

**Osteoporoseinduktion am Tiermodell der Ratte –  
Biomechanische Analysen zur Qualitätssicherung  
am Rattenknochen**

**Inauguraldisseration  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Vorgelegt von  
Britta Kerstin Hürter  
aus Bonn  
Gießen 2014**

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Gießen

Direktor: Herr Univ. - Prof. Dr. med. Christian Heiß

Gutachter: Herr Univ. - Prof. Dr. med. Christian Heiß

Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Markus Rickert

Tag der Disputation: 09. Juni 2015

Meiner Familie

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Osteoporose .....	1
1.1.1	Epidemiologie .....	1
1.1.2	Pathogenese.....	2
1.1.3	Einteilung.....	3
1.1.4	Risikofaktoren.....	6
1.1.5	Klinik .....	7
1.1.6	Diagnostik .....	8
1.2	Der Knochen .....	11
1.2.1	Übersicht und Einteilung .....	11
1.2.2	Mikrostruktur und mechanische Eigenschaften.....	17
1.3	Parameter der Biomechanik.....	18
1.4	Fragestellung und Ziele der Studie .....	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.1	Versuchstiere .....	23
2.2	Tierhaltung und-betreuung .....	24
2.3	Versuchsprotokoll.....	25
2.4	Randomisierung.....	27
2.5	Diät- und Glukokortikoidgabe .....	27
2.6	Operationsverlauf .....	27
2.7	Postoperativer Verlauf.....	30
2.8	Tötungen.....	31
2.9	Biomechanische Testung.....	33
2.9.1	Kompression der Wirbelkörper.....	33
2.9.2	Torsion der Tibiae.....	34
2.9.3	Drei-Punkt-Biegung der Femura.....	36
2.10	Fotodokumentation .....	39
2.11	Statistische Auswertung der Daten .....	40

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
3.1	Klinischer Verlauf .....	41
3.2	Allgemeine Parameter .....	41
3.3	Knochenmorphologie .....	42
3.4	Biomechanische Testungen .....	46
3.4.1	Kompression der Wirbelkörper.....	47
3.4.2	Torsion der Tibiae.....	50
3.4.3	Drei-Punkt-Biegung der Femura.....	54
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>59</b>
4.1	Tiermodell.....	59
4.2	Bewertung der einzelnen Methoden .....	61
4.3	Ergebnisse.....	64
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungs- / Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>82</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>90</b>
<b>11</b>	<b>Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>91</b>
<b>12</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>92</b>
<b>13</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>93</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Osteoporose

Die Osteoporose wurde durch die *Consensus Development Conference (1993)* definiert, als „eine systemische Skeletterkrankung, charakterisiert durch eine niedrige Knochenmasse und Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes, mit der Folge vermehrter Knochenbrüchigkeit“.

„Eine Osteoporose liegt vor, wenn die Knochenmineraldichte um 2,5 Standardabweichungen unterhalb des statistischen Mittelwerts gesunder prämenopausaler Frauen liegt“ (WHO Definition) [Wülker et al. 2010].

### 1.1.1 Epidemiologie

Osteoporose ist derzeit die häufigste generalisierte Skeletterkrankung im höheren Alter und zählt zu den 10 wichtigsten Volkskrankheiten [Bartl et al. 2009].

Heutzutage erkranken in Europa ca. jede 3. Frau und jeder 5. Mann an Osteoporose. Die Prävalenz der Osteoporose für Frauen der weißen Bevölkerung liegt oberhalb des 65. Lebensjahres bei ca. 15%. Weiter besteht für Frauen ab dem 50. Lebensjahr ein 39,7%iges Risiko eine osteoporotische Fraktur zu erleiden, für den Mann liegt das Risiko bei 13,1% [Melton et al. 2005]. Typische Frakturbereiche sind die Wirbelkörper, das proximale Femur und der distale Unterarm. Erwachsene, die bereits eine osteoporosebedingte Fraktur erlitten haben, haben ein besonders erhöhtes Risiko für eine weitere Fraktur.

Da die Bevölkerungsgruppe der älteren Menschen im Laufe der Zeit immer mehr zunehmen wird, wird sich auch die Prävalenz der Erkrankung und deren Folgen erhöhen. Laut *Sambrook et al. (2006)* wird die Anzahl der Frakturen des proximalen Femur weltweit von 1,7 Millionen im Jahr 1990 auf 6,3 Millionen im Jahr 2050 ansteigen. Folgen dieser Frakturen sind Schmerzen, Morbidität, Verlust an Mobilität und sie führen häufig zu einer langen Hospitalisierung. Sie stellen eine enorme Belastung des Gesundheitssystems dar. Auch die Mortalität ist erhöht. So sterben rund 20% bis 30% der Betroffenen an den Folgen einer Hüftfraktur. Das Mortalitätsrisiko ist allgemein besonders in den ersten 6 Monaten nach der Fraktur erhöht.

Weiter wird eine geographische Häufigkeitsverteilung beobachtet: Frakturen des proximalen Femurs kommen in Skandinavien und Nord-Amerika besonders häufig vor, in Lateinamerika und Asien weniger häufig. Ebenfalls ist ein Anstieg in städtischen Gegenden zu erkennen. Wirbelkörperfrakturen weisen hingegen keine geographischen Unterschiede auf.

Ein wesentliches Problem stellt die mangelnde Diagnostik und Therapie osteoporotischer Patienten dar. Nur rund 20% der Erkrankten werden laut des *Joint Commission Report Improving and Measuring Osteoporosis Management 2008* heutzutage korrekt diagnostiziert und leitliniengerecht behandelt [Bartl et al. 2009, Cummings et al. 2002, Gärdsell et al. 1991, Javaid et al. 2002, Kanis et al. 2003, Melton et al. 2005, Niethard et al. 2009, Roy et al. 2011, Sambrook et al. 2006].

### **1.1.2 Pathogenese**

Der Knochen unterliegt ständigen Auf- und Abbauprozessen, dem sogenannten „Bone remodeling“. Diese Prozesse werden durch Hormone, mechanische Faktoren, Wachstumsfaktoren und Zytokine beeinflusst bzw. gesteuert. Ebenfalls spielen nutritive und genetische Faktoren eine wichtige Rolle. Bis zum 30. Lebensjahr überwiegen die Knochenaufbauprozesse und es wird eine maximale Knochenmineraldichte („peak bone mass“) erreicht. Danach findet ein kontinuierlicher Knochendichteverlust von ca. 0,5% bis 1% pro Jahr statt. Dies entspricht der physiologischen Altersatrophie des Knochens. Die Knochenmasse des Einzelnen im späteren Leben ist demnach das Ergebnis der Knochenaufbauprozesse und des sich anschließenden Knochendichteverlustes.

Nach dem 40. Lebensjahr beginnt der altersabhängige Knochenabbau. Bei Frauen kann dieser zu einem Verlust von insgesamt 35% bis 40% der Kortikalis und 55% bis 60% der Spongiosa führen. Männer liegen ca. 2/3 unter diesen Werten. Der Abbau der Spongiosa setzt im Alter früher ein und ist stärker ausgeprägt, als der der Kortikalis [Javaid et al. 2002, Niethard et al. 2009, Sambrook et al. 2006].

Zusätzlich zur Altersatrophie kommt es bei der Osteoporose zu einem pathologischen Knochenschwund. Hierbei ist hauptsächlich die Spongiosa betroffen. Unmittelbar nach der Menopause kann ihre Abbaurate 4% bis 8% pro Jahr betragen. Da die verlorene Knochendichte, wenn überhaupt, nur schwer wieder aufgebaut werden kann, sollte die Primärprävention in den Mittelpunkt des Therapiekonzepts gerückt werden.

Bei der Osteoporose lässt sich auf zellulärer Ebene ein Aktivitätsungleichgewicht der Osteoblasten und Osteoklasten nachweisen. Die Knochenresorption der Osteoklasten überwiegt im Vergleich zur Knochenneubildung der Osteoblasten.

In den physiologischen Prozessen spielt auch das Östrogen eine zentrale Rolle. Fehlt es, kommt es u.a. zu dem genannten Ungleichgewicht von Knochenresorption und Knochenneubildung. Östrogene wirken direkt auf die Apoptose der Osteoklasten und regulieren negativ einige proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ . Fehlt Östrogen, werden diese Zytokine aktiviert, die dann Knochenbestandteile resorbieren und die Knochenneubildung hemmen.

Ein weiterer wichtiger Meilenstein im Verständnis der Osteoporose auf zellulärer Ebene ist die Entdeckung und die Erkenntnis des Osteoprotegerin, des RANK und dessen Liganden (RANKL). Sie spielen eine wichtige Schlüsselrolle in der Knochenresorption der Osteoklasten. RANKL wird kontinuierlich von Osteoblasten ausgeschüttet, welches dann an seinen RANK-Rezeptor bindet. Dieser wird von den Osteoklasten exprimiert und reguliert deren Differenzierung. Durch diese Bindung werden die Osteoklasten aktiviert und verlängern ihre Lebenszeit. Osteoprotegerin wird durch Stimulation von Östrogen von Osteoblasten ausgeschüttet. Es hemmt die Interaktion von RANK und RANKL und ist somit ein physiologischer Regulator des Knochenstoffwechsels. Östrogen hat daher antiresorptive Wirkungen auf den Knochen [Bord et al. 2003, Boyle et al. 2003, Pacifici 1996, Sambrook et al. 2006].

### 1.1.3 Einteilung

Die Osteoporose lässt sich in eine primäre (95%) und sekundäre (5%) Form einteilen (Tab. 1).

Primäre Osteoporose	Sekundäre Osteoporose
Idiopathisch bei jungen Menschen	Endokrin
Postmenopausal/Präsenil (Typ I, 50.-70. Lebensjahr)	Malabsorption
Altersosteoporose/Senil (Typ II, über 70. Lebensjahr)	Medikamentös
	Immobilisation

Tab. 1: Einteilung primäre vs. sekundäre Osteoporose.



### Primäre Osteoporose

Die idiopathische Osteoporose bezeichnet die Osteoporose junger Menschen und gilt als früherwachsene Form. Dies bedeutet die Erkrankung tritt vor dem 50. Lebensjahr auf. Sie kommt sehr selten vor.

Die postmenopausale bzw. präsenile Form - Typ I - kommt im Alter von 50 bis 70 Jahren vor. Sie ist gekennzeichnet durch einen relativen Östrogenmangel, der durch die verminderte endokrine Ovarialfunktion nach der Menopause entsteht. Ebenfalls reagiert der Knochen empfindlicher auf das ausgeschüttete Parathormon der Nebenschilddrüse. Diese Veränderungen führen zu einem rasch progredienten Knochenabbau, besonders im Bereich der Wirbelkörper und des Femurs. Hieraus folgt ein erhöhtes Frakturrisiko. Weiter ist der sogenannte „high turnover“ charakteristisch. Dies bedeutet, der Knochendichteverlust geht mit einer verstärkten Knochenresorption einher. Beträgt der Dichteverlust mehr als 10% pro Jahr, wird dies als „Fast Looser“ bezeichnet. Es kennzeichnet den dramatischen Verlauf mit schnell beginnenden statischen Verformungen.

Der Typ II umfasst die senile bzw. Altersosteoporose (Inovulationsosteoporose). Sie beginnt mit dem 70. Lebensjahr und betrifft ca. 50% dieser Bevölkerungsgruppe. Hierbei kommt es zu einem „low turnover“, d.h. der Knochendichteverlust geht mit einer verminderten Knochenneubildung einher. Diese Form der Osteoporose zählt zu den „Slow Loosern“, der Knochendichteverlust beträgt hierbei maximal 3,5% pro Jahr. Für dessen Verlauf sind chronische Schmerzen und allmählich einsetzende statische Veränderungen charakteristisch.

Weitere Faktoren der Entstehung sind beispielsweise eine zunehmende Immobilität im Alter und ein defekter Vitamin-D-Metabolismus. Typische Frakturen für den beschriebenen Typ sind die Schenkelhals-, Radius- und Beckenfraktur [Krämer et al. 2007, Niethard et al. 2005, Niethard et al. 2009, Wülker et al. 2010].

### Sekundäre Osteoporose

Die sekundäre Osteoporose macht nur 5% der Osteoporose aus, ist aber für 20% der osteoporotischen Frakturen verantwortlich. Sie hat viele verschiedene Ursachen.

Besonders hervorzuheben ist die Glukokortikoid-induzierte Osteoporose. Sie entsteht entweder über eine endogene Überproduktion beim M. Cushing oder über eine übermäßige exogene Zufuhr z.B. von Kortisonpräparaten bei Asthma bronchiale oder bei der rheumatoiden Arthritis. Hierbei kommt es zu einer reduzierten Kalziumabsorption und zu einer tubulären Hyperkalziurie. Diese negative Kalziumbilanz führt zu einem sekundären Hyperparathyreoidismus, der einen erhöhten Knochenumsatz bedingt. Am häufigsten ist das Stammskelett betroffen. Es kommt zu Spontanfrakturen der Rippen und der Wirbelkörper. Als Folge der Frakturen kommt es zu einer hyperthrophischen Kallusbildung.

Weitere Ursachen der sekundären Osteoporose sind:

1. Endokrinologische Erkrankungen: Diabetes mellitus Typ I, Hyperparathyreoidismus, Hyperkortisolismus, Hyperthyreose,
2. Entzündliche Erkrankungen: entzündliche Magen-Darm-Erkrankung, rheumatoide Arthritis, Spondylitis ankylosans
3. Immobilisation: z.B. durch Paraplegie und M. Parkinson
4. Hypogonadismus: Anorexia nervosa, Klinefelter Syndrom, Turner Syndrom
5. Malabsorption: Lebererkrankung, parenterale Ernährung, Laktoseintoleranz, Postgastrektomie, Zöliakie
6. Knochenmarkserkrankungen: Leukämie, Mastozytose, M. Gaucher, multiples Myelom
7. Medikamente: Antikonvulsiva, Aromatasehemmer, Zyklosporin, Glukokortikoide, Glitazone, Heparin, Methotrexat, Protonenpumpeninhibitoren

Sehr niedrige Knochendichtewerte, ungewöhnliche Frakturlokalisationen für Osteoporose, wiederholte Frakturen trotz Prophylaxe und unklare Knochenläsionen im Röntgenbild sind Hinweise auf die Skeletterkrankung. Biochemische Tests wie die Bestimmung des Kalzium in Serum und Urin, des Serum-Kreatinin und der Protein Elektrophorese, dienen zur Abklärung der Differentialdiagnosen [Adami et al. 2009, Buchholtz et al. 2010, Breusch et al. 2006].

T-Score	Bewertung
<b>bis -1 SD</b>	Normal
<b>-1 bis -2,5 SD</b>	Osteopenie
<b>mehr als -2,5 SD</b>	Osteoporose
<b>mehr als -2,5 SD plus Fraktur</b>	Manifeste Osteoporose

Tab. 2: WHO Schweregrade der Osteoporose. SD: Standardabweichung, T-Score: maximale Knochendichte in einem Kollektiv junger gesunder Erwachsener [Niethard et al. 2009].

Die Osteoporose wird zusätzlich zur oben genannten Einteilung von der WHO in einzelne Schweregrade (Tab. 2) eingeteilt. Diese basieren auf DXA- (Dual-X-Ray-Absorptiometrie-) Messungen der Knochendichte [Buchholtz et al. 2010].

#### 1.1.4 Risikofaktoren

Bei der Erkrankung der Osteoporose spielen beeinflussbare, sowie nicht beeinflussbare Risikofaktoren eine große Rolle. Sie tragen u.a. zum Auftreten der Erkrankung bei. Des Weiteren erhöhen sie beispielsweise bei ihrem Auftreten das Frakturrisiko, auch wenn die Knochendichte hohe T-Werte anzeigt [Bartl et al. 2009, Braun et al. 2010, Niethard et al. 2005, Sambrook et al. 2006].

- Familiäre Vorbelastung
- Genetik: weiße und asiatische Rasse, Vitamin-D-Rezeptor-Allel BB
- Alter
- Geschlecht
- Untergewicht (BMI < 20)
- Immobilität
- Frühe Menopause: vor dem 45. LJ.
- Ovariectomie
- Ernährungsfaktoren: Tabak-, Alkoholkonsum
- Hyperthyreose
- Diabetes mellitus Typ 1
- Multiple Stürze
- Glukokortikoidbehandlung
- Proximale Femurfraktur eines Elternteils

- Rheumatoide Arthritis
- Vorrausgegangen Frakturen

### 1.1.5 Klinik

Die Osteoporose ohne Fraktur verläuft oft asymptomatisch. Klinisch manifest wird sie meist erst mit dem Einhergehen einer Fraktur. Hierbei sind besonders die Wirbelkörper, der Schenkelhals und der Radius betroffen. Es kann durch Verformungen der Wirbelsäule zu akuten belastungsabhängigen Schmerzen kommen und auch chronische Rückenschmerzen sind ein häufiges Erkrankungszeichen. Durch die Verformungen der Knochen entsteht ein typischer Habitus osteoporotischer Patienten (Abb. 1). Dieser ist gekennzeichnet durch eine deutliche Kyphose der Brustwirbelsäule und durch eine Abnahme der Körpergröße um mehr als 4 cm. Die Bauchdecke ist vorgewölbt („Osteoporosebauch“), es kommt zum „Tannenbaumphänomen“ (Hautfalten vom Rücken bis zu den Flanken) und das Gangbild der Patienten wird unsicherer und kleinschrittig.

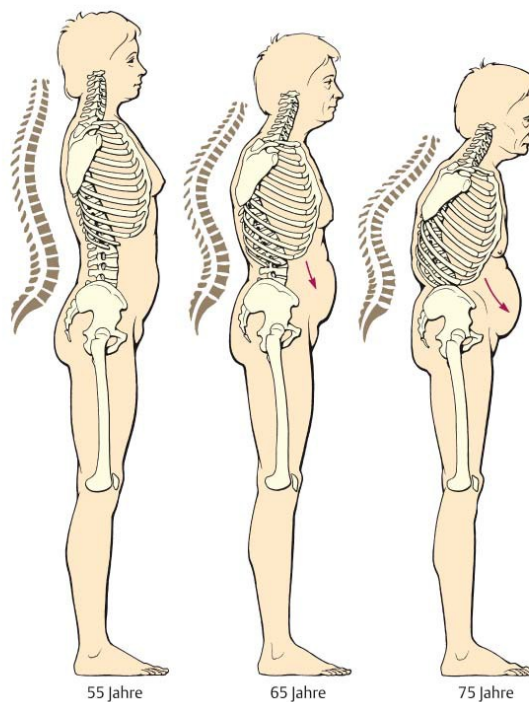


Abb. 1: Veränderung des Habitus bei osteoporotischen Patienten [Niethard et al. 2009, S. 147]

Des Weiteren kann der Rippenbogen den Beckenkamm berühren und dort Schmerzen auslösen. Die Dornfortsätze und die Muskelansätze können zudem druckempfindlich sein. Patienten mit bereits erlittener Fraktur weisen eine erhöhte Sterblichkeit im 1. Jahr nach dem Ereignis auf. Außerdem haben sie ein erhöhtes Risiko weitere Frakturen zu erleiden. Durch die Erkrankung entsteht häufig ein Mobilitätsverlust mit Hilfsbedürftigkeit und Abhängigkeit, sowie Vereinsamung. Dies hat eine reduzierte Lebensqualität und letztendlich eine erhöhte Mortalität zur Folge [Krämer et al. 2007, Niethard et al. 2009, Sambrook et al. 2006, Ruchholtz et al. 2010, Wülker et al. 2010].

### **1.1.6 Diagnostik**

Zur Basisdiagnostik gehören die Anamnese und die klinische Untersuchung. Sie dienen der Erfassung von Schmerzen, von funktionellen Einschränkungen und von Erkrankungen mit Sturz- oder Frakturrisiko. Mit dem „Timed-up-and-go-“ und dem „Chair-rising-Test“ werden Muskelkraft und Koordination erfasst. Gegebenenfalls muss ein gesamtes geriatrisches Assessment vorgenommen werden.

Weitere Basisuntersuchungen sind die Osteodensitometrie (DXA-Messung) der LWS und des Femurs, sowie eine Röntgenaufnahme der Frakturen insbesondere der BWS und LWS in 2 Ebenen (Tab. 3). Die Laboruntersuchung trägt eher zur Differentialdiagnosefindung, u.a. von Metastasen, Plasmozytom, Hyperparathyreoidismus oder Infektion bei. Ein Basislabor sollte sich an die DXA-Messung anschließen, wenn der T-Wert  $< - 2,0$  ist, eine Fraktur Anlass für die bildgebende Untersuchung war oder wenn sich in der Anamnese oder Untersuchung Hinweise auf eine sekundär osteologische Grunderkrankung ergeben. Folgende Parameter sollten bestimmt werden: Serum-Kalzium, -Phosphat und -Alkalische Phosphatase, Gamma-GT, Kreatinin-Clearance, BSG und CRP, Blutbild, Serum-Elektrophorese, TSH, ggf. Testosteron (bei Männern), 25-Hydroxy-Vitamin D3 und Knochenresorptionsparameter.

Weitere Diagnostik findet durch das CT (quantitatives CT und peripheres quantitatives CT), das MRT und die Skelettszintigraphie, den Ultraschall, sowie durch eine Knochenbiopsie statt.

### Bildgebende Untersuchungen

DXA der LWS und des Femurs

Röntgen der BWS und LWS

QCT der LWS und des Femurs

pQCT des Radius und der Tibia

Sonographie an Kalkaneus und Finger

Tab. 3: Bildgebende Untersuchungen der Osteoporose.

Die DXA-Messung ist eine schnelle, verlässliche und allgemeingültige Methode zur Messung der Knochendichte. In der Klinik werden T-Werte für die LWS L1 bis L4 (Abb. 2), den proximalen Femur und den Schenkelhals gemessen. Die T-Werte sind die maximale Knochendichte in einem Kollektiv junger gesunder Erwachsener. So kann eine Aussage über die Schwere der Erkrankung getroffen werden (Tab. 2: WHO Schweregrade der Osteoporose). Ebenfalls ist die DXA-Messung zur Zeit das Mittel der 1. Wahl für die Indikationsstellung für eine Behandlung der Osteoporose. Sie wird allen Frauen über 65 Jahren empfohlen. Bei Männern bzw. Frauen unter 65 Jahren wird diese Messung nur mit Einhergehen bestimmter Risikofaktoren vorgenommen.

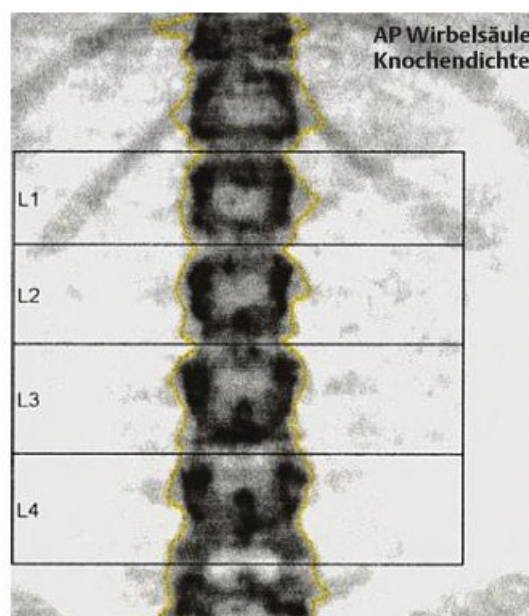


Abb. 2: DXA-Messung der Lendenwirbelsäule [Bartl 2010, S. 86].

Eine Alternative zur DXA-Messung ist die quantitative Computertomographie (QCT) an der Wirbelsäule und am Unterarm (Abb. 3). Mit dieser Methode kann man ebenfalls

das Wirbelkörperfrakturrisiko abschätzen. Sie lässt für wissenschaftliche Fragestellungen detailliertere Aussagen zu, ist jedoch hinsichtlich der Frakturvorhersage schlechter evaluiert. Auch sind die T-Werte bei postmenopausalen Frauen im QCT meist niedriger, als die der DXA-Messung.

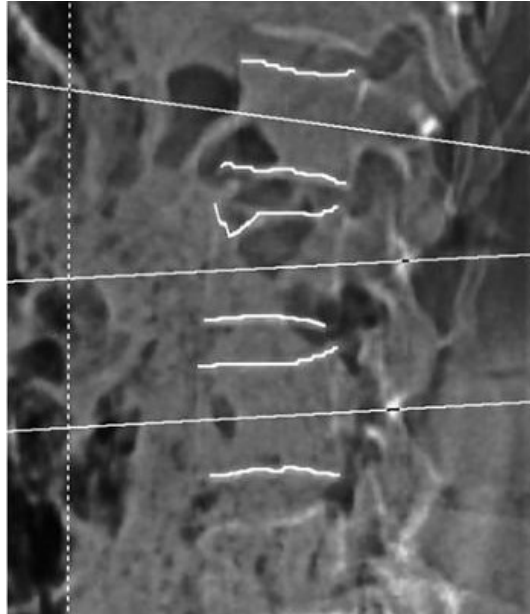


Abb. 3: Quantitative Computertomographie der Wirbelsäule. Festlegung der Schichtebene [Bartl 2010, S. 90].

