

Knochenmatrixanalyse des Wirbelkörpers L3 am senilen Rattenmodell der Osteoporose

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

vorgelegt von Ogbazghi, Mesel
aus Heidelberg

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfall-,
Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thaqif El Khassawna

Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Schäffler

Tag der Disputation: 19.12.2022

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	2
2.1	Funktionen und makroskopische Anatomie des Knochens.....	2
2.2	Mikroskopischer Aufbau des Knochens.....	4
2.2.1	Grundgerüst und extrazelluläre Matrix	4
2.2.2	Histologische Knochenarchitektur	4
2.3	Zelluläre Knochenbestandteile	6
2.3.1	Osteoprogenitorzellen und deren Differenzierungsprozess	6
2.3.2	Osteoblasten	7
2.3.3	Osteozyten.....	8
2.3.4	Osteoklasten	10
2.4	Knöcherne Umbauprozesse („Bone remodeling“)	11
2.5	Interzelluläre Wechselwirkungen in der Knochenmatrix.....	14
2.5.1	Wirkung von Osteoblasten auf Osteoklasten	14
2.5.2	Regulation der Osteoblasten durch Osteoklasten.....	15
2.5.3	Osteozyten als zentrale Regulatoren für Osteoblasten und Osteoklasten	16
2.6	Hormonelle Steuerung des Knochenmetabolismus.....	17
2.6.1	Parathormon (PTH).....	17
2.6.2	Calcitonin	19
2.6.3	Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol).....	19
2.6.4	Östrogen	20
2.7	Osteoporose und der Stellenwert Wirbelkörper-assoziiierter Frakturen	21
3	Hypothese und Zielsetzung	25
4	Material und Methoden	27
4.1	Versuchstiere	27
4.2	Studiendesign	27
4.3	Laborbedingungen und tiergerechte Haltung	29
4.4	Tierdiäten.....	29
4.5	Operationsablauf	29
4.5.1	Anästhesie	29
4.5.2	Bilaterale Ovariectomie und Scheinoperation	30
4.5.3	Postoperative Nachsorge und Versorgung	31

Inhaltsverzeichnis

4.5.4	Euthanasie und Probengewinnung	31
4.6	Herstellungsprozess von Knochenschnitten	32
4.7	Paraffinschnitt-Technik und Probeneinbettung	32
4.8	Histologische Färbemethoden	33
4.8.1	Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung	33
4.8.2	Movat-Pentachrom-Färbung	34
4.8.3	Silbernitrat-Färbung	35
4.9	Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP).....	35
4.10	Immunhistochemischer Nachweis von Osteocalcin.....	37
4.11	Fotomikroskopie.....	38
4.12	Knochenhistomorphometrie	39
4.12.1	Histomorphometrische Analyse der HE-Färbung	40
4.12.2	Histomorphometrische Analyse der Movat-Pentachrom-Färbung	42
4.12.3	Manuelle Untersuchung der Silbernitrat-Färbung	43
4.12.4	Manuelle Analyse der enzymhistochemischen TRAP-Färbung	43
4.12.5	Histomorphometrische Analyse der Osteocalcin-positiven Regionen	44
4.13	Statistische Analyse.....	45
5	Ergebnisse	47
5.1	Quantifizierung der Knochenflächen in den Behandlungsgruppen	47
5.2	Differenzierte Auswertung der Knochen-, Knorpel- und Osteoidflächen ...	48
5.3	Quantitative Analyse der Knochenmarkfläche in den Behandlungsgruppen	50
5.4	Osteozyten – Anzahl der Subtypen und Gesamtanzahl in den Behandlungsgruppen	51
5.5	Osteoklasten-Anzahl und -Aktivität in den Behandlungsgruppen	55
5.6	Nachweis von Osteocalcin in den Behandlungsgruppen	58
6	Diskussion	61
6.1	Katabole Effekte im Knochengewebe	62
6.2	Katabole Effekte auf die mineralisierte Knochen- und Knorpelmatrix	65
6.3	Anabole Effekte auf das Knochenmark- und Osteoidgewebe.....	67
6.4	Inhibitorische Effekte der Behandlungen auf die Osteozyten- Anzahl und -Funktion.....	70
6.5	Korrelation zwischen der Osteoporose und der Osteoklasten- Anzahl bzw. -Aktivität	74
6.6	Metabolische Folgen nach reduziertem Osteocalcin-Gehalt.....	77

Inhaltsverzeichnis

6.7	Limitationen der Studie	80
6.8	Schlussfolgerungen und Ausblick	81
7	Zusammenfassung	83
8	Summary	84
9	Abkürzungsverzeichnis	85
10	Abbildungsverzeichnis	87
11	Tabellenverzeichnis	89
12	Literaturverzeichnis	91
13	Anhang	117
13.1	Kontrolldiät und Multidefizienzdiät für Ratte und Maus	117
13.2	Protokoll der Paraformaldehyd-(PFA)-Fixierung nach Lillie	120
13.3	Protokoll zur Entkalkung von Knochenproben	121
13.4	Protokoll zur Herstellung von Paraffinschnitten	121
13.5	Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung	122
13.6	Protokoll der Movat-Pentachrom-Färbung	123
13.7	Protokoll der Silbernitrat-Färbung	125
13.8	Protokoll der Tartrat-resistenten-sauren-Phosphatase-(TRAP)-Färbung ...	126
13.9	Protokoll der Osteocalcin-Färbung	128
13.10	Protokoll der Histomorphometrie mit ImageJ	130
14	Ehrenwörtliche Erklärung	131
15	Danksagung	132

1 Einleitung

Die Osteoporose ist eine Erkrankung des Knochenstoffwechsels, die durch eine reduzierte Knochenmineraldichte (engl. bone mineral density, BMD) und eine gestörte Mikroarchitektur des Knochens charakterisiert ist [271]. Die resultierende erhöhte Frakturanfälligkeit betrifft vor allem Wirbelkörper, Oberschenkelhals, Radius, Humerus und Becken [73, 82]. Pathophysiologisch liegt der Erkrankung eine Imbalance im Knochenmetabolismus mit einem vermehrten Knochenabbau durch Osteoklasten und einem verminderten Knochenaufbau durch Osteoblasten zugrunde [70, 271]. Zentrale Einflussfaktoren für die Entstehung einer Osteoporose sind neben dem Östrogen-Mangel, der meist postmenopausale Frauen betrifft, auch der altersbedingte Knochenverlust, endokrine bzw. metabolische Auslöser (z. B. Vitamin D-Mangel, sekundärer Hyperparathyreoidismus) oder iatrogene Ursachen (z. B. systemische Dauertherapie mit Glukokortikoiden) [61, 271, 283]. Weiter können Risikofaktoren (z. B. Nikotin- oder Alkoholabusus, Immobilität, genetische Veranlagung) den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen [5, 298]. Osteoporose-assoziierte Frakturen bedeuten für Betroffene eine Beeinträchtigung des Alltags sowie den Verlust der Mobilität und führen aufgrund von Folgeerkrankungen zu einer erhöhten Mortalität [33, 51, 238, 239]. Durch die medizinische Versorgung von Osteoporose-Patienten ergeben sich für das deutsche Gesundheitssystem jährliche Kosten von ca. 786 Millionen Euro [36].

Aufgrund des demographischen Wandels wird eine Zunahme an Osteoporose-Patienten und osteoporotischer Frakturen prognostiziert [290]. Daher wird die Prävention in Zukunft einen noch höheren Stellenwert erhalten [289]. Die vorliegende Dissertation nutzt ein seniles Rattenmodell, das den osteoporotischen Knochenstatus des Menschen simuliert [343]. Der Fokus liegt auf dem dritten Lendenwirbel (L3), da Osteoporose-assoziierte Wirbelkörperfrakturen zu den häufigsten osteoporotischen Frakturen gehören [183]. Neben Veränderungen der mikrostrukturellen Knochenarchitektur werden auch Mineralisationsunterschiede der Knochenmatrix sowie die wechselseitige Interaktion der Knochenzellen analysiert. Zur Untersuchung des Einflusses der Osteoporose auf die Knochenstruktur und für die Entwicklung präventiver bzw. therapeutischer Maßnahmen ist die Ratte ein etabliertes Kleintiermodell [20, 232]. Versuche wurden jedoch meist mit Ratten im Jungalter durchgeführt [171]. Daher ist es ein weiteres Ziel dieser Studie, ein seniles Rattenmodell der Osteoporose zu etablieren.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Funktionen und makroskopische Anatomie des Knochens

Knorpel- und Knochengewebe gehören zu den Stützgeweben des Körpers [356]. Die charakteristische Eigenschaft des Knochengewebes – Druckfestigkeit bei gleichzeitiger Elastizität [31, 356] – beruht auf der Zusammensetzung und Struktur der Knochenmatrix. Der hohe Anteil an Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$) bedingt die Härte des Knochens; die Anordnung der Kollagen-Fibrillen sorgt für die Elastizität und Flexibilität [31, 356]. Zusammen mit Gelenken, Bändern und der Skelettmuskulatur bilden Knochen den Bewegungsapparat [17]. Weiter schützen Knochen sensible Organe (z. B. die Schädelknochen das Gehirn) [31]. Das rote Knochenmark spielt bei der Hämatopoese eine wichtige Rolle [17, 31, 356]. Mit einem Anteil von 99 % an dem im menschlichen Körper enthaltenen Kalzium ist der Knochen essentiell für die Regulierung der Kalzium-Homöostase [356]. Je nach Struktur lassen sich Geflechtknochen (primäre Knochen) und Lamellenknochen (sekundäre Knochen) unterscheiden [17]. Der Geflechtknochen dominiert im ersten Lebensjahr und in der Phase der Frakturheilung und Knochenbildung, der Lamellenknochen im Erwachsenenalter [31]. Charakteristischerweise tritt Lamellenknochen in zwei Ausprägungen auf. Bei der kompakten Form (Substantia corticalis) fehlen Spalträume, während die Substantia spongiosa aus schwammartigen bzw. trabekulären Knochenbälkchen besteht [31, 356]. Der kompakte Knochen kommt vornehmlich an der Außenseite der Knochen vor, spongiöser Knochen eher im Inneren. Die äußere bzw. innere Knochenoberfläche wird als Periost bzw. Endost bezeichnet [31].

Der Knochenaufbau wird am Beispiel des Femurs dargestellt (Abb. 1). Die beiden aus spongiösem Knochen bestehenden Gelenkendigungen (Epiphysen), die mit dem Gelenkknorpel die Gelenkfläche bilden, sind über einen Knochenschaft (Diaphyse) verbunden [17, 31]. Der Schaft des Knochens besteht aus der Substantia compacta (Kompakta) [17]. Die beiden Metaphysen mit den Epiphysenlinien (Epiphysenfugen) an beiden Seiten der Epiphysen erlauben ein Längenwachstum bis zur Pubertät [17, 31]. Die Apophyse ist ein Knochenfortsatz an dem Sehnen und Bänder ansetzen [17]. Die Markhöhle der Spongiosa enthält rotes, blutbildendes Knochenmark, die Markhöhle der Diaphyse dagegen gelbes, fettspeicherndes Knochenmark [17, 31]. Außen ist der Knochen von der Knochenhaut (Periost) umhüllt [31].

Theoretische Grundlagen

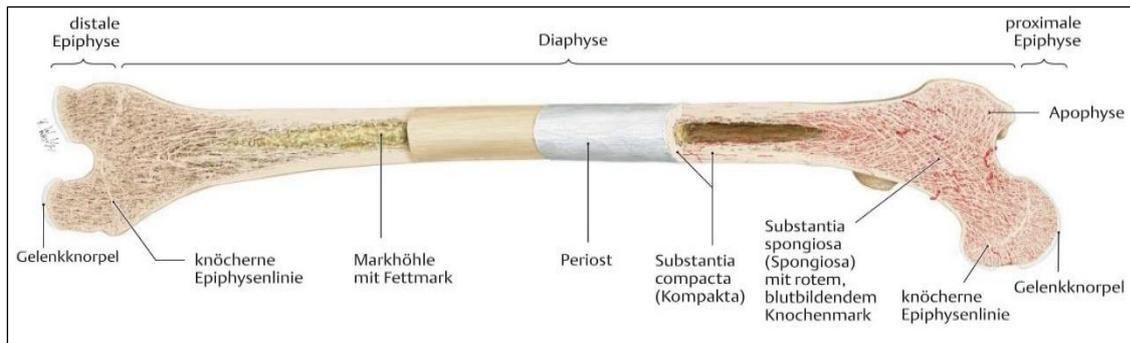


Abbildung 1: Aufbau eines langen Röhrenknochens am Beispiel des Femurs

Frontaler Sägeschnitt durch das Femur eines Erwachsenen. Röhrenknochen bestehen aus zwei Epiphysen (proximales und distales Gelenkende) mit einer zwischengelagerten Diaphyse. An der Apophyse setzen Muskeln, Bänder und Sehnen an. Die Epiphysenlinie (Epiphysenfuge) ist für das Längenwachstum des Knochens essenziell und verknöchert ca. mit dem 20. Lebensjahr. An den Gelenkenden befindet sich der Gelenkknorpel, der für die Druckverteilung und Reibungsminderung zwischen Knochen verantwortlich ist. Das rote, blutbildende Knochenmark liegt bei Erwachsenen vorwiegend in den Epiphysen; die Diaphyse enthält gelbes, fettspeicherndes Knochenmark. Unter dem Periost (Knochenhaut) liegt die Kompakta. Der Innenraum des Röhrenknochens ist durch die Spongiosa ausgekleidet [17, 304].

Die Grundform eines Wirbelknochens wird am Beispiel eines Lendenwirbelknochens (Abb. 2, links) dargestellt.

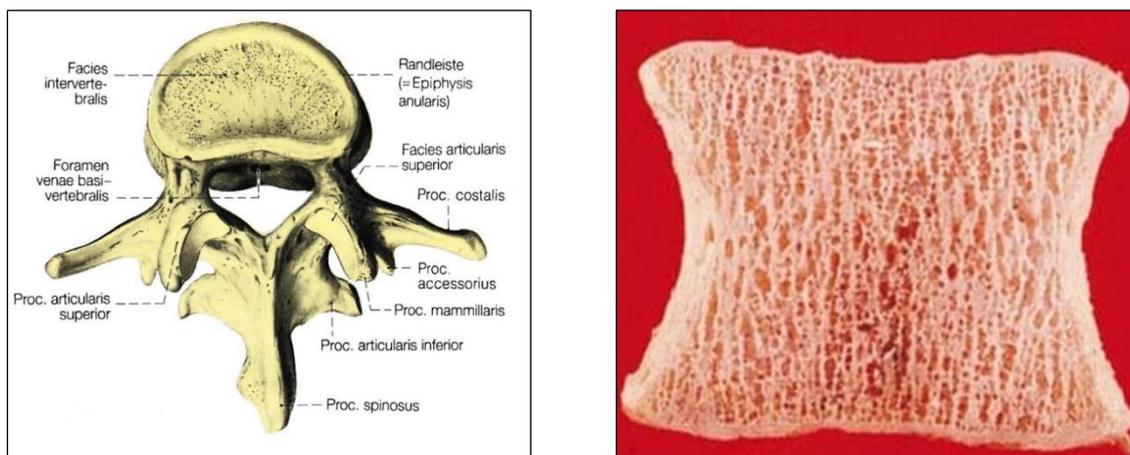


Abbildung 2: Aufbau des dritten Lendenwirbels (L3) (Ansicht von kranial, links) und Knochenarchitektur der Spongiosa eines gesunden Lendenwirbelkörpers (rechts)

Links: Lendenwirbel bestehen aus Wirbelkörper (Corpus vertebrae), Wirbelbogen (Arcus vertebrae), Dornfortsatz (Processus (Proc.) spinosus), Querfortsätzen (Proc. costalis) und Gelenkfortsätzen (Proc. articularis). Die Aneinanderreihung der Wirbellöcher (Foramen vertebrale) bildet den Wirbelkanal (Canalis vertebralis). An die Randleisten (Epiphysis anularis) schließen die Endflächen (Facies intervertebralis) an, die über die Bandscheiben eine Druckkraftverteilung erlauben. Charakteristisch für Lendenwirbel sind ein knöcherner Fortsatz (Proc. accessorius) und ein Knochenwulst (Proc. mamillaris). Die Wirbelvenen drainieren das venöse Blut über eine Öffnung (Foramen venae basivertebralis) [31].

Rechts: Dreidimensionale Spongiosa-Architektur eines gesunden Lendenwirbelkörpers. In der Spongiosa kommen sowohl vertikal ausgerichtete Drucktrabekel als auch horizontal ausgerichtete Zugtrabekel vor [17].

Zwar unterscheiden sich Wirbelknochen in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation in einigen Bauelementen, besitzen aber die gleiche Grundstruktur [17, 31]. Der Wirbelkörper besteht aus dichten, spongiösen, senkrecht ausgerichteten Knochenbälkchen, die den longitudinalen Druck abfedern (Abb. 2, rechts) [31]. Bis auf die Randleiste (Epiphysis anularis) sind die Endflächen (Facies intervertebralis) mit einer hyalinen Schicht überzogen, die die Verbindung zu den Zwischenwirbelscheiben (Bandscheiben) herstellt und eine ausgeglichene Druckkraftverteilung ermöglicht [31].

2.2 Mikroskopischer Aufbau des Knochens

2.2.1 Grundgerüst und extrazelluläre Matrix

Binde- und Stützgewebe wie Knochengewebe zeichnen sich durch große Zellzwischenräume (interstitieller Raum) aus [221]. Neben der interstitiellen Flüssigkeit beinhaltet dieser Raum eine für das Knochengewebe charakteristische Extrazellulärmatrix [221]. Die Knochenmatrix besteht zu 25 % aus Wasser, zu 30 % aus organischen und zu ca. 45 % aus mineralischen Substanzen [31, 221, 356]. Den Hauptanteil der organischen Matrixbestandteile (90 %) bilden Kollagen-Fibrillen [31] aus Kollagen Typ 1 [356], deren Anordnung dem Knochen die Zugfestigkeit und simultane Elastizität verleiht [31]. Die restlichen 10 % des organischen Materials bestehen aus Matrixproteinen (z. B. Osteocalcin, Matrix- γ -Carboxyglutaminsäure-Gruppen-Protein, Osteonectin, Osteopontin, Bone-Sialoprotein, Thrombospondin, Kollagen Typ 5, Proteoglykane, Sclerostin) [31]. Kollagen Typ 5 reguliert die Faserbildung des Kollagens Typ 1. Osteocalcin und das Matrix- γ -Carboxyglutaminsäure-Protein hemmen den Mineralisationsprozess [31]. Osteopontin und Osteonectin inhibieren die Hydroxylapatit-Kristallbildung [31, 356]. Das von Osteozyten gebildete Sclerostin ist aufgrund seiner inhibierenden Wirkung auf Osteoblasten eine potentielle therapeutische Zielstruktur [356]. Bei den anorganischen Anteilen der Matrix dominiert kristallines Hydroxylapatit, das sich sowohl an der Oberfläche als auch im Inneren der Kollagen-Fibrillen anlagert und für die Druckfestigkeit des Knochens sorgt [221, 356]. Weitere anorganische Bestandteile sind Kalziumkarbonat (CaCO_3), Kalziumhydrogenphosphat (CaHPO_4) sowie Anionen (z. B. Fluorid) und Kationen (z. B. Magnesium) [31].

2.2.2 Histologische Knochenarchitektur

Histologisch lassen sich in Abhängigkeit von der Anordnung der Kollagen-Fibrillen Geflecht- und Lamellenknochen unterscheiden [31, 221]. Im gesunden knöchernen Skelett

von Erwachsenen findet sich Geflechtknochen im Labyrinth des inneren Gehörgangs, am Felsenbein und an den Knochennähten des Schädels [17, 31]. Die miteinander verflochtenen Kollagen-Fasern [31, 221] bilden ein dreidimensionales Netzwerk aus Knochen-trabekeln ohne eine lamelläre Ordnung [31, 356]. In gefäßreichen Geflechtknochen fin-

den dynamische Umbauprozesse zu dem mechanisch stabileren Lamellenknochen statt (Abb. 3) [356]. Charakteristisch für den Aufbau von Lamellenknochen sind 3–7 μm dicke Knochenlamellen mit konsensuell ausgerichteten, mineralisierten Kollagen-Fasern [221, 356]. Von Knochenlamelle zu Knochenlamelle ändert sich die Anordnung der Kollagen-Fasern, wobei sie mehrheitlich senkrecht zueinander stehen [31, 221]. Innerhalb der Knochenlamellen liegen runde-ovale Aussparungen (Lakunen) mit Osteozyten [356]. Diese Osteozyten-Lakunen sind über Zellausläufer (Dendriten) und Kanäle (Canaliculi) miteinander verbunden [356]. Während in den Knochenbälkchen eine parallel zur Oberfläche verlaufende La-

melleanordnung dominiert, kommen in der Kompakta unterschiedliche Lamellenformen vor [356]. Die dominierende Lamellenform in der Kompakta sind walzenförmige Struktureinheiten (Osteone bzw. Havers-Systeme), die um ein in Längsrichtung verlaufendes Gefäß liegen [356]. Die aus 4–20 Speziallamellen bestehenden [356] Osteone (Durchmesser 100–400 μm) machen bis zu 95 % des Kortikalis-Volumens aus [31]. Innerhalb der Osteone verlaufen Gefäßkanäle (Havers-Kanäle, Durchmesser ca. 20–30 μm) [31, 356]. Wie die Osteone verbinden sich auch die Havers-Kanäle in transversaler Richtung durch die Kompakta über Volkmann-Kanäle miteinander [31, 356]. Durch den dynamischen Knochenumbau liegen zwischen funktionsfähigen Osteonen Überreste resorbierter Osteone. Diese Schaltlamellen sind das histologische Äquivalent des „Bone remodelings“ [31, 221, 356]. Die Abgrenzung von Schaltlamellen und Osteone zu benachbarten

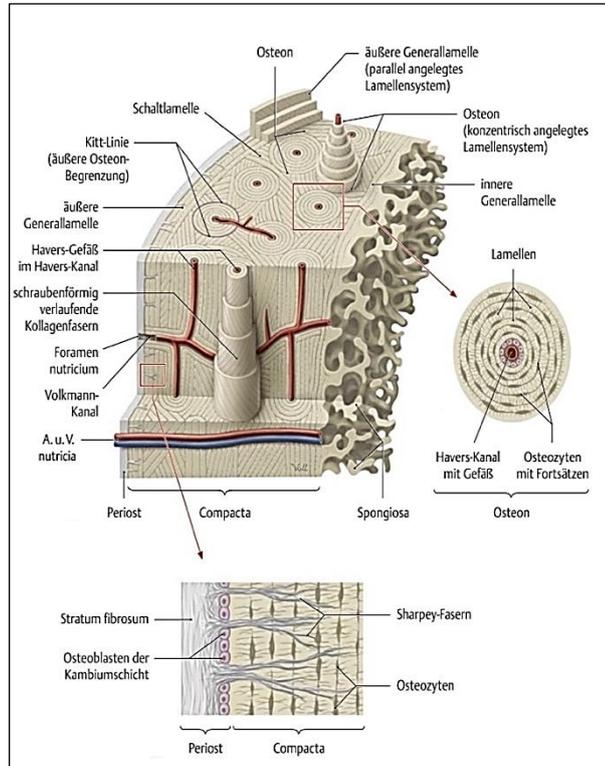


Abbildung 3: Histologischer Aufbau des Knochens

Oben links: Ausschnittvergrößerung der Substantia compacta mit den strukturellen Baueinheiten in Form von Osteonen, Havers-Kanälen und Volkmann-Kanälen. Oben rechts: Querschnitt durch ein Osteon. Unten: Aufbau des Periosts [304].

Funktionseinheiten erfolgt über Kollagen-arme und Proteoglykan-reiche Zementlinien [31, 356]. Endostal und periostal besteht der Lamellenknochen aus einer ca. 100 µm dünnen Schicht aus Zirkumferenzlamellen [31, 221, 356]. Verglichen mit den Kompakta-Trabekeln sind die Spongiosa-Trabekel mit maximal 200 µm dünner und besitzen eine Länge von maximal 600 µm [31]. Diese Trabekellamellen enthalten kaum Osteone und werden ebenfalls durch Kollagen-arme Zementlinien voneinander abgetrennt [31]. Die Außenseite des Knochens wird vom Periost umhüllt, innere Knochenflächen (z. B. Spongiosa, Havers-Kanäle) vom Endost [221]. Beide Strukturen weisen osteogene Eigenschaften auf [356]. Das bei Erwachsenen dreischichtige Periost besteht von außen nach innen aus der gefäßreichen Adventitia, dem Kollagen-reichen Stratum fibrosum (Fibroelastika), das über Sharpey-Fasern das Periost mit dem Knochen verbindet, und aus dem Stratum osteogenicum (Kambiumschicht) mit Knochenvorläuferzellen für den Knochenaufbau [356]. Im Periost liegen zahlreiche Gefäße und Nerven [221]. Das dünnere Endost besteht aus Kollagen-Fasern, Knochendeckzellen (endostale Saumzellen) [356] und verschiedenen Knochenvorläuferzellen, die für das osteogene Potential des Endosts verantwortlich sind [356].

2.3 Zelluläre Knochenbestandteile

Knochenzellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Funktion und Herkunft. Knochenaufbauende Osteoblasten gehören mit Osteoblasten-Vorläuferzellen, Osteoprogenitorzellen, endostalen Saumzellen, osteozytären Osteoblasten und Osteozyten der osteoblastären Zellreihe an. Demgegenüber stehen knochenresorbierende Osteoklasten.

2.3.1 Osteoprogenitorzellen und deren Differenzierungsprozess

Die knochenformierende Zelleinheit entstammt mesenchymalen Zellpopulationen [221]. Multipotente Progenitorzellen (Abb. 4) entwickeln sich unter dem Einfluss von Bone morphogenetic proteins (BMPs) zu bipotenten Progenitorzellen, Präosteoblasten oder Chondroblasten (Knorpelzellvorläufer) [31, 55]. Am Reifungsprozess der osteoblastären Zellreihe sind die beiden Transkriptionsfaktoren „runx-related transcription factor 2“ (RUNX2) und „osterix“ (OSX) beteiligt [9]. Die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren ist essentiell für die Knochenhomöostase; Mutationen in ihren Genen führen zu einer eingeschränkten Frakturheilung oder zu einer defizitären Knochenentwicklung des Kopfskeletts oder Schlüsselbeins [9, 31, 316]. Die beiden Transkriptionsfaktoren stimulieren Osteoblasten zur Sekretion von Kollagen Typ 1, Osteocalcin und alkalischer Phosphatase

(AP) [9]. Osteoblasten-Vorläuferzellen sind an knöchernen Oberflächen, im Endost oder in der Kambiumschicht des Periosts lokalisiert [31, 221, 356]. Osteoblasten differenzieren je nach Aktivitätszustand zu osteozytären Osteoblasten, endostalen Saumzellen oder zu Osteozyten [31, 221]. Umgekehrt können aus endostalen Saumzellen wiederum aktive Osteoblasten werden [31].

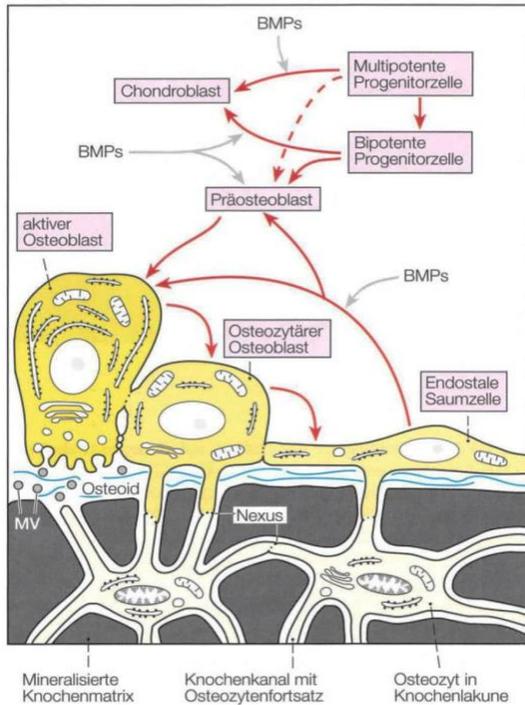


Abbildung 4: Osteoblastäre Differenzierung der mesenchymalen Zellreihe

Multipotente Progenitorzellen differenzieren unter dem Einfluss von bone morphogenetic proteins (BMPs) zu Chondroblasten, bipotenten Progenitorzellen oder Präosteoblasten. Beim anschließenden Reifeprozess entstehen aktive Osteoblasten, osteozytäre Osteoblasten, endostale Saumzellen oder Osteozyten. Osteoblasten sezernieren über Matrixvesikel (MV) verschiedene Proteine (z. B. Zytokine) [31].

2.3.2 Osteoblasten

Reife, aktive Osteoblasten sind einkernige Zellen mit zahlreichen Zellorganellen (Abb. 5) [98, 116]. Als polare Zellen sezernieren sie auf der einen Seite Matrixproteine und auf der dem Knochengewebe zugewandten Seite nicht-mineralisierte Knochenmatrix (Osteoid) [116, 356]. An der Knochenfläche anliegend machen Osteoblasten ca. 4–6 % der Knochenzellen aus [107]. Zur Koordination der zytoplasmatischen Prozesse sind sie über Gap junctions untereinander und mit osteozytären Osteoblasten und Osteozyten in stän-

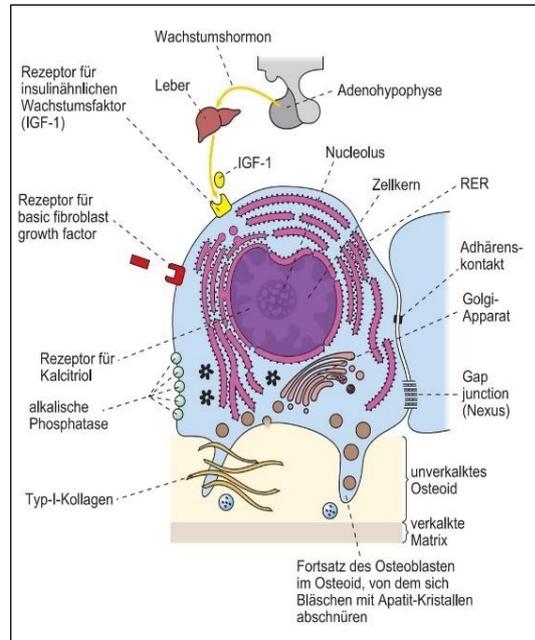


Abbildung 5: Funktionen eines reifen Osteoblasten

Aktive Osteoblasten besitzen aufgrund ihrer hohen Syntheseaktivität ein ausgeprägtes, raues endoplasmatisches Retikulum (RER) und einen auffälligen Golgi-Apparat. Neben Zell-Zell-Kontakten (Gap junctions) kommunizieren Osteoblasten über verschiedene Hormone (Parathormon, Calcitriol) und Zytokine mit anderen Knochenzellen [356].

digem Zell-Zell-Kontakt [107, 221]. Ihre einschichtige Anordnung erinnert an Epithelgewebe [31, 221, 356]. Eine Hauptfunktion der Osteoblasten ist die Synthese des überwiegend aus Kollagenen (vor allem Typ 1) und Proteoglykanen bestehenden Osteoids [356], das anschließend mineralisiert wird.

Aktive Osteoblasten lagern über abgeschnürte Matrixvesikel Kristallisationskerne in das Osteoid ein [221]. Das für den Mineralisationsprozess benötigte anorganische Phosphat (Pi) stammt aus Reaktionen, die durch die AP katalysiert werden [225]. Kalzium-bindende Ionen bilden die Grundlage für das Wachstum der Kristalle [221], das letztlich zur Zerstörung der Vesikel und zur Freisetzung der Kristalle führt, die sich an die Kollagen-Filamente anlagern und das Fundament der mineralisierten Knochenmatrix bilden [221]. Im vollständig entwickelten Skelett befindet sich ein Großteil der Osteoblasten im Ruhezustand [221]. Aufgrund der geringen AP-Aktivität sind diese osteozytären Osteoblasten nicht aktiv an der Osteoid-Synthese beteiligt [31]. Osteozytäre Osteoblasten werden im Rahmen der Osteoid-Synthese in die nicht-mineralisierte Knochenmatrix eingemauert [31]. Nach dem Mineralisationsprozess und der Einbettung in die mineralisierte Knochenmatrix werden sie als Osteozyten bezeichnet [221].

Über verschiedene Rezeptoren (z. B. für Parathormon (PTH), 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol, aktive Form des Vitamin D₃), PDGF (platelet-derived growth factor), TGF- β („transforming growth factor-beta“) oder IGFs („insulin-like growth factor“)) reagieren Osteoblasten auf endokrine, parakrine oder autokrine Signale [31, 356]. Nach der Knochenbildung gehen Osteoblasten entweder durch den programmierten Zelltod (Apoptose) unter oder entwickeln sich zu endostalen Saumzellen („bone lining cells“) bzw. Osteozyten [45, 65, 167]. Die mit zunehmendem Alter rarer werdenden aktiven Osteoblasten besitzen eine Lebensdauer von einigen Wochen. Im ausgereiften Skelett überwiegen langlebige Osteozyten (ca. 95 %) [221, 356]. Endostale Saumzellen zeigen eine geringe Zellaktivität [31, 221]. Sie kleiden die Kortikalis, die Havers-Kanäle und Spongiosa-Trabekel aus und liegen als flache Zellschicht der nicht-mineralisierten Knochenmatrix an [31, 221]. Über Canaliculi und Gap junctions halten sie Kontakt zu den Osteozyten [221].

2.3.3 Osteozyten

Als terminal ausdifferenzierte Osteoblasten übernehmen Osteozyten (Abb. 6) [184, 356] zahlreiche Funktionen bei der Steuerung des Knochenaufbaus und -abbaus [184]. Eingebettet in die mineralisierte Knochenmatrix stehen sie über Canaliculi und Gap junctions

untereinander und mit endostalen Saumzellen und Osteoblasten in Kontakt [233]. Über dendritische Fortsätze bilden sie mit anderen Osteozyten ein Netzwerk [221, 294], das aufgrund des hohen Vernetzungsgrades (ein Osteozyt steht mit bis zu 50 anderen Osteozyten in Verbindung) als Synzytium bezeichnet wird [237, 294]. Die Nährstoffversorgung erfolgt über den flüssigkeitsgefüllten Spaltraum zwischen Zellkörper und mineralisierter Knochenmatrix [31, 356]. Auch für die Funktion der Osteozyten als Mechanosensoren ist dieser nicht-mineralisierte Flüssigkeitssaum von großer Bedeutung [294]. Über mechanosensitive Kanäle (Piezo-Kanäle) nehmen die Zellen physikalische Stressreize wie Scherkräfte oder Druckbelastungen wahr [221, 317, 356]. Bei fehlender mechanischer Belastung steigt die Sekretion von Sclerostin an [4, 221]. Das Glykoprotein inhibiert über eine Bindung an das „low density lipoprotein receptor-related protein“ (LRP) den Differenzierungsprozess der osteoblastären Zellreihe [9]. Die folgende geringere Knochenbildung führt zur Abnahme der Knochenmasse [221, 356]. Eine entgegengesetzte Wirkung hat das von den Osteozyten sekretierte „parathyroid hormone-related Protein“ (PTHrP) [9]. Dieses Peptidhormon unterstützt die Knochenformation durch die Hemmung der Sclerostin-Produktion und Stimulierung des Reifungsprozesses der osteoblastären Zellreihe [9]. Zusätzlich fördern Osteozyten über den „receptor activator of NF- κ B Ligand“ (RANKL) bei fehlerhafter Belastung oder Mikrofrakturen die Osteoklastogenese und Mobilisierung der Osteoklasten [9, 221], wodurch beschädigte Abschnitte des lakunokanalikulären Netzwerks abgebaut werden [9]. Den Knochenabbau hemmen Osteozyten über das lösliche Rezeptorprotein Osteoprotegerin (OPG) [314], das an RANKL bindet und dessen Bindung an den auf der Oberfläche von Osteoklasten liegenden RANK verhindert [9]. Osteozyten regulieren den Knochenaufbau und -abbau und damit die Knochenhomöostase über das RANKL/OPG-Verhältnis [221]. Das Fehlen von Osteozyten führt auch beim Vorhandensein von funktionsfähigen Osteoblasten und Osteoklasten durch die gestörte Mechanotransduktion zu einer erhöhten Frakturanfälligkeit [177, 249, 305, 335]. Weiter beeinflussen Osteozyten über die Sekretion von „fibroblast growth factor“ 23 (FGF23) den Mineralhaushalt [221]. FGF23 steuert über eine Inhibition der PTH-Sekretion in den Nebenschilddrüsen und über eine gesteigerte renale Phosphat-Ausscheidung den Phosphat-Gehalt im Körper [221]. Weiter scheinen Osteozyten unabhängig von Osteoklasten Knochen abzubauen zu können (osteozytäre Osteolyse) [26, 39, 359]. Dieser perilakunäre bzw. kanalikuläre Knochenabbau findet bei temporär erhöhtem Kalzium-Bedarf, wie bei der Laktation statt [221, 359]. Die RANKL- oder Sclerostin-Sekretion der Osteozyten wird über Hormone (z. B. PTH) gesteuert [356].

Theoretische Grundlagen

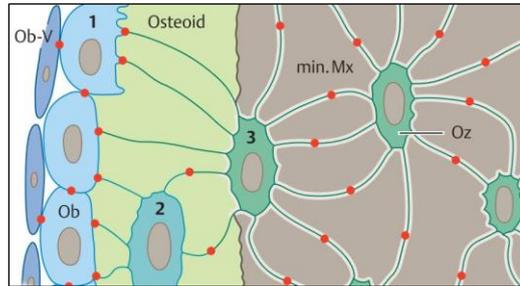


Abbildung 6: Entwicklung der Osteoblasten zu Osteozyten

Osteoblasten-Vorstufen (Ob-V), Osteoblasten (Ob) und Osteozyten (Oz) stehen über Gap junctions (rote Punkte) in ständigem Zell-Zell-Kontakt. Ob (1) synthetisieren das Osteoid und bilden Zellausläufer zu umliegenden Knochenzellen. Als Zwischenstufe auf dem Weg zum Oz liegen Ob im Osteoid eingemauert vor (2). Als Vorgänger zu terminal ausdifferenzierten Oz (3) mineralisieren diese „Osteoid-Oz“ die Knochenmatrix. In der mineralisierten Knochenmatrix (min. Mx) liegen eingemauert Oz vor [221].

2.3.4 Osteoklasten

Die knochenabbauenden Osteoklasten stammen aus dem monozytären Phagozytensystem des Knochenmarks [31, 46]. Osteoklasten-Vorläuferzellen erreichen über die Blutbahn (Sinusoide) oder über direktem Wege die Knochenmatrix [261, 262]. Der von Osteozyten und Osteoblasten sezernierte „macrophage colony-stimulating factor“ (M-CSF) fördert die Differenzierung zu reifen, aktiven Osteoklasten [58, 356]. Zellverbindungen mit endostalen Saumzellen und Osteoblasten über das Membranprotein Cadherin 6 ermöglichen beim Reifungsprozess den Zusammenschluss einkerniger, osteoklastärer Progenitorzellen zu vielkernigen Osteoklasten (Synzytium) [31, 45]. Die mehrkernigen (2–15 Kerne) Riesenzellen (30–150 μm) mit zahlreichen Zellorganellen (z. B. Mitochondrien, Golgi-Apparate) sind polar aufgebaut (Abb. 7) [9, 31, 221, 356]. Die apikale Seite liegt dem mineralisierten Knochengewebe an, die basolaterale Seite grenzt an das Stroma [65]. Als demineralisierende und knochenabbauende Zellen verfügen sie über zahlreiche Vakuolen und Lysosomen [221, 356]. Die Oberfläche ihrer apikalen Seite wird durch einen Faltensaum („ruffled border“) um das 5–10-Fache vergrößert [31, 65, 221, 356]. Durch die Bindung des Adhäsionsmoleküls $\alpha_v\beta_3$ -Integrin an die Matrixproteine Osteopontin und Bone-Sialoprotein bilden Osteoklasten an der Knochenmatrix Howship-Lakunen [65, 98], die durch Aktinfilamente stabilisiert werden [221, 356]. Die funktionelle Begrenzung der Howship-Lakunen (subosteoklastisches Kompartiment) bildet die Grundlage für die Knochenresorption [356]. In dem sauren Milieu der Lakune (pH-Wert 4,5) arbeiten lysosomale und nicht-lysosomale Enzyme optimal [98, 107]. Protonen-(H^+)-Adenosintriphosphatasen (ATPasen) in der Faltensaummembran pumpen H^+ -Ionen in das subosteoklastische Kompartiment [209]. Die H^+ -Ionen werden von der zytosolischen Carboanhydrase II gebildet, die die Umsetzung von Kohlensäure (H_2CO_3) und Wasser (H_2O)

zu H^+ -Ionen und Bikarbonat (HCO_3^-) katalysiert [31, 356]. HCO_3^- -Ionen werden über den Anionenaustauscher 2 an der basolateralen Membran an das Stroma abgegeben; im Gegenzug gelangen Chlorid-Ionen (Cl^-) in das Zytosol [31]. Die Cl^- -Ionen werden anschließend über den Chlorid-Ionenkanal CIC-7 in die Howship-Lakune transportiert, wo sie mit den H^+ -Ionen zu Salzsäure (HCl) reagieren [233]. Im sauren Milieu werden Kalzium-Kristalle aufgelöst. Lysosomale (z. B. Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP), Cathepsin K) und nicht-lysosomale Enzyme (z. B. Prokollagenasen, Lysozyme) bauen Matrixbestandteile wie Kollagene und Proteoglykane ab [31, 356]. Nach der Zerlegung werden die Fragmente der extrazellulären Matrix über Endozytose aufgenommen und über Transzytose an der basolaterale Seite in Richtung Stroma abgegeben [12, 337]. Dabei nehmen Kalzium-Kanäle freie Kalzium-Ionen aus dem subosteoklastischen Kompartiment auf [31]. Die zerlegten Matrixkomponenten werden von Makrophagen abgebaut [221].

An der Aktivierung und Hemmung der Osteoklasten sind Osteoblasten und Osteozyten beteiligt [221]. Entscheidend ist das RANKL/OPG-Verhältnis [305]. Die Bindung von RANKL an RANK auf der Osteoklasten-Membran fördert die Proliferation und Aktivität der Zellen. Als Decoy-Rezeptor verhindert OPG die Bindung von RANKL an RANK [221, 305]. Weiter wird die Aktivität der Osteoklasten endokrin durch Calcitonin und PTH beeinflusst [31,

65, 356]. Nach der Knochenresorption gehen Osteoklasten in eine inaktive Form über [356]. Sie werden bei Bedarf wieder reaktiviert oder gehen durch Apoptose unter [221]. Die durchschnittliche Lebenszeit von Osteoklasten beträgt ca. 10–15 Tage [221, 356].

2.4 Knöcherner Umbauprozesse („Bone remodeling“)

Das Knochengewebe durchläuft zeitlebens einen dynamischen Umbau [135, 176, 280, 282]. Aufgrund der Anpassung der Knochengestalt, der Adaptation an sich verändernde

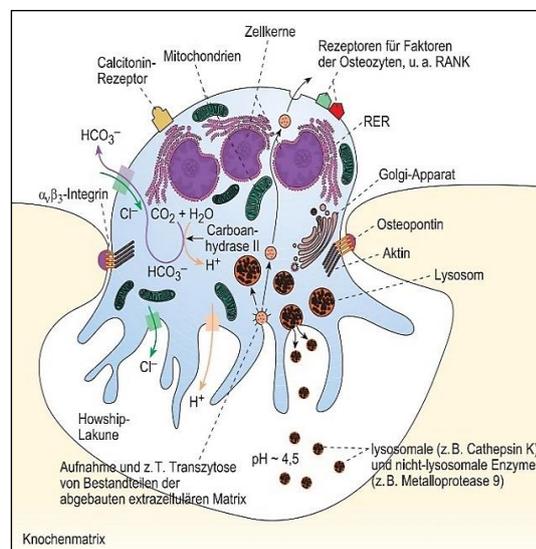


Abbildung 7: Aktiver Osteoklast mit subosteoklastischem Kompartiment

Aktive Osteoklasten bilden über Adhäsionsmoleküle (Integrine und Aktine) einen funktionell abgegrenzten Raum (Howship-Lakune). Für die energieaufwendigen Knochenabbauprozesse enthalten Osteoklasten zahlreiche Zellorganellen (Mitochondrien, Golgi-Apparate, raues endoplasmatisches Retikulum (RER)) [356].

mechanische Belastungen, der Korrektur von Mikrofrakturen oder der Bereitstellung von Kalzium werden jährlich ca. 10 % des knöchernen Skeletts ausgewechselt [77, 96, 221]. Im gesunden Skelett halten sich Knochenaufbau und -resorption die Waage. Störungen dieser Knochenhomöostase können zum Krankheitsbild der Osteoporose führen [31].

Der hochkomplexe Vorgang des Knochenumbaus erfordert eine koordinierte Interaktion der Knochenzellen [77]. Der Knochenumbau lässt sich in drei Phasen einteilen: In der Resorptionsphase (wenige Wochen) bauen Osteoklasten altes bzw. geschädigtes Knochengewebe ab. In der Umkehrphase (einige Wochen) entfernen Monozyten bzw. Makrophagen-ähnliche Zellen entkalkte Matrixreste und in der Neubildungsphase (mehrere Monate) bilden Osteoblasten neues Knochengewebe [31, 135, 221]. Die Zellen der osteoblastären Reihe und Osteoklasten bilden dabei temporär eine funktionelle Einheit. Die Funktion dieser „basic multicellular units“ (BMUs) [111, 112, 280] wird lokal (z. B. durch RANKL, OPG, TGF- β , „tumor necrosis factor- α (TNF- α)) und systemisch (z. B. PTH, Vitamin D₃ oder Calcitonin) reguliert [282, 311]. Prinzipiell läuft der Knochenumbau in spongiosem und kompaktem Knochen ähnlich ab, er unterscheidet sich aber in der BMU-Anordnung [356]. In der Kompakta formen Osteoklasten einen Bohrtunnel in die Knochenmatrix, in trabekulärem Knochen bilden sie an der Knochenoberfläche eine Erosionslakune (Abb. 8) [31, 221].

