Pathologie.3. Auflage. München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag.

Bonse U, Busch F (1996) X-ray computed microtomography (microCT) using synchrotron radiation (SR). Prog Biophys Mol Biol. 65(1-2):133–69.

Borah B, Gross GJ, Dufresne TE, Smith TS, Cockman MD, Chmielewski PA, Lundy MW, Hartke JR, Sod EW (2001) Three-dimensional microimaging (MRmicrol and microCT), finite element modeling, and rapid prototyping provide unique insights into bone architecture in osteoporosis. Anat Rec. 265(2):101–10.

Bord S, Horner A, Hembry RM, Reynolds JJ, Compston JE (1996) Production of collagenase by human osteoblasts and osteoclasts in vivo. Bone. 19(1):35–40.

Bousson V, Le Bras A, Roqueplan F, Kang Y, Mitton D, Kolta S, Bergot C, Skalli W, Vicaut E, Kalender W, Engelke K, Laredo JD (2006) Volumetric quantitative computed tomography of the proximal femur: relationships linking geometric and densitometric variables to bone strength. Role for compact bone. Osteoporos Int.17(6): 855–64.

Boutroy S, Bouxsein ML, Munoz F, Delmas PD (2005) In vivo assessment of trabecular bone microarchitecture by high-resolution peripheral quantitative computed tomography. J Clin Endocrinol Metab. 90(12):6508–15.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. Nature. 423(6937):337–42.

Braun MJ, Meta MD, Schneider P, Reiners C (1998) Clinical evaluation of a high-resolution new peripheral quantitative computerized tomography (pQCT) scanner for the bone densitometry at the lower limbs. Phys Med Biol. 43(8):2279–94.

Brenner DJ, Elliston CD (2004) Estimated radiation risks potentially associated with fullbody CT screening. Radiology. 232(3):735–8.

Bröll H, Dambacher MA (1996) Osteoporose: Grundlagen, Diagnostik und Therapiekonzepte. Basel: Karger Verlag.

Brown JP, Prince RL, Deal C, Recker RR, Kiel DP, de Gregorio LH, Hadji P, Hofbauer LC, Alvaro-Gracia JM, Wang H, Austin M, Wagman RB, Newmark R, Libanati C, San Martin J, Bone HG (2009) Comparison of the effect of denosumab and alendronate on BMD and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with low bone mass: a randomized, blinded, phase 3 trial. J Bone Miner Res. 24(1):153–61.

Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS (1998) Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes Dev. 12(9):1260–8.

Budoff MJ, Hamirani YS, Gao YL, Ismaeel H, Flores FR, Child J, Carson S, Nee JN, Mao S (2010) Measurement of thoracic bone mineral density with quantitative CT. Radiology. 257(2):434–40.

Burghardt AJ, Issever AS, Schwartz AV, Davis KA, Masharani U, Majumdar S, Link TM (2010a) High-resolution peripheral quantitative computed tomographic imaging of cortical and trabecular bone microarchitecture in patients with type 2 diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab. 95(11):5045–55.

Burghardt AJ, Kazakia GJ, Ramachandran S, Link TM, Majumdar S (2010b) Age- and gender-related differences in the geometric properties and biomechanical significance of intracortical porosity in the distal radius and tibia. J Bone Miner Res. 25(5):983–93.

Cann CE, Genant HK (1980) Precise measurement of vertebral mineral content using computed tomography. J Comput Assist Tomogr. 4(4):493–500.

Charlesworth TM, Agthe P, Moores A, Anderson DM (2012) The use of haemostatic gelatin sponges in veterinary surgery. J Small Anim Pract. 53(1):51–6.

Claes L, Blakytny R, Göckelmann M, Schoen M, Ignatius A, Willie B (2009) Early dynamization by reduced fixation stiffness does not improve fracture healing in a rat femoral osteotomy model. J Orthop Res. 27(1):22–7.

Claes L, Eckert-Hübner K, Augat P (2003) The fracture gap size influences the local vascularization and tissue differentiation in callus healing. Langenbecks Arch Surg. 388(5):316–22.

Claes L, Augat P, Suger G, Wilke HJ (1997) Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. J Orthop Res. 15(4):577–84.

Claes L, Burri C, Gerngroß H (1980) Biomechanische Messungen zur Stabilität von Tibiafrakturen nach Versorgung mit verschiedenen Fixateur externe Konstruktionen. Biomed Technik. 25(S1):199–201.

Claes L, Burri C, Heckmann G, Rüter A (1979) Biomechanische Untersuchungen zur Stabilität von Tibiaosteosynthesen mit dem Fixateur externe und einer Minimalosteosynthese. Akt Traumatol. 9(4):185–9.

Clark DP, Badea CT (2014) Micro-CT of rodents: State-of-the-art and future perspectives. Phys Med. 30(6):619–34.

Clark EA, Goodship AE, Lanyon LE (1975) Locomotor bone strain as the stimulus for bone's mechanical adaptability. J Physiol. 245(2):57P.

Compston JE, Papapoulos SE, Blanchard F (1998) Report on osteoporosis in the European Community: current status and recommendations for the future. Working Party from European Union Member States. Osteoporos Int. 8(6):531–4.

Consensus development conference (1993) Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. Am J Med. 94(6):646–50.

Cooper C (1999) Epidemiology of osteoporosis. Osteoporos Int. 9 Suppl 2:S2-8.

Cooper C, Campion G, Melton LJ 3rd (1992) Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. Osteoporos Int. 2(6):285–9.

Court-Brown C, Penning D (1997) Tibia & Fibula. Oxford: Butterworth-Heinemann Medical. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A, Kutilek S, Adami S, Zanchetta J, Libanati C, Siddhanti S, Christiansen C; FREEDOM Trial. (2009) Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. N Engl J Med. 361(8):756–65.

