

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für experimentelle Medizin, Institut für Osteologie und Biomechanik

Prof. Dr. med. Michael Amling

Mineralisierung von therapienaivem und bisphosphonat- therapiertem Knochen bei postmenopausaler Osteoporose: Unterschiedliche Knochenregionen im Vergleich

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von

Lydia Felicitas Herzog
aus Nürnberg

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.12.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. M. Amling

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. M. Graeser

Inhalt

Fragestellung und Zielsetzung.....	v
1 Einleitung und Grundlagen.....	1
1.1 Osteoporose	2
1.1.1 Formen.....	2
1.1.2 Symptomatik	3
1.1.3 Diagnostik	3
1.1.4 Therapie der Osteoporose.....	5
1.2 Aufbau und Funktionen von Knochengewebe.....	7
1.2.1 Funktionen von Knochengewebe	7
1.2.2 Zusammensetzung und Aufbau von Knochengewebe.....	7
1.2.3 Lamellenknochen.....	9
1.2.4 Geflechtknochen.....	9
1.2.5 Knochenhäute.....	10
1.3 Knochenzellen	11
1.4 Remodeling.....	15
1.5 Bisphosphonate	17
1.5.1 Aufbau.....	17
1.5.2 Pharmakomechanismen	17
1.5.3 Kontrolle und Validierung der Effekte von Bisphosphonaten auf den Knochen.....	18
1.5.4 Das BioAsset-Konsortium.....	21
1.6 Rasterelektronenmikroskopie	22
1.6.1 Funktionsweise eines Rasterelektronenmikroskops	22

1.6.2	Quantitative Rückstreuelektronenmikroskopie / Quantitative Backscattered Electron Microscopy	22
1.6.3	Bone Mineral Density Distribution (BMDD)	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Untersuchtes Kollektiv	25
2.1.2	Gruppeneinteilung	26
2.2	Probenvorbereitung	27
2.2.1	Gewinnung der Proben	27
2.2.2	Entwässerung und Infiltration	27
2.2.3	Polymerisation	28
2.2.4	Schleifen und Polieren	29
2.2.5	Besputtern	29
2.3	Messungen im Rasterelektronenmikroskop	29
2.4	Mineralisationsanalyse	30
2.4.1	Erstellung der BMDD-Histogramme	30
2.4.2	Statistische Auswertung	31
3	Ergebnisse und Auswertung	33
3.1	Einfluss der Lokalisation auf die Mineralisierungsverteilung	34
3.1.1	Mittelwerte der verschiedenen Lokalisationen	34
3.1.2	Geschätzte Randmittel adjustiert für den Einflussfaktor Gruppe	34
3.1.3	Spongiosa: Vergleich von Beckenkämmen und Radii	37
3.1.4	Kortikalis: Vergleich von Beckenkämmen und Radii	38
3.1.5	Beckenkamm Kortikalis verglichen mit Beckenkamm Spongiosa	39
3.1.6	Radius Kortikalis verglichen mit Radius Spongiosa	41
3.2	Einfluss der Bisphosphonattherapie auf die Mineralisierungsverteilung ..	42
4	Diskussion	47

4.1	Mineralisierungsunterschiede zwischen den Körperregionen	
	Beckenkamm und Radius.....	47
4.1.1	Spongiosa.....	47
4.1.2	Kortikalis.....	50
4.2	Mineralisierungsunterschiede innerhalb einer Körperregion zwischen	
	Kortikalis und Spongiosa.....	54
4.2.1	Beckenkamm.....	54
4.2.2	Radius.....	55
4.3	Bisphosphonateffekte.....	57
4.3.1	Generelle Wirkung von Bisphosphonaten.....	57
4.3.2	Unterschiede der Bisphosphonatwirkung an verschiedenen	
	Lokalisationen.....	60
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	65
	Summary and Outlook.....	66
	Abkürzungsverzeichnis.....	67
	Literaturverzeichnis.....	69
	Publikationsverzeichnis.....	79
	Anhang.....	80
	Danksagung.....	84
	Eidesstattliche Versicherung.....	85

Fragestellung und Zielsetzung

Die genauen Auswirkungen von Bisphosphonaten auf das Mineralisierungsverhalten von Knochen bei postmenopausaler Osteoporose sind weiterhin nicht abschließend verstanden. Insbesondere die Frage nach unterschiedlichen Effekten an verschiedenen Knochen- und Körperregionen ist nicht beantwortet. In dieser Arbeit werden daher kortikaler und trabekulärer Knochen aus Beckenkämmen und Radii mittels qBEI getrennt analysiert, um eventuell vorliegende Unterschiede in der Mineralisierungsverteilung aufzuzeigen.

In einem ersten Schritt sollen hierbei Knochenproben von therapienaiven, verstorbenen Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose untersucht werden. Dabei werden sowohl Unterschiede zwischen Kortikalis und Spongiosa innerhalb einer Körperregion, als auch zwischen den beiden Körperregionen Beckenkamm und Radius untersucht. Dadurch soll der Frage nachgegangen werden, wie sich die Mineralisierung verschiedener Knochen- und Körperregionen bei postmenopausaler Osteoporose schon unabhängig von einer medikamentösen Therapie verhält.

Im zweiten Schritt sollen die gleichen Unterschiede an Biopsien eines Kollektivs postmenopausaler Osteoporosepatientinnen unter Bisphosphonattherapie überprüft werden. Die beiden zentralen Fragestellungen sind hierbei:

1. Liegen signifikante Effekte durch die Bisphosphonattherapie vor?
2. Sind mögliche Effekte an den genannten Lokalisationen unterschiedlich stark ausgeprägt?

Ziel dieser Arbeit ist zum einen, das Mineralisierungsverhalten osteoporotischen Knochens in Abhängigkeit von Körper- und Knochenregion zu untersuchen, und zum anderen, die Frage nach einer eventuell lokalisationsabhängigen Wirkung von Bisphosphonaten näher zu beleuchten.

1 Einleitung und Grundlagen

Osteoporose ist eine chronische Erkrankung, die eine von drei Frauen und einen von fünf Männern über 50 Jahren betrifft (Melton et al., 1998). Aktuelle Hochrechnungen sagen alleine für Deutschland zwischen 2010 und 2050 8,1 Millionen Osteoporose-assoziierte Frakturen vorher. Am stärksten hiervon betroffen sind Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose (Bleibler et al., 2013). In den letzten Jahrzehnten haben sich daher zahlreiche Studien dieser häufigsten Form der Osteoporose und ihrer Pharmakotherapie gewidmet. Die größte Gruppe der sogenannten antiresorptiven Medikamente bilden hierbei seit vielen Jahren Bisphosphonate (BP) (Russell, 2011). Ihre Auswirkungen auf Mikroarchitektur und Mineralisierungsverteilung, und ihr genauer Wirkmechanismus sind jedoch nicht abschließend verstanden und weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Dabei werden in den Studien vielfach Knochenproben des Beckenkammes verwendet (Bala et al., 2011; Roschger et al., 2010; Borah et al., 2010). Dieser stellt jedoch keine typische osteoporotische Frakturlokalisation dar. Klinisch im Vordergrund stehen vielmehr Sinterungsfrakturen der Wirbelkörper, Frakturen des Femurhalses und des distalen Radius (Johnell & Kanis, 2006; World Health Organization, 2004). In dieser Doktorarbeit werden daher die Auswirkungen von Bisphosphonaten auf die Mineralisierung des Radius, als eine der klassischen Frakturlokalisationen untersucht, und mit den Beckenkämmen, als klassische Probenlokalisation vieler Osteoporosestudien verglichen. Spongiosa und Kortikalis, als zwei morphologisch sehr unterschiedliche Knochenkompartimente, werden hierbei unabhängig voneinander ausgewertet. Da jedoch bereits über mögliche Unterschiede in der Mineralisierung verschiedener Körper- und Knochenregionen bei therapienaiver Osteoporose wenig bekannt ist, wird zunächst eine therapienaive Kontrollgruppe näher untersucht, bevor auf die spezifischen Auswirkungen einer Bisphosphonattherapie eingegangen wird.

1.1 Osteoporose

Osteoporose (OPO) ist die bedeutendste Knochenerkrankung des älteren Menschen. Charakteristische Hauptmerkmale sind eine niedrige Knochenmasse und eine Verschlechterung der Mikroarchitektur, die zu erhöhter Knochenbrüchigkeit führen (Briggs et al., 2004; Johnell et al., 2005). Die Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organization, WHO) hat zur Definition der Osteoporose den sogenannten T-Score eingeführt. Ihm liegt die Messung der Knochendichte (engl. Bone Mineral Density, BMD) per Dual-Röntgen-Absorptiometrie (engl. Dual-Energy-X-Ray-Absorptiometry, DXA) zugrunde, und er gibt an, um wie viele Standardabweichungen (SD) ein Wert vom Mittelwert eines gesunden Kontrollkollektivs zwischen 20 und 40 Jahren abweicht. Eine Osteoporose liegt nach WHO-Definition ab einem T-Score von $-2,5$ SD vor (WHO, 2004).

1.1.1 Formen

Es werden zwei Formen von Osteoporose unterschieden, die primäre und die sekundäre. Die primäre Osteoporose wird weiter unterteilt in die

- idiopathische Osteoporose des jungen Menschen,
- Typ I / postmenopausale Osteoporose, die bei Frauen zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr als Folge des Ausfalls der Ovarialfunktion auftritt,
- Typ II / senile Osteoporose, die bei Männern und Frauen ab dem 70. Lebensjahr auftritt.

Die sekundäre Osteoporose tritt infolge bestimmter Grunderkrankungen auf, wie z.B. Hyperthyreose, Hyperparathyreoidismus, Malnutrition oder renaler Osteopathie. Sie kann auch durch Medikamente ausgelöst werden wie z.B. Kortikosteroide, Heparine, Zytostatika oder Protonenpumpenhemmer. Außerdem können einige genetische Erkrankungen wie z.B. Osteogenesis imperfecta, Hypophosphatasie oder das Marfan-Syndrom im Verlauf eine Osteoporose bedingen (Bartl, 2004).

1.1.2 Symptomatik

OsteoporosepatientInnen können völlig beschwerdefrei sein, oder z.B. über starke Rückenschmerzen aufgrund von Wirbelkörperfrakturen klagen. Außerdem fällt teilweise ein Verlust der Körpergröße oder der sog. „Witwenbuckel“ durch Sinterungen der Wirbelkörper (WK) auf. Vielfach manifestiert sich die Erkrankung klinisch erst durch pathologische Frakturen ohne oder nach geringem Trauma. Neben den Sinterungsfrakturen der Wirbelkörper treten diese charakteristischerweise vor allem in Femurhals und distalem Radius auf (Iqbal, 2000; World Health Organization, 2004).

1.1.3 Diagnostik

Zu unter anderem der Diagnostik und Therapie der Osteoporose hat der Dachverband der deutschsprachigen, wissenschaftlichen, osteologischen Gesellschaften (DVO) 2014 eine überarbeitete Leitlinie herausgegeben. Die dort genannten Empfehlungen zur Basisdiagnostik werden in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1: Empfehlungen zur Osteoporosediagnostik des DVO,
modifiziert nach DVO-Leitlinie 2014**

Anamnese und klinischer Befund

- Hinweise für WK-Frakturen, wie z.B. funktionelle Einschränkungen oder Schmerzen
 - Überprüfung und wenn möglich Beseitigung von Risikofaktoren
 - Messung von Körpergröße und -gewicht
 - Beurteilung von Muskelkraft und Koordination, ggf. geriatrisches Assessment
-

Osteodensitometrie

- Zur Optimierung der Frakturrisikobeurteilung und zur Prüfung der Indikation für eine medikamentöse Therapie
 - Empfohlenes Verfahren ist die DXA-Messung an den drei Messorten LWS, Gesamtfemur und Femurhals
-

Ggf. Röntgen / andere Bildgebung

- Zur Erfassung von WK-Frakturen bei klinischen Hinweisen
 - Röntgenaufnahme der BWS und/oder LWS
 - Ggf. und zur Differentialdiagnostik weitere bildgebende Diagnostik
-

Labor

- Zur Erfassung laborchemisch fassbarer Risikofaktoren und sekundärer Osteoporose, anderer Osteopathien und von Kontraindikationen für eine medikamentöse Therapie
 - Serumkalzium, Serumphosphat
 - Kreatinin-Clearance
 - Alkalische Phosphatase, GGT
 - Blutbild, BSG/CRP, Serumeiweißelektrophorese
 - TSH
 - 25-Hydroxyvitamin D3 als Einzelfallentscheidung, Testosteron bei Männern fakultativ, Knochenumbau-marker als Einzelfallentscheidung
-

1.1.4 Therapie der Osteoporose

Die Therapie der Osteoporose erfordert einen interdisziplinären Therapieansatz, bei dem medikamentöse und nicht-medikamentöse Strategien eingesetzt werden. Die nicht-medikamentösen umfassen hierbei unter anderem regelmäßige Bewegung, diätetische Empfehlungen, Sturzprävention und sog. Lifestyle-Faktoren (z.B. Nikotinverzicht) (Body et al., 2011). Auch chirurgische Interventionen wie die Vertebroplastie und Kyphoplastie gehören zum Therapiespektrum. Im Rahmen der pharmakologischen Therapie ist eine fraktur-reduzierende Wirkung am besten für Bisphosphonate, Bazedoxifen, Denosumab, Östrogene, Teriparatid, Raloxifen und Strontiumranelat belegt. Die Indikationen für eine medikamentöse Therapie der Osteoporose werden in der DVO-Leitlinie von 2014 neu definiert, und sind in Tabelle 2 in verkürzter Form zusammengefasst (DVO Leitlinie Osteoporose, 2014).

Da die verwendeten Knochenproben der vorliegenden Arbeit alle von Frauen mit postmenopausaler Osteoporose (PMO) stammen, soll im Folgenden der Terminus „Osteoporose“ nur für diese Form der Erkrankung gelten.

Tabelle 2: Indikationen für eine medikamentöse Therapie der Osteoporose, modifiziert nach DVO-Leitlinie Osteoporose 2014 (Dachverband der deutschsprachigen, wissenschaftlichen, osteologischen Gesellschaften, 2014)

1. Niedrigtraumatische WK-Fraktur 2. oder 3. Grades singulär oder 1. bis 3. Grades multipel, wenn andere Ursachen einer Fraktur nicht wahrscheinlicher sind, bei einem T-Score $< -2,0$, individuell auch bei einem T-Score $> -2,0$

2. Niedrigtraumatische proximale Femurfraktur bei einem T-Score $< -2,0$, individuell auch bei einem T-Score $> -2,0$

Bei typischen, osteoporotischen, radiologischen und/oder klinischen Aspekten von WK- oder Femurfrakturen kann in Abhängigkeit von der Klinik ggf. auf die Knochendichtemessung verzichtet werden.

3. Bestehende oder geplante Therapie mit oralen Glukokortikoiden $\geq 7,5$ mg Prednisolonäquivalent täglich für > 3 Monate, wenn

- T-Score $\leq -1,5$, individuell auch wenn T-Score $> -1,5$
- Niedrigtraumatische WK-Frakturen oder multiple periphere Frakturen unabhängig vom T-Score

4. Hohes 10-Jahresfrakturrisiko ($>30\%$ für radiographische WK-Frakturen und proximale Femurfrakturen) wenn T-Score $> -2,0$

1.2 Aufbau und Funktionen von Knochengewebe

1.2.1 Funktionen von Knochengewebe

Die Aufgaben des menschlichen Knochengewebes lassen sich in mechanische und metabolische Funktionen gliedern. In seiner mechanischen Funktion bildet das Skelett die zentrale Stütze aller anderen menschlichen Gewebe, schützt empfindliche Weichteile und dient den Sehnen als Ansatzpunkt. Hierdurch ermöglicht es Lokomotion und aufrechten Stand.

Die metabolische Komponente umfasst im Wesentlichen die Kalzium- und Phosphathomöostase und die Blutbildung. Physiologischerweise befinden sich 99 % des im Körper vorhandenen Kalziums im Knochen, und dienen als flexibel mobilisierbares Speicherreservoir. Durch beständigen Auf- und Abbau des Knochens (Remodeling) kann je nach Bedarf vermehrt Kalzium in den Knochen eingebaut, oder mobilisiert werden. Bei diesem Remodeling überwiegt physiologisch im Kindesalter die Knochenformation, im jungen Erwachsenenalter sind Knochenauf- und abbau im Gleichgewicht, und im höheren Lebensalter dominiert die Knochenresorption (Safadi et al., 2009).

1.2.2 Zusammensetzung und Aufbau von Knochengewebe

Die Knochenmatrix besteht zu ca. 40 % aus einer organischen und zu ca. 60 % einer mineralischen Komponente. Die organische Komponente besteht zu über 90 % aus Kollagen Typ I, das intrazellulär als Tropokollagen synthetisiert, und dann in Form von Kollagenfibrillen nach extrazellulär exportiert wird. Darüber hinaus enthält sie unterschiedliche Proteoglykane und Glykoproteine wie z.B. Osteokalzin, Osteopontin, Osteonektin und Knochensialoprotein (Safadi et al., 2009).

Der anorganische Anteil besteht aus Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5[\text{OH}](\text{PO}_4)_3$), einer kristallinen Ablagerungsform des Kalziumphosphats. In geringen Mengen enthält er auch Magnesium, Natrium, Fluorid, Citrat- und Carbonat-Ionen (Safadi et al., 2009).

Durch die vielfältigen, mechanisch einwirkenden Kräfte sind die Anforderungen an die spezifischen Materialeigenschaften von Knochengewebe hoch. Es muss

sowohl eine hohe Druck- und Zugfestigkeit, als auch Elastizität aufweisen. Diesen Erfordernissen trägt ein charakteristischer Aufbau Rechnung: Makroskopisch lässt sich mit bloßem Auge die Gliederung in Kompakta und Spongiosa erkennen. Die Substantia compacta oder Kortikalis dient als harte, äußere Hülle und umgibt die innenliegende Substantia spongiosa. Diese besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk von Knochen trabekeln, das Raum für blutbildendes und Fettgewebe lässt. Die Ausrichtung der einzelnen Trabekel folgt den Zug- und Drucklinien der jeweils größten mechanischen Beanspruchung. Bei Änderung der Belastung werden auch sie entsprechend umgebaut. Dem Prinzip der Leichtbauweise folgend, wird so Material gespart, und trotzdem ein Maximum an mechanischer Belastbarkeit erreicht. Abbildung 1 zeigt diesen charakteristischen Aufbau anhand eines humanen, proximalen Femurs.



Abbildung 1: Humaner, proximaler Femur, Mazerationspräparat, Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr.-Ing. Michael Hahn

Die histologische Struktur des ausgereiften Knochengewebes beim Erwachsenen wird als Lamellenknochen beschrieben. Dieser kann auf zwei unterschiedliche Arten gebildet werden: Entweder entsteht er im Rahmen der desmalen Ossifikation direkt aus mesenchymalen Stammzellen, wie es z.B. im Schädelknochen oder Schlüsselbein der Fall ist, oder eine knorpelige „Schablone“ ossifiziert durch sukzessive Mineralisierung von Kalziumphosphat. Letzterer, als chondrale Ossifikation bezeichneter Entstehungsweg, ist beispielsweise für die Bildung der langen Röhrenknochen verantwortlich (Welsch, 2005).

1.2.3 Lamellenknochen

Lamellenknochen ist physiologischerweise der überwiegende Knochentyp eines ausgewachsenen Menschen. Die zentrale Baueinheit dieses Knochentyps ist das Osteon. Dies ist eine zylindrisch bis unregelmäßig geformte Knochenlamelle (Speziallamelle), die konzentrisch um einen zentral liegenden Haverskanal angeordnet ist. Im Havers-Kanal liegen – eingebettet in lockeres Bindegewebe – Blutgefäße zur Ernährung des Knochens. Wenn diese sich verzweigen und dann in eigenen Kanälen schräg oder quer zu den Havers-Kanälen verlaufen, werden sie Volkmann-Kanäle genannt. Die Kollagenfasern einer Speziallamelle verlaufen helikal um die Gefäßachse und sind in benachbarten Speziallamellen immer unterschiedlich ausgerichtet. Der Raum zwischen den einzelnen Osteonen wird von sogenannten Schaltlamellen aufgefüllt. Hierbei handelt es sich um die Reste alter, abgebauter Speziallamellen, die im Rahmen des Remodelings entstehen. Sogenannte Zement- oder Kittlinien grenzen Spezial- und Schaltlamellen scharf voneinander ab. Darüber hinaus wird die Markhöhle von einer inneren Generallamelle ausgekleidet, und die äußere Oberfläche entsprechend von einer äußeren Generallamelle bedeckt. Im trabekulären Knochen der Spongiosa sind die Lamellen unregelmäßig angeordnet und führen keine Blutgefäße in den Haver'schen Kanälen (Welsch & Sobotta, 2010).

1.2.4 Geflechtknochen

Dieser Knochentyp entsteht zunächst bei der desmalen Ossifikation und im Rahmen der Frakturheilung. Die Kollagenfasern der Matrix liegen hier in groben Bündeln zwischen unregelmäßig verteilten Osteozyten. Im Laufe der Entwicklung

wird er größtenteils zu Lamellenknochen umgebaut. Geflechtknochen ist niedriger mineralisiert als Lamellenknochen und dadurch sehr zugfest und biegunge-elastisch. Nach Abschluss des Wachstums ist er lediglich an den Rändern der Schädelnähte, in den Gehörknöchelchen, Zahnfächern und dem Felsenbein zu finden (Moll & Moll, 2005).

1.2.5 Knochenhäute

Alle Knochen sind außen von einer bindegewebigen Knochenhaut, dem Periost überzogen. Sie besteht aus einer Kollagenschicht und elastischen Fasern (Sharpey-Fasern), sowie einer zellreichen, inneren Schicht, die dem Knochen direkt aufliegt. Diese innere Schicht ist reich an Nerven und Blutgefäßen, durch die der Knochen ernährt und innerviert wird; außerdem können sich ihre Zellen zu Osteoblasten differenzieren. Die Sharpey-Fasern fixieren die Knochenhaut am Knochen, und vermitteln somit die Kraftübertragung von Ansatzstellen von Muskeln und Sehnen (Graumann & Sasse, 2004).

Im Inneren des Knochens überzieht das sogenannte Endost die Oberfläche der Trabekel und kleidet die Markhöhle aus. Es enthält Mesenchymzellen, die bei Bedarf zu Osteoblasten differenzieren können (Welsch & Sobotta, 2010).

1.3 Knochenzellen

In Knochengewebe werden vier verschiedene Zelltypen unterschieden. Dabei stellen Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteozyten verschiedene Entwicklungsstufen einer gemeinsamen Zellreihe dar, während Osteoklasten ein eigenständiger Zelltyp sind.

Osteoprogenitorzellen finden sich hauptsächlich in Endost und Periost. Sie differenzieren sich ständig aus multipotenten, mesenchymalen Stammzellen und bilden die Vorstufe von Osteoblasten (Celso et al., 2009). Bei Bedarf (z.B. im Rahmen der Frakturheilung) können sie aktiviert werden und sich teilen. Unter dem Einfluss, insbesondere des Transkriptionsfaktors Runx2 (runt-related transcription factor 2) differenzieren sie sich dann zu reifen Osteoblasten (Camilleri & McDonald, 2006).