Röntgenologisch sieht man bei der Osteoporose eine Rarefizierung der Spongiosa mit Hervorhebung der Deck- und Grundplatten der Wirbelkörper. Eine vermehrte Knochenparenz lässt sich abzeichnen (Abb. 4). Die Verminderung des Knochengewebes beginnt im Markraum und schreitet nach peripher zur Kortikalis hin fort. Die Kortikalis ist allerdings nur bei hochgradiger Osteoporose verschmälert. Zuerst ist die Querspongiosa - das Sicherungssystem - betroffen, danach werden die vertikalen Trägerbalken zersetzt. Diese können allerdings auch verdickt sein, was als hypertrophische Knochenatrophie bezeichnet wird. Es kommt meist zur Verformung der Wirbelkörper, da die tragenden Strukturen ihre Stabilität verlieren.



Abb. 4: Röntgenbild der Wirbelsäule. Erhöhte Knochentransparenz und Rarefizierung der Trabekel, Fischwirbel und ein Keilwirbel (Pfeil, LWK 1) [Ackermann et al. 2012, Buch „B“, S 318].

Es können Keil-, Fisch- und Plattwirbel entstehen. Die Keilwirbel befinden sich eher in der BWS auf Grund der Belastung der oberen Körperteile auf dem ventralen Teil des Wirbelkörpers. Dies ist durch eine physiologische Kyphose der BWS bedingt (Abb. 4). Die Fischwirbel sind hingegen in der LWS zu finden. Hier kommt es zu einer gleichmäßigen Druckbelastung der Wirbel. Dadurch verbreitern sich die Bandscheiben durch Wasseraufnahme und die Deckplatten dieser Wirbelkörper senken sich ein [Adami et al. 2009, Adler 1983, Blake et al. 2007, Braun et al. 2010, Dasher et al. 2010, DVO Leitlinie 2009, Krämer et al. 2007, Niethard et al. 2009, Ruchholtz et al. 2010].

## 1.2 Der Knochen

### 1.2.1 Übersicht und Einteilung

Das Knochengewebe bildet zusammen mit dem Knorpelgewebe das Stützgewebe des Körpers. Es zählt zu den härtesten Geweben des menschlichen Organismus und besteht aus Mineralien und verschiedenen organischen Substanzen wie z.B. Kollagen Typ I.

Die Knochen spielen auch für den Kalzium- und Phosphathaushalt des Körpers eine wesentliche Rolle. So werden ca. 99% des Kalziums im Knochengewebe gebunden.



Neben der Stützfunktion ist auch die Schutzfunktion für Gehirn, Brust- und Beckenorgane ein wesentlicher Aspekt. Weiter werden den Knochen einige mechanische Eigenschaften zugeteilt: Druck-, Zug-, Biege- und Verdrehungsfestigkeit. Neben der Knochensubstanz werden Knochenmark, Periost, Lymphgefäße, Blutgefäße und Nerven zum Knochen gezählt. Die Gelenkflächen sind mit hyalinem Knorpel überzogen.

Der Knochen wird in unterschiedliche Formen eingeteilt:

### Makroskopische Form

Das menschliche Skelett besteht in der Regel aus 210 einzeln abgrenzbarer Knochen. Die einzelnen Knochen weisen verschiedene Formen wegen ihrer funktionellen und topographischen Stellung auf:

1. Ossa longa
2. Ossa plana
3. Ossa irregularia
4. Ossa brevia

Die Röhrenknochen - Ossa longa - befinden sich hauptsächlich in den Extremitäten. Sie bestehen aus der Diaphyse, an deren Ende sich jeweils die Metaphyse angliedert. Hier setzen Muskeln, Sehnen und Bänder an. Die Knochenenden werden durch die Epiphysen gebildet, die durch die Epiphysenfuge von der Metaphyse getrennt sind. Die Epiphysenfugen verknöchern am Ende des Skelettwachstums und bestimmen somit das Längenwachstum des Knochens. Zurück bleibt die Epiphysenlinie. Kleine Foramen im Knochen dienen als Ein- bzw. Austritt für Blutgefäße.

Im Querschnitt des Knochens lässt sich eine Spongiosa von einer Kortikalis differenzieren. Die Spongiosa befindet sich im Inneren des Knochens und besteht aus einem dichten Gerüst aus Knochenbälkchen, den Trabekeln. Die äußere Kortikalis besteht aus kompaktem Knochengewebe. Die Spongiosa und die Knochenkanäle der Markhöhle werden vom Endost überzogen. Der Knochen wird außen vom Periost umgeben (Abb. 5). Er besteht aus zwei Schichten: dem Stratum fibrosum aus straffem, geflechtartigem kollagenem Bindegewebe, sowie dem Stratum osteogenicum. Dieses besteht aus osteogenen und chondrogenen Vorläuferzellen und ist zellreich.

Die Spongiosa bildet mit ca. 75% den Hauptbestandteil der Epi- und Metaphyse der Röhrenknochen. Die Zwischenräume in diesem Bereich werden mit blutbildendem roten Knochenmark gefüllt. Die Kortikalis ist hier vergleichsweise dünn.

Im Bereich der Diaphyse ist kaum Spongiosa enthalten und die Markhöhle enthält Fettgewebe, das gelbe Knochenmark. Sie wird von einer sehr dicken Schicht kompakten Knochens umgeben (Abb. 5).

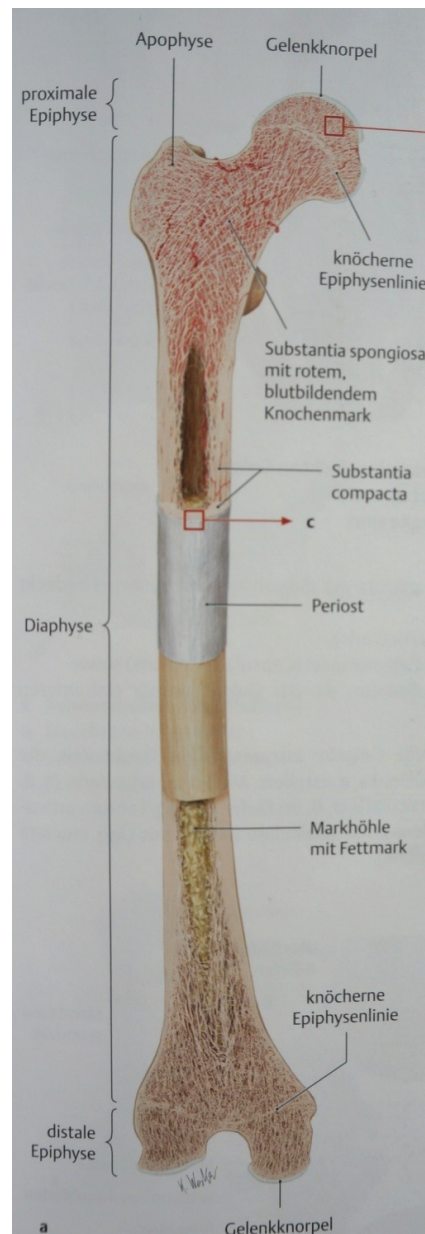


Abb. 5: Schematischer Aufbau eines Röhrenknochens [Schünke et al. 2005, S. 35].

Die Ossa plana finden sich in den Schulterblättern, dem Darmbein, den Rippen bzw. den Schädelknochen. Diese Knochen bestehen hauptsächlich aus Spongiosa mit einer sehr dünnen Kortikalis.

Als Ossa irregularia werden, wegen ihrer unregelmäßig geformten Struktur, die Wirbelkörper bezeichnet. Der Aufbau des Knochens ähnelt dem der Ossa plana.

Die Hand- und Fußwurzelknochen werden von kleinen polygonalen Knochen, den Ossa brevia gebildet [Aumüller et al. 2007, Benninghoff et al. 2008].

### Entwicklungsablauf

Der Knochen kann auf zwei verschiedene Weisen entstehen: durch die direkte desmale oder die indirekte chondrale Ossifikation.

1. Der desmalen Ossifikation, auch membranöse Ossifikation genannt, gehen Mesenchymzellen oder Bindegewebe voraus. Sie findet in der Embryonalzeit statt und es entsteht ein Geflechtknochen (s.u.).

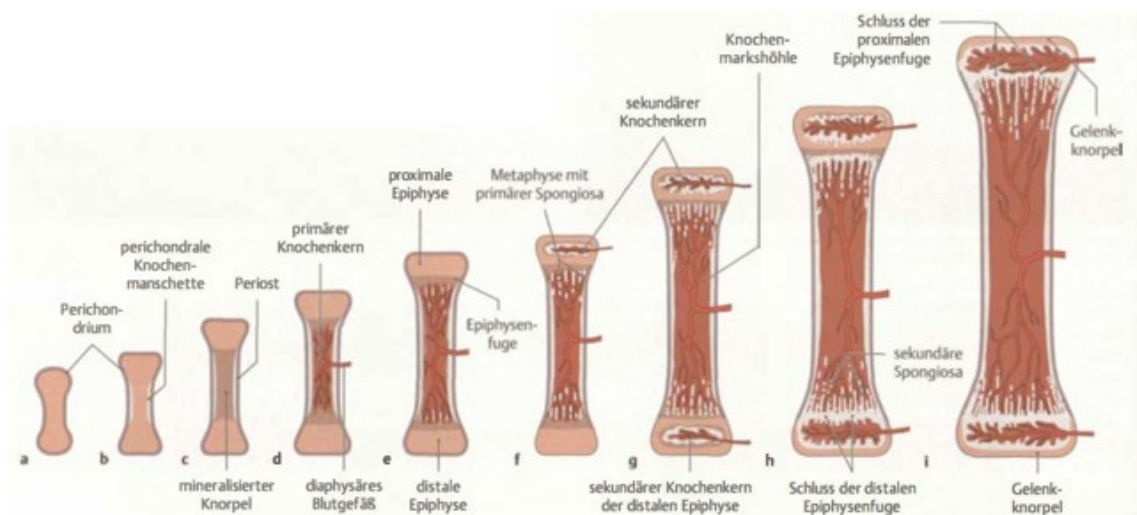


Abb. 6: Entwicklung eines Röhrenknochens [Schünke et al. 2005, S. 14].

2 Das chondrale Knochengewebe entsteht durch ein knorpeliges Vorstadium. Das vorgeformte Knorpelgerüst wird anschließend durch Knochengewebe ersetzt. Die Knorpelanlagen des Knochens vergrößern sich zunächst durch Zellteilung der Knorpelzellen. Dies wird als interstitielles Wachstum bezeichnet.

Zum einen findet die perichondrale Verknöcherung statt. Hierbei wird von außen um das bestehende Knorpelgerüst durch membranöse Ossifikation eine Knochenmanschette (appositionelles Wachstum) gebildet. Auch hier entsteht dann Geflechtknochen.

Oder es kommt zur enchondralen Ossifikation. Hierbei kommt es zu einer Verknöcherung, die im Zentrum der Anlage durch Vergrößerung der Knorpelzellen und Verkalkung der Knorpelgrundsubstanz beginnt.

Das pränatale Längenwachstum der Diaphyse entspricht der enchondralen Ossifikation. Das postnatale Wachstum ist möglich, solange die Epiphysenfuge offen ist. Das bestehende Knorpelgewebe wird langsam durch Knochengewebe ersetzt. Das Wachstum endet mit dem Schluss der Epiphysenfuge am Ende der Pubertät. Zurück bleibt die Epiphysenlinie (Abb. 6).

Das Dickenwachstum der Diaphyse erfolgt über Knochenabbau im Inneren und über appositionelles Wachstum von außen [Aumüller et al. 2007, Benninghoff et al. 2008].

### Mikroskopische Form

Es werden zwei Arten von Knochengewebe unterschieden: der Geflechtknochen, auch primärer Knochen genannt und der Lamellenknochen - sekundärer Knochen.

Geflechtknochen kommen beim adulten Skelett (Schädelnähte, Labyrinth des Innenohrs, Kallusgewebe) kaum vor. Es sind Faserknochen und sie spielen während der Knochenentwicklung und Knochenbruchheilung eine wichtige Rolle. Kollagenfibrillen bilden ein Flechtwerk aus Kollagenfasern ohne Organisationsmuster. Die Knochenzellen sind ebenfalls ohne Ordnung in der Matrix verteilt. Der Knochen weist eine starke Biege- und Zugfestigkeit auf.

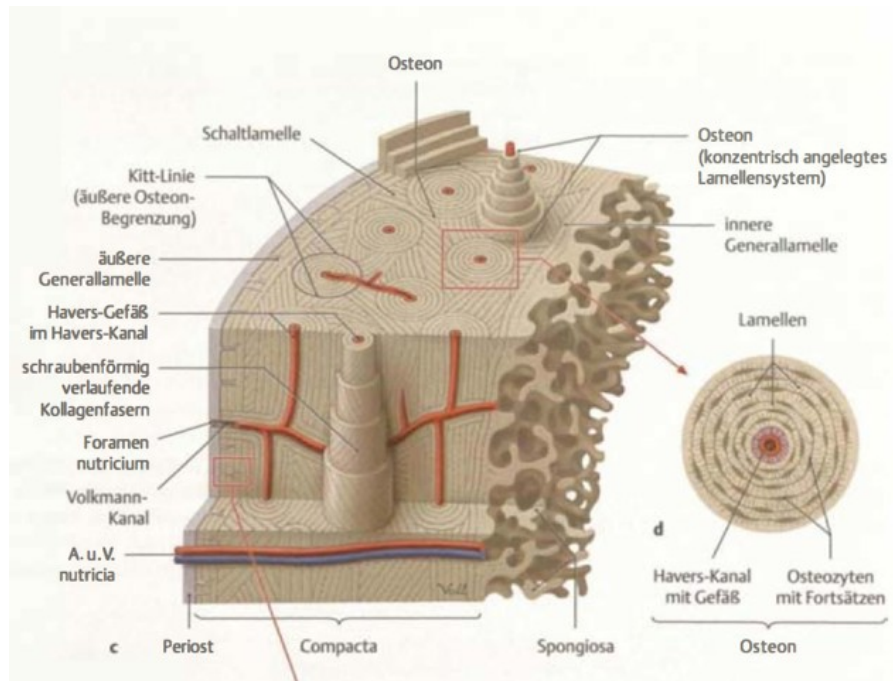


Abb. 7: Schematischer Knochenaufbau [Schünke et al. 2005, S. 35].

Der Lamellenknochen entsteht nach Abbau des Geflechtknochens. Er ist an seine Funktionsanforderungen optimal angepasst und weist einen regelmäßigen Aufbau auf. Außen findet sich der kompakte Knochen, innen die Spongiosa mit den Knochenbälkchen. Diese bilden mittels säulenförmiger verzweigter Strukturen ein gitterförmiges Gerüst. Die Trabekel laufen in Richtung der im Knochen herrschenden Zug- und Druckspannungen.

Die Kompakta besteht aus den Strukturelementen Knochenlamellen. In diesen Lamellen sind Kollagenfibrillen gleichsinnig ausgerichtet. Man unterscheidet Osteone (Speziallamellen), interstitielle Lamellen zwischen den Osteonen, Zirkumferenzlamellen an der periostalen Oberfläche und Trabekellamellen. Im Zentrum des zylindrisch gebauten Osteons verläuft der Havers-Kanal mit Blutgefäßen und Nervenfasern. Sie bilden zusammen das Havers-System. Konzentrisch angeordnete Speziallamellen, sowie kollagene Fasern des Typ I, umgeben den Kanal. Zwischen und in den Lamellen liegen Osteozyten in Knochenhöhlen. Sie kommunizieren über lange Fortsätze in kleinen Kanälchen miteinander. Die Osteone werden über eine Kittlinie, die Linea cementalis, nach außen hin abgeschlossen. Volkmannsche Kanäle verlaufen transversal durch die Kompakta und verbinden die Haversschen Kanäle untereinander (Abb. 7) [Aumüller et al. 2007, Benninghoff et al. 2008].

### 1.2.2 Mikrostruktur und mechanische Eigenschaften

Die Integrität und die Materialeigenschaften eines Knochens, bzw. eines Körpers, sind durch innere atomare und intermolekulare Kräfte gegeben. Zu den inneren Kraftgrößen zählen u.a. Axialkräfte, Querkräfte, Biegemomente und Torsionsmomente. Wirken nun äußere Kraftgrößen auf einen Körper, so werden die Inneren beansprucht. Werden diese auf eine Flächeneinheit bezogen, ergibt sich die *Spannung*. Sie wird in Kraft [N] pro Fläche [cm<sup>2</sup>] angegeben. Spannungen sind geeignete Größen zur Beschreibung von Knochenbeanspruchungen. Es werden *Normalspannungen* ( $\sigma$ -Spannungen) von *Querspannungen* ( $\tau$ -Spannungen) unterschieden. Die Normalspannungen wirken senkrecht zum Knochenquerschnitt und entsprechen den Druck- bzw. Zugspannungen. Die  $\tau$ -Spannungen hingegen wirken parallel und bestimmen somit die Schub- oder Torsionsspannung. Bei einer Biegespannung liegt gleichzeitig eine Druck- und Zugspannung vor.

Um nicht zu brechen, muss bei Spannungen, die auf den Knochen einwirken, immer eine mindestens gleich große Gegenspannung im Knochen bestehen. Da der Knochen gegenüber der Zugspannung eine geringere Stabilität als gegenüber einer Druckspannung aufweist (Verhältnis 2:3), sind Schutzmechanismen essentiell. Diese bestehen u.a. aus dem Zuggurtungsprinzip der Muskelzüge und Bänder oder aus der Faszienerstärkung [Benninghoff et al. 2008].

Die Aufgabe des Knochenskeletts ist es, mechanisch einwirkenden Kräften zu widerstehen. Maximal auftretende Spannungen können lokal so hoch werden, dass der Knochen nicht standhalten kann und bricht. Der Schwellenwert einer solchen Belastung hängt von 3 Faktoren ab:

1. Der geometrischen Struktur des Knochens
2. Den mechanischen Eigenschaften des Knochens (Spannungs-, Dehnungsverhalten, Druckresistenz)
3. Der Größe und Richtung der angreifenden Kraft

Weiterhin erfordern diese einwirkenden Kräfte, die zu Druck-, Zug-, Torsions- und Schubspannung führen, kombinierte Eigenschaften des Knochens wie *Elastizität* und *Härte*.

Für die mechanische Widerstandsfähigkeit sind die Hauptkomponenten des Knochens verantwortlich: organische - Kollagenfaser, Glykoproteine und Proteoglykane - und

anorganische Materialien, die Mineralien. Die Kombination der Materialien unterschiedlicher Eigenschaften, die sich ergänzen wird als Kombinationsbauweise bezeichnet.

Die *Elastizität* des Knochens wird durch die Kollagenfasern erzielt. Ihr Verlauf in den Osteonen ist konzentrisch, longitudinal, transversal und gemischt. Von der Lokalisation und somit Beanspruchung des Osteons, ist die Ausrichtung der Kollagenfasern abhängig. Der Steigungswinkel der Kollagenfasern in den Osteonen bestimmt die verschiedenen mechanische Eigenschaften und Belastungsgrenzen des Knochens (Abb. 7).

Im Allgemeinen werden die Zugspannungen von den Kollagenfasern und die Druckspannungen von den Mineralien aufgefangen.

Der Grad der *Härte* des Knochens wird über die Einlagerung von Mineralien bestimmt. Ebenfalls wichtig für die mechanische Belastbarkeit des Knochens ist der Kalzifizierungsgrad. Ein hoher Grad steht für eine große mechanische Stabilität. Deswegen kommt es bei starker Belastung des Knochens zu einer vermehrten Kalzifizierung und Vermehrung des Knochengewebes. Bei verminderter Belastung sinkt diese hingegen. Ebenfalls reduzieren sich die organischen Bestandteile, es kommt zum Matrixverlust [Benninghoff et al. 2008].

### **1.3 Parameter der Biomechanik**

#### Definition von Spannung und Dehnung

Die äußere Belastung eines Stabes verursacht innere Kräfte. Führt man einen Schnitt durch diesen Stab, stellen die inneren Kräfte auf der Schnittfläche Flächenkräfte dar. Diese werden als *Spannung* bezeichnet. Die *Spannung*  $\sigma$  [ $\text{Pa} = \text{N/m}^2$ ] ist definiert als die Kraft pro Flächeneinheit.

Die *Dehnung*  $\varepsilon$  [%] gibt das Verhältnis der Längenänderung eines Körpers zur ursprünglichen Länge unter Belastung an. Von einer positiven Dehnung (*Streckung*) spricht man, wenn sich der Körper verlängert. Eine *Stauchung* (negative Dehnung) gibt umgekehrt die Verkürzung in Bezug auf die Ausgangslänge an [Gross et al. 2012, Turner und Burr 1993].

Definition der Steifigkeit

Die *Steifigkeit* eines Körpers ist dessen Eigenschaft, einer Verformung einen Widerstand entgegenzusetzen. Sie beschreibt die aufzubringende Kraft  $\mathbf{F}$  [N], um einen Körper um den Weg  $s$  [mm] in die Richtung der einwirkenden Kraft zu bewegen bzw. zu verformen [Stelzmann et al. 2008].

$$\text{Steifigkeit} = \frac{\text{Belastung}}{\text{Verformung}} = \frac{\text{Kraft}}{\text{Weg}} = \frac{F}{s} \text{ [N/mm]}$$

Definition der Biegesteigung

Die *Biegesteigung* beschreibt die Änderung beim Drei-Punkt-Biegeversuch der aufzubringenden Kraft  $\mathbf{F}$  um den Knochen um die Streck  $\mathbf{l}$  zu verformen. Sie wird in Newton pro Millimeter angegeben [N/mm].

Definition der Kraft

Die Größe *Kraft* spielt eine große Rolle bei der biomechanischen Testung der hier beschriebenen Studie.

Isaac Newton (1643-1727) wird meist als Begründer der klassischen Mechanik bezeichnet. 1687 definierte er die Kraft als physikalische Größe in seiner Schrift „Philosophia naturalis principia mathematica“. Nach Newton gibt die *Kraft*  $\vec{F}$  die Stärke der Einwirkung auf einen Körper (Masse  $\mathbf{m}$  [kg]) an. Sie misst die Einwirkung, die schließlich eine Bewegungsänderung  $\vec{a}$  [m/s<sup>2</sup>] verursacht. Sie ist eine vektorielle Größe, d.h. diese Größe wird durch ihren Betrag, ihre Einheit und die Richtung definiert [Diehl et al. 2008].

$$\mathbf{Kraft} = \text{Masse} * \text{Beschleunigung} = m * a \text{ [kg/(m/s}^2\text{)} = \text{N]}$$

Die *Bruchkraft* der Drei-Punkt-Biegung des Femurs ist die aufzuwendende Kraft bzw. Belastung, um den Knochen zum Versagen zu bringen. Angegeben wird sie ebenfalls mit der Einheit [N] [Turner et al. 1993].



Die *Kompressionskraft* ist die Kraft, die beim Kompressionsversuch der Wirbelkörper gemessen wird, um diese zum Zerschlagen zu bringen. Sie wird ebenfalls in [N] angegeben.

### Definition des Drehmoments

Das *Drehmoment* ist das Produkt aus der Kraft  $F$  [N] und dem Wirkabstand (Hebelarm)  $l$  [mm] von einem Bezugspunkt  $D$ . Der Wirkabstand steht senkrecht zur Wirklinie und damit senkrecht zur Krafrichtung [Böge 2011].

$$\mathbf{Drehmoment} = \text{Kraft} * \text{Hebelarm} = F * l \text{ [N/mm]}$$

### Definition des Mittelwertes, der Varianz und der Standardabweichung

Der *Mittelwert* ist definiert, als die Summe der Einzelwerte dividiert durch die Anzahl aller Werte.

$$\mathbf{Mittelwert: } \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

$\bar{x}$  = Mittelwert

$n$  = Anzahl der Messungen

$x$  = Einzelwert der Messung

Die *Varianz* ist ein Maß für die Streuung, die die Verteilung von Werten um deren Mittelwert angibt.

$$\mathbf{Varianz: } VAR(x) = s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

VAR = Varianz

$s$  = Standardabweichung

$$\mathbf{Standardabweichung: } s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Die *Standardabweichung* ist ein Maß für die Streuung einer Variablen um ihren Erwartungswert. Sie ist definiert als die Wurzel aus der Varianz.

#### **1.4 Fragestellung und Ziele der Studie**

Die Anzahl der an Osteoporose erkrankten Menschen und die daraus resultierenden gravierenden Folgen nehmen immer mehr zu. Deshalb ist es wichtig, weitere Erkenntnisse über die Erkrankung, die körperlichen Beschwerden samt Langzeitschäden, die Therapie und die Prophylaxe zu erlangen. Die Osteoporose soll früh erkannt und schnell behandelt werden können.

Deshalb ist das Ziel des Teilprojektes T1 des Sonderforschungsbereichs/Transregio 79 („Werkstoffe für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen“), ein mit dem menschlichen osteoporotischen Knochenstatus vergleichbares Modell am Kleintier Ratte zu induzieren und zu etablieren. Der protische-, der steroidinduzierte- und der senile Knochenstatus soll im Tiermodell erzeugt werden. Dies soll durch operative-, hormonelle-, diätetische- und medikamentöse Manipulationen erreicht werden. Die Qualitätssicherung des Tiermodells erfolgte im Versuch durch Messungen *in vivo*, *in vitro* und *ex vivo* an den Tieren.

Dieses standardisierte und reproduzierbare Grundlagenmodell soll dann später zur Untersuchung von Frakturheilung und Defektbehandlung des osteoporotischen Knochens eingesetzt werden können.

Das Ziel dieser Dissertation ist es, das oben beschriebene Grundlagenmodell durch biomechanische Messungen an Knochen *ex vivo* zu sichern und zu etablieren.

