

Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik

Direktorin: Prof. Dr. med. vet. Anita Ignatius

**Einfluss der Hypochlorhydrie-induzierten  
Calcium-Malabsorption auf die Frakturheilung**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Humanbiologie  
(Dr. biol. hum.)  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Ulm

Aline Heilmann

geboren in Erbach im Odenwaldkreis

Ulm 2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Anita Ignatius

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf Brenner

Tag der Promotion: 06. Juni 2014

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>7</b>
<b>1.1.</b>	<b>KNOCHENMETABOLISMUS</b>	<b>7</b>
1.1.1.	KNOCHENREMODELING	8
<b>1.2.</b>	<b>OSTEOPOROSE</b>	<b>11</b>
1.2.1	PATHOPHYSIOLOGIE DER OSTEOPOROSE	12
1.2.2	EPIDEMIOLOGIE DER OSTEOPOROSE UND OSTEOPOROTISCHER FRAKTUREN	13
<b>1.3.</b>	<b>CALCIUM</b>	<b>15</b>
1.3.1	CALCIUM IM KÖRPER	15
1.3.2	CALCIUM-HOMÖOSTASE	17
1.3.3	HYPERKALZÄMIE UND PRIMÄRER HYPERPARATHYREOIDISMUS	19
1.3.4	HYPOKALZÄMIE UND SEKUNDÄRER HYPERPARATHYREOIDISMUS	20
1.3.5	CALCIUM-THERAPIE BEI OSTEOPOROSE	21
1.3.6	CALCIUM UND FRAKTUREN	23
<b>1.4.</b>	<b>PROTONENPUMPENINHIBITOREN</b>	<b>24</b>
1.4.1	EINFLUSS VON PROTONENPUMPENINHIBITOREN UND HYPOCHLORHYDRIE AUF DEN KNOCHEN	26
1.4.2	PROTONENPUMPENINHIBITOREN UND FRAKTURRISIKO	28
<b>1.5.</b>	<b>ZIEL DER ARBEIT</b>	<b>30</b>
<b>2.</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>31</b>
<b>2.1.</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>31</b>
2.1.1	FIXATEUR EXTERNE	31
2.1.2	TIERMODELLE	32
2.1.3	CHOLEZYSTOKININ-B/GASTRIN-REZEPTOR DEFIZIENTE MAUS ( <i>CCKBR<sup>-/-</sup></i> )	33
2.1.4	TIERHALTUNG	33
<b>2.2.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>36</b>
2.2.1	PRÄOPERATIVE UND POSTOPERATIVE BEHANDLUNGEN	36
2.2.2	OPERATIONSVORBEREITUNGEN	37
2.2.3	OSTEOTOMIE DES FEMURS	38
2.2.4	BLUTENTNAHME UND EUTHANASIE	40
2.2.5	PRÄPARATION DER KNOCHEN EX-VIVO	40
2.2.6	BIOMECHANISCHE TESTUNG	41
2.2.7	μCT-AUFNAHMEN	42
2.2.8	HISTOLOGIE	44
2.2.9	HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN	45
2.2.10	SERUMANALYSEN	47
2.2.11	STATISTIK	48
<b>3.</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>50</b>
<b>3.1.</b>	<b>AUSWERTUNG DES NICHT-OSTEOTOMIERTEN KNOCHENS</b>	<b>50</b>
3.1.1	ERGEBNISSE DER BIOMECHANISCHEN DREI-PUNKT-BIEGUNG	50

3.1.2	ERGEBNISSE DER $\mu$ CT-ANALYSEN	51
<b>3.2.</b>	<b>AUSWERTUNG DES OSTEOTOMIERTEN KNOCHENS</b>	<b>53</b>
3.2.1	ERGEBNISSE DER BIOMECHANISCHEN DREI-PUNKT-BIEGUNG	53
3.2.2	ERGEBNISSE DER $\mu$ CT-ANALYSEN	54
3.2.3	KORTIKALE ÜBERBRÜCKUNG DES FRAKTURSPALTS	56
<b>3.3.</b>	<b>HISTOLOGISCHE GEWEBEDIFFERENZIERUNG</b>	<b>58</b>
<b>3.4.</b>	<b>CALCIUM- UND PARATHORMONKONZENTRATION IM SERUM</b>	<b>63</b>
<b>4.</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>65</b>
4.1.	EFFEKTE DER CALCIUM-MALABSORPTION UND CALCIUM-SUPPLEMENTATION AUF DEN NICHT-OSTEOTOMIERTEN KNOCHEN	65
4.2.	EFFEKTE DER CALCIUM-MALABSORPTION AUF DIE SERUM-CALCIUM- UND SERUM-PTH-KONZENTRATION	71
4.3.	EFFEKTE DER OSTEOTOMIE AUF DIE PTH- UND CALCIUM-KONZENTRATION IM SERUM	73
4.4.	EFFEKTE DER CALCIUM-MALABSORPTION UND CALCIUM-SUPPLEMENTATION AUF DEN OSTEOTOMIERTEN KNOCHEN	77
<b>5.</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>85</b>
<b>6.</b>	<b><u>LITERATUR</u></b>	<b>84</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celcius
A	Ampere
BFR	bone formation rate (Knochenformationsrate)
BMD	bone mineral density (Knochenmineraldichte)
BMP	bone morphogenetic protein (Knochenmorphogenetisches Protein)
BS	bone surface (Knochenoberfläche)
C	Calcium-Carbonatfutter
CAII	Carboanhydrase II
Cckbr	Cholezystokinin-B/Gastrin-Rezeptor
Cg	cartilage (Knorpel)
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
dL	Deziliter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Biegesteifigkeit
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der vereinten Nationen)
FGF	fibroblast growth factor (Fibroblastenwachstumsfaktor)
FT	fibrous tissue (fibröses Gewebe)
HA	Hydroxylapatit
HCl	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
IGF	insulin-like growth factors (insulinähnliche Wachstumsfaktoren)
kV	Kilovolt
LRP5	low-density lipoprotein-receptor-related-protein 5
M	Mischfutter
max.	maximal
Max.	Maximum
mg	Milligramm
min	Minuten
Min.	Minimum

mind.	mindestens
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
NF- $\kappa$ B (RANK)	Rezeptor Aktivator Nuklearfaktor-kappa-B
NF- $\kappa$ B (RANKL)	Rezeptor Aktivator Nuklearfaktor-kappa-B-Ligand
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drugs (nichtsteroidale anti-inflammatorische Medikamente)
OPG	Osteoprotegerin
OVX	ovariektomiert
pg	Pikogramm
PPI	Protonenpumpeninhibitor
PTH	Parathormon
ROI	region of interest (Auswertungsregion in 2D)
S	Standardfutter
sek.	Sekunden
SERM	selective estrogen receptor modulator (selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator)
TOT	total osseous tissue (Gesamtknochengewebe)
TRAP	tartrate resistant acid phosphatase (Tartrat-resistente saure Phosphatase)
VOI	volume of interest (Auswertungsregion in 3D)
vs.	versus
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
WT	Wildtyp
$\mu$ CT	Mikro-Computer-Tomographie
$\mu$ m	Mikrometer

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Einflussfaktoren auf die Knochenhomöostase. ....	7
Abbildung 2: Vereinfachtes Schaubild der Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten. ....	9
Abbildung 3: Die Pathogenese der Osteoporose .....	12
Abbildung 4: Querschnitt durch einen Wirbelkörper eines jungen ( <i>links</i> ) und eines älteren Menschen ( <i>rechts</i> ).....	13
Abbildung 5: Veränderungen des kortikalen Knochens mit dem Lebensalter ....	14
Abbildung 6: Calcium-Homöostase im Körper .....	19
Abbildung 7: Mögliche Auswirkungen nach einer Langzeit-PPI-Einnahme .....	27
Abbildung 8: Instrumentarium für die Operation der Mäuse.....	32
Abbildung 9: Phänotypisierung von 2, 12 und 52 Wochen alten <i>Cckbr<sup>-/-</sup></i> -Mäusen im Vergleich zum Wildtyp .....	34
Abbildung 10: Operationsverlauf der Osteotomie des Femurs.....	39
Abbildung 11: Biomechanische Testung mit Drei-Punkt-Biegeprüfung.....	42
Abbildung 12: VOI für die Auswertung der $\mu$ CT-Aufnahmen der osteotomierten Femora.....	44
Abbildung 13: ROI für die Auswertung der histologischen Schnitte .....	47
Abbildung 14: Biegesteifigkeit der intakten Femora nach 24 (A) und 32 (B) Tagen Standzeit.....	51
Abbildung 15: Biegesteifigkeit der osteotomierten Femora nach 24 (A) und 32 (B) Tagen Standzeit .....	53
Abbildung 16: $\mu$ CT-Ergebnisse des Gesamtkallusvolumens (A und B), des relativen Knochenanteils (B und C) und der Knochenmineraldichte (E und F) der Kalli nach 24 und 32 Tagen Standzeit.....	55
Abbildung 17: Flächenträgheitsmoment $I_x$ (A und B) und apparenter E-Modul (C und D) nach 24 und 32 Tagen Standzeit.....	56
Abbildung 18: Histologische Schnitte der osteotomierten Femora des WT mit Standard- und Mischfutter nach 10, 24 und 32 Tagen Standzeit ..	60
Abbildung 19: Histologische Schnitte der osteotomierten Femora der <i>Cckbr<sup>-/-</sup></i> mit Standard-, Carbonat- und Mischfutter nach 10, 24 und 32 Tagen Standzeit.....	61
Abbildung 20: Histologische Auswertung des relativen Knochenanteils im Frakturkallus nach 10 (A), 24 (B) und 32 (C) Tagen Standzeit.....	62

Abbildung 21: Parathormon- (A, C) und Calcium-Konzentration (B, D) im Serum des WT und der <i>Cckbr</i> -defizienten Mäuse prä-op (T 0), nach 10 (T 10), 24 (T 24) und 32 (T 32) Tagen Standzeit mit unterschiedlichem Futter .....	64
---	----

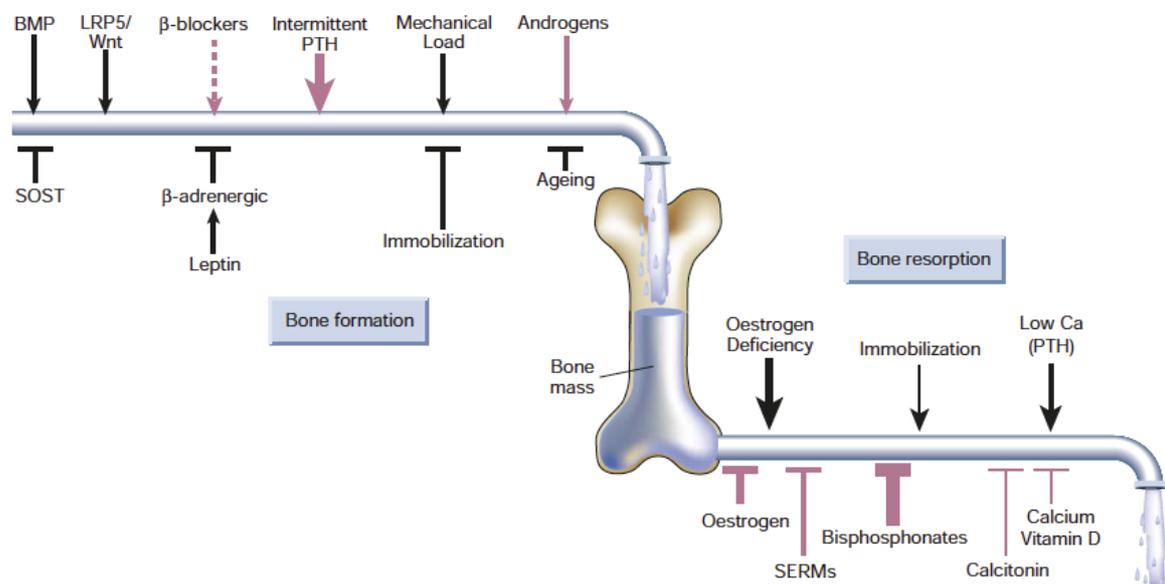
## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Definition der Osteoporose mittels festgelegtem T-Score der WHO .....	11
Tabelle 2: Mineralstoffe, Vitamine und Spurenelemente in den verwendeten Diäten.....	34
Tabelle 3: In die Auswertung eingeschlossene Tierzahlen pro Gruppe, Standzeit und Futter. ....	35
Tabelle 4: Ausfälle innerhalb der Behandlungsgruppen während der Operation .....	50
Tabelle 5: Ergebnisse der $\mu$ CT-Auswertung der nicht-osteotomierten Femora im WT und in <i>Cckbr</i> <sup>-/-</sup> mit unterschiedlichem Futter nach 24 Tagen Standzeit .....	52
Tabelle 6: Ergebnisse der $\mu$ CT-Auswertung der nicht-osteotomierten Femora im WT und in <i>Cckbr</i> <sup>-/-</sup> mit unterschiedlichem Futter nach 32 Tagen Standzeit .....	52
Tabelle 7: Anzahl der Mäuse pro Gruppe mit 1, 2, 3 oder 4 überbrückten Kortices an Tag 24 im WT und in <i>Cckbr</i> <sup>-/-</sup> mit unterschiedlichen Diäten.....	57
Tabelle 8: Anzahl der Mäuse pro Gruppe mit 1, 2, 3 oder 4 überbrückten Kortices an Tag 24 im WT und in <i>Cckbr</i> <sup>-/-</sup> mit unterschiedlichen Diäten.....	57
Tabelle 9: Prozentuale Anzahl geheilter Knochen an Tag 24 und 32 im WT und in <i>Cckbr</i> <sup>-/-</sup> mit unterschiedlichen Diäten.....	58

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Knochenmetabolismus

Die Knochenhomöostase wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, wie z.B. durch Calcium, Hormone (z.B. Östrogen, Androgen, Parathormon), Cytokine und Wachstumsfaktoren [26, 38]. Sie können die Bildung der Knochenmasse stimulieren oder hemmen, indem sie die Knochenbildung oder -resorption fördern oder hemmen (Abbildung 1). Androgene wirken positiv auf die Knochenbildung, während Östrogen eine inhibierende Wirkung auf die Knochenresorption hat und eine Östrogen-Defizienz daher die Resorption fördert. Die Menge an verfügbarem Calcium entscheidet ebenfalls über die Wirkung auf den Knochen. Bei einem niedrigen Spiegel wird vermehrt Parathormon ausgeschüttet, was wiederum die Knochenresorption erhöht, um Calcium aus der mineralischen Knochenmatrix (Hydroxylapatit) zu lösen. Ein ausreichender Calcium-Spiegel hemmt dagegen die Knochenresorption.



**Abbildung 1: Einflussfaktoren auf die Knochenhomöostase.**

Die dargestellten Faktoren können eine fördernde oder hemmende Wirkung auf die Knochenbildung und -resorption haben und damit die Knochenmasse positiv oder negativ beeinflussen. Pfeile zeigen einen fördernden Einfluss, „T-Linien“ einen hemmenden. Die Dicke der Pfeile und Linien gibt hierbei deren Wirkungsgrad an. Schwarz dargestellt sind physiologische, rot pharmakologische Faktoren. Durchgängige Linien sind angewendete Therapien, gepunktete putative.

BMP, bone morphogenetic proteins, LRP5, low-density lipoprotein-receptor-related protein 5; PTH, Parathormon; SERM, selective estrogen receptor modulator; SOST, Gen codierend für das Protein Sklerostin [38]

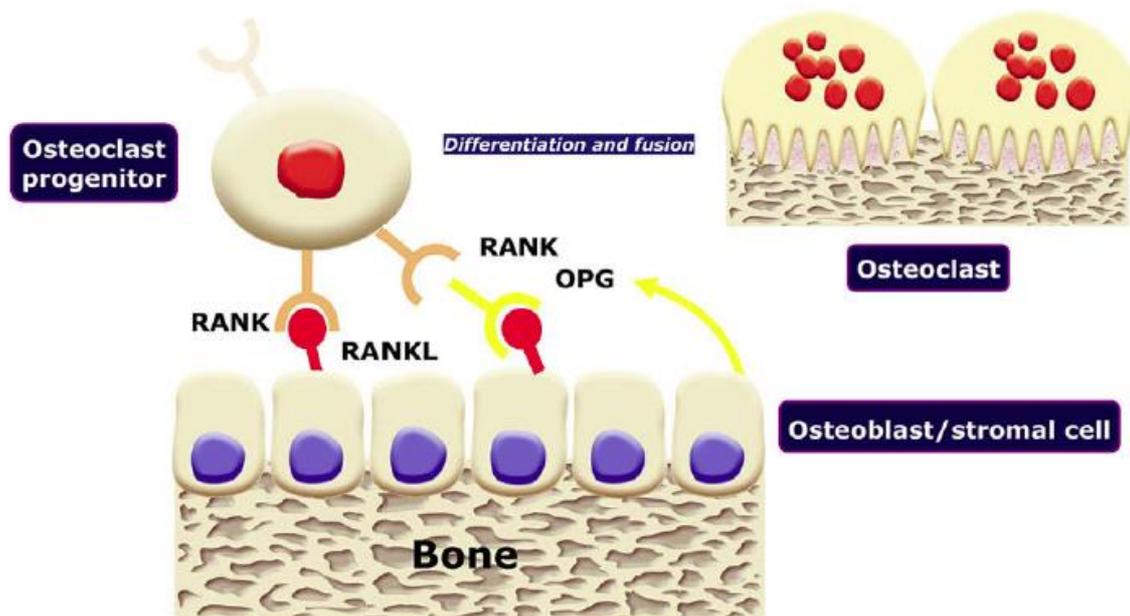
Der Wirkungsgrad der Inhibitoren und Stimulatoren ist demnach entscheidend für die Balance zwischen der Knochenresorption und -formation, die über den Erhalt oder Verlust der Knochenmasse entscheidet. Fehlendes Östrogen, z.B. während der Postmenopause, kann durch eine gesteigerte Resorption zu einem Ungleichgewicht und zu erheblichen Störung des Knochenmetabolismus führen. Für den Erhalt der Knochenmasse bei z.B. höherer mechanischer Belastung ist die Neubildung von Knochen an belasteten Stellen wichtig. Dies wird über das Knochenremodeling gesteuert.

### **1.1.1. Knochenremodeling**

Knochengewebe unterliegt einem ständigen Umbauprozess (Remodeling), der durch Knochen-resorbierende Zellen, die Osteoklasten, und Knochen-aufbauenden Zellen, die Osteoblasten, erfolgt [14, 101]. Die Osteoklasten differenzieren aus Vorläuferzellen der hämatopoetischen Stammzellen der Monozyten- und Makrophagenzelllinie, was durch die Osteoblasten, initiiert wird. Das von Osteoblasten produzierte und sezernierte Zytokin receptor activator NF-kappa-B-Ligand (RANKL) bindet an receptor activator NF-kappa-B (RANK) auf den Prä-Osteoklasten und stimuliert durch Aktivierung von entsprechenden Transkriptionsfaktoren deren Differenzierung zu aktiven multinukleären Osteoklasten [13]. Diese heften sich mittels  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin an die Knochenoberfläche an und bilden Resorptionslakunen (Howship-Lakunen), indem sie mittels Protonenpumpen und Chlorid-Kanälen in ihrer Saumfaltenstruktur ein sehr saures Milieu erzeugen. In diesem Milieu produzieren Osteoklasten Kathepsin K, eine Cystein-Protease, die das Kollagen im Knochen degradiert. Während der Resorption des Knochens werden aus dem Hydroxylapatit gelöstes Calcium und Phosphat über Diffusion oder in Vesikeln durch Transzytose in die Umgebung freigesetzt [7, 41, 106]. In diesen Vesikeln befindet sich auch das Enzym Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP), das von Osteoklasten während der Resorption gebildet wird und als Knochenumbau- bzw. Abbaumarker dient [41].

Der RANKL-RANK-Signalweg und damit die Osteoklastenformation kann durch das Protein Osteoprotegerin (OPG) gehemmt werden, welches von Osteoblasten sezerniert wird [14]. Es fungiert auf der Osteoblastenoberfläche als sogenannter

„Täuschungs-Rezeptor“, indem es die Form eines Rezeptors hat, an dem RANKL binden kann. Durch die Expression von OPG und das „Abfangen“ von RANKL wird die Osteoklastenbildung gehemmt und damit die Knochenresorption vermindert (Abbildung 2). Eine OPG-Überexpression und damit eine gegenüber der Resorption überwiegende Knochenbildung führt wiederum zu Osteopetrose, einer pathologisch erhöhten Knochenmasse mit gleichzeitiger Verringerung der Knochenfestigkeit durch Änderungen der Mikrostruktur [103]. Im Gegensatz hierzu führt fehlendes OPG zu einem osteoporotischen Phänotyp aufgrund erhöhter Osteoklastenformation. In der Postmenopause führt der reduzierte Östrogenspiegel zu einer verminderten OPG- und einer erhöhten RANKL-Expression [29]. Die folglich gesteigerte Osteoklastenformation und Knochenresorption resultiert in einer erhöhten Porosität durch eine Verminderung der Knochenmineraldichte im trabekulären und kortikalen Knochen, Verlust von trabekulären Strukturen und vermehrt auftretenden Frakturen [15, 73].



**Abbildung 2: Vereinfachtes Schaubild der Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten.**

RANK, receptor activator NF-kappa-B; RANKL, receptor activator NF-kappa-B-ligand; OPG, Osteoprotegerin [26]

Für den Aufbau von Knochen sind die Knochen-bildenden Zellen, die Osteoblasten, verantwortlich. Die Reifung der Osteoblastenvorläuferzellen aus

mesenchymalen Stammzellen wird wesentlich über den Transkriptionsfaktor Runx2 vermittelt [29], welcher wiederum von anderen Faktoren wie BMPs (bone morphogenetic proteins), FGF (fibroblast growth factors) und IGF (insulin-like growth factors) reguliert wird. Endokrine Faktoren wie Östrogen, Parathormon und Vitamin D haben ebenfalls einen Einfluss auf die Osteoblastenreifung und -aktivität. Reife Osteoblasten sind charakterisiert durch die Expression von alkalischer Phosphatase, Typ I Kollagen, Osteocalcin und RANKL. Aktive Osteoblasten haben eine Lebensspanne von 3 Monaten und befinden sich auf der Knochenoberfläche.

Einen weiteren Knochenzelltyp stellen die Osteozyten dar, die mechanosensitiven Zellen [61]. Diese sind der häufigsten Zelltyp im Knochen und liegen 10 Mal häufiger als Osteoblasten vor. Osteozyten befinden sich in der Knochenmatrix und kommunizieren über dendritische Fortsätze des Zellplasmas mit anderen Osteozyten, wodurch sie z.B. Mikrorisse im Knochen oder mechanische Belastungen detektieren können und Signale für den Knochenumbau oder -anbau weiterleiten können [9].

Obwohl Osteoklasten nur eine Lebensspanne von 2 Wochen haben [61], erfolgt die Knochenneubildung im Vergleich zum Resorptionsprozess viel langsamer, so dass innerhalb 2-3 Wochen abgebauter Knochen erst nach 3 Monaten komplett durch neugebildeten ersetzt wird [38]. Eine Verschiebung der Osteoblasten-Osteoklasten-Balance zugunsten der Osteoklasten führt demnach zu einer erheblichen Störung des Knochens durch einen Verlust der Knochenmasse. Dies kann die Folge einer gesteigerten Resorption (erhöhte Osteoklastenaktivität), einer verringerten Knochenneubildung (verminderte Osteoblastenaktivität) oder eine Kombination aus beidem sein, wie im Fall der Osteoporose. Hier führt ein gesteigertes Remodeling mit einer erhöhten Resorptionsrate und einer unvollständigen Knochenneubildung zu einem Verlust der Knochenmasse und porösen Knochen [29].

## 1.2. Osteoporose

Osteoporose bezeichnet eine systemische Veränderung des Knochens, die durch eine verminderte Knochenmasse, -festigkeit und einer Veränderung der Mikroarchitektur gekennzeichnet ist [22]. Einhergehend mit diesen Störungen erhöht sich das Risiko von Frakturen, da der Knochen zunehmend poröser und damit fragiler wird. Die World Health Organisation (WHO) definierte die Osteoporose mittels des sogenannten T-Score, der die Standardabweichung der gemessenen Knochenmineraldichte vom mittleren Normwert gesunder, junger erwachsener Frauen angibt (Tabelle 1).

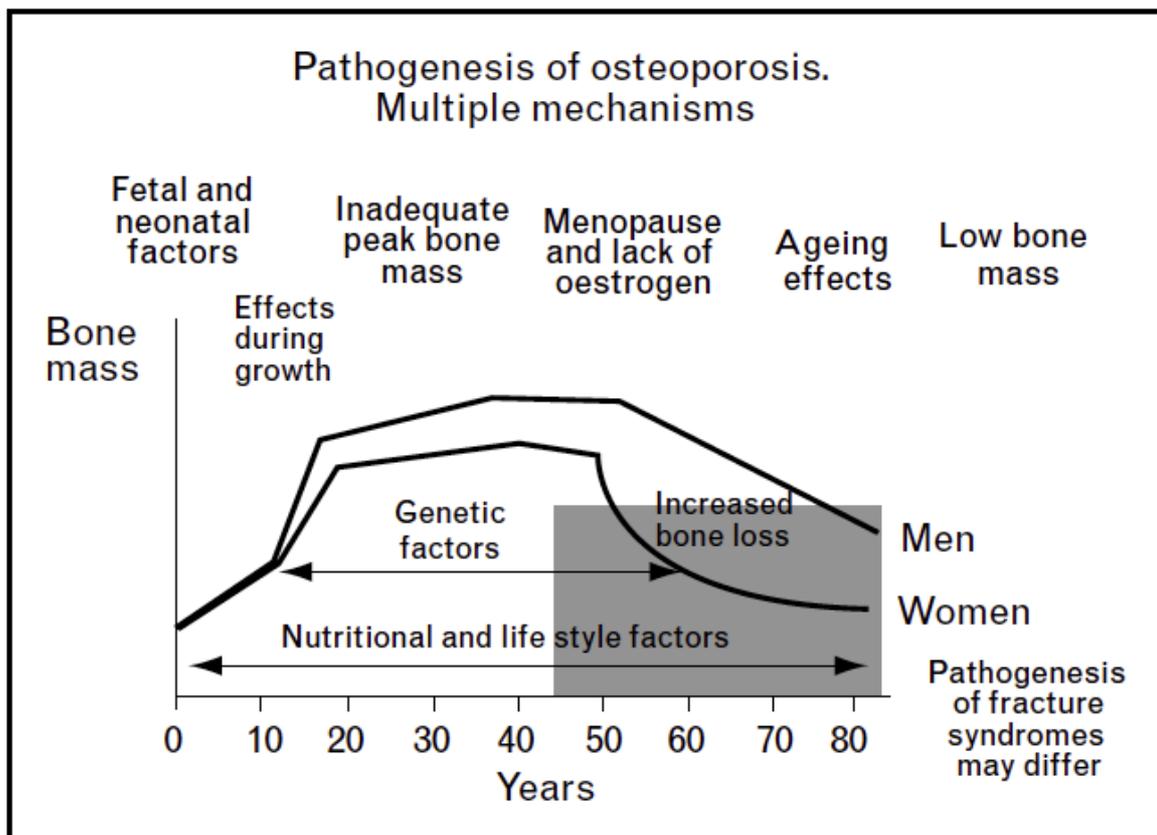
**Tabelle 1: Definition der Osteoporose mittels festgelegtem T-Score der WHO**

<b>T-Score</b>	<b>Befund</b>
$\geq -1$	Normalbefund
-1 bis $\geq -2,5$	Osteopenie
$\leq -2,5$	Osteoporose
$\leq -2,5$ und mind. eine Fraktur	manifestierte schwere Osteoporose

Man unterscheidet zwischen der primären und sekundären Osteoporose [30]. Innerhalb der primären Osteoporose bezeichnet die Subgruppe Typ I die postmenopausale Osteoporose, die primär auf den Verlust von Östrogen während der Menopause zurückzuführen ist. Typ II ist die alters-assoziierte Form und kann sowohl Frauen, als auch Männer betreffen. Eine sekundäre Osteoporose ist gekennzeichnet durch Störungen des Knochens z.B. aufgrund von Medikationen, wie die Glukokortikoid-induzierte Osteoporose, oder einer Immobilisation (Immobilisation-induzierte Osteoporose). Risikofaktoren sind genetische Faktoren, zunehmendes Alter, ein geringer Body-Mass-Index, Alkohol- und Tabakkonsum [81].

### 1.2.1 Pathophysiologie der Osteoporose

Die Knochenmasse wird von verschiedenen Faktoren geregelt, wie z.B. dem Einfluss von Genen, Nahrung, physischer Aktivität oder dem Lebensstil [82]. Die maximale Knochenmasse („peak bone mass“), die ein erwachsener Mensch erreichen kann, ist neben genetischen Faktoren abhängig von der Knochenbildung während den Monaten im Mutterleib, der Kindheit und der Pubertät [86, 89] (Abbildung 3).

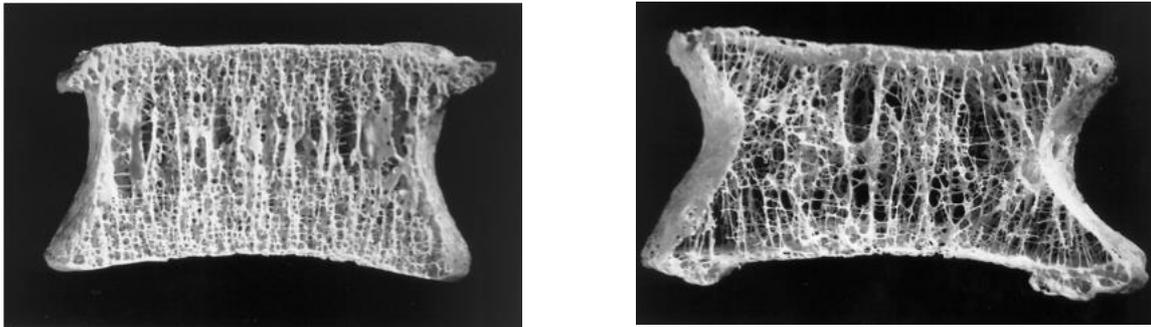


**Abbildung 3: Die Pathogenese der Osteoporose**

Verschiedene Faktoren beeinflussen die Knochenmasse während des Lebens. Während der embryonalen, kindlichen und pubertären Wachstumsphasen, die die maximale Knochenmasse beeinflussen, überwiegt im Normalfall die Knochenformation die Resorption. Während der Menopause, die hauptsächlich durch einen Abfall des Östrogenspiegels gekennzeichnet ist, tritt ein erhöhter Knochenmasseverlust auf. War vor der Menopause der Knochen bereits durch eine geringe „peak bone mass“ gekennzeichnet, führt dies zu einem erhöhtem Knochenverlust, was wiederum das Frakturrisiko stark erhöht [86].

Pro Jahr verlieren gesunde Erwachsene 0,3 % ihrer Knochenmasse, wohingegen dieser Verlust bei Frauen in der Postmenopause wesentlich höher ist [37]. Resultierend aus einer relativen Erhöhung des Knochenabbaus (Resorption)

gegenüber der Knochenbildung (Formation) zeichnet sich der osteoporotische Knochen im Gegensatz zum gesundem Knochen durch eine verminderte Knochenmasse und eine veränderte -struktur aus. Primär betrifft diese Verminderung den trabekulären Knochen, wie z.B. Wirbelkörper, Femurkopf und die trabekulären Strukturen im Radius (Abbildung 4).