Daichendt D (o. J.) Osteoporose Verfügbar unter: http://www.osteoporosezentrum.de/osteoporose-was-ist-osteoporose-informationen-im-osteoporosezentrum-muenchen-frankfurt-berlin-hamburg-stuttgart (Zugriff am zuletzt geprüft 30.12.2020)

Deckardt K, Weber I, Kaspers U, Hellwig J, Tennekes H, van Ravenzwaay B (2007) The effect of inhalation anesthesia on common clinical parameters in laboratory rats. Food Chem Toxicol. 45(9):1709–18.

Delling G, Hahn M, Bonse U, Busch F, Günnewig O, Beckmann F, Uebbing H, Graeff W (1995) Neue Möglichkeiten der Strukturanalyse von Knochenbiopsien bei Anwendung der Mikrocomputertomographie (µCT). Pathologe. 16:342–7.

Delmas PD (1995) Diagnostic procedures for osteoporosis in the elderly. Horm Res. 43(1–3):80–2.

Dempster DW, Birchman R, Xu R, Lindsay R, Shen V (1995) Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. Bone. 16(1):157–61.

Dequeker J, Luyten FP (2001) Bone densitometry is not a good predictor of hip fracture. BMJ. 323(7316):797–9.

Diederichs G, Engelken F, Marshall LM, Peters K, Black DM, Issever AS, Barrett-Connor E, Orwoll E, Hamm B, Link TM; Osteoporotic Fractures in Men Research Group. (2011) Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH): relation to vertebral fractures and bone density. Osteoporos Int. 22(6):1789–97.

Dimai HP, Redlich K, Peretz M, Borgström F, Siebert U, Mahlich J (2012) Economic burden of osteoporotic fractures in Austria. Health Econ Rev. 2(1):12.

Donath K (1988) Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien: Apparate- und Methodenbeschreibung. Wehrheim: EXAKT-Kulzer-Druckschriften.

Duda GN, Sollmann M, Sporrer S, Hoffmann JE, Kassi JP, Khodadadyan C, Raschke M (2002) Interfragmentary motion in tibial osteotomies stabilized with ring fixators. Clin Orthop Relat Res. (396):163–72.

DVO (2017) Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und bei Männern. Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V., 2017 – Langfassung. Verfügbar unter: https://dv-osteologie.org/uploads/Leitlinie%202017/Finale%20Version%20Leitlinie%

20Osteoporose%202017_end.pdf (Zugriff am 04.06.2020)

DVO (2014) Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen. Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V., 2014 – Kurzfassung und Langfassung. Verfügbar unter: http://www.dv-osteologie.org/dvo_leitlinien/osteoporose-leitlinie-2014 (Zugriff am 04.06.2020).

Einhorn TA (1996) The bone organ system: form and function. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J (eds.) Osteoporosis. San Diego: Academic Press, 3–21.

Einhorn T (1991) Mechanisms of fracture healing. Hosp Pract (Off Ed). 26 Suppl 1:41– 5.

Engelke K, Libanati C, Liu Y, Wang H, Austin M, Fuerst T, Stampa B, Timm W, Genant HK (2009) Quantitative computed tomography (QCT) of the forearm using general purpose spiral whole-body CT scanners: accuracy, precision and comparison with dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). Bone. 45(1):110–8.

Engelke K (2002) Quantitative Computertomographie. J Miner Stoffwechs Muskuloskelet Erkrank. 9(4):22–31.

Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W (1999) Mikro-CT Technologie und Applikationen zur Erfassung von Knochenarchitektur. Radiologe. 39:203–12.

Faulkner KG, von Stetten E, Miller P (1999) Discordance in patient classification using T-scores. J Clin Densitom. 2(3):343–50.

Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G Kleerekoper M (1989) The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. J Bone Miner Res. 4(1):3–11.

Felsenberg D, Gowin W (1999) Knochendichtemessung mit Zwei-Spektren-Methoden. Radiologe 39:186–93.

Flannery BP, Deckman HW, Roberge WG, D'Amico KL (1987) Three-Dimensional Xray Microtomography. Science 237(4821):1439–44.

Flecknell P (2009) Laboratory animal anesthesia. 3. Aufl. Amsterdam: Elsevier.

Flecknell PA. Richardson CA, Popovic A (2007) Laboratory Animals. In: Tranquille WJ, Thurmon JC, Grimm KA (eds.) Lumb & Jones Veterinary anesthesia and analgesia. 4. Aufl. Ames (Iowa, USA): Blackwell Publishing, 765–84.

Flecknell PA (1993) Anesthesia of animals for biomedical research. Br J Anaesth. 71(6):885–94.

Flick LM, Weaver JM, Ulrich-Vinther M, Abuzzahab F, Zhang X, Dougall WC, Anderson D, O'Keefe RJ, Schwarz EM (2003) Effects of receptor activator of NFκB (RANK) signaling blockade on fracture healing. J Orthop Res. 21(4):676–84.

Flohr T, Stierstorfer K, Bruder H, Simon J, Schaller S (2002) New technical developments in multislice CT--Part 1: Approaching isotropic resolution with sub-millimeter 16slice scanning. RoFo. 174(7): 839–45.

Franke J, Clarenz P, Dören M, Franck H, Keck E, Kruse HP, Schmidt-Gayk H, Seibel M, Werner E (1996) Bericht der interdisziplinären Leitlinienkommission zur Diagnostik der Osteoporose. Osteologie. 5(3):162–73.

Freeman TA, Patel P, Parvizi J, Antoci V Jr, Shapiro IM (2009) Micro-CT analysis with multiple thresholds allows detection of bone formation and resorption during ultrasound-treated fracture healing. J Orthop Res. 27(5):673–9.

Fujita T (1997) Osteoporosis: past, present and future. Osteoporos Int. 7 Suppl 3:S6-9.

Gao Y, Luo E, Hu J, Xue J, Zhu S, Li J (2009) Effect of combined local treatment with zoledronic acid and basic fibroblast growth factor on implant fixation in ovariectomized rats. Bone. 44(2):225–32.

