

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Osteologie und Biomechanik

Direktor: Professor Dr. med. Michael Amling

## **„Analyse von Mikrofrakturen in der Substantia compacta des proximalen Femurs nach Langzeit-Bisphosphonattherapie“**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Benjamin Brunswig  
aus Hamburg

Hamburg 2019

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.08.2019**

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

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Matthias Krause**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Torsten Schinke**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Aufgaben und Entstehung von Knochen</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Makroskopischer Aufbau</b> .....	<b>3</b>
1.2.1 Substantia compacta .....	4
1.2.2 Substantia spongiosa .....	5
<b>1.3 Histologischer Aufbau</b> .....	<b>6</b>
1.3.1 Knochenzellen .....	8
<b>1.4 Remodeling</b> .....	<b>13</b>
<b>1.5 Aufbau des Femurs</b> .....	<b>15</b>
<b>1.6 Biomechanische Beanspruchung des Femurs</b> .....	<b>16</b>
<b>1.7 Osteoporose</b> .....	<b>18</b>
1.7.1 Ursachen .....	20
1.7.2 Klinik und Diagnostik .....	21
1.7.3 Therapie .....	23
<b>1.8 Bisphosphonate</b> .....	<b>25</b>
1.8.1 Wirkungsmechanismus .....	26
1.8.2 Nebenwirkungen.....	29
<b>1.9 Atypische Femurfraktur</b> .....	<b>32</b>
1.9.1 Risiko und Entstehungshypothesen .....	34
<b>1.10 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>36</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>37</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>37</b>
2.1.1 Gewinnung der Probe.....	37

2.1.2 Färbung .....	38
2.1.3 Makroskopische Aufarbeitung .....	40
2.1.4 Histologische Aufarbeitung .....	41
<b>2.2 Methode .....</b>	<b>42</b>
2.2.1 Identifizierung von Microcracks .....	43
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>50</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>57</b>
<b>6. Abstract .....</b>	<b>58</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>59</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>61</b>
<b>9. Danksagung .....</b>	<b>79</b>
<b>10. Lebenslauf.....</b>	<b>80</b>
<b>11. Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>82</b>

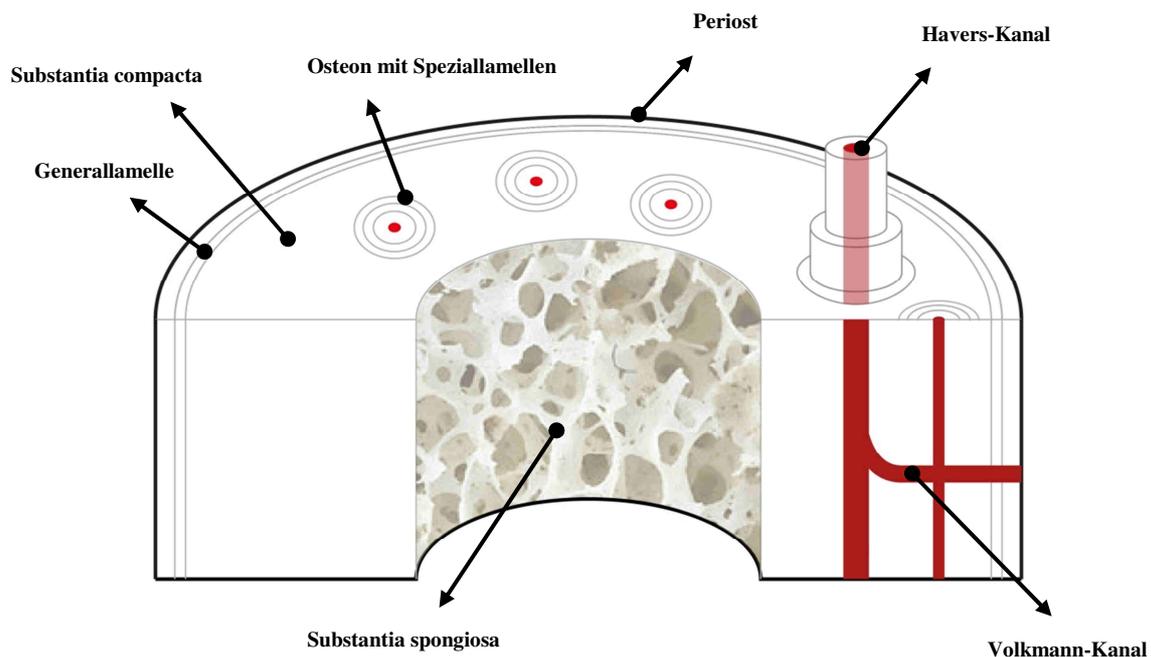
# 1. Einleitung

## 1.1 Aufgaben und Entstehung von Knochen

Der Knochen hat eine Reihe von Aufgaben, die sich je nach Form, Aufbau und Lage im Körper unterschiedlich verteilen. Er kann eine schützende Funktion besitzen, wie zum Beispiel der Schädel zum Schutz des Gehirns oder die Rippen, die das Herz und die Lungen vor äußeren Einflüssen schützen. Er dient als einer der wichtigsten Depotspeicher für Mineralien. 99% des gesamten Kalziums in Form von Hydroxylapatit, 85% des Phosphats und 50% des Magnesiums werden unter anderem im Knochen gespeichert. Des Weiteren spielt der Knochen eine wesentliche Rolle in der Hämatopoese und ermöglicht die Motilität des Menschen. Dabei dient der Knochen als Ansatz und Hebel für die Muskulatur (Bartl, R. und Bartl, C. 2004). Neuere Erkenntnisse haben gezeigt, dass der Knochen auch eine wesentliche Rolle als endokrines Organ spielt. Er sezerniert dabei zwei wichtige Hormone. Zum einen den „fibroblast growth factor 23“ (FGF-23) und das Osteocalcin (OC). Der FGF-23 koordiniert den Phosphat- und Vitamin D3 Haushalt an der Niere und im Intestinaltrakt. Das OC dagegen steigert die Insulinsekretion und reduziert die Insulinresistenz an den Adipozyten. Somit nimmt das OC Einfluss auf den Glukosemetabolismus (Burr und Akkus 2014).

Knochen kann auf zwei verschiedene Arten entstehen. Man unterscheidet eine desmale Ossifikation (direkte Ossifikation) von einer chondralen Ossifikation (indirekte Ossifikation). Bei der desmalen Ossifikation sammeln sich Mesenchymzellen an gefäßreichen Ossifikationspunkten und differenzieren sich zu Osteoblasten. Sie produzieren zunächst eine unverkalkte Matrix aus Kollagen Typ I. Im späteren Verlauf kommt es dann zu einer Verkalkung durch die Einlagerung von Kalziumphosphat in Form von Hydroxylapatit. Dieser Prozess findet vor allem im flachen Schädelknochen und in der Klavikula statt. Die chondrale Ossifikation geschieht dagegen in zwei Schritten und findet in den meisten Knochen statt. Der wesentliche Unterschied bei dieser Form der Ossifikation ist, dass der Knochen zuvor knorpelig angelegt wird. Sie beginnt mit der perichondralen Ossifikation. Hierbei bildet sich eine Knochenmanschette um den knorpeligen Schaft der späteren

Diaphyse. Reaktiv hypertrophieren die Chondrozyten im Bereich der Knochenmanschette und bilden den sogenannten Blasenknorpel. Die enchondrale Ossifikation stellt den zweiten Schritt dar und beginnt mit dem Einwandern von Gefäßen. Dadurch können Chondroklasten einströmen und den Knorpel abbauen. Es entstehen Hohlräume die von Gefäßen und Mesenchymzellen besiedelt werden können. Analog zur desmalen Ossifikation differenzieren sich die Mesenchymzellen zu Osteoblasten und verkalken das präformierte Höhlennetzwerk. Dies bildet das primäre Knochenmark, das später zum blutzellbildenden sekundären Knochenmark umgewandelt wird. Am Ende beider Ossifikationsarten entsteht Geflechtknochen, ein dreidimensionales Höhlennetzwerk aus Knochenbälkchen. Im weiteren Reifungsprozess wird der Geflechtknochen zum Lamellenknochen (Abbildung 1) umstrukturiert (Welsch 2006).



**Abbildung 1:** Darstellung eines Lamellenknochens.

## 1.2 Makroskopischer Aufbau

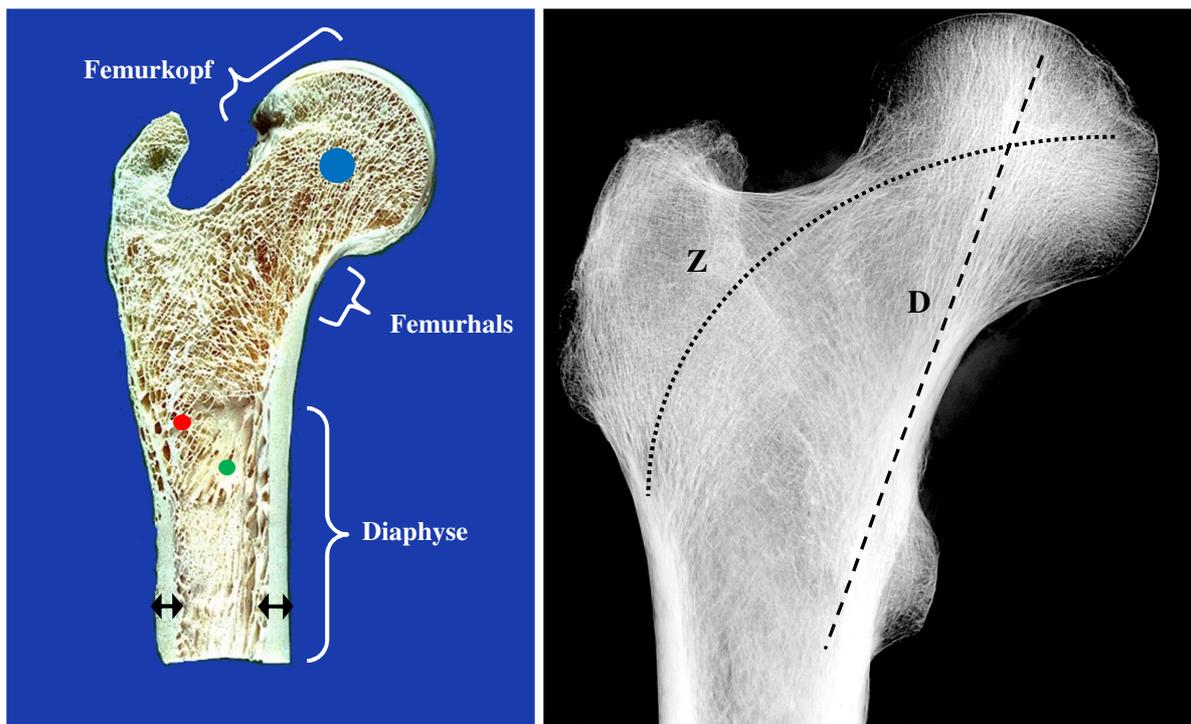
Peripher wird jeder Knochen von einer sehr dichten, kompakten Schicht begrenzt, der sogenannten Substantia compacta oder Substantia kortikalis (Abbildung 2). Im Inneren dagegen imponiert eine schwammähnliche Struktur, die Substantia spongiosa. Dabei ist die chemische Zusammensetzung identisch. Je nach Belastung und Art der mechanischen Beanspruchung variiert das Verhältnis von Substantia compacta und Substantia spongiosa im Knochen.



**Abbildung 2:** Proximaler Femur mit radiologischer Transversalaufnahme der Diaphyse des Femurs mit deutlich ausgebildeter Substantia compacta und fehlender Substantia spongiosa.

### 1.2.1 Substantia compacta

Die Substantia compacta ist besonders in der Diaphyse der langen oder kurzen Röhrenknochen aller Extremitäten zu finden (Abbildung 3). Sie macht ungefähr 80% der gesamten Knochenmasse aus und weist eine geringe Knochenumbaurate auf (Bartl, R. und Bartl, C. 2004). Da zum Beispiel am Femur eine hohe Druck- und Zugbelastung herrscht, ist die Knochenumbaurate hier besonders stark ausgeprägt. Am Wirbelkörper dagegen ist sie nur sehr schmal ausgebildet. Mit seiner dicht gepackten und soliden Architektur weist sie eine geringe Porosität auf (Verhältnis von Hohlraumvolumen zu Gesamtvolumen). Sie liegt ungefähr bei 3-5%. Gerade durch diese Festigkeit (plastische Verformbarkeit bis zum Bruch des Knochens) hat sie auch eine protektive Funktion und schützt zum Beispiel das Knochenmark vor äußeren Einflüssen (Burr und Akkus 2014).



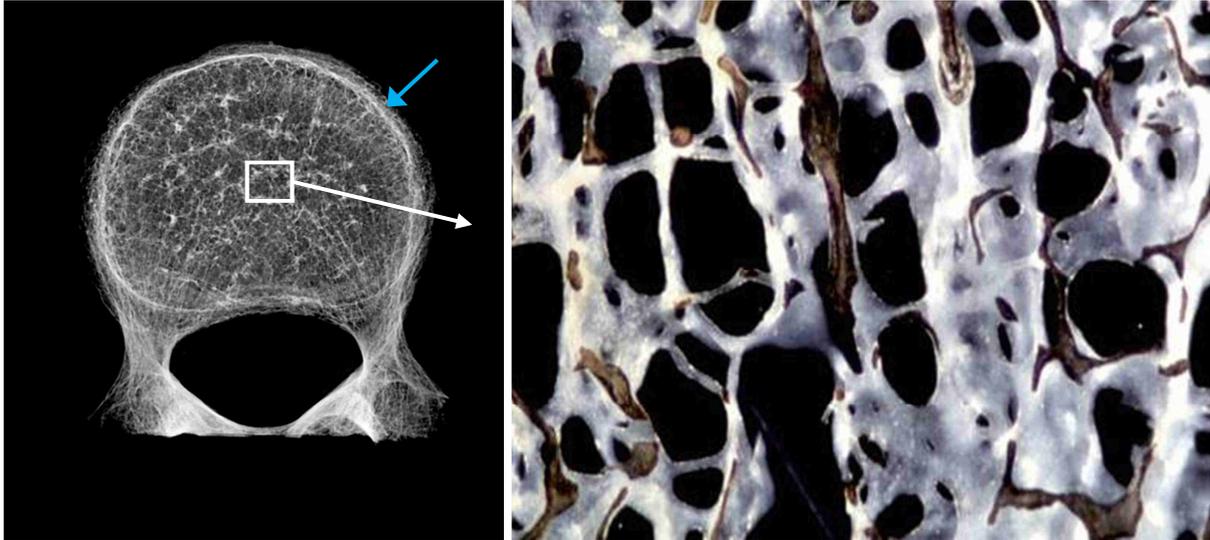
**Abbildung 3:** Darstellung eines Femurkopfes mit Femurhals und proximalem Abschnitt der Diaphyse im Koronarschnitt. Links: ↔ Substantia compacta, ● Substantia spongiosa, ● rotes Knochenmark und ● gelbes Knochenmark hier bereits rausgewaschen. Rechts: Radiologisch sichtbare Trajektionlinien mit Druck- (D) und Zugtrabekeln (Z).

### 1.2.2 Substantia spongiosa

Die Substantia spongiosa ist ein dreidimensionales Konstrukt aus Knochenplatten und -balken, den sogenannten Trabekeln. Ein Trabekel ist im Mittel ungefähr 140-160 µm dick (Busse et al. 2009). Die Substantia spongiosa findet sich überwiegend in der Epiphyse der langen Röhrenknochen, den Wirbelkörpern, den Rippen und dem Beckenkamm. Der Hohlraum zwischen den Trabekeln ist mit hämatopoetischen Stammzellen besiedelt und bildet das Knochenmark. Es dient der Bildung von Blutzellen und wird rotes Knochenmark genannt. Im Laufe des Alterungsprozesses verfettet das rote Knochenmark in der Diaphyse zunehmend und wird deshalb gelbes Knochenmark genannt. Dies geht einher mit einer Verminderung der trabekulären Struktur (Abbildung 3).

Eine wichtige biomechanische Aufgabe erfüllt das trabekuläre System durch die Anordnung der einzelnen Trabekel. Sie richten sich entlang der Belastungslinien aus (Trajektionslinien) und leiten einen Teil der Belastung auf den kortikalen Knochen um (Burr und Akkus 2014). Somit ist ihre effektive statische Konstruktion, die dadurch reduzierte Knochenmasse und dem verminderten Gewicht, Grundlage für die Leichtbauweise eines Knochens (Abbildung 4).

Die Porosität, als Verhältnis von Hohlraumvolumen zum Gesamtvolumen, der Substantia spongiosa beträgt hier über 70% (Schaffler und Burr 1988). Mit einer Knochenmasse von nur 20%, aber einer Knochenoberfläche von 80% besitzt die Substantia spongiosa eine hohe Knochenumbaurate, bei der neuer Knochen gebildet und alter Knochen abgebaut wird (Hadjidakis und Androulakis 2006).



**Abbildung 4:** Radiologische Transversalaufnahme eines Wirbelkörpers (links) mit Vergrößerung der Substantia spongiosa (rechts), Dunkelfeld, Färbung von Kossa Modifikation, 40-fache Vergrößerung. Gut erkennbar, im Gegensatz zum Femur, ist die nur zart ausgeprägte Substantia compacta (→).

### 1.3 Histologischer Aufbau

Der Knochen ist ein hoch aktives Gewebe und ein dynamisches Konstrukt, das einem ständigen Umbau unterliegt. Man unterscheidet den Knochen zum einen in der Anordnung der Typ I Kollagenfasern und zum anderen in der Entwicklungsstufe innerhalb dieses dynamischen Prozesses. Daraus ergibt sich die Unterteilung in Geflechtknochen, primären-, sekundären- und interstitiellen Knochen.

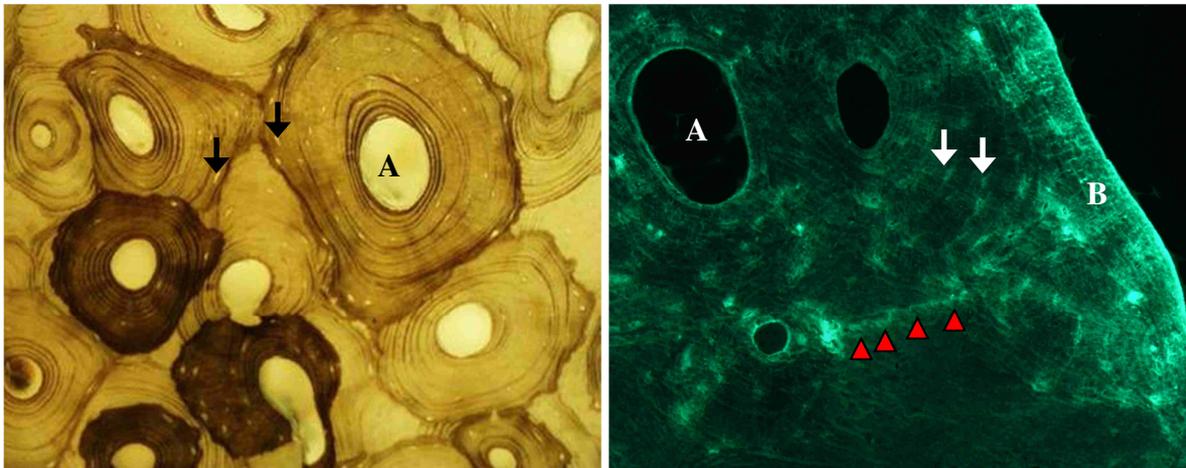
Der Prototyp eines Knochens ist der Geflechtknochen. Er spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Knochenskeletts und dem Knochenwachstum in der Epiphysenfuge. Er wird von Osteoblasten und im Verhältnis zum primären Knochen schneller synthetisiert, wodurch es zu einer unsortierten und zufälligen Anordnung der Typ I Kollagenfasern kommt. Daraus resultiert eine gitterartige Struktur, die anschließend mineralisiert wird. Durch die Mineralisierung gewinnt der Geflechtknochen an Festigkeit. Diese Eigenschaften spielen nicht nur eine wichtige Rolle im Knochenwachstum, sondern auch in der Knochenheilung bei Frakturen. In der Frakturzone kommt es zunächst zu einer Entzündungsreaktion. Dies führt zur Gefäßeinsprossung in die Frakturzone. Nachdem Ansiedeln von Osteoblasten folgt die Synthese neuer Knochenmatrix und die Bildung von Geflechtknochen, welche die

Fraktur überbrückt. Der dabei entstehende Kallus führt zu einer gewissen Stabilität und unterstützt so den Heilungsprozess (Burr und Akkus 2014).

Als primärer Knochen wird prinzipiell Knochen bezeichnet, der ohne Resorption des vorbestehenden Knochens neu entsteht. Das bedeutet, der Knochen entsteht direkt auf Knochengewebe oder aus Gewebe wie Knorpel. Man unterscheidet hier nach der Anordnung der Typ I Kollagenfasern unterschiedliche Typen. Beim primären Lamellenknochen sind Typ I Kollagenfasern in Form parallel angeordneter lamellärer Bänder (jeweils 3-7  $\mu\text{m}$  dick) geschichtet, welche jeweils von einer Zwischenlamelle (1  $\mu\text{m}$  dick) getrennt sind. Mikroskopisch ergibt dies das Bild von drei Ringen und bildet die Generallamelle. Diese beinhalten nur wenige vaskuläre Kanäle, was eine hohe Festigkeit ermöglicht. Die Generallamelle umgibt das gesamte Knochenelement und innen kleidet sie die Markhöhle aus. Andere wichtige Strukturen sind die primären Osteone. Sie entstehen aus vergrößerten vaskulären Kanälen. Die Typ I Kollagenfasern sind auch hier parallel angeordnet, allerdings werden sie von außen nach innen in konzentrischen Kreisen angelegt, sodass letztlich nur noch ein kleiner vaskulärer Kanal übrigbleibt, der sogenannte Havers-Kanal. Benannt wurde er nach dem britischen Arzt und Anatom Clopton Havers (1657-1702), der sie im Jahre 1691 entdeckte (Abbildung 5). Die dabei entstehenden konzentrischen Lamellen werden auch Speziallamellen genannt. Ein primäres Osteon ist im Durchmesser ungefähr 50-100  $\mu\text{m}$  breit und besteht aus ungefähr 10 Speziallamellen. Die Abgrenzung zu anderen Osteonen ist unscharf. Die Verbindung der einzelnen Havers-Kanäle werden durch Querverbindungen sichergestellt, die sogenannten Volkmann-Kanäle, benannt nach dem deutschen Physiologen Alfred Wilhelm Volkmann (1801 - 1877). Primärer Knochen ist vor allem während der Knochenneubildung zu finden. Dies betrifft insbesondere die Wachstumsphase eines Menschen und die Frakturheilung.

Sekundärer Knochen entsteht, weil der Knochen einem ständigen dynamischen Umbauprozess (Knochenremodeling) unterliegt, bei dem sich der Knochen auf veränderte Belastungen einstellen muss oder physiologisch entstandene Mikrofrakturen (Microcracks, MC`s) repariert werden müssen (Burr und Akkus 2014). Als sekundäre Knochensubstanz wird damit Knochen bezeichnet, der neu entsteht und dabei vorbestehender Knochen resorbiert wird. Ein sekundäres Osteon unterscheidet sich gegenüber einem primären Osteon zum einen in der Größe, zum

anderen in der Anzahl der Lamellen und ihrer Begrenzung. Der Durchmesser beträgt hier zwischen 100-250  $\mu\text{m}$  und besteht aus ungefähr 20-25 Speziallamellen, welche durch Zementlinien begrenzt werden. Diese dienen einerseits als mechanische Verstärkung der Typ I Kollagenfasern und Minimierung der Ausbreitung von MC`s. Andererseits bilden sie eine Grenze und hemmen den Abbau durch Osteoklasten. Durch die Entstehung von neuen Osteonen wird alter Knochen partiell abgebaut. Der alte Knochen füllt so die Lücken zwischen den neu gebildeten Osteonen, welcher nun interstitieller Knochen genannt wird. Er besitzt ein höheres Gewebsalter und ist in seiner Gesamtheit gestört, wodurch dieser Teil anfälliger für MC`s wird (Burr und Akkus 2014).



**Abbildung 5:** Darstellung der Substantia compacta. A: Osteon mit Havers-Kanal und umgebenden Speziallamellen, B: Generallamelle,  $\rightarrow$  Osteozyten,  $\blacktriangle$  Microcrack. links: Dunkelfeld, Schliff, Färbung von Kossa, Modifikation, 100-fache Vergrößerung, rechts: Fluoreszenzmikroskopie, Calceinfärbung, 100-fache Vergrößerung.