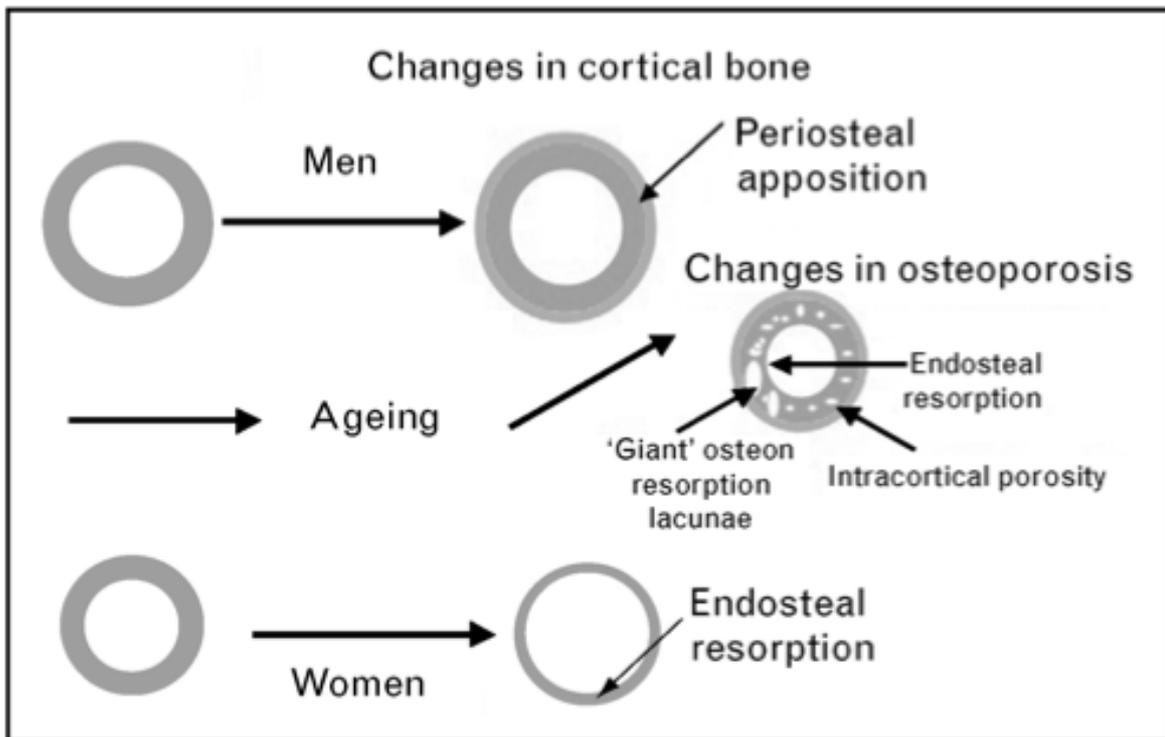
**Abbildung 4: Querschnitt durch einen Wirbelkörper eines jungen (*links*) und eines älteren Menschen (*rechts*)**

Der Schnitt durch den gesunden Wirbelkörper zeigt eine dichte, intakt vernetzte Spongiosa. Der Wirbelkörper des älteren Menschen ist durch eine Verformung in Folge einer Abnahme der Wirbelkörperhöhe gekennzeichnet. Aufgrund von Knochenresorption weist die Spongiosa löchrige Strukturen, eine geringere Dichte und Instabilität auf [68].

Gleichzeitig ändert sich auch die Struktur des kortikalen Knochens (Abbildung 5). Bei älteren Frauen wird mehr Knochen endostal resorbiert und periostal neugebildeter Knochen angelagert. Da jedoch die Resorption die Knochenbildung überwiegt, führt dies zu einem größerem Durchmesser des Knochenmarks und einem größeren kortikalen Gesamtdurchmesser mit jedoch einer dünneren Kortikalis [87].

### 1.2.2 Epidemiologie der Osteoporose und osteoporotischer Frakturen

Osteoporose ist eine weltweit häufig auftretende Krankheit. Nach einem Bericht der WHO von 1994 sind über 30 % der postmenopausalen Frauen von Osteoporose betroffen. Im Jahr 2003 wurden in Deutschland bei 39 % der Frauen und 10 % der Männer  $\geq 50$  Jahre Osteoporose diagnostiziert [40]. Die Anzahl auf Osteoporose zurückzuführenden Frakturen belief sich auf > 300 000 Fälle, was ca. 4 % aller Osteoporose-Patienten entspricht. Risikofaktoren für Frakturen sind z.B.



**Abbildung 5: Veränderungen des kortikalen Knochens mit dem Lebensalter**

Bei Männern kommt es im Laufe des Alters zu einer periostalen Knochenanlagerung und damit zu einer Zunahme der kortikalen Dicke. Knochen von älteren Frauen weisen dagegen eine höhere endostale Resorption auf. Im Falle von osteoporotischen Knochen ist diese endostale Resorption trotz gleichzeitigem periostalen Knochenzuwachs so erhöht, dass vermehrt große Resorptionslakunen in der Kortikalis auftreten, die zu einem porösen Knochen führen [86].

eine geringe Knochendichte, bereits früher aufgetretene Frakturen, Glukokortikosteroide, Rauchen und das Lebensalter [54, 86]. Das Lebensrisiko für eine osteoporotische Fraktur beträgt für Frauen 40-50 % und für Männer 13-22 % [53]. Die häufigsten Frakturen treten in den trabekulären Regionen des osteoporotischen Knochens auf, wie Hüfte oder Wirbelkörper [22, 27]. In Deutschland waren 2003 von 333 322 aufgetretenen osteoporotischen Frakturen 30 % Hüftfrakturen [40]. Hochrechnungen zufolge sind ca. 90 % aller Hüft- und Vertebrafrakturen bei älteren Menschen auf Osteoporose zurückzuführen (Melton 1997). Mehr als 50 % der Patienten mit einer Hüftfraktur bleiben körperlich eingeschränkt, 5-20 % sterben innerhalb eines Jahres nach Auftreten der Fraktur aufgrund von auftretenden Komplikationen wie z.B. Thrombosen, hervorgerufen durch die chronische Immobilisation [22]. Im Jahr 1990 betrug die Anzahl von Hüftfrakturen nach Cooper et al. [23] 1,6 Mio. und wurde für das Jahr 2050 weltweit auf ca. 6,26 Mio. geschätzt.

Erst nach dem Auftreten von Frakturen wird in vielen Fällen die Diagnose Osteoporose gestellt, da die Krankheit zunächst symptomlos verläuft und durch diese Unterdiagnostizierung auch keine Therapie eingeleitet wird. Die Behandlung, aber auch eine rechtzeitige Prophylaxe, könnten jedoch gerade in der frühen Krankheitsphase spätere Frakturen verhindern. Bei einem rechtzeitig diagnostizierten Risiko für Osteoporose, wie z.B. die Postmenopause, familiäres Auftreten von Osteoporose, geringer Körpermasse-Index (BMI) und geringe Knochenmasse, wird primär zur Prophylaxe und Behandlung eine Basistherapie mit Calcium/Vitamin D angewendet, die auch in den 2009 veröffentlichten Leitlinien des „Dachverband der Osteologie“ (DVO) empfohlen wurde [24]. Als Empfehlung gilt eine tägliche Aufnahme von 1000 mg Calcium über die Nahrung, die bei einer unzureichenden Aufnahme durch eine Calcium-Supplementation ergänzt werden sollte. Zusätzlich wurde eine tägliche 30minütige Sonnenlichtexposition der Arme und des Gesichts zur Bildung des Vitamin D3 empfohlen, was ebenfalls bei weniger Sonnenlichtexposition durch eine Supplementierung mit 800-2000 IE Vitamin D3 komplementiert werden könnte. Bei schweren Fällen der Osteoporose mit einem erhöhten Risikofaktor für Frakturen, wie z.B. durch die Einnahme von Glukokortikoiden, einer Fraktur nach dem 50. Lebensjahr, Vorliegen eines Hyperparathyreoidismus oder auch Nikotinkonsum, kann die Basistherapie mit einer medikamentösen Behandlung, z.B. mit Bisphosphonaten, kombiniert werden [24]. Von allen verzeichneten Osteoporose-Patienten in Deutschland nahmen 17 % Präparate mit Calcium/Vitamin-D, gefolgt von 10 % mit einer Bisphosphonat-Therapie [40].

## **1.3. Calcium**

### **1.3.1 Calcium im Körper**

Im Knochen liegen 99 % des gesamten Calcium-Reservoirs des Körpers in gebundener Form vor. Rund die Hälfte des extrazellulären Knochenmaterials besteht aus Calcium-Phosphat-Verbindungen, primär Hydroxylapatit, so dass Calcium für die Bildung der extrazellulären Matrix essentiell ist. Durch Calcium erhält der Knochen seine Festigkeit und stellt hierbei gleichzeitig das Calcium-Depot für den Ein- und Abbau von Calcium. Calcium, das nicht im

Knochen gebunden ist (ca. 1 %), ist in den Zähnen und im Weichgewebe eingelagert. Im extrazellulären Bereich findet sich ca. 0,1 % Calcium, das für extra- und intrazelluläre Signalwege, für die Nervenerregung und Reizweiterleitung, und für Muskelkontraktionen benötigt wird. Die Calcium-Versorgung des Körpers erfolgt nur über die Nahrungsaufnahme, so dass die Absorption abhängig ist von der insgesamt aufgenommenen Menge über die Nahrung (calciumarme oder -reiche Kost), der intestinalen Absorption, sowie von der ausgeschiedenen Menge über Schweiß, Urin und Fäzes. Zusätzlich spielen auch eine Schwangerschaft und Stillzeit, Skelettwachstum während der Kindheit und Pubertät eine wichtige Rolle, da der Bedarf an Calcium während dieser Phasen höher ist [75]. Der Calciumverlust kann durch die Nahrung beeinflusst werden. Tierisches Protein, Kaffee, Tee, Alkohol und Speisesalz können die Calciumausscheidung über den Urin erhöhen [37].

Empfehlungen zur täglichen Calcium-Aufnahme werden in der Literatur mit unterschiedlichen Werten angegeben. Heaney empfahl für Jugendliche 1350-1550 mg/Tag, für Erwachsene 800-1200 mg/Tag und für Ältere 1400 -1700 mg/Tag [43]. Die WHO (World Health Organization) schlug gemeinsam mit der FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) eine tägliche Calcium-Aufnahme von 1300 mg für Jugendliche zwischen 10 und 18 Jahren vor, für erwachsene Frauen bis zum Eintritt in die Menopause 1000 mg und ab der Postmenopause 1300 mg [32]. Für Männer zwischen 19 und 65 Jahren wurden 1000 mg, ab 65 Jahren 1300 mg vorgeschlagen.

Eine ausreichende Versorgung mit Vitamin D (1,25-Dihydroxycholecalciferol) ist ebenfalls von großer Bedeutung für die Calcium-Absorption. Calcium wird bei geringen Calciumkonzentrationen aktiv im Körper weiter transportiert. Der Transport durch die Magenschleimhaut erfolgt vermittelt durch Vitamin D. Dieses erhöht die Expression des Transportproteins Calbindin- $D_{9k}$ , das Calcium mit hoher Affinität bindet, und via Calciumionen-Kanäle in die extra- und intrazelluläre Umgebung sezerniert [48]. Bei höheren Konzentrationen wird Calcium über passive Diffusion absorbiert, welche allerdings nur ca. 8-23 % der gesamten Calciumabsorption ausmacht [63]. Der durch ausreichend Vitamin D vermittelte aktive Transport ist daher entscheidend für die benötigte tägliche Calciumabsorption. Vorläufer von Vitamin D werden unter dem Einfluss ultravioletter Strahlung (230-315 nm) in der Haut synthetisiert und in der Leber und

Niere in die biologisch aktive Form metabolisiert. Die DVO empfahl in ihren Leitlinien von 2009 eine tägliche Sonnenexposition der Arme und des Gesichtes von 30 min zur ausreichenden Bildung von Vitamin D [24]. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) empfahl dagegen je nach Monat und Hauttyp eine Bestrahlung des Gesichts, der Hände und Teile der Arme und Beine von 5-25 min, wobei die Sonnenstrahlen in den Wintermonaten Oktober bis März nicht ausreichend seien, um Vitamin D zu bilden ([http://www.bfr.bund.de/de/ausgewaehlte\\_fragen\\_und\\_antworten\\_zu\\_vitamin\\_d-131898.html](http://www.bfr.bund.de/de/ausgewaehlte_fragen_und_antworten_zu_vitamin_d-131898.html), Zugriff am 05.11.2013). Da jedoch Vitamin D als Provitamin im Körper gespeichert werden kann, ist eine entsprechende Sonnenlichtexposition in den anderen Monaten eine mögliche Prävention vor einer Unterversorgung in den Wintermonaten. Allerdings zeigte eine Studie, dass auch in den Sommermonaten eine Vitamin-D-Defizienz auftreten kann [45]. Besonders betroffen waren ältere Menschen. 75 % der Frauen  $\geq 65$  Jahre hatten eine Vitamin-D-Defizienz, die auch in den Sommermonaten auftrat [45]. Die Unterversorgung an Vitamin D in älteren Menschen liegt sowohl an einer verringerten Metabolisierung in den Nieren, als auch an einer geringeren Provitamin D<sub>3</sub>(7-Dehydrocholesterol)-Bildung in der Dermis [59]. Im Vergleich zu jüngeren Menschen bilden Ältere bis zu 5 Mal weniger Vitamin D bei gleicher Sonnenlichtexposition [47]. Durch eine altersbedingte verminderte Vitamin-D-Synthesekapazität der Dermis [47, 60] wird Provitamin D<sub>3</sub> in der Epidermis und Dermis nicht mehr durch UV-Strahlung in Prävitamin D<sub>3</sub> metabolisiert und dieses nicht in Vitamin D<sub>3</sub> umgewandelt. Die Metabolisierung von Vitamin D<sub>3</sub> in der Leber zu 25-Hydroxycholecalciferol (25-OH-D<sub>3</sub>) und die anschließende Hydroxylierung zum aktiven Vitamin-D-Hormon Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol) in der Niere finden nicht statt. Die Folge ist ein Vitamin-D-Mangel, der nur durch externe Zufuhr von Vitamin D in Form von Tabletten oder Spritzen behoben werden kann.

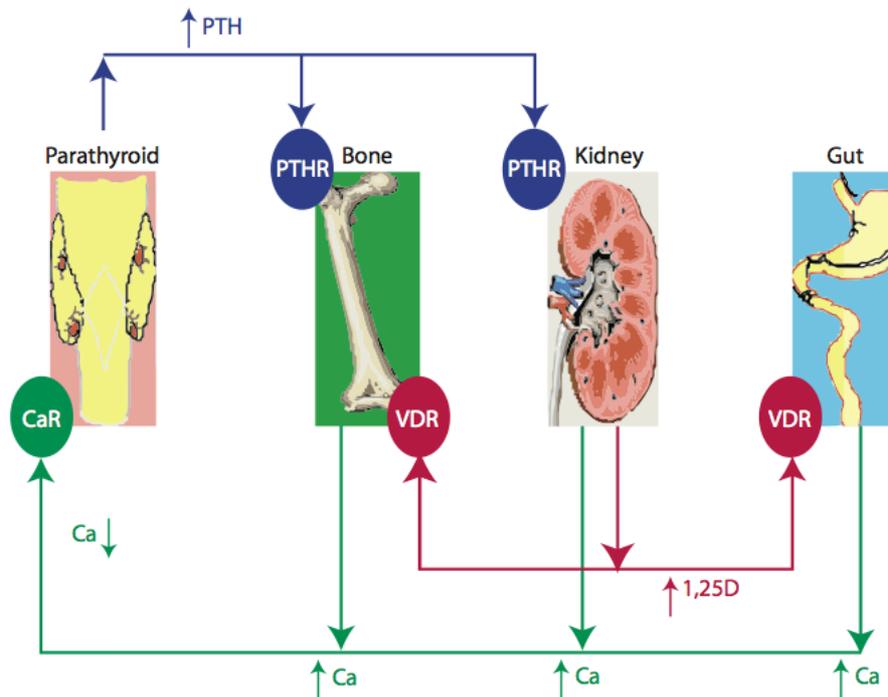
### **1.3.2 Calcium-Homöostase**

Bei einem Abfall der Calcium-Konzentration im Blutserum werden die Calcium-Rezeptoren in den Zellen der Nebenschilddrüse inaktiviert (Abbildung 6). Dies führt zu einer erhöhten Sekretion des Parathormons aus der Nebenschilddrüse, welches an die PTH-Rezeptoren der Osteoblasten im Knochen

bindet. Dies stimuliert die Freisetzung von Nuklearfaktor-kappa-B-Ligand (NF- $\kappa$ B, RANKL), welches an den Rezeptor RANK auf der Osteoklasten-Oberfläche bindet und die Osteoklastogenese stimuliert. Die hierdurch gesteigerte Resorptionsrate des Knochens führt zur Freisetzung von Calcium, das in den Blutkreislauf gelangt. Neben der gesteigerten Knochenresorption bindet PTH auch an Rezeptoren in der Niere und im Darm und erhöht dadurch die Rückresorption von Calcium. Stimuliert durch die Freisetzung von PTH erfolgt die Hydroxylierung von 25-OH-D<sub>3</sub> in der Niere zum aktiven Vitamin-D 1,25-Dihydroxycholecalciferol. Vitamin D bindet an die Rezeptoren auf den Osteoblastenvorläuferzellen und induziert deren Differenzierung [111]. Die Osteoblasten bilden vermehrt RANKL, wodurch die Osteoklastogenese stimuliert wird. Dies führt zu einem vermehrten Knochenabbau, um eine Hypokalzämie zu verhindern. Durch den resultierenden Anstieg der Calcium-Konzentration im Serum kommt es zu einer negativen Rückkopplung. Die Calcium-Rezeptoren in den Nebenschilddrüsen werden aktiviert und folglich die PTH-Freisetzung gehemmt.

Mittels diesem sich selbst regulierendem Signalweg ist eine adäquate Calcium-Regulation im gesunden Körper gewährleistet. Im Fall von Calcium-unterversorgten Menschen, zu denen vorrangig ältere Menschen gehören, lässt sich durch diesen Signalweg ein Knochenmasseverlust erklären. Durch die stetig geringe Calcium-Konzentration im Blut kommt es zu einer andauernden, erhöhten Knochenresorption, die zwar den Mangel an Calcium ausgleicht, aber auch den Verlust von Knochenmaterial zur Folge hat. Daraus resultieren osteoporotische Knochen.

Auch ein Vitamin-D-Mangel kann zu einer negativen Calcium-Balance führen, da der Vitamin-D-vermittelte Calcium-Transport durch den Mangel reduziert ist oder ausbleibt. Liegt ein schwerwiegender Mangel vor, der zu einer Hypokalzämie führt, die Knochenresorption verursacht, ist eine Rachitis im Kindes- bzw. eine Osteomalazie im Erwachsenenalter die Folge. Bedingt durch einen Calcium- und Phosphatmangel und einen erhöhten PTH-Spiegel (sekundärer Hyperparathyreoidismus) äussert sich diese histologisch in einem vermehrten Anteil an Osteoid, der von Osteoblasten gebildeten noch nicht mineralisierten Grundsubstanz des Knochens. Hiermit verbunden ist eine gestörte Knochenneubildung, die das Risiko für Frakturen erhöht.



**Abbildung 6: Calcium-Homöostase im Körper**

Eine niedrige Serum-Calcium-Konzentration führt zur Inaktivierung von Calcium-Rezeptoren in der Nebenschilddrüse. Durch die erhöhte Freisetzung von PTH wird Calcium durch Knochenresorption freigesetzt und die Absorption in den Nieren und dem Darm erhöht. Das aus den Nieren abgegebene 1,25-Dihydroxyvitamin D stimuliert die Calcium-Absorption im Darm und die Calcium-Resorption im Knochen. Die Erhöhung der Calcium-Konzentration im Serum führt zu einer negativen Rückkopplung, die PTH-Ausschüttung wird inaktiviert.

C, Calcium; CaR, Calcium-Rezeptor; PTHR, Parathormon-Rezeptor; VDR, Vitamin-D-Rezeptor [80].

### 1.3.3 Hyperkalzämie und primärer Hyperparathyreoidismus

Eine Hyperkalzämie ist gekennzeichnet durch eine stark erhöhte Serum-Calcium-Konzentration. Bei gesunden Menschen liegt die Calcium-Konzentration in der extrazellulären Flüssigkeit zwischen 8,5-10,5 mg/dL, während bei Menschen mit einer milden Form der Hyperkalzämie der Calcium-Anteil bis zu 14 mg/dL betragen kann [92]. Werte, die über 14 mg/dL liegen, weisen auf eine manifestierte Form der Hyperkalzämie hin.

Eine erhöhte Calcium-Konzentration im Blut ist in den meisten Fällen auf einen erhöhten PTH-Spiegel zurückzuführen, der die Osteoklastenaktivität stimuliert und zu einer erhöhten Knochenresorption führt [2]. Die exzessive PTH-Ausschüttung ist auf eine benigne Erkrankung der Nebenschilddrüsen zurückzuführen (primärer Hyperparathyreoidismus) [17]. Andere maligne Erkrankungen, wie z.B. des Knochens, können ebenfalls eine Hyperkalzämie verursachen. Hierbei treten aufgrund der pathologisch erhöhten Serum-Calcium-Konzentration im Gegensatz zum primären Hyperparathyreoidismus schwerere Symptome wie neurologische

Störungen, Depressionen, Verwirrtheit, Herzrhythmusstörungen und Koma auf [92]. Die Behandlung einer leichten Hyperkalzämie erfolgt mittels Erhöhung der Urinausscheidung. Hierfür wird den betroffenen Patienten 3-4 Liter einer 0,9%igen Natrium-Chlorid-Lösung (NaCl) über den Zeitraum von 24-48 Stunden injiziert. Durch die dadurch gesteigerte Filtrationsrate der Niere kann die Serum-Calcium-Konzentration um bis zu 3 mg/dL gesenkt werden [92]. In akuten Fällen kann zusätzlich ein Diuretikum, wie z.B. Furosemid, verabreicht werden. Dieses hemmt die Ionenkanäle in der Henleschen Schleife in den Nephronen der Niere, wodurch die Rückresorption von Calcium aus dem Urin verhindert wird.

Da in den meisten Fällen von Hyperkalzämie der hohe Calcium-Anteil bedingt ist durch eine erhöhte Knochenresorption, erhalten Patienten nach entsprechender Diagnose eine anti-resorptive Therapie mit Bisphosphonaten. Diese hemmen Farnesyldiphosphat in Osteoklasten, wodurch wiederum die Prenylierung von Guanosin-Tri-Phosphatase(GTPase)-Proteinen verhindert wird [31, 83]. Hierdurch können sich Osteoklasten nicht mehr an die Knochenoberfläche anheften und gehen in die Apoptose.

Als alternative Therapie zu Bisphosphonaten wird Calcitonin eingesetzt, was ebenfalls die Osteoklastenaktivität hemmt und gleichzeitig die Urinausscheidung erhöht. Der Vorteil von Calcitonin ist die schnelle Senkung des Calcium-Spiegels innerhalb 2-6 Stunden, allerdings nur um durchschnittlich 2 mg/dL. Ein weiterer Nachteil ist die geringere Wirkungszeit von 24 Stunden nach Einnahme des Präparates und auch bei Weiterführung der Therapie [92]. Aus diesem Grund werden meist Bisphosphonate und Calcitonin in Kombination zur Behandlung von Hyperkalzämie eingesetzt.

#### **1.3.4 Hypokalzämie und sekundärer Hyperparathyreoidismus**

Eine verminderte oder gestörte Aufnahme von Calcium über die Nahrung führt zu Calciummangel und ist ein weit verbreitetes und ernst zu nehmendes Problem, insbesondere bei älteren Patienten. Die intestinale Calcium-Absorption und Rückresorption über die Niere sind im Alter vermindert [51]. Ebenso tritt eine Unterversorgung von Vitamin D auf, die bedingt ist durch die verringerte Sonnenlichtexposition und der verminderten Vitamin-D-Synthesekapazität der Dermis [47, 60]. Die Calcium-Unterversorgung führt zu einer stetigen Stimulation

der Nebenschilddrüsen, welche vermehrt PTH sezernieren. Die Folge ist ein sekundärer Hyperparathyreoidismus. Ebenso wie der primäre Hyperparathyreoidismus führt der sekundäre Hyperparathyreoidismus zu einer erhöhten Knochenresorption, die nicht ausreichend durch eine Knochenneubildung ausgeglichen werden kann [12]. Die Knochenmasse nimmt stetig ab, wodurch zunächst Osteomalazie, dann Osteoporose entsteht. In postmenopausalen Frauen konnte bei Vorliegen eines Calcium-Mangels ein erhöhter Knochenumbau und -abbau festgestellt werden [71].

Auch in der Wachstumsphase des Skeletts spielt Calcium eine entscheidende Rolle. Calcium-Mangel bei Kindern zeigt sich in Form einer Rachitis, die durch eine Mineralisationsstörung des Knochens gekennzeichnet ist. Diese Krankheit lässt sich vermehrt in Weltregionen beobachten, in der eine Mangelernährung besonders häufig auftritt. Okonofua et al. beobachteten an nigerianischen Kindern zwischen 3 und 5 Jahren eine Rachitis, die durch einen Calcium-Unterversorgung auftrat [78]. Bei keinem der Kinder konnte eine Vitamin-D-Insuffizienz festgestellt werden, was auf den Calcium-Mangel als alleinigen Grund für die gestörte Knochenmineralisation hinweist. Auch eine Studie an indischen Kindern im Alter von 6 Monaten bis 5 Jahren wies eine durch Calcium-Mangel erzeugte Rachitis nach [1]. Die Serum-PTH-Konzentration lag im Median bei 130,7 pg/ml im Vergleich zu 47,9 pg/ml in der gesunden Kontrollgruppe mit calciumreicherer Kost.

### **1.3.5 Calcium-Therapie bei Osteoporose**

Gesunde Erwachsene verlieren pro Jahr 0,3 % ihrer Knochenmasse, was einem Verlust von ca. 10 mg Calcium pro Tag entspricht [37]. In postmenopausalen Frauen kann dieser Wert jedoch um das bis zu 10fache erhöht sein und zu einer Imbalance führen. Zur Prävention von Knochenmasseverlusten im postmenopausalen Alter werden Calciumpräparate in Kombination mit Vitamin D als Basistherapie empfohlen. Sie zählen zu den meist eingenommenen Therapeutika zur Prävention und Behandlung von Osteoporose und werden auch begleitend neben antiresorptiven (z.B. Bisphosphonate) und osteoanabolen (z.B. Teriparatid) Therapien eingesetzt [40]. Durch die Möglichkeit einer einfachen oralen, nicht-verschreibungspflichtigen Verabreichung ist die Compliance für Calcium-Präparate hoch.

Chapuy et al. [18] konnten in einer Studie mit 3270 gesunden Frauen zwischen 69 und 106 Jahren zeigen, dass eine 18-monatige tägliche Calcium-Supplementation von 1200 mg in Kombination mit Vitamin D (800 Einheiten) zu einer Erhöhung der Knochenmineraldichte um 2,7 % im Vergleich zum Basiswert vor der Behandlung führte. Die PTH-Konzentration nahm dagegen im Verlauf durchschnittlich um 44 % vom Ausgangswert ab. Ebenso war das Risiko für Hüftfrakturen und anderer nicht-vertebralen Frakturen im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant reduziert. In der Behandlungsgruppe traten nach 18 Monaten 43 % weniger Hüftfrakturen und 32 % weniger nicht-vertebralen Frakturen auf. Diese signifikanten Verbesserungen durch eine Calcium-Vitamin-D-Supplementation wiesen auch auf eine vor der Behandlung vorliegenden Mangelsituation hin, was deutlich durch die Absenkung des PTH-Spiegels nach der Therapie zu erkennen war [18].

Ein reduzierter Knochenmasseverlust konnte auch in einer Studie mit Männern und Frauen über 65 Jahre gezeigt werden, in der die Probanden über einen Zeitraum von 3 Jahren täglich 500 mg Calcium und 700 Einheiten Vitamin D einnahmen [25]. Dieser positive Effekt konnte bereits ein Jahr nach Studienbeginn aufgezeigt und im zweiten und dritten Behandlungsjahr weiterhin detektiert werden. Im Vergleich zur Placebogruppe traten in der Behandlungsgruppe weniger nicht-vertebrale Frakturen auf. Die Osteocalcin-Konzentration war 14 % geringer als der Basalwert, was einen reduzierten Knochenumbau in der Behandlungsgruppe zeigte. Sowohl die schnelle Reduktion des Knochenmasseverlustes, als auch dessen weitere erfolgreiche Reduzierung und die Absenkung des Osteocalcin-Spiegels sprechen für eine Langzeittherapie mit Calcium-Supplementation. Allerdings sind die Studienergebnisse bezüglich des positiven Effekts von Calcium auf den Knochen in der Literatur sehr widersprüchlich [11, 91], da sie sehr vom Studiendesign abhängig sind. So unterscheiden sich z.B. die Probanden zwischen den Studien, deren Anzahl, die Darreichungsform und Dosierung von Calcium (Calcium-Carbonat, -Gluconat, -Citrat), die Dosis an zusätzlich verabreichtem Vitamin-D, der Zeitpunkt der Einnahme (während des Essens, auf nüchternen Magen), sowie die Dauer der Studie. Die Calcium-Dosierung, wie auch die Wahl der Probanden, spielen hierbei eine sehr wichtige Rolle bei der Betrachtung von Studienergebnissen. Nakamura et al. konnten zeigen, dass eine Calcium-Supplementation von 500 mg/Tag über 2 Jahre den Knochenverlust im

Oberschenkelhals in asiatischen, postmenopausalen Frauen mit geringer diätischer Calcium-Aufnahme nicht verhindern konnte [72]. Jedoch konnte der Knochenabbau in den Lendenwirbelsäulen mit der Calcium-Therapie zwar nicht verhindert, aber verzögert werden. Im Vergleich zur Studie von Dawson-Hughes et al. wurde hier zwar auch die gleiche Dosis an Calcium gewählt, jedoch wiesen die Probandinnen bereits eine geringe diätische Calcium-Aufnahme auf. Die tägliche Aufnahme von Calcium über die Nahrung lag hier bei min. 350 mg und max. 626 mg. Im Vergleich hierzu nahmen die Probandinnen in der Studie von Dawson-Hughes zwischen 403 mg und 1164 mg täglich über die Nahrung zu sich. In dieser Studie erhielten die Probanden auch additives Vitamin D in Kombination mit Calcium.