Genant HK, Guglielmi G, Jergas M (1998) Bone Densitometry and Osteoporosis. Berlin, Heidelberg: Springer.

Genant HK, Boyd D (1977) Quantitative bone mineral analysis using dual energy computed tomography. Invest Radiol. 12(6):545–51.

Glüer CC, Blake G, Lu Y, Blunt BA, Jergas M, Genant HK (1995) Accurate assessment of precision errors: how to measure the reproducibility of bone densitometry techniques. Osteoporos Int. 5(4):262–70.

Glüer CC, Genant HK (1989) Impact of marrow fat on accuracy of quantitative CT. J Comput Assist Tomogr. 13(6):1023–35. Goodship AE, Watkins PE, Rigby HS, Kenwright J (1993) The role of fixator frame stiffness in the control of fracture healing. An experimental study. J Biomech. 26(9):1027–35.

Goodship AE, Kenwright J (1985) The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. J Bone Joint Surg Br. 67(4):650–5.

Goodsitt MM, Johnson RH, Chesnut CH 3rd (1991) A new set of calibration standards for estimating the fat and mineral content of vertebrae via dual energy QCT. Bone Miner. 13(3):217–33.

Grampp S, Henk CB, Imhof H (1999) Bone densitometry: comparative value and limitations of different techniques. Wien Med Wochenschr. 149(16-17):472–8.

Grampp S, Genant HK, Mathur A, Lang P, Jergas M, Takada M, Glüer CC, Chavez M (1997) Comparisons of noninvasive bone mineral measurements in assessing age-related loss, fracture discrimination, and diagnostic classification. J Bone Miner Res. 12(5):697–711.

Grifka J, Kuster M (2011) Orthopädie und Unfallchirurgie. Berlin, Heidelberg: Springer.

Guglielmi G, van Kuijk C, Li J, Meta MD, Scillitani A, Lang TF (2006) Influence of anthropometric parameters and bone size on bone mineral density using volumetric quantitative computed tomography and dual X-ray absorptiometry at the hip. Acta Radiol. 47(6):574–80.

Guglielmi G, Lang TF (2002) Quantitative computed tomography. Sem Musculoskelet Radiol. 6(3):219–27.

Gullberg B, Johnell O, Kanis JA (1997) World-wide projections for hip fracture. Osteoporos Int. 7(5):407–13.

GV-SOLAS (2017) Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GVSOLAS und Arbeitskreis 4 in der TVT. Empfehlung zur Substanzapplikation bei Versuchstieren; Verfügbar unter: http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publikation/Tierschutzbeauftragte/2017Fachinformation_Injektionsvolumina.pdf (Zugriff am 04.06.2020)

Haberkamp M, Allolio B (1992) Indikationen zur Knochendichtemessung. Med Klinik. 87(3):131–8.

Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, Steinle T, Verheyen F, Linder R (2013) The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. Dtsch Arztebl Int. 110(4):52–7.

Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, Ahrens W, Joo J, Ahn H, Jurman M, White DW, Rubin CT (2002) Transcriptional profiling of bone regeneration: Insight into the molecular complexity of wound repair. J Biol Chem. 277(33):30177–82.

Haentjens P, Magaziner J, Colón-Emeric CS, Vanderschueren D, Milisen K, Velkeniers B, Boonen S (2010) Meta-analysis: excess mortality after hip fracture among older women and men. Ann Intern Med. 152(6):380–90.

Hahn A (2016) Ernährung und Osteoporose – Bedeutung von Calcium und Vitamin D. Verfügbar unter: https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/daz-az/2005/daz-15-2005/uid-13782 (Zugriff am 16.05.2021)

Häussler B, Gothe H, Gol D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D (2007) Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. Osteoporos Int. 18(1):77–84.

Harrison LJ, Cunningham JL, Strömberg L, Goodship AE (2003) Controlled induction of a pseudarthrosis: a study using a rodent model. J Orthop Trauma. 2003 17(1):11–21.

Henke J, Erhardt W (2012) Nager. In: Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, Baumgartner C, Tacke S. Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen. Stuttgart: Schattauer Verlag, 703–25.

Henke J, Tacke S, Erhardt W (2012) Analgesie. In: Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, Baumgartner C, Tacke S. Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen. Stuttgart: Schattauer Verlag, 383–433.

Hernlund E, Svedbom A, Ivergard M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA (2013) Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). Arch Osteoporos. 8(1):136.

Herold G (2017) Innere Medizin. Köln: Gerd Herold Verlag.

Hock JM, Canalis E, Centrella M (1990) Transforming growth factor-beta stimulates bone matrix apposition and bone cell replication in cultured fetal rat calvariae. Endocrinology 126(1):421–6.

Hoerauf K, Lierz M, Wiesner G, Schroegendorfer K, Lierz P, Spacek A, Brunnberg L, Nüsse M (1999) Genetic damage in operating room personal exposed to isoflurane and nitrous oxide. Occup Environ Med. 56(7):433–7. Hofbauer LC, Schoppet M (2004) Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. JAMA. 292(4):490–5.

Hu C, Flecknell PA, Liles JH (1992) Fentanyl and medetomidine anaesthesia in the rat and its reversal using atipamazole and either nalbuphine or butorphanol. Lab Anim. 26(1):15–22.

Ignatoski KM, Escara-Wilke JF, Dai JL, Lui A, Dougall W, Daignault S, Yao Z, Zhang J, Day ML, Sargent EE, Keller ET (2008) RANKL inhibition is an effective adjuvant for docetaxel in a prostate cancer bone metastases model. Prostate. 68(8):820–9.

Ioannidis G, Papaioannou A, Hopman WM, Akhtar-Danesh N, Anastassiades T, Pickard L, Kennedy CC, Prior JC, Olszynski WP, Davison KS, Goltzman D, Thabane L, Gafni A, Papadimitropoulos EA, Brown JP, Josse RG, Hanley DA, Adachi JD (2009) Relation between fractures and mortality: results from the Canadian Multicentre Osteoporosis Study. CMAJ. 181(5):265–71.