Die biomechanischen Messungen an der Ratte finden *ex vivo* statt. Geprüft werden die Wirbelkörperkompression, die Torsion der Tibia und die Drei-Punkt-Biegung der Femura. Die Absicht mit diesen Messungen ist es, Aussagen über die mechanischen Eigenschaften der Tierknochen machen zu können und Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen aufzuzeigen. Die Einflüsse der Osteoporose auf die Stabilität der Knochen sollen so verdeutlicht werden können.

Dass die unterschiedlichen Behandlung und die verschieden langen Standzeiten der Tiere einen maßgeblichen Einfluss auf die Induktion der postmenopausalen-, steroidinduzierten- und senilen Osteoporose haben, soll mittels der durchgeführten biomechanischen Untersuchungen bewiesen werden.

Wegen des langsamen Krankheitsverlaufs der Osteoporose und um krankheitsbeeinflussende Faktoren beim Menschen wie Rauchen, Alkohol, Medikamente und verschiedene Diäten zu eliminieren, muss ein Tiermodell zur Erforschung der Erkrankung etabliert werden [Turner 2001].

Bis heute existiert jedoch noch kein definitiv anerkanntes Tiermodell, in dem die anatomischen Verhältnisse und die hormonellen Systeme mit den humanen vergleichbar sind. Deswegen muss ein dem Menschen ähnliches Tiermodell ausgewählt werden. Später sollen dann Behandlungsmöglichkeiten von Frakturen oder Knochendefekte im porotischen Knochen untersucht werden können [Egermann et al. 2005, Rodgers et al. 1993, Turner 2001].

Für diese Studie wurde das Kleintiermodell der Ratte ausgewählt, da sie in der Erforschung der Osteoporose als aussichtsreiches Modell gilt und viele Daten hierzu vorliegen. Die ovariectomierte Ratte weist beispielsweise viele Charakteristika der postmenopausalen Osteoporose des Menschen auf. Ebenfalls gibt es viele Studien zur Therapie der Osteoporose, bei denen die Ratte als nahezu analoges Modell zum Menschen verwendet wird. Zudem sind die Tiere unkompliziert in der Unterbringung sowie Haltung und weisen eine Spontanovulation auf [Egermann et al. 2005, Heldmaier et al. 2004, Rodgers et al. 1993, Turner 2001].

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an 80 weiblichen, 10 Wochen alten Sprague Dawley Ratten aus der Haltung des „Charles River Labors, Research Models and Services Germany“ (Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld) durchgeführt. Die durchzuführenden Operationen fanden jeweils nach weiteren 4 Wochen Standzeit im Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen (Frankfurterstraße 105, 35392 Gießen) statt. Der Operationszeitpunkt entsprach dem Zeitpunkt Null in der Versuchsreihe. Die Angaben zum Alter der Tiere bzw. den Tötungszeitpunkten 3, 12 und 14 Monate beziehen sich immer auf diesen Ausgangszeitpunkt.

Der Tierversuchsantrag wurde am 17.02.2010 nach § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt.

Die 80 Tiere wurden in 8 Gruppen mit jeweils 10 Tieren eingeteilt:

Gruppe 0: Messbasis = baseline (n = 10)

Bei dieser Gruppe wurde keine Operation durchgeführt. Die Ratten wurden zum Zeitpunkt Null getötet und dienten als Kontrolle.

Gruppe 1: Sham (n = 10)

Die Standzeit betrug 14 Monate. Die Tiere dieser Gruppe wurden einer Sham-Operation unterzogen (s. Kapitel 2.6).

Gruppe 1 a: Sham (n = 10)

Die Standzeit betrug 3 Monate. Es erfolgte ebenfalls eine Sham-Operation.

Gruppe 1 b: Sham (n = 10)

Die Standzeit der Tiere betrug nach einer Sham-Operation 12 Monate.

Gruppe 2: Postmenopausale Osteoporose (n = 10)

Die Standzeit betrug 3 Monate. Bei diesen Tieren wurde eine Ovariectomie durchgeführt. Anschließend erhielten die Tiere für 12 Wochen eine Diät (s. Kapitel 2.5).

Gruppe 3: Steroidinduzierte Osteoporose (n = 10)

Die Standzeit betrug 3 Monate. Diese Tiere wurden ebenfalls ovariectomiert. Ihnen wurden anschließend alle 3 Wochen nach der Operation und insgesamt 12 Wochen lang Steroide injiziert.

Gruppe 4a: Senile Osteoporose (n = 10)

Die Standzeit betrug nach einer Ovariectomie 12 Monate. In dieser Zeit erhielten die Tiere eine Diät (s. Kapitel 2.5).

Gruppe 4b: Senile Osteoporose (n = 10)

Die Standzeit betrug 14 Monate. Nach der Ovariectomie wurden die Tiere diätetisch ernährt (s. Kapitel 2.5).

## **2.2 Tierhaltung und –betreuung**

Die Haltung der Tiere erfolgte in einem für Labortiere ausgestatteten Makrolonkäfig Typ III und IV mit Einstreu (Abb. 8).

Die Tierhaltung, Operationen und die Nachsorge bis zur Tötung unterlagen regelmäßigen strengen veterinärmedizinischen Kontrollen. Die Tiere befanden sich während der gesamten Versuchsreihe im Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität in Gießen.

Die Tiere wurden artgerecht gehalten und von Pflegern sowie Tierärzten mit langjähriger Berufserfahrung betreut.



Abb. 8: Die Tierhaltung in den Makrolonkäfigen.

Die Fütterung wurde der jeweiligen Versuchsgruppe angepasst. Das Wasser erfolgte ad libidum.

### **2.3 Versuchsprotokoll**

Die Tierversuche des Projekts T1 des SFB/TRR 79 wurden nach Stellungnahme des Tierschutzbeauftragten nach § 8b Absatz 3 Nr. 3 vom Regierungspräsidium Gießen, Veterinärdezernat (Schanzenfeldstraße 8, 35578 Wetzlar) genehmigt. Die Genehmigung erfolgte auf Antrag nach § 8 Abs. 2 des Tierschutzgesetzes.

Die 80 weiblichen Sprague Dawley Ratten wurden wie weiter oben beschrieben in insgesamt 8 gleichgroße Gruppen mit jeweils 10 Tieren eingeteilt.

Nach einer Standzeit von 4 Wochen im Zentralen Tierlabor in Gießen wurde die Ovariectomie bei den Ratten der Gruppen 2, 4a, 4b und 3 durchgeführt. Die Ratten der Gruppe 1, 1a und 1b wurden Sham operiert (Tab. 4). Dies entspricht dem Zeitpunkt Null der Versuchsreihe. Zur selben Zeit wurden die Tiere der Gruppe 0 getötet, da sie eine Messbasis darstellen sollten.

	Gr. 0	Gr. 1	Gr. 1a	Gr. 1b	Gr. 2	Gr. 3	Gr. 4a	Gr. 4b
<b>Sham</b>		X	X	X				
<b>OVX</b>					X	X	X	X

Tab. 4: Übersicht über die Operationen (OVX = Ovariectomie).

Die Tötungen der jeweiligen Gruppen fanden zum Zeitpunkt Null, nach 3, 12 und 14 Monaten statt (Tab. 5).

	Messbasis bzw. Sham	OVX + Diät / Steroid
<b>0 Monate</b>	Gr. 0	
<b>3 Monate</b>	Gr. 1a	Gr. 2 / 3
<b>12 Monate</b>	Gr. 1	Gr. 4a
<b>14 Monate</b>	Gr. 1b	Gr. 4b

Tab. 5: Übersicht über die Zeitpunkte der Tötungen (OVX = Ovariectomie).

Nach der Tötung wurden die Knochen präpariert und bei -20 °C in Kompressen mit 0,9%iger NaCl eingefroren. Auf Trockeneis wurden sie nach Ulm in das Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik (Helmholzstraße 14, 89091 Ulm) transportiert. Dort wurden sie bis zu den Messungen weiter eingefroren.

Knochen	Messung/Parameter
<b>Wirbelkörper (Th8 und Th9)</b>	Kompressionsversuch: - Kompressionskraft [N]
<b>Tibia (rechts)</b>	Torsionsprüfung: - Torsionssteifigkeit [Nmm/°] - Bruchmoment [Nmm]
<b>Femur (rechts)</b>	Drei-Punkt-Biegung: - Biegesteigung [N/mm] - Bruchkraft [N]

Tab. 6: Übersicht über die Messungen der Knochen und der gemessenen mechanischen Parameter.

Aufgetaut konnten sie weiterbearbeitet und schließlich gemessen werden. Es folgten Messungen an den Wirbelkörpern, den Tibiae rechts und den Femura rechts (Tab. 6).

## **2.4 Randomisierung**

Um Strukturgleichheit für die jeweiligen Gruppen herzustellen, wurden die Tiere auf diese Gruppen randomisiert. Die 80 weiblichen Ratten wurden nach Ankunft im Zentralen Tierlabor in Gießen per Los den einzelnen Gruppen zugeordnet. So wurde gewährleistet, dass jedes Tier die gleiche Chance hatte in die jeweilige Gruppe zu gelangen. In der jeweiligen Gruppe wurde ihnen dann eine Tiernummer zugelost. Die zeitliche Reihenfolge der Operationen wurde ebenfalls per Zufallsprinzip durchgeführt.

## **2.5 Diät und Gukokortikoidgabe**

Die Gruppen 2, 4a und 4b erhielten zusätzlich zwischen Ovariectomie und der Tötung eine Diät. Diese Diät war Soja- und Phytoestrogenfrei. Sie beinhaltete wenig Vitamin D2 und D3, sowie wenig Vitamin K und Kalzium. Zudem sollte eine geringe Phosphatversorgung herrschen. Durch die Diät sollte ein Mangel dieser Stoffe bei den Tieren vorherrschen. Das Futter wurde über Altromin Spezialfutter GmbH (Altromin-C1034, Lage, Deutschland) bezogen.

Für die Steroidgabe der Gruppe 3 wurde ein Dexamethason-21-isonicotinat 0,3 mg/kg KG (Voren-Depot<sup>®</sup>, Boehringer-Ingelheim, Deutschland) verwendet. Es wurde jedem Tier dieser Gruppe in der oben genannten Dosis alle 3 Wochen s.c. appliziert. Es wurde 2 Wochen nach der Operation bei gesicherter Wundheilung mit den Injektionen begonnen und bis zur Tötung fortgeführt.

## **2.6 Operationsverlauf**

Jedes Versuchstier, bis auf die Tiere der Gruppe 0, wurde unter Narkose einer Ovariectomie oder einer Sham-Operation unterzogen. Zur Narkose diente eine Mischspritze mit 7,5 mg/kg KG Xylazin (Rompun<sup>®</sup> 2%, Bayer) und 62,5 mg/kg KG Ketamin (Hostaket<sup>®</sup>, Hoechst). Die Substanzen wurden in 0,9% körperwarmer NaCl-Lösung gelöst und i.v. in die Schwanzvene mit einer G26 Kanüle injiziert.



Die jeweilige Ratte wurde ventral auf eine Heizmatte mit einer Temperatur von maximal 38 °C gelegt. Vor der Operation wurde die Haut im Bereich des Rückens und der Lendenwirbel rasiert (Abb. 9, Rasierer für Labornager, Indulab Model 1574) und anschließend mit nichtalkoholischem Desinfektionsmittel (Braunol<sup>®</sup>) desinfiziert. Das Operationsgebiet wurde anschließend steril abgedeckt.



Abb. 9: Die Ratte ist am Rücken rasiert und liegt auf der Heizmatte.

Der operative Zugang erfolgte über einen ca. 1,5 cm langen Hautschnitt unterhalb des Rippenbogens über der Wirbelsäule in kraniokaudaler Richtung. Das Bindegewebe wurde zwischen Haut und Muskel stumpf freipräpariert. Die Bauchwand wurde mit einer Pinzette angehoben und das Peritoneum scharf eröffnet. Der Schnitt wurde verlängert um in der Bauchhöhle präparieren zu können. Uterus, Ovar und das sie umgebende Fettgewebe wurden mit einer Pinzette vorsichtig nach außen luxiert. Nach der Freipräparation des Ovars wurde der Eileiter doppelt ligiert (Abb. 10) und anschließend durchtrennt (Abb. 11).

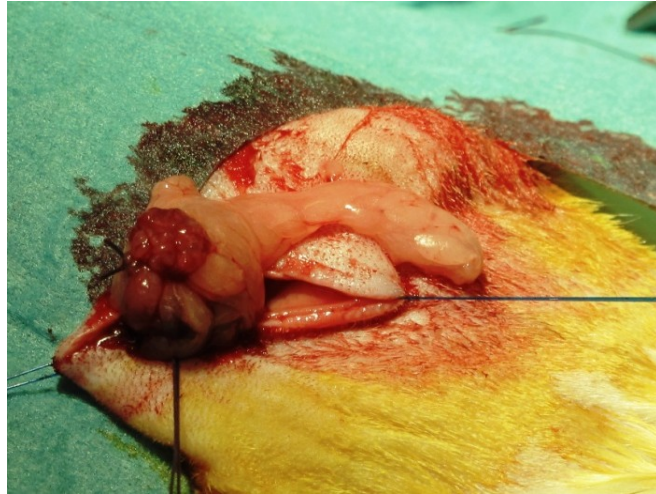


Abb. 10: Vorlagerung und Abbinden des Ovars.

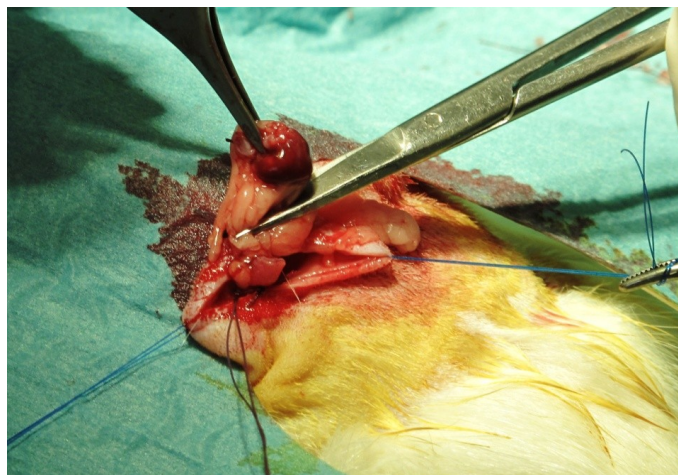


Abb. 11: Abtrennung des Ovars zwischen den zwei Ligaturen.

Die Bauchhöhle wurde mit einem resorbierbaren 5-0 (Vicryl UPS = 1,0 metric) Faden mit 2 bis 3 Einzelknoten verschlossen.

Der gleiche Eingriff mit der Abtrennung des Ovars erfolgte anschließend auf der anderen Körperseite.

Die Hautnaht erfolgte mit 3 bis 4 Wundverschlussklammern und wurde anschließend noch einmal desinfiziert (Abb. 12).

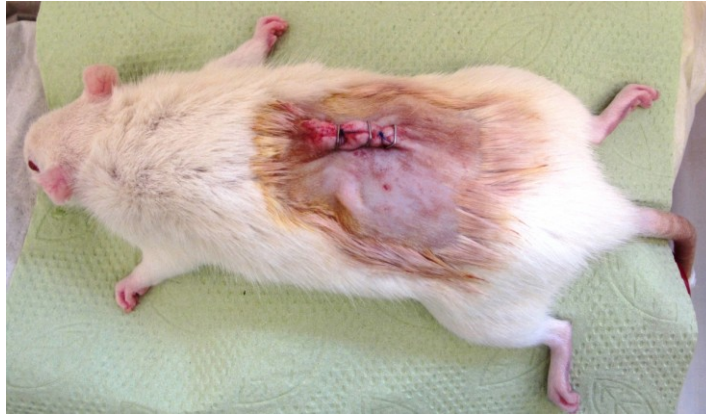


Abb. 12: Die geklammerte Naht am Rücken in der Aufwachphase nach der Operation.

Bei der Sham-Gruppe erfolgten ebenfalls die oben beschriebenen Haut- und OP-Schnitte, Eröffnungen und Verschlüsse des Peritoneums. Die Ovarien wurden hervor- und anschließend wieder intraperitoneal verlagert. Anschließend erfolgte eine Hautklammerung (Abb. 12 und 13).

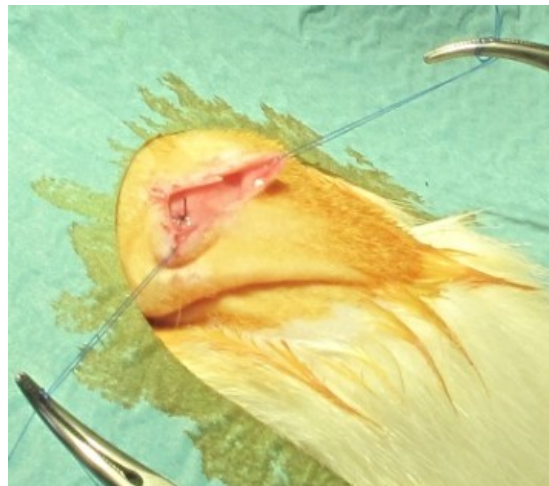


Abb. 13: Eröffnung des Peritoneums bei der Sham-Operation.

Mit diesem Eingriff sollten Begleitfaktoren einer Operation, wie der perioperative Stress und der Wundschmerz in allen Vergleichsgruppen verursacht werden.

## 2.7 Postoperativer Verlauf

Noch während der postoperativen Narkosephase erfolgte eine DXA-Messung. Hiernach wurden die Tiere bis zum Wiedererlangen des vollen Bewusstseins in einer warmen, gut

kontrollierten Umgebung gehalten. Die Temperatur und das klinische Erscheinungsbild der Tiere wurden stets kontrolliert. Danach wurden sie in Käfige zur Einzelhaltung zurück gesetzt. Diese wurde für 5 Tage beibehalten, damit sich die Tiere nicht gegenseitig unter der Schmerzbehandlung mit Meloxicam (Metacam<sup>®</sup>, s.c. 2 mg/kg KG/d über 3-5 Tage) verletzen konnten. Tierärzte und Pfleger beurteilten und prüften täglich das Verhalten und Allgemeinbefinden der Tiere, sowie führten regelmäßige Wundkontrollen durch.

### **2.8 Tötungen**

Nach einer Beobachtungszeit von 0, 3, 12 oder 14 Monaten wurden die Tiere der jeweiligen Gruppe schmerzlos mittels CO<sub>2</sub>-Narkose getötet.

Anschließend wurden in Rückenlage von ventral alle Hautschichten des Abdomens mit Skalpell und Schere eröffnet bis die Bauchhöhle sichtbar war. Es wurde sofort mittels einer Kanüle Blut aus der Vena cava entnommen und weiteren Teilprojekten des SFB/TRR 79 für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Der Bauchraum wurde weiter eröffnet. Die inneren Organe Herz, Leber, Niere, Lunge und Milz wurden entnommen. Sie wurden an die jeweiligen Gruppen der Teilprojekte des SFB/TRR 79 zu Analysen weitergegeben.

Nun wurden die 4 Extremitäten mit Schere und Skalpell vom Körperstamm abgetrennt. Die einzelnen Knochen der Extremitäten wurden mittels behutsamer Durchtrennung der Gelenke durch ein Skalpell separiert. Anschließend wurden die Knochen vom umgebenden Gewebe bis auf das Periost entfernt, ohne diese zu beschädigen. Die Präparation erfolgte ebenfalls mit Skalpell und Pinzette. Bei dem rechten Femur und der rechten Tibia mussten besonders gut das proximale und distale Ende präpariert sein, um sie später für die eigentliche biomechanische Messung vorbereiten zu können (Abb. 14).



Abb. 14: Rechter Femur und rechte Tibia nach der Präparation.

Abschließend wurde die Wirbelsäule im Ganzen entnommen (Abb. 15). Die einzelnen Wirbelkörper wurden mit Skalpell voneinander getrennt und ebenfalls vom weichen Gewebe befreit. Bei den Wirbelkörpern Th8 und Th9 wurden zusätzlich die Bandscheiben und das Rückenmark entfernt, sodass nur noch der Wirbelkörper mit seinen Fortsätzen übrig blieb (Abb. 16).



Abb. 15: Die Wirbelsäule vor der Präparation.



Abb. 16: Ein Wirbelkörper (BWS) nach der Präparation.

Das rechte Femur, die rechte Tibia und die Wirbelkörper Th8 und Th9 wurden in mit isotonischer 0,9%iger NaCl-Lösung benetzten Kompressen eingewickelt und bei -20°C im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der JLU - Gießen (Kerkraderstraße 9, 35394 Gießen) eingefroren. Von Gießen wurden die Proben auf Trockeneis nach Ulm transportiert. Im Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universitätsklinik Ulm (Institutsleiterin Frau Univ. - Prof. Dr. med. vet. Anita Ignatius) fanden die biomechanischen Messungen statt. Die Knochen wurden vor den Messungen aufgetaut und weiter aufgearbeitet. In den Abschnitten 2.9.1 bis 2.9.3 wird genauer auf die jeweiligen Vorbereitungen für die Kompressions-, Torsions- und Drei-Punkt-Biegungs-Versuche eingegangen.

## **2.9 Biomechanische Testung**

### **2.9.1 Kompression der Wirbelkörper**

Die Wirbelkörper 8 und 9 der Brustwirbelsäule (Th8 und Th9) der Ratten wurden für die Kompressionsmessung verwendet. Die Bandscheiben der Wirbelkörper mussten mit entfernt werden, da die Wirbelkörper sonst zwischen den Druckstempeln der Prüfmaschine leicht weggerutscht wären.

Die anschließende Messung wurde auf der Materialprüfmaschine (Typ Z10, Serien-Nr. Ab 480483) der Firma Zwick durchgeführt (Abb. 17). Die Kraftmessdose (Typ KAF-TC, der Firma A.S.T., Serien-Nr. 814221) hatte ein Maximum von 500N.

Die Wirbelkörper wurden in proximal-distaler Ausrichtung zwischen dem Auflager und dem Druckstempel positioniert (Abb. 18). Durch das Absenken des Druckstempels wurden sie kontinuierlich und gleichmäßig mit einer Geschwindigkeit von 10 mm/min bis zu ihrem Versagen belastet. Die maximale Kraft [N], die der Wirbelkörper dem Druckstempel entgegensetzen konnte, wurde gemessen und aufgezeichnet.

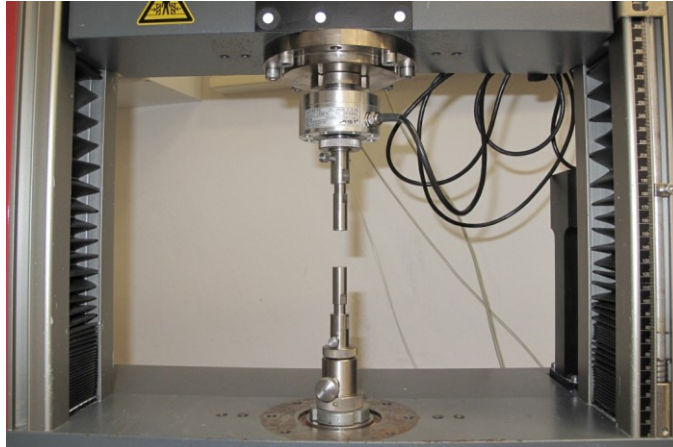


Abb. 17: Die Prüfmaschine (Typ Z10, Serien-Nr. Ab 480483) der Firma Zwick zur Kompression der Wirbelkörper.

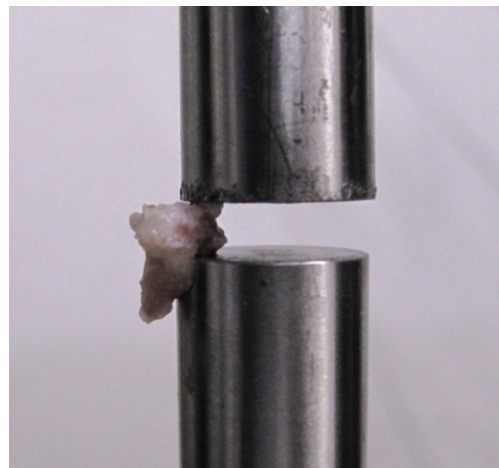


Abb. 18: Die Kompression eines Wirbelkörpers. Der Wirbelkörper befindet sich zwischen dem Auflager und dem Druckstempel.

Zwischen den einzelnen Messungen der jeweiligen Tests war es wichtig die Knochen feucht zu halten, damit sie nicht austrockneten. Hierfür wurden ebenfalls mit isotonischer 0,9%ige NaCl-Lösung benetzte Kompressen benutzt. Dies wurde auch bei den Torsionsmessungen der Tibiae und der Drei-Punkt-Biegeprüfung der Femora berücksichtigt.

### **2.9.2 Torsion der Tibiae**

Für die Torsionsprüfung wurden die, ebenfalls vom tierischen Weichteilgewebe vollständig befreiten, rechten Tibiae der jeweiligen Tiere verwendet. Die Messungen erforderten eine weitere Vorbereitung der Tibiae. Hierzu wurden das proximale und das distale Ende der Knochen jeweils fest in kleine Aluminiumhülsen eingegossen. Ein

Gemisch aus Technovit<sup>®</sup> 3040 Pulver (Kaltpolymerisierender Kunststoff für Oberflächenprüfungen und Abdrucknahme, gelb) und Technovit<sup>®</sup> universal liquid diente zum Eingießen. Das Pulver und die Flüssigkeit wurden im Verhältnis 2:1 gemischt und in die Hülsen gespritzt. Es durften keine Luftblasen eingegossen werden, da die Knochen sonst nicht maximal fixiert gewesen wären. Eine Eingießvorrichtung mit Probenhalterung (Eigenbau des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Universität Ulm) diente als Hilfe, damit ein senkrecht eingießen der Knochen gewährleistet werden konnte (Abb. 19).