Osteoblasten exprimieren die alkalische Phosphatase (AP) und sezernieren eine extrazelluläre Matrix (Osteoid), die zu 95 % aus Typ-I-Kollagen besteht und weitere knochenspezifische Proteine wie Osteokalzin, Osteopontin und Bone Sialoprotein (BSP) enthält. Durch Einlagerung von Kalziumphosphat mineralisiert das frisch gebildete Osteoid dann in einem mehrere Monate dauernden Prozess. Reife Osteoblasten sind kubisch geformt, liegen in epithelartiger Anordnung auf der Matrixoberfläche und sind über Nexus miteinander verbunden (vgl. hierzu Abbildung 2). Sie produzieren para- und autokrin wirkende Wachstumsfaktoren, und besitzen Rezeptoren für Vitamin D3 und verschiedene Zytokine und Hormone, insbesondere Parathormon. Nach Bindung von Parathormon bilden sie Zytokine und andere Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise RANKL (receptor activator of NF- κ B-Ligand), die Osteoklastenvorläuferzellen zur weiteren Differenzierung stimulieren (Soltanoff et al., 2009).

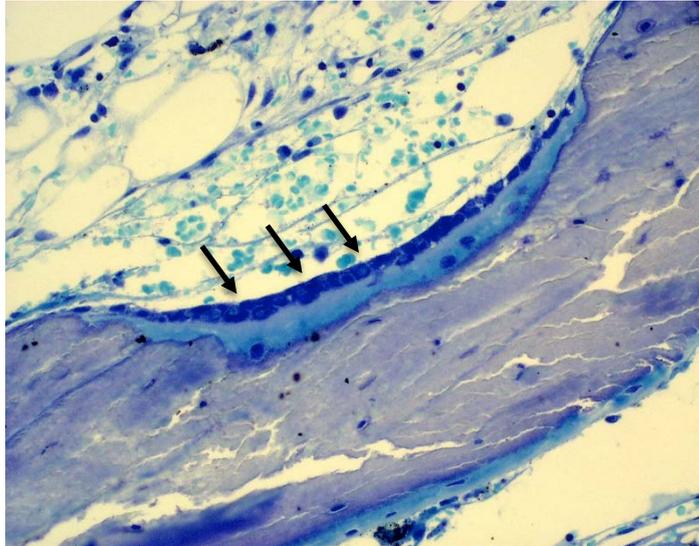


Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahme des Osteoblastensaum (schwarze Pfeile) an der Knochenoberfläche. Unentkalkter, histologischer Schnitt in Toluidinblaufärbung, 100-fache Vergrößerung, Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr.-Ing. Michael Hahn

Im weiteren Verlauf gibt es für Osteoblasten vier mögliche Entwicklungen:

- Sie gehen per Apoptose zugrunde.
- Sie treten in einen inaktiven Ruhezustand ein, und werden so zu sogenannten endostalen Saumzellen (Knochendeckzellen, engl. Bone Lining Cells).
- Sie entwickeln sich zu Zellen weiter, die knorpelartiges Gewebe produzieren.
- Sie werden durch „Einmauerung“ in den Knochen zu Osteozyten.

Ab dem 20. Lebensjahr werden Osteoblasten deutlich seltener; ab einem Alter von 45 Jahren liegt ihre Zahl meist unter 3 – 5 % der Zellen, die die Knochenoberfläche bedecken (Welsch & Sobotta, 2010).

Osteozyten sind terminal ausdifferenzierte Osteoblasten, die in Lakunen der Knochenmatrix eingemauert sind. Sie besitzen zahlreiche Zellfortsätze, die in sogenannten Canaliculi liegen, und die sie über Nexus mit den Zellfortsätzen benachbarter Osteozyten verbinden. So entsteht ein weitverzweigtes Netzwerk, das den Austausch von Elektrolyten und kleineren Molekülen erlaubt, und über das alle Osteozyten per Diffusion erreichbar sind. Auch mit dem Osteoblastensaum

an der Knochenoberfläche stehen sie so in Verbindung, sodass ein Stofffluss von der Oberfläche bis tief in die Osteone hinein ermöglicht wird. Die Funktion von Osteozyten ist nicht abschließend geklärt. Ihr aufwändig gebautes Netzwerk scheint aber für Kommunikation und Stofftransport innerhalb des Knochen, sowie für die Mechanosensorik eine entscheidende Rolle zu spielen (Aarden et al., 1994; Bonewald, 2006; Komori, 2014). Abbildung 3 zeigt exemplarisch eine lichtmikroskopische Aufnahme von Osteozyten, die über Canaliculi miteinander verbunden sind.

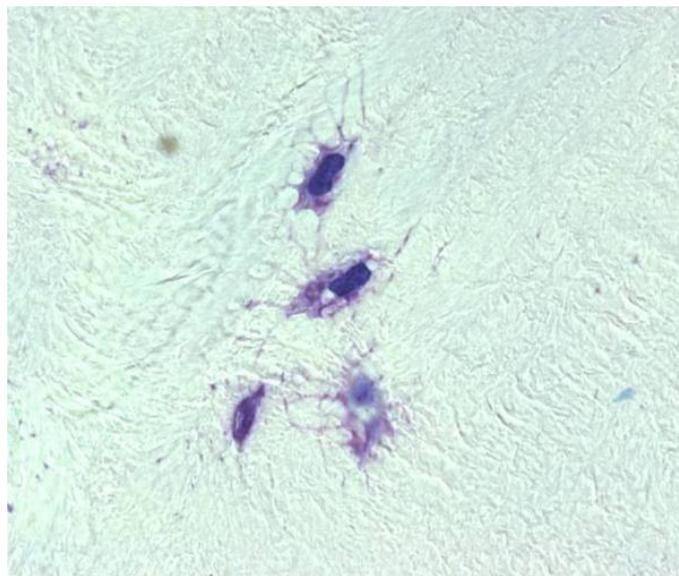


Abbildung 3: Lichtmikroskopische Aufnahme von Osteozyten in ihren Lakunen, die über Canaliculi miteinander in Verbindung stehen. 400-fache Vergrößerung, Toluidinblaufärbung, Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr.-Ing. Michael Hahn

Osteoklasten sind mehrkernige Synzytien, die für die Knochenresorption verantwortlich sind. Sie entstehen aus Vorläuferzellen, die mit dem Monozyten-Makrophagen-System verwandt sind. Bei der Differenzierung zu reifen Osteoklasten sind eine Vielzahl von lokalen und systemischen Faktoren beteiligt. In den letzten Jahren konnte der von Osteoblasten sezernierte RANK-Ligand als einer der entscheidenden identifiziert werden. Er bindet und aktiviert den RANK-Rezeptor (Receptor Activator of NF- κ B), der auf der Oberfläche von Osteoklastenvorläuferzellen exprimiert wird, und setzt so die weitere Differenzierung in Gang. Antagonisierbar ist dieser Prozess durch Osteoprotegerin, das mit hoher Affinität

RANK-Ligand bindet, dessen Aktivität neutralisiert und somit die Osteoklastogenese regulieren kann. Neben diesen lokal produzierten Faktoren sind auch systemisch wirksame Hormone wie Calcitonin, Parathormon und Vitamin D an der Regulation der Osteoklastenformation beteiligt (Keller, 2010; Khosla, 2001). Abbildung 4 zeigt exemplarisch mehrkernige Osteoklasten in einer lichtmikroskopischen Aufnahme.

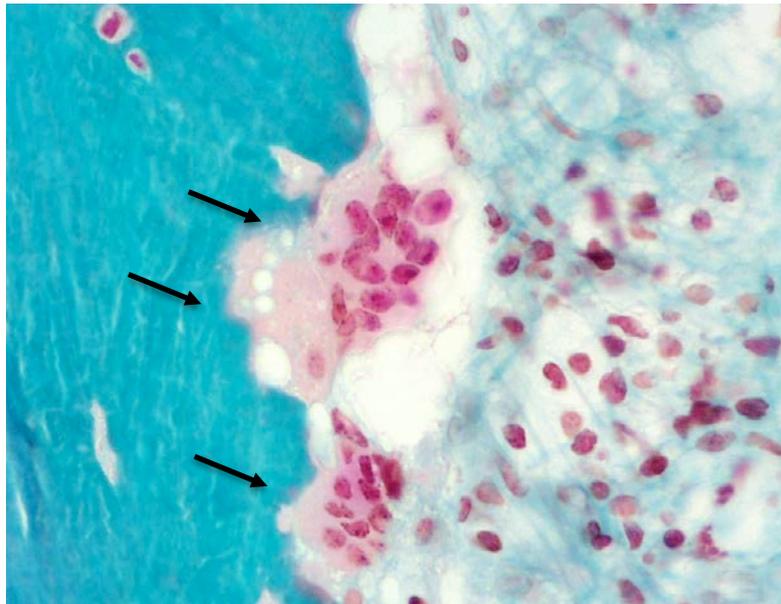


Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahme von Osteoklasten mit mehreren Zellkernen (schwarze Pfeile), 200-fache Vergrößerung, Masson-Goldner-Färbung. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr.-Ing. Michael Hahn

1.4 Remodeling

Wie die meisten anderen biologischen Gewebe, unterliegt auch Knochen einem ständigen Auf-, Um- und Abbau. Dieser, als Remodeling bezeichnete Reparaturmechanismus, dient der Erhaltung eines funktionsfähigen Skelettsystems. Er erfordert eine feine Regulation, um die Balance zwischen osteoklastischer Resorption und osteoblastischer Knochenbildung zu gewährleisten. Diese Balance kann durch verschiedene Faktoren gestört werden, wie z.B. postmenopausale, hormonelle Umstellungen, Nierenerkrankungen, Immobilität oder verschiedene Medikamente (Feng & McDonald, 2011).

Im Folgenden soll der Remodelingzyklus, beginnend mit der osteoklastischen Resorption, näher erläutert werden: In der Spongiosa bilden reife Osteoklasten durch Ansäuerung erste Resorptionshöhlen, die sogenannten Howship-Lakunen an der Oberfläche der Trabekel. Dort, wo die Zellmembran der Osteoklasten direkt an der Knochenmatrix anliegt, bildet sie einen sogenannten Faltensaum (engl. Ruffled Border). Zwischen Faltensaum und Knochenoberfläche entsteht so ein funktionell abgegrenzter Raum, das „subosteoklastische Kompartiment“. Dieses wird an den Seiten versiegelt, indem sich zahlreiche Aktinfilamente der Zelle über Integrine wie Osteopontin an Matrixkomponenten anheften. In der Zellmembran des Faltensaums befinden sich eine ATP-abhängige Protonenpumpe und eine Carboanhydrase, die die Abgabe von Protonen in das subosteoklastische Kompartiment ermöglichen. Durch das so entstehende saure Milieu werden zum einen die HA-Kristalle angedaut. Zum anderen werden saure Hydrolasen aktiviert, die dann die organische Matrix abbauen (Welsch & Sobotta, 2010). Durch diese Resorptionsmechanismen wird alter oder geschädigter Knochen abgebaut. Resorption und Knochenneubildung finden immer parallel und in gegenseitiger Abhängigkeit statt. Im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus ist die Osteoklastentätigkeit mit den Osteoblasten verbunden: Beim Abbau der Knochenmatrix werden dort gebundene Wachstumsfaktoren mobilisiert, die dann die Osteoblasten stimulieren. Diese wiederum können die Funktion von Osteoklasten entweder durch Sekretion von RANKL verstärken oder durch Sekretion von Osteoprotegerin hemmen. Werden die Osteoblasten stimuliert, sezernieren sie

Osteoid, die noch nicht verkalkte Knochenmatrix in den Raum der Howship-Lakunen, der durch die Resorption entstanden ist. Durch Einlagerung von HA-Kristallen verkalkt das Osteoid dann in einem zweistufigen Mineralisierungsprozess. Dabei unterscheidet man die primäre Mineralisation, die innerhalb weniger Monate abgeschlossen ist, von der sekundären, die sich über Jahre erstreckt, und zu hochmineralisiertem, „alten“ Knochen führt (Lüllmann-Rauch, 2009). In jedem Knochen liegen normalerweise viele unterschiedliche Mineralisierungsstufen nebeneinander vor.

Um seine vielfältigen Funktionen erfüllen zu können, unterliegt der Mineralisierungsprozess physiologischerweise einer feinen Regulierung. Ist diese gestört, und liegt insgesamt ein zu geringer Mineralgehalt vor, verliert der Knochen an Festigkeit, wie es z.B. beim Krankheitsbild der Osteomalazie der Fall ist (Roschger et al., 2003). Überwiegen die hochmineralisierten Anteile in pathologischem Ausmaß, wie bei der Osteogenesis imperfecta, treten vermehrt Frakturen auf. Durch den Grad der Mineralisierung werden so Stärke und Widerstandsfähigkeit des Knochens wesentlich mitbestimmt (Boyde et al., 1999).

Der Umbau in der Kompakta erfolgt vergleichbar zu den Vorgängen in der Spongiosa, weist aber einige charakteristische Unterschiede auf: Eine Gruppe von Osteoklasten resorbiert die bestehende Knochenmatrix, sodass ein sog. Bohrkanal entsteht. Im Verlauf folgen Bindegewebe, Gefäße und marklose Nerven, und eine Gruppe von Osteoblasten sezerniert die erste Osteoidlamelle an der Wand des Bohrkanals. Die nächste Kolonne von Osteoblasten produziert die zweite Lamelle, wodurch die erste Osteoblastengeneration eingemauert und zu Osteozyten wird. Die letzte Osteoblastengeneration wird nicht eingemauert und bildet zusammen mit unreifen Vorläuferzellen dann das Endost. Als Ergebnis dieses Prozesses entsteht nach mehreren Monaten ein neues Osteon mit zentralem Havers-Kanal (Hauge et al., 2001).

Im Rahmen des Remodelings sind Osteoklasten und -blasten als sog. Bone Multicellular Units (BMU) organisiert, die zeitlich und räumlich koordiniert arbeiten. Im Laufe eines Jahres werden so ca. 10 % der Knochenmasse eines Menschen umgebaut, sodass das Skelett nach zehn Jahren einmal vollständig „erneuert“ wurde (Lüllmann-Rauch, 2009; Welsch & Sobotta, 2010).

1.5 Bisphosphonate

Schon 1969 konnten Fleisch et al. in einer wegweisenden Arbeit zeigen, dass Bisphosphonate die Knochenresorption behindern (Fleisch et al., 1969). Seit 1979 werden sie als Therapeutikum gegen Osteoporose eingesetzt (Reginster, 1999). Seitdem konnte vielfach eine effektive Minderung des Frakturrisikos nachgewiesen werden (Black et al., 2000; Ott, 2011; Pols et al., 1999).

1.5.1 Aufbau

Chemisch gesehen sind Bisphosphonate stabile Analoga zu natürlich vorkommenden, anorganischen Pyrophosphaten. Aufgebaut aus einem zentralen C-Atom, das zwei Phosphonatgruppen verbindet, sind sie chemisch sehr stabil, auch gegenüber enzymatischen Spaltungen (Rogers, 1999). Die beiden Phosphonatgruppen sind sowohl für die hohe Affinität zu Hydroxylapatit (HA), als auch für die zellvermittelte Aktivität verantwortlich. Es werden zwei Hauptgruppen von Bisphosphonaten unterschieden: Aminobisphosphate (wichtige Vertreter: Alendronat (ALN), Ibandronat, Risedronat) und Alkylbisphosphate (wichtige Vertreter: Clodronat und Etidronat) (Rogers, 1999). Da alle Patientinnen der vorliegenden Arbeit zu Lebzeiten Alendronat einnahmen, soll im Folgenden der Einfachheit halber nur von Bisphosphaten die Rede sein. Gemeint sind hiermit ausschließlich Aminobisphosphonate, und auch alle Aussagen zu pharmakologischen Details betreffen nur diese Klasse.

1.5.2 Pharmakomechanismen

Die Wirkungen von Bisphosphonaten lassen sich in physikochemische und zellvermittelte unterteilen. Die physikochemischen Wirkungen umfassen dabei:

- Inhibition der de novo Präzipitation von Kalziumphosphat
- Verzögerung der Umwandlung von amorphem zu kristallinem HA
- Inhibition der Aggregation und Dissolution der HA-Kristalle

Die zellvermittelten Wirkungen spielen jedoch laut Boivin und Meunier (Boivin & Meunier, 2002) eine weitaus wichtigere Rolle: Nach Bindung an HA werden die

Bisphosphonate durch Endozytose in die Osteoklasten aufgenommen. Dort inhibieren sie die Farnesylpyrophosphatsynthase (FPP-Synthase) und Geranylgeranyldiphosphatsynthase (GGPP-Synthase). Bei den genannten handelt es sich um wichtige Schlüsselenzyme des Mevalonatstoffwechsels, der Teil der Steroidsynthese ist. In intakten Osteoklasten werden FPP und GGPP an GTP-bindende Proteine gekoppelt, was als Prenylation bezeichnet wird. Durch Hemmung dieser Prenylation verhindern Bisphosphonate, dass diese Proteine ihre vielfältigen Aufgaben wie Membranstabilität, Organisation des Zytoskeletts, Überwachung der Zellmorphologie und Steuerung der Apoptose erfüllen können. Funktion und Überleben der Osteoklasten werden so essentiell beeinträchtigt (Rogers et al., 2000). Dadurch wird die Knochenresorption zwar indirekt, aber effektiv gehemmt (Russell et al., 2007; van Beek et al., 1999).

Neben den genannten, sind es noch eine Reihe weiterer Mechanismen, die zur antiresorptiven Wirksamkeit der Bisphosphonate beitragen: Fleisch beschrieb eine Hemmung von Phosphatasen und sauren Hydrolasen der Osteoklasten (Fleisch, 1993). Darüber hinaus bewirkt eine direkte Wirkung auf die Sekretion von lysosomalen Enzymen, dass die hydrolytische Spaltung der Knochenmatrix blockiert wird (Rogers et al., 2000). Neben den Wirkungen auf Osteoklasten ist in vitro auch eine verstärkte Differenzierung und Reifung von Osteoblastenvorstufen beschrieben (Im et al., 2004; von Knoch et al., 2005).

1.5.3 Kontrolle und Validierung der Effekte von Bisphosphonaten auf den Knochen

Es existiert derzeit kein valides Diagnostikinstrument, um die Effekte von Bisphosphonaten auf Knochengewebe in ihrer Gesamtheit nachzuweisen und zu kontrollieren. Die verschiedenen Wirkmechanismen werden in der klinischen Praxis routinemäßig auf zwei Arten kontrolliert und quantifiziert.

Zum einen gibt es verschiedene Laborparameter, die als Surrogatparameter für Knochen turnover eingesetzt werden, und deren Spiegel sich nach der Einnahme verändern. Als Resorptionsmarker gelten Urinparameter wie Pyridinolin, Hydroxiprolin und N- und C-Telopeptid-Crosslinks, die schon in den ersten Monaten

nach Therapiebeginn absinken (Harris et al., 2013). Die Marker für Knochenbildung – Propeptide von Kollagen-Typ-I, Osteokalzin und die knochenspezifische alkalische Phosphatase – werden aus dem Serum bestimmt (Looker et al., 2000).

Knochenformations- und Knochenresorptionsmarker werden zusammenfassend als Turnovermarker bezeichnet und reagieren beide auf eine Bisphosphonateinnahme mit einem Rückgang ihrer Spiegel, wie in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden konnte: N-Telopeptid-Crosslinks und Osteokalzin reagierten in einer Studie von Ravn et al. auf Bisphosphonate schon nach sechs Monaten mit einem signifikantem Absinken (Ravn et al., 1999). Auch Fink et al. konnten zeigen, dass alle Formations- und Resorptionsmarker vier Monate nach Beginn einer Bisphosphonattherapie signifikant sanken (Fink et al., 2000). Die knochenspezifische alkalische Phosphatase fiel in einer Studie von Bauer et al. nach Bisphosphonateinnahme signifikant ab (Bauer et al., 2004).

Turnovermarker sind demnach sensitiv und reagieren schnell auf Schwankungen im Turnover. Zur Wahl des richtigen Medikaments oder als alleinige ausreichende Kontrolle des Therapieerfolges genügen sie jedoch nicht. Deshalb werden sie aktuell für die klinische Praxis nur als zusätzliches Instrument bei Therapieentscheidungen und Verlaufskontrollen empfohlen (Bergmann et al., 2009; Wheeler et al., 2013).

Bei Verlaufskontrollen nach Initiation einer Bisphosphonattherapie reagieren die Turnovermarker schneller als die BMD-Messung, die als zweite Diagnostikmethode routinemäßig in der klinischen Praxis angewandt wird. Obwohl BMD und Turnovermarker signifikant korrelieren, eignen sich die Marker bei einzelnen PatientInnen nicht als Prädiktor der BMD (Bergmann et al., 2009).

In der Osteoporosediagnostik und -therapiekontrolle nimmt die Bildgebung per DXA immer noch einen zentralen Stellenwert ein, u. a. weil die WHO-Definition der Osteoporose an die BMD geknüpft ist. Die DXA-Messung ist kostengünstig, strahlungsarm, reproduzierbar, in Deutschland überall verfügbar und wird weiterhin vielfach empfohlen (DVO Leitlinie Osteoporose, 2014). Trotzdem haben 82 % aller postmenopausalen Frauen mit Frakturen einen T-Score größer als - 2,5, also nach WHO-Definition keine Osteoporose (Siris et al., 2004). Zoehrer et al.

fürten außerdem über 80 % der Frakturrisikoreduktion nach Bisphosphonattherapie auf Veränderungen der Knochengometrie, Mikroarchitektur und Mineral- und Gewebeeigenschaften (wie z.B. die BMDD) zurück, die durch die BMD nicht abgebildet werden können (Zoehrer et al., 2006).

Die Ursachen für die genannten Limitationen der DXA liegen in der Art der BMD-Erstellung durch die DXA. Diese kann nur quantitativ einen Dichtewert ermitteln, aber nicht zwischen Veränderungen des Knochenvolumens und des Mineralisierungsgrades differenzieren. Entsprechend können die Ergebnisse für die BMD-Messung einer Knochenregion dieselben sein, unabhängig davon, ob dort ein hohes Knochenvolumen vorliegt, oder ein niedriges Knochenvolumen stark mineralisiert ist (Roschger et al., 1998).

Dies hat womöglich auch Auswirkungen auf die DXA-Messwerte bei PatientInnen, die Bisphosphonate einnehmen. Unter Bisphosphonattherapie wird die osteoklastische Resorption stark vermindert. Die Osteoblasten hingegen werden zwar gehemmt, scheinen aber die noch vorhandenen, leeren Resorptionshöhlen aufzufüllen, was den schnellen BMD-Anstieg in den ersten Einnahmemonaten zu erklären scheint. Im Rahmen der sekundären Mineralisierung steigt dann das BMD in den folgenden Monaten und Jahren weiter an, auch wenn die Formation gehemmt wird. Es wird kaum noch neuer Knochen gebildet, aber der schon bestehende, über Jahre hinweg stärker mineralisiert. Schlussendlich persistieren Resorption und Formation auf einem niedrigeren als dem Ausgangsniveau. (Russell et al., 2007).

Für ein tiefergehendes Verständnis dafür, wie sich Mineralisierung und Mikroarchitektur durch eine Bisphosphonateinnahme verändern, eignet sich die klassische DXA-Messung daher nicht. Eine neue Möglichkeit, die jedoch auch auf den DXA-Bildern beruht, ist der sog. Trabecular Bone Score (TBS). Er soll genauere Informationen über Mikroarchitektur und Frakturrisiko von spongiosen Knochen liefern (Silva et al., 2014). Bei widersprüchlichen und ungenügenden empirischen Daten hierzu bleibt der Mehrwert für die klinische Nutzung abzuwarten.