Ismail AA, O'Neill TW, Cooper C, Finn JD, Bhalla AK, Cannata JB, Delmas P, Falch JA, Felsch B, Hoszowski K, Johnell O, Diaz-Lopez JB, Lopez Vaz A, Marchand F, Raspe H, Reid DM, Todd C, Weber K, Woolf A, Reeve J, Silman AJ (1998) Mortality associated with vertebral deformity in men and women: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). Osteoporos Int. 8(3):291–7.

Ito M, Nakamura T, Matsumoto T, Tsurusaki K, Hayashi K (1998) Analysis of trabecular microarchitecture of human iliac bone using microcomputed tomography in patients with hip arthrosis with or without vertebral fracture. Bone. 23(2):163–9.

Ito M, Hayashi K, Ishida Y, Uetani M, Yamada M, Ohki M, Nakamura T (1997) Discrimination of spinal fracture with various bone mineral measurements. Calcif Tissue Int 60(1):11–5.

Jamsa T, Jalovaara P, Peng Z, Vaananen HK, Tuukkanen J (1998) Comparison of threepoint bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. Bone. 23(2):155–61.

Jang HS, Choi HS, Sung H. LH, Jang K, Lee MG (2009) Evaluation of the anaesthetic effects of medetomidin and ketamin in rats and their reversal with atipamezole. Vet Anaesth Analg. 36(4):319–27.

Johnell O, Kanis JA, Odén A, Sernbo I, Redlund-Johnell I, Petterson C, De Laet C, Jönsson B (2004) Mortality after osteoporotic fractures. Osteoporos Int. 15(1):38–42. Johnell O, Kanis J (2005) Epidemiology of osteoporotic fractures. Osteoporos Int. 16 Suppl 2:S3-S7.

Johnson & Johnson Medical (o. J.) Packungsbeilage Spongostan®; Verfügbar unter: https://www.jnjmedicaldevices.com/de-DE/product/spongostan-standard-resorbierbaregelatine-zur-blutstillung; (Zugriff am 16.05.2021)

Kalender WA (2005) Computed tomography. Fundamentals, system technology, image quality, applications. 2. Aufl. Erlangen: Publicis.

Kalender WA, Suess C (1987) A new calibration phantom for quantitative computed tomography. Med Phys. 14(5):863–6.

Kanis JA, Oden A, Johnell O, De Laet C, Jonsson B, Oglesby AK (2003) The components of excess mortality after hip fracture. Bone. 32(5):468–73.

Kanis JA (1997) Bone density measurements and osteoporosis. J Intern Med. 241(3):173–5.

Kanis JA (1994) Assessment of osteoporosis at the primary health-care level. WHO Scientific Group Technicla Report. Verfügbar unter: https://www.sheffield.ac.uk/FRAX/pdfs/WHO_Technical_Report.pdf (Zugriff am 16.05.2021)

Karibiyik L, Sardas S, Polat U, Kocabas NA, Karakaya AE (2001) Comparison of sevofluran and isofluran in human lymphocytes studied in vivo using the comet assay. Mutat Res. 492(1–2):99–107.

Kendler DL, Roux C, Benhamou CL, Brown JP, Lillestol M, Siddhanti S, Man HS, San Martin J, Bone HG (2010) Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women transitioning from alendronate therapy. J Bone Miner Res. 25(1):72–81.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. Cell. 89(5):755–64.

Konrads C, Giebel G (2012) Grundlagen der Frakturheilung und Bedeutung für die Osteosynthese. CHAZ. 13(9):468–70.

Kos M, Staniszewska-Kuś J, Matusiewicz M, Łuczak K, Klempous R, Pielka S (2003) Tissue reaction after implantation of Spongostan, as the carrier of xenogenic bone morphogenetic protein. Experimental study. Polim Med. 33(1–2):25–33. Kostenuik PJ, Capparelli C, Morony S, Adamu S, Shimamoto G, Shen V, Lacey DL, Dunstan CR (2001) OPG and PTH-(1-34) have additive effects on bone density and mechanical strength in osteopenic ovariectomized rats. Endocrinology. 142(10):4295–304.

Seibel MJ, Kraenzlin ME (1995) Osteoporose: Moderne Diagnostik – therapeutische Konsequenzen für Klinik und Praxis. Basel: Karger Verlag

Krestan C, Gruber M (2013) Quantitative Computertomographie (QCT). J Mineralstoffwechs Muskuloskelet Erkrank. 20(2):59–65.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell. 93(2):165–76.

Lang G (2006) Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. Wien: Springer.

Lang TF, Li J, Harris ST, Genant HK (1999) Assessment of vertebral bone mineral density using volumetric quantitative CT. J Comput Assist Tomogr. 23(1):130–7.

Langnickel R, Salenbauch N, Hörnle S, Jung A (1978) Investigations on the quantitative resorption of three gelatin sponge preparations in the bulla of guinea pigs (author's transl). Arch Otorhinolaryngol. 221(4):243–54.

Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliot R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan SC, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ (2000) RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A. 97(4):1566–71.

Light RU, Prentice HR (1945) Surgical investigation of a new absorbable sponge derived from gelatine for use in haemostasis. J Neurosurg. 2:435–55.

Link TM, Vieth V, Stehling C, Lotter A, Beer A, Newitt D, Majumdar S (2003) High-resolution MRI vs multislice spiral CT: which technique depicts the trabecular bone structure best? Eur Radiol. 13(4):663–71.

Link L, Zwaan M, Weiss HD, Borgis KH, Bätge B (1993) The initial results of lumbar dualenergy x-ray absorptiometry (DEXA) compared to double-energy quantitative computed tomography (DE-QCT). Rofo. 158(5):475–8. Lips P, van Schoor NM (2005) Quality of life in patients with osteoporosis. Osteoporos Int.16(5):447–55.