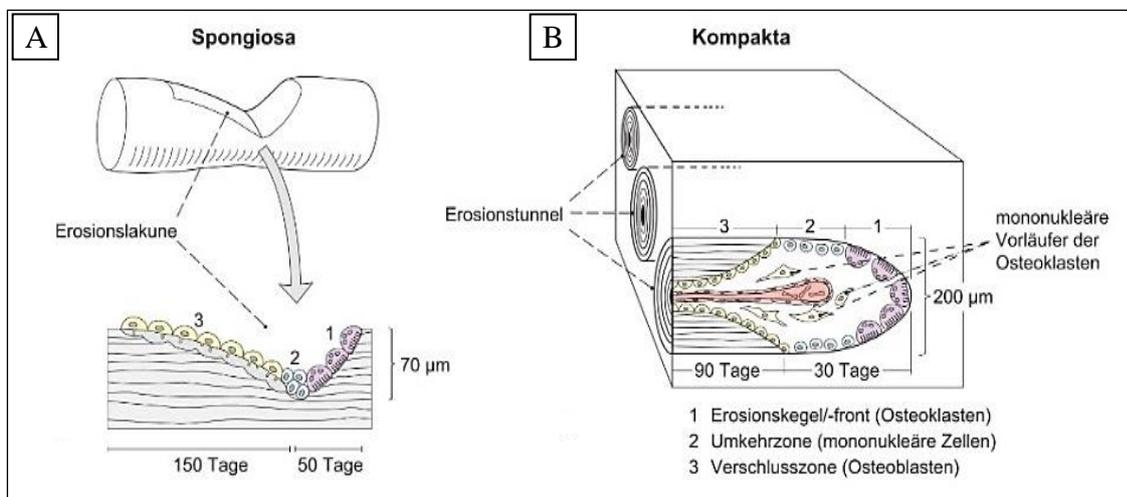


Abbildung 8: Bone remodeling in der Spongiosa (A) und Kompakta (B)

Die Abfolge der Phasen (Resorptionsphase, Umkehrphase und Neubildungsphase) ist in beiden Knochenformen identisch. Zunächst bauen Osteoklasten geschädigte bzw. gealterte Knochenmatrix ab (1). Anschließend resorbieren Monozyten und Makrophagen-ähnliche Zellen die entstehenden Matrixreste (2). Zum Schluss beenden Zellen der osteoblastären Reihe mit der Bildung von Knochengewebe den Knochenumbau (3). Die basic multicellular units (BMUs) bilden in der Spongiosa eine Erosionslakune bzw. Howship-Lakune (A) und in der Kompakta einen Erosionstunnel (B) [31].

Theoretische Grundlagen

Eingeleitet wird der Knochenumbau durch Zellen der osteoblastären Zellreihe (Osteozyten, endostale Saumzellen, Osteoblasten-Vorläuferzellen) [135]. Die osteozytäre Sekretion von RANKL führt zur Rekrutierung und Aktivierung von Osteoklasten [96, 176, 280] [135]. Zusätzlich fällt durch die verminderte, osteozytäre Sekretion von TGF- β die Inhibition der Osteoklastogenese weg [280]. Endostale Saumzellen nehmen Schäden am Knochengewebe wahr und leiten diese Information über ihre Fortsätze an umliegende Osteozyten weiter, wodurch das Signal verstärkt wird [221]. Weiter produzieren Osteoblasten und Osteoblasten-Vorläuferzellen M-CSF und „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1), die die RANKL-induzierte Osteoklasten-Aktivität und -Mobilisierung steigern [280]. Systemisch wird dieser Aktivierungsprozess durch zirkulierende Hormone (z. B. PTH, Calcitonin, Östrogen, Androgen) gesteuert [221].

Der weitere Ablauf ist am Beispiel des Knochenumbaus in der Kompakta dargestellt. In der Resorptionsphase bilden Osteoklasten einen Bohrkopf (osteoklastäre Erosionszone) in der Knochenmatrix [31, 221, 356]. Mit der Einwanderung von Monozyten und Makrophagen-ähnlichen Zellen beginnt die Umkehrphase [280]. Die mononukleären Zellen (monozytäre Umkehrzone [31]) bauen Matrixreste und demineralisierte Kollagen-Bestandteile ab [221]. In die freien Bereiche wandern Osteoblasten und Osteoblasten-Vorläuferzellen ein [221, 356] und leiten die Neubildungsphase ein [176, 311]. Für die Rekrutierung der Zellen der osteoblastären Reihe sind durch den Knochenabbau freiwerdende Zytokine (z. B. TGF- β , IGF-1, IGF-2) sowie von Osteoklasten sekretiertes Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und EphrinB2/EphrinB4 verantwortlich [280]. Nach der Differenzierung der osteoblastären Vorläuferzellen in aktive Osteoblasten bauen diese die erste Osteoid-Lamelle auf [221, 280]. Während der anschließenden Mineralisierung dieser Lamelle wird parallel die nächste Osteoid-Lamelle gebildet [221]. Der Vorgang setzt sich fort, bis ca. 20 Knochenlamellen den Bohrtunnel auskleiden [221, 356]. Über mehrere Monate wird ein Osteon gebildet, in dem einwandernde Blutgefäße und Bindegewebe den Havers-Kanal formen [221, 280, 356]. Die Osteoblasten werden nach Beendigung des Knochenaufbaus entweder zu eingemauerten Osteozyten, zu ruhenden, inaktiven Osteoblasten, endostalen Saumzellen oder gehen in Apoptose [221, 356]. Die Knochenneubildung endet, wenn das zuvor resorbierte Knochengewebe vollständig ersetzt ist [221, 280].

In der Spongiosa entstehen beim Knochenumbau etwa 50 μm tiefe Erosionslakunen (Howship-Lakunen bzw. „bone remodeling compartment“), indem die endostalen Saumzellen eine „Zeltüberdachung“ („canopy“) über die umzubauende Knochenregion bilden

[31, 135, 221, 356]. Die Knochenresorption in der Howship-Lakune verläuft langsamer als in den Bohrkanälen der Kompakta ($25 \mu\text{m/d}$ vs. $50 \mu\text{m/d}$) [135]. Dennoch findet in der Spongiosa aufgrund des größeren Oberfläche-Volumen-Verhältnisses mehr Knochenumbau statt als in der Kompakta [135]. Jährlich werden in der Kompakta etwa 2–4 % und in der Spongiosa 6–8 % der Knochenmasse umgebaut [135, 221]. Aufgrund der Anordnung der BMUs und der Lamellenanordnung der Trabekel in der Spongiosa erfolgt der Knochenumbau im trabekulären Knochen im Vergleich zur Kompakta schneller (7 vs. 12 Monate) [31, 135, 221, 356].

2.5 Interzelluläre Wechselwirkungen in der Knochenmatrix

Die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität, der mechanischen Stabilität und der Homöostase des Knochengewebes erfordert koordinierte Zellinteraktionen zwischen Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten [64]. Neben der direkten Zell-Zell-Kommunikation mittels Gap junctions spielen biochemische Signale eine entscheidende Rolle [42, 360]. Da Knochenzellen in funktionellen Einheiten (BMUs) vorliegen, hat die Beeinflussung einer Zellgruppe meist auch Konsequenzen für die anderen Zellen [184].

2.5.1 Wirkung von Osteoblasten auf Osteoklasten

Der Einfluss von Osteoblasten auf Osteoklasten über den RANKL/RANK/OPG-Signalweg wurde bereits erwähnt [42, 79, 184, 220]. Die Bindung des von Osteoblasten sezernierten RANKL (auch „osteoclast differentiation factor“) an RANK auf der Membranoberfläche von Osteoklasten und Osteoklasten-Vorläuferzellen [231, 315] fördert die Proliferation und Differenzierung [184] sowie die Synzytien-Bildung und Aktivierung der Zellen [220]. Bei der autosomal-rezessiven Form der Osteopetrose (Marmorknochenkrankheit) führt ein RANKL-Mangel zu einer ungerichteten Vermehrung von Knochengewebe [184]. Inhibiert wird die RANKL/RANK-Wechselwirkung durch das ebenfalls von Osteoblasten sezernierte OPG [42]. Als „Rezeptorattrappe“ hemmt OPG die Bindung von RANKL an RANK und somit die Stimulation der Osteoklastogenese [79].

Ein weiteres Signal ist die Bindung von durch Osteoblasten ausgeschüttetes M-CSF an den „colony stimulating factor 1 receptor“ (C-FMS) [220] auf der Membranoberfläche von Osteoklasten, wodurch diese zur Proliferation und Differenzierung stimuliert werden [184] und ihr Abbau gehemmt wird [220, 231].

Zusätzlich regulieren Osteoblasten die Osteoklastogenese über den Wnt-Signalweg (zusammengesetzt aus „wingless“ und „Int-1“) [184, 226]. Sowohl der kanonische, β -

Catenin-abhängige Wnt-Signalweg als auch der nicht-kanonische, β -Catenin-unabhängige und Kalzium-abhängige Wnt-Signalweg sind entscheidend für den Erhalt der Knochenhomöostase [184, 219]. Zellen der osteoblastären Reihe sezernieren den nicht-kanonischen Wnt-Liganden Wnt-5A, der an den Osteoklasten-Rezeptor „receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2“ (ROR2) bindet [184]. Der durch diese Bindung aktivierte „c-Jun N-terminal kinase-mitogen-activated protein kinase pathway“ (JNK-MAPK-Signalweg) [184] verstärkt die RANK-Expression der Osteoklasten und somit die RANKL-induzierte Osteoklastogenese [226]. Als Gegenspieler sezernieren Osteoblasten den Wnt-Liganden Wnt-16 [184], der die Osteoklastogenese über den nicht-kanonischen JNK-MAPK-Signalweg inhibiert [184] und so die kortikale BMD [97, 184, 192, 235] beeinflusst. Zusätzlich induziert Wnt-16 über die Phosphorylierung von c-Jun die Synthese von OPG in Osteoblasten, wodurch die Osteoklastogenese weiter gehemmt wird [97, 192, 235]. Ein Wnt-16-Mangel oder ein Defekt im direkten oder indirekten Signalweg verringert die kortikale BMD und geht mit einem erhöhten Frakturrisiko einher [184].

2.5.2 Regulation der Osteoblasten durch Osteoklasten

Osteoblasten regulieren nicht nur Osteoklasten, sondern auch umgekehrt [231]. Dazu sezernieren aktive Osteoklasten eine lösliche Form des Transmembranproteins RANK („reverse coupling factor“) [159, 361], das an membranständiges RANKL auf der Oberfläche von Osteoblasten bindet [159, 184, 361], wodurch die Osteoblastogenese und Osteoblasten-Differenzierung stimuliert wird [184]. Auch RANKL kommt als Membranprotein und nach proteolytischer Spaltung als löslicher Ligand sRANKL („soluble“ RANKL) vor [159, 361]. In Abhängigkeit vom aktuellen Bedarf und Knochenstatus wird über die „klassische“ sRANKL/RANK-Wechselwirkung die Osteoklastogenese aktiviert oder durch die Wechselwirkung des löslichen RANK mit dem membranständigen RANKL die Osteoblastogenese und Knochenformation [184]. Ein weiteres Signalmolekül zur Förderung der Osteoblastogenese ist das von Osteoklasten und Osteoklasten-Vorläuferzellen gebildete Sphingolipid S1P [161, 268], das an den S1P-Rezeptor auf Osteoblasten bindet [184]. Dieser Kontakt mobilisiert Osteoblasten und gewährleistet ihr Überleben [162, 184, 268]. Zusätzlich stimuliert diese Wechselwirkung die RANKL-Expression in Osteoblasten, so dass die Osteoklastogenese gefördert wird und Osteoblasten und Osteoklasten sich gegenseitig aktivieren [301]. Daneben können Osteoklasten die Osteoblastogenese auch inhibieren. Das von Osteoklasten und Oligodendrozyten exprimierte Semapho-

rin-4D (SEMA4D) [49, 247] bindet an das Oberflächenprotein Plexin-B1 auf Osteoblasten [184]. Diese Wechselwirkung reduziert die IGF-1-Synthese und folglich die Differenzierung von Osteoblasten-Vorläuferzellen zu Osteoblasten [49, 184, 247]. Im Mausmodell der postmenopausalen Osteoporose führen Anti-SEMA4D-Antikörper zu einem verminderten Knochenabbau, ohne die Knochenresorption durch Osteoklasten zu beeinflussen [49]. Daher ist SEMA4D ein therapeutischer Ansatzpunkt für die Behandlung von Osteoporose [49, 184].

2.5.3 Osteozyten als zentrale Regulatoren für Osteoblasten und Osteoklasten

Als dominierende Zellen im Knochen (ca. 90–95 %) spielen Osteozyten als Regulatoren von Osteoblasten und Osteoklasten eine entscheidende Rolle [342]. Über das von Osteozyten synthetisierte Protein E11 treten die Zellen mit Osteoblasten und Osteoklasten in Verbindung [28, 342]. Neben den Gap junctions ist diese Zellverbindung für den Erhalt der Knochenhomöostase essentiell [28]. Weiter verfügen Osteozyten über lösliche Signalmoleküle, die auf Osteoblasten bzw. Osteoklasten wirken (Abb. 9).

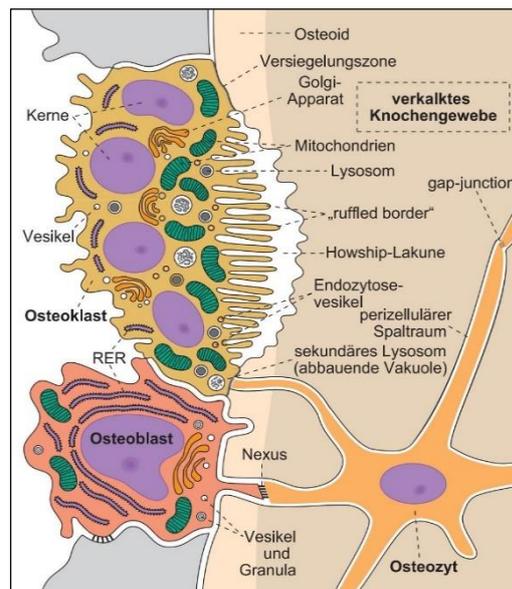


Abbildung 9: Zellverbindungen zwischen Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten

Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten stehen in einem dynamischen interzellulären Kontakt [356].

Über die lokale Sekretion von Osteopontin mobilisieren Osteozyten Vorläuferzellen der osteoblastären Zellreihe, um gezielt eine Knochenformation einzuleiten [281]. Auch die

durch mechanische Reize von Osteozyten sekretierten Signalmoleküle Stickstoffmonoxid (NO) oder Prostaglandin E2 fördern den Stoffwechsel von Osteoblasten [296]. Zusätzlich beeinflussen Osteozyten die Knochenformation über den kanonischen Wnt-Signalweg, indem sie β -Catenin-abhängig die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten stimulieren [196, 272]. Dabei inhibiert die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3) die Wnt-Signalkaskade [22]. GSK-3 destabilisiert für gewöhnlich β -Catenin durch Phosphorylierung, so dass der kanonische Wnt-Signalweg gehemmt wird [22, 342]. Erst die Bindung von β -Catenin an Transkriptionsfaktoren initiiert die Differenzierung der osteoblastären Zellreihe [22, 342]. Weiter hemmen Osteozyten über die Ausschüttung des Glykoproteins „Dickkopf-related protein 1“ (DKK-1) die Differenzierung von Osteoblasten [303]. Als

Antagonist des Wnt-Signalwegs bindet DKK-1 an LRP 5/6 und inhibiert so die β -Catenin-Synthese [303, 342]. Weiter induzieren Osteozyten den Knochenabbau, indem sie über die Sekretion von RANKL die RANKL/RANK-Wechselwirkung und folglich die Osteoklastogenese fördern [245, 363]. Das osteozytäre RANKL hat vermutlich einen stärkeren Effekt auf die Osteoklastogenese als das von Osteoblasten sezernierte RANKL [342, 364]. Weiter synthetisieren Osteozyten M-CSF, das die Osteoklastogenese und Osteoklasten-Aktivität ebenfalls fördert [342]. Zur Vermeidung einer überschüssigen Knochenresorption, exprimieren Osteozyten OPG [196], das durch die Bindung an RANKL die RANKL/RANK-Interaktion und somit die Proliferation und Differenzierung von Osteoklasten verhindert [196, 342].

2.6 Hormonelle Steuerung des Knochenmetabolismus

Für den Erhalt der Knochenhomöostase spielen neben parakrinen auch endokrine Einflüsse eine zentrale Rolle [31, 133, 216, 221]. Die Knochenmasse zeigt im Rahmen der Skelettentwicklung eine ausgeprägte Abhängigkeit vom Alter, von genetischen Faktoren, Hormonen (z. B. Wachstumshormone, IGFs) und von einer ausreichenden Vitamin D- und Kalzium-Aufnahme (Abb. 10) [13, 40, 143]. In der Kindheit dominiert der Knochenaufbau [13, 40, 143]. Durch den zusätzlichen Ein-

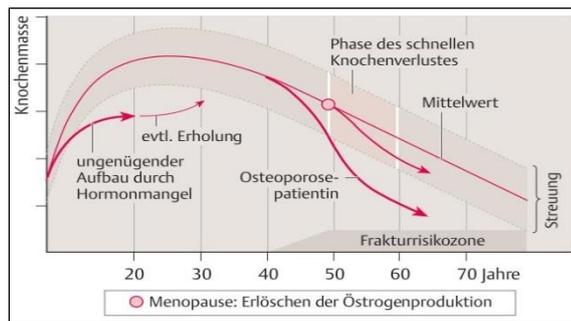


Abbildung 10: Entwicklung der Knochenmasse im Laufe des Lebens

Bis zur maximalen Knochenmasse („peak bone mass“) überwiegt der Knochenaufbau. Anschließend dominiert der Knochenabbau, der mit einem erhöhten Frakturrisiko einhergeht [13].

fluss der Sexualhormone ab Beginn der Pubertät wird zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr die maximale Knochenmasse („peak bone mass“) erreicht [13]. Danach dominiert mit zunehmendem Alter durch metabolische und mechanische Einflüsse der Knochenabbau. Bei Frauen verstärkt der Östrogen-Ausfall ab Beginn der Menopause diese Tendenz [13, 143].

2.6.1 Parathormon (PTH)

Das von den Hauptzellen der Nebenschilddrüsen synthetisierte PTH steuert den extrazellulären Kalzium-Gehalt [13, 50, 143, 240, 260, 333]. Zusätzlich beeinflusst PTH auch die Phosphat-Homöostase [376]. Kalzium-sensitive Rezeptoren in der Membran der Hauptzellen der Nebenschilddrüsen nehmen aktuelle Kalzium-Konzentrationen im Blut wahr

[31, 221]. Steigende Kalzium-Konzentrationen verringern die PTH-Sekretion, fallende Kalzium-Konzentration stimulieren die Hauptzellen der Nebenschilddrüsen zur PTH-Ausschüttung [13, 293, 349]. PTH fungiert als indirekter Osteoklasten-Aktivator: Zellen der osteoblastären Zellreihe (v. a. Osteozyten) exprimieren den PTH-Rezeptor 1 (PTHr1) und werden durch PTH [50, 221, 312] zur Synthese von RANKL angeregt, das wiederum über die Wechselwirkung mit RANK Osteoklasten mobilisiert und aktiviert [31, 50, 221]. Zudem inhibiert PTH die OPG-Synthese in Osteozyten und Osteoblasten, wodurch der Effekt verstärkt wird [312, 370]. Beim folgenden Knochenabbau wird Kalzium und Phosphat freigesetzt [31, 221]. Bindet PTH an den PTHr1 von endostalen Saumzellen, sezernieren die Zellen Kollagenasen und wandern von der Knochenoberfläche ab, so dass Osteoklasten den Knochen abbauen können [333]. Die Bereitstellung von Kalzium und Phosphat durch PTH ist nicht immer mit einem vermehrten Knochenabbau verbunden [221]. PTH inhibiert über die Bindung an den PTHr1 der Osteozyten die Synthese von Sclerostin, wodurch die Hemmung der Osteoblasten-Aktivität wegfällt und die Knochenmasse zunimmt [221]. Ob PTH katabol oder anabol wirkt, hängt von der Frequenz der PTH-Sekretion ab [50, 221, 376]. Eine anhaltende PTH-Ausschüttung zeigt knochenkatabole, eine intermittierende PTH-Sekretion dagegen knochenanabole Effekte [221]. Beeinflusst wird der Wirkmechanismus zudem durch die osteozytäre Sekretion von FGF23 [50, 349, 376]. FGF23 stimuliert die Hauptzellen der Nebenschilddrüsen zur PTH-Sekretion und inhibiert die renale Calcitriol-Produktion [50, 349, 376], wodurch vermehrt auftretende Phosphat-Ionen renal eliminiert werden [349, 376].

2.6.2 Calcitonin

Das von parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse sezernierte Peptidhormon Calcitonin reguliert die Serumkalzium-Konzentration [13, 240]. Zusammen mit PTH und Vitamin D gehört es zu den entscheidenden Regulatoren des Knochenstoffwechsels und der Kalzium-Homöostase, indem es durch eine Inhibition der Osteoklasten einen überproportionalen Knochenabbau verhindert [13, 31, 240, 260, 376]. Calcitonin wird bei erhöhtem Serumkalzium freigesetzt [221]. Durch Bindung an den Calcitonin-Rezeptor der Osteoklasten leitet Calcitonin eine intrazelluläre Signalkaskade ein, die zur Schädigung des Zytoskeletts und zum Untergang der Osteoklasten führt [31, 221, 240]. Calcitonin wirkt kurzfristig und temporär [13]. Eine dauerhafte Präsenz oder ein chronischer Mangel an Calcitonin haben keine Wirkung auf den Kalzium- oder Knochenhaushalt, da sich der Organismus über eine verminderte Rezeptor-Expression und ein Escape-Phänomen dem physiologischen Regelkreislauf entzieht [240]. Die kurzfristige Wirkung unterdrückt abnormal gesteigerte Osteoklasten-Aktivitäten [221, 240].

2.6.3 Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol)

Calcitriol ist ein weiterer Regulator der Kalzium-Homöostase und des Knochenstoffwechsels [356]. Im Gastrointestinaltrakt fördert es die Absorption von Kalzium und Phosphat [13, 31, 75, 221] und in der Niere die tubuläre Rückresorption von Kalzium und Phosphat aus dem Ultrafiltrat [40, 240, 376]. Die Bereitstellung von Kalzium und Phosphat ermöglicht die Knochenmineralisierung und trägt zur Knochenbildung bei [31, 50, 75, 238]. Daneben fördert Calcitriol den Knochenaufbau über Vitamin-D-Rezeptoren (VDR auf Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen auch direkt, indem es die Proliferation und Differenzierung der osteoblastären Zellreihe stimuliert [350, 376] und Osteoblasten zur Synthese von knochenbauenden Matrixbestandteilen (z. B. Osteocalcin, Osteopontin, AP) anregt) [1, 76, 349, 376]. In Abhängigkeit vom Serumkalzium-Gehalt fördert Calcitriol auch den Knochenabbau [31, 76, 143, 349, 376]. Calcitriol stimuliert Osteoklasten-Vorläuferzellen zur Bildung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen, die für die Bindung reifer Osteoklasten an der Knochenoberfläche erforderlich sind [76]. Zusätzlich steigert Calcitriol die Synthese von Prostaglandin E2 und TNF- α , die die Proliferation und Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen fördern [76]. Weiter stimuliert Calcitriol die RANKL-Synthese in Osteoprogenitorzellen und somit die über die RANKL-RANK-Wechselwirkung geförderte Osteoklastogenese [21]. Ob Calcitriol knochenanabol oder knochenkatabol wirkt, hängt von der Calcitriol- und Serumkalzium-Konzentration und von weiteren

Regulationsmechanismen ab [76]. Eine Hypokalzämie, Hypophosphatämie oder erhöhte PTH-Konzentrationen erhöhen die Calcitriol-Synthese und fördern die Mobilisierung von Kalzium und Phosphat aus der Knochenmatrix [13]. Ein moderater Mangel an Kalzium und Phosphat wird PTH-unabhängig über den Gastrointestinaltrakt und den renalen Weg ausgeglichen [76]. In Abhängigkeit vom aktuellen Knochenstatus werden dann Kalzium und Phosphat zur Mineralisierung der Knochenmatrix genutzt [76]. Calcitriol kann im Rahmen einer negativen Rückkopplung seine eigene Synthese inhibieren [18, 76, 349].

2.6.4 Östrogen

Das Sexualhormon Östrogen spielt als zentraler Regulator der Knochenhomöostase bei der Skelettentwicklung und -reife eine entscheidende Rolle [347]. Östrogen wirkt über nukleäre Östrogen-Rezeptoren ($ER\alpha$, $ER\beta$), die auch in Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten vorkommen [243]. Diese Steroid-Rezeptoren fungieren als Transkriptionsfaktoren, die nach Bindung von Östrogen die Transkription verschiedener Gene einleiten [6, 181, 182], wodurch die Proliferation und Differenzierung der osteoblastären Zellreihe stimuliert wird, indem vermehrt OPG synthetisiert und gleichzeitig die RANKL-Produktion inhibiert wird [6, 181, 182, 329]. Durch die verminderte RANKL-Aktivität verringert sich die Aktivität und Lebensdauer von Osteoklasten [88, 113, 329]. Zusätzlich führt Östrogen in Osteoblasten zu einer verstärkten Ausschüttung von TGF- β und IGFs, die die Knochenformation fördern [254]. Weiter reduziert die Östrogen-vermittelte Hemmung der Sekretion von TNF- α und Interleukin-(IL)-1 die Osteoklasten-Aktivität, so dass insgesamt knochenanabole Effekte überwiegen [365]. Verstärkend kommt hinzu, dass Östrogen die Apoptose von Osteoklasten über die Induktion des Fas-Liganden (FasL) fördert [6, 243]. Der FasL bindet an den Fas-Rezeptor (FasR) auf der Oberfläche der Osteoklasten und leitet so über einen autokrinen Mechanismus den programmierten Zelltod ein [6, 243]. Zusätzlich steuert Östrogen den Knochenstoffwechsel indirekt über eine Steigerung der Calcitonin- und Calcitriol-Produktion [53, 88]. Insgesamt fördert das Sexualhormon Östrogen den Knochenaufbau [221] und hemmt gleichzeitig den Knochenabbau [6, 221].

2.7 Osteoporose und der Stellenwert Wirbelkörper-assoziiierter Frakturen

Pathologien des Knochenmetabolismus beeinträchtigen die Knochenhomöostase und können zu einer Osteoporose führen [69, 72]. Trotz der reduzierten Knochenmasse und defizitären Spongiosa-Architektur bleibt die Osteoporose lange Zeit asymptomatisch [74]. Die Folgen sind eine erhöhte Frakturanfälligkeit, eine eingeschränkte Mobilität, eine erhöhte Mortalität sowie ein großer Betreuungsaufwand für das Gesundheitswesen [200, 323]. Bei den Osteoporose-Ursachen lassen sich beeinflussbare und nicht-beeinflussbare Faktoren unterscheiden [72, 284]. Ein wichtiger, nicht-beeinflussbarer Faktor ist das Alter [284]. Die maximale BMD wird um das 30. Lebensjahr erreicht und nimmt von da an jährlich um ca. 0,7 % ab [221]. Ursache ist eine Verschiebung des Knochenbaus zugunsten des Knochenabbaus (katabole Knochenstoffwechsellage) [72, 221]. Bei postmenopausalen Frauen verstärkt der Östrogen-Mangel die Knochenresorption [221]. Weitere die Osteoporose begünstigende, nicht-beeinflussbare Risikofaktoren sind eine positive Familienanamnese, die ethnische Zugehörigkeit und der Konstitutionstyp [115]. Zu den beeinflussbaren Osteoporose-Risikofaktoren zählen das Rauchen, eine Kalzium- bzw. Vitamin D-arme Ernährung, regelmäßiger Alkoholkonsum, Bewegungsarmut und die Einnahme bestimmter Medikamente (z. B. Glukokortikoide, Antikonvulsiva, selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer) [201]. Die Diagnose einer Osteoporose erfolgt über die Dual-Röntgen-Absorptiometrie [173], wobei die BMD in g/cm^2 ermittelt wird [217]. Die Osteoporose-Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) beruht auf der BMD-Messung [285]. Der verwendete T-Score beschreibt die Abweichung des BMD-Messwerts vom Mittelwert einer Referenzgruppe aus gesunden, jungen Erwachsenen gleichen Geschlechts und gleicher Ethnie [279]; er wird in Standardabweichungen („Standard deviation“, SD) angegeben. Beträgt der T-Score mehr als -2,5 SD liegt eine Osteoporose vor [320]. Ein T-Score von -1 bis -2,5 wird als Osteopenie definiert [72]. Entscheidend für die Diagnose der Osteoporose ist der Ausschluss anderer Erkrankungen, die mit einer BMD-Abnahme einhergehen [69, 72]. Mithilfe des „Fracture Risk Assessment Tool“ (FRAX) lässt sich die Wahrscheinlichkeit einer Osteoporose-bedingten Fraktur in den nächsten zehn Jahren abschätzen [73, 76, 285, 326]. Mit Hilfe von Messkriterien (z. B. vorausgegangene Frakturen, Vorerkrankungen, Körpergröße, Körpergewicht) werden das individuelle Frakturrisiko bei osteoporotischen und osteopenen Patienten ermittelt [72, 279] und eine geeignete medikamentösen Therapie eingeleitet [69, 72, 279, 320]. Ausschlaggebend für die Therapiewahl ist die Form der Osteoporose [115, 320].

Theoretische Grundlagen

Die mit ca. 90 % häufigste Form der Osteoporose [125, 158, 253], die primäre bzw. idiopathische Osteoporose, wird weiter in Typ 1 (postmenopausale Osteoporose) und Typ 2 (senile Osteoporose) unterteilt [115]. Die postmenopausale Osteoporose ist durch einen zunächst schnellen Knochenverlust („high turnover“) binnen zehn Jahre (ca. 5–6 %) durch den Wegfall des knochenanabolen Hormons Östrogen und einen anschließend langsameren, aber gleichbleibenden Knochenabbau („low turnover“) gekennzeichnet [69, 279, 284]. Da vornehmlich trabekuläre bzw. spongiöse Knochenstrukturen betroffen sind, sind Wirbelkörperfrakturen oder distale Radiusfrakturen häufig [31, 115, 173, 320]. Bei der senilen Osteoporose spielt neben der altersbedingten Osteoblasten-Insuffizienz und reduzierten Kalzium-Aufnahme auch der Bewegungsmangel eine Rolle [115, 320]. Sie trifft vor allem Menschen ab dem 70. Lebensjahr mit einem deutlich höheren Männeranteil als bei der postmenopausalen Osteoporose (Frauen 2:1 Männer vs. Frauen 8:1 Männer) [158]. Charakteristisch sind ein langsamer, konstanter Knochenverlust und ein erhöhtes Frakturrisiko im spongiösen und kompakten Knochengewebe (z. B. Schenkelhalsfrakturen) [31, 115, 158]. Auch der altersbedingt abnehmende Östrogen-Spiegel fördert die Entwicklung der senilen Osteoporose [320]. Sekundäre Osteoporosen (ca. 10 % der Osteoporose-Fälle [69, 115, 320, 328]) sind mit einer Vielzahl von Erkrankungen (z. B. endokrine und rheumatologische Erkrankungen, Malassimilationssyndrome, Tumoren) assoziiert [115, 328]. Die meisten sekundären Osteoporosen sind jedoch iatrogen bedingt, am häufigsten durch systemische Glukokortikoid-Langzeittherapien [69, 115, 279, 284, 320, 328]. Dabei kommt es innerhalb der ersten drei bis sechs Monate zu einem rapiden Knochenverlust (ca. 5–10 %) mit erhöhtem Frakturrisiko [3, 68]. Die Glukokortikoid-induzierte Osteoporose betrifft meist das trabekuläre Knochengewebe und geht daher mit Frakturen der Wirbelkörper einher [3, 68]. Das Gesamtfrakturrisiko während einer Glukokortikoid-Langzeittherapie beträgt ca. 20–45 % [3, 68]. Ähnliches gilt für einen Hypercortisolismus (z. B. Cushing-Syndrom) [69].

Entscheidend für das Osteoporose-Therapiemanagement ist neben der Früherkennung die Prävention [115, 200, 320, 323]. Zu den präventiven Maßnahmen zählen eine adäquate Kalzium- und Vitamin D-Zufuhr, regelmäßige körperliche Aktivitäten, der Verzicht auf Alkohol und Rauchen sowie die Vermeidung von das Sturzrisiko erhöhenden Medikamenten (z. B. selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, Antikonvulsiva) [3, 68, 74, 115]. Eine durch konstante physische Aktivität trainierte Körperstatur im jungen Erwachsenenalter fördert langfristig die Knochenformation und reduziert das Risiko für osteoporotische Frakturen um bis zu 50 % [179]. Weiter gilt es das Sturzrisiko zu minimieren,

da osteoporotische Frakturen häufig durch ein Sturzgeschehen ausgelöst werden. Etwa 30 % der Menschen über 65 Jahre stürzen jedes Jahr mindestens einmal [83, 179]. Zudem verringert ein gesunder Lebensstil die Wahrscheinlichkeit für Komorbiditäten (z. B. arterielle Hypertonie, Koronare Herzkrankheit, Diabetes mellitus Typ 2), die den Krankheitsverlauf der Osteoporose negativ beeinflussen [83, 179]. Bei einer Glukokortikoid-Langzeittherapie gilt es, eine möglichst geringe Erhaltungsdosis anzustreben oder Glukokortikoid-sparende Medikamente einzusetzen [3, 68]. Falls diese Basismaßnahmen nicht ausreichen um das Frakturrisiko zu senken, ist bei allen Formen der Osteoporose eine medikamentöse Therapie möglich [3, 10]. Indikationen sind neben der Diagnose einer Osteoporose, Osteopenie oder einer BMD-Minderung ($T\text{-Score} \leq -1 \text{ SD}$) auch vorausgegangene Frakturen und eine mittels FRAX-ermittelte 10-Jahres-Wahrscheinlichkeit für eine osteoporotische Fraktur von $\geq 20 \%$ [10]. Mittel der ersten Wahl sind Bisphosphonate (z. B. Alendronat, Risedronat) [3, 10, 68, 69]. Diese Pyrophosphat-Analoga reduzieren die Knochenresorption, fördern die Knochenformation [69, 115] und vermindern somit das Frakturrisiko. Sie werden sowohl therapeutisch als auch präventiv eingesetzt [3, 10, 68, 69, 72, 83, 115]. Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) wie Raloxifen [3, 10, 69, 72, 115, 279, 320] zeigen eine Östrogen-ähnliche Wirkung und verringern über die Reduktion der Knochenresorption das Frakturrisiko von Wirbelkörpern [10, 69, 115]. Das rekombinante Peptidhormon und PTH-Analogon Teriparatid [10, 69] besitzt als einziges Osteoporose-Medikament osteoanabole Eigenschaften [10, 69, 320]. Durch einen BMD-Anstieg in kortikalem bzw. spongiossem Knochen senkt es das Risiko für osteoporotisch bedingte Frakturen [3, 10, 68, 69, 72]. Ergänzend wird bei der Osteoporose-Therapie der RANKL-Inhibitor Denosumab eingesetzt [3, 10, 69, 179]. Der monoklonale Antikörper hemmt die RANK/RANKL-Wechselwirkung und folglich die Knochenresorption. Sein Effekt ist mit dem des Bisphosphonats Alendronat vergleichbar [10, 179]. Der minimierte Knochenabbau reduziert das Frakturrisiko für kortikale und trabekuläre Knochenstrukturen [279].

Die epidemiologische Analyse belegt den hohen gesellschaftlichen Stellenwert der Osteoporose: 2003 waren in Deutschland ca. 7,8 Millionen Menschen im Alter von ≥ 50 Jahren an Osteoporose erkrankt (6,5 Millionen Frauen, 1,3 Millionen Männer) [126, 141]. Die Prävalenz betrug ca. 26 %; wobei die Prävalenz bei Frauen (ca. 39 %) signifikant höher lag als bei Männern (ca. 9,7 %) [126, 141]. Zudem stieg die Prävalenz mit zunehmendem Alter [126, 141]. Bei Frauen ab 75 Jahren betrug die Prävalenz ca. 50 % [126, 134, 141]. Von den an Osteoporose erkrankten Menschen erlitten ca. 4,3 % mindestens

Theoretische Grundlagen

eine osteoporotisch bedingte Fraktur [126, 141]. Die häufigsten Fragilitätsfrakturen waren Hüftfrakturen (99973 Patienten), gefolgt von Unterarm-/Handgelenksfrakturen (42242 Patienten) bzw. Wirbelkörperfrakturen (40741 Patienten) [126, 141]. Der „disability-adjusted life years“- (DALY)-Wert bildet die durch eine Erkrankung oder Behinderung „verlorenen“ gesunden Jahre ab. Danach haben osteoporotisch bedingte Frakturen europaweit eine höhere Bedeutung als die Koronare Herzkrankheit (KHK) oder die Rheumatoide Arthritis [147]. Für eine 50-jährige Frau in Europa ist das Risiko für eine osteoporotisch bedingte Fraktur höher als das Risiko ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden oder an einem Mammakarzinom zu erkranken [15, 33]. Die Präsenz der Erkrankung spiegelt sich auch in der ökonomischen Belastung des deutschen Gesundheitssystems wider [35, 126, 134, 141]. 2003 betrug die durch Osteoporose verursachten Kosten ca. 4,5 Milliarden Euro und bei Einbindung der krankheitsbezogenen Langzeitpflege ca. 5,4 Milliarden Euro [141]. Aufgrund des demographischen Wandels werden steigende Kosten prognostiziert, so dass zukünftig ca. 44,5 % der durch Frakturversorgungen verursachten Kosten bei Frauen im Alter von ≥ 50 Jahren auf eine Osteoporose zurückgehen werden [35, 126]. Die Kosten für die Frakturversorgung für osteoporotisch erkrankte Frauen im Alter von ≥ 50 Jahren liegen aktuell ca. dreimal höher als für gesunde Frauen in derselben Altersgruppe [35, 126].

3 Hypothese und Zielsetzung

Die Osteoporose und die mit ihr assoziierten Frakturen sind eine medizinische und sozioökonomische Herausforderung für das Gesundheitswesen [204]. Trotz effizienter Medikamente und interventionell-chirurgischer Maßnahmen erweist sich die Verhinderung osteoporotisch bedingter Frakturen und die rechtzeitige, individuell angepasste Indikationsstellung zur Therapieeinleitung bei Hochrisikopatienten als schwierig [149, 180].

Zur Analyse der Pathogenese der Osteoporose und zur Identifikation neuer Behandlungsmöglichkeiten existieren Tiermodelle in Mäusen, Ratten oder Primaten [91], die neben orthopädischen Parametern (z. B. Knochenbrüchigkeit, Knochenheilung, Implantat-Verankerungen) auch pharmakologische Parameter (z. B. Knochenstoffwechsel, Knochenumbau) berücksichtigen [91]. Das senile Rattenmodell eignet sich zur Untersuchung osteoporotisch veränderter trabekulärer bzw. spongiöser Knochenstrukturen (z. B. Wirbelkörper) [91, 341]. In einem Beobachtungszeitraum von zwölf Monaten zeigen die Ratten osteoporotische Veränderungen, die denen im Menschen ähneln [166]. Obwohl sich die Skelettsysteme von Ratten und Menschen ähneln, wurden mit diesem Osteoporose-Modell aber auch teils widersprüchliche Ergebnisse erzielt [91, 166]. Dazu zählten ein mangelnder Knochenverlust bei der Osteoporose-Induktion, ein BMD-Anstieg und ein Zuwachs an Knochenmasse [166]. Im senilen Rattenmodell reicht eine bilaterale Ovariectomie zur Simulation des Knochenverlusts bei osteoporotischen Patienten nicht aus [91].

Im Rahmen der vorliegenden Studie erhielten die Tiere neben einer bilateralen Ovariectomie eine Kalzium- bzw. Vitamin D-arme Diät. Diese zusätzliche nutritive Behandlung sollte die Effekte auf die Knochenmatrix und den Knochenmetabolismus verstärken. Zur Analyse der Effekte der Interventionen (bilaterale Ovariectomie, Multidefizienzdiät, bilaterale Ovariectomie + Multidefizienzdiät) auf den Knochenstoffwechsel wurden die Wirbelkörper L3 der unterschiedlich behandelten Tiere mit histologischen Färbemethoden und enzym- bzw. immunhistochemischen Analysen untersucht.

Hypothese und Zielsetzung

Folgende Parameter wurden dabei bestimmt:

- Knochenfläche
- mineralisierte Knochenfläche, Knorpelfläche, Knochenmarkfläche, Osteoidfläche
- Osteozyten - Gesamtanzahl sowie Anzahlen spindelförmiger, runder und leerer apoptotischer Zellen
- Osteoklasten - mittlere Osteoklasten-Anzahl, mittlere Osteoklasten-Länge und Osteoklasten-Aktivität
- Osteocalcin-positive Fläche (Osteoblasten-Parameter)

Mit den vorliegenden Versuchen soll die folgende Hypothese evaluiert werden:

Eine Kombination aus bilateraler Ovariectomie und Kalzium- bzw. Vitamin D- armer Diät in dem senilen Rattenmodell führt zu einer ausgeprägteren Form der Osteoporose als die Einzelbehandlungen.

Das optimierte Modell soll helfen, neue medikamentöse Interventionsmöglichkeiten zur Prävention bzw. Therapie der Osteoporose zu entwickeln.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 35 weibliche Sprague-Dawley-Ratten (Firma Envigo, Roßdorf, Deutschland) im senilen Alter von 45–48 Wochen ausgewählt. Die Tierversuche fanden unter veterinärmedizinischer Aufsicht in der Zentralen Forschungseinrichtung (ZFE) des Fachbereichs Medizin der Goethe-Universität Frankfurt am Main statt. Die Versuche wurden mit Einverständnis der zuständigen Tierschutzkommissionen des Regierungspräsidiums Darmstadt (Dezernat V54 – Veterinärwesen und Verbraucherschutz, Wilhelminenstraße 1–3, Wilhelminenhäuser, 64283 Darmstadt, Deutschland) und unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Der Antrag des Teilprojekts T1 des Sonderforschungsbereichs Transregio 79 auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (Genehmigungsnummer F11/1083) wurde am 09.06.2015 durch das Regierungspräsidium Darmstadt positiv beschieden. Die Zustimmung der zuständigen Ethik-Kommission des Regierungspräsidiums Darmstadt erfolgte am 08.10.2015.

4.2 Studiendesign

Die Sprague-Dawley-Ratten wurden für den Versuchszeitraum in mit Nistmaterial und Unterschlupfen ausgestatteten Typ IV Käfigen untergebracht und einen Monat mit einer Standarddiät gefüttert und akklimatisiert (s. Kap. 13.1). Während der Versuchsdauer wurde eine artgerechte Haltung und tierärztliche Versorgung fortlaufend gewährleistet. Zu Beginn der Versuche erfolgte die randomisierte Aufteilung in fünf Versuchsgruppen. Zum Ausgangszeitpunkt 0 Monate (M) wurde die senile Osteoporose-Induktion mittels folgendem Stufenschema (Abb. 11) eingeleitet:

- Kontroll-(K)-Gruppe (n=7): Die unbehandelten Tiere dienten der Beurteilung der physiologischen Knochenparameter. Sie wurden zum Ausgangszeitpunkt 0M euthanasiert.
- Schein-(Sch)-Gruppe (n=7): Bei den Tieren wurde eine Operation ohne Ovariectomie durchgeführt, um einen möglichen Placebo-Effekt darzustellen.
- Ovariectomie-(OVX)-Gruppe (n=6): Bei den Tieren wurde eine bilaterale Ovariectomie durchgeführt, um eine postmenopausale Osteoporose herbeizuführen.

Material und Methoden

- Diät-(D)-Gruppe (n=7): Die Tiere wurden scheinoperiert und erhielten eine Multidefizienzdiät (s. Kap. 13.1), um den metabolischen Einfluss auf die Entwicklung der Osteoporose zu untersuchen.
- Ovariectomie+Diät-(OVXD)-Gruppe (n=8): Die Tiere erhielten eine beidseitige Ovariectomie und eine Multidefizienzdiät, um den endokrin und metabolisch bedingten Knochenschwund zu analysieren.

Nach zweiwöchiger postoperativer Genesung erhielten die Versuchstiere der Sch-Gruppe und OVX-Gruppe im weiteren Verlauf eine Standarddiät und die Tiere der OVXD- und D-Gruppe eine Mangel diät. Am Ende des Versuchszeitraums (3M) wurden alle Tiere euthanasiert. Zur weiteren Analyse wurden Knochen (u. a. Wirbelkörper L3) und Organe entnommen.

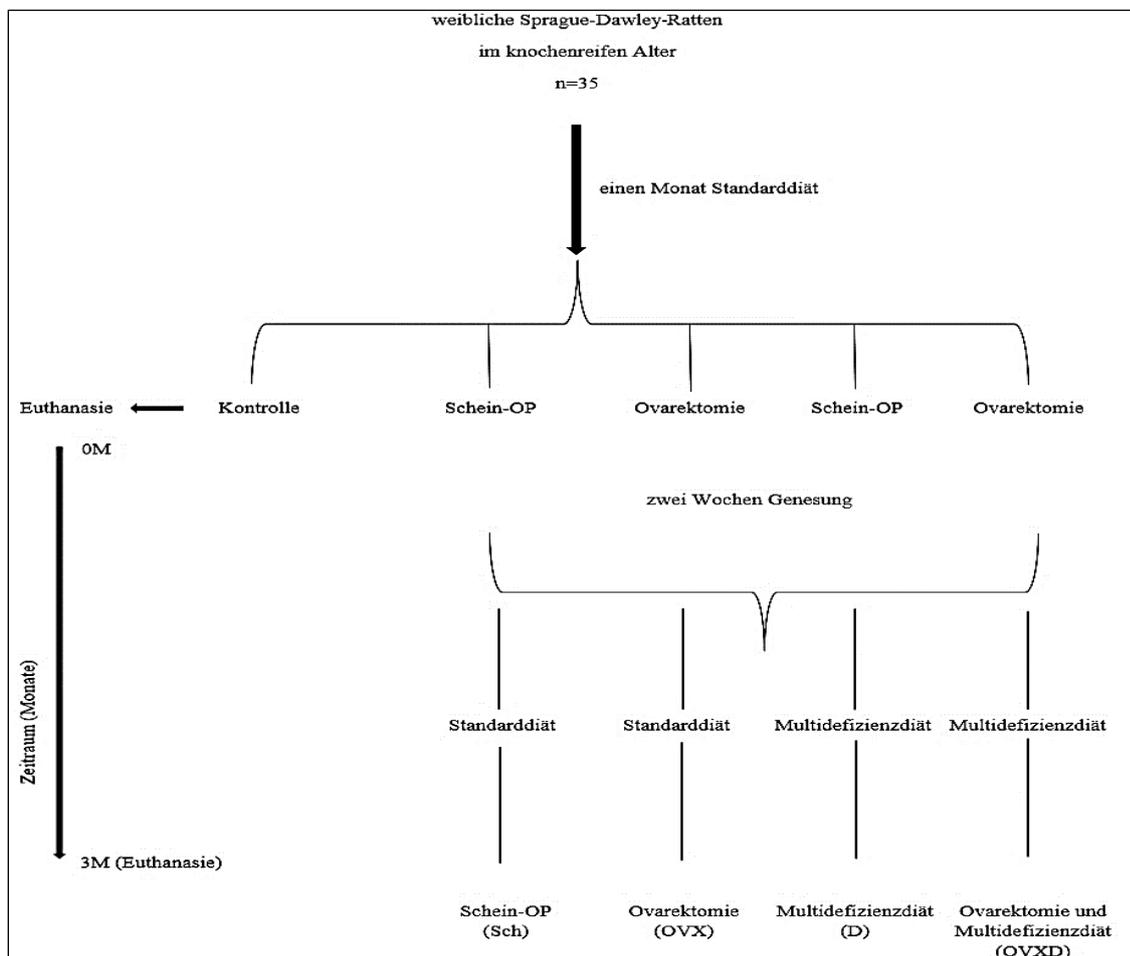


Abbildung 11: Stufenschema der senilen Osteoporose-Induktion im Rattenmodell

35 weibliche Sprague-Dawley-Ratten wurden in fünf Versuchsgruppen eingeteilt. Die Kontrollgruppe wurde zum Ausgangszeitpunkt 0 Monate (M) euthanasiert. Die Tiere der anderen Versuchsgruppen wurden drei Monate (3M) nach Behandlungsbeginn euthanasiert. Eigene Darstellung.