Eine Methode, um die genannten Details experimentell untersuchen zu können ist die quantitative Rückstreuелеktronenmikroskopie (engl. Quantitative Backscattered Electron Imaging, qBEI). Hierbei wird nicht die Knochendichte gemessen, sondern in Form eines Histogrammes die Knochendichteverteilung (engl. Bone Mineral Density Distribution, BMDD). Fünf charakteristische Parameter zur Beschreibung dieses Histogrammes wurden definiert. Anhand dieser lassen sich sehr genaue Informationen über die tatsächliche Mineralisierungsverteilung und -heterogenität und sehr niedrig- und hochmineralisierte Anteile von Knochengewebe gewinnen (vgl. Kapitel 1.7.4).

1.5.4 Das BioAsset-Konsortium

Dem tieferen Verständnis von Osteoporose und den Effekten von Bisphosphonaten bei Osteoporose widmet sich das BioAsset Konsortium. BioAsset steht für „Biomechanically founded individualized Osteoporosis Assessment and Treatment“ und ist ein Forschungskonsortium mit Beteiligung verschiedener deutscher Universitäten und Forschungszentren. In mehreren Clustern werden Fragestellungen experimentell und klinisch bearbeitet. Kernthema sind hierbei die Effekte von Bisphosphonaten insbesondere auf BMD, Mikrostruktur und Materialeigenschaften von Knochengewebe. Ziel ist unter anderem die Entwicklung biomechanisch und histologisch begründeter Diagnostik- und Therapieempfehlungen.

1.6 Rasterelektronenmikroskopie

1.6.1 Funktionsweise eines Rasterelektronenmikroskops

In einer Hochvakuumkammer wird ein fein gebündelter Elektronenstrahl erzeugt. Dieser tastet die Oberfläche einer Probe gleichmäßig ab, wodurch Wechselwirkungen zwischen Probenoberfläche und Elektronenstrahl entstehen. Die dabei auftretenden Strahlen bzw. Elektronen können durch spezifische Detektoren aufgenommen und in elektrische Signale umgewandelt werden. Um ein Bild zu erzeugen, werden diese Signale dann verstärkt, und ihrer Intensität entsprechend in verschiedenen Helligkeiten am Monitor angezeigt (Egerton, 2005; Koehne, 2012).

1.6.2 Quantitative Rückstreuelektronenmikroskopie / Quantitative Backscattered Electron Microscopy

Bei der vorliegenden Arbeit wurde die sog. Rückstreuelektronenmikroskopie (engl. Backscattered Electron Microscopy / BSE Microscopy) angewandt. Sie ist besonders geeignet zur Messung des Mineralgehalts von Geweben, da die Menge der emittierten Rückstreuelektronen hauptsächlich von der Atommassenzahl des Materials und der Oberflächenbeschaffenheit abhängt (Egerton, 2005). Der Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit wird durch Feinschliff mit anschließender Politur, sowie eine Beschichtung mit Kohlenstoff vernachlässigbar gering. Entsprechend korrelieren die rückgestreuten Elektronen und damit die Grauwerte im erzeugten Bild mit der Atommassenzahl im untersuchten Gewebe. Da Kalzium mit 20 eine wesentlich höhere Ordnungszahl hat, als die anderen vorkommenden Bestandteile (H = 1, C = 6, O = 8, P = 15), hängt die durchschnittliche Atommasse hauptsächlich davon ab (Koehne, 2012). Sowohl Roschger et al., als auch Skedros et al. konnten zeigen, dass in der BSE-Mikroskopie die Intensitätswerte proportional zum Kalziumgehalt der korrespondierenden Stellen einer Knochenprobe sind (Roschger et al., 1995; Skedros et al., 1993).

Zur Eichung der Bildverarbeitung haben sich Standards aus Kohlenstoff (Atommasse C = 6) und Aluminium (Atommasse Al = 13) bewährt. Helligkeit und Kon-

trast werden so eingestellt, dass sich für die Eichstandards spezifische Grauwerte als Abbildung der gemessenen Signalintensitäten ergeben (5 für Kohlenstoff und 222,4 für Aluminium). Durch diese Eichung wird auf einer Grauwertskala (0 – 255) ein Spektrum von rein organischer Matrix (Osteoid) bis zu vollständig mineralisierter Matrix (reines Hydroxylapatit, Ordnungszahl 14,06) dargestellt. Zur Kontrolle dieser Eichung wird die Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) angewandt, die die charakteristische Röntgenstrahlung detektiert. Diese entsteht beim Übergang zwischen den Energieniveaus der inneren Elektronenhülle und ist für jedes Element charakteristisch. Dadurch eignet sie sich zur Quantifizierung aller Elemente eines untersuchten Materials. Da aber nur sehr kleine Areale so gemessen werden können, wären die Messergebnisse für die Zusammensetzung einer gesamten Knochenbiopsie unzuverlässig. Deshalb wird sie nur zur Validierung der durch qBEI ermittelten Mineralisierungsanalysen verwendet (Roschger et al., 1998; Koehne 2012).

1.6.3 Bone Mineral Density Distribution (BMDD)

Zur Quantifizierung der Mineralisierungsverteilung wird das sogenannte BMDD-Histogramm definiert. Es bildet auf der Abszisse den Mineralgehalt ab – in der vorliegenden Arbeit Kalzium in Gew.-% (Gewichtsprozent). Auf der Ordinate zeigt es die Häufigkeit des Auftretens in Prozent der gemessenen Knochenfläche. Abbildung 5 zeigt ein schematisches BMDD-Diagramm. Fünf Parameter wurden zur statistischen Auswertung festgelegt:

- *Ca-Mean*: Mittlerer Kalziumgehalt in Gew.-%
- *Ca-Peak*: Am häufigsten auftretender Kalziumgehalt in Gew.-% (Teilweise in der Literatur „CaMaxFrequ“)
- *Ca-Width*: Entspricht der Standardabweichung des Histogramms und zeigt die Varianz der Mineralisierungsverteilung in Δ -Gew.-% (Manche Autoren verwenden statt der Standardabweichung auch die Halbwertsbreite (engl. Full Width at Half Maximum (FWHM))
- *Ca-Low*: Es wird die 5 %-Perzentile des jeweiligen Kontrollkollektivs errechnet und auf das Histogramm angewandt. Die Fläche unter der Kurve bis zu dieser 5 %-Perzentile ergibt *Ca-Low* in % der Knochenfläche.

Spezifischer Parameter, um frischen, niedrig mineralisierten Knochen abzubilden

- *Ca-High*: Vergleichbar mit *Ca-Low*, aber unter Anwendung der 95 %-Perzentile, ebenfalls in % der Knochenfläche. Spezifischer Parameter für alten, hochmineralisierten Knochen

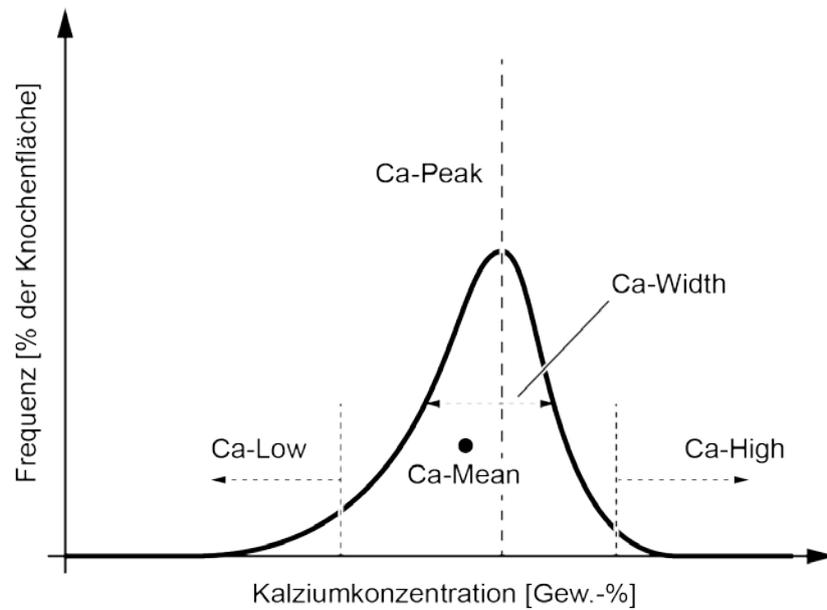


Abbildung 5: Schematisches BMDD-Histogramm

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Untersuchtes Kollektiv

Die verwendeten Knochenbiopsien wurden im Rahmen des BioAsset-Konsortiums gewonnen. Ziel dieser Studie war, die Effekte von Bisphosphonaten auf den Knochen sowohl mit bildgebenden Verfahren, als auch mit biomechanischen Techniken zu untersuchen.

Einschlusskriterien der verstorbenen Donoren waren hierbei: Osteoporose (entsprechend WHO-Definition, nach der eine Osteoporose ab einem T-Score von $-2,5$ und weniger in der DXA-Messung von Femur oder Lendenwirbelsäule vorliegt), weibliches Geschlecht, Postmenopause, Alter zwischen 60 und 90 Jahren, Frakturen von Wirbelkörpern, Schenkelhals oder distalem Radius nach dem 50. Lebensjahr, eine Größenabnahme über zwei Zentimeter, ein sogenannter „Witwenbuckel“, eine Totalendoprothese des Hüftgelenks (Hüft-TEP) oder eine Vertebro- oder Kyphoplastie.

Ausschlusskriterien waren eine drittgradige Niereninsuffizienz oder Nierentransplantation in der Anamnese, Immobilität über ein Jahr, maligne Knochentumoren, andere antiresorptive Therapien als Bisphosphonate, Bisphosphonate kürzer als ein Jahr und die Einnahme von Strontiumranelat oder Fluoriden. Ein- und Ausschlusskriterien sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

MitarbeiterInnen des Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf untersuchten die Leichen der Verstorbenen im Rahmen der Autopsie oder zweiten Leichenschau anhand des Kriterienkatalogs (vgl. Tabelle 3). Die Einverständniserklärungen wurden von den Angehörigen sämtlicher Patientinnen eingeholt. Die Studie wurde durch die zuständige Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg (PV 3486) genehmigt.

Tabelle 3: Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> • Postmenopausale Frauen • 60–90 Jahre • Osteoporose (T-Score < 2,5) • Wirbelkörper-, Schenkelhals- oder distale Radiusfraktur jenseits des 50. Lebensjahrs • Größenabnahme > 2 cm • „Witwenbuckel“ • Hüft-TEP / Vertebro- oder Kyphoplastie 	<ul style="list-style-type: none"> • Nierentransplantation oder Niereninsuffizienz III. Grades in der Anamnese • Immobilität > 1 Jahr • Maligne Knochentumoren • Einnahme v. Strontiumranelat • Einnahme v. Fluoriden • Andere antiresorptive Therapien als BP • BP < 1 Jahr

2.1.2 Gruppeneinteilung

Zum Ende der Akquirierungsphase konnten insgesamt 31 Donoren zwischen 65 und 90 Jahren eingeschlossen werden. Mit Hilfe der betreuenden AllgemeinmedizinerInnen und Angehörigen wurde eine genaue Medikamentenanamnese bis zum Lebensende erhoben. Bei 20 Patientinnen lag zu Lebzeiten zwar eine postmenopausale Osteoporose vor, es erfolgte aber keinerlei antiresorptive Therapie in mindestens den fünf letzten Lebensjahren (= Kontrollgruppe, im Folgenden „OPO“). Elf Patientinnen erhielten das Zweit-Generations-Bisphosphonat Alendronat, 70 mg pro Woche (= Therapiegruppe, im Folgenden „BP“). Alter, Einnahmedauer der BP und BMI sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Gruppeneinteilung

	OPO	BP	Gesamt
Stichprobengröße n	20	11	31
Alter in Jahren	80.5 ± 8	81.5 ± 7	81 ± 7
Einnahmedauer BP in Jahren	-	3.5 ± 2	-
BMI in kg/m ²	21.5 ± 4	22.7 ± 5	21.9 ± 5

2.2 Probenvorbereitung

2.2.1 Gewinnung der Proben

Es wurden Biopsien aus Radius und Beckenkamm entnommen. Bei den Radiusproben handelte es sich um axiale, 0,5 cm dicke Scheiben des distalen Radius. Diese wurden nach einem standardisierten Verfahren mit Hilfe einer Diamantsäge (EXAKT 310 CP mit EXAKT Diamanttrennband 0,3 mm D64, EXAKT-Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) 0,8 cm von der distalen Gelenksfläche entfernt, entnommen. Für die Beckenkambbiopsien wurden an der Entnahmestelle nach Bordier 2 cm dorsal der Spina iliaca anterior superior und 2 cm kaudal der Crista iliaca ein 1 cm × 1 cm × 0,5–1 cm großes bikortikales Knochenstück ebenfalls mit der oben genannten Diamantsäge herausgesägt. Anschließend wurden die unentkalkten Proben für mindestens drei Wochen in gepufferter 3,5 %iger Formalinlösung (Grimm GmbH, Torgelov, Deutschland) fixiert, um eine Gewebestruktur zu vermeiden.

2.2.2 Entwässerung und Infiltration

Die fixierten Proben wurden anschließend in einem Autotechnicon (Bavimed GmbH, Birkenau, Deutschland) in einer aufsteigenden Alkoholreihe (3 × 80 % (V/V) Ethanol, 4 × 96 % (V/V) Ethanol, 5 × 100 % (V/V) Ethanol) (Geyer GmbH, Hamburg, Deutschland) für je ca. eine Stunde entwässert. Anschließend erfolgte die Infiltration in zwei aufeinanderfolgenden Infiltrationsgängen für je mindestens 24 Stunden.

Der gesamte Infiltrationsvorgang erfolgte bei einer Temperatur von + 4° Celsius, um ein vorzeitiges Polymerisieren zu verhindern. Die genauen Zusammensetzungen der Infiltrationslösungen sind in Tabelle 5 aufgelistet, wobei Methylmethacrylat (MMA, Merck 800590) mit Hilfe von Aluminiumoxid 60 (Merck 1.01067) entstabilisiert wurde.

Tabelle 5: Infiltrationslösungen

Infiltrationslösung I

- 1000 ml entstabilisiertes Methylmethacrylat (MMA) (Merck 800590)
 - 100 ml Nonylphenyl-polyethyleneglycolacetat (Sigma Life Science 74432)
 - 3,3 g Benzoylperoxid (BPO) (Merck 801641)
 - N,N-Dimethyl-p-Toluidin (Merck, 8.22040)
-

Infiltrationslösung II

- 1000 ml entstabilisiertes Methylmethacrylat (MMA) (Merck 800590)
 - 100 ml Nonylphenyl-polyethyleneglycolacetat (Sigma Life Science 74432)
 - 3,3 g Benzoylperoxid (BPO) (Merck 801641)
-

2.2.3 Polymerisation

Im nächsten Schritt wurden die Proben mit einer der beiden breiten Schnittflächen auf dem Boden von größenmäßig passenden (15, 25 oder 75 ml) Rollrandgläsern (Roth, Karlsruhe, Deutschland) positioniert. Diese wurden anschließend mit der Polymerisationslösung – bestehend aus 200 ml Gießlösung mit 1000 µl N,N-Dimethyl-p-Toluidin (DMPT) (Merck 822040) – aufgefüllt. Bis zur vollständigen Aushärtung wurden die luftdicht verschlossenen Gläser bei + 4° Celsius im Wasserbad gelagert. Die Zusammensetzung der Gießlösung ist in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Gießlösung

Gießlösung

- 1000 ml mmA
 - 6,0 g Benzoylperoxid (BPO) (Merck 801641)
 - 100 ml Nonylphenyl-polyethyleneglycolacetat (Sigma Life Science 74432)
-

2.2.4 Schleifen und Polieren

Nachdem die ausgehärteten Kunststoffzylinder aus den Gläsern herausgeschlagen worden waren, wurden sie mithilfe des EXAKT-Schleifsystems (EXAKT 400 CS Tellerschleifgerät, EXAKT-Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) geschliffen. Hierfür wurden sie auf einen Objektträger geklebt, der über eine Unterdruckhalterung in das Schleifsystem eingespannt wurde. Dann wurde zuerst die Probenunterseite mit einem Schleifpapier der Körnung P 800 (Hermes WS Flex 18C, Hermes Abrasives Ltd., Virginia Beach, Virginia, USA) glatt geschliffen. Anschließend wurde in zwei Schritten die Probenoberseite mit Schleifpapieren aufsteigender Körnung (P800 und P1200, beide von Hermes WS Flex 18C, Hermes Abrasives Ltd., Virginia Beach, Virginia, USA) planparallel geschliffen und zum Schluss mit Polierpapier (Körnung 1200/1400, Silicon-Carbide Paper, Allied High Tech Products Inc., Rancho Domingues, California, USA) poliert.

2.2.5 Besputtern

Um sie für den Elektronenstrahl leitfähig zu machen, wurden die Proben unter Vakuum durch Verdampfen eines Kohlegarns (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit einer dünnen Karbonschicht beschichtet (BAL-TEC CED 030 Carbon Evaporator, BAL-TEC AG Liechtenstein). Eine möglichst vergleichbare Dicke der Karbonschichten wurde durch Standardisierung der Erhitzungszeiten des Kohlegarns auf je 30 s erreicht.

Die beschichtete Probenoberfläche wurde während der Messungen durch ein selbstklebendes Kohleband (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit dem Probenteller verbunden, um eine gute Ableitung der Elektronen zu erreichen.

2.3 Messungen im Rasterelektronenmikroskop

Die Messungen wurden unter Hochvakuum in einem Elektronenrastermikroskop (LEO 435 VP, LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, England) durchgeführt. Die Beschleunigungsspannung betrug 20 kV, der Fokus-Objekt-Abstand 20 mm. Um die Stabilität des Elektronenstrahls zu kontrollieren, wurde er vor und nach

jeder gemessenen Probe in einem Faraday-Zylinder mit Hilfe eines Sondenstrommessgeräts überprüft. Dabei wurde maximal eine Abweichung von ± 1 pA toleriert.

Die Signalverarbeitung wurde mithilfe des mittleren Grauwerts eines Kohlenstoffstandards (MAC Consultant Ltd., London, England) und eines Aluminiumstandards (MAC Consultant Ltd., London, England) geeicht. Die Grauwerte wurden auf 5 für Kohlenstoff und 222,4 für Aluminium festgelegt. Abweichungen bis max. 1 Grauwert wurden toleriert.

Wenn der Elektronenstrahl stabil und alle Einstellungen im optimalen Bereich waren, wurden die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bei 50-facher Vergrößerung erstellt. Hierbei wurden vier zufällig gewählte Stichproben spongiösen Knochens aufgenommen. Aus der Kortikalis wurden aufgrund der geringeren Größe der Biopsien zufällig je eine Stichprobe aus den gegenüberliegenden Anteilen des bikortikalen Knochenspans ausgewählt.

Anschließend wurden mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes GIMP 2.6.2 (The GIMP Team) Verunreinigungen (z.B. durch Kohlenstoffaserrückstände vom Sputtering) und Artefakte entfernt, um Überschneidungen mit dem Grauwertbereich der Proben bei der Datenanalyse zu verhindern. Diese Bildbearbeitungen wurden manuell an den originalen Bilddaten ausgeführt, wobei Artefakte auf Basis einer Plausibilitätsüberprüfung identifiziert wurden.

2.4 Mineralisationsanalyse

2.4.1 Erstellung der BMDD-Histogramme

Die nun folgende Analyse der Grauwertverteilung und Erstellung der BMDD-Histogramme erfolgte mit Hilfe eines MATLAB-Skripts (R2014a, The MathWorks, Natick, Massachusetts, USA), das von Annika vom Scheidt und Christoph Riedel für das Institut für Osteologie und Biomechanik entwickelt wurde. Damit wurde die auszuwertende Knochenfläche, der durchschnittliche Ca-Gehalt (*Ca-Mean*) und der am häufigsten auftretenden Ca-Wert (*Ca-Peak*) ermittelt. Die Heteroge-

nität der Mineralisierung wurde durch die Standardabweichung des BMDD-Histogrammes, den sog. *Ca-Width*-Wert berechnet. Um die Werte für *Ca-Low* und *Ca-High* zu ermitteln, wurden die 5 %- und 95 %-Perzentile des Kontrollkollektives errechnet und jeweils gemittelt. Anschließend wurden diese gemittelten Werte auf das Histogramm des Studienkollektivs angewendet und die Fläche unter der Kurve unterhalb der 5 %-Perzentile als *Ca-Low*-Wert und die Fläche unter der Kurve oberhalb der 95 %-Perzentile als *Ca-High*-Wert angegeben.

2.4.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS, Version 15.0 (IBM, Armonk, USA) durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0.05$ definiert.

Alle fünf BMDD-Parameter (*Ca-Mean*, *Ca-Peak*, *Ca-Width*, *Ca-Low* und *Ca-High*) wurden einzeln und voneinander unabhängig statistisch analysiert. Die Normalverteilung der Daten wurde mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests mit positivem Resultat überprüft. Um die Unterschiede der Mineralisierungseigenschaften sowohl zwischen den beiden Gruppen, als auch zwischen unterschiedlichen Körperregionen zu untersuchen, wurden Varianzanalysen mit Messwiederholungen (engl. Repeated Measures ANOVA) durchgeführt. Im Rahmen derer wurde zuerst durch Mauchly's Test überprüft, ob Sphärizität angenommen werden konnte. Falls die Sphärizität verletzt war, wurde anschließend die Greenhouse-Geisser-Korrektur verwendet.

Da die Knochenbiopsien unterschiedlicher Körperregionen jeweils von derselben Patientin stammten, wurden sowohl die Knochen- als auch Körperregion als Innersubjektfaktoren definiert. Es gab also pro Patientin die vier Ausprägungen „Beckenkamm Kortikalis“, „Beckenkamm Spongiosa“, „Radius Kortikalis“ und „Radius Spongiosa“ (zusammen im Folgenden „Lokalisation“ genannt). Die Unterschiede zwischen diesen Lokalisationen wurden als Innersubjekteffekte definiert.

Als „Gruppen“ wurden entsprechend die therapienaive Osteoporosekohorte („OPO“) und die Bisphosphonatkohorte („BP“) definiert. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als Zwischensubjekteffekte definiert. Abschließend

wurde die Abhängigkeit zwischen Gruppe und Lokalisation überprüft. Alle Post-hoc-Tests wurden mit Bonferroni-Korrektur adjustiert. Um die Stärke des linearen Zusammenhangs der verschiedenen Parameter zu testen, wurde Pearson`s Korrelationskoeffizient verwendet.

3 Ergebnisse und Auswertung

Grundlage der Datengewinnung in der vorliegenden Arbeit waren die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Knochenproben, deren Grauwertverteilungen ausgewertet wurden. In Abbildung 6 (a)–(d) sind exemplarisch jeweils eine Aufnahme der vier verschiedenen Lokalisationen gezeigt, wobei Abbildung 6 (a) die Kortikalis eines Beckenkamms, (b) die Spongiosa eines Beckenkamms, (c) die Kortikalis eines Radius und (d) die Spongiosa eines Radius zeigt. Abbildung 6 (a) und (c) stammen hierbei aus der therapienaiven Kontrollgruppe; Abbildung 6 (b) und (d) aus der Bisphosphonatgruppe. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind jedoch mit bloßem Auge für gewöhnlich nicht erkennbar.