### 1.3.1 Knochenzellen

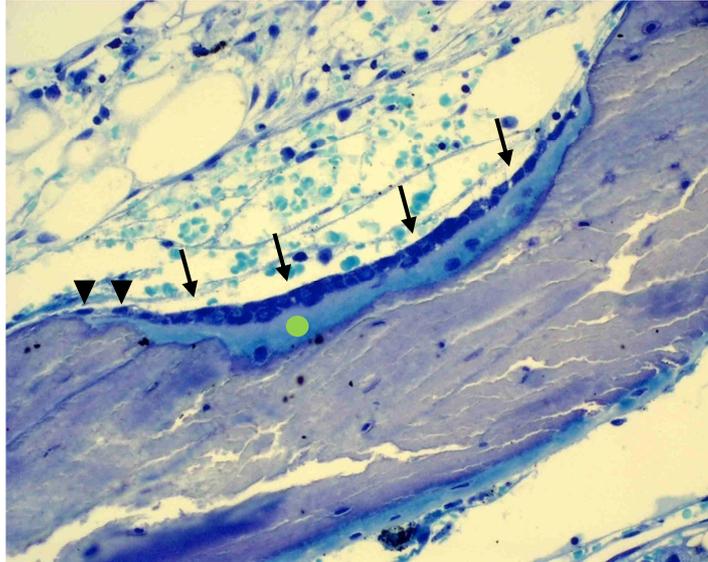
Mesenchymzellen sind multipotente Stammzellen, die in der Lage sind, sich in eine Vielzahl von gewebsspezifischen Zellen zu differenzieren. Je nach Differenzierung bilden sie so einen bestimmten Gewebetyp. Zu diesen Differenzierungen gehören zum Beispiel Knochen-, Knorpel-, Fett- oder Muskelgewebe (Pittenger et al. 1999). Für die Bildung, den Abbau und die Organisation von Knochengewebe spielen drei Zellarten eine wesentliche Rolle. Es handelt sich dabei um die Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten, die im Weiteren genauer erklärt werden.

## Osteoblast

Der Osteoblast entsteht aus einer multipotenten Mesenchymzelle. Dies geschieht über mehrere Vorstufen aus einer Osteoprogenitorzelle, die über den Präosteoblasten zum reifen Osteoblasten heranreift. Nach Beendigung der Knochensynthese wandelt sich der Osteoblast in einen Osteozyt oder in eine Knochenbelegzelle („Bone Lining Cell“) um (Aubin et al. 1995).

Die Hauptaufgabe des Osteoblasten ist die Synthese neuer Knochenmatrix. Durch die Produktion von alkalischer Phosphatase, Osteopontin, Osteocalcin, Typ I Kollagen und anderen spezifischen Matrixproteinen entsteht das Osteoid, die unverkalkte Knochenmatrix (Bellido et al. 2014). Die Osteoblasten liegen meist auf der Knochenoberfläche nebeneinander und bilden so einen Osteoidsaum (Abbildung 6). Die Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen führt dann zur Verkalkung, wodurch der Knochen seine Festigkeit erhält. Erkennbar sind diese hochaktiven Zellen an einem großen Kern, einem vergrößerten Golgi-Apparat, sowie einem hoch entwickelten endoplasmatischen Retikulum. Einige Osteoblasten werden während der Synthese in die verkalkte Knochenmatrix eingemauert und differenzieren sich zu Osteozyten. Andere gehen nach der Synthese des Knochens in einen inaktiven Zustand über und liegen auf der Knochenoberfläche als Knochenbelegzellen („Bone Lining Cells“) vor. Die restlichen Osteoblasten, die nicht mehr gebraucht werden, gehen in die Apoptose über.

Neben den anabolen Eigenschaften erfüllen sie auch katabole Aufgaben. Durch osteoklasten-stimulierende Zytokine beeinflussen sie die Knochenresorption. Dieses hoch komplexe Zusammenspiel wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Einerseits ist eine Kommunikation zwischen den Zellen erforderlich, die durch „gap junctions“, sowie para- und autokrine Mechanismen gewährleistet wird. Andererseits besteht ein systemischer Signalweg über Hormone, wie das Parathormon (PTH) oder Androgene. Ebenso spielt das Vitamin D3 im Rahmen des Kalziumhaushaltes eine große Rolle (Bellido et al. 2014).

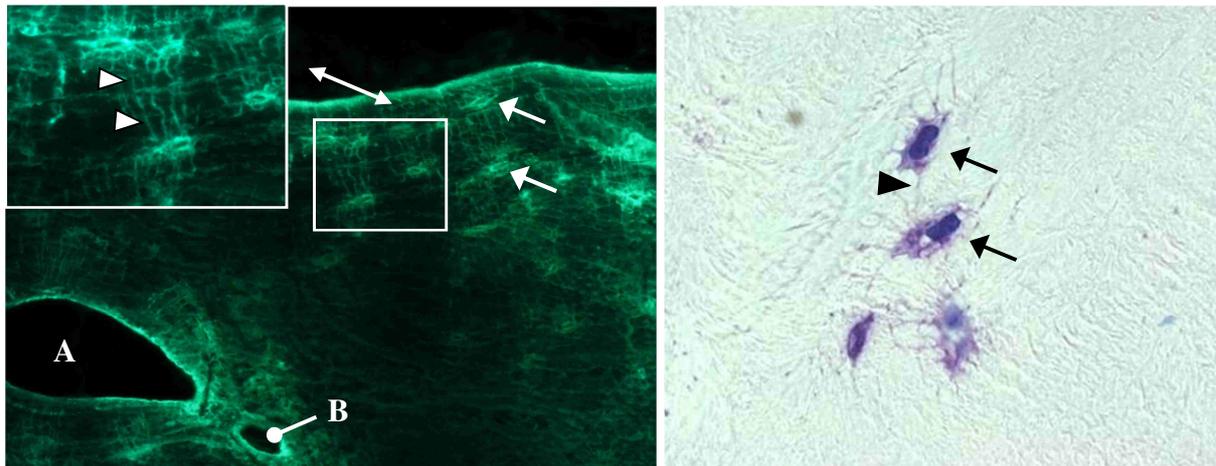


**Abbildung 6:** Erkennbar sind großkernige Osteoblasten, die perlschnurartig aneinander gereiht auf der Knochenoberfläche liegen (→) und einen Osteoidsaum bilden (●). Im Randbereich liegen inaktive Lining Cells (▼). Toluidinfärbung, 100-fache Vergrößerung.

### Osteozyt

Die Osteozyten machen etwa 90% der Zellen innerhalb der Knochenmatrix aus und sind die am längsten lebenden Knochenzellen. Während der Umwandlung vom Osteoblasten zum Osteozyten entsteht die charakteristische Morphologie. Durch die Expression bestimmter Gene entstehen Zellausläufer, ähnlich derer eines Neurons. Sie werden genauso wie der Zellkörper während der Synthese in die Knochenmatrix eingebettet. Der Zellkörper liegt dann in sogenannten Lakunen und um die Zellausläufer herum entstehen enge Kanälchen (Kanalikuli) (Abbildung 7). Etwa 50 Zellausläufer hat ein Osteozyt, die wiederum mit benachbarten Osteozyten in Verbindung stehen. Die Zellausläufer treffen sich in den Kanälchen und sind über „gap junctions“ miteinander verbunden. Diese Art von Verbindung ergibt ein hoch komplexes dreidimensionales Netzwerk, das nahezu den gesamten Knochen durchzieht. Über das dendritische Netzwerk fungieren sie als mechanosensorische Zellen und koordinieren die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten. Dies geschieht zum Beispiel über den FGF-23. Dies ermöglicht eine Anpassung auf Veränderungen äußerer Umstände und das Aufspüren von MC`s. Dazu kommen wichtige endokrine Funktionen sowie der Einfluss auf den Phosphat- und Kalziumhaushalt (Bellido et al. 2014, Bonewald 2011). Die Versorgung dieser Zellen stellt eine besondere Herausforderung dar. Bei Knochengewebe handelt es sich um sehr dichtes Gewebe, dass eine schnelle Diffusion unmöglich macht. Die

Knochenzellen dürfen also nur ungefähr 250 µm von einer blutversorgenden Kapillare entfernt sein. Durch die konzentrische Anordnung der Osteozyten um einen Havers-Kanal wird dies effizient umgesetzt. So kann eine hohe Anzahl an Osteozyten innerhalb eines Osteons durch ein zentrales Gefäß versorgt werden. Die einzelnen Havers-Kanäle werden zusätzlich durch die Volkmann-Kanäle verbunden, welche zur Blutversorgung beitragen (Burr und Akkus 2014).

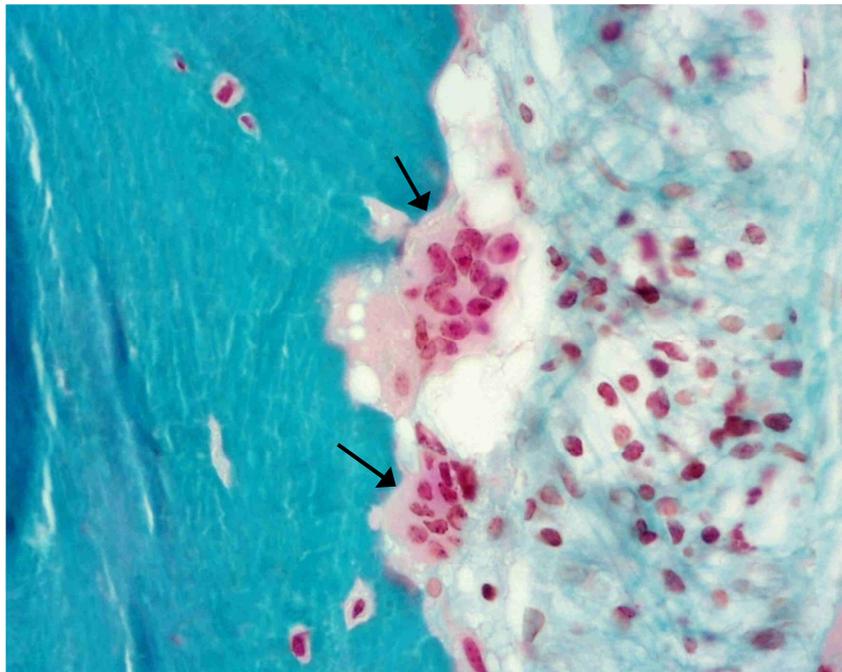


**Abbildung 7:** links: Fluoreszenzmikroskopie, Calceinfärbung, 200-fache Vergrößerung, rechts: lila, Schliff, Toluidinfärbung, 100-fache Vergrößerung. → Osteozyten, ► Kanalikuli zwischen kommunizierenden Osteozyten, A: Havers-Kanal, B: Anschnitt eines Volkmann-Kanals.

### Osteoklast

Der Osteoklast entsteht im Gegensatz zu den anderen Knochenzellen nicht aus Mesenchymzellen, sondern aus einer hämatopoetischen Stammzelle. Genauer gesagt, entsteht er aus einer myeloischen Vorläuferzelle aus der Monozyten-Makrophagen-Reihe. Dabei entwickeln sich die Vorläuferzellen zu einkernigen Präosteoklasten, die wiederum zu mehrkernigen Osteoklasten fusionieren (Suda et al. 1992) (Abbildung 8). Die Differenzierung der Osteoklasten hängt von vielen Faktoren ab. Zu den systemischen Faktoren zählen unter anderem die Kalziumkonzentration im Blut oder Wachstumsfaktoren wie Interleukin-3 (IL3) oder „granulocyte macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF). Auf zellulärer Ebene spielen die Osteozyten und Osteoblasten eine entscheidende Rolle. Sie stimulieren die Osteoklasten über Zytokine wie dem „osteoclast differentiation factor“ (ODF), einem Liganden der Tumornekrosefamilie (RANKL) oder dem GM-CSF. Die Hauptaufgabe besteht darin, die mineralisierte Knochenmatrix abzubauen. Dafür müssen die Hydroxylapatitkristalle aufgelöst und die organische Matrix gespalten

werden. Das ermöglicht eine Neustrukturierung des Knochens und nimmt Einfluss auf den Kalziumspiegel im Blut. Um Knochen zu resorbieren lagern sich die Osteoklasten auf der Knochenoberfläche an. Bei Aktivierung dieser Zellen findet eine Polarisation statt, die zur Veränderung des Zytoskeletts führt. Am Rande der Zelle entsteht eine dichte zirkuläre Kontaktzone mit dem Knochen. Es werden dort zahlreiche punktförmige Aktinfilamente (Podosomen) ausgebildet. Diese Zone wird „sealing-zone“ genannt. Innerhalb dieser Zone bildet die Membran dicht aneinander liegende Falten, den sogenannten Faltensaum oder „ruffled border“ und bildet das Resorptionskompartiment. Mit Hilfe von Hydrolasen und anderen Enzymen wird bei einem niedrigen pH-Wert die Knochenmatrix zersetzt und es bildet sich eine Resorptionslakune oder auch „Howship-Lakune“ genannt (Bellido et al. 2014). Die Spaltprodukte werden anschließend über den Faltensaum endozytotisch aufgenommen und in Vesikel verpackt. Sie werden dann transzytotisch durch die Zelle transportiert und in einen extrazellulären Raum über Exozytose wieder abgegeben. So ist die Zelle fähig große Mengen an Knochen zu resorbieren (Nesbitt und Horton 1997, Salo et al. 1997).



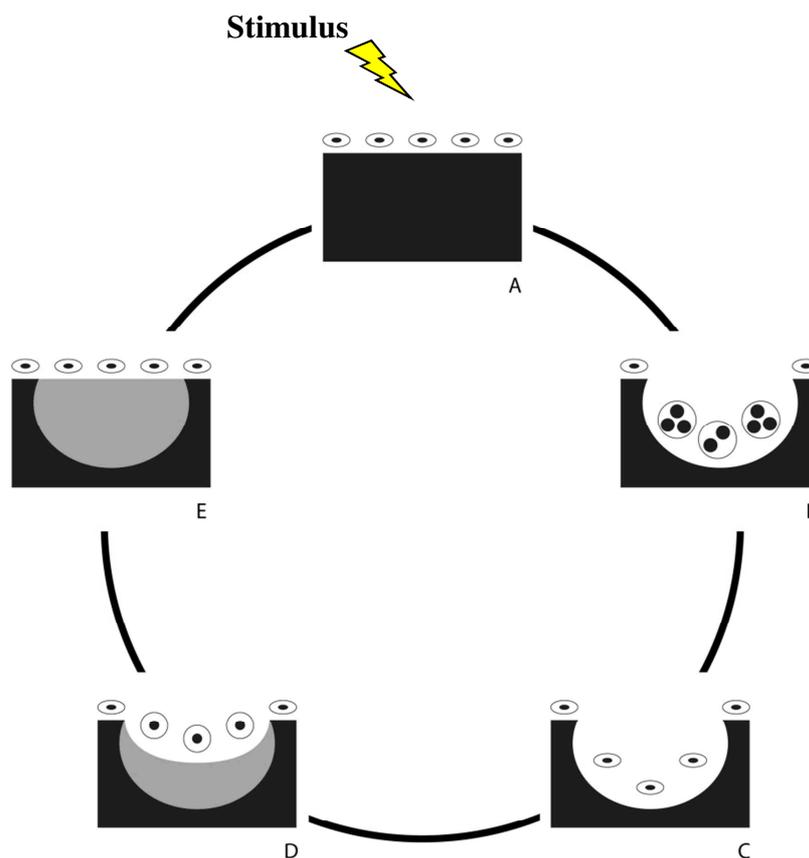
**Abbildung 8:** Mehrkernige Osteoklasten (→) in einer Resorptionslakune auf Knochengewebe. Masson Goldner Färbung, 200-fache Vergrößerung.

## 1.4 Remodeling

Im Jahr 1892 beschrieb Julius Wolff (1836-1902), ein orthopädischer Chirurg an der Berliner Universität, mit seinem Werk „Das Gesetz der Transformation der Knochen“, die Anpassung des Knochens bei neuartiger Belastung. Er beobachtete die Veränderung der äußeren Form und der inneren Trabekelstruktur an unbehandelten Schenkelhalsfrakturen und pathologisch verheilten Frakturen (Prendergast 1995, Wolff 1892). Erweitert wurde das Gesetz durch Harold M. Frost (1921-2004) mit seiner Theorie des „Mechanostat“ (Frost 1987). Demnach gibt es nicht nur eine zelluläre- und Organebene, sondern auch eine Gewebsebene auf der mechanische Signale verarbeitet werden. Das mechanische Signal ist hier die elastische Verformbarkeit, die den Knochen lokal zum Knochenaufbau oder -abbau stimuliert. Die Hauptbelastung der Knochen entsteht durch die Muskeln, die mit ihren unterschiedlichen Ursprüngen und Ansätzen eine Druck- oder Zugbelastung ausüben. Dementsprechend korreliert die Stärke der Muskeln mit der Festigkeit des Knochens (Frost 2003, Frost 2004). 1990 definierte Frost den Begriff „Remodeling“ neu, um ihn von dem Begriff „Modeling“ zu unterscheiden. Der wesentliche Unterschied ist, dass während des Knochenwachstums die Knochenmasse stark zunimmt. Die Knochensynthese ist also stärker vertreten als die Resorption und wird als „Modeling“ bezeichnet. Beim „Remodeling“ dagegen ist die Resorption in etwa so hoch wie die Neubildung, sodass die Knochenmasse annähernd konstant bleibt. Dabei bilden Osteoblasten und Osteoklasten eine Einheit, die sogenannte „Basic Multicellular Unit“ (BMU) (Frost 1969, Frost 1990). Dieser Vorgang findet ständig und zeitlebens statt. Er ermöglicht den Abbau alter Knochen, Heilung von MC`s und Anpassung an veränderte Belastungen. Außerdem spielt er eine wichtige Rolle in der Kalziumhämostasie. Man unterteilt das „Remodeling“ in 5 Schritte (Abbildung 9):

- A) „*Activation*“: Hier kommt es über einen Stimulus zur Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten.
- B) „*Resorption*“: Mit Hilfe der Lining Cells binden die Osteoklasten am Knochen und beginnen mit der Auflösung der Knochenmatrix.

- C) „*Reversal*“: Die Osteoklasten stellen die Resorption ein und die Knochenoberfläche wird mit aktivierten Lining Cells vorbereitet.
- D) „*Formation*“: Osteoblasten beginnen mit der Synthese von unmineralisierter Knochenmatrix (Osteoid), die im Anschluss in ca. 2-3 Wochen zu 70% mineralisiert wird.
- E) „*Quiescence*“: Im Anschluss befindet sich der neue Knochen in einer Art „Ruhephase“, in der die restliche Matrix mineralisiert wird. Dies kann bis zu einem Jahr dauern (Allen und Burr 2014).



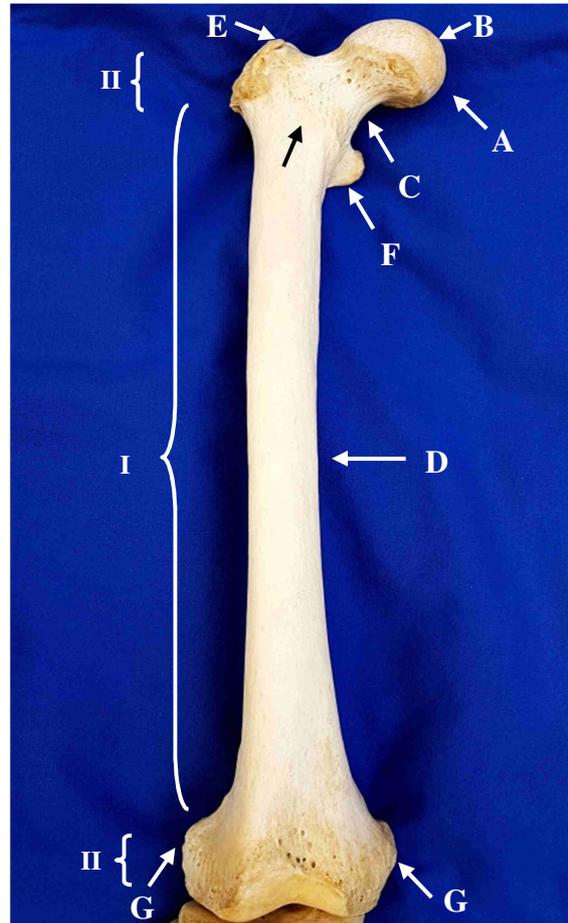
**Abbildung 9:** Bone-Remodeling, A: Activation, B: Resorption, C: Reversal, D: Formation, E: Quiescence

Entscheidend für die lokale Regulation ist das OPG/RANKL/RANK System. Der RANKL („receptor activator of the NF- $\kappa$ B ligand“) ist ein hoch potenter Aktivator. Er wird von den Präosteoblasten gebildet und bindet an dem entsprechenden Rezeptor RANK („receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B“) auf den osteoklastären Vorläuferzellen. Dies führt zur Fusion und Aktivierung der Osteoklasten (Hsu et al. 1999). Das Osteoprotegerin (OPG) dagegen ist ein lokal wirkendes Zytokin, das den Effekt vom RANKL blockiert. Es ist der Gegenspieler und inhibiert so die Aktivität der Osteoklasten (Simonet et al. 1997).

### 1.5 Aufbau des Femurs

Als längster Knochen des menschlichen Skeletts gehört der Oberschenkelknochen (Os femoris) zu den Röhrenknochen. Er besteht aus einem Femurkopf (Caput femoris), der mit der Gelenkpfanne (Acetabulum) des Beckenknochens (Os coxae) das kugelige Hüftgelenk bildet. Beide Gelenkflächenanteile sind mit hyalinem Knorpel überzogen und sorgen so für eine reibungsarme Kontaktfläche. Medial auf dem Femurkopf befindet sich eine kleine Grube (Fovea capitis femoris), die nicht mit hyalinem Knorpel überzogen ist. Sie dient als Ansatz des Ligamentum capitis femoris, ein intraartikulär verlaufendes Band ohne nennenswerte mechanische Funktion. Sie dient als Leitstruktur für einen Ast der Arteria circumflexa femoris und übernimmt so einen Teil der Blutversorgung des Femurkopfes, besonders in der Wachstumsphase (Aumüller et al. 2007). Der größte Teil erfolgt aber über zirkulär verlaufende Gefäße unterhalb der Gelenkkapsel und intraossäre Äste der A. circumflexa femoris lateralis und medialis (Beaulé 2006, Freeman 1978). Die Brücke zwischen dem Femurkopf und dem distal anschließenden Femurschaft (Corpus femoris) bildet der Schenkelhals (Collum femoris). Dieser ist gegenüber dem Femurschaft im Mittel um  $126^\circ$  nach medial abgewinkelt. Dieser Winkel wird als CCD-Winkel (Caput-Collum-Diaphysenwinkel) bezeichnet. Der anatomische Übergang von Femurhals und Femurschaft ist geprägt durch imponierende Höcker (Apophysen). Dazu gehören der Trochanter major und der Trochanter minor (Abbildung 10). Dorsal werden diese Höcker verbunden durch die prominente Crista intertrochanterica und ventral durch die weniger prominente Linea intertrochanterica. An der Basis des Trochanter majors befindet sich die Fossa trochanterica. Zusammen mit der Linea aspera dienen sie unter anderem als wichtige Ansatzpunkte

für die Becken- und Beinmuskulatur. Am distalen Femurschaft bilden die Femurkondylen den proximalen Gelenkkörper des Kniegelenks (Aumüller et al. 2007).

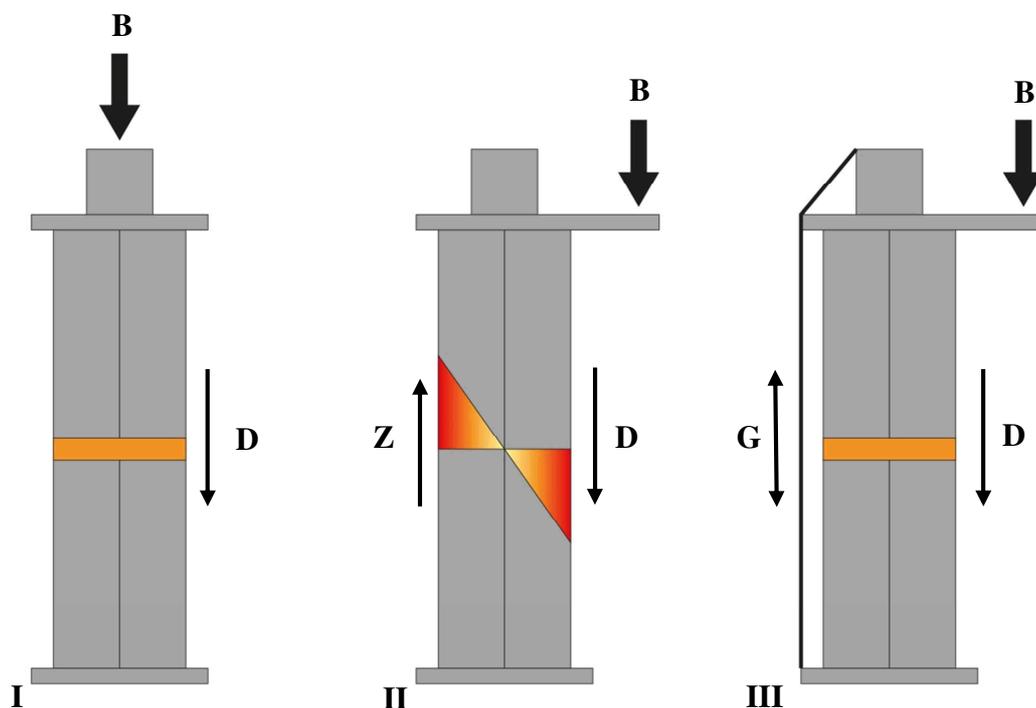


**Abbildung 10:** Darstellung eines Oberschenkelknochens (Os femoris) von ventral betrachtet. I: Diaphyse, II: Epiphyse, A: Caput femoris, B: Fovea capitis femoris, C: Collum femoris, D: Corpus femoris, E: Trochanter major, F: Trochanter minor, G: Femurkondylen, → Linea intertrochanterica. Die Fossa trochanterica und Crista intertrochanterica liegen dorsal und sind hier nicht erkennbar.