Littenberg B, Weinstein LP, McCarren M, Mead T, Swiontkowski MF, Rudicel SA, Heck D (1998) Closed fractures of the tibial shaft. A meta-analysis of three methods of treatment. J Bone Joint Surg Am. 80(2):174–83.

Longley LA (2008) Anesthesia of exotic pets. 1. Aufl. Philadeplhia: Elsevier Saunders.

Löscher W (2010) Pharmaka mit Wirkung auf das Zentralnervensystem. In: Löscher W, Ungemach FR, Kroker R (Hrsg.) Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. 8. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag, 64–133.

Lukasik VM, Gillies RJ (2003) Animal anesthesia for in vivo magnetic resonance. NMR Biomed. 16(8):459–67.

Mark H, Bergholm J, Nilsson A, Rydevik B, Strömberg L (2003) An external fixation method and device to study fracture healing in rats. Acta Orthop Scand. 74(4):476–82.

Markel MD, Sielman E, Rapoff AJ, Kohles SS (1994) Mechanical properties of long bones in dogs. Am J Vet Res. 55(8):1178–83.

Marshall D, Johnell O, Wedel H (1996) Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. BMJ. 312(7041):1254–9.

Mazess RB, Gallagher JC, Notelovitz M, Schiff I, Utian W (1989) Monitoring skeletal response to estrogen. Am J Obstet Gynecol 161(4):843–8.

McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB, Bolognese MA, Woodson GC, Moffett AH, Peacock M, Miller PD, Lederman SN, Chesnut CH, Lain D, Kivitz AJ, Holloway DL, Zhang C, Peterson MC, Bekker PJ, AMG 162 Bone Loss Study Group (2006) Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. N Engl J Med. 354(8):821–31.

McKibbin B (1978) The biology of fracture healing in long bones. J Bone Joint Surg Br. 60-B(2):150–62.

Med Library.com (2013) Das medizinische Nachschlagewerk. Verfügbar unter: https://www.med-library.com/wp-content/uploads/2013/01/Fotolia_29453350_S.jpg (Zu-griff am 12.05.2020)

Meier C, Kraenzlin ME (2013) Osteoporose: Therapie-Update 2013 (Teil 1): Therapieindikationen und praktisches Vorgehen. Swiss Med Forum. 13:811–3. Melton LJ 3rd, Achenbach SJ, Atkinson EJ, Therneau TM, Amin S (2013) Long-term mortality following fractures at different skeletal sites: a population-based cohort study. Osteoporos Int. 24(5):1689–96.

Minne HW, Pfeifer M, Begerow B, Pollähne W (2002) Osteoporosis. Orthopade 31(7)681–97.

Nägele E, Kuhn V, Vogt H, Link TM, Müller R, Lochmüller EM, Eckstein F (2004) Technical considerations for microstructural analysis of human trabecular bone from specimens excised at various skeletal sites. Calcif Tissue Int. 75(1):15–22.

National Cancer Institute SEER Training Modules (o. J.) Compact bone & spongy bone (Cancellous Bone) Verfügbar unter: https://training.seer.cancer.gov/anatomy/skele-tal/tissue.html (Zugriff am 30.05.2021).

Nilas L, Christiansen C (1987) Bone mass and its relationship to age and the menopause. J Clin Endocrin Metab. 65(4):697–702.

Njeh CF, Fuerst T, Hans D, Blake GM, Genant HK (1999) Radiation exposure in bone mineral density assessment. Appl Radiat Isot. 50(1):215–36.

Nordin BE (1987) The definition and diagnosis of osteoporosis. Calcif Tissue Int. 40(2):57–8.

North American Menopause Society (2002) Management of postmenopausal osteoporosis: position statement of the North American Menopause Society. Menopause 9(2):84–101.

Novotec Medical GmbH (2021) Verfügbar unter: https://www.galileo-training.com/dedeutsch/produkte/pqct-knochendichte-geometrie/grundlagen/vorteile-gegenueber-anderen-messmethoden.html (Zugriff am 30.05.2021).

Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A (2015) Bone injury and fracture healing biology. Biomed Environ Sci. 28(1):57–71.

Ott SM, In: Bilezikian et al. (eds). Principles of Bone Biology. Vol.18. San Diego: Academic Press, 231–41.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ (1997) Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. Cell. 89(5):765–71. Paganelli C, Fontana P, Porta F, Majorana A, Pazzaglia UE, Sapelli PL (2006) Indications on suitable scaffold as carrier of stem cells in the alveoloplasty of cleft palate. J Oral Rehabil. 33(8):625–9.

Pandey MP, Schöggl K, Viszelj J, Widhalm K (2011) Body Composition: Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DEXA). JEM. 13(1):32–4.

Patel V, Issever AS, Burghardt A, Laib A, Ries M, Majumdar S (2003) MicroCT evaluation of normal and osteoarthritic bone structure in human knee specimens. J Orthop Res 21(1):6–13.

Pearce A, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG (2007) Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. Eur Cell Mater. 13:1–10.

Pickhardt PJ, Lee LJ, del Rio AM, Lauder T, Bruce RJ, Summers RM, Pooler BD, Binkley N (2011) Simultaneous screening for osteoporosis at CT colonography: bone mineral density assessment using MDCT attenuation techniques compared with the DXA reference standard. J Bone Miner Res. (26):2194–203.

Pietschmann P Peterlik M (1999) Pathophysiologie und Therapie der Osteoporose. Radiologe 39(3):228–34.

Pinkernell R (2010) Untersuchung zum 3-D-Einwachsverhalten von Osteoblasten like cells (MG63) in resorbierbare Gelatine-Schwämme. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

Pollähne W, Minne HW (2001) Epidemiologie, Diagnostik und klinisches Bild der Osteoporose. Bundesgesundheitsbla. 44(1):32–6.

Ponticiello MS, Schinagl RM, Kadiyala S, Barry FP (2000) Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. J Biomed Mater Res. 52(2):246–55.