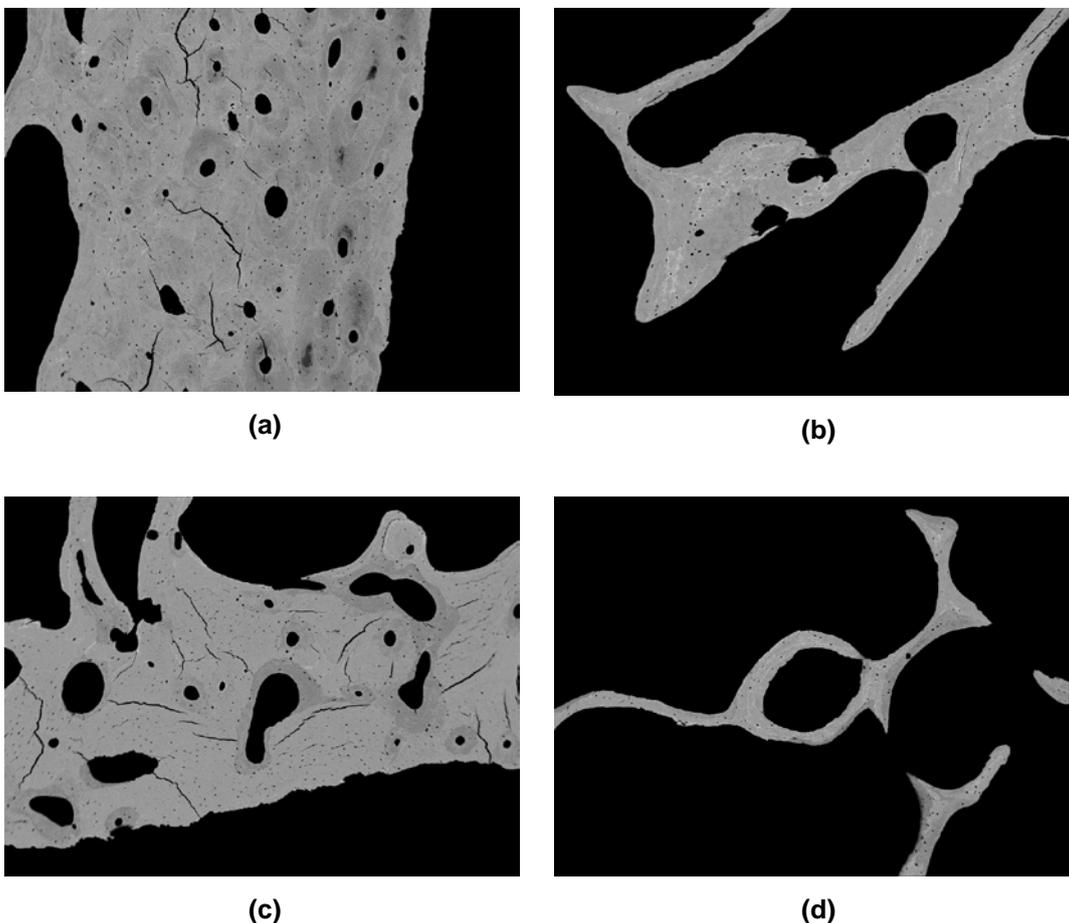


Abbildung 6: Exemplarische qBEI-Aufnahmen.
(a) Kortikalis eines Beckenkamms, (b) Spongiosa eines Beckenkamms,
(c) Kortikalis eines Radius, (d) Spongiosa eines Radius

3.1 Einfluss der Lokalisation auf die Mineralisierungsverteilung

3.1.1 Mittelwerte der verschiedenen Lokalisationen

Im ersten Schritt wurden für die vier Lokalisationen die Mittelwerte und Standardabweichungen aller fünf BMDD-Parameter der Osteoporosegruppe ermittelt; sie sind in Abbildungen 7–11 dargestellt.

Anschließend wurden an diesen Mittelwerten die Innersubjekteffekte getestet, um zu überprüfen, ob die Lokalisation generell einen Einfluss auf die verschiedenen BMDD-Parameter hatte. Zunächst wurde durch Mauchly's Test die Sphärität überprüft. War sie verletzt, wurde die Greenhouse-Geisser-Korrektur angewandt. So zeigte sich, dass der Einflussfaktor Lokalisation bei *Ca-Mean*, *Ca-Peak* und *Ca-Width* jeweils signifikant war; verschiedene Lokalisationen sich also hinsichtlich dieser Parameter signifikant voneinander unterscheiden. Auf *Ca-Low* und *Ca-High* hatte die Lokalisation keinen signifikanten Einfluss. Die Ergebnisse des Tests auf Signifikanz der Innersubjekteffekte aller Parameter sind in Tabelle 7 aufgelistet.

3.1.2 Geschätzte Randmittel adjustiert für den Einflussfaktor Gruppe

Für die genauere Untersuchung des Einflusses der Lokalisation wurden zunächst die geschätzten Randmittel, adjustiert für die Gruppenzugehörigkeit, errechnet. Tabellen 10–14 im Anhang zeigen für jeden gemessenen Parameter die geschätzten Randmittel der vier Lokalisationen.

Um schließlich feststellen zu können, zwischen welchen Körper- und Knochenregionen genau signifikante Unterschiede vorliegen, wurden an diesen geschätzten Randmitteln paarweise Vergleiche zwischen den einzelnen Lokalisationen vorgenommen. Zum leichteren Verständnis werden im Folgenden die einzelnen Lokalisationen direkt einander gegenübergestellt.

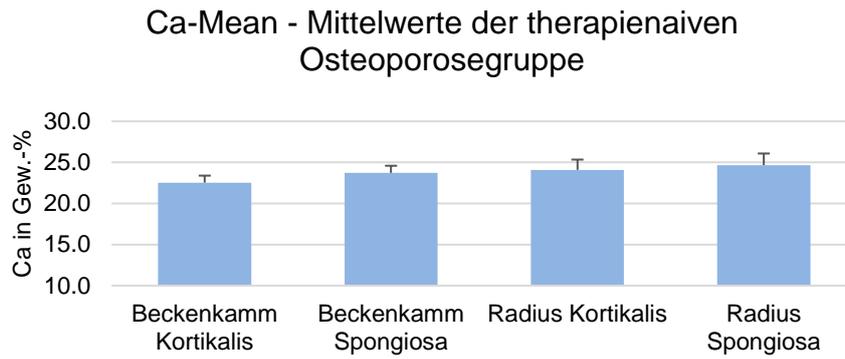


Abbildung 7: Deskriptive Statistik des Parameters *Ca-Mean*: Mittelwerte der therapienaiven Osteoporosegruppe mit Standardabweichung

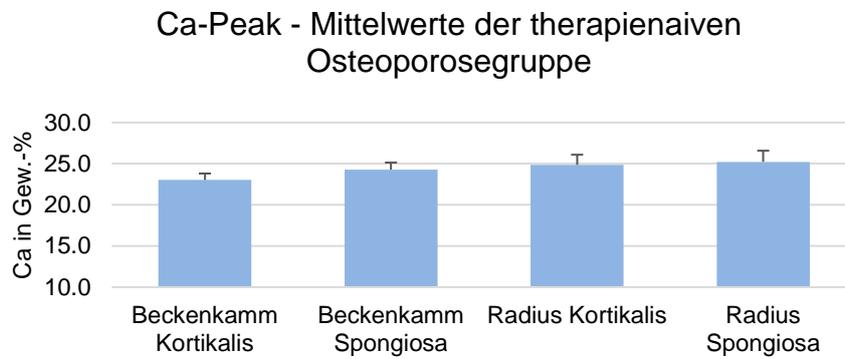


Abbildung 8: Deskriptive Statistik des Parameters *Ca-Peak*: Mittelwerte der therapienaiven Osteoporosegruppe mit Standardabweichung

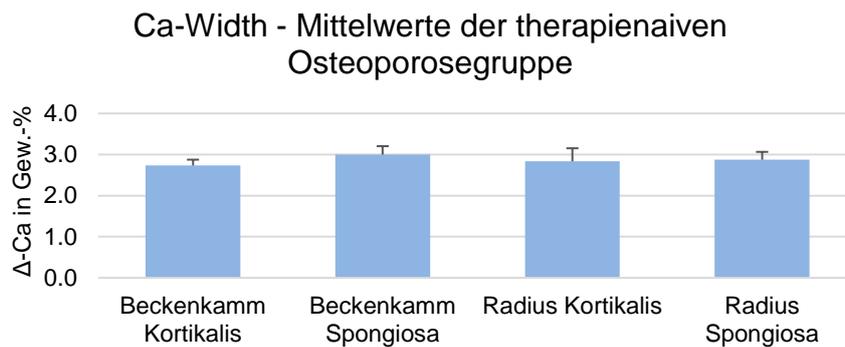


Abbildung 9: Deskriptive Statistik des Parameters *Ca-Width*: Mittelwerte der therapienaiven Osteoporosegruppe mit Standardabweichung

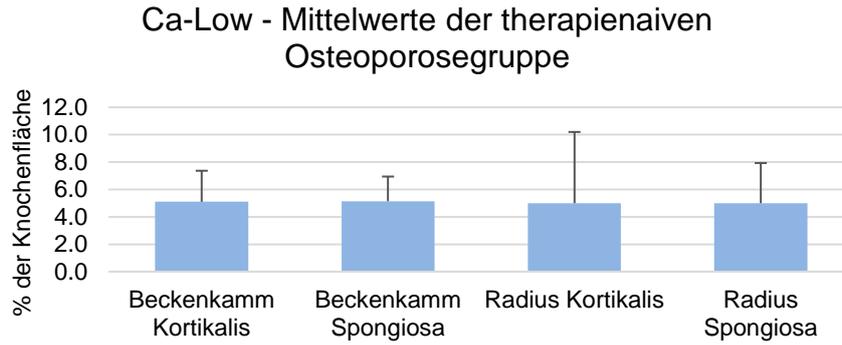


Abbildung 10: Deskriptive Statistik des Parameters *Ca-Low*: Mittelwerte der therapienaiven Osteoporosegruppe mit Standardabweichung

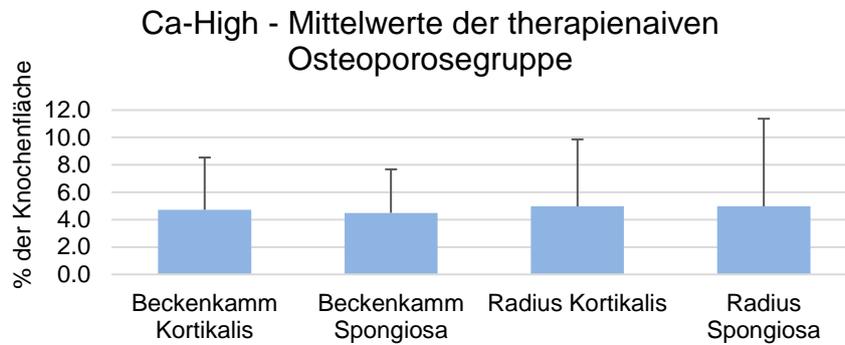


Abbildung 11: Deskriptive Statistik des Parameters *Ca-High*: Mittelwerte der therapienaiven Osteoporosegruppe mit Standardabweichung

Tabelle 7: Test der Signifikanz der Innersubjekteffekte aller Parameter. Bei Verletzung der Sphärizität (wenn $p < 0,05$ in Mauchly`s Test) wurde die Greenhouse-Geisser-Korrektur angewandt

	<i>Ca-Mean</i>	<i>Ca-Peak</i>	<i>Ca-Width</i>	<i>Ca-Low</i>	<i>Ca-High</i>
Mauchly`s Test	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,086$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Sphärizität angenommen	$p < 0,001$				
Greenhouse-Geisser	$p < 0,001$	$p < 0,001$		$p = 0,378$	$p = 0,663$

3.1.3 Spongiosa: Vergleich von Beckenkämmen und Radii

Im Direktvergleich zwischen der Spongiosa aus Beckenkämmen und Radii zeigte sich, dass – unabhängig von der Körperregion – der spongiöse Knochen bei postmenopausaler Osteoporose eine relative Konstanz in der Mineralisierungsverteilung aufweist. Bei keinem der fünf BMDD-Parameter konnten hier auch nur annähernd signifikante Unterschiede zwischen Radii und Beckenkämmen nachgewiesen werden. Es fand sich jedoch ein nicht signifikanter Trend hin zu höheren Mittelwerten in den Radii für die Parameter *Ca-Mean*, *Ca-Peak*, *Ca-Width* und *Ca-Low*. Die Daten des Vergleichs von *Ca-Mean* und *Ca-Peak* sind in Abbildung 12 dargestellt. Abbildung 13 zeigt den Vergleich für *Ca-Width*, *Ca-Low* und *Ca-High*.

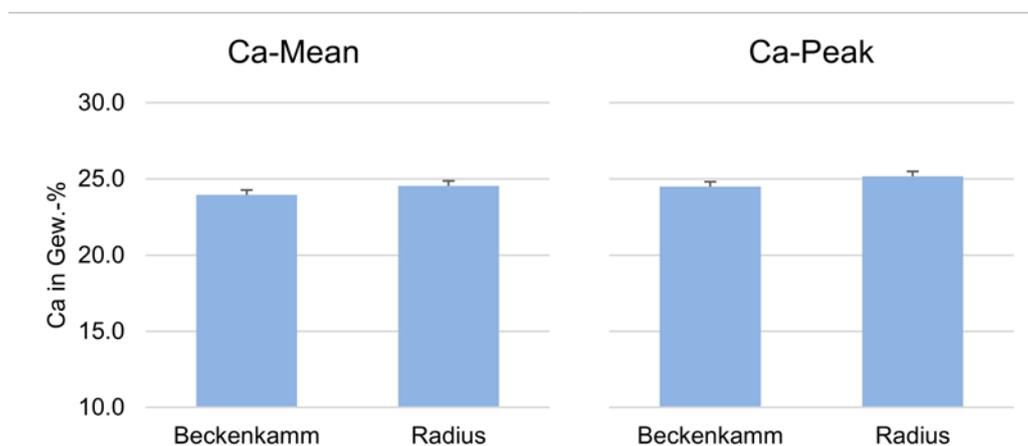


Abbildung 12: Vergleich der *Ca-Mean* und *Ca-Peak*-Werte der Spongiosa von Beckenkämmen und Radii auf Grundlage der geschätzten Randmittel, adjustiert für die Gruppenzugehörigkeit, mit 95 %-Konfidenzintervall (mit Bonferroni-Korrektur für multiple Paarvergleiche)

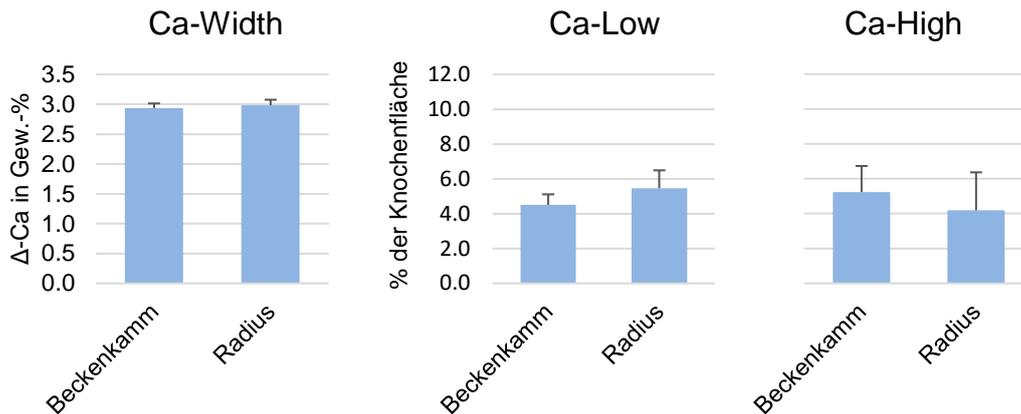


Abbildung 13: Vergleich der Ergebnisse für *Ca-Width*, *Ca-Low* und *Ca-High* der Spongiosa von Beckenkämmen und Radii auf Grundlage der geschätzten Randmittel, adjustiert für die Gruppenzugehörigkeit, mit 95 %-Konfidenzintervall (mit Bonferroni-Korrektur für multiple Paarvergleiche)

3.1.4 Kortikalis: Vergleich von Beckenkämmen und Radii

Im direkten Vergleich der Kortikalis von Beckenkämmen und Radii ergaben sich signifikante Unterschiede für *Ca-Mean* und *Ca-Peak*. Die kortikalen Radii zeigten hier durchweg höhere Mineralisierungen als die kortikalen Beckenkämme, vgl. Abbildung 14.

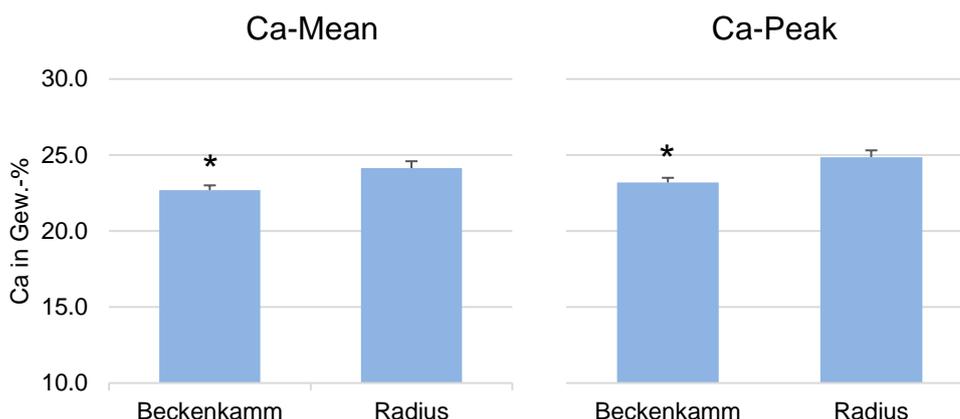


Abbildung 14: Vergleich der *Ca-Mean* und *Ca-Peak*-Werte der Kortikalis von Beckenkämmen und Radii auf Grundlage der geschätzten Randmittel, adjustiert für die Gruppenzugehörigkeit, mit 95 %-Konfidenzintervall (mit Bonferroni-Korrektur für multiple Paarvergleiche); * = statistisch signifikanter Unterschied

Für *Ca-Width* und *Ca-Low* ließ sich zwar ebenfalls ein Trend hin zu höheren Werten für die Radii erkennen, dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Bezüglich *Ca-High* unterschieden sich die beiden Lokalisationen nur in geringem Maße und ohne statistische Signifikanz. Abbildung 15 stellt die Ergebnisse des Vergleichs der Parameter *Ca-Width*, *Ca-Low* und *Ca-High* dar.

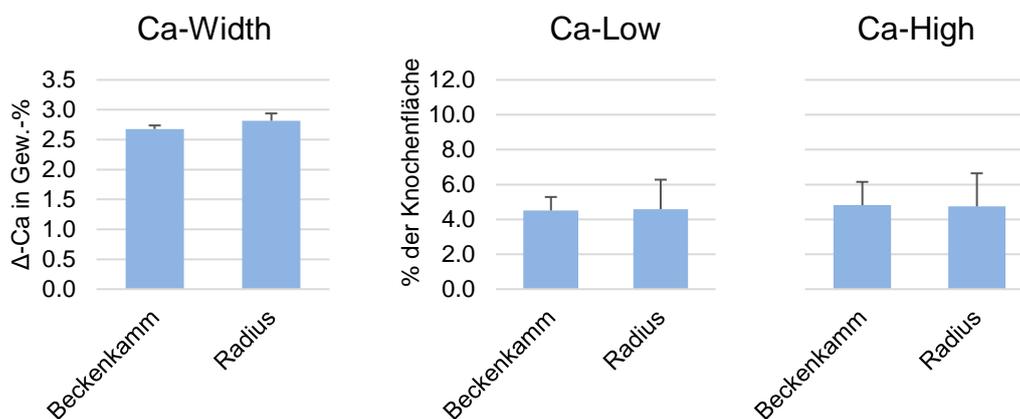


Abbildung 15: Vergleich der *Ca-Width*, *Ca-Low* und *Ca-High*-Werte der Kortikalis von Beckenkämmen und Radii auf Grundlage der geschätzten Randmittel, adjustiert für die Gruppenzugehörigkeit, mit 95 %-Konfidenzintervall (mit Bonferroni-Korrektur für multiple Paarvergleiche)

3.1.5 Beckenkamm Kortikalis verglichen mit Beckenkamm Spongiosa

Der Vergleich von Kortikalis und Spongiosa der Beckenkämme ergab signifikante Unterschiede bei *Ca-Mean*, *Ca-Peak* und *Ca-Width*. Der spongiöse Knochen zeigte sowohl eine stärkere Mineralisierung durch höhere Werte für *Ca-Mean* und *Ca-Peak*, als auch eine höhere Inhomogenität durch größeres *Ca-Width* (vgl. Abbildung 16). Hinsichtlich *Ca-Low* und *Ca-High* konnte kein signifikanter Unterschied erkannt werden; dieser Vergleich ist in Abbildung 17 dargestellt.

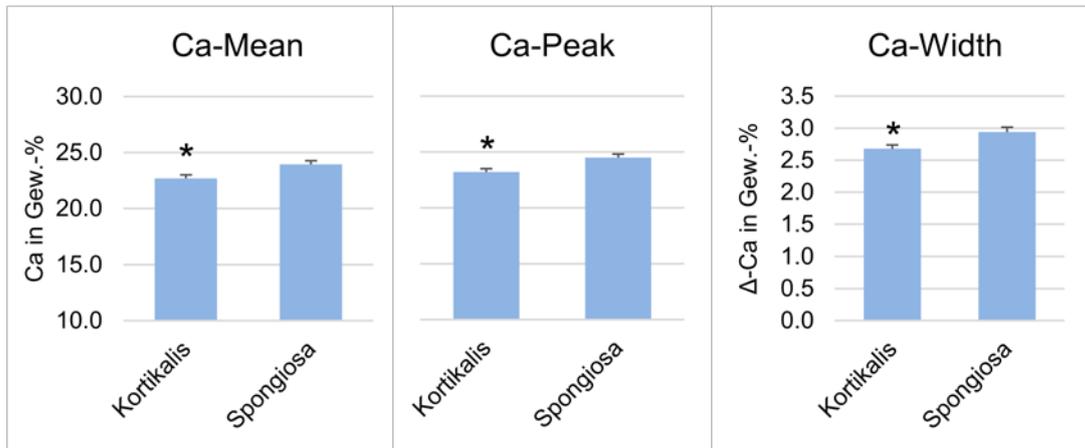


Abbildung 16: Vergleich der *Ca-Mean*-, *Ca-Peak*-, und *Ca-Width*-Werte von Kortikalis und Spongiosa der Beckenkämme auf Grundlage der geschätzten Randmittel, adjustiert für die Gruppenzugehörigkeit, mit 95 %-Konfidenzintervall (mit Bonferroni-Korrektur für multiple Paarvergleiche); * = statistisch signifikanter Unterschied

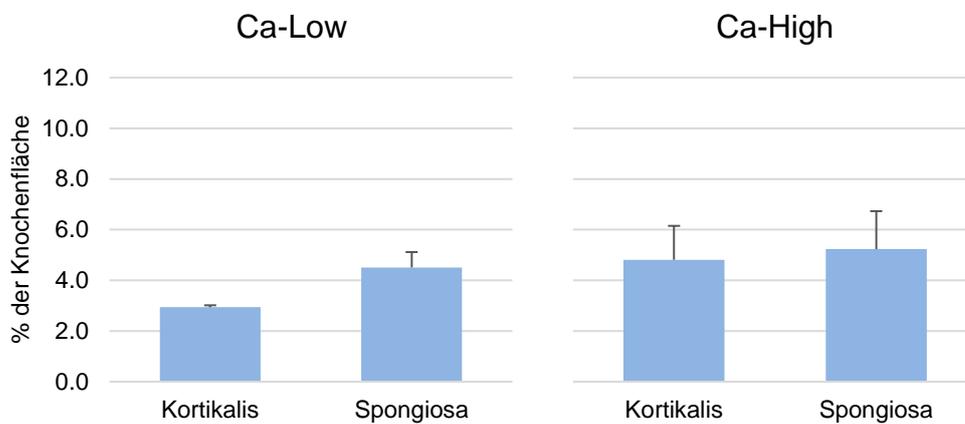


Abbildung 17: Vergleich der *Ca-Low* und *Ca-High*-Werte von Kortikalis und Spongiosa der Beckenkämme auf Grundlage der geschätzten Randmittel, adjustiert für die Gruppenzugehörigkeit, mit 95 %-Konfidenzintervall (mit Bonferroni-Korrektur für multiple Paarvergleiche)

3.1.6 Radius Kortikalis verglichen mit Radius Spongiosa

Die großen Unterschiede innerhalb einer Körperregion, wie sie im Beckenkamm vorlagen, bestätigten sich innerhalb der Radii nicht. Es zeigten sich zwar für *Ca-Mean*, *Ca-Peak*, *Ca-Width* und *Ca-Low* durchweg höhere Mittelwerte in der Spongiosa als in der Kortikalis; diese Unterschiede waren aber nicht statistisch signifikant, bzw. grenzwertig für *Ca-Mean* ($p = 0,053$). Für *Ca-High* ergaben sich in der Kortikalis höhere Werte als in der Spongiosa, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Abbildung 18 und Abbildung 19 zeigen die Daten aus dem Vergleich der BMDD-Parameter.