4.3 Laborbedingungen und tiergerechte Haltung

Die Versuchstiere wurden unter standardisierten Laborbedingungen bei einer Raumtemperatur von 22 ± 2 °C, einer relativen Luftfeuchte von 45–65 % und einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Ratten wurden regelmäßig gewogen. Die artgerechte Versorgung wurde durch erfahrenes, veterinärmedizinisches Personal sichergestellt. Die chirurgischen Interventionen, die postoperative Nachsorge und die Euthanasie erfolgten unter tierärztlicher und tierpflegerischer Aufsicht. Zu jedem Zeitpunkt erhielten alle Versuchsgruppen unbegrenzt Zugang zu Wasser und Futter. Die Tierfütterung erfolgte entsprechend der Gruppenzugehörigkeit.

4.4 Tierdiäten

Die Ratten der Sch-Gruppe und der OVX-Gruppe erhielten im gesamten Versuchszeitraum eine Standarddiät (Altromin C1000, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) [7]. Diese basierte mehrheitlich auf Getreide (Soja, Weizen, Mais) und wurde vor dem Ausgangszeitpunkt (0M) allen Versuchstieren gegeben. Das Alleinfuttermittel erfüllte den Tagesbedarf an Nährstoffen (s. Kap. 13.1). Die Tiere der D-Gruppe und der OVXD-Gruppe erhielten zwei Wochen nach der chirurgischen Intervention eine Kalzium-, Vitamin D-, Vitamin K- und Phosphor-arme Sonderdiät (Altromin C1034, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) [7]. Das Futtermittel enthielt 0 % Vitamin D, 15 % Kalzium, 7 % Phosphor, 50 % Vitamin K und 75 % Kalium im Vergleich zur Standarddiät (s. Kap. 13.1). Der Energiegehalt der beiden Diätvarianten war nahezu identisch (3518 kcal/kg vs. 3663 kcal/kg).

4.5 Operationsablauf

4.5.1 Anästhesie

Zur Narkoseeinleitung für die chirurgischen Interventionen (Scheinoperation oder bilaterale Ovariectomie) wurde intravenös 62,5 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin (Hostaket®, Parke-Davis, Freiburg, Deutschland) und 7,5 mg/kg KG Xylazin (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) verabreicht. Beides wurde zuvor jeweils in 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt. Die Prämedikation wurde mittels steriler Venenverweilkanüle (Vasofix®, 26 Gauge, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in die Vena caudalis mediana injiziert.

4.5.2 Bilaterale Ovariectomie und Scheinoperation

Nach der Narkoseeinleitung wurden die Versuchstiere ventral auf eine auf 38 °C erwärmte Heizmatte gelagert, die Extremitäten fixiert und der Lendenwirbelbereich freipariert (Rasierer für Labornager, Indulab AG, Gams, Schweiz). Das Operationsgebiet wurde gesäubert, ausgedehnt desinfiziert (Braunol®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und ergänzend steril abgedeckt. Mittels eines Skalpells wurde ein 1,5 cm langer Hautschnitt über den Lendenwirbelbereich gesetzt und das Bindegewebe zwischen Muskulatur und Haut stumpf freipräpariert. Für eine ausreichende Sicht auf den Operationssitus wurden die Bauchhöhle mit einer Pinzette eröffnet sowie die Geschlechtsorgane samt Uterus dargestellt und nach außen mobilisiert. Die Ovarien wurden mittels resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl 5-0, United States Pharmacopeia (USP) 5/0, Metric 1, Ethicon Johnson und Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) doppelt ligiert. Nach erfolgter Absetzung beider Ovarien und zum Ausschluss von Komplikationen wie Blutungen oder Perforationen wurden die mobilisierten Organe reponiert (Abb. 12). Die Bauchhöhle wurde mit resorbierbarem Fadenmaterial und zwei bis drei Einzelknoten vernäht. Zuletzt wurde die Haut mit Wundverschlussklammern verschlossen und erneut desinfiziert.

Das chirurgische Vorgehen bei den Scheinoperationen erfolgte nach demselben Prinzip. Die Ovarien wurden aber nach erfolgter Mobilisierung ohne Ligatur wieder ins Peritoneum zurückverlagert. Das Vorgehen bei den Tieren der Sch-Gruppe entsprach so weit wie möglich dem Vorgehen bei den Tieren der OVX- bzw. OVXD-Gruppe.

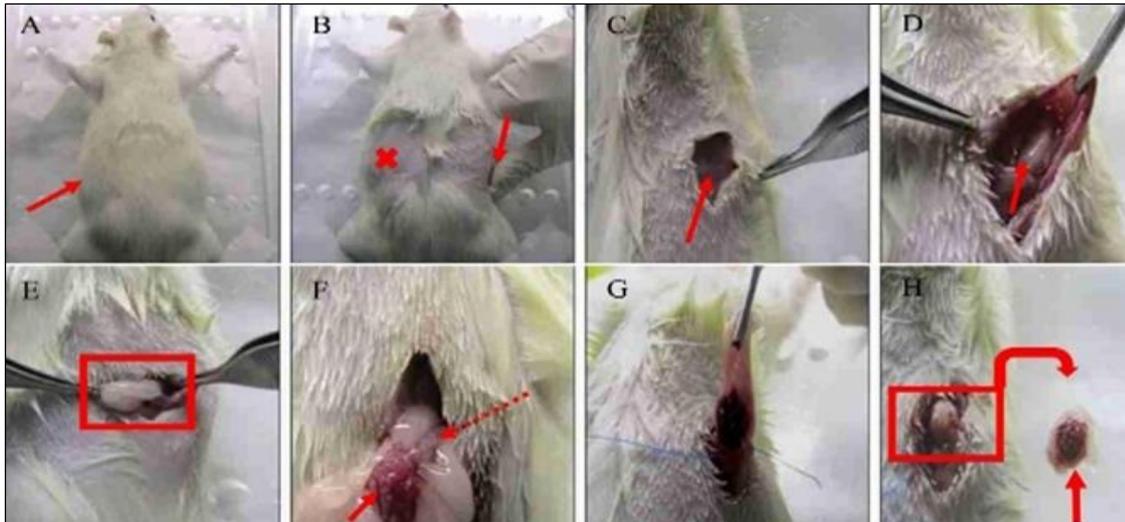


Abbildung 12: Ovariectomie bei einer Sprague-Dawley-Ratte

Der rote Pfeil kennzeichnet das zu rasierende Operationsgebiet (A). Die Inzisionsstelle ist durch die Vorwölbung (rotes Kreuz) oder durch Palpation mit dem Daumen (roter Pfeil) eruierbar (B). Anschließend erfolgt die Präparation des schrägen äußeren Bauchmuskels (roter Pfeil) (C). Nach Präparation des umliegenden Fettgewebes wird das Ovar vorsichtig mobilisiert (roter Pfeil, rotes Rechteck) (D, E). Bei der Ligation ist auf die Verbindung des Ovars (roter Pfeil) zum Eileiter (gestrichelter, roter Pfeil) zu achten (F, G). Abschließend wird das Ovar entfernt (rotes Rechteck und rote Pfeile) (H) [264].

4.5.3 Postoperative Nachsorge und Versorgung

Nach erfolgter chirurgischer Intervention wurden die Tiere bis zum Erlangen des Bewusstseins veterinärmedizinisch betreut. Neben der Kontrolle der Vitalparameter und des Allgemeinzustands wurde täglich der Heilungsverlauf der Operationswunde geprüft. Eine zusätzliche Schmerzmedikation von 0,2 mg/kg KG Meloxicam (Metacam®, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland) wurde präoperativ und fünf Tage postoperativ verabreicht. Zur Vermeidung gegenseitiger Verletzungen wurden die Versuchstiere fünf Tage nach der Operation in Einzelhaltung untergebracht. Das tierärztliche und pflegerische Personal prüfte im postoperativen Verlauf täglich das Allgemeinbefinden der Ratten. Ein erhöhter Bedarf an Schmerzmittel oder die Notwendigkeit einer Antibiotikatherapie bestand nicht.

4.5.4 Euthanasie und Probengewinnung

In Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit wurden die Tiere zum Ausgangszeitpunkt (0M) oder drei Monate (3M) nach dem Eingriff euthanasiert. Die Tötung erfolgte durch Inhalation von 100 %igem Kohlenstoffdioxid (CO₂) in einem Tötungsbehälter und anschließender zervikaler Dislokation. Als Kohlenstoffdioxid-Quelle dienten Druckgasflaschen. Die Kohlenstoffdioxid-Flussrate von 6 l/min wurde laufend mit einem Messgerät digital kontrolliert. Auf die Einhaltung arbeitsschutzrechtlicher Vorschriften und der tierschutzkonformen Durchführung wurde jederzeit geachtet.

Nach der Euthanasie wurden die Versuchstiere in Rückenlage gebracht, um sich von ventral Zugang zur Bauchhöhle zu verschaffen. Die inneren Organe (z. B. Herz, Leber, Niere, Milz, Lungen) und Extremitäten wurden für andere Forschungszwecke und Fragestellungen entnommen und an die jeweiligen Forschungsgruppen übergeben. Die Wirbelsäule wurde in die einzelnen Wirbelkörper aufgeteilt. Die Wirbelkörper wurden vom umliegenden Bindegewebe und den Bandscheiben befreit. Die Wirbelkörper L3 wurden für histomorphometrische und immunhistochemische Analysen in das Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen verbracht.

4.6 Herstellungsprozess von Knochenschnitten

Von den vom umliegenden Weichteilgewebe befreiten Wirbelkörpern L3 wurden Paraffinschnitte erstellt (s. Kap. 13.4). Mithilfe von histologischen Färbungen und histomorphometrischen Analysen wurden der Knochenaufbau und die Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten untersucht.

4.7 Paraffinschnitt-Technik und Probeneinbettung

Für die Herstellung der Paraffinschnitte wurde das Knochengewebe fixiert (s. Kap. 13.2). Die Fixierung erfolgte mit Paraformaldehyd (PFA; 4 % PFA-Lösung in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,2–7,4) über 48 h bei 4 °C (s. Kap. 13.2). Die in Formalin fixierten Knochenproben wurden sechsmal mit 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,2–7,4) gewaschen. Die Gewebelöcke wurden für den folgenden Dekalzifikationsprozess in Einbettungskassetten aus Polymer gelegt (s. Kap. 13.3). Die Dekalzifizierung erfolgte über eine gewebeschonende Ethylendiamintetraessigsäure-(EDTA)-Entkalkung (3,4 % EDTA /10 % Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-Lösung)) über einen Zeitraum von vier Wochen. Die Entkalkungslösung wurde alle zwei Tage erneuert. Nach der Dekalzifizierung wurden die Knochenproben für 1 h unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Entwässerung und Einbettung erfolgte mit einem Entwässerungsautomaten (Leica Tissue Processor (TP) 1050, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) und einem stufenweisen Entwässerungsschema mit einem Xylol-Intermedium (Tab. 1), das sowohl alkohol- als auch paraffinverträglich war.

Tabelle 1: Entwässerungsschema der Paraffineinbettung

Medium	Dauer	
70% Alkohol	2 h	} Entwässerung
80% Alkohol	2,5 h	
96% Alkohol	2 h	
100% Alkohol	3 x 3 h	
Xylol	1 h	} Intermedium
Xylol	2 x 45 min	
Paraffin	3 x 40 min	→ Infiltration mit Paraffin

Nach der Umbettung in Metallgefäße wurde das Paraffin auf einer Kälteplatte bei -20 °C gehärtet. Die entstandenen Paraffinblöcke wurden mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM355S Coolcutsystem, Thermo Scientific, Massachusetts) in 6 µm dicke Querschnitte mit einer Schnitthöhe von 4 µm geschnitten. Diese wurden mittels einer Schneide mit 34° Schnittwinkel und 80 mm Länge angefertigt. Die Schnitte wurden in ein 42 °C warmes Wasserbad gelegt, wo sie sich ausdehnten. Abschließend wurden die Schnittpräparate auf SuperFrost Plus Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) gebracht und über Nacht bei 37 °C in einem Wärmeschrank getrocknet, um dauerhafte Präparate herzustellen (s. Kap. 13.4).

4.8 Histologische Färbemethoden

4.8.1 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Die HE-Färbung lieferte einen orientierenden Überblick über die verschiedenen Gewebestrukturen (Abb. 13). Bei der Färbung stellten sich die Muskulatur rot, das Bindegewebe hellrot und die Erythrozyten leuchtend rot dar. Das Hämatoxylin färbte basophile Strukturen (z. B. Zellkerne, Ribosomen) blau und der synthetische Farbstoff Eosin azidophile Strukturen (z. B. Mitochondrien, Zellplasmaproteine) rot. Ergänzend wurden pathologische und entzündlich-degenerative Veränderungen untersucht. Das Färbeprotokoll und die Reagenzien sind im Anhang dokumentiert (s. Kap. 13.5).

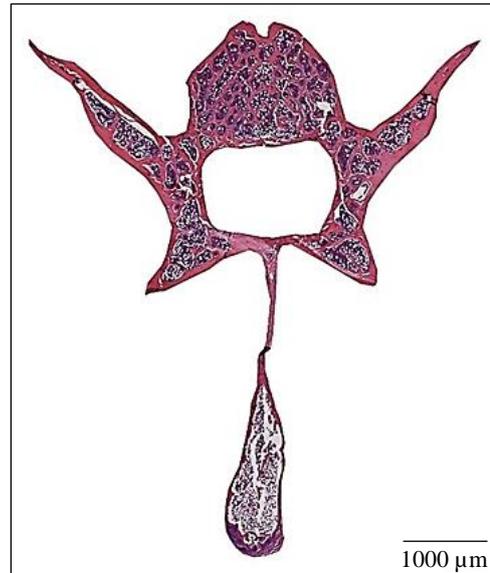


Abbildung 13: Histologische Übersichtsaufnahme des dritten Lendenwirbels (L3) nach Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung im Querschnitt bei einer Schnitthöhe von 4 μm

Übersichtsaufnahme eines Wirbels L3 aus der Schein-(Sch)-Gruppe. Rote Färbung: azidophile Strukturen (z. B. Mitochondrien, Zellplasmaproteine, Kollagen). Blaue Färbung: basophile Strukturen (z. B. Ribosomen). Eigene Aufnahme.

4.8.2 Movat-Pentachrom-Färbung

Die Movat-Pentachrom-Färbung erlaubte eine Unterscheidung verschiedener Weich- und Hartgewebe auf zellulärer und extrazellulärer Ebene (Abb. 14). In Abhängigkeit von den Bindegewebskomponenten und vom Mineralisationsgrad wurden Knorpel- und Knochenstrukturen unterschiedlich gefärbt. Zellkerne erschienen schwarz, das Zytoplasma und die elastischen Fasern rötlich, das kollagene Bindegewebe hellgelb, die Muskulatur rot, das Osteoid dunkelrot, nicht-mineralisiertes Knorpelgewebe blaugrün und mineralisiertes Knochengewebe dunkelgelb. Das Färberegebnis wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Anhand der histomorphometrischen Quantifizierung ließ sich der mineralisierte Anteil des Knorpel- und Knochengewebes bestimmen. Das Färbeprotokoll und die Reagenzien sind im Anhang dokumentiert (s. Kap. 13.6).

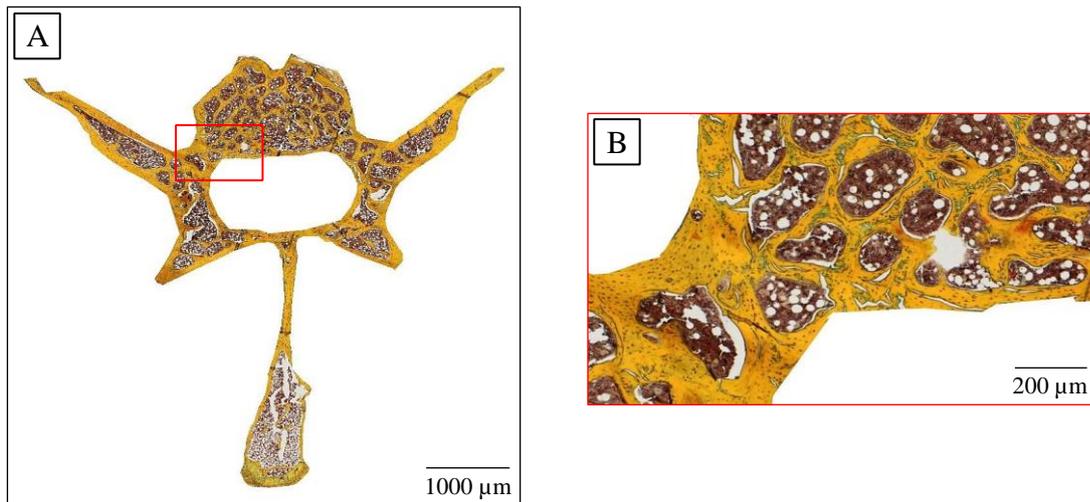


Abbildung 14: Histologische Übersichtsaufnahme des dritten Lendenwirbels (L3) nach Movat-Pentachrom-Färbung im Querschnitt bei einer Schnitthöhe von 4 µm

(A) Übersichtsaufnahme eines Wirbels L3 aus der Schein-(Sch)-Gruppe. (B) Detailaufnahme: mineralisierte Knochenmatrix (dunkelgelb), nicht-mineralisiertes Knochengewebe (dunkelrot), mineralisiertes Knorpelgewebe (gelbgrün), nicht-mineralisiertes Knorpelgewebe (blaugrün). Eigene Aufnahme.

4.8.3 Silbernitrat-Färbung

Die Silbernitrat-Färbung ermöglichte die Darstellung von Osteozyten und deren lakunokanalikulärem Netzwerk. Die Färbung basierte auf einer Reaktion der Silber-Ionen mit den Karbonat- und Phosphat-Ionen des Kalksalzes in den Knochen. Hierbei wurden die Kalzium-Ionen durch Ameisensäure verdrängt und die mineralisierten Teile des Knochens braun gefärbt. Basierend auf der Morphologie der Osteozyten ließen sich Aussagen bezüglich der Aktivität, des Alters und potenzieller Zellinteraktionen treffen. Zellinteraktionen waren zwischen Osteozyten, zwischen Osteozyten und Osteoblasten und zwischen Osteozyten und Osteoklasten möglich. Aktivierte Osteozyten waren durch große Zellkörper, einem spindelförmigen Aufbau und einem komplexen Geflecht aus Kanalikuli gekennzeichnet. Osteozyten im Zwischenstadium zeigten eine sphärische Zellkörperform. Inaktive bzw. apoptotische Osteozyten waren an den leeren Knochenlakunen erkennbar. Anhand dieser morphologischen Kriterien ließen sich die drei Osteozyten-Arten ermitteln und manuell auszählen. Das Färbeprotokoll und die Reagenzien sind im Anhang dokumentiert (s. Kap. 13.7)

4.9 Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP)

Mittels Enzymhistochemie lassen sich Enzymaktivitäten in Gewebeschnitten und Ausstrichen lokalisieren. Dabei werden farblose, lösliche Substrate von in den Geweben vorhandenen Enzymen zu unlöslichen Farbstoffen umgesetzt. Der hochspezifische Nachweis

von Enzymaktivitäten in Zellen erlaubt eine elektive Darstellung und Quantifizierung von Zellgewebsstrukturen.

Der enzymhistochemische TRAP-Nachweis diente der Analyse der Osteoklasten-Aktivität. Die TRAP ist ein basisches, eisenbindendes Enzym, das von Makrophagen und Osteoklasten synthetisiert wird. Die aktive Isoform 5b TRAP wird spezifisch von knochenabbauenden Osteoklasten sezerniert und gilt somit als Markerenzym für diesen Zelltyp. In den Paraffinschnitten dienen Naphtol-AS-TR-Phosphat (N6125, Merck, Darmstadt, Deutschland) und N,N-Dimethylformamid (D-4551, Merck, Darmstadt, Deutschland) als Substratlösung für die TRAP. Zusätzlich wurde di-Natriumtartrat-Dihydrat (Bestellnummer 1.06663.0250, Merck, Darmstadt, Deutschland) in die Lösung gegeben, um andere saure Phosphatasen zu hemmen. Die TRAP in den Osteoklasten katalysierte die Umsetzung der Naphtolester zu α -Naphtol, das mit dem Echtrotsalz (Bestellnummer 89453-69-0, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) zu dem charakteristischen roten Farbstoff reagierte (Abb. 15). Die Zellkerne waren bläulich gefärbt. Die folgende histomorphometrische Auswertung ermöglichte eine Analyse der gefärbten Trabekeloberfläche und der Anzahl der Osteoklasten. Das Färbeprotokoll und die Reagenzien sind im Anhang dokumentiert (s. Kap. 13.8).

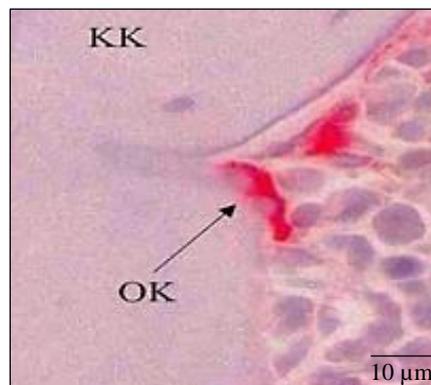


Abbildung 15: Histologische Darstellung der Osteoklasten im kortikalen Knochen des dritten Lendenwirbels (L3) im Querschnitt bei einer Schnitthöhe von 4 µm – Nachweis über die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)

Die Aufnahme zeigt einen am kortikalen Knochen (KK) anliegenden Osteoklasten (OK). Das Präparat stammt aus der Schein-(Sch)-Gruppe. Eigene Aufnahme.

4.10 Immunhistochemischer Nachweis von Osteocalcin

Die Immunhistochemie (IHC) dient dem Nachweis von Antigenen (Proteine, Polysaccharide u.a.) auf Zell-, Gewebsstrukturen oder in der extrazellulären Matrix mittels Antigen-Antikörper-Reaktionen (Abb. 16). Bei der direkte IHC ist ein Enzym oder Fluorophor (z. B. Rhodamin, Fluorescein) an den Primärantikörper gekoppelt. Die Antigen-Antikörper-Komplexe werden durch Zugabe eines chromogenen Substrates nachgewiesen. Bei der indirekten IHC wird der an das Antigen gebundene Primärantikörper durch einen markierten Sekundärantikörper gebunden. Auch hier erfolgt der Nachweis der „Antigen-Antikörper-Antikörper-Komplexe“ mittels eines chromogenen Substrats.

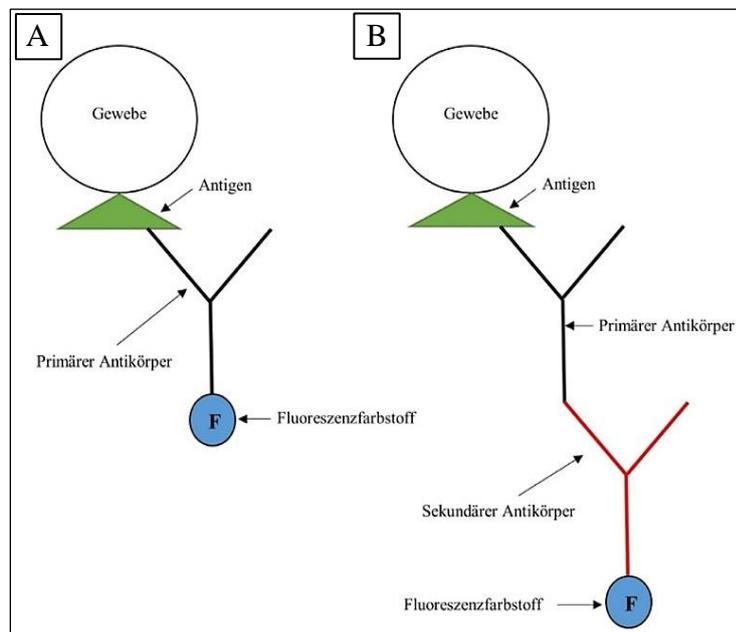


Abbildung 16: Direkte Immunhistochemie (A) und die indirekte Immunhistochemie (B)
Eigene Darstellung.

Als nicht-kollagenes Protein der extrazellulären Matrix wird Osteocalcin von aktiven Osteoblasten synthetisiert und gilt daher als Marker der osteoblastären Differenzierung. Osteocalcin wirkt inhibierend auf die Knochenmineralisation [375]. Für die Osteocalcin-IHC wurde ein monoklonaler muriner Primärantikörper (1:200 mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt) gegen humanes Osteocalcin (Bestellnummer MAB1419, R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) verwendet. Mit Hilfe des Blocking-Reagenzes von Bloxall (SP-6000, Vector Laboratories Incorporation, Burlingame, Kalifornien) wurden vor der Inkubation mögliche unspezifische Bindungsstellen des Osteocalcin-Antikörpers blockiert. Als Sekundärantikörper wurde biotinyliertes anti-Maus Immunglobulin (IgG, made in horse, Vector Laboratories Incorporation, Burlingame, Kalifornien, 1:150 in PBS-Puffer verdünnt) genutzt. Als Chromogen diente der

ABC-AP Komplex (Anti-Kaninchen IgG, Vector Laboratories Incorporation, Burlingame, Kalifornien). Der Osteocalcin-Nachweis erfolgte mittels Magenta-System (rote bis purpurähnliche Färbung) und die Gegenfärbung mit Methylgrün (Bestellnummer H-3402, Vector Laboratories Incorporation, Burlingame, Kalifornien). Nach der Kontrolle des Färberefolgs wurden die Ansätze histomorphometrisch mit ImageJ ausgewertet. Das Färbeprotokoll und die Reagenzien sind im Anhang dokumentiert (s. Kap. 13.9).

4.11 Fotomikroskopie

Für die Fotodokumentation der gefärbten Paraffinschnitte wurden zwei Fotomikroskope verwendet. Das Fotomikroskop Leica DM5500 (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit der Kamera Leica DCF 7000 T (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) und der zugehörigen Software Leica Application Suite X, 1.9.13747 (LAS X, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) diente zur Herstellung von Übersichtsaufnahmen der mit HE, Osteocalcin-IHC und Movat-Pentachrom gefärbten Präparate. Das Fotomikroskop Axioplan 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) mit der Kamera Leica DC 500 (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) und der zugehörigen Software Axio Vision (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) wurde für Detailaufnahmen der TRAP-Färbung verwendet. Bei der HE-Färbung und der Movat-Pentachrom-Färbung erfolgten die Übersichtsaufnahmen in 5-facher Vergrößerung. Die Osteocalcin-IHC-Präparate wurden in 10-facher Vergrößerung fotografiert. Für die Silbernitrat-Färbung wurde zur besseren Darstellung der Osteozyten eine 20-fache Vergrößerung gewählt. Die Aufnahmen für den enzymhistochemischen TRAP-Nachweis erfolgten in 40-facher Vergrößerung.

Für die Bildbearbeitung und Analyse wurde ImageJ (Version: 2.0.0-rc-15/ 1.49m, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) genutzt. Mittels computergestützter Histomorphometrie und mit dem ImageJ Plugin „Trainable Weka Segmentation“ wurde der prozentuale Flächenanteil der verschiedenen Gewebearten an der Gesamtfläche berechnet. Laut Arganda-Carreras et al. 2017 lassen sich mithilfe von ImageJ bzw. Fiji verschiedene biologische oder auch nicht-biologische Bilder analysieren, wodurch sich das kostenlose Programm in verschiedenen Forschungsbereichen etabliert hat [14]. Weitere Einzelheiten zur Nutzung sind im Anhang dokumentiert (s. Kap. 13.10).

4.12 Knochenhistomorphometrie

Zur Untersuchung der Knochenstrukturen und der Aktivität verschiedener Zelltypen wurde das Programm ImageJ genutzt. Das Plugin „Trainable Weka Segmentation“ diente der quantitativen Analyse der Knochenparameter (z. B. Mineralisationsgrad, Osteoid-Gehalt, Osteoklasten-Anzahl) [228]. Die Analyse erfolgte in Abhängigkeit vom gefärbten Präparat entweder allein durch das Plugin „Trainable Weka Segmentation“ oder zusätzlich durch eine selbstständige, manuelle Analyse. Die quantitative Analyse wurde anschließend durch den Untersucher überprüft, indem die einzelnen Parameter hinsichtlich ihrer Einteilung kontrolliert wurden. Der genaue „Trainingsvorgang“ wird am Beispiel der histomorphometrischen Analyse der HE-Färbung dargestellt (s. Kap. 4.12.1). Die Analyse wurde gemäß den Standards des American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) Nomenklatursystem durchgeführt [78, 263]. Folgende Hauptparameter wurden analysiert:

1. Knochenfläche: absoluter Wert
2. Mineralisierte Knochenfläche: absoluter Wert und Prozentanteil des kalzifizierten Knochens an der Gesamtknochenfläche des Wirbels
3. Knorpelfläche: absoluter Wert und Prozentanteil des Knorpelgewebes an der Gesamtknochenfläche des Wirbels
4. Osteoid/nicht-mineralisierte Knochenfläche: absoluter Wert und Prozentanteil des Osteoidgewebes an der Gesamtknochenfläche des Wirbels
5. Knochenmarkgewebe: absoluter Wert und Prozentanteil an der Gesamtknochenfläche des Wirbels
6. Osteozyten: Gesamtzahl an Osteozyten und der Subtypen spindelförmig, rund, leer im Verhältnis zur Gesamtknochenfläche des Wirbels
7. Osteoblasten-Parameter: Prozentanteil der Osteocalcin-positiven Flächen des Knochens an der Gesamtknochenfläche des Wirbels bzw. Gesamtfläche des Wirbels
8. Osteoklasten-Parameter: mittlere Anzahl und Länge der Osteoklasten im Verhältnis zur Gesamtknochenfläche des Wirbels

4.12.1 Histomorphometrische Analyse der HE-Färbung

Zunächst erfolgte die visuelle Auswertung der Präparate unter dem Lichtmikroskop. Der Fokus lag hierbei auf der Unterscheidung zwischen mineralisierter und nicht-mineralisierter Knochenmatrix. Der mineralisierte Knochenbereich stellte sich rot dar, die nicht-mineralisierte Knochenfläche rotviolett. Zur Beurteilung der Knochenmorphologie wurde der Prozentanteil der mineralisierten Knochenfläche an der Gesamtknochenfläche ermittelt. Hierzu wurden die in 5-facher Vergrößerung aufgenommenen Fotografien im Programm ImageJ geöffnet. Anschließend wurde die „region of interest“ (ROI) dargestellt, indem nicht zu analysierende Abschnitte (z. B. Muskulatur, Nervengewebe) mit der Option „Edit“ und dem Befehl „Clear Outside“ ausgeschnitten wurden. Nachfolgend wurde über „Image“ → „Adjust“ → „Crop“ das Bild auf die geringstmögliche Größe angepasst. Für die histomorphometrische Analyse des bearbeiteten Bildes wurde das halbautomatische Plugin „Trainable Weka Segmentation“ verwendet. Dazu wurde zunächst ein Bild manuell ausgewertet, woraufhin das Makro „Weka Stats“ automatisch die anderen Bilder derselben Färbung analysierte. Dafür ordnete das Plugin jedes Pixel eines Bildes nach seinem spezifischen Farbcode einer bestimmten Klasse zu (Abb. 17+18). Bei den Präparaten der HE-Färbung wurden zwei Klassen unterschieden. Der mineralisierte Knochenbereich wurde anhand der Rotfärbung der ersten Klasse zugeordnet. Andere Farben wie der Hintergrund (schwarz), der nicht-mineralisierte Knochenbereich (rotviolett), das Knochenmark (blau) und das Knorpelgewebe (violett) wurden der zweiten Klasse zugeteilt. Diese Zuordnung wurde als „Classifier“ gespeichert. Mit dem „Classifier“ konnten die anderen Präparate der HE-Färbung analysiert werden, wodurch eine Vergleichbarkeit der Auswertung gewährleistet war. Abschließend errechnete das Makro den prozentualen Anteil jeder Klasse an der Gesamtfläche. Die Werte wurden in einer Excel-Tabelle dargestellt. Damit wurde der mineralisierte Knochenbereich jedes HE-Präparats aus allen Versuchstiergruppen in absoluten Werten bestimmt. Dazu musste zunächst die Skalierung über einen Mikroskop-spezifischen Umrechnungsfaktor mit der Maßeinheit Pixel/ μm angepasst werden (Tab. 2). Dieser Wert hing von der gewählten Vergrößerung ab und bezifferte sich in diesem Fall auf 0,77 Pixel/ μm . Mit folgender Formel wurde die mineralisierte Knochenfläche in μm^2 berechnet:

$$x = \frac{y * z}{100 \%}$$

x = mineralisierte Knochenfläche in μm^2 ;
y = Gesamtfläche eines Bildes;
z = Prozentanteil der mineralisierten Knochenfläche

Tabelle 2: Mikroskop-spezifische Umrechnungsfaktoren in Abhängigkeit von der Vergrößerung

Vergrößerung im Mikroskop	Zeiss Mikroskop	Leica Mikroskop
2,5x	0,25 <i>pixel/μm</i>	0,39 <i>pixel/μm</i>
5x	0,5 <i>pixel/μm</i>	0,77 <i>pixel/μm</i>
10x	1 <i>pixel/μm</i>	1,55 <i>pixel/μm</i>
20x	2 <i>pixel/μm</i>	3,09 <i>pixel/μm</i>
40x	3,8 <i>pixel/μm</i>	6,17 <i>pixel/μm</i>

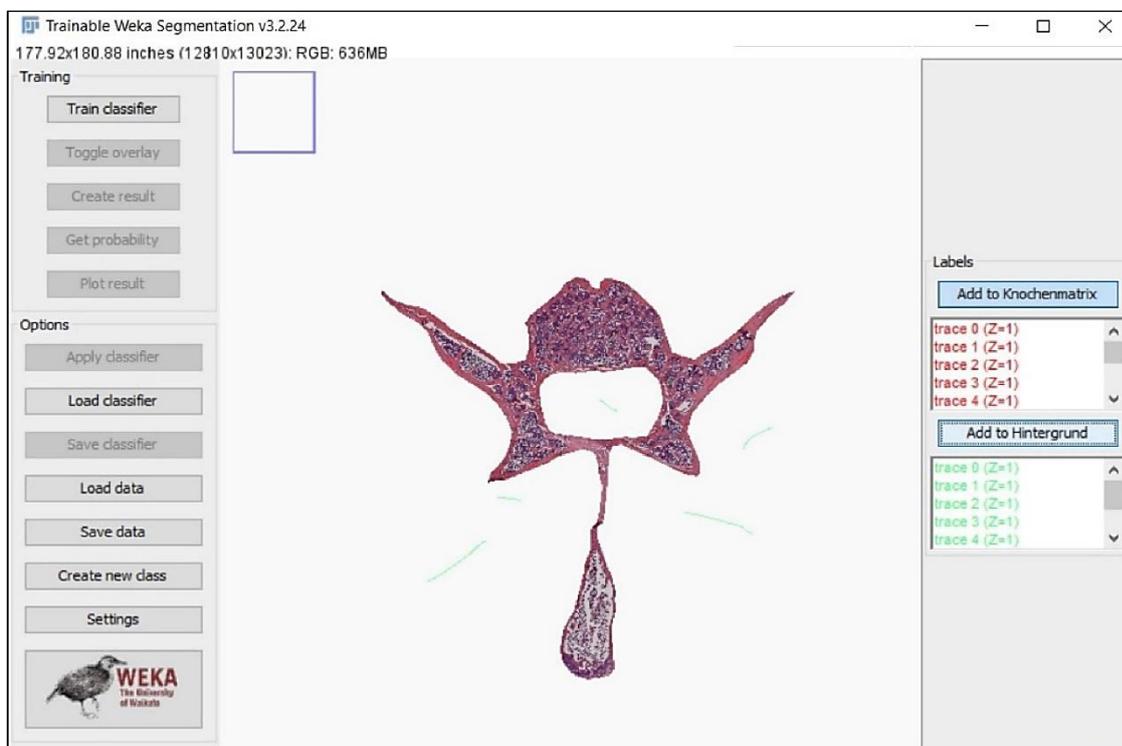


Abbildung 17: Vorbereitung der Auswertung des dritten Lendenwirbels (L3) nach der Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung im Querschnitt bei einer Schnitthöhe von 4 μm mithilfe des Plugins „Trainable Weka Segmentation“

Die beiden spezifischen Klassen werden als „Knochenmatrix“ und „Hintergrund“ bezeichnet. Das genaue Vorgehen wird in Kap. 4.12.1 beschrieben. Der dargestellte Wirbel L3 stammt aus der Schein-(Sch)-Gruppe. Eigene Darstellung.

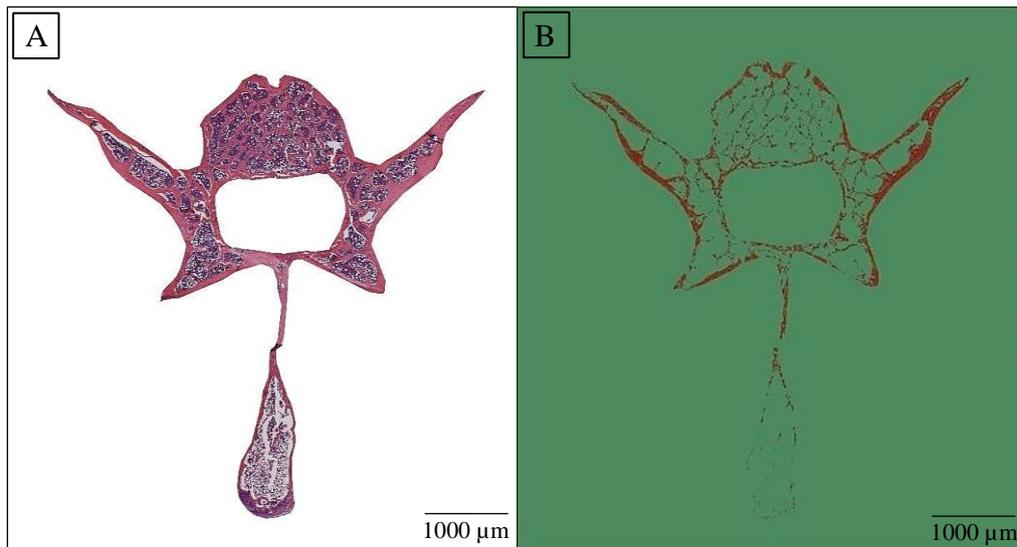


Abbildung 18: Klassifizierung des dritten Lendenwirbels (L3) nach der Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung im Querschnitt bei einer Schnitthöhe von 4 µm mithilfe des Plugins „Trainable Weka Segmentation“

(A) Wirbel L3 aus der Schein-(Sch)-Gruppe vor der Klassifizierung mittels des Plugins „Trainable Weka Segmentation“, (B) derselbe Wirbel nach der Klassifizierung. Eigene Darstellung.

4.12.2 Histomorphometrische Analyse der Movat-Pentachrom-Färbung

Die mit Movat-Pentachrom gefärbten Präparate erlaubten eine Identifizierung der Bestandteile des Bindegewebes. In den in 5-facher Vergrößerung aufgenommenen Übersichtsaufnahmen war mineralisierter Knochen dunkelgelb gefärbt, mineralisiertes Knorpelgewebe gelbgrün, nicht-mineralisierter Knorpel blaugrün sowie nicht-mineralisiertes Knochengewebe dunkelrot [228]. Mithilfe des Programm ImageJ wurde die ROI-Region zurechtgeschnitten und angepasst (s. Kap. 14.2.1). Danach wurden die Aufnahmen mit dem Plugin „Trainable Weka Segmentation“ ausgewertet. Entsprechend der Farbcodes erfolgte eine Einteilung in fünf Klassen: mineralisierte Knochenmatrix (dunkelgelber Bereich), Osteoid (dunkelroter Bereich), mineralisierter Knorpel (gelbgrüner Bereich), Knochenmark (brauner Bereich) und der Hintergrund (schwarzer Bereich). Anhand des für diese Färbung individuell erstellten „Classifier“ ermittelte das Makro „Weka Stats“ die Prozentanteile der fünf Klassen an der Gesamtfläche. Abschließend wurden mittels des Mikroskop-spezifischen Umrechnungsfaktors (s. Tab. 2) die Anteile in absoluten Werten (μm^2) umgerechnet.

4.12.3 Manuelle Untersuchung der Silbernitrat-Färbung

Osteozyten und deren kanalikulären Tunnelsysteme wurden mittels Silbernitrat-Färbung dargestellt. Dabei wurde die Osteozyten morphologisch in spindelförmige (aktive Form), kugelförmige (Zwischenstadium) und apoptotische (Zelltod/leere Lakune) Zelltypen differenziert (Abb. 19). Die Bilder wurden in 20-facher Vergrößerung ausgewertet. Zur Bestimmung der Osteozyten-Anzahl wurden die Zellen mit einem Hand-Klick-Zähler gezählt, wobei die drei Zelltypen (spindelförmig, kugelförmig, apoptotisch) unterschieden wurden. Die Summe der Osteozyten und bzw. Osteozyten-Subtypen aller Präparate ergab die Gesamtzellzahl und die Zellzahl der Subtypen. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit wurden die Werte auf die mineralisierte Knochenfläche normalisiert.

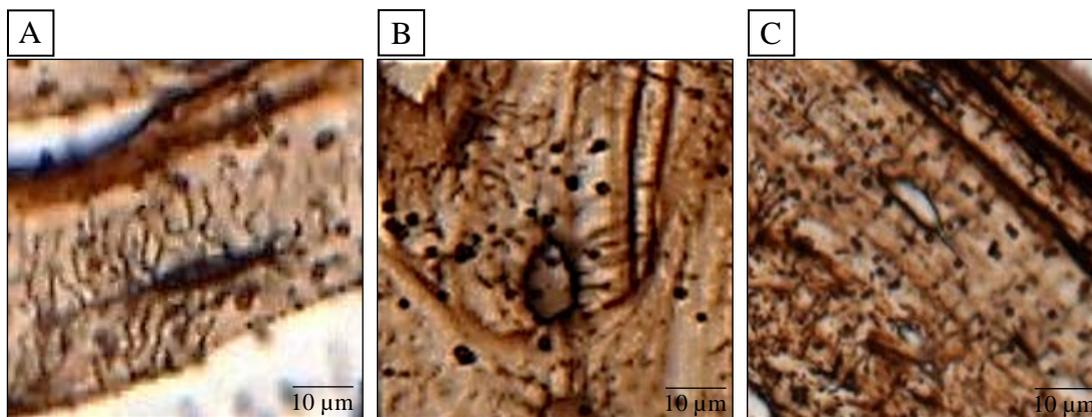


Abbildung 19: Osteozyten-Formen des dritten Lendenwirbels (L3) nach der Silbernitrat-Färbung im Querschnitt bei einer Schnitthöhe von 4 µm

(A) spindelförmiger Osteozyt mit charakteristischen Zellausläufern, (B) runder Osteozyt mit deutlich weniger Zellausläufern, (C) apoptotischer Osteozyt mit leerer, weißlicher Lakune. Die Präparate stammen aus der Diät-(D)-Gruppe. Eigene Aufnahme.

4.12.4 Manuelle Analyse der enzymhistochemischen TRAP-Färbung

Die TRAP-Färbung gab Aufschluss über die Anzahl, die Länge und die Aktivität der Osteoklasten. Neben einer TRAP-positiven Reaktion mussten die Zellen drei Kriterien erfüllen, um als Osteoklast klassifiziert zu werden:

1. Zellen mussten mehrere Kerne enthalten.
2. Zellen mussten an der Knochenoberfläche anliegen bzw. Kontakt zum Knochengewebe haben
3. Zellen mussten einen Faltensaum („ruffled border“) besitzen.

Um die obligaten Kriterien beurteilen zu können, waren Detailaufnahmen in 40-facher Vergrößerung erforderlich. Nach der Anpassung der Skalierung mit dem Programm ImageJ (Mikroskop-spezifischer Umrechnungsfaktor: 3,8 Pixel/µm) wurde die Osteoklasten-Anzahl und -Länge bestimmt. Die Gesamtzahl wurde manuell mittels Hand-

Klick-Zählers ermittelt, die Länge mithilfe der Option „Segmented lines“ (Abb. 20). Anschließend wurde die durchschnittliche Länge der Osteoklasten in jedem Präparat bestimmt. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit wurden die Werte auf die mineralisierte Knochenfläche normalisiert.

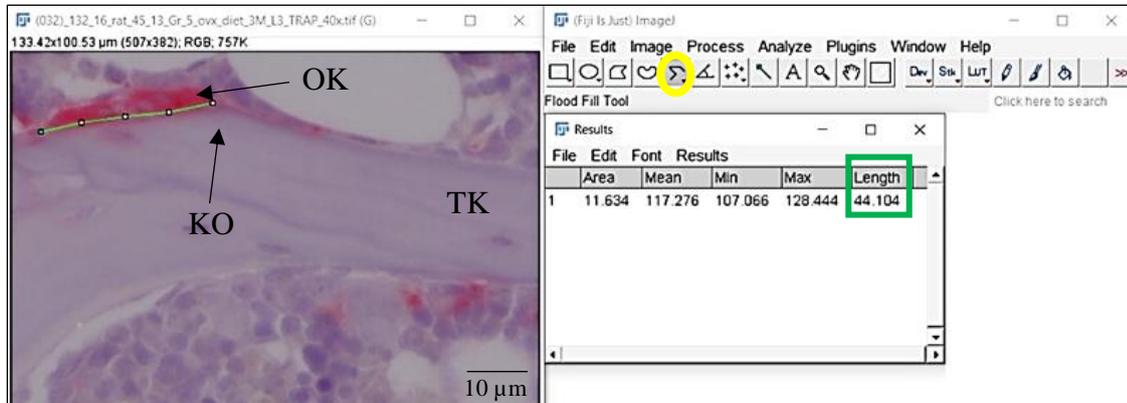


Abbildung 20: Manuelle Analyse des enzymhistochemischen Nachweises der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) mithilfe des Programms „ImageJ“

Ausschnitt aus einem TRAP-gefärbten dritten Lendenwirbelkörper (L3) im Querschnitt bei einer Schnitthöhe von 4 µm in 40-facher Vergrößerung aus der Ovariectomie+Diät-(OVXD)-Gruppe. Zunächst wurde bei den TRAP-positiven Zellen das Vorliegen der Osteoklasten-(OK)-Kriterien (mehrkernig, an der Knochenoberfläche (KO) des trabekulären Knochens (TK) anliegend, Vorliegen eines Faltensaums) überprüft. Waren diese erfüllt, wurde die TRAP-positive Zelle als OK definiert. Nach angepasster Skalierung wurde mittels der Option „Segmented Lines“ (gelber Kreis) die OK-Länge bestimmt. Nach Wahl der Option „Analyze“ → „Measure“ öffnete sich das Fenster „Results“ mit der gemessenen OK-Länge (grünes Rechteck). Eigene Darstellung.