### **1.3.6 Calcium und Frakturen**

Präventionsmaßnahmen sind im Hinblick auf schlecht heilende Frakturen, wie z.B. osteoporotische Frakturen, unerlässlich geworden. Da bei einer diagnostizierten Osteoporose als Basistherapie eine Calcium-Vitamin-D-Supplementation verabreicht wird und in einigen Studien ein positiver Einfluss von Calcium auf den Knochen gezeigt wurde [18, 25], war es von großem Interesse den Einfluss von Calcium auf das Frakturrisiko zu untersuchen. In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass eine mangelnde Calcium-Versorgung zu einem erhöhten Frakturrisiko führt [28]. Postmenopausale Frauen hatten ein 2,5fach erhöhtes Hüftfrakturrisiko bei einer diätischen Einnahme von weniger als 400 mg Calcium pro Tag und bei Vorliegen einer geringen Calcium-Absorptionseffizienz. Eine ausreichende tägliche Versorgung mit 1200 mg Calcium wiederum verminderte das Frakturrisiko in Frauen und Männern nach 4 Jahren Einnahmezeit [6]. Der positive Effekt wurde jedoch eliminiert, wenn die Calcium-Einnahme gestoppt wurde. Dieses Ergebnis bestätigt die hohe Relevanz einer ausreichenden und kontinuierlichen Calcium-Versorgung zur Prävention von Frakturen. Die in diesem Zusammenhang auftretende Frage, ob Calcium auch die Heilung einer akuten Fraktur beeinflussen kann, wurde bisher erst in einer experimentellen Studie untersucht [94]. Hierbei wurden sowohl Femora von ovariectomierten (OVX), als auch Sham-operierten Ratten frakturiert. OVX-Tiere, die zusätzlich Calcium über das Trinkwasser verabreicht bekamen, wiesen nach

2-monatiger Studienzeit einen dem der Sham-operierten Tiere vergleichbar großen Kallus auf, der die Kortices vollständig überbrückte. Im Gegensatz hierzu bildete sich in OVX-Ratten ohne eine zusätzliche Supplementation ein größerer Frakturkallus, der zwar die Kortices ebenfalls überbrückte, jedoch war die Frakturlinie noch deutlich sichtbar. Die biomechanischen Eigenschaften des Frakturkallus waren jedoch im Vergleich zu OVX-Tieren trotz Calcium-Gabe nicht verbessert und lagen ebenfalls unter den Werten der Sham-Tiere. Diese Studie lässt darauf schließen, dass eine Verabreichung von Calcium durchaus einen positiven Effekt auf die Frakturheilung hat. Jedoch gibt es bisher keine veröffentlichten Studien, die die Frakturheilung bei einer Calcium-Unterversorgung, wie z.B. bei Vorliegen eines sekundärem Hyperparathyreoidismus, untersuchten. Da allerdings gerade ältere Menschen unter einem diätischen Calcium-Mangel und einer verringerten Calcium-Absorption leiden und der Verdacht besteht, dass der Calcium-Mangel von Medikamenten wie z.B. Protonenpumpeninhibitoren verursacht oder verstärkt werden könnte [113], sind solche Studien dringend erforderlich.

## 1.4. Protonenpumpeninhibitoren

Protonenpumpeninhibitoren (PPIs) zählen zu den zehn weltweit verkauften Pharmaprodukten mit dem stärksten Umsatz. Nach Cholesterinsenkern, Blutgerinnungshemmern und Asthmamitteln wurden im Jahr 2010 8,36 Milliarden US-Dollar mit Esomeprazol umgesetzt [50]. PPIs werden in der Medizin umgangssprachlich als „Magenschutz“ bezeichnet. Ihr effektiver Wirkmechanismus besteht in der Hemmung des membranständigen Enzyms  $H^+/K^+$ -Adenosintriphosphatase ( $H^+/K^+$ -ATPase), welches sich in den Parietalzellen (Belegzellen) der Mageninnenwand befindet. Dieses Enzym wird auch als Protonen-Kalium-Pumpe oder Protonenpumpe bezeichnet.

Aufgrund ihrer schwach basischen Eigenschaften können PPIs durch das Cytoplasma der Parietalzellen diffundieren und so in die sekretorischen Kanäle (Canaliculi) gelangen [88]. Sie binden mit ihrer  $\alpha$ -Untereinheit irreversibel durch Bildung einer kovalenten Disulfid-Brücke an die  $H^+/K^+$ -ATPase, wodurch der Austausch von Protonen und Kalium-Ionen blockiert wird. Durch die Hemmung

wird die Sekretion von Protonen ( $H^+$ ) aus den Sekretkanälen der Parietalzellen verhindert, was eine verminderte Sekretion von Salzsäure zur Folge hat. Dies führt zum klinischen Bild einer Hypochlorhydrie, bedingt durch den Anstieg des pH-Wertes des Magensaftes. Der pH-Wert liegt nun eher im neutralen, anstatt im sauren Bereich. Dieser Effekt ist das therapeutische Ziel von PPIs bei Patienten mit Ulcus (Magengeschwüren), *Helicobacter pylori* oder der Refluxösophagitis mit dem chronischen Symptom des Sodbrennens.

Charakteristisch bei der Einnahme von PPIs ist ein erhöhter Gastrin-Spiegel im Blutserum. Dies resultiert aus der Hemmung der Somatostatin-Sekretion aus den D-Zellen des Magenfundus aufgrund der geringen Magensäureproduktion. Eine geringe Salzsäurekonzentration führt wiederum zu einer vermehrten Gastrin-Produktion. Gastrin, ein Peptidhormon gebildet und sezerniert von den G-Zellen des Ösophagus, stimuliert die Salzsäureproduktion. Es kann sowohl von Somatostatin, als auch durch einen geringen pH-Wert gehemmt werden. Durch eine fehlende Somatostatin-Sekretion und einen durch PPI-Einnahme hohen pH, erklärt sich die hohe Gastrin-Konzentration im Blutserum.

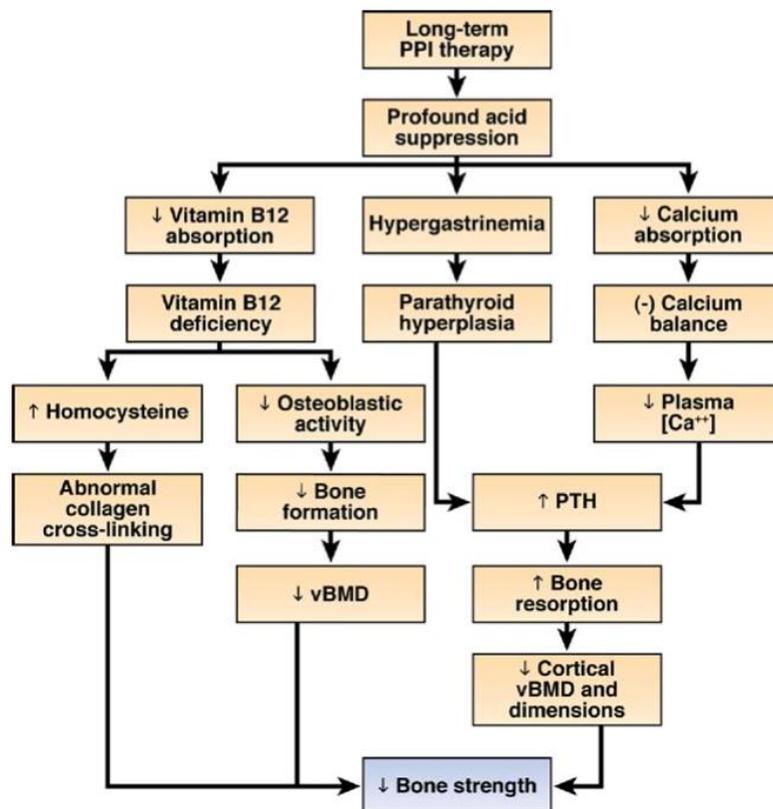
Im Gegensatz zu den früher eingesetzten Antihistaminika Histamin- $H_2$ -Rezeptorantagonisten ( $H_2RA$ ) gelten PPIs als effektiver und sicherer [69, 88], da sie in nur wenigen Fällen Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Flatulenzen, Diarrhö, Bauchschmerzen oder Übelkeit hervorrufen [102]. Sie werden Patienten während der Einnahme von Schmerzmitteln wie z.B. nicht-steroidalen anti-inflammatorischen (NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drugs) Medikamenten verschrieben, da diese als Nebeneffekt Magengeschwüre hervorrufen können [93]. Gerade bei Patienten, die eine Osteoporose aufweisen, werden primär Analgetika wie NSAIDs eingesetzt [40]. Neun von zehn Patienten, die eine Osteoporose aufweisen, erhalten NSAIDs [40] und nehmen gegen die Nebenwirkungen zusätzlich PPIs ein [93]. Patienten, die Bisphosphonate gegen Osteoporose einnehmen, nehmen PPIs gegen die auftretenden gastrointestinalen Nebenwirkungen ein [84]. Vertreter dieser Medikamentenklasse sind u.a. Omeprazol, Pantoprazol und Lansoprazol. Seit 1989 sind PPIs in Deutschland zugelassen. PPIs mit einer maximalen Tagesdosis von 20 mg sind seit dem 1. August 2009 nicht mehr verschreibungspflichtig, sondern rezeptfrei erhältlich.

#### **1.4.1 Einfluss von Protonenpumpeninhibitoren und Hypochlorhydrie auf den Knochen**

Untersuchungen bezüglich der Auswirkungen einer PPI-Einnahme auf den Knochenmetabolismus wurden erst durchgeführt, nachdem Studien an gastrektomierten Tieren erhebliche Knochenveränderungen aufdeckten. Bereits 1937 zeigte eine Studie an gastrektomierten Hundewelpen eine starke skelettale Deformation, die die Autoren mit einer inadäquaten Calcium-Aufnahme begründeten [16]. Aufgrund des fehlenden sauren Milieus, welches normalerweise im Magen durch die Produktion von Magensäure bedingt ist, konnte das Calcium aus dem Futter nicht ausreichend aufgenommen und im Knochen eingebaut werden, was zu einer Osteoporose führte. Mittels der oralen Verabreichung von Calcium-Gluconat konnten Knochendeformitäten zwar nicht komplett verhindert, jedoch der Schweregrad der Ausprägung deutlich gemildert werden. Calcium-Diphosphat im Futter zeigte im Gegensatz hierzu keine Verbesserungen. Für die Aufnahme von Calcium-Gluconat über die Nahrung wird im Vergleich zu Calcium-Diphosphat kein saures Milieu im Magen benötigt [97, 108]. Da den Tieren in der Studie der Magen explantiert wurde und sie damit eine Achlorhydrie aufwiesen, ist das neutral bis basische Milieu des Dünndarms ausreichend, um Calcium-Gluconat aufnehmen und im Knochen speichern zu können.

Diese Studie zeigte deutlich, dass eine Beeinflussung des Gastrointestinal-Traktes Auswirkungen auf den Calciummetabolismus und damit weitreichende Folgen auf den Knochen haben kann. Medikamente, die den Gastrointestinal-Trakt durch ihren Einfluss auf die Produktion der Magensäure beeinträchtigen, sind -wie bereits zuvor beschrieben- PPIs. Eine Hypochlorhydrie, die gestörte oder fehlende Produktion von Magensäure, tritt meist aufgrund einer atrophischen Gastritis auf, die durch eine Infektion mit *Helicobacter pylori* verursacht wurde [55, 96]. Während dem zunächst symptomlosen Krankheitsverlauf wird die Anzahl der Parietalzellen, die Protonen sezernieren, verringert, wodurch eine Hypo- bzw. Achlorhydrie entsteht. Die Häufigkeit für eine atrophische Gastritis steigt mit zunehmenden Alter und betrifft 30 % der Menschen über 60 Jahre [55]. Die medikamentöse Behandlung einer *Helicobacter pylori* Infektion erfolgt mit Antibiotika in Kombination mit PPIs, die die bereits geschädigte Magenschleimhaut vor der Magensäure schützen sollen [88]. Der Einsatz von PPIs führt jedoch ebenfalls zum klinischen Bild einer Hypochlorhydrie und den von

Bussabarger beschrieben Störungen der Calcium-Aufnahme über die Nahrung. Hierdurch kommt es zu einer negativen Calciumbalance, die zu einem Abfall des Calcium-Spiegels im Blut und zu einem PTH-Anstieg führt (Abbildung 7). Die Knochenresorption wird erhöht um Calcium aus dem Knochen freizusetzen, was zu einer Verminderung der Knochenstabilität führt, falls die Calciumbalance nicht wieder hergestellt werden kann.



**Abbildung 7: Mögliche Auswirkungen nach einer Langzeit-PPI-Einnahme**  
vBMD, volumetric bone mineral density; PTH, parathyreoid hormone [115].

Eine klinische Studie, die den Zusammenhang zwischen PPI-Einnahme und Calcium-Absorption untersuchte, konnte in 18 postmenopausalen Frauen zeigen, dass nach einwöchiger Einnahme von 20 mg Omeprazol pro Tag die Absorption signifikant um 61 % niedriger war im Vergleich zur Placebo-Gruppe [77]. Diese Studie war von großer Bedeutung, da sie die Vermutung bestätigte, dass PPIs durch die Einnahme-bedingte, verringerte Calcium-Aufnahme negative Auswirkungen auf den Knochen haben könnten. Da weiterhin PPIs weltweit vermehrt eingesetzt werden, obwohl eine Verbindung zwischen Hypochlohydrie und einer verminderten Calcium-Aufnahme besteht, wurden weitere Studien zu

Auswirkungen der PPI-Einnahme auf den Knochen durchgeführt, die jedoch widersprüchliche Ergebnisse präsentierten.

In einer klinischen Studie wurde der Einfluss von Omeprazol auf Knochenumbaumarker untersucht. Hierfür wurden 19 Probanden mit Magengeschwüren 8 Wochen mit 20 mg Omeprazol pro Tag behandelt, während 13 weitere Probanden nicht therapiert wurden (Kontrollgruppe) [66]. Nach dem Untersuchungszeitraum befand sich in den Urinproben der Therapie-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ein verringerter Anteil an Calcium, während das Blutserum erhöhte Werte an Knochenumbaumarkern wie Parathormon (PTH), alkalischer Phosphatase (ALP) und Osteocalcin aufwies. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch eine Studie von Graziani et al., in der 8 gesunde Probanden nach 3tägiger Einnahme von 60 mg Omeprazol pro Tag eine Reduktion des Plasma-Calciums und eine 33%ige Verringerung der Calcium-Exkretion über den Urin zeigten [36]. Diese zwei Studien wiesen einen negativen Effekt von PPIs auf die Calcium-Aufnahme und den Knochen nach, jedoch konnten retrospektive Studien keinen Einfluss von chronisch eingenommenen PPIs auf die Knochenmineraldichte nachweisen [35, 100, 116]. Auch das Risiko für Osteoporose blieb trotz hoher Dosen unbeeinflusst [100]. Die Ergebnisse wurden allerdings nur an den Messwerten der Knochenmineraldichte erhoben, so dass lediglich Aussagen über die Mineraldichte in einem definierten Bereich getroffen werden konnten. Wichtige Parameter wie die Knochengeometrie oder die Mikroarchitektur fehlten, die mit der Knochenmineraldichte die Belastbarkeit des Knochens definieren.

#### **1.4.2 Protonenpumpeninhibitoren und Frakturrisiko**

Eine reduzierte Calcium-Aufnahme erhöht die Knochenresorption und das Risiko für Hüft- und Vertebrafrakturen in postmenopausalen Frauen [70, 71]. Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, dass PPIs durch ihren negativen Einfluss auf die Calcium-Absorption auch das Risiko von Frakturen erhöhen könnten. In einer Studie wurde der Effekt von PPIs auf das Frakturrisiko von Patienten im Alter von 50 Jahren untersucht [114]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bereits eine einjährige Einnahme von PPIs positiv mit dem Risiko für Hüftfrakturen assoziiert ist. Dieser Effekt wurde mit der Dauer der Einnahme und der Dosis signifikant

verstärkt. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen Targownik et al. und Chiu et al., die eine dosis- und zeitabhängige Assoziation zwischen der PPI-Einnahme und Frakturen aufwiesen [20, 99]. Da PPIs meist in höheren Dosen eingenommen werden, als es der Standarddosis entsprechen würde [98], sind die Ergebnisse der Studien von großer Bedeutung zur Vermeidung eines erhöhten Frakturrisikos.

In einer prospektiven Studie, die den Effekt von Omeprazol an postmenopausalen Frauen untersuchte, wurde im Vergleich zu postmenopausalen Frauen, die keine PPIs einnahmen, eine geringere Knochenmineraldichte in der Hüfte und in den unteren Lendenwirbelkörpern gemessen [85]. Das Risiko für vertebrale Frakturen war in dieser Gruppe erhöht, was unabhängig von anderen Risikofaktoren wie z.B. Alter, früheren Frakturen und geringer Knochenmineraldichte auftrat.

Zu einem gegenteiligen Ergebnis kam eine Studie der Women's Health Initiative, die keinen Zusammenhang zwischen einer PPI-Einnahme und dem Risiko einer Hüftfraktur, jedoch einen mäßigen Effekt auf Wirbelkörper- und Handgelenksfrakturen finden konnte [35]. Yu et al. konnten ebenfalls nur einen mäßigen Effekt von PPIs auf das Frakturrisiko der Hüfte feststellen, wiesen aber daraufhin, dass nach ihrem Studienergebnis ca. 5 % aller Hüftfrakturen auf den Gebrauch von PPIs zurückzuführen wären [117]. Aufgrund dieser zum Teil widersprüchlichen Studienergebnisse hat die FDA (U.S. Food and Drug Administration) am 23. März 2011 einen Hinweis herausgegeben, der vor einer höher dosierten und/oder längeren PPI-Einnahme von mehr als einem Jahr warnt, da ein mögliches erhöhtes Risiko für Hüft-, Handgelenk- und Wirbelkörper-Frakturen bestünde.

## 1.5. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frakturheilung in genetisch veränderten Mäusen untersucht. Die Tiere wiesen eine Defizienz eines bestimmten Rezeptors (Cholezystokinin-B/Gastrin-Rezeptor) in den Belegzellen des Magens auf, wodurch die Produktion der Magensäure beeinträchtigt war und die Tiere einen erhöhten Magen-pH aufwiesen. Die Mäuse dienten somit als Modell für eine Hypochlorhydrie, die auch im Falle einer Langzeit-PPI-Einnahme auftritt. Der Knochen der Tiere zeigte einen osteoporotischen Phänotyp, der auf die beeinträchtigte Aufnahme von Calcium zurückzuführen war.

Sowohl die genetisch veränderten, als auch die entsprechenden Wildtyp-Mäuse erhielten eine diaphysäre Osteotomie des Femurs mit anschließender Calcium-Supplementation über das Futter, um zwei wichtige Fragen beantworten zu können:

- 1) Hat eine Hypochlorhydrie und die damit verbundene geringe Calcium-Absorption einen Einfluss auf die Frakturheilung?
- 2) Beeinflusst eine Calcium-Supplementation über das Futter mit unterschiedlichen Calcium-Formen (Carbonat und Gluconat) die Frakturheilung? Kann Calcium-Gluconat durch seine -im Gegensatz zu Calcium-Carbonat- besseren Löslichkeit im weniger sauren Magenmilieu die Calcium-Absorption erhöhen und die Frakturheilung verbessern?

## 2. MATERIAL UND METHODEN

Um die Auswirkungen einer Calcium-Supplementation auf die Frakturheilung in Cholezystokinin-B/Gastrin-Rezeptor defizienten Mäusen (*Cckbr*<sup>-/-</sup>) mit einem erhöhten Magen-pH und osteoporotischen Knochen zu untersuchen, wurde bei diesen Tieren eine Osteotomie des rechten Femurs durchgeführt und mittels Fixateur externe stabilisiert. Die Tiere erhielten nach der Operation Futter mit unterschiedlichen Calcium-Quellen (Carbonat, Gluconat) und -Konzentrationen (0,8 %, 1,6 %). Nach 10, 24 und 32 Tagen Standzeit wurden die Tiere euthanasiert und die Heilung der osteotomierten Femora mit verschiedenen Methoden (biomechanisch, mikrotomographisch, histologisch), als auch die Serum-Calcium- und Serum-Parathormon-Konzentrationen untersucht.

### 2.1. Material

#### 2.1.1 Fixateur externe

Die für die Fixierung des Fixateur externe speziell benötigten Operationsinstrumente (Bohrer und Pindreher) wurden vom AO Development Institute (Davos, Schweiz) hergestellt. Scheren, Skalpellhalter und Pinzetten wurden von Aesculap (Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) bezogen (Abbildung 8). Der Fixateur externe wurde ebenfalls von AO Development Institute entwickelt und bestand aus einem 10 mm langen Kunststoff-Korpus und 4 Pins. Diese besaßen eine Länge von 10 mm und einen Durchmesser von 0,45 mm. Die Pins wiesen Windungen zur Fixierung im Korpus und zur Verankerung im Knochen auf. Die axiale Steifigkeit des Fixateurs, welche *in vitro* in einer Materialprüfmaschine (1454, Zwick Roell AG, Ulm, Deutschland) mit einer Kraftmessdose (A.S.I. Dresden, Deutschland) von 50 N bestimmt wurde, betrug 3,0 N/mm.

Um eine Verformung des Fixateurs während dessen Anbringung am Femur zu vermeiden, wurde eine spezielle Halterung am Fixateur angebracht (Abbildung 10, A). Diese wurde nach Fixierung des Fixateurs am Knochen wieder entfernt. Sie verhinderte eine konkave oder konvexe Krümmung, welche die Osteotomiebreite hätte beeinflussen können.



**Abbildung 8: Instrumentarium für die Operation der Mäuse**

*Oberer Bildrand von links nach rechts:* Blaue sterile Abdeckfolie, Tupfer, Gigli-Säge, Resolon-Faden, grüne OP-Tücher

*Obere Reihe von links nach rechts:* Steriler Abschnitt eines Handschuhs, Becherglas mit 0,9 % NaCl-Lösung, Becherglas mit Octenisept, Pegasling-Tupfer und chirurgischer Pinzette, Tisch-Halterung mit 4 Pins und Fixateur externe mit montierter Halterung

*Untere Reihe von links nach rechts:* Abdeckfolie, 10 ml Spritze mit 0,9 % NaCl-Lösung, große gerade Pinzette, Klemme, spitze Präparierschere, Nadelhalter mit Vicryl-Faden, Skalpell, 2 gebogene anatomische Pinzetten, gebogene chirurgische Pinzette, kleine gerade Pinzette mit Widerhaken, kleine gerade Mikrofederschere, Bohrer, Pindreher, kleiner Schlitzschraubenzieher für die Montage der Fixateurhalterung

### 2.1.2 Tiermodelle

Für diese Arbeit wurden weibliche Mäuse im Alter von 26 Wochen (+/- 7 Tage) verwendet. Alle transgenen Tiere (*Cckbr<sup>-/-</sup>*) wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Michael Amling vom Institut für Osteologie und Biomechanik, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, zur Verfügung gestellt. Nach Geno- und Phänotypisierung der Mäuse am Institut für Osteologie und Biomechanik wurden die Tiere mit entsprechendem Alter nach Ulm transferiert. Die korrespondierenden Wildtypen (129S6/SvEvTac) wurden über den Lieferanten Charles River Laboratories International Inc. von Taconic Farms Inc. bezogen.

### **2.1.3 Cholezystokinin-B/Gastrin-Rezeptor defiziente Maus (*Cckbr*<sup>-/-</sup>)**

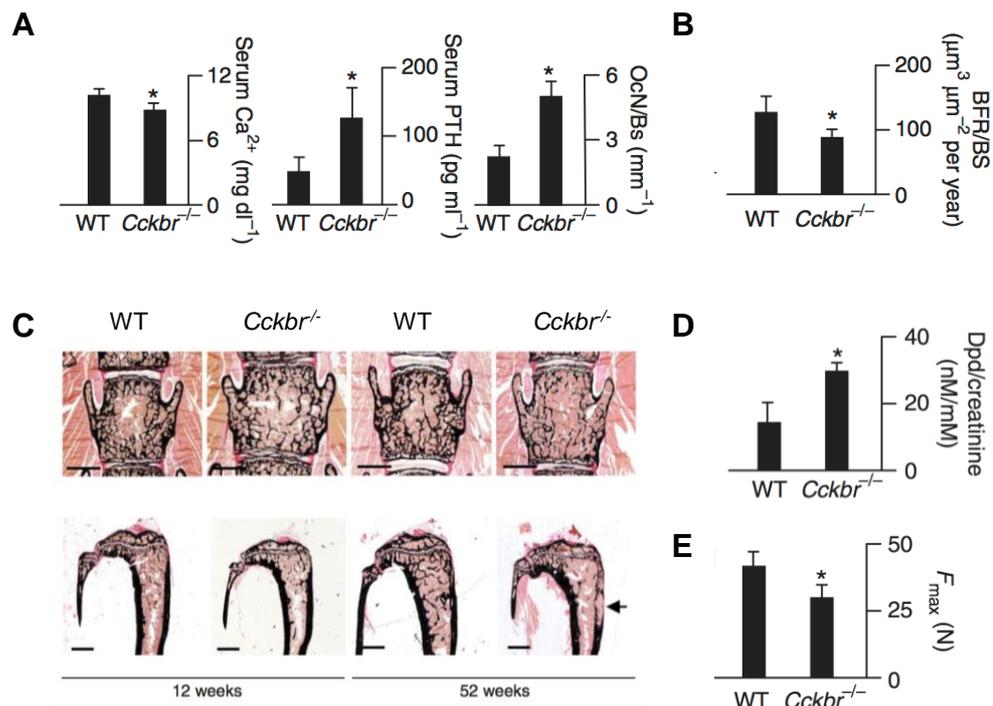
Für die Generierung der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurde die Methode von Langhans et al. verwendet [57]. Die Züchtung der Tiere im Institut für Osteologie und Biomechanik, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, erfolgte mit den von Alan S. Kopin (Arbeitsgruppe von Langhans) zur Verfügung gestellten homozygoten Zuchtpaaren.

Die Phänotypisierung der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Alter von 2, 12 und 52 Wochen wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Michael Amling durchgeführt [90]. Die transgenen Tiere wiesen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Magen-pH auf (4-5 vs. 2,5). Analysen von Seren zwei Wochen alter Tiere zeigten einen signifikant geringeren Serum-Calcium-Spiegel und eine mehr als zweifach erhöhte PTH-Konzentration der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse (Abbildung 9, A). Die Anzahl der Osteoklasten war signifikant erhöht im Vergleich zum Wildtyp. Ergebnisse der Knochenbildungsrate pro Jahr von 52 Wochen alten Tieren (BFR/BS, bone formation rate/bone surface) zeigten eine signifikante Verringerung (Abbildung 9, B). Die Trabekeldicke nahm ab und es traten kortikale Läsionen auf (Abbildung 9, C). Die *Cckbr*-defizienten Mäuse wiesen einen osteoporotischen Phänotyp auf.

### **2.1.4 Tierhaltung**

Die Mäuse wurden in einer maximalen Gruppengröße von 4 Geschwistertieren pro Macrolon-Käfig (Typ II mit 370 cm<sup>2</sup>) gehalten. Bei einem 14 stündigen Hell- und 10 stündigem Dunkel-Rhythmus standen Trinkwasser und Futter ad libitum zur Verfügung. Als Standardfutter wurde ein autoklavierbares Haltungsfutter speziell für Mäuse und Ratten verwendet (V1534-300, ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland; 1 % Calcium, 1000 IE Vitamin D3, 0,7 % Phosphor; Tabelle 2), das alle Tiere bis zum Tag der Operation erhielten.

Im Alter von 8-10 Wochen wurden die Wildtypen nach Ulm transferiert und erhielten ab dem Tag ihrer Ankunft in Ulm das gleiche Haltungsfutter wie die *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse. Die *Cckbr*-defizienten Mäuse kamen im Alter von 18-24 Wochen nach Ulm. Sie erhielten zuvor in der Tierhaltung am Uniklinikum Hamburg-Eppendorf das gleiche Haltungsfutter wie im Tierforschungszentrum in Ulm.



**Abbildung 9: Phänotypisierung von 2, 12 und 52 Wochen alten *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp**

(A) Serumanalysen und Osteoklastenzahl von zwei Wochen alten Mäusen. *links*: Serum-Calcium-Spiegel, *Mitte*: Serum-PTH-Spiegel, *rechts*: Osteoklastenzahl pro Knochenoberfläche. \* $p < 0,05$  vs. WT;  $n=5$  pro Gruppe. (B) Knochenformation von 52 Wochen alten Mäusen. *links*: Grüne Fluoreszenzbanden, Skala: 20  $\mu\text{m}$ ; *rechts*: Knochenformationsrate pro Knochenoberfläche pro Jahr. (C) Histologie unentkalkter Wirbelkörper (*oben*) und Tibien (*C, unten*) 12 und 52 Wochen alter Tiere. Der Pfeil weist auf kortikale Porosität hin. Skala: 1 mm (D) Konzentration von knochenspezifischen Kollagenabbauprodukten im Urin. Dpd, Desoxy-Pyridinolin \* $p < 0,05$  vs. WT;  $n=6$  pro Gruppe (E) Maximal aufgewendete Kraft bis zum Bruch der Femora während der Drei-Punkt-Biegung. \* $p < 0,05$  vs. WT;  $n=6$  pro Gruppe [90].

Für die Therapie mit einer Calcium-Supplementation wurde ein speziell für die Studie hergestelltes, autoklavierbares Spezialfutter verwendet (C1032, 1000 IE Vitamin D3, 0,8 % Phosphor, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland; Tabelle 2). Ab dem Tag der Operation wurden die transgenen Tiere in drei Gruppen eingeteilt und erhielten bis zum Tag der Euthanasie entweder weiterhin das Standardfutter, ein Spezialfutter mit einem Anteil von 1,6 % Calcium-Carbonat oder eine Mischdiät bestehend aus einer Kombination aus 0,8 % Calcium-Carbonat und 0,8 % Calcium-Gluconat. Wildtyp-Mäuse dienten als Kontrolle und bekamen nach der Operation weiterhin das Standardfutter. Eine weitere Wildtyp-Gruppe bekam nach der Operation ebenfalls die Mischdiät. Nach 10, 24 und 32 Tagen post-op wurden die Tiere euthanasiert. Insgesamt wurden 109 Tiere in die Auswertung eingeschlossen (Tabelle 3).

**Tabelle 2: Mineralstoffe, Vitamine und Spurenelemente in den verwendeten Diäten**

Angaben pro kg Futter

	<b>Standardfutter ssniff</b>	<b>Spezialfutter Altromin</b>
umsetzbare Energie	3057 kcal/kg	3252 kcal/kg
<b>Mineralstoffe</b>		
Calcium	1,00 %	1,60 %
Phosphor	0,70 %	0,80 %
Natrium	0,24 %	0,24 %
Magnesium	0,23 %	0,06 %
Kalium	0,92 %	0,70 %
<b>Vitamine</b>		
Vitamin A	25000 IE	15000 IE
Vitamin D <sub>3</sub>	1000 IE	1000 IE
Vitamin E	135 mg	164 mg
Vitamin K	20 mg	10 mg
Thiamin (B <sub>1</sub> )	86 mg	20 mg
Riboflavin (B <sub>2</sub> )	32 mg	20 mg
Pyridoxin (B <sub>6</sub> )	32 mg	15 mg
Cobalamin (B <sub>12</sub> )	150 mg	0 mg
Nicotinsäure	165 mg	50 mg
Pantothensäure	62 mg	50 mg
Folsäure	10 mg	10 mg
Biotin	730 mg	0,2 mg
Cholinchlorid	3000 mg	1012 mg
Inositol	100 mg	111 mg
<b>Spurenelemente</b>		
Eisen	179 mg	179 mg
Mangan	69 mg	100 mg
Zink	94 mg	29 mg
Kupfer	16 mg	5,6 mg
Iod	2,2 mg	0,5 mg
Selen	0,3 mg	0,3 mg
Cobalt	2,1 mg	0,1 mg

**Tabelle 3: In die Auswertung eingeschlossene Tierzahlen pro Gruppe, Standzeit und Futter.**

Gruppe	Standzeit in Tagen	Futter		
		S	C	M
WT	10	6	0	7
	24	7	0	6
	32	10	0	5
Cckbr <sup>-/-</sup>	10	8	5	6
	24	9	8	11
	32	6	7	8

S, Standardfutter; C, Carbonatfutter; M, Mischfutter

## 2.2. Methoden

Alle Tierversuche wurden gemäß dem Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 zum Schutz von Tieren und mit der Genehmigung des Regierungspräsidiums Tübingen (Reg. 1026) durchgeführt.