Abb. 19: Die Tibia in der Eingießvorrichtung. Das distale Ende ist in Technovit<sup>®</sup> eingebettet.

Nach einer Trockenzeit des Technovits<sup>®</sup> von ca. 15 Minuten konnte die Messung mit der Materialprüfmaschine Typ Z10 der Firma Zwick (Serien-Nr. AB 480483) erfolgen. Als Erstes wurde ohne den Knochen eine Korrekturkurve im Bereich der Kraftmessdose (Typ KAP-Z, Firma A.S.T., Serien-Nr. 151450, Messbereich  $\leq 40$  N) gefahren, um so mögliche Messfehler zu reduzieren. Es gilt, je steifer die Probe desto größer der Messfehler. Anschließend wurden die beiden eingegossenen Enden des Knochens in die Torsionseinrichtung (Eigenbau des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Universität Ulm) eingespannt. Das proximale Ende der Tibia wurde dabei fest fixiert. Das Distale war in seiner Verankerung ebenfalls fest fixiert, jedoch um die Längsachse des Knochens zirkulär beweglich. Über einen Hebelarm wurde die aufzuwendende Kraft übertragen und die Probe tordiert (Abb. 20 und 21).



Es folgten 3 Messungen mit jeweils 1 N und einer Prüfgeschwindigkeit von 10 mm/min. Durch die ersten beiden Messungen wurde die Probe richtig platziert. Mit den Messergebnissen des 3. Durchlaufs wurde die Torsionssteifigkeit [Nmm/°] ermittelt.

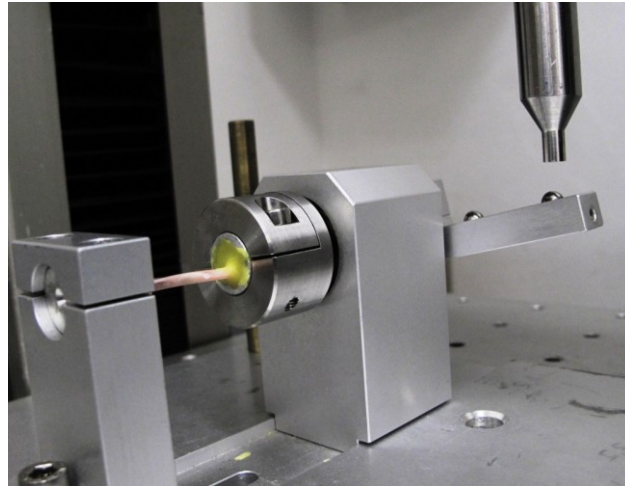


Abb. 20: Die Tibia ist in der Materialprüfmaschine eingespannt.

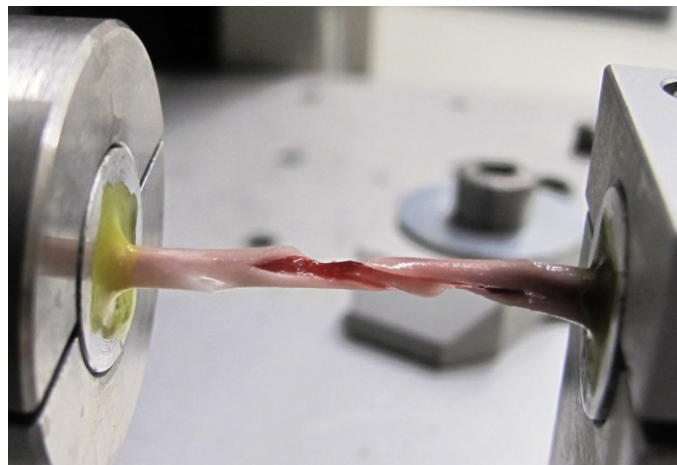


Abb.21 : Die Tibia in den Halterungen der Prüfmaschine nach dem Bruch.

Anschließend wurde der Knochen in einer 4. Messung so lange mit einer Geschwindigkeit von 20 mm/min tordiert, bis er zerbrach. Hierdurch wurde das Bruchmoment [Nmm] des Knochens ermittelt.

### **2.9.3 Drei-Punkt-Biegung der Femura**

Die rechten Femora wurden einer Drei-Punkt-Biege-Messung unterzogen. Die Knochen wurden ebenfalls in eine Eingießvorrichtung mit Probenhalterung (s. Kapitel 2.9.2) eingespannt. Das distale Ende des Knochens wurde mit Technovit<sup>®</sup> (s. Kapitel 2.9.2) in

kleine Aluminiumhülsen eingegossen. Die Probenhalterung diente zum senkrechten Eingießen der Proben, damit diese später in die Materialprüfmaschine eingespannt und so standardisierte Messungen durchgeführt werden konnten (Abb. 22).

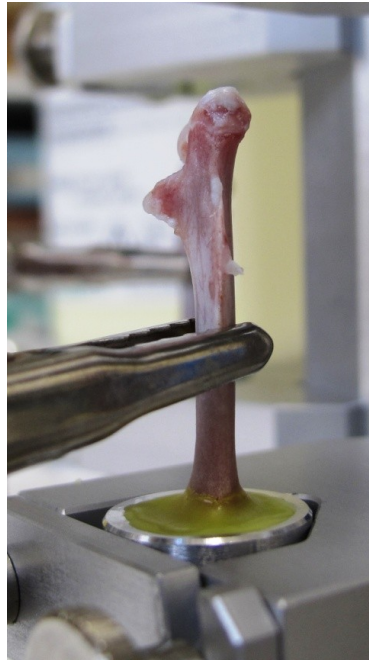


Abb. 22: Rechter Femur in der Probehalterung. Das distale Ende ist in Technovit<sup>®</sup> eingebettet.

Mit der Materialprüfmaschine des Typs Z10 der Firma Zwick (Serien-Nr. AB 480483) erfolgte die Drei-Punkt-Biege-Messung. Als erstes wurde auch hier eine Korrekturkurve der Kraftmessdose von  $\leq 500$  N (Typ KAF-TC, Firma A.S.T., Serien-Nr. 814221) mit einem Dummy (Eigenbau des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Universität Ulm) mit maximaler Steifheit erstellt. Die eigentlichen Messwerte der Knochen wurden mit der Korrekturkurve verrechnet, um Messfehler zu eliminieren (Abb. 23).

Das distale Ende des Femur wurde in die Drei-Punkt-Biegungsvorrichtung mit Halterung für Rattenknochen (Eigenbau des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Universität Ulm) eingespannt. Das proximale Ende lag locker auf einem Auflager auf. Eine Stützweite von 32 mm wurde eingestellt. Die Stützweite entsprach der Länge des frei hängenden Knochens. Weiter wurde sichergestellt, dass die Krafteinwirkung mittig zwischen den Auflagern und senkrecht zur Längsachse des Femur erfolgte. Die Kraft wurde über eine Druckfinne (Eigenbau des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Universität Ulm) auf den Femur übertragen (Abb. 25).

In Abbildung 24 ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt (s.u.).

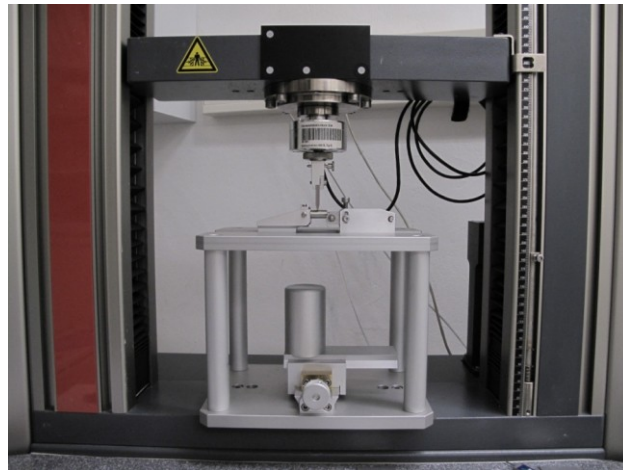


Abb. 23: Die Prüfvorrichtung für die Messung der Rattenfemora mit eingespanntem Dummy.

Die Knochen wurden zweimal mit einer Kraft von 5 N und einer Geschwindigkeit von jeweils 1 mm/min vorbelastet, danach mit 20 N und 1 mm/min Geschwindigkeit. Für die Auswertungen der Biegesteigung wurde der 3. Zyklus (20 N) verwendet, da auch hier zuerst ein richtiges Setzen der Probe für die eigentliche Messung vorausgehen musste. Im 4. Zyklus wurden die Femura mit einer Geschwindigkeit von ebenfalls 1 mm/min bis zum Bruch geprüft (Abb. 25 und 26).

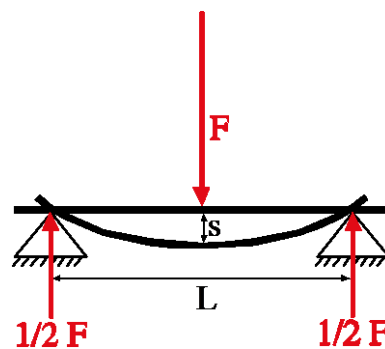


Abb. 24: Schematische Darstellung der Drei-Punkt-Biegung. [Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik]

$L$  = Abstand der Befestigung und Auflagefläche des Femur (Stützweite = 32mm)

$F$  = einwirkende Kraft auf den Femur über die Druckfinne [N]

$S$  = Verformung der Probe [mm] (entspricht dem bei der Messung zurückgelegten Weg der Druckfinne)

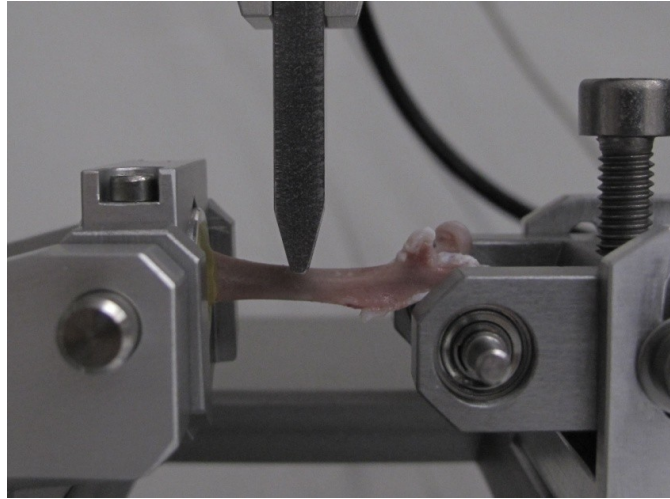


Abb. 25: Das in die Prüfmaschine eingespannte Femur wird gemessen (3-Punkt-Biegung).

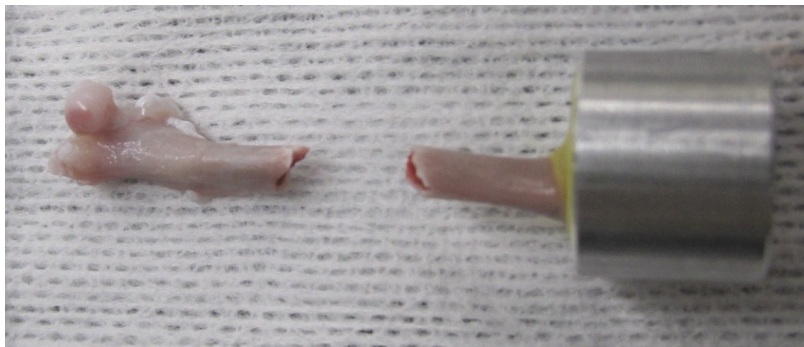


Abb. 26: Nach der 4. Messreihe ist das Femur gebrochen.

Die Ermittlung der Bruchkraft [N] und der Biegesteigung [N/mm] des Femurs erfolgte durch diese Messung.

### 2.10 Fotodokumentation

Die gesamte fotografische Dokumentation der Tierhaltung, Operationen, DXA-Messungen, Tötungen und biomechanischen Messungen, sowie deren Vorbereitungen und Verlauf, erfolgte mit einer Canon Digitalkamera Typ „Power Shot G10“. Ebenfalls wurden mit dieser Kamera die morphologischen Veränderungen der Knochen im Laufe der Testreihe festgehalten.

Kurze Videosequenzen konnten mit derselben Kamera aufgenommen und dann für Vorträge verwendet werden.

### **2.11 Statistische Auswertung der Daten**

Die Datenaufnahme und Auswertungen der Testreihe erfolgte mit dem Materialprüfprogramm testXpert II Version 3.2. der Fima Zwick. Dieser Vorgang fand im Institut für Biomechanische Forschung und Unfallchirurgie der Universität Ulm statt. Abschließend wurden die Daten in Excel-Tabellen exportiert.

Die statistische Weiterverarbeitung erfolgte am PC Lenovo Z360 mit dem Programm Microsoft EXCEL 2007<sup>®</sup>. Es wurden die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung berechnet und die Diagramme für diese Dissertation erstellt.

Für die weitere statistische Auswertung, einschließlich der Varianzanalyse und der deskriptive Analyse der Daten wurde das Programm IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> Version 20 am Institut für Medizinische Informatik (Leiter: Dr. R.-H. Bödeker) der Justus-Liebig Universität Gießen verwendet. Die Auswertung wurde zusammen mit dem wissenschaftlichen Mitarbeiter des SFB 79/TRR Dr. Thaqif ElKhassawna durchgeführt. Es wurden die Tests One-way-ANOVA sowie der Bonferroni Post-Hoc-Test durchgeführt. Ebenfalls erfolgten diese Auswertungen auf dem PC Lenovo Z360.

Die Textverarbeitung der Dissertation erfolgte auf dem PC Lenovo Z360 mit Microsoft WORD 2007<sup>®</sup>.

Die Fotobearbeitung wurde mit Microsoft Office Picture Manager 2007<sup>®</sup> durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klinischer Verlauf

Der klinische Verlauf der Tiere und der unterschiedlichen Gruppen war während der gesamten Projektzeit sehr verschieden.

Bereits zu Beginn der Versuchsreihe starben einige Tiere. Während bzw. nach den Operationen lebten einige Ratten vermutlich auf Grund des Operationsstressses und der Narkose ab.

Die Diät-Gruppen der 12 und 14 Monatstiere zeigten klinisch bereits während der Versuchsreihe „Osteoporosezeichen“ (s. Kapitel 1.1.5), wie eine Verformung der Wirbelsäule. Die Tiere bewegten sich kaum noch im Käfig. Da es somit ethisch nicht mehr vertretbar war die Ratten noch länger leben zu lassen, um die geplante Standzeit von 18 Monaten zu erreichen, wurde diese von den Gruppen 1 und 4b auf 14 Monate verkürzt.

Bei den Tieren der Steroid-Gruppe traten zusätzlich klinisch stark ausgeprägte Glykokortikoidnebenwirkungen, wie ein gelbes Fell, Stammfettsucht und eine derbe Haut auf.

### 3.2 Allgemeine Parameter

Die 80 weiblichen Ratten hatten zum Zeitpunkt Null ein durchschnittliches Gewicht von 274,87 g ( $\pm$  14,62 g).

Nach 3 Monaten erreichten die Sham-Tiere ein mittleres Gewicht von 323,33 g. Nach weiteren 9 Monaten nahmen die Tiere noch mal um durchschnittlich 100,38 g (423,71g) zu, um dann ein durchschnittliches Endgewicht nach insgesamt 14 Monaten von 472,67 g zu erreichen. Die Steroid-Gruppe wog nach 3 Monaten durchschnittlich 341,67 g und lag somit 18,34g über der Sham-Gruppe (Tab. 7 und Abb. 27).

	Sham	OVX + Diät	OVX + Steroide
<b>0 Monate</b>	276,98 ± 12,11	268,93 ± 14,14	276,1 ± 13,73
<b>3 Monate</b>	323,33 ± 16,48	361,72 ± 21,96	341,67 ± 31,67
<b>12 Monate</b>	423,71 ± 41,08	389 ± 44,76	
<b>14 Monate</b>	472,67 ± 14,59	371,25 ± 67,41	

Tab. 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der Gewichte in Gramm (g) der jeweiligen Versuchsgruppen.

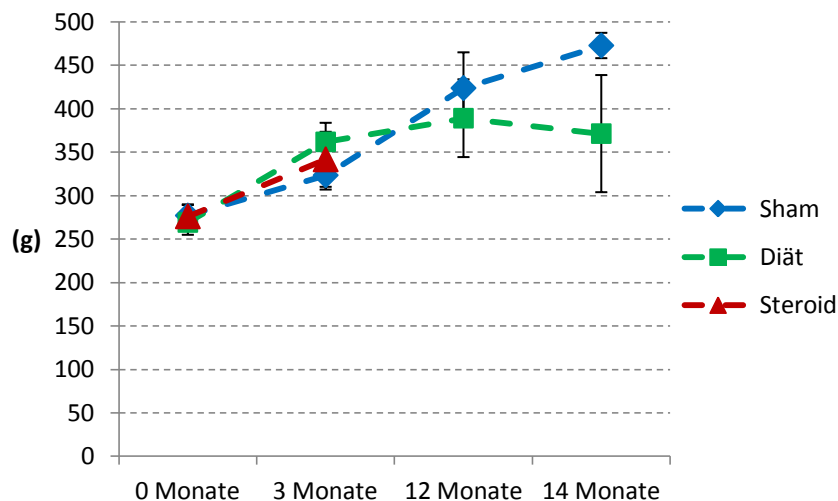


Abb. 27: Gewichtsentwicklung der Gruppen (Sham, Diät und Steroid) im zeitlichen Verlauf.

Die Diät-Gruppe erreichte nach 3 Monaten ein Gewicht von 361,72 g. Dies entsprach einem Zuwachs von 38,39 g im Vergleich zur Sham-Gruppe. Nach insgesamt 12 Monaten nahm das Gewicht nur wenig zu und lag somit bereits mit durchschnittlichen 389 g unter der Vergleichsgruppe. Nach weiteren 2 Monaten verloren die Diättiere etwas an Gewicht. Die Tiere wogen noch 371,25 g (Tab. 7 und Abb. 27).

### 3.3 Knochenmorphologie

Während der Präparationen zeigten sich mit zunehmender Versuchsdauer deutliche makroskopische Unterschiede von Knochen und Gewebe bei den Ratten.

### 3 Monate Standzeit

Nach insgesamt 3 Monaten sah man zwischen den verschieden behandelten Gruppen keine enormen makroskopischen Unterschiede. Bei den Wirbelkörpern waren keine merklichen Veränderungen zu sehen. Jedoch war im Vergleich zur Ausgangsgruppe (Kontrolle) ein Längenwachstum der Röhrenknochen zu erkennen, da die Tiere zu diesem Zeitpunkt (Zeitpunkt Null) noch nicht ausgewachsen waren (Abb. 28 und 29).



Abb. 28: Tibia der Kontrolle.



Abb. 29: Tibia der Sham-Gruppe nach 3 Monaten.



Abb. 30: Tibia der Sham-Gruppe nach 14 Monaten.

### Sham-Gruppe im Verlauf

In den Sham-Gruppen nahmen bei Tibia und Femur das Dicken- und Längenwachstum im Verlauf der Studie deutlich zu. Die Strukturen des Knochens waren gut abgrenzbar. Das Periost war glatt begrenzt und der äußerlich Knochen nicht beschädigt. Es waren keine äußerlichen Strukturdefizite erkennbar (Abb. 30 und 31).





Abb. 31: Femur der Sham-Gruppe nach 3 (links) und 14 Monaten (rechts).



Abb. 32: Wirbelkörper der Sham-Gruppe nach 3 Monaten.



Abb. 33: Wirbelkörper der Sham-Gruppe nach 14 Monaten.

Im Vergleich der Dreimonatstiere nahmen die Wirbelkörper der Ratten nach 12 und 14 Monaten an Volumen und Größe zu. Ebenfalls zeigten sich die Fortsätze der Wirbelkörper prominenter (Abb. 32 und 33).

#### Diät-Gruppe im Verlauf

Bei den 12-Monatstieren der Diät-Gruppe konnte beobachtet werden, dass die Knochenstruktur aufgelockerter, nicht mehr so dicht gepackt war und instabiler wirkte. Diese morphologischen Veränderungen verstärkten sich bei der Diät-Gruppe nach insgesamt 14 Monaten. Die Knochen waren stärker aufgelockert, die äußerlichen

Strukturen nicht mehr glatt begrenzt und das Periost wirkte zerklüftet. Die Gelenkflächen waren beschädigt. Bei den Femura waren die Kondylen und der proximale Anteil deformiert (Abb. 34, 35 und 36). Bei den Tibiae war zudem das Plateau stark deformiert (Abb. 37 und 38). Die Knochen waren allgemein kürzer als die der Vergleichsgruppe, hatten jedoch merklich an Umfang zugenommen.



Abb. 34: Femur der Sham-Gruppe nach 3 (links) und 14 Monaten (Mitte), sowie der Diät-Gruppe nach 14 Monaten (rechts).



Abb. 35: Femur der Diät-Gruppe nach 12 Monaten.



Abb. 36: Femur der Diät-Gruppe nach 14 Monaten.



Abb. 37: Tibia der Diät-Gruppe nach 12 Monaten.



Abb. 38: Tibia der Diät-Gruppe nach 14 Monaten.



Abb. 39: Wirbelkörper der Diät-Gruppe nach 14 Monaten (links) und der Sham-Gruppe nach 3 Monaten (rechts).

Die Wirbelkörper wirkten volumenvermehrt, die Dornfortsätze jedoch weniger stark ausgeprägt und teilweise verkümmert (Abb. 39).

### 3.4 Biomechanische Testungen

Die durchgeführten biomechanischen Messungen sollten Auskunft über die mechanischen Eigenschaften der Knochen geben. Somit lassen sich Aussagen über die Osteoporoseentwicklung durch unterschiedliche Behandlungen (Sham, OVX + Diät und

OVX + Steroid) und unterschiedlich lange Standzeiten (3, 12 und 14 Monate) bei den Versuchstieren machen.

### 3.4.1 Kompression der Wirbelkörper

Bei der Kompressionsprüfung der Wirbelkörper Th8 und Th9 wurde die Kraft [N] bis zum Zerschneiden der Wirbelkörper ermittelt.

Im Laufe der Versuchsreihe kam es in der Diät-Gruppe bereits zu spontanen Frakturen, sodass diese Wirbelkörper nicht mehr mit gemessen werden konnten.

#### Messzeitpunkt 3 Monate

Die Kompressionskraft der Wirbelkörper der Diättiere wurde mit durchschnittlich 106,4 N (Th8) und 101,7 N (Th9) bestimmt. Im Vergleich mit der Sham-Gruppe (Th8: 162,17 N und Th9: 180,21 N) zeigte sich bei beiden Wirbelkörpern ein signifikanter Unterschied (Th8:  $p = 0,002$  und Th9:  $p < 0,001$ ).

Die Steroid-Gruppe erreichte mittlere Werte von 114,8 N (Th8) und 126,1 N (Th9). Auch hier fand sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Sham-Gruppe (Th8:  $p = 0,011$ , Th9:  $p = 0,006$ ).

Zwischen der Diät- und Steroid-Gruppe kam es bei Th8 zu einer Erhöhung im Mittel von 8,4 N ( $p = 0,844$ ) und bei Th9 von 24,4 N ( $p = 0,304$ ). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (Abb. 40 und 41).

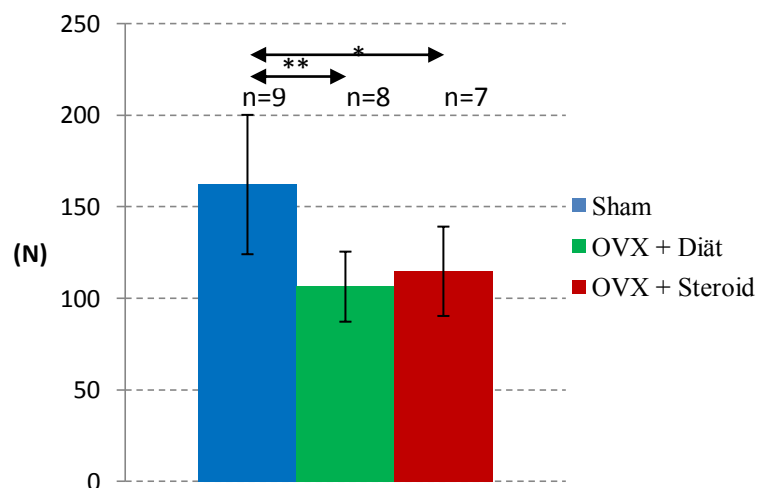


Abb. 40: Kompressionskraft von Th8 nach 3 Monaten (Sham, OVX +Diät, OVX + Steroid im Vergleich).