4.12.5 Histomorphometrische Analyse der Osteocalcin-positiven Regionen

Der immunhistochemische Nachweis des Markers Osteocalcin erlaubte detaillierte Aussagen zu den Osteoblasten und deren Aktivität. Lichtmikroskopisch stellten sich Osteocalcin-positiv gefärbte Regionen rot dar, während hingegen die Knochenmatrix rosa erschien (Abb. 21).

Eine Differenzierung der Gewebsabschnitte gestaltete sich schwierig. Nach Verstärkung des Kontrastes über den Programmpfad „Process“ → „Enhance Contrast“ wurde eine Zuordnung möglich. Mit dem Programm ImageJ wurde die gesuchte ROI zugeschnitten. Die quantitative Analyse erfolgte mittels des Plugins „Trainable Weka Segmentation“. Die rot gefärbten und somit Osteocalcin-positiven Bereiche wurden einer Klasse zugeordnet. Die rosa gefärbten Areale wurden als Knochengewebe definiert (zweite Klasse). Alle anderen kolorierten Flächen wurden als Hintergrund festgelegt (dritte Klasse). Anhand des Makros „Weka Stats“ wurden die prozentualen Anteile der Klassen bestimmt und mit dem Mikroskop-spezifischen Umrechnungsfaktor (1,55 pixel/µm, s. Tab. 2) die absoluten Werte (µm²) der Osteocalcin-positiven Flächen berechnet. Die Knochenfläche ließ sich

in dieser Färbemethode nicht weiter differenzieren und beinhaltete neben nicht-mineralisiertem Knochengewebe auch Knochenmarkgewebe. Die Gesamtfläche setzte sich aus der Summe der drei definierten Klassen zusammen.

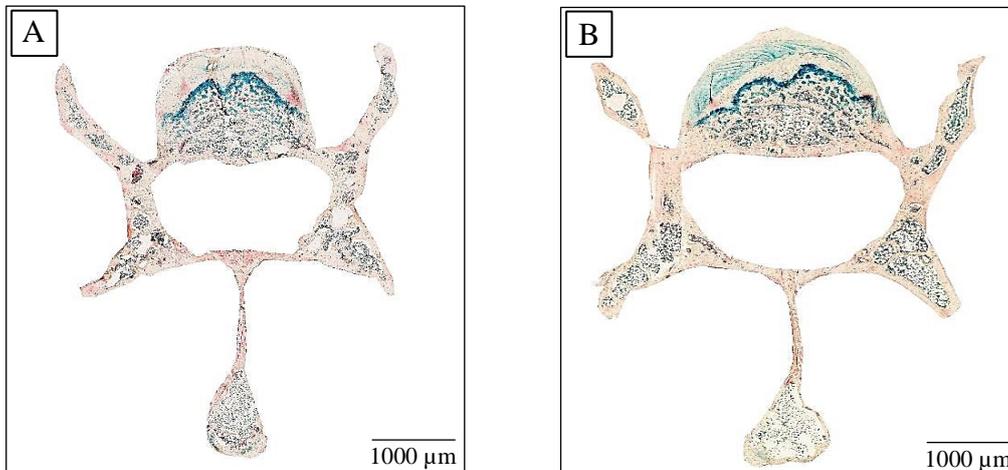


Abbildung 21: Histologische Übersichtsaufnahme des dritten Lendenwirbels (L3) nach dem immunhistochemischen Nachweis von Osteocalcin im Querschnitt bei einer Schnitthöhe von 4 µm
(A) Wirbel L3 aus der Kontroll-(K)-Gruppe, (B) Wirbel L3 aus der Ovarektomie-(OVX)-Gruppe. Knochengewebe = rosa, Osteocalcin-positive Areale = rot. Eigene Aufnahme.

4.13 Statistische Analyse

Die mit der manuellen und histomorphometrischen Analyse erhobenen Daten wurden in der Tabellenkalkulationssoftware Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) dokumentiert. Zur statistischen Datenauswertung wurde das Programm "International Business Machines Corporation" IBM SPSS Statistical Package 24.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA) verwendet. Folgende Daten wurden mittels Säulendiagrammen dargestellt: Knochenfläche, mineralisierte Knochenfläche, Osteoidfläche, Knorpelfläche, Knochenmarkfläche, Osteozyten-Anzahl (Gesamt und Subtypen: spindelförmig, rund, leer), Osteocalcin-positive Flächen als Osteoblasten-Parameter, Osteoklasten-Anzahl und -Länge sowie die Osteoklasten-Aktivität.

Die graphische Darstellung der histomorphometrischen Ergebnisse der HE-Präparate gab Auskunft über die Struktur des Knochens. Zudem dienten die Daten als Vergleichsparameter der Osteoklasten-Daten. Dazu wurde die Osteoklasten-Anzahl und die mittlere Osteoklasten-Länge auf die Knochenfläche bezogen. Das Verhältnis aus mittlerer Osteoklasten-Anzahl und mittlerer Osteoklasten-Länge definiert die Osteoklasten-Aktivität [151, 228]. Bei der histomorphometrischen Auswertung der Movat-Pentachrom-Färbung wurden die Gewebe in verschiedene Bindegewebskomponenten aufgeteilt. Das Knorpelgewebe, das Osteoid, das Knochenmark und die mineralisierte Knochenmatrix wurden

Material und Methoden

jeweils im Verhältnis zur gesamten Knochenfläche ausgewertet. Die Anteile der einzelnen Bindegewebsstrukturen wurden anschließend in Form von Balkendiagrammen graphisch dargestellt. Bei der histomorphometrischen Auswertung der Osteocalcin-positiven Zellen wurde ebenfalls der Anteil der Zellen an der Knochenfläche bestimmt. Auf diese Weise konnte der Osteoblasten-Parameter in den Versuchsgruppen verglichen werden. Zur Verdeutlichung wurden die Ergebnisse graphisch dargestellt. Die Ergebnisse der Silbernitrat-Färbung ermöglichten einen Einblick in das komplexe Osteozyten-Geflecht und die verschiedenen Zelltypen. Die Gesamtanzahl der Osteozyten sowie die Anzahl der jeweiligen Zelltypen wurden auf die Knochenfläche normalisiert.

Laut deskriptiver Datenanalyse waren die Werte nicht normalverteilt. Ein Vergleich zweier unabhängiger Stichproben (Vergleich der Daten aus den Behandlungsgruppen), die nicht die Normalverteilungsannahme erfüllten, erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Das Signifikanzniveau wurde nach Bonferroni-Korrektur auf $\alpha=0,05$ festgelegt, wodurch Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant galten. Alle Ergebnisse wurden in Form von Balkendiagrammen graphisch dargestellt. Diese bildeten die Mittelwerte und den Standardfehler als Fehlerbalken ab.

5 Ergebnisse

5.1 Quantifizierung der Knochenflächen in den Behandlungsgruppen

Die HE-Färbung diente der Beurteilung der Größe der Knochenflächen des Wirbels L3 in den Versuchsgruppen. Die Wirbel L3 der K-Gruppe [$4918444,72 \mu\text{m}^2 \pm 732913,12$] zeigten eine kleinere Knochenfläche als die Wirbel L3 der Sch-, OVX- und D-Gruppe. Die Knochenfläche der Wirbel L3 der OVX-Gruppe [$6543534,80 \mu\text{m}^2 \pm 488152,19$] war verglichen mit den anderen Versuchsgruppen am größten und die der OVXD-Gruppe [$4610491,10 \mu\text{m}^2 \pm 730339,39$] am kleinsten. Die D-Gruppe [$5801518,89 \mu\text{m}^2 \pm 409934,28$] besaß eine leicht geringere Knochenfläche als die Sch-Gruppe [$5841158,86 \mu\text{m}^2 \pm 637984,11$]. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bestanden nicht (Abb. 22A). Durch Normalisierung auf die Gesamtfläche wurden die relativen Werte der Knochenfläche bestimmt. Die relative Knochenfläche in der K-Gruppe [$5,95 \% \pm 1,04$] unterschied sich signifikant von den relativen Knochenflächen in der D-Gruppe [$3,16 \% \pm 0,49$] und in der OVXD-Gruppe [$2,92 \% \pm 0,46$]. In der Sch-Gruppe [$6,60 \% \pm 1,04$] war die relative Knochenfläche signifikant größer als in der D- und OVXD-Gruppe. Die OVX-Gruppe [$7,15 \% \pm 1,14$] wies von allen Experimentalgruppen die größte relative Knochenfläche auf. Signifikante Unterschiede bestanden hier zur D- und OVXD-Gruppe. Die relative Knochenfläche war in der D- und der OVXD-Gruppe deutlich kleiner als in den anderen Versuchsgruppen (Abb. 22B).

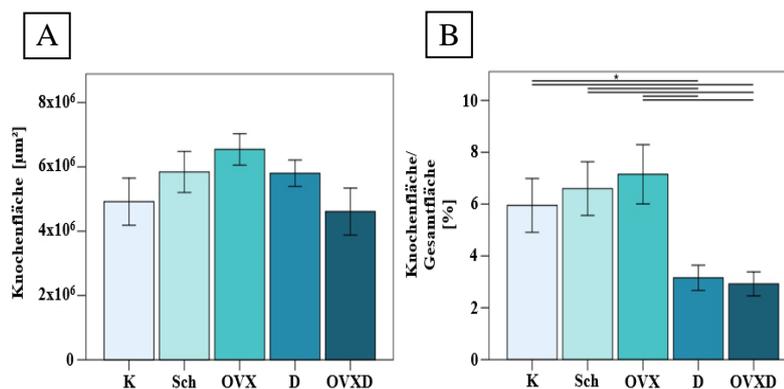


Abbildung 22: Histomorphometrische Auswertung der Knochenfläche des dritten Lendenwirbels (L3)

Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung: (A) Knochenfläche des Wirbels L3 in den Versuchsgruppen: Die geringste Knochenfläche lag in der OVXD-Gruppe vor. (B) Verhältnis der Knochenfläche zur Gesamtfläche: Auch die relative Knochenfläche war in der OVXD-Gruppe am kleinsten. Die Anteile der Knochenfläche an der Gesamtfläche in der D- und OVXD-Gruppe unterschieden sich signifikant von den Werten der anderen Versuchsgruppen (nichtparametrisches Testverfahren, Mann-Whitney-U-Test, * = $p \leq 0,05$, n=7 (K), n=7 (Sch), n=6 (OVX), n=7 (D), n=8 (OVXD)).

K = Kontrollgruppe, Sch = Scheingruppe, OVX = Ovarektomiegruppe, D = Diätgruppe, OVXD = Ovarektomie+Diät-Gruppe

5.2 Differenzierte Auswertung der Knochen-, Knorpel- und Osteoidflächen

Für die differenzierte Analyse der Knochenbeschaffenheit wurden die Schnitte des Wirbelkörpers L3 nach einer Movat-Pentachrom-Färbung quantitativ ausgewertet. Beurteilt wurden die mineralisierte Knochenfläche, die nicht-mineralisierte Knochenfläche (Osteoid) und die Knorpelfläche (Abb. 23). Zusätzlich wurden die prozentualen Anteile dieser Flächen an der Gesamtknochenfläche (mineralisierte Knochenfläche + nicht-mineralisierte Knochenfläche + Knorpelfläche + Knochenmarkfläche) bestimmt (Abb. 24).

In der OVXD-Gruppe [$611700,23 \mu\text{m}^2 \pm 152172,20$] war die mineralisierte Knochenfläche im Wirbelkörper L3 am kleinsten. Die D-Gruppe [$764810,51 \mu\text{m}^2 \pm 203911,06$] zeigte im Vergleich zur OVX-Gruppe [$681135,72 \mu\text{m}^2 \pm 160092,16$] eine größere, mineralisierte Knochenfläche, wobei sich die Werte der Sch-Gruppe [$785255,32 \mu\text{m}^2 \pm 223137,70$] und D-Gruppe ähnelten. In der K-Gruppe [$939548,02 \mu\text{m}^2 \pm 316438,11$] wurde die größte mineralisierte Knochenfläche gemessen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bestanden nicht (Abb. 23A).

Die Osteoidfläche (nicht-mineralisierte Knochenfläche) war in der OVXD-Gruppe [$85300,82 \mu\text{m}^2 \pm 52661,06$] am größten. Verglichen mit der OVX-Gruppe [$38611,91 \mu\text{m}^2 \pm 22176,25$] und K-Gruppe [$67767,80 \mu\text{m}^2 \pm 38616,37$] zeigte die D-Gruppe [$21635,26 \mu\text{m}^2 \pm 3520,69$] eine kleinere Osteoidfläche. Die Sch-Gruppe [$13481,65 \mu\text{m}^2 \pm 6613,10$] wies die kleinste Osteoidfläche von allen Behandlungsgruppen auf. Die Größe der Osteoidflächen waren in den Behandlungsgruppen nicht signifikant verschieden (Abb. 23C).

Die Fläche des Knorpelgewebes war in der K-Gruppe [$573476,61 \mu\text{m}^2 \pm 205773,10$] am größten. Verglichen mit der OVX-Gruppe [$183539,12 \mu\text{m}^2 \pm 56268,36$] zeigten die Sch-Gruppe [$441106,35 \mu\text{m}^2 \pm 207044,35$] und D-Gruppe [$217885,15 \mu\text{m}^2 \pm 61781,31$] größere Knorpelflächen. Die Knorpelfläche in der OVXD-Gruppe [$440541,87 \mu\text{m}^2 \pm 283762,90$] war vergleichbar mit der in der Sch-Gruppe. Auch hier bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 23B).

Zur Bestimmung der relativen Anteile der drei Flächen, wurden diese auf die Gesamtknochenfläche (mineralisierte Knochenfläche, Osteoid, Knorpelgewebe und Knochenmarkfläche) bezogen. Der Anteil der mineralisierten Knochenfläche an der Gesamtknochenfläche nahm ausgehend von der K-Gruppe [$55,02 \% \pm 6,28$] über die OVXD-Gruppe [$64,34 \% \pm 8,92$], die Sch-Gruppe [$64,67 \% \pm 6,70$], die D-Gruppe [$70,81 \% \pm 7,00$] bis

Ergebnisse

zur OVX-Gruppe [74,32 % ± 6,89] zu. Verglichen mit der K-Gruppe war in der OVX-Gruppe der Anteil der mineralisierten Knochenfläche signifikant größer (Abb. 24A).

Die OVXD-Gruppe [8,22 % ± 4,02] zeigte den größten relativen Osteoidanteil. Im Vergleich zur D-Gruppe [3,40 % ± 1,17] und OVX-Gruppe [4,38 % ± 2,13] waren in der Sch-Gruppe [1,00 % ± 0,39] die relativen Osteoidanteile deutlich geringer. In der K-Gruppe [7,58 % ± 4,63] wurde ein ähnlicher Wert wie in der OVXD-Gruppe nachgewiesen. Signifikante Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen bestanden nicht (Abb. 24C).

Beim Vergleich der Versuchsgruppen hinsichtlich der Flächenanteile der Knorpelmatrix zeigte die K-Gruppe [37,40 % ± 4,60] die größten Werte, gefolgt von der Sch-Gruppe [34,34 % ± 6,84], der OVXD-Gruppe [27,44 % ± 9,03] und der D-Gruppe [25,79 % ± 6,21]. In der OVX-Gruppe [21,30 % ± 6,27] wurden die geringsten Anteile detektiert (Abb. 24B). Signifikante Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen bestanden nicht.

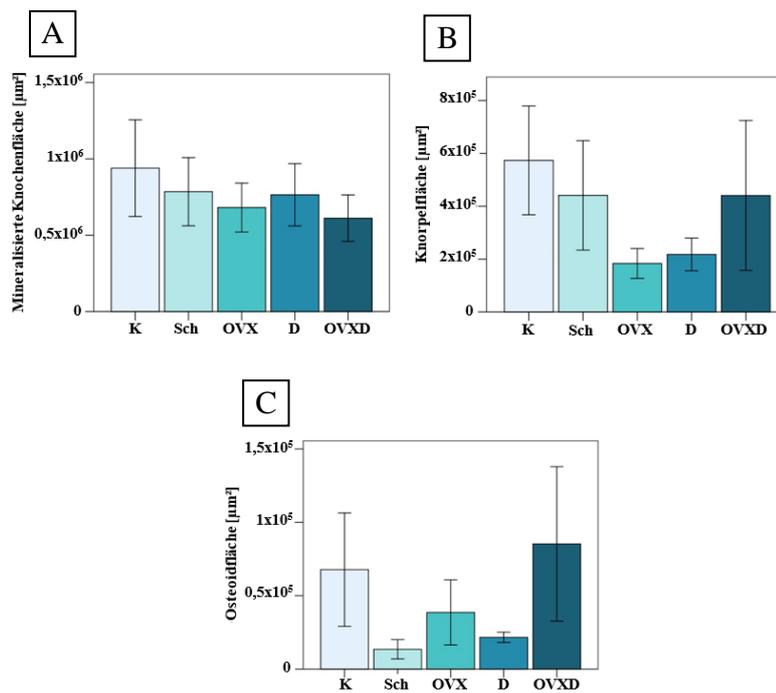


Abbildung 23: Größe der mineralisierten Knochenfläche (A), der Knorpelfläche (B) und der Osteoidfläche (C) des dritten Lendenwirbels (L3)

Auswertung der Movat-Pentachrom-Färbung: (A) Mineralisiertes Knochengewebe: Die OVXD-Gruppe zeigte die kleinste Fläche, die K-Gruppe die größte Fläche. (B) Knorpelgewebe: Die OVX-Gruppe zeigte die kleinste Fläche, die K-Gruppe die größte Fläche. (C) Nicht-mineralisiertes Knochengewebe (Osteoid): Die OVXD-Gruppe zeigte die größte Fläche, die Sch-Gruppe die kleinste Fläche. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der untersuchten Flächen bestanden nicht (nichtparametrisches Testverfahren, Mann-Whitney-U-Test, * = $p < 0,05$, $n=7$ (K), $n=7$ (Sch), $n=6$ (OVX), $n=7$ (D), $n=8$ (OVXD)).

K = Kontrollgruppe, Sch = Scheingruppe, OVX = Ovarektomiegruppe, D = Diätgruppe, OVXD = Ovarektomie+Diät-Gruppe

Ergebnisse

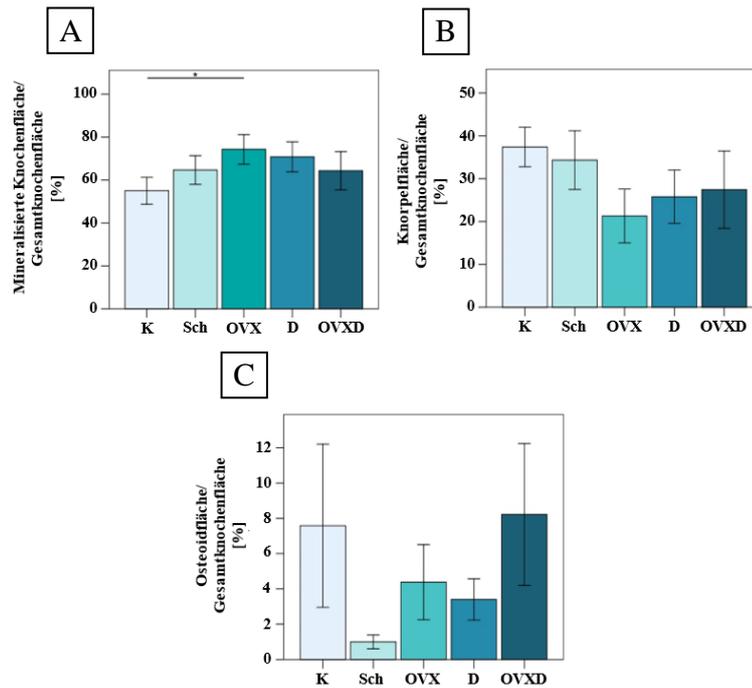


Abbildung 24: Relativer Anteil der mineralisierten Knochenfläche (A), der Knorpelfläche (B) und der Osteoidfläche (C) an der Gesamtknochenfläche des dritten Lendenwirbels (L3)

Auswertung der Movat-Pentachrom-Färbung: (A) Mineralisiertes Knochengewebe: Den größten Flächenanteil zeigte die OVX-Gruppe. Die Anteile in der Sch-, D- und OVXD-Gruppe waren vergleichbar. (B) Knorpelgewebe: Den kleinsten Flächenanteil zeigte die OVX-Gruppe, den größten die K-Gruppe. (C) Nicht-mineralisiertes Knochengewebe (Osteoid): Der Flächenanteil war in der OVXD-Gruppe am größten und in der Sch-Gruppe am kleinsten. Bezüglich der Flächenanteile an mineralisiertem Knochen bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der K- und OVX-Gruppe (nichtparametrisches Testverfahren, Mann-Whitney-U-Test, * = $p \leq 0,05$, $n=7$ (K), $n=7$ (Sch), $n=6$ (OVX), $n=7$ (D), $n=8$ (OVXD)).

K = Kontrollgruppe, Sch = Scheingruppe, OVX = Ovarektomiegruppe, D = Diätgruppe, OVXD = Ovarektomie+Diät-Gruppe

5.3 Quantitative Analyse der Knochenmarkfläche in den Behandlungsgruppen

Zusätzlich wurde die Knochenmarkfläche des Wirbelkörpers L3 quantifiziert (Abb. 25). Die bei der Berechnung des Flächenanteils verwendete Gesamtknochenfläche setzte sich aus der mineralisierten Knochenfläche, der nicht-mineralisierten Knochenfläche, der Knorpelfläche und der Knochenmarkfläche zusammen. In der OVX-Gruppe [$2421826,67 \mu\text{m}^2 \pm 754448,61$] war die Knochenmarkfläche am größten. Die Knochenmarkflächen in der K-Gruppe [$2325757,27 \mu\text{m}^2 \pm 587592,34$] und in der D-Gruppe [$2359117,24 \mu\text{m}^2 \pm 813773,68$] waren vergleichbar. In der OVXD-Gruppe [$1934351,28 \mu\text{m}^2 \pm 496232,23$] und in der Sch-Gruppe [$2077946,77 \mu\text{m}^2 \pm 490511,58$] waren die Knochenmarkflächen deutlich kleiner als in den anderen Behandlungsgruppen (Abb. 25A). Bezogen auf die Gesamtknochenfläche wies die OVX-Gruppe [69,26 % \pm 3,62] den größten Knochenmarkflächenanteil auf. In der D-Gruppe [65,63 % \pm 2,95] war der Anteil etwas geringer.

Ergebnisse

Die K-Gruppe [62,39 % \pm 3,27], Sch-Gruppe [61,59 % \pm 3,89] und OVXD-Gruppe [62,39 % \pm 5,72] zeigten die geringsten Knochenmarkflächenanteile (Abb. 25B). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.

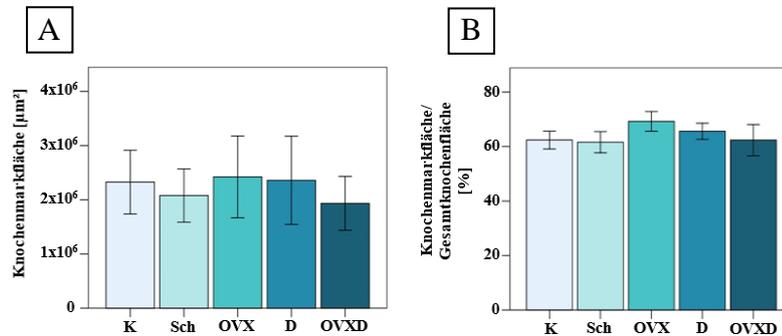


Abbildung 25: Größe der Knochenmarkfläche (A) und relativer Anteil der Knochenmarkfläche an der Gesamtknochenfläche (B) des dritten Lendenwirbels (L3)

Auswertung der Movat-Pentachrom-Färbung: (A) Die Knochenmarkfläche war in der OVXD-Gruppe am kleinsten und in der OVX-Gruppe am größten. (B) Der relative Anteil der Knochenmarkfläche an der Gesamtknochenfläche war in der OVX-Gruppe am größten. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (nichtparametrisches Testverfahren, Mann-Whitney-U-Test, * = $p \leq 0,05$, $n=7$ (K), $n=7$ (Sch), $n=6$ (OVX), $n=7$ (D), $n=8$ (OVXD)).

K = Kontrollgruppe, Sch = Scheingruppe, OVX = Ovarektomiegruppe, D = Diätgruppe, OVXD = Ovarektomie+Diät-Gruppe

5.4 Osteozyten – Anzahl der Subtypen und Gesamtanzahl in den Behandlungsgruppen

Die Silbernitrat-Färbung ermöglichte neben der Beurteilung des kanalikulären Netzwerks auch Aussagen über den Aktivitätszustand der Osteozyten. Im Rahmen einer Subgruppenanalyse wurde die Anzahl spindelförmiger, runder und apoptotischer (leerer) Osteozyten manuell bestimmt (Abb. 26). Die Werte wurden auf die Knochenfläche des gesamten Wirbels normalisiert.

Die Anzahl der spindelförmigen Osteozyten war in der K-Gruppe [623 \pm 86] am größten, gefolgt von der Sch-Gruppe [602 \pm 100], der OVX-Gruppe [563 \pm 183], der D-Gruppe [310 \pm 52] und der OVXD-Gruppe [90 \pm 20]. Die Unterschiede zwischen der K-Gruppe bzw. Sch-Gruppe und der D-Gruppe waren signifikant. Zudem zeigte die OVXD-Gruppe eine signifikant geringere Anzahl an spindelförmigen Osteozyten als die anderen Behandlungsgruppen (Abb. 26A).

Bei der Analyse der Anzahl der runden Osteozyten zeigte ebenfalls die K-Gruppe [733 \pm 84] die höchsten Werte, gefolgt von der OVX-Gruppe [681 \pm 126], der Sch-Gruppe [656 \pm 93] und der D-Gruppe [636 \pm 112]. Auch hier zeigte die OVXD-Gruppe [221 \pm 42] den

Ergebnisse

mit Abstand niedrigsten Wert. Die Unterschiede zu den anderen Behandlungsgruppen waren signifikant (Abb. 26B).

Die Anzahl der leeren bzw. apoptotischen Osteozyten war in der Sch-Gruppe [606 ± 92] am größten, gefolgt von der K-Gruppe [502 ± 93], der D-Gruppe [492 ± 80], der OVX-Gruppe [361 ± 105] und der OVXD-Gruppe [161 ± 68]. Signifikant waren die Unterschiede zwischen der OVXD-Gruppe und der Sch-, K- bzw. D-Gruppe (Abb. 26C).

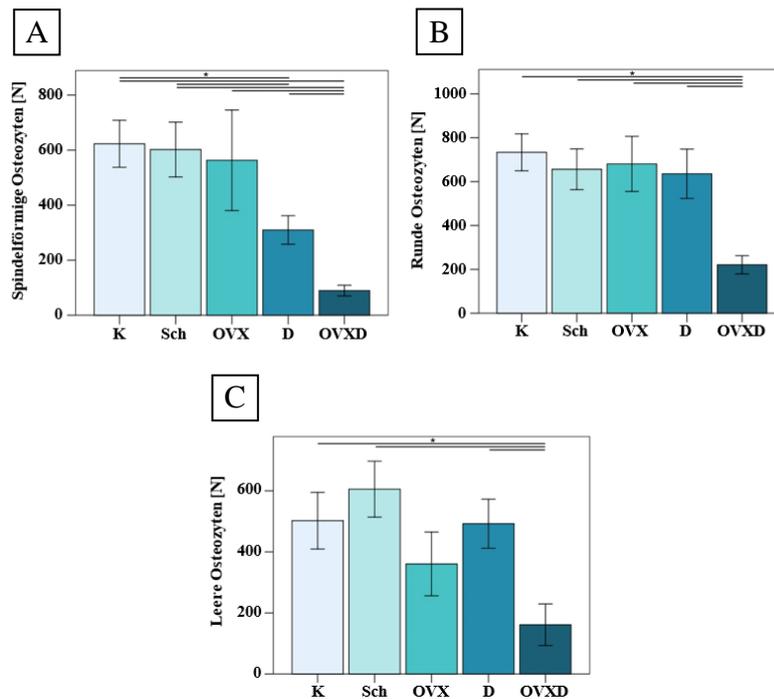


Abbildung 26: Anzahl spindelförmiger (A), runder (B) und leerer (apoptotischer) (C) Osteozyten im dritten Lendenwirbel (L3)

Auswertung der Silbernitrat-Färbung: In der OVXD-Gruppe wurden mit Abstand die wenigsten spindelförmigen (A), runden (B) und leeren (C) Osteozyten gezählt (nichtparametrisches Testverfahren, Mann-Whitney-U-Test, * = $p \leq 0,05$, $n=7$ (K), $n=7$ (Sch), $n=6$ (OVX), $n=7$ (D), $n=8$ (OVXD)).

K = Kontrollgruppe, Sch = Scheingruppe, OVX = Ovariectomiegruppe, D = Diätgruppe, OVXD = Ovariectomie+Diät-Gruppe

Die Anzahl aller manuell bestimmten Osteozyten (Gesamtosteozyten) war in der K-Gruppe [1859 ± 213] und Sch-Gruppe [1864 ± 253] vergleichbar hoch (Abb. 27A). Es folgten die OVX- [1604 ± 386] und D-Gruppe [1438 ± 202]. Die Anzahl der Gesamtosteozyten in der OVXD-Gruppe [472 ± 107] lag im Vergleich zu den Werten in den anderen Versuchsgruppen signifikant niedriger.

Um die Anzahl der Zellen besser vergleichen zu können, wurde die Knochenfläche des Wirbels L3 bestimmt (Abb. 27B). Die Bestimmung der Knochenfläche erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Ermittlung der Knochenfläche des Wirbels L3 nach HE-Färbung. Aufgrund der hohen Anzahl an Einzelbildern erfolgte eine statistische Auswertung der

Ergebnisse

Summe aller Einzelbilder pro Sample. Die OVXD-Gruppe [$7711187,38 \mu\text{m}^2 \pm 1336534,19$] wies die niedrigste Knochenfläche auf. In der Sch-Gruppe [$10827561,88 \mu\text{m}^2 \pm 858784,12$] war die Knochenfläche am größten, gefolgt von der D-Gruppe [$11147670,26 \mu\text{m}^2 \pm 764092,96$], der OVX-Gruppe [$10451168,09 \mu\text{m}^2 \pm 1338858,65$] und der K-Gruppe [$9205515,92 \mu\text{m}^2 \pm 719341,23$]. Bezüglich der Knochenfläche bestand lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen der K- und D-Gruppe.

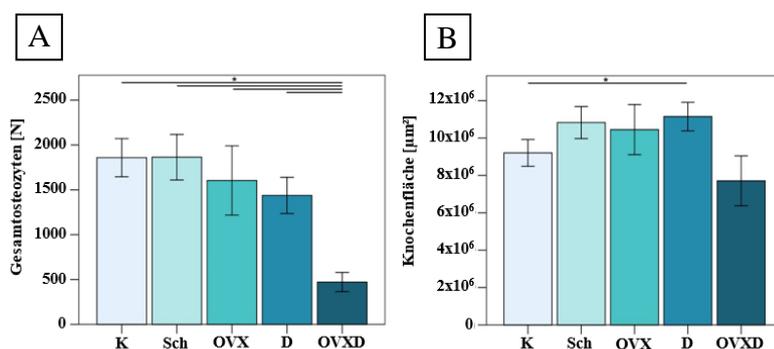


Abbildung 27: Gesamtosteozyten-Anzahl (A) und Knochenfläche (B) des dritten Lendenwirbels (L3)
Auswertung der Silbernitrat-Färbung: (A) Die Anzahl der Gesamtosteozyten lag in der OVXD-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen deutlich niedriger. (B) Auch die Knochenfläche zeigte in der OVXD-Gruppe den geringsten Wert (nichtparametrisches Testverfahren, Mann-Whitney-U-Test, * = $\leq 0,05$, n=7 (K), n=7 (Sch), n=6 (OVX), n=7 (D), N=8 (OVXD)).
K = Kontrollgruppe, Sch = Scheingruppe, OVX = Ovarektomiegruppe, D = Diätgruppe, OVXD = Ovarektomie+Diät-Gruppe

Anschließend wurde die Anzahl an Osteozyten bezogen auf die Knochenfläche ausgewertet. Die Anzahl spindelförmiger Osteozyten pro Knochenfläche war in der K-Gruppe [$6,61 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2 \pm 0,62 \times 10^{-5}$] am größten, gefolgt von der Sch-Gruppe [$5,41 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2 \pm 0,67 \times 10^{-5}$], der OVX-Gruppe [$5,03 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2 \pm 1,39 \times 10^{-5}$], der D-Gruppe [$2,76 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2 \pm 0,35 \times 10^{-5}$] und der OVXD-Gruppe [$1,13 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2 \pm 0,08 \times 10^{-5}$] (Abb. 28A). Die Anzahl der spindelförmigen Osteozyten war in der OVXD-Gruppe signifikant geringer als in der K-, Sch-, OVX- und D-Gruppe. Das Gleiche galt für die D-Gruppe verglichen mit der Sch- und K-Gruppe.

Die Anzahl runder Osteozyten pro Knochenfläche war in der OVXD-Gruppe [$3,08 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2 \pm 0,36 \times 10^{-5}$] ebenfalls signifikant geringer als in allen anderen Versuchsgruppen (Abb. 28B). In der K-Gruppe [$7,89 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2 \pm 0,50 \times 10^{-5}$] war der Anteil am größten, gefolgt von der OVX-Gruppe [$6,31 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2 \pm 0,73 \times 10^{-5}$], der Sch-Gruppe [$6,00 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2 \pm 0,59 \times 10^{-5}$] und der D-Gruppe [$5,55 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2 \pm 0,69 \times 10^{-5}$]. Der Unterschied zwischen der K- und D-Gruppe war signifikant.

Die Anzahl leerer Osteozyten pro Knochenfläche war in der OVXD-Gruppe [$2,12 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2 \pm 0,73 \times 10^{-5}$] am kleinsten und in der Sch-Gruppe [$5,53 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2 \pm 0,72 \times 10^{-5}$] am größten, gefolgt von der K-Gruppe [$5,37 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2 \pm 0,77 \times 10^{-5}$], der D-Gruppe [$4,55 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2 \pm 0,79 \times 10^{-5}$] und der

Ergebnisse

OVX-Gruppe [$3,05e^{-5}/\mu\text{m}^2 \pm 0,81e^{-5}$]. Signifikante Unterschiede bestanden zwischen der OVXD-Gruppe und der K-, Sch- bzw. D-Gruppe (Abb. 28C).

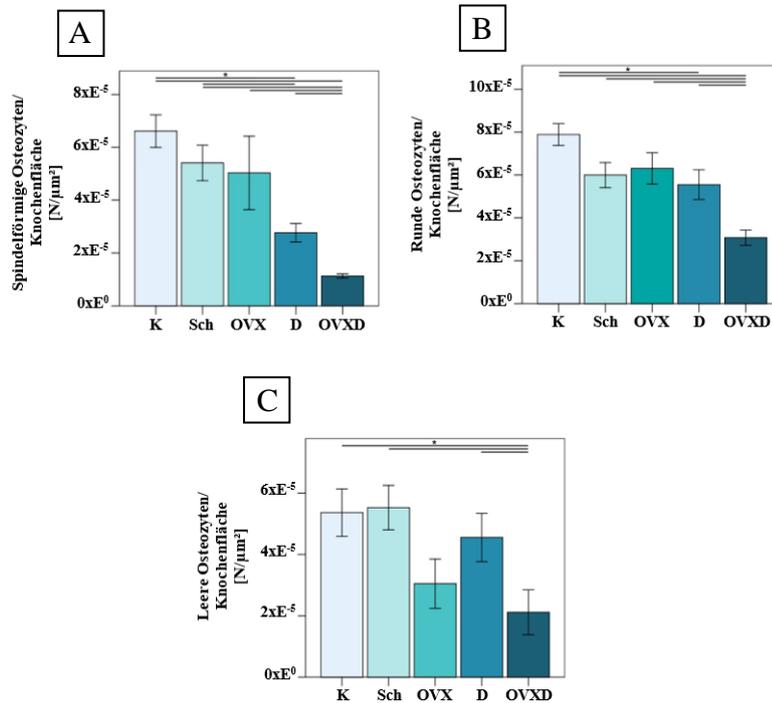


Abbildung 28: Anzahl spindelförmiger (A), runder (B) und leerer (apoptotischer) (C) Osteozyten im dritten Lendenwirbel (L3) pro Knochenfläche

Auswertung der Silbernitrat-Färbung: Die Anzahl der spindelförmigen (A), runden (B) und leeren (C) Osteozyten war in der OVXD-Gruppe jeweils am kleinsten (nichtparametrisches Testverfahren, Mann-Whitney-U-Test, * = $p \leq 0,05$, $n=7$ (K), $n=7$ (Sch), $n=6$ (OVX), $n=7$ (D), $n=8$ (OVXD)).

K = Kontrollgruppe, Sch = Scheingruppe, OVX = Ovarektomiegruppe, D = Diätgruppe, OVXD = Ovarektomie+Diät-Gruppe

Auch die Gesamtosteozyten-Anzahl (spindelförmig, rund und leer) pro Knochenfläche (Abb. 29) war in der K-Gruppe [$1,99e^{-4}/\mu\text{m}^2 \pm 0,11e^{-4}$] am größten und in der OVXD-Gruppe [$6,33e^{-5}/\mu\text{m}^2 \pm 0,95e^{-5}$] am kleinsten. Dazwischen lagen die Sch-Gruppe [$1,69e^{-4}/\mu\text{m}^2 \pm 0,16e^{-4}$], die OVX-Gruppe [$1,44e^{-4}/\mu\text{m}^2 \pm 0,26e^{-4}$] und die D-Gruppe [$1,29e^{-4}/\mu\text{m}^2 \pm 0,13e^{-4}$]. Signifikante Unterschiede bestanden zwischen der OVXD-Gruppe und den anderen Gruppen sowie zwischen der K-Gruppe und der D-Gruppe.

Ergebnisse

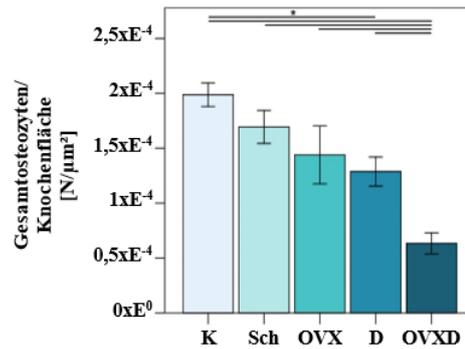


Abbildung 29: Gesamtosteozyten-Anzahl im dritten Lendenwirbel (L3) pro Knochenfläche

Auswertung der Silbernitrat-Färbung: Tiere der OVXD-Gruppe zeigten mit Abstand die niedrigsten Gesamtosteozyten-Anzahlen pro Knochenfläche. Signifikante Unterschiede bestanden zwischen der OVXD-Gruppe und den anderen Gruppen, sowie zwischen der K-Gruppe und D-Gruppe (nichtparametrisches Testverfahren, Mann-Whitney-U-Test, * = $p \leq 0,05$, $n=7$ (K), $n=7$ (Sch), $n=6$ (OVX), $n=7$ (D), $n=8$ (OVXD)). K = Kontrollgruppe, Sch = Scheingruppe, OVX = Ovariectomiegruppe, D = Diätgruppe, OVXD = Ovariectomie+Diät-Gruppe

5.5 Osteoklasten-Anzahl und -Aktivität in den Behandlungsgruppen

Im Rahmen der Analyse des Knochenmetabolismus des Wirbelkörpers L3 wurden auch Osteoklasten-Parameter (Länge, Anzahl, Aktivität) untersucht. Für die Klassifikation als Osteoklast mussten TRAP-positive Zellen weitere Kriterien erfüllen (s. Kap. 4.12.4). Die manuell bestimmte Anzahl und Länge der Zellen wurden auf die Knochenfläche normalisiert, um den prozentualen Anteil zu ermitteln (Abb. 30+31). Abschließend wurde das Verhältnis aus der mittleren Osteoklasten-Länge und der mittleren Osteoklasten-Anzahl berechnet (Abb. 32).

Die mittlere Osteoklasten-Anzahlen lagen in der D-Gruppe [41 ± 5] und der OVXD-Gruppe [45 ± 7] höher als in den anderen Versuchsgruppen. Es folgten die Sch-Gruppe [37 ± 7] und die K-Gruppe [34 ± 9]; die geringste Anzahl zeigte die OVX-Gruppe [31 ± 4]. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant (Abb. 30A). Die Anzahl an Osteoklasten pro Knochenfläche war in der OVXD-Gruppe [$1,14e^{-5}/\mu\text{m}^2 \pm 0,19e^{-5}$] verglichen mit den anderen Behandlungsgruppen am höchsten. Signifikante Unterschiede bestanden zur Sch-Gruppe [$6,40e^{-6}/\mu\text{m}^2 \pm 1,07e^{-6}$] und zur OVX-Gruppe [$5,05e^{-6}/\mu\text{m}^2 \pm 1,09e^{-6}$]. Letztere zeigte die geringste Anzahl an Osteoklasten pro Knochenfläche. In der D-Gruppe [$7,31e^{-6}/\mu\text{m}^2 \pm 1,06e^{-6}$] lag der Wert geringfügig höher als in der K-Gruppe [$7,88e^{-6}/\mu\text{m}^2 \pm 2e^{-6}$] (Abb. 30B).

Die Untersuchung der mittleren Osteoklasten-Länge ergab ähnliche Resultate. Die durchschnittliche Osteoklasten-Länge in der OVXD-Gruppe [$24,22 \pm 0,40$] war länger als in den anderen Experimentalgruppen. Signifikante Unterschiede bestanden zur K-Gruppe

Ergebnisse

[21,13 $\mu\text{m} \pm 0,67$], zur Sch-Gruppe [21,40 $\mu\text{m} \pm 0,38$] und zur OVX-Gruppe [21,17 $\mu\text{m} \pm 0,54$]. Auch die Osteoklasten-Längen in der D-Gruppe [23,34 $\mu\text{m} \pm 0,76$] und Sch-Gruppe unterschieden sich signifikant (Abb. 31A).

Das Verhältnis der Osteoklasten-Länge zur Knochenfläche zeigte in der OVXD-Gruppe [8,55e⁻⁶ $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2 \pm 3,49\text{e}^{-6}$] einen signifikant höheren Wert als in der OVX-Gruppe [3,33e⁻⁶ $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2 \pm 0,26\text{e}^{-6}$]. Die D-Gruppe [4,13e⁻⁶ $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2 \pm 0,30\text{e}^{-6}$] und die Sch-Gruppe [3,96e⁻⁶ $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2 \pm 0,48\text{e}^{-6}$] wiesen vergleichbare Werte auf. In der K-Gruppe [4,97e⁻⁶ $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2 \pm 0,79\text{e}^{-6}$] war das Verhältnis der Osteoklasten-Länge zur Knochenfläche kleiner als in der OVXD-Gruppe (Abb. 31B).

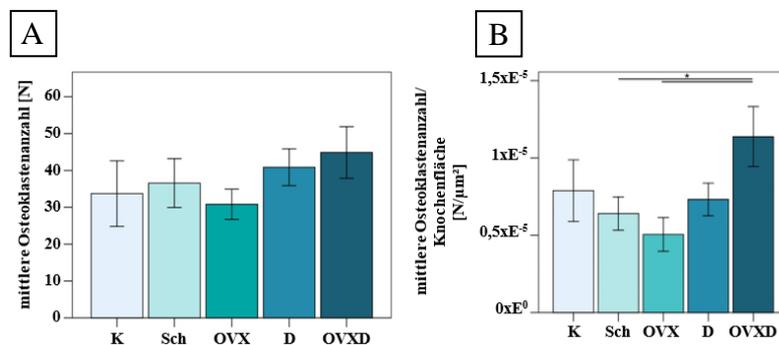


Abbildung 30: Mittlere Osteoklasten-Anzahl (A) und mittlere Osteoklasten-Anzahl pro Knochenfläche (B) des dritten Lendenwirbels (L3)

Auswertung der Tartrat-resistenten-sauren-Phosphatase-(TRAP)-Färbung: (A) Die OVXD-Gruppe zeigte den höchsten Wert, gefolgt von der D-Gruppe. Signifikante Unterschiede bestanden nicht. (B) Die OVXD-Gruppe zeigte einen signifikant größeren Wert als die OVX- und Sch-Gruppe (nichtparametrisches Testverfahren, Mann-Whitney-U-Test, * = $p \leq 0,05$, $n=7$ (K), $n=7$ (Sch), $n=6$ (OVX), $n=7$ (D), $n=8$ (OVXD)). K = Kontrollgruppe, Sch = Scheingruppe, OVX = Ovariectomiegruppe, D = Diätgruppe, OVXD = Ovariectomie+Diät-Gruppe

Ergebnisse

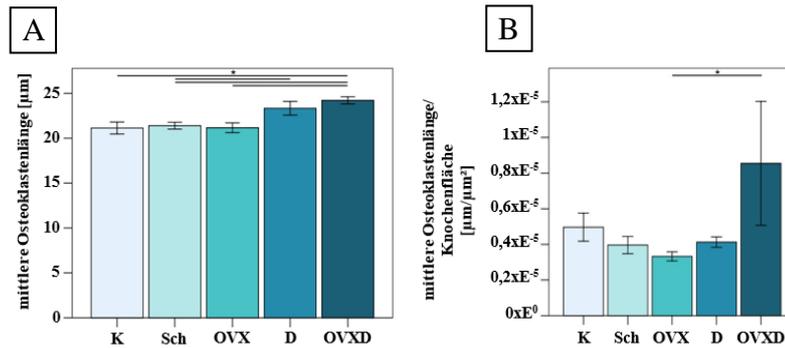


Abbildung 31: Mittlere Osteoklasten-Länge (A) und mittlere Osteoklasten-Länge pro Knochenfläche (B) des dritten Lendenwirbels (L3)

Auswertung der Tartrat-resistenten-sauren-Phosphatase-(TRAP)-Färbung: (A) Die mittlere Osteoklasten-Länge war in der OVXD-Gruppe signifikant größer als in der K-, Sch- und OVX-Gruppe. Zwischen der Sch- und D-Gruppe bestand ebenfalls ein signifikanter Unterschied. (B) Den höchsten Wert zeigte die OVXD-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied bestand zwischen der OVXD- und OVX-Gruppe (nichtparametrisches Testverfahren, Mann-Whitney-U-Test, * = $p \leq 0,05$, $n=7$ (K), $n=7$ (Sch), $n=6$ (OVX), $n=7$ (D), $n=8$ (OVXD)).

