

# **Enzymhistochemische Analysen des zellulären Knochenmetabolismus bei der Osteoporoseinduktion am Großtiermodell**

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

vorgelegt von Doppstadt, Alina Mareike  
aus Pforzheim

Gießen (2021)

Aus dem Labor für Experimentelle Unfallchirurgie  
Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie  
Direktor: Univ. – Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß  
des Fachbereichs Medizin

**der Justus-Liebig-Universität Gießen**

1. Gutachter: Univ. - Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Karrasch

Tag der Disputation: 21.12.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Skelettsystem.....	2
1.1.1	Makroskopischer Aufbau der Knochen .....	2
1.1.2	Knochenmatrix und mikroskopischer Knochenaufbau.....	4
1.1.3	Knochenzellen.....	6
1.1.4	Knochenaufbau und –umbau .....	8
1.1.5	Kalziumhaushalt des Knochens .....	14
1.2	Osteoporose .....	16
1.2.1	Einteilung der Osteoporose.....	18
1.2.2	Diagnostik der Osteoporose .....	20
1.2.3	Therapie der Osteoporose .....	22
1.3	Fragestellung und Zielsetzung .....	23
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.1	Versuchstiere .....	25
2.2	Studiendesign.....	26
2.3	Versuchsdurchführung.....	27
2.3.1	DEXA–Messungen und Gewichtskontrolle.....	27
2.3.2	Operationen.....	29
2.3.3	Diättherapie.....	33
2.3.4	Glukokortikoidtherapie .....	34

2.4	Probenbearbeitung .....	35
2.4.1	Herstellung von Paraffinschnitten.....	35
2.4.2	Enzymhistochemie - Tartrat-resistente saure Phosphatase .....	36
2.4.3	Immunhistochemie - Osteocalcin .....	37
2.4.4	Toluidinblau O .....	39
2.5	Auswertungen .....	40
2.5.1	Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) .....	41
2.5.2	Osteocalcin.....	44
2.5.3	Toluidinblau O .....	45
2.6	Statistik .....	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
3.1	Studienverlauf.....	49
3.2	Gewichtsentwicklung .....	50
3.3	Knochendichtemessung durch DEXA.....	52
3.4	Histomorphometrie der Beckenkammbiopsien .....	57
3.4.1	TRAP-Osteoklasten.....	57
3.4.2	Osteocalcin-Osteoblasten .....	64
3.4.3	Semiquantitative Analyse mittels Toluidinblau O.....	69
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>76</b>
4.1	Methodik.....	77
4.1.1	Knochendichtemessung .....	77
4.1.2	Histomorphometrie .....	79
4.2	Ergebnisse.....	80
4.2.1	Kontrolle .....	80
4.2.2	Ovariectomie.....	81
4.2.3	Ovariectomie und defizitäre Diät.....	83

4.2.4 Ovariectomie, defizitäre Diät und Glukkokortikoide .....	84
4.3 Das Schaf im Vergleich zu anderen Tiermodellen .....	88
4.4 Fazit .....	92
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>95</b>
<b>6 Summary .....</b>	<b>96</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>97</b>
<b>8 Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>103</b>
<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>109</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>110</b>

# 1 Einleitung

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die aufgrund des demographischen Wandels und der stetig steigenden Lebenserwartung an Bedeutung gewinnt. Diese Erkrankung geht mit einem Verlust an Knochenmasse und einer Verschlechterung der Knochenarchitektur einher. Die Knochen werden brüchiger und das Risiko für Frakturen aufgrund von Osteoporose steigt.

Allein in Deutschland leiden schätzungsweise acht Millionen Menschen an Osteoporose, darunter gut 30 % der über 50jährigen Frauen. Typische Komplikationen sind Schenkelhalsfrakturen, Frakturen des distalen Radius und Wirbelkörperfrakturen. Insgesamt gibt es jährlich circa 400.000 Frakturen, die auf die Osteoporose zurück zu führen sind und die Kosten für die Therapie, Rehabilitation und Folgen belaufen sich in der Bundesrepublik Deutschland derzeit auf rund fünf Milliarden Euro jährlich (Bundesselbsthilfeverband für Osteoporose e.V., 2013).

Als Folge einer Schenkelhalsfraktur werden ca. 30 % der Patienten zu dauerhaften Pflegefällen und bis zu 10 % sterben an den Folgen der Fraktur. Bei Frakturen der Wirbelkörper kommt es zu einer dauerhaften Schmerzsymptomatik, die mit einer erheblichen Einschränkung des täglichen Lebens einhergeht. Zu Beginn kann der frakturierte Wirbelkörper schmerzen, langfristig entwickeln sich statische Probleme des Bewegungsapparates und die Schmerzsymptomatik kann die Muskeln, Gelenke und Sehnen betreffen. Es kommt zu einem Verlust an Körpergröße von bis zu 15 % und kann zur Ausbildung eines Rundrückens führen (Gibbus) (Ringe JD, 1995). Dabei lässt sich das Tannenbaumphänomen beobachten. Dieses entsteht aufgrund des Höhenverlustes und der damit verbundenen Verkürzung der Wirbelsäule. Die überschüssige Haut des Oberkörpers legt sich ausgehend von der Wirbelsäule in Falten. Dies erweckt den Eindruck eines Tannenbaums. In Anbetracht dieser Entwicklung ist es von großer Bedeutung, neue Möglichkeiten für die Behandlung der Folgeschäden der Osteoporose, insbesondere der Frakturen, zu ergründen. In den letzten Jahren wurde bereits ein Wissenszuwachs im Bereich der Epidemiologie, der Pathophysiologie und der Therapie der Osteoporose erreicht, jedoch besteht vor allem im Bereich der Pathogenese unterschiedlicher Osteoporoseformen noch ein großer Erkenntnisbedarf. Durch die Vertiefung des Wissens über die Entstehung und der Mechanismen auf zellulärer Ebene könnten weitere Ansatzpunkte für neue Therapien gefunden werden.

Ziel dieser Studie ist es, ein geeignetes Tiermodell zu etablieren, um neue Therapiemöglichkeiten im speziellen, experimentellen Bezug auf die Frakturheilung bei der systemischen Skeletterkrankung Osteoporose entwickeln und etablieren zu können. Durch die Kombination verschiedener Behandlungsansätze, die eine Osteoporose induzieren, soll ein osteoporotischer Knochenstatus provoziert werden, der dem des Menschen nahekommt.

## 1.1 Das Skelettsystem

Das Skelett bezeichnet die Gesamtheit der Knochen eines Körpers. Im menschlichen Organismus besteht dieses durchschnittlich aus 206 einzelnen Knochen, wobei die Zahl variieren kann. Das Knochengewebe ist nach dem Zahnschmelz und dem Dentin der Zähne das härteste Gewebe des menschlichen Körpers (Aumüller et al., 2007).

Die Knochen- und Knorpelgewebe haben die Stützfunktion des Körpers inne und bilden zusammen mit Bindegewebe und Bändern die Gelenke und damit den passiven Bewegungsapparat, welcher durch die Muskulatur aktiv bewegt wird. Eine weitere wichtige Funktion des Knochens ist die des Kalziumspeichers des Körpers, da im Knochengewebe circa 90 % des Gesamtkalziums gespeichert ist. Im Bereich des Brustkorbes, des Schädels und des Beckens übernimmt das Skelett eine Schutzfunktion, um beispielsweise das Gehirn und die Lunge vor mechanischen äußeren Einflüssen zu schützen.

### 1.1.1 Makroskopischer Aufbau der Knochen

Es gibt fünf verschiedene Formen von Knochen im Körper:

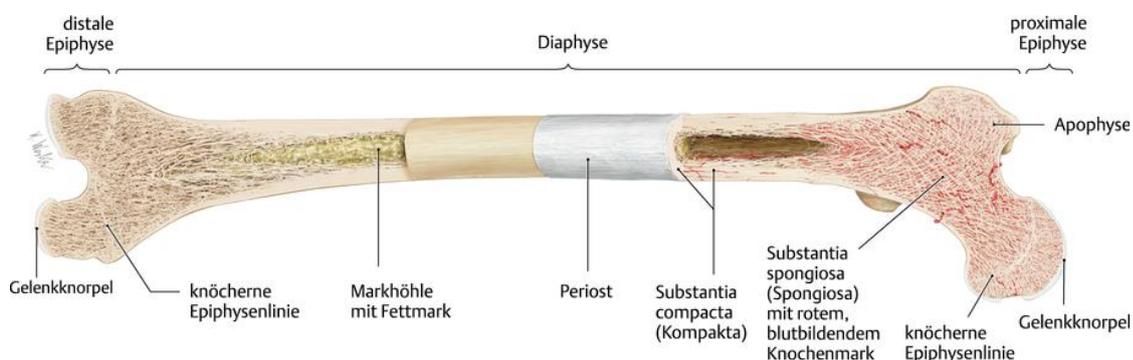
1. Ossa longa  
hierunter zählen u.a. die langen Röhrenknochen der Extremitäten bsp. der Radius
2. Ossa brevia  
hierunter zählen die kurzen Knochen der Hand- und Fußwurzel
3. Ossa plana  
hierunter zählen die flächigen Knochen des Schädels und die Schulterblätter
4. Ossa pneumatica  
dies sind die lufthaltigen Knochen v.a. der Nasennebenhöhlen
5. Ossa irregularia  
dies sind unregelmäßig geformte Knochen bsp. die Wirbelkörper

Im Weiteren unterscheidet man die Ossa sesamoidea (= in Sehnen eingelagerte Knochen bsp. Patella) und die Ossa accessoria (= zusätzliche Knochen).

### *Ossa longa*

Zu den Ossa longa zählen vor allem die langen Röhrenknochen der oberen und unteren Extremität (Radius, Ulna, Humerus, Femur, Tibia, Fibula).

Sie bestehen im Wesentlichen aus der distalen und proximalen Epiphyse, welche die Gelenkflächen bilden. Die Epiphysen unterliegen vor allem hoher Beanspruchung durch Druck. In diesem Bereich befinden sich die Apophysen, große Knochenvorsprünge, die Bändern und Muskeln als Ursprungs- und Ansatzpunkt dienen. Den größten Anteil der Knochen hat die in der Mitte gelegene Diaphyse, welche die Cavitas medullaris mit dem blutbildenden Knochenmark enthält (Abb. 1). Während in der Epiphyse überwiegend Spongiosa vorkommt, verdichtet sich der Knochen in den Diaphysen zur Kompakta. Die Diaphyse unterliegt hoher Beanspruchung durch Biegung. Den Übergang zwischen den Epiphysen und der Diaphyse bilden die Metaphysen, die Zone des Längenwachstums während der Wachstumsphase.



**Abbildung 1: Makroskopischer Aufbau eines Röhrenknochens am Beispiel des Femurs**

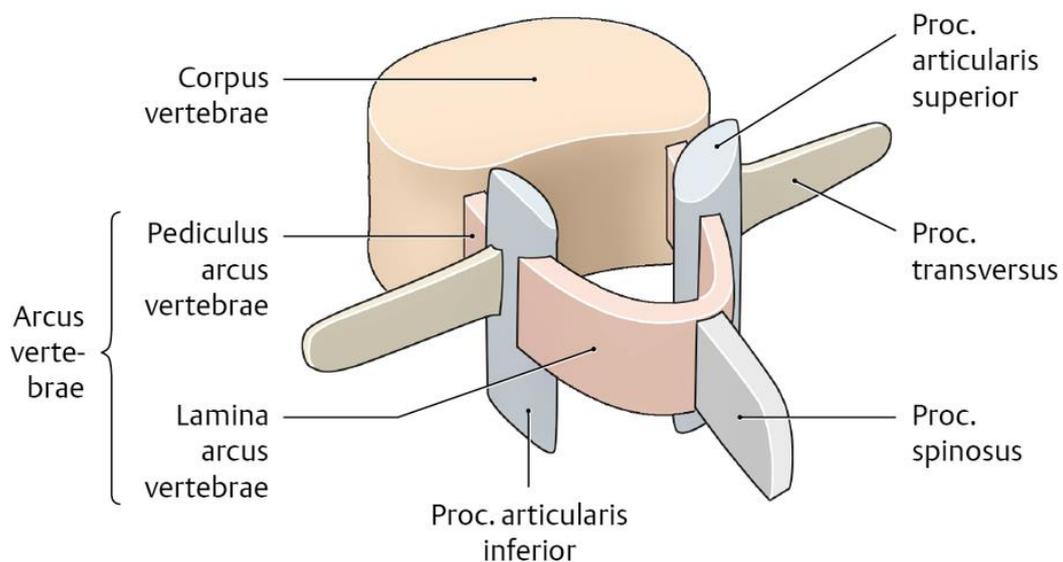
Die in der Mitte gelegene Diaphyse besteht aus Kompakta, welche die Markhöhle (Cavitas medullaris) umgibt. Die Endpunkte und damit auch die Gelenkflächen bildet jeweils die proximale bzw. distale Epiphyse. Diese bestehen aus Spongiosa, welche von Kompakta umhüllt ist. Die Metaphysen bilden den Übergang zwischen Dia- und Epiphyse. Der gesamte Knochen ist von Periost umgeben (Aulmüller et al., 2014).

### *Ossa irregularia*

Die menschliche Wirbelsäule bildet das Achsenskelett und überträgt das Gewicht des Kopfes, der oberen Extremitäten, des Thorax und des Abdomens auf das Becken und die Beine. Sie besteht aus 24 bis 26 einzelnen Wirbelkörpern (7 Hals-, 12 Brust-, 5 Lenden-, 5 Sakral- und 3 bis 5 rudimentären Steißwirbeln). Ihre Größe nimmt von kranial nach kaudal zu.

Die einzelnen Wirbel setzen sich im Wesentlichen aus drei Bestandteilen zusammen (Abb. 2):

- **Corpus vertebrae (Wirbelkörper)**  
Sie tragen die Last der oberen Körperabschnitte und übertragen sie auf die unteren Körperschnitte
- **Arcus vertebrae (Wirbelbogen)**  
Sie umschließen das Rückenmark und bilden mit den benachbarten Wirbelbögen die Foramina intervertebrale, in welchen die Spinalnerven verlaufen
- **Processus arcus vertebrae (Wirbelbogenfortsätzen)**



### Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Wirbelkörpers

Die Wirbelsäule gliedert sich in die Hals-, Brust-, Lenden-, Sakral- und Steißwirbelsäule. Die Wirbel unterscheiden sich in Größe und Form, die Grundbauweise ist dieselbe und besteht aus drei Bestandteilen. Der Wirbelkörper bildet das Zentrum und trägt die Last der oberen Extremitäten. Dorsal des Wirbelkörpers befindet sich der Wirbelbogen, der den Wirbelkanal (Canalis vertebralis) mit dem Rückenmark umschließt und mit den angrenzenden Wirbelbögen die Foramina intervertebrale bildet, in denen die Spinalnerven verlaufen. Am Wirbelbogen sind sieben Wirbelbogenfortsätze angelagert: ein Dornfortsatz (Proc. spinosus), zwei Querfortsätze (Proc. transversi), zwei oberer und zwei untere Gelenkfortsätze (Proc. articularis sup. et. inf.) (Aulmüller et al., 2014).

## 1.1.2 Knochenmatrix und mikroskopischer Knochenaufbau

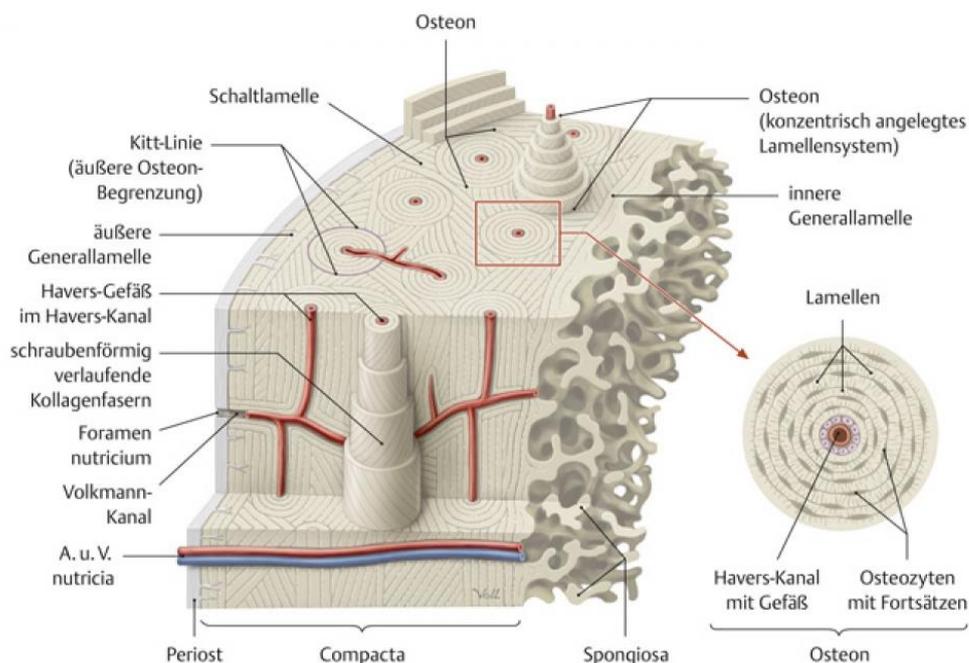
Der mineralisierte Knochen besteht zu ca. 40 % aus anorganischen Stoffen, zu 35 % aus organischem Material und zu 25 % aus Wasser (Gong et al., 1964).

Kollagen Typ 1 macht 90 % der nicht-mineralisierten Knochenmatrix, dem Osteoid, aus. Die restlichen 10 % bestehen aus nicht-kollagenen Proteinen wie Glykoproteinen und Proteoglykanen, beispielsweise Osteocalcin und Osteopontin (Heinegård und Oldberg,

1989). Die Extrazellulärmatrix ist im ausdifferenzierten Knochen in Lamellen angeordnet.

Durch Einlagerung von Hydroxylapatit-Kristallen  $[3 \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2]$  zwischen den Kollagenfibrillen wird das Osteoid mineralisiert. Die Kollagenfibrillen sind zugfest und die Kristalle druckfest, der Knochen ist dadurch biegefest.

Die äußere Schicht des Knochens, die Kompakta, besteht aus Osteonen, in diesen sind die Lamellen konzentrisch um einen Haverskanal angeordnet, in welchem wiederum das Blut- und Nervengewebe verläuft. Die Haverskanäle sind durch Volkmann-Kanäle miteinander verbunden (Abb. 3).



### Abbildung 3: Mikroskopischer Aufbau der Kompakta

Das Zentrum eines Osteons bildet der Havers-Kanal, in dem das Gefäß- und Nervengewebe verläuft. Die Lamellen verlaufen konzentrisch um den Haverskanal, zwischen den einzelnen Lamellen liegen die Osteozyten. Zwischen den Osteonen verlaufen Schaltlamellen und als Begrenzung zum Periost verläuft eine Generallamelle. Zur Blut- und Nährstoffversorgung verlaufen durch die Lamellen die Volkmann-Kanäle, welche die Haverskanäle miteinander verbinden (Spinas und Fischli, 2011).

Die innere Schicht, die Spongiosa, besteht aus parallel zur Oberfläche angeordneten Lamellen, den Trabekeln. Die Versorgung erfolgt aus den Gefäßen des Knochenmarks, da die Spongiosa keine Blutgefäße besitzt. Die Trabekel sind trajektorieell ausgerichtet, d.h. sie werden entweder auf Druck oder Zug beansprucht.

In den Wirbelkörpern, die insbesondere axialen Druckkräften ausgesetzt sind, kreuzen sich in der Spongiosa vertikale Drucktrabekel mit horizontal ausgerichteten Zugtrabekeln. Die Kortikalis ist nur als dünner Randsaum ausgebildet.

### 1.1.3 Knochenzellen

#### *Osteoblasten*

Die Osteoblasten spielen eine entscheidende Rolle beim Knochenaufbau, da sie das Osteoid synthetisieren. Osteoblasten differenzieren sich aus mesenchymalen Stammzellen, die sich ebenfalls in Adipozyten, Myozyten, Chondrozyten oder Osteoblasten entwickeln können. Ein wichtiger Faktor für die Differenzierung in Osteoblasten ist der runt-related transcription factor 2 (RUNX2). Osteoblasten sind kubische, mononukleare Zellen, welche die gesamte Knochenoberfläche besetzen und Osteoid synthetisieren, welches anschließend mineralisiert wird. Des Weiteren synthetisieren Osteoblasten Kollagen Typ I und in hoher Konzentration alkalische Phosphatase und Osteocalcin (Macdonald und Gowen, 1993).

Die alkalische Phosphatase (AP) spaltet organisches Phosphat in anorganisches Phosphat und stellt dieses für die Mineralisation zu Verfügung. Hierdurch spielen die Osteoblasten durch die Sekretion der AP ebenfalls eine wichtige Rolle im Phosphathaushalt des Körpers. Bei Mangel an AP kann es zu einer Hypophosphatämie kommen. Osteocalcin, das Vitamin-K abhängig carboxyliert wird, dient mit seinen negativen Ladungen als Bindeproteine von Calciumionen, um dieses für die Kristallisation des Hydroxylapatits lokal zu konzentrieren (Hauschka et al., 1989). Kalzium und Phosphat werden von den Osteoblasten aktiv sezerniert, sodass lokal eine Übersättigung entsteht, die zu einem Ausfall der Kristalle und Mineralisation führt.

Die Osteoblasten besitzen als einzige Knochenzellen Rezeptoren für das Parathormon an ihrer Zelloberfläche und spielen hierdurch eine entscheidende Rolle bei der Steuerung des Remodellings in Bezug auf den Calciumhaushalt. Ebenso besitzen die Osteoblasten Oberflächenrezeptoren für aktives Vitamin A (Retinsäure), welches das Gleichgewicht von Knochenauf- und abbau sowie Calcitriol (1,25-Dihydro-Vitamin-D3) beeinflusst. Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor ist Vitamin C, welches für die Synthese von Kollagen benötigt wird. Für die Synthese der multiplen Proteine besitzen Osteoblasten große Mengen an Ribosomen und einen großen Golgi-Apparat.

Nach Abschluss der Osteoidbildung und Mineralisation einer Knochenlamelle werden circa 20 % der Osteoblasten in die Knochenmatrix eingemauert und differenzieren sich zu Osteozyten.

### *Osteozyten*

Die Zellkörper der Osteozyten liegen zwischen den einzelnen Knochenlamellen in Lakunen und bilden lange Zellfortsätze, die in einem System aus Canaliculli liegen und mittels Gap-Junctions mit den Zellfortsätzen der benachbarten Osteozyten und den an der Oberfläche liegenden Osteoblasten verbunden sind und darüber kommunizieren. In diesem Hohlraumsystem bleibt um die Osteozyten und deren Zellfortsätze eine schmale Zone, die mit Kollagenfibrillen ausgekleidet ist und mit interstitieller Flüssigkeit ausgefüllt ist. Bei Bewegung wird diese Flüssigkeit in Schwingung versetzt und dadurch auf die Osteozyten übertragen. Die Osteozyten dienen hierbei als Mechanorezeptoren und gelten als Hauptsensoren für mechanische Reize und sind damit an der Anpassung des Knochens an die sich verändernde mechanische Belastung im Laufe des Lebens eines Organismus maßgeblich beteiligt. Durch dieses weitläufige Hohlraumsystem sind die Kommunikation und die Ernährung der Osteozyten gewährleistet.

Die Osteozyten sezernieren unter anderem Sclerostin, FGF 23, RANKL und Osteoprotegerin (OPG) (Sapir-Koren und Livshits et al., 2014).

Es ist davon auszugehen, dass Osteozyten durch erneute Freilegung aus den Knochenlamellen erneut zu Osteoblasten differenzieren können.

### *Osteoklasten*

Osteoklasten sind der wesentliche Bestandteil des Knochenabbaus und sind für die Resorption der Knochenmatrix zuständig. Sie differenzieren sich aus hämatopoetischen Stammzellen, den gleichen Vorläuferzellen, aus denen sich Makrophagen differenzieren und sind mehrkernige Riesenzellen mit bis zu 25 Zellkernen, die Lakunen und Kanäle in die Knochenmatrix fressen, um die Resorptionsfläche zu vergrößern und die Knochenmatrix zu resorbieren. Die Osteoklasten umschließen zur Matrix hin einen abgeschlossenen Raum und bilden einen Bürstensaum (*ruffled membrane*) durch Fusion von sauren Vesikeln, welche dem Endosomen-Lysosomen-System entstammen. Die Zellmembran liegt der Knochenoberfläche auf. Hierdurch kann sich dieser Bürstensaum durch Endo- und Exostose den Ansprüchen anpassen und verändern.

In diesen so entstandenen Zwischenraum sezernieren sie Protonen und erschaffen ein saures Milieu mit einem pH von circa 4,5, wodurch zunächst die Kalzium-Verbindungen aufgelöst werden. Die Protonen werden mithilfe einer Carboanhydrase (CA), welche reich in den Osteoklasten vorhanden ist, aus CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O gewonnen. Lysosomale Enzyme bspw. Cathepsin K und die Tartrat-resistente Phosphatase (TRAP), deren



der Sexualhormone die Funktion der Osteoblasten und gleicht sich zum Ende des Wachstums an die Osteoklastenaktivität an (Riggs et al., 2000). Das Modelling spielt ebenfalls eine Rolle bei der Knochenentwicklung und der Frakturheilung. Physiologisch ist es mit der Verknöcherung der Wachstumsfugen abgeschlossen.

### *Osteogenese und Ossifikation*

Die Osteogenese bezeichnet die Entwicklung eines individuellen Knochens in der Embryogenese oder im frühen Wachstum aus Knochenkernen beispielsweise die Hand- oder Fußwurzelknochen. Es werden zwei Formen der Osteogenese unterschieden. Bei der desmalen oder direkten Osteogenese entstehen Osteoblasten direkt aus Mesenchymzellen. Die Mesenchymzellen gruppieren sich um ein dichtes Kapillarnetz und bilden ein Ossifikationszentrum. Sie differenzieren sich zu Osteoblasten und bilden zunächst Osteoid, welches mineralisiert. Es entstehen Knochenlamellen. Durch appositionelles Wachstum, die periphere Anlagerung von neuen Knochenlamellen, wächst das Knochenfragment weiter. Es entsteht Geflechtknochen, zunächst als Spongiosa, welche im weiteren Verlauf zur Kompakta umgebaut werden. Bereits während des Wachstums wird das entstandene Knochenfragment durch die Stimulation von Osteoklasten umgebaut, um sich an die Anforderungen des Knochens anzupassen. Auf diese Weise entstehen die Schädel- und Gesichtsknochen sowie die Clavicula.