### 1.6 Biomechanische Beanspruchung des Femurs

Das Femur ist mit seiner effizienten Leichtbauweise optimal an die tägliche Beanspruchung angepasst. Neben Torsionskräften muss er besonders Druck-, Zug- und Biegespannungen kompensieren. Die mechanischen Eigenschaften sind geprägt durch die Zusammensetzung aus organischen und anorganischen Bestandteilen. Die Substantia compacta weist eine hohe Festigkeit auf und hält große Zug- und Druckspannungen aus. Die einzelnen Trabekel in der Substantia spongiosa sind

nach den einwirkenden Kräften ausgerichtet (Traktionslinien) und leiten die Kräfte auf die Substantia compacta um. Auf Grund der Form des Schenkelhalses entsteht bei einer axialen Belastung eine zusätzliche Biegespannung, da die Belastung seitlich der Femurachse liegt (Abbildung 11). Demzufolge entsteht auf der einen Seite des Querschnittes eine Druckspannung und auf der anderen Seite eine Zugspannung, die nach außen hin linear zunimmt. Somit ist die Belastung außen am höchsten und in der Mitte annähernd null. Diese Tatsache ist ein Grund für die kompakte Bauweise am Rand. Die größte Belastung des Femurs im Rahmen einer Biegespannung besteht kurz unterhalb des Trochanter minors (Pauwels 1948). Durch die Anordnung bestimmter Muskeln, wie zum Beispiel dem M. tensor fasciae latae am Femur, kann ein Gegenzug über den Tractus iliotibialis aufgebaut werden, wodurch eine Biegespannung in die umgekehrte Richtung entsteht. Diese Bauweise wird auch als „Zuggurtungsprinzip“ bezeichnet. Sie reduziert die Zugspannung verhältnismäßig stärker als die Druckspannung. Dies ist ein Vorteil, da der Knochen eine wesentlich kleinere Zugfestigkeit als Druckfestigkeit aufweist (Pauwels 1948).



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung der Druck- und Zugbelastungen bei I: axiale Belastung, II: nach medial versetzte, axiale Belastung, entspricht dem Femur ohne Zuggurtung, III: nach medial versetzte, axiale Belastung, entspricht dem Femur mit Zuggurtung. B: Belastung, D: Druckbelastung, Z: Zugbelastung, G: Gegenzug durch Kontraktion des M. iliotibialis.

## 1.7 Osteoporose

Osteoporose lässt sich aus den altgriechischen Wörtern „osteon“ = Knochen und „poros“ = Pore herleiten und bedeutet „poröser Knochen“. Früher sah man den Zustand der Osteoporose nicht als Erkrankung an, sondern betrachtete es als Involution, beziehungsweise eine physiologische Altersatrophie. Im Laufe der Zeit wurde die Osteoporose vermehrt als Erkrankung angesehen. Schon Astley Cooper, ein englischer Chirurg, bemerkte im 19. Jahrhundert einen Zusammenhang zwischen dünnen Knochen älterer Menschen und einem erhöhten Frakturrisiko (Cooper 1851). Eine der ersten Definitionen stellten Edward Reifenstein und Fuller Albright in den 1940er Jahren auf. Darin wird beschrieben, dass der Verlust der Knochensubstanz nicht einhergeht mit einer Demineralisierung des Knochens. Die Erkrankung ist also strikt zu trennen gegenüber anderen Erkrankungen wie die Osteomalazie, bei der eine Mineralisierungsstörung vorliegt (Reifenstein und Albright 1947). Anfang der 1990er Jahre wurde in der Consensus Development Conference eine neue Definition niedergeschrieben, die wie folgt lautet:

„Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine Störung der Mikroarchitektur des Knochengewebes mit konsekutiv erhöhter Knochenbrüchigkeit und erhöhtem Frakturrisiko charakterisiert ist“ (Consensus Development Conference 1993).

Die klinische Manifestation der Osteoporose sind die Frakturen, die erhebliche Folgen haben können. Etwa 5% - 20% der Patienten mit osteoporosebedingten Hüftfrakturen sterben innerhalb eines Jahres nach dem Frakturereignis. 50% der Patienten, die das Ereignis überleben sind dauerhaft immobil (Peck et al. 1993). Um die Osteoporose klar definieren zu können und für den klinischen Alltag gebräuchlich zu machen, schlug die WHO (World Health Organization) eine Definition anhand der Knochenmineraldichte („bone mineral density“, BMD) vor. Diese wird mit Durchschnittswerten von jungen Frauen der gleichen Ethnie verglichen und als Standardabweichung (SD) angegeben (T-Score). Dagegen gibt der Z-Score die Mineraldichte im Vergleich zu gesunden gleichaltrigen Patienten des gleichen Geschlechts an. Nach der Definition der WHO beruht die Diagnose einer Osteoporose auf einem T-Score von  $< -2,5$  SD. Bei einem Wert zwischen  $-1$  und  $-2,5$

SD spricht man von einer Osteopenie und alles darüber zählt als physiologische Abnahme der BMD (Abbildung 12). Als Standardverfahren wird eine Messung an einem bestimmten Messort, wie zum Beispiel an der LWS L1-L4 oder am Femurhals empfohlen (WHO 1994). Die Messwerte der einzelnen Messorte werden auch als „areal bone mineral density“ (aBMD) bezeichnet. Da das Frakturrisiko aber nicht alleine von der Knochendichte, beziehungsweise der Knochenmasse abhängt, entschied sich das National Institute of Health (NIH) im Jahr 2000 die Definition anzupassen. Demnach ist die Rede von einer Verminderung der Knochenfestigkeit („bone strength“) und dadurch erhöhte Knochenbrüchigkeit. Die Knochenfestigkeit ergibt sich zum einen aus der Knochenquantität, d. h. der Knochenmasse, und zum anderen aus der Knochenqualität, d. h. der Knochenarchitektur oder der Akkumulation von Mikrofrakturen. Außerdem spielt der Knochenumsatz eine Rolle als Ausdruck des Remodeling eines Knochens. Zurzeit gibt es allerdings keine akkuraten Messmethoden zur Darstellung der Knochenfestigkeit, die für den klinischen Alltag zu gebrauchen wären, sodass der T-Score weiterhin Goldstandard zur Diagnosestellung der Osteoporose ist.

Die WHO zählt die Osteoporose zu den 10 häufigsten Krankheiten weltweit. Etwa 10% der Bevölkerung leiden an Osteoporose (Minne 2001). In Deutschland sind ungefähr 30% der Frauen und 10% der Männer über 50 Jahren betroffen. Das entspricht etwa 6. Mio. Menschen, wovon 50% osteoporoseassoziierte Frakturen erleiden. Eine einzelne Fraktur kann langwierige und teilweise irreversible Folgen haben. Dazu gehören Akutbehandlung, Rehabilitation und eventuell dauerhafte Pflegebedürftigkeit. Dies wiederum verursacht erhebliche Kosten. In Deutschland belaufen sich die Kosten auf etwa 3,5 Mrd. € pro Jahr (Pollähne und Minne 2001). Im Rahmen des demographischen Wandels ist dies kritisch zu betrachten. Schätzungsweise verdoppelt sich die Anzahl der Rentner über 65 Jahren in der EU bis 2040 (European Commission 1998). Das entspricht einer Erhöhung von 15% auf 30%. Es gibt also viele Gründe die Prävention und die Früherkennung voranzutreiben, die Therapie dieser Erkrankung zu verbessern und eine optimale Versorgung der Frakturen zu gewährleisten.

### 1.7.1 Ursachen

Die Osteoporose wird in eine primäre und in eine sekundäre Osteoporose eingeteilt. Die primären Osteoporosen werden unterschieden in Typ I, der postmenopausalen Östrogenmangel assoziierten Osteoporose und in Typ II, der Kalziummangel assoziierten senilen Osteoporose (Riggs und Melton 1986). Die sekundäre Osteoporose entsteht in Folge anderer Erkrankungen oder entwickelt sich durch die Einnahme bestimmter Medikamente. Einige Beispiele dafür sind: Langjährige Glukokortikoidbehandlung, Hypogonadismus, Hyperthyreose, Alkoholismus, Malabsorption (Pietschmann und Peterlik 1999).

Die Pathogenese der Osteoporose ist eine multifaktorielle Entstehung. Zunächst ist es wichtig, dass es zu einer vollständigen Entwicklung der Knochenmasse kommt. Dies bezeichnet man als „peak bone mass“ und erreicht sein Maximum zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr. Wird dieses Maximum nicht erreicht, ist das Risiko eine Osteoporose zu entwickeln deutlich erhöht. Grundlegend herrscht eine Dysbalance zwischen Knochenresorption und Knochenaufbau, sodass es zu einem Knochenmasseverlustsyndrom kommt. Ein wichtiger Faktor ist der Kalziummangel. Dieser kann durch Mangelernährung oder durch eine verminderte intestinale Resorption im Rahmen von Malabsorptionssyndromen wie M. Crohn entstehen. Ebenso wie eine Hypokalziämie, kann ein Vitamin-D Mangel zu einem sekundären Hyperparathyreodismus führen. Das Parathormon (PTH) setzt Kalzium aus dem Knochen frei, indem es die osteoklastäre Knochenresorption verstärkt (Priemel et al. 2006).

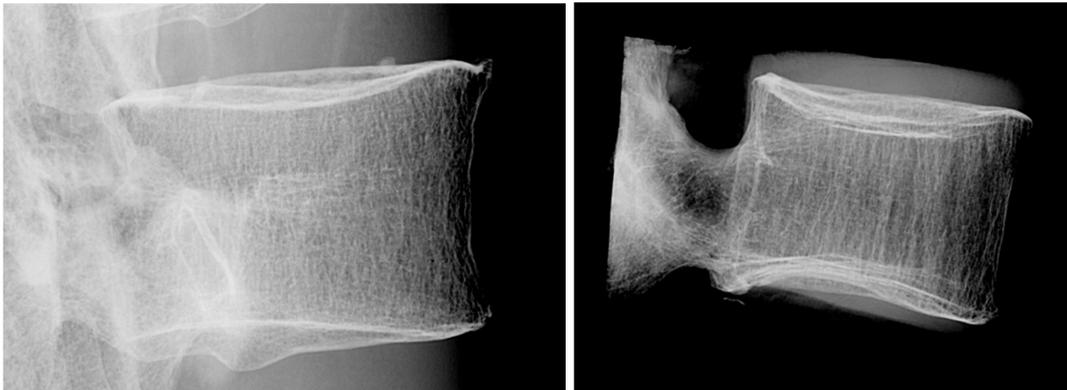
Untersuchungen haben gezeigt, dass der Vitamin-D Mangel in Deutschland wesentlich höher ist, als bisher vermutet. Etwa 20% der Bevölkerung weisen nachweisliche Mineralisationsstörungen auf (von Domarus und Amling 2009). Im Alter kommen mehrere Faktoren zusammen. Es kommt zu einer verminderten Sonnenexposition zum Beispiel durch Hospitalisierung oder Immobilität und zum Anderen verringert sich die Syntheseleistung der Haut, um Vitamin D3 ausreichend zu produzieren. Die Supplementation von Kalzium und Vitamin D kann das Frakturrisiko nachweislich verringern und die Knochenmasse steigern (Lips 2001). Ein weiterer Faktor sind die Östrogene, die mit ihrer inhibierenden Wirkung auf die Knochenresorption, besonders in der postmenopausalen Osteoporose eine wichtige Rolle spielen. Bei einem Abfall in der Menopause kommt es durch die fehlende

Hemmung der Osteoklasten zu einer erhöhten Knochenresorption (Pacifci et al. 1991). Auch das follikelstimulierende Hormon (FSH) spielt dabei eine Rolle, da es im Rahmen der hormonellen Feedbackschleife bei erniedrigtem Östrogen erhöht ist. Es bindet direkt am Osteoklasten und steigert die Aktivität. Außerdem bindet es an Osteoklastenvorläuferzellen und erhöht die Osteoklastenbildung (Sun et al. 2006). Wenn man die molekulare Ebene betrachtet, spielt auch das RANK/RANKL-System eine Rolle. Es wurde nachgewiesen, dass bei postmenopausalen Frauen eine erhöhte RANKL Expression vorliegt, die durch einen niedrigen Östrogenspiegel induziert wird und so direkt die Knochenresorption steigert (Eghbali-Fatourechhi 2003). Andere Risikofaktoren sind unter anderem das Gewicht der Patienten. Dabei steigt das Risiko bei niedrigem Body-Mass-Index (BMI) ( $\text{kg/m}^2$ ) an. Kommt dazu noch eine niedrige BMD, steigt das Risiko nochmals an (De Laet 2005). Der Dachverband Osteologie (DVO) empfiehlt deshalb eine ausreichende Kalorienzufuhr und ein BMI  $>20 \text{ kg/m}^2$ . Sie beschreibt außerdem das Alter, Immobilität, Rauchen und daraus resultierende chronisch-obstruktive Lungenerkrankung als weitere Risikofaktoren (DVO 2014).

### 1.7.2 Klinik und Diagnostik

Die Osteoporose ist eine schleichende Erkrankung, die sich klinisch entweder durch Frakturen oder Schmerzen manifestiert. Häufig kommt es bei dem Einbruch eines Wirbelkörpers zu akut einsetzenden Rückenschmerzen mit unterschiedlicher Intensität. Diese sogenannten Sinterungsfrakturen können zu einer erheblichen Größenabnahme führen. Die dadurch entstehenden charakteristischen Hautfalten am Rücken ziehen von medial oben bogenförmig nach lateral unten und werden auch als „Tannenbaumphänomen“ bezeichnet. Außerdem kann es zur Vorwölbung des Bauches kommen („Osteoporose-Bäuchlein“). Bei keilförmigen Einbrüchen der Brustwirbel kommt es zu einer Verstärkung der Brustkyphose und es kommt zum typischen Bild eines Rundrückens. Bei stark ausgeprägter Brustkyphose, kann es zu einer Reduktion der Lungenkapazität führen. Durch die veränderte Statik kommt es häufig zu einer Fehlbelastung, wodurch chronische Schmerzen und ein unsicheres Gangbild entstehen können. Andere osteoporoseassoziierte Frakturen sind proximale Femurfrakturen und distale Radiusfrakturen. Wichtig für die Patienten mit

Osteoporose ist die frühe Diagnose und Intervention, um das Risiko von Frakturen zu vermindern (Bartl, R. und Bartl, C. 2004).



**Abbildung 12:** Radiologische Sagittalaufnahme zweier Wirbelkörper unterschiedlicher Patientinnen. Links: Patientin mit Osteopenie ohne Fraktur (T-Score -2,2 SD), die Binnenstruktur wirkt noch größtenteils homogen. Rechts: Patientin mit starker Osteoporose ohne Fraktur (T-Score -4,6 SD), durch die Rarefizierung der Quertrabekel erkennt man eine eher vertikale Ausrichtung der Trajektionslinien und der Wirbelkörper wirkt insgesamt inhomogen.

Ein wichtiger Prädiktor für das Risiko einer Fraktur ist die BMD. Der diagnostische Goldstandard ist die Dual-energy-X-Ray-Absorptiometry (DXA). Dabei werden Röntgenstrahlen zweier unterschiedlicher Intensitäten appliziert und aus der absorbierten Differenz kann die BMD errechnet werden. Die BMD steht im engen Verhältnis zum Frakturrisiko. Dabei steigt das relative Frakturrisiko pro SD Abnahme deutlich an. Die Genauigkeit des Prädiktionwertes ist dabei abhängig vom Ort an dem gemessen wurde. So ist er bei der Messung am Femurhals für Hüftfrakturen und am LWK für Wirbelkörperfrakturen genauer. Das relative Risiko steigt hier pro SD Abnahme um circa 2,5 (Marshall et al. 1996). Kritisch zu betrachten ist die Tatsache, dass die BMD nur ein Frakturrisikofaktor von vielen ist. Wie zuvor beschrieben wäre die Knochenfestigkeit ein wesentlich genauerer Faktor, allerdings sind die dafür verfügbaren Messmethoden noch nicht für den klinischen Alltag anwendbar. Die DXA-Methode besitzt einige Vorteile, die sie alltagstauglich macht. Sie ist nicht invasiv, schnell durchzuführen (5-10 Min) und hat eine geringe Strahlenbelastung ( $13 \text{ mRem} = 130 \text{ } \mu\text{Sv}$ , entspricht 1/10-1/100 einer Röntgenaufnahme). Dies macht sie sehr angenehm für den Patienten und erhöht die Compliance. Zudem besitzt sie eine hohe Evidenz. Auf der anderen Seite ist sie sehr preiswert und macht sie so für alle zugänglich (Bartl, R. und Bartl, C. 2004). Allerdings ist das errechnete Risiko kein individuelles Risiko.

Ein anderes Problem liegt in der klinischen Indikationsstellung. Die klinischen Risikofaktoren sind zurzeit noch nicht eindeutig validiert, sodass es schwierig ist zu bestimmen, wer diagnostiziert und therapiert wird (NIH 2000). Neben der DXA-Methode stehen noch andere Methoden zur Verfügung, die in bestimmten Fällen angewandt werden können. Dazu gehört das konventionelle Röntgen, CT oder Skelettszintigraphie. Diese Methoden haben aber eine deutlich höhere Strahlenbelastung und sind teilweise deutlich teurer. Um die Osteoporosedagnostik zu verbessern, benutzt man zusätzlich biochemische Parameter. Die alkalische Phosphatase (ALP) ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, das besonders während der Osteoidsynthese und der Mineralisation vorkommt. Das Osteocalcin (OC) wird von den Osteoblasten gebildet und bindet Hydroxylapatit. Zusammen mit dem carboxy- und aminoterminalen Propeptid des Typ I Kollagens bilden sie Marker für den Knochenaufbau. Dagegen bildet das Hydroxypyridinium (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) Marker für die Knochenresorption und stellen Kollagenabbauprodukte dar. Sie werden beim Abbau des Kollagens freigesetzt. Das PYD und das DPD werden im Urin nachgewiesen (Delmas et al. 2000). Bis auf die ALP sind die biochemischen Parameter auf Grund der fehlenden Evaluation im Zusammenhang mit anderen Risikofaktoren derzeit nicht als Basisdiagnostik empfohlen, können aber im Einzelfall durchaus eine wichtige Ergänzung sein (DVO 2014).

### 1.7.3 Therapie

Die Hauptziele im Umgang mit der Osteoporose sind es Patienten mit einem hohen Frakturrisiko frühzeitig zu identifizieren, die adäquate Therapieindikation zu stellen, das Risiko einer osteoporosebedingten Fraktur zu minimieren und im besten Fall zu verhindern. Dazu hat die WHO ein Tool entwickelt, um das individuelle 10-Jahres-Frakturrisiko zu errechnen. Der Fracture Risk Assessment Score (FRAX) berechnet aus 12 unabhängig getesteten Risikofaktoren, wie zum Beispiel Alter, Geschlecht, BMD, Rauchen u. a. ein individuelles Risiko (FRAX 2008). Dieses Werkzeug kann somit zur Indikationsstellung einer Knochendichtemessung dienen. Nach Diagnose eines erhöhten Frakturrisikos gilt es die Risikofaktoren zu minimieren, wie zum Beispiel durch eine Sturzprophylaxe und Anpassen der Medikation. Außerdem ist eine adäquate körperliche Aktivität aufrecht zu erhalten. Wichtig dabei ist das

Training gegen Widerstand oder mit leichten Gewichten im Sinne eines isometrischen Trainings. Dies führt zu einer deutlichen Zunahme der BMD (Hinton 2015). Ergänzend sollten Übungen durchgeführt werden, die die Balance und den Muskeltonus erhöhen. Um das Sturzrisiko zu senken, ist es wichtig, die häusliche Umgebung umzugestalten. Es muss alles für den täglichen Gebrauch gut zugänglich sein und Stolperfallen müssen beseitigt werden. Dazu sollte wenn möglich auf Medikamente verzichtet werden, die das Gleichgewicht beeinträchtigen können, wie zum Beispiel Psychopharmaka (Solomon 2016). Bei chronischer Schmerzsymptomatik ist eine adäquate Schmerztherapie indiziert, um weiteres Chronifizieren zu verhindern und die Mobilität weiter zu erhalten. Die DVO empfiehlt zusätzlich eine ausreichende Kalorienzufuhr und ein BMI von  $>20 \text{ kg/m}^2$ , wenn nötig eine Kalzium und Vitamin D Supplementation sowie eine Nikotinkarenz. Bei stattgefundenener osteoporosebedingter Fraktur, einem hohen individuellen 10-Jahresfrakturrisiko oder einem bestimmten T-Score in Abhängigkeit von Alter und Risikofaktoren, wird eine medikamentöse Therapie empfohlen.

Die laut DVO Leitlinie zugelassenen Medikamente sind Bisphosphonate wie Alendronat, Ibandronat, Risedronat oder Zoledronat. Weitere Medikamente sind Östrogene, Raloxifen, Denosumab und Teriparatid (DVO 2014). Eines der am häufigsten benutzten Medikamente sind die Bisphosphonate. Sie reduzieren die Knochenresorption und erhöhen so die BMD. Zudem sind sie gut verträglich und risikoarm. Da sie schon eine lange Zeit auf dem Markt sind, gibt es zum einen Generika, die sie relativ günstig machen und zum anderen sind sie sehr gut evaluiert. Östrogene sind wirkungsvolle Medikamente für postmenopausale Frauen. Sie wirken direkt am Osteozyten, Osteoklasten und Osteoblasten. Sie hemmen so die Resorption und verstärken den Knochenaufbau. Studien belegen einen deutlichen Anstieg der BMD und damit verbundene Risikoreduktion von Frakturen (Jackson 2006). Der selektive Östrogen-Rezeptor-Modulator Raloxifen, ist ebenso ein zugelassenes Medikament zur Behandlung der Osteoporose. Beide zeigen Nebenwirkungen wie thrombotische Ereignisse. Zudem erhöht Östrogen das Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Ein neueres Medikament ist der humane monoklonale Antikörper Denosumab. Er bindet am RANKL und verhindert so die Bindung am RANK. Dadurch wird auf molekularer Ebene die Differenzierung der Osteoklasten verhindert und so die Resorption vermindert. Denosumab zeigt nachweislich eine Reduktion des Frakturrisikos von vertebralem-, nichtvertebralem- und Hüftfrakturen

(Cummings 2009). Teriparatid ist ein aminoterminales Analogon des nativen Parathormons und erhöht die BMD. Die Risikoreduktion ist für vertebrale und nichtvertebrale Frakturen nachgewiesen, allerdings nicht für Hüftfrakturen. Dazu ist es nur für einen Therapiezeitraum von 2 Jahren zugelassen und die Wirkung lässt nach Absetzen des Medikaments schnell nach. Zudem wird berichtet, dass in Tierversuchen vereinzelt eine Osteosarkomentstehung diagnostiziert wurde (Orwoll 2003).

Strontiumranelat ist ein Strontiumsalz. Es steigert die Replikation von Osteoblasten und führt so zu einer vermehrten Synthese von Knochenkollagen. Gleichzeitig hemmt es die Osteoklasten Aktivität (Dimai 2005). Allerdings darf es nicht mehr angewendet werden, da die Behandlung mit Strontium eine signifikant höhere Anzahl an Myokardinfarkten und erhöhtes Auftreten von Thromboembolien zeigte (DVO 2014).

## 1.8 Bisphosphonate

Bei einem Versuch 1885 mit Phosphorsäure und Chloracetyl stellte der russische Chemiker N. A. Menshutkin (1842–1907) eine Substanz her, die er selbst als „acetopyrophosphorige Säure“ bezeichnete (Menschutkin 1885). Durch deren Weiterentwicklung entdeckten Fleisch et al. durch in vitro Versuche, dass sich durch Bisphosphonate das Auflösen von Hydroxylapatitkristallen verhindern lässt. Durch darauf folgende Tierversuche konnte er den Einfluss auf die Knochenresorption zeigen und ebnete so den Weg für die Entwicklung der heutigen Bisphosphonate (Fleisch et al. 1969, Francis et al. 1969). Heutzutage sind Bisphosphonate ein häufig verwendetes Medikament und für eine Reihe von Knochenerkrankung (M. Paget, osteolytische Knochenmetastasen, Tumor-assoziierte Hyperkalzämien) zugelassen. Die häufigste Indikation ist allerdings die postmenopausale oder glukokortikoidinduzierte Osteoporose (Scriba 2000).

Das am meisten verwendete Medikament in der Osteoporosebehandlung ist Alendronat (ALN). Es wird in einer Dosierung von 10mg täglich oder 70mg wöchentlich verwendet, da die Wirksamkeit bei 5mg geringer ist und bei 20mg keinen zusätzlichen Effekt bringt. Es erhöht signifikant die BMD und verringert die Inzidenz von osteoporosebedingten Frakturen (Lieberman 1995). In einer prospektiven randomisierten placebo-kontrollierten Blindstudie, der sogenannten „Fracture Intervention Trial“, wurde bei einer Behandlungsdauer von 3-4 Jahren eine

Risikoreduktion von 50% für vertebrale Frakturen und 55% für nichtvertebrale Frakturen nachgewiesen (Black et al. 1996, Cummings et al. 1998). Die Risikoreduktion korrelierte dabei negativ mit der BMD. Je niedriger die Ausgangs-BMD, desto größer die Risikoreduktion (Cummings et al. 1998). Oder anders ausgedrückt, umso höher der BMD-Anstieg, desto größer die Risikoreduktion (Hochberg 1999).