\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

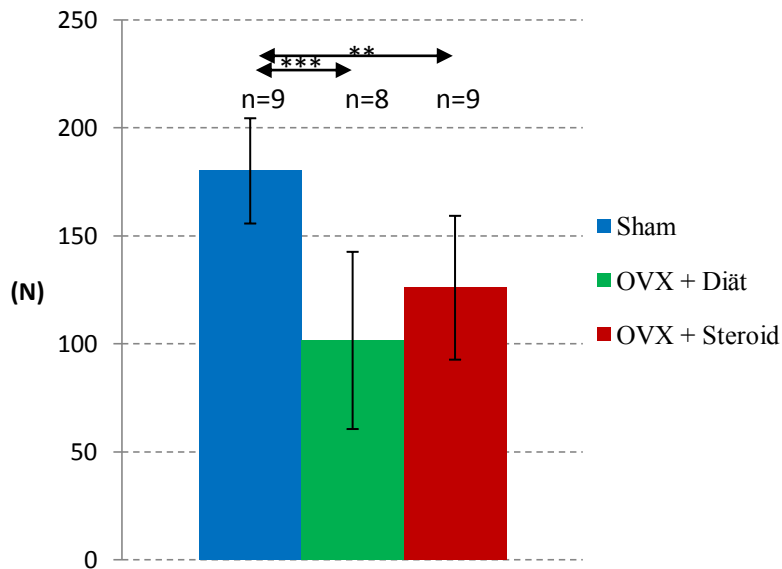


Abb. 41: Kompressionskraft von Th9 nach 3 Monaten (Sham, OVX +Diät, OVX + Steroid im Vergleich).

\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

### Verlauf der Standzeiten

#### **Monat 3**

Zwischen den Zeitpunkten Null (Messbasis: Th8 n=9, Th9 n=10) und 3 Monaten nahm die Kraft zur Sham-Gruppe im Mittel von 142,66 N (Th8) um 19,51 N zu. Bei Th9 kam es zu einer Zunahme von 2,39 N (Abb. 42 und 43).

#### **Monat 12**

Nach weiteren 9 Monaten sah man bei der Sham-Gruppe einen mittleren Abfall der Kompressionskraft um ca. 13% bei Th8 (n=8) bzw. 7% bei Th9 (n=8). Dieser Abfall war nicht signifikant (Th8:  $p = 0,725$  und Th9:  $p = 1,000$ ).

Die Ergebnisse der Diät-Gruppe diminuierten sich durchschnittlich nach insgesamt 12 Monaten auf 42,81 N (Th8, n=8) und auf 60,76 N (Th9, n=7). Die Wirbelkörper Th8 wiesen somit signifikante Unterschiede auf ( $p < 0,001$ ), bei Th9 waren diese nicht signifikant ( $p = 0,123$ ).

Nach 12 Monaten kam es zwischen den beiden Gruppen, Sham und OVX mit Diät, ebenfalls zu deutlich signifikanten Unterschieden:  $p < 0,001$  bei Th8, sowie bei Th9 (Abb.42 und 43).

### Monat 14

Am Ende des Projekts betrug die Kompressionskraft der Sham-Gruppe durchschnittlich 139,35 N (Th8, n=6) bzw. 128,03 N (Th9, n=6). Hinsichtlich der Ergebnisse der 12-Monatstiere war kein signifikanter Abfall erkennbar ( $p = 1,000$  für Th8 und  $p = 0,057$  für Th9).

Dies traf ebenfalls auf die Reduktion von Th9 (n=8) bzw. Erhöhung von Th8 (n=7) der Kompressionskraft der Diät-Tiere nach insgesamt 14 Monaten zu:  $p = 1,000$  (Th8) und  $p = 0,898$  (Th9).

Die Kompressionskraft der Sham- und der Diät-Gruppe bei Th8 und Th9 zum Zeitpunkt 14 Monate wies mit jeweils ca. 64% Differenz deutliche Unterschiede auf (Th8:  $p = 0,001$  und Th9  $p = 0,003$ ) (Abb. 42 und 43).

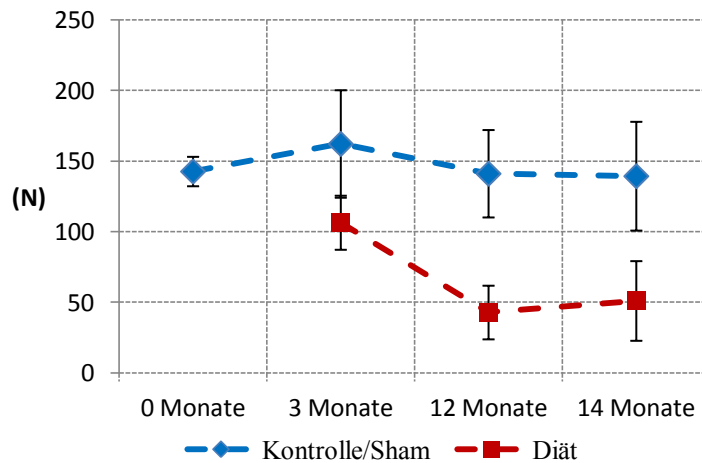


Abb. 42: Kraft von Th8 im Verlauf (Kontrolle/Sham vs. Diät im Vergleich).

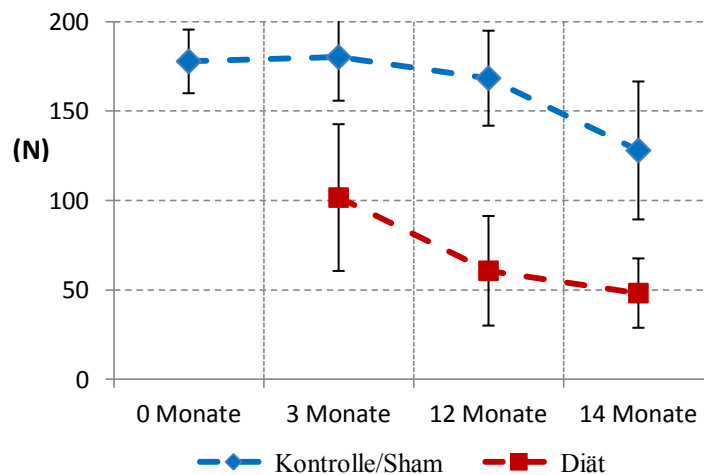


Abb. 43: Kraft von Th9 im Verlauf (Kontrolle/Sham vs. Diät im Vergleich).

	Kompressionskraft [N] ± SD Th8 (Median)	Kompressionskraft [N] ± SD Th9 (Median)
<b>0 Monate Messbasis</b>	142,65 ± 10,4 (138,96)	177,82 ± 17,97 (179,96)
<b>3 Monate Sham</b>	162,17 ± 38,05 (151,93)	180,21 ± 24,37 (183,58)
<b>3 Monate OVX + Diät</b>	106,4 ± 19,1 (105,51)	101,7 ± 41,02 (109,01)
<b>3 Monate OVX + Steroide</b>	114,8 ± 24,2 (117,50)	126,1 ± 33,3 (110,60)
<b>12 Monate Sham</b>	141,1 ± 30,95 (143,20)	168,43 ± 26,57 (163,00)
<b>12 Monate OVX + Diät</b>	42,82 ± 18,99 (46,35)	60,67 ± 30,64 (71,57)
<b>14 Monate Sham</b>	139,35 ± 38,51 (149,58)	128,03 ± 38,56 (129,48)
<b>14 Monate OVX + Diät</b>	51,00 ± 28,20 (61,86)	48,3 ± 19,39 (46,43)

Tab. 8: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Kraft im Kompressionsversuch von Th8 und Th9. SD = Standardabweichung, OVX = Ovariectomie.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Kraft der Kompressionsversuche werden in Tabelle 8 dargestellt.

### 3.4.2 Torsion der Tibiae

In der Torsionsprüfung wurden die Torsionssteifigkeit [Nmm/°] sowie das Bruchmoment [Nmm] bestimmt.

#### Messzeitpunkt 3 Monate

#### **Torsionssteifigkeit [Nmm/°]**

Die Ergebnisse der Torsionssteifigkeit der Gruppen 1a (Sham), 2 (OVX mit Diät) und 3 (OVX mit Steroide) zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Sham-Gruppe wies nach 3 Monaten eine mittlere Steifigkeit von 21,63 Nmm/° auf. Die Tiere der Diät-Gruppe lagen im Vergleich zu Sham-Gruppe nur um 1,57 Nmm/° höher ( $p = 0,763$ ) und die der Steroidgruppe um 0,17 Nmm/° ( $p = 0,997$ ).

Die Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ ) betrug zwischen der Diät- und Steroid-Gruppe  $p = 0,804$  (Abb. 44 und Tab. 9).

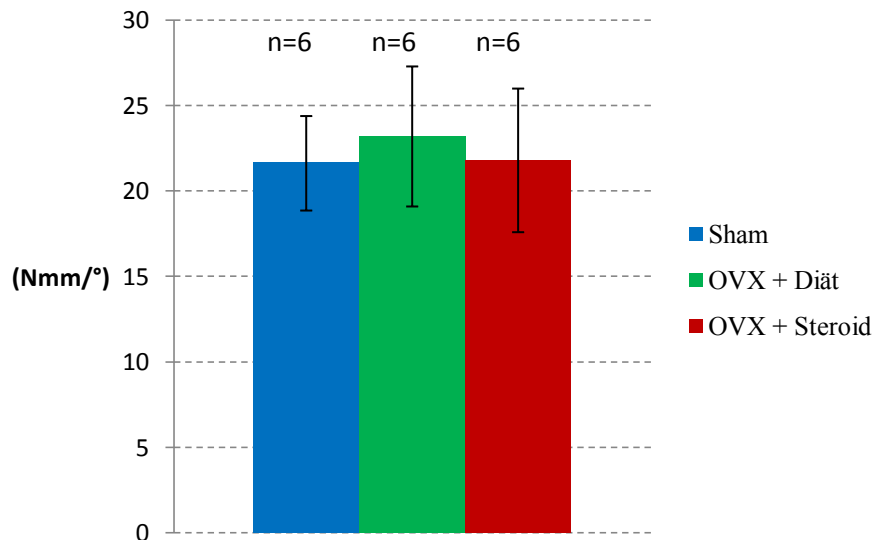


Abb. 44: Torsionssteifigkeit der Tibiae nach 3 Monaten (Sham, OVX +Diät, OVX + Steroid im Vergleich).

\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

### Bruchmoment [Nmm]

Der durchschnittliche Unterschied von der Diät- (212,6 Nmm/°) und Steroid-Gruppe (234,8 Nmm/°) lag bei 22,2 Nmm/° und war somit nicht signifikant ( $p = 0,644$ ) verändert. Es kam zu einem Abfall zwischen der Sham- und Diät- bzw. Steroid-Gruppe mit einer 28%ige ( $p = 0,013$ ) bzw. 20%ige ( $p = 0,060$ ) Reduktion (Abb. 45 und Tab. 9).

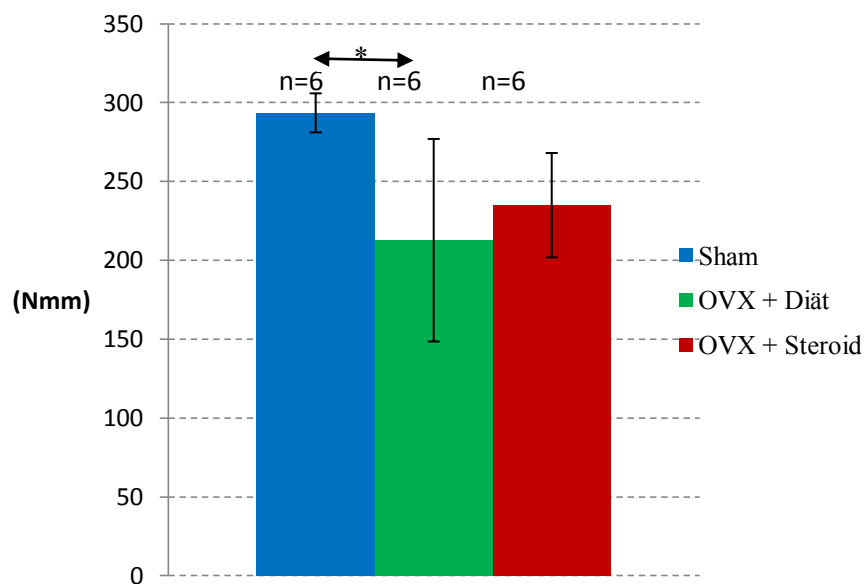


Abb. 45: Bruchmoment der Tibiae nach 3 Monaten (Sham, OVX +Diät, OVX + Steroid im Vergleich).

\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$



### Verlauf der Standzeiten

In der Abbildung 46 erkennt man, dass die Torsionssteifigkeit und das Bruchmoment einen ähnlichen Verlauf aufweisen.

#### **Torsionssteifigkeit [Nmm/°]**

##### **Monat 3**

Die Messbasis (n=7) wies zum Zeitpunkt Null eine mittlere Steifigkeit von 14,15 Nmm/° auf. Nach weiteren 3 Monaten erreichte die Sham-Gruppe eine Torsionssteifigkeit im Mittel von 21,63 Nmm/° (Abb. 44 und 46).

##### **Monat 12**

Nach insgesamt 12 Monaten betrug die Torsionssteifigkeit der Sham-Gruppe (n=7) durchschnittlich 19,57 Nmm/° und war tendenziell ( $p = 0,954$ ) niedriger als nach 3 Monaten.

Die Ergebnisse der Diät-Gruppe (n=6) nahmen zu diesem Zeitpunkt um ca. 59% ( $p = 0,012$ ) signifikant ab.

Zwischen Sham- und Diät-Gruppe ließen sich signifikante Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 0,035$  aufzeigen (Abb. 46 und Tab. 9).

##### **Monat 14**

Im weiteren Verlauf nahm die Steifigkeit der Sham-Gruppe (n=6) im Mittel um 6,01 Nmm/° zu ( $p = 0,025$ ).

Bei der Diät-Gruppe (n=5) ließ der starke Abfall von 3 auf 12 Monate der Steifigkeit nach. Sie betrug jetzt 86% der Steifigkeit nach 12 Monaten ( $p = 1,000$ ).

Zwischen Sham- und Diät-Gruppe war ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,009$ ) zu verzeichnen (Abb. 46 und Tab. 9)

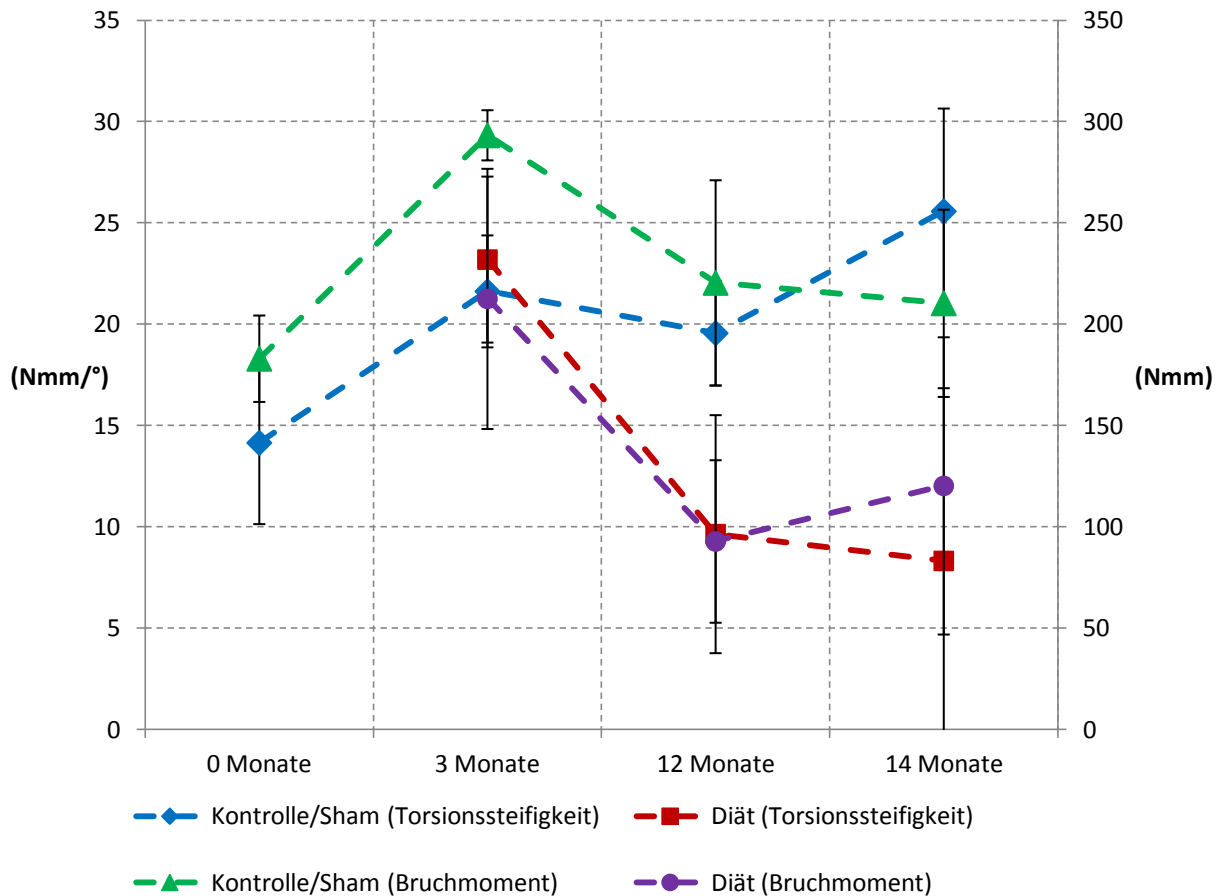


Abb. 46: Torsionssteifigkeiten und Bruchmomente der Tibiae im Verlauf (Kontrolle/Sham vs. Diät im Verlauf).

	Torsionssteifigkeit Tibiae [Nmm/°] ± SD (Median)	Bruchmoment Tibiae [Nmm] ± SD (Median)
<b>0 Monate Messbasis</b>	14,15 ± 4,01 (13,33)	183,07 ± 21,32 (179,87)
<b>3 Monate Sham</b>	21,63 ± 2,76 (22,39)	293,34 ± 12,3 (296,19)
<b>3 Monate OVX + Diät</b>	23,2 ± 4,1 (23,15)	212,6 ± 64,2 (229,70)
<b>3 Monate OVX + Steroide</b>	21,8 ± 4,2 (23,05)	234,8 ± 33,1 (233,35)
<b>12 Monate Sham</b>	19,57 ± 2,59 (19,36)	220,53 ± 50,63 (212,07)
<b>12 Monate OVX + Diät</b>	9,65 ± 5,87 (8,70)	92,86 ± 40,1 (91,83)
<b>14 Monate Sham</b>	25,58 ± 5,08 (24,17)	210,41 ± 42 (210,45)
<b>14 Monate OVX + Diät</b>	8,32 ± 8,52 (7,77)	120,3 ± 73,36 (120,30)

Tab. 9: Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der Torsionssteifigkeit und Bruchmomente der Tibiae. SD = Standardabweichung, OVX = Ovariectomie.

**Bruchmoment [Nmm]****Monat 3**

Auch hier kam es zwischen der Messbasis- (n=7) und der Sham-Gruppe nach 3 Monaten zu einer durchschnittlichen Zunahme des Bruchmoments von 183,07 Nmm auf 293,34 Nmm (Abb. 45 und 46).

**Monat 12**

In der Sham-Gruppe (n=7) kam es von 3 auf 12 Monate zu einer signifikanten Reduktion des Bruchmoments auf 220,53 Nmm ( $p = 0,017$ ) im Mittel.

In der Diät-Gruppe (n=6) war ein deutlicher Abfall der Werte im Verlauf zu verzeichnen: von durchschnittlich 212,6 Nmm nach 3 Monaten auf 92,86 Nmm nach 12 Monaten ( $p = 0,014$ ).

Der Unterschied zwischen Sham- und Diätgruppe war zu diesem Zeitpunkt mit einer mittleren Differenz von 127,66 Nmm ebenfalls sehr groß und signifikant ( $p = 0,002$ ) verändert (Abb. 46 und Tab. 9).

**Monat 14**

Nach weiteren 2 Monaten Standzeit kam es im Durchschnitt zu einem leichten Abfall des Bruchmoments bei der Sham-Gruppe (n=6) auf 210,42 Nmm ( $p = 1,000$ ).

In der Diät-Gruppe (n=2) ließ sich ein durchschnittlicher Anstieg auf 120,3 Nmm verzeichnen ( $p = 1,000$ ).

Im Vergleich Diät- zur Sham-Gruppe war dennoch auch hier ein Unterschied erkennbar. Die Differenz ist jedoch nicht signifikant ( $p = 0,143$ ) (Abb. 46 und Tab. 9).

**3.4.3 Drei-Punkt-Biegung der Femura**

Bei dieser mechanischen Testung des Knochens wurden die Biegesteigung [N/mm] der Femura, sowie die Bruchkraft [N] ermittelt.

Messzeitpunkt 3 Monate**Biegesteigung [N/mm]**

Bei der Prüfung der Biegesteigung der Femura ließ sich eine kontinuierliche Zunahme der unterschiedlichen Versuchsgruppen festhalten: von durchschnittlich 212,33 N/mm der Sham-Gruppe (n=6) auf 233,7 N/mm der Diät-Gruppe (n=6,  $p = 0,582$ ) auf 273,5 N/mm der Steroidgruppe (n=6). Nur der Unterschied von Sham- zur Steroid-Gruppe war signifikant ( $p = 0,029$ ) verändert. Zwischen der Sham- und Diät-Gruppe betrug der

p-Wert  $p = 0,582$  und zwischen Diät- und Steroid-Gruppe  $p = 0,179$  (Abb. 47 und Tab. 10).

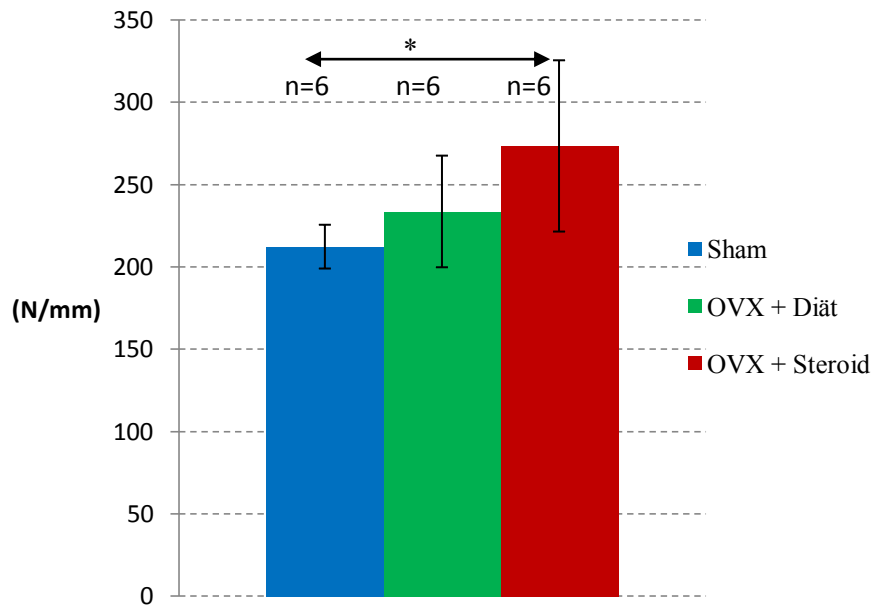


Abb. 47: Biegesteigung der Femura nach 3 Monaten (Sham, OVX +Diät, OVX + Steroid im Vergleich).

\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

	Biegesteigung Femura [N/mm] $\pm$ SD (Median)	Bruchkraft Femura [N] $\pm$ SD (Median)
<b>0 Monate Messbasis</b>	119,37 $\pm$ 22,16 (118,30)	69,73 $\pm$ 5,9 (69,35)
<b>3 Monate Sham</b>	212,33 $\pm$ 13,29 (218,50)	95,23 $\pm$ 8,81 (90,90)
<b>3 Monate OVX + Diät</b>	233,7 $\pm$ 33,9 (220,77)	117,4 $\pm$ 11,6 (114,75)
<b>3 Monate OVX + Steroide</b>	273,5 $\pm$ 52,03 (283,07)	130,2 $\pm$ 13,5 (131,40)
<b>12 Monate Sham</b>	274,14 $\pm$ 29,45 (282,00)	108,8 $\pm$ 15,22 (105,00)
<b>12 Monate OVX + Diät</b>	67,63 $\pm$ 62,86 (44,60)	30,49 $\pm$ 19,15 (24,98)
<b>14 Monate Sham</b>	268,33 $\pm$ 19,39 (264,50)	99,35 $\pm$ 14,9 (103,00)
<b>14 Monate OVX + Diät</b>	42,92 $\pm$ 11,89 (30,21)	16,86 $\pm$ 11,89 (14,77)

Tab. 10: Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der Biegesteigung und Bruchkraft. SD = Standardabweichung, OVX = Ovariectomie.

### Bruchkraft [N]

Auch hier war eine kontinuierliche Zunahme sichtbar: ausgehend von durchschnittlich 95,23 N der Sham-Gruppe über eine Zunahme von 22,17 N der Diät-Gruppe und einer weiteren Steigerung von 12,8 N (auf 130,2 N) bei der Steroid-Gruppe. Hier kam es zu Signifikanzen zwischen Sham- und Diät-Gruppe ( $p = 0,011$ ) und Sham- und Steroid-Gruppe ( $p < 0,001$ ). Zwischen Diät- und Steroid-Gruppe bestand eine ansteigende Tendenz ( $p = 0,162$ ) (Abb. 48 und Tab. 10).