Reid IR, Miller PD, Brown JP, Kendler DL, Fahrleitner-Pammer A, Valter I, Maasalu K, Bolognese MA, Woodson G, Bone H, Ding B, Wagman RB, San Martin J, Ominsky MS, Dempster DW (2010) Effects of denosumab on bone histomorphometry: the FREEDOM and STAND studies. J Bone Miner Res. 25(10):2256–65.

Revell PA (1983) Histomorphometry of bone. J Clin Pathol. 36(12):1323–31.

Rico H, Revilla M, Villa LF, Alvarez de Buergo M (1993) Age-related differences in total and regional bone mass: a cross-sectional study with DXA in 429 normal women. Osteoporos Int. 3(3):154–9.

Riegels-Nielsen P, Greiff J, Løvgreen Nielsen P (1986) Spongostan used for space obliteration in bone defects. Acta Orthop Belg. 52(1):46–53.

Rodin A, Murby B, Smith MA, Caleffi M, Fentiman I, Chapman MG, Fogelman I (1990) Premenopausal bone loss in the lumbar spine and neck of femur: a study of 225 Caucasian women. Bone 11 (1):1–5.

Romeis B (1989) Mikroskopische Technik. 17. Aufl. München Wien: Urban und Schwarzenberg.

Sato T (2016) Evaluation of World Population-Weighted Effective Dose due to Cosmic Ray Exposure. Sci Rep. 6:33932.

Schatz P (o. J.) A typical long bone shows the gross anatomical characteristics of bone. Anatomy & Physiology. Verfügbar unter: https://philschatz.com/anatomy-book/contents/m46281.html (Zugriff am 02.06.2021)

Schell H, Epari DR, Kassi JP, Bragulla H, Bail HJ, Duda GN (2005) The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability. J Orthop Res. 23(5):1022–8.

Schenk R (1978) Histomorphologische und physiologische Grundlagen des Skeletwachstums. In: Weber BG, Brunner C, Freuler F (eds.) Die Frakturenbehandlung bei Kindern und Jugendlichen. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 3–20.

Schießl H, Frost HM, Jee WS (1998) Estrogen and bone-muscle strength and mass relationships. Bone 22(1):1–6.

Schießl H, Willnecker J (1997) New insights about the relationship between bone strength and muscle strength. Paediatric Osteology, Proceedings of the 2nd International Workshop Cologne, Germany. In: New aspects of bone and muscle diagnostics Verfügbar unter: http://www.vibratech.co.il/_Uploads/dbsAttachedFiles/091.-New-Insights-about-the-Relationship-between-Bone-Strength-and-Muscle-Strength(1).pdf (Zugriff am 12.04.2021).

Schmidmaier G, Wildemann B, Melis, B, Krummrey G. Einhorn A, Haas N, Raschke M (2004) Development and Characterization of a Standard Closed Tibial Fracture Model in the Rat. Eur J Trauma. 30:35–42.

Schmolke B (2001) Labordiagnostik der Osteoporose. Orthopade 30(7):425–36.

Schneider P (2009) The Diagnosis and Treatment of Primary Osteoporosis According to Current Guidelines: Unreliable in the Individual Case. Dtsch Arztebl Int. 106(3):39. Schneider P, Reiners C (1998) Quantitative Bestimmung der Knochenmasse: heutiger Stand und Fallstricke der Methoden. Med Welt. 49:157–63.

Schneider P, Börner W, Rendl J, Eilles C, Schlisske K, Scheubeck M (1992) [Significance of 2 different bone density measurement methods in the assessment of mineral content of the peripheral and axial skeleton]. Z Orthop Ihre Grenzgeb. 130(1):16–21.

Schoen M, Rotter R, Schattner S, Mittlmeier T, Claes L, Vollmar B, Gradl G (2008) Introduction of a new interlocked intramedullary nailing device for stabilization of critically sized femoral defects in the rat: A combined biomechanical and animal experimental study. J Orthop Res. 26(2):184–9.

Schuit SC, van der Klift M, Weel AE, de Laet CEDH, Burger H, Seeman E, Hofman A, Uitterlinden AG, van Leeuwen JPTM, Pols HAP (2004) Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: the Rotterdam Study. Bone. 34(1):195–202. [published correction appears in Bone. 2006, 38(4):603].

Schulte am Esch J, Kochs E, Bause H (2000) Allgemeinanästhesie. In: Schulte am Esch J, Kochs E, Bause H (Hrsg.) Anästhesie und Intensivmedizin. Stuttgart: Thieme, 68–184.

Schulz S (2010) Versuchstierkunde und Tierexperimentelle Methoden (Kursskript). Philipps-Universität Marburg; Tierarzneimittel-Kompendium der Schweiz, Anästhetikum für Nutz-und Heimtiere.

Seeman E, Martin TJ (1989) Non-invasive techniques for the measurement of bone mineral. Baillieres Clin Endocrinol Metab. 3(1):1–33.

Seibel MJ, Kraenzlin ME (1995) Osteoporose: Moderne Diagnostik – therapeutische Konsequenzen für Klinik und Praxis. Basel: Karger Verlag.

Shafer SL, Stanski DR (2008) Defining depth of anesthesia. In: Schüttler J, Schwilden H (Hrsg.) Modern anesthetics. handbook of experimental pharmacology. Vol. 182. Berlin, Heidelberg: Springer, 409–22.

Sharp P, Villano JS (2012) The laboratory rat - experimental methodology. Boca Raton (Florida): CRC press.

Si L, Winzenberg TM, Palmer AJ (2014) A systematic review of models used in costeffectiveness analyses of preventing osteoporotic fractures. Osteoporos Int. 25(1):51– 60. Sievänen H, Koskue V, Rauhio A, Kannus P, Heinonen A, Vuori I (1998) Peripheral quantitative computed tomography in human long bones: evaluation of in vitro and in vivo precision. J Bone Miner Res. 13(5):871–82.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliot R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derbay P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 89(2):309–19.