### 2.2.1 Präoperative und postoperative Behandlungen

Die Tiere erhielten 1 Tag präoperativ und 3 Tage postoperativ Schmerzmittel in Form von Tramadol (Tramal<sup>®</sup>, 12,55 mg/500 ml Tramalhydrochlorid, Grünenthal, Aachen, Deutschland) über das Trinkwasser.

Direkt nach Beendigung der Operation wurden Röntgenaufnahmen der Tiere mittels Faxitron (43805N X-Ray System, Faxitron series, Hewlett-Packard, Tucson, USA; Röntgenfilm: Structurix D4 DW ETE, Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien) durchgeführt, um die Position des Fixateur externe und der Pins detektieren zu können. Die Tiere wurden anschließend in ihren bisherigen Käfig zu ihren Geschwistertieren zurückgesetzt. Die Wundkontrolle erfolgte mind. 3 Tage postoperativ und anschließend 3 Mal pro Woche, um eventuelle Infektionen oder ein Nichtbelasten des operierten Hinterbeines detektieren zu können.

## 2.2.2 Operationsvorbereitungen

Die Anästhesie der Maus wurde mittels Inhalationsnarkose durchgeführt. Hierfür wurde die Maus in eine mit Narkosegas gefüllte, transparente Röhre überführt. Das Narkosegas bestand aus einem 5-6%igen Isofluran-Sauerstoff-Gemisch (Forene<sup>®</sup>, Abbott, Wiesbaden, Deutschland), welches der Inhalationsanästhesie diente. Nach Einstellung des Stellreflexes und Verlangsamung der Atemfrequenz wurde die Maus aus der Röhre genommen. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde eine spezielle Inhalationsmaske verwendet, über die der Maus ein 2-2,5 % Isofluran/Sauerstoffgemisch zugeführt wurde. Der narkotisierten Maus wurden zunächst subcutan 500 µl einer Kochsalz-Lösung (0,9 %, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) zur Volumensubstitution in die Rückenfalte injiziert und zur Antibiose prophylaktisch eine subcutane Clindamycin-Injektion (Clindamycin-2-dihydrogenphosphat 45 mg/kg, Sobelin600<sup>®</sup>, Pfizer Pharma, Karlsruhe, Deutschland). Um ein Austrocknen der Augen während der Operation zu verhindern (narkotisierte Mäuse zeigen keinen Lidreflex), erfolgte die Befeuchtung der Augenoberfläche mit einem Tränenersatzstoff in Form eines Gels (Vidisic<sup>®</sup>, Dr. Mann Pharma und Bausch & Lomb GmbH, Berlin, Deutschland).

Der Maus wurde das Fell am rechten Femur rasiert und die freiliegende Haut anschließend dreimal mit Freka Derm<sup>®</sup> desinfiziert (Fresenius SE, Bad Homburg, Deutschland). Um eine Unterkühlung der Maus während der Operation zu verhindern, wurde die Maus auf eine mit sterilem Tuch abgedeckte Wärmeplatte (Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Ober Beerbach, Deutschland) gelegt. Die Temperatur der Platte wurde während des operativen Eingriffs mit einem Temperaturregler regelmäßig kontrolliert und reguliert und lag zwischen 36 und 39 °C. In Bauchlage wurden beide Vordergliedmaßen, sowie das linke Hinterbein und der Schwanz mit Klebeband fixiert.

Die Maus wurde mit einer gammasterilisierten, durchsichtigen Folie abgedeckt. Das zu operierende rechte Femur wurde mit einer Pinzette durch ein in die Folie geschnittenes Loch hindurch gezogen. Die rechte Hinterpfote wurde in ein abgeschnittenes Stück eines sterilen Handschuhs platziert und mit einem sterilen Faden (Vicryl<sup>®</sup> 6-0, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Um die Augen vor dem Austrocknen zu schützen, wurde ein steriler Tupfer über die Augen gelegt.

Zuletzt wurde das rechte freiliegende Hinterbein mit einem mit Octenisept® (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) getränkten, sterilen Tupfer dreimal desinfiziert. Nach dieser letzten Desinfektion wurde mit dem darauffolgenden Hautschnitt gewartet, bis das Octenisept auf der Haut getrocknet war.

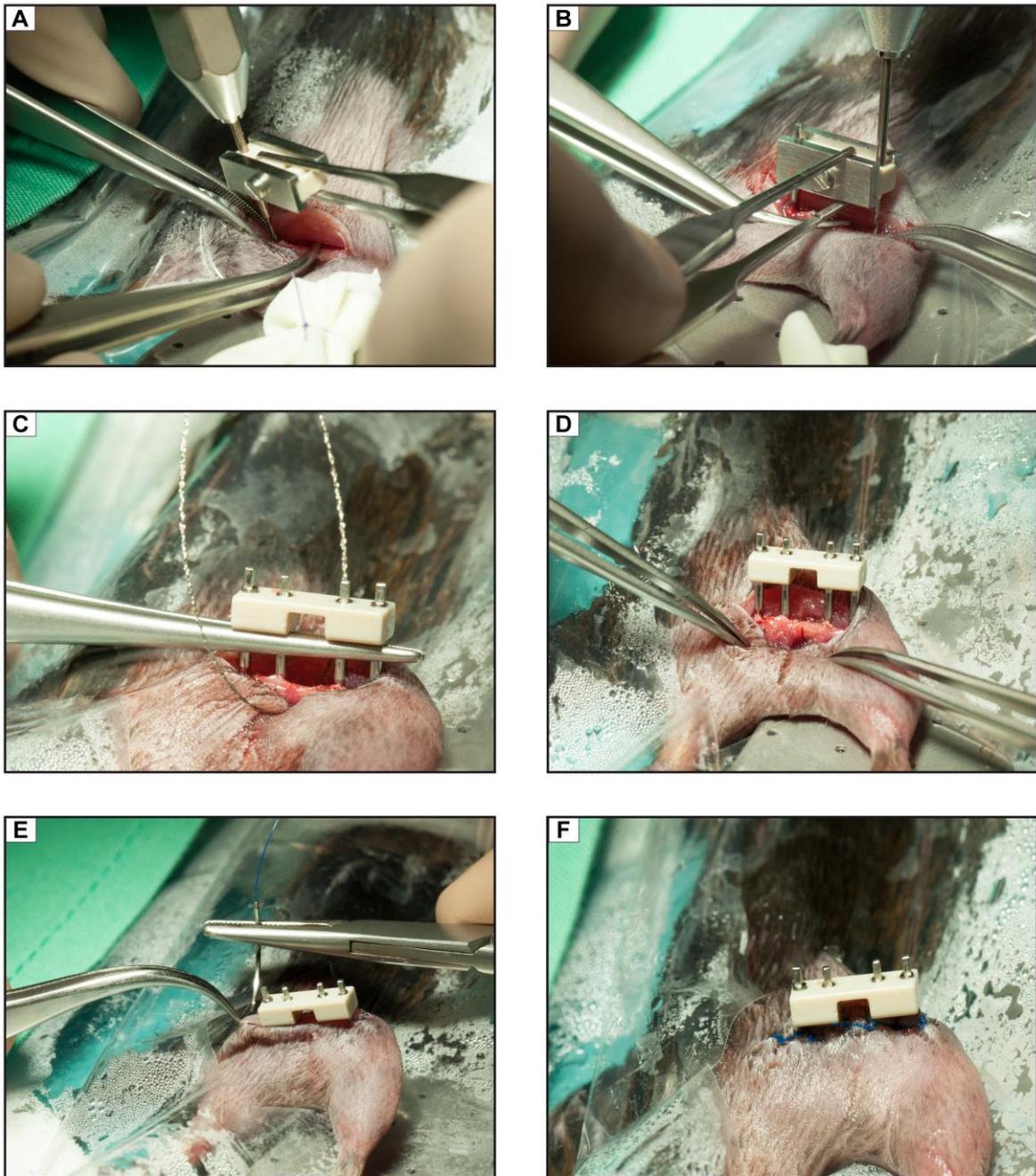
### **2.2.3 Osteotomie des Femurs**

Für den Zugang wurde ein ca. 1,5 cm langer Hautschnitt in Höhe des rechten Femurs gesetzt, welcher von proximal nach distal verlief. Mittels einer kleinen Präparierschere wurde die Muskelfazie durchtrennt und stumpf bis auf den Muskel präpariert. Anschließend erfolgte das stumpfe Ablösen der Muskulatur von der rechten lateralen Seite des Femurs, so dass der Knochen frei lag.

Zur Fixierung des ersten Pins wurde mit einem feinen Bohrer (RISystem, AO Research Institute, Davos, Schweiz) ein Loch distal des Femurkopfes und proximal des Trochanter tertius gebohrt, bei der der Fixateur als Bohrlehre diente (Abbildung 10, A). Nach Befestigung des Pins mittels Pindreher wurde ein zweites Loch proximal der Femurkondylen gebohrt und darin ein Pin mit dem Fixateur verankert (Abbildung 10, B). Hierdurch wurde der Fixateur externe bereits in seiner endgültigen Position fixiert. Die beiden letzten Pins wurden entsprechend der dadurch vorgegebenen Position im Fixateur und Knochen befestigt, nachdem hier ebenfalls zunächst Löcher gebohrt wurden. Anschließend wurde die Fixateurhalterung, die eine Verbiegung des Fixateurs während dessen Fixierung im Knochen verhinderte, entfernt und das Femur mit 0,9%iger Kochsalz-Lösung (B. Braun, Melsungen AG, Deutschland) gespült. Mittels einer 0,45 mm Gigli Drahtsäge (RISystem, AO Research Institute, Davos, Schweiz) wurde eine Osteotomie mittig zwischen die zwei inneren Pins gesetzt und anschließend erneut mit 0,9%iger Kochsalzlösung gespült (Abbildung 10, C & D).

Die Wunde wurde mit einer fortlaufenden Muskel-, sowie mit einer Hautnaht mit Einzelknopf-Heften verschlossen (Abbildung 10, E & F). Ein resorbierbarer Vicryl-Faden (Vicryl® 6-0, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) diente der Muskelnah und ein nicht-resorbierbarer Faden (Resolon® 5-0, Resorba, Nürnberg, Deutschland) der Hautnaht. Abschließend wurde das operierte Bein mit

Octenisept gereinigt. Die gesamte standardisierte Operation erfolgte unter sterilen Bedingungen.



**Abbildung 10: Operationsverlauf der Osteotomie des Femurs**

Nach Hautschnitt und Freilegung des Femurs wurde das Femur mit Pinzetten fixiert und das erste Pinloch distal des Femurkopfes gebohrt (A). Hierbei diente der Fixateur externe als Bohrlehre und die Fixateurhalterung zur Vermeidung einer Biegung des Fixateurs. Nach Fixierung des ersten Pins im Knochen und im Fixateur wurde das distalst gelegene Loch proximal der Femurkondylen gebohrt und ein Pin eingebracht (B). Die zwei inneren Pins wurden auf gleiche Weise im Knochen und Fixateur fixiert und anschließend die Fixateurhalterung entfernt. Mittels einer Gigli Drahtsäge wurde eine Osteotomie in die Diaphysenmitte gesägt (C, D). Nach einer fortlaufenden Muskelnaht wurde die Haut mit Einzelknopfnähten verschlossen (E, F)

## **2.2.4 Blutentnahme und Euthanasie**

Um die Calcium- und Parathormonkonzentration im Serum bestimmen zu können, wurden den Tieren sowohl kurz vor der Operation, als auch nach einer Standzeit von 10, 24 und 32 Tagen unmittelbar vor der Tötung unter Narkose Blut abgenommen. Hierfür wurde mit einer Lanzette (Goldenrod Animal Lancet®, Medipoint Inc., Mineola, USA) mit einer Spitzengröße von 5 mm die Vena fascialis punktiert und ca. 0,3 bis 0,8 ml Blut in Mikrovetten (Microvette® 200 Z, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nürnberg, Deutschland) gewonnen. Nach 30 min wurde das Blut für 10 min bei 2800 Umdrehungen zentrifugiert und anschließend das Serum abpipettiert. In Eppendorf-Gefäßen wurde das Serum bis zur nächsten Aufarbeitung bei -80 °C tiefgefroren.

Die in Narkose liegenden Tiere wurden nach finaler Blutentnahme mittels cervikaler Dislokation euthanasiert und anschließend präpariert.

## **2.2.5 Präparation der Knochen ex-vivo**

### **Knochenpräparation der Tiere mit 10 Tagen Standzeit**

Für die Auswertung der Tiere mit einer Standzeit von 10 Tagen wurde das operierte Femur direkt nach der Tötung explantiert. Das Muskelgewebe wurde mit einer kleinen Präparierschere und einer chirurgischen Pinzette vorsichtig vom Knochen entfernt. Hierbei wurde darauf geachtet, das Kallusgewebe bei der Präparation nicht zu beschädigen. Die Knochen wurden in Einbettkassetten (Histosette®, Simport, Boleil, Kanada) gelegt und für 48 Stunden in 4%igem Formalin bis zur histologischen Weiterverarbeitung fixiert.

### **Knochenpräparation der Tiere mit 24 und 32 Tagen Standzeit**

Die Femora der nach 24 und 32 Tagen euthanasierten Tiere wurden wie die Femora der Tiere mit frühem Tötungszeitpunkt explantiert und präpariert. Zusätzlich wurde hierbei noch das nicht-osteotomierte, kontralaterale Femur entnommen. Die Knochen wurden in Einbettkassetten (Histosette®, Simport, Boleil, Kanada) gelegt und in einer 0,9%igen Kochsalzlösung (B. Braun, Melsungen AG, Deutschland) aufbewahrt. Für die Einbettung der Knochen für die

biomechanische Testung wurde das Gewebe am Femurkopf sehr sorgfältig entfernt. Nach Entfernung der 3 proximalen Pins wurde der Femurkopf mit einem Tupfer getrocknet und mit einem Tropfen Kleber (i-Cem® Self-Adhesive, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) auf einer Aluminiumhülse fixiert. Anschließend wurde der letzte Pin und Fixateur externe entfernt. Der so fixierte Knochen wurde bis zur biomechanischen Testung am gleichen Tag in einer 0,9%igen Kochsalzlösung aufbewahrt. Nach Beendigung der Testung wurde der mit Kleber fixierte Femurkopf abgesägt und die Knochen bis zur histologischen Aufarbeitung für 48 Stunden in 4%igem Formalin aufbewahrt.

## 2.2.6 Biomechanische Testung

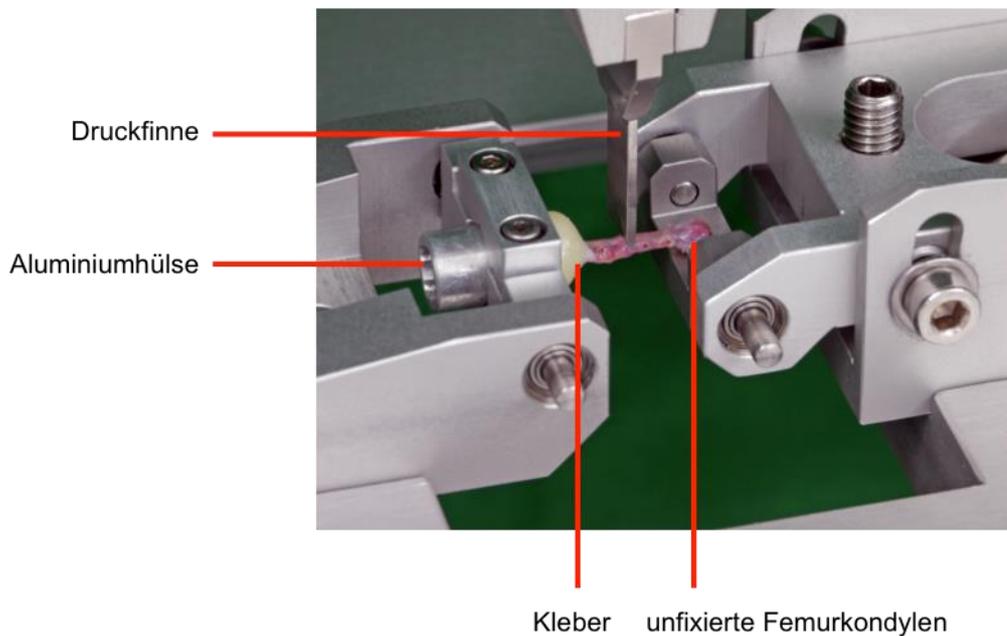
### Drei-Punkt-Biegung

Die präparierten, osteotomierten rechten Femora, wie auch die nicht-osteotomierten, kontralateralen Femora der Tiere mit einer Standzeit von 24 und 32 Tagen, wurden zur Ermittlung der Biegesteifigkeit einer nicht-destruktiven Drei-Punkt-Biegeprüfung in einer Materialprüfmaschine (Z10, Zwick Roell GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) unterzogen. Hierfür wurden die auf einer Aluminiumhülse fixierten Femora in einem Scharnier fixiert und die Kondylen unfixiert aufgelegt (Abbildung 11). Der Abstand ( $L$ ) zwischen der proximalen Fixierung und der distalen Auflagerung des Knochens betrug 20 mm. Mittels einer an einer 50 N Kraftmessdose (A.S.I. Dresden, Deutschland) befestigten Druckfinne wurde auf den Kallus in Höhe der Fraktur eine Biegekraft von max. 4 N aufgebracht. Konnte diese Kraft nicht erreicht werden, wurde die Messung vorzeitig beendet, um eine Deformation und einen Bruch des Knochens zu verhindern. Insgesamt wurden 3 Messzyklen pro Knochen durchgeführt, wobei der 3. Messzyklus zur Auswertung der Biegesteifigkeit ( $E^*$ ) aus der Steigung ( $k$ ) des linearen Bereichs der Messkurve herangezogen wurde. Für die anschließende Berechnung der Biegesteifigkeit wurde der Hebelarm ermittelt, indem der proximale Abstand ( $a$ ) und der distale ( $b$ ) zur Druckfinne gemessen wurde. Dieser Wert wurde benötigt, da der Kallus nicht immer in der Mitte der proximalen und distalen Auflagerungspunkte lag ( $L/2$ ). Die Formel zur Berechnung der Biegesteifigkeit lautet:

$$E^*I = k \frac{a^2b^2}{3L} \quad (\text{in Nmm}^2)$$

Die Materialkonstante Young's Modulus ( $E_{app}$ ) des Frakturkallus' wurde bestimmt durch das Verhältnis zwischen Biegesteifigkeit ( $E^*I$ ) und Moment of Inertia ( $I_x$ ), welches durch die Analyse der Micro-Computer-Tomographie ermittelt wurde:

$$E_{app} = E^*I / I_x \quad (\text{in N/mm}^2)$$



#### **Abbildung 11: Biomechanische Testung mit Drei-Punkt-Biegeprüfung**

Das mittels Kleber in einer Aluminiumhülse befestigte Mausfemur wird in eine spezielle Vorrichtung in die Zwick-Prüfmaschine eingespannt. Die Kondylen liegen hierbei frei. Mit der Druckfinne wird auf den Kallus in Höhe der Osteotomie bzw. auf die entsprechende Stelle des intakten, kontralateralen Femurs nicht-destruktiv gedrückt und die Steifigkeit mit spezieller Software gemessen.

## **2.2.7 $\mu$ CT-Aufnahmen**

### **Scannen der Femora**

Die osteotomierten und nicht-osteotomierten Femora wurden nach biomechanischer Drei-Punkt-Biegung mittels Mikro-Computer-Tomographie ( $\mu$ CT) (Skyscan 1172, SkyScan, Kontich, Belgien) ausgewertet. Die Auflösung betrug  $8 \mu\text{m}$  bei 50 kV und  $200 \mu\text{A}$ . Für die Bestimmung der Knochenmineraldichte wurden zur Kalibrierung in jedem Scan zwei Phantome mitgeführt, die eine

definierte Dichte ( $250 \text{ mg/cm}^3$  und  $750 \text{ mg/cm}^3$ ) an Hydroxylapatit aufwiesen. Die Knochen und Phantome wurden in einem Probenbehälter befestigt. Dieser war mit 0,9 % Kochsalzlösung gefüllt, um eine Austrocknung der Knochen zu verhindern.

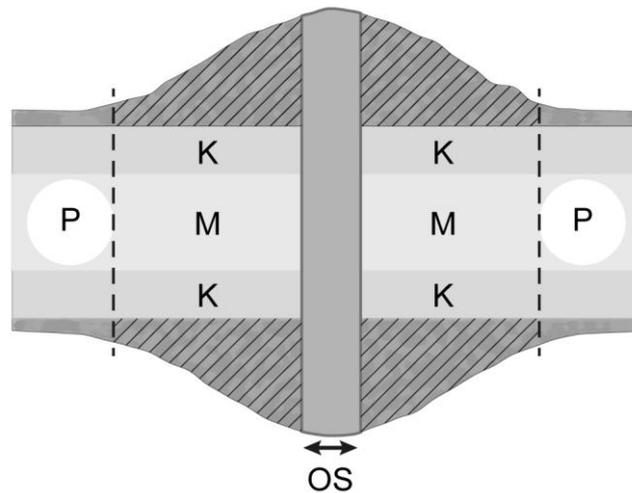
### **Auswertung der $\mu\text{CT}$ -Aufnahmen**

Die Auswertung der gescannten Femora erfolgte mit den Programmen CT Analyser (Version 1.10.1.3 64-bit, SkyScan, Kontich, Belgien) und DataViewer (Version 1.4.3, SkyScan, Kontich, Belgien). Es wurden Standardparameter wie die Knochenmineraldichte (BMD, bone mineral density), das Kallusvolumen (TV, total tissue volume), das Knochenvolumen (BV, bone volume), der Knochenanteil im Kallus (BV/TV, bone volume/tissue volume) und das Flächenträgheitsmoment ( $I_x$ , moment of inertia) für die osteotomierten Femora, sowie die kortikale Dicke (Ct.Th) der nicht-osteotomierten, kontralateralen Femora bestimmt. Hierfür wurde zunächst ein Auswertungsbereich (VOI, volume of interest) festgelegt, der dem endost- und periostalen Osteotomie-Bereich entsprach (Abbildung 12). Die Kortices wurden nicht miteingeschlossen, so dass das VOI ausschließlich aus neu gebildetem Knochen und Gewebe innerhalb der Osteotomie bestand.

Für die Bestimmung von BMD, TV, BV und BV/TV wurde ein Schwellenwert gewählt, der einen Grauwert von  $641.9 \text{ mg HA/cm}^3$  aufwies [67]. Dieser Wert entsprach kortikalem Knochen und diente zur Unterscheidung zwischen mineralisiertem und nicht-mineralisiertem Gewebe. Im nicht-osteotomierten, kontralateralen Femur wurde zur Ermittlung des BMD ausgehend von der Diaphysenmitte 1 mm proximal und 1 mm distal ausgewertet, für  $I_x$  10 Schnitte proximal und distal.

### **Kortikale Überbrückung**

Für die Bestimmung der Heilungsrate wurde die kortikale Überbrückung in den  $\mu\text{CT}$ -Aufnahmen der Tiere mit 24 und 32 Tagen Standzeit bewertet. Hierfür wurde die Anzahl der überbrückten Kortices in 2 Ebenen pro Präparat gezählt, so dass eine minimale Anzahl von 0 und eine maximale Anzahl von 4 Überbrückungen möglich war. Analog der klinischen Definition einer Frakturheilung wurde ab mindestens 3 überbrückten Kortices die Fraktur als geheilt bewertet.



**Abbildung 12: VOI für die Auswertung der  $\mu$ CT-Aufnahmen der osteotomierten Femora**

Für die Auswertung der relevanten Knochenparameter wurde der endostale und periostale Osteotomie-Bereich zwischen den zwei inneren Pins ohne Kortices ausgewertet (durchgängige graue Fläche). K, Kortikalis; M, Markhöhle; P, Pin; OS, Osteotomiespalt

## 2.2.8 Histologie

### Anfertigung von Paraffin-Schnitten

Für die Anfertigung von Paraffin-Schnitten wurden die Knochen der Tiere mit einer Standzeit von 10 Tagen verwendet. Die operierten Femora wurden vorsichtig von Muskelgewebe mit einer kleinen Präparierschere und einer chirurgischen Pinzette befreit ohne das Kallusgewebe zu zerstören. Um dies gewährleisten zu können, wurde der Fixateur externe nicht vom Knochen entfernt. Um das Eindringen der Lösungen für die Paraffin-Aufarbeitung sicher zu stellen, wurde der Femurkopf anschließend bei allen Femora abgesägt. Die Knochen wurden in Einbettkassetten für 48 Stunden in 4%igen Formalin fixiert. Anschließend erfolgte die Dekalzifizierung mittels 20%igem EDTA mit einem pH von 7,2-7,4 für mind. 8 Tage, max. 14 Tage. Während der Entkalkung wurden die Proben auf einem Schüttler aufbewahrt, um das Eindringen der Lösung zu optimieren. Das EDTA wurde 2-3 mal pro Woche ausgewechselt.

Nach der Dekalzifizierung wurden die Proben in einen Vakuum-Gewebeeinbettautomat (MTM, SLEE Medical GmbH, Mainz, Deutschland) gegeben. Anschließend wurden die Einbettkassetten mit den Proben in flüssigem Paraffin getränkt und Paraffinblöcke gegossen. Nach Aushärtung der Blöcke wurden die Pins und der Fixateur externe vorsichtig entfernt und 5-7  $\mu$ m

dünne Probenschnitte mittels Mikrotom (SLEE Cut 6062, SLEE Medical GmbH, Mainz, Deutschland) angefertigt. Die Längsschnitte erfolgten entlang der Diaphyse. Die angefertigten Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht und anschließend an der Luft getrocknet.

### **Anfertigung von Methacrylat-Schnitten**

Die präparierten und biomechanisch getesteten Femora der an Tag 24 und 32 getöteten Tiere wurden zur Fixierung für mind. 48, max. 72 Stunden, in 4%igem Formalin aufbewahrt. Für unentkalkte Kunststoff-Schnitte wurden diese anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Hierfür befanden sie sich für jeweils einen Tag in 40 %igen, 70%igen, 80%igen, 90%igen und 100%igen Ethanol. Für insgesamt 4 Tage wurden sie in 100%igen Ethanol bei täglichem Austausch des Alkohols entwässert. Anschließend erfolgte die Infiltration für 8-14 Tage mit einer Lösung aus entstabilisiertes Methacrylat, Benzoylperoxid und Nonylphenyl. Die darauffolgende Polymerisation wurde mit einem Gemisch aus entstabilisiertes Methacrylat, Benzoylperoxid, Nonylphenyl-Polyethylenglycolacetat und Dimethyl-p-Toluidin durchgeführt. Anschließend wurden 5-7 µm Schnitte mittels Hartschnittmikrotom (Leica SM2500E, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) angefertigt.

## **2.2.9 Histologische Färbungen**

### **Safranin-Orange**

Die histologischen Femur-Schnitte der Tiere mit einer Standzeit von 10 Tagen wurden für die Gewebedifferenzierung mit Safranin-Orange gefärbt. Durch die Färbung erscheint der Knochen türkis, neugebildeter Knochen rosa-violett und Knorpel dunkelrot.

Hierfür wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert indem sie für 30 min bei 60 °C in den Wärmeschrank gegeben, zweimal für jeweils 5 min in Xylol eingetaucht und anschließend in eine absteigende Alkoholreihe für je zwei 2 min gegeben wurden. Anschließend wurden die Schnitte für 4 min in Weigerts Eisenhämatoxilin und danach kurz in angesäuerten Alkohol (1 ml konzentrierte HCl in 100 ml 70 % Alkohol) gegeben. Die Präparate wurden für 5 min unter fließendem

Leitungswasser gewässert und danach mit 0,02%igem Echtgrün für 3 min gefärbt. Dieses wurde mit 1%iger Essigsäure für 30 s abgespült und darauffolgend für 5 min mit Safranin-Orange gefärbt. Abschließend kamen die Präparate in eine aufsteigende Alkoholreihe und wurden final mit Deckgläsern versehen.

## **Giemsa**

Für die histologische Gewebedifferenzierung der Femora der 24 und 32 Tage postoperativ getöteten Tiere wurden die Präparate mit Giemsa gefärbt. Hierbei färbte sich Knorpel violett bis blau, Knochen grau und neugebildeter Knochen hell-rosa bis hell-grau.

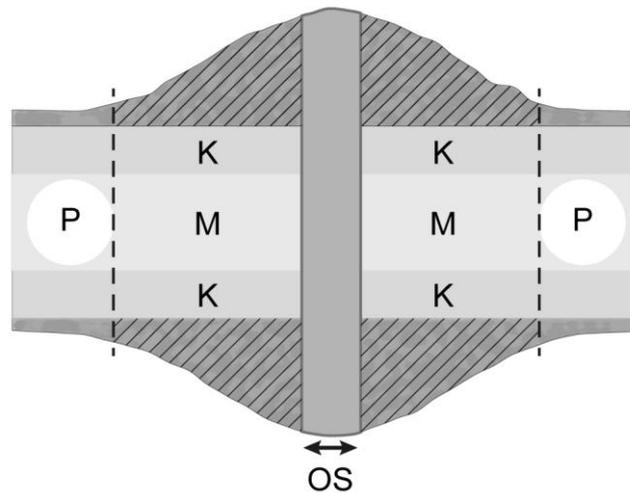
Die Schnitte wurden zunächst mittels Methoxyethylacetat entplastet und in eine absteigende Alkoholreihe gegeben. Die Schnitte wurden kurz in Aqua dest. eingetaucht bevor sie für 45 min in die Giemsa-Lösung überführt wurden. Nach der Färbung wurden die Präparate kurz in 0,4%ige Essigsäure und anschließend in 100%igen Ethanol eingetaucht. Anschließend wurde der Ethanol zwei Mal ausgewechselt und die Präparate wiederum jeweils kurz eingetaucht. Die Schnitte wurden darauffolgend in Xylol eingetaucht. Dieser wurde anschließend ausgetauscht und die Schnitte wieder kurz eingetaucht. Mit abschließender Fixierung der Präparate mit Deckgläschen war diese Färbung abgeschlossen.

## **Auswertung der histologischen Schnitte**

Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Leica DMI6000, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) bei 50facher Vergrößerung und dazugehöriger Software MM AF Version 1.4.0 (MetaMorph®, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Zur Bestimmung des Anteils an Knochen (TOT, total osseous tissue), Knorpel (Cg, cartilage) und Weichgewebe (FT, fibrous tissue) im Frakturkallus, wurden zunächst Auswertungsareale festgelegt (ROI, region of interest). Für die mit Safranin-Orange gefärbten histologischen Schnitte der Tiere mit 10 Tagen Standzeit wurde der Bereich des periostalen Kallus zwischen den zwei inneren Pins und die Fläche des Osteotomiespaltes ausgewertet (Abbildung 13). Analog der Auswertung der  $\mu$ CT-Aufnahmen wurden die mit Giemsa gefärbten Schnitte

der Tiere mit 24 und 32 Tagen Standzeit nur im Bereich des Osteotomiespalts ausgewertet (Abbildung 13).