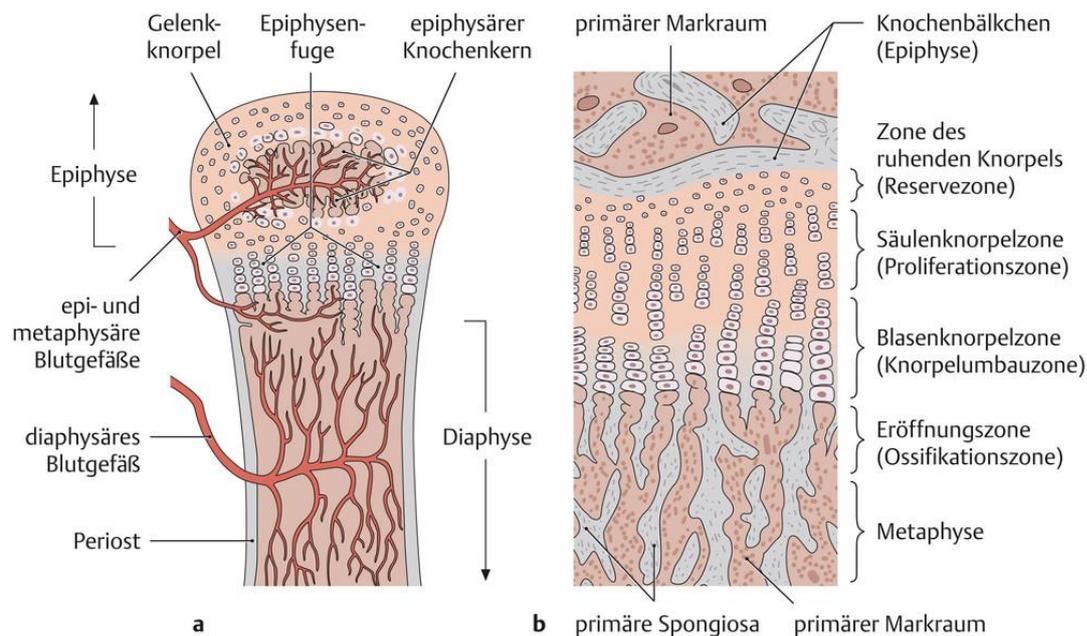
Bei der chondralen oder indirekten Osteogenese bzw. Ossifikation wird zunächst ein vorgeformtes Gerüst aus hyalinem Knorpel gebildet, welches im weiteren Verlauf zu Knochen umgewandelt wird.

Es kommt zunächst zu einer Verdichtung von Mesenchymzellen, die sich zu Chondroblasten, knorpelbildenden Zellen, differenzieren. Um die Chondroblasten bildet sich ein sogenanntes Perichondrium und es entstehen Chondrone. Diese werden durch die Synthese der neuen Knorpelmatrix immer weiter auseinander gedrängt. Nach einer gewissen Zeit differenzieren sich in den mittig gelegenen Chondronen Osteoblasten, diese beginnen nach dem Prinzip der desmalen Osteogenese eine Knochenmanschette, um die zukünftige Diaphyse zu bilden. Das Perichondrium wird zum Periost umgewandelt.

Anschließend erfolgt die endochondrale Ossifikation der Diaphyse. Im Zentrum des Knorpels hypertrophieren die Chondrozyten und führen zur Mineralisation der Knorpelmatrix. Osteoblasten bilden zunehmend Osteoid, welches mineralisiert wird. Durch Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen entstehen Osteoklasten,

welche bereits beginnen den neu entstandenen Knochen umzubauen. Im Folgenden sprießen zunehmend Blutgefäße in die Knochenmatrix ein.

Durch die Resorption der Knorpelmatrix durch Chondroklasten entsteht die primäre Markhöhle, ist dies abgeschlossen werden die Chondrozyten apoptotisch. Ein kleiner Teil der mineralisierten Knorpelmatrix bleibt aber in Form von kleinen Balken und Sporen stehen, und dient als Grundgerüst für die Ablagerung von Knochengewebe durch die Osteoblasten. Das so entstandene Knochengewebe ist die primäre Spongiosa, die im Weiteren zu Kompakta umgebaut wird, je nach den mechanischen Voraussetzungen und Bedürfnissen. Die Ossifikation setzt sich nach proximal und distal fort, bis die primäre Markhöhle zu beiden Seiten von einer Ossifikationsgrenze, in der die sekundären Knochenkerne bzw. die Epiphysenfugen liegen, umgeben ist. Das in diesem Bereich folgende Längenwachstum, das erst mit Ende der Pubertät und dem Verschluss der Epiphysenfugen (Abb. 5) Jahre später abgeschlossen wird, erfolgt nach dem gleichen Prinzip.



### Abbildung 5: Aufbau der Epiphysenfuge

Versorgung des Knochens durch Blutgefäße (a). Die Epiphysenfuge ist in verschiedenen Zonen eingeteilt (b). In der Eröffnungszone werden die Transversalsepten, die zwischen hypertrophen Chondrozyten liegen durch Makrophagen und katabolen Proteinen aufgelöst. In der Knorpelumbauzone nehmen die Chondrozyten Wasser auf und hypertrophieren. Sie produzieren Kollagen Typ X und beginnen die Longitudinalsepten zu mineralisieren. Ebenfalls wird VEGF (vascular endothelial growth factor) synthetisiert, der Gefäße in der darunter liegenden Eröffnungszone zur Bildung von Migrationsfortsätzen (Vasculogenese) anregt. In der Proliferationszone flachen die Chondrozyten ab und ordnen sich longitudinal an und bilden säulenartige Chondrone. Die Reservezone beinhaltet Stammzellen als Chondrozytenvorläuferzellen und liefern Nachschub von Zellen für das Wachstum (Schünke et al., 2007). Schlussendlich bleiben von dem zu Beginn bestehenden Knorpelgewebe nur knorpelige Gelenkflächen an den proximalen und distalen Epiphysen bestehen. Das

Längenwachstum eines Knochens erfolgt durch interstitielles Wachstum, das heißt neues Knochengewebe wird von innen angelegt. Das Dickenwachstum wird durch eine Anlagerung des neuen Knochengewebes von außen durch das appositionelle Wachstum gewährleistet.

### *Remodelling*

Um die Integrität der mechanischen Belastbarkeit des Knochens zu bewahren und das im Knochen gespeicherte Kalzium zu nutzen, unterliegt das Knochengewebe einem ständigen Umbau.

Das Remodelling bezeichnet einen ständigen Austausch des Knochenmaterials, um sich verändernden mechanischen Belastungen anzupassen, Frakturen zu regenerieren, altes Knochenmaterial zu ersetzen, und um die Kalziumhämostase zu beeinflussen. Es wird größtenteils lokal reguliert, so wird circa 10% der Knochenmasse eines gesunden Erwachsenen jährlich ausgetauscht. Hierbei besteht im Idealfall ein Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau. Bei Erwachsenen verhält sich die Knochenmasse relativ stabil bis zum Erreichen der Menopause

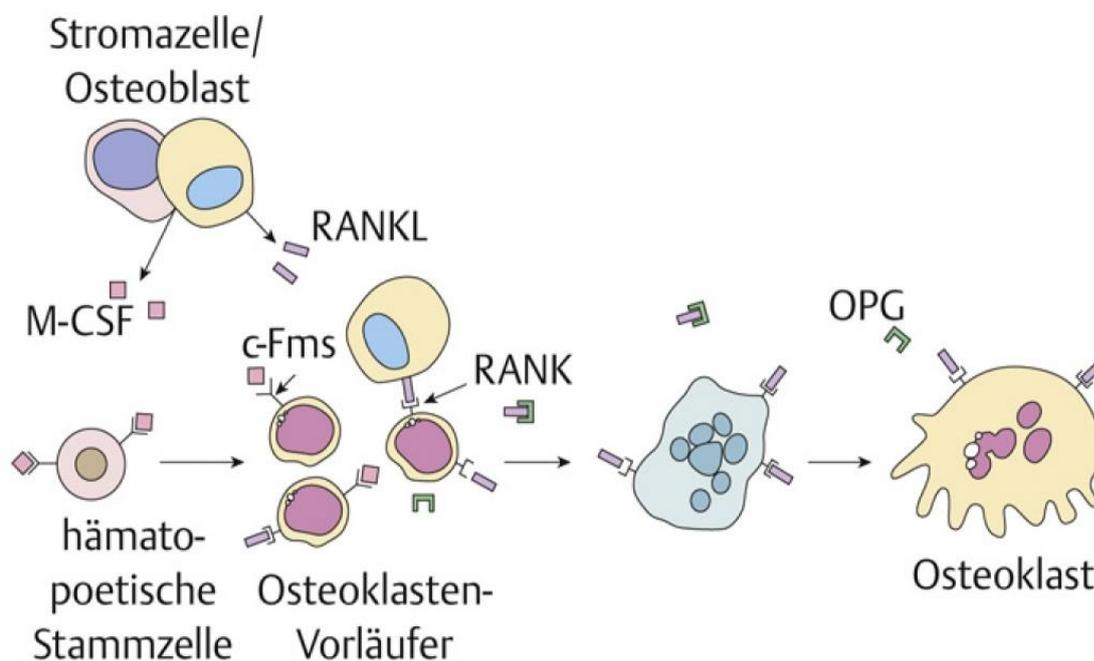
Die Regulation dieser Umbauprozesse wird von multiplen Faktoren beeinflusst. Der Knochen muss sich der mechanischen Belastung, welcher er ausgesetzt ist, anpassen können. Zudem werden die Umbauprozesse von multiplen systemischen und lokalen Hormonen sowie Wachstumsfaktoren, die das Gleichgewicht zwischen der lokalen Aktivität der Osteoblasten, Osteoklasten und der Osteozyten regulieren, beeinflusst.

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Regulation ist das RANK/RANKL/OPG-System (Abb. 6). Osteoblasten sezernieren den Receptor Activator of NF-κB ligand (RANKL), der an den Receptor Activator of NF-κB (RANK) bindet, der wiederum auf der Oberfläche der Osteoklasten und deren Vorläuferzellen sitzt. Durch diese Bindung stimulieren die Osteoblasten die Osteoklasten. Eine Variante des RANKL, das Osteoprotegerin (OPG), die auch von den Osteoblasten sezerniert wird, hemmt wiederum die Osteoklastenaktivität. Bei Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose ist sowohl RANKL als auch OPG erhöht, was für einen erhöhten Knochenumbau spricht (Jabbar et al., 2011).

Die Osteoblasten sezernieren zudem den macrophage colony factor (M-CSF), der die Entstehung von Vorläuferzellen der Osteoklasten stimuliert. Die Osteoklasten wiederum setzen bei dem Abbau der Knochenmatrix gespeicherte Wachstumsfaktoren frei, die die Osteoblasten zur erhöhten Produktion von Osteoid anregen.

Ein weiteres Element, das das Remodelling beeinflusst, ist der Wnt/Frz/ $\beta$ -Catenin-Signalweg. Osteozyten beeinflussen diesen Weg zum einen als Mechanorezeptoren, die mechanischen Reize als Zeichen der Beanspruchung in chemische Signale umwandeln und über diesen Weg Osteoblasten aktivieren.

Durch die Aktivierung des Signalweges werden verschiedenen Glykoproteine sezerniert, die wiederum an Frizzled – Rezeptor (Frz) und seinen Co-Rezeptoren low density lipoprotein receptor-related protein 5 und 6 (LRP5/6) der Osteoblasten binden und damit den Transkriptionsfaktor  $\beta$ -Catenin aktivieren. Durch Veränderung der Genexpression werden die Proliferation und die Differenzierung von Osteoblasten gesteigert.



**Abbildung. 6: Signaltransduktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten via RANK/RANKL/OPG - System**

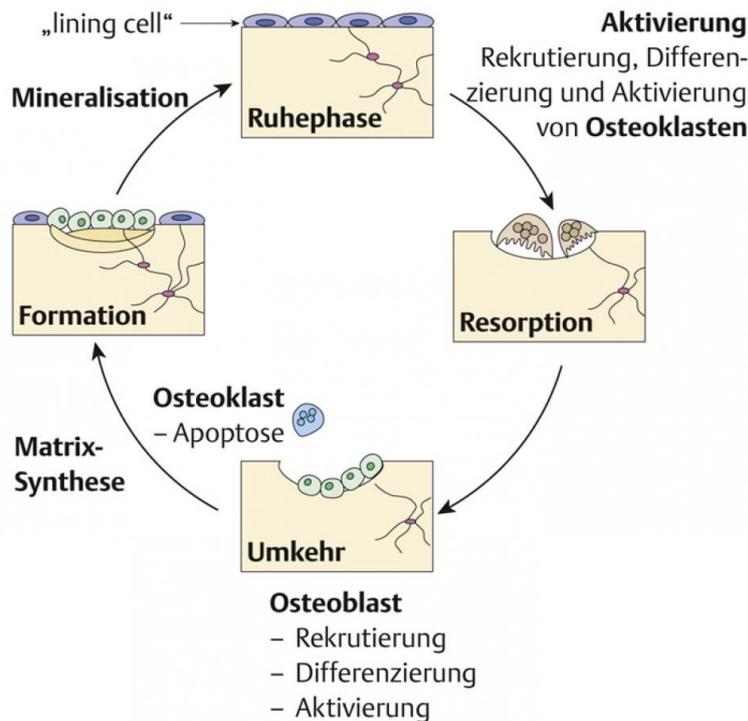
Der von den Osteoblasten sezernierte *Receptor Activator of  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  ligand (RANKL)* bindet an den *Receptor Activator of  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  (RANK)*, welcher von Osteoklasten und deren Vorläuferzellen exprimiert wird. Hierdurch stimulieren die Osteoblasten die Osteoklasten und deren Vorläuferzellen. Osteoblasten sezernieren zudem das Osteoprotegerin (OPG), dies hemmt wiederum die Osteoklastenaktivität. Durch die Sezernierung von macrophage colony factor (M-CSF) stimulieren die Osteoblasten zudem die Bildung von Vorläuferzellen der Osteoklasten. Durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der von den Osteoklasten abgebauten Knochenmatrix, werden die Osteoblasten zur Produktion von Osteoid angeregt (Jabber et al., 2011).

Bei geringer mechanischer Beanspruchung sezernieren die Osteozyten Sclerostin, ein Glykoprotein, das wiederum diesen Signalweg hemmt, in dem es einen Teil des Rezeptorkomplexes besetzt. Dies kann teilweise erklären, warum längere Immobilisation ein Risikofaktor für Osteoporose darstellt.

Bei einem gesunden Erwachsenen besteht somit ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten, das sich an die geforderte Situation anpasst.

Das Remodelling lässt sich in verschiedene Phasen einteilen (Abb. 7), je nachdem welche Zellfunktion im Vordergrund steht (Bartl, 2011):

1. Ruhephase: Endostezellen („Bone lining cells“) schützen den Knochen
2. Aktivierungsphase: Rekrutierung der Osteoklasten durch Aktivierung und Differenzierung aus dem Knochenmark, die Knochenmatrix wird frei gelegt.
3. Resorptionsphase: Osteoklasten resorbieren Knochenmaterial
4. Umschaltphase: Ausgleich der Resorptionslakunen, Osteoblasten werden aktiviert und Osteoklasten apoptotisch
5. Anbauphase
  - Osteoidproduktion
  - Mineralisation
  - Resorptionslakunen werden wieder aufgefüllt
  - Im Osteoid eingelagerten Osteoblasten differenzieren sich zu Osteozyten
6. Erneute Ruhephase: Osteoblasten differenzieren zu Endostzellen



### Abbildung 7: Schematische Darstellung des Remodellings

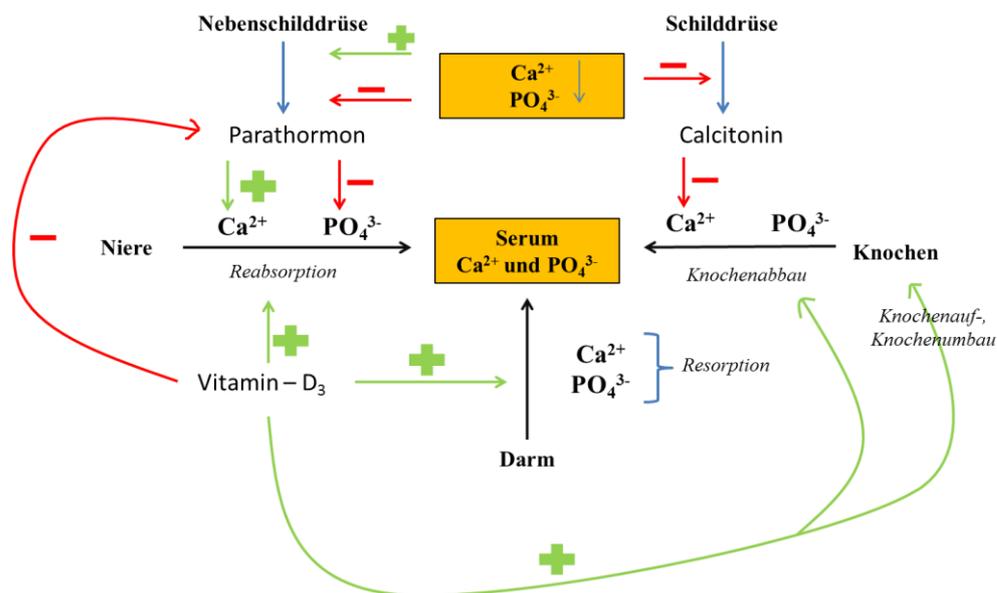
Der Knochenumbau verläuft in fünf Phasen. In der Ruhephase liegen der Knochenoberfläche „bone lining cells“ an und schützen den Knochen vor äußeren Einflüssen. Wird der Knochenabbau stimuliert werden die Osteoklasten in der Aktivierungsphase rekrutiert, diese bauen in der Resorptionsphase die Knochenmatrix ab. In der Umkehrphase überwiegt die Stimulation der Osteoblasten und die Osteoklasten sterben ab. Zuletzt folgt die Anbauphase, in der die Knochenmatrix wieder aufgebaut wird. Ist dies abgeschlossen, treten die Zellen erneut in die Ruhephase ein (Spinas et al., 2011).

### 1.1.5 Kalziumhaushalt des Knochens

Im menschlichen Körper sind circa 1000 bis 1200 mg Kalzium gespeichert, dieses wird für die Funktion, die Aktivierung und die Regulation von Signaltransduktionsprozessen benötigt.

Die Knochen speichern 99 % des gesamten Kalziums des menschlichen Körpers, wodurch zu erklären ist, dass auch der Kalziumhaushalt den Knochenstoffwechsel wesentlich beeinflusst. Der Normbereich des Serumspiegels des Gesamtkalziums des Menschen liegt zwischen 2,2 und 2,6 mmol/L. Ist dieser Spiegel zu hoch, kann es zu einer Kalzifizierung von Gewebe führen, ein zu niedriger Spiegel wiederum zu einer Übererregbarkeit von Nerven- und Muskelgewebe (Tetanie). An der Regulation des Kalziumhaushaltes sind die Schilddrüse, die Nebenschilddrüsen, der Darm, die Nieren und der Knochen mit seiner Speicherfunktion beteiligt. Die Knochenzellen werden im Wesentlichen über das RANK/OPG – System stimuliert bzw. gehemmt.

Sinkt der Serumkalziumspiegel, sezernieren die Nebenschilddrüsen vermehrt Parathormon (PTH), dies bindet an einen Rezeptor des Osteoblasten, der daraufhin vermehrt RANKL produziert. Dadurch werden Osteoklasten aktiviert und durch den hieraus resultierenden Knochenabbau wird Kalzium freigesetzt, um den Serumkalziumspiegel zu erhöhen. Zudem bindet das PTH auch an Rezeptoren der Osteozyten und unterdrückt die Synthese von Sclerostin und hemmt somit auch den Knochenaufbau. Bei einem dauerhaft erhöhten PTH-Spiegel überwiegt die katabole Seite und es kommt zum Verlust von Knochenmasse, bei intermittierenden hohen Serumspiegeln überwiegt hingegen die anabole Seite und es kommt zum Knochenaufbau. In der Osteoporosetherapie kommt die intermittierende Gabe von PTH zum Einsatz, um die Knochenmasse zu erhöhen (Nishida et al., 1994). Calcitriol/Vitamin-D (1,25 – Dihydroxy – Cholecalciferol) erhöht die Kalzium-Resorption im Darm und die tubuläre Rückresorption von Kalzium und Phosphat in der Niere. Zudem erhöht es die Kalziumspeicherung in dem es die Osteoklasten hemmt (Abb. 8). Die kombinierte Gabe von Vitamin-D und Kalzium ist ein fester Bestandteil der Osteoporosetherapie. So zeigen Frauen, die Kalzium und Vitamin D3 einnehmen, ein bis zu 40 % geringeres Risiko für Frakturen (Chapuy et al., 1992) und auch eine Steigerung der Knochenmasse (Jackson et al., 2006).



**Abbildung 8: Überblick über die hormonelle Regulation des Kalzium- und Phosphathaushalts**

Der Serumkalziumspiegel wird durch multiple Faktoren reguliert. Hypokalziämie führt zur Ausschüttung von Parathormon (PTH), welches die Niere stimuliert, Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) zu reabsorbieren und Phosphat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) auszuscheiden. Calcitonin wird wiederum gehemmt und damit auch der Knochenabbau. Vitamin – D<sub>3</sub> hemmt PTH, fördert die Resorption von  $\text{Ca}^{2+}$  im Darm, den Knochenaufbau und –umbau, um den Kalziumspeicher zu erhöhen und stimuliert den Knochenabbau, um den Serumkalziumspiegel zu erhöhen (Rassow et al., 2008).

Das von den C-Zellen der Schilddrüse gebildete Calcitonin senkt kurzfristig den Kalziumspiegel. Es hemmt die Osteoklastenaktivität innerhalb weniger Minuten und steigert in hohen Dosen die renale Kalziumausscheidung in den Nieren. In physiologischen Dosen hemmt es wiederum die renale Ausscheidung.

## 1.2 Osteoporose

„Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist, mit der Folge vermehrter Knochenbrüchigkeit“ (National Institute of Health Consensus Development Conference Statement, 2000).

Die höchste Knochenmasse (*peak bone mass*) besitzt der menschliche Körper zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr, danach nimmt sie kontinuierlich langsam ab. Bei Frauen beschleunigt sich dieser Effekt nach der Menopause erheblich. Das Lebensalter ist dementsprechend ein nicht beeinflussbarer Risikofaktor für die Entwicklung einer Osteoporose. Hinzu kommen auch genetische Veranlagung, da bei positiver Familienanamnese bezüglich Osteoporose-bedingter Frakturen bei den Eltern das individuelle Risiko, eine Fraktur zu erleiden, steigt (Kanis et al., 2004) Frauen, deren Mütter Oberschenkelfrakturen erlitten, haben ein um 50 % erhöhtes Risiko, ebenfalls eine Fraktur zu erleiden (Cummings et al., 1995). Männer hingegen haben bei vergleichbarer Risikokonstellation ein nur halb so hohes Risiko.

Der Verlust an Knochenmasse entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen Osteoklasten und Osteoblasten zu Gunsten des Knochenabbaus. Dies kann aus einer isoliert erhöhten Osteoklastenaktivität („high turnover“), einer isoliert verminderten Osteoblastenaktivität („low turnover“) oder durch eine Kombination aus der verminderten Aktivität sowohl der Osteoblasten als auch der Osteoklasten (Knochenatrophie) hervor gehen.

Ein weiterer wichtiger Risikofaktor ist der Body Mass Index (BMI). Untergewichtige Frauen, haben eine erhöhtes Risiko für eine niedrige Knochenmasse, als auch für einen schnelleren postmenopausale Verlust (Ravn et al., 1999). Dies wird zum einen durch eine mangelnde Muskelmasse, als auch ein fehlendes Fettgewebe für die Aromatase-abhängige Östradiolproduktion begünstigt.

Langjähriger Nikotinkonsum wirkt sich ebenfalls negativ auf die Knochendichte aus und erhöht das Risiko einer Fraktur, sowohl bei peri- als auch postmenopausaler Frauen (La Vecchia et al., 1991).

Auch eine stattgehabte osteoporotische Fraktur erhöht das Risiko einer weiteren osteoporosebedingten Fraktur, vor allem in der ersten Zeit nach dem Ereignis (Johnell et al., 2004).

Die osteoporosebedingten Frakturen haben sowohl weitreichende Folgen für die Lebensqualität der Patienten, da diese in ihrem Alltag durch die Folgen der Frakturen beispielsweise durch Bewegungseinschränkungen oder chronische Schmerzen eingeschränkt sind. Ebenso haben die Frakturen auch ökonomische Folgen, da durch notwendige Operationen, Krankenhausaufenthalte, Rehabilitationsmaßnahmen und Ausfall von Arbeitskräften hohen Kosten entstehen.

Die häufigsten Lokalisationen der nicht-traumatischen oder Bagatelle-Frakturen im Rahmen der Osteoporose als Grunderkrankungen sind die Oberschenkelhalse, die Wirbelkörper und die distalen Radii. Hier sind 70 % (Radius) bis zu 90 % (Oberschenkelhals) der Gesamtfrakturen dieser Knochen beschrieben (Bartl, 2011). Im Falle einer Schenkelhalsfraktur werden bis zu 30 % der betroffenen Patienten als Folge der Verletzung zu dauerhaften Pflegefällen, jeder zehnte Patient stirbt aufgrund einer solchen Fraktur. Durch Wirbelkörperfrakturen kann es zu akuten Schmerzen kommen, die häufig chronifizieren, den Bewegungsapparat in seiner Statik einschränken und zu einem Verlust der Körpergröße von bis zu 15 % führen (Ringe, 1995).

Durch das zunehmende Durchschnittsalter der Bevölkerung wird die Inzidenz der Osteoporose als Grunderkrankung weiter steigen und auch die Anzahl der daraus resultierenden Frakturen wird sich deutlich erhöht. Dies wird zur Folge haben, dass Kosten für deren akute, aber auch poststationäre Behandlung, die bereits im Bereich von mehreren Milliarden Euro in der Bundesrepublik Deutschland liegen, zunehmen und die Strukturen der Gesundheitsversorgung weiter ausgebaut werden müssen, um die Therapie gewährleisten zu können.

Aufgrund dessen sollte daran gearbeitet werden, die Prophylaxe der Osteoporose zu verbessern, und bei bereits manifester Osteoporose eine suffiziente Therapie durchzuführen.

## 1.2.1 Einteilung der Osteoporose

Die Osteoporose kann aufgrund verschiedener, zugrunde liegender Ursache unterteilt werden. Mit circa 95 % macht die primäre Osteoporose einen Großteil der Erkrankungen aus. Man unterscheidet hier weiter die idiopathische Osteoporose, die postmenopausale Osteoporose (Typ I) und die senile Osteoporose (Typ II). Die sekundäre Osteoporose macht nur 5 % der Fälle aus, hierunter zählen endokrine Ursachen, Immobilisation und auch die glukokortikoidinduzierte Osteoporose.