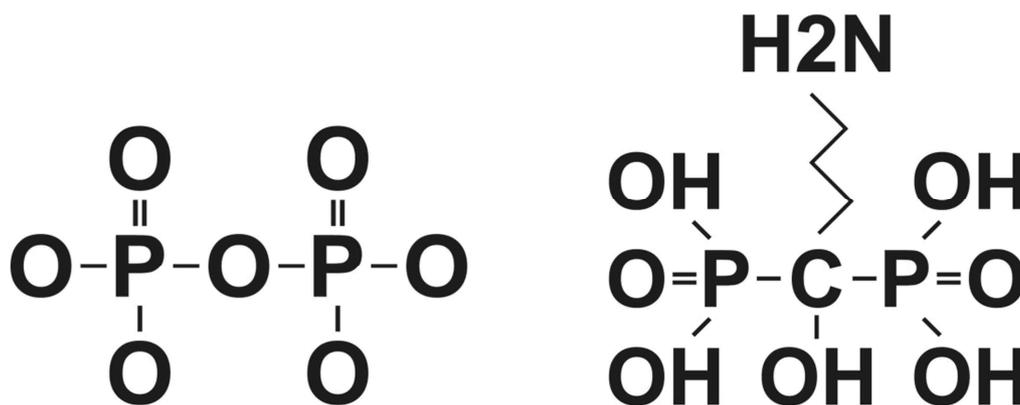
Der Haupteffekt der Alendronatbehandlung liegt in der kontinuierlichen Suppression der osteoklastären Knochenresorption. Das dadurch verminderte Frakturrisiko wird nach einer Behandlungsdauer von 12-18 Monaten statistisch signifikant (Black et al. 2000). Dies kann unter Umständen ein Problem darstellen, da die Compliance sehr gering ist. Nach einem Jahr nehmen nur noch ca. 40% der behandelten Patienten ihre Bisphosphonate regelmäßig. Dies führt zu einer Erhöhung der Behandlungskosten und bei Noncompliance zu einer Erhöhung des Frakturrisikos um 20% im Vergleich zu kontinuierlich behandelten Patienten (Modi 2015). Es gibt mittlerweile eine Reihe anderer Bisphosphonate mit unterschiedlichen Darreichungsformen, wie zum Beispiel monatliche Infusionen mit Zoledronat oder Tabletten (z. B. Alendronat, ALN), die nur einmal die Woche genommen werden müssen. ALN ist pharmakologisch so verändert worden, dass anstelle der vorher täglichen Dosis von 10 mg nun 70 mg einmal die Woche ausreichen. Dabei ist die Effektivität ebenso hoch, wie bei der täglichen Gabe (Rizzoli 2002).

Ein ganz anderes Anwendungsgebiet der Bisphosphonate ist die Diagnostik. Im Rahmen der Knochenszintigraphie dienen sie als sogenannter „Tracer“. Sie werden mit einem radioaktiven Stoff markiert, mit Technetium 99 (Tc-99-m). Durch die hohe Knochenaffinität werden die Bisphosphonate rasch aufgenommen und sind durch die Radioaktivität detektierbar. Somit lassen sich Knochenläsionen mit unterschiedlicher Stoffwechsellage sichtbar machen (Fleisch 2001).

### 1.8.1 Wirkungsmechanismus

Die von Menschutkin entwickelte Substanz, ist dem natürlich vorkommenden Pyrophosphat (PP) sehr ähnlich. Das PP ist eine anorganische Säure mit einem zentralen Sauerstoffatom (P-O-P) und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Kalzifikation, Mineralisation und Knochenresorption. Vermutlich schützt es auch das nicht mineralisierte Gewebe vor einer Kalzifikation (Russell und Fleisch 1975). Die P-

O-P-Bindung ist allerdings chemisch relativ instabil, sodass es als Therapeutikum ungeeignet wäre. Während der Entwicklung der Bisphosphonate wurde das zentrale Sauerstoffatom mit einem Kohlenstoffatom ersetzt und ist so vor einer chemischen und enzymatischen Hydrolyse geschützt. Alle heute gängigen Bisphosphonate besitzen somit eine P-C-P-Bindung als Grundstruktur (Abbildung 13). Durch die zwei Phosphatome erhalten die Bisphosphonate zwei wesentliche Eigenschaften, nämlich die Affinität zum Hydroxylapatit und die zellvermittelte antiresorptive Wirkung. Die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften, in Bezug auf die Affinität und antiresorptive Potenz, liegen in der unterschiedlichen Gestaltung der Seitenketten am zentralen C-Atom. Es liegen immer zwei Seitenketten vor, R1 und R2. R2 ist die entscheidende Kette, die die antiresorptive Potenz ausmacht. Nach dieser werden drei unterschiedliche Gruppen klassifiziert (Russel et al. 2008).



**Abbildung 13:** Chemische Formel von links: Pyrophosphat mit einem zentralen Sauerstoffatom (P-O-P) und rechts: Alendronat mit einem zentralen Kohlenstoffatom (P-C-P)

### **Stickstofffreie Bisphosphonate (Non N-BP)**

Zu den stickstofffreien Bisphosphonaten gehören Clodronat, Etidronat und Tiludronat. Nach der Aufnahme werden sie in ein nicht hydrolysierbares Analog des Adenosintriphosphat (Adenosin 5'-( $\beta,\gamma$ -dichloromethylene) triphosphat) metabolisiert (Frith et al. 1997). Durch die Akkumulation dieser zytotoxischen Metaboliten kommt es zur Apoptose der Osteoklasten und zum eigentlichen antiresorptiven Effekt (Frith et al. 2001).

### **Stickstoffhaltige Alkylaminobisphosphonate (Alkyl-N-BP)**

Zu den stickstoffhaltigen Aminobisphosphonaten gehören Alendronat, Ibandronat und Pamidronat. Der Hauptangriffspunkt ist die Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPPS). Sie ist eine wichtige Synthase im Mevalonatstoffwechsel und gut bekannt aus der Steroidsynthese. Durch die Hemmung dieser Synthase kommt es zum einen zu einer Akkumulation von Isopentenyl-diphosphaten (IPP) und zum anderen zu einer verminderten Synthese von Farnesyldiphosphaten (FPP) und Geranylgeranyldiphosphaten (GGPP). Durch die verminderte Synthese von FPP und GGPP können posttranslational die GTPase nicht mehr prenyliert werden. Da die GTPasen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion besitzen, wie etwa im Ras-Signalweg, sind sie essentiell für die Funktion und das Überleben der Osteoklasten. Die Akkumulation von IPP führt zu einer Vermehrung eines ATP Analogon, das zusätzlich die Apoptose der Osteoklasten induziert (Luckman et al. 1998, Dunford et al. 2001, Russel et al. 2008).

### **Heterozyklische Aminobisphosphonate (Heterozyklische N-BP)**

Zu dieser Gruppe der Aminobisphosphonaten gehören Risedronat und Zoledronat. Wie die anderen Aminobisphosphonate erzielen sie ihre Wirkung über die Hemmung der FPPS. Durch die zyklische Konfiguration der Seitenkette R<sub>2</sub>, erreichen sie allerdings eine deutlich höhere Affinität zum Hydroxylapatit (Nancollas et al. 2006, Russel et al 2008).

Die ossäre Aufnahme ist bei den meisten Bisphosphonaten sehr ähnlich. Durch die Affinität zum Hydroxylapatit gelangen sie überwiegend zu den Knochenzellen, insbesondere den Osteoklasten und bilden ein Komplex aus Kalzium und Knochenmatrixproteinen. Anschließend werden sie über Endozytose („fluid-phase endocytosis“) aufgenommen und liegen intrazellulär als Vesikel vor. Innerhalb dieser sogenannten Liposomen fällt der pH-Wert ab. Dieses saure Milieu ermöglicht den Übertritt der Bisphosphonate ins Zytosol. Von dort aus werden sie dann vermutlich in andere Zellorganellen aufgenommen (Thompson 2006).

Bisphosphonate unterscheiden sich, abgesehen von ihren unterschiedlichen Darreichungsformen und pharmakologischen Eigenschaften wie Plasmahalbwertszeit und Bioverfügbarkeit, auch in ihrer Affinität zum Hydroxylapatit. Daraus resultiert eine

Rangfolge für die einzelnen Bisphosphonate: Zoledronat > Pamidronat > Alendronat > Ibandronat > Risedronat > Etidronat > Clodronat. Aus dieser Rangfolge wird die deutlich höhere Affinität der stickstoffhaltigen Bisphosphonate (N-BP) erkennbar (Nancollas et al. 2006). Vergleicht man zusätzlich die Effizienz der Hemmung der FPPS von N-BP und die daraus resultierende antiresorptive Potenz (Zoledronat > Risedronat > Ibandronat > Alendronat > Pamidronat) wird erkennbar, dass die zyklische Konfiguration der Seitenkette nochmals zu einer deutlichen Steigerung der Effizienz führt (Dunford et al. 2001).

### 1.8.2 Nebenwirkungen

#### **Obere gastrointestinale Beschwerden**

Neben allgemeinen Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen und epigastrischen Schmerzen, kann es zu einer chemischen Ösophagitis kommen. Es entsteht zunächst eine allgemeine Entzündungsreaktion mit Verdickung der Schleimhaut. Im weiteren Verlauf kann es dann zu Erosionen und Ulzerationen kommen. Diese Nebenwirkung scheint stark assoziiert zu sein mit einer inkorrekten Anwendung und ösophagealen Vorerkrankungen wie Achalasie oder Reflux. Es wurden Einnahmehinweise konzipiert um das Risiko zu minimieren. Demnach muss die Einnahme 30 Minuten vor der ersten Mahlzeit mit mindestens 180- 240 ml Wasser eingenommen werden, damit sich keine Komplexe mit dem Kalzium aus der Nahrung bilden. 30 Minuten lang nach Einnahme sollte eine aufrechte Position eingehalten werden und bei ösophagealen Beschwerden die weitere Einnahme pausiert werden (de Groen et al. 1996, Papapetrou 2009). Bei korrekter Einnahme, zeigten Greenspan et al. sogar eine leicht geringere Häufigkeit (11%) von ösophagealen Nebenwirkungen bei Patienten die Bisphosphonate einnahmen als in der Placebogruppe (13%) (Greenspan et al. 2002).

#### **Akut-Phase-Reaktion**

Bei der intravenösen Gabe von N-BP kommt es bei 30-35% zu einer Akut-Phase-Reaktion. Klinisch ist sie charakterisiert durch Fieber und grippeähnliche Symptome wie Abgeschlagenheit, Muskel-, Gelenks- und Knochenschmerzen. Dabei ist das Ausmaß dosisabhängig und tritt meistens nach der ersten Infusion auf. Diese Reaktion ist in der Regel nach 2-3 Tagen selbstlimitierend und eine kontinuierliche

Weiterbehandlung ist ohne Bedenken möglich (Adami et al. 1987, Olson und van Poznak 2007). Weitaus häufiger zeigt das neuere Bisphosphonat Zoledronat eine Akut-Phase-Reaktion. Hier kommt es bei circa 70% aller Patienten bei der ersten Infusion zu einer akuten Reaktion meistens mit Fieber und Arthralgien (Santini et al. 2007).

### **Nephrotoxische Komplikationen**

Einige Fälle berichten über ein Auftreten von Nierenversagen nach intravenöser Gabe von Bisphosphonaten. Ein Entstehungsmechanismus könnte sein, dass sich Komplexe aus metallischen Ionen bilden, die in ihrer unlöslichen Form in der Niere akkumulieren und diese schädigen (Fleisch 2000). Neuere häufiger auftretende Fälle werden berichtet bei der intravenösen Gabe von Zoledronat (Beitz 2003).

### **Kieferosteonekrosen**

Bereits in den Jahren 1858-1906, lange vor dem Einsatz der heutigen Bisphosphonate, gab es eine Epidemie von Kieferosteonekrosen. Diese zu der Zeit als „phossy jaw“ bezeichneten Nekrosen, traten bei Arbeitern in Zündholzfabriken auf. Die sogenannten „Mixers“ oder „Dippers“ arbeiteten mit gelbem Phosphor (P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>), der mit H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> und gängigen Aminosäuren auf unserer Schleimhaut zu Bisphosphonaten reagieren, die chemisch fast identisch sind mit Alendronat oder Pamidronat (Marx 2008). Nach dieser Zeit gab es nur selten Fälle mit dieser Art von Osteonekrose. Seit 2002 gibt es wieder häufiger beschriebene Fälle dieser Art, besonders im Zusammenhang mit der intravenösen Gabe von Bisphosphonaten (Marx 2003, Ruggiero et al. 2004, Edwards et al. 2008).

Die American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons legte 2007 eine genaue Definition für die BRONJ (Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw) fest, um sie von anderen Erkrankungen mit ähnlicher Klinik zu unterscheiden. Nach der Aktualisierung 2014 liegt demnach eine BRONJ vor, wenn alle der folgenden Bedingungen zutreffen: 1) eine bestehende oder in der Vergangenheit liegende Behandlung mit antiresorptiven oder antiangiogenen Medikamenten; 2) freiliegender nekrotischer Knochen oder Knochen der über eine Fistel sondiert werden kann im maxillo-facialen Bereich seit mindestens 8 Wochen; 3) keine Bestrahlung in der Vergangenheit oder Metastasen in dieser Region (AAOMS 2007, AAOMS 2014). Das Risiko für eine BRONJ hängt dabei stark mit der Dauer der Behandlung zusammen.

Bei einer Dauer von < 12 Monaten lag das Risiko bei etwa 1,5% und nach 48 Monaten bei ca. 8%. Dazu kommt ein signifikant höheres Risiko bei Zoledronat. Außerdem hatten fast alle Patienten eine Zahnbehandlung in der Vergangenheit (Bamias et al. 2005).

Die Task Force of the American Society for Bone and Mineral Research ermittelte aus den bis dato vorliegenden Daten ein Risiko, bei einer oralen Behandlung mit Bisphosphonaten, zwischen 1/10000 bis <1/100000 pro Patient und Behandlungsjahr. Im Gegensatz dazu liegt das Risiko bei einer intravenösen Hochdosistherapie bei 1-10/100 in Abhängigkeit der Therapiedauer. Die intravenöse Therapie ist also ebenso wie die Therapiedauer als wichtiger Risikofaktor zu betrachten (Khosla et al. 2007, Bamias et al. 2005). Darüber hinaus gelten weitere orale Erkrankungen, wie Abszesse oder chronische Entzündungen, Diabetes mellitus, Glukokortikoidtherapie, Rauchen, Alkohol und ein schlechter Zahnstatus mit ungenügender Mundhygiene als potentielle Prädiktore (AAOMS 2007).

Die Ursache einer BRONJ Manifestation wird zurzeit kontrovers diskutiert. Ein Erklärungsversuch ist die Akkumulation von Bisphosphonaten im Knochen, die direkt toxisch auf das umgebende Gewebe wirken und es so zu Wundheilungsstörungen nach oralen Eingriffen oder zu einer sehr starken Hemmung der Osteoklasten und Induktion der Apoptose kommt. Die dadurch unterdrückte Knochenheilung könnte eine Osteonekrose begünstigen (Reid et al. 2007). Eine andere Hypothese beschreibt die, vor allem bei den neueren Bisphosphonaten auftretende, antiangiotische Wirkung. Bei Untersuchungen von Gewebeproben von BRONJ Patienten und Kontrollen, zeigte sich eine ähnlich starke Vaskularisation, allerdings mit stark reduzierter Neoangiogenese (Wehrhan et al. 2011). Dieser Befund wird unterstützt, wenn man den VEGF (Vascular endothelial growth factor) betrachtet. Nach der Gabe von Zoledronat, verringerte sich dosisabhängig die Sekretion von VEGF (Di Salvatore et al. 2011). Somit ist die Annahme, dass es bei einer verminderten Neoangiogenese zu einer avaskulären Osteonekrose kommen kann durchaus nachvollziehbar, zumal sie auch mit anderen antiangiösen Medikamenten im Zusammenhang steht.

Andere Nebenwirkungen sind Augenentzündungen wie zum Beispiel die Retinitis, Skleritis oder Uveitis. Diese Nebenwirkungen sind überwiegend assoziiert mit Pamidronat (Frauenfelder et al. 2003). Die Food and Drug Administration (FDA)

warnen vor muskuloskelettalen Schmerzen. Diese können nach Tagen, Monaten oder Jahren auftreten. Es kann außerdem zu einer Hypokalzämie und einem sekundären Hyperparathyreodismus kommen. Im Normalfall wird das fehlende Kalzium durch das erhöhte PTH wieder ausgeglichen und pendelt sich wieder ein (Papapetrou 2009). Im Rahmen der „HORIZON-Studie“ wurde eine signifikante Erhöhung der Inzidenz von Vorhofflimmern beobachtet. Es gibt derzeit keine Studie, die den Mechanismus genau erklären kann. Ein Erklärungsversuch könnte der Kalziumspiegel sein, der nach der Gabe allerdings nur leicht oder gar nicht erhöht war (Black et al. 2007). Eine weitere, kontrovers diskutierte Nebenwirkung sind die atypischen Frakturen des proximalen Femurs.

### 1.9 Atypische Femurfraktur

Das erste zugelassene Bisphosphonat war Etidronat. Es kam in Deutschland im Frühjahr 1996 zur Behandlung der Osteoporose auf den Markt. In den folgenden Jahren wurde die Wirksamkeit in großen randomisierten Studien bewiesen (Black et al. 1996, Cummings et al. 1998, Black et al. 2000). Heute sind die Bisphosphonate führend in der Osteoporosebehandlung. Langezeit waren die Auswirkungen der Langzeittherapie ungewiss und sind bis heute nicht vollständig verstanden. Man vermutete, dass der unterdrückte Knochenumsatz (severe suppression of bone turnover, SSBT) langfristig zu einer Verminderung der Knochenfestigkeit führt (Ott 2001). 2005 wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen einer Langzeittherapie mit Bisphosphonaten und atraumatischen nicht vertebrealen Frakturen postuliert. Aus Knochenbiopsien wurde ein SSBT diagnostiziert und bei anhaltender Bisphosphonattherapie eine verzögerte oder ausbleibende Frakturheilung beobachtet (Odvina et al. 2005). Die proximale Femurfraktur geriet immer mehr in den Fokus. Patienten berichteten bei dieser neuen Art von insuffizienter Femurfraktur von einem prodromalen Schmerzereignis 2 bis 6 Monate vorher und es wurde eine laterale Hypertrophie der Kortikalis bemerkt. Teilweise zeigte sich auch eine Stressreaktion der kontralateralen Kortikalis (Goh et al. 2007).

Lenart et al. brachten die atypischen Femurfrakturen mit einem besonderen radiologischen Muster in Zusammenhang, welches fast ausschließlich bei Patienten unter Bisphosphonattherapie beobachtet wurde und definierten sie als eine atypische Low-Energy Fraktur. Darunter versteht man eine Fallhöhe aus dem Stand oder

darunter (Lenart et al. 2008). Zusätzlich bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Therapiedauer, sodass man von einer erheblichen Steigerung des Risikos für atypische Femurfrakturen bei einer Therapiedauer über 4-5 Jahren ausging (Neviaser et al. 2008, Lenart et al. 2009). Um atypische Femurfrakturen in zukünftigen Studien einheitlich zu definieren erarbeitete die „Task Force of the American Society for Bone and Mineral Research“ 2010 aus den vorliegenden Beobachtungen folgende einheitliche Merkmale einer atypischen Femurfraktur.

#### Hauptmerkmale:

Unterhalb des Trochanter minor und oberhalb der Condylen, atraumatisch oder Trauma mit geringer Intensität aus Standhöhe oder darunter, Quer- oder Schrägfraktur ( $<30^\circ$ ), kein Trümmerbruch, Fraktur mit einem medialen dornartigen oder schnabelartigen Ausriss (Shane et al. 2010) (Abbildung 14).

#### Nebenmerkmale:

Verdickung der Kortikalis, laterale periostale Reaktion, prodromale Symptome, verzögerte Heilung, Medikamente (Glukokortikoide (GC), Protonpumpeninhibitoren (PPI)), Komorbiditäten wie Vitamin D Mangel oder Rheumatoide Arthritis (RA) (Shane et al. 2010).



**Abbildung 14:** Darstellung einer atypischen Femurfraktur. Patientin, 69 Jahre mit bekannter Osteoporose und einer Behandlungsdauer mit Alendronat von etwa 5 Jahren, stürzte am Rollator auf die linke Seite (mit freundlicher Genehmigung des Klinikum LdW Bremen).

### 1.9.1 Risiko und Entstehungshypothesen

Die Fragen nach dem eigentlichen Risiko einer atypischen Fraktur in Bezug auf die Bisphosphonattherapie und dem Zusammenhang mit der Therapiedauer wird kontrovers diskutiert und variiert in der Literatur. Das Risiko einer proximalen Femurfraktur liegt bei 400-600/100000 (Nieves et al. 2010). Im Vergleich dazu variiert das Risiko einer atypischen Femurfraktur von 1/100000-5/10000. Das entspricht etwa 5 atypischen Frakturen von 1000 Femurfrakturen. Diese sind somit insgesamt selten (Feldstein et al. 2012, Schilcher et al. 2014, Black und Rosen 2016).

Viele Studien zeigen eine Assoziation mit der Therapie von Bisphosphonaten und das gehäufte Auftreten von atypischen Femurfrakturen (Odvina et al. 2005, Goh et al. 2007, Neviasser et al. 2008, Lenart et al. 2008, Lenart et al. 2009, Abrahamsen et al. 2010), aber nicht alle kommen zu ähnlichen Ergebnissen (Black et al. 2010, Feldstein

et al. 2012). Dazu kommt eine signifikante Steigerung des Risikos nach etwa 5 Jahren Bisphosphonattherapiedauer (Lenart et al. 2008, Neviaser et al. 2008, Lenart et al. 2009, Park-Wyllie et al. 2011). Aber auch dieses konnte nicht in allen Studien belegt werden (Abrahamsen et al. 2010, Black et al. 2010).

Man erkennt, dass eine genaue Risikoabschätzung schwer auszumachen ist, zumal die genaue Ursache noch völlig ungeklärt ist. In der Vorstellung, dass es bei einer Behandlung mit Bisphosphonaten zu einer SSBT und einer verzögerten Heilung kommt (Odvina et al. 2005), geht man von einer Akkumulation von MC`s aus, da die physiologisch entstehenden MC`s nicht mehr repariert werden können. Es ist bekannt, dass eine Akkumulation von MC`s zu einer Verminderung der Knochenfestigkeit führt (Boivin et al. 2000, Roschger et al. 2001, Nyman et al. 2004). Tierversuche haben gezeigt, dass es tatsächlich zu einer Akkumulation von MC`s kommt. Außerdem zeigte sich eine Verminderung der mechanischen Eigenschaften (Mashiba et al. 2000, Mashiba et al. 2001). Dies geschah allerdings bei einer 5x höheren Dosis als sie beim Menschen angewandt werden. Später wurde es nochmal mit äquivalenten Dosen untersucht, indem ebenfalls eine Akkumulation beobachtet wurde, allerdings ohne Beeinträchtigung der mechanischen Eigenschaften (Allen et al. 2006). Trotz der angepassten Dosis ist die Übertragbarkeit auf den Menschen beschränkt.

Später wurden Knochenbiopsien von Frauen mit postmenopausaler Osteoporose unter Bisphosphonattherapie von >3 Jahren aus dem Beckenkamm genommen und untersucht. Man konnte einen Zusammenhang zwischen einer Akkumulation von MC`s, Alter und einer verminderten BMD feststellen (Stepan et al. 2007), allerdings keine Beziehung zwischen Bisphosphonatbehandlung und Akkumulation von MC`s. Die Beeinträchtigung mechanischer Eigenschaften konnte ebenfalls nicht aufgezeigt werden (Chapurlat et al. 2007).

In neueren Untersuchungen wurden Wirbelkörper posthum von Patientinnen mit Osteoporose untersucht. Dabei wurde unterschieden zwischen unbehandelt, mittlerer Behandlungsdauer (1-5 Jahren) und einer Langzeitbehandlung (>5 Jahre). Auch hier wurde keine Akkumulation von MC`s oder Beeinträchtigung der mechanischen Eigenschaften beobachtet (Krause et al. 2014). Der genaue Pathomechanismus ist also noch lange nicht verstanden und erschwert die Einschätzung der aktuellen Datenlage.

## 1.10 Zielsetzung der Arbeit

Ungefähr 6 Mio. Menschen in Deutschland leiden unter Osteoporose. Etwa 50% der Patienten erleiden osteoporoseassoziierte Frakturen, die von Immobilität bis zur erhöhten Mortalität schwerwiegende Folgen haben können (Pollähne und Minne 2001). Bisphosphonate reduzieren nachweislich das Risiko der Manifestation vertebraler Frakturen um 50% und nichtvertebralen Frakturen um bis zu 55% (Black et al. 1996, Cummings et al. 1998). Aktuell sind Bisphosphonate die am häufigsten verschriebene Medikamentengruppe in der Osteoporosebehandlung. Die häufig im Zusammenhang mit der Bisphosphonattherapie beobachtete atypische Femurfraktur und die kontrovers diskutierte Datenlage wirft besonders bezüglich der Pathogenese viele Fragen auf. In Tierversuchen ist eine Akkumulation von MC`s unter Bisphosphonattherapie gut dokumentiert (Mashiba et al. 2000, Mashiba et al. 2001, Allen et al. 2006). Untersuchungen beim menschlichen Knochen sind dagegen unzureichend und deuten eher auf eine andere Pathogenese hin (Stepan et al. 2007, Chapurlat et al. 2007). Neuere Untersuchungen am spongiösen Wirbelkörperknochen posthum zeigen weder eine Akkumulation von MC`s noch eine Beeinträchtigung mechanischer Eigenschaften (Krause et al. 2014). Diese Untersuchungen beziehen sich alle auf spongiösen Knochen und es gibt keine Untersuchungen im humanen kortikalen Knochen, bezogen auf eine Bisphosphonattherapie bei Patienten mit Osteoporose. Die atypischen Femurfrakturen treten häufig subtrochantär auf, zudem ist die Belastung dort am höchsten (Pauwels 1948). Es wird außerdem über eine Verdickung der Kortikalis unter Bisphosphonattherapie berichtet (Goh et al. 2007, Lenart et al. 2008). Möglich wäre, dass es durch die Belastung am Femur und durch die Bisphosphonattherapie zu einer Akkumulation von MC`s in der Kortikalis kommt, die das Risiko einer atypischen Femurfraktur erhöht.