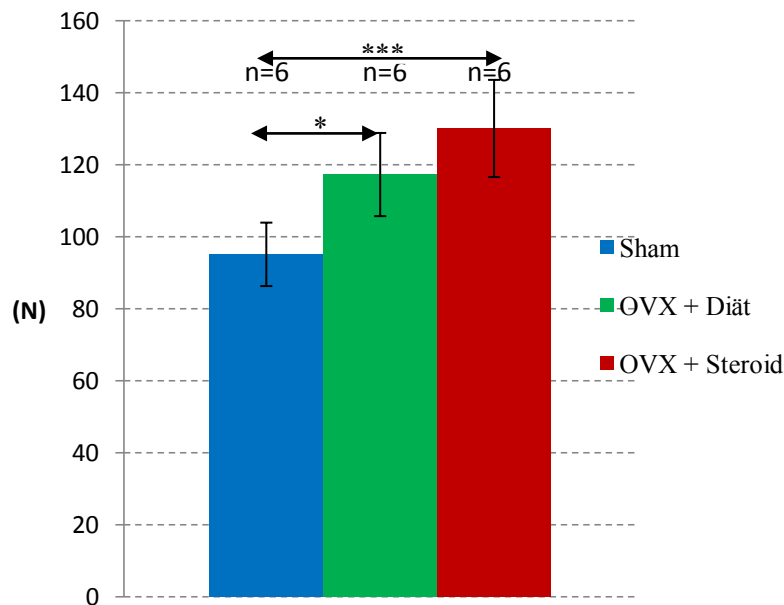


Abb. 48: Bruchkraft der Femura nach 3 Monaten (Sham, OVX +Diät, OVX + Steroid im Vergleich).

\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

### Verlauf der Standzeiten

#### Biegesteigung [N/mm]

##### Monat 3

Zwischen der Biegesteigung der Messbasis und der Sham-Gruppe sah man einen deutlichen Zuwachs: von durchschnittlich 119,37 N/mm ( $n=7$ ) auf 212,33 N/mm (Abb. 47).

##### Monat 12

Die Biegesteigung der Femora der Sham-Gruppe ( $n=7$ ) betrug nun 274,14 N/mm im Mittel und war somit signifikant größer als die der 3-Monatstiere ( $p < 0,001$ ).

Die Ergebnisse der Diät-Gruppe (n=6) verringerten sich durchschnittlich von 233,7 N/mm nach 3 Monaten auf 67,63 N/mm nach 12 Monaten ( $p < 0,001$ ).

Zwischen Sham- und Diät-Gruppe kam es auch hier zu signifikanten Unterschieden.

Die Differenz betrug 206,51 N/mm mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 0,001$  (Abb. 49 und Tab. 10).

#### Monat 14

Die Werte der Sham-Gruppe (n=6) nahmen jetzt tendenziell ab und erreichten eine Steigung im Mittel von 368,33 N/mm ( $p = 1,000$ ).

Im weiteren Prozess diminuierte sich die Steigung der Diät-Gruppe (n=6) um weitere 37% und war ebenfalls nur ein tendenzieller ( $p = 1,000$ ) Abfall.

Die Differenz der Sham- und der Diät-Gruppe betrug durchschnittlich 225,41 N/mm (85%) und war somit signifikant ( $p = 0,002$ ) (Abb. 49 und Tab. 10).

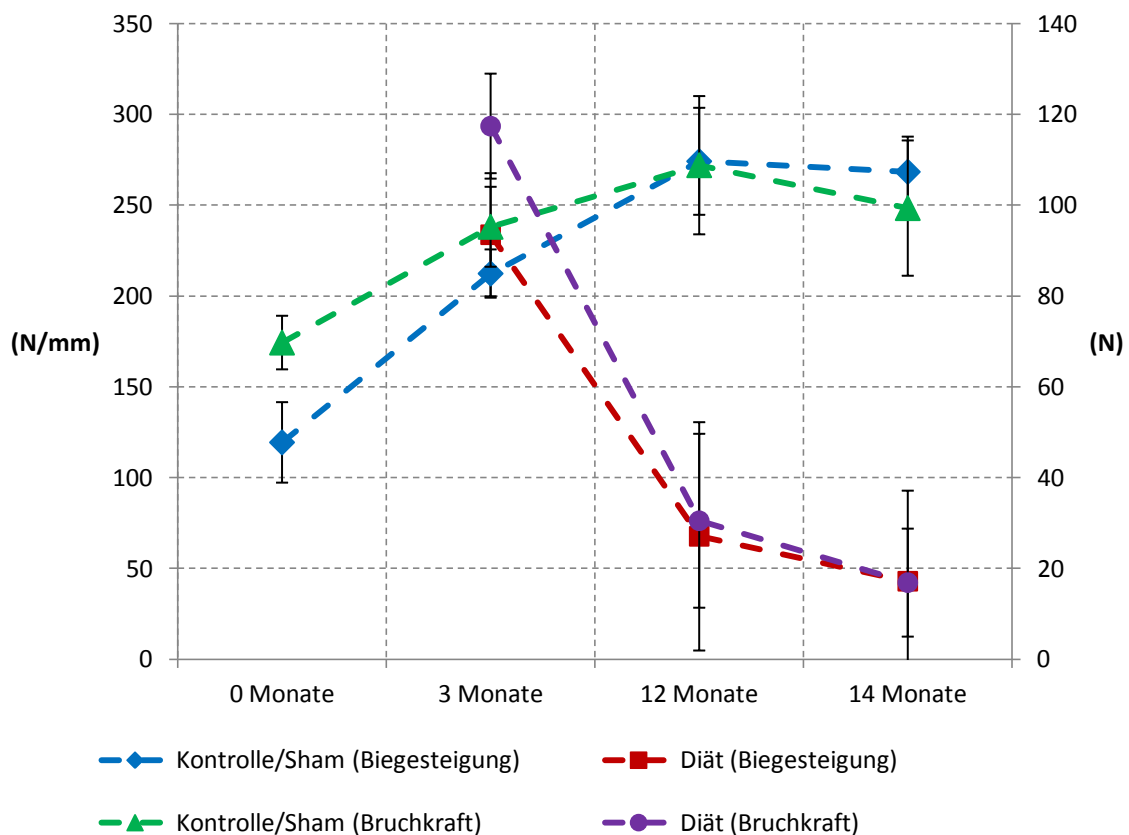


Abb. 49: Biegesteigung und Bruchkraft des Femur im Verlauf (Kontrolle/Sham vs. Diät im Verlauf).

**Bruchkraft [N]****Monat 3**

Die Bruchkraft stieg ausgehend von der Messbasis im Mittel 69,73 N (n=7) auf 95,23 N in der Sham-Gruppe nach 3 Monaten (Abb. 48).

**Monat 12**

Auch die Bruchkraft vergrößerte sich bei der Sham-Gruppe (n=7) von durchschnittlich 95,23 N nach 3 Monaten auf 108,8 N nach 12 Monaten ( $p = 0,265$ ).

In der Diät-Gruppe (n=6) wurde eine Reduktion von 117,4 N nach 3 Monaten auf durchschnittlich 30,49 N gemessen ( $p < 0,001$ ).

Die Minderung der Bruchkraft zwischen Sham- und Diät-Gruppe betrug ca. 72% und war signifikant ( $p = 0,001$ ) verändert (Abb.49 und Tab. 10).

**Monat 14**

Wie auch die Biegesteigung nahm die Bruchkraft in der Sham-Gruppe (n=6) von 12 auf 14 Monate ab und erreichte im Durchschnitt einen Wert von 99,35 N ( $p = 0,673$ ).

Zu diesem Zeitpunkt sank die Bruchkraft der Diät-Gruppe (n=6) um weitere 13,63 N ( $p = 0,383$ ).

Im Vergleich zur Sham-Gruppe zeigte sich bei der Diät-Gruppe eine signifikante Kraftreduktion von 74% ( $p = 0,002$ ) (Abb. 49 und Tab. 10).

## 4 Diskussion

### 4.1 Tiermodell

Die Osteoporose ist heute in der älterwerdenden Gesellschaft eine weit verbreitete Erkrankung und somit Mittelpunkt medizinischer Diskussionen. Es müssen Tiermodelle, die mit dem Humanen vergleichbar sind für die weitere Erforschung der Erkrankung zur Verfügung gestellt werden. Diese minimieren einige Einschränkungen, die bei Osteoporosestudien mit dem Menschen auftreten würden. Darunter fallen u.a. der Faktor Zeit, sowie die verschiedenen Verhaltensweisen der Menschen, wie der allgemeine Lebensstil, Rauchen und Alkohol. Auch sind die Kosten bei Studien an Tiermodellen vergleichsweise gering. Da die Osteoporose biologisch nur bei Menschen und nicht-humanen Primaten vorkommt, gilt es ein anderes adäquates Tiermodell zu finden [Egermann et al. 2005, Rodgers 1993, Turner 2001].

Bei der Festlegung eines geeigneten Tiermodells ist eine ausführliche und gründliche Auswahl der Tiere notwendig. Die jeweiligen Tiere einer Studie sollten der gleichen Rasse entstammen, das gleiche Alter und dieselbe Herkunft haben, sowie sich in Größe und Gewicht ähneln. Die interindividuellen Variablen sollen durch möglichst gleiche Bedingungen und Ausgangskriterien in der Versuchsreihe verringert werden.

*Davidson et al.* (1987) beschrieben bestimmte Kriterien für Tiermodelle, die bei jeder Tierforschung eingehalten werden sollten. Die Forschungsergebnisse des Tiermodells sollten bestmöglich auf den Menschen übertragbar sein. Ein weiterer wichtiger Punkt sei die zutreffende genetische, hormonelle und ökologische Übereinstimmung. Auch sollte ausreichendes Wissen über die biologischen Eigenschaften des Tieres vorliegen. Eine Verallgemeinerung der Studien muss gegeben sein und die ethischen sowie gesellschaftlichen Auswirkungen des Tiermodells müssen berücksichtigt werden. Es kann bei der Auswahl des Tiermodells nicht jeder der genannten Aspekte eingehalten werden. So sind in der Regel mehrere Tiermodelle zu nutzen, um gesammeltes Wissen verallgemeinern zu können [Hazzard et al. 1992].

Das Tiermodell zur Untersuchung der Osteoporose wurde von *Kalu* (1991) wie folgt definiert: ein lebendes Tiermodell, bei dem spontaner oder induzierter Knochenverlust



aufgrund eines ovariellen Hormonmangels studiert werden kann. Ebenso müssen die Charakteristika des Knochenverlusts und der Spätkomplikationen der Tiere in einem oder mehreren Aspekten denen der postmenopausalen Frau ähneln. Auch bestimmte die *US Food and Drug Administration (FDA)* 1994 Richtlinien für präklinische und klinische Osteoporosestudien. Sie fordert, dass präklinische Studien zuerst an dem Tiermodell Ratte durchgeführt werden und dann in einer weiteren Untersuchung an einem Großtiermodell, z.B. dem Schaf. Ein weiterer wichtiger Punkt bei Osteoporosestudien ist die Berücksichtigung, dass die meisten Tierarten Quadrupeden sind. Im Gegensatz zum Menschen, der ein Biped ist. Die biomechanischen Kräfte, sowie die biochemischen Eigenschaften wirken sich auf die Knochenmasse aus und könnten somit einen anderen Einfluss beim Menschen als bei den Quadrupeden aufweisen [Turner 1991].

Bis heute wurden für die Studien zur Osteoporose vor allem Nicht-humane Primaten, Hunde, Katzen, Nagetiere, Meerschweinchen, Kaninchen, Schweine oder Schafe untersucht [Turner 2001].

Das am häufigsten verwendete Tier bei Osteoporosestudien ist die Ratte [Barlet et al. 1994]. Die Ratte wird oft bei Vorversuchen eingesetzt, um die Effizienz und Schadhafteigkeit neuer Medikamente oder Therapieansätzen zu testen. Hiernach folgen Untersuchungen am größeren Tiermodell und schließlich finden klinische Studien am Menschen statt [Aerrens et al. 1998]. *Kimmel et al.* (1990) zeigten in einer Studie, dass sich die adulte Ratte gut eignet, um Aussagen über den spongiösen Knochen des Menschen zu machen. Weitere Vorteile für das Tiermodell Ratte sind die preiswerte und unkomplizierte Haltung, sowie die Akzeptanz der Ratte als Versuchstier in der Bevölkerung. Aufgrund ihrer relativ kurzen Lebenszeit sind Veränderungen des Knochens im Alter gut darstellbar.

Da Nagetiere im Alter keine Menopause haben, ist die Ovariectomie eine effektive Methode diese künstlich zu induzieren [Kalu 1991]. Das Vorhandensein des Havers-Systems, der signifikante Knochenverlust nach Ovariectomie und die menschenähnlichen Knochenumbauvorgänge sprechen ebenfalls für das Modell der Ratte bei Osteoporosestudien [Frost et al. 1992, Kalu 1991]. Laut *Abe et al.* (1993) sind weder Ratte noch Mensch in der Lage nach einem Östrogenmangel ihre Knochen zu erneuern.

In der vorliegenden Studie wurde die Ratte als Tiermodell ausgewählt, da sie gut zu handhaben, kostengünstig und leicht unterzubringen ist. Auch der durch Ovariectomie induzierte Knochenverlust weist viele Parallelen zum Knochenverlust der postmenopausalen Frau auf. Des Weiteren spricht für die Ratte als Tiermodell deren relativ kurze Lebenszeit, sodass man Veränderungen im Alter gut erforschen kann.

#### **4.2 Bewertung der einzelnen Methoden**

Die *Food and Drug Administration* (FDA 1994) empfiehlt für die biomechanischen Testungen der Knochenfestigkeit in präklinischen Osteoporosestudien bestimmte Messverfahren: die Biege-, Torsions- und Kompressions-Prüfung. Die spongiösen Knochen, wie die Wirbelkörper, sollten mittels Kompressionsprüfung getestet werden. Die vertebrale Wirbelkörper würden sich dafür gut eignen. Die mechanischen Eigenschaften der kortikalen Knochen sollten mittels Drei- oder Vier-Punkt-Biegung oder Torsionsprüfung getestet werden. Wichtig sei, dass Röhrenknochen und Wirbelkörper biomechanisch geprüft werden da es unklar ist, ob die Aussagen über die kortikalen Knochen auch auf die spongiösen Knochen zutreffen.

Auch in ausführlichen Literaturrecherchen waren die oben genannten Prüfmethode an den Tierknochen *ex vivo* die Testverfahren der Wahl [z.B.: Indrekvam et al. 1991, Jiang et al. 1997, Lill et al. 2002, Mosekilde et al. 1993, Vogel 1980].

Die mechanischen Eigenschaften des anisotropischen Knochens unterscheiden sich von denen isotropischer Materialien. Die elastischen Eigenschaften der isotropischen Materialien sind in jede Richtung gleich, im Gegensatz zu denen des Knochens. Bei den Knochen spielt die Richtung der einwirkenden Kraft eine große Rolle, sowie deren anatomische Herkunft. Weiter ist es wichtig um die Skelettbrüchigkeit zu verstehen, zwischen den Beeinflussungen der mechanischen Eigenschaften des ganzen Knochens (Strukturverhalten) und des Knochengewebes (Materialverhalten) zu unterscheiden. Das Strukturverhalten wird mittels Biegung- oder Torsion-Messung geprüft und Kompressionsversuche bestimmen das Materialverhalten eines Knochens. Im Alter nehmen die mechanischen Eigenschaften des Knochens ab. Sie scheinen in Relation zur Knochendichte zu stehen, die ebenfalls im Alter abnimmt [Marcus et al. 2008]. Das mechanische Verhalten des Knochens variiert ebenfalls mit dem Knochentyp - spongiös

vs. kortikal -, dem Alter, der anatomischen Herkunft, der Prüfgeschwindigkeit und den Testkonditionen. Bei dem Letztgenannten spielen die Konservierung, die Hydratation und die Temperatur eine entscheidende Rolle. Die beste Methode zur langen Konservierung einer Probe ist die Einfrierung in 0,9%iger NaCl getunkte Kompressen bei -20 °C. Die mechanischen Eigenschaften der trabekulären Knochen werden davon nicht beeinflusst. Die Messtemperatur der Knochen spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. Optimale Bedingungen würden bei 37 °C herrschen. Allerdings sind die Raumtemperaturen meist um die 23 °C. Dieser Messfehler sei allerdings vernachlässigbar. Ferner ist die Feuchthaltung der Proben sehr wichtig, um optimale Testbedingungen zu schaffen. Natürlich haben auch biologische Variablen wie Alter, Geschlecht, Rasse und Grad der Aktivität einen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Knochen [Borchers et al. 1995, Gerlach 2002, Turner et al. 1993].

### Kompressions-Prüfung

Der Kompressionstest ist besonders bei spongiösen Knochen eine häufig angewandte Messung. Es können relativ kleine Proben verwendet werden, um noch gute Ergebnisse zu erhalten. Laut *Keavney et al.* (1993) sollten die Proben zu einem Zylinder im Verhältnis 2:1 (Länge : Durchmesser) geschnitten werden. *Mosekilde et al.* (1987) testeten die Kompression an Zylindern aus humanen Wirbelkörpern mit einem Durchmesser von 7 mm und erhielten aussagekräftige Ergebnisse. Weitere Vorteile dieser Prüfung sind die Ähnlichkeit der Belastung im Test verglichen mit der Belastung des Knochens *in vivo*, sowie die Genauigkeit der Prüfung. Messfehler können nach der Messung abgezogen werden, da diese konstant sind [Jiang et al. 1997, Turner et al. 1993].

In der hier durchgeführten Versuchsreihe wurden die Wirbelkörper auf Grund ihrer geringen Größe als Ganzes gemessen.

Die richtige Platzierung und Ausrichtung der Probe bei der Versuchsdurchführung ist essentiell. Sie sollte nach dem Prinzip der meisten Kraftaufnahme gesetzt sein. Beim Wirbelkörper entspricht diese der proximal-distalen Ausrichtung. Für eine optimale Prüfung müssen die Proben zwei planparallele Oberflächen aufweisen. Dies wurde in dem hier durchgeführten Versuch durch die Entfernung aller Gewebe vom Wirbelkörper erreicht. Unregelmäßigkeiten des Knochens ließen sich nicht ganz

vermeiden. Bei der Positionierung der Probe zwischen den Druckstempeln war auch darauf zu achten, dass sie zu Beginn der Messung noch mit keiner Kraft vorbelastet wurden. Dies war ebenfalls für die nachfolgenden biomechanischen Analysen zu berücksichtigen.

Über ein aufgezeichnetes Kraft-Weg-Diagramm wurde die maximale Kompressionskraft ermittelt werden. Die Prüfung ist durch die Subtraktion des Messfehlers recht genau. Jedoch können weitere Fehler auftreten, da die Proben alle manuell von Gewebe befreit und manuell zwischen die Druckstempel platziert wurden.

### Torsions-Prüfung

Torsionstests werden häufig zur Messung der Kraft des kompletten Knochens eingesetzt, um dessen Strukturverhalten zu bestimmen. Dies gilt, da die Bruchstelle am Knochen nicht durch die Prüfmethode vorgeben ist. Auch eignet sich diese Kraftprüfung bis zum Versagen der langen Knochen gut, um Frakturen durch hohe Belastungstraumata in der Klinik zu simulieren [Jiang et al. 1997].

In der vorliegenden Studie wurde die rechte Tibia tordiert. Gemessen wurden die Torsionssteifigkeit sowie das Bruchmoment der Probe. Auch hier wurden die Knochen manuell bearbeitet, eingegossen und eingespannt. Dies könnte zu Messungenauigkeiten geführt haben. Um den Messfehler der Prüfmaschine weitgehend zu reduzieren, wurde eine Korrekturkurve der Kraftmessdose gefahren.

Die Knochen brachen im Bereich der Diaphyse. Da in diesem Bereich die Kortikalis sehr dick ist, lässt diese Prüfmethode speziell Aussagen über die mechanischen Eigenschaften des kortikalen Knochens zu.

### Drei-Punkt-Biegungs-Prüfung

Der Biegeversuch ist eine gute Methode, um Messungen an Knochen von kleinen Tieren durchzuführen. Die Biegung verursacht Zug- und Druckspannungen im Knochen. Dieser ist wesentlich stabiler gegenüber der Druckspannung. Somit ist die Biegung des Knochens durch die Zugspannung limitiert. Die Stützweite, also die Auflagefläche des Femur an beiden Seiten muss eine gewisse Größe haben, damit eine Flexibilität des Knochens während der Messung gegeben ist. Laut *Turner et al.* (1993)

sollte diese Größe im Verhältnis 16:1 mit der Knochendicke stehen. Dies ist allerdings bei Kleintieren unmöglich und so sollte die Stützweite mindestens 15-20 mm betragen. In der vorliegenden Studie waren es 32 mm. Die Drei-Punkt-Biegung ist einfach durchzuführen. Allerdings erfährt die nahe Umgebung des Kochenmittelteils dabei eine hohe Schubspannung. Diese entsteht wenn ein Drehmoment auf einen zirkulären Körper einwirkt und bewirkt so eine Verdrehung des Stabes um einen bestimmten Winkel. Auch ist das Biegemoment bei der Drei-Punkt-Biegung nur in der Knochenmitte maximal [Benninghoff et al. 2008, Fuhrmann et al. 2008, Riehle et al. 2000, Turner et al. 1993, Wittenburg et al. 2011].

Um die Messfehler zu reduzieren, wurde hier eine Korrekturkurve mittels eines Dummy gefahren. Die oben beschriebene Variabilität lässt sich auch hier durch die manuelle Arbeit nicht vollständig verhindern.

Da auch hier der Knochen im Bereich der Diaphyse brach, konnten Aussagen speziell über die mechanischen Eigenschaften des kortikalen Knochens gemacht werden.

### 4.3 Ergebnisse

Es wurde von Beginn der Studie an versucht alle Störfaktoren, die auf die Messergebnisse Einfluss nehmen könnten, zu minimieren bzw. zu eliminieren. Eine Gleichheit für alle Tiere sollte hergestellt werden. Dies begann mit der Auswahl der Tiere, deren Randomisierung, Unterbringung, Versorgung und den Operationen. Die Tötungen wurden ebenfalls nach gleichem Ablauf durchgeführt. Die Präparation, Aufarbeitung und Vorbereitung, sowie die Messung der einzelnen Knochen für die biomechanischen Prüfungen wurden standardisiert durchgeführt. Die Messfehler der Materialprüfmaschinen wurden durch Korrekturkurven minimiert.

Die Knochendichte (Bone Mineral Density = BMD) ist ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Osteoporose (s. Kapitel 1.1.3). Sie wird in  $\text{g/cm}^2$  angegeben. Der Bone Mineral Content (BMC) spiegelt die Knochenmasse [g] wieder. Dieser ist essentiell für die Quantifizierung des Knochenverlustes, sowie ein Überwachungsparameter der Behandlung [Gala et al. 1998]. Deswegen wurden der BMD und der BMC im Teilprojekt T1 des SFB/TRR 79 mittels DXA-Messung (Dual-X-Ray-Absorptiometrie)

gemessen. Der BMD und BMC wurden vom gesamten Skelettsystem der Ratte, sowie einzelnen Teilbereichen, wie der Wirbelsäule, der Femura und der Tibiae bestimmt. Die Messungen fanden zum Zeitpunkt Null nach 3, 12 und 14 Monaten statt (Tab. 11 und 12 im Anhang) [El Kassawna et al. 2013, Heiss et al. 2012, Govindarajan et al. 2013].

Allgemein traten bei den Tieren der Steroid-Gruppe ausgeprägte Glukokortikoidnebenwirkungen, wie ein gelbliches Fell, eine dünne Haut und eine Stammfettsucht auf. Dies lässt vermuten, dass die Glukokortikoidwirkung des hier ausgewählten Kortisonpräparates den mineralokortikoiden Wirkungen überwiegen. Und somit dieses Präparat für die Versuchsreihe nicht optimal ist. Auch lassen die Ergebnisse der mechanischen Tests vermuten, dass die ausgewählte kumulative Kortisondosis zu niedrig gewählt wurde, sowie die Verabreichungsintervalle von 3 Wochen zu groß waren, um eine steroidinduzierte Osteoporose bei der Ratte zu induzieren.

#### Kompressionsergebnisse

Nach 3 Monaten war die Kompressionskraft der Wirbelkörper Th8 und Th9 der Diät- und der Steroid-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe signifikant erniedrigt. Die gemessenen Werte von BMD und BMC der Wirbelsäule stimmen mit diesen Ergebnissen überein (Tab. 11 und 12 im Anhang) [Heiss et al. 2012]. Die zwei unterschiedlichen Behandlungen nehmen demnach bereits einen frühen prägnanten Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des spongiösen Knochens. Wie auch bei der postmenopausalen Osteoporose der Frau. Hierbei werden primär die Wirbelkörper beeinflusst und brechen bereits früh. Ein wichtiger Parameter für diese Knochenbrüche ist die Minderung der Knochendichte der Wirbelkörper [Jiang et al. 1997].

*Lill et al.* (2002) konnten in einer Pilotstudie an Schafen nachweisen, dass die Glukokortikoidgabe nach Ovariectomie einen negativen Einfluss auf die Kompressionskraft der Wirbelkörper nahm. Dieser Einfluss war stärker ausgeprägt als nach Ovariectomie und einer Kalzium- und Vitamin D-armen Diät. Er vergrößerte sich noch zusätzlich bei einer Behandlung von Ovariectomie, Diät und Methylprednisolon [Lill et al. 2002].