### Primäre Osteoporose

#### *Postmenopausale Osteoporose (Typ I – Osteoporose)*

Die größte Rolle für den Knochenstoffwechsel spielen Östrogene, insbesondere das Östradiol-17- $\beta$  (E2). Gesichert existieren auf Molekularebene zwei Östrogenrezeptorklassen. Die Wirkung im Knochenstoffwechsel erfolgt hierbei über den  $\alpha$ -Östrogenrezeptor (Barkhem et al., 1998). Sie balancieren den Knochenumsatz und stabilisieren dadurch die Knochenmasse und -dichte.

Auf der einen Seite wird die Lebenszeit der Osteoklasten verkürzt, deren Differenzierung und knochenresorbierende Aktivität gehemmt (Hughes et al., 1996; Kameda et al., 1997). Andererseits führt ein Mangel an E2 zu einer gesteigerten Apoptoserate der Osteoblasten. Eine Östrogensatztherapie bei postmenopausaler Osteoporose führt zu einer signifikanten Steigerung der Knochendichte (Kohrt et al., 1995).

Die postmenopausale Osteoporose (Typ I) hat ihre Ursache insbesondere in der sinkenden Produktion von Östradiol-17- $\beta$  (E2) in den Gonaden. Postmenopausal erfolgt die Synthese des Östradiol-17- $\beta$  (E2) überwiegend im Fettgewebe aus Östron und Testosteron (Pacifici 1996). Kumulativ sinkt der Östrogenspiegel und die Hemmung der Knochenresorption verringert sich. Es kommt primär zu einem Verlust der Trabekelmasse und dadurch zu Frakturen an biomechanisch stark beanspruchten Stellen wie die Lendenwirbel und distalen Radien (Kanis et al., 1994).

#### *Senile Osteoporose (Typ II – Osteoporose)*

Diese Form der Osteoporose ist ab dem 70. Lebensjahr bei beiden Geschlechtern zu finden, wobei auch hier der Anteil der Frauen 50 % höher liegt als der Anteil der Männer. In die Entstehung dieser Form der Osteoporose spielen viele Faktoren eine Rolle, vor allem der physiologische Verlust an Knochenmasse durch das zunehmende Alter, die

zunehmende Bewegungseinschränkung und der damit verbundene Bewegungsmangel oder auch eine Mangelernährung (Kalzium und Vitamin D). Die Patienten sind bis zum Auftreten der osteoporotischen Frakturen asymptomatisch. Die Frakturen betreffen insbesondere den Schenkelhals, den distalen Radius, die Wirbelkörper oder den Humerus (Herold, 2019).

### *Risikofaktoren für die Entwicklung einer primären Osteoporose*

Das generelle Risiko für die Entwicklung einer Osteoporose nimmt mit zunehmenden Alter kontinuierlich zu, da die „peak bone mass“ (der Höchstwert der Knochendichte) im Alter von circa 30 Jahren nach kontinuierlicher Zunahme in der Wachstumsphase erreicht ist und danach physiologischer Weise wieder reduziert wird. Die weibliche „peak bone mass“ liegt hierbei nur bei 70 % der männlichen „peak bone mass“. Dieser Verlust von bis 2 % Prozent pro Jahr in den ersten 10 Jahren nach der Postmenopause, begründet sich in dem Verlust des Gleichgewichts zwischen der Osteoblasten- und der Osteoklastenaktivität zu Gunsten des katabolen Knochenstoffwechsels (Reid, 2011). In der Risikoabschätzung zur Entwicklung von Osteoporose eines Patienten können durch den Patienten nicht beeinflussbare Faktoren von beeinflussbaren Faktoren unterschieden werden.

- Nicht beeinflussbare Risikofaktoren
  - Altersabhängige Abnahme der „peak bone mass“
  - weibliches Geschlecht >50 % höheres Frakturrisiko als Männer
  - Genetik u.a. familiäre Häufung
  
- Beeinflussbare Risikofaktoren
  - Verkürzter Östrogenexpositionszeitraum <30 Jahre (frühe Menopause, späte Menarche, Ovariectomie)
  - Immobilisation, Bewegungsmangel
  - Mangel an Vitamin D und Kalzium
  - BMI < 20 kg/m<sup>2</sup>
  - Alkohol- und Nikotinabusus
  - Hyperparathyreodismus – erhöhter Knochenumsatz mit insgesamt negativer Skelettbilanz

Hinzu kommen Risikofaktoren zur Entwicklung von osteoporotischen Frakturen wie erhöhtes Sturzrisiko beispielsweise durch Medikamente begünstig (z.B. Antidepressiva,

Neuroleptika, Sedative) oder Erkrankungen, die das Sturzrisiko erhöhen (z.B. Morbus Parkinson). Eine bereits erlittene osteoporotische Fraktur erhöht generell das Risiko eine weitere Fraktur zu erleiden.

## Sekundäre Osteoporose

### *Glukokortikoid-induzierte Osteoporose*

Patienten, die für mehr als drei Monate eine Glukokortikoidtherapie mit mehr als 5mg Prednisolonäquivalent erhalten, entwickeln mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Osteoporose und damit verbunden ein höheres Frakturrisiko (Reid, 2000). Glukokortikoide greifen auf mehreren Ebenen in den Knochenstoffwechsel ein. Sie hemmen die Transkription von Kollagen- und Osteocalcin Genen in Osteoblasten, die Synthese von Osteoprotegerin (Humphrey et al., 2006) und stimulieren die Synthese von RANKL. Dies stimuliert wiederum die Osteoklastendifferenzierung und -aktivität. Zudem steigern sie die Apoptoserate von Osteoblasten und Osteozyten (O'Brien et al., 2004).

Durch Denosumab, einem monoklonaler Antikörper gegen RANKL, kann dem Abbau entgegen gewirkt werden (Hofbauer et al., 2009). Dies kommt in der Osteoporosetherapie zur Anwendung.

Weiter hemmen Glukokortikoide die Kalziumaufnahme im Darm, wodurch der Kalzium – Serumspiegel sinkt und daraufhin die Kalziumfreisetzung aus dem Knochen induziert wird. Unter einer Glukokortikoid Langzeittherapie kann die Knochenmasse bis zu 30% abnehmen (LoCascio et al., 1990). Jedoch ist der Effekt nach Therapieende potenziell reversibel. Patienten, die länger als 3 Monate mit mehr als 5mg Prednisolonäquivalent behandelt werden müssen, sollten Bisphosphonate als Prävention erhalten (American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Glucocorticoid-Induced Osteoporosis, 2001).

## 1.2.2 Diagnostik der Osteoporose

Die Basisdiagnostik besteht nach den Leitlinien des Dachverbandes Osteologie (2017) aus den folgenden 4 Punkten:

### **1. Anamnese und klinische Befunde**

Gibt es anamnestisch Risikofaktoren für die Entwicklung einer Osteoporose? Gibt es Hinweise auf akute Frakturen oder eine chronische Schmerzsymptomatik, die

beispielsweise auf eine alte Wirbelkörperfraktur hinweisen?  
Medikamenteneinnahme?

## 2. Osteodensitometrie

Zur Beurteilung der Knochendichte wird die Osteodensitometrie in Form der Dual-energy-X-Ray absorptiometry (DEXA) herangezogen. Hierbei wird der Knochenmineralgehalt (BMD) als Flächendichte ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) an spezifischen Messorten der Lendenwirbelkörper 1 bis 4 und dem Femur gemessen. Die ermittelten Werte werden zur durchschnittlichen Knochendichte gesunder 30-jähriger Patienten (Z-Score) ins Verhältnis gesetzt und als Standardabweichung (T-Score) wiedergegeben. Dieser T-Score bildet die Grundlage für die Einteilung in die klinischen Stadien nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO). Ab einem T-Wert von  $<-2,5$  spricht man von einer Osteoporose, von einer klinisch manifesten Osteoporose bei dem zusätzlichen Vorliegen einer Fraktur. Der reine Verlust an Knochendichte bei einem T-Score von  $-1,0$  bis  $-2,5$  definiert lediglich eine Osteopenie (Tab. 1)

## 3. Bildgebung bei klinischem Hinweis auf eine Fraktur

*Röntgen: BWS/LWS in 2 Ebenen*

Hinweisend auf eine Wirbelkörperfraktur ist eine Höhenminderung des Wirbels (Vorder-, Hinter-, oder Mittelkante) um mehr als 20 %.

Jedoch sind frische Wirbelkörperfrakturen im Nativröntgen oft nicht eindeutig nachweisbar.

*Osteosonografie*

Die Sonografie an peripheren Knochen kann ein Hinweis auf eine verminderte Knochenmineraldichte und eine erhöhtes Frakturrisiko geben.

*CT und MRT*

Diese Verfahren sind wichtig bei der Frage nach dem Alter einer Fraktur, Stabilität der Fraktur oder auch dem Ausschluss einer pathologischen Fraktur. In der Basisdiagnostik haben diese Verfahren einen geringen Stellenwert.

## 4. Laborchemie

Zum Ausschluss differentialdiagnostisch in Frage kommender anderer Osteopathien, Risikofaktoren, Hinweis auf sekundäre Osteoporosen, Hormonstatus Bsp. Serumkalzium, Serumphosphat, AP, Gamma-GT, Blutbild, BSG/CRP, TSH 25-Hydroxyvitamin D3, Testosteron bei Männern fakultativ, Knochenumbau-Marker als Einzelfallentscheidung etc.

Klinisches Stadium	T-Score DEXA-Messung
Normalbefund	$> -1,0$
Osteopenie	$-1,0$ bis $-2,5$
Osteoporose	$\leq -2,5$
Manifeste Osteoporose	$\leq -2,5$ + $\geq 1$ Fraktur

**Tabelle 1: Einteilung der Osteoporose anhand des osteodensitometrischen Befundes**

Die in der Dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) ermittelten Knochenmineralgehalt (BMD) werden zu den durchschnittlichen Knochendichte gesunder 30-jähriger Patienten (Z-Score) ins Verhältnis gesetzt und als Standardabweichung (T-Score) wiedergegeben. Der T-Score bildet die Grundlage für die Einteilung in die klinischen Stadien nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO).

### 1.2.3 Therapie der Osteoporose

Eine Therapie der Osteoporose ist indiziert bei einer niedrigtraumatischen singulären Wirbelkörperfraktur oder multiplen Osteoporose-bedingten Wirbelkörperfrakturen. Bei Frakturen des Femurs, des Radius oder der Lendenwirbelsäule ist eine Therapie ab einem T-Score  $> -2$  oder ab einem isolierten T-Score  $< -2$  indiziert.

Bei einer ausgeprägten Klinik kann zur Therapieinitiierung auf die Knochendichtemessung verzichtet werden.

Besteht die Indikation für eine Therapie mit oralen Glukokortikoiden, für eine Dauer von mehr als drei Monaten mit einer Prednisolonäquivalent von 7,5 mg täglich, sollte eine Therapie ab einem T – Score  $< -1,5$  begonnen werden oder wenn bereits niedrig – traumatische Frakturen vorliegen oder anamnestisch bekannt sind. Zur medikamentösen Therapie werden entweder Antiresorptiva, welche den Knochenumbau und –abbau hemmen, oder Osteoanabolika, die die Osteoblasten stimulieren, eingesetzt. Zu den Antiresorptiva zählen Bisphosphonate, Raloxifen (ein selektiver Östrogen-Rezeptor-Antagonist), Calcitonin, Statine, Östrogene und Gestagene, Tibolon (gewebsspezifischer Regulator der Östrogenaktivität), Denosumab (Antikörper gegen RANKL), Inhibitoren gegen Cathepsin – K und Integrin und Osteoprotegerin. PTH, Teriparatid (rekombinantes Parathormon-Fragment), Fluoride und Anabolika (beispielsweise Testosteron) zählen zu den Osteoanabolika. Strontium – Ranelat hat Eigenschaften von beiden Gruppen.

Darüber hinaus sollte grundsätzlich die tägliche Zufuhr von mindestens 1000 mg Kalzium und 800 bis 1000 IE Vitamin D sichergestellt sein (DVO, Leitlinien Osteoporose 2017).

### 1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen menschenähnlichen osteoporotischen Knochenstatus im Großtiermodell zu induzieren, um ein reproduzierbares Grundlagenmodell zu etablieren. Die verschiedenen Induktionsansätze mittels Ovariectomie, defizitärer Diättherapie, einer Glukokortikoidbehandlung und Kombinationen dieser Behandlungen, sollten zu einer signifikanten Osteoporose und mit zu einer erhöhten sowie klinisch relevanten Knochenbrüchigkeit führen.

Um dieses Ziel zu erreichen, sollen die verschiedenen Behandlungsstrategien zur Induktion der Osteoporose gegeneinander abgewogen werden und in einem effizienten Zeitabschnitt erfolgen. Zudem sollte der Versuchsablauf optimiert werden, damit eine kostengünstige Reproduktion der Ergebnisse ermöglicht wird. Neben der Induktion der Osteoporose müssen auch die histomorphologischen Verfahren zur Auswertung etabliert und ebenso effizient durchgeführt werden, um ebenfalls den ökonomischen Aspekt zu sichern.

Die Hypothesen, welche aufgestellt wurden und in dieser Arbeit bestätigt oder widerlegt werden sollen, sind folgende:

- Die verschiedenen Induktionsverfahren führen in unterschiedlicher Intensität zu einem Verlust der Knochendichte.
- Die Induktionen führen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem Missverhältnis zwischen der Aktivität der Osteoklasten und Osteoblasten zu Gunsten der knochenabbauenden Osteoklasten.
- Die Induktion der Osteoporose durch die verschiedenen Maßnahmen ist bereits rein morphologisch durch einen Verlust der Trabekelstruktur und –dicke erkennbar.

Durch die experimentellen Auswertungen soll ein Protokoll zur Induktion eines menschenähnlichen osteoporotischen Knochenstatus im Großtiermodell entwickelt werden, welches kostengünstig, gesichert und mit minimalen subjektiven Fehlern reproduzierbar ist. Die Auswertungen sollen optimiert und standardisiert werden.

Durch die Ergebnisse dieser Studie könnte ein geeignetes Großtiermodell etabliert werden, damit in noch folgenden Projekten neue Therapien für die Osteoporose als auch deren Folgen, wie beispielsweise Frakturen gefunden werden können, welche im stabilitätsgeschwächten Knochen besser verankert werden können. Die gewonnenen Erkenntnisse können ebenso genutzt werden, um systemische oder lokale Pharmazeutika um prophylaktische oder therapeutische Behandlungen in Zukunft einsetzen zu können.

## 2 Material und Methoden

Die experimentelle Studie, die im Rahmen des T1-Projektes des Sonderforschungsbereich/Transregio 79 durchgeführt wurde, wurde konform des §8b Absatz 3 Nr.3 durch das Veterinärdezernat (Schanzenfeldstraße 8, 35578 Wetzlar) des Regierungspräsidiums Darmstadt am 27. September 2012 genehmigt (GE: F21/36). Der Antrag wurde laut §8 Absatz 2 des Tierschutzgesetzes gestellt.

Die Tierhaltung, die Operationen, die DEXA-Messungen und die Euthanasie der Tiere erfolgten in der Zentralen Forschungseinrichtung der Goethe Universität Frankfurt, Frankfurt am Main (Theodor – Stern – Kai 7, 60590 Frankfurt am Main, Deutschland).

### 2.1. Versuchstiere

Für die Studie wurden 31 weibliche hessische Merinolandschafe randomisiert und eine Kontrollgruppe sowie drei Versuchsgruppen eingeteilt (Tab. 2), die jeweils ein durchschnittliches Alter von 5,5 Jahren aufwiesen.

Gruppe	Behandlung	Gruppengröße (n)
K	Kontrolle (K)	n=8
OVX	Ovariectomie (OVX)	n=7
OD	Ovariectomie und Diät (OD)	n=8
ODS	Ovariectomie, Diät und Steroidbehandlung (ODS)	n=8

**Tabelle 2: Einteilung und Gruppengröße der Versuchsgruppen**

*Die 31 Versuchstiere wurden in die vier Gruppen K, OVX, OD und ODS eingeteilt, sodass ein Durchschnittsalter von 5,5 Jahren in jeder Gruppe vorlag.*

Die drei experimentellen Gruppen OVX, OD und ODS wurden zu Beginn (M = Monat, TP = 0M) bilateral ovariectomiert. Die beiden Gruppen OD und ODS erhielten zudem eine multidefizitäre Diät über den gesamten Verlauf und die ODS Gruppe zusätzlich eine Behandlung mit Glukokortikoiden. Sowohl die Diät als auch die Glukokortikoidgabe begann zwei Wochen postoperativ nach Abschluss der Wundheilung der Operationswunden.

Die Tiere der Gruppen K und OVX wurden zwischen den einzelnen Zeitpunkten 0M, 3M und 8M auf den Weiden der Zentralen Forschungseinrichtung Frankfurt gehalten und wurden mit einer Standarddiät versorgt.

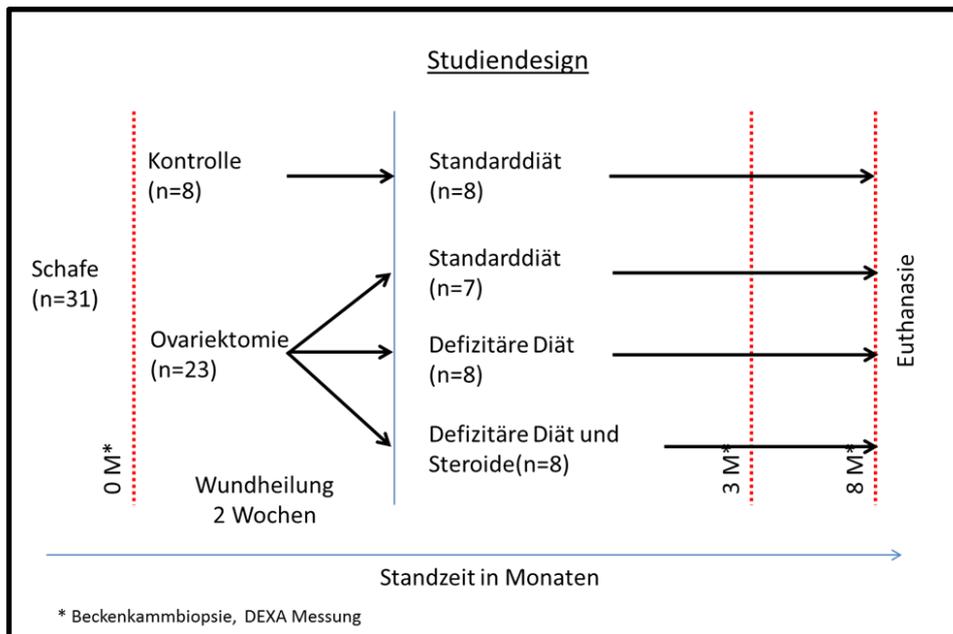
Die beiden Gruppen OD und ODS, bei denen die Ernährung kontrolliert werden musste, wurden über den gesamten Versuchszeitraum in den Ställen der zentralen Forschungseinrichtung Frankfurt gehalten. Zudem diente die Haltung zum Schutz vor Sonneneinstrahlung, um die Vitamin-D<sub>3</sub>-Eigenproduktion der Schafe zu minimieren.

## 2.2 Studiendesign

Die Gesamtdauer des Versuchs betrug insgesamt acht Monate von Anfang Oktober 2012 bis Anfang Juni 2013. Als Ausgangspunkt der gesamten Versuchsreihe gilt der Zeitpunkt der ersten Operation bzw. DEXA-Messung (TP = 0 M, Abb. 9). Zu diesem Zeitpunkt erfolgte bei allen vier Versuchsgruppen die erste DEXA-Messung und die Beckenkammbiopsie des linken Beckenkamms, in den Gruppen OVX, OD und ODS erfolgte die operative Ovariectomie. Nach Durchführung der Operation und einem Erholungszeitraum von zwei Wochen bekamen die Tiere je nach Gruppenzugehörigkeit eine defizitäre Diät oder eine Standarddiät (Normalfutter), die Gruppe ODS wurde zusätzlich einer Behandlung mit Glukokortikoiden unterzogen.

Die Gruppen K und OVX durften auf der Weide im Freien grasen, während die Gruppen OD und ODS strikt im Stall gehalten wurden.

Nach einer Standzeit von drei Monaten erfolgten die ersten Kontrollmessungen (TP = 3 M, Abb. 9) durch DEXA und die erneute Entnahme von Beckenkammbiopsien. Acht Monate nach Beginn erfolgte die dritte Messung der Knochendichte, die wiederholte Biopsie der Beckenkämme und die Euthanasie der Tiere (TP = 8M, Abb. 9). Die Beckenkammbiopsien wurden nach jeder Operation direkt aufgearbeitet und mit Hilfe der Enzymhistochemie und der Immunhistochemie bezüglich der Unterschiede der Osteoblasten – und Osteoklastenaktivität sowie der Trabekelarchitektur untersucht.



### Abbildung 9: Studiendesign

Die Versuchsdauer betrug insgesamt acht Monate. Die Untersuchungszeitpunkte waren zu Beginn (TP = 0M), nach drei Monaten (TP = 3M) und zum Zeitpunkt der Euthanasie (TP = 8M). Es wurde eine Kontrollgruppe, sowie drei experimentellen Gruppen unterschieden. Diese drei Gruppen OVX, OD und ODS wurden zu Beginn bilateral ovariectomiert. Die beiden Gruppen OD und ODS erhielten zudem eine multidefizitäre Diät über den gesamten Verlauf und die ODS Gruppe zusätzlich eine Induktion mit Glukokortikoiden. Sowohl die Diät als auch die Glukokortikoidtherapie begann zwei Wochen nach der Wundheilung.

## 2.3 Versuchsdurchführung

### 2.3.1 DEXA–Messungen und Gewichtskontrolle

Die Dual–energy–X–Ray absorptiometry (DEXA) nimmt als bildgebendes, radiologisches Verfahren einen wichtigen Stellenwert bei der Erhebung des Knochenstatus ein. Das Verfahren nutzt die unterschiedliche, gewebeabhängige Resorption von Röntgenstrahlen verschiedenerer Wellenlängen. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte von verschiedenen Gewebearten zeigen Röntgenstrahlen beim Durchtritt dieser Gewebearten charakteristische Abschwächungen, wodurch eine entsprechende Software eine Aussage bezüglich des bestrahlten Gewebes und seiner Eigenschaften treffen bzw. berechnen kann. Dabei wird ein zweidimensionales Bild erstellt, bei dem die verschiedenen Messwerte als Flächendichte ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) dargestellt werden.

Die Schafe aller vier Gruppen wurden zu Beginn zunächst mittels einer intramuskulären Injektion in die Hinterläufe bestehend aus 5 ml/Schaf Ketavet® 10 mg/ml (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid, ca. 10 mg/kg i.m., Bela- Pharm GmbH und Co.KG, Vechta),

0,5 ml Rompun® 2 % (Wirkstoff: Xylazin, ca. 0,01 ml/kg, Hersteller: Bayer AG, Leverkusen), 3,0 ml Midazolam Rotexmedica 5 mg/ml (Wirkstoff: Midazolam, ca. 0,3 mg/kg, Hersteller: ROTEXMEDICA GmbH, Trittau) und 1 ml Atropinsulfat B. Braun 0,5 mg/ml (Wirkstoff: Atropinsulfat, ca. 0,01- 0,02 mg/kg, B. Braun Mesungen AG, Melsungen) sediert, um sie zu wiegen, und die DEXA-Messungen zu ermöglichen, da für die Gewinnung scharfer Bilder eine kurzzeitige Immobilisation notwendig war. Die DEXA-Messungen wurden jeweils vor Beginn der Operationen (Gruppen OVX, OD, ODS) bzw. als alleinstehende Untersuchung (Kontrollgruppe) an den sedierten Versuchstieren durchgeführt (Abb. 10). Die Versuchstiere wurden auf dem Bauch liegend, alle Extremitäten von sich streckend, mit dem Kopf nach vorne, auf dem Gerät positioniert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Wirbelsäule des untersuchten Tieres möglichst gerade am Laserkreuz des DEXA Gerätes orientiert lag. Anschließend erfolgte ein Ganzkörperscan durch das DEXA Gerät (Lunar Prodigy®, GE Healthcare, Deutschland) und die erhobenen Daten mit der entsprechenden enCORE Software (GE Healthcare, v. 13.40) analysiert. Der Messvorgang wurde im Großtiermodus mit einer durchschnittlichen Dauer von 10 - 15 Minuten pro Versuchstier durchgeführt. Vor jeder Messung wurden fachgerecht eine Kalibrierung und ein Selbstcheck (Qualitätssicherung) durchgeführt. Die Software berechnet folgende Messwerte:

- Knochendichte als bone mineral density (BMD) in  $\text{g}/\text{cm}^2$
- Knochenmineralgehalt als bone mineral content (BMC) in g
- Körperfettanteil in %



**Abbildung 10: Durchführung der DEXA-Messung**

*In der Kontrollgruppe wurde die DEXA-Messung unter Sedierung, als alleinige Untersuchung an den Versuchszeitpunkten, durchgeführt. Bei den Gruppen OVX, OD und ODS wurden sie vor Beginn der Operationen an den bereits sedierten Tieren durchgeführt.*

### 2.3.2 Operationen

#### *Präoperative Vorbereitung*

Zum Zeitpunkt 0M wurden für die Beckenkammstanzen der linke Beckenkamm gewählt, zum Zeitpunkt 3M der rechte Beckenkamm und zum Zeitpunkt 8M wiederum der linke Beckenkamm. Das Operationsgebiet wurde zunächst geschoren und dann mittels Pilca Enthaarungscreme (GlaxoSmithKline Consumer Healthcare GmbH & Co. KG Bühl, Deutschland) komplett enthaart. Bei den Schafen der Gruppe OVX, OD und ODS wurden zum Zeitpunkt 0M zusätzlich das ventrale Abdomen für die Ovariectomie geschoren und enthaart. Die enthaarten Stellen wurden danach mit Sterillium (BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland) gesäubert.