Die Zielsetzung der Arbeit besteht in der Aufklärung der Frage, ob es im Rahmen einer Langzeit-Bisphosphonattherapie zu einer Akkumulation von MC`s in der Substantia compacta des Femurs unterhalb des Trochanter minors kommt. Das Ergebnis dieser Untersuchung kann einen Teil der kontrovers diskutierten Meinung zur Pathogenese der atypischen Femurfrakturen beitragen und neue Erkenntnisse zur allgemeinen Auffassung der Langzeit-Bisphosphonattherapie bringen.

## 2. Material und Methoden

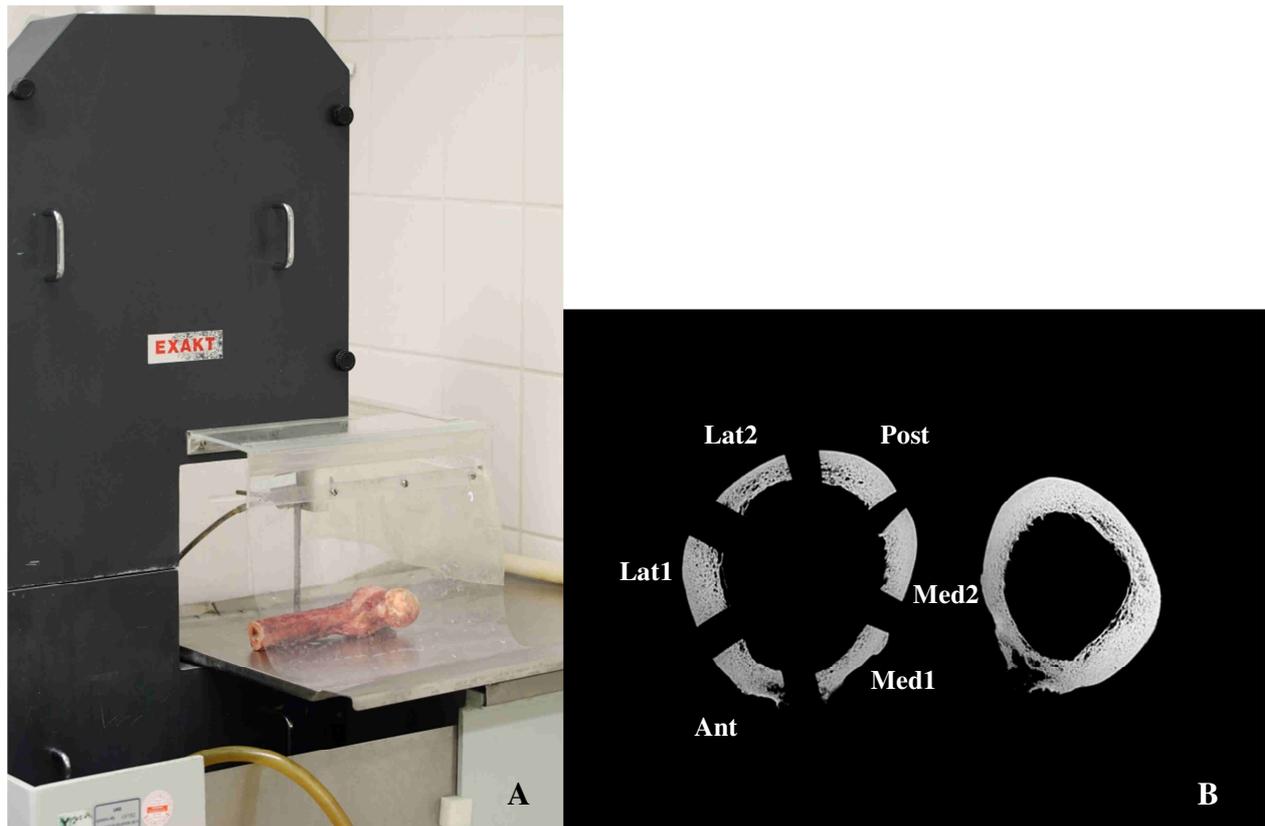
### 2.1 Material

Es wurden proximale Femurproben von 33 Patientinnen aus der ex vivo „Biomechanically founded individualized osteoporosis assessment and treatment (BioAsset)“-Studie verwendet, um an der Kortikalis des Femurknochens eine Analyse der Mikrofrakturen durchzuführen. Die Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer stimmte dieser Untersuchung zu (PV3486). Die Einwilligung für die Probenentnahmen und der Verwendung der Krankendaten wurde von den Angehörigen, nach ausführlicher Aufklärung über den Inhalt dieser Studie, eingeholt. Im Institut für Rechtsmedizin der Universität Hamburg wurden die Proben im Rahmen der Autopsie gewonnen und für die weiteren Untersuchungen dem IOBM (Institut für Osteologie und Biomechanik) zur Verfügung gestellt. Bei allen Patientinnen ergab eine DXA-Untersuchung am Lendenwirbelkörper L1-L4 und am Femurknochen die Manifestation einer postmenopausalen Osteoporose entsprechend den standardisierten WHO-Kriterien und einem aBMD T-Score von  $<-2,5$  SD. Ausgeschlossen wurden Patientinnen mit malignen Knochenerkrankungen, Niereninsuffizienz III° oder Nierentransplantation, bestehende Immobilität über ein Jahr, andere antiresorptive Medikamente zur Behandlung von Osteoporose oder eine Bisphosphonattherapie unter einem Jahr.

#### 2.1.1 Gewinnung der Probe

Nach der Autopsie wurde das entnommene rechte und linke Femur zur weiteren Bearbeitung im IOBM bei ca.  $-23$  °C tiefgefroren gelagert. Zunächst wurde mit einer Knochenbandsäge (EXAKT 310 CP mit Exakt Diamanttrennband 0,3 mm D64, EXAKT-Apparatebau, Norderstedt, Deutschland), im gefrorenem Zustand, eine Scheibe von etwa 0,6 cm Dicke kurz unterhalb (ca. 3 cm) des Trochanter minors herausgeschnitten. Dabei wurde besonders auf eine saubere Schnittführung geachtet. Mit Hilfe einer Wasserspülung während des Sägevorganges, wurden die Hitzeentwicklung und die Reibungsenergie minimiert, wodurch die artifizielle Erzeugung von MC`s verringert wurde. Anschließend wurde der gewonnene

Femurring in 6 gleichgroße Stücke aufgeteilt. Daraus ergaben sich 1x Anterior (Ant), 1x Posterior (Post) und jeweils 2x Medial (Med) und Lateral (Lat) (Abbildung 15). Es entstanden so jeweils 6 Proben pro Patientenfall und damit insgesamt 174 Proben. Diese wurden über mindestens 3 Tage in Ethanol (80%) eingelegt und aufgetaut.

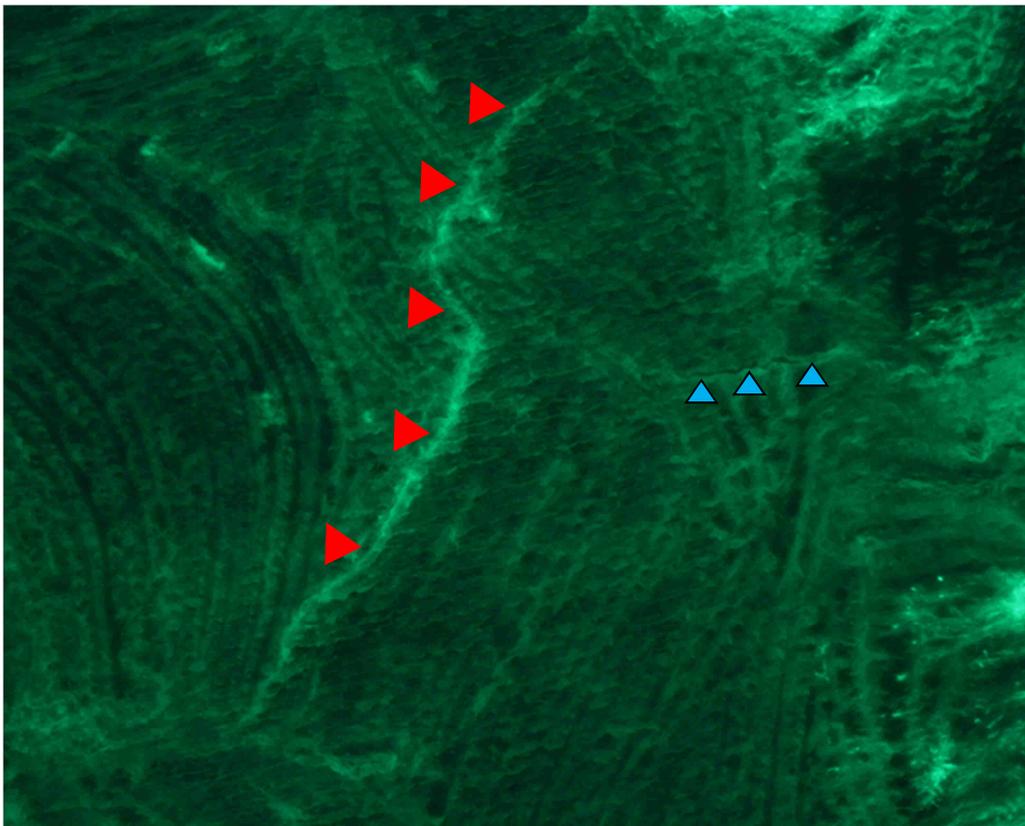


**Abbildung 15:** A: Schneidevorgang an der Knochenbandsäge, B: Radiologische Darstellung des entstandenen Femurrings (rechts), in 6 Teile geschnitten (links) und nach Lokalisation beschriftet.

### 2.1.2 Färbung

Um in der weiteren Herstellung entstehende MC`s zu unterscheiden, wurden die Proben nach der Gewinnung direkt gefärbt. Somit sind alle MC`s, die im folgenden Prozess entstehen nicht mit angefärbt und histologisch unterscheidbar (Abbildung 16). Es erfolgte zunächst eine Rehydrierung mit einer 0,9% Kochsalzlösung (Braun) für mindestens 4 Stunden. Danach folgte die eigentliche Färbung mit Calcein. In einem Versuch mit unterschiedlichen Färbungen, wie zum Beispiel Fuchsin, Calcein, Alizarin u. a., zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Lokalisation, Länge oder Dichte der MC`s und sind somit gleichwertig anzusehen (Lee et al. 2000).

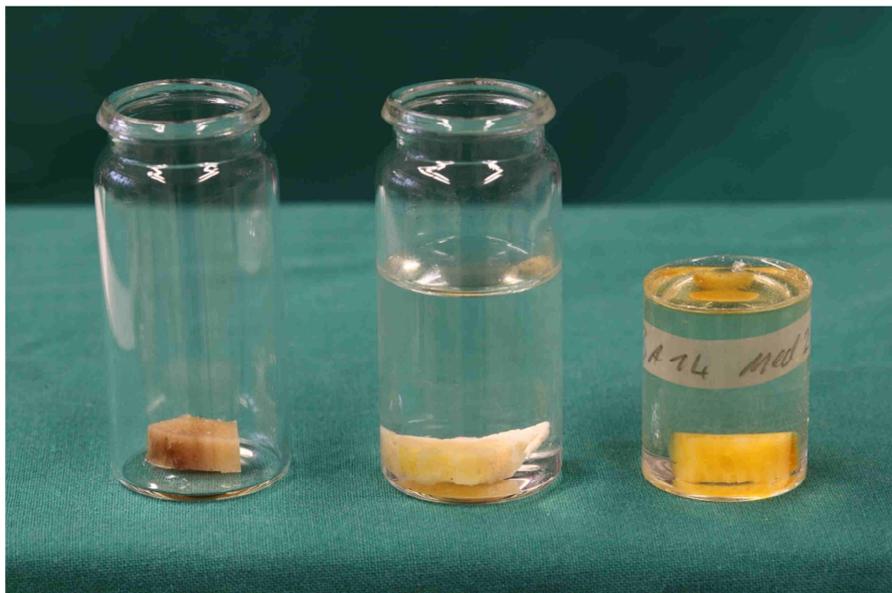
In einer eigenen Versuchsreihe wurde die optimale Färbedauer von 105 Minuten ermittelt. Die Proben wurden lichtundurchlässig verpackt, mit einer Calcein-Lösung (Konzentration 0,3g Calcein, 0,6g Natriumbicarbonat und 0,26g Natriumchlorid pro 100ml) vollständig bedeckt und unter Vakuum (20mmHg) für 105 Minuten gefärbt. Anschließend wurden die Proben mit destilliertem Wasser abgespült und für 10 Minuten in ein Wasserbad aus destilliertem Wasser gelegt, um das Calcein vollständig zu entfernen. Aufgrund der Dichte des kompakten Knochens und der geringen Knochenoberfläche wurde dieser Vorgang im Anschluss wiederholt. Um eine optimale Kunststoffeinfettung zu gewähren und das Gewebe zu entfetten, mussten die Proben entwässert werden. Dazu wurden sie in eine aufsteigende Alkoholreihe (80%, 96%, 100%) getaucht. Dies geschah mit Hilfe eines Autotechnikons (Firma Bavimed, Modell 2052/2, Standard-Gewebeeinbettautomat, Deutschland) über insgesamt 12 Stunden.



**Abbildung 16:** Gegenüberstellung von einem gefärbten in vivo entstandenen MC (▶) und im Herstellungsprozess entstandener ungefärbter MC (▲).

### 2.1.3 Makroskopische Aufarbeitung

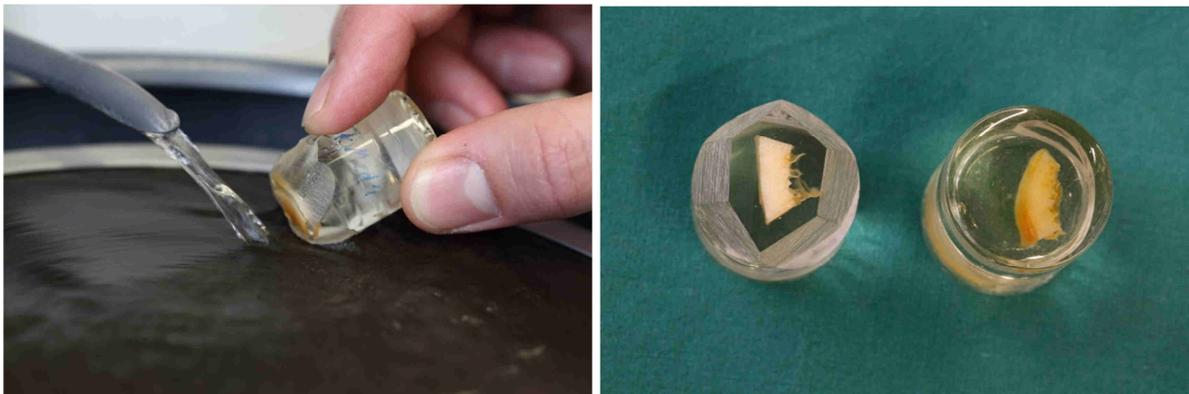
Für die Kunststoffeinfettung wurden die Proben in eine Infiltrationslösung I, ein Gemisch aus 1000 ml entstabilisiertes Methylmethacrylat (MMA) (Merck 800590), 3,3 g Benzoylperoxid (BPO) (Merck 801641) und 100 ml Nonylphenylpolyethylenglycolacetat (NPA) für 24 Stunden getaucht. Im Anschluss folgten weitere 48 Stunden in einer Infiltrationslösung II (Anstatt 3,3 g sind hier 6,6 g BPO gelöst). Um eine vorzeitige Polymerisation zu verhindern, erfolgte die Infiltration bei +4 °C. Durch die lange Infiltrationszeit des flüssigen Kunststoffes MMA ist eine spannungsfreie Polymerisation möglich und verhindert spannungsbedingte Risse der Probe. Nach abgeschlossener Infiltration schließt sich die Polymerisation an. Dazu wurde das Gewebe unter behutsamer Vorgehensweise in ein Rollrandglas (Rotilabo®-Rollrandgläser 25 ml) gelegt und mit Gießlösung (1000 ml MMA, 6,6 g BPO und 100 ml NPA) großzügig bedeckt (ca. 20 ml). Dabei wurde der Knochen mit seiner breiten Fläche (entspricht einer cranio-caudalen Ausrichtung) im Gefäß zentral platziert. Um die Polymerisation zu starten wurden 1000 µl Starterflüssigkeit (N, N Dimethyl-p-Toluidin, DMPT) (Merck 822040) verwendet. Eine langsame schonende Aushärtung wurde gewährleistet, indem die Gläser luftdicht in ein +4 C° kaltes Wasserbad gestellt wurden. Nach 24 Stunden konnte der vollständig ausgehärtete Kunststoff aus den Gläsern entfernt und von Glasresten befreit werden (Abbildung17).



**Abbildung 17:** Die Probe wird im Rollrandglas zentriert platziert (links) und mit Gießlösung aufgefüllt (Mitte). Nach der Aushärtung wird der zylindrische Acrylatblock vom Glas befreit (rechts).

## 2.1.4 Histologische Aufarbeitung

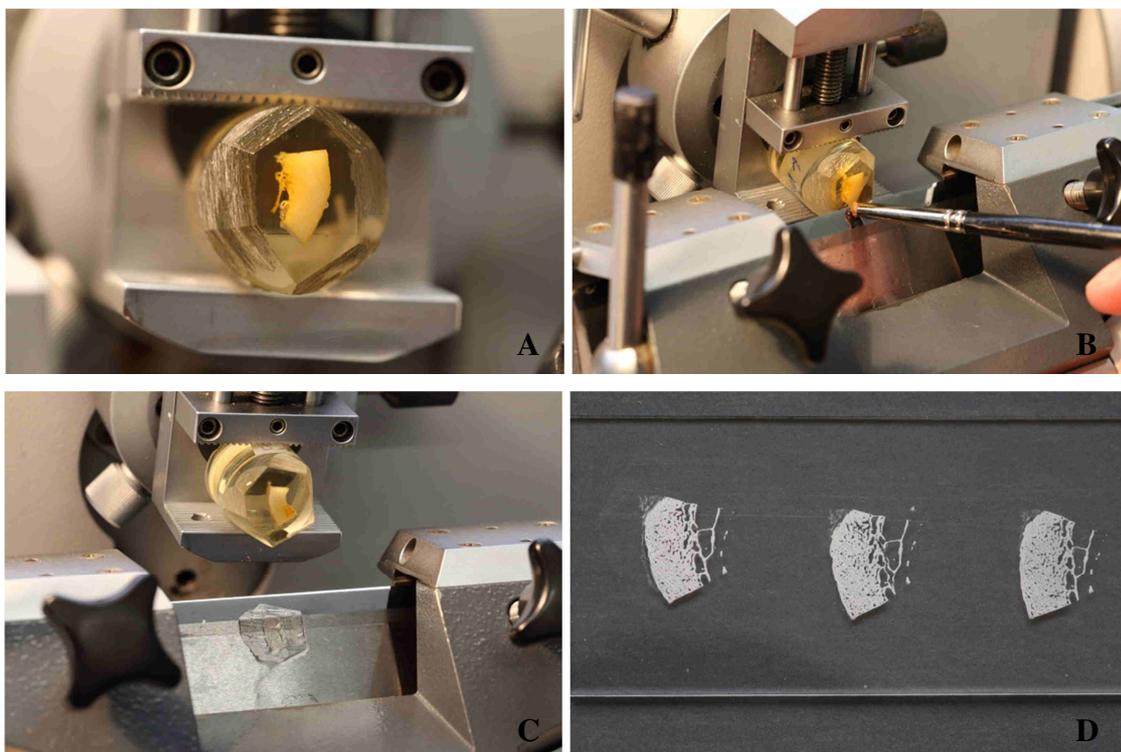
Die so entstandenen zylindrischen Acrylatblöcke ermöglichten es histologische Schnitte mittels Microtom anzufertigen. Zunächst wurden sie allerdings hexagonal geschliffen, um eine möglichst kleine und plane Fläche zu schaffen (Abbildung 18). Dies ermöglichte einen reibungsarmen Schnitt und verminderte so die Anzahl der Schnittartefakte. Geschliffen wurde mit einer Handschleifmaschine (Buehler, Modell: Phoenix Alpha 49-5500-230 Grinder Polisher, Deutschland) und einem Nassschleifpapier (Hermes, Modell: BW 110, Deutschland, Körnung/80) unter laufender Wasserkühlung, um die künstliche Rissentstehung zu minimieren. Zusätzlich wurde ca. 0,5 mm der Knochenoberfläche weggeschliffen, um eventuell während des Sägevorgangs entstandene MC`s zu entfernen.



**Abbildung 18:** Anfertigung des hexagonalen Schliffes unter laufender Wasserkühlung.

Die histologischen Schnitte wurden an einem Rotationsmicrotom (Reichert-Jung, Modell: Mod 1140/ Autocut, Deutschland) hergestellt. Dazu wurde der ganze Acrylatblock ins Microtom fest eingespannt, um ein Verrutschen in der Schnittebene zu verhindern. Als erstes wurden ca. 125  $\mu\text{m}$  in 10x10  $\mu\text{m}$  und 5x5  $\mu\text{m}$  Schnitte entfernt, um Schliffurchen und andere künstlich entstandene Risse zu entfernen. Als zweites folgten die eigentlichen Schnitte von 3x5  $\mu\text{m}$ . Sie wurden mit Hilfe eines feinen Pinsels auf einen Objektträger gezogen (Abbildung 19). Dieser Prozess fand unter stetiger Verwendung von reichlich Schneideflüssigkeit (WIV, Modell: WIV Schneideflüssigkeit, Deutschland) statt, um einen sauberen, flüssigen und reibungsarmen Schnitt herzustellen. Dies war wichtig, um die Anzahl von Schnittartefakten im Schnitt zu minimieren. Hier erfolgte eine erste Bewertung der

Qualität der Schnitte, die bei Bedarf wiederholt wurden. Bei guter Qualität wurden konsekutive Schnitte verwendet. Anschließend wurden die Schnitte mit Alkohol benetzt (Ethanol 96%). Dies macht sie elastischer und ermöglichte das Strecken der Schnitte, um entstandene Falten zu glätten. Wurde der Schnitt zu dem Zeitpunkt nicht beschädigt, folgte eine Abdeckung des Objektträgers mit einer Kunststoffolie. Überflüssiger Alkohol wurde mittels Trockenblock entfernt. Im letzten Schritt wurden die Objektträger mit einer Objektträgerpresse in einem Autoklaven (Thermo Scientific, Modell: Kelvitron t, USA) bei 60 °C über 24 Stunden gepresst und getrocknet.



**Abbildung 19:** A: Einspannen des Acrylatblockes in die Halterung. B und C: Beim Herunterfahren der Halterung schneidet die Klinge einen 5 µm dicken Schnitt, der mit Hilfe eines Pinsels auf die Klinge gezogen wird. D: Anschließend wird der Schnitt auf einen Objektträger gezogen und in der Objektträgerpresse getrocknet.