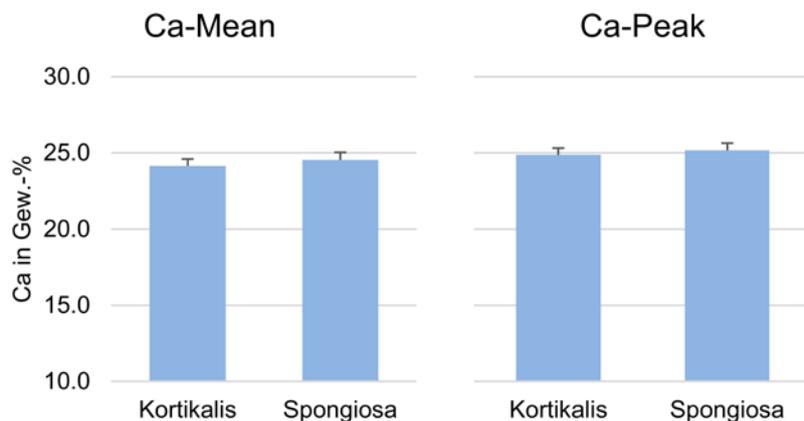


Abbildung 18: Vergleich der *Ca-Mean* und *Ca-Peak*-Werte von Kortikalis und Spongiosa der Radii auf Grundlage der geschätzten Randmittel, adjustiert für die Gruppenzugehörigkeit, mit 95 %-Konfidenzintervall (mit Bonferroni-Korrektur für multiple Paarvergleiche)

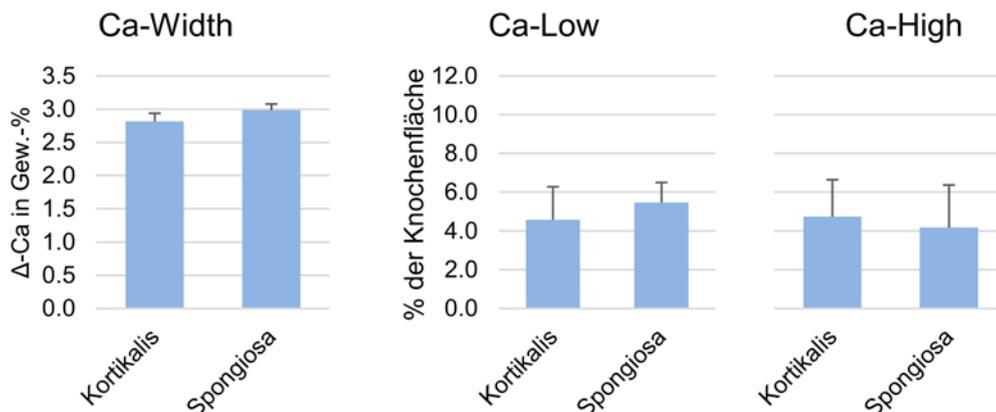


Abbildung 19: Vergleich der *Ca-Width*, *Ca-Low* und *Ca-High*-Werte von Kortikalis und Spongiosa der Radii auf Grundlage der geschätzten Randmittel, adjustiert für die Gruppenzugehörigkeit, mit 95 %-Konfidenzintervall (mit Bonferroni-Korrektur für multiple Paarvergleiche)

3.2 Einfluss der Bisphosphonattherapie auf die Mineralisierungsverteilung

Zunächst wurden für alle fünf Parameter des BMDD-Histogrammes die Mittelwerte der vier Lokalisationen ermittelt; sie sind in den Abbildungen 20–24 dargestellt.

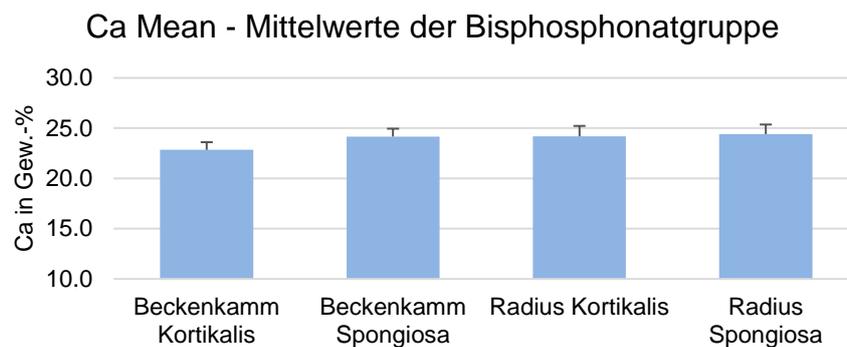


Abbildung 20: Deskriptive Statistik des Parameters *Ca-Mean*: Mittelwerte der Bisphosphonatgruppe mit Standardabweichung

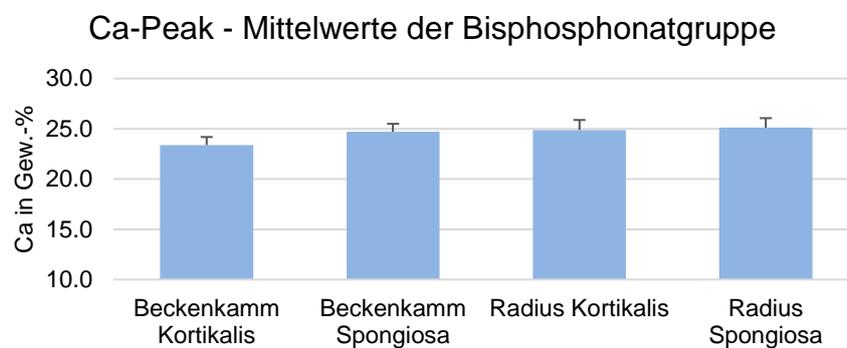


Abbildung 21: Deskriptive Statistik des Parameters *Ca-Peak*: Mittelwerte der Bisphosphonatgruppe mit Standardabweichung

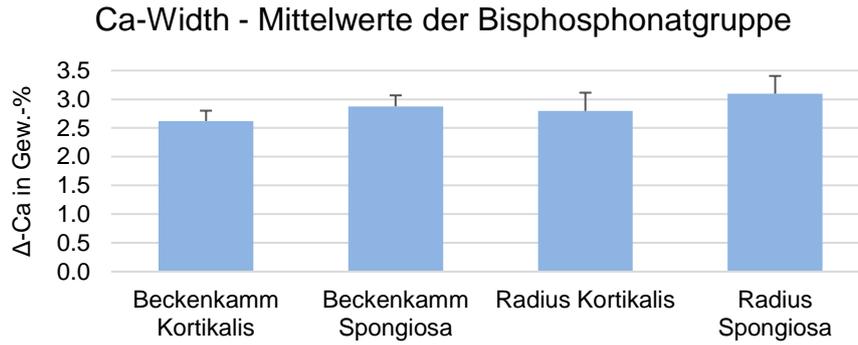


Abbildung 22: Deskriptive Statistik des Parameters *Ca-Width*: Mittelwerte der Bisphosphonatgruppe mit Standardabweichung

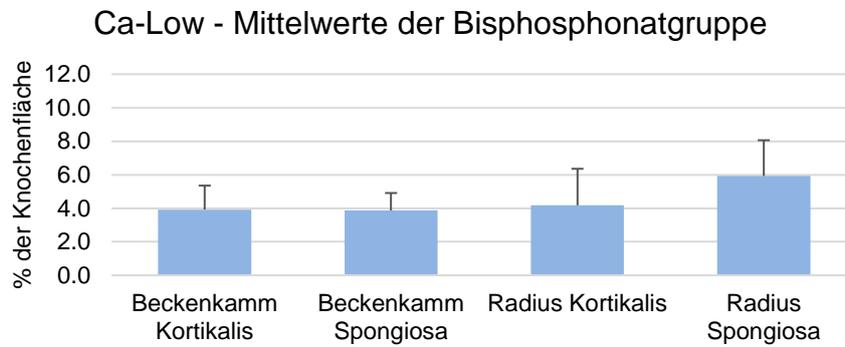


Abbildung 23: Deskriptive Statistik des Parameters *Ca-Low*: Mittelwerte der Bisphosphonatgruppe mit Standardabweichung

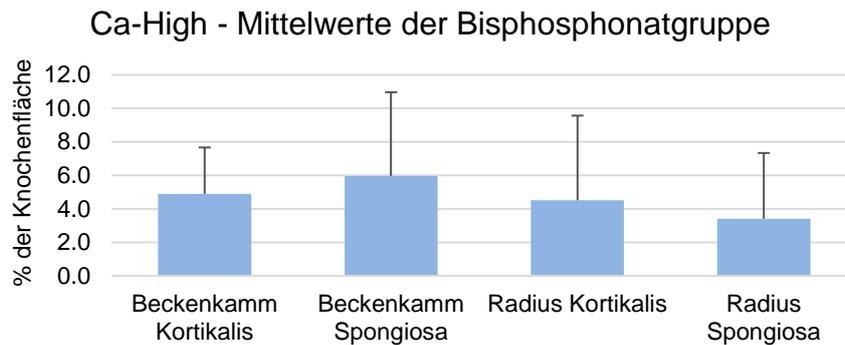


Abbildung 24: Deskriptive Statistik des Parameters *Ca-High*: Mittelwerte der Bisphosphonatgruppe mit Standardabweichung

Um den Einfluss allein einer Bisphosphonateinnahme auf die Mineralisierungsverteilung zu untersuchen, wurden anschließend – ungeachtet der verschiedenen Lokalisationen – die Zwischensubjekteffekte berechnet. Dabei befanden sich die p-Werte für alle BMDD-Parameter gänzlich im nicht signifikanten Bereich (vgl. Tabelle 8). Dies bedeutet, dass eine Bisphosphonateinnahme keinen signifikanten Einfluss auf die Mineralisierung hatte, wenn man der Berechnung den Mittelwert aus allen vier Lokalisationen zugrunde legt. Daraus lässt sich noch keine Aussage über die Wirksamkeit der Bisphosphonate an den jeweils einzelnen Lokalisationen ableiten.

Tabelle 8: Testung der Signifikanz der Zwischensubjekteffekte aller Parameter

	<i>Ca-Mean</i>	<i>Ca-Peak</i>	<i>Ca-Width</i>	<i>Ca-Low</i>	<i>Ca-High</i>
p-Wert	0,574	0,486	0,802	0,413	0,934

Zur genaueren Untersuchung wurden für beide Gruppen die geschätzten Randmittel, adjustiert für die Gruppenzugehörigkeit, berechnet (vgl. Tabellen 15 und 16 im Anhang).

Ob die Unterschiede der Mineralisierungen zwischen den verschiedenen Lokalisationen von der Gruppenzugehörigkeit abhängig waren, wurde durch die Interaktion „Lokalisation * Gruppe“ in den Tests der Innersubjekteffekte überprüft (vgl. Tabelle 9). Durch Mauchly`s Test wurde zunächst wieder geprüft, ob Sphärizität angenommen werden konnte. War sie verletzt, wurde die Greenhouse-Geisser-Korrektur angewandt.

Es zeigte sich, dass die Interaktion für die Parameter *Ca-Mean*, *Ca-Peak*, *Ca-Low* und *Ca-High* keine signifikanten Unterschiede aufwies. Das heißt, die Mineralisierungsunterschiede zwischen den einzelnen Lokalisationen waren nicht signifikant davon abhängig, ob die Patientinnen Bisphosphonate eingenommen hatten oder nicht.

Für *Ca-Width* ergab die Interaktion einen signifikanten Unterschied, d.h. die Unterschiede in der Mineralisierungsheterogenität der verschiedenen Lokalisationen waren signifikant davon abhängig, ob die Patientinnen Bisphosphonate eingenommen hatten. In Kortikalis und Spongiosa der Beckenkämme, sowie der

Kortikalis der Radii ließen sich in der therapienaiven Osteoporosegruppe auch stets höhere Werte für *Ca-Width* erkennen, d.h. der Knochen war hier heterogener mineralisiert. Diese Relation kehrte sich in der Spongiosa der Radii um, so dass hier die Bisphosphonatgruppe höhere Ergebnisse für *Ca-Width*, und somit eine inhomogenere Mineralisierungsverteilung zeigte. Die Ergebnisse für *Ca-Width* der einzelnen Lokalisationen beider Gruppen sind in Abbildung 25 zur Veranschaulichung im Überblick abgebildet.

Tabelle 9: Tests der Innersubjekteffekte mit Test der Interaktion Lokalisation * Gruppe der einzelnen BMDD-Parameter. Bei Verletzung der Sphärizität ($p < 0,05$ in Mauchly's Test) wurde die Greenhouse-Geisser-Korrektur angewandt, * = statistisch signifikant

	<i>Ca-Mean</i>	<i>Ca-Peak</i>	<i>Ca-Width</i>	<i>Ca-Low</i>	<i>Ca-High</i>
Signifikanz in Mauchly's Test	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,086$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Sphärizität angenommen	$p = 0,014^*$				
Greenhouse-Geisser	$p = 0,426$	$p = 0,534$		$p = 0,307$	$p = 0,474$

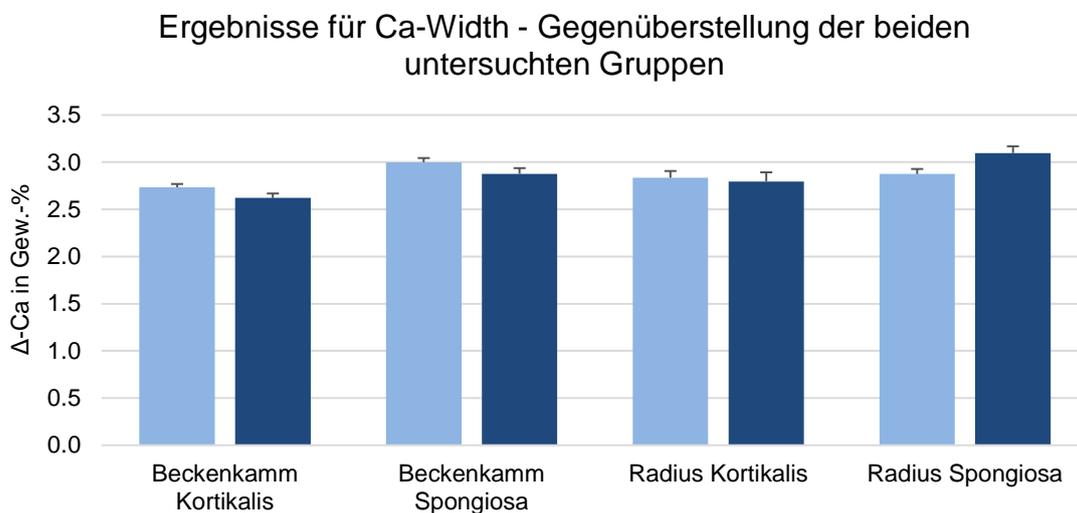


Abbildung 25: Ergebnisse für *Ca-Width* – Gegenüberstellung der beiden untersuchten Gruppen mit Standardfehler, Hellblau = Therapienaive Osteoporosegruppe, Dunkelblau = Bisphosphonatgruppe

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass der Einflussfaktor Lokalisation auf die Parameter *Ca-Mean*, *Ca-Peak* und *Ca-Width* einen signifikanten Einfluss hatte. Innerhalb der Beckenkämme war hierbei die Spongiosa höher und heterogener mineralisiert als die Kortikalis. Innerhalb der Radii bestätigten sich diese Unterschiede nicht in statistischer Signifikanz; es fiel jedoch ein Trend zu höheren Mittelwerten in der Spongiosa für *Ca-Mean*, *Ca-Peak*, *Ca-Width* und *Ca-Low* auf. Im direkten Vergleich der beiden Körperregionen zeigten Beckenkämme und Radii in der Spongiosa ein homogenes Mineralisierungsverhalten. In der Kortikalis hingegen waren in den Radii die Ergebnisse für durchschnittliche und häufigste Mineralisierung (*Ca-Mean* und *Ca-Peak*) signifikant höher als in den Beckenkämmen.

Die Interaktion „Lokalisation * Gruppe“ war für den Parameter *Ca-Width* signifikant. Das bedeutet, dass hier die gefundenen Unterschiede in der Körper- und Knochenregion auch signifikant von der Bisphosphonateinnahme abhängig waren. Hierbei wies die Bisphosphonatgruppe - mit Ausnahme der Spongiosa der Radii - durchweg niedrigere Werte auf; der Knochen war also homogener mineralisiert. Die Spongiosa der Radii zeigte ein gegenteiliges Verhalten, mit höherer Heterogenität der Mineralisierung in der Bisphosphonatgruppe als der therapie-naiven Osteoporosegruppe. Für die anderen Parameter des BMDD-Histogrammes war die Interaktion „Lokalisation * Gruppe“ nicht signifikant, es war jedoch teilweise ein Trend zu höheren Mineralisierungen in der Bisphosphonatgruppe zu erkennen.

4 Diskussion

4.1 Mineralisierungsunterschiede zwischen den Körperregionen Beckenkamm und Radius

4.1.1 Spongiosa

Bei den hier untersuchten Biopsien osteoporotischen Knochens zeigte sich in der Spongiosa ein homogenes Mineralisierungsverhalten der beiden analysierten Körperregionen Beckenkamm und Radius. Im direkten Vergleich von Beckenkämmen und Radii wies keiner der fünf BMDD-Parameter statistisch signifikante Unterschiede auf.

Zu Mineralisierungsunterschieden zwischen den Körperregionen bei Osteoporose ist die Datenlage insgesamt dünn. Es liegen aber für gesunden Knochen mehrere Arbeiten vor:

Roschger et al. haben bei der Etablierung von qBEI 2003 das BMDD-Histogramm eines sogenannten „Referenz-Kollektivs“ definiert. Hierfür untersuchten sie spongiöse Biopsien von knochengesunden Individuen unterschiedlichen Alters, Ethnie und Geschlecht. Beim Vergleich der Spongiosa aus Beckenkämmen, Wirbelkörpern, Femurhälsen, Femurköpfen und Patellae fand die Gruppe um Roschger keine Unterschiede in der Mineralisierungsverteilung. In der Altersspanne von 25–97 Jahren fanden sich nur verschwindend geringe Abweichungen der Mineralisierung, ebenso hatten weder Geschlecht, noch Ethnie einen signifikanten Einfluss. Knochenerkrankungen, wie z.B. Osteomalazie, fielen hingegen durch signifikante Abweichungen vom Referenz-BMDD der gesunden Vergleichskohorte auf. Dies führte die Autoren zu der Feststellung, dass in Zukunft wohl eine Biopsie des Beckenkamms genügen würde, um durch qBEI sensitiv Mineralisierungspathologien des gesamten Körpers diagnostizieren zu können (Roschger et al., 2003).

In der Arbeit von Köhne et al. 2014 wurde dasselbe Rasterelektronenmikroskop wie bei den hier präsentierten Daten und identische Messeinstellungen verwendet. Daher sind diese Daten geeignet, als gesundes Vergleichskollektiv zu den hier präsentierten Ergebnissen der Beckenkämme zu dienen. Köhne et al. vermaßen die spongiösen Beckenkämme einer knochengesunden Kohorte von 152 PatientInnen, unterschiedlichen Alters (30–90 Jahre), Geschlechts und BMI. Ein Ergebnis war, dass *Ca-Peak* und *Ca-High* (und nach Adjustierung der Kovariaten auch *Ca-Mean*) positiv mit dem Alter korrelieren. Die in der vorliegenden Arbeit vermessene Kohorte war mit einer Alterspanne von 60–90 Jahren im Durchschnitt wesentlich älter als die von Köhne et al. Dass die Ergebnisse für *Ca-Mean*, *Ca-Peak* und *Ca-High* entsprechend höher ausfielen, kann als Bestätigung dieser These zur Alterskorrelation gewertet werden (Köhne et al., 2014).

Auch Turunen et al. stellten mittels μ -CT einen direkten Vergleich der Spongiosa verschiedener Körperregionen an. Neben signifikanten Unterschieden in der Mikroarchitektur fanden sie eine signifikant höhere Mineralisierung des Trochanter major als des Calcaneus (Turunen et al., 2013).

Abrahamsen et al. untersuchten die Korrelation der DXA-Messwerte verschiedener Körperregionen von knochengesunden Patientinnen in den ersten fünf Jahren nach der Menopause. In dieser Studie wichen die Messergebnisse für den Unterarm von denen von Hüfte und Wirbelkörpern ab. Die Autoren folgerten daraus, dass von der alleinigen Unterarmmessung nicht auf das Mineralisationsverhalten des gesamten restlichen Körpers geschlossen werden könne (Abrahamsen et al., 2001). Die Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Arbeit ist durch die methodische Differenz und die dadurch fehlende Unterscheidung von Kortikalis und Spongiosa eingeschränkt. Sie kann daher lediglich als Hinweis auf ein möglicherweise abweichendes Mineralisationsverhalten der Radii im Vergleich mit den großen zentralen Knochenkompartimenten wie Beckenkamm und Wirbelkörper verstanden werden.

Da sich die genannten Arbeiten auf knochengesunde Patientinnen beziehen, stellte sich die Frage, wie sich die Mineralisierungsverteilung in der Spongiosa verschiedener Körperregionen bei manifester postmenopausaler Osteoporose

verhält. Insbesondere mit Blick auf die sehr häufigen Radiusfrakturen erschien eine genauere Untersuchung dieser Knochenregion hier von Interesse.

Bezüglich der Mineralisierungsverteilung der Spongiosa allgemein bei postmenopausaler Osteoporose kamen qBEI-Studien an therapienaiven Patientinnen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Einerseits wurde berichtet, dass die Mineralisierung einer Körperregion im Vergleich zu gesunden, gleichaltrigen Kontrollen niedriger (*Ca-Mean*) und inhomogener (*Ca-Peak*) sei (Zoehrer et al., 2006; Roschger et al., 2008). Ruffoni et al. führten dies in einer Computer-simulierten qBEI-Studie auf vermehrt auftretende „junge“ Knochenpakete durch erhöhte Remodelingraten zurück (Ruffoni et al., 2008).

Andererseits berichteten Busse et al. von signifikant erhöhtem *Ca-Mean* und *Ca-Width* in Wirbelkörpern (Th 12) osteoporotischer Patientinnen im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Busse et al., 2009). Diese These wird auch durch die Ergebnisse von McNamara et al. untermauert, die erhöhte Mineralisationen bei ovariectomierten Ratten fanden (McNamara et al., 2006), sowie Boyde et al. die eine erhöhte Mineralisierung durch Östrogenentzug bei jungen Frauen feststellen konnten (Boyde et al., 1998).