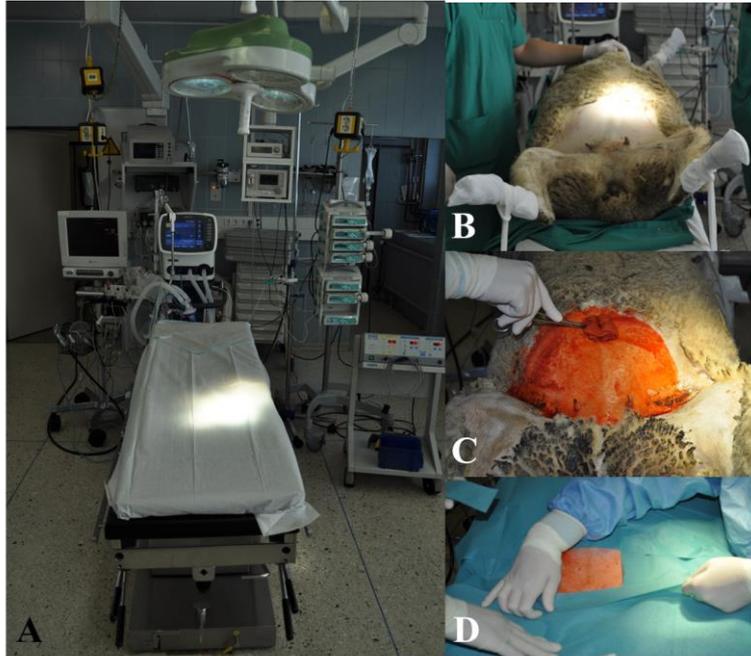
Jedes Tier erhielt vor den Eingriffen eine antibiotische Prophylaxe mit 4 ml Veracin® RS (Wirkstoffe: Dihydrostreptomycinsulfat, Benzylpenicillin- Procain, Benzylpenicillin-Benzathin, 0,1 ml/kg, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) sowie eine Analgesie von 1 ml TEMGESIC® Ampullen 0,3 mg (Wirkstoff: Buprenorphinhydrochlorid, ca. 0,01 mg/kg, RB Pharmaceuticals GmbH, Mannheim, Deutschland) subkutan.

#### *Narkose*

Bei der Narkose handelte es sich um eine Intubationsnarkose. Zunächst wurde jedem Tier ein intravenöser Zugang in einen der Vorderläufe gelegt. Die Einleitung erfolgte dann mit 4 ml Propofol 2 % (20 mg/1ml) MCT Fresenius (Wirkstoff: Propofol, 2 mg/kg i.v., Hersteller: Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) und 2 ml Fentanylhameln 50 µg/ml intravenös (Wirkstoff: Fentanyl, 2 µg/kg i.v., hameln pharmaceuticals GmbH, Hameln, Deutschland). Nach eingetretener Muskelrelaxation wurden die Tiere intubiert. Die Narkose wurde mittels Dauerperfusor mit einer Laufrate von ca. 0,3 ml/kg/min Propofol aufrechterhalten. Bei Bedarf erhielt ein Tier eine Pansensonde.

#### *Ovarektomie*

Zum Zeitpunkt 0M wurden die Schafe der Gruppen OVX, OD und ODS zunächst bilateral ovariectomiert. Zu diesem Zweck erfolgte die Lagerung der Tiere in Rückenlage und fixierten Gliedmaßen durch Mullbinden. Das Abdomen wurde zunächst mit Braunol® (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) abgewaschen und anschließend steril abgedeckt (Abb. 11).

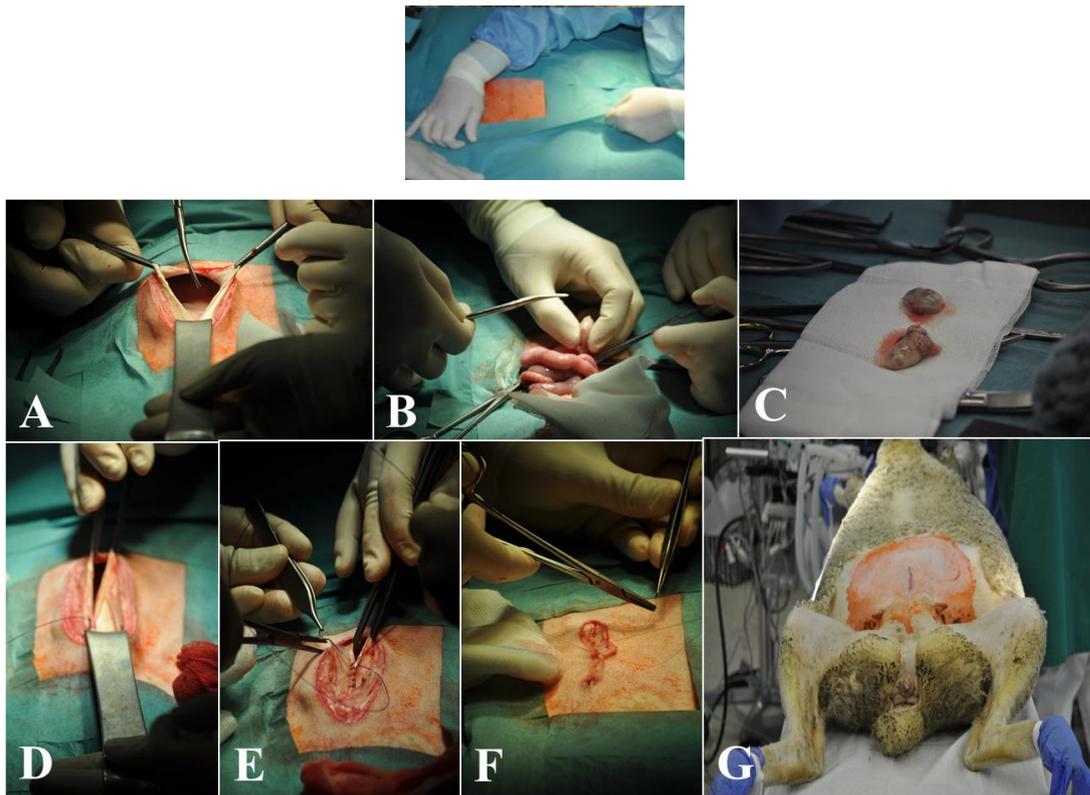


### **Abbildung 11: Präoperative Vorbereitung zur Ovariectomie**

*Die Operationen wurden im Operationssaal (A) der Zentralen Forschungseinrichtung der Goethe Universität Frankfurt, Frankfurt am Main (Theodor – Stern – Kai 7, 60590 Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt. Für die Ovariectomie wurden die Versuchstiere in Rückenlage gelagert (B), das ventrale Abdomen geschoren und gemäß dem Operationsstandard steril abgewaschen (C) und steril abgedeckt (D).*

Durch einen circa 15cm Schnitt ventro–medial kranial des Euters erfolgte der Zugang und zunächst wurde die Linea alba dargestellt. Diese wurde durch eine Stichinzision eröffnet und danach das Peritoneum eröffnet. Des Weiteren wurden der Uterus und die Ovarien dargestellt sowie mobilisiert, anschließend wurden die Ovarien mittels eines resorbierbaren 3-5 Vicryl Ethicon Nahtmaterial (johnson und johnson St-stevens, Woluwe, Belgien) ligiert. Daraufhin wurden die Ovargefäße ligiert und die Ovarien abgesetzt. Der Uterus wurde wieder zurück verlagert und der Operationsitus auf Blutungen untersucht.

Anschließend wurde das Peritoneum verschlossen, die Muskulatur adaptiert und die Haut mittels einer intrakutanen Naht genäht (Abb. 12).



### Abbildung 12: Ablauf der Ovariektomie

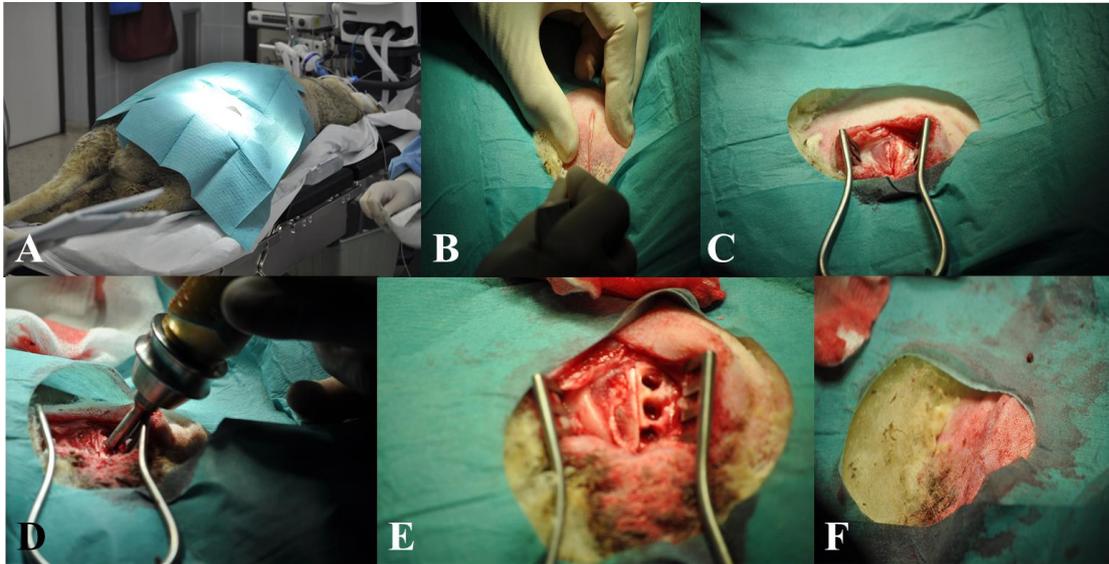
Die Eröffnung des Abdomens erfolgte durch eine mediane Unterbauchlaparotomie und schichtweiser Präparation der Abdominalwand bis hin zu Eröffnung des Peritoneums (A). Nach Präparation des inneren Genitals wurden die Ovarien vor die Bauchwand luxiert (B) und mittels Umstechungsligatur abgesetzt. Abbildung C zeigt die resezierten Ovarien. Nach der Reposition der Organe nach intraabdominell erfolgte der schichtweise Wundverschluss (D + E), die Hautnaht erfolgte mit resorbierbarem Nahtmaterial intrakutan (F) und die Operation beendet (G).

### Beckenkammbiopsien

Die Beckenkammbiopsie erfolgte zum Zeitpunkt 0M bei allen Schafen in Rechtsseitenlage und wurde am linken Beckenkamm vorgenommen. Hierfür wurden die Schafe der Gruppe K direkt in Linksseitenlage gelagert und die Schafe der Gruppen OVX, OD und ODS aus der Rückenlage umgelagert.

Am Zeitpunkt 3M erfolgte die Biopsie am rechten Beckenkamm und zum Zeitpunkt 8M wiederum aus dem linken Beckenkamm, die Lagerung erfolgte dementsprechend auf der linken bzw. rechten Seite. Das Operationsgebiet wurde mit Braunol® (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) abgewaschen und steril abgedeckt. Es erfolgte eine Hautinzision mit dem Skalpell und dann die Präparation des Beckenkamms. Die Biopsien (Abb. 14) wurden mit Hilfe einer Hohlfräse (Durchmesser: 7,5 mm Länge: 20 mm) gewonnen (Abb. 13). Danach wurde die Wunde mit einer Subkutan- und einer

darauffolgenden Intrakutannaht verschlossen und die Wunde mit Sprühpflaster versiegelt.



#### Abbildung 13: Ablauf der Beckenkammbiopsien

Die Tiere wurden in Seitenlage gelagert, der Beckenkamm geschoren sowie enthaart und anschließend steril abgewaschen und abgedeckt (A). Nach erfolgtem Hautschnitt (B) wurde der Beckenkamm freigelegt (C) und mittels einer Hohlfräse die Beckenkammbiopsien gewonnen (D). Abbildung E zeigt den Zustand des Beckenkamms nach erfolgter Biopsieentnahme. Nach schichtweisem Wundverschluss wurde die Haut mittels resorbierbarer Intrakutannaht verschlossen (F).

≈ 20 mm



#### Abbildung 14: Knochenzylinder nach der Beckenkammbiopsie

Die Beckenkammbiopsien wurden mit Hilfe einer Diameterhohlfräse (Durchmesser: 7,5 mm Länge: 20 mm) gewonnen und wiesen eine Länge von circa 20 mm auf.

#### Postoperative Versorgung

Die Schafe wurden bis zur Stabilisierung der Spontanatmung im Operationssaal überwacht und danach unter Aufsicht in Einzelboxen bis zum Erlangen des vollständigen Bewusstseins gebracht. Nach den abschließenden tierärztlichen Untersuchungen wurden sie wieder in ihre gewohnte Umgebung gelassen, die Gruppen K und OVX auf die Weide und die Gruppen OD und ODS in ihre Gemeinschaftsboxen. Die postoperative Wundkontrolle und Analgesie wurde durch die Tierärzte und -pfleger der Zentralen Forschungseinrichtung Frankfurt durchgeführt. Die peri- und postoperative Analgesie

erfolgte zunächst mittels zweimal täglicher Gabe von TEMGESIC® Ampullen 0,3 mg mit jeweils 1 ml (Wirkstoff: Buprenorphinhydrochlorid, ca. 0,01 mg/kg subkutan, RB Pharmaceuticals GmbH, Mannheim, Deutschland) sowie einer einmaligen Gabe von 1,5 ml Metacam® 20 mg/ml ad. us. vet. (Wirkstoff: Meloxicam, 0,5 mg/kg i.m., Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim/Rhein, Deutschland). Die Analgesie wurde durch die Tierärzte dem Bedarf angepasst und kontinuierlich reduziert, bis kein Bedarf mehr bestand. Die antibiotische Prophylaxe erfolgte in den ersten fünf postoperativen Tagen einmal alle 48 Stunden. Diese erfolgte durch die intramuskuläre Injektion des Antibiotikums Veracin® RS (Wirkstoffe: Dihydrostreptomycinsulfat, Benzylpenicillin- Procain, Benzylpenicillin- Benzathin, 0,1 ml/kg, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland)

### *Euthanasie*

Nach acht Monaten Standzeit wurden alle Tiere nach der letzten Beckenkambiospie schmerzlos euthanasiert. Die Tiere wurden zu diesem Zweck nicht mehr aus der Narkose erweckt und durch eine hohe Dosis Propofol und Fentanyl euthanasiert.

### 2.3.3 Diättherapie

Die Tiere der Gruppe K (n=8) und OVX (n=7), somit insgesamt 15 Tiere, erhielten eine Standarddiät (sniff Spezialdiäten GmbH), die auf kleine Wiederkäuer abgestimmt ist und durften auf der außenliegenden Wiese unbegrenzt fressen (Tab. 3).

<b>Analytische Bestandteile</b>	<b>Anteil (in %)</b>	<b>Ernährungsphysiologische Zusatzstoffe</b>	<b>Anteile</b>
Rohprotein	18,0	E672 Vitamin A	12.000 IE
Rohfett	3,8	E671 Vitamin D3	1.100 IE
Rohfaser	12,8	Vitamin E	105 mg
Rohasche	8,2		
Stärke	19,4	E4 Kupfer	15 mg
Zucker	4,6		
Kalzium	1,10		
Phosphor	0,55		
N freie Extraktstoffe	47,2		

**Tabelle 3: Zusammensetzung der Standarddiät der Gruppen K und OVX**

*Die Gruppen K und OVX wurden mit einer kalzium- und Vitamin-D<sub>3</sub>-haltigen Standarddiät gefüttert.*

Für die Tiere der Gruppen OD (n=8) und ODS (n=8) wurde von der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland, Futter (S6189-S010 Sondermischung) eine defizitäre Diät zubereitet. Die Diät bestand aus Kalzium- und Vitamin-D<sub>3</sub>-reduzierten Spezialfutter (Tab. 4). Die Schafe erhielten 1 kg pro kg Körpergewicht (KG) des Spezialfutters und zudem 200-300 g Weizenstroh, sodass die Kalziumaufnahme kontrolliert werden konnte. Insgesamt wurden 16 Tiere mit dieser Spezialdiät für den gesamten Versuchszeitraum versorgt. Um die Vitamin-D<sub>3</sub>-Bildung durch Sonnenlicht und die Kalziumaufnahme genauer kontrollieren zu können, wurden die Tiere der OD und ODS Gruppe strikt im Stall gehalten.

Analytische Bestandteile	Anteil (in %)	Ernährungsphysiologische Zusatzstoffe	Anteile
Rohproteine	14,70	E672 Vitamin A	12.000 IE /kg
Rohöle u. – fette	4,90	E671 Vitamin D <sub>3</sub>	-
Rohfaser	11,80	Vitamin E	85 mg/kg
Rohasche	5,30	Vitamin K <sub>3</sub>	7mg/kg
Stärke	28,00	E4 Kupfer	4mg/kg
Zucker	3,10		
Kalzium	0,16		
Phosphor	0,76		

**Tabelle 4: Zusammensetzung der defizitären Diät der Gruppen OD und ODS**

*Die Gruppen OD und ODS wurden mit einer kalziumarmen und Vitamin-D<sub>3</sub>-freien Diät gefüttert.*

### 2.3.4 Glukokortikoidtherapie

Den Schafen der Gruppe ODS (n=8) wurden durch Tierpfleger der Zentralen Forschungseinrichtung Frankfurt ab zwei Wochen postoperativ nach der Ovariectomie bis zur Euthanasie TP=8M eine Methylprednisoloninjektion intramuskuläre verabreicht (Depot- Medrate® ad us. Vet. 40 mg/ml Injektionssuspension für Hunde und Katzen, Methylprednisolonacetat 40,0 mg, Pfizer, Berlin, Deutschland). Diesen acht Tieren wurde jeweils im Abstand von 14 Tagen bis zur Euthanasie eine intramuskuläre Injektion von 320 mg Methylprednisolon pro Schaf verabreicht. Die Gaben erfolgten abwechselnd in

die Vorder- und Hintergliedmaßen. Das Ziel dieser Applikation ist es, ein Knochenstatus zu induzieren, der dem Knochenstatus bei einer Glukokortikoid-induzierten Osteoporose beim Menschen entspricht.

## 2.4 Probenbearbeitung

### 2.4.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Probenverarbeitung erfolgte im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Justus – Liebig – Universität Gießen, Kerkraderstraße 9, 35394 Gießen. Nachdem die Beckenkammbiopsien gewonnen wurden, wurden diese zunächst für 48 Stunden in 4 % PFA (Paraformaldehyd) im Kühlschrank bei 4°C fixiert. Anschließend wurden sie sechs Mal mit 0,1 Natriumphosphatpuffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  sauer/  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$  alkalisch, pH 7,2–7,4, Merck, Darmstadt, Deutschland) gespült und danach zur Entkalkung je nach Knochendicke 2-4 Wochen in 3,4 % Tris/10 % EDTA (Tris – Base sigma BioChemika, Titriplex III p.A., Merck, Darmstadt, Deutschland) gegeben.

Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben unter fließendem Leitungswasser gespült und nochmals für 24 Stunden in 0,1M Natriumphosphatpuffer gegeben. Im nächsten Schritt durchlaufen die Proben den Paraffin-Einbettungsautomat TP1050 (Leica TP1050, Leica Biosystem Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) (Tab. 5).

Nach Beendigung erfolgte die Einbettung in flüssigem Paraffin. Hierfür wurden die Proben in Metallschälchen mit flüssigem Paraffin übergossen und danach bei -20°C auf einer Kälteplatte zum Erstarren gebracht. Nun konnten die Proben mittels eines Rotationsmikrotoms (Mikrom HM355S Coolcutsystem, Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland) in 5 µm dicke Schnitte aufgeteilt werden. Um die Schnitte besser auf die Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufbringen zu können, wurden sie über eine Wasserrutsche in ein 44°C warmes Wasserbad überführt, wodurch diese sich entfalteten und einfacher weiterverarbeitet werden konnten.

Abschließend wurden die Objektträger über Nacht bei 37°C im Wärmeschränk getrocknet.

Medium	Dauer in Minuten	Temperatur
70 % Alkohol	120	Raumtemperatur
80 % Alkohol	150	Raumtemperatur
96 % Alkohol	120	Raumtemperatur
100 % Alkohol	180	Raumtemperatur
100 % Alkohol	180	Raumtemperatur
100 % Alkohol	180	Raumtemperatur
Xylol	60	Raumtemperatur
Xylol	45	Raumtemperatur
Xylol	45	Raumtemperatur
Paraffin	40	58°C
Paraffin	40	58°C
Paraffin	40	58°C

**Tabelle 5: Protokoll des Paraffin–Einbettautomaten TP 1050**

*Die Beckenkammstanzen wurden zunächst in 4 % PFA (Paraformaldehyd) im Kühlschrank fixiert. Nach sechsmaligem Spülen in 0,1 Natriumphosphatpuffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  sauer/  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$  alkalisch, pH 7,2 – 7,4, Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden sie nach Knochendicke 2-4 Wochen in 3,4 % Tris/10 % EDTA (Tris – Base sigma BioChemika, Titriplex III p.A., Merck, Darmstadt, Deutschland) entkalkt. Anschließend durchliefen die Proben den Paraffin-Einbettungsautomat TP1050 (Leica TP1050, LeicaBiosystem Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland). Zuletzt erfolgte die Einbettung in flüssigem Paraffin.*

## 2.4.2 Enzymhistochemie – Tartrat-resistente saure Phosphatase

Die Tartrat–resistente saure Phosphatase wird von den Osteoklasten in Abhängigkeit ihrer Aktivität synthetisiert, d.h. die Menge an TRAP korreliert mit der Aktivität der Osteoklasten (H. Rico, 1993).

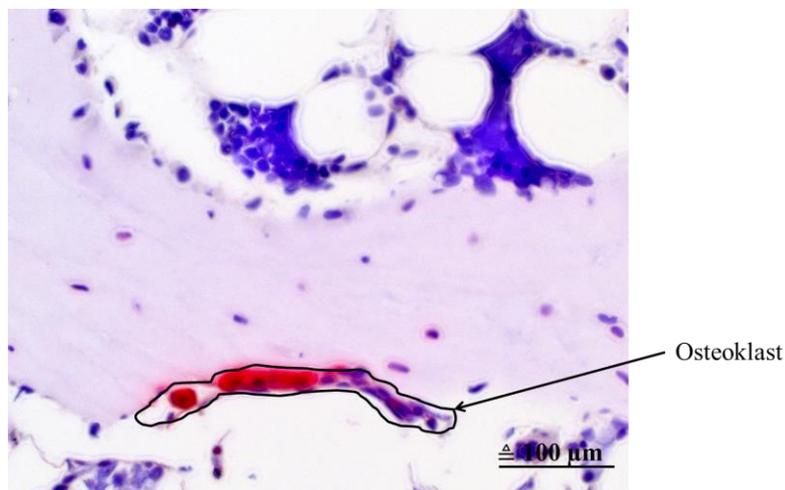
Um enzymhistochemisch die Tartrat-resistente saure Phosphatase der Osteoklasten und der Makrophagen nachweisen zu können, mussten die hergestellten Schnitte entparaffiniert werden. Dies geschah mittels Xylol (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) einer absteigenden Ethanolreihe (Stockmeier, Bielefeld, Deutschland) (100 %, 96 %, 80 %, 70 %) und anschließendem Spülen mit destilliertem Wasser. Danach wurden die Schnitte in 0,1M Natriumacetatpuffer (pH 5,2, Merck, Darmstadt, Deutschland) für 10 min vorinkubiert und anschließend in der Substratlösung

bei 37°C für 45 min inkubiert. Die Substratlösung wurde aus zwei Färbelösungen und Natriumacetatpuffer (pH 5,2) angemischt:

Färbelösung 1: 35 mg Naphthol – AS – TR – Phosphat (Sigma – Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) + 125 µl N-N-Dimethylformamid (Sigma – Aldrich, Taufkirchen, Deutschland).

Färbelösung 2: 57,5 mg di – Natriumtartrat – Dihydrid (Fa. Merck) + 35 mg Echtrotsalz (Fast Red TR Salt, Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Zum Anschluss der Färbung wurden die Schnitte gespült und mit Hämatoxylin (Instant Hämatoxylin, Shandon Inc, Pittsburgh, Großbritannien) gegengefärbt.

Nach erneuter Spülung wurden die Objektträger mit Kaisers Glyceringelantine (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt (Abb. 15).



#### Abbildung 15: TRAP – Färbung

*Die Tartrat-resistente saure Phosphatase wird von den Osteoklasten in Abhängigkeit ihrer Aktivität synthetisiert, d.h. die Menge an TRAP korreliert mit der Aktivität der Osteoklasten. Die roten Flächen entsprechen den durch die TRAP angefärbten Osteoklasten. Die Biopsie stammt von einem Tier der OD Gruppe zum Zeitpunkt 8M (Tier OD8). Die Gegenfärbung erfolgte mittels Hämatoxylin (Instant Hämatoxylin, Shandon Inc, Pittsburgh, Großbritannien).*

### 2.4.3 Immunhistochemie – Osteocalcin

Die Immunhistochemische Färbung des Osteocalcins der Osteoblasten erfolgte über zwei Tage. Zunächst wurden die Schnitte mittels Xylol (Carl Roth GmbH und Co, KG, Karlsruhe, Deutschland), Aceton und Waschpuffer (TBS 0,025 % TritonX – 100) entparaffiniert. Im nächsten Schritt werden die Proben bei 60°C in Citratpuffer (pH 6) eine Stunde inkubiert.

Der Citratpuffer wurde wie folgt hergestellt:

Lösung A: 0,1M Zitronensäure (2,1 g in 100 ml Aqua dest.)

Lösung B: 0,1M Trinatriumdihydrat (5,5 g in 200 ml Aqua dest.)

41 ml Lösung B auf ca. 400 ml Aqua dest -> mit Lösung A auf pH 6,0 einstellen und mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen.