Smiler KL, Stein S, Hrapkiewicz KL, Hiben JR (1990) Tissue response to intramuscular and intraperitoneal injections of ketamine and xylazine in rats. Lab Anim Sci. 40(1):60–4.

Smith W (1993) Responses of laboratory animals to some injectable anaesthetics. Lab Anim. 27(1):30–9.

Soma LR (1983) Anesthetic and analgesic considerations in the experimental animal. Ann N Y Acad Sci. 406:32–47.

Sommer NG, Hahn D, Okutan B, Marek R, Weinberg AM (2019) Animal Models in Orthopedic Research: The Proper Animal Model to answer Fundamental Questions on Bone Healing Depending on Pathology and Implant Material. In: Tvrdá E, Yenisetti SC (eds.) Animal Models in Medicine and Biology. Verfügbar unter: https://www.intechopen.com/books/animal-models-in-medicine-and-biology/animal-models-in-orthopedicresearch-the-proper-animal-model-to-answer-fundamental-questions-on-bone (Zugriff am 12.04.2021)

Stokes EL, Flecknell PA, Richardson CA (2009) Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. Lab Anim. 43(29:149–54.

Ström O, Borgström F, Kanis JA, Compston J, Cooper C, McCloskey EV, Jönsson B (2011) Osteoporosis: burden, health care provision and opportunities in the EU: a report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). Arch Osteoporos. 6:59–155.

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endocr Rev. 20(3):345–57.

Takada M, Engelke K, Hagiwara S, Grampp S, Genant HK (1996) Accuracy and precision study in vitro for peripheral quantitative computed tomography. Osteoporos Int. 6(3):207–12.

Takahashi N, Ozawa H (2005) [A new treatment for osteoporosis using fully human monoclonal antibody to RANKL, AMG 162]. Clin Calcium. 15(1):43–8.

Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, Martin TJ, Suda T (1988) Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. Endocrinology. 123(5):2600–2.

Toth M, Tulassay, Z (2000) [Glucocorticoid-induced osteoporosis.] Orv Hetil. 141(5):219–23.

Tsukimura N, Yamada M, Aita H, Hori N, Yoshino F, Lee MCI, Kimoto K, Jewett A, Ogawa T (2009) N-acetyl cysteine (NAC)-mediated detoxification and functionalization of poly(methyl methacrylate) bone cement. Biomaterials. 30(20):3378–89.

Ullmann K (2012) Anästhesie und Analgesie im Tierversuch. 6. Leipziger Tierärztekongress; 3:347–9.

UNSCEAR (2001) UNSCEAR 2000 published. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. In: Health Phys. 80(3):291.

Utvag SE, Reikeras O (1998) Effects of nail rigidity on fracture healing. Strength and mineralisation in rat femoral bone. Arch Orthop Trauma Surg. 118(1–2):7–13.

Watts NB (2004) Fundamentals and pitfalls of bone densitometry using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). Osteoporos Int. 15(11):847–54.

WHO Study Group (1994) Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser. 843:1–129.

Wiesner E, Ribbeck R (2000) Lexikon der Veterinärmedizin A–Z. 4. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag.

Williams EA, Rand JA, An KN, Chao EY, Kelly PJ (1987) The early healing of tibial osteotomies stabilized by one-plane or two-plane external fixation. J Bone Joint Surg Am. 69(3):355–65. Willie B, Adkins K, Zheng X, Simon U, Claes L (2009) Mechanical characterization of external fixator stiffness for a rat femoral fracture model. J Orthop Res. 27(5):687–93.

Wixson SK, Smiler KL (1997) Anesthesia and analgesia in rodents. In: Kohn DF, Wixson SK, White WJ, Benson GJ (eds.) Anesthesia und analgesia in laboratory rodents. New York, London: Academic Press, 165–200.

Wixson SK, White WJ, Hughes HC Jr, Marshall WK, Lang CM (1987) The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on noxious stimulus perception in adult male rats. Lab Anim Sci. 37(6):731–5.

Woitge HW, Seibel MJ (2000) Risk assessment for osteoporosis. II. Biochemical markers of bone turnover: bone resorption indices. Clin Lab Med. 20(3):503–25,vi.

Wolfensohn S, Lloyd M (2013) Handbook of laboratory animal management and welfare. 4. Aufl. Chichester: John Wiley & Sons.

Wrońska-Nofer T, Nofer JR, Jajte J, Dziubałtowska E, Szymczak W, Krajewski W, Wąsowicz W, Rydzyński K (2012) Oxidative DNA damage and oxidative stress in subjects occupationally exposed to nitrous oxide (N(2)O). Mutat Res. 731(1–2):58–63.

Wu JJ, Shyr HS, Chao EY, Kelly PJ (1984) Comparison of osteotomy healing under external fixation devices with different stiffness characteristics. J Bone Joint Surg Am. 166(8):1258–64.

Wüster C, Ziegler R. (1999) Metabolische Knochenerkrankungen. In: THIEMES INNERE MEDIZIN TIM. Stuttgart: Thieme Verlag, 350–62.

Wüster C, Engels K, Renner E, Hesch RD, Hadji P, Pourfard JY (1998) Meßwertinterpretation der Osteoporose. Dtsch Arztebl. 95(41): A2547/B-1990/C-1817.

Wüster C, Allolio B, Grußendorf M, Hüfner M, Kruse HP, Minne HW, Raue F, Reiners C, Ringe JD, Schweikert HU, Ziegler R (1994) Stellungnahme der Sektion Kalzium regulierende Hormone und Knochenstoffwechsel der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie zur rationellen Anwendung der Knochendichtemessung. Endok Informationen. 5(18):11–5.

Yamazaki I, Yamaguchi H (1989) Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat model. J Bone Miner Res. 4(1):13–22.