Die Ausgangs-Gruppe 0 diente als Messbasis für die Versuchsreihe zum Zeitpunkt der Operationen. Eine deutliche Zunahme der Kompressionskraft war zu den Sham-Tieren nach 3 Monaten zu verzeichnen. Der BMD und der BMC vergrößerten sich bei diesen Tieren signifikant. Im weiteren Verlauf kam es in der hier vorliegenden Studie zu einer kontinuierlichen Minderung der Kompressionskraft von Th8 und Th9 der Sham-Tiere. Der Verlauf des BMD der Wirbelkörper war durch einen minimalen Anstieg bis zu 12 Monate gekennzeichnet, ehe es dann zu einem Abfall kam. Der BMC hingegen stieg kontinuierlich während der gesamten Versuchsreihe an (Tab. 11 und 12 im Anhang) [Govindarajan et al. 2013].

Einen Anstieg der mechanischen Parameter von Wirbelkörpern in einer Sham-Gruppe konnten auch *Mosekilde et al.* (1993) und *Jiang et al.* (1997) aufzeigen. In beiden Studien nahmen die mechanischen Parameter bei der Sham-Gruppe stetig zu. Die Studienlänge betrug jedoch nur 6 bzw. 9 Monate. Dieser Anstieg sei durch das physiologische Altern der Tiere zu erklären. In der hier vorliegenden Studie betrug die Studienlänge hingegen 14 Monate. Auf Grund der hier erhobenen Ergebnisse ist anzunehmen, dass die spongiösen Knochen der Ratte zwischen dem 9. und 12. Monat ausgereift sind. Die im weiteren Verlauf verzeichnete Kraftabnahme der Wirbelkörper lässt ein Beginnen des „senilen Alterungsprozesses“ dieser Knochen vermuten.

Im Verlauf der Diät-Gruppen war ein signifikanter Abfall der Kraft bei Th8 von 3 auf 12 Monate zu verzeichnen, bei Th9 war dieser nur minimal. Nach weiteren 2 Monaten war die Kompressionskraft von Th8 und Th9 annähernd gleichbleibend. Es bestand zwischen den letzten beiden Messzeitpunkten nach 12 und 14 Monaten nur noch eine geringe Zeitdifferenz. Die Studienlänge musste aus ethischen Gründen von 18 auf 14 Monate gekürzt werden, da das klinische Erscheinungsbild der behandelten Tiere zu diesem Zeitpunkt bereits sehr schlecht war. Auf Grund von spontanen Frakturen, waren die mechanischen Parameter einiger Knochen nicht mehr messbar und somit nicht statistisch auswertbar. Bei dem BMD und BMC der Wirbelkörper der Diättiere war hingegen während der gesamten Studienlänge ein kontinuierlicher Abfall festzustellen (Tab. 11 und 12 im Anhang) [Govindarajan et al. 2013, Müller et al. 2014].

Die Ovariectomie nimmt folglich einen frühen prägnanten Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Wirbelkörper. Es wurde deutlich, dass auch das Lebensalter der Tiere einen erheblichen Einfluss auf die Fähigkeiten dieses Knochens nimmt.

In den beiden oben erwähnten Studien kam es zu einem stetigen Abfall der biomechanischen Parameter der Wirbelkörper nach einer Ovariectomie. Demnach würde sich die Ratte gut für Studien über die Osteoporose mit therapeutischem Ansatz eignen [Mosekilde et al. 1993, Jiang et al. 1997].

### Torsionsergebnisse

Bei der Torsionssteifigkeit der Sham-, Diät- und Steroid-Gruppe waren nach 3 Monaten kaum Unterschiede zu verzeichnen. Beim Bruchmoment zeigte sich ein signifikanter Abfall von der Sham- zur Diät-Gruppe und einen nicht signifikanten Abfall von Sham- zur Steroid-Gruppe. Der BMC und der BMD hingegen wiesen während dieses Zeitpunktes signifikante Unterschiede auf. Die Diät-Tiere nahmen im Vergleich zur Sham-Gruppe an BMC und BMD deutlich ab. Die negative Differenz zwischen Sham- und Steroid-Gruppe war weniger stark ausgeprägt (Tab. 11 und 12 im Anhang) [El Kassawna et al. 2013, Heiss et al. 2012, Govindarajan et al. 2013]. Die Steroidbehandlung erzielte bei den Tibiae nicht seinen gewünschten negativen Effekt. Auch die Ovariectomie und Diät beeinflussten die mechanischen Eigenschaften des Knochens nur teilweise. Hierbei zeigte sich im Vergleich zum spongiösen Knochen, dass dieser bereits nach kurzer Behandlungsdauer stärker beeinflusst wurde. In der Regel werden auch bei der Osteoporose der postmenopausalen Frau die Wirbelkörper frühzeitig beeinflusst [Jiang et al. 1997].

Auch in der Sham-Gruppe nahmen die mechanischen Werte im Vergleich zur Messbasis nach 3 Monaten zu. Die Steifigkeit dieser Gruppen sank bis zum 12. Monat nicht signifikant ab, ehe sie dann im Verlauf von weiteren 2 Monaten signifikant zunahm. Allerdings war die Standardabweichung auch hier wieder groß, sodass keine eindeutigen Aussagen getroffen werden können. Das Bruchmoment der Tibiae nahm in den Proben nach 3 Monaten bis zu den nach 14 Monaten kontinuierlich ab. Die Knochendichte wies einen leichten Anstieg bis 12 Monate und dann einen Abfall nach weiteren 2 Monaten auf. Der BMC der Tibiae nahm bis zum 12. Monat zu und blieb danach annähernd konstant (Tab. 11 und 12 im Anhang) [Govindarajan et al. 2013, Govindarajan et al. 2014]. Der Femur wies hingegen andere mechanische Eigenschaften in der Sham-Gruppe auf. Die beiden kortikalen Knochen scheinen demnach einem unterschiedlichen Alterungsprozess zu unterliegen (s.u.).



Sowohl Diät als auch Ovariectomie wirkten sich durch eine Abnahme der mechanischen Parameter auf die Tibiae aus. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Steifigkeit und des Bruchmoments zwischen den Messungen von 3. bis zum 12. Monat. Es folgte ein tendenzieller Abfall der Steifigkeit nach weiteren 2 Monaten, sowie eine nicht signifikante Zunahme des Bruchmoments zur selben Zeit. Die letzten Ergebnisse des Bruchmoments müssen zurückhaltend bewertet werden, da der Probenumfang nur  $n = 2$  betrug. In Folge der Erkrankung waren die Knochenproben der Tibiae bereits sehr elastisch. Aus technischen Gründen war die Materialprüfmaschine nicht mehr in der Lage über den Hebelarm einen Weg zurückzulegen, der die Probe zum Brechen brachte. Andererseits waren einige Knochen schon so zerbrechlich, dass diese bereits bei der Vorbelastung mit 1 N brachen und somit ebenfalls nicht für das Bruchmoment mit ausgewertet werden konnten. Der BMC und BMD dieser Gruppen minimierten sich kontinuierlich im Laufe der Testreihe (Tab. 11 und 12 im Anhang) [Govindarajan et al. 2013, Govindarajan et al. 2014]. Die Behandlung (OVX und Diät) zeigte, dass auch der kortikale Knochen negativ beeinflusst wird, eindeutig jedoch erst nach 12 Monaten Behandlung. Die langen Röhrenknochen wurden zu einem späteren Zeitpunkt als die spongiösen Wirbelkörper beeinflusst. Ähnliche Effekte (s.u.) zeigten auch *Jee und Yao* (1997).

#### Drei-Punkt-Biegeergebnisse

Die biomechanischen Parameter des Femur waren nach 3 Monaten zwischen der Sham-, der Diät- und der Steroid-Gruppe ansteigend. Die Unterschiede waren nur teilweise signifikant. Der Anstieg könnte damit erklärt werden, dass die Gewichtszunahme der Diät- und Steroid-Gruppe nach 3 Monaten größer war, als die der Sham-Gruppe. So könnte der eigentliche Kraftverlust durch die Ovariectomie und Diät- bzw. Steroidgabe kurzzeitig kompensiert werden und sogar noch einen positiven Einfluss auf das Kraftverhalten des Knochens nehmen. Bei der Knochendichte und der Knochenmasse der Femora kam es zu einem Abfall zwischen Sham- und Diät-Gruppe und einem weniger starken Abfall zwischen Sham- und Steroid-Gruppe (Tab. 11 und 12 im Anhang) [El Kassawna et al. 2013, Heiss et al. 2012, Govindarajan et al. 2013].

*Jee und Yao* (2001) beschrieben, dass die Ovariectomie bereits nach 3 Monaten einen negativen Einfluss auf die biomechanischen Parameter der spongiösen Wirbelkörper

hat. Die mechanischen Parameter des kortikalen Knochens (Femur) stiegen hingegen zuerst an, ehe sie dann nach 9 Monaten abfielen.

*Jiang et al.* (1997) wiesen nach, dass kortikaler Knochen erst in einem Alter von 7,5 Monaten vollständig ausgereift sei. Wegen dieser Ergebnisse postulierten die Autoren, dass die Ratten zum Zeitpunkt der Ovariectomie ausgereift sein sollten, um adäquate Aussagen über mechanische Eigenschaften der kortikalen Knochen machen zu können. Ebenso zeigten sie bei den Torsionsprüfungen der Femura, dass die ovariectomierten Tiere ebenfalls einen anfänglichen Kraftanstieg bis 6 Monate aufwiesen, ehe die Kraft dann nach weiteren 3 Monaten abnahm. Sie erklärten dies durch die Änderung der geometrischen Eigenschaften der Knochenstruktur. Das Knochenmark sowie die kortikale Resorption nahmen ab. Die gleichzeitig gesteigerte periostale Formation glich diesen Strukturverlust u.a. jedoch aus. Auch nahm der Knochen an Größe zu und die Tiere wurden allgemein schwerer, was sich ebenfalls positiv auf die mechanischen Kompetenzen des Knochens auswirkte.

In der durchgeführten Prüfung nahmen die mechanischen Parameter der Sham-Gruppe im Vergleich zur Messbasis nach 3 Monaten zu. Im weiteren Verlauf nahmen Bruchkraft und Biegesteigung der Sham-Gruppen bis zum Messzeitpunkt nach 12 Monaten zu und fielen danach leicht ab. Der BMD des Femurs verhielt sich identisch. Der BMC stieg ebenfalls bis zum 12. Monat, blieb dann aber annähernd konstant (Tab. 11 und 12 im Anhang) [Govindarajan et al. 2013, Govindarajan et al. 2014].

Dass die Steifigkeit und Bruchkraft der Biegung des Femur mit dem Alter der Ratte zunehmen konnten auch *Indrekvam et al.* 1991 nachweisen. Sie testeten die Tiere bis zu einem maximalen Alter von 52 Wochen. In der Studie von *Vogel* (1980) wurde an Ratten die biomechanischen Parameter u.a. der diaphysären Knochen untersucht. *Vogel* beschrieb einen Anstieg der biomechanischen Parameter bis zu einem Jahr als Reifung der Tiere, die anschließende Abnahme zwischen einem und zwei Jahren als einen Effekt der Alterung. Auch *Jiang et al.* (1997) zeigten eine Zunahme des Bruchmoments und der Torsionssteifigkeit in der Sham-Gruppe nach 1, 3 und 9 Monaten. Dies wurde in der Studie als physiologischer Alterungsprozess beschrieben, kombiniert mit einer Gewichtszunahme und Knochengrößenzunahme der Tiere.

Tibia und Femur sind Röhrenknochen, die zu den kortikalen Knochen zählen. Die beiden Knochen unterscheiden jedoch der Verlauf der biomechanischen Parameter in

den jeweiligen Prüfungen bei den Sham-Gruppen. Bei der Tibia (s.o.) nahmen die mechanischen Parameter in der Torsionsprüfung kontinuierlich ab. Beim Femur stiegen in der Drei-Punkt-Biegeprüfung die mechanischen Parameter bis zum 12. Monate zuerst an und nahmen danach ab. Dies könnte in einem Zusammenhang mit der höher gemessenen Knochendichte, sowie dem höheren BMC des Femur zu allen Messzeitpunkten bei den Sham-Tieren stehen. Wie oben beschrieben kann der anfängliche Anstieg der biomechanischen Parameter des Femurs als physiologische Reifung bezeichnet werden. Femur und Tibia würden demnach einem unterschiedlichen Alterungsprozess unterliegen.

In der Diät-Gruppe kam es bei den Messungen von Bruchmoment und Biegesteigung in der durchgeführten Studie zu einem signifikanten Abfall zwischen den Tests nach 3 und 12 Monaten und einem minimalen Abfall bis zu den Proben nach 14 Monaten. Der BMD und BMC minimierten sich ebenfalls kontinuierlich, um insgesamt ca. 23% (Tab. 11 und 12 im Anhang) [Govindarajan et al. 2013, Govindarajan et al. 2014].

Die Auswirkungen der Ovariectomie und Diät auf die Tibiae und den Femura traten sichtbar später, als beim Wirbelkörper ein, und wurden erst durch die lange Standzeit deutlich. Erst nach 12 Monaten sah man bei den mechanischen Parametern der Knochen eine negative Beeinflussung. Da bei der Osteoporose vor allem zuerst die Spongiosa betroffen ist, haben diese Röhrenknochen scheinbar auch nach der Ovariectomie noch Zeit zu reifen und sich zu festigen.

Zusammenfassend nimmt die Ovariectomie mit Diät einen negativen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des spongiösen und des kortikalen Knochens der Ratte. Ein osteoporotischer Knochenstatus konnte in den Wirbelkörpern und den langen Röhrenknochen induziert werden. Dieses Tiermodell eignet sich somit gut für weitere Studien zur Frakturheilung und Defektbehandlung des osteoporotischen Knochens.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es ein Grundlagenmodell für die weitere Erforschung der Osteoporose zu etablieren. Es sollte eine steroidinduzierte, eine postmenopausale, sowie eine senile Osteoporose an ovariectomierten Ratten induziert werden.

Es wurden 80 weibliche Sprague Dawley Ratten im Alter von 14 Wochen (Zeitpunkt 0 Monate) in 4 Gruppen eingeteilt, zwei Kontroll- und zwei Testgruppen. Die Kontrollgruppe wurde unterteilt in 1) eine Ausgangsgruppe (n = 10, 0 Monate) und 2) eine Sham-operierte Gruppe (Sham, 3, 12 und 14 Monate; jeweils n = 10). Die Tiere der Testgruppe wurden ovariectomiert und anschließend entsprechend ihrer unterschiedlichen Behandlung eingeteilt: 1) Kalzium- und Vitamin D-arme Diät (OVX + Diät, 3, 12 und 14 Monate; jeweils n = 10) und 2) eine Dexamethason-21-isonicotinat-Behandlung s.c. (OVX + Steroid, 3 Monate; n = 10).

*Ex vivo* wurden folgende biomechanische Analysen an den Knochen der Tiere durchgeführt: 1) Kompressionstests an den Wirbelkörpern Th8 und Th9 zur Kraftmessung, 2) Torsionsprüfungen der rechten Tibia zur Messung der Steifigkeit und des Bruchmoment und 3) Drei-Punkt-Biegungsprüfungen der rechten Femura zur Testung der Biegesteigung und der Bruchkraft.

Nach 3 Monaten wies die Kompressionskraft von Th8 und Th9 zwischen Sham- und Diät- (Th8  $p = 0,002$  und Th9  $p < 0,001$ ) bzw. zwischen Sham- und Steroid-Gruppe (Th8  $p = 0,011$  und Th9  $p = 0,006$ ) signifikante Unterschiede auf. Im weiteren Verlauf der Versuchsreihe verminderte sich die Kraft der Sham-Gruppe jeweils nicht signifikant. In der Diät-Gruppe sank die Kraft bei Th8 nach 12 Monaten signifikant ab ( $p < 0,001$ ).

In der Torsionsprüfung war nach 3 Monaten Standzeit die Steifigkeit tendenziell und das Bruchmoment zwischen Sham- und Diät-Gruppe ( $p = 0,013$ ) signifikant verringert. Von 3 auf 12 Monate sank die Steifigkeit der Sham-Gruppe gering (12 Monate  $p = 0,954$ ). Das Bruchmoment verringerte sich bis zum 12. Monat signifikant ( $p = 0,017$ ), danach nur noch minimal. In der Diät-Gruppe kam es von 3 auf 12 Monate zu

signifikanten Differenzen beider Parameter (Steifigkeit  $p = 0,012$  und Bruchkraft  $p = 0,014$ ). Nach weiteren 2 Monaten war der weitere Unterschied nur noch gering.

In der Drei-Punkt-Biegeprüfung kam es nach 3 Monaten bei der Bruchkraft zu signifikant ansteigenden Abweichungen zwischen Sham- und Diät- ( $p = 0,011$ ) bzw. Sham- und Steroid-Gruppe ( $p < 0,001$ ). Die Biegesteigung war zwischen Sham- und Steroid-Gruppe ( $p = 0,029$ ) signifikant erhöht. Beide Parameter der Sham-Gruppe stiegen von 3 auf 12 Monate an (Steigung  $p < 0,001$  und Bruchkraft  $p = 0,265$ ). Nach weiteren 2 Monaten sanken beide Werte nicht signifikant ab. In der Diät-Gruppe kam es von 3 auf 12 Monate zu signifikanten Differenzen beider mechanischen Parameter (jeweils  $p < 0,001$ ). Von 12 auf 14 Monate nahmen die mechanischen Parameter nur wenig ab.

Die Ovariectomie mit Diät nimmt einen negativen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der spongiösen Wirbelkörper und der kortikalen Knochen der Ratte. Der osteoporotische Knochenstatus wurde bei den Tieren in den spongiösen Knochen bereits nach 3 Monaten Behandlung induziert (Kompressionstest). Bei den kortikalen langen Röhrenknochen hingegen manifestiert sich die Osteoporose erst 12 Monate nach Ovariectomie und Diätgabe (Torsionstest und Drei-Punkt-Biegeprüfung). Die Steroidgabe erzielte nicht den gewünschten negativen Effekt auf die Knochen.

Dementsprechend kann das beschriebene Tiermodell verwendet werden, um weitere Untersuchungen zur osteoporosebedingter Frakturheilung, auch in Kombination mit neuen Biomaterialien oder Implantaten, durchzuführen.

## 6 Summary

Aim of this study was to establish a basic model for the further study of osteoporosis. Postmenopausal and senile osteoporosis in ovariectomized rats was established through multi-deficient diet and steroidal induction.

The study encompassed four groups, two control and two experimental groups. The two control groups were divided into: 1) an initial control to show bone status before treatment start (control, 0M; n=10); 2) a sham operated group that served as an experimental control (sham, 3M, 12M, 14M; n=10 each). The experimental groups were divided according to their treatment post bilateral ovariectomy into two groups as well: 1) steroid induced osteoporosis, (OVX+Steroid, 3M; n=10); 2) Diet-deficiency induced osteoporosis, (OVX+Diet, 3M, 12M, 14M; n=10 each).

The study examined biomechanical competence in several anatomical sites: 1) compression tests of the vertebra body (Th8 und Th9) to assess loading at failure, 2) torsion test of the right tibia to assess torsional stiffness and torque at failure and 3) three-point-bending measurements of the right femur bending and breaking load.

At the early phase (after 3M), both treatments reflected a significantly inferior biomechanical competence (compression test) in the vertebral bodies Th8 and Th9 when compared to the sham (OVX+Diet  $p = 0.002$  Th8,  $p < 0.001$  Th9; OVX+Steroid  $p = 0.011$  Th8,  $p = 0.006$  Th8, respectively) showed differences. At the later phase under diet-deficiency this effect intensified (12M, Th8;  $p < 0.001$ ). However, no further effects were seen at 14M in the vertebrae.

Although torsional stiffness showed only a lower trend, the maximum torque at failure was significantly lower in the OVX+Diet at 3M when compared to the sham ( $p = 0.013$ ). However, torsional stiffness of the sham group was lower at 12M when compared to 3M ( $p = 0.954$ ) and then higher at 14M compared to 12M ( $p = 0.025$ ). The maximum torque at failure was significantly lower at 12M compared to sham ( $p = 0.017$ ). The OVX+Diet group showed lower torsional stiffness and torque at 12M compared to 3M ( $p = 0.012$  and  $p = 0.014$ , respectively), nonetheless, minimal changes occurred at 14M.

In the three-point bending test significantly higher differences in the breaking load between sham and OVX+Diet ( $p = 0.011$ ) and sham and OVX+Steroid group ( $p < 0.001$ ) were observed after 3 months. The bending was significantly increased between sham and OVX+Steroid group ( $p = 0.029$ ). In the femur, the three-point bending test in the sham group showed higher bending and breaking force at 12M when compared to 3M ( $p < 0.001$  and  $p = 0.265$  respectively), two months later at 14M there was no real change. In the OVX+Diet group the mechanical parameters showed a significant increase (each  $p < 0.001$ ) between the 3<sup>th</sup> and the 12<sup>th</sup> month. From 12 to 14 months it decreased slightly.

In conclusion, bilateral ovariectomy combined with multi-deficient diet influence the mechanical properties of cancellous and cortical bone in the rat spine and long bone, negatively. Inferior bone competence in the OVX+Diet group vertebra indicated that. Induction of osteoporotic bone status took place in cancellous bone (compression test) after 3 months of treatment. However in the cortical bone (torsional and three-point-bending tests) the osteoporotic bone status influenced its integrity at later stage after 12 months of treatment.

Therefore, the described animal model could be utilized for further investigation of osteoporotic fractures healing aided with novel osteoinductive biomaterials.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

BMC	Bone Mineral Content
BMD	Bone Mineral Density
BMI	Body Mass Index
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
BWS	Brustwirbelsäule
CRP	C-reaktives Protein
DXA	Dual X-Ray Absorptiometrie
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm
Il-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
i.v.	intravenous
kg	Kilogramm
LWS	Lendenwirbelsäule
L1 / 4	Lendenwirbel 1 / 4
LWK	Lendenwirbelkörper
mg	Milligramm
min	Minute
N	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
pQTC	periphere Quantitative Computertomographie
OVX	Ovarektomie
Ö	Östrogen
QCT	Quantitative Computertomographie
RANK	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B
RANKL	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand
s.c.	subcutan
SD	Standardabweichung
Th8	Thorakalwirbel 8
Th9	Thorakalwirbel 9
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha



T-Wert	Maximale Knochendichte in einem Kollektiv junger gesunder Erwachsener
WK	Wirbelkörper

## 8 Abbildungs-/Tabellenverzeichnis

### Abbildungen:

- Abb. 1:** Veränderung des Habitus bei osteoporotischen Patienten [Niethard FU., Pfeil J., Biberthaler P.: *Orthopädie und Unfallchirurgie (Duale Reihe)*. 6. Auflage, Thieme, Stuttgart 2009, S. 147].....S. 7
- Abb. 2:** DXA-Messung der Lendenwirbelsäule [Bartl R: *Osteoporose – Prävention-Diagnostik-Therapie*, 4. Auflage, Thieme, 2010, S. 86]...S. 9
- Abb. 3:** Quantitative Computertomographie der Wirbelsäule. Festlegung der Schichtebene [Bartl R: *Osteoporose – Prävention-Diagnostik-Therapie*, 4. Auflage, Thieme, 2010, S. 90].....S. 10
- Abb. 4:** Röntgenbild der Wirbelsäule. Erhöhte Knochentransparenz und Rarefizierung der Trabekel, Fischwirbel und ein Keilwirbel (Pfeil, LWK 1) [Ackermann H et al.: *ALLEX Alles fürs Examen, Band B*, Georg Thieme Verlag, 2012, S. 318].....S. 11
- Abb. 5:** Schematischer Aufbau eines Röhrenknochens [Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K: *Prometheus-LernAtlas der Anatomie, Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*. Thieme, Stuttgart, 2005, S. 35].....S. 13
- Abb. 6:** Entwicklung eines Röhrenknochens [Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K: *Prometheus-LernAtlas der Anatomie, Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*. Thieme, Stuttgart, 2005, S. 14].....S. 14
- Abb. 7:** Schematischer Knochenaufbau [Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K: *Prometheus-LernAtlas der Anatomie, Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*. Thieme, Stuttgart, 2005, S. 35].....S. 16
- Abb. 8:** Die Tierhaltung in den Makrolonkäfigen.....S. 25

---

<b>Abb. 9:</b>	Die Ratte ist am Rücken rasiert und liegt auf der Heizmatte.....	S. 28
<b>Abb. 10:</b>	Vorlagerung und Abbinden des Ovars.....	S. 29
<b>Abb. 11:</b>	Abtrennung des Ovars zwischen den zwei Ligaturen.....	S. 29
<b>Abb.12:</b>	Die geklammerte Naht am Rücken in der Aufwachphase nach der Operation.....	S. 30
<b>Abb. 13:</b>	Eröffnung des Peritoneums bei der Sham-Operation.....	S. 30
<b>Abb. 14:</b>	Rechter Femur und rechte Tibia nach der Präparation.....	S. 32
<b>Abb. 15:</b>	Die Wirbelsäule vor der Präparation.....	S. 32
<b>Abb. 16:</b>	Ein Wirbelkörper (BWS) nach der Präparation.....	S. 32
<b>Abb. 17:</b>	Die Prüfmaschine (Typ Z10, Serien-Nr. Ab 480483) zur Kompression der Wirbelkörper.....	S. 34
<b>Abb. 18:</b>	Die Kompression eines Wirbelkörpers. Der Wirbelkörper befindet sich zwischen dem Auflager und dem Druckstempel.....	S. 34
<b>Abb. 19:</b>	Die Tibia in der Eingießvorrichtung. Das distale Ende ist in Technovit <sup>®</sup> eingebettet.....	S. 35
<b>Abb. 20:</b>	Die Tibia ist in der Materialprüfmaschine eingespannt.....	S. 36
<b>Abb. 21:</b>	Die Tibia in den Halterungen der Prüfmaschine nach dem Bruch.....	S. 36
<b>Abb. 22:</b>	Rechter Femur in der Probehalterung. Das distale Ende ist in Technovit <sup>®</sup> eingebettet.....	S. 37