Nach einer fünfminütigen Behandlung mit Wasserstoffperoxid (3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) wurde der erste Antikörper aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurde der zweiten Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, aufgetragen und in einer Dunkelkammer für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

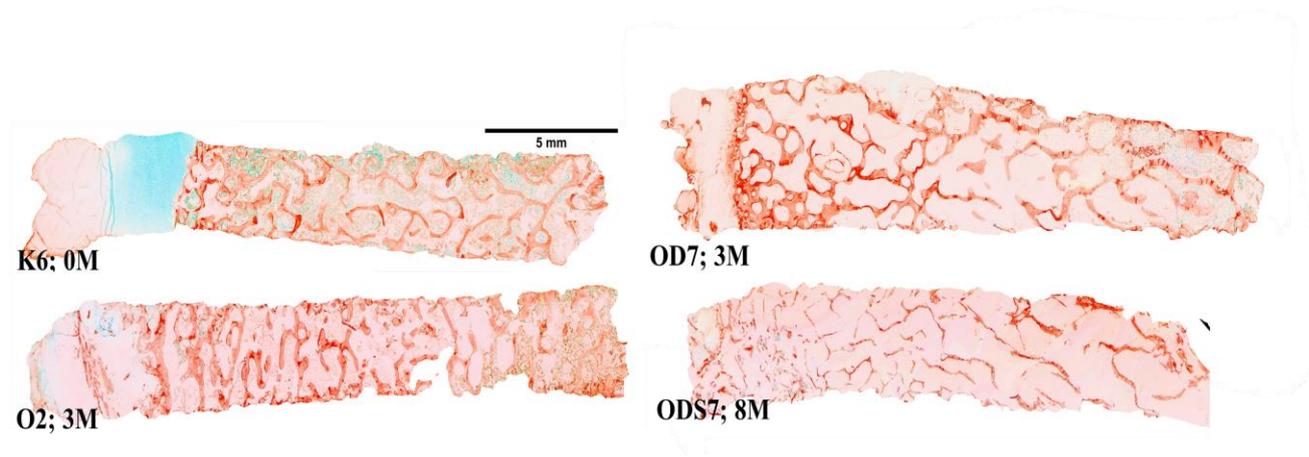
Antikörper 1: monoclonal anti-human osteocalcin antibody (R&D Systems, 19 Barton Lane, Abingdon, Großbritannien)

1:200 in Verdünnungspuffer (Dako Deutschland GmbH, Stresemannstrasse 161, 22769 Hamburg, Deutschland)

Antikörper 2: anti – mouse IgG

1:8 in Schafsserum (1 µl AK + 62,5 µl Schafsserum + 436,5 µl BSA)

Nach einem Spülgang wurde der ABC Komplex Vector (500 µl + 9 µl Reagenz A + 9 µl Reagenz B) hinzugegeben und wiederum für 30 min in der Dunkelkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Anfärbung des gebildeten Komplexes wurde nun der Nova Red Vector (5 ml Aqua inject. + 3 Tropfen Reagenz 1 + 2 Tropfen Reagenz 2 + 2 Tropfen Reagenz 3 + 2 Tropfen Hydroperoxidase; Vector Laboratories Inc., 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010, U.S.A.) hinzugegeben, bis eine deutliche Rotfärbung zu beobachten war (max. 15 min.). Anschließend werden die Objektträger gespült und mit Methylgrün für drei bis fünf Sekunden behandelt. Zum Eindeckeln werden die Objektträger zunächst in eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 %, Stockmeier, Bielefeld, Deutschland) gegeben und mit DePex (VWR) eingedeckelt (Abb. 16).



**Abbildung 16: Übersichtsaufnahmen der Osteocalcinfärbungen**

Die roten Flächen entsprechen dem Osteocalcin, welches in Abhängigkeit der Aktivität von den Osteoblasten synthetisiert wird. Dargestellt ist ein Tier der Kontrollgruppe (K6) nach 0 Monaten (0M), ein Tier der Ovariectomiegruppe (O2) und ein Tier der Ovariectomie-Diättherapie-Gruppe (OD7) nach drei Monaten (3M) und ein Tier der Ovariectomie-Diättherapie-Steroid-Gruppe (ODS7) nach acht Monaten (8M).

#### 2.4.4 Toluidinblau O

Für die Färbung mit Toluidinblau O müssen die Schnitte zunächst entparaffiniert werden. Dies wurde mittels Xylol (Roth), einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 %; Stockmeier, Bielefeld, Deutschland) und anschließenden Spülen mit destilliertem Wasser durchgeführt. Danach wurden die Schnitte in für 10 Sekunden bis 1 Minute in die Färbelösung, die im Verhältnis 1:1 mit doppelt destilliertem Wasser (Bidest) verdünnt wurde, gegeben.

Die Färbelösungen wurden wie folgt hergestellt:

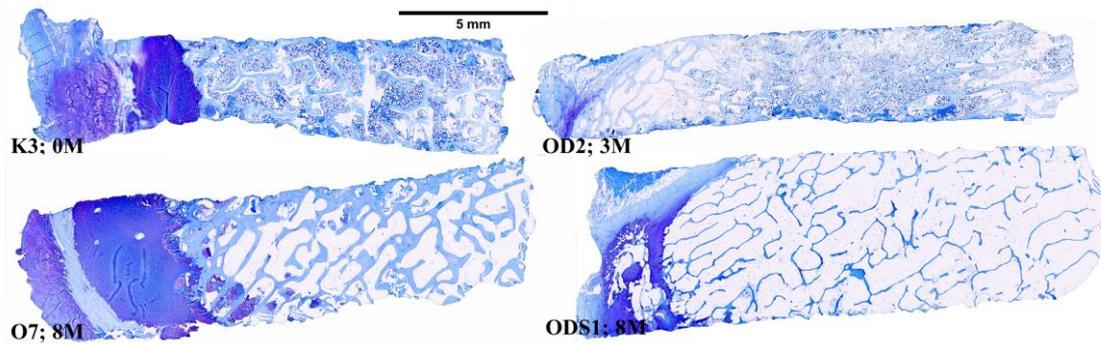
Toluidinblau O – Pyronin G nach Prof. Donath:

Lösung A: 8 g Natrium – Tetraborat (Merck, Darmstadt, Deutschland) + 8 g Toluidinblau O (Chroma) + 800 ml Aqua dest; 15 min auf den Magnetrührer geben

Lösung B: 2 g Pyronin G (Merck, Darmstadt, Deutschland) + 200 ml Aqua dest; 15 min auf den Magnetrührer geben

Lösung A und Lösung B zusammengeben und 15 min auf den Magnetrührer geben und anschließend zweimal filtrieren

Nach der Färbung werden die Präparate in eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 %; Stockmeier, Bielefeld, Deutschland) gegeben und mit DePex (VWR) eingedeckt (Abb. 17).



### Abbildung 17: Übersichtsaufnahmen mit Toluidinblau O

Mittels der Toluidinblau O Färbung wird die Trabekelqualität, die Vernetzung der Trabekel sowie die Mineralisation der Knochenmatrix analysiert. Dargestellt ist ein Tier der Kontrollgruppe (K3) nach null Monaten (0M), ein Tier der Ovariectomiegruppe (O7) und ein Tier der Ovariectomie – Diättherapie – Gruppe (OD2) nach drei Monaten (3M) und nach acht Monaten (8M) ein Tier aus der Ovariectomie–Diättherapie–Steroid–Gruppe (ODS1).

## 2.5 Auswertungen

Die jeweiligen Präparate wurden mittels des Mikroskops Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland), das mit der Kamera DC500 (Leica, Wetzlar, Deutschland) verbunden ist, fotografiert und digitalisiert. Dies erfolgte im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Justus – Liebig – Universität Gießen, Kerkraderstraße 9, 35394 Gießen. Für die nachfolgenden Bearbeitungen wurde die Software Adobe Photoshop CS3 und ImageJ–Win64 verwendet. Die Flächen- und Längenberechnung durch ImageJ erfolgte in Pixel und es folgte die Umrechnungen in Mikrometer bzw. Quadratmikrometer (Tab. 6).

Vergrößerung Mikroskop	Länge (Pixel/ $\mu\text{m}$ )	Fläche (Pixel/ $\mu\text{m}^2$ )
2,5fach	0,25	0,0625
5fach	0,5	0,25
10fach	1	1
20fach	2	4
40fach	3,8	14,44
100fach	9,5	90,25

### Tabelle 6: Die Umrechnungstabelle von den ermittelten Pixelwerten zu Mikrometer

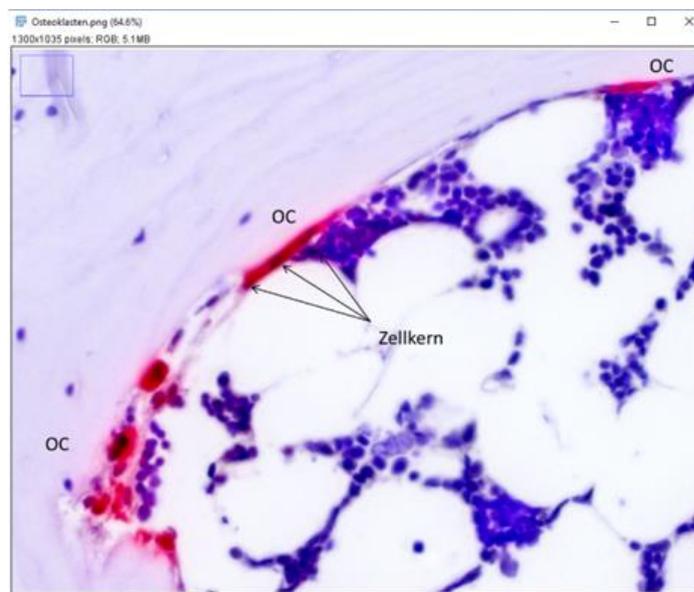
Nach der Ermittlung der Flächen- und Längenmaße in Pixel durch ImageJ erfolgte anhand der gezeigten Umrechnungstabelle die Berechnung der Mikrometer– bzw. Quadratmikrometer.

### 2.5.1 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)

Die gefärbten Präparate wurden in vierzigfacher Vergrößerung mit dem Lichtmikroskop fotografiert. Hierfür wurde ein repräsentativer Ausschnitt des jeweiligen Präparates gewählt und jeweils 18–20 zusammenhängende Bilder gemacht.

Die rot gefärbten Flächen, die der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase entsprechen, wurden aufgrund folgender Kriterien als Osteoklasten eingestuft:

1. direktes Anliegen auf einer Knochenfläche
2. mindestens drei Zellkerne



#### Abbildung 18: Osteoklasten - Identifizierungskriterien

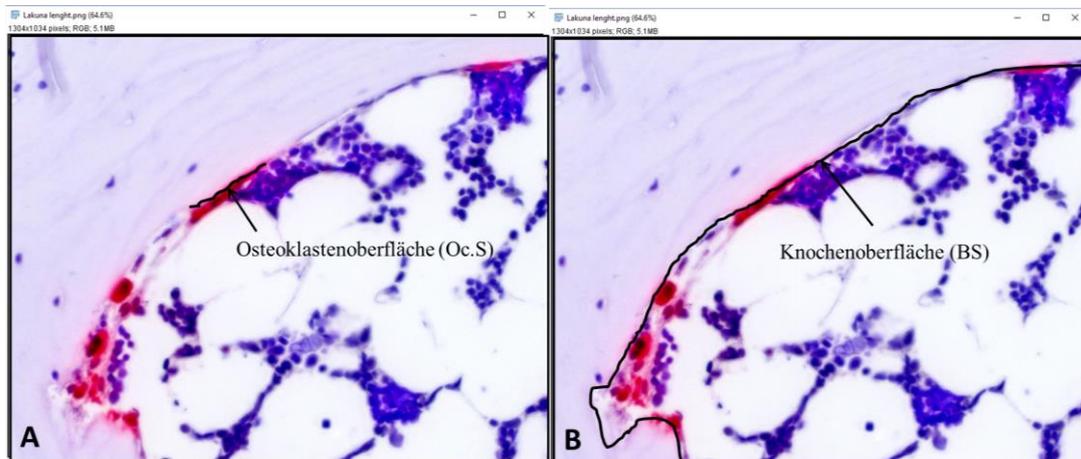
*Die roten Flächen entsprechen der angefärbten Tartrat-resistenten sauren Phosphatase. Weiter musste ein Osteoklast (OC), um als solcher gewertet zu werden, direkt der Knochenoberfläche anliegen und mindestens drei Zellkerne aufweisen.*

Die Osteoklasten wurden anhand der o.g. Kriterien klassifiziert und bearbeitet (Tier OD8 zum Zeitpunkt 8 M) (Abb. 18).

Die Flächen, die den Kriterien entsprachen, wurden mittels ImageJ bemessen. Zudem wurde die Lakuna length eingezeichnet und bemessen, hierbei handelt es sich um die Auflagefläche eines Osteoklasten auf dem Knochen.

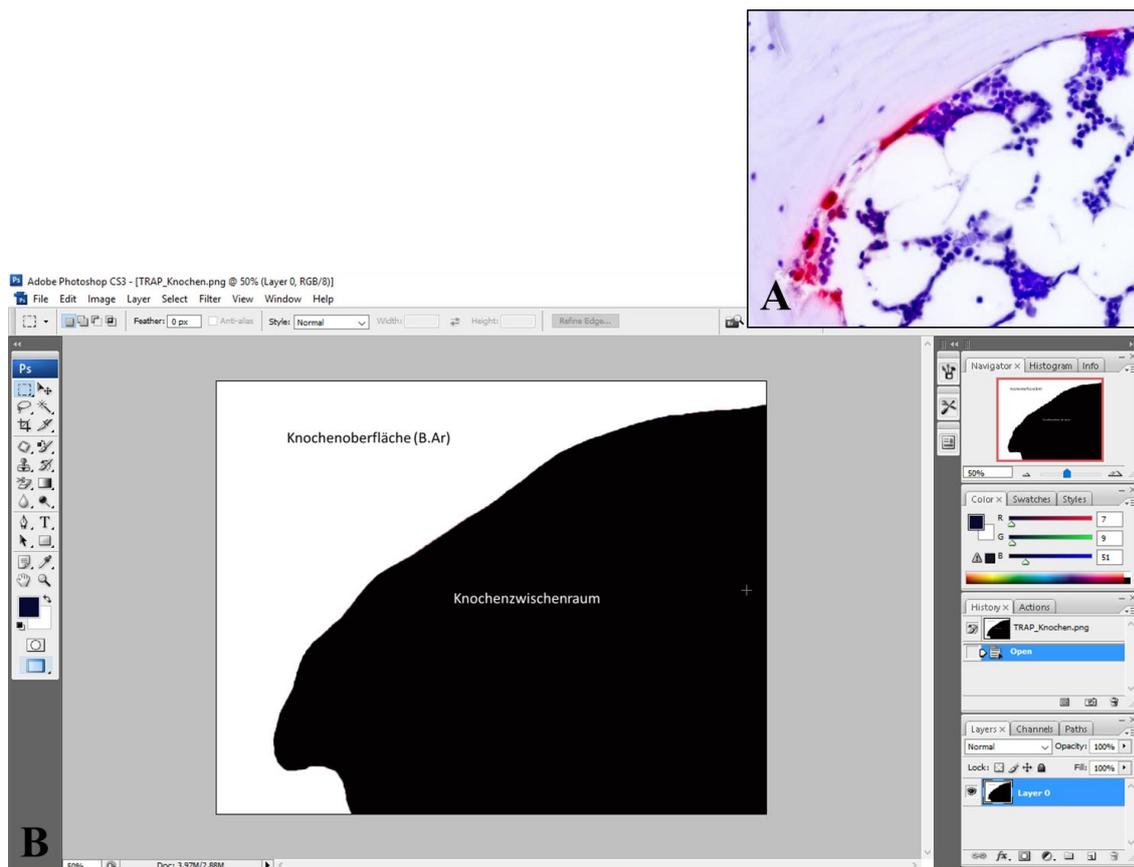
Bei der Osteoklastenoberfläche (A) handelt es sich um die Auflagefläche des Osteoklasten auf die Knochenoberfläche (Abb. 19). Dies entspricht der Resorptionslakune, in der der Osteoklast die Knochenmatrix resorbiert. Der

Knochenumfang (B) wurde bei allen Bildern eines Präparates eingezeichnet und zusammengerechnet (Abb. 20).



### Abbildung 19: Osteoklastenoberfläche (Oc.S) und Knochenoberfläche (BS)

Um die Osteoklastenoberfläche zu ermitteln wurde die Grenzfläche zwischen der Knochenoberfläche und den Osteoklasten berechnet (A). Um sie ins Verhältnis mit der Knochenoberfläche setzen zu können, wurde der gesamte Trabekelumfang aller Bilder eines Präparates ermittelt und addiert (B).



### Abbildung 20: Messung der Knochenoberfläche

Die weiße Fläche entspricht der Trabekelfläche, die schwarze Fläche entspricht dem Knochenzwischenraum. Zunächst wurde mittels Photoshop die Trabekel weiß gefärbt und der Knochenzwischenraum schwarz. Die Größe der Flächen wurde durch Image J ermittelt (Tier OD8 zum Zeitpunkt 8M).

Um die Knochenoberfläche berechnen zu können, musste die Knochenoberfläche und der Knochenzwischenraum als solcher für das Programm Image J zu erkennen sein. Hierfür wurden diese Flächen in Photoshop CS3 einheitlich eingefärbt, die Trabekelfläche wurde markiert und weiß eingefärbt, der Knochenzwischenraum wurde schwarz gefärbt (Abb. 20).

Als letztes wurden die Osteoklasten, die den Kriterien entsprachen, eines jeden Präparats gezählt. Erhoben wurden die Gewebefläche (T.Ar), die Knochenfläche (B.Ar.), der Knochenumfang (B.Pm) und als Osteoklastenparameter die Osteoklastenzahl (N.Oc) und die Osteoklastenoberfläche (Oc.S).

Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist zu beachten, dass die Parameter in der Histomorphometrie zweidimensional bestimmt wurden und in zweidimensionalen Einheiten angegeben werden, aber den in der Realität dreidimensionalen Werten entsprechen (Tab. 7).

<b>Zweidimensional</b>	<b>Dreidimensional</b>
Gewebefläche (T.Ar) in $\mu\text{m}^2$	Gewebevolumen (TV) in $\mu\text{m}^3$
Knochenfläche (B.Ar) $\mu\text{m}^2$	Knochenvolumen (BV) in $\mu\text{m}^3$
Knochenumfang (B.Pm) in $\mu\text{m}$	Knochenoberfläche (BS) in $\mu\text{m}^2$

#### **Tabelle 7: Parameter der Histomorphometrie**

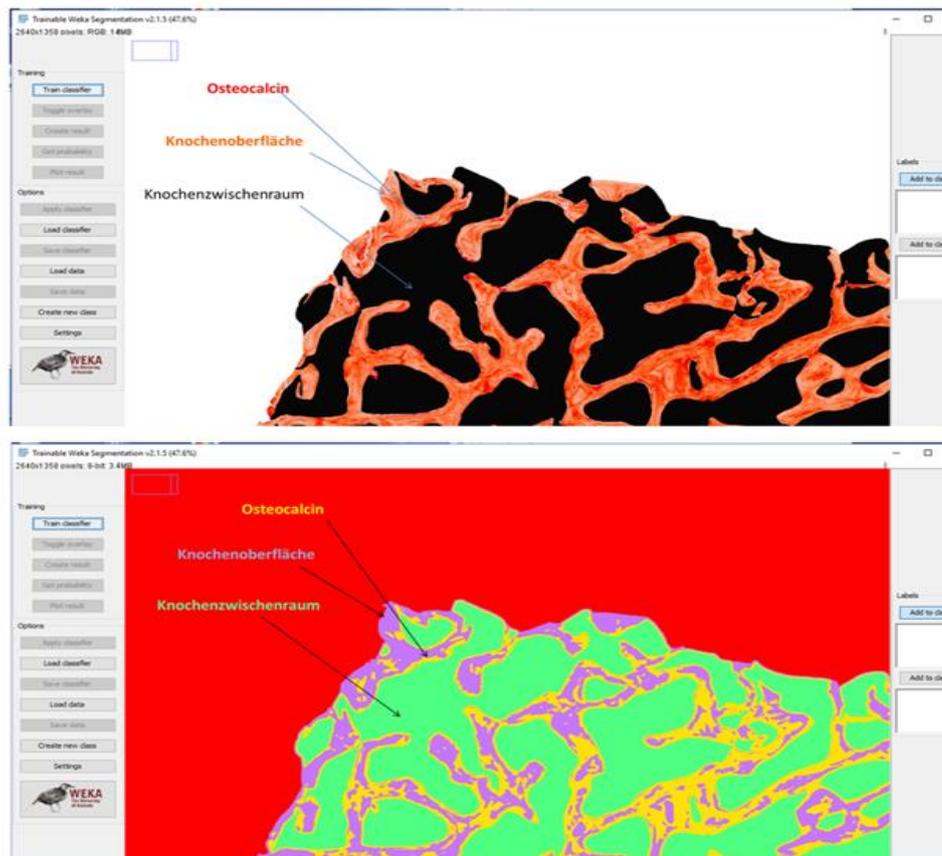
*Bei den Werten, die in der Histomorphometrie erhoben wurden, handelt es sich um zweidimensionale Einheiten. Anhand dieser Tabelle ist aufgeführt, welcher dreidimensionalen Einheit in der Realität die Werte entsprechen.*

Daraus resultieren folgende berechneten relativen Werte:

1. Knochenvolumen/Gewebevolumen (BV/TV)
2. Knochenoberfläche/Gewebevolumen (BS/TV)
3. Osteoklastenzahl/Knochenoberfläche (N.Oc/BS)
4. Osteoklastenzahl/Gewebevolumen (N.Oc/TV)
5. Osteoklastenzahl/Knochenvolumen (N.Oc/BV)
6. Osteoklastenoberfläche/Knochenoberfläche (Oc.S/BS)

## 2.5.2 Osteocalcin

Mithilfe des Mikroskops wurden in zweieinhalbfacher Vergrößerung Übersichtsaufnahmen angefertigt, die durch Photoshop CS3 zusammengesetzt wurden. Durch Photoshop CS3 wurde der Knochenzwischenraum schwarz gefärbt (Abb. 21), sodass dieser einheitlich gefärbt war und für das Programm als ein Parameter zu erkennen war. Für die weitere Auswertung wurde darauf geachtet, dass nur spongiöser Knochen, kein kompakter verwendet wurde. Die weiteren Auswertungen erfolgten mittels ImageJ mit dem Plugin WEKA (Waikato Environment for Knowledge Analysis) Segmentation, wodurch die Knochenoberfläche, die gefärbte Osteocalcinfläche und die schwarze Fläche anteilig berechnet wurden. Es wurden die Gewebefläche (T.Ar), die Knochenfläche (B.Ar) und die Osteocalcinfläche (Oc.Ar) ermittelt. Analog der TRAP–Auswertung sind die zweidimensionalen Parameter (T.Ar, B.Ar, Osteocalcinfläche) der Histomorphometrie den dreidimensionalen Werten (TV, BV, Osteocalcinvolumen)



gleichzusetzen.

**Abbildung 21: Auswertung Osteocalcin mittels trainable WEKA Segmentation**  
 Dieses Plugin berechnet zunächst die prozentualen Anteile der einzelnen Parameter anhand der verschiedenen Färbungen, um anschließend Absolutwerte zu errechnen.

Das Programm ermittelte zunächst prozentuale Anteile der einzelnen Parameter, setzt diese ins Verhältnis zueinander und berechnete anschließend Absolutwerte.

Hieraus ergeben sich die folgenden erhobenen Parameter:

1. Knochenvolumen/Gewebevolumen (BV/TV)
2. Osteocalcinvolumen/Knochenvolumen (Oc.V/BV)

### 2.5.3 Toluidinblau O

Die mit Toluidinblau gefärbten Schnitte wurden unter dem Mikroskop begutachtet und beurteilt. Die Differenzierung der verschiedenen Gewebe- und Zelltypen basiert auf metachromatischen Farbeffekten. Während mineralisierte Knochenmatrix ungefärbt bis blass-blau erscheint, werden Zellen, deren Zellkerne, Kollagenfasern und Osteoid in verschiedenen Blautönen angefärbt. Mastzellgranula und Knorpelmatrix werden rot-violett angefärbt (Abb. 22). Für die Beurteilung der Schnitte wurde ein Rankingsystem von eins bis vier gewählt, wobei je Gruppe pro Zeitpunkt ein Präparat als Bezugspräparat gewählt wurde, dass dem zu erwarteten Knochenstatus entsprach. In die Erwartungen wurden die Ergebnisse der bereits stattgehabten Untersuchungen mit einbezogen. Es wurden die Kortikalis und die Spongiosa, welche in drei Abschnitte eingeteilt wurden, bewertet. Die Spongiosa wurde durch die nachfolgenden Parametern beurteilt:

1. Trabekelqualität
2. Trabekelvernetzung
3. Zellenquantität und -qualität im Knochenzwischenraum

Um die verschiedenen Versuchstiere der unterschiedlichen Gruppen zu den drei Zeitpunkten zu vergleichen, wurde im Vergleich zu den Ergebnissen der Immunhistochemie und der Enzymhistochemie für jeden Zeitpunkt für jede der Gruppen ein zu erwartendes Ergebnis festgelegt. Hier wurden die folgenden Erwartungen an die Veränderungen, die im Laufe des Versuchs in den einzelnen Gruppen zu beobachten sein sollten, bewertet:

#### *0 Monaten*

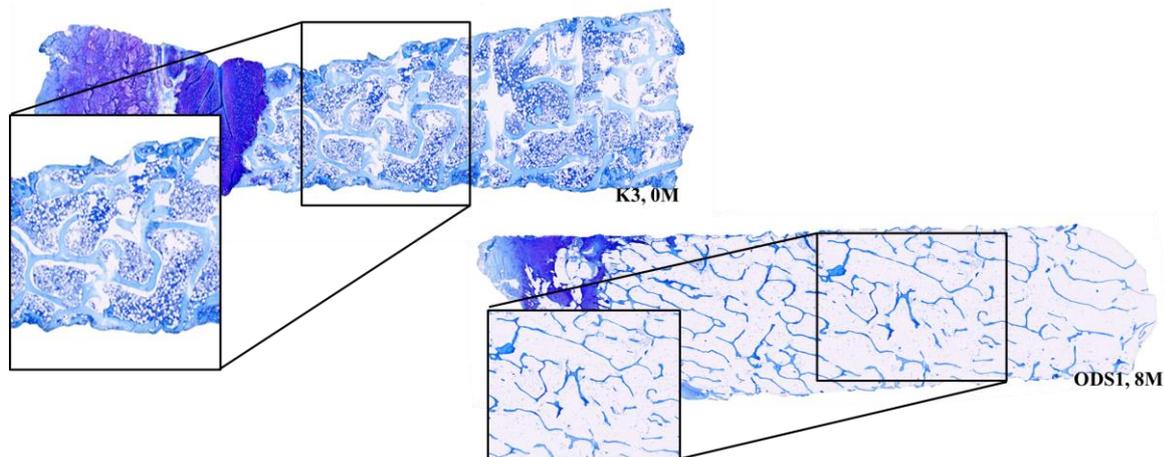
Bei allen vier Gruppen war ein normaler Knochenstatus bezüglich aller Parameter zu erwarten.

### 3 Monate

In den Gruppen K und OVX wurden keine wesentlichen Veränderungen im Vergleich zum Beginn des Versuchs erwartet. Leichte Veränderungen bezüglich der Trabekelqualität und der Vernetzung waren in den Gruppen OD und ODS zu erwarten, wobei der Verlust in ODS ausgeprägter sein sollte.

### 8 Monate

Die Kontrollgruppe sollte einen konstanten Knochenstatus im Vergleich zum Versuchsbeginn zeigen, die Gruppe OVX einen leichten Verlust der Trabekelqualität. Die Tiere der OD Gruppe sollten wiederum einen Knochenstatus im Sinne einer Osteopenie zeigen. Dies bedeutet, dass ein deutlicher Verlust an Knochenmasse zu sehen sein müsste. Die Gruppen, die mit der Triplebehandlung Ovariectomie, defizitäre Diät und Steroidtherapie behandelt wurden, sollte einen osteoporoseartigen Knochenstatus aufweisen. Ebenso sollte ein ausgeprägter Verlust an Knochenmasse in Form einer deutlichen Ausdünnung der Trabekel, sowie eine deutliche Verringerung der Trabekelvernetzung untereinander zu beobachten sein. Im Knochenzwischenraum ist eine Verfettung zu erwarten.