Yasui N, Sato M, Ochi T, Kimura T, Kawahata H, Kitamura Y, Nomura S (1997) Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. J Bone Joint Surg Br. 79(5):824–30.

Yu W, Glüer CC, Fuerst T, Grampp S, Li J, Lu Y, Genant HK (1995a) Influence of degenerative joint disease on spinal bone mineral measurements in postmenopausal women. Calcif Tissue Int. 57(3):169–74.

Yu W, Glüer CC, Grampp S, Jergas M, Fuerst T, Wu CY, Lu Y, Fan B, Genant HK (1995b) Spinal bone mineral assessment in postmenopausal women: a comparison between dual X-ray absorptiometry and quantitative computed tomography. Osteoporos Int. 5(6):433–9.

Zou X, Liu F, Zhang X, Patterson TA, Callicott R, Liu S, Hanig JP, Paule MG, Slikker W, Wang C (2011) Inhalation anesthetic-induced neuronal damage in developing rhesus monkey. Neurotoxicol Teratol. 33(5):592–7.

8 Danksagung

An der Realisierung dieser Arbeit haben viele Personen und Institute mitgewirkt ohne deren Hilfe dies nicht möglich gewesen wäre. Besonderer Dank gilt:

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Steffen Ruchholtz,

Direktor der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg,

für die Realisierung dieses Projektes, die sehr gute wissenschaftliche Beratung, die zielführenden konzeptionellen Beiträge und die Korrektur der Arbeit.

Frau Christina Wack,

Oberärztin der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg,

für die sehr gute Betreuung des Projektes, die Zusammenarbeit und viele konstruktive Gespäche, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Frau Marita Kratz,

Medizinisch Technische Assistentin des Instituts für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik und der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg,

für die außerordentliche Unterstützung in allen Belangen auch außerhalb des Labors. Vielen Dank für die unentbehrliche aktive Mitarbeit und freundschaftliche Begleitung.

Prof. Dr. David B. Jones,

Direktor des Instituts für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik der Philipps-Universität Marburg,

für die Bereitstellung der Laborräume der Experimentellen Orthopädie und Biomechanik zu jeder Zeit.

Herrn Guido Schemken und dem Team der Tierexperimentellen Einrichtung der Philipps-Universität Marburg

für die tatkräftige Unterstützung und fürsorgliche Pflege der Tiere während der tierexperimentellen Phase. Herrn Dr. med. vet. Schulz, Veterinär der Tierversuchs-Ethik-Kommission, Universität Marburg, für die wissenschaftliche und praktische Beratung aus dem Bereich der Veterinärmedizin.

Herrn Prof. Dr. med. Lutz Claes und seiner Arbeitsgruppe des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm für die freundliche Zusammenarbeit und Gastfreundschaft während der Einarbeitung und darüber hinaus.

Herrn Johannes Willnecker,

Firma STRATEC Medizintechnik GmbH,

für die fundierten Fachkenntnisse und Gastfreundschaft während der Messungen in Pforzheim.

Herrn Jakob Smigierski, M.Sc. Statistik, für die umfangreiche und fundierte statistische Beratung.

Anika für ihre Freundschaft und selbstlose Unterstützung seit 2007.

Peschi, Gunnar, Marijke, Jeremias, Lisa, Tjark, Rico, Sören, Christian und dem Lazarett-Team der Fregatte MECKLENBURG-VORPOMMERN. Jeder einzelne von Euch weiß inwiefern ihr mir eine Stütze ward und seid.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mir eine gute Bildung ermöglichten, mich zur Verfolgung meiner Ziele ermutigten und deren bedingungsloser Unterstützung ich mir immer sicher sein konnte.

Mein herzlicher Dank gilt in diesem Sinne auch meiner Familie. Vielen Dank für Eure Geduld, Zuspruch ("Vor den Erfolg haben die Götter den Schweiß gesetzt", Hesiod) und Strukturierung ("Alles Prosa").

9 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

"Radiologische Analyse eines Knochendefektmodells zur Lokalapplikation von Medikamenten am osteoporotisch induzierten Rattenfemur"

in der Klinik für Unfall-, Hand-, und Wiederherstellungs-Chirurgie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Stefen Ruchholtz mit Unterstützung durch Herrn Dr. med. Frank Kliebe, Frau Dr. Christina Wack und Frau Marita Kratz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Ort, Datum, Unterschrift Doktorandin Marburg, den 12.11.2021

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen, die Angebote der Philipps-Universität zur Plagiatserkennung (Plagiatssoftware zu beziehen über das Hochschulrechenzentrum) sind mir bekannt.

Ort, Datum, Unterschrift Referent Marburg, den 12.11.2021

10 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Aigner, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Baumann, K. Becker, S. Becker, Cetin, Daut, Donner-Banzhoff, Ellenrieder, Fuchs-Winkelmann, Görg, Graz, Gress, Grosse, Grundmann, Grzeschik, Hasilik, Herrmann-Lingen, Hertl, Hoyer, Jungclas, Kaluza, Kann, Kill, Kircher, Klose, Koehler, Koolman, Krause, Kroll, Kuhlmann, Kurt, Lang, Langer, Lenz, Lill, Löffler, Lohoff, F. Maier, R. Maier, Maisch, Mandrek, Maschuw, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Opitz, Renz, Richter, Riße, Röper, Rothmund, Ruchholtz, Seeger, Seifart, Seitz, Schade, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schofer, Schrader, Steiniger, Stiletto, Teymoortash, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Wennemut, Werner, Westermann, Wulf, Zielke, Ziring

Im Kantonspital Uri in Altdorf (Universität Zürich, Schweiz): Auf der Maur, Brunner, Burri, Hurni, Marbet, Simon

Im Kreisklinikum in Siegen (Philipps-Universität Marburg): Grond, Nordmeyer, Palm, Schanz

Im Tigerberg Hospital in Cape Town (Stellenbosch-University, Südafrika): Warren, Zühlke

11 Lebenslauf