## 2.2 Methode

Die Analyse der Proben zur Evaluierung der MC's erfolgte durch Fluoreszenzlichtmikroskopie (Zeiss, Modell: Axio Scope.A1, Jena) in abgedunkelter Umgebung (Huja et al. 1999). Die drei Schnitte auf einem Objektträger wurden

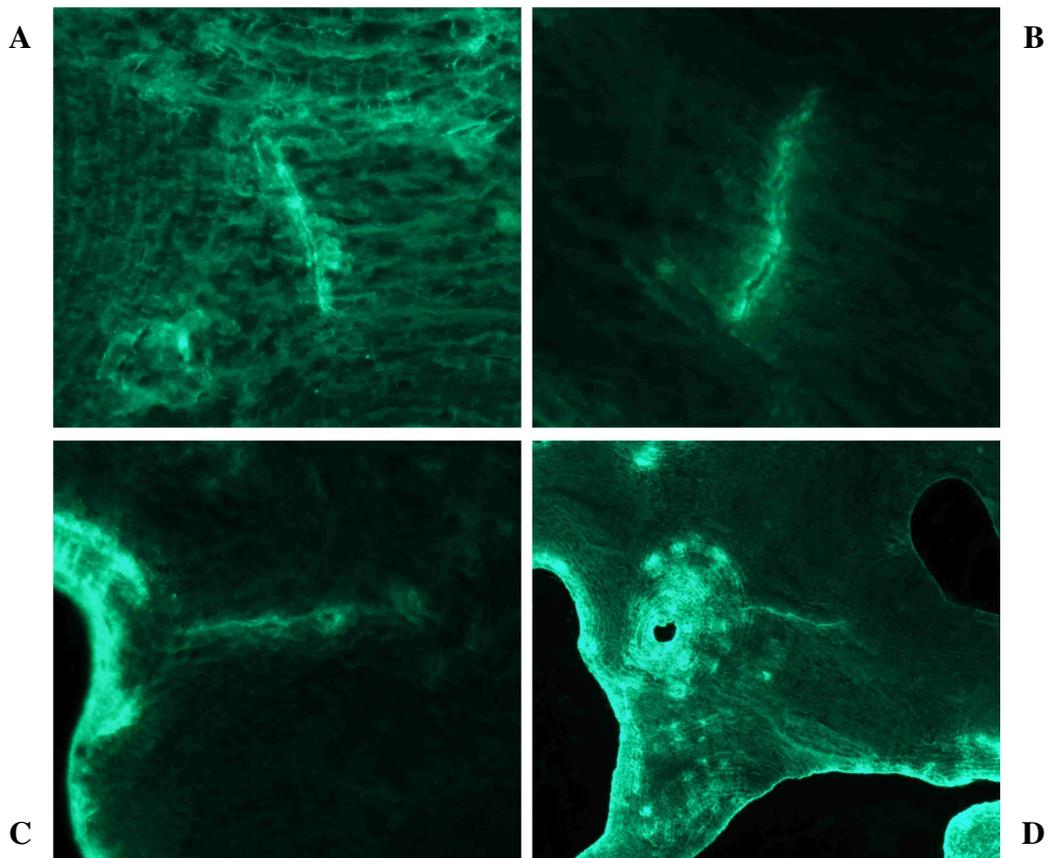
anfangs bei 10x Vergrößerung auf ihre Qualität untersucht. Danach wurde der Schnitt mit der höchsten Qualität bei einer 100x Vergrößerung von oben nach unten gerastert und immer ein halbes Sichtfeld zur Seite verschoben. Bei Verdacht auf einen MC, wurde diese Region (Regio of Interest, ROI) bei 200x Vergrößerung überprüft. Es wurde eine Gesamtfläche (Tissue area, TA [mm<sup>2</sup>]) der ROI von 0,3125 mm<sup>2</sup> mit Osteomeasure (OsteoMetrics, USA) vermessen und die darin enthaltene Knochenfläche (Bone Area, BA [mm<sup>2</sup>]) ermittelt. Außerdem wurde die Anzahl von MC's (Number of Cracks, Cr.N., [n]) innerhalb einer Probe notiert und die Gesamtlänge (Crack length, Cr.Le., [mm]) vermessen. Aus den vorliegenden Daten wurden anschließend die Rissdichte (Crack density, Cr.D., [n/mm<sup>2</sup>]) und die Rissoberflächendichte (Crack surface density, Cr.s.D., [mm/mm<sup>2</sup>]) errechnet. Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte extern, mit IBM® SPSS® Statistics Version 21. Es wurden die erhobenen Daten (Cr.s.D, Cr.D, Cr.Le, Cr.N) mit den einzelnen Gruppen je nach Behandlungsdauer (Kontrollgruppe, mittlere Behandlungsdauer und Langzeitbehandlung) im Rahmen einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) miteinander verglichen. Dies geschah innerhalb der einzelnen Lokalisationen (Anterior, Posterior, Medial 1, 2 und Lateral 1, 2) und des gesamten Patientenfalles. Somit konnte eine Aussage getroffen werden, ob es bei unterschiedlicher Behandlungsdauer vermehrt zu MC's kommt und ob eine bestimmte Region verstärkt betroffen ist. Außerdem wurden die Medianwerte gebildet und ein Boxplot erstellt. Alle statistischen Untersuchungen erfolgten bei einem Signifikanzniveau von 5%.

### 2.2.1 Identifizierung von Microcracks

Die Identifizierung der MC's erfolgte anhand der gängigen Kriterien nach Burr und Stafford (Burr und Stafford 1990, Aruwajoye et al. 2013):

1. Mikrorisse sind kleiner als vaskuläre Kanäle aber größer als Canaliculi.
2. Mikrorisse besitzen klare, scharfe Kanten und heben sich in unserem Fall durch helles Calcein-Leuchten von der Umgebung ab (Abbildung 20).

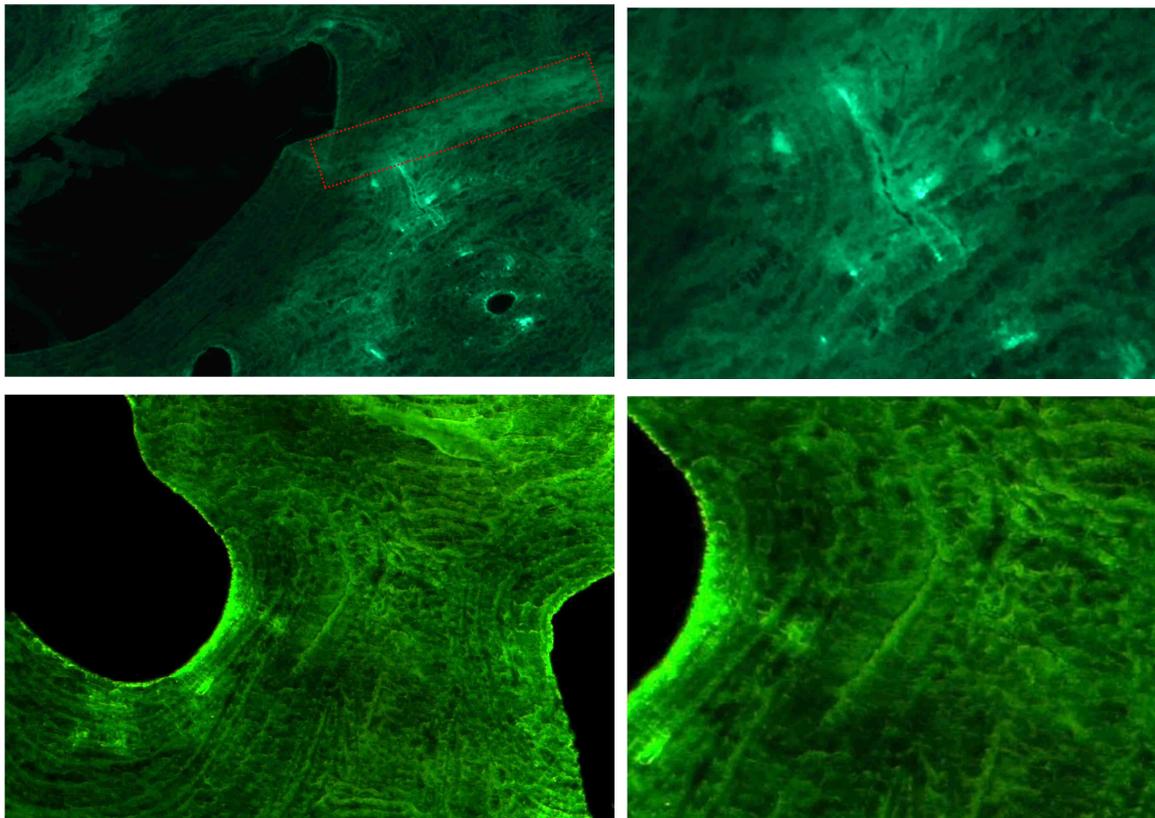
3. Bei Veränderung des Fokus kann eine höhere Tiefenfärbung der Risskante als in dem dazwischenliegenden Raum erkannt werden.



**Abbildung 20** : Beispiele für eindeutige MC`s nach der Definition von Burr und Stafford, Fluoreszenzmikroskopie, Calceinfärbung A: 200x Vergrößerung, B: 200x Vergrößerung, C: 200x Vergrößerung, D: 100x Vergrößerung.

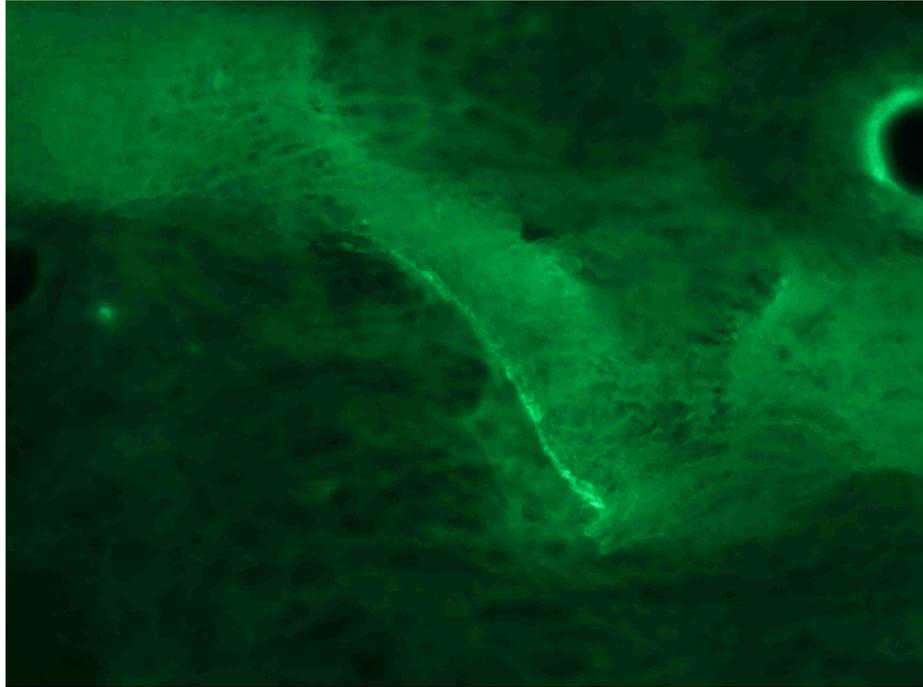
Da nicht alle MC`s eindeutig zu identifizieren waren, wurden ergänzend Nebenkriterien entwickelt, um eine höhere Sicherheit bei der Identifizierung zu gewinnen. Zunächst wurde geprüft, ob ein verwertbarer Bereich vorliegt. Ausgeschlossen wurden Bereiche mit Falten (Abbildung 21), Risse des Schnittpräparates oder Überlagerungen von ausgerissem Material. Außerdem wurden Risse mit Verbindung zum Kantenbereich nicht bewertet. Da es bei einem 5  $\mu\text{m}$  Schnitt häufig zu einem dunklen Risslumen kommt, war es wichtig, dass beide Risskanten gefärbt waren (Farbreihenfolge: Grün-Schwarz-Grün). Ein Riss wurde als MC gewertet, wenn er keiner anatomischen Struktur folgte, da es im Schnittprozess zu einer „Raffung“ kommen kann, sodass zum Beispiel eine Lamelle eines Osteons ein verstärktes Calcein-Leuchten aufweist. Wenn hinter der „Raffung“ ein Riss

entsteht, entstand eine typische Farbreihenfolge, die nicht als MC gewertet wurde (Farbreihenfolge: Normal-Schwarz-Grün) (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Darstellung eines echten MC`s mit der Farbreihenfolge Grün-Schwarz-Grün (obere Reihe links und Vergrößerung rechts), Darstellung einer „Raffung“ mit Einriss und der Farbreihenfolge Normal-Schwarz-Grün (untere Reihe links und Vergrößerung rechts). □ Nicht gewerteter Bereich wegen Faltenbildung. Fluoreszenzmikroskopie, Calceinfärbung.

Bei den „Schnittartefakten“ kommt es zu kleinen Einrissen des Gewebes, das sich in Schnittrichtung umschlägt. So entsteht eine Überlappung von zwei normal gefärbten Abschnitten (Abbildung 22). Daraus ergibt sich auch eine größere Sicherheit, wenn der MC antiparallel zu den Schnittartefakten verläuft. Ein weiterer Punkt, der aber aus technischen Gründen nicht bei allen anwendbar ist, ist der Vergleich mit konsekutiven Schnitten. Sind dort an derselben Stelle MC`s zu identifizieren, handelt es sich sicher um kein Schnittartefakt. Zu beobachten war, dass sich große MC`s auch in nicht direkt aufeinanderfolgenden Schnitten (2-3 verworfene Schnitte) nachweisen ließen.



**Abbildung 22:** Darstellung eines „Schnittartefaktes“ bei dem es durch das Umklappen eines Gewebestückes zu Überlagerungen kommt.

### 3. Ergebnisse

Aus einem Patientenkollektiv von insgesamt 33 Patientinnen wurden nachträglich weitere vier Patientinnen ausgeschlossen. Ein Ausschluss erfolgte bei einer Patientin wegen starken Untergewichts mit einem BMI von  $13,7 \text{ kg/m}^2$  (normal  $18\text{-}25 \text{ kg/m}^2$ ), sowie einer konservativ behandelten Schenkelhalsfraktur auf der rechten Seite und wegen Implantation einer Hüftendoprothese auf der linken Seite. Drei weitere Patientinnen wurden ebenfalls wegen beidseitiger unnatürlicher Manipulation am proximalen Femur ausgeschlossen. Eine Patientin auf Grund einer Versorgung mittels Gammanagelosteosynthese im Rahmen einer pertrochantären Femurfraktur auf beiden Seiten. Zwei weitere Patientinnen wurden wegen einer Implantation von Hüftendoprothesen bei Coxarthrose beidseits ausgeschlossen. Dadurch ergab sich ein Patientenkollektiv von 29 Patientinnen im Alter von 65-90 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 81 Jahren und einem durchschnittlichen BMI von  $22,1 \text{ kg/m}^2$ .

Das Patientenkollektiv wurde entsprechend ihrer Behandlungsdauer mit Bisphosphonaten in eine mittlere und eine lange Behandlungsdauer aufgeteilt. Zu den verwendeten Bisphosphonaten gehörten Alendronat, Risedronat und Ibandronat. 6 Patientinnen erhielten eine Therapie mit Alendronat, 3 mit Risedronat und 1 mit Ibandronat. Patientinnen ohne Bisphosphonatbehandlung bildeten die Kontrollgruppe. Daraus ergab sich eine Aufteilung wie folgt:

**1. Gruppe: Kontrollgruppe (KG) (n=19)**

Patientinnen mit Osteoporose ohne Bisphosphonattherapie

**2. Gruppe: mittlere Behandlungsdauer (MBD) (n=3)**

Patientinnen mit Osteoporose und einer Behandlungsdauer zwischen 1 und 5 Jahren mit Bisphosphonat.

**3. Gruppe: Langzeitbehandlung (LB) (n=7)**

Patientinnen mit Osteoporose und einer Behandlungsdauer >5 Jahre mit Bisphosphonat.

Die Validierung der Daten erfolgte nach der ersten vollständigen Untersuchung und einem Pausenintervall von zwei Monaten, durch wiederholtes Untersuchen von 10 zufällig gewählten Proben. Dabei galten die gleichen Kriterien wie bei der Erstuntersuchung und wurden unter denselben Bedingungen durchgeführt. Die Intraobserver-Reliabilität (ICC = 0,979) zeigt eine hohe Zuverlässigkeit und geringe Variabilität der Ergebnisse durch denselben Untersucher.

Betrachtet man zunächst die reine Anzahl an MC`s in den unterschiedlichen Gruppen, zeigt sich kein wesentlicher Unterschied der Mediane (KG = 3, MBD = 3,

LB = 4). Wird die Anzahl nun in Bezug mit der Knochenfläche gebracht, kann die Rissdichte errechnet werden ( $Cr. D. = n/mm^2$ ).

*Berechnung der Rissdichte:*

$$Cr.D = Cr.N. / BA = n/mm^2$$

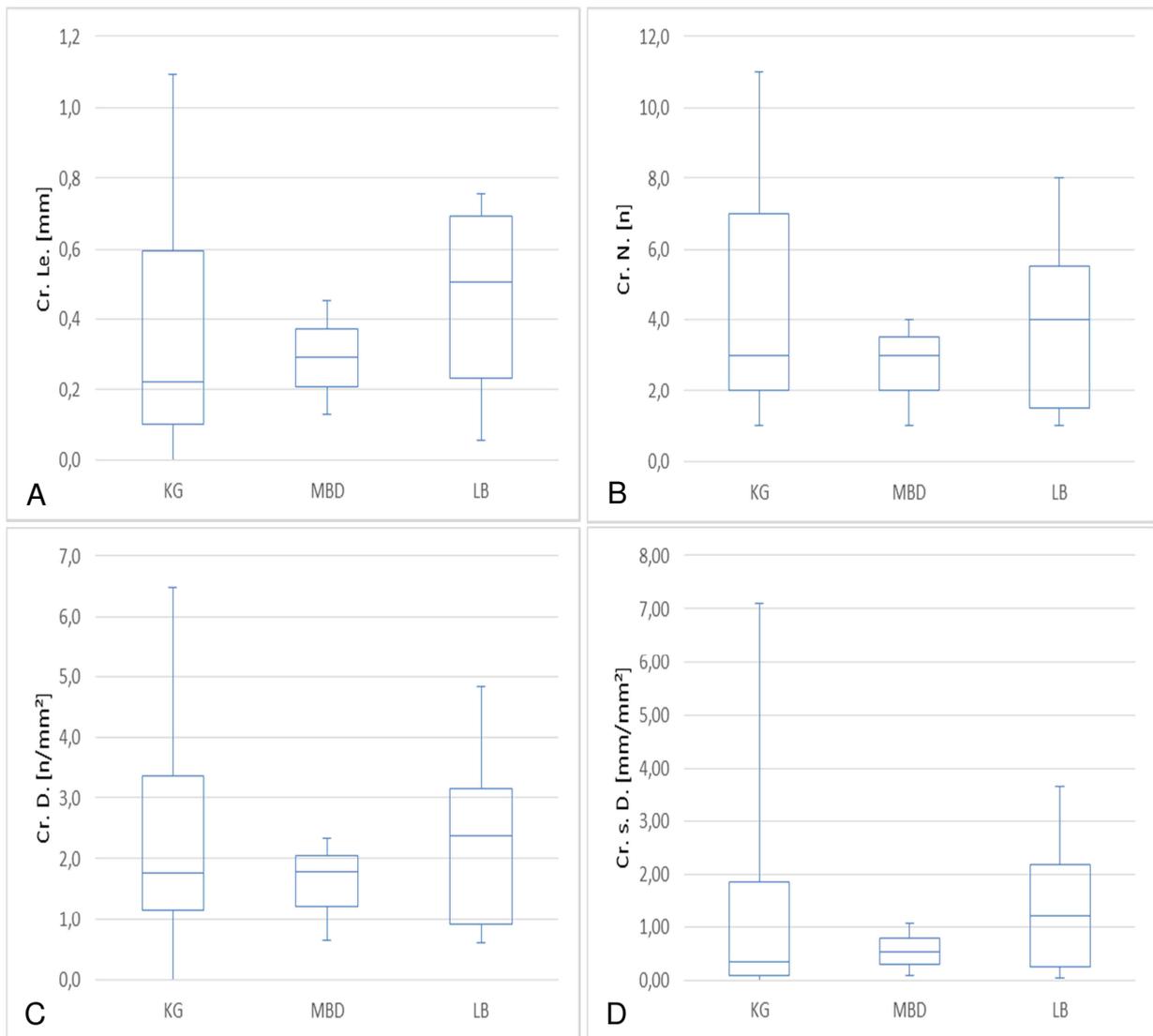
Dies ergab die gleichen Werte in der KG und der MBD, in der LB dahingegen eine leichte Steigerung (KG = 1,8, MBD = 1,8, LB = 2,4).

Die zweite errechnete Größe war die Rissoberflächendichte ( $Cr. s. D. = mm/mm^2$ ).

*Berechnung der Rissoberflächendichte:*

$$Cr.s.D. = (Cr.N. * Cr.Le.) / BA = (n*mm) / mm^2 = mm/mm^2$$

Sie setzt die Oberfläche eines Risses in Bezug zur Knochenoberfläche. Dabei ist die Rissoberfläche von der Gesamtlänge aller Risse abhängig. Hier wurde ein stärkerer Anstieg in der LB beobachtet (KG = 0,34, MBD = 0,52, LB = 1,2) im Vergleich zur KG und MBD. Dies ist hauptsächlich dadurch begründet, dass der Median der Cr. Le. (KG = 0,2, MBD = 0,3, LB = 0,5) in den Gruppen MBD und LB erhöht ist.



**Abbildung 23:** Boxplot-Abbildung der gemessenen Werte: A) Gesamtlänge, B) Anzahl, C) Rissdichte, D) Rissoberflächendichte.

Um nun eine Antwort auf die anfangs gestellte Fragestellung zu bekommen, ob es unter einer Bisphosphonattherapie zu einem vermehrten Auftreten von MC's kommt, wurden die Gesamtergebnisse aller Einzelfälle (d. h. die Summe der Ergebnisse aller 6 Proben eines Falles) miteinander verglichen.

In Bezug auf die erhobenen und errechneten Parameter ergab die Analyse keinen signifikanten Unterschied in allen Parametern (Cr. N,  $p=0,849$ ; Cr. D.,  $p=0,795$ ; Cr. s. D.,  $p=0,751$ ; Cr. Le.,  $p=0,763$ ). Das bedeutet, es kommt zu keiner signifikanten Akkumulation von MC's in der Substantia compacta des Femurs durch eine Bisphosphonattherapie.

Somit spricht das Ergebnis gegen die zurzeit kontrovers diskutierte Behauptung, dass es bei einem unterdrückten Knochenumsatz durch Bisphosphonate zu einer Akkumulation von MC`s kommt und dies zu einer Erhöhung des Risikos für atypische Frakturen führt.

Da es auf Grund der anatomischen Konstruktion des Femurknochens zu einer unterschiedlichen Krafteinwirkung in der Substantia compacta kommt, stellte sich die Frage, ob es vielleicht zu einer vermehrten Akkumulation von MC`s in einer bestimmten Region kommt. Um einen Einblick auf die Rissverteilung innerhalb des Knochens zu bekommen, wurden die Parameter der verschiedenen Lokalisationen in allen Gruppen (KG, MBD, LB) miteinander verglichen.

Es zeigte sich für alle Lokalisationen eine gleichmäßige Verteilung. Signifikante Unterschiede konnten nicht festgestellt werden. Die zuvor erläuterten mechanischen Belastungen wie Zug- und Druckbelastungen haben nach diesen Ergebnissen also keinen entscheidenden Einfluss auf die Bildung von MC`s.

#### **4. Diskussion**

Seit 2005 wird wiederholt der Zusammenhang zwischen Bisphosphonattherapie und atypischen Femurfrakturen kontrovers diskutiert. Man geht davon aus, dass der unterdrückte Knochenumsatz zu einer Akkumulation von MC`s führt, welche die mechanische Kompetenz des Knochens beeinträchtigt und so das Risiko für eine atypische Femurfraktur erhöht (Ott 2001, Odvina et al. 2005). Die bislang durchgeführten Untersuchungen zum Nachweis von MC`s und der biomechanischen Kompetenz von Knochen nach Langzeit-Bisphosphonattherapie fanden ausschließlich am spongiösen Knochen statt (Mashiba et al. 2000, Mashiba et al. 2001, Odvina et al 2005, Allen et al 2006), sodass die Frage nach den Veränderungen in der Substantia compacta offen bleibt.

In Bezug auf die atypischen Frakturen, die häufig an der Stelle mit der größten Festigkeit auftreten, stellte sich die Frage, ob es dort zur Veränderung der Gewebequalität unter Bisphosphonattherapie kommt (Pauwels 1948, Lenart et al. 2008). Das Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob es bei einer Therapie mit Bisphosphonaten zu einer Akkumulation von MC`s in der Substantia compacta des

Femurs in der subtrochantären Risikoregion atypischer Femurfrakturen kommt und so durch die Beeinträchtigung der Knochenqualität ihre Entstehung begünstigt werden.

In der einfaktoriellen Varianzanalyse zwischen den einzelnen Gruppen (KG, MBD, LB) zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei den erhobenen (Cr. Le., Cr. N.) und errechneten Parametern (Cr. D., Cr. s. D.). Die postulierte Arbeitshypothese, dass es bei einer bisphosphonatinduzierten Unterdrückung des Knochenumsatzes zu einer Akkumulation von MC`s kommt und die dadurch beeinträchtigte Gewebequalität zu vermehrten atypischen Femurfrakturen führt, kann durch die aktuellen Ergebnisse dieser Studie nicht bestätigt werden.

Dies steht im Widerspruch zu tierexperimentellen Untersuchungen an Rippen-, Wirbelkörper- und Schenkelhalsgewebe von Hunden, bei welcher eine hochdosierte Bisphosphonatgabe zu einer Akkumulation von MC`s führte (Mashiba et al. 2000, Mashiba et al. 2001). Die Übertragbarkeit auf den Menschen ist dabei allerdings eingeschränkt, da im Gegensatz zur humanen Dosierung einer primären Osteoporose (z. B. Alendronat 70 mg/Woche) erheblich höhere Dosen appliziert wurden (1 mg/KG/Tag). Bezogen auf einen Erwachsenen mit einem Gewicht von 70 kg würde dies eine Dosis von 70 mg/Tag ergeben. Es wurde in den tierexperimentellen Untersuchungen somit eine 7x höhere Dosis verwendet (Mashiba et al. 2000, Mashiba et al. 2001). In einer anschließenden Analyse mit humanvergleichen Bisphosphonatdosierungen zeigte sich eine signifikante Akkumulation von MC`s ohne Beeinträchtigung der mechanischen Eigenschaften. Allerdings wurden diese Untersuchungen nur an spongiösen Knochen am Wirbelkörper durchgeführt (Allen et al. 2006). Dagegen zeigen Ergebnisse humaner Beckenkammbiopsien und einer Bisphosphonattherapie >3 Jahren ebenfalls keine Korrelationen zwischen der Therapiedauer und Akkumulation von MC`s (Chapurlat et al. 2007). Allerdings ist die Aussagekraft der genannten Resultate bezogen auf die Fragestellung einer Erhöhung des Frakturrisikos limitiert, da sich in dem rekrutierten Patientengut keine osteoporosebedingten Frakturen fanden und die Möglichkeit der artifiziellen Generierung von MC`s bei der Entnahme einer ca. 7,5 mm großen Biopsie nicht ausgeschlossen werden konnte.