K = Kontrollgruppe, Sch = Scheingruppe, OVX = Ovarektomiegruppe, D = Diätgruppe, OVXD = Ovarektomie+Diät-Gruppe

Aus der Osteoklasten-Anzahl und -Länge wurde ein Quotient gebildet, um den Aktivitätszustand der Zellen zu analysieren (Abb. 32A). Dabei zeigte die OVXD-Gruppe $[1,86/\mu\text{m} \pm 0,30]$ die höchsten Werte und damit die höchste Osteoklasten-Aktivität. Auch die D-Gruppe $[1,78/\mu\text{m} \pm 0,25]$ wies höhere Werte auf als die Sch- $[1,72/\mu\text{m} \pm 0,33]$, K- $[1,55/\mu\text{m} \pm 0,38]$ und OVX-Gruppe $[1,47/\mu\text{m} \pm 0,21]$. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant.

Durch den Tausch von Zähler und Nenner wurde ein Quotient aus der Osteoklasten-Länge und Osteoklasten-Anzahl gebildet (Abb. 32B). Dieser sollte als Vergleichsparameter zur Osteoklasten-Aktivität dienen. Die D-Gruppe $[0,62 \mu\text{m} \pm 0,07]$ zeigte die niedrigsten Werte, gefolgt von der OVXD-Gruppe $[0,66 \mu\text{m} \pm 0,12]$, der Sch-Gruppe $[0,74 \mu\text{m} \pm 0,15]$ und der OVX-Gruppe $[0,76 \mu\text{m} \pm 0,12]$. In der K-Gruppe $[0,92 \mu\text{m} \pm 0,23]$ war das Verhältnis aus mittlerer Osteoklasten-Länge und mittlerer Osteoklasten-Anzahl am größten. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden nicht.

Ergebnisse

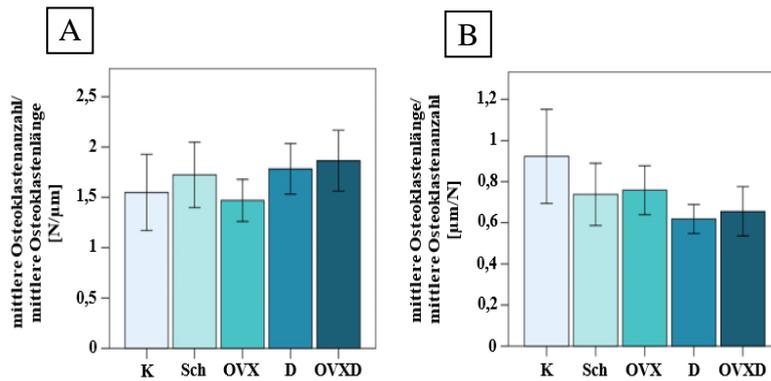


Abbildung 32: Nachweis der Osteoklasten-Aktivität – Quotient aus der mittleren Osteoklasten-Anzahl und -Länge (A) bzw. Quotient aus der mittleren Osteoklasten-Länge und -Anzahl (B) des dritten Lendenwirbels (L3)

Auswertung der Tartrat-resistenten-sauren-Phosphatase-(TRAP)-Färbung: (A) Die OVXD-Gruppe zeigte die höchste Osteoklasten-Aktivität gefolgt von der D-Gruppe. Die niedrigste Osteoklasten-Aktivität wurde in der OVX-Gruppe nachgewiesen. (B) Die K-Gruppe zeigte die höchsten Werte, die D- bzw. OVXD-Gruppe die geringsten Werte. Signifikante Unterschiede lagen in beiden Auswertungen nicht vor (nichtparametrisches Testverfahren, Mann-Whitney-U-Test, * = $p \leq 0,05$, $n=7$ (K), $n=7$ (Sch), $n=6$ (OVX), $n=7$ (D), $n=8$ (OVXD)).

K = Kontrollgruppe, Sch = Scheingruppe, OVX = Ovarektomiegruppe, D = Diätgruppe, OVXD = Ovarektomie+Diät-Gruppe

5.6 Nachweis von Osteocalcin in den Behandlungsgruppen

Der Nachweis von Osteocalcin diente der Analyse des Knochenaufbaus und der Knochenneubildung. Osteocalcin wird von Osteoblasten gebildet und wird als hochspezifischer Knochenaufbauparameter in der Osteoporose-Diagnostik eingesetzt. Zunächst wurde die absolute Fläche Osteocalcin-positiver Regionen im Wirbelkörper L3 ermittelt (Abb. 33A). Die K-Gruppe [$2915,13 \mu\text{m}^2 \pm 1655,73$] zeigte im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen die größte Osteocalcin-positive Fläche. Es folgten die OVXD-Gruppe [$831,81 \mu\text{m}^2 \pm 778,95$] und Sch-Gruppe [$831,70 \mu\text{m}^2 \pm 270,60$] mit annähernd gleichen Werten. Deutlich geringere Werte zeigten die D-Gruppe [$337,72 \mu\text{m}^2 \pm 183,11$] und OVX-Gruppe [$233,32 \mu\text{m}^2 \pm 52,35$]. Signifikante Unterschiede bestanden zwischen der K-Gruppe und der OVX-, D- und OVXD-Gruppe, sowie zwischen der Sch- und OVXD-Gruppe.

Die Bestimmung der Knochenfläche des Wirbelkörpers L3 (Abb. 33B) erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Ermittlung der Knochenfläche des Wirbels L3 nach HE-Färbung. Die OVX-Gruppe [$14910,38 \mu\text{m}^2 \pm 3051,59$] zeigte verglichen mit den anderen Experimentalgruppen den geringsten Wert; im Vergleich zur K- und Sch-Gruppe war der Unterschied signifikant. Auch in der D-Gruppe [$21633,76 \mu\text{m}^2 \pm 4372,95$] war die Knochenfläche kleiner als in der K- [$31616,66 \mu\text{m}^2 \pm 7144,27$], Sch- [$30393,22 \mu\text{m}^2 \pm 3331,59$]

Ergebnisse

und OVXD-Gruppe [$32188,35 \mu\text{m}^2 \pm 10689,10$]. Die Unterschiede zwischen der OVX-Gruppe und der K- bzw. Sch-Gruppe erreichten die statistische Signifikanz.

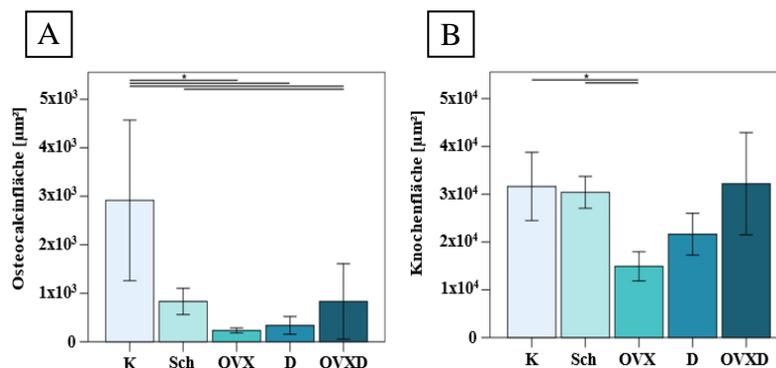


Abbildung 33: Osteocalcin-positive Fläche (A) und Knochenfläche (B) des dritten Lendenwirbels (L3)

Auswertung der Osteocalcin-Immunhistochemie: (A) In der OVX-Gruppe war die Osteocalcin-positive Fläche am kleinsten, in der K-Gruppe am größten. Signifikante Unterschiede bestanden zwischen der K-Gruppe und der OVX-, D- bzw. OVXD-Gruppe, sowie zwischen der Sch- und OVXD-Gruppe. (B) Die größte Knochenfläche lag in der OVXD-Gruppe vor. Die K- und Sch-Gruppe zeigte annähernd gleiche Werte. In der OVX-Gruppe war die Knochenfläche signifikant kleiner als in der K-Gruppe und in der Sch-Gruppe (nichtparametrisches Testverfahren, Mann-Whitney-U-Test, * = $p \leq 0,05$, $n=7$ (K), $n=7$ (Sch), $n=6$ (OVX), $n=7$ (D), $n=8$ (OVXD)).

K = Kontrollgruppe, Sch = Scheingruppe, OVX = Ovarektomiegruppe, D = Diätgruppe, OVXD = Ovarektomie+Diät-Gruppe

Im Folgenden wurden die prozentualen Anteile der Osteocalcin-positiven Flächen an der Gesamtfläche in den Behandlungsgruppen bestimmt (Abb. 34A). Die Gesamtfläche setzte sich aus den zuvor definierten drei Klassen (s. Kap. 4.12.5) zusammen. Die doppelt behandelte OVXD-Gruppe [$0,04 \% \pm 0,02$] zeigte den geringsten Anteil an Osteocalcin-positiven Regionen. Der Anteil der Osteocalcin-positiven Flächen an der Gesamtfläche war in dieser Gruppe signifikant geringer als der in der K-Gruppe [$0,41 \% \pm 0,18$] und Sch-Gruppe [$0,14 \% \pm 0,04$]. Auch die einfach behandelte OVX-Gruppe [$0,07 \% \pm 0,02$] enthielt einen signifikant geringeren Anteil an Osteocalcin-positiven Regionen als die unbehandelte K-Gruppe. In der D-Gruppe [$0,09 \% \pm 0,04$] lag der Anteil niedriger als der in der K- und Sch-Gruppe, jedoch höher als der der OVX- und OVXD-Gruppe.

Im Anschluss wurde das Verhältnis der Knochenfläche zur Gesamtfläche analysiert (Abb. 34B). Der relative Anteil der Knochenfläche an der Gesamtfläche war in der OVX-Gruppe [$3,91 \% \pm 0,38$] niedriger als in den anderen Gruppen; der Unterschied zur Sch-Gruppe [$5,81 \% \pm 0,41$] war signifikant. Auch der Knochenflächenanteil in der OVXD-Gruppe [$4,91 \% \pm 0,56$] war kleiner als in der K- [$5,44 \% \pm 0,95$], Sch- und D-Gruppe [$6,84 \% \pm 1,36$]; die Unterschiede erreichten keine statistische Signifikanz.

Ergebnisse

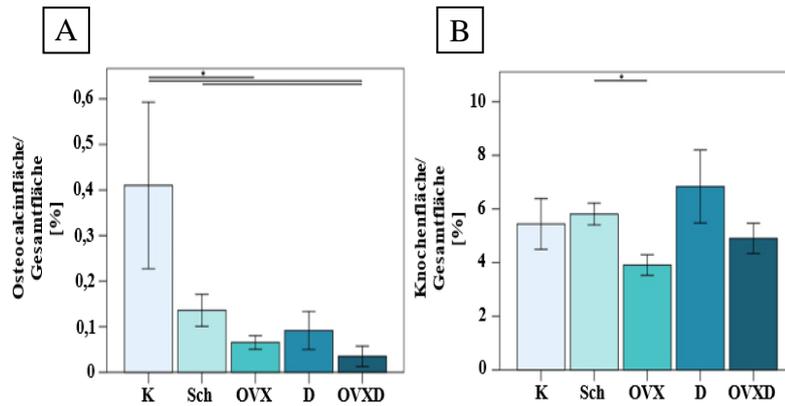


Abbildung 34: Anteil der Osteocalcin-positiven Fläche an der Gesamtfläche (A) und Anteil der Knochenfläche an der Gesamtfläche (B) des dritten Lendenwirbels (L3)

Auswertung der Osteocalcin-Immunhistochemie: (A) Die OVXD-Gruppe enthielt einen signifikant geringeren Anteil Osteocalcin-positiver Regionen an der Gesamtfläche als die K- und Sch-Gruppe. In der K-Gruppe war der Anteil am größten. Weiter waren die Anteile in der K- und OVX-Gruppe signifikant verschieden. (B) Die Knochenflächenanteile an der Gesamtfläche waren zwischen der OVX- und Sch-Gruppe signifikant verschieden. Den höchsten Knochenflächenanteil zeigte die D-Gruppe, den geringsten Wert die OVX-Gruppe (nichtparametrisches Testverfahren, Mann-Whitney-U-Test, * = $p \leq 0,05$, $n=7$ (K), $n=7$ (Sch), $n=6$ (OVX), $n=7$ (D), $n=8$ (OVXD)).

K = Kontrollgruppe, Sch = Scheingruppe, OVX = Ovariectomiegruppe, D = Diätgruppe, OVXD = Ovariectomie+Diät-Gruppe

Im Anschluss wurde der Anteil Osteocalcin-positiver Regionen an der Knochenfläche des Wirbelkörpers L3 ermittelt (Abb. 35). Die K-Gruppe [$8,86 \% \pm 4,41$] enthielt den höchsten Anteil, gefolgt von der Sch-Gruppe [$2,50 \% \pm 0,68$], der OVX-Gruppe [$1,61 \% \pm 0,36$] der D-Gruppe [$1,44 \% \pm 0,53$] und der OVXD-Gruppe [$0,96 \% \pm 0,73$]. Signifikante Unterschiede bestanden zwischen der K-Gruppe und der D-Gruppe sowie zwischen der OVXD-Gruppe und allen anderen Behandlungsgruppen mit Ausnahme der D-Gruppe.

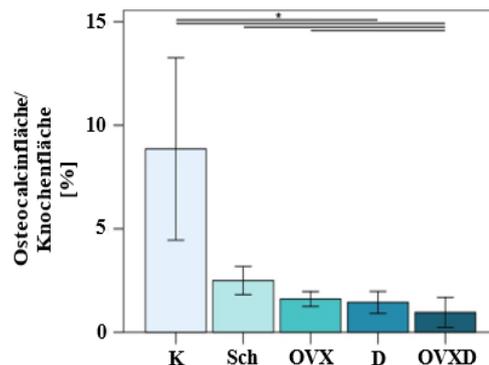


Abbildung 35: Anteil der Osteocalcin-positiven Fläche an der Knochenfläche des dritten Lendenwirbels (L3)

Auswertung der Osteocalcin-Immunhistochemie: In der K-Gruppe war der prozentuale Anteil der Osteocalcin-positiven Regionen an der Knochenfläche am größten. Den geringsten Wert zeigte die OVXD-Gruppe. Der Wert der OVXD-Gruppe unterschied sich signifikant von den Werten der K-, Sch- und OVX-Gruppe. Weiter bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der D- und K-Gruppe (nichtparametrisches Testverfahren, Mann-Whitney-U-Test, * = $p \leq 0,05$, $n=7$ (K), $n=7$ (Sch), $n=6$ (OVX), $n=7$ (D), $n=8$ (OVXD)).

K = Kontrollgruppe, Sch = Scheingruppe, OVX = Ovariectomiegruppe, D = Diätgruppe, OVXD = Ovariectomie+Diät-Gruppe

6 Diskussion

Die Osteoporose ist als systemisches Krankheitsbild des Skelettsystems durch eine pathologische Knochenstruktur und einen gestörten Knochenumbau mit einer resultierenden Abnahme der BMD gekennzeichnet [202]. Die Abnahme an Knochenmasse, die Dysbalance im Knochenstoffwechsel und die geringere mechanische Widerstandskraft hat ein erhöhtes Frakturrisiko zur Folge [81]. In Deutschland betrug die Osteoporose-Prävalenz 2001 für Frauen im Alter von 50–60 Jahren ca. 15 % und für Frauen > 70 Jahre ca. 45 % [274]. Bei Männern lagen die Prävalenzwerte bei ca. 2,4 % (50–60 Jahre) bzw. ca. 17 % (> 70 Jahre) [274]. Ein ähnliches Bild zeigen Osteoporose-assoziierte Wirbelkörperfrakturen. In Europa beträgt die jährliche Inzidenz in der Altersklasse von 50–79 Jahren für Frauen ca. 1,1 % und für Männer ca. 0,6 % [100, 252]. Da die Osteoporose überwiegend ältere Menschen und hier vor allem Frauen betrifft (Prävalenz Frauen : Prävalenz Männer 4:1 in der Altersgruppe ≥ 50 Jahre, Daten von 2009) und die Lebenserwartung zunehmend steigt, stellt diese Erkrankung nicht nur medizinisch, sondern auch ökonomisch eine gesellschaftliche Herausforderung dar [25, 99]. Zur detaillierten Analyse der Knochenstoffwechselprozesse bei der Osteoporose und zur Entwicklung neuer Präventions- und Therapieoptionen für osteoporotisch bedingte Frakturen sind geeignete Tiermodelle von großer Bedeutung [91]. Die Analyse des altersbedingten Knochenverlusts im Wirbelkörper ist aufgrund der Komplexität und Spezifität des menschlichen Skeletts herausfordernd. Nach dem Wissen des Autors dieser Dissertation lagen bis 1996 keine quantitativen Studien zu dieser Thematik vor [11].

Beim bilateral-ovarektomierten Rattenmodell handelt es sich um das aktuell bestuntersuchte Kleintiermodell in der Osteoporose-Forschung [91]. Die biochemischen Mechanismen im Knochen von Menschen und Ratten sind nahezu identisch, so dass zelluläre und extrazelluläre, anabole und katabole Stoffwechselprozesse vergleichbar sind [193, 373]. Zudem ist der Leitsatz der Food and Drug Administration (FDA) (3-R-Prinzip: „Replace“, „Reduce“, „Refine“) für Tierversuche im Rattenmodell eher anwendbar als bei anderen Tiermodellen [118]. Zu den Vorteilen des Rattenmodells gehören neben der Möglichkeit der Haltung der Tiere unter Laborbedingungen und der Ähnlichkeit zum menschlichen, osteoporotischen Knochenstatus auch der im Vergleich zu anderen Tiermodellen (z. B. Schafe, Primaten) um etwa 90 % geringere wirtschaftliche Aufwand bei gleichen Rahmenbedingungen [114]. Bisher wurde das bilateral-ovarektomierte Rattenmodell insbesondere zur Nachbildung postmenopausaler Zustände über einen kürzeren

Zeitraum (< 12 Monate) eingesetzt [118]. Untersuchungen über einen Zeitraum von mehr als 12 Monaten gestalten sich trotz der Vergleichbarkeit der pathophysiologischen Mechanismen beim Menschen und bei der Ratte als schwierig [193]. Zudem ist im Rattenmodell die BMD-Abnahme nicht mit der humanen Situation vergleichbar [91]. Der alleinige Fokus auf den endokrin bedingten Knochenschwund wird der multifaktoriellen Ätiologie des Krankheitsbildes nicht gerecht. Insbesondere die metabolisch bedingte Form der Osteoporose (Vitamin D-Mangel, Kalzium-Mangel etc.) spielt in diesem Kontext eine wichtige Rolle [93, 118].

Um ähnlich hohe Knochenmasseverluste wie bei einer humanen Osteoporose zu induzieren, sollte in dieser Dissertation ein Rattenmodell mit einer Kombination aus Multidefizienzdiät (betroffene Substanzen: Kalzium, Vitamin D, Vitamin K, Phosphor) und bilateraler Ovariectomie analysiert werden. Dieses Osteoporose-Kleintiermodell wurde erstmals 2012 in der Experimentellen Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen bei der Analyse von Femora und Tibiae von weiblichen Sprague-Dawley-Ratten im Jungalter von 14 Wochen eingesetzt [93]. In diesem Modell kam es zu einer beschleunigten Entwicklung eines osteoporotischen Knochenstatus im Sinne einer „High-Turnover-Osteoporose“ [93]. Ähnliche Ergebnisse wurden 2013 mit dem gleichen Studiendesign für den lumbalen Wirbelkörper L1 erzielt [129]. Das in der vorliegenden Dissertation verwendete Studiendesign diente der Etablierung eines senilen Rattenmodells (> 11 Monate) der Osteoporose. Weiterhin sollten die Ergebnisse der Arbeit dazu beitragen, präventive und therapeutische Verfahren gegen Osteoporose zu evaluieren. In dem Experiment dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde gemäß den Maßgaben der FDA auf die Einhaltung des 3-R-Prinzips („Replace“, „Reduce“, „Refine“) geachtet.

6.1 Katabole Effekte im Knochengewebe

Bei der histomorphometrischen Analyse der HE-gefärbten Schnitte der Wirbel L3 des senilen Rattenmodells zeigten die Tiere in der OVXD-Gruppe eine geringere Knochenfläche als in allen anderen Gruppen (Abb. 22A+B). Dies betraf nicht nur die absolute Knochenfläche, sondern auch den relativen Anteil der Knochenfläche an der Gesamtfläche, mit teils signifikanten Unterschieden zu den anderen Gruppen. Die morphologische Analyse ergab in der histologischen Übersichtsaufnahme der OVXD-Gruppe eine reduzierte Trabekelstruktur mit aufgelockertem und verdünntem spongiösem Geflecht. Das

gewählte Modell spiegelt aufgrund des hohen Durchschnittsalters der weiblichen Sprague-Dawley-Ratten (ca. 11 Monate) die klinische Form der Typ-II-Osteoporose bzw. die senile Osteoporose wider [291]. Mit der beidseitigen Ovariectomie wird die klinische Form der Typ-I-Osteoporose bzw. die postmenopausale Osteoporose nachgebildet [41]. Während sich die postmenopausale Osteoporose durch einen rapiden Knochenschwund vornehmlich in trabekulären, spongiösen Anteilen auszeichnet (high turnover), ist der Knochenschwund bei der senilen Osteoporose eher langsam fortschreitend (low turnover) und betrifft bevorzugt kortikale Knochenstrukturen [80]. Der herbeigeführte Östrogenmangel führt in dem Rattenmodell zu einer gesteigerten Knochenresorption [164] aufgrund einer Dysbalance zwischen Knochenresorption und Knochenformation zugunsten des Knochenabbaus [101]. Der durch eine beidseitige Ovariectomie induzierte, osteoporotische Knochenstatus im Wirbelkörper ist nicht mit der Situation im Menschen vergleichbar [91]. Ursachen hierfür sind die geringere BMD im Rattenskelett und das Fehlen von Havers-Kanälen im Knochensystem [91]. In der vorliegenden Studie erhielten die Ratten daher neben der beidseitigen Ovariectomie eine Multidefizienzdiät, um durch einen zusätzlichen metabolischen Effekt (sekundäre Osteoporose) einen vergleichbaren Osteoporose-Status zu erreichen. Dieser konnte in der Übersichtsaufnahme der HE-Färbung im Wirbel L3 der OVXD-Gruppe nachgewiesen werden (Abb. 22A+B). Der negative Einfluss der doppelten Osteoporose-Induktion betraf sowohl kortikale als auch spongiöse Knochenbereiche des Wirbels L3. Bauer et al. (2015) fanden bei gleichem Studiendesign mit weiblichen Sprague-Dawley-Ratten im Jungalter von 10 Wochen ebenfalls eine deutlich verminderte Knochenqualität mit osteoporotischer, spongiöser Knochenarchitektur [23]. Nicht ovariectomierte Ratten, die eine Multidefizienzdiät erhielten (D-Gruppe) zeigten in der vorliegenden Dissertation in der Übersichtsaufnahme der HE-Färbung des Wirbels L3 ebenfalls einen osteoporotischen Knochenstatus (Abb. 22A+B). Ein Mangel an Kalzium, Vitamin D, Vitamin K und Phosphor führt zum Krankheitsbild der sekundären Osteoporose. Spencer (1979) untersuchte den metabolischen Einfluss auf die Entwicklung einer Osteoporose bei sieben Wochen alten weiblichen Schweinen mittels Multidefizienzdiät und fand einen osteoporotischen Knochenstatus in Wirbelkörpern und Femora [321]. Laut dem Autor gehen Osteoporose-assoziierte Frakturen der Wirbelkörper und der Femora mit einer deutlichen Ausdünnung kortikaler und spongiöser Knochenareale einher [321]. In der vorliegenden Dissertation bestätigte sich in der OVXD- und D-Gruppe der negative metabolische Einfluss auf den Wirbel L3, wie er bereits bei weiblichen Jungratten nachgewiesen wurde. Der osteoporotische Knochenstatus in der D-

Gruppe beruhte auf einer durch die Multidefizienzdiät bedingten PTH-Ausschüttung [288]. Sowohl eine Hypokalzämie als auch ein Vitamin D-Defizit bewirken einen PTH-Anstieg [313]. Der Vitamin D-Mangel führt zu einer verringerten Kalzium-Resorption im Gastrointestinaltrakt und über eine entkoppelte PTH-Sekretion zu einem sekundären Hyperparathyreoidismus [288]. Das PTH aktiviert Osteoblasten direkt über den PTHR und indirekt über die Sezernierung von IGF-1 [101]. Diese Effekte müssten primär eine knochenanabole Wirkung haben und die Knochenfestigkeit erhöhen. Hinzu kommt, dass PTH die OPG-Sekretion fördert, die über eine vermehrte Osteoblasten-Aktivierung die knochenanabole Wirkung verstärkt und damit die BMD erhöht [156]. Laut Weitzmann & Ofotokun (2016) besitzt PTH jedoch in Abhängigkeit von Sekretionsmenge knochenanabole oder knochenkatabole Funktionen [355]. Eine exzessive PTH-Ausschüttung führt sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen über eine vermehrte Bildung von RANKL zu einer gesteigerten Osteoklastogenese und somit zur Knochenresorption [355]. Eine intermittierende bzw. pulsatile PTH-Ausschüttung fördert dagegen über OPG und IGF-1 den Knochenanabolismus [257]. Auf dieser Basis wurde Teriparatid (rekombinantes PTH-Fragment aus der Klasse der PTH-Analoga) als erstes knochenanaboles Medikament in den USA von der FDA zur Therapie der Osteoporose zugelassen [257]. Der genaue Wirkmechanismus ist bis heute nicht vollständig verstanden, jedoch scheint die verminderte Expression des Sclerostin-Gens (SOST) eine Rolle zu spielen [211]. In Osteoblasten fungiert PTH als Gegenspieler von Sclerostin und gleichzeitig als Wnt-Aktivator [29], wodurch es die Knochenmasse erhöht. Ein möglicher Zusammenhang zwischen T-Zellen und dem Wnt-Signaltransduktionsweg wird aktuell diskutiert [355].

In der OVX-Gruppe wurde eine höhere Knochenfläche ermittelt als in allen anderen Versuchsgruppen (Abb. 22A+B). Dieser Befund entspricht nicht dem aktuellen Wissensstand zur Osteoporose beim Menschen [67, 109, 132]. Argumentiert werden könnte, dass trotz der Dominanz von trabekulärem Knochen im Wirbelkörper ein negativer, endokriner Einfluss vorliegen könnte [128]. Laut Yamauchi et al. (1995) bleibt die BMD bei weiblichen Jungratten im Alter von acht Wochen nach einem rapiden Verlust in den ersten drei Wochen nach der Ovariectomie anschließend weitgehend stabil [367]. Methodisch limitierend war in der vorliegenden Analyse die HE-Färbung, die keine genauere Aussagen zum Knochengewebe erlaubte und Knochenareale bestehend aus Osteoid und mineralisierter Knochenmatrix gemeinsam anfärbte [93]. Die Diskrepanz bezüglich der endokrin induzierten Osteoporose und der ermittelten Knochenzunahme (OVX-Gruppe) in der vorliegenden Dissertation könnte ein möglicher Ansatzpunkt für zukünftige Pilotstudien des

senilen Rattenmodells sein. Mittels variabler Untersuchungszeiträume könnte ein möglicher knochenkataboler Effekt von Östrogen bei senilen Ratten zeitlich eingegrenzt werden. Neben dem Alter der senilen Ratten spielt der zeitliche Abstand zur endokrin induzierten Osteoporose eine zentrale Rolle. Möglicherweise ließen sich mit einem solchen Studiendesign nicht nur knochenanabole Effekte von Östrogen auf den Knochenstoffwechsel nachweisen.

6.2 Katabole Effekte auf die mineralisierte Knochen- und Knorpelmatrix

Bei der differenzierten Betrachtung des Wirbelkörpers L3 mithilfe der Movat-Pentachrom-Färbung zeigte die OVXD-Gruppe die kleinste mineralisierte Knochenfläche (Abb. 23A). In der OVX-Gruppe war dieser Wert minimal geringer als in der D-Gruppe. Interessanterweise war der Anteil der mineralisierten Knochenfläche an der Gesamtfläche in der OVX-Gruppe größer als in der OVXD-Gruppe und D-Gruppe (Abb. 24A). Auch Yamazaki & Yamaguchi (1989) detektierten einen Verlust des mineralisierten Knochengewebes der Femora bei endokrin und metabolisch induzierter Osteoporose von Sprague-Dawley-Ratten im Jungalter (4–10 Wochen) [368]. Kinney et al. (2000) stellten bei vier Wochen alten Sprague-Dawley-Ratten nach bilateraler Ovariectomie einen geringeren Knochenverlust im Wirbelkörper L6 als in der Tibia fest [187]. Ein Grund für die unterschiedliche Größe der mineralisierten Knochenflächen in der OVX-, D- und OVXD-Gruppe war die divergierende Größe der Osteoidflächen, mit einer deutlich größeren Fläche in der OVXD-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen (Abb. 23C + 24C). Zudem war die Knorpelfläche in der OVX-Gruppe besonders klein (Abb. 23B + 24B). Da beide Gewebekomponenten bei der Berechnung der Gesamtknochenfläche berücksichtigt wurden, beeinflussen sie die Ergebnisse der Flächenanteile. Das Knorpelgewebe nimmt in den ersten sechs Wochen nach Osteoporoseinduktion durch Zellvermehrung temporär zu [366]. Anschließend wird das Knorpelgewebe durch Knochengewebe ersetzt [366]. Zum Einfluss von Östrogen auf die Knorpelzusammensetzung liegen widersprüchliche Erkenntnisse vor [60]. In einer Studie wurde unter Östrogen-Einfluss von einer zunehmenden Verschlechterung des Knorpelgewebes mit abnehmender Chondrozyten-Anzahl berichtet [225]. In ein Jahr alten Stieren hemmte Östrogen die Proteoglykan-Synthese von Chondrozyten, wodurch die Knorpelmatrix geschädigt wurde [225]. Ein möglicher gegenteiliger Östrogen-Effekt beruht auf der Hemmung der Synthese von Stickstoffmonoxid-Synthasen (iNOS) und folglich der NO-Synthese [47]. Das hochreaktive freie Radikal

beeinflusst die Knorpelmatrix negativ [63]. Cake et al. (2005) fanden bei sieben Jahre alten, bilateral ovariectomierten Schafen ein reduziertes und geschädigtes Knorpelgewebe, bedingt durch eine gestörte Proteoglykan-Synthese [47]. Weiter wird ein negativer Einfluss des Östrogen-Entzugs auf den IGF-1-Zyklus diskutiert [103, 130]. Die resultierende Hemmung des Metabolismus von Chondrozyten führt zu einer Reduktion des Knorpelgewebes [236, 346].

In der vorliegenden Dissertation zeigte die D-Gruppe eine reduzierte Knorpelfläche (Abb. 23B + 24B), was möglicherweise auf einer Wechselwirkung des Vitamin D-Haushalts und des Metabolismus des Knorpelgewebes beruht. Chondrozyten exprimieren VDRs und werden durch die Bindung von Vitamin D zur Proliferation stimuliert [188]. Weiterhin inhibiert Vitamin D die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) 9 und 13, die extra- und intrazellulär vorkommen und im Rahmen von Entzündungsprozessen einen destruktiven Einfluss auf die Knorpelmatrix ausüben [212]. In einer Studie von Li et al. (2019) mit sechs Monate alten, weiblichen Sprague-Dawley-Ratten führte eine Multidefizienzdiät - vergleichbar mit den Ergebnissen in der vorliegenden Dissertation - zu einer Reduktion der Knorpeldicke und zu einer Abnahme der Knorpelmatrix im Kniegelenk [212]. Übereinstimmend fanden Pascual-Garrido et al. (2016) bei sechs Monate alten, männlichen Sprague-Dawley-Ratten nach einer Vitamin D-armen Ernährung eine reduzierte Knorpelmatrix und verringerte Proteoglykan-Mengen im Kniegelenk sowie eine verstärkte VDR-Expression in Chondrozyten [266]. Letzteres wurde als Kompensationsmechanismus der Chondrozyten gegenüber einem Vitamin D-Mangel bewertet [340]. Li et al. (2016) fanden bei sechs Monate alten, weiblichen Sprague-Dawley-Ratten, die bilateral ovariectomiert wurden und eine Vitamin D-arme Ernährung erhielten, eine Abnahme an Knorpelgewebe im Kniegelenk [213]. Alle diese Studien wurden an Ratten im Jungalter durchgeführt; entsprechende Untersuchungen an senilen Ratten fehlen [332]. In der Studie von Szychlinska et al. (2019) erhielten männliche Sprague-Dawley-Ratten im Alter von neun Wochen zunächst zehn Wochen eine Vitamin D-arme Diät, was zu einer Reduktion der Knorpeldicke der Tibiae führte. Durch die anschließende zehnwöchige Vitamin D-Zufuhr kam es zu einer Hemmung der MMPs, die für die Zerstörung des Knorpelgewebes und der Extrazellulärmatrix verantwortlich waren, und zu einer Erholung des Knorpelgewebes mit einer ausgeprägten Proteoglykan-Synthese [332]. Zusätzlich exprimierten die Chondrozyten mehr VDRs [332]. Die zellulären und molekularen Mechanismen des positiven Effekts von Vitamin D auf das Knorpelgewebe ist aktuell Gegenstand

der Forschung [227]. Neben den erwähnten MMPs und Proteoglykanen wird auch eine Wechselwirkung mit Glykosaminoglykanen und Kollagen Typ II vermutet [265].

6.3 Anabole Effekte auf das Knochenmark- und Osteoidgewebe

Nach der Betrachtung der katabolen Stoffwechselprozesse liegt der Fokus im folgenden Kapitel auf dem anabolen Metabolismus. Tiere der OVX-Gruppe zeigten im Wirbel L3 die größte Knochenmarkfläche und den größten Anteil der Knochenmarkfläche an der Gesamtknochenfläche (Abb. 25A+B). Vermehrt auftretendes Knochenmarkgewebe und besonders Fettgewebe geht mit einem Verlust an trabekulären Knochen einher und führt in letzter Konsequenz zu einer Knochenatrophie [30, 32]. Da sowohl Osteoblasten als auch Adipozyten von mesenchymalen Stammzellen abstammen, wird bei ihrer Entwicklung eine reziproke Korrelation vermutet [142]. Die gemeinsame mesenchymale Stammzelle wird durch Östrogen beeinflusst [207]. Interessanterweise führt ein Östrogen-Entzug zunächst zu einer vermehrten Bildung von Adipozyten und somit zu einer Vermehrung des Fettgewebes im Knochenmark und erst danach über eine verminderte Bildung und Aktivierung von Osteoblasten zu einer Knochenatrophie [142]. Lei et al. (2009) fanden bei drei Monate alten, bilateral ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratten eine negative Korrelation zwischen der Fettgewebismenge und der BMD in den Femora. Bei den Tieren waren die Zwischenräume in den destruierten Spongiosa-Netzwerken mit Fettgewebe ausgefüllt [207]. Vermutlich fungiert Östrogen als Mediator im Differenzierungsprozess von Osteoblasten und Adipozyten [117, 170]. Im physiologischen Zustand ist die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Adipozyten und knochenformierenden Osteoblasten ausbalanciert [32, 270]. Wie Okazaki et al. (2002) an Knochenmarkzellen von Mäusen belegten, ist an dem Östrogen-induzierten Reifungsprozess von Adipozyten und Osteoblasten BMP-2 beteiligt [251]. In der zu einer gesteigerten Osteoblastogenese führenden BMP-2-Signalkaskade ist der „bone morphogenetic protein receptor type-1B“ (BMPRII) involviert, nicht aber BMPRI, der vermutlich die Differenzierung von Adipozyten beeinflusst [54, 251]. Verstärkend kommt hinzu, dass Östrogen die Expression der an der Adipogenese beteiligten Lipoproteinlipase (LPL) inhibiert [154]. Durch den Östrogen-Entzug fällt somit die Inhibition der Adipogenese weg und die Osteoblastogenese wird nicht stimuliert [302]. Welche weiteren Signalwege in dem durch Östrogen induzierten, dualen Differenzierungsprozess von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten und Adipozyten involviert sind und welche Mediatoren an der Verschiebung

zugunsten der Adipogenese beteiligt sind, ist aktuell unklar und Gegenstand der Forschung [251]. Möglicherweise spielen Proteinkinasen wie die „extracellular signal-regulated kinase“ (ERK) oder Transkriptionsfaktoren wie das „activator protein 1“ (AP-1) eine Rolle [215, 258].

In der vorliegenden Dissertation kam es über die Adipogenese hinaus auch in den Osteoidgeweben durch die Multidefizienzdiät und durch den Östrogen-Mangel (OVXD-Gruppe) zu anabolen Stoffwechseleffekten. Die OVXD-Gruppe zeigte von allen Versuchsgruppen die größte Osteoidfläche (Abb. 23C+24C). Eine wahrscheinliche Erklärung für diesen Befund ist eine metabolisch und endokrin induzierte High-Turnover-Osteoporose [129, 241]. In der Studie von Myburgh et al. (1989) wiesen weibliche Long-Evans-Ratten im Alter von fünf Monaten nach einer metabolisch induzierten Osteoporose eine geschädigte Mikroarchitektur der Femora und Tibiae mit verringerter Knochenstärke und einem größeren Anteil nicht-mineralisierter „weicher“ Knochenmatrix auf [241]. Dieser Befund ist auf einen gesteigerten Knochenabbau durch eine erhöhte Anzahl aktiver Osteoklasten bei gleichzeitig vermindertem Knochenaufbau zurückzuführen [37]. Hinzu kommt, dass Osteoblasten zum einen bei einem osteoporotischen Knochenstatus nicht mit dem Mineralisationsprozess nachkommen und zum anderen im Rahmen der High-Turnover-Osteoporose vermehrt Matrixproteine synthetisieren, die den Mineralisationsvorgang beeinträchtigen [148]. In diesem Kontext ist der zweiphasig ablaufende Mineralisationsprozess wichtig. Während der primären Mineralisation erreicht innerhalb weniger Tage ca. die Hälfte der Knochenmatrix eine BMD von ca. $1,4 \text{ g/cm}^3$ [37, 218, 255]. Der mehr als sechs Monate dauernde sekundäre Mineralisationsprozess erhöht die BMD auf ca. $1,9 \text{ g/cm}^3$ [37, 218]. Der Mineralisationsgehalt eines Osteons (funktionelle Einheit des Knochengewebes) hängt vom Alter ab: junges, niedrig mineralisiertes Knochengewebe zeigt einen hohen Knochenumsatz (high-turnover), altes, hoch mineralisiertes Knochengewebe dagegen einen niedrigeren Knochenumsatz (low-turnover) [218]. El Khassawna et al. (2013) zeigten in weiblichen Sprague-Dawley-Ratten im Alter von 14 Wochen, dass die Kombination aus Multidefizienzdiät und bilateraler Ovariectomie zu einer Hyperosteoidose führt; die Menge an nicht-mineralisiertem Knochengewebe war in der OVXD-Gruppe fünfmal so hoch wie in der Sch-Gruppe [93]. Auch Govindarajan et al. (2014) detektierten im Wirbelkörper L1 von weiblichen Sprague-Dawley-Ratten im Jungalter von zweieinhalb Monaten nach einer Multidefizienzdiät und bilateralen Ovariectomie eine Hyperosteoidose im Rahmen einer High-Turnover-Osteoporose [129]. Zu-

sätzlich zeigte sich eine vermehrte Kollagen-Synthese, die zusammen mit der Hyperosteoidose als Kompensationsmechanismus gegen den Knochenabbau fungierte [129, 255], aber die Mineralisierung der nicht-mineralisierten Knochenmatrix verzögerte [129, 255, 372]. Als weitere mögliche Mediatoren bei einem gestörten Mineralisationsprozess des Osteoidgewebes werden auch FGFs (insbesondere FGF2) diskutiert [48, 137, 214, 297]. In der Studie von Liang et al. (1999) beschleunigte FGF in ovariectomierten weiblichen Sprague-Dawley-Ratten im Alter von drei Monaten den Mineralisationsprozess des Osteoidgewebes der Tibiae [214]. Weitere mögliche Einflussfaktoren des Mineralisationsprozesses sind aktuell Gegenstand der Forschung [214, 218]. Die für die High-Turnover-Osteoporose charakteristische Hyperosteoidose ist auch ein zentrales Merkmal der Osteomalazie [218].

Zur Frage, ob ein Östrogen-Entzug oder eine Multidefizienzdiät die Osteoidbildung stärker beeinflusst, liefert die Literatur widersprüchliche Ergebnisse [345, 354]. Laut Govindarajan et al. (2014) beeinflussen eine Multidefizienzdiät bzw. bilaterale Ovariectomie den Osteoidgehalt unterschiedlich stark, vor allem die Kombinationsbehandlung führte zu einer signifikanten Zunahme an Osteoidgewebe [129]. Ein Östrogen-Mangel bewirkte in ihrer Studie vornehmlich einen trabekulären Knochenverlust, wohingegen die Mangel-diät sowohl den trabekulären als auch den kortikalen Knochen negativ beeinflusste [129]. In der vorliegenden Studie war die Osteoidfläche in der OVX-Gruppe größer als in der D-Gruppe (Abb. 23C+24C). In einem vergleichbaren Versuchsaufbau fanden Hodgkinson et al. (1978) bei weiblichen Wistar-Ratten im Jungalter von einem Monat bei einer kalziumarmen Ernährung einen höheren Anteil an Osteoidgewebe im Wirbelkörper L1 und L2 als bei bilateral ovariectomierten Tieren [150]. Als mögliche Ursache wird der relativ geringe Kalzium-Gehalt der Standardnahrung aufgeführt, die die bilateral ovariectomierten Ratten erhielten [27, 150]. In dieser Studie zeigten die bilaterale Ovariectomie und eine Mangeldiät einen additiven Effekt auf den Osteoidgehalt [150], wobei die Hyperosteoidose als ein Indikator für eine High-Turnover-Osteoporose und nicht als Anzeichen für eine Osteomalazie interpretiert wurde [150, 155].

Zusammenfassend lässt die aktuelle Datenlage darauf schließen, dass die Hyperosteoidose eher auf einen vermehrten Knochenumsatz zurückgeführt werden kann und weniger als Indiz für eine Osteomalazie zu verstehen ist [37, 93, 129, 148, 241, 255]. Für die Diagnose einer Osteomalazie sind neben der Hyperosteoidose und dem fehlgesteuerten Kalzium-Phosphat-Kreislauf auch ein unverändertes Knochenvolumen bzw. eine nahezu konstante BMD erforderlich [87]. Shirai et al. (2002) konnten zudem bei vier Wochen

alten Wistar-Ratten mit einer metabolisch und endokrin induzierten Osteoporose die entstandene Hyperosteoidose in den Tibiae teilweise durch eine nachträglich erhöhte Kalzium-Zufuhr rückgängig machen [309].

6.4 Inhibitorische Effekte der Behandlungen auf die Osteozyten-Anzahl und -Funktion

Als multifunktionale, in die mineralisierte Knochenmatrix eingebaute Zellen machen Osteozyten 90–95 % der Knochenzellen bei senilen Ratten aus [38]. Neben ihren mechanosensorischen Aufgaben besitzen sie im Rahmen der Knochenhomöostase auch endokrine Funktionen (z. B. Regulierung des Phosphat-Haushalts) [259]. Die Lakunen-Struktur und die Dendriten-Vernetzung über Canaliculi spielen eine entscheidende Rolle für die Lebens- und Entwicklungsfähigkeit von Osteozyten [203]. Die Canaliculi dienen über Gap junctions der Zellkommunikation und sezernieren biochemische Botenstoffe in das umliegende, lakuno-kanalikuläre Netzwerk [172]. Die Wahrnehmung mechanischer Stimuli und damit die Funktionsfähigkeit der Osteozyten wird durch ihre Lokalisation und Vernetzungsdichte bestimmt [62]. Veränderungen der Knochenhomöostase (z. B. Östrogen-Entzug, metabolisch bedingter Kalzium- oder Vitamin D-Defizit, besondere physische Belastungen) nehmen Osteozyten über ihre Zellfortläufer wahr und modellieren daraufhin mittels perikanalikulärer und kanalikulärer Umbauprozesse ihre unmittelbare Umgebung [275]. Bei der osteozytären Osteolyse passen sich Osteozyten durch Knochenumbau (Resorption und Reparatur) der mineralisierten Knochenmatrix den veränderten Umweltbedingungen an [339]. Zur Beurteilung der Funktionalität der Osteozyten-Netzwerke der Behandlungsgruppen wurde in der vorliegenden Dissertation die Gesamtanzahl an Osteozyten verglichen. In der K-Gruppe und Sch-Gruppe war die Anzahl an Gesamtosteozyten vergleichbar hoch. Tiere der D-Gruppe wiesen höhere Zahlen auf als Tiere der OVXD-Gruppe, aber geringere Zahlen als Tiere der OVX-Gruppe (Abb. 27A). Die Befunde lassen einen synergistischen Effekt der metabolischen und hormonellen Einflüsse auf das Osteozyten-Netzwerk vermuten. El Khassawna et al. (2015) stellten bei weiblichen Sprague-Dawley-Ratten im Alter von 6–18 Monaten nach einer bilateraler Ovariectomie unter Multidefizienzdät einen ähnlichen Effekt in lumbalen Wirbelkörpern (L1–L3) fest [92]. Die Tiere zeigten neben komplett freiliegenden und nicht mehr im Netzwerk verankerten Osteozyten auch eine geringere MMP-14-Expression [92, 153]. MMP-14 trägt entscheidend zur Ausbildung und Formation der Dendriten bzw. Canaliculi bei und ist ein Marker für den Ausprägungsgrad des Osteozyten-Netzwerks [153]. In der gleichen

Studie exprimierten die ovariectomierten Tiere unter dem Einfluss der Multidefizienzdiät das für die Mechanotransduktion von Osteozyten wichtige Protein LRP5, was als Reaktion auf ein geschädigtes Osteozyten-Netzwerk zu bewerten ist [92]. Der in der vorliegenden Dissertation detektierte, negative Einfluss der Multidefizienzdiät auf Osteozyten ist aktuell noch Gegenstand der Forschung [16]. El Khassawna et al. (2015) wiesen in der Versuchsgruppe mit Osteoporose-Induktion vermehrt das „matrix extracellular phosphoglycoprotein“ (MEPE) nach. Dieses Protein wird als destrukturierender Einflussfaktor auf die Osteozyten-Anzahl und das Osteozyten-Netzwerk diskutiert [16, 92]. Vermutlich sezernieren Osteozyten auch TRAP, das normalerweise von Osteoklasten gebildet wird [16, 336]. Die resultierende Mobilisierung der mineralisierten Knochenmatrix in Form eines perikanalikulären Knochenumbaus kann als Versuch der Aufrechterhaltung der Kalzium-Homöostase verstanden werden [244, 276].