Der Vergleich von Patientinnen mit prämenopausaler, idiopathischer Osteoporose und gesunden Kontrollen ergab signifikant erniedrigte Werte spongiösen Knochens für *Ca-Mean*, *Ca-Peak* und *Ca-High*. *Ca-Width* und *Ca-Low* unterschieden sich in dieser Arbeit nicht von der gesunden Kontrollkohorte (Misof et al., 2012).

Die erste Gegenüberstellung von spongiösen BMDD-Parametern verschiedener Körperregionen therapienaiver Osteoporosepatientinnen legten Milovanovic et al. vor. Er verwendete in dieser Arbeit eine Untergruppe des Studienkollektivs der vorliegenden Dissertation, und zog sie zum Vergleich mit anderen Körperregionen heran. Der trabekuläre Knochen von Wirbelkörpern und Beckenkämmen unterschied sich hier nicht signifikant, auch zwischen Beckenkämmen und Radii zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Allerdings konnten im direkten Ver-

gleich der Spongiosa von Wirbelkörpern und Radii signifikant höhere Mineralisierungen bei *Ca-Mean* und *Ca-Peak* in den Radii gezeigt werden (Milovanovic, Zimmermann, et al., 2015).

Da die meisten qBEI-Studien bei postmenopausaler Osteoporose an Beckenkambibiopsien durchgeführt werden, fehlte bislang ein Vergleich der Spongiosa verschiedener Körperregionen, wie er in der vorliegenden Arbeit zwischen Radii und Beckenkämmen vorliegt, und zu Teilen in der oben genannten Publikation von Milovanovic et al. präsentiert wurde. Für die Regionen Beckenkamm und Radius bestätigt er die genannten Ergebnisse bezüglich einer homogenen Mineralisierung spongiösen Knochens über mehrere Körperregionen hinweg.

Im Vergleich mit der gesunden Kohorte von Köhne et al. (Koehne et al., 2014) fielen in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse für *Ca-Mean*, *Ca-Peak* und *Ca-High* höher aus. Dies könnte zum einen an dem höheren Durchschnittsalter der vorliegenden Kohorte liegen, und somit die These von Köhne zur Alterskorrelation stützen. Zum anderen bestätigt es die von Busse et al., McNamara et al. und Boyde et al. beschriebene, erhöhte Mineralisierung bei postmenopausaler Osteoporose bzw. Östrogenentzug.

4.1.2 Kortikalis

Im Gegensatz zum spongiösen, zeigte der kortikale Knochen in der vorliegenden Arbeit zwei signifikante Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Körperregionen: Sowohl der durchschnittliche Kalziumgehalt (*Ca-Mean*), als auch der häufigste Kalziumgehalt (*Ca-Peak*) war in den Radii deutlich höher als in den Beckenkämmen.

Sowohl für Gesunde, als auch OsteoporosepatientInnen sind zur Kortikalis weit weniger Studien vorhanden, als zur Spongiosa. Ein Referenz-BMDD von verschiedenen Knochenregionen Gesunder, wie das von Roschger et al. 2003 publizierte, liegt bisher nur für spongiösen Knochen vor. Misof et al. erstellten anhand einer Kohorte von 73 gesunden, prämenopausalen Patientinnen, eine Art Referenz-BMDD; allerdings handelt es sich hier nur um Messdaten von Biopsien des Beckenkamms (Misof et al., 2014).

Donnelly et al. verglichen mittels Fourier-Transform-Infrarotspektrometer das durchschnittliche Mineral- zu Matrix-Verhältnis von Beckenkamm, Trochanter major und subtrochanterischem Femur knochengesunder PatientInnen. Dieses war im subtrochanterischen Kortex 20 % höher als in den Kortices von Beckenkamm und Trochanter major, was auf unterschiedliche Mineralisierungsverteilungen verschiedener Körperregionen hinweist (Donnelly et al., 2012).

Die vorhandenen Arbeiten zur Kortikalis bei Osteoporosepatientinnen beziehen sich größtenteils auf die Kortikalis nur einer einzelnen Körperregion: Misof et al. unternahmen auch den Vergleich zwischen kortikalem Knochen des Beckenkamms von Patientinnen mit prämenopausaler, idiopathischer Osteoporose und gesunden Kontrollen. Im Gegensatz zu den spongiösen Knochenarealen fanden sie hierbei in der Kortikalis keinerlei Unterschiede zwischen den Gruppen (Misof et al., 2012). Bei Kindern mit idiopathischer Osteoporose fanden Tamminen et al. jedoch in der Kortikalis der Beckenkämme eine erhöhte Heterogenität, sowie einen erhöhten Anteil hochmineralisierten Knochens, im Vergleich mit den BMDD-Histogrammen von gesunden Kindern (Tamminen et al., 2014).

Es besteht in der Literatur daher nicht völlige Klarheit darüber, wie verschiedene Osteoporoseformen die BMDD-Parameter generell des kortikalen Knochens beeinflussen. Zu postmenopausaler Osteoporose und der kortikalen Mineralisierungsverteilung verschiedener Körperregionen im Vergleich liegen bisher kaum Daten vor.

Eine Arbeit, die man zum Vergleich heranziehen könnte, ist die von Fratzl-Zelman et al. Sie verglichen das superiore und inferiore Kompartiment des Femurhalses von postmenopausalen Osteoporosepatientinnen mit Frakturen und gesunden Kontrollen. In den superioren Kompartimenten war *Ca-Peak* signifikant niedriger als in den inferioren (Fratzl-Zelman et al., 2009). Jedoch wurde hier *Ca-Peak* als einziger BMDD-Parameter ermittelt, sodass sie sich nur begrenzt mit der vorliegenden Arbeit vergleichen lässt. Auch können das superiore und inferiore Kompartiment des Femurhalses streng genommen nicht als unterschiedliche Körperregionen gewertet werden, sodass die Ergebnisse dieser Arbeit nur als Hinweis auf Mineralisierungsvariationen in der Kortikalis verstanden werden können.

Außerdem konnten Milovanovic et al. zeigen, dass die Mineralisierung im Kortex des Femurs bei therapienaiven Osteoporose-Patientinnen signifikant höher ist, als im Kortex des Beckenkamms (Milovanovic, Zimmermann, et al., 2015). Die beiden Arbeiten weisen darauf hin, dass die Mineralisierung der Kortices bei Osteoporose in unterschiedlichen Körperregionen nicht einheitlich betroffen ist. Auch die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen eine erhöhte Mineralisierung der radialen Kortices im Vergleich zu den Beckenkämmen bei postmenopausaler Osteoporose.

Als mögliche Kausalhypothese hierfür könnten unterschiedliche mechanische Krafteinwirkungen in verschiedenen Knochenregionen des Skeletts gesehen werden. Der distale Radius ist durch zahlreiche Sehnenansätze auf geringer Kortikalisfläche starken Zug- und Scherkräften ausgesetzt. Adaptationsmechanismen von Knochengewebe an unterschiedliche mechanischen Krafteinwirkungen sind seit Jahren Gegenstand der Forschung:

Im Tierversuch sind zum Beispiel Veränderungen der Osteonendichte und „Cortical Porosity“ (Skedros et al., 1994), der 3D-Ausrichtung der Haver'schen Kanäle (Britz et al., 2012) und der „Cortical Thickness“ (Bouvard et al., 2012) als Reaktion auf unterschiedliche mechanische Belastungen beschrieben.

Auch an humanem Knochen wurden die Folgen verschiedener Krafteinwirkungen auf Mineralisierung und mikrostrukturelle Parameter untersucht. Heinonen et al. verglichen in einer pQCT-Studie die Auswirkungen von Gewichtheben auf Radius, Femur und Tibia gesunder Probandinnen. Nach Aussage der Autoren wirkten hierbei auf Femur und Tibia hohe Kompressionsdrücke, während die Radii starken Biegungskräften ausgesetzt waren. Dies führte an den Radii zu signifikant größeren kortikalen Querschnittsflächen, die Mineralisierung ebendort war jedoch nicht erhöht (Heinonen et al., 2002).

Haapasalo et al. und Ashizawa et al. führten jeweils pQCT-Studien zu Adaptationsvorgängen im Knochen an regelmäßiges Tennisspielen durch. Sie verzeichneten bei den gesunden Probanden unter anderem eine Zunahme der kortikalen Wanddicke und der „Total Cross-Sectional Area“ des Radius und indirekt dadurch

eine höhere Mineralisierung, aber keine explizite Zunahme der kortikalen Dichte selbst (Haapasalo et al., 2000; Ashizawa et al., 1999).

Zu gegenteiligen Ergebnissen kamen Adami et al. in einer Untersuchung an gesunden, postmenopausalen Frauen mit 6-monatigem Trainingsprogramm. Sie vermaßen per DXA Oberschenkelhals, Lendenwirbelsäule und Radii, und zusätzlich die ultradistalen Radii per pQCT. Im Radius fand sich in der Kortikalis ein statistisch signifikanter Anstieg der „Volumetric Density“, in der Spongiosa hingegen sank diese (Adami et al., 1999).

Bei fehlender Datenlage zu Adaptationsmechanismen an unterschiedliche mechanische Krafteinwirkungen speziell osteoporotischen Knochens, kann die gesteigerte Mineralisierung der kortikalen Radii in der vorliegenden Arbeit nur berichtet werden. Es bleibt zu überprüfen, ob sich der gefundene Trend hin zu höheren Werten bei *Ca-Width* und *Ca-Low* auch bei größeren Kollektiven als statistisch signifikant herausstellen würde.

4.2 Mineralisierungsunterschiede innerhalb einer Körperregion zwischen Kortikalis und Spongiosa

4.2.1 Beckenkamm

Bei dem hier untersuchten Kollektiv zeigten sich in der Spongiosa des Beckenkammes signifikant höhere Ergebnisse als in der Kortikalis für die durchschnittliche und häufigste Mineralisierung (*Ca-Mean* und *Ca-Peak*), sowie die Mineralisierungshomogenität (*Ca-Width*). Dies bedeutet, dass der spongiöse Knochen sowohl stärker, als auch inhomogener mineralisiert war, als der kortikale.

Die Korrelation der BMDD-Histogramme von Kortikalis und Spongiosa des Beckenkamms haben Misof et al. 2014 überprüft. Bei dem gesunden, prämenopausalen Patientinnenkollektiv fanden sie durchweg signifikante Korrelationen zwischen den BMDD-Histogrammen von Kortikalis und Spongiosa mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0,42 (*Ca-Low*) und 0,73 (*Ca-High* und *Ca-Peak*) (Misof et al., 2014).

Zum Vergleich von Kortikalis und Spongiosa des Beckenkamms bei postmenopausaler Osteoporose lagen nach aktuellem Kenntnisstand bisher keine Veröffentlichungen vor.

In der Publikation von Milovanovic et al. 2015 wurde ein Teil der hier vorliegenden Daten verwendet, und mit anderen Körperregionen verglichen. Schon bei dieser Gegenüberstellung zeigten sich signifikant höhere Messwerte in der Spongiosa für *Ca-Mean*, *Ca-Peak* und *Ca-Width* (Milovanovic, Zimmermann, et al., 2015). Dieses Ergebnis ließ sich nach Auswertung der vollständigen Osteoporose-Kohorte bestätigen, in der *Ca-Mean*, *Ca-Peak* und *Ca-Width* in der Spongiosa durchgehend signifikant höher ausfielen als in der Kortikalis.

Die niedrigere Mineralisierung der Kortikalis könnte ursächlich mit gesteigerten Turnoverraten, wie sie Ruffoni et al. simuliert haben, erklärt werden. Sie beschrieben anhand einer qBEI-Computersimulation eine Linksverschiebung von *Ca-Peak* durch vermehrte Neubildung von BMU. Durch den niedrigen Mineralgehalt dieser jungen BMU würde sich das BMDD-Histogramm nach links verschieben und in erniedrigten Werten für *Ca-Mean* und *Ca-Peak* resultieren. Zwar wurden

in dieser Studie Daten von trabekulärem Knochen verwendet, laut Aussage der Autoren lässt sich das Modell allerdings auch auf kortikalen Knochen übertragen (Ruffoni et al., 2007).

Auch könnten die vorliegenden Ergebnisse die Daten von Busse, McNamara und Boyde bestätigen: Sie beschrieben für spongiösen Knochen bei postmenopausaler Osteoporose bzw. Östrogenentzug gesteigerte Mineralisierungen (insbesondere *Ca-Mean* und *Ca-Peak*). Dass dieses Phänomen in der Spongiosa stärker ausgeprägt ist als der Kortikalis, könnte ursächlich mit dem größeren Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis trabekulären Knochens insgesamt erklärt werden.

4.2.2 Radius

Für den Radius gibt es nach derzeitigem Wissensstand keine direkt vergleichbaren Arbeiten zu Mineralisierungsunterschieden zwischen Kortikalis und Spongiosa bei Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose. Boyd beschäftigte sich in seiner Arbeit mit den spezifischen Variationen der Mikroarchitektur in distalem Radius und Tibia. Mittels HR-pQCT erhob er morphologische Parameter wie „Apparent Density“, „Trabecular Density“, „Trabecular Number“ und „Cortical Thickness“. Es zeigte sich, dass in Kortikalis und Spongiosa des Radius mehr lokalisationspezifische Variationen vorlagen als in der Tibia (Boyd, 2008).

Milovanovic et al. verglichen in einer 2015 veröffentlichten HR-pQCT-Studie u.a. die Mineralisierung von distalen Radii und Tibiae einer Kohorte unterschiedlichen Alters und Geschlechts. Der Fokus dieser Arbeit lag jedoch auf Alters- und Geschlechtsspezifischen Veränderungen der osteoporotischen und osteopenischen Biopsien, im Gegensatz zur gesunden Kontrollgruppe. Ein direkter Vergleich des Mineralisierungsverhaltens von Spongiosa und Kortikalis innerhalb der Osteoporosegruppe wurde nicht unternommen (Milovanovic et al., 2015).

Für die in dieser Arbeit untersuchte Kohorte ließen sich bei keinem der BMDD-Parameter signifikante Unterschiede zwischen Kortikalis und Spongiosa des Radius nachweisen. Für einen Teil der Daten wurde dieses Ergebnis schon von

Milovanovic et al. erwähnt (Milovanovic, Zimmermann, et al., 2015), und bestätigte sich nach Auswertung der gesamten Kohorte.

Trotz der Tatsache, dass keine signifikanten Unterschiede bestanden, zeigte sich ein nicht signifikanter Trend hin zu höheren Mineralisierungen in der Spongiosa für *Ca-Mean*, *Ca-Peak*, *Ca-Width* und *Ca-Low*. Es bleibt zu überprüfen, ob sich dieser bei größerer Stichprobenzahl als signifikant erweisen würde, und somit die hier gefundene Beobachtung von erhöhten Mineralisierungen in der Spongiosa bei Osteoporose neben dem Beckenkamm durch eine zweite Körperregion bestätigt würde.

4.3 Bisphosphonateffekte

4.3.1 Generelle Wirkung von Bisphosphonaten

Bei den hier vorliegenden Daten traten, auch unabhängig von einer Bisphosphonat-Einnahme, signifikante Unterschiede in der Mineralisierungsverteilung verschiedener Körper- und Knochenregionen auf. Dies betraf sowohl den mittleren und häufigsten Kalziumgehalt (*Ca-Mean* und *Ca-Peak*), als auch die Mineralisierungsverteilung (*Ca-Width*). In der Bisphosphonatgruppe konnte im Vergleich mit der therapienaiven Osteoporosegruppe aber insgesamt ein Trend hin zu höheren Ergebnissen für die Parameter *Ca-Mean* und *Ca-Peak* beobachtet werden, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte.

Eine lokalisationspezifische Wirkung der Bisphosphonate konnte für die Mineralisierungsverteilung (*Ca-Width*) als statistisch signifikant nachgewiesen werden. Sie führte in Kortikalis und Spongiosa der Beckenkämme und der Kortikalis der Radii zu einer homogeneren Mineralisierungsverteilung als in der osteoporotischen Kontrollgruppe. In der Spongiosa der Radii hingegen wies die Bisphosphonatgruppe eine inhomogenere Mineralisierungsverteilung als die Kontrollgruppe auf.

Für *Ca-Low* und *Ca-High* konnten keine signifikanten Einflüsse der Bisphosphonate auf die Mineralisierungsverteilung gezeigt werden; weder lokalisationspezifische, noch unabhängig von den Lokalisationen bestehende.

Insgesamt betrachtet ist die Datenlage zu Mineralisierungsverteilungen bei Osteoporose nach Bisphosphonattherapie aufgrund methodischer Differenzen teils schwer zu interpretieren. In qBEI-Studien wurde teilweise eine Tendenz zu gesteigerten und homogeneren Mineralisierungen beschrieben:

Roschger et al. konnten das für Alendronat an spongiösen Beckenkämmen zeigen. Sie fanden in der Therapiegruppe eine signifikant höhere und homogenere Mineralisierung als in der Kontrollgruppe (Roschger et al., 2001). Zoehrer et al. untersuchten die Effekte von Risedronat auf trabekuläre Beckenkämme von Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose. Im Vergleich zu den Ausgangswerten stiegen sowohl in der Risedronat-Gruppe, als auch der Placebo-Gruppe

die Mineralisierung (*Ca-Mean* und *Ca-Peak*) signifikant, aber gleich stark an. Die Mineralisierungshomogenität stieg in der Risedronatgruppe nach drei Jahren signifikant, nahm jedoch nach fünf Jahren wieder deutlich ab, was die Autoren mit einer gesteigerten Bildung von jungem Knochen erklärten. *Ca-Low* war im Vergleich mit der Placebogruppe nach drei und fünf Jahren vermindert; *Ca-High* wurde nicht erhoben (Zoehrer et al., 2006).

Auch Arbeiten mit unterschiedlichem methodischem Aufbau dokumentierten wiederholt erhöhte und teilweise homogenere Mineralisierungen nach Bisphosphonattherapie. Bala et al. beispielsweise prüften mittels quantitativer Mikroradiographie die Effekte einer Langzeit-Alendronatbehandlung bei Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose. Sowohl in den kortikalen als auch spongiösen Anteilen des Beckenkamms führte diese zu einer erhöhten Mineralisierung (Bala et al., 2011).

Borah et al. verwendeten ein 3D-Micro-CT, um an spongiösen Beckenkämmen die Wirkung von Risedronat zu untersuchen. Die gesunden Kontrollen hatten zu Studienbeginn eine höhere „Average Mineralization“ und „Peak Mineralization“ als die therapienaiven Osteoporosepatientinnen. Drei und genauso fünf Jahre nach Therapiebeginn waren diese beiden Parameter in der Osteoporosegruppe signifikant erhöht im Vergleich zu den Ausgangswerten. Die „Full Width at Half Maximum“ unterschied sich nicht signifikant bei gesunden Frauen, und drei- und fünfjähriger Risedronattherapie, war jedoch in der Osteoporosegruppe zum Startzeitpunkt signifikant erhöht, sodass insgesamt von einer Homogenisierung der Mineralisierung in der Therapiegruppe auszugehen ist (Borah et al., 2006).

Der in der vorliegenden Arbeit gefundene, nicht signifikante Trend zu höheren Werten für *Ca-Mean* und *Ca-Peak* in der Bisphosphonatgruppe bestätigt die genannten Daten aus der Literatur. Auch die homogenere Mineralisierung in der Bisphosphonatgruppe im gesamten Beckenkamm und kortikalen Radius ist in Einklang mit den genannten Publikationen. Da sich diese allerdings ausschließlich auf Knochenproben des Beckenkamms beziehen, stellte sich die Frage nach den Daten aus anderen Körperregionen.

Eine Studie, die zu ähnlichen Ergebnissen wie die genannten Beckenkammstudien kam, ist die von Krause et al. 2014. Sie vermaßten mittels micro-CT trabekulären Knochen aus dem fünften Lendenwirbelkörper von therapienaiven Osteoporosepatientinnen und Alendronattherapierten. Es zeigte sich eine signifikant höhere „Tissue Mineral Density“ der Alendronatgruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Krause et al., 2014).

Bone et al. bezogen in ihre Arbeit mehrere Körperregionen ein, und widmeten sich außerdem der Frage nach den Langzeiteffekten von Bisphosphonaten. Untersucht wurden hier zwei Bisphosphonatgruppen mit zehnjähriger Einnahme von Alendronat (5 mg und 10 mg), und eine Gruppe von fünf Jahren Alendronat, gefolgt von fünf Jahren Placebo. Dabei wurde, an unterschiedlichen Körperregionen (LWS, Trochanter major, Femurhals, distaler Unterarm und gesamter proximaler Femur) die BMD per DXA gemessen. An LWS und Trochanter major zeigte diese nach 10 Jahren insgesamt eine dosisabhängige, signifikante Steigerung. Auch in der ALN/Placebo-Gruppe konnte nach Jahr fünf eine signifikant erhöhte BMD festgestellt werden, die auch nach 5 weiteren Jahren Placebo oberhalb der Ausgangswerte blieb (Bone et al., 2004).

Auch Roschger et al. legten eine Langzeitstudie zu Bisphosphonateffekten vor. Sie überprüften den Effekt einer zehnjährigen Alendronatgabe (5 mg und 10 mg/pro Tag), gegenüber einer Gabe von fünf Jahren Alendronat und anschließend fünf Jahren Placebo auf alle fünf BMDD-Parameter des trabekulären Beckenkamms. Bei keinem der Parameter konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden, sogar der Vergleich mit einer gesunden Kontrollkohorte erbrachte keine abweichenden Ergebnisse. Die Autoren leiteten daraus die These ab, dass mit einer fünfjährigen Alendronattherapie die BMDD-Parameter wieder auf das Niveau Knochengesunder gebracht werden könnten und eine weitere Einnahme keine neuen Effekte bewirke (Roschger et al., 2010).

Aufgrund der limitierten Kohortengröße wurde in der vorliegenden Arbeit die Bisphosphonatgruppe nicht noch weiter nach Einnahmedauer oder Dosis unterteilt. Mit durchschnittlich 3,5 Jahren Einnahmedauer ist sie allerdings eindeutig nicht im Langzeittherapiebereich einzuordnen, weshalb ein Vergleich mit Langzeitstudien nur zurückhaltend gezogen werden sollte. 70 mg Alendronat pro Woche

(bzw. entsprechend 10 mg/Tag) entsprechen der empfohlenen Dosierung der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, weshalb von einer repräsentativen Dosierung ausgegangen werden kann (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 2003).

Die hier gefundenen Ergebnisse für die Kortikalis und Spongiosa der Beckenkämme und Kortikalis der Radii bestätigen demnach die genannten Erkenntnisse von Krause et al., Borah et al., Bala et al. und Zoehrer et al. und lassen sich mit der These von Roschger et al. zur Bisphosphonatwirkung nach fünf Jahren in Einklang bringen. Aufgrund der geringen Stichprobengröße der vorliegenden Arbeit sollten sich hier allerdings weitergehende Untersuchungen anhand größerer Kohorten und unterteilt nach Einnahmedauer der Bisphosphonate anschließen. Auf die Ergebnisse aus dem spongiösen Knochen der Radii soll im nächsten Kapitel näher eingegangen werden.

4.3.2 Unterschiede der Bisphosphonatwirkung an verschiedenen Lokalisationen

In der Bisphosphonاتفorschung wurde lange hauptsächlich die Wirkung auf trabekulären Knochen untersucht, und auch die genannten Arbeiten beziehen sich größtenteils hierauf, oder waren aus methodischen Gründen nicht in der Lage, sauber zwischen Kortikalis und Spongiosa zu differenzieren (DXA-Studien). Das vielfach beschriebene Fazit ist, dass Bisphosphonate in spongiösem Knochen potente Hemmstoffe u.a. der osteoklastischen Resorption darstellen (Roschger et al., 2001; Hu et al., 2002; Milovanovic, Zimmermann, et al., 2015).