Die Beobachtung einiger Studien, dass es nach 4-5 Jahren Bisphosphonattherapie zu einer signifikanten Risikoerhöhung für atypische Femurfrakturen kommt (Neviaser et al. 2008, Lenart et al. 2009), konnte in dieser Arbeit zwar nicht widerlegt werden, allerdings konnte der postulierte zu Grunde liegende Pathomechanismus in Bezug auf eine Langzeittherapie und Akkumulation von MC`s nicht bestätigt werden. Wenn von einer signifikanten Erhöhung des Frakturrisikos nach 5 Jahren ausgegangen wird, wäre eine anhaltende Suppression des Knochenumsatzes mit steigender Mineralisation und weiterer Akkumulation von MC`s zu erwarten. Die Studie von Roschger et al., zeigte keine wesentliche Zunahme der Mineralisation nach 10 Jahren im Vergleich zu einer 5-jährigen Bisphosphonattherapie (Roschger et al. 2010). Es konnte somit keine pathophysiologische Grundlage für eine weitere Akkumulation von MC`s und damit verbundene Frakturrisikoerhöhung nachgewiesen werden.

Der Zusammenhang von atypischen Femurfrakturen und einer Langzeit-Bisphosphonattherapie lässt sich jedoch auch mit diesen Ergebnissen nicht vollständig ausschließen. Die Frage, ob eine Langzeittherapie mit anhaltender Suppression des Knochenumsatzes die mechanischen Eigenschaften verändert, ist bei der inkongruenten Datenlage derzeit nicht eindeutig zu beantworten. Zum Teil zeigten Studien eine Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften (Bala et al. 2011) und es gibt Überlegungen, dass die Veränderung der Plastizität (Formbarkeit) im kortikalen Knochen mit der Entstehung der atypischen Femurfrakturen assoziiert ist (Tjhia et al. 2011).

Im Rahmen der aktuellen BioAsset-Studie wurden bei Patientinnen mit Osteoporose posthum Wirbelkörper untersucht. Dabei wurden mechanische Eigenschaften und die Akkumulation von MC`s im spongiösen Knochen bei bisphosphonattherapierten Patientinnen mit einer Kontrollgruppe verglichen. Hier zeigten sich, entgegen der zurzeit vorherrschenden Meinung, keine Akkumulation von MC`s oder Veränderungen der mechanischen Eigenschaften (Krause et al. 2014).

Bei einer globalen Betrachtung der Inzidenz von Hüftfrakturen (400-600/100000 (Nieves et al. 2010)) und atypischen Femurfrakturen (1/100000-5/10000 (Feldstein et al. 2012, Schilcher et al. 2014, Black und Rosen 2016)) wird deutlich, dass die Häufigkeit einer atypischen Femurfraktur insgesamt sehr gering ist. Der

Zusammenhang zwischen Bisphosphonattherapie und atypischen Femurfrakturen konnte vielmehr nicht konsistent nachgewiesen werden (Black et al. 2010). Ebenso konnte kein konsistenter Nachweis erbracht werden, dass das Frakturrisiko nach 4-5 Jahren Behandlungsdauer gegenüber einer kürzeren Behandlungsdauer <5 Jahren signifikant erhöht ist (Abrahamsen et al. 2010, Black et al. 2010). Feldstein et al. gehen vielmehr von mehreren Risikofaktoren aus, welche eine Rolle für das Auftreten von atypischen Femurfrakturen spielen (Feldstein et al. 2012). Frauen haben ein 3-fach erhöhtes Frakturrisiko im Vergleich zu Männern, welches zwischen den einzelnen Bisphosphonaten und der Darreichungsform variiert (Schilcher et al. 2015). Der Unterschied zwischen ethnischen Gruppen wurde bei asiatischen Frauen aufgezeigt. Sie haben ein 8-fach erhöhtes Frakturrisiko eine atypische Femurfraktur zu erleiden (Lo et al. 2016).

Ein anderes Problem ist die Compliance der Patienten. Denn nur 40% nehmen ihre Medikamente nach einem Jahr noch regelmäßig ein. Diese Noncompliance führt zu einer Erhöhung des Frakturrisikos von 20% (Modi 2015).

Eine Nutzen-Risiko-Bewertung aus den derzeit vorliegenden Daten ergab einen hohen Nutzen bei einer Behandlungsdauer von 5 Jahren. Während eine atypische Femurfraktur potentiell verursacht wird, werden 100 osteoporotische Frakturen verhindert (Black und Rosen 2016). Dabei ist anzumerken, dass die Letalität von osteoporosebedingten Frakturen sehr hoch ist. Bis zu 20% der Patienten mit osteoporosebedingten Hüftfrakturen versterben innerhalb eines Jahres und 50% sind dauerhaft immobil (Peck et al. 1993). Der Nutzen einer Behandlung mit Bisphosphonaten steht deutlich im Vordergrund. Dazu belaufen sich die Kosten in Europa für die Osteoporosebehandlung auf rund 13 Billionen €, die hauptsächlich durch die Folgen einer Fraktur entstehen (Dennison et al. 2005). Es besteht vor allem durch den demographischen Wandel auch ein volkswirtschaftliches Interesse eine effiziente Behandlung zur Risikoreduktion von Frakturen zu finden.

Die Unterbrechung der Therapie von Alendronat nach 5 Jahren, führte für weitere 5 Jahre zu einem positiven Effekt, bezogen auf die BMD und den biochemischen Marker (Black et al. 2006, Black et al. 2012). Zudem verringert sich das Risiko für atypische Femurfrakturen um 70% nach dem Absetzen der Bisphosphonate (Schilcher et al. 2011, Schilcher et al. 2015). Es gibt Überlegungen, ob eine Therapieunterbrechung nach 5 Jahren Behandlungsdauer („Drug Holidays“) eine

generelle Therapieoption für die Behandlung der Osteoporose mit Bisphosphonaten wäre. Allerdings ist die vertebrale Frakturrate signifikant geringer bei kontinuierlicher als bei diskontinuierlicher Einnahme (Black und Rosen 2016).

Diese Arbeit besitzt folgende Limitationen: Die gewählte Methode zur Detektion der MC`s war die Fluoreszenzmikroskopie mit einer Calcein-Färbung der gewonnenen Proben. Diese 1999 eingeführte Methode von Huja et al. ist eine gängige und häufig angewandte Methode zur Färbung der MC`s (Huja et al. 1999). Sie ist dabei als gleichwertig im Vergleich zu anderen gängigen Färbungen anzusehen (Lee et al. 2000). Wie jede Methode weist auch diese Limitationen auf, die zu einer Einschränkung der Aussagekraft führt. Trotz ihrer Etablierung, ist sie eine rein subjektive Methode und ist sehr abhängig von der Erfahrung des Untersuchers. Zudem wurde diese Untersuchung von einem einzelnen Untersucher durchgeführt, sodass die unabhängige Überprüfung der erhobenen Daten nicht möglich war. Dies wurde verbessert, indem eine Einarbeitungszeit bis zur sicheren Identifikation durchgeführt wurde. Im Anschluss folgte die eigentliche Auswertung. Nach Beendigung der Datenerhebung wurde ein Pausenintervall von 2 Monaten eingehalten und eine nahezu perfekte Intraobserver-Reliabilität ( $ICC = 0,979$ ) nachgewiesen.

Das Einbringen von künstlich erzeugten MC`s im Laufe des Herstellungsprozesses ex vivo, stellte eine weitere Schwachstelle da. Während der Untersuchung der Proben, wurde ein gehäuftes Auftreten von ungefärbten MC`s im Bereich der Schnittkante beobachtet. Es wurde von einer artifiziellen Erzeugung von MC`s während des Zuschneidens der Probe durch die mechanische Krafteinwirkung und dadurch einwirkende Energie im Randbereich ausgegangen. Dem wurde entgegengewirkt, indem auf eine saubere Schnitfführung unter laufendem Wasser geachtet und ca. 0,5 mm von der Schnittfläche weggeschliffen wurde. Durch die Spannungsenergie während der Aushärtung des Kunststoffes konnte es ebenfalls zu MC`s kommen. Im Gegensatz zu den MC`s die während des Sägeprozesses entstanden, konnten diese aber unterschieden werden, da die Färbung im Vorhinein stattgefunden hat. Außerdem wurde das Risiko der Entstehung durch eine lange Einwirkungszeit der Infiltrationslösungen minimiert. Die weitere Rissbildung nach der Kunststoffeinführung war generell geringer. Da diese jedoch nicht angefärbt waren, konnten sie zweifelsfrei in der Analyse unterschieden werden.

Eine weitere wichtige Limitation war die Identifikation der MC`s. Es wurden hier die gängigen Kriterien nach Burr und Stafford verwendet (Burr und Stafford 1990). Da die Schnittdicke in der Arbeit von Burr und Stafford 250  $\mu\text{m}$  betrug und in dieser Untersuchung 5  $\mu\text{m}$  Schnitte verwendet wurden, war das Kriterium der Tiefenfärbung beim Verändern des Fokus nur eingeschränkt anwendbar. Im Verlauf des Schnittvorganges konnten verschiedene qualitative Mängel auftreten, die das Identifizieren erschwerten. Bei der „Raffung“ kam es zu einem Auftürmen des Schnittpräparates im  $\mu\text{m}$  Bereich, bei dem es durch Überlagerungen zu einem deutlichen Calcein-Leuchten kommen konnte. Ebenso kam es bei einem „Schnittartefakt“ zu einem Ausriss von Gewebsteilen und folgender Faltung in Schnittrichtung. Dies konnte ebenfalls zu Überlagerungen führen und MC`s imitieren. Diese waren häufig durch ihre Unebenheit beim Verstellen der Schärfeneinstellung zu erkennen. Dazu kam, dass sich einige MC`s durch die zweidimensionale Betrachtung nicht immer eindeutig identifizieren ließen. Um die Sicherheit und damit die Qualität der Identifikation zu verbessern, wurden Nebenkriterien entwickelt. Sie halfen dem Untersucher bei nicht eindeutigen MC`s bei der Entscheidungsfindung.

Neuere Untersuchungsmethoden mittels Synchrotron Radiation Micro-CT (SR  $\mu\text{CT}$ ) ermöglichen eine dreidimensionale Darstellung der MC`s, wodurch das Ausmaß und der Verlauf eines MC besser erfasst werden kann. Die durchschnittliche Länge eines MC lag hier zwischen 88  $\mu\text{m}$  und 492  $\mu\text{m}$  (Larrue et al. 2011, Mohsin et al. 2006). In dieser Arbeit variierten die gemessenen Längen zwischen 24,5  $\mu\text{m}$  und 307  $\mu\text{m}$  und stimmten mit den Längen aus den Arbeiten von Larrue et al. und Mohsin et al. näherungsweise überein (Larrue et al. 2011, Mohsin et al. 2006). Es gibt zurzeit jedoch noch keine zuverlässigen Kontrastmittel, die das Markieren von MC`s ermöglichen, weshalb diese daher auch CT-morphologisch nur schwer von Artefakten zu trennen sind. Außerdem ist die Verfügbarkeit eines Micro-CT nicht immer gegeben und das Erstellen der Dateien mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden (Larrue et al. 2011). Es ist daher nicht abschließend definiert, welche Methode die höchste Genauigkeit zur Identifikation von MC`s besitzt.

Mit nur 29 Patientenfällen ist die Fallzahl darüberhinaus gering und unregelmäßig über die einzelnen Gruppen verteilt. Außerdem mussten nachträglich wichtige Fälle von Patientinnen mit Bisphosphonattherapie wegen unnatürlicher Manipulation an beiden Femora wie Schenkelhalsfrakturen, Gammanagelosteosynthesen oder

Implantation von Hüftendprothesen ausgeschlossen werden. Dies betraf besonders die Gruppe mit mittlerer Behandlungsdauer (n=3). Durch die Untersuchung des gesamten Femurringes und die Aufteilung in 6 Teile je Fall konnte nicht nur eine Aussage über die Lokalisationen der MC's getroffen werden. Dieses Vorgehen steigerte auch die Anzahl der untersuchten Proben auf 174. Dadurch erhöhte sich die untersuchte Knochenfläche und damit die ROI um ein 6-faches im Vergleich zu einer einzelnen untersuchten Probe und verbesserte so die Aussagekraft pro Fall.

Auch in Zukunft werden Bisphosphonate ein elementarer Bestandteil der Osteoporosebehandlung sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen einen Teil zur Aufklärung der Langzeitauswirkungen bei und können die bisher postulierte Hypothese einer bisphosphonatinduzierten atypischen Femurfraktur nicht bestätigen. Andere pathophysiologische Ursachen sollten daher in Erwägung gezogen werden. Nichtsdestotrotz können die vorliegenden Ergebnisse helfen, die Patientenangst vor einer gefürchteten atypischen Femurfraktur aufgrund einer bisphosphonatinduzierten proximalen Femurfraktur zu reduzieren und die Compliance zu verbessern. Das bedeutet einerseits die Entscheidungen einer Therapie individuell anzupassen, über mögliche Therapiealternativen und potentielle Nebenwirkungen aufzuklären sowie bei deren Auftreten rechtzeitig zu reagieren. Um die Langzeitauswirkungen der Bisphosphonattherapie und ihre Mechanismen jedoch genauer zu verstehen, bedarf es weiterer Untersuchungen am menschlichen Gewebe.

## 5. Zusammenfassung

Einen Grundpfeiler der medikamentösen Osteoporosetherapie stellen die Bisphosphonate dar. Aufgrund tierexperimenteller Untersuchungen wurde postuliert, dass die bisphosphonat-induzierte Unterdrückung des Knochenumsatzes die Heilung physiologisch entstehender MC`s vermindert und so zu einer Akkumulation von MC`s im Knochen führt. Diese gelten zurzeit als Ursache für atypische proximale Femurfrakturen. Bei mangelnder und inkongruenter Datenlage, besonders bezogen auf den humanen kompakten Knochen, galt das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob es tatsächlich zu einer Akkumulation von MC`s unter Bisphosphonattherapie kommt und ob es Unterschiede in Bezug auf die Therapiedauer gibt. Es wurden posthum von 29 Patientinnen mit Osteoporose Proben aus dem Femurknochen genommen und mittels Fluoreszenzmikroskopie auf MC`s untersucht. Dabei galten gängige Kriterien zur Identifizierung der MC`s, die durch Nebenkriterien ergänzt wurden. Zuvor wurden die Fälle entsprechend ihrer Behandlungsdauer in unterschiedliche Gruppen (KG, MBD, LB) unterteilt. Der gewonnene Femurring wurde unterhalb des Trochanter minors entnommen, in 6 Abschnitte unterteilt und nach Lokalisation beschriftet. Somit wurden 174 Proben untersucht und verschiedene Parameter erhoben (Cr. N., Cr. Le.) und berechnet (Cr. D., Cr. s. D.). Die Ergebnisse wurden in einer Varianzanalyse miteinander verglichen. Diese ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Patienten in allen Parametern. Zwischen mittlerer Behandlungsdauer und Langzeitbehandlung lag ebenfalls kein signifikanter Unterschied vor. Die Ergebnisse zeigen somit keinen Zusammenhang zwischen Bisphosphonattherapie und Akkumulation von MC`s und deuten entgegen der bislang angenommenen Auswirkung der Bisphosphonattherapie auf eine andere Pathogenese hin. Außerdem kommt es nach mehr als 5 Jahren Therapie zu keiner Mehranhäufung von MC`s. Durch die Unterteilung in die verschiedenen Lokalisationen konnte zusätzlich aufgezeigt werden, dass sich die MC`s gleichmäßig in der Substantia compacta verteilen. Es gibt derzeit nur wenige Daten von humanen Biopsien von bisphosphonattherapierten Patienten mit Osteoporose. Diese Arbeit ist die erste am kortikalen Knochen. Die Ergebnisse verbessern den Kenntnisstand über die Auswirkung der Langzeit-Bisphosphonattherapie und können die aktuell diskutierte Hypothese zur Entstehung von atypischen Femurfrakturen nicht unterstützen.

## 6. Abstract

Bisphosphonates represent a cornerstone of drug therapy for osteoporosis. Based on results from animal testing, it has been postulated that bisphosphonate-induced suppression of bone regeneration reduces the healing of physiologically produced microcracks (MCs), which in turn correlates to an accumulation of MCs in the bone.

They are currently considered to be the cause of atypical proximal femur fractures. Due to a lack of data, or data that are inconsistent, especially with regard to human compact bone, the aim of this study was to analyze whether there is a notable accumulation of MCs under bisphosphonate therapy and treatment duration. 29 patients with osteoporosis were sampled from the femur (post mortem) and examined with fluorescent microscopy on MCs.

Common criteria for the identification of MCs, which were supplemented by secondary criteria, were applied. Previously, cases were then divided into separate groups (control group, mean treatment duration, long-term treatment) according to respective duration of treatment. The collected femur ring was taken below the trochanter minor, divided into six sections and labeled according to location.

As a result, 174 samples were examined, and various parameters were recorded (Number of Cracks, Crack length and calculated (Crack density, Crack surface density). The results were compared in a variance analysis. This process revealed no significant difference between treated and non-treated patients within all parameters. There was also no significant difference between the mean treatment duration of 1 to 5 years and long-term treatment (>5 years). The results did not reveal an association between bisphosphonate therapy and accumulation of MCs, which suggested a different pathogenesis in opposite of the previously assumed effect of bisphosphonate therapy. Further, after more than five years of therapy, there was no accumulation of MCs.

By subdividing MCs into different localizations, it could be shown that MCs are evenly distributed in the substantia compacta.

There is currently little data from human biopsies of bisphosphonate-treated patients with osteoporosis. This work is the first on cortical bone. The results add to the volume of knowledge concerning the effect of long-term bisphosphonate therapy and cannot support the current hypothesis on the development of atypical femur fracture currently being discussed.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

aBMD	areal bone mineral density
ALN	Alendronat
ALP	alkalische Phosphatase
ANOVA	analysis of variance
Ant	Anterior
ATP	Adenosintriphosphat
BA	Bone Area
BMD	Bone Mineral Density
BMI	Body Mass Index
BMU	Basic Multicellular Unit
BPO	Benzoylperoxid
BRONJ	Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws
ca.	circa
CCD-Winkel	Caput-Collum-Diaphysenwinkel
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cr.D.	Crack density
Cr.Le.	Crack length
Cr.N.	Number of Cracks
Cr.s.D.	Crack surface density
CT	Computertomographie
d. h.	das heißt
DMPT	N, N Dimethyl-p-Toluidin
DPD	Desoxypyridinolin
DVO	Dachverband Osteologie
DXA	Dual-energy-X-Ray-Absorptiometry
EU	Europäische Union
FDA	Food and Drug Administration, Maryland, USA
FGF-23	Fibroblast growth factor 23
FPP	Farnesyldiphosphate
FPPS	Farnesylpyrophosphat-Synthase
FRAX	Fracture Risk Assessment Score
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
g	Gramm

GC	Glukokortikoide
GGPP	Geranylgeranyldiphosphate
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
H <sub>2</sub> O	Wasser
ICC	Intraobserver-Reliabilität
IL3	Interleukin-3
IOBM	Institut für Osteologie und Biomechanik, Hamburg, Deutschland
IPP	Isopentenyl-diphosphat
kg	Kilogramm
KG	Kontrollgruppe
Lat	Lateral
LB	Langzeitbehandlung
LWK	Lendenwirbelkörper
LWS	Lendenwirbelsäule
MBD	mittlere Behandlungsdauer
MC	Microcrack
Med	Medial
mg	Milligramm
Min	Minuten
Mio	Millionen
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mm	Millimeter
MMA	Methylmethacrylat
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
μm	Mikrometer
Mrd	Milliarden
mRem	Millirem (röntgen-äquivalent)
μSv	Mikrosievert
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
N-BP	stickstoffhaltigen Bisphosphonate
NIH	National Institute of Health, Maryland, USA
NPA	Nonylphenylpolyethylene-glycolacetat

OC	Osteocalcin
ODF	Osteoclast differentiation factor
OPG	Osteoprotegerin
Post	Posterior
PP	Pyrophosphat
PPI	Protonpumpeninhibitoren
PTH	Parathormon
PYD	Hydroxypyridinium
RA	Rheumatoide Arthritis
RANK	Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B
RANKL	Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand
ROI	Regio of Interest
SD	Standardabweichung
SR $\mu$ CT	Synchrotron Radiation Micro-CT
SSBT	Severe suppression of boneturnover
TA	Tissue area
Tc-99-m	Technetium 99
USA	United States of America
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
€	Euro
%	Prozent
®	eingetragene Handelsmarke

## 8. Literaturverzeichnis

AAOMS (2007). American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 65(3), 369-376.

AAOMS (2014). American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws, [Online im Internet]

URL: [http://www.aaoms.org/images/uploads/pdfs/mronj\\_position\\_paper.pdf](http://www.aaoms.org/images/uploads/pdfs/mronj_position_paper.pdf) [Stand: 01.02.2016,13:38].

Abrahamsen, B., Eiken, P., & Eastell, R. (2010). Cumulative alendronate dose and the long-term absolute risk of subtrochanteric and diaphyseal femur fractures: a register-based national cohort analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(12), 5258-5265.

Adami, S., Bhalla, A. K., Dorizzi, R., Montesanti, F., Rosini, S., Salvagno, G., & Cascio, V. L. (1987). The acute-phase response after bisphosphonate administration. *Calcified tissue international*, 41(6), 326-331.

Allen, M. R., Iwata, K., Phipps, R., & Burr, D. B. (2006). Alterations in canine vertebral bone turnover, microdamage accumulation, and biomechanical properties following 1-year treatment with clinical treatment doses of risedronate or alendronate. *Bone*, 39(4), 872-879.

Allen, M. R., & Burr, D. B. (2014). Bone Modeling and Remodeling. In: *Basic and applied bone biology*. Burr, D. B., & Allen, M. R., Elsevier Academic Press, Amsterdam, 3-25.

Aruwajoye, O. O., Patel, M. K., Allen, M. R., Burr, D. B., Aswath, P. B., & Kim, H. K. (2013). Microcrack density and nanomechanical properties in the subchondral region of the immature piglet femoral head following ischemic osteonecrosis. *Bone*, 52(2), 632-639.

Aubin, J. E., Liu, F., Malaval, L., & Gupta, A. K. (1995). Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*, 17(2), S77-S83.

Aumüller, G., Aust, G., Doll, A., Engele, J., Kirsch, J., Mense, S., Reißig D., Salvetter J., Schmidt W., Schmitz F., Schulte E., Spanel-Borowski K., Wolff W., Wurzinger L. J & Zilch, H. G. (2007). *Anatomie, Duale Reihe*. 1. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 329-332.

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), 647-655.

Bamias, A., Kastiris, E., Bamia, C., Mouloupoulos, L. A., Melakopoulos, I., Bozas, G., Koutsoukou, V., Gika, D., Anagnostopoulos, A., Papadimitriou, C., Dimopoulos, M. A. & Terpos, E. (2005). Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *Journal of clinical Oncology*, 23(34), 8580-8587.

Bartl, R., & Bartl, C. (2004). *Osteoporose-Manual Diagnostik. Prävention und Therapie*, Springer, Berlin.

Beaulé, P. E., Campbell, P., Lu, Z., Leunig-Ganz, K., Beck, M., Leunig, M., & Ganz, R. (2006). Vascularity of the arthritic femoral head and hip resurfacing. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 88(suppl 4), 85-96.

Beitz, J., Ibrahim, A., Scher, N., & Williams, G. (2003). Renal failure with the use of zoledronic acid. *N Engl J Med*, 349, 1676-1679.

Bellido, T., Plotkin, L. I. & Bruzzaniti, A. (2014). Bone Cells. In: *Basic and applied bone biology*. Burr, D. B., & Allen, M. R., Elsevier Academic Press, Amsterdam, 27-44.

Black, D. M., Cummings, S. R., Karpf, D. B., Cauley, J. A., Thompson, D. E., Nevitt, M. C., Bauer, D. C., Genant, H. K., Haskell, W. L., Marcus, R., Torner, J. C., Quandt, S. A., Reiss, T. F., Ensrudi, K. E. & Ott, S. M. (1996). Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. *The Lancet*, 348(9041), 1535-1541.

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 & Metabolism*, 85(11), 4118-4124.

Black, D. M., Schwartz, A. V., Ensrud, K. E., Cauley, J. A., Levis, S., Quandt, S. A., Satterfield, S., Wallace, R. B., Bauer, D. C., Palermo, L., Lombardi, A., Santora, A. C., Cummings, S. R. & Wehren, L. E. (2006). Effects of continuing or stopping alendronate after 5 years of treatment: the Fracture Intervention Trial Long-term Extension (FLEX): a randomized trial. *Jama*, 296(24), 2927-2938.

Black, D. M., Delmas, P. D., Eastell, R., Reid, I. R., Boonen, S., Cauley, J. A., Cosman, F., Lakatos, P., Leung, P. C., Man, Z., Mesenbrink, P., Hu, H., Caminis, J., Tong, K., Rosario-Jansen, T., Krasnow, J., Hue, T. F., Sellmeyer, D., Fink Eriksen, E., Cummings, S. R. & Mautalen, C. (2007). Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *New England Journal of Medicine*, 356(18), 1809-1822.

Black, D. M., Kelly, M. P., Genant, H. K., Palermo, L., Eastell, R., Bucci-Rechtweg, C., Cauley, J., Chung Leung, P., Boonen, S., Santora, A., Bauer, D. C. & de Papp, A. (2010). Bisphosphonates and fractures of the subtrochanteric or diaphyseal femur. *New England Journal of Medicine*, 362(19), 1761-1771.