#### **Abbildung 22: Einstufung der Knochenqualität mittels Toluidinblau O**

Bei der Auswertung wurden die Präparate der unterschiedlichen Tiere innerhalb einer Versuchsgruppe und zwischen den Versuchsgruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten, aber auch über die gesamte Versuchsdauer verglichen. Das Tier der Kontrollgruppe (K3) zum Zeitpunkt 0 Monate (0M) repräsentiert den Knochenstatus zu Anfang des Versuchs, den jedes Tier zu Beginn aufweisen sollte. Die Trabekel hatten eine gute Qualität, sind ausreichend untereinander vernetzt und der Knochenzwischenraum ist mit sehr vielen Zellen gefüllt. Im Vergleich hierzu repräsentiert das Tier der Ovariectomie–Diättherapie–Steroid–Gruppe (ODS1) zum Ende des Versuchs nach acht Monaten (8M) einen schlechten, osteoporotischen Knochenstatus mit ausgedünnten, brüchigen Trabekeln, schlechter Trabekelvernetzung und einem sehr zellarmen Knochenzwischenraum.

## 2.6 Statistik

Für die statistischen Auswertungen der erhobenen Daten wurde die Software SPSS Statistics Version 21 (IBM, Armonk, USA) angewendet.

Es wurden jeweils die vier Versuchsgruppen zu dem jeweiligen Zeitpunkt untereinander, sowie die Veränderungen innerhalb der einzelnen Gruppen über die drei Zeitpunkte hinweg verglichen.

Es wurde zunächst der Mann–Whitney–U Test durchgeführt. Lag dabei eine Signifikanz vor, so wurde der post–hoc Bonferroni Test bzw. der Games–Howell Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau betrug bei allen durchgeführten Tests 0,05.

Es wurden folgende Aspekte analysiert:

1. Die durchschnittliche Gewichtsentwicklung der einzelnen Gruppen über den Versuchsverlauf
2. Die Knochendichte mittels DEXA Messung am rechten Radius, an der Lendenwirbelsäule und am Becken
3. Osteoklasten
  - 3.1 Osteoklastenzahl/Knochenoberfläche
  - 3.2 Osteoklastenzahl/Knochenvolumen
  - 3.3 Osteoklastenfläche/Knochenoberfläche
  - 3.4 Osteoklastenzahl/Gewebevolumen
  - 3.5 Knochenvolumen/Gewebevolumen
4. Osteoblasten
  - 4.1 Osteocalcin/Knochenvolumen
  - 4.2 Knochenvolumen/Gewebevolumen
  - 4.3 absolute Knochenfläche
  - 4.4 absolute Gewebefläche
5. Knochenstruktur
  - 5.1 Trabekelqualität
  - 5.2 Trabekelvernetzung
  - 5.3 Zusammensetzung des Knochenzwischenraums

Die Analysen wurden jeweils für eine Versuchsgruppe zu einem der Versuchszeitpunkte zusammengefasst, sodass insgesamt 12 zu untersuchende Gruppen entstanden (Tab. 8).

	0 Monate	3 Monate	8 Monate
Kontrolle	K, 0M	K, 3M	K, 8M
Ovariectomie	OVX, 0M	OVX, 3M	OVX, 8M
Ovariectomie und Diättherapie	OD, 0M	OD, 3M	OD, 8M
Ovariectomie, Diättherapie und Steroide	ODS, 0M	ODS, 3M	ODS, 8M

**Tabelle 8: Gruppeneinteilungen**

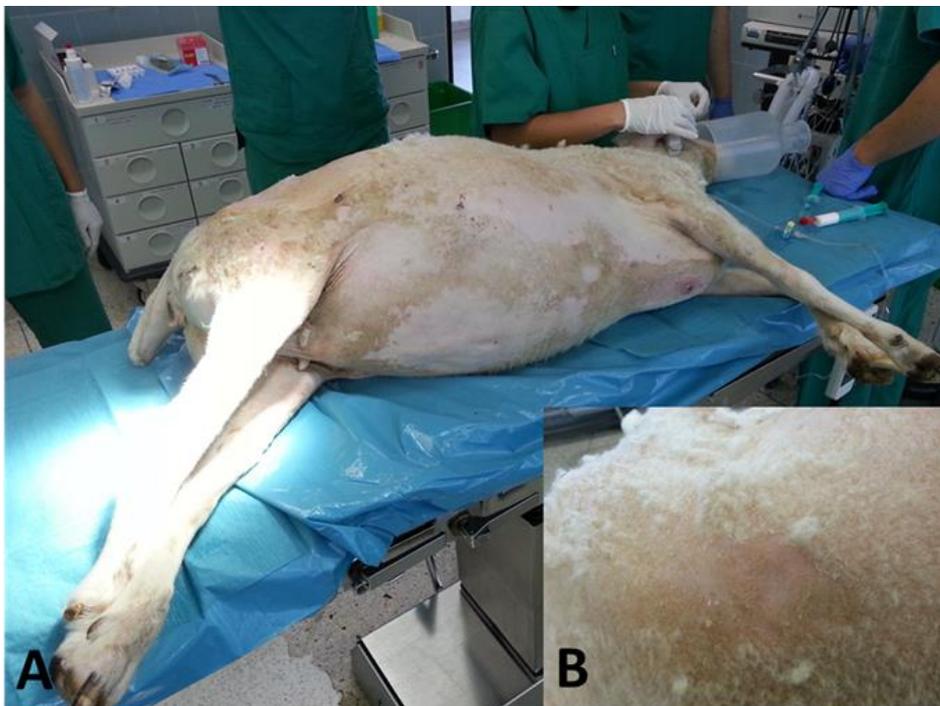
*Die Ergebnisse wurden als Durchschnittsergebnisse innerhalb der Versuchsgruppen (K, OVX, OD, ODS) zu den drei unterschiedlichen Zeitpunkten (0M, 3M, 8M) erhoben.*

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Studienverlauf

Zu Beginn wurden 31 Versuchstiere in die Studie aufgenommen. Die Gewichtskontrollen und die DEXA-Messungen verliefen ohne Komplikationen. Die Ovariectomien zu Beginn des Versuchs verliefen ohne schwerwiegende Komplikationen und alle Versuchstiere erholten sich postoperativ.

Am Zeitpunkt der zweiten Beckenkammernahme (TP= 3 Monate) musste ein Tier aufgrund einer insuffizienten Spontanatmung nach der Narkose längere Zeit nachbeatmet werden. Das Tier konnte schließlich erfolgreich aus der Narkose erwachen und stand einige Zeit unter strenger Beobachtung und erholte sich wieder. Die Tiere, der mit steroidbehandelten ODS Gruppe (n=8) zeigten zunehmend einen verminderten Allgemeinzustand, insbesondere in Bezug auf Fell und Hautgewebe (Abb. 23). Die Haut der Tiere war empfindlicher und riss schnell ein. Ein Tier musste nach einer großflächigen Ablederung an der rechten Flanke mittels Hautnaht versorgt werden. Das Fell der Schafe wurde dünner und fiel zunehmend aus, zum Zeitpunkt der Euthanasie (TP = 8M) hatte sich bei mehreren Tieren dieser Gruppe eine Alopezie entwickelt.



**Abbildung 23: Hautveränderung bei den Tieren der ODS Gruppe**

*Die Tiere der ODS Gruppe entwickelten eine Alopezie unter der Glukokortikoidbehandlung. Diese Alopezie zeigte sich an den ganzen Tieren (A), jedoch in unterschiedlicher Ausprägung (B).*

Die Tiere zeigten eine Alopezie am ganzen Körper (Abb. 23). Ein Tier der ODS Gruppe (Tier ODS6) verstarb zwei Wochen vor Beendigung des Versuchs und aufgrund seines Zustandes und der schon eingetretenen Leichenstarre konnten keine Proben mehr gewonnen werden. Ein weiteres Tier der ODS Gruppe erlitt einen schweren Oberschenkelhalsbruch, wodurch dieses zwei Wochen vor dem eigentlichen Euthanasiezeitpunkt eingeschlafert werden musste und die Probengewinnung früher stattfand. So wurden zum Zeitpunkt acht Monate 30 Versuchstiere mittels DEXA Messung untersucht und euthanasiert (Tab. 9).

	0 Monate				3 Monate				8 Monate			
	K	OVX	OD	ODS	K	OVX	OD	ODS	K	OVX	OD	ODS
<b>Gewicht</b>	8	7	8	8	8	7	8	8	7	7	8	7
<b>DEXA</b>	8	7	8	8	8	7	8	8	8	7	8	6
<b>Osteocalcin</b>	8	5	6	8	8	7	8	8	8	7	8	7
<b>TRAP</b>	8	5	6	8	8	6	8	8	8	7	8	7
<b>Toluidin- blau O</b>	8	3	6	7	8	7	8	7	7	7	8	7

**Tabelle 9: Anzahl der auswertbaren Proben je Untersuchung und Zeitpunkt**

*Aufgezeigt werden die Versuchsgruppen (K, OVX, OD, ODS) zu den drei Untersuchungszeitpunkten (0, 3 und 8 Monaten) und wie viele Versuchstiere der jeweiligen Gruppen mit den jeweiligen Methoden (Gewichtsmessung DEXA, Osteocalcin, TRAP und Toluidinblau O) untersucht werden konnten.*

Die Beckenkammbiopsien der Tiere O3, O4, OD1 und OD6 mussten entweder aufgrund des schlechten Zustandes nach stattgefundener Entkalkung und der daraus resultierenden fehlenden Möglichkeit der Färbung oder der schlechten Färbequalität, grundsätzlich aus der Bewertung genommen werden. Das Tier ODS6 verstarb vor Beendigung des Versuches.

## 3.2 Gewichtsentwicklung

Das Körpergewicht wurde zu den drei Untersuchungszeitpunkten (0 Monaten, 3 Monaten, 8 Monaten) analysiert, bevor die Knochendichtemessungen durchgeführt wurden. Zu Beginn des Versuchs betrug das durchschnittliche Gewicht der Tiere (n=31) 61,71 kg  $\pm$  10,66 kg. Im Zeitraum zwischen dem ersten (0 Monate) und dem zweiten

Zeitraum (3 Monate) zeigten alle Gruppen eine Gewichtszunahme und erreichten ein Durchschnittsgewicht von 66,16 kg  $\pm$  11,26 kg. Hierbei nahm die Gruppe OD mit durchschnittlich +6,125 kg am kräftigsten zu, dicht gefolgt von der Kontrollgruppe mit +6 kg. Die beiden anderen Gruppen nahmen mit +3,86 kg (ODS) und +1,75 kg (OVX) deutlich weniger zu. Zum Zeitpunkt der Euthanasie (8 Monate) zeigte sich ein Durchschnittsgewicht von 65,14 kg  $\pm$  11,11 kg und damit eine Abnahme an Gewicht in Bezug auf den zweiten Zeitpunkt (3 Monaten). Im Vergleich des Euthanasiezeitpunktes (8 Monate) zu Beginn des Versuches (0 Monate) wurde weiterhin ein erhöhtes durchschnittliches Körpergewicht beobachtet (Tab. 10). Die Kontrollgruppe nahm mit +0,46 kg weiterhin zu, wenn auch diskret. Die anderen drei Gruppen verloren zwischen Zeitpunkt drei Monaten und acht Monaten an Körpergewicht, am deutlichsten die Gruppe OVX mit -3,57 kg, gefolgt von der Gruppe OD mit -1,25 kg. Die Gruppe ODS (-0,11 kg) hielt das Durchschnittsgewicht weitestgehend konstant.

	<b>Kontrolle</b>	<b>OVX</b>	<b>OD</b>	<b>ODS</b>
<b>0 Monate</b>	63,25 $\pm$ 11,34 (52;81)	62,57 $\pm$ 10,61 (53;81)	62,63 $\pm$ 13,34 (47;86)	58,50 $\pm$ 8,17 (41;67)
<b>3 Monate</b>	69,25 $\pm$ 12,28 (58;88)	66,43 $\pm$ 6,83 (60;70)	68,75 $\pm$ 13,33 (54;92)	60,25 $\pm$ 10,79 (41;73)
<b>8 Monate</b>	69,71 $\pm$ 11,12 (58;88)	62,86 $\pm$ 5,58 (55;70)	67,50 $\pm$ 12,95 (53;94)	60,14 $\pm$ 12,58 (40;76)

**Tabelle 10: Durchschnittliches Körpergewicht in kg der Versuchsgruppen im Verlauf**

*Die Tabelle zeigt die durchschnittliche Gewichtsentwicklung der einzelnen Gruppen (K, OVX, OD, ODS) zu den drei Untersuchungszeitpunkten (0, 3 und 8 Monate). Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung sowie Minimum und Maximum (untere Werte).*

Es gab zu keinem Beobachtungszeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen oder innerhalb der einzelnen Gruppen im Versuchsverlauf.

### 3.3 Knochendichtemessung durch DEXA

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Knochendichtemessungen am rechten Radius, der Lendenwirbelsäule und im Beckenbereich beschrieben. Die Messungen fanden an allen drei Untersuchungszeitpunkten (0, 3 und 8 Monate) vor den operativen Eingriffen an den bereits sedierten Tieren statt. Die Ergebnisse wurden durch das Studienteam des SFB/Transregio 79 im Rahmen dieses Versuchs erhoben und zur Verfügung gestellt. Bei Erhebung der Ausgangswerte zu Beginn des Versuchs bestand bei keinem der Messorte ein signifikanter Unterschied zwischen und innerhalb der einzelnen Gruppen.

#### *Rechter Radius*

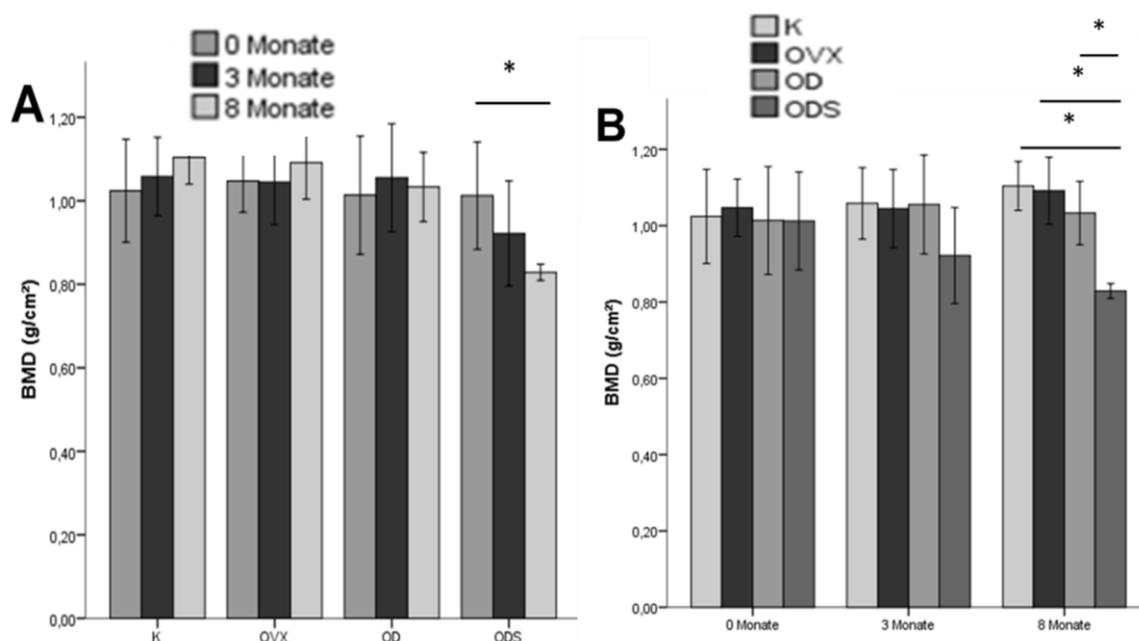
Die Kontrollgruppe zeigte im Verlauf des Versuchs einen leichten, kontinuierlichen Anstieg der Knochenmineraldichte (BMD) am rechten Radius von insgesamt +7,81 %. Die Gruppe der ovariectomierten Tiere verlor in den ersten drei Monaten zunächst geringfügig an Knochendichte, diese stieg in den folgenden Monaten wieder an und war mit durchschnittlich +4,20 % etwas höher als zu Versuchsbeginn.

Ähnlich stabile Werte zeigten sich auch in der OD Gruppe, hier stiegen die Werte zwischen den ersten zwei Zeitpunkten (0 und 3 Monate) und fielen anschließend bis zum Ende der acht Monate wieder geringfügig, sodass die Knochenmineraldichte im Gesamten um +1,87 % anstieg. Die größten Veränderungen zeigte die Gruppe der ODS Tiere, bei denen die BMD bereits in den ersten drei Monaten um -8,89 % abnahm und diese Entwicklung sich auch in den folgenden fünf Monaten bis zum Ende der acht Monate fortsetzte. Schlussendlich zeigte sich eine Abnahme der BMD von  $1,012 \pm 0,129$  g/cm<sup>2</sup> auf  $0,829 \pm 0,019$  g/cm<sup>2</sup> und somit einen Verlust von -18,08 %. Zum Zeitpunkt der Euthanasie (8 Monate) zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied zwischen der ODS Gruppe und der anderen drei Gruppen (Tab. 11).

	Kontrolle	OVX	OD	ODS
<b>0 Monate</b>	1,024 ± 0,123 (0,86;1,18)	1,047 ± 0,748 (0,92;1,13)	1,014 ± 0,142 (0,83;1,23)	1,012 ± 0,129 (0,80;1,18)
<b>3 Monate</b>	1,058 ± 0,094 (0,94;1,17)	1,045 ± 0,102 (0,91;1,16)	1,055 ± 0,129 (0,93;1,32)	0,922 ± 0,126 (0,73;1,07)
<b>8 Monate</b>	1,104 ± 0,064 (1,01;1,19)	1,091 ± 0,088 (0,98;1,19)	1,033 ± 0,83 (0,92;1,20)	0,829 ± 0,019 (0,79;0,85)

**Tabelle 11: Knochenmineralgehalt (BMD) in g/cm<sup>2</sup> am rechten Radius zu den verschiedenen Zeitpunkten (0, 3 und 8 Monate)**

Die Tabelle zeigt die Entwicklung des durchschnittlichen Knochenmineralgehalts im rechten Radius in den einzelnen Gruppen zu den drei Untersuchungszeitpunkten. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung, sowie Minimum und Maximum (untere Werte).



**Abbildung 24: Signifikante Veränderungen der BMD gemessen am rechten Radius**

Die ODS Gruppe zeigte eine signifikant geringere BMD nach acht Monaten sowohl im Vergleich zu den Ausgangswerten zu Beginn (A), als auch zu den anderen Gruppen zum Zeitpunkt der Euthanasie (B). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen; \* $p \leq 0,05$  (Mann-Whitney-U Test bzw. Bonferroni post-hoc).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Tiere der ODS Gruppe im Verlauf der acht Monate Versuchszeit eine signifikante Abnahme der Knochenmineraldicht (BMD) entwickelten, sodass die durchschnittliche BMD beim letzten gemessenen Zeitpunkt (8 Monate) signifikant geringer war als zu Beginn des Versuchs (0 Monate). Vergleicht man

die Versuchsgruppen (K, OVX, OD, ODS) zu den unterschiedlichen Messpunkten (0, 3, 8 Monate) ergab sich zum Euthanasiezeitpunkt (8 Monate), dass die durchschnittliche Knochenmineraldichte (BMD) der Gruppe ODS signifikant geringer war als in den anderen drei Gruppen (K, OVX, OD) (Abb. 24).

#### *Lendenwirbelsäule*

Die Kontrollgruppe zeigte hier als einzige der Gruppen über den ganzen Zeitraum gesehen einen Anstieg der Knochenmineraldichte (BMD), obwohl die BMD in den ersten drei Monaten zunächst sank (Tab. 12).

Die OVX Gruppe hingegen verlor wie an der Lendenwirbelsäule in den ersten drei Monaten zunächst an BMD (-5,27 %), um im Vergleich zwischen den Zeitpunkten drei und acht Monaten wieder zu zulegen (+3,15 %).

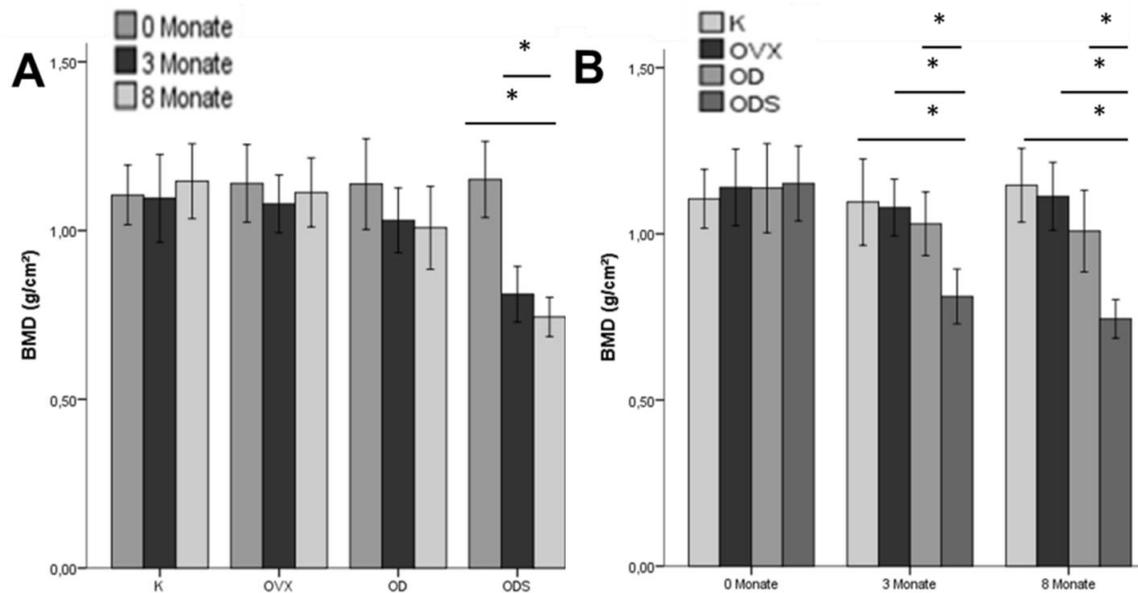
Die OD und die ODS Gruppen verloren über den gesamten Zeitraum kontinuierlich an BMD, wobei auch hier der größte Verlust bei der ODS Gruppe mit insgesamt -35,36 % von  $1,151 \pm 0,113 \text{ g/cm}^2$  auf  $0,744 \pm 0,058 \text{ g/cm}^2$  zu beobachten war.

Die ODS Gruppe wies im Vergleich zu den anderen drei Gruppen (K, OVX, OD) zu jedem der unterschiedlichen Zeitpunkte (0, 3, 8 Monate) im Bereich der Lendenwirbelsäule einen signifikanten Verlust an Knochenmineraldichte (BMD) auf. Innerhalb der Gruppe ODS war die Knochenmineraldichte (BMD) zum Zeitpunkt der Euthanasie (8 Monate) signifikant geringer, sowohl im Vergleich zum Beginn des Versuchs (0 Monate) als auch zum zweiten Messzeitpunkt (3 Monate) (Abb. 25).

	<b>Kontrolle</b>	<b>OVX</b>	<b>OD</b>	<b>ODS</b>
<b>0</b> <b>Monate</b>	1,105 ± 0,089 (0,99;1,21)	1,139 ± 0,115 (0,98;1,33)	1,137 ± 0,134 (0,92;1,36)	1,151 ± 0,113 (0,98;1,32)
<b>3</b> <b>Monate</b>	1,096 ± 0,130 (0,87;1,24)	1,079 ± 0,086 (0,98;1,25)	1,030 ± 0,096 (0,87;1,11)	0,811 ± 0,083 (0,70;0,92)
<b>8</b> <b>Monate</b>	1,146 ± 0,111 (0,99;1,29)	1,113 ± 0,102 (0,98;1,23)	1,008 ± 0,123 (0,79;1,14)	0,744 ± 0,058 (0,70;0,84)

**Tabelle 12: Knochenmineralgehalt (BMD) in  $\text{g/cm}^2$  der Lendenwirbelsäule zu den verschiedenen Zeitpunkten (0, 3 und 8 Monate)**

*Die Tabelle zeigt die Entwicklung des durchschnittlichen Knochenmineralgehalts der Lendenwirbelsäule in den einzelnen Gruppen zu den drei Untersuchungszeitpunkten. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung, sowie Minimum und Maximum (untere Werten).*



**Abbildung 25: Signifikante Veränderungen der BMD gemessen an der Lendenwirbelsäule**  
 Die ODS Gruppe entwickelte einen signifikanten Verlust der BMD nach acht Monaten (A). Die BMD ist in der ODS Gruppe nach drei und nach acht Monaten signifikant niedriger als in den restlichen Versuchsgruppen (B). Im Vergleich zu den Ausgangswerten zeigte die ODS Gruppe einen signifikanten Verlust der BMD nach acht Monaten (A). Im Vergleich zu den anderen Gruppen ist die BMD der ODS Gruppe sowohl nach drei als auch nach acht Monaten signifikant niedriger (B). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen;  $*p \leq 0,05$  (Mann-Whitney-U Test bzw. Bonferroni post hoc).

### Becken

Im Bereich des Beckens hatte die Kontrollgruppe wie im Bereich des Radius einen kontinuierlichen Anstieg der Knochenmineraldichte (BMD) mit insgesamt +2,62 % zu verzeichnen. Die Werte in der OVX Gruppe blieben in diesem Bereich relativ stabil und stiegen um insgesamt 1,47 %.