Zur Bestimmung der Knochen-, Knorpel- und Weichgewebeanteile wurden die entsprechenden Bereiche in der Auswertungssoftware markiert und anschließend im Programm als Fläche wiedergegeben. Die Anteile wurden relativ zur gesamten ROI-Fläche ausgerechnet.



**Abbildung 13: ROI für die Auswertung der histologischen Schnitte**

Für die Auswertung der histologischen Schnitte der Tiere mit 10 Tagen Standzeit wurde der Osteotomiespalt (durchgängige graue Fläche) und der periostale Kallus zwischen den zwei inneren Pins (schraffierte Flächen) ausgewertet. Für die Schnitte der Tiere mit 24 und 32 Tagen Standzeit wurde analog der  $\mu$ CT-Auswertung nur der Osteotomiespalt (durchgängige graue Fläche) zwischen den zwei inneren Pins als ROI festgelegt.

K, Kortikalis; M, Markhöhle; P, Pin; OS, Osteotomiespalt

## 2.2.10 Serumanalysen

### Calcium

Für die Bestimmung der Calciumkonzentration im Serum wurde ein Calcium Assay Kit nach Gebrauchsangaben des Herstellers verwendet (QuantiChrom™ Calcium Assay Kit DICA-500, BioAssay Systems, Hayward, USA). Hierfür wurden in 96-well-Platten je 5  $\mu$ l Serum mit 200  $\mu$ l Reaktionslösung pipettiert und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte mittels Mikroplatten-Lesegerät und zugehöriger Software bestimmt (Infinite M200 NanoQuant, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz; Software Magellan Version 6, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz). Die Calcium-Konzentration wurde mit dem vom Hersteller vorgegebenen Standard ermittelt. Für jede Serumprobe wurde

eine Doppelbestimmung durchgeführt und zur weiteren Auswertung der Mittelwert dieser zwei Ergebnisse herangezogen.

## **PTH**

Die Parathormonkonzentration im Serum wurde mittels ELISA Kit quantifiziert (Mouse PTH 1-84 ELISA Kit 60-2305, Immotopics Inc., San Clemente, USA). Zunächst wurden die im Kit enthaltenen Antikörper, Standards, Kontrollen, Waschkonzentrate und ELISA Substrate nach Herstellerangaben aufbereitet. Anschließend wurden jeweils 20 µl der Standard- und Kontroll-Lösungen, sowie 20 µl pro Serumprobe in die mitgelieferte, beschichtete 96-well-Platte pipettiert. In jedes belegte Well wurden abschließend jeweils 50 µl der Antikörperlösung hinzugegeben und die Platte mit Aluminiumfolie bedeckt für drei Stunden auf einen Schüttler (200 Umdrehungen pro Minute horizontal) bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde jedes Well fünf Mal mit 350 µl Waschlösung gespült und 100 µl des ELISA Substrates hinzupipettiert. Die Platte wurde bedeckt mit Aluminiumfolie für 30 min zurück auf den Schüttler gestellt. Anschließend wurde nach Herstellerangaben die Absorption bei 620 nm gemessen (Infinite M200 NanoQuant, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz; Software Magellan Version 6, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz), in jedes Well 100 µl der ELISA Stopplösung gegeben und danach die Absorption bei 450 nm abgelesen. Die erste Messung diente der Ermittlung des höchsten Wertes des höchsten Standards und würde nur für den Fall benötigt werden, dass Ergebnisse von Proben zwischen den Ergebnissen des zweithöchsten und höchsten Standards fallen würden. Für die Identifizierung der Absorptionswerte der ersten fünf Standards wurde die zweite Messung herangezogen und diente der Ermittlung von Werten, die unterhalb des zweithöchsten Standards lagen.

### **2.2.11 Statistik**

Die Ergebnisse der Drei-Punkt-Biegung-, µCT- und Histologie-Auswertung werden als Mediane, Minimum, Maximum und Interquartile dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurden die Ergebniswerte mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen.

Um die Effekte der unterschiedlichen Futtersorten vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse und des WT mit Mischfutter mit den Ergebnissen des WT mit Standardfutter verglichen. Weiterhin wurden die Ergebnisse der drei *Cckbr*-defizienten Gruppen untereinander verglichen, um die Auswirkungen der Futtersorten im defizienten Tier analysieren zu können.

Die Auswertung der Serumanalysen wurden mittels Kruskal-Wallis-H-Test und der Fisher's LSD(least significant difference)-Posthoc-Analyse durchgeführt.

Die im Text angegebenen prozentualen Änderungen wurden auf den Mittelwert bezogen.

Für alle statistischen Auswertungen wurde die Software IBM SPSS Statistics 19.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet. Das Signifikanzniveau betrug im Mann-Whitney-U- und Kruskal-Wallis-H-Test  $p \leq 0,05$ .

### 3. ERGEBNISSE

#### Ausfälle während der Operation

Von den insgesamt 119 operierten Mäusen wurden 10 Ausfälle verzeichnet (Tabelle 4). Bedingt durch den spröden, osteoporotischen Knochen der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse kam es während der Operation zu Knochenbrüchen, so dass diese Tiere noch in Narkose mittels cervikaler Dislokation euthanasiert wurden.

Tabelle 4: Ausfälle innerhalb der Behandlungsgruppen während der Operation.

Futter	WT	<i>Cckbr</i> <sup>-/-</sup>
S	0	1
C	-	6
M	0	3

S, Standardfutter; C, Carbonatfutter; M, Mischfutter

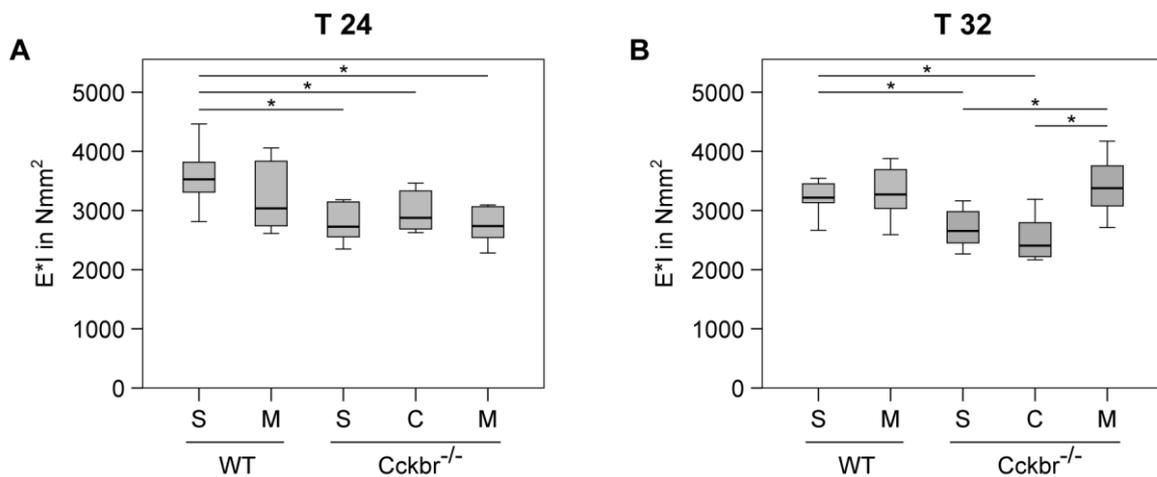
#### Postoperative Röntgenaufnahmen

Die Auswertung der postoperativen Röntgenaufnahmen zeigte keine Auffälligkeiten, die zu einem Ausschluss von Tieren geführt hätten. Es konnten keine Fehlplatzierungen der Pins und des Fixateurs festgestellt werden.

### 3.1. Auswertung des nicht-osteotomierten Knochens

#### 3.1.1 Ergebnisse der biomechanischen Drei-Punkt-Biegung

Die intakten Femora der verschiedenen *Cckbr*-defizienten Gruppen wiesen nach einer Standzeit von 24 Tagen im Vergleich zum gesunden WT mit Standardfutter eine signifikant geringere (- 17 % bis - 24 %) Biegesteifigkeit auf (Abbildung 14, A). Trotz des unterschiedlichen Futters wurden keine Unterschiede zwischen den *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Gruppen detektiert. Nach 32 Tagen zeigte sich ein ähnliches Bild. Die Biegesteifigkeit der Standard- und Carbonat-Gruppe war im Vergleich zum WT signifikant niedriger (- 13 %,  $p = 0,015$  und - 20 %,  $p = 0,006$ ), unterschied sich



**Abbildung 14: Biegesteifigkeit der intakten Femora nach 24 (A) und 32 (B) Tagen Standzeit**  
S, Standardfutter; C, Carbonatfutter; M, Mischfutter

allerdings nicht zwischen diesen zwei Gruppen (Abbildung 14, B). Jedoch wies die Calcium-Carbonat-Gruppe eine um 16 % geringere Biegesteifigkeit auf als nach 24 Tagen Standzeit. Die Zugabe von Calcium-Gluconat (Mischdiät-Gruppe) führte zu einer Erhöhung der Biegesteifigkeit auf Werte des WT. Die Biegesteifigkeit in der Mischfutter-Gruppe war damit signifikant höher als die der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Standard- und Carbonatfutter (+ 24 %,  $p = 0,020$  und + 24 %,  $p = 0,005$ ). Auch der Vergleich zwischen den zwei Standzeiten zeigte in der Mischfutter-Gruppe eine um 26 % erhöhte Biegesteifigkeit.

Die Fütterung mit Gluconat führte somit in der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Maus zu einer verbesserten Biegesteifigkeit des intakten Femurs nach 32 Tagen. Im WT hatte die Mischdiät dagegen keinen Einfluss.

### 3.1.2 Ergebnisse der $\mu$ CT-Analysen der nicht-osteotomierten Femora

Die Bestimmung der kortikalen Knochenmineraldichte ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den *Cckbr*-defizienten Gruppen und dem WT mit Standardfutter 24 und 32 Tage post-op (Tabelle 5 und Tabelle 6).

Die Mischdiät führte im WT zu einer nur leicht, aber signifikant erhöhten BMD. Dieses Ergebnis konnte jedoch nach 32 Tagen Standzeit nicht detektiert werden. Ebenso wiesen das Flächenträgheitsmoment und die kortikale Dicke nach 24 und 32 Tagen keine Unterschiede zwischen den beiden WT-Gruppen auf. Diese Ergebnisse bestätigten die Ergebnisse der biomechanischen Drei-Punkt-Biegung,

**Tabelle 5: Ergebnisse der  $\mu$ CT-Auswertung der nicht-osteotomierten Femora im WT und in *Cckbr*<sup>-/-</sup> mit unterschiedlichem Futter nach 24 Tagen Standzeit**

	WT		<i>Cckbr</i> <sup>-/-</sup>		
	S	M	S	C	M
BMD <sub>Ct</sub> in mg HA/cm <sup>3</sup>	1447 ± 42	1519 ± 22*	1466 ± 56	1,421 ± 44	1456 ± 43
Ct.Th in $\mu$ m	165 ± 1	166 ± 0	164 ± 2	165 ± 2	167 ± 0 <sup>#</sup>
I <sub>x</sub> in mm <sup>4</sup>	0,185 ± 0,03	0,162 ± 0,02	0,153 ± 0.01*	0,165 ± 0,02	0,159 ± 0,01*

BMD<sub>Ct</sub>, kortikale Knochenmineraldichte; HA, Hydroxylapatit; Ct.Th, kortikale Dicke; I<sub>x</sub>, Flächenträgheitsmoment in Richtung x; \*p ≤ 0.05 vs. WT S, <sup>#</sup>p ≤ 0.05 vs. *Cckbr*<sup>-/-</sup> S

**Tabelle 6: Ergebnisse der  $\mu$ CT-Auswertung der nicht- osteotomierten Femora im WT und in *Cckbr*<sup>-/-</sup> mit unterschiedlichem Futter nach 32 Tagen Standzeit**

	WT		<i>Cckbr</i> <sup>-/-</sup>		
	S	M	S	C	M
BMD <sub>Ct</sub> in mg HA/cm <sup>3</sup>	1474 ± 28	1492 ± 21	1446 ± 16	1476 ± 14	1464 ± 36
Ct.Th in $\mu$ m	168 ± 1	166 ± 1	164 ± 2	166 ± 1 <sup>#</sup>	166 ± 0 <sup>#</sup>
I <sub>x</sub> in mm <sup>4</sup>	0,157 ± 0,01	0,184 ± 0,04*	0,169 ± 0,01	0,156 ± 0,02	0,160 ± 0,01

BMD<sub>Ct</sub>, kortikale Knochenmineraldichte; HA, Hydroxylapatit; Ct.Th, kortikale Dicke; I<sub>x</sub>, Flächenträgheitsmoment in Richtung x; \*p ≤ 0.05 vs. WT S, <sup>#</sup>p ≤ 0.05 vs. *Cckbr*<sup>-/-</sup> S

die keine Unterschiede in der Biegesteifigkeit zwischen WT mit Standard- und Mischfutter aufwies.

Im Vergleich zwischen allen Gruppen konnten zusammengefasst keine signifikanten Unterschiede in der kortikalen Dicke und im Flächenträgheitsmoment festgestellt werden, so dass die beobachteten Unterschiede in der Biegesteifigkeit nicht mit mikrotomographisch ermittelten Strukturparametern erklärt werden können.



### 3.2.2 Ergebnisse der $\mu$ CT-Analysen der osteotomierten Femora

Nach 24 und 32 Tagen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Kallusvolumen zwischen dem WT und den *Cckbr*-defizienten Mäusen mit Standard- oder Carbonatfutter (Abbildung 16, A und B). Die *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse, die 24 Tage lang das Mischfutter erhielten, wiesen einen Trend zu einem erhöhten Kallusvolumen auf. Nach 32 Tagen war das Kallusvolumen in dieser Gruppe im Vergleich zum WT signifikant erhöht ( $p = 0,05$ , + 48 %) (Abbildung 16, A und B).

Der relative Knochenanteil im Kallus (BV/TV) war, wie zu erwarten, nach 32 Tagen größer als nach 24 Tagen, zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen allen Gruppen (Abbildung 16, C und D).

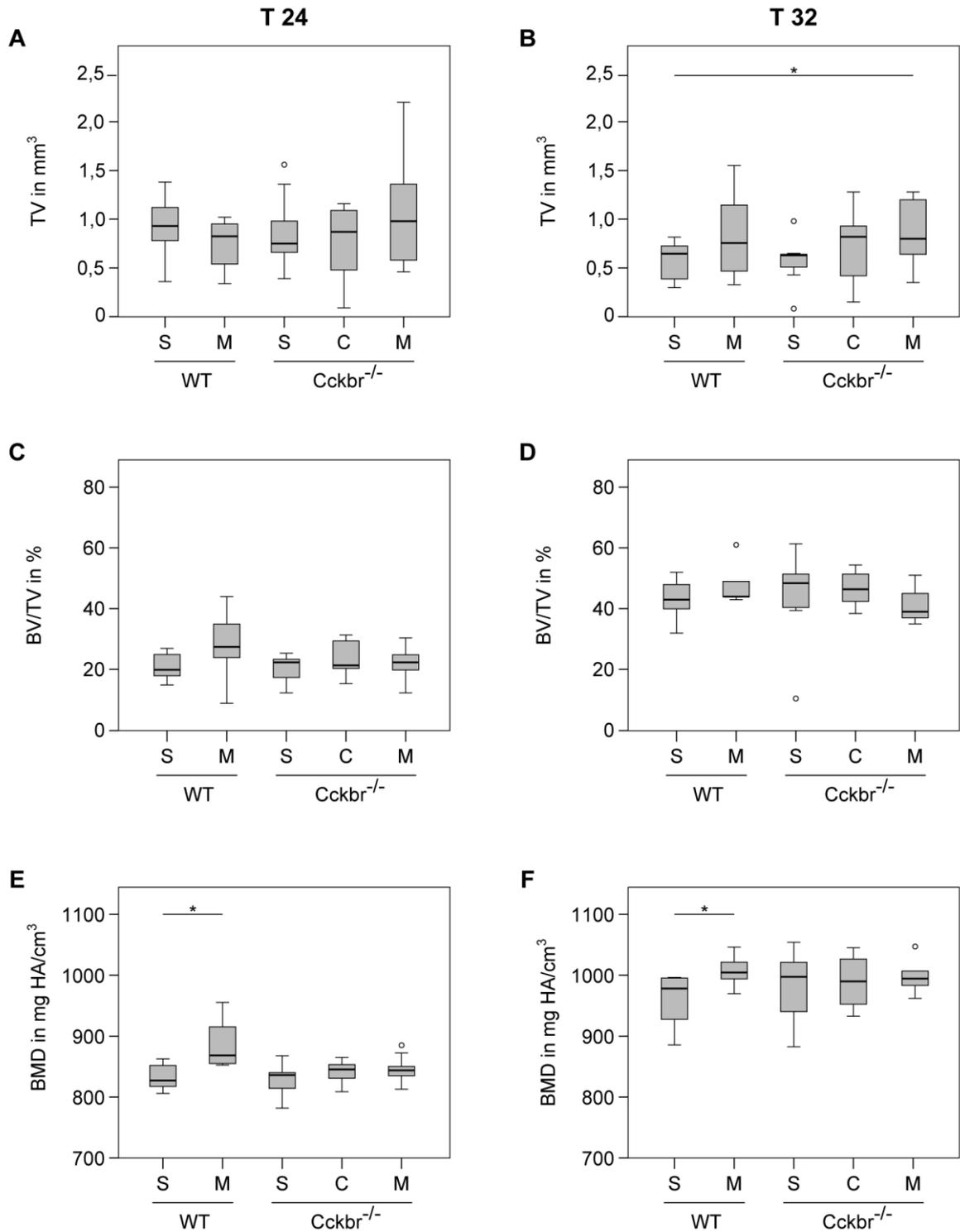
Die Knochenmineraldichte (BMD) war in den *Cckbr*-defizienten Gruppen im Vergleich zum WT unverändert (Abbildung 16, E und F). Die Mischdiät führte im WT zu einer leicht, aber signifikanten Erhöhung der BMD nach 24 und 32 Tagen ( $p = 0,015$  und  $p = 0,037$ ). Bei den *Cckbr*-defizienten Mäusen waren keine signifikanten Unterschiede zu beobachten.

Das Flächenträgheitsmoment  $I_x$  wies in der *Cckbr*-defizienten Gruppe mit Standardfutter keine Unterschiede zum WT auf, weder nach 24, noch nach 32 Tagen Heilungszeit (Abbildung 17, A und B). Im WT führte die Mischdiät nach 32 Tagen zu einer signifikanten Zunahme des Flächenträgheitsmomentes (Abbildung 17, B).

Bei den *Cckbr*-defizienten Mäusen zeigten sich ebenfalls fütterungsbedingte Einflüsse auf das Flächenträgheitsmoment. Die Calcium-Carbonat-Diät induzierte an Tag 32 ein signifikant höheres Flächenträgheitsmoment sowohl im Vergleich zur WT-Kontrolle ( $p = 0,001$ ), als auch zu *Cckbr*-defizienten Mäusen, die Standardfutter erhielten ( $p = 0,018$ ). Die Mischdiät führte nach 24 Tagen ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung des Flächenträgheitsmoments sowohl im Vergleich zum WT ( $p = 0,026$ ) als auch im Vergleich zu *Cckbr*-defizienten Mäusen mit Standardfutter ( $p = 0,02$ ) (Abbildung 17, A). Auch nach 32 Tagen war das Flächenträgheitsmoment in den *Cckbr*-defizienten Mäusen mit Mischdiät im Vergleich zum Standard-WT signifikant erhöht ( $p = 0,003$ ).

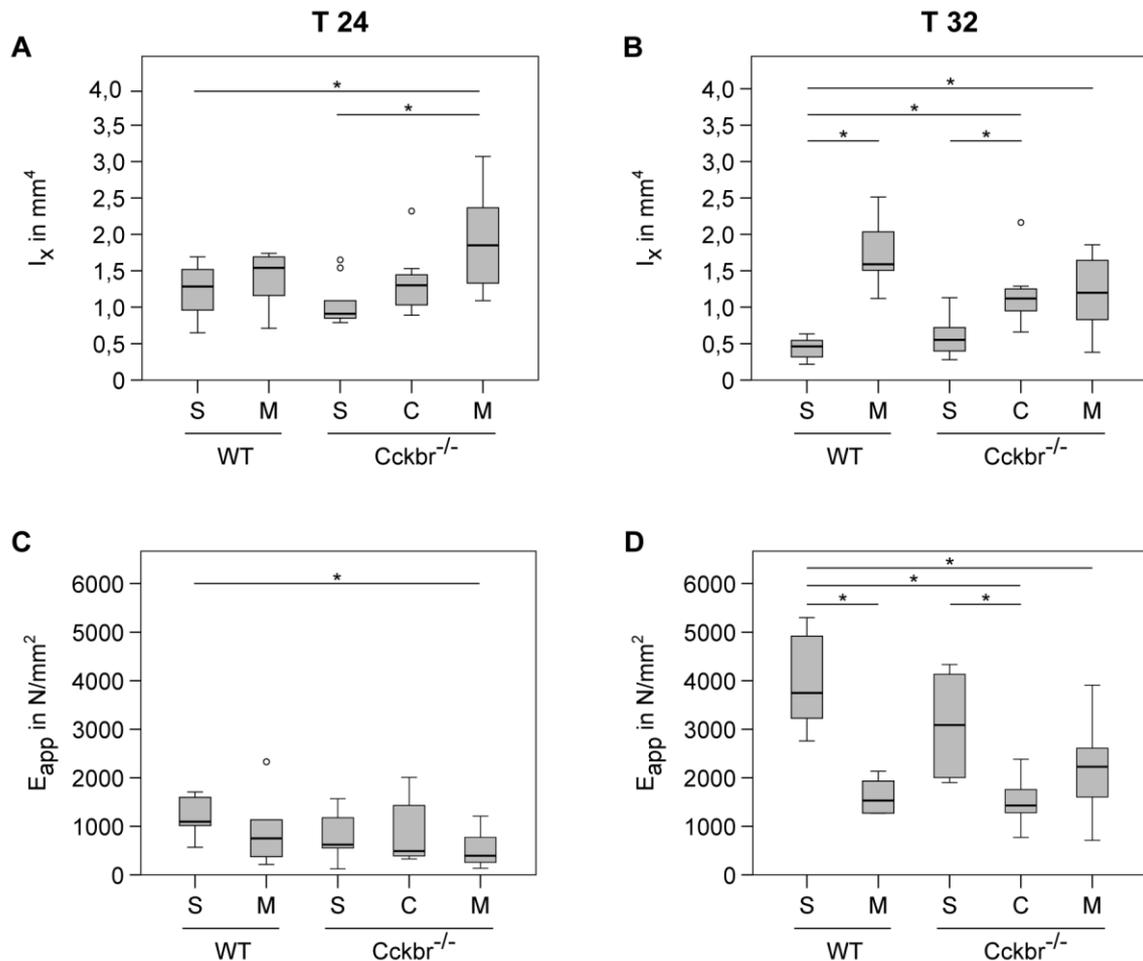
Das apparente E-Modul wies in der *Cckbr*-defizienten Gruppe mit Standardfutter keine Unterschiede auf im Vergleich zur WT-Kontrolle. Im WT führte die Mischdiät nach 32 Tagen zu einer signifikanten Abnahme des apparenten E-Moduls. Bei den *Cckbr*-defizienten Mäusen führte sowohl das Carbonat-, als auch das Mischfutter

zu einem deutlich geringerem apparenten E-Modul nach 32 Tagen im Vergleich zum WT und *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Standardfutter (Abbildung 17, D).



**Abbildung 16:  $\mu$ CT-Ergebnisse des Gesamtkallusvolumens (A und B), des relativen Knochenanteils (B und C) und der Knochenmineraldichte (E und F) der Kalli nach 24 und 32 Tagen Standzeit**

S, Standardfutter; C, Carbonatfutter; M, Mischfutter



**Abbildung 17: Flächenträgheitsmoment  $I_x$  (A und B) und apparenter E-Modul (C und D) nach 24 und 32 Tagen Standzeit**

S, Standardfutter; C, Carbonatfutter; M, Mischfutter

### 3.2.3 Kortikale Überbrückung des Frakturspalts

Für die Auswertung der Knochenheilung nach 24 und 32 Tagen Standzeit wurde die kortikale Überbrückung in  $\mu$ CT-Aufnahmen in 2 Ebenen bewertet. Analog zur klinischen Situation wurde dafür die Anzahl überbrückter Kortices gezählt wurde (Tabelle 7 und Tabelle 8). Als geheilt zählte eine Fraktur, wenn mindestens 3 überbrückte Kortices detektiert werden konnten.

An Tag 24 wurden die meisten Überbrückungen in der WT-Gruppe mit Mischdiät gezählt (Tabelle 9). Auf 10 Frakturen normiert galten rund 7 Frakturen als geheilt, im WT und der *Cckbr*-defizienten Gruppe mit Standardfutter waren es ca. 6. In den *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Calcium-Carbonat-Futter war dagegen nur jede dritte Fraktur geheilt. Auch nach 32 Tagen Standzeit konnten in dieser Gruppe nur rund 6 geheilte Frakturen von 10 (57 %) in den  $\mu$ CT-Aufnahmen gezählt werden. In den

anderen Gruppen waren nach gleicher Standzeit mindestens 86 % der Frakturen geheilt.

**Tabelle 7: Anzahl der Mäuse pro Gruppe mit 1, 2, 3 oder 4 überbrückten Kortices an Tag 24 im WT und in *Cckbr*<sup>-/-</sup> mit unterschiedlichen Diäten**

Gruppe	Futter	Anzahl überbrückter Kortices				
		0	1	2	3	4
WT	S	0	0	3	3	1
	M	0	1	1	3	1
<i>Cckbr</i> <sup>-/-</sup>	S	0	2	1	1	3
	C	0	2	3	2	0
	M	0	4	1	3	2

S, Standardfutter; C, Carbonatfutter; M, Mischfutter

**Tabelle 8: Anzahl der Mäuse pro Gruppe mit 1, 2, 3 oder 4 überbrückten Kortices an Tag 24 im WT und in *Cckbr*<sup>-/-</sup> mit unterschiedlichen Diäten**

Gruppe	Futter	Anzahl überbrückter Kortices				
		0	1	2	3	4
WT	S	0	0	1	2	7
	M	0	0	0	2	3
<i>Cckbr</i> <sup>-/-</sup>	S	1	0	0	1	5
	C	0	1	2	0	4
	M	0	0	1	2	5

S, Standardfutter; C, Carbonatfutter; M, Mischfutter

**Tabelle 9: Prozentuale Anzahl geheilter Knochen an Tag 24 und 32 im WT und in *Cckbr*<sup>-/-</sup> mit unterschiedlichen Diäten**

Gruppe	Futter	Anzahl der Frakturheilungen in %	
		Tag 24	Tag 32
WT	S	57	90
	M	67	100
<i>Cckbr</i> <sup>-/-</sup>	S	57	86
	C	29	57
	M	50	88

S, Standardfutter; C, Carbonatfutter; M, Mischfutter

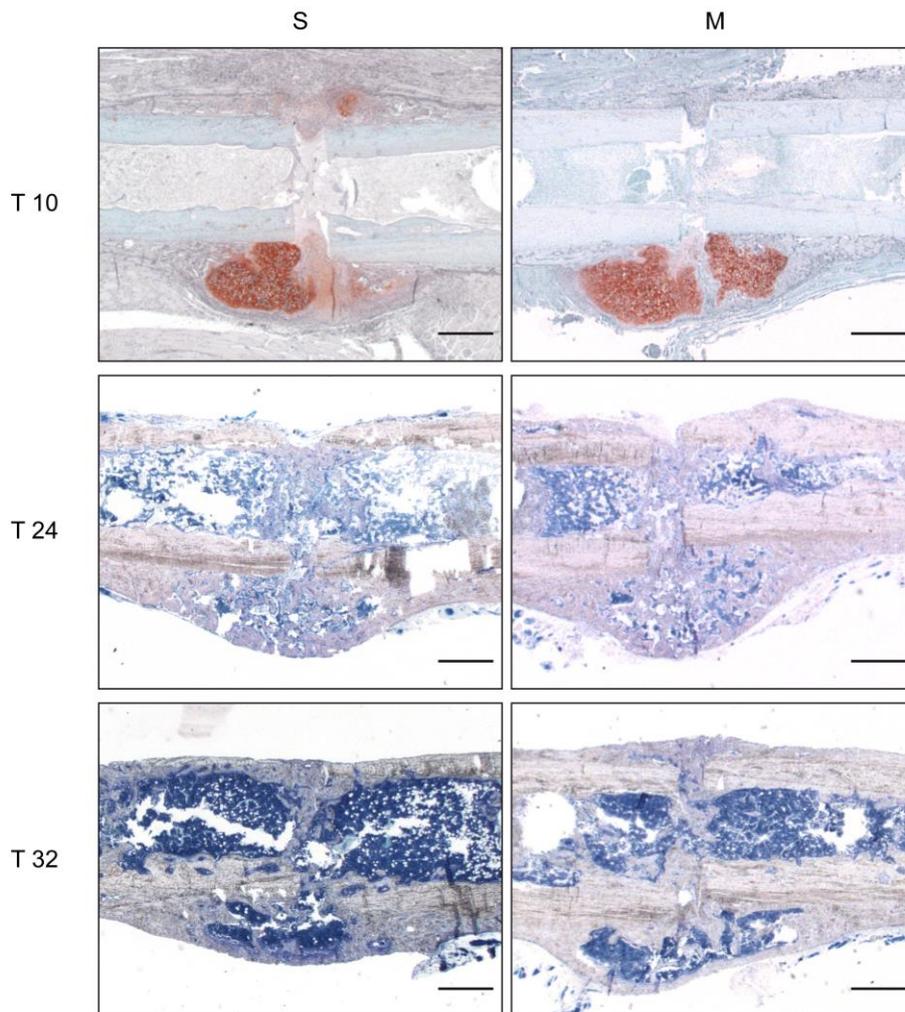
### 3.3. Histologische Gewebedifferenzierung

Die histologische Auswertung aller Gewebeanteile (Knochen, Knorpel, Bindegewebe) nach 10 Tagen Standzeit erfolgte sowohl innerhalb des Osteotomiespaltes endost- und periostal, als auch im periostalen Bereich auf Höhe der zwei inneren Pins. Für die Auswertung der Femora-Schnitte nach 24 und 32 Tagen Standzeit wurde nur der Osteotomiespalt peri- und endostal gewählt, da dort in der späten Phase der Frakturheilung Knochen gebildet wird. Im Vergleich zu den  $\mu$ CT-Auswertungen konnte in der quantitativen Auswertung der Gewebedifferenzierung auch wenig-mineralisierter Knochen beobachtet und ausgewertet werden, der in den  $\mu$ CT-Aufnahmen aufgrund des geringeren Grades der Mineralisation und des gesetzten Tresholdes nicht immer zu detektieren war. Insgesamt ergaben sich in der histologischen Auswertung wenig Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 18-20).