Inzwischen konnte aber gezeigt werden, dass auch das intrakortikale Remodelling beeinflusst, und so effektiv die Porosität reduziert wird (Borah et al., 2010; Roschger et al., 2001; Smith et al., 2003). Bezüglich der Mineralisierung zeigten Bala et al. erhöhte Werte sowohl in kortikalen, als auch spongiösen Anteilen des Beckenkamms nach Alendronatbehandlung (Bala et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden signifikante, lokalisationsabhängige Unterschiede in der Mineralisierungshomogenität (*Ca-Width*) nach Bisphosphonattherapie gefunden. Innerhalb der Beckenkämme reagierten hierbei spongiöser und

kortikaler Knochen gleichsinnig mit einer Erhöhung der Homogenität auf die Bisphosphonatgabe. Dies bestätigt die genannten Ergebnisse von Bala et al. (Bala et al., 2011) und die erwähnten Daten für spongiösen Knochen von Krause, Roschger und Zoehrer (Roschger et al., 2001; Zoehrer et al., 2006; Krause et al., 2014).

Innerhalb der Radii verhielten sich spongiöser und kortikaler Knochen gegenseitig: In der Kortikalis führte die Bisphosphonattherapie zu höherer Homogenität, vergleichbar mit den Ergebnissen in den Beckenkämmen. In der Spongiosa hingegen zeigte die Bisphosphonatgruppe eine niedrigere Homogenität der Mineralisierungsverteilung als die therapienaive Osteoporosegruppe.

Zu den Unterschieden von Bisphosphonatwirkungen in Spongiosa und Kortikalis des Radius gibt es nach Wissen der Autorin bislang keine publizierten Daten. Einige wenige Arbeiten beschäftigen sich aber mit den lokalisationsabhängigen Wirkunterschieden anderer Körperregionen:

Aus Tierversuchen ist ein unterschiedliches Mineralisierungsverhalten verschiedener Körper- und Knochenregionen nach Bisphosphonatgabe bekannt. Zum Beispiel beschrieben Smith et al. eine unterschiedlich starke Anreicherung von Ibandronat in Kortikalis und Spongiosa von Tibiae und Radii bei. Dies führte dazu, dass der Knochenmasseverlust in den Tibiae durch Ibandronat stärker vermindert wurde als in den Radii (Smith et al., 2003).

An menschlichen Knochenproben fanden Milovanovic et al. einen nicht signifikanten Trend, hin zu höheren Mineralisierungen in der BMDD durch Alendronatgabe in der Spongiosa von Wirbelkörpern und Beckenkämmen bei postmenopausaler Osteoporose. Gegensätzlich dazu zeigten sich in Radii und Femora niedrigere Mineralisierungen in der Bisphosphonatgruppe als der therapienaiven Osteoporosegruppe. Diese Unterschiede zwischen den Gruppen waren für *Ca-Mean*, *Ca-Peak*, *Ca-Low* und *Ca-High* jedoch nicht statistisch signifikant. Bei *Ca-Width* bestätigte sich der vielfach beschriebene, signifikante Trend hin zu homogenerer Mineralisierung durch Bisphosphonate, mit Ausnahme der spongiösen Radii. Dies bestätigt die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Er-

gebnisse, jedoch handelt es sich in der genannten Studie auch um eine Untergruppe des hier vermessenen Studienkollektivs (Milovanovic, Zimmermann, et al., 2015).

Burghardt et al. verglichen Alendronattherapie und Placebo in einer Osteoporose-Studie mittels HR-pQCT an Tibiae und Radii. Es zeigte sich, dass Alendronat unterschiedliche Effekte auslöste: Nach zwei Jahren erhöhte sich in der kortikalen und spongiösen Tibia die Mineralisierung durch Alendronat signifikant, im Radius jedoch nicht (Burghardt et al., 2010).

Bock et al. verglichen in einer micro-CT-Studie den Effekt von Ibandronat gegen Placebo auf Radii und Tibiae von Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose. Nach einem Jahr war die kortikale und totale Dichte in den Tibiae signifikant erhöht, wohingegen sich in den Radii keinerlei Veränderungen zeigten (Bock et al., 2012).

Die genannten Studien weisen alle darauf hin, dass Bisphosphonate in verschiedenen Körper- und Knochenregionen ihre Wirkung nicht gleich stark entfalten oder sich diese sogar unterscheidet. Dies könnte zum einen an Unterschieden in der Mineralisierungsverteilung liegen, die schon unabhängig von pharmakologischen Einflüssen an verschiedenen Lokalisationen bestehen (vgl. Kapitel 4.1 und 4.2). Insbesondere bei postmenopausaler Osteoporose sind sie mehrfach beschrieben (Fratzl-Zelman et al., 2009; Milovanovic, Zimmermann, et al., 2015), und konnten auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Zum anderen sind unabhängig von der Mineralisierung Mechanismen beschrieben, die die Wirkung von Bisphosphonaten lokalisationsabhängig zu beeinflussen scheinen:

Remodelingraten

An den Orten im Knochen, wo Remodeling stattfindet, scheint der Zugang zu Hydroxylapatit für Bisphosphonate erleichtert und ihre Absorption am höchsten (Gatti & Adami, 1999). Deshalb und aufgrund des Wirkmechanismus von Bisphosphonaten, der u.a. aus einer Hemmung des osteoklastischen Remodelings besteht, erscheint ein möglicher Zusammenhang zwischen den Remodelingraten und der Verteilung von Bisphosphonaten zwischen den Lokalisationen nahelie-

gend. Lin beschrieb diese Verteilungsunterschiede im Tierversuch sowohl zwischen Kortikalis und Spongiosa, als auch zwischen verschiedenen Körperregionen (Lin, 1996).

Unterschiedliche Remodelingraten in verschiedenen Körperregionen, zeigten an menschlichem Knochen Eventov et al. anhand von Biopsien aus Beckenkämmen und Femora. Dabei korrelierte das Remodelingverhalten der Beckenkämme in keiner Weise mit dem der Femora (Eventov et al., 1991). Schnitzler et al. unternahmen den direkten Vergleich von Knochenstruktur und Turnover in Beckenkämmen und distalen Radii. Dabei zeigte sich – neben anderen strukturellen Unterschieden – ein signifikant geringerer Turnover im Radius als im Beckenkamm (Schnitzler et al., 1996).

Perfusion

Neben den Remodelingraten sind auch lokalisationspezifische Unterschiede der Perfusion und des lokalen Metabolismus beschrieben, wobei der trabekuläre Knochen stärker durchblutet ist, als der kortikale (Lin, 1996). Inwieweit sich das auf die Verteilung und Wirksamkeit von Bisphosphonaten auswirkt, ist noch nicht abschließend geklärt.

Mikroarchitektur und „Load Patterns“

Adaptationsmechanismen von Knochengewebe an unterschiedliche „Load Patterns“ sind mehrfach beschrieben und können sich lokalisationspezifisch unterscheiden (vgl. 4.1.2). Burghardt et al. beschrieben signifikante Unterschiede in der Mineralisierung von Radii und Tibiae durch Bisphosphonate, die sie ursächlich auf Schwankungen der trabekulären Mikroarchitektur und dieser „Load Patterns“ zurückführten (Burghardt et al., 2010).

„Surface Area to Volume Ratio“

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen Kortikalis und Spongiosa ist die „Surface Area to Volume Ratio“, die in der Spongiosa durchschnittlich sechsmal höher ist als in der Kortikalis (Kahn et al., 1984; McParland, 2010; Parfitt, 1988). Dadurch ist die Hemmung der osteoklastischen Resorption durch Bisphosphonate ebendort weniger stark ausgeprägt (Milovanovic, Zimmermann, et al., 2015).

Auch Smith et al. beschrieben eine stärkere Wirksamkeit von Bisphosphonaten in trabekulärem Knochen und führten dies auf die große Oberfläche des trabekulären Netzwerkes zurück, die der Medikamentenbindung zur Verfügung stehe, und dadurch die Inkorporation erleichtere (Smith et al., 2003).

Bindungsaffinität

Ebenso scheint die Bindungsaffinität von Bisphosphonaten zu Hydroxylapatit eine zentrale Rolle bei der Vermittlung mehrerer Wirkeffekte zu spielen. So konnten Russell et al. zeigen, dass sowohl der Beginn der fraktur-reduzierenden Wirkung, als auch die „Erholungsgeschwindigkeit“ des Turnover nach Therapiebeendigung, und die Unterschiede in der Reduktion des Frakturrisikos verschiedener Körperregionen von der Bindungsaffinität des verwendeten Bisphosphonats beeinflusst werden (Russell et al., 2008).

Turek et al. zufolge beeinflusst die Bindungsaffinität auch die Verteilung der Bisphosphonate innerhalb der „Bone Multicellular Unit“ spongiösen und kortikalen Knochens. Sie fanden im Tiermodell (Kaninchen) in Rippen und Tibiae ein unterschiedliches Verteilungsverhalten von Bisphosphonaten zwischen Kortikalis und Spongiosa. Die zentrale Schlussfolgerung der Autoren daraus war, dass die Bindungsaffinität wesentlich die Reichweite von Bisphosphonaten in Kortikalis und Spongiosa bestimmt (Turek et al., 2012).

Die zahlreichen, beschriebenen Einflussfaktoren auf die Bisphosphonatwirkung bieten viele Ansatzpunkte für weitergehende Untersuchungen. Die größte Limitation der vorliegenden Arbeit war nach Ansicht der Autorin die begrenzte Stichprobengröße. Insbesondere die gefundenen, lokalisationsabhängigen Effekte einer Bisphosphonattherapie sollten anhand größerer Kohorten überprüft und weitere Körperregionen mit einbezogen werden. Darüberhinaus erscheint eine genauere Untersuchung des Zusammenhangs von unterschiedlichen mechanischen Kräfteinflüssen und Bisphosphonatwirkung interessant. Perspektivisch könnten so für pharmakologische Forschung und klinischen Alltag möglicherweise wichtige Erkenntnisse über das Ansprechen und die eventuell unterschiedliche Wirkung von Bisphosphonaten an verschiedenen frakturrelevanten Lokalisationen gewonnen werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Bisphosphonaten auf die Mineralisierungsverteilung (BMDD) osteoporotischen Knochens, sowie deren Abhängigkeit von der Knochenregion untersucht. Dabei wurde mittels quantitativer Rückstreuелеktronenmikroskopie trabekulärer und kortikaler Knochen aus humanen Beckenkämmen und Radii post mortem analysiert.

Die Lokalisation allein hatte auf die durchschnittliche und häufigste Mineralisierung (*Ca-Mean* und *Ca-Peak*), sowie auf die Mineralisierungsverteilung (*Ca-Width*) einen signifikanten Einfluss. Dabei zeigte sich innerhalb der Beckenkämme die Spongiosa höher und heterogener mineralisiert als die Kortikalis. Innerhalb der Radii bestätigten sich diese Unterschiede nicht. Im Vergleich von Beckenkämmen und Radii zeigte sich in der Spongiosa ein homogenes Mineralisierungsverhalten. In der Kortikalis hingegen waren in den Radii die Ergebnisse für durchschnittliche und häufigste Mineralisierung (*Ca-Mean* und *Ca-Peak*) signifikant höher als in den Beckenkämmen. Bezüglich einer Bisphosphonattherapie konnte gezeigt werden, dass die gefundenen Unterschiede in der Mineralisierungsverteilung (*Ca-Width*) signifikant von einer Bisphosphonatgabe beeinflusst wurden. Hierbei wies die Bisphosphonatgruppe mit Ausnahme der Spongiosa der Radii durchweg niedrigere Werte auf, der Knochen war also homogener mineralisiert. Die Spongiosa der Radii zeigte ein gegenteiliges Verhalten, mit höherer Heterogenität der Mineralisierung in der Bisphosphonatgruppe.

Die hier vorgelegten Ergebnisse weisen auf signifikante Unterschiede in der Mineralisierungsverteilung verschiedener Körper- und Knochenregionen bei postmenopausaler Osteoporose hin. Auch die Wirkung von Bisphosphonaten scheint in unterschiedlichen Regionen zu variieren. Ursächlich hierfür könnten u.a. lokalisationspezifische Unterschiede in der Knochenperfusion, den mechanischen Krafteinflüssen und entsprechende Adaptationsmechanismen an diese sein. Um eine möglicherweise unterschiedliche Wirkung von Bisphosphonaten an verschiedenen frakturrelevanten Lokalisationen besser zu verstehen und ggf. im klinischen Alltag gezielt einzusetzen, sollte sich hier vertiefende Forschung anhand größerer Kollektive anschließen.

Summary and Outlook

This study tested the influence of bisphosphonates on the bone mineralization density distribution (BMDD) in osteoporotic bone as well as the parameters' dependence on different bone and body regions. Post mortem biopsies of human cortical and cancellous bone were taken from the iliac crest and distal radius and analysed by quantitative backscattered electron imaging (qBEI).

It was verified that the average and peak calcium content (Ca-mean and Ca-peak) as well as the calcium distribution (Ca-width) differed significantly among locations. More concisely, the iliac crest biopsies exhibited a more heterogeneous and higher degree of mineralization in trabecular than cortical bone whereas these differences could not be confirmed within the biopsies from the radii. A direct comparison of the trabecular bone from iliac crests and radii showed homogeneous mineralization patterns across those two body regions. On the contrary, cortical bone from the radii yielded significantly higher results for the average and peak mineralization (Ca-mean and Ca-peak) than iliac crest.

Moreover, the differences in Ca-width among the locations were significantly influenced by a bisphosphonate therapy. In the bisphosphonate group lower values for Ca-width and thus a more homogeneous mineralization distribution were observed in the entire iliac crest and the cortical distal radius. In contrast to that the trabecular distal radius showed a more heterogeneous mineralization distribution in the bisphosphonate group than in the control group.

These results reveal significant differences in the BMDD of different bone regions in postmenopausal osteoporosis. Similarly, the effect of bisphosphonates appears to vary in different sites. A literature survey suggests possible reasons to reside in site specific differences in perfusion, loading patterns and adaptation mechanisms. These findings should be followed up by studies on larger cohorts to obtain deeper insight into the possibly differing effects of bisphosphonates among different bone regions. This could lead to a better understanding of the differences in the fracture preventing effect at various skeletal sites and its subsequent beneficial exploitation in daily clinical care.

Abkürzungsverzeichnis

ALN	Alendronat
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BioAsset	Biomechanically founded individualized Osteoporosis Assessment and Treatment
BMD	Bone Mineral Density
BMDD	Bone Mineral Density Distribution
BMI	Body Mass Index
BMU	Bone Multicellular Unit
BP	Bisphosphonat
BPO	Benzoylperoxid
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
BSP	Bone Sialoprotein
BWS	Brustwirbelsäule
CRP	C-reaktives Protein
DVO	Dachverband der deutschsprachigen, wissenschaftlichen, osteologischen Gesellschaften
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
FPP-Synthase	Farnesylpyrophosphatsynthase
FWHM	Full Width at Half Maximum
GGPP-Synthase	Geranylgeranyldiphosphatsynthase
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hydroxylapatit

HR-pQCT	High Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography
LWK	Lendenwirbelkörper
LWS	Lendenwirbelsäule
Micro-CT	Micro Computed Tomography
MMA	Methylmethacrylat
PMO	Postmenopausale Osteoporose
qBEI	Quantitative Backscattered Electron Imaging
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B-Ligand
TBS	Trabecular Bone Score
TSH	Thyreidea-stimulierendes Hormon
WHO	World Health Organization
WK	Wirbelkörper
Gew.-%	Gewichtsprozent

Literaturverzeichnis

- Aarden, E.M., Burger, E.H. & Nijweide, P.J., 1994. Function of Osteocytes in Bone. *Journal of Cellular Biochemistry*, 55, S.287–299.
- Abrahamsen, B., Stilgren, L.S., Hermann, A.P., Tofteng, C.L., Ba, O., Vestergaard, P., Brot, C. & Nielsen, S.P., 2001. Discordance Between Changes in Bone Mineral Density Measured at Different Skeletal Sites in Perimenopausal Women — Implications for Assessment of Bone Loss and Response to Therapy: The Danish Osteoporosis Prevention Study. *Journal of bone and mineral research*, 16(7), S.1212–1219.
- Adami, S., Gatti, D., Braga, V., Bianchini, D. & Rossini, M., 1999. Site-Specific Effects of Strength Training on Bone Structure and Geometry of Ultradistal Radius in Postmenopausal Women. *Journal of bone and mineral research*, 14(1), S.120–124.
- Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 2003. Handlungsleitlinie Osteoporose. *Empfehlungen zur Prävention und Therapie der Osteoporose, Arzneiverordnung in der Praxis, Sonderheft*, S.1–4.
- Ashizawa, N., Nonaka, K., Michikami, S., Mizuki, T., Amagai, H., Tokuyama, K. & Suzuki, M., 1999. Tomographical description of tennis-loaded radius: reciprocal relation between bone size and volumetric BMD. *Journal of applied physiology*, 86(4), S.1347–1351.
- Bala, Y., Farlay, D., Chapurlat, R.D. & Boivin, G., 2011. Modifications of bone material properties in postmenopausal osteoporotic women long-term treated with alendronate. *European journal of endocrinology*, 165(4), S.647–655.
- Bartl, R., 2004. Osteoporose Prävention - Diagnostik - Therapie R. Bartl, hrsg. , S.24 f.
- Bauer, D.C., Black, D.M. & Garnero, P., 2004. Fracture Intervention Trial Study Group. Change in bone turnover and hip, non-spine, and vertebral fracture in alendronate-treated women: the fracture intervention trial. *Journal of bone and mineral research*, 19, S.1250–1258.
- van Beek, E., Pieterman, E., Cohen, L., Löwik, C. & Papapoulos, S., 1999. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit isopentenyl pyrophosphate isomerase/farnesyl pyrophosphate synthase activity with relative potencies corresponding to their antiresorptive potencies in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, 255(2), S.491–494.

- Bergmann, P., Body, J.-J., Boonen, S., Boutsen, Y., Devogelaer, J.-P., Goemaere, S., Kaufman, J.-M., Reginster, J.-Y. & Gangji, V., 2009. Evidence-based guidelines for the use of biochemical markers of bone turnover in the selection and monitoring of bisphosphonate treatment in osteoporosis: a consensus document of the Belgian Bone Club. *International journal of clinical practice*, 63(1), S.19–26.
- Black, D.M., Thompson, D.E., Bauer, D.C., Ensrud, K., Musliner, T., Hochberg, M.C., Nevitt, M.C., Suryawanshi, S. & Cummings, S.R., 2000. Fracture Risk Reduction with Alendronate in Women with Osteoporosis: The Fracture Intervention Trial. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(11), S.4118–4124.
- Bleibler, F., Konnopka, A., Benzinger, P., Rapp, K. & König, H.-H., 2013. The health burden and costs of incident fractures attributable to osteoporosis from 2010 to 2050 in Germany—a demographic simulation model. *Osteoporosis international*, 24(3), S.835–847.
- Bock, O., Börst, H., Beller, G., Armbrecht, G., Degner, C., Martus, P., Roth, H.-J. & Felsenberg, D., 2012. Impact of oral ibandronate 150 mg once monthly on bone structure and density in post-menopausal osteoporosis or osteopenia derived from in vivo μ CT. *Bone*, 50(1), S.317–324.
- Body, J.J., Bergmann, P., Boonen, S., Boutsen, Y., Bruyere, O., Devogelaer, J.P., Goemaere, S., Hollevoet, N., Kaufman, J.M., Milisen, K., Rozenberg, S. & Reginster, J.Y., 2011. Non-pharmacological management of osteoporosis: A consensus of the Belgian Bone Club. *Osteoporosis International*, 22, S.2769–2788.
- Bone, H.G., Hosking, D., Devogelaer, J.-P., Tucci, J.R., Emkey, R.D., Tonino, R.P., Rodriguez-Portales, J.A., Downs, R.W., Gupta, J., Santora, A.C. & Liberman, U., 2004. Ten Years' Experience with Alendronate for Osteoporosis in Postmenopausal Women. *New England Journal of Medicine*, S.1189–1199.
- Bonewald, L.F., 2006. Osteocytes as multifunctional cells. *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions*, 6(4), S.331–333.
- Borah, B., Dufresne, T., Nurre, J., Phipps, R., Chmielewski, P., Wagner, L., Lundy, M., Bouxsein, M., Zebaze, R. & Seeman, E., 2010. Risedronate Reduces Intracortical Porosity in Women With Osteoporosis. *Journal of bone and mineral research*, 25(1), S.41–47.
- Borah, B., Dufresne, T.E., Ritman, E.L., Jorgensen, S.M., Liu, S., Chmielewski, P.A., Phipps, R.J., Zhou, X., Sibonga, J.D. & Turner, R.T., 2006. Long-term risedronate treatment normalizes mineralization and continues to preserve trabecular architecture: sequential triple biopsy studies with micro-computed tomography. *Bone*, 39(2), S.345–352.

- Bouvard, B., Mabileau, G., Legrand, E., Audran, M. & Chappard, D., 2012. Micro and macroarchitectural changes at the tibia after botulinum toxin injection in the growing rat. *Bone*, 50(4), S.858–864.
- Boyd, S.K., 2008. Site-Specific Variation of Bone Micro-Architecture in the Distal Radius and Tibia. *Journal of Clinical Densitometry*, 11(3), S.424–430.
- Boyde, A., Compston, J.E., Reeve, J., Bell, K.L., Noble, B.S., Jones, S.J. & Loveridge, N., 1998. Effect of Estrogen Suppression on the Mineralization Density of Iliac Crest Biopsies in Young Women as Assessed by Backscattered Electron Imaging. *Bone*, 22(3), S.241–250.
- Boyde, A., Travers, R., Glorieux, F.H. & Jones, S.J., 1999. The mineralization density of iliac crest bone from children with osteogenesis imperfecta. *Calcified tissue international*, 64(3), S.185–190.
- Briggs, A.M., Greig, A.M., Wark, J.D., Fazzalari, N.L. & Bennell, K.L., 2004. A review of anatomical and mechanical factors affecting vertebral body integrity. *International journal of medical sciences*, 1, S.170–180.
- Britz, H.M., Jokihaara, J., Leppänen, O. V, Järvinen, T.L.N. & Cooper, D.M.L., 2012. The effects of immobilization on vascular canal orientation in rat cortical bone. *Journal of anatomy*, 220(1), S.67–76.
- Burghardt, A.J., Kazakia, G.J., Sode, M., de Papp, A.E., Link, T.M. & Majumdar, S., 2010. A longitudinal HR-pQCT study of alendronate treatment in postmenopausal women with low bone density: Relations among density, cortical and trabecular microarchitecture, biomechanics, and bone turnover. *Journal of bone and mineral research*, 25(12), S.2558–2571.
- Busse, B., Hahn, M., Soltau, M., Zustin, J., Püschel, K., Duda, G.N. & Amling, M., 2009. Increased calcium content and inhomogeneity of mineralization render bone toughness in osteoporosis: mineralization, morphology and biomechanics of human single trabeculae. *Bone*, 45(6), S.1034–1043.
- Camilleri, S. & McDonald, F., 2006. Runx2 and dental development. *European Journal of Oral Sciences*, (4), S.361–373.
- Celso, C. Lo, Fleming, H.E., Wu, J.W., Zhao, C.X., Miake-, S., Fujisaki, J., Côté, D., Rowe, D.W., Lin, C.P. & Scadden, D., 2009. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature*, 457(7225), S.1–13.
- Dachverband der deutschsprachigen, wissenschaftlichen, osteologischen G. (DVO), 2014. Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und postmenopausalen Frauen, S3-Leitlinie. , S.8.
- Donnelly, E., Meredith, D.S., Nguyen, J.T. & Boskey, A.L., 2012. Bone tissue composition varies across anatomic sites in the proximal femur and the iliac crest. *Journal of orthopaedic research*, 30(5), S.700–706.