Weitere, mögliche Einflussfaktoren auf die Osteozyten-Anzahl in der OVX- und OVXD-Gruppe sind RANKL und Sclerostin [94]. In Merinoschafen im Durchschnittsalter von 5,5 Jahren fanden El Khassawna et al. (2017) im Wirbelkörper L2 nach einer Ovariectomie mit oder ohne Multidefizienzdiät eine reduzierte Osteozyten-Anzahl und ein defektes Osteozyten-Netzwerk [94]. Das Ausmaß des negativen Einflusses auf die Gesamtosteozyten-Anzahl korrelierte positiv mit den RANKL- und Sclerostin-Werten [57, 178]. Die Kombination beider Mediatoren förderte die Osteoklasten-induzierte Knochenresorption [94, 230].

In der vorliegenden Dissertation wurde in der D-Gruppe eine geringere Gesamtosteozyten-Anzahl ermittelt als in der OVX-Gruppe (Abb. 27A). Auch bei Emerton et al. (2010) war der Einfluss eines Östrogen-Mangels auf die Gesamtosteozyten-Anzahl in 17 Wochen alten, bilateral ovariectomierten Mäusen begrenzt; selbst in den am stärksten betroffenen Knochenregionen (Femur) gingen nur ca. 10–15 % der Osteozyten unter [95]. Der Einfluss von Östrogen auf das Osteozyten-Netzwerk sollte jedoch nicht unterschätzt werden. Florencio-Silva et al. (2018) untersuchten die Oberkieferknochen von vier Monate alten, bilateral ovariectomierten Wistar-Ratten, die anschließend eine Östrogen-Therapie erhielten [108]. Die Östrogen-Zufuhr hemmte die Ovariectomie-induzierte Apoptose der Osteozyten. Gegen Versuchsende (nach 45 Tagen) bestand kein signifikanter Unterschied in der Gesamtosteozyten-Anzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe [2, 108, 169]. Östrogen sichert über die Bindung an „extracellular-signal regulated kinase“ (ERK)-1/2-Rezeptoren auf Osteozyten das Überleben der Zellen [195, 319]. Dabei

kommt es zur Aktivierung des „mechanistic Target of rapamycin“- (mTOR)-Signalwegs, wodurch die Apoptose verhindert wird [195, 319].

In der vorliegenden Dissertation wurde darüber hinaus die Anzahl von morphologischen Osteozyten-Subpopulationen analysiert. Junge und aktive Osteozyten besitzen spindelförmige Zellkörper. Mit zunehmendem Alter und zunehmender mechanischer Belastung werden die Osteozyten runder und kleiner, bis sie abschließend apoptotisch werden [197]. Verglichen mit der OVX-, D- und OVXD-Gruppe war die Anzahl an spindelförmigen, runden und leeren Osteozyten in der K-Gruppe höher (Abb. 26A+B+C). Die reduzierten Zellzahlen gehen auf die metabolisch hervorgerufene und endokrin verursachte Osteoporose zurück [145]. Durch die resultierenden Veränderungen in der Umgebung des lakunokanalikulären Netzwerks passen sich die Osteozyten an die veränderten Rahmenbedingungen an [189, 190]. Neben der bereits thematisierten osteozytären Osteolyse ist auch die Art und Richtung der mechanischen Belastung entscheidend für die Lebensdauer der Osteozyten [248, 348]. Bei einer ausgewogenen, dem Alter entsprechenden Belastung zeigen Osteozyten flache, spindelförmige Zellkörper [352]. Bei falscher bzw. fehlender Krafteinwirkung dominieren dagegen runde, irreguläre und unregelmäßige Osteozyten-Formen [250]. Laut Hemmatian et al. (2017) sind bei männlichen, sechs Wochen alten Mäusen runder und „leerer“ werdende Osteozyten im Femur mechanosensibler und sezernieren bereits bei geringerer Krafteinwirkung als Stressreaktion NO [145]. Zusätzlich zeigen die runder werdenden Zellen eine geringere Anzahl an Canaliculi pro Lakune [145].

Bacabac et al. (2008) bestätigten an isolierten Zellkulturen aus embryonalen Schädelknochen von Hühnern den Befund, dass runde bzw. leere Osteozyten bei mechanischem Stress eher NO sezernieren als spindelförmige Osteozyten [19]. Die NO-Sekretion schädigt die Knochenhomöostase und kennzeichnet im Hinblick auf das Osteozyten-Netzwerk eine destruierte Knochenstruktur [19]. Diese Zusammenhänge spiegeln sich auch in den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation wider, wo in der D- und OVXD-Gruppe die Anzahl der runden bzw. leeren Osteozyten die der spindelförmigen Osteozyten überstieg (Abb. 26B+C).

Eine weitere, mögliche Ursache für die Anfälligkeit des Osteozyten-Netzwerks gegenüber einem Östrogen-Entzug bzw. einer Multidefizienzdiät zeigt sich auf mikrostruktureller Ebene. Im Fokus steht die durch einen Östrogen-Entzug verursachte, vermehrte vaskuläre Durchlässigkeit innerhalb des Osteozyten-Netzwerks [122]. Gatti et al. (2018)

fanden bei 20 Wochen alten, bilateral ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratten eine erhöhte vaskuläre Permeabilität des Osteozyten-Netzwerks der Tibia und einen verlangsamten Signaltransport zwischen den Osteozyten im Vergleich zu Kontrolltieren [122]. Diese Effekte beeinflussten die Form der Einbettung der Osteozyten im lakuno-kanalikulären Netzwerk und ihre Mechanosensibilität [110, 122]. Eine erhöhte vaskuläre Durchlässigkeit und eine verlangsamte, interzelluläre Kommunikation schränkt die Wahrnehmung mechanischer Reize durch Osteozyten ein und schadet somit der Knochenhomöostase [122, 127]. Ein verlangsamter Signaltransport verringert den mechanischen Stimulus, was zu einer gesteigerten und ungesteuerten Knochenresorption führt [122]. Durch einen positiven Feedback-Mechanismus und durch die zusätzliche Apoptose-Neigung der Osteozyten wird das lakuno-kanalikuläre Netzwerk abgebaut [295]. Ähnliche Zusammenhänge detektierten Gershon-Cohen & Jowsey (1964) bei jungen Wistar-Ratten, die kalziumarm ernährt wurden. In den Tieren führte die metabolisch induzierte Osteoporose zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität in den Femora [123].

Jahani et al. (2012) untersuchten mit einem simulierten Computerprogramm den interzellulären Transport und die interzelluläre Kommunikation innerhalb des Osteozyten-Netzwerks und mit endostalen Saumzellen. Sie fanden eine deutliche Abhängigkeit der Mechanosensibilität und Mechanotransduktion der Osteozyten von Kalzium [165]. Gap junctions dienen nicht nur zur interzellulären Kommunikation zwischen Osteozyten im lakuno-kanalikulären Netzwerk, sondern übertragen auch Signale an die Saumzellen der Knochenoberfläche [165, 277]. Neben den bekannten Einflussfaktoren (z. B. Alter, Mikrofrakturen, Sexualhormon-Mangel) könnte die bei Kalzium-Mangel erhöhte Apoptose-Neigung der Osteozyten mit einer verschlechterten Signalvermittlung an die Saumzellen zusammenhängen [165, 306].

Die Konsequenz der Reduktion der Gesamtosteozyten-Anzahl für die Knochenqualität verdeutlicht eine Osteoporose-Studie von Ma et al. (2008) mit sieben Monate alten, bilateral ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratten [224]. Im Wirbelkörper L5 bestand ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen der Osteozyten-Dichte und der Knochenqualität [75, 224]. Auch die Widerstandskraft (gemessen mit dem biomechanischen Parameter „maximum loading“ (ML)) korrelierte mit der Osteozyten-Dichte [75, 224]. Zudem hatte die Osteoporose-Induktion eine geringere Osteozyten-Anzahl und ein geschädigtes Osteozyten-Netzwerk zur Folge [224]. Laut McNamara (2010) fungiert die Osteozyten-Dichte als regulatorische Komponente zur Steuerung der sensorischen Kapazität des Knochengewebes [234].

Zusammenfassend zeigt die Datenlage inklusive der vorliegenden Dissertation, dass ein Östrogen-Entzug, aber auch eine Nährstoffdefizienz, den Osteozyten-Zustand und die Osteozyten-Anzahl negativ beeinflusst [307]. Neben einer höheren Anzahl an runden und leeren Osteozyten bzw. einer geringeren Anzahl an spindelförmigen Osteozyten in der D- und OVXD-Gruppe verglichen mit den anderen Gruppen, wurde in dieser Dissertation auch eine geringere Gesamtanzahl an Osteozyten in der OVX-, D- und OVXD-Gruppe ermittelt. An dieser Stelle sollte nochmals betont werden, dass der osteoporotisch hervorgerufene Knochenstatus im lakuno-kanalikulären Netzwerk primär durch Veränderungen des Matrixmilieus und nicht durch einen gestörten Mineralisationsprozess hervorgerufen wird [308].

6.5 Korrelation zwischen der Osteoporose und der Osteoklasten-Anzahl bzw. -Aktivität

Als knochenabbauende Zellen spielen Osteoklasten in der Knochenmatrix eine zentrale Rolle für den Erhalt der Knochenhomöostase [56]. Ausgehend von einkernigen hämatopoetischen Stammzellen entwickeln sich Osteoklasten über mehrere durch RANKL und M-CSF induzierte Differenzierungsschritte zu knochenresorbierenden mehrkernigen Osteoklasten [120, 210]. In der vorliegenden Dissertation wurde die Osteoklasten-Anzahl und -Aktivität bestimmt, um die Beteiligung der Osteoklasten an der metabolisch oder endokrin induzierten Osteoporose zu analysieren. Die OVXD-Gruppe zeigte die höchste Osteoklasten-Anzahl und -Aktivität (Abb. 30A+32A). Vermutlich zeigte der Östrogen-Entzug und die Multidefizienzdiät einen additiven Effekt auf diese Parameter. In einer Studie von Cenci et al. (2000) mit fünf Wochen alten, bilateral ovariectomierten Mäusen hing die gesteigerte Osteoklastogenese nach einer bilateralen Ovariectomie maßgeblich von der T-Zellfunktion ab [52]. In diesem Kontext ist die TNF- α -Produktion durch T-Zellen von Bedeutung [52, 194, 199, 369]. Bei einem Östrogen-Defizit erhöht sich die TNF- α -Produktion in T-Zellen, was wiederum die M-CSF und RANKL-induzierte Osteoklastogenese steigert [52]. In T-Zell-defizienten Mäusen war eine Ovariectomie nicht in der Lage eine M-CSF und RANKL-induzierte Osteoklastogenese bzw. einen osteoporotischen Knochenstatus auszulösen [52, 157, 256]. Die essenzielle Funktion von T-Zellen bei der postmenopausalen Osteoporose zeigt sich auch an der Regulation der Osteoklastogenese über Östrogen-Rezeptoren, die im Zytosol der T-Zellen vorliegen [152, 186]. Ein Östrogen-Entzug stimuliert nicht die Proliferation aller T-Zellen, sondern bevorzugt von TNF- α -produzierenden T-Zellen [1, 52]. Weiter ist vermutlich JNK an der Signalkaskade

beteiligt [191, 330]. Die Östrogen-vermittelte Inhibition der TNF- α -Produktion durch T-Zellen ist ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt bei der postmenopausalen Osteoporose [52]. Potenziell lassen sich daher TNF- α -Inhibitoren zur Prävention einer hormonell bedingten Osteoporose einsetzen [8, 52].

Weiter führt der Östrogen-Entzug über eine gesteigerte IL-6-Synthese zu einer erhöhten Osteoklasten-Anzahl und -Aktivität [168]. Jilka et al. (1992) untersuchten den Einfluss von IL-6 an den Femora von zwei Monate alten, bilateral ovariectomierten Mäusen [168, 198]. Die gesteigerte Osteoklastogenese im trabekulären Knochen konnte durch die Gabe eines IL-6-Antikörpers verhindert werden [124, 168]. Dieser Befund belegt den Einfluss des Zytokins IL-6 auf die Entstehung einer postmenopausalen Osteoporose [144, 168].

Im Folgenden soll anhand der Ergebnisse der D-Gruppe der metabolische Einfluss (Multidefizienzdiät) auf die Osteoklasten-Anzahl und -Aktivität diskutiert werden. Die D-Gruppe zeigte nach der OVXD-Gruppe die höchste Osteoklasten-Anzahl und -Aktivität (Abb. 30A+32A). In einer Studie mit 5,5 Wochen alten Ratten, die über neun Tage eine Kalzium- und Vitamin D-arme Nahrung erhielten, wiesen die Tibiae ebenfalls eine höhere Osteoklasten-Anzahl und -Aktivität auf [166, 354]. Shiraishi et al. (2000) untersuchten an acht Wochen alten, weiblichen Wistar-Ratten den Einfluss einer nachträglichen Vitamin D-Zufuhr auf einen osteoporotischen Wirbel L3 [166, 310]. Die Behandlung führte zu einer Reduktion der Osteoklasten-Anzahl und -Aktivität und weiter zu einer Abnahme der Knochenresorption [166, 310]. Während sich Östrogen und Vitamin D hinsichtlich ihrer antikatabolen Eigenschaften auf den Knochenabbau und auf Osteoklasten ähneln, zeigt Vitamin D darüber hinaus in vivo anabole Effekte auf die Knochenformation [310]. Bei Vitamin D lassen sich der hemmende Effekt auf die Osteoklastogenese und der positive Effekt auf die Knochenformation einerseits auf eine Inhibition des RANKL/RANK/OPG-Signalwegs und andererseits auf eine vermehrte Kalzium-Resorption und Reduktion der PTH-Synthese zurückführen [24, 89, 310, 334].

Einen anderen Aspekt des senilen Rattenmodells der Osteoporose im Zusammenhang mit der Osteoklasten-Anzahl und -Aktivität untersuchten Pietschmann et al. (2007). Sie fanden bei 23 Monate alten, männlichen Sprague-Dawley-Ratten im Vergleich zu jüngeren Tieren erniedrigte TRAP 5b-Werte in den Tibiae bei gleichzeitig reduzierter BMD [269]. Mit zunehmendem Alter lag demzufolge bei abnehmender Osteoklasten-Anzahl eine gesteigerte Knochenresorption vor [269, 352]. Neben einer reduzierten Anzahl an Osteoklasten trat auch eine für das senile Rattenmodell charakteristische Osteoblasten-Insuffizienz auf [131, 269]. Weiter kam es zu einer deutlichen Zunahme des carboxyterminalen

Typ-1-Kollagen-Telopeptids (CTX), das als Marker der Knochen Degradation gilt [136, 269]. Dieser Befund verstärkt die Hypothese, dass bei der senilen Osteoporose bei einer insgesamt reduzierten Anzahl von Osteoklasten die verbliebenen, knochenabbauenden Zellen eine hohe Aktivität zeigen [292]. Möglicherweise lässt sich CTX als Indikator für die Osteoklasten-Aktivität nutzen [59, 292]. Das Verhältnis aus CTX/TRAP-5b könnte als „Resorptionsindex“-Parameter im senilen Rattenmodell der Osteoporose verwendet werden [292]. Neben der Knochenresorption übernehmen Osteoklasten auch Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase [175, 292]. Wichtig ist, dass die alleinige Reduktion der Osteoklasten-Anzahl nicht ausreicht, um anti-osteoporotische Wirkungen zu erzielen [292]. Für eine wirksame Hemmung der Knochenumbauprozesse müsste der Resorptionsindex – also die Osteoklasten-Aktivität – gesenkt werden, ohne notwendigerweise die Osteoklasten-Anzahl zu beeinflussen, da diese nicht ausschlaggebend zu sein scheint [292]. So ließe sich möglicherweise die Knochenresorption bei gleichzeitig stabiler Knochenformation hemmen [292]. Die Bedeutung von CTX für die Osteoporose und das Verhalten von CTX in weiblichen Sprague-Dawley-Ratten ist aktuell Gegenstand der Forschung [146, 269, 278].

Weiter beeinflussen auch Kathepsin K und Sclerostin Östrogen- bzw. Kalzium-abhängig die Osteoklastogenese [287]. In der Studie von Ren et al. (2016) mit drei Monate alten, bilateral ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratten förderten Kathepsin K und Sclerostin die Osteoklastogenese [121, 287, 357, 362]. Neben einer verstärkten Expression der den Knochenabbau fördernden Proteine Kathepsin K und Sclerostin verringerte sich in den Tieren die Expression von Knochenaufbau fördernden Proteinen (z. B. „runt-related transcription factor 2“ (RUNX2), OPG, LRP-5) [185, 229, 287, 338]. Diese Expressionsänderungen gingen mit einer Erhöhung der Osteoklasten-Anzahl und -Aktivität einher [287].

Die in der vorliegenden Dissertation verwendete Methode zur Osteoporose-Induktion (Multidefizienzdiät und bilaterale Ovariectomie) beeinflusst die Osteoklastogenese auf unterschiedlichen Ebenen, wie die nachfolgenden Studien belegen [318, 327]. Sørensen et al. (2006) regten humane kultivierte CD14⁺-Monozyten mittels M-CSF und RANKL zur Osteoklastogenese an [318]. Die Zugabe von Östrogen zu sich differenzierenden Osteoklasten führte zur Reduktion von TRAP und CTX [318]. Die Zugabe von Östrogen zu differenzierten, reifen Osteoklasten hatte hingegen weder eine Inhibition der Knochenresorption noch eine TRAP-Reduktion zur Folge [318]. Diese Befunde unterstützen die Vermutung, dass die Wirkung von Östrogen vornehmlich auf die Osteoklastogenese und

weniger auf reife Osteoklasten gerichtet ist [318]. Unter dieser Voraussetzung wurde in der vorliegenden Dissertation in der OVX-Gruppe durch den Östrogen-Entzug vornehmlich die Osteoklastogenese gefördert [318]. Vorhandene Osteoklasten werden durch den Wegfall von Östrogen weniger beeinflusst [318]. Dagegen war in der Studie von Starczak et al. (2018) mit VDR-defizienten Mäusen in den Femora eine gesteigerte Osteoklasten-Aktivität bei einer gleichbleibenden Osteoklastogenese nachweisbar [327]. Die Resorptionskapazität und Enzymaktivität der reifen Osteoklasten wurde ohne die Mobilisierung neuer Osteoklasten verstärkt [285, 286, 327].

Ein weiterer Einflussfaktor der Osteoklastogenese bzw. der Osteoklasten-Aktivität sind microRNAs [331]. Dieser Zusammenhang scheint ein möglicher therapeutischer Ansatz zur Prävention der Osteoporose zu sein [331]. Sun et al. (2019) fanden in isolierten murinen Zellen eine deutliche Überexpression der microRNA miR-338-3p während des Differenzierungsprozesses von Vorläuferzellen zu Osteoklasten [331]. Eine Inhibition dieser microRNA hatte eine Hemmung der Osteoklasten-Differenzierung zur Folge [331, 371]. Für die Nutzung der miR-338-3p als Zielmolekül zur Osteoporose-Prävention sind weitere Untersuchungen notwendig [331, 374].

6.6 Metabolische Folgen nach reduziertem Osteocalcin-Gehalt

In der vorliegenden Dissertation zeigte die OVXD-Gruppe im Vergleich zur K-Gruppe einen signifikant geringeren Anteil der Osteocalcin-positiven Fläche an der Knochenfläche (Abb. 35). Als ein von Osteoblasten synthetisiertes Protein spiegelt Osteocalcin die osteoblastäre Differenzierung wider [267]. Parallel zur Abnahme der mineralisierten Knochenfläche nach Osteoporose-Induktion nahm sowohl der absolute als auch der relative Anteil der Osteocalcin-positiven Fläche in der OVX-, D- und OVXD-Gruppe ab (Abb. 33A+35). Da es sich bei Osteocalcin um einen knochenspezifischen osteoblastären Marker handelt, der die osteogene Differenzierung und Reifung von Osteoblasten darstellt, lassen sich aus den Befunden Schlüsse bezüglich des Mineralisationsprozesses von Knochengewebe ziehen. Nakamura et al. (2009) zeigten an aus männlichen Fischer-344-Ratten isolierten mesenchymalen Stammzellen, dass die Osteocalcin-Produktion Kalzium-abhängig erfolgt [242]. Die Kalzium-abhängige Synthese könnte die geringere Osteocalcin-positive Fläche in der D- und OVXD-Gruppe erklären [242].

Das im Knochen häufigste nicht-kollagene Peptid, Osteocalcin, zeigt eine Vitamin K-abhängige posttranslationale Modifikation, bei der Glutamat-Reste carboxyliert werden

[43, 140, 273]. Carboxyliertes Osteocalcin besitzt eine höhere Bindungsaffinität zur mineralisierten Knochenmatrix [43, 84, 300]. Nicht-carboxyliertes Osteocalcin weist dagegen metabolische bzw. hormonelle Eigenschaften auf und führt beispielsweise zu einer vermehrten Insulin-Sekretion, gesteigerten Insulin-Sensitivität und folglich zu einem verminderten Blutzuckerspiegel [43, 104, 105, 206]. Die möglichen hormonellen Eigenschaften des carboxylierten Osteocalcin sind aktuell Gegenstand der Forschung [43, 44]. Drei bis sechs Monate alte Osteocalcin-Knockout-Mäuse waren hyperglykämisch und adipös [85, 86]. Sie zeigten Anzeichen eines metabolischen Syndroms, die mit einer erhöhten Insulin-Resistenz einhergingen [85]. Die auftretende Hypoinsulinämie bestätigte den metabolischen Einfluss von Osteocalcin auf den Energiestoffwechsel [85, 106]. In den Tieren führte eine durch Osteoklasten verursachte Knochenresorption zu einer vermehrten Freisetzung von nicht-carboxyliertem Osteocalcin, welches die aktive Form darstellt [85, 106]. Osteocalcin-Knockout-Mäuse, denen subkutan rekombinantes Osteocalcin injiziert wurde, zeigten einen erhöhten Insulin-Spiegel, eine vermehrte Insulin-Sensitivität und eine verbesserte Glukose-Toleranz [85, 104, 206]. Möglicherweise fungiert der Osteoblasten-Marker auch als ein Insulin-Analogon [85].

Auch Fernández-Real & Ricart (2011) thematisieren in ihrem Review den Zusammenhang zwischen Osteocalcin und Insulin [102]. Die Autoren postulierten, dass ein bisher noch unbekannter Osteocalcin-Rezeptor an den Beta-Zellen die Insulin-Sekretion moduliert, wodurch wiederum über spezifische Insulin-Rezeptoren der Kohlenhydrat-Metabolismus der Osteoblasten beeinflusst wird [71, 102]. Über Interaktionen zwischen Osteoblasten und Osteoklasten wird die Osteocalcin-Synthese reguliert [66, 102, 205]. Aufgrund der engen Verbindung zwischen Osteocalcin und dem Kohlenhydrat-Metabolismus hielten García-Martín et al. (2011) den Osteocalcin-Gehalt für einen möglichen prädiktiven Parameter für das metabolische Syndrom [119].

Bezüglich des in der hier vorliegenden Dissertation untersuchten Einflusses von Östrogen auf den Osteocalcin-Gehalt trägt die Studie von Hara et al. (2007) zum Verständnis bei. Die Autoren untersuchten den Einfluss von Osteocalcin auf die Knochenmatrix in weiblichen, drei Wochen alten Ratten, deren Osteocalcin-Synthese durch Warfarin-Gabe inhibiert wurde. Ein Teil dieser Ratten wurde nach zwölf Wochen euthanasiert; bei den restlichen vorbehandelten Ratten wurde vier Wochen später eine bilaterale Ovariectomie durchgeführt und anschließend die Warfarin-Gabe bis zur Euthanasie zwölf Wochen fortgesetzt. Als Vergleichsgruppe diente eine Kontrollgruppe, die lediglich scheinoperiert wurde und keine Medikamente erhielt [139]. Die einfach behandelte Versuchsgruppe

zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Unterschiede bei der Knochenreife nicht aber bei der BMD [86, 138, 139]. Die Tiere bildeten die gleiche Menge an Knochenmatrix, allerdings zeigte das Knochengewebe eine „mindere“ Qualität [138, 139]. Die zweifach behandelte Versuchsgruppe wies durch den zusätzlichen Wegfall von Östrogen eine geringere und gleichzeitig fragilere Knochenstruktur auf [138, 139]. Dieser Befund unterstützt die Annahme, dass Osteocalcin nicht direkt die BMD beeinflusst, sondern die Knochenumwandlung. Das bei Osteocalcin-Mangel entstehende Knochengewebe geringerer Qualität kann leichter abgebaut werden [138, 139].

In der Studie von Ikeda et al. (1993) mit sieben Monate alten, bilateral ovariectomierten Wistar-Ratten [161] kam es in den ersten zwei Wochen nach dem Eingriff in den Tibiae zu einem temporären Anstieg des Osteocalcin-Gehalts [161, 174]. Die Autoren vermuteten eine initial stark zunehmende Knochenresorption, die mit einer erhöhten Freisetzung von Osteocalcin-Fragmenten einherging [161]. Laut Lumachi et al. (2009) korreliert zu Beginn der postmenopausalen Osteoporose der Osteocalcin-Gehalt im Serum linear mit dem Knochenverlust [222]. Damit könnte das freigesetzte Osteocalcin Rückschlüsse auf das Ausmaß des Knochenabbaus erlauben [161, 222].

Aufgrund der geringeren Osteocalcin-positiven Flächen in der OVX-, D- und OVXD-Gruppe in der vorliegenden Dissertation soll auch die Osteocalcin-Synthese in den Osteoblasten diskutiert werden. In einer Studie ermittelten Luvizuto et al. (2010) mit neun Wochen alten, bilateral ovariectomierten Wistar-Ratten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen einen geringeren Osteocalcin-Gehalt in der Knochenmatrix des Kieferknochens [223]. Grund hierfür war der mit der Apoptose von Osteoblasten einhergehende Syntheseverlust an Osteocalcin [163, 223], der mit einer geringeren Mineralisation und Formation von Knochengewebe verbunden ist [223]. Ähnliches gilt für die mit einer Multidefizienzdiät vorbehandelten Versuchsgruppen, da Kalzium im Reifungsprozess der Osteocalcin-Synthese als Kofaktor benötigt wird [299].

In einer Studie mit zwölf Wochen alten, bilateral ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratten fanden Srivastava et al. (2000), dass sich durch Vitamin D-Zugabe die Osteocalcin-Synthese in den Femora steigern ließ; dieser Effekt beruhte auf einer direkten Stimulation der Transkription des Osteocalcin-Gens [322]. Damit besteht auch eine Verknüpfung zwischen Osteocalcin und Vitamin D [322]. Auch Staal et al. (1998) fanden bei fetalen Knochenzellen von Mäusen eine Abhängigkeit des Osteocalcin-Kreislaufs von Vitamin D [325]. Dieser Effekt beruht auf einer direkten Stimulation der Osteoblasten [325]. Die

Regulation und Kontrolle des Osteocalcin-Haushalts hängt somit eng mit der Anwesenheit von Vitamin D zusammen [324–326].

Zusammenfassend handelt es sich bei Osteocalcin nicht ausschließlich um einen Osteoblasten-Marker und Knochenformationsparameter. Zahlreiche Studien belegen die metabolischen Eigenschaften des Proteins [104, 206, 353]. Neben dem bereits thematisierten Effekt auf die Glukose-Homöostase könnte Osteocalcin noch über weitere, bisher noch nicht bekannte endokrine Eigenschaften verfügen.

6.7 Limitationen der Studie

Die vorliegende Untersuchung zielt darauf ab, die Eignung des senilen Rattenmodells für die Osteoporoseforschung zu evaluieren. Bei der Bewertung der Erkenntnisse zum metabolischen und endokrinen Einfluss auf den osteoporotischen Knochenstatus sind verschiedene, teilweise limitierende Aspekte zu berücksichtigen.

Das nicht vollends identische Alter der untersuchten Sprague-Dawley-Ratten hat möglicherweise die Ergebnisse der histologischen Analyse der Wirbelkörper beeinflusst. Zwar befanden sich alle Versuchstiere in einem Altersfenster von 45–48 Wochen und galten somit als senile Ratten, jedoch sind Veränderungen der Knochenarchitektur auch bei geringen Altersunterschieden von zwei bis drei Wochen möglich. Der aus Gründen der Praktikabilität zugelassene geringfügige Altersunterschied könnte zu einer altersabhängigen Beeinflussung der Ergebnisse geführt haben.

Weiterhin war der begrenzte Behandlungszeitraum von ca. drei Monaten möglicherweise limitierend. Längere Behandlungszeiträume von ca. 12–18 Monaten hätten vermutlich zu deutlicheren Veränderungen im Knochenstoffwechsel mit daraus resultierenden osteoporotischen Frakturen geführt [91, 341, 358]. Solche langen Behandlungszeiträume sind jedoch aus ethischer Sicht schwer vertretbar. Tierexperimentelle Studien sollten nach den drei Prinzipien Replacement, Reduction und Refinement durchgeführt werden, um einen verantwortungsvollen und tierschutzkonformen Umgang zu gewährleisten [208].

Für eine bessere Vergleichbarkeit und zum Ausschluss möglicher Störfaktoren durch Dritte erfolgte die Bestimmung der Zellzahlen und die Festlegung der ROIs durch einen einzigen Untersucher. Gleichwohl könnte die Erwartungshaltung des Untersuchers die Auswertung beeinflusst haben. Daher wäre eine verblindete Auswertung sinnvoll gewesen.

Zudem ist einschränkend aufzuführen, dass die Verarbeitung der histologischen Schnitte und die Herstellung der Paraffinschnitte zwar nach standardisierten Protokollen (z. B. identische Schnitthöhe und Schnittwinkel) erfolgten, aber von mehreren Untersuchern ausgeführt wurden. Trotz der Einhaltung technischer Standards könnten bei der Durchführung Probleme entstanden sein, die in letzter Konsequenz auch die Qualität der histologischen Präparate negativ beeinflusst haben. Die Auswertung gefärbter histologischer Schnitte hängt entscheidend von der Beschaffenheit der Präparate ab. Aufgrund der niedrigen Fallzahlen in den Versuchsgruppen wurden auch Präparate mit einer geringfügig reduzierten Qualität berücksichtigt. Durch die Bestimmung von Mittelwerten \pm Standardabweichung war es dennoch möglich, die Streubreite der Werte abzuschätzen.

6.8 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die vorliegende Dissertation diente der Evaluation der Hypothese, dass eine kombinierte Behandlung aus einer bilateralen Ovariectomie und einer Kalzium- bzw. Vitamin D- armen Diät zu einer ausgeprägteren Form der Osteoporose im Wirbelknochen L3 führt als die jeweiligen Einzelbehandlungen.

Sowohl histologisch als auch histomorphometrisch ließ sich in der OVXD-Gruppe eine kleinere Knochenfläche nachweisen als in der OVX- und D-Gruppe. Hierbei bestand zwischen der OVXD-Gruppe und OVX-Gruppe ein signifikanter Unterschied. Gleiches galt für die mineralisierte Knochenfläche. Weitere Ergebnisse wie ein gesteigertes Osteoidgewebe in der zweifach behandelten OVXD-Gruppe bestätigten einen für die Osteoporose charakteristischen pathophysiologischen Knochenmetabolismus. Die verminderte Osteozyten-Anzahl bei gleichzeitig erhöhter Osteoklasten-Anzahl in der OVXD-Gruppe belegten den Einfluss dieser Knochenzellpopulationen auf die Knochenmatrix. Zusätzlich bestätigte die gesteigerte Osteoklasten-Aktivität in der OVXD-Gruppe die verstärkte Osteoporoseinduktion durch die kombinierte Behandlung aus bilateraler Ovariectomie und Kalzium- bzw. Vitamin D- armer Diät. Weiter war in der OVXD-Gruppe eine reduzierte Aktivität der knochenbildenden Osteoblasten nachweisbar.

Zusammenfassend wies die vorliegende tierexperimentelle Studie einen stärkeren Einfluss einer kombinierten Behandlung aus bilateraler Ovariectomie und Kalzium- bzw. Vitamin D- armer Diät auf die Osteoporoseinduktion im Vergleich zu den Einzelbehandlungen nach. Das senile Rattenmodell in Form einer OVXD-Gruppe erwies sich somit für

Diskussion

die Analyse osteoporotischer Veränderungen im Knochenstatus und pathophysiologischer Mechanismen als geeigneter.

Die gewonnenen Erkenntnisse werfen aber neue Fragen auf, die in zukünftigen Studien behandelt werden sollten. Dazu zählt die Analyse von osteoporotischen Veränderungen in anderen Knochenregionen. Möglicherweise lässt sich in Knochenarealen mit dominierendem trabekulärem Knochengewebe leichter ein osteoporotischer Knochenstatus hervorrufen [67, 246].

Weiter scheint die Wechselwirkung zwischen Adipozyten und Osteoblasten bei der endokrin induzierten Osteoporose eine Rolle zu spielen. Weitere Studien sind notwendig, um den Einfluss dieses Zusammenhangs auf den Knochenmetabolismus zu evaluieren.

Interessant wäre auch, ob sich die vorliegenden Befunde auf andere Tiermodelle übertragen lassen und ob es möglicherweise geeignetere Tiermodelle für die Abbildung eines osteoporotischen Knochenstatus gibt [90, 344].

Zur Analyse endokriner und metabolischer Einflussfaktoren der Osteoporose sind Knockout-Tiermodelle eine vielversprechende Alternative zum senilen Rattenmodell [350]. Denkbar wäre die Generierung spezifischer Knockout-Tiermodelle für verschiedene Osteoporoseformen mit unterschiedlichen Knochenstoffwechselfiziten. Bei diesen Knockout-Tieren könnte man möglicherweise auf die üblichen Behandlungsmethoden (z. B. bilaterale Ovariectomie, Diäten) verzichten. Die Möglichkeit der Etablierung universeller Osteoporose-Knockout-Tiermodelle scheint aber vor dem Hintergrund der multifaktoriell bedingten Pathogenese der Erkrankung schwierig.

In der vorliegenden Dissertation wurde auch ein möglicher Zusammenhang zwischen Osteocalcin und dem Kohlenhydrat-Metabolismus diskutiert [71, 102]. Dies würde für eine Verbindung zwischen der endokrinen bzw. metabolischen Osteoporose und dem metabolischen Syndrom sprechen. Die Beeinflussung des Insulin-Spiegels durch Osteocalcin unterstützt diese Hypothese.

Der Fokus der vorliegenden Dissertation lag auf der knochenhistologischen und histomorphometrischen Untersuchung des Knochenmetabolismus der Osteoporose. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten auch dazu beitragen, neue Verfahren zur Prävention und Therapie des Krankheitsbilds der Osteoporose zu entwickeln.

7 Zusammenfassung

Bei der Osteoporose handelt es sich um eine systemische Skeletterkrankung, der ein Ungleichgewicht im Knochenmetabolismus zugrunde liegt. Die Folge ist eine Imbalance zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau zugunsten der Knochenresorption, die mit einer verminderten Knochenmineraldichte einhergeht. Bisher war das bilateral ovariectomierte Rattenmodell das Tiermodell der Wahl in der Osteoporose-Forschung. Die Versuche wurden meist an Jungtieren ohne Berücksichtigung metabolischer Einflussfaktoren der Osteoporose durchgeführt. Das Hauptziel dieser Dissertation war daher die Etablierung eines senilen Rattenmodells zur Analyse knochenhistologischer Veränderungen im Rahmen einer metabolisch und endokrin induzierten Osteoporose.

Hierfür wurden 35 weibliche Sprague-Dawley-Ratten im Alter von 45–48 Wochen in fünf Versuchsgruppen aufgeteilt (Kontrollgruppe (K), Scheingruppe (Sch), bilaterale Ovariectomiegruppe (OVX), Gruppe mit Kalzium- und Vitamin D-armer Diät (D) und Gruppe mit Kombination aus bilateraler Ovariectomie und Diät (OVXD)). Nach dreimonatiger Behandlung wurden die Tiere euthanasiert und Schnitte der Wirbelknochen L3 histologisch ausgewertet. Neben der Knochenfläche wurden auch Knochenzellpopulationen (Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten) mit verschiedenen Färbemethoden analysiert. Mit der histomorphometrischen Untersuchung sollte überprüft werden, ob eine Kombinationsbehandlung aus bilateraler Ovariectomie und Multidefizienzdiät (OVXD) zur Herbeiführung eines osteoporotischen Knochenstatus geeigneter ist als eine alleinige bilaterale Ovariectomie (OVX) oder Multidefizienzdiät (D).

Tiere der OVXD- und D-Gruppe zeigten eine verminderte Knochenfläche. Zusätzlich wies die OVXD-Gruppe eine verminderte mineralisierte Knochenfläche auf. Parallel dazu war in der D- und OVXD-Gruppe eine reduzierte Gesamtosteozyten-Anzahl, eine erhöhte Osteoklasten-Anzahl und -Aktivität und ein erniedrigter, relativer Osteocalcin-Gehalt nachweisbar. Die beobachtete Mineralisationsstörung und die in Richtung eines erhöhten Knochenkatabolismus deutenden Veränderungen der Zellzahlen von Osteozyten, Osteoklasten und Osteoblasten bildeten einen osteoporotischen Knochenstatus ab. Die vorliegenden Daten belegen, dass das vorgestellte senile Rattenmodell mit einer metabolisch und endokrin ausgelösten Osteoporose als Tiermodell für zukünftige Studien zur Osteoporose geeignet ist.

8 Summary

Osteoporosis is a systemic skeletal disease based on an imbalance in bone metabolism. The consequence is a disproportion between bone resorption and bone formation in favor of bone resorption, resulting in reduced bone density. So far, the bilateral ovariectomized rat model has served as the animal model of choice in osteoporosis research. However, experiments were mainly undertaken in young animals without considering the metabolic factors influencing osteoporosis. Therefore, the focus of this dissertation was the establishment of a senile rat model for the investigation of bone histological changes in the context of metabolic and endocrine-induced osteoporosis.

For this purpose, 35 female Sprague Dawley rats aged 45–48 weeks were divided into five test groups (control group (K), sham group (Sch), bilaterally ovariectomized group (OVX), the group receiving low calcium and low vitamin D diet (D), and the group with a combination of bilateral ovariectomy and diet (OVXD)). After three months of treatment, euthanasia and histological evaluation of sections of the L3 vertebral bone took place. In addition to the bone tissue area, bone cell populations (osteoblasts, osteoclasts, osteocytes) were examined with different staining procedures. With this histomorphometric analysis, it should be verified whether a combination treatment of bilateral ovariectomy and multi-deficiency diet (OVXD) is more suitable for inducing osteoporotic bone status than bilateral ovariectomy (OVX) or multi-deficiency diet (D) alone.

Animals in the OVXD and D groups showed a reduced bone area. In addition, a reduced mineralized bone area was found in the OVXD group. At the same time, a reduced total number of osteocytes, an increased number and activity of osteoclasts, and a reduced relative osteocalcin content were detected in the D and OVXD groups. The observed mineralization disturbance and the changes in the cell counts of osteocytes, osteoclasts, and osteoblasts, pointing in the direction of bone catabolism, reflected an osteoporotic bone status. The available data show that the presented senile rat model based on metabolic and endocrine-induced osteoporosis is suitable as an animal model for future studies on osteoporosis.

9 Abkürzungsverzeichnis

AP.....	alkalische Phosphatase
Aqua dest.....	Aqua destillata
BMD.....	bone mineral density
BMP	bone morphogenetic protein
BMU.....	basic multicellular unit
Calcitriol.....	1,25-Dihydroxycholecalciferol
CTX.....	carboxyterminales Typ-1-Kollagen-Telopeptid
D-Gruppe.....	Diätgruppe
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FGF.....	fibroblast growth factor
FRAX	Fracture Risk Assessment Tool
H ⁺	Proton
HCl	Salzsäure
HE.....	Hämatoxylin-Eosin
IGF	insulin-like growth factor
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
JNK.....	c-Jun N-terminal kinase
K-Gruppe.....	Kontrollgruppe
KG	Körpergewicht
L3	dritter Lendenwirbel
LRP.....	low density lipoprotein receptor-related protein
M	Monate
MAPK	mitogen-activated protein kinase
M-CSF.....	macrophage colony-stimulating factor
MMP.....	Matrix-Metalloproteinase
NF-κB.....	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
OPG.....	Osteoprotegerin
OVX-Gruppe.....	Ovarektomiegruppe
OVXD-Gruppe	Ovarektomie+Diät-Gruppe
PBS.....	phosphatgepufferte Salzlösung
PFA.....	Paraformaldehyd

Abkürzungsverzeichnis

PTH	Parathormon
PTHR.....	Parathormonrezeptor
RANK.....	Receptor Activator of NF- κ B
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
ROI.....	region of interest
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
Sch-Gruppe.....	Scheingruppe
SEMA.....	Semaphorin
sRANKL.....	soluble Receptor Activator of NF- κ B Ligand
TGF- β	transforming growth factor-beta
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TRAP.....	Tartrat-resistente saure Phosphatase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
Wnt.....	Wortkreuzung aus wingless und Int-1

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Aufbau eines langen Röhrenknochens am Beispiel des Femurs	3
Abbildung 2:	Aufbau des dritten Lendenwirbels (L3) (Ansicht von kranial, links) und Knochenarchitektur der Spongiosa eines gesunden Lendenwirbelkörpers (rechts)	3
Abbildung 3:	Histologischer Aufbau des Knochens	5
Abbildung 4:	Osteoblastäre Differenzierung der mesenchymalen Zellreihe	7
Abbildung 5:	Funktionen eines reifen Osteoblasten	7
Abbildung 6:	Entwicklung der Osteoblasten zu Osteozyten.....	10
Abbildung 7:	Aktiver Osteoklast mit subosteoklastischem Kompartiment.....	11
Abbildung 8:	Bone remodeling in der Spongiosa (A) und Kompakta (B)	12
Abbildung 9:	Zellverbindungen zwischen Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten.....	16
Abbildung 10:	Entwicklung der Knochenmasse im Laufe des Lebens	17
Abbildung 11:	Stufenschema der senilen Osteoporose-Induktion im Rattenmodell ..	28
Abbildung 12:	Ovarektomie bei einer Sprague-Dawley-Ratte	31
Abbildung 13:	Histologische Übersichtsaufnahme des dritten Lendenwirbels (L3) nach Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung im Querschnitt bei einer Schnitthöhe von 4 µm	34
Abbildung 14:	Histologische Übersichtsaufnahme des dritten Lendenwirbels (L3) nach Movat-Pentachrom-Färbung im Querschnitt bei einer Schnitthöhe von 4 µm	35
Abbildung 15:	Histologische Darstellung der Osteoklasten im kortikalen Knochen des dritten Lendenwirbels (L3) im Querschnitt bei einer Schnitthöhe von 4 µm – Nachweis über die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP).....	36
Abbildung 16:	Direkte Immunhistochemie (A) und die indirekte Immunhistochemie (B)	37
Abbildung 17:	Vorbereitung der Auswertung des dritten Lendenwirbels (L3) nach der Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung im Querschnitt bei einer Schnitthöhe von 4 µm mithilfe des Plugins „Trainable Weka Segmentation“	41
Abbildung 18:	Klassifizierung des dritten Lendenwirbels (L3) nach der Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung im Querschnitt bei einer Schnitthöhe von 4 µm mithilfe des Plugins „Trainable Weka Segmentation“	42
Abbildung 19:	Osteozyten-Formen des dritten Lendenwirbels (L3) nach der Silbernitrat-Färbung im Querschnitt bei einer Schnitthöhe von 4 µm	43
Abbildung 20:	Manuelle Analyse des enzymhistochemischen Nachweises der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) mithilfe des Programms „ImageJ“	44

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 21:	Histologische Übersichtsaufnahme des dritten Lendenwirbels (L3) nach dem immunhistochemischen Nachweis von Osteocalcin im Querschnitt bei einer Schnitthöhe von 4 µm	45
Abbildung 22:	Histomorphometrische Auswertung der Knochenfläche des dritten Lendenwirbels (L3).....	47
Abbildung 23:	Größe der mineralisierten Knochenfläche (A), der Knorpelfläche (B) und der Osteoidfläche (C) des dritten Lendenwirbels (L3)	49
Abbildung 24:	Relativer Anteil der mineralisierten Knochenfläche (A), der Knorpelfläche (B) und der Osteoidfläche (C) an der Gesamtknochenfläche des dritten Lendenwirbels (L3)	50
Abbildung 25:	Größe der Knochenmarkfläche (A) und relativer Anteil der Knochenmarkfläche an der Gesamtknochenfläche (B) des dritten Lendenwirbels (L3)	51
Abbildung 26:	Anzahl spindelförmiger (A), runder (B) und leerer (apoptotischer) (C) Osteozyten im dritten Lendenwirbel (L3).....	52
Abbildung 27:	Gesamtosteozyten-Anzahl (A) und Knochenfläche (B) des dritten Lendenwirbels (L3).....	53
Abbildung 28:	Anzahl spindelförmiger (A), runder (B) und leerer (apoptotischer) (C) Osteozyten im dritten Lendenwirbel (L3) pro Knochenfläche	54
Abbildung 29:	Gesamtosteozyten-Anzahl im dritten Lendenwirbel (L3) pro Knochenfläche.....	55
Abbildung 30:	Mittlere Osteoklasten-Anzahl (A) und mittlere Osteoklasten-Anzahl pro Knochenfläche (B) des dritten Lendenwirbels (L3).....	56
Abbildung 31:	Mittlere Osteoklasten-Länge (A) und mittlere Osteoklasten-Länge pro Knochenfläche (B) des dritten Lendenwirbels (L3)	57
Abbildung 32:	Nachweis der Osteoklasten-Aktivität – Quotient aus der mittleren Osteoklasten-Anzahl und -Länge (A) bzw. Quotient aus der mittleren Osteoklasten-Länge und -Anzahl (B) des dritten Lendenwirbels (L3)	58
Abbildung 33:	Osteocalcin-positive Fläche (A) und Knochenfläche (B) des dritten Lendenwirbels (L3).....	59
Abbildung 34:	Anteil der Osteocalcin-positiven Fläche an der Gesamtfläche (A) und Anteil der Knochenfläche an der Gesamtfläche (B) des dritten Lendenwirbels (L3).....	60
Abbildung 35:	Anteil der Osteocalcin-positiven Fläche an der Knochenfläche des dritten Lendenwirbels (L3)	60