Nach 10 Tagen Standzeit wiesen die beiden WT-Gruppen im relativen Knochenanteil keine Unterschiede auf (Abbildung 18 und Abbildung 20, A). Im Vergleich zum WT mit Standardfutter konnte nur in der Carbonat-Gruppe ein signifikant ( $p = 0,027$ ) kleinerer Knochenanteil beobachtet werden. Die drei *Cckbr*-defizienten Gruppen unterschieden sich jedoch nicht untereinander.

Der Knorpelanteil im gesamten Frakturkallus wies 10 Tage post-op ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf, jedoch konnte ein Trend zu weniger Knorpel und mehr Bindegewebe in den *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Calcium-Carbonat-Futter beobachtet werden (Abbildung 19). Gegenüber der *Cckbr*-defizienten Gruppe mit Standardfutter mit durchschnittlich 19 % und der Mischfuttergruppe mit 17 % wies diese Gruppe nur anteilig 12 % Knorpel im Kallusgewebe auf.

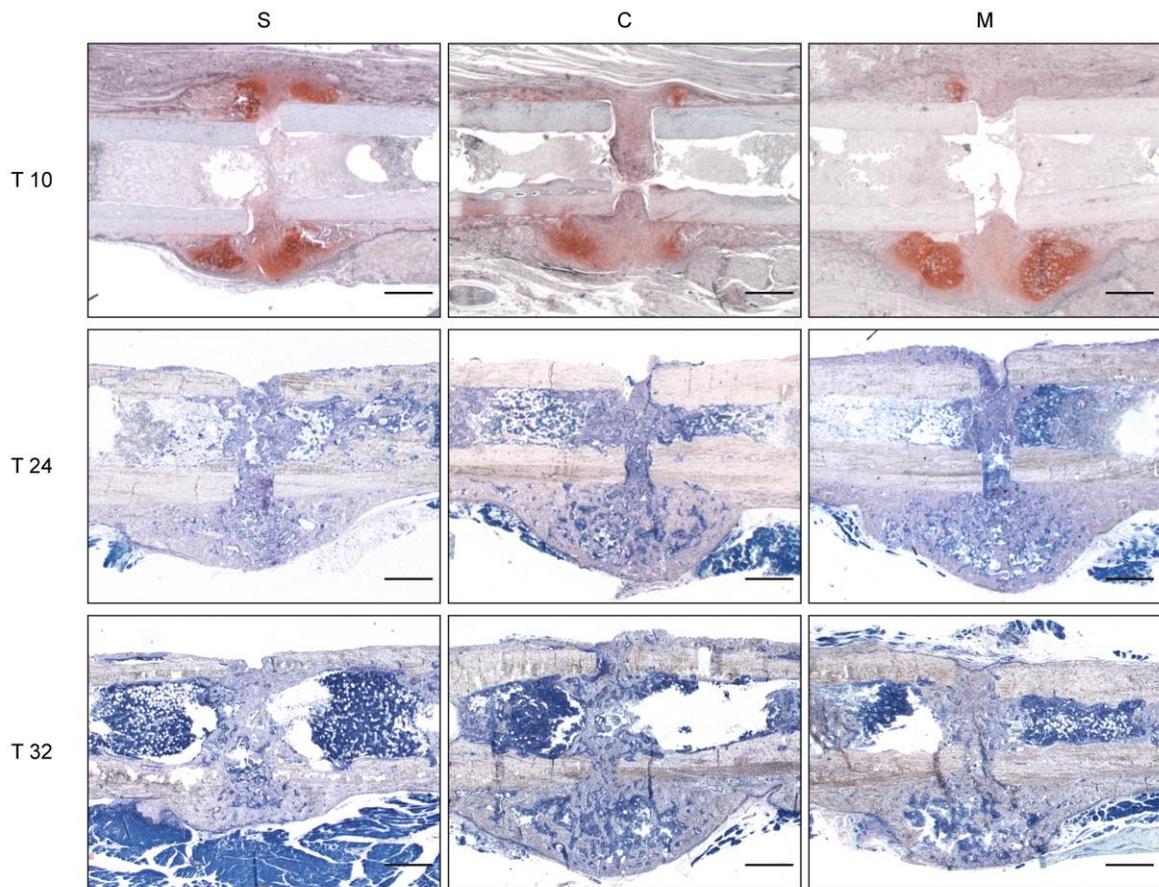
An Tag 24 zeigten sich im Frakturspalt ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen (Abbildung 18, Abbildung 19 und Abbildung 20, B). Der relative Knochenanteil lag in allen Gruppen im Mittel zwischen 36 % und 47 %, der Bindegewebeanteil entsprechend zwischen 53 % und 62 %. In den histologischen Schnitten konnte nur noch vereinzelt Knorpel detektiert werden, der an Tag 32 nicht mehr auftrat. An diesem Tötungszeitpunkt wurde ein signifikant ( $p = 0,014$ ) höherer Knochenanteil im WT mit Mischfutter (64 %) detektiert im Vergleich zum WT mit Standardfutter (48 %) (Abbildung 18 und Abbildung 20, C).



**Abbildung 18: Histologische Schnitte der osteotomierten Femora des WT mit Standard- und Mischfutter nach 10, 24 und 32 Tagen Standzeit**

In den histologischen Schnitten war nach 10 Tagen (*obere Reihe*, Safranin-O-Färbung) ein vergleichbarer Knorpelanteil (rot) im Kallus bei unterschiedlichem Futter zu erkennen. Der Spalt war noch deutlich erkennbar und mit Weichgewebe periostal überbrückt. An Tag 24 (*mittlere Reihe*, Giemsa-Färbung) und 32 (*untere Reihe*, Giemsa-Färbung) zeigten sich in beiden Gruppen knöcherne, unsymmetrische Kalli, die keinen Knorpel mehr aufwiesen. Der Spalt war fast vollständig mit neugebildetem Knochen überbrückt. Nach 32 Tagen Standzeit wurden die Kalli umgebaut und waren gegenüber Tag 24 deutlich kleiner.

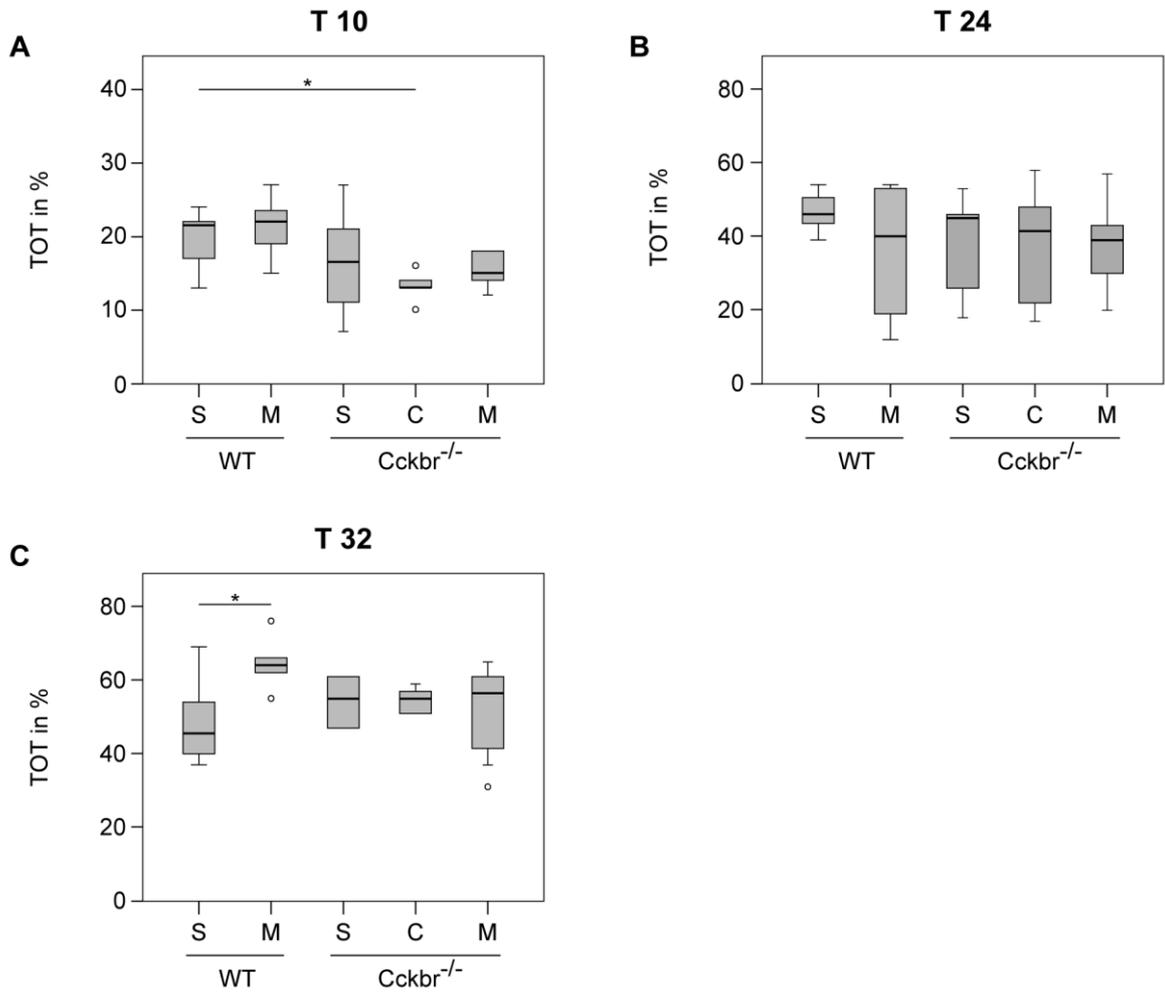
S, Standardfutter; M, Mischfutter; Messbalken: 500  $\mu$ m



**Abbildung 19: Histologische Schnitte der osteotomierten Femora der *Cckbr<sup>-/-</sup>* mit Standard-, Carbonat- und Mischfutter nach 10, 24 und 32 Tagen Standzeit**

Die Frakturkalli der transgenen Tiere wiesen an Tag 10 (*obere Reihe*, Safranin-O-Färbung) einen vergleichbaren Knorpelanteil auf. Nach 24 Tagen (*mittlere Reihe*, Giemsa-Färbung) zeigte sich der Trend eines etwas größeren Kallusvolumens in der Gruppe mit Mischfutter, der an Tag 32 nicht mehr zu beobachten war (*untere Reihe*, Giemsa-Färbung). Die Kalli der Mäuse mit Standardfutter wiesen 32 Tage post-op tendenziell einen kleineren Kallus auf.

S, Standardfutter; C; Carbonatfutter; M, Mischfutter; Messbalken: 500 µm



**Abbildung 20: Histologische Auswertung des relativen Knochenanteils im Frakturkallus nach 10 (A), 24 (B) und 32 (C) Tagen Standzeit**  
 S, Standardfutter; C, Carbonatfutter; M, Mischfutter

### 3.4. Calcium- und Parathormonkonzentration im Serum

Unmittelbar vor der Operation und den Tötungen 10, 24 und 32 Tage post-op wurde den Mäusen Blut abgenommen und der Calcium- und PTH-Spiegel im Serum gemessen.

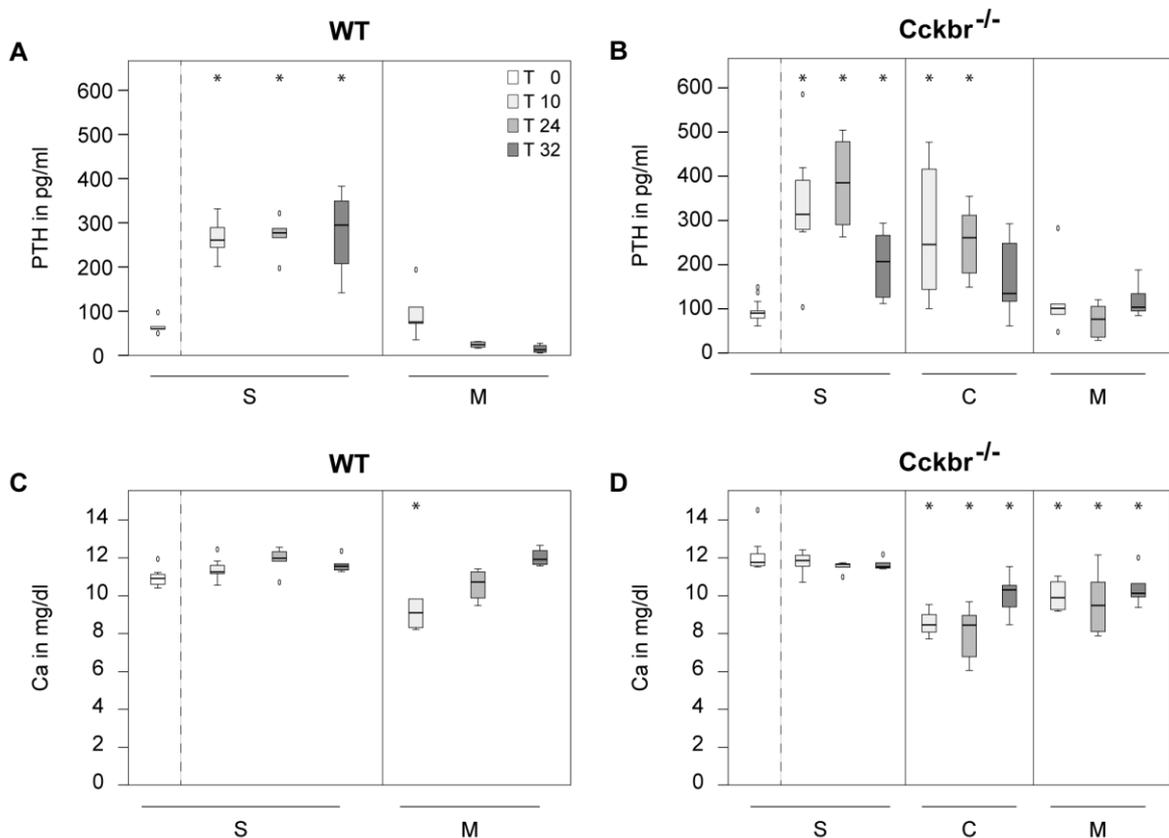
Verglichen mit dem WT wies die *Cckbr*-defiziente Maus mit Standardfutter vor der Operation einen 44 % höheren Basiswert in der PTH-Konzentration im Serum auf, der einen Hyperparathyreoidismus bestätigte. Auch der Serum-Calcium-Anteil war in der *Cckbr*-defizienten Maus signifikant um 11 % höher ( $p = 0,009$ ). Die Osteotomie führte in der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Maus und im WT zu deutlichen Veränderungen, die an Tag 10 detektiert werden konnten. Im WT wurde 10 Tage post-op im Vergleich zum Wert vor der Operation ein signifikant 4fach höherer PTH-Spiegel gemessen (Abbildung 21, A). Dieser Wert war sowohl 24, als auch 32 Tage post-op unverändert hoch. Der Calcium-Wert stieg dagegen an Tag 10 nur mäßig um 5 % an und erreichte höhere Werte an Tag 24 und 32 (+ 6 %, 11,65 mg/ml) (Abbildung 21, C). Erhielt der WT ab dem Tag der Operation eine Mischdiät, stieg der PTH-Wert an Tag 10 weniger stark an (Abbildung 21, A). Im Gegensatz zum WT mit Standardfutter konnte hier ein nicht-signifikant, nur 1,5fach erhöhter PTH-Spiegel verzeichnet werden. An Tag 24 und 32 zeigten sich dagegen deutlich geringere Werte verglichen mit dem Basiswert (- 63 % und - 78 %). Im Gegensatz zum WT mit Standardfutter lag der Serum-Calcium-Gehalt im WT nach Mischdiät-Fütterung an Tag 10 und 24 unter (- 17 % und - 4 %) dem Basiswert, an Tag 32 darüber (+ 10 %) (Abbildung 21, C).

Die Serum-PTH-Konzentration in der *Cckbr*-defizienten Maus mit Standardfutter stieg, wie im WT, nach 10 Tagen Heilungszeit signifikant um das 3,5-fache an und zeigte den höchsten Wert an Tag 24, während 32 Tage post-op wieder ein geringerer Wert zu detektieren war (Abbildung 21, B). Es wurde keine Veränderung des Calcium-Spiegels zum Basiswert gemessen (Abbildung 21, D).

Die mit Calcium-Carbonat gefütterten *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen 10 Tage nach Osteotomie ebenfalls einen signifikant höheren PTH-Wert (359,95 pg/ml) gegenüber dem Basiswert (95,01 pg/ml) auf (Abbildung 21, B). Innerhalb dieser Gruppe wiesen die Werte zwar eine große Streuung auf, zeigten jedoch klar einen Trend zu einer höheren PTH-Konzentration im Serum. Diese hohen Werte wurden auch nach 24 Tagen Standzeit gemessen, während an Tag 32 die PTH-Konzentration wieder niedriger, aber noch deutlich signifikant 83 % über dem

Basiswert lag. Der Calcium-Spiegel lag an Tag 10 und 24 in der Carbonat-Gruppe deutlich unterhalb (- 30 % und - 34 %) des Basiswertes, war aber an Tag 32 bei niedrigerem PTH-Wert wieder oberhalb dieser gemessenen, niedrigeren Werte zu verzeichnen (Abbildung 21, D).

In der *Cckbr*-defizienten Gruppe mit Mischfutter konnte nach Osteotomie an allen Tötungszeitpunkten keine Änderung der PTH-Konzentration im Serum im Vergleich zum Basiswert prä-op festgestellt werden (Abbildung 21, B). Es wurden ebenfalls konstante Calcium-Werte gemessen, die zwischen 15 % und 21 % unterhalb des Basiswertes lagen (Abbildung 21, D).



**Abbildung 21: Parathormon- (A, C) und Calcium-Konzentration (B, D) im Serum des WT und der *Cckbr*-defizienten Mäuse prä-op (T 0), nach 10 (T 10), 24 (T 24) und 32 (T 32) Tagen Standzeit mit unterschiedlichem Futter**

S, Standardfutter; C, Carbonatfutter; M, Mischfutter; \* $p \leq 0,05$  im Vergleich zum Zeitpunkt T 0

## 4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Calcium-Supplementation in Form von Calcium-Carbonat und -Gluconat auf die Frakturheilung von 26 Wochen alten Mäusen mit einer Hypochlorhydrie untersucht, deren Femur osteotomiert und mit einem Fixateur externe stabilisiert wurde. Mittels diesem Modell sollte das klinische Bild eines Patienten mit Hypochlorhydrie-induzierter Osteoporose des Knochens simuliert werden, der eine akute Fraktur aufweist. Hierbei wurden auch die Auswirkungen der Calcium-Supplementation auf das nicht-osteotomierte, kontralaterale Femur analysiert. Es sollte untersucht werden, ob die Hypochlorhydrie und die damit verbundene eingeschränkte Calcium-Absorption Auswirkungen auf den intakten Knochen und die Frakturheilung haben und ob die Frakturheilung durch eine Calcium-Supplementation in Form von Carbonat und Gluconat beeinflusst werden kann.

### 4.1. Effekte der Cholezystokinin-B/Gastrin-Rezeptor-Defizienz und der Calcium-Supplementation auf den nicht-osteotomierten Knochen

#### 4.1.1. Effekte der Calcium-Malabsorption auf den nicht-osteotomierten Knochen: Vergleich der WT- und *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Standarddiät

Bereits 1937 wurden in einer Studie starke skelettale Deformationen und pathologische Frakturen an Hundewelpen detektiert, die gastrektomiert waren und deshalb eine Achlorhydrie aufwiesen [16]. Durch die fehlende Magensäure konnte das Calcium aus dem Futter nicht mehr vollständig aufgenommen und adäquat in die Knochen eingebaut werden. Die Tiere wiesen osteoporotische Knochen auf, die in Röntgenaufnahmen eine geringe Knochendichte, eine Abnahme der Trabekel und dünne Kortices zeigten. Ein erhöhter Knochenumbau und Knochenverlust konnten auch in klinischen Studien nachgewiesen werden, in denen Patienten ein Magenbypass gesetzt wurde (Bruno et al. 2010, Coates et al. 2004). Sowohl die präklinischen, als auch die klinischen Daten weisen auf die wichtige Funktion des Gastrointestinal-Traktes auf die Calciumaufnahme hin. Störungen der Calciumaufnahme können einen gravierenden Einfluss auf den Knochen haben.

In einer Studie an Mäusen mit einer Defizienz des Cholezystokinin-B/Gastrin-Rezeptors (*Cckbr*<sup>-/-</sup>) entwickelten die Tiere eine Hypochlorhydrie, die zu einem sekundären Hyperparathyreoidismus aufgrund eines Calcium-Mangels und damit zu einer erhöhten Knochenresorption führte [90]. Die Knochen der Tiere wiesen einen osteoporotischen Phänotyp auf, gekennzeichnet durch eine höhere Anzahl an knochenresorbierenden Osteoklasten, eine geringere Knochenformationsrate, Abnahme der trabekulären Dicke, kortikale Läsionen, geringere maximale Bruchkraft des Femurs, und durch eine erhöhte Menge an Knochenkollagen-spezifischen Abbauprodukten im Urin. Diese Effekte wiesen auf eine gestörte Calcium-Aufnahme über die Nahrung hin, was durch eine geringere Calcium- und eine gleichzeitig erhöhte PTH-Konzentration im Serum bestätigt werden konnte. Durch die Supplementation von Calcium-Gluconat über das Futter konnten diese negativen Effekte reduziert werden. Nach 52 Wochen Verabreichung eines Futters mit 0,8 % Gluconat konnte, im Vergleich zu einem Futter mit der selben Menge an Carbonat, ein signifikant niedriger PTH-Wert im Serum der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse gemessen werden, der nochmals durch die Erhöhung auf 2 % Gluconat deutlich reduziert werden konnte. Auch die Anzahl der Osteoklasten nahm mit der Gluconat-Diät signifikant ab und die maximale Bruchkraft der Femora signifikant zu. Schinke et al. konnten mittels dieser Studie nachweisen, dass Calcium-Gluconat im Vergleich zu -Carbonat bei Vorliegen einer beeinträchtigten Magensäureproduktion besser resorbiert werden kann und folglich auch eine gestörte Calcium-Aufnahme und osteoporotische Knochen verhindert werden können [90].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frakturheilung an *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Alter von 26 Wochen untersucht, die ab dem Tag der Osteotomie des Femurs weiterhin das Standardfutter, eine reine Calcium-Carbonat- oder eine Mischdiät in Form von Calcium-Gluconat und -Carbonat erhielten. Das kontralaterale, nicht-osteotomierte Femur der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Standardfutter wies im Vergleich zum WT nach 24 und 32 Tagen eine signifikant um 22 % und 13 % verminderte biomechanische Biegesteifigkeit auf. Trotz dieser Verringerung konnten jedoch keine Unterschiede zum WT in der Knochenmineraldichte (BMD) oder anderen  $\mu$ CT-Parametern festgestellt werden.

Die BMD gibt die Menge an Mineral pro Volumen Knochen an (Einheit: mg/cm<sup>3</sup>). Hydroxylapatit, die mineralische Hauptkomponente des Knochens, bedingt die

Steifigkeit und Druckfestigkeit des Knochens. Eine ausreichende Calcium-Absorption ist für die Mineralisierung des Knochens unerlässlich. Die Bestimmung der Mineraleichte des Knochens lässt jedoch keine Aussagen über die Verteilung des Minerals in dem definierten Volumen zu. So kann sie z.B. abnehmen ohne die Steifigkeit des Knochens zu beeinflussen [105]. Eine Erhöhung der BMD kann sogar die mechanischen Eigenschaften des Knochens verschlechtern. So führen z.B. Behandlungen mit Bisphosphonaten, die die Knochenresorption und damit auch den -umbau hemmen, zwar zu einem höheren Mineralisationsgrad, der die Steifigkeit des Knochens erhöht [62]. Durch die Akkumulation von Mikrorissen, die durch den fehlenden Umbau nicht mehr beseitigt werden können, werden die Knochen jedoch brüchiger, was wiederum das Frakturrisiko erhöht [62]. Ebenso weisen Knochen bei Vorliegen einer Osteopetrose, der sogenannten Marmorknochenkrankheit, eine pathologisch erhöhte BMD bedingt durch einen Osteoklastendefekt auf [103]. Die Steifigkeit ist zwar höher als in gesunden Knochen, jedoch ist Deformationsfähigkeit des Knochens signifikant reduziert [8], was das Frakturrisiko steigert.

In der vorliegenden Studie zeigten die nicht-osteotomierten Knochen der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse keine Unterschiede in der BMD zum WT nach 24 und 32 Tagen Standzeit. Ein vergleichbares Ergebnis zeigten auch klinische Studien, in denen die BMD von Patienten gemessen wurde, die PPIs einnahmen. Hier konnten ebenfalls keine bis nur mäßige Effekte auf die BMD detektiert werden [35, 100, 116]. Jedoch wurde trotz der unveränderten BMD ein höheres Frakturrisiko der Wirbelkörper, des Unterarmes und Handgelenks festgestellt [35, 116].

Der nicht-osteotomierte Knochen der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Standardfutter wies schlechtere biomechanische Eigenschaften auf, die durch die im  $\mu$ CT erhobenen Daten (BMD, Ct.Th, I<sub>x</sub>) nicht unmittelbar erklärt werden können. Sowohl die Ergebnisse der klinischen Studien, als auch die der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse könnten durch Veränderungen auf nanostruktureller Ebene bedingt sein.

#### **4.1.2 Effekte der Calcium-Gluconat-Diät auf den nicht-osteotomierten Knochen: Vergleich der WT-Mäuse mit Standard- und Mischdiät**

In der vorliegenden Arbeit führte die Verabreichung von Calcium-Gluconat im WT zu keiner signifikanten Veränderung der Biegesteifigkeit im nicht-osteotomierten

Knochen. Sowohl die 24tägige, als auch die 32tägige Fütterung hatte keine Effekte auf den Knochen, was auch durch die mikrotomographischen Analysen bestätigt werden konnte. Die kortikale Dicke war unverändert, allerdings konnte zunächst ein positiver Effekt von Calcium-Gluconat auf die BMD nach 24 Tagen festgestellt werden, der jedoch 32 Tage nach Studienbeginn nicht mehr zu verzeichnen war. Diese Ergebnisse lassen sich vermutlich durch die kurze Fütterungsdauer und den Phänotyp der Mäuse erklären. 129S6/SvEvTac zählen zu den Mausstämmen mit einer bereits hohen Knochenmineraldichte [5, 104] und Knochensteifigkeit [109], so dass vermutlich zusätzlich bereitstehendes Calcium nicht darüber hinaus in den Knochen eingelagert wird. Studien an Ratten mit verschiedenen Calcium-Konzentrationen im Futter konnten zeigen, dass sich nach Erreichen eines bestimmten Calcium-Plateaus keine weiteren Effekte auf die biomechanischen Eigenschaften des Knochens nachweisen lassen [49, 112]. Hunt et al. konnten an Urinproben der gesunden Tiere zeigen, dass eine hohe Calcium-Konzentration im Futter zu einer höheren Calcium-Exkretion über den Urin führte [49]. Dies könnte auch die fehlenden Effekte von Calcium-Gluconat auf den Knochen des WT erklären.

#### **4.1.3 Effekte der Calcium-Carbonat-Diät auf den nicht-osteotomierten Knochen: Vergleich der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Calcium-Carbonat-Diät mit Mäusen mit Standarddiät**

In der *Cckbr*-defizienten Maus mit einer Calcium-Carbonat-Supplementation konnte eine geringere Biegesteifigkeit des nicht-osteotomierten Femurs detektiert werden. Sie war signifikant 17 % geringer als die des WT an Tag 24 und wies 8 Tage später sogar einen signifikant 20 % kleineren Wert auf. Dies entsprach einer Verringerung von 14 % in der Carbonat-Gruppe innerhalb von 8 Tagen! Entgegen den Erwartungen zeigten sich jedoch 24 Tage nach Studienbeginn keine Unterschiede im Vergleich zu den *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Standardfutter. Da für das Knochenremodeling Calcium benötigt und eingebaut wird, aber das zur Verfügung stehende Calcium-Carbonat nachweislich eine schlechte Löslichkeit in neutralem Milieu aufweist [97, 108], wurde eine Beeinträchtigung des nicht-osteotomierten Knochens in diesen Tieren erwartet. Das Ausbleiben eines Effektes im Vergleich zur *Cckbr*-defizienten Gruppe mit Standardfutter kann aber durch die kurze

Fütterungsdauer von 24 und 32 Tagen bedingt sein. Alle Tiere erhielten bis zum Studienbeginn im Alter von 26 Wochen das Standardfutter, das die gleichen verfügbaren Anteile von Calcium-Carbonat und Calcium-Propionat und weiterhin 0,3 % Calcium aus pflanzlicher Quelle enthielt. Erst ab dem Tag der Osteotomie des Femurs wurden die Tiere auf die 1,6%ige Calcium-Carbonat-Diät gesetzt und spätestens nach 32 Tagen Standzeit getötet. In der Studie von Schinke et al. [90] wurden die Tiere jedoch erst nach 52 Wochen getötet und die Knochen analysiert. Im Vergleich zeigten die *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit 2 % Calcium-Carbonat zwar eine reduzierte kortikale Porosität des Femurs gegenüber der Gruppe mit nur 0,8 % Carbonat, jedoch konnten keine positiven Effekte auf die maximale Bruchkraft des Knochens beobachtet werden. Diese war in beiden Gruppen nahezu gleich und bestätigt die Ergebnisse der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Calcium-Carbonat-Futter in der vorliegenden Arbeit.

#### **4.1.4 Effekte der Calcium-Gluconat-Diät auf den nicht-osteotomierten Knochen: Vergleich der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Calcium-Gluconat-Diät mit Mäusen mit Standarddiät**

Gluconat im Futter der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigte nach 24 Tagen Fütterung, ebenso wie im WT, keinen Effekt auf die Biegesteifigkeit des nicht-osteotomierten Knochens. Diese war auch im Vergleich zu den *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Standard- und Carbonat-Futter nicht signifikant unterschiedlich. Alle *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse hatten eine signifikant, zwischen 17 % und 24 % schlechtere Biegesteifigkeit des nicht-osteotomierten Knochens nach 24 Tagen Standzeit im Vergleich zum WT. Dies war vermutlich einerseits durch die Hypochlorhydrie und den Calcium-Mangel bedingt, der zum Hyperparathyreoidismus und damit zu einer erhöhten Knochenresorption führte. Jedoch handelte es sich bei den nicht-osteotomierten Knochen um die kontralateralen Femora der osteotomierten Tiere. Ein systemischer Einfluss der Osteotomie auf das gesamte Skelett lässt sich nicht ausschließen. In einer Studie an Ratten und Kaninchen konnte gezeigt wurde, dass bei einer akuten Fraktur die Knochenresorption erhöht wurde, um Calcium für die Knochenheilung zur Verfügung zu stellen [56]. Gleichzeitig konnte im entsprechenden kontralateralen, nicht-frakturierten Knochen ein erhöhtes Calcium-Phosphat-Verhältnis als mögliche Konsequenz auf die

Calcium-Mobilisation gemessen werden [56]. Auch in der vorliegenden Arbeit könnte die Osteotomie einen systemischen Effekt auf den intakten Knochen verursacht haben, der sowohl in den *Cckbr*-defizienten Mäusen, als auch im WT zu einer Verminderung der Biegesteifigkeit führte. Unabhängig von diesem möglichen systemischen Effekt wiesen die *Cckbr*-defizienten Mäuse dennoch geringere Biegesteifigkeiten im nicht-osteotomierten Femur auf als der WT.