- Egerton, R.F., 2005. *Physical Principles of Electron Microscopy* 1. Auflage. R. F. Egerton, hrsg., New York: Springer Science & Business Media.
- Eventov, I., Frisch, B., Cohen, Z. & Hammel, I., 1991. Osteopenia, Hematopoiesis and Bone Remodelling in Iliac Crest and Femoral Biopsies: A Prospective Study of 102 Cases of Femoral Neck Fractures. *Bone*, 12(1), S.1–6.
- Feng, X. & McDonald, J.M., 2011. Disorders of bone remodeling. *Annual review of pathology*, 6, S.121–145.
- Fink, E., Cormier, C., Steinmetz, P., Kindermans, C., Le Bouc, Y. & Souberbielle, J.C., 2000. Differences in the capacity of several biochemical bone markers to assess high bone turnover in early menopause and response to alendronate therapy. *Osteoporosis international*, 11(4), S.295–303.
- Fleisch, H., 1993. New bisphosphonates in osteoporosis. *Osteoporosis International*, 2, S.515–522.
- Fratzl-Zelman, N., Roschger, P., Gourrier, A., Weber, M., Misof, B.M., Loveridge, N., Reeve, J., Klaushofer, K. & Fratzl, P., 2009. Combination of nanoindentation and quantitative backscattered electron imaging revealed altered bone material properties associated with femoral neck fragility. *Calcified tissue international*, 85(4), S.335–343.
- Gatti, D. & Adami, S., 1999. New bisphosphonates in the treatment of bone diseases. *Drugs Aging*, 15, S.285–296.
- Graumann, W. & Sasse, D., 2004. *Compact Lehrbuch Anatomie* W. Graumann & D. Sasse, hrsg., Stuttgart: Schattauer Verlag.
- Haapasalo, H., Kontulainen, S., Sievaenen, H., Kannus, P., Jaervinen, M. & Vuori, I., 2000. Exercise-induced bone gain is due to enlargement in bone size without a change in volumetric bone density: A peripheral quantitative computed tomography study of the upper arms of male tennis players. *Bone*, 27(3), S.351–357.
- Harris, S., Gertz, B., Genant, H., Eyre, D., Survill, T., Ventura, J., DeBrock, J., Riccerca, E. & Chesnut, C., 2013. The effect of short term treatment with alendronate on vertebral density and biochemical markers of bone remodeling in early postmenopausal women. *The Journal of clinical Endocrinology and Metabolism*, 76(6), S.1399–1406.
- Hauge, E.M., Qvesel, D., Eriksen, E.F., Mosekilde, L. & Melsen, F., 2001. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *Journal of bone and mineral research*, 16, S.1575–1582.
- Heinonen, A., Sievänen, H., Kannus, P., Oja, P. & Vuori, I., 2002. Site-specific skeletal response to long-term weight training seems to be attributable to principal loading modality: A pQCT study of female weightlifters. *Calcified Tissue International*, 70(6), S.469–474.

- Hu, J.H., Ding, M., Søballe, K., Bechtold, J.E., Danielsen, C.C., Day, J.S. & Hvid, I., 2002. Effects of short-term alendronate treatment on the three-dimensional microstructural, physical, and mechanical properties of dog trabecular bone. *Bone*, 31(5), S.591–597.
- Im, G.-I., Qureshi, S.A., Kenney, J., Rubash, H.E. & Shanbhag, A.S., 2004. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials*, 25(18), S.4105–4015.
- Iqbal, M.M., 2000. Osteoporosis: epidemiology, diagnosis and treatment. *Southern medical journal*, 93(1), S.2–18.
- Johnell, O. & Kanis, J.A., 2006. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporosis International*, S.1726–1733.
- Johnell, O., Kanis, J.A., Oden, A., Johansson, H., De Laet, C., Delmas, P., Eisman, J.A., Fujiwara, S., Kroger, H., Mellstrom, D., Meunier, P.J., Melton, L.J., O'Neill, T., Pols, H., Reeve, J., Silman, A. & Tenenhouse, A., 2005. Predictive value of BMD for hip and other fractures. *Journal of bone and mineral research*, 20, S.1185–1194.
- Kahn, A.J., Fallon, M.D. & Teitelbaum, S.L., 1984. Structure-function relationships in bone: an examination of events at the cellular level. *Journal of bone and mineral research*, 2, S.125–174.
- Keller, J.H., 2010. *Die Rolle von Calcitonin und seines Rezeptors im Knochenstoffwechsel - Untersuchungen an gentechnisch modifizierten Mausmodellen. Medizinische Dissertation.* Universität Hamburg.
- Khosla, S., 2001. Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, 142(12), S.5050–5055.
- von Knoch, F., Jaquiere, C., Kowalsky, M., Schaeren, S., Alabre, C., Martin, I., Rubash, H.E. & Shanbhag, A.S., 2005. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 26(34), S.6941–6949.
- Koehne, T., 2012. *Untersuchung der Zahnentwicklung bei Mausmodellen der Osteopetrose, Osteopetrorachitis und hypophosphatämischen Rachitis. Zahnmedizinische Dissertation.* Universität Hamburg.
- Koehne, T., Vettorazzi, E., Küsters, N., Lüneburg, R., Kahl-Nieke, B., Püschel, K., Amling, M. & Busse, B., 2014. Trends in trabecular architecture and bone mineral density distribution in 152 individuals aged 30-90 years. *Bone*, 66, S.31–38.
- Komori, T., 2014. Mouse Models for the Evaluation of Osteocyte Functions. *Journal of bone metabolism*, 21, S.55–60.

- Krause, M., Soltau, M., Zimmermann, E.A., Hahn, M., Kornet, J., Hapfelmeier, A., Breer, S., Morlock, M., Wulff, B., Püschel, K., Glueer, C.C., Amling, M. & Busse, B., 2014. Effects of long-term alendronate treatment on bone mineralisation, resorption parameters and biomechanics of single human vertebral trabeculae. *European cells & materials*, 28, S.152–165.
- Lin, J.H., 1996. Bisphosphonates: A Review of Their Pharmacokinetic Properties. *Bone*, 3282(2), S.75–85.
- Looker, A.C., Bauer, D.C., Chesnut III, C.H., Gundberg, C.M., Hochberg, M.C., Klee, G., Kleerekoper, M., Watts, N.B. & Bell, N.H., 2000. Clinical Use of Biochemical Markers of Bone Remodeling: Current Status and Future Directions. *Osteoporosis International*, 11(1), S.467–480.
- Lüllmann-Rauch, 2009. *Taschenlehrbuch Histologie* 3. Auflage., Stuttgart: Thieme Verlag.
- McNamara, L.M., Ederveen, a G.H., Lyons, C.G., Price, C., Schaffler, M.B., Weinans, H. & Prendergast, P.J., 2006. Strength of cancellous bone trabecular tissue from normal, ovariectomized and drug-treated rats over the course of ageing. *Bone*, 39(2), S.392–400.
- McParland, B.J., 2010. *Nuclear Medicine Radiation Dosimetry* 1. Auflage., London: Springer Science & Business Media.
- Melton, L.J., Atkinson, E.J., O'Connor, M.K., O'Fallon, W.M. & Riggs, B.L., 1998. Bone density and fracture risk in men. *Journal of bone and mineral research*, 13(12), S.1915–1923.
- Milovanovic, P., Adamu, U., Simon, M.J.K., Rolvien, T., Djuric, M., Amling, M. & Busse, B., 2015. Age-and Sex-Specific Bone Structure Patterns Portend Bone Fragility in Radii and Tibiae in Relation to Osteodensitometry: A High-Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography Study in 385 Individuals. *The journals of gerontology*, 70(10), S.1269–1275.
- Milovanovic, P., Zimmermann, E.A., Riedel, C., vom Scheidt, A., Herzog, L., Krause, M., Djonic, D., Djuric, M., Püschel, K., Amling, M. & Ritchie, R.O., 2015. Multi-level characterization of human femoral cortices and their underlying osteocyte network reveal trends in quality of young, aged, osteoporotic and antiresorptive-treated bone. *Biomaterials*, 45, S.46–55.
- Misof, B.M., Dempster, D.W., Zhou, H., Roschger, P., Fratzi-Zelman, N., Fratzi, P., Silverberg, S.J., Shane, E., Cohen, A., Stein, E., Nickolas, T.L., Recker, R.R., Lappe, J., Bilezikian, J.P. & Klaushofer, K., 2014. Relationship of bone mineralization density distribution (BMDD) in cortical and cancellous bone within the iliac crest of healthy premenopausal women. *Calcified tissue international*, 95(4), S.332–339.

- Misof, B.M., Gamsjaeger, S., Cohen, A., Hofstetter, B., Roschger, P., Stein, E., Nickolas, T.L., Rogers, H.F., Dempster, D., Zhou, H., Recker, R., Lappe, J., McMahon, D., Paschalis, E.P., Fratzl, P., Shane, E. & Klaushofer, K., 2012. Bone material properties in premenopausal women with idiopathic osteoporosis. *Journal of bone and mineral research*, 27(12), S.2551–2561.
- Moll, K.-J. & Moll, M., 2005. *Anatomie: Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog* 18. Auflag., Berlin/München: Elsevier, Urban und Fischer.
- Ott, S.M., 2011. What is the optimal duration of bisphosphonate therapy? *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 78(9), S.619–630.
- Parfitt, A.M., 1988. Bone remodeling: relationship to the amount and structure of bone, and the pathogenesis and prevention of fractures. In B. L. Riggs & L. J. Melton, hrsg. *Osteoporosis Etiology, Diagnosis and Management*. New York: Raven Press, S. 45–93.
- Pols, H.A., Felsenberg, D., Hanley, D.A., Stepán, J., Muñoz-Torres, M., Wilkin, T.J., Qin-Sheng, G., Galich, A.M., Vandormael, K., Yates, A.J. & Stych, B., 1999. Multinational, placebo-controlled, randomized trial of the effects of alendronate on bone density and fracture risk in postmenopausal women with low bone mass: results of the FOSIT study. FOSAMaX International Trial Study Group. *Osteoporosis International*, 9(5), S.461–468.
- Ravn, P., Hosking, D., Thompson, D., Cizza, G. & Wasnich, R.D., 1999. Monitoring of Alendronate Treatment and Prediction of Effect on Bone Mass by Biochemical Markers in the Early Postmenopausal Intervention Cohort Study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 84(7), S.2363–2368.
- Reginster, J.Y., 1999. Treatment of osteoporosis: where are we and where are we going to. *Morphologie*, 83(261), S.41–45.
- Rogers, M.J., 1999. New Data on the Mechanism of Action of Bisphosphonates. *Cell Biology*, 96, S.133–138.
- Rogers, M.J., Gordon, S., Benford, H.L., Coxon, F.P., Luckman, S.P., Monkkonen, J. & Frith, J.C., 2000. Cellular and Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates. *Cancer*, 88(12), S.2961–2978.
- Roschger, P., Fratzl, P., Eschberger, J. & Klaushofer, K., 1998. Validation of quantitative backscattered electron imaging for the measurement of mineral density distribution in human bone biopsies. *Bone*, 23(4), S.319–326.
- Roschger, P., Gupta, H.S., Berzlanovich, A., Ittner, G., Dempster, D.W., Fratzl, P., Cosman, F., Parisien, M., Lindsay, R., Nieves, J.W. & Klaushofer, K., 2003. Constant mineralization density distribution in cancellous human bone. *Bone*, 32(3), S.316–323.

- Roschger, P., Lombardi, A., Misof, B.M., Maier, G., Fratzl-Zelman, N., Fratzl, P. & Klaushofer, K., 2010. Mineralization Density Distribution of Postmenopausal Osteoporotic Bone Is Restored to Normal After Long-Term Alendronate Treatment: qBEI and sSAXS Data From The Fracture Intervention Trial Long-Term Extension (FLEX). *Journal of bone and mineral research*, 25(1), S.48–55.
- Roschger, P., Paschalis, E.P., Fratzl, P. & Klaushofer, K., 2008. Bone mineralization density distribution in health and disease. *Bone*, 42(3), S.456–466.
- Roschger, P., Plenk, H., Klaushofer, K. & Eschberger, J., 1995. A new scanning electron microscopy approach to the quantification of bone mineral distribution: backscattered electron image grey-levels correlated to calcium K alpha-line intensities. *Scanning microscopy*, 9(1), S.75–86; discussion 86–8.
- Roschger, P., Rinnerthaler, S., Yates, J., Rodan, G.A., Fratzl, P. & Klaushofer, K., 2001. Alendronate increases degree and uniformity of mineralization in cancellous bone and decreases the porosity in cortical bone of osteoporotic women. *Bone*, 29(2), S.185–191.
- Ruffoni, D., Fratzl, P., Roschger, P., Klaushofer, K. & Weinkamer, R., 2007. The bone mineralization density distribution as a fingerprint of the mineralization process. *Bone*, 40, S.1308–1319.
- Ruffoni, D., Fratzl, P., Roschger, P., Phipps, R., Klaushofer, K. & Weinkamer, R., 2008. Effect of Temporal Changes in Bone Turnover on the Bone Mineralization Density Distribution: A Computer Simulation Study. *Journal of bone and mineral research*, 23(12), S.1905–1914.
- Russell, R.G.G., 2011. Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone*, 49, S.2–19.
- Russell, R.G.G., Watts, N.B., Ebtino, F.H. & Rogers, M.J., 2008. Mechanisms of action of bisphosphonates : similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporosis international*, 19, S.733–759.
- Russell, R.G.G., Xia, Z., Dunford, J.E., Oppermann, U., Kwaasi, A., Hulley, P.A., Kavanagh, K.L., Triffitt, J.T., Lundy, M.W., Phipps, R.J., Barnett, B.L., Coxon, F.P., Rogers, M.J., Watts, N.B. & Ebtino, F.H., 2007. Bisphosphonates: An update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1117, S.209–257.
- Safadi, F.F., Barbe, M.F., Abdelmagid, S.M., Ricoh, M.C., Aswad, R.A., Litvin, J. & Popoff, S.N., 2009. *Bone Pathology 2*. Auflage. J. Khurana, hrsg., New York: Humana Press.
- Schnitzler, C.M., Biddulph, S.L., Mesquita, J.M. & Gear, K.A., 1996. Bone Structure and Turnover in the Distal Radius and Iliac Crest: A Histomorphometric Study. *Journal of bone and mineral research*, 11(11), S.1761–1768.

- Silva, B.C., Leslie, W.D., Resch, H., Lamy, O., Lesnyak, O., Binkley, N., McCloskey, E. V., Kanis, J.A. & Bilezikian, J.P., 2014. Trabecular bone score: a noninvasive analytical method based upon the DXA image. *Journal of bone and mineral research*, 29(3), S.518–530.
- Siris, E.S., Chen, Y., Abbott, T.A., Barrett-Connor, E., Miller, P.D., Wehren, L.E. & Berger, M.L., 2004. Bone Mineral Density Thresholds for Pharmacological Intervention to Prevent Fractures. *Archives of internal medicine*, 164, S.1108–1112.
- Skedros, J., Bloebaum, R., Bachus, K., Boyce, T. & Constantz, B., 1993. Influence of mineral content and composition on graylevels in backscattered electron images of bone. *Journal of biomedical materials research*, 27(1), S.57–64.
- Skedros, J.G., Mason, M.W. & Bloebaum, R.D., 1994. Differences in osteonal micromorphology between tensile and compressive cortices of a bending skeletal system: indications of potential strain-specific differences in bone microstructure. *The Anatomical Record*, 239(4), S.405–413.
- Smith, S.Y., Recker, R.R., Hannan, M., Müller, R. & Bauss, F., 2003. Intermittent intravenous administration of the bisphosphonate ibandronate prevents bone loss and maintains bone strength and quality in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Bone*, 32, S.45–55.
- Tamminen, I.S., Misof, B.M., Roschger, P., Mäyränpää, M.K., Turunen, M.J., Isaksson, H., Kröger, H., Mäkitie, O. & Klaushofer, K., 2014. Increased heterogeneity of bone matrix mineralization in pediatric patients prone to fractures: a biopsy study. *Journal of bone and mineral research*, 29(5), S.1110–1117.
- Turek, J., Ebetino, F.H., Lundy, M.W., Sun, S., Kashemirov, B.A., McKenna, C.E., Gallant, M.A., Plotkin, L.I., Bellido, T., Duan, X., Triffitt, J.T., Russell, R.G.G., Burr, D.B. & Allen, M.R., 2012. Bisphosphonate binding affinity affects drug distribution in both intracortical and trabecular bone of rabbits. *Calcified tissue international*, 90(3), S.202–210.
- Turunen, M.J., Prantner, V., Jurvelin, J.S., Kröger, H. & Isaksson, H., 2013. Composition and microarchitecture of human trabecular bone change with age and differ between anatomical locations. *Bone*, 54(1), S.118–125.
- Welsch, U., 2005. *Atlas Histologie 7. Auflage.*, Berlin/München: Elsevier, Urban und Fischer.
- Welsch, U. & Sobotta, J., 2010. *Lehrbuch Histologie 3. Auflage.*, München/Jena: Elsevier, Urban und Fischer.
- Wheater, G., Elshahaly, M., Tuck, S.P., Datta, H.K. & van Laar, J.M., 2013. The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. *Journal of translational medicine*, 11(1), S.201.

World Health Organization, 2004. *WHO Scientific Group on the Assessment of Osteoporosis at Primary Health Care Level*, Brussels: World Health Organization.

Zoehrer, R., Roschger, P., Paschalis, E.P., Hofstaetter, J.G., Durchschlag, E., Fratzl, P., Phipps, R. & Klaushofer, K., 2006. Effects of 3- and 5-year treatment with risedronate on bone mineralization density distribution in triple biopsies of the iliac crest in postmenopausal women. *Journal of bone and mineral research*, 21(7), S.1106–1112.

Publikationsverzeichnis

Milovanovic, P., Zimmermann, E.A., Riedel, C., vom Scheidt, A., Herzog, L., Krause, M., Djonic, D., Djuric, M., Püschel, K., Amling, M. & Ritchie, R.O., 2015. Multi-level characterization of human femoral cortices and their underlying osteocyte network reveal trends in quality of young, aged, osteoporotic and antiresorptive-treated bone. *Biomaterials*, 45, S.46–55.

Anhang

Tabelle 10: Ca-Mean - Geschätzte Randmittel der vier Lokalisationen, adjustiert für die Gruppenzugehörigkeit, mit Standardfehler und 95%-Konfidenzintervall

Lokalisation	Mittelwert	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Beckenkamm Kortikalis	22,692	0,154	22,377	23,006
Beckenkamm Spongiosa	23,944	0,158	23,621	24,266
Radius Kortikalis	24,140	0,222	23,687	24,593
Radius Spongiosa	24,539	0,239	24,051	25,027

Tabelle 11: Ca-Peak - Geschätzte Randmittel der vier Lokalisationen, adjustiert für die Gruppenzugehörigkeit, mit Standardfehler und 95%-Konfidenzintervall

Lokalisation	Mittelwert	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Beckenkamm Kortikalis	23,199	0,148	22,896	23,503
Beckenkamm Spongiosa	24,489	0,157	24,169	24,809
Radius Kortikalis	24,864	0,218	24,419	25,309
Radius Spongiosa	25,165	0,231	24,692	25,637

Tabelle 12: Ca-Width - Geschätzte Randmittel der vier Lokalisationen, adjustiert für die Gruppenzugehörigkeit, mit Standardfehler und 95%-Konfidenzintervall

Lokalisation	Mittelwert	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Beckenkamm Kortikalis	2,678	0,029	2,617	2,738
Beckenkamm Spongiosa	2,938	0,038	2,861	3,015
Radius Kortikalis	2,816	0,060	2,694	2,938
Radius Spongiosa	2,986	0,045	2,894	3,077

Tabelle 13: Ca-Low - Geschätzte Randmittel der vier Lokalisationen, adjustiert für die Gruppenzugehörigkeit, mit Standardfehler und 95%-Konfidenzintervall

Lokalisation	Mittelwert	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Beckenkamm Kortikalis	4,510	0,379	3,735	5,284
Beckenkamm Spongiosa	4,510	0,296	3,904	5,116
Radius Kortikalis	4,588	0,826	2,899	6,277
Radius Spongiosa	5,466	0,503	4,437	6,495

Tabelle 14: *Ca-High* - Geschätzte Randmittel der vier Lokalisationen, adjustiert für die Gruppenzugehörigkeit, mit Standardfehler und 95%-Konfidenzintervall

	Mittelwert	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Beckenkamm Kortikalis	4,811	0,655	3,472	6,151
Beckenkamm Spongiosa	5,233	0,732	3,735	6,731
Radius Kortikalis	4,742	0,929	2,843	6,642
Radius Spongiosa	4,189	1,065	2,012	6,367

Tabelle 15: Geschätzte Randmittel der Osteoporosegruppe, adjustiert für die Lokalisation, mit Standardfehler und 95%-Konfidenzintervall

	Mittelwert	Standard- fehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
<i>Ca-Mean</i>	23,756	0,153	23,443	24,068
<i>Ca-Peak</i>	24,346	0,141	24,058	24,634
<i>Ca-Width</i>	2,861	0,031	2,798	2,924
<i>Ca-Low</i>	5,062	0,421	4,201	5,923
<i>Ca-High</i>	4,788	0,630	3,499	6,077

Tabelle 16: Geschätzte Randmittel der Bisphosphonatgruppe, adjustiert für Lokalisation, mit Standardfehler und 95%-Konfidenzintervall

	Mittelwert	Standard- fehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
<i>Ca-Mean</i>	23,901	0,206	23,480	24,323
<i>Ca-Peak</i>	24,513	0,190	24,124	24,901
<i>Ca-Width</i>	2,848	0,042	2,762	2,933
<i>Ca-Low</i>	4,475	0,568	3,314	5,636
<i>Ca-High</i>	4,700	0,850	2,962	6,438

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Amling danken, für die Möglichkeit, am Institut für Osteologie und Biomechanik dieses interessante Promotionsthema zu bearbeiten. Dadurch gab er mir die Möglichkeit, in ausgesprochen freundlicher Atmosphäre und unter guten Bedingungen wissenschaftlich arbeiten zu können.

Auch meinen beiden Betreuern, Herrn Dr. rer. medic. Björn Busse und Herrn Dr. med. Matthias Krause möchte ich dafür danken, dass sie immer unkompliziert ansprechbar waren und mir alle meine Fragen geduldig beantworteten.

Herrn Ph.D. Petar Milovanovic möchte ich sehr herzlich danken, der mir stets mit Rat bei der statistischen Auswertung zur Seite stand.

Die MitarbeiterInnen des Instituts für Osteologie und Biomechanik standen mir immer unkompliziert und mit großer Hilfsbereitschaft zur Seite. Insbesondere Anika vom Scheidt, Dr.-Ing. Michael Hahn und Prof. Dr. Thorsten Schinke bin ich überaus dankbar für all ihre Unterstützung.

Zuletzt möchte ich meinem Freund Christian Hoffmann für seine konstruktive und liebevolle Unterstützung danken.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Lübeck, 30.6.2016 Lydia Felicitas Herzog