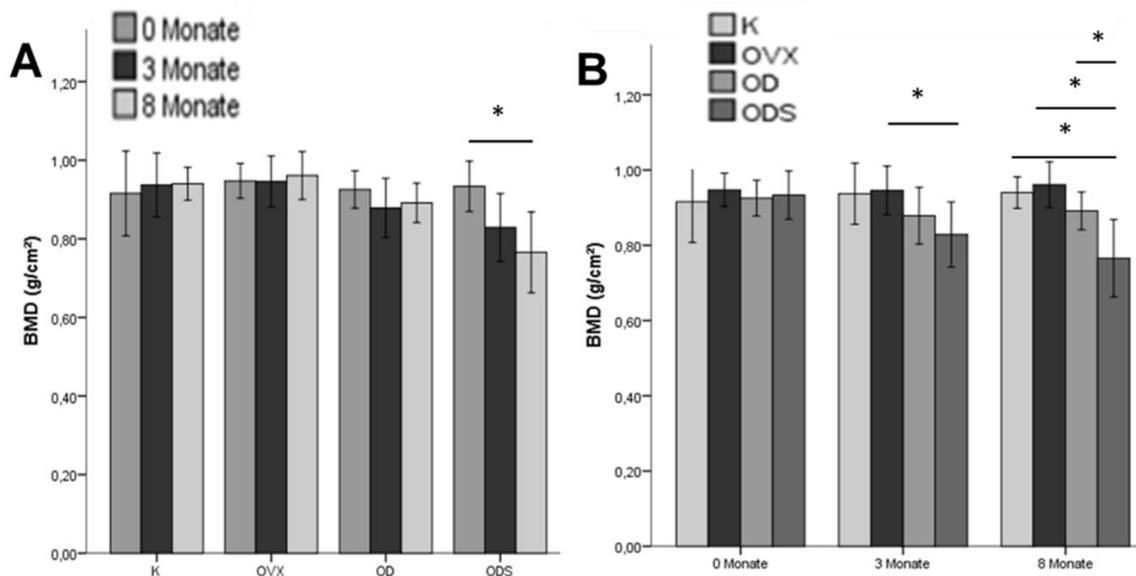
Wohingegen die BMD in den ersten drei Monate bei der OD Gruppe von  $0,925 \pm 0,047$  g/cm<sup>2</sup> auf  $0,879 \pm 0,075$  g/cm<sup>2</sup> fiel, um bis zum Versuchsende nach acht Monaten wieder auf  $0,891 \pm 0,050$  g/cm<sup>2</sup> zu steigen (Tab. 13).

Bei der ODS Gruppe zeigte sich auch hier am Versuchsende eine signifikante Abnahme der Knochendichte im Vergleich zum Versuchsbeginn mit einem Verlust von -17,98 %, auch im Vergleich zu den anderen Gruppen war diese Abnahme am Ende des Versuchs signifikant höher.

	Kontrolle	OVX	OD	ODS
<b>0</b> <b>Monate</b>	0,916 ± 0,108 (0,83;1,13)	0,947 ± 0,044 (0,89;1,02)	0,925 ± 0,047 (0,86;0,98)	0,934 ± 0,064 (0,85;1,02)
<b>3</b> <b>Monate</b>	0,937 ± 0,081 (0,86;1,06)	0,946 ± 0,065 (0,85;1,02)	0,879 ± 0,075 (0,74;0,96)	0,829 ± 0,087 (0,69;0,91)
<b>8</b> <b>Monate</b>	0,940 ± 0,0418 (0,90;1,03)	0,961 ± 0,061 (0,88;1,07)	0,891 ± 0,050 (0,81;0,96)	0,766 ± 0,103 (0,62;0,93)

**Tabelle 13: Knochenmineralgehalt (BMD) in g/cm<sup>2</sup> im Bereich des Beckens zu den verschiedenen Zeitpunkten (0, 3 und 8 Monate)**

Die Tabelle zeigt die Entwicklung des durchschnittlichen Knochenmineralgehalts des Beckens in den einzelnen Gruppen (K, OVX, OD und ODS) zu den drei Untersuchungszeitpunkten (0,3 und 8 Monaten).



Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung, sowie Minimum und Maximum (untere Werten).

**Abbildung 26: Signifikante Veränderungen der BMD gemessen im Bereich des Beckens**

Die ODS Gruppe weist nach drei Monaten eine signifikant geringere BMD als die OVX Gruppe auf. Nach acht Monaten ist sie im Vergleich zu allen drei anderen Versuchsgruppen signifikant geringer (B). Innerhalb der Gruppe ODS kommt es nach drei Monaten zu einer signifikanten Minderung der BMD im Bereich des Beckens (A). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen; \* $p \leq 0,05$  (Mann-Whitney-U Test bzw. Bonferroni post-hoc).

Im Vergleich zu den Ausgangswerten zeigte die ODS Gruppe einen signifikanten Verlust der BMD nach acht Monaten (Abb. 26, A). Nach drei Monaten war die BMD der ODS Gruppe signifikant geringer als die der OVX Gruppe. Nach acht Monaten war dieser Unterschied zwischen der ODS Gruppe und allen anderen drei Gruppen signifikant (Abb. 26, B).

## 3.4 Histomorphometrie der Beckenkammbiopsien

Im Folgenden werden die Ergebnisse der enzymhistochemischen TRAP-Färbungen und der immunhistochemischen Osteocalcin-Färbungen der Beckenkammbiopsien erläutert. Es wurden die Durchschnittsergebnisse der verschiedenen Gruppen K (n=8), OVX (n=7), OD (n=8) und ODS (n=8) am jeweiligen Zeitpunkt (0, 3 und 8 Monaten) im Vergleich zueinander bewertet. Zusätzlich wurde die Entwicklung der Ergebnisse der einzelnen Gruppen (K, OVX, OD, ODS) zwischen den einzelnen Versuchszeitpunkten (0, 3 und 8 Monate) sowie über den gesamten Versuchszeitraum (8 Monate) analysiert. Die Proben wurden zum Zeitpunkt null Monate und zum Zeitpunkt acht Monate aus dem linken Beckenkamm gewonnen. Zum Zeitpunkt drei Monate wurden die Proben aus dem rechten Beckenkamm entnommen.

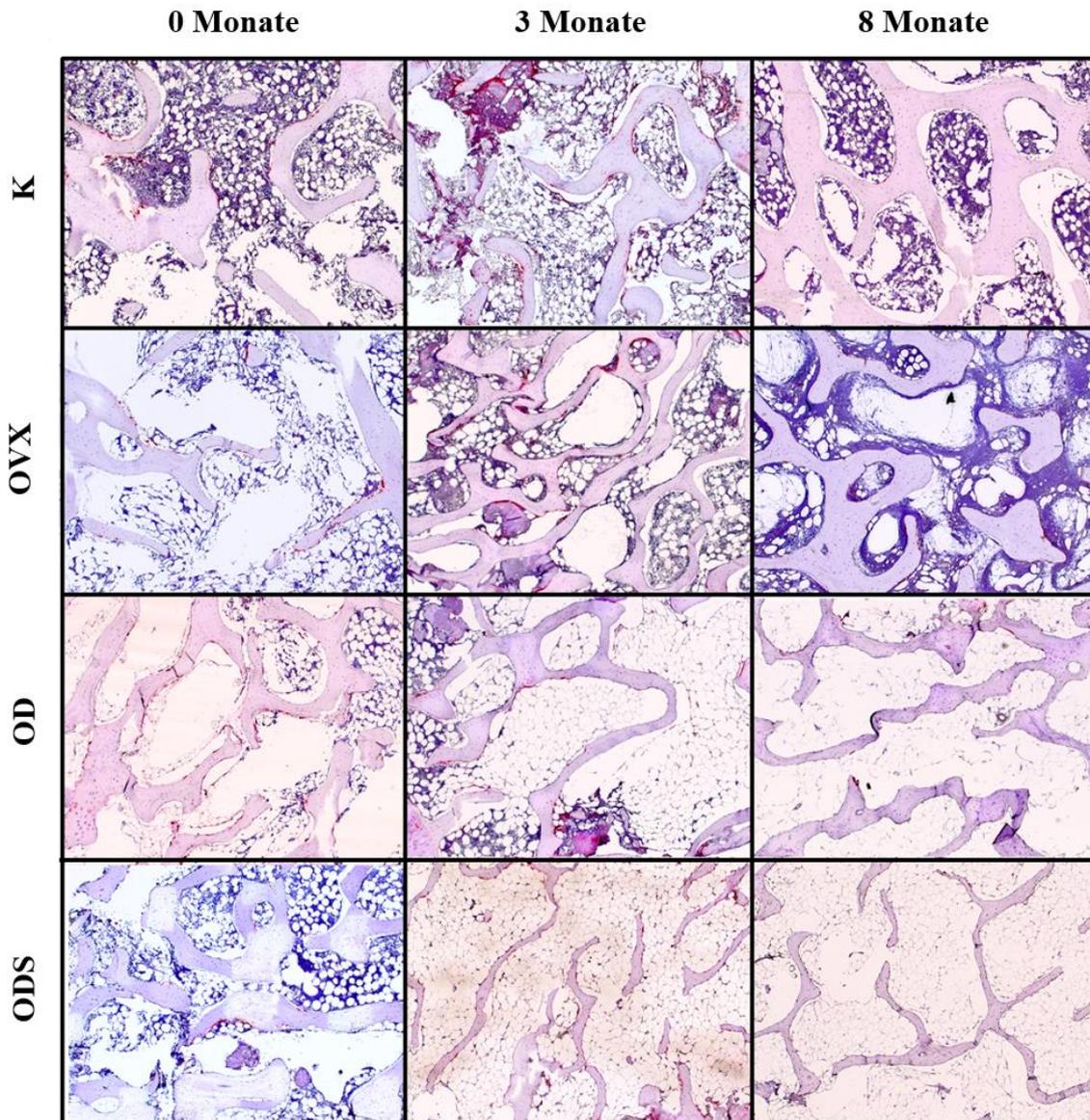
### 3.4.1 TRAP-Osteoklasten

Die Proben wurden bezüglich folgender Parameter analysiert:

- Gewebefläche (T.Ar)
- Knochenfläche (B.Ar)
- Knochenumfang (B.Pm)
- Knochenvolumen/Gewebevolumen (BV/TV)
- Osteoklastenoberfläche/Knochenoberfläche (Oc.S/BS)
- Osteoklastenanzahl/Knochenoberfläche (N.Oc/BS)
- Osteoklastenanzahl/Gewebevolumen (N.Oc/TV)
- Knochenoberfläche/Gewebevolumen (BS/TV)

Zu Beginn des Versuchs ließen sich keine signifikanten Unterschiede in den gesamten erhobenen Parametern zwischen den einzelnen Gruppen nachweisen. Zum Versuchszeitpunkt nach drei Monaten wiesen die Tiere der ODS Gruppe eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten pro Knochenvolumen (N.Oc/BV) im Vergleich zum Versuchsbeginn ( $p < 0,001$ ) auf. Dies ließ sich auch im Vergleich zwischen der ODS-Gruppe mit der Kontroll- ( $p = 0,002$ ) und OVX-Gruppe ( $p = 0,007$ ) zum Zeitpunkt drei Monate beobachten. Dieser Unterschied war auch nach acht Monaten zu beobachten (K:  $p = 0,001$ ; OVX:  $p = 0,002$ ). Eine Steigerung im Vergleich zur Kontrollgruppe nach drei Monaten wiesen die Tiere der ODS Gruppe auch hinsichtlich der Osteoklastenanzahl, bezogen auf die Knochenoberfläche (N.Oc/BS,  $p = 0,015$ ) als auch auf das Gewebevolumen (N.Oc/TV,  $p = 0,001$ ), auf. Zum Zeitpunkt der Euthanasie (8 Monate)

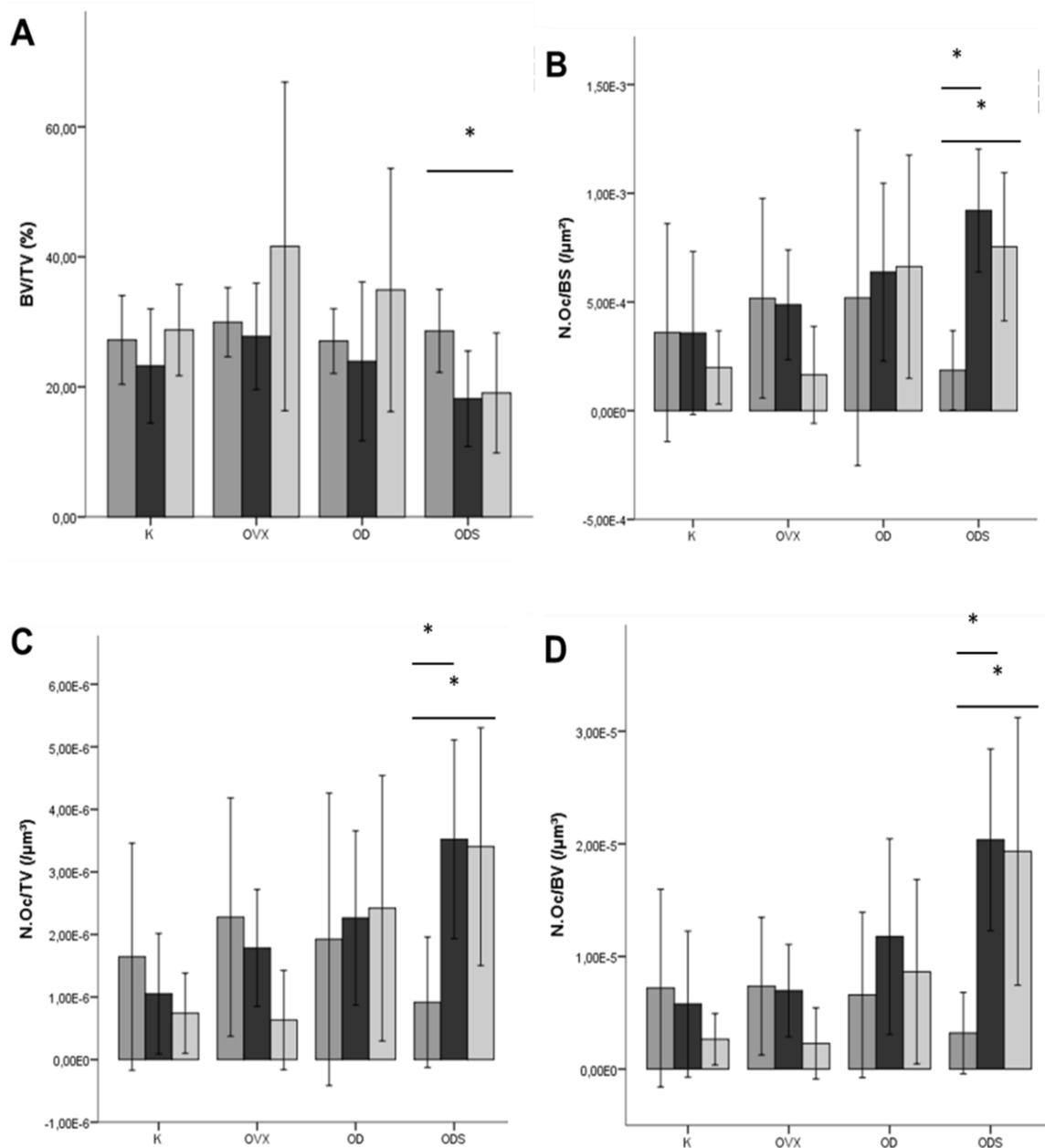
waren diese Unterschiede weiterhin signifikant (N.Oc/BS:  $p=0,001$ , N.Oc/TV:  $p<0,001$ ) und zusätzlich ließen sie sich auch im Vergleich der ODS- mit der OVX-Gruppe zum Zeitpunkt acht Monate nachweisen (N.Oc/BS:  $p=0,002$ , N.Oc/TV:  $p<0,001$ ).

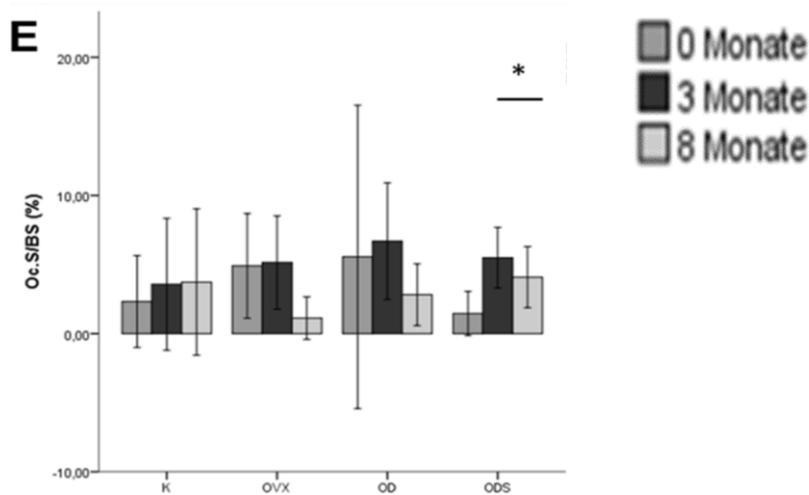


**Abbildung 27: Repräsentative Übersichtsaufnahmen der durchschnittlichen Ergebnisse der Versuchsgruppen zu den drei Untersuchungszeitpunkten in der TRAP Färbung (5fach Vergrößerung)**

Bereits in der Übersichtsaufnahme ließ sich erkennen, dass sich der Knochenstatus in den Gruppen K und OVX über die acht Monate Versuchszeitraum nur geringfügig bis gar nicht verändern. In den Gruppen OD und ODS verschlechtert sich der Knochenstatus durch das Ausdünnen der Trabekel und Verschlechterung der Vernetzung zunehmend. In der ODS Gruppe war dies wesentlich ausgeprägter als in der OD Gruppe. Bereits nach drei Monaten wies die ODS Gruppe eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten pro Knochenvolumen (N.Oc/BV) auf, dies setzte sich bis zum Zeitpunkt 8M fort und zeigte hier auch eine signifikant höheren Anteil als die Gruppen K und OVX im Vergleich. Diese Ergebnisse zeigten sich auch hinsichtlich des Osteoklastenanzahl pro Knochenoberfläche (N.Oc/BS). Zum Zeitpunkt drei Monate ist dieses Verhältnis in der ODS Gruppe signifikant höher als in der Gruppe K, nach acht Monate zusätzlich auch im Vergleich zu der Gruppen OVX.

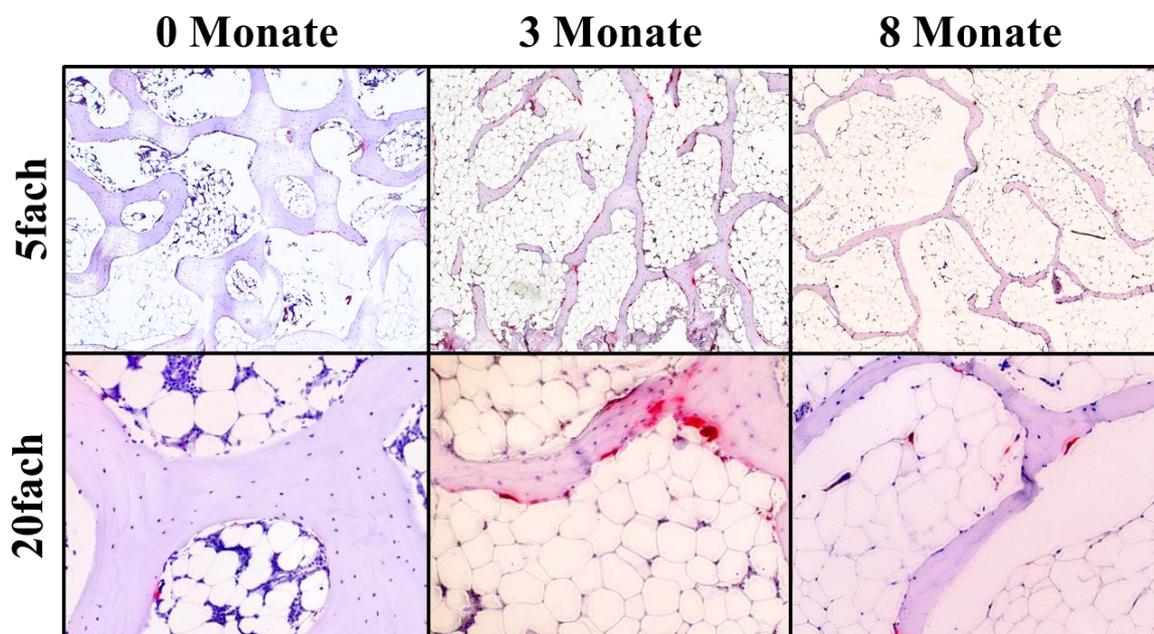
Vergleicht man die ODS-Gruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten, so ließ sich nach drei Monaten sowohl eine gesteigerte Anzahl der Osteoklasten bezogen auf das Knochenvolumen ( $N.Oc/BV(p=0,002)$ ), das Gewebevolumen ( $N.Oc/TV(p=<0,001)$ ) als auch auf die Knochenoberfläche ( $N.Oc/BS(p=<0,001)$ ) feststellen. Ebenso war die Osteoklastenoberfläche pro Knochenoberfläche ( $Oc.S/BS(p=0,002)$ ) gesteigert (Abb. 29). Nach acht Monaten waren diese Verhältnisse im Vergleich zu den Ausgangswerten zum Versuchsbeginn weiterhin signifikant erhöht ( $N.Oc/BV: p=0,004$ ;  $N.Oc/BS: p=0,002$ ;  $N.Oc/TV: p=0,016$ ), außer das Verhältnis  $Oc.S/BS$ . Vergleicht man die ODS Gruppe zwischen dem Zeitpunkt drei Monate und acht Monate waren die Ergebnisse jedoch relativ konstant und wiesen keinen signifikanten Unterschied auf.





**Abbildung 28: Signifikante Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen im Versuchsverlauf**

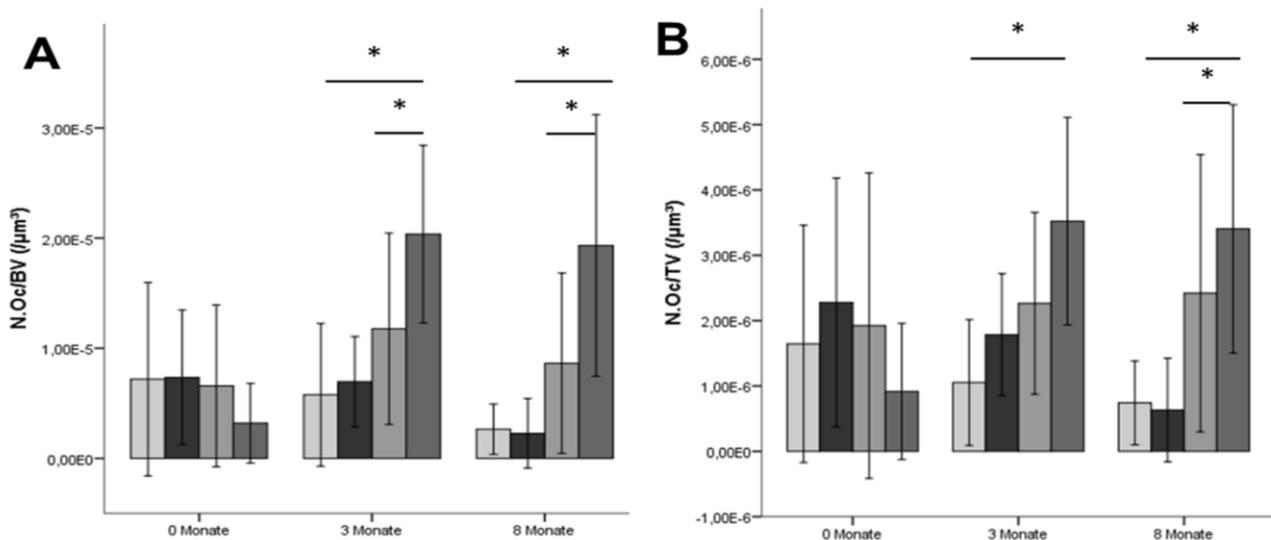
Nach drei bzw. acht Monaten kommt es innerhalb der ODS Gruppe zu einer signifikanten Zunahme der Osteoklastenzahl pro Knochenoberfläche (B), Gewebevolumen (C) und Knochenvolumen (D). Im Vergleich zur Knochenoberfläche ist nach acht Monaten die Osteoklastenaktivität in der ODS Gruppe deutlich erhöht (E), während der Anteil des Knochenvolumens am Gewebevolumen signifikant abnimmt (A). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen;  $*p \leq 0,05$  (Mann-Whitney-U Test bzw. Bonferroni post-hoc)

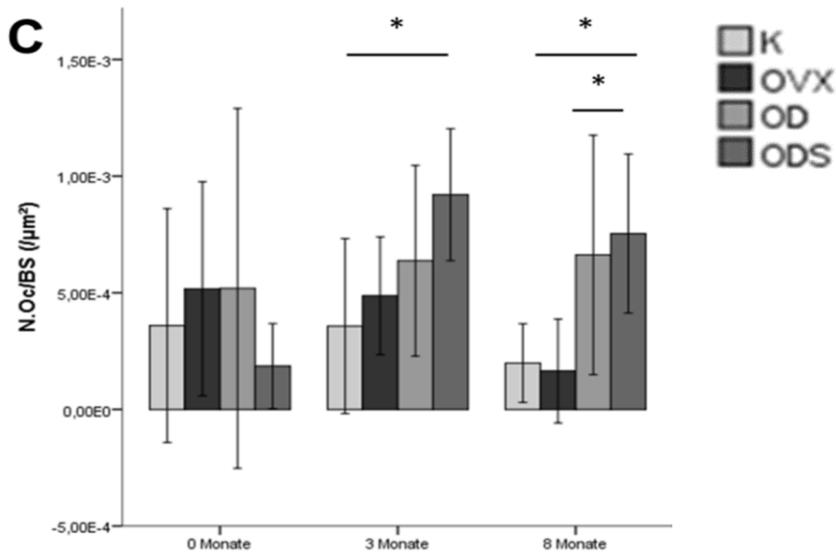


**Abbildung 29: Signifikante Unterschiede innerhalb der ODS Gruppe zu den drei Zeitpunkten**

Innerhalb der ODS Gruppe zeigte sich im Vergleich Zeitpunkt 0M und 3M bzw. 8M ein erhöhtes  $N.Oc/BS$ ,  $N.Oc/TV$  und  $N.Oc/BV$ . Nach acht Monaten war die  $N.Oc/BS$  erhöht. Das  $BV/TV$  war zum Zeitpunkt 8M signifikant geringer als zu Beginn. Dargestellt ist beispielhaft das Tier ODS8 zu den Zeitpunkten 0M, 3M und 8M in je 5facher und 20facher Vergrößerung.