Black, D. M., Reid, I. R., Boonen, S., Bucci-Rechtweg, C., Cauley, J. A., Cosman, F., Cummings, S. R., Hue, T. F., Lippuner, K., Lakatos, P., Man, Z., Martinez, R. L. M., Tan, M., Ruzicky, M. E., Su, G., Eastell, R. & Leung, P. C. (2012). The effect of 3 versus 6 years of Zoledronic acid treatment of osteoporosis: A randomized extension to the HORIZON-Pivotal Fracture Trial (PFT). *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(2), 243-254.

Black, D. M., & Rosen, C. J. (2016). Clinical Practice. Postmenopausal Osteoporosis. *The New England journal of medicine*, 374(3), 254-262.

Boivin, G. Y., Chavassieux, P. M., Santora, A. C., Yates, J., & Meunier, P. J. (2000). Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. *Bone*, 27(5), 687-694.

Bonewald, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(2), 229-238.

Burr, D. B., & Akkus, O. (2014). Bone morphology and organization. In: *Basic and applied bone biology*. Burr, D. B., & Allen, M. R., Elsevier Academic Press, Amsterdam, 3-25.

Burr, D. B., & Stafford, T. (1990). Validity of the bulk-staining technique to separate artifactual from in vivo bone microdamage. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 260, 305-308.

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), 1034-1043.

Chapurlat, R. D., Arlot, M., Burt-Pichat, B., Chavassieux, P., Roux, J. P., Portero-Muzy, N., & Delmas, P. D. (2007). Microcrack Frequency and Bone Remodeling in Postmenopausal Osteoporotic Women on Long-Term Bisphosphonates: A Bone Biopsy Study. *Journal of Bone and Mineral Research*, 22(10), 1502-1509.

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

Cooper, A. (1851). *A Treatise on Dislocations and Fractures of the Joints*. Blanchard and Lea.

Cummings, S. R., Black, D. M., Thompson, D. E., Applegate, W. B., Barrett-Connor, E., Musliner, T. A., Palermo, L., Prineas, R., Rubin, S. M., Scott, J. C., Wallace, R., Yates, A. J., LaCroix, A. Z. & Vogt, T. (1998). Effect of alendronate on risk of fracture in women with low bone density but without vertebral fractures: results from the Fracture Intervention Trial. *Jama*, 280(24), 2077-2082.

Cummings, S. R., Martin, J. S., McClung, M. R., Siris, E. S., Eastell, R., Reid, I. R., Delmas, P., Zoog, H. B., Austin, M., Wang, A., Adami, S., Zanchetta, J., Libanati, C., Siddhanti, S., Christiansen, C. & Kutilek, S. (2009). Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *New England Journal of Medicine*, 361(8), 756-765.

de Groen, P. C., Lubbe, D. F., Hirsch, L. J., Daifotis, A., Stephenson, W., Freedholm, D., Pryor-Tillotson, S., Seleznick, M. J., Pinkas, H. & Wang, K. K. (1996). Esophagitis associated with the use of alendronate. *New England Journal of Medicine*, 335(14), 1016-1021.

De Laet, C., Kanis, J. A., Odén, A., Johanson, H., Johnell, O., Delmas, P., ... & McCloskey, E. V. (2005). Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporosis international*, 16(11), 1330-1338.

Delmas, P. D., Eastell, R., Garnero, P., Seibel, M. J., & Stepan, J. (2000). The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporosis International*, 11(18), S2-S17.

Dimai, H. P. (2005). Strontium ranelate: a novel concept for the treatment of osteoporosis. *Wiener klinische Wochenschrift*, 117(21), 728-738.

Di Salvatore, M., Orlandi, A., Bagalà, C., Quirino, M., Cassano, A., Astone, A., & Barone, C. (2011). Anti-tumour and anti-angiogenetic effects of zoledronic acid on human non-small-cell lung cancer cell line. *Cell proliferation*, 44(2), 139-146.

Dunford, J. E., Thompson, K., Coxon, F. P., Luckman, S. P., Hahn, F. M., Poulter, C. D., Ebetino, F. H. & Rogers, M. J. (2001). Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296(2), 235-242.

DVO Leitlinie Osteoporose (2014) Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen.

Edwards, B. J., Gounder, M., McKoy, J. M., Boyd, I., Farrugia, M., Migliorati, C., Marx, R., Ruggiero, S., Dimopoulos, M., Raisch, D. W., Carson, K., Obadina, E., Trifilio, S., West, D., Mehta, J., Bennett C. L. & Singhal, S. (2008). Pharmacovigilance and reporting oversight in US FDA fast-track process: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *The lancet oncology*, 9(12), 1166-1172.

Eghbali-Fatourehchi, G., Khosla, S., Sanyal, A., Boyle, W. J., Lacey, D. L., & Riggs, B. L. (2003). Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *Journal of Clinical Investigation*, 111(8), 1221.

European Commission (1998) Report on Osteoporosis in the European Community, Action for prevention [Online im Internet.] URL: <http://ec.europa.eu/health/reports/publications/eu-report-1998.pdf> [Stand: 20.01.2016, 13:50].

Feldstein, A. C., Black, D., Perrin, N., Rosales, A. G., Friess, D., Boardman, D., Dell, R., Santora, A., Chandler, J. M., Rix, M. M. & Orwoll, E. (2012). Incidence and demography of femur fractures with and without atypical features. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(5), 977-986.

Fleisch, H., Graham, R., Russell, G., & Francis, M. D. (1969). Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science*, 165(3899), 1262-1264.

Fleisch, H. (2000). Bisphosphonates in bone disease: from the laboratory to the patient. Academic press.

Fleisch, H. (2001). The role of bisphosphonates in breast cancer: Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Research*, 4(1), 30.

Francis, M. D., Graham, R., Russell, G., & Fleisch, H. (1969). Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *Science*, 165(3899), 1264-1266.

Fraunfelder, F. W., Fraunfelder, F. T., & Jensvold, B. (2003). Scleritis and other ocular side effects associated with pamidronate disodium. *American journal of ophthalmology*, 135(2), 219-222.

FRAX (2008) WHO Fracture Risk Assessment. World Health Organization Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases, University of Sheffield, UK, 2008. [Online im Internet.] URL: [www.shef.ac.uk/FRAX](http://www.shef.ac.uk/FRAX) (Stand: 26.01.2016).

Freeman, M. A. R. (1978). Some anatomical and mechanical considerations relevant to the surface replacement of the femoral head. *Clinical orthopaedics and related research*, 134, 19-24.

Frith, J. C., Mönkkönen, J., Blackburn, G. M., Russell, R. G. G., & Rogers, M. J. (1997). Clodronate and Liposome-Encapsulated Clodronate Are Metabolized to a Toxic ATP Analog, Adenosine 5'-( $\beta$ ,  $\gamma$ -Dichloromethylene) Triphosphate, by Mammalian Cells In Vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12(9), 1358-1367.

Frith, J. C., Mönkkönen, J., Auriola, S., Mönkkönen, H. & Rogers, M. J. (2001). The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. *Arthritis & Rheumatism*, 44(9), 2201-2210.

Frost, H. M. (1969). Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcified Tissue International*, 3(1), 211-237.

Frost, H. M. (1987). Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *The anatomical record*, 219(1), 1-9.

Frost, H. M. (1990). Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *The anatomical record*, 226(4), 414-422.

Frost, H. M. (2003). Bone's mechanostat: a 2003 update. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 275(2), 1081-1101.

Frost, H. M. (2004). A 2003 update of bone physiology and Wolff's Law for clinicians. *The Angle Orthodontist*, 74(1), 3-15.

Gedmintas, L., Solomon, D. H., & Kim, S. C. (2013). Bisphosphonates and risk of subtrochanteric, femoral shaft, and atypical femur fracture: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 28(8), 1729-1737.

Goh, S. K., Yang, K. Y., Koh, J. S. B., Wong, M. K., Chua, S. Y., Chua, D. T. C., & Howe, T. S. (2007). Subtrochanteric insufficiency fractures in patients on alendronate therapy A CAUTION. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*, 89(3), 349-353.

Greenspan, S., Field-Munves, E., Tonino, R., Smith, M., Petruschke, R., Wang, L., Yates, J., de Papp, A. E. & Palmisano, J. (2002, October). Tolerability of once-weekly alendronate in patients with osteoporosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 77, No. 10, pp. 1044-1052). Elsevier.

Hadjidakis, D. J., & Androulakis, I. I. (2006). Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092(1), 385-396.

Hinton, P. S., Nigh, P., Thyfault, J. Effectiveness of resistance training or jumping-exercise to increase bone mineral density in men with low bone mass: a 12-month randomized, clinical trial. *Bone* 2015; 79: 203-12.

Hochberg, M. C., Ross, P. D., Black, D., Cummings, S. R., Genant, H. K., Nevitt, M. C., Barrett-Connor, E., Musliner, T. & Thompson, D. (1999). Larger increases in bone mineral density during alendronate therapy are associated with a lower risk of new vertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis. *Arthritis & Rheumatism*, 42(6), 1246-1254.

Hsu, H., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Lacey, D. L., Tan, H.-L., Elliott, G., Kelley, M. J., Sarosi, I., Xia, X. Z., Elliott, R., Chiu L., Black, T., Scully, S., Capparelli, C., Morony, S., Shimamoto, G., Bass, M. B., Boyle, W. J., & Wang, L. (1999). Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3540-3545.

Huja, S. S., Hasan, M. S., Pidaparti, R., Turner, C. H., Garetto, L. P., & Burr, D. B. (1999). Development of a fluorescent light technique for evaluating microdamage in bone subjected to fatigue loading. *Journal of biomechanics*, 32(11), 1243-1249.

Jackson, R. D., Wactawski-Wende, J., LaCroix, A. Z., Pettinger, M., Yood, R. A., Watts, N. B., Robbins, J. A., Lewis, C. E., Beresford, S. A. A., Ko, M. G., Satterfield, S., Bassford, T. & Naughton, M. J. (2006). Effects of conjugated equine estrogen on risk of fractures and BMD in postmenopausal women with hysterectomy: results from the women's health initiative randomized trial. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(6), 817-828.

Khan, A. A., Morrison, A., Hanley, D. A., Felsenberg, D., McCauley, L. K., O'Ryan, F., Reid, I. R., Ruggiero, S. L., Taguchi, A., Tetradis, S., Brandi, L. M., Peters, E., Guise, T., Eastell, R., Cheung, A. M., Morin, S. N., Masri, B., Cooper, C., Morgan, S. L., Obermayer-Pietsch, B., Langdahl, B. L., Al Dabagh, R., Davison, K. S., Kendler, D. L., Sándor, G. K., Josse, R. G., Bhandari, M., El Rabbany, M., Pierroz, D. D., Sulimani, R., Saunders, D. P., Brown, J. P., Compston, J. & Watts, N. B. (2015). Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *Journal of Bone and Mineral Research*, 30(1), 3-23.

Khosla, S., Burr, D., Cauley, J., Dempster, D. W., Ebeling, P. R., Felsenberg, D., Gagel, R. F., Gilsanz, V., Guise, T., Koka, S., McGowan, J., McKee, M. D., Mohla, S., Pendrys, D. G., Raisz, L. G., Ruggiero, S. L., Shafer, D. M., Shum, L., Silverman, S. L., Van Poznak, C. H., Watts, N., Woo, S.-B., Shane, E. & McCauley, L. K. (2007). Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *Journal of Bone and Mineral Research*, 22(10), 1479-1491.

Krause, M., Soltau, M., Zimmermann, E. A., Hahn, M., Kornet, J., Hapfelmeier, A., Breer, S., Morlock, M., Wulff, B., Püschel, K., Amling, M., Busse, B. & Glueer, C. C. (2014). Effects of long-term alendronate treatment on bone mineralisation, resorption parameters and biomechanics of single human vertebral trabeculae. *Euro Cells Mat*, 28, 152-165.

Larrue, A., Rattner, A., Peter, Z. A., Olivier, C., Laroche, N., Vico, L., & Peyrin, F. (2011). Synchrotron radiation micro-CT at the micrometer scale for the analysis of the three-dimensional morphology of microcracks in human trabecular bone. *PLoS One*, 6(7), e21297.

Lenart, B. A., Lorch, D. G., & Lane, J. M. (2008). Atypical fractures of the femoral diaphysis in postmenopausal women taking alendronate. *New England Journal of Medicine*, 358(12), 1304-1306.

Lenart, B. A., Neviaser, A. S., Lyman, S., Chang, C. C., Edobor-Osula, F., Steele, B., van der Meulen, M. C. H., Lorch, D. G. & Lane, J. M. (2009). Association of low-energy femoral fractures with prolonged bisphosphonate use: a case control study. *Osteoporosis international*, 20(8), 1353-1362.

Lieberman, U. A., Weiss, S. R., Bröll, J., Minne, H. W., Quan, H., Bell, N. H., Portales, J. R., Downs, R. W., Dequeker, J., Favus, M., Recker, R. R., Capizzi, T., Santora, A. C., Lombardi, A., Shah, R. V., Hirsch, L. J., Karpf, D. B. & Seeman, E. (1995). Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. *New England Journal of Medicine*, 333(22), 1437-1444.

Lips, P. (2001). Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocrine reviews*, 22(4), 477-501.

Lo, J. C., Hui, R. L., Grimsrud, C. D., Chandra, M., Neugebauer, R. S., Gonzalez, J. R., Budayrb, A., Laue, G. & Ettinger, B. (2016). The association of race/ethnicity and risk of atypical femur fracture among older women receiving oral bisphosphonate therapy. *Bone*.

Luckman, S. P., Hughes, D. E., Coxon, F. P., Russell, R. G. G., & Rogers, M. J. (1998). Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(4), 581-589.

Marshall, D., Johnell, O., & Wedel, H. (1996). Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *Bmj*, 312(7041), 1254-1259.

Marx, R. E. (2003). Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 61(9), 1115-1117.

Marx, R. E. (2008). Uncovering the cause of “phossy jaw” circa 1858 to 1906: Oral and maxillofacial surgery closed case files—Case closed. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 66(11), 2356-2363.

Mashiba, T., Hirano, T., Turner, C. H., Forwood, M. R., Johnston, C. C., & Burr, D. B. (2000). Suppressed bone turnover by bisphosphonates increases microdamage accumulation and reduces some biomechanical properties in dog rib. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15(4), 613-620.

Mashiba, T., Turner, C. H., Hirano, T., Forwood, M. R., Johnston, C. C., & Burr, D. B. (2001). Effects of suppressed bone turnover by bisphosphonates on microdamage

accumulation and biomechanical properties in clinically relevant skeletal sites in beagles. *Bone*, 28(5), 524-531.

Menschutkin, N. (1865). Ueber die Einwirkung des Chloracetyls auf phosphorige Säure. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 133(3), 317-320.

Minne HW. (2001) Geriatric prevention. Bisphosphonates in the treatment of osteoporosis. *Pharm Unserer Zeit*. 30:512-517.

Modi, A., Siris, E. S., Tang, J., & Sen, S. (2015). Cost and consequences of noncompliance with osteoporosis treatment among women initiating therapy. *Current Medical Research & Opinion*, 31(4), 757-765.

Mohsin, S., O'Brien, F. J., & Lee, T. C. (2006). Microcracks in compact bone: a three-dimensional view. *Journal of anatomy*, 209(1), 119-124.

Nancollas, G. H., Tang, R., Phipps, R. J., Henneman, Z., Gulde, S., Wu, W., Mangood, A., Russell, R.G.G. & Ebetino, F. H. (2006). Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone*, 38(5), 617-627.

Nesbitt, S. A., & Horton, M. A. (1997). Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science*, 276(5310), 266-269.

Neviaser, A. S., Lane, J. M., Lenart, B. A., Edobor-Osula, F., & Lorich, D. G. (2008). Low-energy femoral shaft fractures associated with alendronate use. *Journal of orthopaedic trauma*, 22(5), 346-350.

Nieves, J. W., Bilezikian, J. P., Lane, J. M., Einhorn, T. A., Wang, Y., Steinbuch, M., & Cosman, F. (2010). Fragility fractures of the hip and femur: incidence and patient characteristics. *Osteoporosis international*, 21(3), 399-408.

NIH Consensus Statement (2000). Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy. March 27-29; 17(1): 1-36.

Nyman, J. S., Yeh, O. C., Hazelwood, S. J., & Martin, R. B. (2004). A theoretical analysis of long-term bisphosphonate effects on trabecular bone volume and microdamage. *Bone*, 35(1), 296-305.

Odvina, C. V., Zerwekh, J. E., Rao, D. S., Maalouf, N., Gottschalk, F. A., & Pak, C. Y. (2005). Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(3), 1294-1301.

Olson, K., & Van Poznak, C. (2007). Significance and impact of bisphosphonate-induced acute phase responses. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 13(4), 223-229.

Orwoll, E. S., Scheele, W. H., Paul, S., Adami, S., Syversen, U., Diez-Perez, A., Kaufman, J.-M., Clancy, A. D. & Gaich, G. A. (2003). The effect of teriparatide [human parathyroid hormone (1–34)] therapy on bone density in men with osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(1), 9-17.

Ott, S. M. (2001). Fractures after long-term alendronate therapy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(4), 1835-1835.

Pacifici, R., Brown, C., Puscheck, E., Friedrich, E., Slatopolsky, E., Maggio, D., McCracken, R. & Avioli, L. V. (1991). Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(12), 5134-5138.

Papapetrou, P. D. (2009). Bisphosphonate-associated adverse events. *Hormones (Athens)*, 8(2), 96-110.

Park-Wyllie, L. Y., Mamdani, M. M., Juurlink, D. N., Hawker, G. A., Gunraj, N., Austin, P. C., Whelan, D. B., Weiler, P. J. & Laupacis, A. (2011). Bisphosphonate use and the risk of subtrochanteric or femoral shaft fractures in older women. *Jama*, 305(8), 783-789.

Pauwels F. Die bedeutung der bauprinzipien des stutz- und bewegungsapparates für die beanspruchung der röhrenknochen. *Anatomy and Embryology* 1948;114:1-2.

Peck, W. A., Burckhardt, P., Christiansen, C., Fleisch, H. A., Genant, H. K., Gennari, C., Martin, T. J., Martini, L., Morita, R., Ogata, E., Rapado, A., Shulman, L.E., Stern, P.H. & Young, R.T.T. (1993). Consensus development conference-diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis.

Pietschmann, P., & Peterlik, M. (1999). Pathophysiologie und Therapie der Osteoporose. *Der Radiologe*, 39(3), 228-234.

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*, 284(5411), 143-147.

Pollähne, W., & Minne, H. W. (2001). Epidemiologie, Diagnostik und klinisches Bild der Osteoporose. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, 44(1), 32-36.

Prendergast PJ, Huiskes R (1995) The biomechanics of Wolff's law: recent advances. *Ir J Med Sci.* 164(2):152-4.

Priemel, M., Münch, C., Beil, F. T., Ritzel, H., & Amling, M. (2006). Pathophysiologie und Pathomorphologie der Osteoporose. *Der Radiologe*, 46(10), 831-838.

Reid, I. R., Bolland, M. J., & Grey, A. B. (2007). Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity?. *Bone*, 41(3), 318-320.

Reifenstein Jr, E. C., & Albright, F. (1947). The metabolic effects of steroid hormones in osteoporosis. *Journal of Clinical Investigation*, 26(1), 24.

Riggs BL, Melton LJ (1986) Involutional osteoporosis. *N Engl J Med* 314:1676–1686.

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), 185-191.

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), 48-55.

Ruggiero, S. L., Mehrotra, B., Rosenberg, T. J., & Engroff, S. L. (2004). Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 62(5), 527-534.

Russell, R. G. G. & Fleisch, H. (1975). Pyrophosphate and diphosphonates in skeletal metabolism: Physiological, clinical and therapeutic aspects. *Clinical orthopaedics and related research*, 108, 241-263.

Russell, R. G. G., Watts, N. B., Ebetino, F. H., & Rogers, M. J. (2008). Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporosis international*, 19(6), 733-759.

Salo, J., Lehenkari, P., Mulari, M., Metsikkö, K., & Väänänen, H. K. (1997). Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science*, 276(5310), 270-273.

Santini, D., Vincenzi, B., Caraglia, M., & Tonini, G. (2007). A hitherto unreported high incidence of zoledronic acid-induced acute phase reaction in patients with cancer treatment-induced bone loss. *Annals of oncology*, 18(1), 201-202.

Schaffler, M. B., & Burr, D. B. (1988). Stiffness of compact bone: effects of porosity and density. *Journal of biomechanics*, 21(1), 13-16.

Schilcher, J., Michaëlsson, K., & Aspenberg, P. (2011). Bisphosphonate use and atypical fractures of the femoral shaft. *New England Journal of Medicine*, 364(18), 1728-1737.

Schilcher, J., Koeppen, V., Aspenberg, P., & Michaelsson, K. (2014). Risk of atypical femoral fracture during and after bisphosphonate use. *New England Journal of Medicine*, 371(10), 974-976.

Schilcher, J., Koeppen, V., Aspenberg, P., & Michaëlsson, K. (2015). Risk of atypical femoral fracture during and after bisphosphonate use: Full report of a nationwide study. *Acta orthopaedica*, 86(1), 100-107.

Scriba, G. K. (2000). Bisphosphonate im Überblick. *Pharmazie in unserer Zeit*, 29(1), 50-56.

Shane, E., Burr, D., Ebeling, P. R., Abrahamsen, B., Adler, R. A., Brown, T. D., Cheung, A. M., Cosman, F., Curtis, J. R., Dell, R., Einhorn, T. A., Genant, H. K., Geusens, P., Klaushofer, K., Koval, K., Lane, J. M., McKiernan, F., McKinney, R., Ng, A., Nieves, J., O'Keefe, R., Papapoulos, S., Tet Sen, H., van der Meulen, M. C. H., Weinstein, R. S., Whyte, M. & Dempster, D. (2010). Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(11), 2267-2294.

Solomon, C. G., Black, D. M., & Rosen, C. J. (2016). Postmenopausal Osteoporosis. *New England Journal of Medicine*, 374(3), 254-262.

Stepan, J. J., Burr, D. B., Pavo, I., Sipos, A., Michalska, D., Li, J., Fahrleitner-Pammer, A., Petto, H., Westmore, M., Michalsky, D., Dobnig, H. & Sato, M. (2007). Low bone mineral density is associated with bone microdamage accumulation in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone*, 41(3), 378-385.

SUDA, T., TAKAHASHI, N., & MARTIN, T. J. (1992). Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine reviews*, 13(1), 66-80.

Sun, L., Peng, Y., Sharrow, A. C., Iqbal, J., Zhang, Z., Papachristou, D. J., Zaidi, S., Zhu, L. L., Yaroslavskiy, B. B., Zhou, H., Sairam, M. R., Kumar, T. R., Bo, W., Braun, J., Landa, L. C., Schaffler, M. B., Moonga, B. S., Blair, H. C., Zaidi, M. & Zallone, A. (2006). FSH directly regulates bone mass. *cell*, 125(2), 247-260.

Thompson, K., Rogers, M. J., Coxon, F. P., & Crockett, J. C. (2006). Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. *Molecular pharmacology*, 69(5), 1624-1632.

Tjhia, C. K., Odvina, C. V., Rao, D. S., Stover, S. M., Wang, X., & Fyhrie, D. P. (2011). Mechanical property and tissue mineral density differences among severely suppressed bone turnover (SSBT) patients, osteoporotic patients, and normal subjects. *Bone*, 49(6), 1279-1289.

von Domarus, C., & Amling, M. (2009). Volkswirtschaftliche Bedeutung einer Vitamin-D-Anreicherung von Lebensmitteln. *Osteologie*, 18(2), 112-124

Wehrhan, F., Stockmann, P., Nkenke, E., Schlegel, K. A., Guentsch, A., Wehrhan, T., Neukam, F. W. & Amann, K. (2011). Differential impairment of vascularization and angiogenesis in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw-related mucoperiosteal tissue. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 112(2), 216-221.

Welsch, U. (2006). Sobotta Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie, 2. Aufl. Elsevier, Urban&FischerVerlag, München, S. 131-146

WHO World Health Organization. (1994). Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: report of a WHO study group [meeting held in Rome from 22 to 25 June 1992].

Wolff, J. (1892). Gesetz der Transformation der Knochen. A. Hirschwald Berlin.

## 9. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Michael Amling, welcher mir die Möglichkeit gegeben hat im Rahmen meiner Dissertation ein äußerst interessantes Gebiet kennenzulernen, einen wissenschaftlichen Beitrag zu leisten und meine Fähigkeiten im Bereich der experimentellen Forschung auszubauen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Matthias Krause, der mir das Vertrauen für diese Arbeit geschenkt hat und mir für die gesamte Zeit meiner Promotion in allen unklaren Situationen zur Seite stand.

Ebenso möchte ich mich bedanken bei Dr. Ing. Michael Hahn für seine ständige Bereitschaft für technische Fragen, Bereitstellung von Bildmaterial und zügigen Hilfestellung bei Arbeiten im Institut.

Den übrigen Mitarbeitern möchte ich genauso einen Dank aussprechen für die stets nette und freundliche Zusammenarbeit im Institut für Osteologie und Biomechanik am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf.

Der größte Dank geht an meine Frau Eva Brunswig und meinen beiden Töchter Noemi und Lanea. Es war ein sehr zeitintensiver Abschnitt, indem mir alle stets zur Seite standen, mir Kraft und Motivation gegeben haben. Die bedingungslose Liebe und der ständige Rückhalt in allen schwierigen und anstrengenden Situationen machte die Promotion erst möglich.

Auch meiner restlichen Familie muss ich danken, da auch sie mir in der ganzen Zeit des Studiums und der Promotion stets zur Seite standen und mir uneingeschränkte Hilfe zukommen ließen.

## **10. Lebenslauf**

**Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen**



## **11. 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.

Benjamin Brunswig