Wurde die Gluconat-Fütterung jedoch 8 Tage länger durchgeführt, konnte an Tag 32 eine höhere Biegesteifigkeit in den *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtet werden, die verglichen mit Tag 24 sogar um 26 % zunahm! Die Biegesteifigkeit entsprach der des WT und war signifikant höher im Vergleich zu *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Standard- oder Carbonat-Futter. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Einnahme von Calcium-Gluconat die Calcium-Malabsorption behoben und der Knochen positiv beeinflusst werden kann trotz des gleichzeitigen Vorliegens einer Fraktur. Die positive Wirkung konnte sogar nach einer kurzen Therapie von nur 32 Tagen erzielt werden und bestätigte die Vorteile einer Calcium-Gluconat- anstelle einer Calcium-Carbonat-Therapie bei Vorliegen einer Beeinträchtigung des Magens.

Zu diesem Ergebnis kam auch die Studie von Schinke et al. [90], die eine geringere maximale Bruchkraft des nicht-osteotomierten Femurs in *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachteten, die Calcium ausschließlich in Form von Carbonat über das Futter erhielten. Nur mit Calcium-Gluconat konnte dieser negative Effekt behoben und Werte vergleichbar mit denen des WT erzielt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen allerdings noch deutlicher die Effizienz der Gluconat-Therapie, da hier deutliche Effekte auf den Knochen bereits nach 32 Tagen Fütterungszeit erzielt werden konnten, wohingegen die Fütterung in der Studie von Schinke et al. über eine Dauer von 365 Tagen erfolgte.

Die positive Auswirkung von Gluconat auf die Biegesteifigkeit des nicht-osteotomierten Knochens lässt sich nicht durch eine Erhöhung der BMD erklären, da hier keine signifikanten Unterschiede zu beobachten waren. Die Belastbarkeit des Knochens ist jedoch nicht nur definiert durch die Materialeigenschaften wie die BMD, sondern auch durch die Geometrie des Knochens. Er wird belastbarer durch 3 Möglichkeiten [105]:

- 1) Die Erhöhung der Knochenmasse, da größere Knochen höheren Belastungen besser standhalten.

- 2) Eine Verteilung der Knochenmasse an stark belasteten Stellen.
- 3) Eine Verbesserung der Materialeigenschaften des Knochengewebes.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Erhöhung der Biegesteifigkeit durch die Calcium-Gluconat-Diät war nicht durch die Veränderung der Größe oder Geometrie bedingt, wie die  $\mu$ CT-Ergebnisse zeigten. Sie musste demnach durch die Verbesserung der Materialeigenschaften des Knochens auf mikro- und nanostruktureller Ebene bedingt sein.

Eine wichtige Rolle in der Belastbarkeit des Knochens spielt neben der mineralischen Komponente Hydroxylapatit auch die organische Matrix, die hauptsächlich aus Kollagen Typ I besteht. Das Kollagen bedingt die elastische Komponente des Knochens. Die Fasern bestehen aus 100  $\mu$ m dicken Fibrillen, die zu Tripel-Helices (zwei  $\alpha$ 1- und eine  $\alpha$ 2-Polypeptidkette) angeordnet sind [33]. Zwischen den Fasern sind ca. 2-4 nm große Mineralpartikel eingelagert. In einer Studie an Ratten denen die Schilddrüse, Nebenschilddrüsen und die Nieren entfernt wurden, die jedoch durch PTH-Injektionen keinen Hyperparathyreodismus aufwiesen, konnte eine Umstrukturierung der Kortikalis nachgewiesen werden [52]. Die kortikale BMD, Calcium- und Vitamin-D<sub>3</sub>-Konzentration und der spongiösen Knochen blieben unverändert. Es wurde mehr Carbonat zwischen die Kollagenfasern eingebaut als Phosphat. Die Folge waren verschlechterte biomechanische Eigenschaften des Knochens. Sowohl diese, als auch die Daten aus der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Mikro- und Nanostruktur des Knochens die Belastbarkeit des Knochens beeinflusst. Somit könnte die erhöhte Biegesteifigkeit des nicht-osteotomierten Knochens der *Cckbr*-defizienten Mäuse mit Gluconat-Futter durch eine veränderte Nanoarchitektur des Knochens bedingt sein.

#### **4.2. Effekte der Calcium-Malabsorption auf die Serum-Calcium- und Serum-PTH-Konzentration**

Um die Auswirkungen der Calcium-Malabsorption auf die Calcium- und PTH-Konzentration im Serum quantifizieren zu können, wurden den Mäusen kurz vor der Operation Blut entnommen.

Die Beeinträchtigung der Magensäureproduktion in der *Cckbr*-defizienten Maus führte im Vergleich zum WT zu einer 44 % höheren PTH-Konzentration, was die

Ergebnisse von Schinke et al. [90] bestätigte. Ein vergleichbarer Effekt wurde auch in einer klinischen Studie aufgezeigt, in der die tägliche Einnahme von 20 mg Omeprazol über einen Zeitraum von 8 Wochen untersucht wurde. Die Konzentration von PTH im Serum der Probanden war deutlich erhöht. Es konnte eine verminderte Calcium-Exkretion über den Urin nachgewiesen werden, wohingegen die Konzentration an Knochenresorptionsmarkern TRAP (Tartrat resistente saure Phosphatase) und ALP (alkalischer Phosphatase) im Serum signifikant zunahm [66]. Jedoch wurden im Vergleich zur Placebo-Gruppe keine Veränderungen im Serum-Calcium-Spiegel detektiert. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikant erhöhte Calcium-Konzentration in der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Maus im Vergleich zum WT gemessen werden. Im WT entsprach die Messung der Serum-Calcium-Konzentration mit 10,95 mg/ml dem vom Lieferanten Taconic ermittelten Wert für weibliche Mäuse, wohingegen der Calcium-Wert der *Cckbr*-defizienten Mäuse um 1,25 mg/ml darüber lag. Dieser Erhöhung um 11 % können zwei mögliche Ursachen zugrunde liegen. Die Tiere wurden mit einer Cholezystokinin-B/Gastrin-Rezeptor-Defizienz geboren und wiesen einen sekundären Hyperparathyreoidismus zum Zeitpunkt des Studienbeginns im Alter von 26 Wochen auf, so dass eine erhöhte Serum-Calcium-Konzentration durchaus plausibel erscheint. Die stetig hohe PTH-Konzentration stimulierte die Osteoklastenaktivität, was eine erhöhte Knochenresorption zur Folge hatte. Während des Abbaus wurde Calcium aus dem Knochen in den Blutkreislauf freigesetzt. Die zweite mögliche Ursache für den erhöhten Serum-Calcium-Wert lässt sich durch die Anpassungsfähigkeiten der Maus bei Nahrungsknappheit erklären. Bei Mäusen wird der Bedarf an verfügbarem Calcium im Futter auf 0,5 % geschätzt, so dass im Futter meist mindestens 1 % Calcium enthalten ist, wie beim hier gewählten Standardfutter. Im Gegensatz zu Ratten können Mäuse jedoch bei einem Calcium-Mangel die Konzentration von Calcium-bindenden Proteinen im Duodenum erhöhen, um die Absorptionsrate zu erhöhen [79, 107]. Die vorliegende Studie wurde an *Cckbr*-defizienten Tiere im Alter von 26 Wochen durchgeführt. Der sich von Geburt bis zum Alter von 26 Wochen entwickelnde Calcium-Mangel führte zu einer Erhöhung der Calcium-Absorptionsrate und einer erhöhten PTH-Konzentration im Serum. Dies führte zu einer erhöhten Calcium-Konzentration im Serum der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse. In der Studie von Schinke et al. [90] wurde die Serum-Calcium-Konzentration in 2 Wochen alten Mäuse

gemessen. Die 2 Wochen alten *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen eine signifikant geringere Calcium-Konzentration gegenüber dem WT auf [90]. Das unterschiedliche Alter könnte eine Erklärung für die Diskrepanz der Serum-Calcium-Ergebnisse zwischen der vorliegenden Studie und der von Schinke et al. sein. Wegen dem jungen Alter ist es möglich, dass der Effekt des erhöhten PTH-Wertes auf die Calcium-Konzentration noch nicht auftrat.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass eine Calcium-Malabsorption zu einem Hyperparathyreoidismus führte, wodurch der Calcium-Gehalt im Serum konstant gehalten wurde und keine Hypokalzämie auftrat. Im Vergleich zum WT lag hier durch die erhöhte Knochenresorption eine höhere Serum-Calcium-Konzentration vor. Die Mobilisation von Calcium aus dem Skelett der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse führte jedoch zu einer Verschlechterung der Biegesteifigkeit des nicht-osteotomierten Knochens. Diese war 24 Tage nach Studienbeginn in der *Cckbr*-defizienten Gruppe mit Standardfutter um 22 % geringer als im WT.

### **4.3. Effekte der Osteotomie auf die PTH- und Calcium-Konzentration im Serum**

Sowohl kurz vor Operation, als auch vor Tötung der Mäuse nach 10, 24 und 32 Tagen Standzeit wurden Serumproben für die Bestimmung der PTH- und Calcium-Konzentration genommen. Hierdurch sollten einerseits die Auswirkungen einer Osteotomie, als auch der Einfluss einer Calcium-Supplementation während der Heilungszeit untersucht werden.

#### **4.3.1. Effekte der Osteotomie auf die PTH- und Calcium-Konzentration: Vergleich der *Cckbr*<sup>-/-</sup>- und WT-Mäuse mit Standarddiät**

An Tag 10 post-op war die PTH-Konzentration sowohl im WT, als auch in der *Cckbr*-defizienten Maus mit Standardfutter signifikant um das ca. 4-fache erhöht im Vergleich zu den präoperativen Werten. Die Calcium-Konzentration im Serum änderte sich dagegen im WT und *Cckbr*<sup>-/-</sup> mit Standardfutter im Verlauf der Heilungszeit nicht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Osteotomie die Serum-PTH-Konzentration erhöhte. Der Effekt scheint unabhängig davon aufzutreten, wie hoch die PTH-Konzentration vor der Osteotomie war, denn sowohl im WT, als auch in der defizienten Maus wurde ein signifikant höherer

Wert gemessen im Vergleich zu den Basiswerten prä-op. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch in einer Studie an frakturierten Hunden aufgezeigt werden, in der die PTH-Konzentration 10 und 20 Tage post-op signifikant erhöht war [64]. Erst nach der Bildung eines überbrückenden Frakturkallus nach 20 Tagen Heilungszeit war der Wert wieder geringer, lag jedoch immer noch signifikant über dem gemessenen Wert vor der Fraktur. Auch eine klinische Studie, in der PTH im Serum von Patienten direkt nach Fraktur gemessen wurde, konnte eine erhöhte PTH-Konzentration nachweisen [39]. Diese nahm im Verlauf der Frakturheilung ab und erreichte den niedrigsten Wert bei einer gleichzeitigen Normalisierung der Calcium-Konzentration.

Auch nach 24 und 32 Tagen Heilungszeit war im WT und den *Cckbr*-defizienten Mäusen mit Standardfutter der PTH-Wert noch erhöht, wobei bei Vorliegen einer Calcium-Malabsorption in den *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen die Konzentration höher war als im WT. Dies deutet darauf hin, dass in diesen Tieren der erhöhte Calcium-Bedarf für die Frakturheilung vermehrt aus der Resorption von Knochen bereitgestellt wurde. Die Calcium-Konzentration in beiden Gruppen war über die gesamte Heilungszeit unverändert. Die im Vergleich zum WT erhöhten Calcium-Werte in der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Maus bei gleichzeitig hoher PTH-Konzentration lassen jedoch auf einen Calcium-Mangel schließen.

#### **4.3.2 Effekte der Osteotomie auf die PTH- und Calcium-Konzentration: Vergleich der WT-Mäuse mit Standard- und Mischdiät**

Calcium-Gluconat im Futter des WT führte nach 10 Tagen zu einer nur moderat 1,5fach erhöhten PTH-Konzentration im Serum. Im Vergleich zum Basiswert konnten an Tag 24 und 32 deutlich verminderte Konzentrationen beobachtet werden (- 63 % und - 88 %). Diese Ergebnisse zeigen, dass im Gegensatz zum WT mit Standardfutter, die Osteotomie keine signifikante Erhöhung der PTH-Konzentration zur Folge hatte, wenn Calcium-Gluconat verabreicht wurde.

Die Calcium-Konzentration lag an Tag 10 unterhalb des Basiswertes, stieg aber im Verlauf der Fütterungszeit an und wies 32 Tage post-op einen höheren Wert wie zu Beginn der Studie auf (+ 10 %).

Serumanalysen in einer Studie an Ratten mit einer diaphysären Tibiafraktur wiesen im Vergleich mit nicht-frakturierten Ratten ebenfalls eine erniedrigte

Calcium-Konzentration kurz nach Fraktur auf, jedoch wurde hier der PTH-Wert nicht zusätzlich gemessen [58]. In einer klinischen Studie wurden Serumanalysen an Patienten mit einer akuten Tibiafraktur durchgeführt [39]. Die Blutproben wurden kurz nach Fraktur und innerhalb der folgenden 3 Monate nach Fraktur genommen. Kurz nach Fraktur war die PTH-Konzentration erhöht und Calcium erniedrigt. Wie in den WT-Mäusen in der vorliegenden Arbeit nahm auch in der klinischen Studie die PTH-Konzentration im Verlauf der 7 wöchigen Heilungszeit ab und Calcium wieder zu [39]. Eine weitere klinische Studie an Patienten mit einer Röhrenknochen-, Becken- oder Wirbelkörperfraktur konnte ebenfalls diese Effekte im Serum nachweisen [65].

Im WT konnte mit der Calcium-Gluconat-Supplementation eine Erhöhung der PTH-Konzentration verhindert und gleichzeitig ein Anstieg der Calcium-Konzentration im Serum erzielt werden. Im Gegensatz hierzu führte die Standarddiät zu einer konstant hohen PTH-Konzentration nach der Osteotomie, um den erhöhten Calcium-Bedarf während der Frakturheilung zu gewährleisten. Dies konnte durch die konstante Calcium-Konzentration betätigt werden. Die Serumergebnisse des WT mit Calcium-Gluconat zeigen dagegen eine Calcium-Versorgung über das zugeführte Calcium-Gluconat.

#### **4.3.3 Effekte der Osteotomie auf die PTH- und Calcium-Konzentration: Vergleich der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Standard- und Calcium-Carbonat-Diät**

Die Supplementation von Calcium-Carbonat führte ebenso wie das Standardfutter zu einem ca. 4-fach höherem PTH-Wert im Serum 10 Tage post-op. Auch an Tag 24 und 32 war der Wert noch signifikant erhöht. Calcium wies dagegen 10 und 24 Tage nach Fraktur einen um 30 % und 34 % niedrigeren Wert auf im Vergleich zum prä-operativen Wert. Dies weist auf einen deutlichen Calcium-Mangel hin. Da für die Bildung des Frakturkallus' vermehrt Calcium benötigt wird [56, 58] und in der frühen Phase der Knochenheilung die höchste Calcium-Einlagerung in den Kallus erfolgt [4], ist eine ausreichende Calcium-Aufnahme unerlässlich. Da bei *Cckbr*-defizienten Mäusen jedoch eine Hypochlorhydrie vorlag und Calcium-Carbonat nicht ausreichend über den Magen aufgenommen werden konnte [108], kam es aufgrund des erhöhten Calciumbedarf für die

Knochenheilung zu einem Abfall der Calcium-Konzentration. Dies führte wiederum zu erhöhten Serum-PTH-Werten.

Mit dem Beginn des Remodeling-Prozesses des Kallus' wird Calcium weniger eingebaut als zu Beginn der Kallusbildung [4], so dass an Tag 32 wieder eine höhere Calcium-Konzentration in der Carbonat-Gruppe detektiert werden konnte, die jedoch noch 18 % unter dem Basiswert prä-op lag. Gleichzeitig konnte eine geringere PTH-Konzentration beobachtet werden, die allerdings noch signifikant höher war als im Serum prä-op. Diese Daten weisen auf einen bestehenden Calcium-Mangel bei Calcium-Carbonat-Fütterung hin.

#### **4.3.4 Effekte der Osteotomie auf die PTH- und Calcium-Konzentration: Vergleich der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Standard- und Calcium-Gluconat-Diät**

Ebenso wie im WT führte Calcium-Gluconat in den osteotomierten *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen zu einer mäßig erhöhten (+ 1,3fach) PTH-Konzentration an Tag 10. Diese änderte sich im Verlauf der Fütterungsstudie nicht. Auch in der Calcium-Konzentration konnte ein konstanter Wert über den gesamten Fütterungszeitraum beobachtet werden, der unter dem präoperativem lag und dem Basiswert des WT entsprach.

Dieser positive Effekt von Calcium-Gluconat wurde bisher noch nicht in Patienten untersucht, die eine Fraktur aufweisen. Jedoch wurde in einer klinischen Studie die Auswirkungen eines mit Calcium-Citrat und Vitamin-D angereicherten Joghurts auf den intakten Knochen und auf die PTH-Konzentration von postmenopausalen Frauen untersucht [10]. Hierbei bekamen die Frauen täglich 2 Portionen mit jeweils 125 g Joghurt über eine Studiendauer von 8 Wochen. Alle Probandinnen wiesen vor der Studie eine gleichermaßen zu geringe Calcium-Aufnahme auf. Die PTH-Konzentration im Serum war mäßig erhöht, die Calcium-Menge im Blut hierdurch konstant gehalten, vergleichbar mit den *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen in der vorliegenden Arbeit. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit nicht-angereichertem Joghurt konnte eine signifikante Abnahme der PTH-Konzentration um rund 35 % beobachtet werden. Auch Knochenresorptionsmarker waren reduziert. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass, bedingt durch einen akuten Calcium-Mangel, die erhöhte PTH-Konzentration die Knochenresorption stimuliert. Mittels

ausreichendem, aufnahmefähigen Calcium kann PTH reduziert und normalisiert werden. Die Knochenresorption wird gehemmt und das Frakturrisiko vermindert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Osteotomie eine Auswirkung auf die PTH- und Calcium-Konzentration im Serum aller Mäuse hatte. Das Ausmaß des Effekts war abhängig von der zur Verfügung gestellten Form des Calciums im Futter. Es trat in allen Tieren ein erhöhter PTH-Wert auf. Bei Fütterung mit gut verfügbarem Calcium-Gluconat war PTH sowohl im WT, als auch in den *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen weniger stark erhöht. Die Fütterung mit Calcium-Gluconat in der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Maus führte zu einer Calcium-Konzentration, die sich nicht von der des WT mit Standardfutter unterschied.

#### **4.4. Effekte der Calcium-Malabsorption und Calcium-Supplementation auf den osteotomierten Knochen**

##### **4.4.1 Effekte der Calcium-Malabsorption auf die Frakturheilung: Vergleich der *Cckbr*<sup>-/-</sup>- und WT-Mäuse mit Standarddiät**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Femora der Mäuse osteotomiert und mittels Fixateur externe stabilisiert. Nach 10, 24 und 32 Tagen Heilungszeit wurden die Tiere euthanasiert und die Femora biomechanisch, mikrotomographisch und histologisch analysiert.

In der *Cckbr*-defizienten Maus mit Standardfutter zeigte die histomorphometrische Auswertung der Kalli keine Unterschiede im relativen Knochen-, Knorpel- und Weichgewebeanteil im Vergleich zum WT nach 10 Tagen Heilungszeit. An Tag 24 konnte eine signifikant geringere Biegesteifigkeit (- 38 %) im Vergleich zum WT beobachtet werden, die sich jedoch 32 Tage post-op nicht unterschied. Die histomorphometrische Auswertung wies keine Unterschiede im relativen Knochenanteil an Tag 24 und 32 im Vergleich zum WT auf. Diese Ergebnisse konnten auch durch die mikrotomographischen Bestimmungen der Knochenmineraldichte und des relativen Knochenanteils am Gesamtkallusvolumen nach 24 und 32 Tagen bestätigt werden. Beide Parameter stiegen wie erwartet im Verlauf der Frakturheilung an, jedoch zeigten sich auch hier zwischen dem WT und der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Gruppe mit Standardfutter keine Unterschiede.

Diese Ergebnisse zeigen eine weitgehend normale Knochenheilung trotz Vorliegen einer Hypochlorhydrie, wenn Calcium zur Verfügung stand. Der akute Calcium-Bedarf für die Knochenneubildung führte zu einer hohen PTH-Ausschüttung, die wiederum die Knochenresorptionsrate erhöhte, um Calcium aus dem Skelett zu mobilisieren. Tierexperimentelle [64] und klinische Studien [39, 118] konnten ebenfalls eine erhöhte PTH-Konzentration nach Fraktur nachweisen. Eine Studie an weiblichen Patientinnen mit Femurfraktur wies noch 1 Jahr nach Fraktur eine signifikant höhere PTH-Konzentration und einen signifikant erhöhten BMD-Verlust auf [118]. Dies könnte auch einen Grund für das erhöhte Risiko einer erneut auftretenden Fraktur darstellen. In einer Studie an postmenopausalen Frauen konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit nach einer Fraktur eine weitere zu erleiden um das 1,8fache erhöht ist; bei  $\geq 3$  aufgetretenen Frakturen sogar um das 4,8fache [34].

In der vorliegenden Studie war die Serum-Calcium-Konzentration während der Frakturheilung unverändert. Durch die Fütterung einer Diät mit Calcium aus unterschiedlichen Verbindungen (Carbonat, Propionat und pflanzliche Quellen) konnte zwar Calcium aufgenommen werden, jedoch nicht in ausreichender Menge. Über die erhöhte PTH-Konzentration wurde die benötigte Menge aus dem Skelett bereitgestellt. Die Aufnahmefähigkeit von Calcium ist daher entscheidend für die Knochenheilung und die Reduzierung des posttraumatischen Knochenmasseverlustes. Eine Beeinträchtigung des Intestinaltraktes kann die Calcium-Aufnahme stören und die Knochenheilung verschlechtern. In Ratten, die für 4 Tage Omeprazol verabreicht bekamen, konnte ein erhöhter Magen-pH-Wert und eine verminderte Calcium-Absorptionsrate festgestellt werden [21]. Das Calcium-Carbonat im Futter konnte nicht aufgenommen werden. In einer Studie an frakturierten Mäusen führte die Verabreichung von Omeprazol, ein PPI, zu einer verzögerten Frakturheilung [46]. Die Beeinträchtigung war vermutlich auf eine gestörte Calcium-Aufnahme zurückzuführen. Folglich ist für die Knochenheilung verfügbares Calcium unerlässlich. Es stellt eine mögliche Therapie für den Erhalt der Knochenmasse und der Reduzierung des Frakturrisikos dar. Da bekannt ist, dass die Calcium-Absorptionseffizienz im Alter abnimmt [42, 76] und bei Frauen über 40 Jahre pro Jahr zusätzlich 0,2 % weniger Calcium mit der Nahrung absorbiert wird [28], sollte gerade bei diesem Menschen-Kollektiv auf eine

ausreichende Calcium-Zufuhr geachtet werden, vorallem dann, wenn PPIs eingenommen werden.

#### **4.4.2 Effekte der Calcium-Supplementation auf die Frakturheilung: Vergleich der WT-Mäuse mit Calcium-Gluconat- und Standarddiät**

Die Fütterung der Calcium-Gluconat-Diät führte im WT nach 10 und 24 Tagen zu keiner Änderung im relativen Knochenanteil im Kallus. Nach 32 Tagen konnte ein signifikant erhöhter Anteil an Knochen im Vergleich zum WT mit Standardfutter beobachtet werden. In der mikrotomographischen Auswertung konnte dieser Effekt nicht bestätigt werden. Es zeigten sich keine Unterschiede im BV/TV 32 Tage post-op. Die BMD war allerdings an Tag 24 und 32 signifikant erhöht im WT mit Calcium-Gluconat (+ 5 % und + 33 %). Sowohl der erhöhte Knochenanteil, als auch die erhöhte BMD könnten zu der an Tag 32 verbesserten Biegesteifigkeit des osteotomierten Femurs des WT mit Calcium-Gluconat geführt haben. Die Biegesteifigkeit war signifikant um 71 % erhöht. Das Flächenträgheitsmoment in Biegerichtung war im WT mit Calcium-Gluconat-Diät bei gleichem Gesamtkallusvolumen ebenfalls signifikant erhöht (+ 298 %). Da die Geometrie des Kallus' entscheidend zur Biegesteifigkeit beiträgt, führte das erhöhte Flächenträgheitsmoment zu einer erhöhten Biegesteifigkeit.

Die Serum-PTH- und Calcium-Konzentration im WT mit Calcium-Gluconat-Diät weisen auf eine Aufnahme des Calciums während der Frakturheilung hin. Im Gegensatz zum WT mit Standardfutter war die PTH-Konzentration 10 Tage post-op nicht erhöht und lag nach 32 Tagen unterhalb des präoperativen Wertes. Während der Fütterungszeit stieg auch die Calcium-Konzentration und lag 32 Tage post-op über dem Basiswert.

Die Ergebnisse der Calcium-Gluconat-Fütterung im WT zeigen, dass Calcium-Gluconat die Frakturheilung in gesunden Mäusen verbessert. Nach 24 und 32 Tagen Heilungszeit konnte eine höhere Heilungsrate (67 % und 100 %) im Vergleich zum WT mit Standardfutter (57 % und 90 %) beobachtet werden. Eine verbesserte radiologische Heilungsrate wurde auch in einer Studie an ovariectomierten, frakturierten Ratten nachgewiesen, die eine Calcium-Laktat-Supplementation erhielten [94].

#### **4.4.3 Effekte der Calcium-Supplementation auf die Frakturheilung: Vergleich der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Calcium-Carbonat-Diät und mit Mäusen mit Standarddiät**

*Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Calcium-Carbonat-Fütterung wiesen nach 10 Tagen Heilungszeit signifikant weniger Knochen und Knorpel im Frakturkallus auf im Vergleich zum WT (- 35 % und - 30 %). Calcium ausschließlich in Form von Carbonat führte demnach zu einer verzögerten Knochenbildung in der frühen Heilungsphase. Dafür verantwortlich dürfte sein, dass Calcium-Carbonat bei Hypochlorhydrie schwer löslich und damit schlechter verfügbar ist [108].

Die Analyse der Serum-Calcium-Konzentration während der Frakturheilung bestätigte diese Annahme. Nach 10 Tagen Standzeit wiesen die Mäuse mit der Carbonat-Diät einen um 30 % niedrigeren Calcium-Wert im Serum auf im Vergleich zum prä-operativen Wert. Für die Mineralisierung des femoralen Frakturkallus wird vermehrt Calcium benötigt [56, 58], bei Ratten 0,72 mg Calcium pro Tag [4]. Der höchste Calciumbedarf besteht in den ersten Tagen der Frakturheilung, bei z.B. Ratten bis Tag 10 [4]. Erst nach Erreichen eines Spitzenwertes beginnt der Resorptionsprozess des Kallus', wobei zwar immer noch Calcium eingebaut wird, jedoch weniger als in der frühen Heilungsphase [4]. Damit wird eine adäquate Calcium-Versorgung für eine effiziente Frakturheilung deutlich. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit auch durch die Analyse der PTH-Konzentration bestätigt. Bei einer Reduzierung der Serum-Calcium-Konzentration stieg gleichzeitig der Wert für PTH, was wiederum die Knochenresorption erhöhte. Erst an Tag 32 konnte wieder ein höherer Calcium-Wert in der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Maus mit Calcium-Carbonat-Futter detektiert werden, der sich nur noch 18 % unter dem präoperativem Wert befand. Folglich lag auch der PTH-Spiegel wieder niedriger. Da sich der Kallus 32 Tage post-op bereits im Remodelings-Prozess befand und kein Calcium mehr benötigt wurde, erklärt dies den höheren Serum-Calcium-Anteil und die abfallende PTH-Konzentration.

Die Knochenbildung während der Frakturheilung wurde nur in der frühen (10 Tage post-op), aber nicht mehr in der späten Heilungsphase (24 und 32 Tage post-op) beeinflusst. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch eine Studie aufzeigen, in denen ovariectomierte (OVX), frakturierte Ratten ein Futter mit einem geringen Calcium-Anteil erhielten [74]. In der frühen Heilungsphase konnte im Kallus der nicht-OVX-Kontrolltiere mit Normalfutter bereits eine Woche post-op eine intramembranöse Ossifikation nachgewiesen werden, während in der

OVX-Gruppe mit Calcium-armer Diät hauptsächlich undifferenziertes fibröses Gewebe detektiert wurde. Endochondrale Ossifikation konnte dagegen nach 2 Wochen in beiden Gruppen nachgewiesen werden. Die OVX mit anschließender Calcium-armer Diät führte allerdings nach 3 Wochen zu geringeren biomechanischen Eigenschaften des Frakturkallus. Die Autoren der Studie führten dieses Ergebnis auf eine veränderte Mikro- und Nanostruktur zurück, wie z.B. einer veränderten Vernetzung der mineralischen und organischen Matrix während der Bildung in der frühen Heilungsphase [74].

Die Ergebnisse der kortikalen Überbrückung des Frakturspalts bestätigten die verzögerte Heilung in den *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Calcium-Carbonat-Diät. Hierbei zählten mindestens 3 überbrückte Kortices in 2 Ebenen der  $\mu$ CT-Aufnahmen als geheilte Fraktur. Diese Auswertungsmethode wird, wenn auch in etwas komplexerer Form, in der Klinik angewendet [19, 110].

An Tag 24 wiesen nur 29 % der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Calcium-Carbonat-Futter ein geheiltes Femur auf. Der Grund hierfür könnte die verzögerte Knochenbildung in der frühen Heilungsphase (Tag 10) sein. Nach 32 Tagen waren 57 % der Femora geheilt, während die WT- und *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Standard-Futter höhere Heilungsraten aufwiesen (90 % und 86 %). Sowohl die Biegesteifigkeit, als auch BV/TV waren 24 und 32 Tage post-op in den *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Calcium-Carbonat-Futter nicht verschlechtert. Allerdings überbrückte der neu-gebildete Knochen den Frakturspalt nicht vollständig.

Entgegen der Erwartungen führte die Fütterung von Calcium-Carbonat in *Cckbr*-defizienten Tieren zu keiner Verschlechterung der Biegesteifigkeit des Frakturkallus. Sowohl nach 24, als auch nach 32 Tagen Heilungszeit war die Biegesteifigkeit im Vergleich zum WT nicht signifikant verringert. Dieses Ergebnis konnte durch die mikrotomographische und histologische Auswertung bestätigt werden. Auch der Knochenanteil im Kallus war unverändert.

Ein Fazit dieses Ergebnisses könnte sein, dass die Supplementation von Calcium-Carbonat bei Vorliegen einer Hypochlorhydrie keine negativen Auswirkungen auf die Knochenheilung hat. Jedoch ist es entscheidend, sowohl die Ergebnisse des osteotomierten, als auch die des nicht-osteotomierten Knochens gemeinsam zu beachten.