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Entwässerungsschema der Paraffineinbettung	33
Tabelle 2:	Mikroskop-spezifische Umrechnungsfaktoren in Abhängigkeit von der Vergrößerung	41
Tabelle 3:	Umgesetzte Energie.....	117
Tabelle 4:	Rohnährstoffe und Feuchtigkeit	117
Tabelle 5:	Kohlenhydrate	117
Tabelle 6:	Mineralien	117
Tabelle 7:	Spurenelemente	118
Tabelle 8:	Zugesetzte Vitamine.....	118
Tabelle 9:	Aminosäuren	119
Tabelle 10:	Fettsäuren	119
Tabelle 11:	Materialien für die Herstellung der 4 % Paraformaldehyd-(PFA)-Lösung und für die PFA-Fixierung	120
Tabelle 12:	Herstellung der 4 % Paraformaldehyd-(PFA)-Lösung.....	120
Tabelle 13:	Methode zur Fixierung von Knochenproben	120
Tabelle 14:	Materialien zur Entkalkung von Knochenproben	121
Tabelle 15:	Methode zur Entkalkung von Knochenproben.....	121
Tabelle 16:	Materialien zur Herstellung von Paraffinschnitten	121
Tabelle 17:	Methode zur Herstellung von Paraffinschnitten.....	122
Tabelle 18:	Materialien für die Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung.....	122
Tabelle 19:	Herstellung der Eosin-Lösung für die Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung.....	122
Tabelle 20:	Methode der Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung	123
Tabelle 21:	Materialien für die Movat-Pentachrom-Färbung	123
Tabelle 22:	Herstellung der Lösungen für die Movat-Pentachrom-Färbung	124
Tabelle 23:	Methode der Movat-Pentachrom-Färbung	124
Tabelle 24:	Materialien für die Silbernitrat-Färbung	125
Tabelle 25:	Herstellung der Lösungen für die Silbernitrat-Färbung	125
Tabelle 26:	Methode der Silbernitrat-Färbung	125
Tabelle 27:	Materialien für die Färbung der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP).....	126
Tabelle 28:	Herstellung der Lösungen für die Färbung der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP)	127
Tabelle 29:	Methode der Färbung der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP).....	127
Tabelle 30:	Materialien für die Osteocalcin-Färbung	128
Tabelle 31:	Herstellung der Lösungen für die Osteocalcin-Färbung	128

Tabellenverzeichnis

Tabelle 32: Methode der Osteocalcin-Färbung	129
Tabelle 33: Methode der Histomorphometrie mit ImageJ	130

12 Literaturverzeichnis

1. Abrahamsen B, Bendtzen K, Beck-Nielsen H (1997) Cytokines and T-lymphocyte subsets in healthy post-menopausal women: Estrogen retards bone loss without affecting the release of IL-1 or IL-1ra. *Bone* 20(3):251–258
2. Abuohashish HM, Ahmed MM, Sabry D et al. (2017) ACE-2/Ang1-7/Mas cascade mediates ACE inhibitor, captopril, protective effects in estrogen-deficient osteoporotic rats. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 92:58–68
3. Adami G, Saag KG (2019) Glucocorticoid-induced osteoporosis: 2019 concise clinical review. *Osteoporos Int* 30(6):1145–1156
4. Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA et al. (2006) Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *Journal of Bone and Mineral Research* 21(4):605–615
5. Akkawi I, Zmerly H (2018) Osteoporosis: Current Concepts. *Joints* 6(2):122–127
6. Almeida M, Laurent MR, Dubois V et al. (2017) Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews* 97(1):135–187
7. Altromin (2021) Fumi Kalkulation <https://altromin.de/> Zugriff am 26. März 2020
8. Ammann P, Rizzoli R, Bonjour JP et al. (1997) Transgenic mice expressing soluble tumor necrosis factor-receptor are protected against bone loss caused by estrogen deficiency. *J Clin Invest* 99(7):1699–1703
9. Ansari N, Sims NA (2020) The Cells of Bone and Their Interactions. In: Stern PH (Hrsg.) *Bone Regulators and Osteoporosis Therapy*. Springer, Cham, S 1–25
10. Anthamatten A, Parish A (2019) Clinical Update on Osteoporosis. *Journal of Midwifery & Women's Health* 64(3):265–275
11. Antonacci MD, Hanson DS, Leblanc A et al. (1997) Regional variation in vertebral bone density and trabecular architecture are influenced by osteoarthritic change and osteoporosis. *Spine* 22(20):2393–2401; discussion 2401–2402
12. Arana-Chavez VE, Bradaschia-Correa V (2009) Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41(3):446–450
13. Arastéh K, Baenkler H-W, Bieber C et al. (2018) *Duale Reihe – Innere Medizin* (4., überarbeitete Auflage). Thieme, Stuttgart
14. Arganda-Carreras I, Kaynig V, Rueden C et al. (2017) Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinformatics* 33(15):2424–2426

15. Armstrong K, Eisen A, Weber B (2000) Assessing the risk of breast cancer. *The New England journal of medicine* 342(8):564–571
16. Atkins GJ, Findlay DM (2012) Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take. *Osteoporos Int* 23(8):2067–2079
17. Aumüller, G (2020) *Duale Reihe – Anatomie* (5., korrigierte Auflage). Thieme, Stuttgart
18. Avioli LV (1999) Vitamin D and the D-hormones, alfacalcidol and calcitriol, as therapeutic agents for osteoporotic populations. *Calcif Tissue Int* 65(4):292–294
19. Bacabac RG, Mizuno D, Schmidt CF et al. (2008) Round versus flat: bone cell morphology, elasticity, and mechanosensing. *Journal of Biomechanics* 41(7):1590–1598
20. Bagi CM, Wilkie D, Georgelos K et al. (1997) Morphological and structural characteristics of the proximal femur in human and rat. *Bone* 21(3):261–267
21. Baldock PA, Thomas GP, Hodge JM et al. (2006) Vitamin D action and regulation of bone remodeling: suppression of osteoclastogenesis by the mature osteoblast. *Journal of Bone and Mineral Research* 21(10):1618–1626
22. Baron R, Kneissel M (2013) WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 19(2):179–192
23. Bauer NB, Khassawna TE, Goldmann F et al. (2015) Characterization of bone turnover and energy metabolism in a rat model of primary and secondary osteoporosis. *Experimental and toxicologic pathology* 67(4):287–296
24. Baylink D, Stauffer M, Wergedal J et al. (1970) Formation, mineralization, and resorption of bone in vitamin D-deficient rats. *J Clin Invest* 49(6):1122–1134
25. Becker S, Ogon M (2008) Epidemiology of osteoporosis. In: Becker S, Ogon M (Hrsg.) *Balloon Kyphoplasty*. Springer, Wien, S 1–3
26. Bélanger LF (1969) Osteocytic osteolysis. *Calcified tissue research* 4(1):1–12
27. Bell GH, Cuthbertson DP, Orr J (1941) Strength and size of bone in relation to calcium intake. *The Journal of Physiology* 100(3):299–317
28. Bellido T (2014) Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 94(1):25–34
29. Bellido T, Ali AA, Gubrij I et al. (2005) Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology* 146(11):4577–4583
30. Benayahu D, Shur I, Ben-Eliyahu S (2000) Hormonal changes affect the bone and bone marrow cells in a rat model. *J. Cell. Biochem.* 79(3):407–415

Literaturverzeichnis

31. Benninghoff A, Drenckhahn D (2008) Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Bd. 1, Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem (17. Auflage). © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München
32. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C et al. (1992) Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *Journal of cell science* 102 (Pt 2):341–351
33. Berry JD, Dyer A, Cai X et al. (2012) Lifetime risks of cardiovascular disease. *The New England journal of medicine* 366(4):321–329
34. Binkley N, Blank RD, Leslie WD et al. (2017) Osteoporosis in Crisis: It's Time to Focus on Fracture. *Journal of Bone and Mineral Research* 32(7):1391–1394
35. Bleibler F, Rapp K, Jaensch A et al. (2014) Expected lifetime numbers and costs of fractures in postmenopausal women with and without osteoporosis in Germany: a discrete event simulation model. *BMC Health Services Research* 14:284
36. Böcker W, Doobare IU, Khachatryan A et al. (2022) Fractures in untreated patients with osteoporosis in Germany: an InGef healthcare insurance database analysis. *Osteoporos Int.* 33(1):77–86
37. Boivin G, Meunier PJ (2002) Changes in bone remodeling rate influence the degree of mineralization of bone. *Connective tissue research* 43(2-3):535–537
38. Bonewald LF (2006) Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *Bonekey Osteovision* 3(10):7–15
39. Bonewald LF (2011) The amazing osteocyte. *Journal of bone and mineral research* 26(2):229–238
40. Bonjour JP, Theintz G, Law F et al. (1994) Peak bone mass. *Osteoporosis international* 4 Suppl 1(1):7–13
41. Bonucci E, Ballanti P (2014) Osteoporosis-bone remodeling and animal models. *Toxicologic pathology* 42(6):957–969
42. Boyce BF (2013) Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *Journal of Dental Research* 92(10):860–867
43. Brennan-Speranza TC, Conigrave AD (2015) Osteocalcin: an osteoblast-derived polypeptide hormone that modulates whole body energy metabolism. *Calcif Tissue Int* 96(1):1–10
44. Brennan-Speranza TC, Henneicke H, Gasparini SJ et al. (2012) Osteoblasts mediate the adverse effects of glucocorticoids on fuel metabolism. *J Clin Invest* 122(11):4172–4189
45. Buckwalter JA, Cooper RR (1987) Bone structure and function. *Instructional course lectures* 36:27–48

Literaturverzeichnis

46. Burger EH, van der Meer JW, Nijweide PJ (1984) Osteoclast formation from mononuclear phagocytes: role of bone-forming cells. *J Cell Biol* 99(6):1901–1906
47. Calkins MA, Appleyard RC, Read RA et al. (2005) Ovariectomy alters the structural and biomechanical properties of ovine femoro-tibial articular cartilage and increases cartilage iNOS. *Osteoarthritis and Cartilage* 13(12):1066–1075
48. Canalis E, Centrella M, McCarthy T (1988) Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J Clin Invest* 81(5):1572–1577
49. Cao X (2011) Targeting osteoclast-osteoblast communication. *Nat Med* 17(11):1344–1346
50. Cappariello A, Ponzetti M, Rucci N (2016) The "soft" side of the bone: unveiling its endocrine functions. *Hormone molecular biology and clinical investigation* 28(1):5–20
51. Cauley JA (2017) Osteoporosis: fracture epidemiology update 2016. *Current opinion in rheumatology* 29(2):150–156
52. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C et al. (2000) Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *Journal of Clinical Investigation* 106(10):1229–1237
53. Cheema C, Grant BF, Marcus R (1989) Effects of estrogen on circulating "free" and total 1,25-dihydroxyvitamin D and on the parathyroid-vitamin D axis in postmenopausal women. *J Clin Invest* 83(2):537–542
54. Chen D, Ji X, Harris MA et al. (1998) Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol* 142(1):295–305
55. Chen D, Ming Z, Mundy GR (2004) Bone morphogenetic proteins. *Growth factors* 22(4):233–241
56. Chen F, Ouyang Y, Ye T et al. (2014) Estrogen inhibits RANKL-induced osteoclastic differentiation by increasing the expression of TRPV5 channel. *J. Cell. Biochem.* 115(4):651–658
57. Chen H, Senda T, Kubo K (2015) The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. *Medical molecular morphology* 48(2):61–68
58. Chen X, Wang Z, Duan N et al. (2018) Osteoblast-osteoclast interactions. *Connective tissue research* 59(2):99–107
59. Christgau S, Rosenquist C, Alexandersen P et al. (1998) Clinical evaluation of the Serum CrossLaps One Step ELISA, a new assay measuring the serum concentration of bone-derived degradation products of type I collagen C-telopeptides. *Clin Chem* 44(11):2290–2300

60. Christgau S, Tankó LB, Cloos PAC et al. (2004) Suppression of elevated cartilage turnover in postmenopausal women and in ovariectomized rats by estrogen and a selective estrogen-receptor modulator (SERM). *Menopause* 11(5):508–518
61. Christodoulou C, Cooper C (2003) What is osteoporosis? *Postgraduate medical journal* 79(929):133–138
62. Ciani C, Sharma D, Doty SB et al. (2014) Ovariectomy enhances mechanical load-induced solute transport around osteocytes in rat cancellous bone. *Bone* 59:229–234
63. Cipolletta C, Jouzeau JY, Gegout-Pottie P et al. (1998) Modulation of IL-1-induced cartilage injury by NO synthase inhibitors: a comparative study with rat chondrocytes and cartilage entities. *British journal of pharmacology* 124(8):1719–1727
64. Civitelli R (2008) Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Archives of biochemistry and biophysics* 473(2):188–192
65. Clarke B (2008) Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3(Suppl 3):S131–139
66. Clemens TL, Karsenty G (2011) The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis. *Journal of Bone and Mineral Research* 26(4):677–680
67. Comelekoglu U, Bagis S, Yalin S et al. (2007) Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. *Clin Rheumatol* 26(3):380–384
68. Compston J (2018) Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *Endocrine* 61(1):7–16
69. Compston J, Cooper A, Cooper C et al. (2017) UK clinical guideline for the prevention and treatment of osteoporosis. *Archives of Osteoporosis* 12(1):43
70. Compston JE (2001) Sex steroids and bone. *Physiological Reviews* 81(1):419–447
71. Confavreux CB, Levine RL, Karsenty G (2009) A paradigm of integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolisms. *Molecular and cellular endocrinology* 310(1-2):21–29
72. Coughlan T, Dockery F (2014) Osteoporosis and fracture risk in older people. *Clinical medicine* 14(2):187–191
73. Cummings SR, Melton LJ (2002) Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *The Lancet* 359(9319):1761–1767
74. Cymet TC, Wood B, Orbach N (2000) Osteoporosis. *The Journal of the American Osteopathic Association* 100(10 Su Pt 1):S9–15
75. Dai R-C, Liao E-Y, Yang C et al. (2004) Microcracks: an alternative index for evaluating bone biomechanical quality. *Journal of bone and mineral metabolism* 22(3):215–223

76. Dechant KL, Goa KL (1994) Calcitriol. A review of its use in the treatment of postmenopausal osteoporosis and its potential in corticosteroid-induced osteoporosis. *Drugs & Aging* 5(4):300–317
77. Delaisse J-M, Andersen TL, Kristensen HB et al. (2020) Re-thinking the bone remodeling cycle mechanism and the origin of bone loss. *Bone* 141:115628
78. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK et al. (2013) Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Journal of bone and mineral research* 28(1):2–17
79. Deng L, Wang Y, Peng Y et al. (2015) Osteoblast-derived microvesicles: A novel mechanism for communication between osteoblasts and osteoclasts. *Bone* 79:37–42
80. Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie (2020) Osteoporose. <https://www.dgu-online.de/patienten/haeufige-diagnosen/senioren/osteoporose.html> Zugriff am 13. Dezember 2020
81. Devogelaer JP, Nagant de Deuxchaisnes C (1993) Osteoporosis. *British journal of rheumatology* 32(Suppl 4):48–55
82. Dolan P, Torgerson DJ (1998) The cost of treating osteoporotic fractures in the United Kingdom female population. *Osteoporosis international* 8(6):611–617
83. Dontas IA, Yiannakopoulos CK (2007) Risk factors and prevention of osteoporosis-related fractures. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 7(3):268–272
84. Dubois-Ferrière V, Brennan TC, Dayer R et al. (2011) Calcitropic hormones and IGF-I are influenced by dietary protein. *Endocrinology* 152(5):1839–1847
85. Ducy P (2011) The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodelling and energy metabolism. *Diabetologia* 54(6):1291–1297
86. Ducy P, Desbois C, Boyce B et al. (1996) Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382(6590):448–452
87. Durup D, Diaz-delCastillo M, Morgenlykke J et al. (2020) Hypophosphatemic Hypovitaminosis D Induces Osteomalacia in the Adult Female Rat. *Endocrinology* 161(8): bqaa100
88. Duursma SA, Raymakers JA, Boereboom FT et al. (1992) Estrogen and bone metabolism. *Obstetrical & gynecological survey* 47(1):38–44
89. Eastell R (1998) Treatment of postmenopausal osteoporosis. *New England journal of medicine* 338(11):736–746
90. Egermann M, Goldhahn J, Holz R et al. (2008) A sheep model for fracture treatment in osteoporosis: benefits of the model versus animal welfare. *Laboratory animals* 42(4):453–464

Literaturverzeichnis

91. Egermann M, Goldhahn J, Schneider E (2005) Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporosis international* 16 Suppl 2(2):S129-38
92. El Khassawna T, Böcker W, Brodsky K et al. (2015) Impaired extracellular matrix structure resulting from malnutrition in ovariectomized mature rats. *Histochem Cell Biol* 144(5):491–507
93. El Khassawna T, Böcker W, Govindarajan P et al. (2013) Effects of multi-deficiencies-diet on bone parameters of peripheral bone in ovariectomized mature rat. *PLoS ONE* 8(8):e71665
94. El Khassawna T, Merboth F, Malhan D et al. (2017) Osteocyte Regulation of Receptor Activator of NF- κ B Ligand/Osteoprotegerin in a Sheep Model of Osteoporosis. *The American journal of pathology* 187(8):1686–1699
95. Emerton KB, Hu B, Woo AA et al. (2010) Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. *Bone* 46(3):577–583
96. Eriksen EF (2010) Cellular mechanisms of bone remodeling. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 11(4):219–227
97. Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E et al. (2012) Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nature genetics* 44(5):491–501
98. Everts V, Delaissé JM, Korper W et al. (2002) The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research* 17(1):77–90
99. Farahmand P, Spiegel R, Ringe JD (2016) Männliche Osteoporose (Male osteoporosis). *Z Rheumatol* 75(5):459–465
100. Felsenberg D, Silman AJ, Lunt M et al. (2002) Incidence of vertebral fracture in europe: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). *Journal of Bone and Mineral Research* 17(4):716–724
101. Feng X, McDonald JM (2011) Disorders of bone remodeling. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6(1):121–145
102. Fernández-Real JM, Ricart W (2011) Osteocalcin: a new link between bone and energy metabolism. Some evolutionary clues. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 14(4):360–366
103. Fernihough JK, Richmond RS, Carlson CS et al. (1999) Estrogen replacement therapy modulation of the insulin-like growth factor system in monkey knee joints. *Arthritis & Rheumatism* 42(10):2103–2111
104. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G et al. (2008) Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(13):5266–5270

105. Ferron M, McKee MD, Levine RL et al. (2012) Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. *Bone* 50(2):568–575
106. Ferron M, Wei J, Yoshizawa T et al. (2010) Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 142(2):296–308
107. Florencio-Silva R, Sasso GRS, Sasso-Cerri E et al. (2015) Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International* 2015:421746
108. Florencio-Silva R, Sasso GRS, Sasso-Cerri E et al. (2018) Effects of estrogen status in osteocyte autophagy and its relation to osteocyte viability in alveolar process of ovariectomized rats. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 98:406–415
109. French DL, Muir JM, Webber CE (2008) The ovariectomized, mature rat model of postmenopausal osteoporosis: an assessment of the bone sparing effects of curcumin. *Phytomedicine* 15(12):1069–1078
110. Fritton SP, Weinbaum S (2009) Fluid and Solute Transport in Bone: Flow-Induced Mechanotransduction. *Annual review of fluid mechanics* 41:347–374
111. Frost HM (1969) Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcified tissue research* 3(3):211–237
112. Frost HM (1990) Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *The Anatomical record* 226(4):414–422
113. Frost HM (1999) On the estrogen-bone relationship and postmenopausal bone loss: A new model. *Journal of Bone and Mineral Research* 14(9):1473–1477
114. Frost HM, Jee W (1992) On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone and Mineral* 18(3):227–236
115. Gali JC (2001) Osteoporosis. *Acta ortop. bras.* 9:53–62
116. Gallagher JA, Gundle R, Beresford JN (1996) Isolation and Culture of Bone-Forming Cells (Osteoblasts) from Human Bone. In: Jones GE (Hrsg.) *Human Cell Culture Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, S. 233–262
117. Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B et al. (1997) Body weight, body fat distribution, and hormonal replacement therapy in early postmenopausal women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82(2):414–417
118. Gao X, Ma W, Dong H et al. (2014) Establishing a rapid animal model of osteoporosis with ovariectomy plus low calcium diet in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7(8):5123–5128

119. García-Martín A, Cortés-Berdonces M, Luque-Fernández I et al. (2011) Osteocalcin as a marker of metabolic risk in healthy postmenopausal women. *Menopause* 18(5):537–541
120. García Palacios V, Robinson LJ, Borysenko CW et al. (2005) Negative regulation of RANKL-induced osteoclastic differentiation in RAW264.7 Cells by estrogen and phytoestrogens. *The Journal of biological chemistry* 280(14):13720–13727
121. Garnero P (2014) New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis. *Bone* 66:46–55
122. Gatti V, Azoulay EM, Fritton SP (2018) Microstructural changes associated with osteoporosis negatively affect loading-induced fluid flow around osteocytes in cortical bone. *Journal of Biomechanics* 66:127–136
123. Gershon-Cohen J, Jowsey J (1964) The relationship of dietary calcium to osteoporosis. *Metabolism* 13(3):221–226
124. Girasole G, Jilka RL, Passeri G et al. (1992) 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest* 89(3):883–891
125. Glaser DL, Kaplan FS (1997) Osteoporosis. Definition and clinical presentation. *Spine* 22(24 Suppl):12S–16S
126. Gosch M, Kammerlander C, Neuerburg C (2019) Osteoporose – Epidemiologie und Versorgungsqualität (Osteoporosis-epidemiology and quality of care). *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie* 52(5):408–413
127. Goulet GC, Cooper DML, Coombe D et al. (2008) Influence of cortical canal architecture on lacunocanalicular pore pressure and fluid flow. *Computer methods in biomechanics and biomedical engineering* 11(4):379–387
128. Gouveia CH, Jorgetti V, Bianco AC (1997) Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats. *Journal of Bone and Mineral Research* 12(12):2098–2107
129. Govindarajan P, Böcker W, El Khassawna T et al. (2014) Bone matrix, cellularity, and structural changes in a rat model with high-turnover osteoporosis induced by combined ovariectomy and a multiple-deficient diet. *The American journal of pathology* 184(3):765–777
130. Goya L, García-Segura LM, Ramos S et al. (2002) Interaction between malnutrition and ovarian hormones on the systemic IGF-I axis. *European journal of endocrinology* 147(3):417–424
131. Groessner-Schreiber B, Krukowski M, Lyons C et al. (1992) Osteoclast recruitment in response to human bone matrix is age related. *Mechanisms of ageing and development* 62(2):143–154

132. Grynblas MD, Chachra D, Lundon K (2000) Bone quality in animal models of osteoporosis. *Drug Dev. Res.* 49(3):146–158
133. Guntur AR, Rosen CJ (2012) Bone as an endocrine organ. *Endocrine practice* 18(5):758–762
134. Hadji P, Klein S, Gothe H et al. (2013) The epidemiology of osteoporosis—Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. *Deutsches Ärzteblatt International* 110(4):52–57
135. Hadjidakis DJ, Androulakis II (2006) Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1092(1):385–396
136. Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H et al. (2006) Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clinical laboratory* 52(9-10):499–509
137. Hanada K, Dennis JE, Caplan AI (1997) Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 12(10):1606–1614
138. Hara K, Kobayashi M, Akiyama Y (2005) Comparison of inhibitory effects of warfarin on gamma-carboxylation between bone and liver in rats. *Journal of bone and mineral metabolism* 23(5):366–372
139. Hara K, Kobayashi M, Akiyama Y (2007) Influence of bone osteocalcin levels on bone loss induced by ovariectomy in rats. *Journal of bone and mineral metabolism* 25(6):345–353
140. Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM (1975) Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(10):3925–3929
141. Häussler B, Gothe H, Göl D et al. (2007) Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. *Osteoporosis international* 18(1):77–84
142. Hayashi O, Katsube Y, Hirose M et al. (2008) Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif Tissue Int* 82(3):238–247
143. Heaney RP, Abrams S, Dawson-Hughes B et al. (2000) Peak bone mass. *Osteoporosis international* 11(12):985–1009
144. Heaney RP, Recker RR, Saville PD (1978) Menopausal changes in bone remodeling. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 92(6):964–970
145. Hemmatian H, Bakker AD, Klein-Nulend J et al. (2017) Aging, Osteocytes, and Mechanotransduction. *Curr Osteoporos Rep* 15(5):401–411

146. Henriksen K, Tanko LB, Qvist P et al. (2007) Assessment of osteoclast number and function: application in the development of new and improved treatment modalities for bone diseases. *Osteoporosis international* 18(5):681–685
147. Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M et al. (2013) Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Archives of Osteoporosis* 8(1):136
148. Hino S, Kondo S, Yoshinaga K et al. (2010) Regulation of ER molecular chaperone prevents bone loss in a murine model for osteoporosis. *Journal of bone and mineral metabolism* 28(2):131–138
149. Hirsch BP, Unnanuntana A, Cunningham ME et al. (2013) The effect of therapies for osteoporosis on spine fusion: a systematic review. *The spine journal* 13(2):190–199
150. Hodgkinson A, Aaron JE, Horsman A et al. (1978) Effect of oophorectomy and calcium deprivation on bone mass in the rat. *Clinical Science* 54(4):439–446
151. van 't Hof RJ, Rose L, Bassonga E et al. (2017) Open source software for semi-automated histomorphometry of bone resorption and formation parameters. *Bone* 99:69–79
152. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR et al. (1999) Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 140(9):4367–4370
153. Holmbeck K, Bianco P, Pidoux I et al. (2005) The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *Journal of cell science* 118(Pt 1):147–156
154. Homma H, Kurachi H, Nishio Y et al. (2000) Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. *The Journal of biological chemistry* 275(15):11404–11411
155. Horsman A, Simpson M, Kirby PA et al. (1977) Non-linear bone loss in oophorectomized women. *The British journal of radiology* 50(595):504–507
156. Huang JC, Sakata T, Pflieger LL et al. (2004) PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *Journal of Bone and Mineral Research* 19(2):235–244
157. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC et al. (1996) Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med* 2(10):1132–1136
158. Hurley DL, Khosla S (1997) Update on Primary Osteoporosis. *Mayo Clinic Proceedings* 72(10):943–949
159. Ikebuchi Y, Aoki S, Honma M et al. (2018) Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling. *Nature* 561(7722):195–200

160. Ikeda K, Ogata E (1999) The effect of vitamin D on osteoblasts and osteoclasts. *Curr Opin Orthop* 10(5):339–343
161. Ikeda T, Shigeno C, Kasai R et al. (1993) Ovariectomy decreases the mRNA levels of transforming growth factor-beta 1 and increases the mRNA levels of osteocalcin in rat bone in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 194(3):1228–1233
162. Ishii M, Egen JG, Klauschen F et al. (2009) Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 458(7237):524–528
163. Iwamoto J, Yeh JK, Schmidt A et al. (2005) Raloxifene and vitamin K2 combine to improve the femoral neck strength of ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 77(2):119–126
164. Iwaniec UT, Turner RT (2013) Animal Models for Osteoporosis. In: Feldman D, Dempster DW, Cauley JA et al. (Hrsg.) *Osteoporosis*. Elsevier/Academic Press, Amsterdam, S. 939–961
165. Jahani M, Genever PG, Patton RJ et al. (2012) The effect of osteocyte apoptosis on signalling in the osteocyte and bone lining cell network: a computer simulation. *Journal of Biomechanics* 45(16):2876–2883
166. Jee WS, Yao W (2001) Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1(3):193–207
167. Jilka RL (2003) Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Medical and Pediatric Oncology* 41(3):182–185
168. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G et al. (1992) Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 257(5066):88–91
169. Johnston BD, Ward WE (2015) The ovariectomized rat as a model for studying alveolar bone loss in postmenopausal women. *BioMed Research International* 2015:635023
170. Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN et al. (2001) Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2(3):165–171
171. Kalu DN (1991) The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral* 15(3):175–191
172. Kamioka H, Honjo T, Takano-Yamamoto T (2001) A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone* 28(2):145–149
173. Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C et al. (1994) The diagnosis of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 9(8):1137–1141

174. Kanzaki S, Hosoda K, Moriwake T et al. (1992) Serum propeptide and intact molecular osteocalcin in normal children and children with growth hormone (GH) deficiency: a potential marker of bone growth and response to GH therapy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 75(4):1104–1109
175. Karsdal MA, Martin TJ, Bollerslev J et al. (2007) Are nonresorbing osteoclasts sources of bone anabolic activity? *Journal of Bone and Mineral Research* 22(4):487–494
176. Katsimbri P (2017) The biology of normal bone remodelling. *European Journal of Cancer Care* 26(6): e12740
177. Keller H, Kneissel M (2005) SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone* 37(2):148–158
178. Kennedy OD, Herman BC, Laudier DM et al. (2012) Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations. *Bone* 50(5):1115–1122
179. Kerschan-Schindl K (2016) Prevention and rehabilitation of osteoporosis. *Wien Med Wochenschr* 166(1-2):22–27
180. Khosla S, Hofbauer LC (2017) Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 5(11):898–907
181. Khosla S, Monroe DG (2018) Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8(1): a031211
182. Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG (2012) Estrogen and the skeleton. *Trends in endocrinology and metabolism* 23(11):576–581
183. Kim DH, Vaccaro AR (2006) Osteoporotic compression fractures of the spine; current options and considerations for treatment. *The spine journal* 6(5):479–487
184. Kim J-M, Lin C, Stavre Z et al. (2020) Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells* 9(9):2073
185. Kim RY, Yang HJ, Song YM et al. (2015) Estrogen Modulates Bone Morphogenetic Protein-Induced Sclerostin Expression Through the Wnt Signaling Pathway. *Tissue engineering Part A* 21(13-14):2076–2088
186. Kimble RB, Srivastava S, Ross FP et al. (1996) Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production. *The Journal of biological chemistry* 271(46):28890–28897
187. Kinney JH, Haupt DL, Balooch M et al. (2000) Three-dimensional morphometry of the L6 vertebra in the ovariectomized rat model of osteoporosis: biomechanical implications. *Journal of Bone and Mineral Research* 15(10):1981–1991
188. Klaus G, Meinhold-Heerlein R, Milde P et al. (1991) Effect of vitamin D on growth cartilage cell proliferation in vitro. *Pediatric nephrology* 5(4):461–466

Literaturverzeichnis

189. Klein-Nulend J, Bacabac RG, Bakker AD (2012) Mechanical loading and how it affects bone cells: the role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton. *European cells & materials* 24:278–291
190. Klein-Nulend J, Bakker AD, Bacabac RG et al. (2013) Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone* 54(2):182–190
191. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E et al. (2000) Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *The Journal of experimental medicine* 191(2):275–286
192. Koller DL, Zheng H-F, Karasik D et al. (2013) Meta-analysis of genome-wide studies identifies WNT16 and ESR1 SNPs associated with bone mineral density in premenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research* 28(3):547–558
193. Komori T (2015) Animal models for osteoporosis. *European Journal of Pharmacology* 759:287–294
194. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I et al. (1999) OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397(6717):315–323
195. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI et al. (2001) Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104(5):719–730
196. Kramer I, Halleux C, Keller H et al. (2010) Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Molecular and cellular biology* 30(12):3071–3085
197. Krishnan V, Dhurjati R, Vogler EA et al. (2010) Osteogenesis in vitro: from pre-osteoblasts to osteocytes: a contribution from the Osteobiology Research Group, The Pennsylvania State University. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 46(1):28–35
198. Kurihara N, Civin C, Roodman GD (1991) Osteotropic factor responsiveness of highly purified populations of early and late precursors for human multinucleated cells expressing the osteoclast phenotype. *Journal of Bone and Mineral Research* 6(3):257–261
199. Lacey D, Timms E, Tan H-L et al. (1998) Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell* 93(2):165–176
200. Lamichhane AP (2005) Osteoporosis-an update. *Journal of the Nepal Medical Association* 44(158):60–66
201. Lane JM, Russell L, Khan SN (2000) Osteoporosis. *Clinical orthopaedics and related research* 372:139–150
202. Lane NE (2006) Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 194(2 Suppl):S3–11

203. Lanyon LE (1993) Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int* 53(Suppl 1):S102–106; discussion S106–107
204. Laroche M (2008) Treatment of osteoporosis: all the questions we still cannot answer. *The American Journal of Medicine* 121(9):744–747
205. Lee NK, Karsenty G (2008) Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 19(5):161–166
206. Lee NK, Sowa H, Hinoi E et al. (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130(3):456–469
207. Lei Z, Xiaoying Z, Xingguo L (2009) Ovariectomy-associated changes in bone mineral density and bone marrow haematopoiesis in rats. *International Journal of Experimental Pathology* 90(5):512–519
208. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE et al. (2008) The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comparative medicine* 58(5):424–430
209. Lerner UH, Kindstedt E, Lundberg P (2019) The critical interplay between bone resorbing and bone forming cells. *Journal of clinical periodontology* 46(Suppl 21):33–51
210. Li J, Sarosi I, Yan XQ et al. (2000) RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(4):1566–1571
211. Li J-Y, Walker LD, Tyagi AM et al. (2014) The sclerostin-independent bone anabolic activity of intermittent PTH treatment is mediated by T-cell-produced Wnt10b. *Journal of Bone and Mineral Research* 29(1):43–54
212. Li S, Niu G, Dong XN et al. (2019) Vitamin D Inhibits Activities of Metalloproteinase-9/-13 in Articular Cartilage In Vivo and In Vitro. *Journal of nutritional science and vitaminology* 65(2):107–112
213. Li S, Niu G, Wu Y et al. (2016) Vitamin D prevents articular cartilage erosion by regulating collagen II turnover through TGF- β 1 in ovariectomized rats. *Osteoarthritis and Cartilage* 24(2):345–353
214. Liang H, Pun S, Wronski TJ (1999) Bone anabolic effects of basic fibroblast growth factor in ovariectomized rats. *Endocrinology* 140(12):5780–5788
215. Liberati NT, Datto MB, Frederick JP et al. (1999) Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(9):4844–4849
216. Lieben L, Callewaert F, Bouillon R (2009) Bone and metabolism: a complex cross-talk. *Hormone research* 71(Suppl 1):134–138
217. Lin JT, Lane JM (2004) Osteoporosis: A Review. *Clinical Orthopaedics and Related Research*® 425(August 2004):126

218. Lips P (2001) Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 22(4):477–501
219. Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 20:781–810
220. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y (2008) Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* 29(4):403–440
221. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Taschenlehrbuch Histologie (6., vollständig überarbeitete Auflage). Thieme, Stuttgart
222. Lumachi F, Ermani M, Camozzi V et al. (2009) Changes of bone formation markers osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase in postmenopausal women with osteoporosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1173(Suppl 1):E60–63
223. Luvizuto ER, Dias SMD, Queiroz TP et al. (2010) Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone* 46(4):1021–1029
224. Ma Y-L, Dai R-C, Sheng Z-F et al. (2008) Quantitative associations between osteocyte density and biomechanics, microcrack and microstructure in OVX rats vertebral trabeculae. *Journal of Biomechanics* 41(6):1324–1332
225. Mackintosh D, Mason RM (1988) Pharmacological actions of 17β -oestradiol on articular cartilage chondrocytes and chondrosarcoma chondrocytes in the absence of oestrogen receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 964(3):295–302
226. Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N et al. (2012) Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med* 18(3):405–412
227. Malas FU, Kara M, Aktekin L et al. (2014) Does vitamin D affect femoral cartilage thickness? An ultrasonographic study. *Clinical rheumatology* 33(9):1331–1334
228. Malhan D, Muelke M, Rosch S et al. (2018) An Optimized Approach to Perform Bone Histomorphometry. *Frontiers in endocrinology* 9:666
229. Martin A, Xiong J, Koromila T et al. (2015) Estrogens antagonize RUNX2-mediated osteoblast-driven osteoclastogenesis through regulating RANKL membrane association. *Bone* 75:96–104
230. Martin TJ, Sims NA (2015) RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 16(2):131–139
231. Martin TJ, Sims NA, Quinn JM (2011) Interactions Among Osteoblasts, Osteoclasts, and Other Cells in Bone. In: Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y et al. (Hrsg.) *Osteoimmunology: interactions of the immune and skeletal system*. Elsevier/Academic Press, Amsterdam/Boston, S. 227–267

232. Mathavan N, Turunen MJ, Tägil M et al. (2015) Characterising bone material composition and structure in the ovariectomized (OVX) rat model of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 97(2):134–144
233. Matsuo K, Irie N (2008) Osteoclast-osteoblast communication. *Archives of biochemistry and biophysics* 473(2):201–209
234. McNamara LM (2010) Perspective on post-menopausal osteoporosis: establishing an interdisciplinary understanding of the sequence of events from the molecular level to whole bone fractures. *Journal of the Royal Society, Interface* 7(44):353–372
235. Medina-Gomez C, Kemp JP, Estrada K et al. (2012) Meta-analysis of genome-wide scans for total body BMD in children and adults reveals allelic heterogeneity and age-specific effects at the WNT16 locus. *PLoS Genetics* 8(7):e1002718
236. Michels KM (1993) Up-regulation of pituitary [125I]insulin-like growth factor-I (IGF-I) binding and IGF binding protein-2 and IGF-I gene expression by estrogen. *Endocrinology* 132(1):23–29
237. Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM et al. (1989) Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc* 3(3):953–60
238. Morin S, Lix LM, Azimae M et al. (2011) Mortality rates after incident non-traumatic fractures in older men and women. *Osteoporos Int* 22(9):2439–2448
239. Morin S, Lix LM, Azimae M et al. (2012) Institutionalization following incident non-traumatic fractures in community-dwelling men and women. *Osteoporos Int* 23(9):2381–2386
240. Mundy GR, Guise TA (1999) Hormonal Control of Calcium Homeostasis. *Clin Chem* 45(8):1347–1352
241. Myburgh KH, Noakes TD, Roodt M et al. (1989) Effect of exercise on the development of osteoporosis in adult rats. *Journal of applied physiology* 66(1):14–19
242. Nakamura A, Dohi Y, Akahane M et al. (2009) Osteocalcin secretion as an early marker of in vitro osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. Part C, Methods* 15(2):169–180
243. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T et al. (2007) Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* 130(5):811–823
244. Nakano Y, Toyosawa S, Takano Y (2004) Eccentric localization of osteocytes expressing enzymatic activities, protein, and mRNA signals for type 5 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 52(11):1475–1482
245. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T et al. (2011) Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 17(10):1231–1234

Literaturverzeichnis

246. Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J et al. (2001) Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone* 28(1):80–86
247. Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N et al. (2011) Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nat Med* 17(11):1473–1480
248. Nicoletta DP, Moravits DE, Gale AM et al. (2006) Osteocyte lacunae tissue strain in cortical bone. *Journal of Biomechanics* 39(9):1735–1743
249. O'Brien CA, Jia D, Plotkin LI et al. (2004) Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology* 145(4):1835–1841
250. van Oers, RFM, Wang H, Bacabac RG (2015) Osteocyte shape and mechanical loading. *Curr Osteoporos Rep* 13(2):61–66
251. Okazaki R, Inoue D, Shibata M et al. (2002) Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology* 143(6):2349–2356
252. O'Neill TW, Felsenberg D, Varlow J et al. (1996) The prevalence of vertebral deformity in European men and women: the European Vertebral Osteoporosis Study. *Journal of Bone and Mineral Research* 11(7):1010–1018
253. Orimo H, Hayashi Y, Fukunaga M et al. (2001) Diagnostic criteria for primary osteoporosis: year 2000 revision. *Journal of bone and mineral metabolism* 19(6):331–337
254. Orimo H, Shiraki M, Inoue S (1993) Estrogen and bone. *Osteoporosis international* 3(Suppl 1):153–156
255. Ott SM (2008) Histomorphometric measurements of bone turnover, mineralization, and volume. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3(Suppl 3):S151–156
256. Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J et al. (1991) Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(15):6613–6617
257. Pacifici R (2013) Role of T cells in the modulation of PTH action: physiological and clinical significance. *Endocrine* 44(3):576–582
258. Paech K, Webb P, Kuiper GG et al. (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277(5331):1508–1510
259. Parfitt AM (1977) The cellular basis of bone turnover and bone loss: a rebuttal of the osteocytic resorption--bone flow theory. *Clinical orthopaedics and related research* 127:236–247
260. Parfitt AM (1987) Bone and plasma calcium homeostasis. *Bone* 8(Suppl 1):S1–8

261. Parfitt AM (1998) Osteoclast precursors as leukocytes: importance of the area code. *Bone* 23(6):491–494
262. Parfitt AM (2001) The bone remodeling compartment: a circulatory function for bone lining cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 16(9):1583–1585
263. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH et al. (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Journal of Bone and Mineral Research* 2(6):595–610
264. Park SB, Lee YJ, Chung CK (2010) Bone mineral density changes after ovariectomy in rats as an osteopenic model : stepwise description of double dorso-lateral approach. *Journal of Korean Neurosurgical Society* 48(4):309–312
265. Paschalis EP, Gamsjaeger S, Hassler N et al. (2017) Vitamin D and calcium supplementation for three years in postmenopausal osteoporosis significantly alters bone mineral and organic matrix quality. *Bone* 95:41–46
266. Pascual-Garrido C, Angeline ME, Ma R et al. (2016) Low Levels of Vitamin D have a Deleterious Effect on the Articular Cartilage in a Rat Model. *HSS journal* 12(2):150–157
267. Patti A, Gennari L, Merlotti D et al. (2013) Endocrine actions of osteocalcin. *International journal of endocrinology* 2013:846480
268. Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ et al. (2008) Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(52):20764–20769
269. Pietschmann P, Skalicky M, Kneissel M et al. (2007) Bone structure and metabolism in a rodent model of male senile osteoporosis. *Experimental Gerontology* 42(11):1099–1108
270. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411):143–147
271. Poole KES, Compston JE (2006) Osteoporosis and its management. *BMJ (Clinical research ed.)* 333(7581):1251–1256
272. Poole KES, van Bezooijen RL, Loveridge N et al. (2005) Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *The FASEB Journal* 19(13):1842–1844
273. Price PA, Otsuka AA, Poser JW et al. (1976) Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73(5):1447–1451
274. Puth M-T, Klaschik M, Schmid M et al. (2018) Prevalence and comorbidity of osteoporosis - a cross-sectional analysis on 10,660 adults aged 50 years and older in Germany. *BMC Musculoskelet Disord* 19(1):144

275. Qing H, Ardeshirpour L, Pajevic PD et al. (2012) Demonstration of osteocytic perilacunar/canalicular remodeling in mice during lactation. *Journal of Bone and Mineral Research* 27(5):1018–1029
276. Qing H, Bonewald LF (2009) Osteocyte remodeling of the perilacunar and pericanalicular matrix. *International journal of oral science* 1(2):59–65
277. Qiu S, Rao DS, Palnitkar S et al. (2003) Reduced iliac cancellous osteocyte density in patients with osteoporotic vertebral fracture. *Journal of Bone and Mineral Research* 18(9):1657–1663
278. Qvist P, Christgau S, Pedersen B et al. (2002) Circadian variation in the serum concentration of C-terminal telopeptide of type I collagen (serum CTx): effects of gender, age, menopausal status, posture, daylight, serum cortisol, and fasting. *Bone* 31(1):57–61
279. Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC (2011) Osteoporosis: now and the future. *The Lancet* 377(9773):1276–1287
280. Raggatt LJ, Partridge NC (2010) Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Journal of Biological Chemistry* 285(33):25103–25108
281. Raheja LF, Genetos DC, Yellowley CE (2008) Hypoxic osteocytes recruit human MSCs through an OPN/CD44-mediated pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366(4):1061–1066
282. Raisz LG (1999) Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. *Clin Chem* 45(8):1353–1358
283. Raisz LG (2005) Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 115(12):3318–3325
284. Reginster J-Y, Burlet N (2006) Osteoporosis: a still increasing prevalence. *Bone* 38(2 Suppl 1):S4–9
285. Reinke DC, Kogawa M, Barratt KR et al. (2016) Evidence for altered osteoclastogenesis in splenocyte cultures from Cyp27b1 knockout mice. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 164:353–360
286. Reinke DC, Starczak Y, Kogawa M et al. (2018) Evidence for altered osteoclastogenesis in splenocyte cultures from VDR knockout mice. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 177:96–102
287. Ren H, De L, Shen G et al. (2016) Effects of combined ovariectomy with dexamethasone on rat lumbar vertebrae. *Menopause* 23(4):441–450
288. Riggs BL (2003) Role of the vitamin D-endocrine system in the pathophysiology of postmenopausal osteoporosis. *Journal of cellular biochemistry* 88(2):209–215
289. Riggs BL, Melton LJ (1992) The prevention and treatment of osteoporosis. *New England journal of medicine* 327(9):620–627

290. Riggs BL, Melton LJ (1995) The worldwide problem of osteoporosis: Insights afforded by epidemiology. *Bone* 17(5):S505-S511
291. Riggs BL, Wahner HW, Seeman E et al. (1982) Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging. Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes. *J Clin Invest* 70(4):716–723
292. Rissanen JP, Suominen MI, Peng Z et al. (2008) Secreted tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a Marker of osteoclast number in human osteoclast cultures and the rat ovariectomy model. *Calcif Tissue Int* 82(2):108–115
293. Rizzoli R, Bonjour JP (1999) Determinants of peak bone mass and mechanisms of bone loss. *Osteoporosis international* 9(Suppl 2):S17–23
294. Robling AG, Bonewald LF (2020) The Osteocyte: New Insights. *Annual Review of Physiology* 82:485–506
295. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA et al. (2008) Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *The Journal of biological chemistry* 283(9):5866–5875
296. Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL (2010) Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int* 21(9):1457–1469
297. Rodan SB, Wesolowski G, Thomas KA et al. (1989) Effects of acidic and basic fibroblast growth factors on osteoblastic cells. *Connective tissue research* 20(1-4):283–288
298. Ross PD (1996) Osteoporosis. Frequency, consequences, and risk factors. *Archives of Internal Medicine* 156(13):1399–1411
299. Rossi M, Battafarano G, Pepe J et al. (2019) The Endocrine Function of Osteocalcin Regulated by Bone Resorption: A Lesson from Reduced and Increased Bone Mass Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 20(18):4502
300. Rutter MM, Markoff E, Clayton L et al. (2005) Osteoblast-specific expression of insulin-like growth factor-1 in bone of transgenic mice induces insulin-like growth factor binding protein-5. *Bone* 36(2):224–231
301. Ryu J, Kim HJ, Chang E-J et al. (2006) Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *The EMBO Journal* 25(24):5840–5851
302. Saika M, Inoue D, Kido S et al. (2001) 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology* 142(6):2205–2212
303. Sapir-Koren R, Livshits G (2014) Osteocyte control of bone remodeling: is sclerostin a key molecular coordinator of the balanced bone resorption-formation cycles? *Osteoporos Int* 25(12):2685–2700