---

<b>Abb. 23:</b>	Die Prüfvorrichtung für die Messung der Rattenfemora mit eingespanntem Dummy.....	S. 38
<b>Abb. 24:</b>	Schematische Darstellung der Drei-Punkt-Biegung [Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Helmholtzstraße 14, 89081 Ulm].....	S. 38
<b>Abb. 25:</b>	Der in der Prüfmaschine eingespannte Femur wird gemessen.....	S. 39
<b>Abb. 26:</b>	Nach der 4. Messreihe ist der Femur zerbrochen.....	S. 39
<b>Abb. 27:</b>	Gewichtsentwicklung der Gruppen im zeitlichen Verlauf.....	S. 42
<b>Abb. 28:</b>	Tibia der Kontrolle.....	S. 43
<b>Abb. 29:</b>	Tibia der Sham-Gruppe nach 3 Monaten.....	S. 43
<b>Abb. 30:</b>	Tibia der Sham-Gruppe nach 14 Monaten.....	S. 43
<b>Abb. 31:</b>	Femur der Sham-Gruppe nach 3 (links) und 14 Monaten (rechts).....	S. 44
<b>Abb. 32:</b>	Wirbelkörper der Sham-Gruppe nach 3 Monaten.....	S. 44
<b>Abb. 33:</b>	Wirbelkörper der Sham-Gruppe nach 14 Monaten.....	S. 44
<b>Abb. 34:</b>	Femur der Sham-Gruppe nach 3 (links) und 14 Monaten (Mitte), sowie der Diät-Gruppe nach 14 Monaten (rechts) im Vergleich.....	S. 45
<b>Abb. 35:</b>	Femur der Diät-Gruppe nach 12 Monaten.....	S. 45
<b>Abb. 36:</b>	Femur der Diät-Gruppe nach 14 Monaten.....	S. 45
<b>Abb. 37:</b>	Tibia der Diät-Gruppe nach 12 Monaten.....	S. 46

---

<b>Abb. 38:</b>	Tibia der Diät-Gruppe nach 14 Monaten.....	S. 46
<b>Abb. 39:</b>	Wirbelkörper der Diät-Gruppe nach 14 Monaten (links) und der Sham-Gruppe nach 3 Monaten (rechts).....	S. 46
<b>Abb. 40:</b>	Kompressionskraft von Th8 nach 3 Monaten.....	S. 47
<b>Abb. 41:</b>	Kompressionskraft von Th9 nach 3 Monaten.....	S. 48
<b>Abb. 42:</b>	Kraft von Th8 im Verlauf (Kontrolle/Sham vs. Diät im Verlauf).....	S. 49
<b>Abb. 43:</b>	Kraft von Th9 im Verlauf (Kontrolle/Sham vs. Diät im Verlauf).....	S. 49
<b>Abb. 44:</b>	Torsionssteifigkeit der Tibia nach 3 Monaten.....	S. 51
<b>Abb. 45:</b>	Bruchmoment der Tibia nach 3 Monaten.....	S. 51
<b>Abb. 46:</b>	Torsionssteifigkeiten und Bruchmomente der Tibia im Verlauf (Kontrolle/Sham vs. Diät im Verlauf).....	S. 53
<b>Abb. 47:</b>	Biegesteigung des Femur nach 3 Monaten.....	S. 55
<b>Abb. 48:</b>	Bruchkraft des Femur nach 3 Monaten.....	S. 56
<b>Abb. 49:</b>	Biegesteigung und Bruchkraft des Femur im Verlauf (Kontrolle/Sham vs Diät im Verlauf).....	S. 57

**Tabellen:**

<b>Tab. 1:</b>	Einteilung primäre vs. sekundäre Osteoporose.....	S. 3
<b>Tab. 2:</b>	WHO Schweregrade der Osteoporose. [Niethard FU., Pfeil J., Biberthaler P.: <i>Orthopädie und Unfallchirurgie (Duale Reihe)</i> . 6. Auflage, Thieme, Stuttgart 2009, S. 148].....	S. 6
<b>Tab. 3:</b>	Bildgebende Untersuchungen der Osteoporose.....	S. 9
<b>Tab. 4:</b>	Übersicht über die Operationen.....	S. 26
<b>Tab. 5:</b>	Übersicht über die Zeitpunkte der Tötungen.....	S. 26
<b>Tab. 6:</b>	Übersicht über die Messungen der Knochen und der gemessenen mechanischen Parameter.....	S. 26
<b>Tab. 7:</b>	Mittelwerte und Standardabweichungen der Gewichte in Gramm (g) der jeweiligen Versuchsgruppen.....	S. 42
<b>Tab. 8:</b>	Mittelwerte und Standardabweichung der Kraft im Kompressionsversuch von Th8 und Th9.....	S. 50
<b>Tab. 9:</b>	Mittelwerte und Standardabweichungen der Torsionssteifigkeit und Bruchmomente der Tibia.....	S. 53
<b>Tab. 10:</b>	Mittelwerte und Standardabweichungen der Biegesteigung und Bruchkraft des Femurs.....	S. 55
<b>Tab. 11:</b>	Mittelwerte des BMD ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) der Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten.....	S. 90
<b>Tab. 12:</b>	Mittelwerte des BMC (g) der Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten.....	S. 90

## 9 Literaturverzeichnis

Abe T, Chow JW, Lean JM, Chambers TJ (1993). Estrogen does not restore bone lost after ovariectomy in the rat. *J Bone Miner Res* **8** (7): 831-838

Adami S, Bertoldo F, Brandi ML, Cepollaro C, Filippini P, Fiore E, Frediani B, Giannini S, Gonnelli S, Isaia GC, Luisetto G, Mannarino E, Marcocci C, Masi L, Mereu C, Migliaccio S, Minisola S, Nuti R, Rini G, Rossini M, Varenna M, Ventura L, Bianchi G; Società Italiana dell'Osteoporosi, del Metabolismo Minerale e delle Malattie dello Scheletro (2009). Guidelines for the diagnosis, prevention, and treatments of Osteoporosis. *Reumatismo* **61** (4): 260-284

Adler CP: *Knochenkrankheiten*. 2. Auflage, Springer, 1983, S. 65-79

Ackermann H, Aden K, Aurich M, Becker G, Bley C-H, Centgraf M, Dettenkofer M, Döriges S, Ebner W, Eichbaum C, von Figura A, Förster M, Frank U, Genzwürker H, Gminski R, Graze H, Hallbach J, Hauser K, Heppich M, Hermanns G, Herren C, Hermann E, Hinkelbein J, Hohner M, Horn H, Hucklenbroich P, Jacobi E, Jaroslowski K, Johann P-D, Keil J, Klingelhöfer E, Kraatzs J, Krischak G, Kröner H-P, Latz P, Lautenbacher H, Ledig T, Marx M, Merker M, Miksch A, Obermann K, Panea R, Pflieger C, Rehme J, Röhring G, von Sanden S, Schlingloff F, Schneider J, Schnurbs-Duhs A, Schöne-Seifert B, Schulze J, Seiter H, Stahl H-C, Stangler-Alpers E, Wacker-Rohrbach C, Xander C, Ziesenitz V, Zimmer G, Zobel AM: *ALLEX Alles fürs Examen, Band B*, Georg Thieme Verlag, 2012, S 318

Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J (1998). Interspecies difference in bone composition, density, and quality: Potential implications for *in vivo* bone research. *Endocrinology* **139** (2): 663-670

Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spänel-Borowski K, Wolff W, Wurzinger L, Zilch HG: *Anatomie (Duale Reihe)*, Thieme, Stuttgart 2007, S. 49-56

Barlet JP, Coxam V, Davicco MJ, Gaumet N (1994). Animal models of postmenopausal osteoporosis. *Reprod Nutr Dev* **34** (3): 221-236

Bartl R, Gradinger R (2009). Current diagnosis and therapy of osteoporosis on the basis of „European guidance 2008“. *Orthopade* **38** (4): 365-379

Bartl R: *Osteoporose – Prävention-Diagnostik-Therapie*, 4. Auflage, Thieme, 2010, S. 85-90

Benninghoff A, Drenckhahn D: *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Band 1, 17. Auflage, Elsevier, 2008, S.133-149 und S. 266-277

Blake GM, Fogelman I (2007). Role of dual-energy X-ray absorptiometry in the diagnosis and treatment of osteoporosis. *J Clin Densitom.* **10** (1): 102-110

Böge A: *Technische Mechanik, Statik-Dynamik-Fluidmechanik-Festigkeitslehre*. 29. Auflage, Vieweg + Teubner, 2011, S. 4

Borchers RE, Gibson LJ, Burchardt H, Hayes WC (1995). Effects of selected thermal variables on the mechanical properties of trabecular bone. *Biomaterials* **16** (7): 545-551

Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE (2003). The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone* **32** (2): 136-141

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423** (6937): 337-342

Braun J, Pfeilschifter J (2010). Osteoporosis diagnosis and therapy according to the 2010 guidelines. *Z Rheumatol.* **69** (4): 327-339

Breusch S, Mau H, Sabo D: *Klinikleitfaden Orthopädie: Konservative und operative Orthopädie, Unfallchirurgie*. 5.Auflage, Urban und Fischer, 2006, S. 444-447

Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. (1993) *Am J Med* **94** (6): 646-650

Cummings SR, Melton LJ (2002). Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* **359** (9319): 1761-1767

Dasher LG, Newton CD, Lenchik L (2010). Dual X-ray absorptiometry in today's clinical practice. *Radiol Clin North Am.* **48** (3): 541-560



Davidson MK, Lindsey JR, Davis JK (1987). Requirements and selection of an animal model. *Isr J Med Sci.* **23** (6): 551-555

Dempster DW, Birchman R, Xu R, Lindsay R, Shen V (1995). Temporal changes in cancellous bone structure of rat immediately after ovariectomy. *Bone* **16** (1): 157-161

Diehl B, Erb R, Heise H, Kotthaus U, Lindner K, Schlichting HJ, Schmalhofer C, Schön LH, Schröder, Schulze H, Schulze P, Tews W, Tillmanns P, Winter R: *Physik Oberstufe*. 1. Auflage, Cornelsen, Berlin, 2008, S.34

DVO Leitlinie 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen (2009). *Osteologie* **18**: 304-328

El Khassawna T, Böcker W, Govindarajan P, Schlieffe N, Hürter B, Kampschulte M, Schlewitz G, Alt V, Lips KS, Faulenbach M, Möllmann H, Zahner D, Dürselen L, Ignatius A, Bauer N, Wenisch S, Langheinrich AC, Schnettler R, Heiss C (2013). Effects of multi-deficiencies-diet on bone parameters of peripheral bone in ovariectomized mature rat. *Plos One* **8** (8): e71665

Egermann M, Goldhahn J, Schneider E (2005). Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int* **16** (Suppl 2): 129-138

Food and Drug Administration: *Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention of treatment of postmenopausal osteoporosis*. Division of Metabolic and Endocrine Drug Products, Food and Drug Administration, United States, 1994

Frost HM, Jee WS (1992). On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner* **18** (3): 227-236

Fuhrmann E, Horn H, Imhof G, Kindler U, Lensch G, Mix G, Ukens H.: *Einführung in die Werkstoffkunde und Werkstoffprüfung Band 2*. 2. Auflage, Expert Verlag, Renningen 2008, S. 9

Gala Paniaqua J, Diaz-Curiel M, de la Piedra Gordo C, Castilla Reparaz C, Torralbo Garcia M (1998). Bone mass assessment in rats by dual energy X-ray absorptiometry. *Br J Radiol* **71** (847): 754-758

Gärdsell P, Johnell O, Nilsson BE, Sernbo I (1991). Bone mass in an urban and a rural population: a comparative, population-based study in southern Sweden. *J Bone Miner Res* **6** (1): 67-75

Gerlach UV (2002). Induktion von Osteoporose beim Schaf. Tierexperimentelles Modell zur Untersuchung der Frakturbehandlung beim osteoporotischen Knochen. Inaugural-Dissertation der Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Govindarajan P, Khassawna T, Kampschulte M, Böcker W, Huerter B, Dürselen L, Faulenbach M, Heiss C. (2013). Implications of combined ovariectomy and glucocorticoid (dexamethasone) treatment on mineral, microarchitectural, biomechanical and matrix properties of rat bone. *Am J Pathol* **94** (6): 387-398

Govindarajan P, Schlewitz G, Schliepke N, Weisweiler D, Alt V, Thormann U, Lips S K, Wenisch S, Langheinrich A C, Zahner D, Hemdan N, Böcker W, Schnettler R, Heiss C (2013). Implications of combined ovariectomy/multi-deficiency diet on rat bone with age-related variations in bone parameters and bone loss at multiple skeletal sites by DEXA. *Med Sci Monit Basic Res* **19**: 76-86

Govindarajan P, Böcker W, El Khassawna T, Kampschulte M, Schlewitz G, Huerter B, Sommer U, Dürselen L, Ignatius A, Bauer N, Szalay G, Wenisch S, Lips KS, Schnettler R, Langheinrich A, Heiss C (2014). Bone matrix, cellularity, and structural changes in a rat model with high-turnover osteoporosis induced by combined ovariectomy and a multiple-deficient diet. *Am J Pathol.* **184** (3): 765-777

Grardel B, Sutter B, Flautre B, Viguier E, Lavaste F, Hardouin P (1994). Effects of glucocorticoids on skeletal growth in rabbits evaluated by dual-photon absorptiometry, microscopic connectivity and vertebral compression strength. *Osteoporos Int* **4** (4): 204-210

Gross D, Hauger W, Schröder J, Wall A: *Technische Mechanik 2*. 11. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg 2012, S.7-14

Hazzard DG, Bronson RT, McClearn GE, Strong R (1992). Selection of an appropriate animal model to study aging processes with special emphasis on the use of rat strains. *J Gerontol* **47** (3): B63-64

Heiss C, Govindarajan P, Schlewitz G, Hemdan NY, Schliecke N, Alt V, Thormann U, Lips KS, Wenisch S, Langheinrich AC, Zahner D, Schnettler R (2012). Induction of osteoporosis with its influence on osteoporotic determinants and their interrelationships in rats by DEXA. *Med Sci Monit* **18** (6): BR199-207

Heldmaier G, Neuweiler G: *Vergleichende Tierphysiologie, Band 2, Vegetative Physiologie*. Springer, Berlin Heidelberg 2004, S. 441

Indrekvam K, Schnell Husby OS, Gjerdet NR, Engester LB, Langeland N (1991). Age-dependent mechanical properties of rat femur. Measured in vivo and in vitro. *Acta Orthop Scand* **62** (3): 248-252

Javaid MK, Cooper C (2002). Prenatal and childhood influences on osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **16** (2): 349-367

Jee WS, Yao W (2001). Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuron Interact* **1** (3): 193-207

Jiang Y, Zhao J, Genant HK, Dequeker J, Geusens P (1997). Long-term changes in bone mineral and biomechanical properties of vertebrae and femur in aging, dietary calcium restricted, and/or estrogen-deprived/-replaced rats. *J Bone Miner Res* **12** (5): 820-831

Kalu DN (1991). The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* **15** (3): 175-19

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): 468-473

Kimmel DB, Wronski TJ (1990). Nondestructive measurement of bone mineral in femurs from ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* **46** (2): 101-110

Krämer J, Grifka J: *Orthopädie, Unfallchirurgie*. 8. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg 2007, S. 57 und S. 91-96

Lill CA, Fluegel AK, Schneider E (2002). Effect of ovariectomy, malnutrition and glucocorticoid application on the bone properties in sheep: a pilot study. *Osteoporos Int* **13** (6): 480-486

Lill CA, Gerlach UV, Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E (2002). Bone changes due to glucocorticoid application in an ovariectomized animal model for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int* **13** (5): 407-414

Marcus R, Feldman D, Nelson DA, Rosen CJ: *Osteoporosis, Volume 1*. 3. Auflage, Elsevier Academic Press, 2008, S. 601-623

Melton LJ 3rd, Chrischilles EA, Cooper C, Lane AW, Riggs BL (2005). How Many Women Have Osteoporosis?. *J Bone Miner Res.* **20** (5): 886-892

Mosekilde L, Danielsen CC, Knudsen UB (1993). The effect of aging and ovariectomy on the vertebral bone mass and biomechanical properties of mature rats. *Bone* **14** (1): 1-6

Mosekilde L, Mosekilde L, Danielsen CC (1987). Biomechanical competence of vertebral trabecular bone in relation to ash density and age in normal individuals. *Bone* **8** (2): 79-85

Müller R, Kampschulte M, Khassawna TE, Schlewitz G, Hürter B, Böcker W, Bobeth M, Langheinrich AC, Heiss C, Deutsch A, Cuniberti G. (2014). Change of mechanical vertebrae properties due to progressive osteoporosis: combined biomechanical and finite-element analysis within a rat model. *Med Biol Eng Comput* **52** (4): 405-414

Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P: *Orthopädie und Unfallchirurgie (Duale Reihe)*. 6. Auflage, Thieme, Stuttgart 2009, S. 144-150

Niethard F, Weber M, Heller KD: *Orthopädie compact*. Thieme, Stuttgart 2005, S. 381-384

Pacifici R (1996). Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* **11** (8): 1043-1051

Peng Z, Tuukkanen J, Väänänen HK (1994). Exercise can provide protection against bone loss and prevent the decrease in mechanical strength of femoral neck in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* **9** (10): 1559-1564

- Peng ZQ, Väänänen HK, Zhang HX, Tuukkanen J (1997). Long-term effects of ovariectomy on the mechanical properties and chemical composition of rat bone. *Bone* **20** (3): 207-212
- Riehle M, Simmchen E: *Grundlagen der Werkstofftechnik*. 2. Auflage, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Stuttgart 2000, S. 141-143
- Rodgers JB, Monier-Faugere MC, Malluche H (1993). Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function. *Bone* **14** (3): 369-377
- Roy A, Heckman MG, O'Connor MI (2011). Optimizing screening of osteoporosis in patients with fragility hip fractures. *Clin Orthop Relat Res*. **469** (7): 1925-1930
- Ruchholtz S, Wirtz DC: *essentials Orthopädie und Unfallchirurgie*. Thieme, Stuttgart 2010, S. 183-187
- Sambrook P, Cooper C (2006). Osteoporosis. *Lancet* **367** (9527): 2010-2018
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K: *Prometheus-LernAtlas der Anatomie, Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*. Thieme, Stuttgart, 2005, S. 35
- Stelzmann U, Groth C, Müller G: *FEM für Praktiker-Band 2 Strukturodynamik*. 5. Auflage, Expert Verlag, Renningen 2008, S. 12
- Turner AS (2001). Animal models of osteoporosis-necessity and limitations. *European Cells and Materials*. **1**: 66-81
- Turner CH (1991). Homeostatic control of bone structure: an application of feedback theory. *Bone* **12** (3): 203-217
- Turner CH, Burr DB (1993). Basic biomechanical measurements of bone: a Tutorial. *Bone* **14** (4): 595-608
- Vogel HG (1980). Influence of maturation and aging on mechanical and biochemical properties of connective tissue in rats. *Mech Ageing Dev*. **14** (3-4): 282-293
- Wittenburg J, Pestel E: *Festigkeitslehre. Ein Lehr- und Arbeitsbuch*. 3. Auflage in veränderter Ausstattung, Springer, Berlin Heidelberg 2011, S. 50-51

Wülker N, Kluba T, Rehart S, Reize P, Roetman B, Rudert M: *Taschenlehrbuch Orthopädie und Unfallchirurgie*. 2. Auflage, Thieme, Stuttgart 2010, S. 487-498

## 10 Anhang

Im Folgenden sind die Knochendichte (BMD) und der Knochenmineralgehalt (BMC) der einzelnen Gruppen im Verlauf schematisch dargestellt.

		0 Monate	3 Monate	12 Monate	14 Monate
<b>Wirbelsäule</b>	Sham	0,150	0,168	0,169	0,160
	OVX+Diät		0,125	0,118	0,113
	OVX+Steroid		0,144		
<b>Femur</b>	Sham	0,190	0,213	0,233	0,223
	OVX+Diät		0,165	0,135	0,125
	OVX+Steroid		0,183		
<b>Tibia</b>	Sham	0,160	0,171	0,174	0,167
	OVX+Diät		0,131	0,115	0,102
	OVX+Steroid		0,150		

Tab 11: Mittelwerte des BMD ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) der Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten.

		0 Monate	3 Monate	12 Monate	14 Monate
<b>Wirbelsäule</b>	Sham	1,83	2,43	2,90	3,33
	OVX+Diät		2,03	1,98	1,88
	OVX+Steroid		2,14		
<b>Femur</b>	Sham	0,54	0,62	0,72	0,72
	OVX+Diät		0,52	0,38	0,38
	OVX+Steroid		0,53		
<b>Tibia</b>	Sham	0,36	0,38	0,45	0,45
	OVX+Diät		0,31	0,25	0,21
	OVX+Steroid		0,33		

Tab. 12: Mittelwerte des BMC (g) der Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten.

## 11 Publikationsverzeichnis

1. El Khassawna T, Böcker W, Govindarajan P, Schliepke N, Hürter B, Kampschulte M, Schlewitz G, Alt V, Lips KS, Faulenbach M, Möllmann H, Zahner D, Dürselen L, Ignatius A, Bauer N, Wenisch S, Langheinrich AC, Schnettler R, Heiss C (2013). Effects of multi-deficiencies-diet on bone parameters of peripheral bone in ovariectomized mature rat. *PLoS One* **8** (8): e71665
2. Govindarajan P, Khassawna T, Kampschulte M, Böcker W, Huerter B, Dürselen L, Faulenbach M, Heiss C. (2013). Implications of combined ovariectomy and glucocorticoid (dexamethasone) treatment on mineral, microarchitectural, biomechanical and matrix properties of rat bone. *Int J Exp Pathol* **94** (6): 387-398
3. Govindarajan P, Böcker W, El Khassawna T, Kampschulte M, Schlewitz G, Huerter B, Sommer U, Dürselen L, Ignatius A, Bauer N, Szalay G, Wenisch S, Lips KS, Schnettler R, Langheinrich A, Heiss C (2014). Bone matrix, cellularity, and structural changes in a rat model with high-turnover osteoporosis induced by combined ovariectomy and a multiple-deficient diet. *Am J Pathol.* **184** (3): 765-777
4. Müller R, Kampschulte M, Khassawna TE, Schlewitz G, Hürter B, Böcker W, Bobeth M, Langheinrich AC, Heiss C, Deutsch A, Cuniberti G. (2014). Change of mechanical vertebrae properties due to progressive osteoporosis: combined biomechanical and finite-element analysis within a rat model. *Med Biol Eng Comput* **52** (4): 405-414

Vortrag auf der 62. Jahrestagung der Norddeutschen Orthopäden- und Unfallchirurgischenvereinigung e.V.: Tiermodell der Ratte - Eine biomechanische Studie. B. Hürter, G. Schlewitz, T. El Khassawna, W. Böcker, L. Dürselen, A. Ignatius, R. Schnettler, C. Heiß (2013)



## 12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Datum

Unterschrift

## 13 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Univ. - Professor Dr. med. Christian Heiß, meinem Doktorvater, der mir diese interessante Promotionsarbeit ermöglicht hat. Ebenso stand er mir bei der Verwirklichung der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite und nahm sich viel Zeit dafür.

Meiner Betreuerin Frau Dr. med. Gudrun Schlewitz gilt ebenso ein besonderer Dank, die engagiert und hilfsbereit war. Sie hatte stets einen Gesamtüberblick über das Projekt.

Ein recht herzliches Dankeschön geht an die Mitarbeiter des Institutes für unfallchirurgische Forschung und Biomechanik in Ulm, an Frau Univ. - Professor Dr. med. vet. Anita Ignatius und an Herrn Priv.-Doz. Dr. biol. hum. Lutz Dürselen. Besonders danke ich Frau Patrizia Horny, die mir ermöglichte die biomechanischen Messungen mit ihrer Hilfe und unterer Ihrer Anleitung durchzuführen

Dem wissenschaftlichen Mitarbeiter des SFB/TRR 79, Dr. Thaqif ElKhassawna, danke ich ebenfalls für die Unterstützung der statistischen Ausarbeitung der Ergebnisse.

Ebenfalls danke ich dem Sonderforschungsbereich/TRR 79 und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Ermöglichung und Förderung dieser Doktorarbeit.

Auch danke ich den Mitarbeitern des Labors für experimentelle Unfallchirurgie, Gießen. Sie kümmerten sich um die Probenaufbewahrung und Vorbereitung der Tötungen.

Herrn Dr. Jörn Pons-Kühnemann, Mitarbeiter des Institutes für Medizinische Informatik (Leiter: Herr Dr. Bödecker), danke ich für die statistische Beratung dieser Arbeit.

Natürlich gilt mein Dank ganz besonders auch meiner Familie, die mich während der gesamten Zeit der Promotion unterstützte.

Ebenfalls danke ich Tim für die liebevolle Unterstützung.