Für die Frakturheilung wird Calcium benötigt, dass sowohl über die Nahrung, als auch über die Resorption von Knochen zur Verfügung gestellt wird [95]. Da in den

*Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Calcium-Carbonat-Diät das Calcium aus der Nahrung nicht mehr aufgenommen werden konnte, wurde demnach vermutlich Calcium für die Frakturheilung aus dem Skelett mobilisiert. Dadurch konnte zwar die Bildung eines mineralischen Kallus' gewährleistet werden, jedoch hatte dies auch Auswirkungen auf das nicht-osteotomierte, kontralaterale Femur. Dieses wies nach 32 Tagen eine 14 % geringere Steifigkeit auf als nach 24 Tagen Heilungszeit. Lemaire [58] konnte bereits 1966 in frakturierten Ratten, denen radioaktives Calcium verabreicht wurde, zeigen, dass der frakturierte Knochen mehr Calcium aufnimmt als der intakte Knochen. Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass bei Vorliegen einer akuten Fraktur die Knochenresorption signifikant erhöht und die Calcium-Balance beeinträchtigt war. Eine weitere Studie zeigte eine Erhöhung des Calcium-Phosphat-Verhältnisses im Skelett nach Fraktur, was auf eine posttraumatische Calcium-Mobilisation hinweist [56].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Hypochlorhydrie die Calcium-Carbonat-Diät die benötigte Calciummenge für die Frakturheilung nicht bereitstellen kann. Durch die Calciummobilisation aus dem Skelett kam es zu einem posttraumatischen Knochenmasseverlust.

#### **4.4.4 Effekte der Calcium-Supplementation auf die Frakturheilung: Vergleich der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Calcium-Gluconat-Diät und mit Mäusen mit Standarddiät**

Die Fütterung von Calcium-Gluconat hatte keinen Einfluss auf die Frakturheilung in *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach 10 und 24 Tagen Heilungszeit. Im Vergleich zu WT- und *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Standarddiät war die PTH-Konzentration nach 10, 24 und 32 Tagen Calcium-Gluconat-Fütterung nicht signifikant erhöht. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die zur Frakturheilung benötigte Menge an Calcium durch Calcium-Gluconat im Futter gedeckt wurde. Da kein Calcium-Mangel vorlag, erfolgte auch kein PTH-Anstieg nach Osteotomie. Calcium musste nicht aus dem Skelett mobilisiert werden. Sogar das Gegenteil konnte in den *Cckbr*-defizienten Mäusen mit Calcium-Gluconat-Futter festgestellt werden. Die Biegesteifigkeit der nicht-osteotomierten Femora war an Tag 32 um 26 % höher als an Tag 24, die Biegesteifigkeit des osteotomierten Femurs sogar um 141 %. In den *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Calcium-Carbonat-Diät zeigte dagegen an

Tag 32 das nicht-osteotomierte Femur eine um 14 % niedrigere Biegesteifigkeit als an Tag 24, im osteotomierten Femur nur einen um 45 % höheren Wert. Es konnte somit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Lane et al. [56] gezeigt werden, dass für die Knochenheilung Calcium aus dem intakten Knochen mobilisiert und in den frakturierten Knochen eingebaut wird. Die Menge an Calcium, das aus dem Skelett mobilisiert wurde, hing davon ab, wieviel Calcium aus der aufgenommenen Nahrung zur Verfügung stand.

Da die Kallussteifigkeit sowohl von der Qualität des neugebildeten Gewebes, als auch von der Geometrie abhängt [3], wurde der Kallus im  $\mu$ CT analysiert. Das Gesamtvolumen des Kallus' der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Calcium-Gluconat-Fütterung einschließlich des Knochen-, Knorpel- und Bindegewebeanteils, unterschied sich nach 24 Tagen Standzeit nicht zum WT. Es zeichnete sich jedoch ein Trend zu einem größeren Gesamtkallusvolumen in der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Gruppe mit Calcium-Gluconat ab. Das Flächenträgheitsmoment in Biegerichtung war bei den *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Calcium-Gluconat-Futter signifikant größer im Vergleich zum WT und den *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Standardfutter.

Die Geometrie des Kallus' trägt bei gleichem Volumen und gleichem Knochenanteil entscheidend zur Biegesteifigkeit bei. In allen Gruppen, sowohl im WT als auch in *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen war der Kallus caudo-lateral größer als auf der gegenüberliegenden cranio-lateralen Seite. Dies ist vermutlich bedingt durch die Belastung des Femurs in der Maus. Hente et al. [44] konnte anhand frakturierter, mit einem Fixateur externe stabilisierten Tibiae von Schafen zeigen, dass vermehrt Knochen an der Stelle der höchsten Kompression gebildet wurde und dort der periostale Kallus größer war.

Somit könnte das, verglichen mit dem WT, um 2,7-fach höhere Flächenträgheitsmoment in den *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Calcium-Gluconat-Futter nach 32 Tagen entscheidend zur höheren Biegesteifigkeit beigetragen haben. Das Gleiche würde auf den WT mit Calcium-Gluconat-Futter zutreffen, der ebenfalls ein signifikant um 4-fach höheres Flächenträgheitsmoment aufwies und auch eine signifikante Biegesteifigkeit (+ 71 %) gegenüber dem WT mit Standardfutter. Zieht man man das über alle Gewebearten berechnete E-Modul (E<sub>app</sub>) heran, konnte die erhöhte Biegesteifigkeit auf das Flächenträgheitsmoment zurückgeführt werden. Die Materialeigenschaften des Kallusgewebes der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Calcium-Gluconat-Futter waren gegenüber dem WT mit Standardfutter nicht

verbessert. Damit war die Biegesteifigkeit durch die Geometrie des Kallusgewebes bedingt.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In den vergangenen Jahren wurden mehrere Studien veröffentlicht, die ein erhöhtes Frakturrisiko bei Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren (PPIs) nachweisen konnten. PPIs zählen zu den Medikamenten, die sehr häufig von älteren Menschen eingenommen werden, zu denen auch postmenopausale Frauen zählen. Diese nehmen bei Vorliegen eines Calcium-Mangels im Idealfall zusätzliches Calcium ein, um Osteoporose vorzubeugen und damit ihr Frakturrisiko zu senken. Die gängigsten oralen Calcium-Präparate enthalten Calcium in Form von Carbonat. Da PPIs den pH-Wert der Magensäure neutralisieren und damit die Löslichkeit von Calcium-Carbonat gehemmt wird, ist der Nutzen von supplementiertem Calcium-Carbonat nicht gewährleistet. Für die Knochenheilung wird ausreichend Calcium benötigt, was über die orale Aufnahme nicht zur Verfügung steht. Eine adäquate Heilung kann damit nicht erfolgen. Da die Frakturheilung bei Hypochlorhydrie bisher noch nicht ausreichend untersucht wurde, diente die vorliegende Arbeit der Analyse der Knochenheilung bei Calcium-Malabsorption. Dabei wurde auch die Auswirkung einer Calcium-Carbonat- und Calcium-Gluconat-Supplementation auf die Knochenheilung untersucht, da Calcium-Gluconat auch in neutraler Magensäure löslich ist.

Für die Untersuchung der Knochenheilung wurde das Femur der Cholezystokinin-B/Gastrin-Rezeptor-defizienten Maus (*Cckbr*<sup>-/-</sup>), die einen erhöhten Magen-pH-Wert aufwies, und des Wildtyps (WT) osteotomiert und mit einem Fixateur externe stabilisiert. Ab dem Tag der Operation erhielten die Tiere entweder weiterhin das Standardfutter, welches Calcium-Carbonat, -Propionat und Calcium aus pflanzlichen Quellen enthielt, 1,6%iges Calcium-Carbonat-Futter oder ein Mischfutter mit jeweils 0,8 % Calcium-Carbonat und -Gluconat. Nach 10, 24 und 32 Tagen wurden die Tiere euthanasiert.

Die Calcium-Malabsorption führte in den *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Standardfutter zu einer erhöhten Serum-PTH-Konzentration. Die Knochenheilung wies keine Verzögerung auf, jedoch war die Biegesteifigkeit des nicht-osteotomierten Knochens signifikant verringert. *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Calcium-Carbonat-Supplementation wiesen eine verzögerte Frakturheilung auf. Die Knochenneubildung im Kallus und die Anzahl geheilter Frakturen waren verringert. Der nicht-osteotomierte Knochen der Mäuse mit Calcium-Carbonat

zeigte eine signifikante Verschlechterung der Biegesteifigkeit. Die Serum-PTH-Konzentration war während der Frakturheilung signifikant erhöht, da Calcium aus dem Skelett mobilisiert und für die Knochenheilung bereitgestellt wurde. Die Fütterung von Calcium-Gluconat verbesserte die Frakturheilung sowohl in *Cckbr*<sup>-/-</sup>, als auch in WT-Mäusen. Sowohl das Flächenträgheitsmoment, als auch die Biegesteifigkeit waren in beiden Gruppen erhöht, die Serum-PTH-Konzentration deutlich erniedrigt. Auch die Biegesteifigkeit des nicht-osteotomierten Knochens der *Cckbr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Calcium-Gluconat war verbessert und erreichte Werte des WT.

Mit der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass

- 1) die Hypochlorhydrie-induzierte Calcium-Malabsorption keinen Einfluss auf die Frakturheilung hatte, wenn Calcium aus unterschiedlichen Quellen (Standardfutter) zur Verfügung stand. Die Malabsorption führte jedoch zu einer Beeinträchtigung des intakten Knochens.
- 2) die Supplementation von Calcium-Carbonat weder für den nicht-osteotomierten, noch für den osteotomierten Knochen ein Benefit darstellte, da es aufgrund der Hypochlorhydrie nicht aufgenommen werden konnte. Mittels Calcium-Gluconat konnte dagegen die Frakturheilung verbessert werden, sowohl bei physiologisch normalem (WT), als auch bei eher neutralem (*Cckbr*<sup>-/-</sup>) Magensäuremilieu und zeigte nach kurzer Fütterungszeit einen positiven Effekt auf den nicht-osteotomierten Knochen der *Cckbr*-defizienten Mäuse.

Der Wechsel von standardmäßig verabreichtem Calcium-Carbonat auf Calcium-Gluconat erscheint daher effektiv und sollte in einer klinischen Studie genauer untersucht werden. Gerade bei postmenopausalen Frauen mit erhöhtem Frakturrisiko, aber auch bei PPIs-einnehmenden Menschen könnte dies einen großen Vorteil gegenüber der standardmäßig angewendeten Calcium-Carbonat-Therapie darstellen.

## 6. Literatur

1. Aggarwal V, Seth A, Aneja S, Sharma B, Sonkar P, Singh S, Marwaha RK: Role of calcium deficiency in development of nutritional rickets in Indian children: a case control study. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 3461-3466 (2012)
2. Attie MF: Treatment of hypercalcemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 18: 807-828 (1989)
3. Augat P, Schorlemmer S: The role of cortical bone and its microstructure in bone strength. *Age Ageing* 35 Suppl 2: ii27-ii31 (2006)
4. Bauer GC: Rate of bone salt formation in a healing fracture determined in rats by means of radiocalcium. *Acta Orthop Scand* 23: 169-191 (1954)
5. Beamer WG, Donahue LR, Rosen CJ, Baylink DJ: Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice. *Bone* 18: 397-403 (1996)
6. Bischoff-Ferrari HA, Rees JR, Grau MV, Barry E, Gui J, Baron JA: Effect of calcium supplementation on fracture risk: a double-blind randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 87: 1945-1951 (2008)
7. Blair HC: How the osteoclast degrades bone. *Bioessays* 20: 837-846 (1998)
8. Bollerslev J, Mosekilde L, Nielsen HK, Mosekilde L: Biomechanical competence of iliac crest trabecular bone in autosomal dominant osteopetrosis type I. *Bone* 10: 159-164 (1989)
9. Bonewald LF: The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 26: 229-238 (2011)
10. Bonjour JP, Benoit V, Payen F, Kraenzlin M: Consumption of yogurts fortified in vitamin D and calcium reduces serum parathyroid hormone and markers of bone resorption: a double-blind randomized controlled trial in institutionalized elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 98: 2915-2921 (2013)
11. Boonen S, Bischoff-Ferrari HA, Cooper C, Lips P, Ljunggren O, Meunier PJ, Reginster JY: Addressing the musculoskeletal components of fracture risk with calcium and vitamin D: a review of the evidence. *Calcif Tissue Int* 78: 257-270 (2006)
12. Bouillon R, Carmeliet G, Boonen S: Ageing and calcium metabolism. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 11: 341-365 (1997)

13. Boyce BF, Xing L: Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 473: 139-146 (2008)
14. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL: Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-342 (2003)
15. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS: osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12: 1260-1268 (1998)
16. Bussabarger RA, Freeman S, Ivy AC: The Experimental Production of Severe Homogeneous Osteoporosis by Gastrectomy in Puppies. *Am J Physiol* 137-148 (1937)
17. Carmeliet G, Van Cromphaut S, Daci E, Maes C, Bouillon R: Disorders of calcium homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17: 529-546 (2003)
18. Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F, Brun J, Crouzet B, Arnaud S, Delmas PD, Meunier PJ: Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. *N Engl J Med* 327: 1637-1642 (1992)
19. Chiavaras MM, Bains S, Choudur H, Parasu N, Jacobson J, Ayeni O, Petrisor B, Chakraverty R, Sprague S, Bhandari M: The Radiographic Union Score for Hip (RUSH): the use of a checklist to evaluate hip fracture healing improves agreement between radiologists and orthopedic surgeons. *Skeletal Radiol* 42: 1079-1088 (2013)
20. Chiu HF, Huang YW, Chang CC, Yang CY: Use of proton pump inhibitors increased the risk of hip fracture: a population-based case-control study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 19: 1131-1136 (2010)
21. Chonan O, Takahashi R, Yasui H, Watanuki M: Effect of L-lactic acid on calcium absorption in rats fed omeprazole. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 44: 473-481 (1998)
22. Consensus Development Conference: Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 94: 646-650 (1993)
23. Cooper C, Campion G, Melton LJ, 3rd: Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos Int* 2: 285-289 (1992)

24. Dachverband Osteologie (DVO): DVO-Leitlinien 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen. *Osteologie* 18: 304-328 (2009)
25. Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA, Dallal GE: Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *N Engl J Med* 337: 670-676 (1997)
26. de Villiers TJ: Bone health and osteoporosis in postmenopausal women. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 23: 73-85 (2009)
27. Ellegaard M, Jorgensen NR, Schwarz P: Parathyroid hormone and bone healing. *Calcif Tissue Int* 87: 1-13 (2010)
28. Ensrud KE, Duong T, Cauley JA, Heaney RP, Wolf RL, Harris E, Cummings SR: Low fractional calcium absorption increases the risk for hip fracture in women with low calcium intake. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann Intern Med* 132: 345-353 (2000)
29. Eriksen EF: Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord* 11: 219-227 (2010)
30. Feng X, McDonald JM: Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol* 6: 121-145 (2011)
31. Fleisch H: Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res* 4: 30-34 (2002)
32. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): Human Vitamin and Mineral Requirements -Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand-. FAO Rome, S. 1-303 (2002)
33. Fratzl P, Gupta HS, Paschalis EP, Roschger P: Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone. *J Mater Chem* 14: 2115-2123 (2004)
34. Gehlbach S, Saag KG, Adachi JD, Hooven FH, Flahive J, Boonen S, Chapurlat RD, Compston JE, Cooper C, Diez-Perez A, Greenspan SL, LaCroix AZ, Netelenbos JC, Pfeilschifter J, Rossini M, Roux C, Sambrook PN, Silverman S, Siris ES, Watts NB, Lindsay R: Previous fractures at multiple sites increase the risk for subsequent fractures: the Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women. *J Bone Miner Res* 27: 645-653 (2012)

35. Gray SL, LaCroix AZ, Larson J, Robbins J, Cauley JA, Manson JE, Chen Z: Proton pump inhibitor use, hip fracture, and change in bone mineral density in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative. *Arch Intern Med* 170: 765-771 (2010)
36. Graziani G, Como G, Badalamenti S, Finazzi S, Malesci A, Gallieni M, Brancaccio D, Ponticelli C: Effect of gastric acid secretion on intestinal phosphate and calcium absorption in normal subjects. *Nephrol Dial Transplant* 10: 1376-1380 (1995)
37. Gueguen L, Pointillart A: The bioavailability of dietary calcium. *J Am Coll Nutr* 19: 119S-136S (2000)
38. Harada S, Rodan GA: Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423: 349-355 (2003)
39. Hardy JR, Conlan D, Hay S, Gregg PJ: Serum ionised calcium and its relationship to parathyroid hormone after tibial fracture. *J Bone Joint Surg Br* 75: 645-649 (1993)
40. Häussler B, Gothe H, Gol D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D: Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. *Osteoporos Int* 18: 77-84 (2007)
41. Hayman AR: Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity* 41: 218-223 (2008)
42. Heaney RP, Recker RR, Stegman MR, Moy AJ: Calcium absorption in women: relationships to calcium intake, estrogen status, and age. *J Bone Miner Res* 4: 469-475 (1989)
43. Heaney RP: The importance of calcium intake for lifelong skeletal health. *Calcif Tissue Int* 70: 70-73 (2002)
44. Hente R, Fuchtmeier B, Schlegel U, Ernstberger A, Perren SM: The influence of cyclic compression and distraction on the healing of experimental tibial fractures. *J Orthop Res* 22: 709-715 (2004)
45. Hintzpeter B, Mensink GB, Thierfelder W, Muller MJ, Scheidt-Nave C: Vitamin D status and health correlates among German adults. *Eur J Clin Nutr* 62: 1079-1089 (2008)
46. Histing T, Stenger D, Scheuer C, Metzger W, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD: Pantoprazole, a proton pump inhibitor, delays fracture healing in mice. *Calcif Tissue Int* 90: 507-514 (2012)

47. Holick MF, Matsuoka LY, Wortsman J: Age, vitamin D, and solar ultraviolet. *Lancet* 2: 1104-1105 (1989)
48. Hong EJ, Jeung EB: Biological significance of calbindin-D9k within duodenal epithelium. *Int J Mol Sci* 14: 23330-23340 (2013)
49. Hunt JR, Hunt CD, Zito CA, Idso JP, Johnson LK: Calcium requirements of growing rats based on bone mass, structure, or biomechanical strength are similar. *J Nutr* 138: 1462-1468 (2008)
50. IMS Health: Top 10 pharmaceutical products worldwide by sales in 2010 (in billion U.S. dollars). <http://www.statista.com/statistics/186635/top-10-pharmaceutical-products-worldwide-by-sales-2010/> (Zugriff: 24.04.2013)
51. Ireland P, Fordtran JS: Effect of dietary calcium and age on jejunal calcium absorption in humans studied by intestinal perfusion. *J Clin Invest* 52: 2672-2681 (1973)
52. Iwasaki Y, Kazama JJ, Yamato H, Fukagawa M: Changes in chemical composition of cortical bone associated with bone fragility in rat model with chronic kidney disease. *Bone* 48: 1260-1267 (2011)
53. Johnell O, Kanis J: Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 16 Suppl 2: S3-7 (2005)
54. Kanis JA: Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet* 359: 1929-1936 (2002)
55. Kassarijian Z, Russell RM: Hypochlorhydria: a factor in nutrition. *Annu Rev Nutr* 9: 271-285 (1989)
56. Lane JM, Betts F, Posner AS, Yue DW: Mineral parameters in early fracture repair. *J Bone Joint Surg Am* 66: 1289-1293 (1984)
57. Langhans N, Rindi G, Chiu M, Rehfeld JF, Ardman B, Beinborn M, Kopin AS: Abnormal gastric histology and decreased acid production in cholecystokinin-B/gastrin receptor-deficient mice. *Gastroenterology* 112: 280-286 (1997)
58. Lemaire RG: Calcium metabolism in fracture healing. An experimental kinetic study in rats, using Ca<sup>45</sup>. *J Bone Joint Surg Am* 48: 1156-1170 (1966)
59. Lips P: Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 22: 477-501 (2001)

60. MacLaughlin J, Holick MF: Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *J Clin Invest* 76: 1536-1538 (1985)
61. Manolagas SC: Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21: 115-137 (2000)
62. Mashiba T, Turner CH, Hirano T, Forwood MR, Johnston CC, Burr DB: Effects of suppressed bone turnover by bisphosphonates on microdamage accumulation and biomechanical properties in clinically relevant skeletal sites in beagles. *Bone* 28: 524-531 (2001)
63. McCormick CC: Passive diffusion does not play a major role in the absorption of dietary calcium in normal adults. *J Nutr* 132: 3428-3430 (2002)
64. Meller Y, Kestenbaum RS, Mozes M, Mozes G, Yagil R, Shany S: Mineral and endocrine metabolism during fracture healing in dogs. *Clin Orthop Relat Res* 289-295 (1984)
65. Meller Y, Shainkin-Kestenbaum R, Shany S, Zuilli I, Yankowitz N, Giat J, Konforti A, Torok G: Parathyroid hormone, calcitonin, and vitamin D metabolites during normal fracture healing in humans. A preliminary report. *Clin Orthop Relat Res* 238-245 (1984)
66. Mizunashi K, Furukawa Y, Katano K, Abe K: Effect of omeprazole, an inhibitor of H<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase, on bone resorption in humans. *Calcif Tissue Int* 53: 21-25 (1993)
67. Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, Pfeiffer AJ, Barnes GL, Einhorn TA, Gerstenfeld LC: Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone* 44: 335-344 (2009)
68. Mosekilde L: The effect of modelling and remodelling on human vertebral body architecture. *Technol Health Care* 6: 287-297 (1998)
69. Mullin JM, Gabello M, Murray LJ, Farrell CP, Bellows J, Wolov KR, Kearney KR, Rudolph D, Thornton JJ: Proton pump inhibitors: actions and reactions. *Drug Discov Today* 14: 647-660 (2009)
70. Nakamura K, Kurahashi N, Ishihara J, Inoue M, Tsugane S, Japan Public Health Centre-based Prospective Study G: Calcium intake and the 10-year incidence of self-reported vertebral fractures in women and men: the Japan

- Public Health Centre-based Prospective Study. *Br J Nutr* 101: 285-294 (2009)
71. Nakamura K, Saito T, Yoshihara A, Ishikawa M, Tsuchiya Y, Oshiki R, Kobayashi R, Maruyama K, Hyodo K, Nashimoto M, Tsugawa N, Okano T, Oyama M, Yamamoto M: Low calcium intake is associated with increased bone resorption in postmenopausal Japanese women: Yokogoshi Study. *Public Health Nutr* 12: 2366-2370 (2009)
  72. Nakamura K, Saito T, Kobayashi R, Oshiki R, Kitamura K, Oyama M, Narisawa S, Nashimoto M, Takahashi S, Takachi R: Effect of low-dose calcium supplements on bone loss in perimenopausal and postmenopausal Asian women: a randomized controlled trial. *J Bone Miner Res* 27: 2264-2270 (2012)
  73. Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, Mogi M, Nakamura H, Horiuchi H, Saito N, Hiraoka BY, Kobayashi Y, Takaoka K, Ozawa H, Miyazawa H, Takahashi N: Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology* 144: 5441-5449 (2003)
  74. Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, Swain M, Mason RS, Murrell GA, Diwan AD, Diamond T: Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone* 28: 80-86 (2001)
  75. Nordin BE: Calcium and osteoporosis. *Nutrition* 13: 664-686 (1997)
  76. Nordin BE, Need AG, Morris HA, O'Loughlin PD, Horowitz M: Effect of age on calcium absorption in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 80: 998-1002 (2004)
  77. O'Connell MB, Madden DM, Murray AM, Heaney RP, Kerzner LJ: Effects of proton pump inhibitors on calcium carbonate absorption in women: a randomized crossover trial. *Am J Med* 118: 778-781 (2005)
  78. Okonofua F, Gill DS, Alabi ZO, Thomas M, Bell JL, Dandona P: Rickets in Nigerian children: a consequence of calcium malnutrition. *Metabolism* 40: 209-213 (1991)
  79. Ornoy A, Wolinsky I, Guggenheim K: Structure of long bones of rats and mice fed a low calcium diet. *Calcif Tissue Res* 15: 71-76 (1974)
  80. Peacock M: Calcium metabolism in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 5 Suppl 1: S23-30 (2010)

81. Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC: Osteoporosis: now and the future. *Lancet* (2011)
82. Raisz LG: Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 115: 3318-3325 (2005)
83. Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ: Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res* 12: 6222s-6230s (2006)
84. Roughead EE, McGeechan K, Sayer GP: Bisphosphonate use and subsequent prescription of acid suppressants. *Br J Clin Pharmacol* 57: 813-816 (2004)
85. Roux C, Briot K, Gossec L, Kolta S, Blenk T, Felsenberg D, Reid DM, Eastell R, Gluer CC: Increase in vertebral fracture risk in postmenopausal women using omeprazole. *Calcif Tissue Int* 84: 13-19 (2009)
86. Russell RG, Espina B, Hulley P: Bone biology and the pathogenesis of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 18 Suppl 1: S3-10 (2006)
87. Russo CR, Lauretani F, Seeman E, Bartali B, Bandinelli S, Di Iorio A, Guralnik J, Ferrucci L: Structural adaptations to bone loss in aging men and women. *Bone* 38: 112-118 (2006)
88. Sachs G, Shin JM, Hunt R: Novel approaches to inhibition of gastric acid secretion. *Curr Gastroenterol Rep* 12: 437-447 (2010)
89. Sambrook P, Cooper C: Osteoporosis. *Lancet* 367: 2010-2018 (2006)
90. Schinke T, Schilling AF, Baranowsky A, Seitz S, Marshall RP, Linn T, Blaeker M, Huebner AK, Schulz A, Simon R, Gebauer M, Priemel M, Kornak U, Perkovic S, Barvencik F, Beil FT, Del Fattore A, Frattini A, Streichert T, Poeschel K, Villa A, Debatin KM, Rueger JM, Teti A, Zustin J, Sauter G, Amling M: Impaired gastric acidification negatively affects calcium homeostasis and bone mass. *Nat Med* 15: 674-681 (2009)
91. Seeman E: Evidence that calcium supplements reduce fracture risk is lacking. *Clin J Am Soc Nephrol* 5 Suppl 1: S3-11 (2010)
92. Shane E: 29. Hypercalcemia: Pathogenesis, Clinical Manifestations, Differential Diagnosis, and Management. In: Favus MJ (Hrsg) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 4. Aufl, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, S. 183-187 (1999)

93. Shi S, Klotz U: Proton pump inhibitors: an update of their clinical use and pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol* 64: 935-951 (2008)
94. Shuid AN, Mohamad S, Mohamed N, Fadzilah FM, Mokhtar SA, Abdullah S, Othman F, Suhaimi F, Muhammad N, Soelaiman IN: Effects of calcium supplements on fracture healing in a rat osteoporotic model. *J Orthop Res* 28: 1651-1656 (2010)
95. Singh LM, Rosa RJD, Dunphy JE: Mobilization of Calcium in Fractured Bones in Rats. *Surg Gynecol Obstetr* 126: 243-& (1968)
96. Sipponen P, Harkonen M: Hypochlorhydric stomach: a risk condition for calcium malabsorption and osteoporosis? *Scand J Gastroenterol* 45: 133-138 (2010)
97. Straub DA: Calcium supplementation in clinical practice: a review of forms, doses, and indications. *Nutr Clin Pract* 22: 286-296 (2007)
98. Targownik LE, Metge C, Roos L, Leung S: The prevalence of and the clinical and demographic characteristics associated with high-intensity proton pump inhibitor use. *Am J Gastroenterol* 102: 942-950 (2007)
99. Targownik LE, Lix LM, Metge CJ, Prior HJ, Leung S, Leslie WD: Use of proton pump inhibitors and risk of osteoporosis-related fractures. *Can Med Assoc J* 179: 319-326 (2008)
100. Targownik LE, Lix LM, Leung S, Leslie WD: Proton-pump inhibitor use is not associated with osteoporosis or accelerated bone mineral density loss. *Gastroenterology* 138: 896-904 (2010)
101. Teitelbaum SL, Ross FP: Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4: 638-649 (2003)
102. Thomson AB, Sauve MD, Kassam N, Kamitakahara H: Safety of the long-term use of proton pump inhibitors. *World J Gastroenterol* 16: 2323-2330 (2010)
103. Tolar J, Teitelbaum SL, Orchard PJ: Osteopetrosis. *N Engl J Med* 351: 2839-2849 (2004)
104. Tordoff MG, Bachmanov AA, Reed DR: Forty mouse strain survey of voluntary calcium intake, blood calcium, and bone mineral content. *Physiol Behav* 91: 632-643 (2007)
105. Turner CH: Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporos Int* 13: 97-104 (2002)

106. Väänänen HK, Laitala-Leinonen T: Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys* 473: 132-138 (2008)
107. Van Cromphaut SJ, Dewerchin M, Hoenderop JG, Stockmans I, Van Herck E, Kato S, Bindels RJ, Collen D, Carmeliet P, Bouillon R, Carmeliet G: Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13324-13329 (2001)
108. Weerapol Y, Cheewatanakornkool K, Sriamornsak P: Impact of Gastric pH and Dietary Fiber on Calcium Availability of Various Calcium Salts. *Silpakorn U Science & Tech J* 4: 15-23 (2010)
109. Wergedal JE, Sheng MH, Ackert-Bicknell CL, Beamer WG, Baylink DJ: Genetic variation in femur extrinsic strength in 29 different inbred strains of mice is dependent on variations in femur cross-sectional geometry and bone density. *Bone* 36: 111-122 (2005)
110. Whelan DB, Bhandari M, Stephen D, Kreder H, McKee MD, Zdero R, Schemitsch EH: Development of the radiographic union score for tibial fractures for the assessment of tibial fracture healing after intramedullary fixation. *J Trauma* 68: 629-632 (2010)
111. Woeckel VJ, Alves RD, Swagemakers SM, Eijken M, Chiba H, van der Eerden BC, van Leeuwen JP: 1 $\alpha$ ,25-(OH) $_2$ D $_3$  acts in the early phase of osteoblast differentiation to enhance mineralization via accelerated production of mature matrix vesicles. *J Cell Physiol* 225: 593-600 (2010)
112. Won JH, Fukuda S, Sato R, Naito Y: Bone histomorphometric changes due to differences in calcium intake under metabolic acidosis in rats. *J Vet Med Sci* 58: 611-616 (1996)
113. Wright MJ, Proctor DD, Insogna KL, Kerstetter JE: Proton pump-inhibiting drugs, calcium homeostasis, and bone health. *Nutr Rev* 66: 103-108 (2008)
114. Yang YX, Lewis JD, Epstein S, Metz DC: Long-term proton pump inhibitor therapy and risk of hip fracture. *J Am Med Assoc* 296: 2947-2953 (2006)
115. Yang YX, Metz DC: Safety of proton pump inhibitor exposure. *Gastroenterology* 139: 1115-1127 (2010)
116. Yu EW, Blackwell T, Ensrud KE, Hillier TA, Lane NE, Orwoll E, Bauer DC: Acid-suppressive medications and risk of bone loss and fracture in older adults. *Calcif Tissue Int* 83: 251-259 (2008)

117. Yu EW, Bauer SR, Bain PA, Bauer DC: Proton pump inhibitors and risk of fractures: a meta-analysis of 11 international studies. *Am J Med* 124: 519-526 (2011)
118. Yu-Yahiro JA, Michael RH, Dubin NH, Fox KM, Sachs M, Hawkes WG, Hebel JR, Zimmerman SI, Shapiro J, Magaziner J: Serum and urine markers of bone metabolism during the year after hip fracture. *J Am Geriatr Soc* 49: 877-883 (2001)

## **Danksagung**

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.