304. Schünke M, Schulte E, Schumacher U et al. (2018) Prometheus - LernAtlas der Anatomie. Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem (5., vollständig überarbeitete Auflage). Thieme, Stuttgart
305. Seeman E (2009) Bone modeling and remodeling. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 19(3):219–233
306. Seeman E, Delmas PD (2006) Bone quality – the material and structural basis of bone strength and fragility. *New England journal of medicine* 354(21):2250–2261
307. Sharma D, Ciani C, Marin PAR et al. (2012) Alterations in the osteocyte lacunar-canalicular microenvironment due to estrogen deficiency. *Bone* 51(3):488–497
308. Sharma D, Larriera AI, Palacio-Mancheno PE et al. (2018) The effects of estrogen deficiency on cortical bone microporosity and mineralization. *Bone* 110:1–10
309. Shirai H, Sato T, Oka M et al. (2002) Effect of calcium supplementation on bone dynamics of the maxilla, mandible and proximal tibia in experimental osteoporosis. *Journal of Oral Rehabilitation* 29(3):287–294
310. Shiraishi A, Takeda S, Masaki T et al. (2000) Alfacalcidol inhibits bone resorption and stimulates formation in an ovariectomized rat model of osteoporosis: distinct actions from estrogen. *Journal of Bone and Mineral Research* 15(4):770–779
311. Siddiqui JA, Partridge NC (2016) Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology* 31(3):233–245
312. Silva BC, Bilezikian JP (2015) Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton. *Current opinion in pharmacology* 22:41–50
313. Silverberg SJ (2007) Vitamin D deficiency and primary hyperparathyroidism. *Journal of Bone and Mineral Research* 22(Suppl 2):V100–104
314. Simonet W, Lacey D, Dunstan C et al. (1997) Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell* 89(2):309–319
315. Sims NA, Vrahnas C (2014) Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Archives of biochemistry and biophysics* 561:22–28
316. Sinha KM, Zhou X (2013) Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *J. Cell. Biochem.* 114(5):975–984
317. Sommerfeldt DW, Rubin CT (2001) Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J* 10(Suppl 2):S86–95
318. Sørensen MG, Henriksen K, Dziegiel MH et al. (2006) Estrogen directly attenuates human osteoclastogenesis, but has no effect on resorption by mature osteoclasts. *DNA and cell biology* 25(8):475–483
319. de Souza Faloni AP, Schoenmaker T, Azari A et al. (2011) Jaw and long bone marrows have a different osteoclastogenic potential. *Calcif Tissue Int* 88(1):63–74

320. Sözen T, Özışık L, Başaran NÇ (2017) An overview and management of osteoporosis. *European Journal of Rheumatology* 4(1):46–56
321. Spencer GR (1979) Pregnancy and lactational osteoporosis. Animal model: porcine lactational osteoporosis. *The American journal of pathology* 95(1):277–280
322. Srivastava AK, Bhattacharyya S, Castillo G et al. (2000) Development and application of a serum C-telopeptide and osteocalcin assay to measure bone turnover in an ovariectomized rat model. *Calcif Tissue Int* 66(6):435–442
323. Srivastava M, Deal C (2002) Osteoporosis in elderly: prevention and treatment. *Clinics in geriatric medicine* 18(3):529–555
324. Staal A, Birkenhäger JC, Pols H et al. (1994) Transforming growth factor β -induced dissociation between vitamin D receptor level and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ action in osteoblast-like cells. *Bone and Mineral* 26(1):27–42
325. Staal A, Geertsma-Kleinekoort WM, van den Bemd GJ et al. (1998) Regulation of osteocalcin production and bone resorption by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in mouse long bones: interaction with the bone-derived growth factors TGF- β and IGF-I. *Journal of Bone and Mineral Research* 13(1):36–43
326. Staal A, van Wijnen AJ, Desai RK et al. (1996) Antagonistic effects of transforming growth factor- β on vitamin D₃ enhancement of osteocalcin and osteopontin transcription: reduced interactions of vitamin D receptor/retinoid X receptor complexes with vitamin E response elements. *Endocrinology* 137(5):2001–2011
327. Starczak Y, Reinke DC, Barratt KR et al. (2018) Absence of vitamin D receptor in mature osteoclasts results in altered osteoclastic activity and bone loss. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 177:77–82
328. Stein E, Shane E (2003) Secondary osteoporosis. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 32(1):115–134
329. Streicher C, Heyny A, Andrukhova O et al. (2017) Estrogen Regulates Bone Turnover by Targeting RANKL Expression in Bone Lining Cells. *Scientific reports* 7(1):6460
330. Suda T, Takahashi N, Udagawa N et al. (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20(3):345–357
331. Sun Q, Zhang B, Zhu W et al. (2019) A potential therapeutic target for regulating osteoporosis via suppression of osteoclast differentiation. *Journal of dentistry* 82:91–97
332. Szychlinska MA, Imbesi R, Castrogiovanni P et al. (2019) Assessment of Vitamin D Supplementation on Articular Cartilage Morphology in a Young Healthy Sedentary Rat Model. *Nutrients* 11(6):1260

333. Talmage DW, Talmage RV (2007) Calcium homeostasis: how bone solubility relates to all aspects of bone physiology. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 7(2):108–112
334. Tanaka Y, DeLuca HF (1971) Bone mineral mobilization activity of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D. *Archives of biochemistry and biophysics* 146(2):574–578
335. Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N et al. (2007) Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell metabolism* 5(6):464–475
336. Tazawa K, Hoshi K, Kawamoto S et al. (2004) Osteocytic osteolysis observed in rats to which parathyroid hormone was continuously administered. *Journal of bone and mineral metabolism* 22(6):524–529
337. Teitelbaum SL (2007) Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *The American journal of pathology* 170(2):427–435
338. Tera TdM, Prado RFd, de Marco AC et al. (2014) The RANK/ RANKL/ OPG interaction in the repair of autogenous bone grafts in female rats with estrogen deficiency. *Brazilian oral research* 28(1):1–9
339. Teti A, Zallone A (2009) Do osteocytes contribute to bone mineral homeostasis? Osteocytic osteolysis revisited. *Bone* 44(1):11–16
340. Tetlow LC, Woolley DE (2001) Expression of vitamin D receptors and matrix metalloproteinases in osteoarthritic cartilage and human articular chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage* 9(5):423–431
341. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM et al. (1995) FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 17(4):S125-S133
342. Tresguerres FGF, Torres J, López-Quiles J et al. (2020) The osteocyte: A multifunctional cell within the bone. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger* 227:151422
343. Turner AS (2001) Animal models of osteoporosis – necessity and limitations. *European cells & materials* 1:66–81
344. Turner AS (2002) The sheep as a model for osteoporosis in humans. *Veterinary journal* 163(3):232–239
345. Turner RT, Vandersteenhoven JJ, Bell NH (1987) The effects of ovariectomy and 17 beta-estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. *Journal of Bone and Mineral Research* 2(2):115–122
346. Umayahara Y, Kawamori R, Watada H et al. (1994) Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *The Journal of biological chemistry* 269(23):16433–16442
347. Väänänen HK, Härkönen PL (1996) Estrogen and bone metabolism. *Maturitas* 23(Suppl):S65–69

348. Vatsa A, Breuls RG, Semeins CM et al. (2008) Osteocyte morphology in fibula and calvaria – is there a role for mechanosensing? *Bone* 43(3):452–458
349. Veldurthy V, Wei R, Oz L et al. (2016) Vitamin D, calcium homeostasis and aging. *Bone Res* 4(1):16041
350. Wang H, Zhao W, Tian Q-J et al. (2020) Effect of lncRNA AK023948 on rats with postmenopausal osteoporosis via PI3K/AKT signaling pathway. *European review for medical and pharmacological sciences* 24(5):2181–2188
351. Wang L, Banu J, McMahan CA et al. (2001) Male rodent model of age-related bone loss in men. *Bone* 29(2):141–148
352. Wang Z, Odagaki N, Tanaka T et al. (2016) Alternation in the gap-junctional intercellular communication capacity during the maturation of osteocytes in the embryonic chick calvaria. *Bone* 91:20–29
353. Wei J, Karsenty G (2015) An overview of the metabolic functions of osteocalcin. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 16(2):93–98
354. Weinstein RS, Underwood JL, Hutson MS et al. (1984) Bone histomorphometry in vitamin D-deficient rats infused with calcium and phosphorus. *The American journal of physiology* 246(6 Pt 1):E499–505
355. Weitzmann MN, Ofotokun I (2016) Physiological and pathophysiological bone turnover – role of the immune system. *Nature reviews. Endocrinology* 12(9):518–532
356. Welsch U, Kummer W, Deller T (2018) *Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie: das Lehrbuch* (5. Auflage). © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München
357. Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP et al. (2011) Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PLoS ONE* 6(10):e25900
358. Wronski TJ, Dann LM, Scott KS et al. (1989) Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 45(6):360–366
359. Wysolmerski JJ (2012) Osteocytic osteolysis: time for a second look? *Bonekey Reports* 1:229
360. Xiao W, Wang Y, Pacios S et al. (2016) Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. *Frontiers of oral biology* 18:9–16
361. Xiong J, Cawley K, Piemontese M et al. (2018) Soluble RANKL contributes to osteoclast formation in adult mice but not ovariectomy-induced bone loss. *Nat Commun* 9(1):2909
362. Xiong J, O'Brien CA (2012) Osteocyte RANKL: New insights into the control of bone remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research* 27(3):499–505

363. Xiong J, Onal M, Jilka RL et al. (2011) Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med* 17(10):1235–1241
364. Xiong J, Piemontese M, Onal M et al. (2015) Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. *PLoS ONE* 10(9):e0138189
365. Xu Y, Chu N, Qiu X et al. (2017) The interconnected role of chemokines and estrogen in bone metabolism. *Bioscience trends* 10(6):433–444
366. Yamashiro T, Takano-Yamamoto T (1998) Differential responses of mandibular condyle and femur to oestrogen deficiency in young rats. *Archives of Oral Biology* 43(3):191–195
367. Yamauchi H, Kushida K, Yamazaki K et al. (1995) Assessment of spine bone mineral density in ovariectomized rats using DXA. *Journal of Bone and Mineral Research* 10(7):1033–1039
368. Yamazaki I, Yamaguchi H (1989) Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat model. *Journal of Bone and Mineral Research* 4(1):13–22
369. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N et al. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(7):3597–3602
370. Yu X, Yu H, Jiang N et al. (2018) PTH (1-34) affects bone turnover governed by osteocytes exposed to fluoride. *Toxicology Letters* 288:25–34
371. Zhang XH, Geng GL, Su B et al. (2016) MicroRNA-338-3p inhibits glucocorticoid-induced osteoclast formation through RANKL targeting. *Genetics and Molecular Research* 15(3): gmr.15037674
372. Zhang Y, Dong XL, Leung PC et al. (2009) Differential mRNA expression profiles in proximal tibia of aged rats in response to ovariectomy and low-Ca diet. *Bone* 44(1):46–52
373. Zhang Z, Ren H, Shen G et al. (2016) Animal models for glucocorticoid-induced postmenopausal osteoporosis: An updated review. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 84:438–446
374. Zhao C, Sun W, Zhang P et al. (2015) miR-214 promotes osteoclastogenesis by targeting Pten/PI3k/Akt pathway. *RNA biology* 12(3):343–353
375. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC (2016) New insights into the biology of osteocalcin. *Bone* 82:42–49
376. Zofkova I (2015) Bone tissue as a systemic endocrine regulator. *Physiological research* 64(4):439–445

13 Anhang

13.1 Kontrolldiät und Multidefizienzdiät für Ratte und Maus

Die Angaben in den Tabellen 3–10 stammen aus den Produktdatenblättern Altromin C1000 (**Kontrolldiät**) und Altromin C1034 (**Multidefizienzdiät**) GmbH & Co. KG Lage, Deutschland) [7].

Tabelle 3: Umgesetzte Energie

Inhaltsstoff	Kontrolldiät	Multidefizienzdiät
Fette + Proteine + Kohlenhydrate	3506 kcal/kg	3673,928 kcal/kg

Tabelle 4: Rohnährstoffe und Feuchtigkeit

Inhaltsstoff	Kontrolldiät	Multidefizienzdiät
Feuchtigkeit	82540 mg/kg	82582,807 mg/kg
Rohasche	54846 mg/kg	20094,568 mg/kg
Rohfaser	30970 mg/kg	31065,517 mg/kg
Rohfett	50830 mg/kg	50651,839 mg/kg
Rohprotein	172650 mg/kg	180684,195 mg/kg
Stickstofffreie Extraktstoffe	608164 mg/kg	

Tabelle 5: Kohlenhydrate

Inhaltsstoff	Kontrolldiät	Multidefizienzdiät
Monosaccharide	0 mg/kg	93,265 mg/kg
Disaccharide	98105 mg/kg	98000 mg/kg
Polysaccharide	471727 mg/kg	513386,708 mg/kg

Tabelle 6: Mineralien

Inhaltsstoff	Kontrolldiät	Multidefizienzdiät
Kalzium	9311 mg/kg	1367,929 mg/kg
Kalium	7089 mg/kg	5200,851 mg/kg
Magnesium	684 mg/kg	666,635 mg/kg
Natrium	2488 mg/kg	2077,239 mg/kg
Phosphor	7523 mg/kg	1008,373 mg/kg

Anhang

Tabelle 7: Spurenelemente

Inhaltsstoff	Kontrolldiät	Multidefizienzdiät
Aluminium	3,71 mg/kg	3,567 mg/kg
Chlor	3630 mg/kg	3944,253 mg/kg
Eisen	178,58 mg/kg	179,189 mg/kg
Fluor	4,17 mg/kg	8 mg/kg
Jod	0,51 mg/kg	0,516 mg/kg
Kobalt	0,15 mg/kg	0,525 mg/kg
Kupfer	5,75 mg/kg	5,366 mg/kg
Mangan	100,89 mg/kg	99,984 mg/kg
Molybdän	0,20 mg/kg	0,5 mg/kg
Schwefel	2791,54 mg/kg	3180,066 mg/kg
Selen	0,33 mg/kg	0,554 mg/kg
Zink	29,30 mg/kg	31,434 mg/kg

Tabelle 8: Zugewetzte Vitamine

Inhaltsstoff	Kontrolldiät	Multidefizienzdiät
Vitamin A	15000 IU/kg	15000 IU/kg
Vitamin D3	500 IU/kg	
Vitamin E	180 mg/kg	180,1 mg/kg
Vitamin K3	10 mg/kg	5 mg/kg
Vitamin B1	20 mg/kg	20,01 mg/kg
Vitamin B2	20 mg/kg	20,081 mg/kg
Vitamin B6	15 mg/kg	15,009 mg/kg
Vitamin B12	41 µg/kg	33 µg/kg
Nikotinsäure	50 mg/kg	50,043 mg/kg
Pantothensäure	50 mg/kg	50,027 mg/kg
Folsäure	10 mg/kg	10,0006 mg/kg
Biotin	201 µg/kg	500 µg/kg
Cholinchlorid	1012 mg/kg	1002,875 mg/kg
Vitamin C	20 mg/kg	21 mg/kg

Anhang

Tabelle 9: Aminosäuren

Inhaltsstoff	Kontrolldiät	Multidefizienzdiät
Alanin	2528 mg/kg	8703,336 mg/kg
Arginin	9829 mg/kg	11513,122 mg/kg
Asparaginsäure	3583 mg/kg	15052,822 mg/kg
Cystin	3196 mg/kg	4033,945 mg/kg
Glutaminsäure	23675 mg/kg	25378,120 mg/kg
Glycin	3136 mg/kg	5905,368 mg/kg
Histidin	5276 mg/kg	6190,588 mg/kg
Isoleucin	7223 mg/kg	8812,007 mg/kg
Leucin	14763 mg/kg	16897,295 mg/kg
Lysin	17401 mg/kg	15933,449 mg/kg
Methionin	7223 mg/kg	7689,534 mg/kg
Phenylalanin	7172 mg/kg	11759,083 mg/kg
Prolin	12763 mg/kg	9855,907 mg/kg
Serin	5268 mg/kg	10880,378 mg/kg
Threonin	7154 mg/kg	8376,823 mg/kg
Tryptophan	1977 mg/kg	2127,109 mg/kg
Tyrosin	9285 mg/kg	8266,924 mg/kg
Valin	3296 mg/kg	10181,338 mg/kg

Tabelle 10: Fettsäuren

Inhaltsstoff	Kontrolldiät	Multidefizienzdiät
Arachinsäure C-20:0	50 mg/kg	50 mg/kg
Behensäure C-22:0		150 mg/kg
Eicosansäure C-20:1	150 mg/kg	150 mg/kg
Erucasäure C-22:1		50 mg/kg
Laurinsäure C-12:0		50 mg/kg
Lignocerinsäure C-24:0		250 mg/kg
α -Linolensäure C-18:3	150 mg/kg	150 mg/kg
Linolsäure C-18:2	28500 mg/kg	28500 mg/kg
Margarinsäure		100 mg/kg
Myristinsäure C-14:0		100 mg/kg
Palmitinsäure C-16:0	2500 mg/kg	2500 mg/kg
Palmitoleinsäure C-16:1		150 mg/kg
Stearinsäure C-18:0	1350 mg/kg	1350 mg/kg
Ölsäure C-18:1	13500 mg/kg	13500 mg/kg

13.2 Protokoll der Paraformaldehyd-(PFA)-Fixierung nach Lillie

Tabelle 11: Materialien für die Herstellung der 4 % Paraformaldehyd-(PFA)-Lösung und für die PFA-Fixierung

Reagenz	Bezugsquelle (Beispiel für zugelassene Lieferanten)
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Nr. 0335
Filterpapiere HK83.1, MN 615 $\frac{1}{4}$; Ø 185 mm	Roth, Nr. 175511148
Plastikpipette, 5 ml	Alpha Laboratories, Nr. LW4728
Natronlauge	Roth, Nr. 8655
Natriumphosphat-Puffer	Roth, Nr. 1097

Tabelle 12: Herstellung der 4 % Paraformaldehyd-(PFA)-Lösung

Schritt	Arbeitsanweisung
1.	Vor Verwendung 4 % PFA in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer aus einer eingefrorenen und aufgetauten 8 %igen Lösung frisch ansetzen.
2.	Ein 5 l-Becherglas mit 4600 ml Aqua bidest, befüllen und auf einem Magnetrührer mit Kontaktthermometer zum Sieden bringen.
3.	400 g PFA zugeben und mit einem großen Magneten bei 75 °C bis zur Auflösung des Bodensatzes rühren. Die Lösung muss trüb bleiben. Das Becherglas dabei mit Alufolie abdecken.
4.	Tropfenweise 10 M Natronlauge (ca. 5–6 Tropfen) zugeben, bis die Lösung klar ist. Nach dem Abkühlen filtrieren.
5.	500 ml 8 % PFA + 500 ml 0,2 M Natriumphosphat-Puffer mischen.
6.	Die Lösung in eine mit „4 % PFA, Datum, Name“ beschriftete Flasche füllen und bei 4–8 °C für maximal 4 Wochen aufbewahren.

Wenn keine Temperatur angegeben wird, wurden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

Tabelle 13: Methode zur Fixierung von Knochenproben

Schritt	Arbeitsanweisung
1.	Die nach der Euthanasie gewonnenen Knochenproben (Wirbelknochen L3) für ca. 24 h in 4 %iger Paraformaldehyd-(PFA)-Lösung und in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (pH-Wert: 7,2–7,4) bei ca. 4–8 °C fixieren. Volumenverhältnis Lösung zur Probe: 20:1.

Wenn keine Temperatur angegeben wird, wurden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

13.3 Protokoll zur Entkalkung von Knochenproben

Tabelle 14: Materialien zur Entkalkung von Knochenproben

Reagenz	Bezugsquelle (Beispiel für zugelassene Lieferanten)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Nr. 5429
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Nr. 8043

Tabelle 15: Methode zur Entkalkung von Knochenproben

Schritt	Arbeitsanweisung
1.	Fixierte Proben (s. Tab. 13) sechsmal mit 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (pH-Wert: 7,2–7,4) spülen. Nach der Spülung erfolgt die Umbettung in Einbettungskassetten bzw. Einbettungskapseln.
2.	Proben in den Einbettungskapseln ohne Metallkörnchen zum Entkalken in eine EDTA-Lösung (3,4 %ige Tris-Base (17 g) + 10 %iges EDTA (50 g) in 500 ml Aqua dest. (pH-Wert 7,0–7,4 mit 1 N HCl) einlegen.
3.	Wechseln der EDTA-Lösung jeden zweiten Tag. Zur wirksameren Entkalkung verbleiben die Proben kontinuierlich auf einem Rüttler.
4.	Die Dauer der Entkalkung richtet sich nach der Größe der Knochen bzw. der Dicke der Knochenscheiben. Mittels spitzer Pinzette prüfen, ob das Gewebe weich genug für die Herstellung von Paraffinschnitten ist.

Wenn keine Temperatur angegeben wird, wurden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

13.4 Protokoll zur Herstellung von Paraffinschnitten

Tabelle 16: Materialien zur Herstellung von Paraffinschnitten

Reagenz	Bezugsquelle (Beispiel für zugelassene Lieferanten)
Paraformaldehyd	Roth, Nr. 0335
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Nr. 5429
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Nr. 8043
Xylol	Roth, Nr. 9713
Ethanol 522 vergällt mit 1 % Petroläther	Stockmeier Chemie, Nr. 1001043227002
Natriumphosphat-Puffer	Roth, Nr. 1097
Paraffin	Roth, Nr. CN48
Aminopropyltriethoxysilan (APTES)	Roth, Nr. 2328

Tabelle 17: Methode zur Herstellung von Paraffinschnitten

Schritt	Arbeitsanweisung
1.	Fixierte (s. Tab. 13) und entkalkte (s. Tab. 15) Proben für 1 h unter fließendem Leitungswasser spülen und in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (pH-Wert: 7,2–7,4) legen.
2.	Proben in den Paraffin-Einbettungsautomaten (Leica TP1050) geben, wo zunächst die Entwässerung mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, dreimal 100 % Ethanol) erfolgt (Verweildauer: 2–3 h).
3.	Proben dreimal in Xylol baden (Verweildauer jeweils 60 min) und dann dreimal in mit Paraffin befüllte Metalleinbettkassetten überführen (Verweildauer jeweils 40 min).
4.	Die Proben in Metallförmchen umbetten und das Paraffin auf einer Kälteplatte bei -20 °C härten.
5.	Anschließend 5 µm dicke Paraffinschnitte mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM355S) herstellen. Paraffinschnitte in einem Wasserbad (44 °C) entfalten und abschließend auf mit Aminopropyltriethoxysilan (APTES) beschichtete Objektträger über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank trocknen.

Wenn keine Temperatur angegeben wird, wurden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

13.5 Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Tabelle 18: Materialien für die Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Reagenz	Bezugsquelle (Beispiel für zugelassene Lieferanten)
Alkohol: Ethanol 522 vergällt mit 1 % Petroläther	Stockmeier Chemie, Nr. 1001043227002
Xylol	Roth, Nr. 9713
Vitroclud®	R. Langenbrinck GmbH, Nr. 04001
Essigsäure	Merck, Nr. 1.00063
Hämatoxylin-Lösung nach Gill III	Merck, Nr. 105174
Eosin G	Merck, Nr. 1.15935
Filterpapiere HK83.1, MN 615 ¼; Ø 185 mm	Roth, Nr. 175511148

Tabelle 19: Herstellung der Eosin-Lösung für die Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Schritt	Arbeitsanweisung
1.	5 g Eosin (Analysewaage) auf 500 ml Aqua dest. verdünnen und anschließend fünf Tropfen Essigsäure hinzugeben. Die Lösung für 30 min auf einem Magnetrührer mischen. Die fertige, 1 %ige Eosin-Lösung in eine lichtgeschützte Flasche umfüllen. Die Lösung ist bei Raumtemperatur für 14 d haltbar.

Wenn keine Temperatur angegeben wird, wurden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

Tabelle 20: Methode der Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Schritt	Arbeitsanweisung
1.	Entparaffinierung der Schnitte durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 % Ethanol) für jeweils 5 min. Inkubation der Schnitte in Aqua dest. für 5 min.
2.	Zugabe der Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III. Spülen der Schnitte für ca. 5 min in Aqua dest., anschließend für 10 min unter laufendem Leitungswasser reinigen. Abschließend erneut die Schnitte für 5 min in Aqua dest. spülen.
3.	Inkubation der Schnitte für 1 min in der Eosin-Lösung (s. Tab. 19). Spülen mit Aqua dest. (ca. 5 min).
4.	Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 % Ethanol) und Xylol für jeweils 5 min.
5.	Eindeckung der Schnitte durch Zugabe von 1–3 Tropfen Vitroclud® auf das Präparat und Abdeckung mit einem Deckglas. Trocknen mit zusätzlichem Gewicht auf das Deckglas für 24 h unter dem Abzug.

Wenn keine Temperatur angegeben wird, wurden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

13.6 Protokoll der Movat-Pentachrom-Färbung

Tabelle 21: Materialien für die Movat-Pentachrom-Färbung

Reagenz	Bezugsquelle (Beispiel für zugelassene Lieferanten)
Alkohol: Ethanol 522 vergällt mit 1 % Petroläther	Stockmeier Chemie, Nr. 1001043227002
Xylol	Roth, Nr. 9713
Vitroclud®	R. Langenbrinck GmbH, Nr. 04001
Essigsäure	Merck, Nr. 1.00063
Eisenhämatoxylin nach Weigert: Lösung A	Roth, Nr. X906
Eisenhämatoxylin nach Weigert: Lösung B	Roth, Nr. X907
Filterpapiere HK83.1, MN 615 ¼; Ø 185 mm	Roth, Nr. 175511148
Ammoniaklösung 32 %	Roth, Nr. P093.1
Alcian Blau	Chroma, Nr. 2C-005
Brilliant Crocein R	Chroma, Nr. 1B-109
Säurefuchsin	Chroma, Nr. 1B-525
Phosphorwolframsäure (Tungstonphosphoracid)	Merck, Nr. 1.00583
Safran du Gâtinais	Chroma, Nr. 5A-394

Anhang

Tabelle 22: Herstellung der Lösungen für die Movat-Pentachrom-Färbung

Schritt	Arbeitsanweisung
1.	Die Herstellung der Lösungen erfolgt auf einem Magnetrührer mit Heizplatte. Die Feststoffe werden mittels einer Analysenwaage eingewogen. Filtriert wird mithilfe eines Trichters und Filterpapier.
2.	Alkalisches Ethanol: 20 ml 25 % Ammoniak (Ammoniumhydroxid) + 180 ml 96 % Ethanol, bei einem pH-Wert >8. 25 % Ammoniak = 22 ml Aqua dest. + 78 ml Ammoniak.
3.	Hämatoxylin-Lösung A nach Weigert und Hämatoxylin-Lösung B nach Weigert werden zweimal jeweils im Verhältnis 1:1 gemischt, wodurch Lösung 1 und Lösung 2 entstehen.
4.	Lösung 1 = Brilliant Crocein-R: 0,1 g Brilliant Crocein R in 99,5 ml Aqua dest. lösen, 0,5 ml Essigsäure zugeben und filtrieren. Lösung 2 = Säurefuchsin: 0,1 g Säurefuchsin in 99,5 ml Aqua dest. lösen, 0,5 ml Essigsäure zugeben und filtrieren.
5.	Arbeitslösung = Mix aus Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 5:1.
6.	5 g Phosphorwolframsäure in 100 ml Aqua dest. lösen.
7.	Safran du Gâtinais: 6 g in 100 ml 100 % Ethanol lösen, bei 50 °C für 48 h im Wärmeschrank inkubieren, vor Gebrauch filtrieren.
8.	Alle Lösungen lichtgeschützt aufbewahren (z. B. braune Flaschen, Umhüllen der Flaschen mit Alufolie).

Wenn keine Temperatur angegeben wird, wurden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

Tabelle 23: Methode der Movat-Pentachrom-Färbung

Schritt	Arbeitsanweisung
1.	Entparaffinierung der Schnitte durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 % Ethanol) für jeweils 5 min, danach zweimal Zugabe von Aqua dest. (jeweils 5 min).
2.	Alle Lösungen (außer Alcianblau) werden filtriert zu den Proben gegeben. Nach 10 min für 5 min mit Leitungswasser spülen und alkalisches Ethanol zugeben (Dauer: 60 min).
3.	Nach zehnmütiger Spülung mit Aqua dest. Zugabe der Arbeitslösung (Dauer: 10 min).
4.	Nach erneuter Spülung mit Aqua dest. und Leitungswasser Zugabe der Arbeitslösung (Dauer: 12,5 min).
5.	Zugabe von 0,5 %iger Essigsäure (Dauer: 20 min).
6.	Zugabe von 5 %iger Phosphorwolframsäure (Dauer: 20 min).
7.	Spülung mit 0,5 %iger Essigsäure (Dauer ca. 2 min).
8.	dreimalige Inkubation mit 100 %igem Ethanol (Dauer jeweils 5 min).
9.	Zugabe von Safran du Gâtinais (Dauer: 60 min).
10.	Entwässerung mittels 100 %igem Ethanol (dreimal jeweils 2 min) und Xylol (zweimal jeweils 5 min).
11.	Eindeckung der Schnitte durch Zugabe von 1–3 Tropfen Vitroclud® auf das Präparat und Abdeckung mit einem Deckglas. Trocknen mit zusätzlichem Gewicht auf das Deckglas für 24 h unter dem Abzug.

Wenn keine Temperatur angegeben wird, wurden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

13.7 Protokoll der Silbernitrat-Färbung

Tabelle 24: Materialien für die Silbernitrat-Färbung

Reagenz	Bezugsquelle (Beispiel für zugelassene Lieferanten)
Alkohol: Ethanol 522 vergällt mit 1 % Petroläther	Stockmeier Chemie, Nr. 1001043227002
Xylol	Roth, Nr. 9713
Vitroclud®	R. Langenbrinck GmbH, Nr. 04001
Gelatine aus der Rinderhaut	Sigma-Aldrich, Nr. G9391
Ameisensäure 98–100 %	Merck, Nr. 1.00264
Silbernitrat	Sigma-Aldrich, Nr. 31630
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck, Nr. 1.06509
Ammoniaklösung 32 %	Roth, Nr. P093.1
Pap-Pen	Kisker, Nr. MKP-2

Tabelle 25: Herstellung der Lösungen für die Silbernitrat-Färbung

Schritt	Arbeitsanweisung
1.	Lösung A: 24,75 ml Aqua bidest. + 250 µl Ameisensäure + 0,5 g Gelatine. Gelatine in Aqua bidest. im Falcon-Röhrchen auf einem Rollenmischer bei 37°C für 30 min lösen. Anschließend erfolgt die Zugabe von Ameisensäure. Die fertige Lösung kann maximal vier Wochen im Kühlschrank gelagert werden. Vor erneutem Gebrauch Lösung auf 37 °C erwärmen.
2.	Lösung B: 50 % Silbernitrat = 20 ml Aqua bidest. + 10 g Silbernitrat.
3.	Arbeitslösung = Mix aus Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:2.

Wenn keine Temperatur angegeben wird, wurden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

Tabelle 26: Methode der Silbernitrat-Färbung

Schritt	Arbeitsanweisung
1.	Entparaffinierung der Schnitte durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 % Ethanol) für jeweils 5 min, danach zweimal Zugabe von Aqua dest. (Dauer: jeweils 5 min)
2.	Einkreisen der Probe auf dem Objektträger mit einem Pap-Pen. Zugabe der Arbeitslösung (Dauer: 2 h) in einer Dunkelkammer. Da die Einwirkzeit vom zu färbenden Gewebe abhängt, mikroskopische Überprüfung der Probe während der Einwirkzeit alle 10 min.
3.	Spülen mit Aqua bidest. (Dauer: 5 min), Zugabe von 5 %igem Natriumthiosulfat in Aqua bidest. (Dauer: 10 min).
4.	Erneute Spülung mit Aqua bidest. (Dauer: 5 min).
5.	Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 % Ethanol) und Xylol (Dauer: jeweils 5 min).
6.	Eindeckung der Schnitte durch Zugabe von 1–3 Tropfen Vitroclud® auf das Präparat und Abdeckung mit einem Deckglas. Trocknen mit zusätzlichem Gewicht auf das Deckglas für 24 h unter dem Abzug.

Wenn keine Temperatur angegeben wird, wurden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

13.8 Protokoll der Tartrat-resistenten-sauren-Phosphatase-(TRAP)-Färbung

Tabelle 27: Materialien für die Färbung der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP)

Reagenz	Bezugsquelle (Beispiel für zugelassene Lieferanten)
Alkohol: Ethanol 522 vergällt mit 1 % Petroläther	Stockmeier Chemie, Nr. 1001043227002
Xylol	Roth, Nr. 9713
Spritzenfilter: 32 mm mit 0,2 µm Membran	Pall Corporation, Nr. 4652
di-Natriumtartrat-Dihydrat	Merck, Nr. 1.06663
Natriumacetat p. a.	Merck, Nr. 1.062680
Naphthol-AS-TR-Phosphat	Sigma-Aldrich, Nr. N6125
N-N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Nr. D4551
Echtrotsalz	Sigma-Aldrich: Nr. 368881
Shandon Instant Hämatoxylin	Thermo Scientific, Nr. 6765015
Kaisers Glyceringelatine	Roth, Nr. 6474
Salzsäure, 25 %	Roth, Nr. X879
Plastikspatel, Rührspatel	Sarstedt, Nr. 32420090
Eppendorf-Tube, 2 ml	Sarstedt, Nr. 72.695.400
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nr. 70.760.502
Zentrifugenröhrchen mit Stehrand, 50 ml	Sarstedt, Nr. 62.559.001
Filterpapiere HK83,1, MN 615 ¼; Ø 185 mm	Roth, Nr. 175511148
Pap-Pen	Kisker, Nr. MKP-2
Deckgläser: 21 x 26 / 22 x 22 / 24 x 26 / 24 x 36	R. Langenbrinck: Nr. 01-2126/1 / Nr. 01-2222/1 / Nr. 01-2426/1 / Nr. 01-2436/1

Anhang

Tabelle 28: Herstellung der Lösungen für die Färbung der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP)

Schritt	Arbeitsanweisung
1.	0,1 M Na-Acetatpuffer pH-Wert 5,2: Stammlösung (1 M): 82,03 g/l Natriumacetat in Aqua dest. lösen und mit 25 %iger Salzsäure auf pH-Wert 5,2 einstellen. Gebrauchslösung (0,1 M): Puffer im Verhältnis 1:9 mit 25 ml Aqua dest. in einem Zentrifugen-Röhrchen mischen.
2.	Lösung A: 35 mg Naphthol-AS-TR-Phosphat in 125 µl N-N- Dimethylformamid lösen (Eppendorf-Tube).
3.	Lösung B: 57,5 mg di-Natriumtartrat-Dihydrat in 1 ml der 0,1 M Na-Acetatpuffer-Gebrauchslösung lösen (Eppendorf-Tube). 35 mg Echttrotsalz in 1 ml der 0,1 M Na-Acetatpuffer-Gebrauchslösung lösen (Eppendorf-Tube). Abschließend beide Ansätze im Rest der 0,1 M Na-Acetat-Gebrauchslösung lösen.
4.	TRAP-Färbelösung: Lösung A zu Lösung B geben.
5.	Shandon Instant Hämatoxylin: Stammlösung: Teil A der Hämatoxylin-Stammlösung und Teil B der Hämatoxylin-Stammlösung in 1 l Aqua bidest. einrühren und mischen. Gebrauchslösung: Stammlösung mit Aqua bidest. in einem Verhältnis 1:3 mischen.
6.	Kaisers Glyceringelatine: kurz vor Gebrauch im Wasserbad verflüssigen.

Wenn keine Temperatur angegeben wird, wurden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

Tabelle 29: Methode der Färbung der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP)

Schritt	Arbeitsanweisung
1.	Vorbereitung einer Inkubationskammer: Auslegen mit Papierhandtüchern, Zugabe von Aqua bidest. bis das Papier durchgehend nass ist.
2.	Entparaffinierung der Schnitte durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 % Ethanol) für jeweils 5 min, danach zweimal Zugabe von Aqua dest. (Dauer: jeweils 5 min).
3.	Zugabe von 0,1 M Na-Acetatpuffer, pH-Wert 5,2 (Dauer: 10 min).
4.	Einkreisen der Schnitte mit dem Pap-Pen.
5.	Zugabe der TRAP-Färbelösung, Inkubation der Schnitte in der feuchten Inkubationskammer für 30 min in einem Brutschrank (37 °C).
6.	Dreimal spülen in Aqua bidest. für jeweils 5 min.
7.	Gegenfärbung mit Shandon Instant Hämatoxylin-Gebrauchslösung für 1 min.
8.	Spülen in Aqua bidest. (Dauer: 1 min), Bläuen in fließendem Leitungswasser (Dauer: 10 min), erneute Spülung in Aqua bidest. (Dauer: 5 min).
9.	Eindeckung der Schnitte durch Zugabe von 1–3 Tropfen Kaisers Glyceringelatine auf das Präparat und Abdeckung mit einem Deckglas. Trocknen mit zusätzlichem Gewicht auf das Deckglas für 24 h unter dem Abzug.

Wenn keine Temperatur angegeben wird, wurden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

13.9 Protokoll der Osteocalcin-Färbung

Tabelle 30: Materialien für die Osteocalcin-Färbung

Reagenz	Bezugsquelle (Beispiel für zugelassene Lieferanten)
Alkohol: Ethanol 522 vergällt mit 1 % Petroläther	Stockmeier Chemie, Nr. 1001043227002
Xylol	Roth, Nr. 9713
Vitroclud®	R. Langenbrinck GmbH, Nr. 04001
Tris	Roth, Nr. 4855
Pap-Pen	Kisker, Nr. MKP-2
Natriumchlorid	Roth, Nr. 3957
Spritzenfilter: 32 mm mit 0,2 µm Membran	Pall GmbH, Nr. 4659
Salzsäure, 25 %	Roth, Nr. X879
Triton-X-100	Merck, Nr. 108603
Zitronensäure-Monohydrat	Roth, Nr. 3958
Natriumcitrat	Merck, Nr. 1.06448
BLOXALL Endogenous Peroxidase and Alkaline Phosphatase Blocking Solution	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA, Nr. SP-6000
Dako Verdünnungspuffer	Agilent Technologies, Glostrup, Dänemark, Nr. S0809
Primärantikörper: Anti-humanes Osteocalcin, monoklonal (Maus), 1:200 Verdünnung	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA, Nr. MAB1419
Sekundärantikörper: Biotinylierter, Anti-Maus IgG Universalantikörper, monoklonal (Pferd), 1:150 Verdünnung	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA, Nr. BA-1400
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Nr. G6767
ABC-AP Komplex, Anti-Kaninchen IgG	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA, Nr. AK-5200
Mix Magenta Red Vector Substrat	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA, Nr. SK-5100
Methylgrün	Roth, Nr. 5159

Tabelle 31: Herstellung der Lösungen für die Osteocalcin-Färbung

Schritt	Arbeitsanweisung
1.	Tris-NaCl-Puffer: Stammlösung (1 M): 60,57 g Tris + 87,66 g NaCl in 1 l Aqua dest. lösen, einstellen des pH-Wertes mit 25 %iger Salzsäure auf 7,4. Gebrauchslösung (0,1 M): Stammlösung 1:10 in Aqua dest. lösen.
2.	Tris-Waschpuffer: Tris-NaCl-Puffer-Gebrauchslösung (pH-Wert: 7,4) + 0,025 %ige Triton-X-100 Lösung mischen (100 ml Stammlösung in 900 ml Aqua dest. und 0,25 ml Triton-X-100).
3.	Citratpuffer: 41 ml 0,1 M Natriumcitrat in 400 ml Aqua dest. lösen und mit 0,1 M Zitronensäure auf einen pH-Wert von 6 einstellen.
4.	150 mM Tris-HCl-Puffer (pH-Wert 8,3): 18 g Tris in 1 l Aqua dest. lösen und mit 25 %iger Salzsäure auf einen pH-Wert von 8,3 einstellen.
5.	Mix Magenta Red Vector Substrat-Lösung: Jeweils 5 ml Tris-HCl Puffer mit 2 Tropfen der Reagenzien 1, 2 und 3 auf dem Vortex mischen.

Tabelle 32: Methode der Osteocalcin-Färbung

Schritt	Arbeitsanweisung
1.	Entparaffinierung der Schnitte durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 % Ethanol) für jeweils 5 min, danach zweimal Zugabe von Aqua dest. (Dauer: jeweils 5 min).
2.	Zweimal Spülen mit Tris-Waschpuffer (Dauer jeweils 10 min).
3.	Inkubation in Citratpuffer (Dauer: 60 min).
4.	Zweimal Spülen mit Tris-Waschpuffer (Dauer jeweils 5 min).
5.	Zugabe des Enzymreagenz BLOXALL Endogenous Peroxidase and Alkaline Phosphatase Blocking Solution (Dauer: 10 min).
6.	Spülen mit Tris-Waschpuffer (Dauer: 5 min).
7.	Zugabe von 5 ml der Tris-NaCl-Puffer-Gebrauchslösung und von einem Tropfen des Ziegenserums (Dauer: 10 min).
8.	Nach vorsichtiger Säuberung der Präparate mit Tris-Waschpuffer (Dauer: 1 min), Inkubation mit dem Osteocalcin-Antikörper (1:200) in Dako Verdünnungspuffer bei 4 °C (Dauer: 24 h).
9.	Nach Entfernung des Primärantikörpers dreimal Spülen mit Tris-Waschpuffer (Dauer jeweils 5 min)
10.	Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (1:150) mit jeweils einem Tropfen des ABC-AP Komplexes und 2,5 ml Tris-NaCl-Puffer-Gebrauchslösung (Dauer: 30 min).
11.	Zweimal Spülen mit Tris-Waschpuffer (Dauer: jeweils 5 min), Zugabe von jeweils 5 µl Reagenz A und B des ABC-AP Komplexes (in 500 µl Tris-NaCl-Puffer-Gebrauchslösung) (Dauer: 30 min).
12.	Zweimal Spülen mit Tris-Waschpuffer (Dauer: jeweils 5 min), einmal Spülen mit Aqua dest. (Dauer: 5 min) Zugabe von zwei Tropfen der drei Reagenzien des Mix Magenta Red Vector Substrats (in 5 ml 150 mM Tris-HCl-Puffer, pH-Wert: 8,3) (Dauer: 15 min).
13.	Zweimal Spülen mit Aqua dest (Dauer: jeweils 5 min) Gegenfärbung mit Methlygrün (Dauer: 10 min).
14.	Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 % Ethanol) und Xylol durch kurzes Eintauchen.
15.	Trocknung der Proben für 30 min bei 60 °C, Zugabe von 1–3 Tropfen Vitroclud® auf den Schnitt, Eindeckung mit Deckglas, Trocknung mit zusätzlichem Gewicht auf das Deckglas unter dem Abzug (Dauer: 24 h)

Wenn keine Temperatur angegeben wird, wurden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

13.10 Protokoll der Histomorphometrie mit ImageJ

Tabelle 33: Methode der Histomorphometrie mit ImageJ

Schritt	Arbeitsanweisung
1.	Voraussetzungen für die Softwarenutzung: 1. Java Version 8 2. Trainable Weka Segmentation plugin (v 3.2.13) 3. Mindestens 4 GB RAM
2.	Gewünschte Bild in ImageJ einfügen (Drag and Drop/File→Open).
3.	Im Menü von ImageJ auf Stacks→Tools→ Montage to Stack klicken. Bildabschnitt mit allen zu untersuchenden Segmenten der histologischen Färbung auswählen.
4.	Im Menü von ImageJ auf Plugins→Segmentation→Trainable Weka Segmentation klicken, worauf sich ein Fenster mit verschiedenen Optionen öffnet.
5.	Die Standardeinstellung sieht zwei Klassen vor, diese können mittels der Option „Create a new class“ erweitert werden. Die Klassenbezeichnung lässt sich mit der Option „Settings“ ändern. Die Klassen können entsprechend der histologischen Färbung einer Farbe zugeordnet werden. Hierbei markiert man mit der Option „Polygon Tool“ oder „Freehand Line“ Punkte für die jeweilige Klasse.
6.	Nach der Definition von 10–15 Punkten für jede Klasse kann mit der Option „Train classifier“ die Klassenzuordnung mit der jeweiligen Farbe standardisiert festgelegt werden.
7.	Nach Abschluss der Segmentation lässt sich mit der Option „Create result“ die Segmentation verifizieren.
8.	Ähneln das Resultat der Segmentation dem Initialbild, kann dies mit den Optionen „Save classifier“ und „Save data“ gespeichert werden. Hiermit kann die Analyse weiterer Bilder derselben histologischen Färbung durchgeführt werden.
9.	Dafür müssen die gespeicherten „Classifier“ und „Data“ mit den Optionen „Load classifier“ und „Load data“ aufgerufen werden. Die Optionen befinden sich im Programmfenster der Trainable Weka Segmentation.
10.	Nach der Segmentation kann über die Option „Analyze“→„Measure“ der prozentuale Flächenanteil jeder einzelnen, zuvor definierten Klasse im Bild bestimmt werden.
11.	Über „Analyze“→„Set Scale“ kann je nach Fotomikroskop und genutzter Vergrößerung die passende Skalierung bestimmt werden. Der prozentuale Flächenanteil wird durch Multiplikation des Bildmaßstabs mit dem Ergebnis der zuvor durchgeführten Segmentation in die durch die von der American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) definierten Skalierungen (mm oder μm) umgerechnet.
12.	Die ermittelten Werte können nun statistisch ausgewertet werden.

14 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ort/Datum

Unterschrift

15 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir die Fertigstellung meiner Promotion ermöglicht haben und ohne deren Mithilfe die Vollendung dieser Dissertationsschrift niemals zustande gekommen wäre.

Mein größter Dank gebührt Prof. Dr. rer. nat. Thaqif El Khassawna, der mir die interessante Promotionsthematik vorschlug. Seine stetige Hilfsbereitschaft und wissenschaftliche Betreuung waren eine große Hilfe und trugen wesentlich zur kritischen Auseinandersetzung mit meiner Arbeit bei. Sein unerschütterliches Vertrauen in mich spiegelte sich in unzähligen Gesprächen sowohl auf fachbezogener als auch auf persönlicher Ebene wider. Insbesondere wird mir sein stets offenes Ohr für meine Anliegen in Erinnerung bleiben.

Ebenfalls möchte ich Dr. Deeksha Malhan danken, die mir bei Fragen zur statistischen Analyse immer zur Seite stand. Ihre Geduld und vielseitige Unterstützung haben mich stets motiviert und positiv beeinflusst.

Ferner danke ich dem ganzen Team der experimentellen Unfallchirurgie am UKGM und besonders Annette Stengel, Dr. rer. nat. Sabine Stötzel, Ida Oberst und Olga Dakischew für die zahlreichen wertvollen Diskussionen und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Weiter danke ich Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Christian Heiß für die Bereitstellung der Forschungsstätte und des Laborinventars.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie. Meine Eltern und meine Brüder haben mich nicht nur während der Anfertigung dieser Arbeit, sondern auch während des gesamten Studiums uneingeschränkt und in jeder Hinsicht unterstützt. Durch ihre unermüdliche Geduld und ihr entgegengebrachtes Verständnis haben sie einen entscheidenden Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Diese Promotion wäre ohne sie nicht zustande gekommen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freunden, die mich während dieser Zeit fortwährend motiviert haben. Für ihren Rückhalt und für ihre Nachsicht kann ich nicht genug danken.