In der ODS Gruppe zeigte sich im Vergleich zwischen Beginn (0 Monate) und den Zeitpunkten drei bzw. acht Monaten eine Steigerung der Osteoklastenanzahl pro Knochenoberfläche (N.Oc/BS( $p < 0,001$ ,  $p = 0,002$ )) (Abb. 28, B), Gewebevolumen (N.Oc/TV( $p = 0,009$ ,  $p = 0,016$ )) (Abb. 28, C) und Knochenvolumen (N.Oc/BV( $p = 0,002$ ,  $p = 0,004$ ))(Abb. 28, D). Zusätzlich war nach acht Monaten die Osteoklastenoberfläche im Verhältnis zu der Knochenoberfläche (Oc.S/BS ( $p = 0,006$ )) erhöht (Abb. 28, E). Der Anteil an Knochenvolumen am untersuchten Gewebevolumen (BV/TV) war dahingegen zum Zeitpunkt der drei Monatsmessung signifikant geringer als zu Beginn in der ODS Gruppe ( $p = 0,039$ ) (Abb. 28, A). Die ODS Gruppe zeigte sowohl nach drei Monaten als auch nach acht Monaten eine signifikante Erhöhung der Osteoklastenanzahl pro Knochenvolumen ( $p = 0,002$ ,  $p = 0,001$ ) (Abb. 30, A), Gewebevolumen ( $p = 0,003$ ,  $p = 0,016$ ) (Abb.30, B) und Knochenoberfläche ( $p = 0,015$ ,  $p = 0,028$ ) (Abb. 30, C) im Vergleich zur Gruppe K. Im Vergleich zu der OVX Gruppe war diese Erhöhung der Osteoklastenanzahl in Bezug auf das Knochenvolumen (Abb. 30, A) sowohl nach drei ( $p = 0,007$ ) als auch nach acht Monaten ( $p = 0,036$ ) signifikant. Die Osteoklastenanzahl war im Verhältnis zur Knochenoberfläche ( $p = 0,031$ ) (Abb. 30, C) und dem Gewebevolumen ( $p = 0,02$ ) jedoch nur zum Euthanasiezeitpunkt signifikant erhöht (Abb. 30, B).





### Abbildung 30: Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu den drei Zeitpunkten

Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist die Osteoklastenzahl pro Knochenvolumen (A), Gewebenvolumen (B) und Knochenoberfläche (C) in der ODS Gruppe nach drei und acht Monaten signifikant höher. Vergleicht man die ODS und die OVX Gruppen ist die Anzahl der Osteoklasten in Bezug auf das Knochenvolumen (A) in der ODS Gruppe nach drei und acht Monaten signifikant erhöht, im Verhältnis zum Knochenvolumen (A) ist dies erst nach acht Monaten zu sehen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen; \* $p \leq 0,05$  (Mann-Whitney-U Test bzw. Bonferroni post-hoc).

Der Anteil an Knochenvolumen am untersuchten Gewebevolumen (BV/TV) war dahingegen zum Zeitpunkt der drei Monatsmessung signifikant geringer als zu Beginn in der ODS Gruppe ( $p=0,039$ ) (Abb. 28, A). Die ODS Gruppe zeigte sowohl nach drei Monaten als auch nach acht Monaten eine signifikante Erhöhung der Osteoklastenzahl pro Knochenvolumen ( $p=0,002$ ,  $p=0,001$ ) (Abb. 30, A), Gewebenvolumen ( $p=0,003$ ,  $p=0,016$ ) (Abb. 30, B) und Knochenoberfläche ( $p=0,015$ ,  $p=0,028$ ) (Abb. 30, C) im Vergleich zur Gruppe K. Im Vergleich zu der OVX Gruppe war diese Erhöhung der Osteoklastenzahl in Bezug auf das Knochenvolumen (Abb. 30, A) sowohl nach drei ( $p=0,007$ ) als auch nach acht Monaten ( $p=0,036$ ) signifikant. Die Osteoklastenzahl war im Verhältnis zur Knochenoberfläche ( $p=0,031$ ) (Abb. 30, C) und dem Gewebevolumen ( $p=0,02$ ) jedoch nur zum Euthanasiezeitpunkt signifikant erhöht (Abb. 30, B).

In der Tabelle 14 sind die erhobenen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, welche durch die TRAP – Färbung erhoben wurden, aufgeführt.

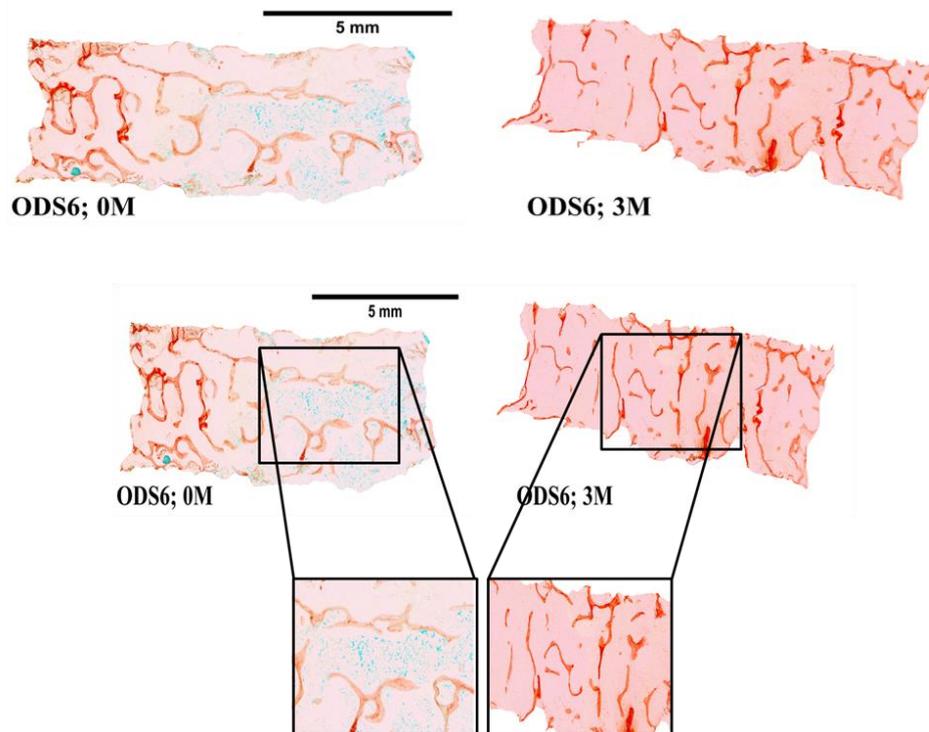
	0 Monate	3 Monate	8 Monate
<b>Kontrolle</b>	<b>n = 8</b>	<b>n = 8</b>	<b>n = 8</b>
T.Ar ( $\mu\text{m}^2$ )	1738659,972 ( $\pm 231158,034$ )	1680740,807 ( $\pm 160152,782$ )	1819797,438 ( $\pm 68992,236$ )
B.Ar ( $\mu\text{m}^2$ )	475252,865 ( $\pm 130139,398$ )	397303,645 ( $\pm 168205,699$ )	523789,335 ( $\pm 134675,904$ )
B.Pm ( $\mu\text{m}$ )	17011,745 ( $\pm 27149,359$ )	6586,323 ( $\pm 2705,396$ )	6731,519 ( $\pm 996,927$ )
BV/TV (%)	27,213 ( $\pm 6,814$ )	23,236 ( $\pm 8,78$ )	28,74 ( $\pm 7,017$ )
Oc.S/BS (%)	2,31 ( $\pm 3,322$ )	3,575 ( $\pm 4,77$ )	3,731 ( $\pm 5,297$ )
N.Oc/BS ( $\mu\text{m}$ )	0,0004 ( $\pm 0,0005$ )	$< 10^{-5}$	0,0002 ( $\pm 0,00017$ )
N.Oc/BV ( $\mu\text{m}^2$ )	$< 10^{-5}$		
N.Oc/TV ( $\mu\text{m}^2$ )	$< 10^{-5}$		
BS/TV ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ )	0,0088 ( $\pm 0,012$ )	0,0039 ( $\pm 0,0014$ )	0,0037 ( $\pm 0,00051$ )
<b>OVX</b>	<b>n = 5</b>	<b>n = 7</b>	<b>n = 7</b>
T.Ar ( $\mu\text{m}^2$ )	1724750,692 ( $\pm 140629,781$ )	1761842,105 ( $\pm 131137,947$ )	1808206,371 ( $\pm 9254,505$ )
B.Ar ( $\mu\text{m}^2$ )	513417,202 ( $\pm 79899,409$ )	492270,409 ( $\pm 162156,1077$ )	738949,356 ( $\pm 134675,904$ )
B.Pm ( $\mu\text{m}$ )	7706,9771 ( $\pm 2733,007$ )	6673,813 ( $\pm 1009,311$ )	6467,186 ( $\pm 2870,767$ )
BV/TV (%)	29,95 ( $\pm 5,329$ )	27,771 ( $\pm 8,169$ )	41,606 ( $\pm 25,266$ )
Oc.S/BS (%)	4,90 ( $\pm 3,78$ )	5,142 ( $\pm 3,38$ )	1,126 ( $\pm 1,532$ )
N.Oc/BS ( $\mu\text{m}$ )	0,0005 ( $\pm 0,00046$ )	0,0003 ( $\pm 0,0007$ )	0,0002 ( $\pm 0,00022$ )
N.Oc/BV ( $\mu\text{m}^2$ )	$< 10^{-5}$		
N.Oc/TV ( $\mu\text{m}^2$ )	$< 10^{-5}$		
BS/TV ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ )	0,0045 ( $\pm 0,0016$ )	0,0038 ( $\pm 0,00055$ )	0,0036 ( $\pm 0,00152$ )
<b>OD</b>	<b>n = 6</b>	<b>n = 8</b>	<b>n = 8</b>
T.Ar ( $\mu\text{m}^2$ )	1761842,105 ( $\pm 117293,346$ )	1854570,637 ( $\pm 85849,939$ )	1866161,704 ( $\pm 32784,487$ )
B.Ar ( $\mu\text{m}^2$ )	476134,545 ( $\pm 89991,273$ )	446362,5433 ( $\pm 236835,535$ )	649967,538 ( $\pm 345202,728$ )
B.Pm ( $\mu\text{m}$ )	7659,041 ( $\pm 1683,046$ )	6439,346 ( $\pm 1581,475$ )	6618,803 ( $\pm 1549,433$ )
BV/TV (%)	27,05 ( $\pm 4,98$ )	23,929 ( $\pm 12,216$ )	34,900 ( $\pm 18,712$ )
Oc.S/BS (%)	5,56 ( $\pm 10,97$ )	6,693 ( $\pm 4,22$ )	2,817 ( $\pm 2,238$ )
N.Oc/BS ( $\mu\text{m}$ )	0,0005 ( $\pm 0,00077$ )	0,0003 ( $\pm 0,001$ )	0,0007 ( $\pm 0,00051$ )
N.Oc/BV ( $\mu\text{m}^2$ )	$< 10^{-5}$		
N.Oc/TV ( $\mu\text{m}^2$ )	$< 10^{-5}$		
BS/TV ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ )	0,0044 ( $\pm 0,00096$ )	0,0035 ( $\pm 0,00072$ )	0,0035 ( $\pm 0,00084$ )
<b>ODS</b>	<b>n = 8</b>	<b>n = 8</b>	<b>n = 8</b>
T.Ar ( $\mu\text{m}^2$ )	1692295,706 ( $\pm 208823,101$ )	1761842,105 ( $\pm 164390,116$ )	1841323,704 ( $\pm 35048,091$ )
B.Ar ( $\mu\text{m}^2$ )	475414,024 ( $\pm 70820,883$ )	313570,533 ( $\pm 104474,191$ )	351439,503 ( $\pm 171915,385$ )
B.Pm ( $\mu\text{m}$ )	7381,315 ( $\pm 1896,745$ )	6619,715 ( $\pm 1739,192$ )	8210,468 ( $\pm 1990,606$ )
BV/TV (%)	28,611 ( $\pm 6,37$ )	18,184 ( $\pm 7,339$ )	19,066 ( $\pm 9,225$ )
Oc.S/BS (%)	1,46 ( $\pm 1,59$ )	5,501 ( $\pm 2,194$ )	4,085 ( $\pm 2,209$ )
N.Oc/BS ( $\mu\text{m}$ )	0,0002 ( $\pm 0,00018$ )	0,0007 ( $\pm 0,0012$ )	0,0008 ( $\pm 0,00034$ )
N.Oc/BV ( $\mu\text{m}^2$ )	$< 10^{-5}$		
N.Oc/TV ( $\mu\text{m}^2$ )	$< 10^{-5}$		
BS/TV ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ )	0,0044 ( $\pm 0,00116$ )	0,0037 ( $\pm 0,00092$ )	0,0045 ( $\pm 0,00107$ )

Tabelle 14: Datentabelle TRAP (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

Die Tabelle zeigt die erhobenen Daten der Osteoklastenauswertung mittels TRAP - Färbung anhand der Mittelwerte und der Standardabweichung. Gewebefläche (T.Ar), Knochenfläche (B.Ar), Knochenumfang (B.Pm), Knochenvolumen/Gewebvolumen (BV/TV), Osteoklastenoberfläche/Knochenoberfläche (Oc.S/BS), Osteoklastenanzahl/Knochenoberfläche (N.Oc/BS), Osteoklastenanzahl/Gewebvolumen (N.Oc/TV), Knochenoberfläche/Gewebvolumen (BS/TV, Anzahl der Tiere (n), Kontrollgruppe (K), Ovariectomiegruppe (OVX, Ovariectomie-Diätbehandlung-Gruppe (OD), Ovariectomie-Diät - Steroidinduktion-Gruppe (ODS).

### 3.4.2 Osteocalcin–Osteoblasten

Bei der Anfangsuntersuchung zum Zeitpunkt null Monate lagen keinerlei signifikante Unterschiede sowohl in den Knochenparametern (BV, TV), als auch in den relativen Parametern der Histomorphometrie (BV/TV, OV/BV) vor.



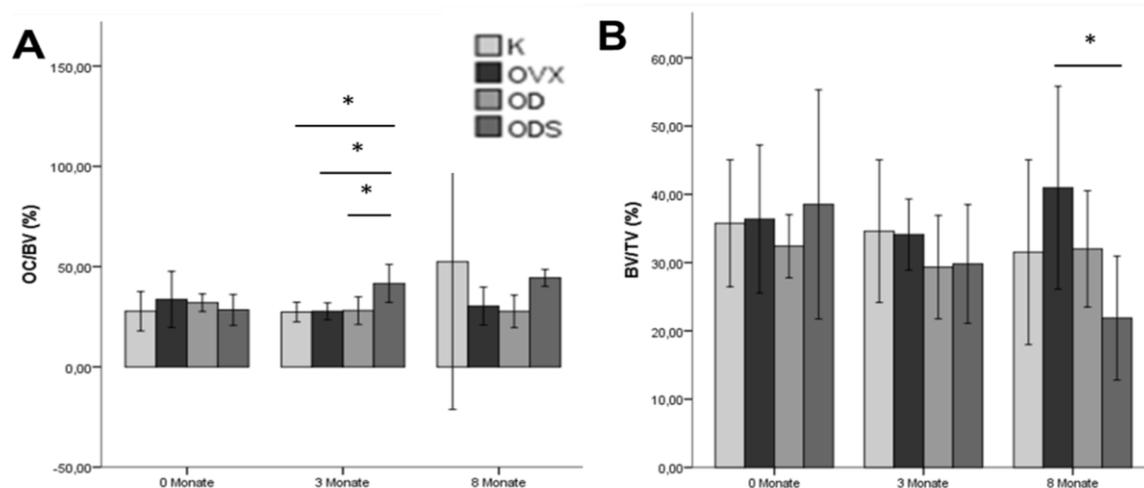
**Abbildung 31: Verhältnis Osteocalcin/Knochenvolumen in der ODS Gruppe im Vergleich zwischen Beginn (0M) und zum Zeitpunkt drei Monate (3M) in der Osteocalcin-Färbung**  
 Bereits nach drei Monaten zeigen die Knochenproben der ODS Gruppe eine signifikante Steigerung bezüglich des Verhältnisses des Osteocalcins zum Knochenvolumen (OC/BV). In der Vergrößerung ist zu erkennen, dass zum einen das Knochenvolumen abgenommen hat, da sich die Trabekel verdünnt darstellten, zum anderen nahm der Anteil der rot gefärbten Fläche (= Osteocalcin) des Knochens zu und daraus resultierend war das Verhältnis zwischen Osteocalcin und Knochenvolumen zum Zeitpunkt drei Monate gesteigert.

Nach einer Behandlungsdauer von drei Monaten zeigten die ODS Tiere eine signifikante Erhöhung ( $p=0,007$ ) in dem Verhältnis des Osteocalcins zum Knochenvolumen (OC/BV), dieses stieg von  $28,41 \pm 7,73$  % auf  $41,60 \pm 9,47$  % an. Dies deutete darauf hin, dass sich die Osteoblastenaktivität durch die Tripletinduktion in den ersten drei Monaten verdoppelt hat (Abb. 31).

Bezüglich dieses Verhältnisses zeigte die ODS Gruppe zum Zeitpunkt drei Monate signifikante Unterschiede zu den restlichen drei Gruppen (K:  $p=0,002$ , OVX:  $p=0,005$ , OD:  $p=0,003$ ). Die Werte der Kontroll-, OVX- und der OD Gruppe lagen alle bei circa 30 %, während die ODS Gruppe bei  $41,60 \pm 9,47$  lag.

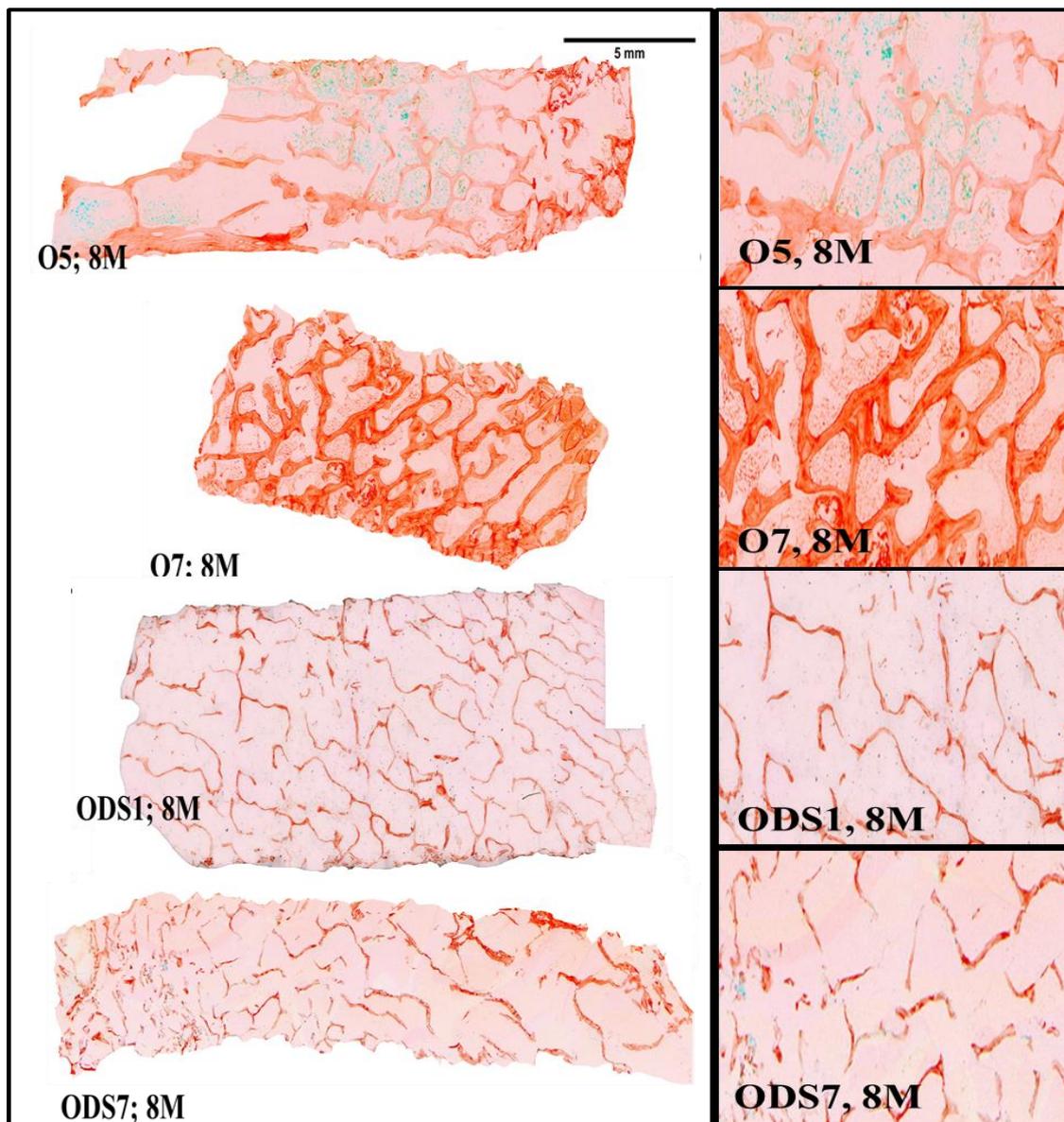
Daraus lässt sich nicht nur schlussfolgern, dass die ODS Gruppe sowohl im Vergleich zum Zeitpunkt drei Monate eine erhöhte Osteoblastenaktivität aufwies, sondern dass die Tripletinduktion die Osteoblastenaktivität im Vergleich zu der Mono- und der Dualbehandlung als einzige in den ersten drei Monaten Osteoblastenaktivität steigerte. Zum Ende des Versuch nach acht Monaten war diese signifikante Erhöhung des Osteocalcins in Bezug auf das Knochenvolumen nur noch im Vergleich zwischen der OVX und der ODS Gruppe ( $p=0,028$ ) nachweisbar.

Nach acht Monaten Versuchslaufzeit wiesen alle Gruppen einen signifikanten Unterschied der absoluten Gewebefläche auf (K:  $p=0,014$ , OVX:  $p=0,007$ , OD:  $p=0,004$ , ODS:  $p=0,003$ ). Die Gruppen K, OVX und ODS zeigten diesen auch in dem Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen zwischen dem Zeitpunkt drei und acht Monaten (K:  $p=0,011$ , OVX:  $p=0,049$ , ODS:  $p=0,011$ ). In Bezug auf die absolute Knochenfläche wiesen die Gruppen OVX, OD und ODS zwischen Beginn (0 Monate) und Euthanasie (8 Monate) einen signifikanten Unterschied (OVX:  $p=0,004$ , OD:  $p=0,016$ , ODS:  $p=0,0499$ ), im Sinne einer Zunahme der Knochenfläche, auf, während dies zwischen den Zeitpunkten drei und acht Monaten nur bei der OVX Gruppe zu beobachten war. Setzt man diese beiden absoluten Werte jedoch ins Verhältnis zueinander, war nur zwischen den Tieren der OVX und den Tieren der ODS Gruppe zum Euthanasiezeitpunkt (8 Monate) eine signifikante Steigerung feststellbar ( $p=0,033$ ). Das Verhältnis zwischen Knochenvolumen und dem absoluten Gewebevolumen war nach acht Monaten in der Gruppe der Tripletherapie signifikant geringer als in der ovariektomierten Gruppe.



### Abbildung 32: Unterschiede zwischen den Gruppen im Versuchsverlauf

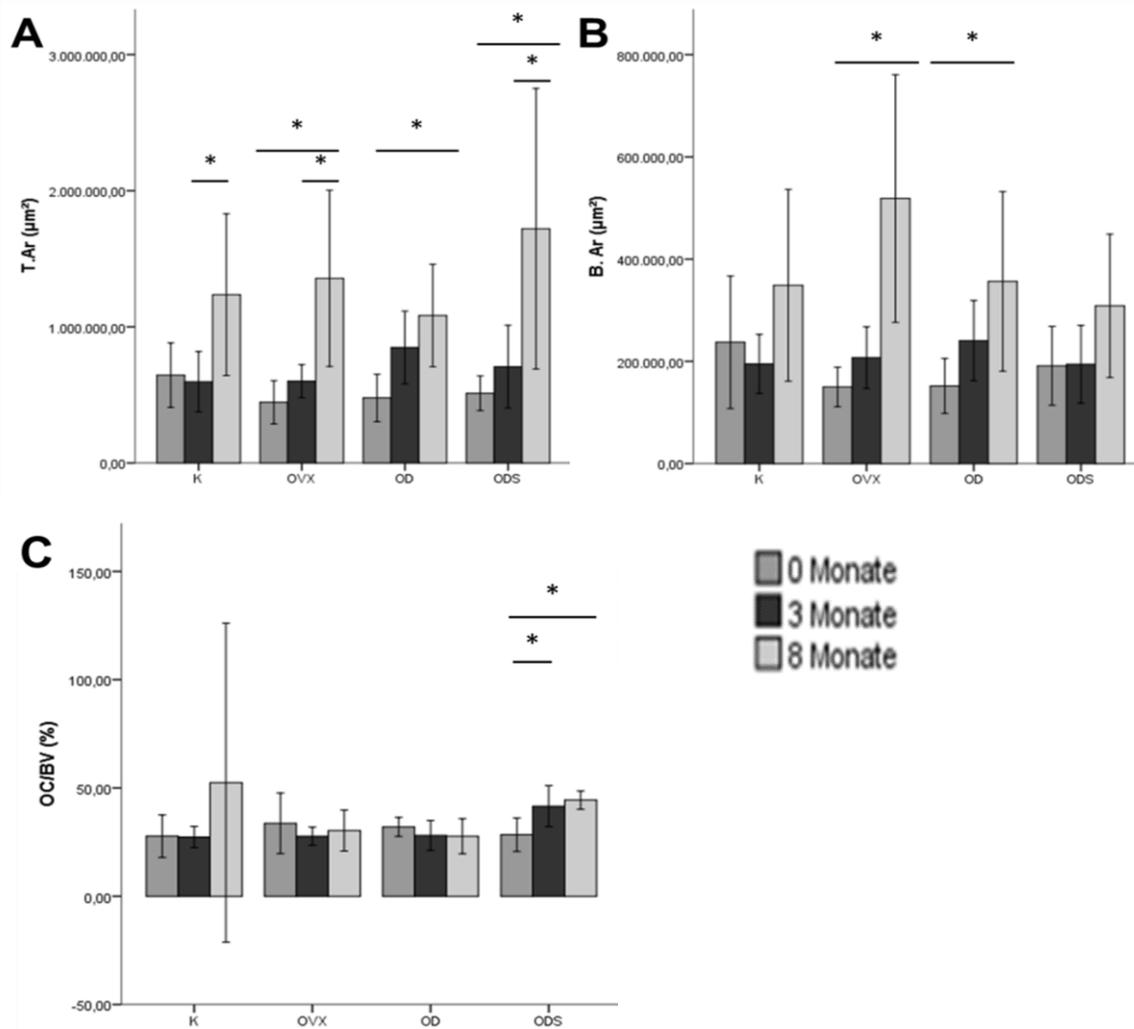
Nach drei Monaten ist im Vergleich zu den anderen Gruppen der Anteil der Osteocalcinfläche am Knochenvolumen in der ODS Gruppe höher (A). Nach 8 Monaten ist der Anteil des Knochenvolumens am gesamten Gewebevolumen in der ODS Gruppe signifikant geringer als in den anderen Versuchsgruppen (B). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen;  $*p \leq 0,05$  (Mann-Whitney-U Test bzw. Bonferroni post-hoc).



**Abbildung 33: Vergleich der OVX und ODS Gruppen zum Euthanasiezeitpunkt (8M)**

Nach acht Monaten ist der Anteil des Knochenvolumens am gesamten Gewebenvolumen in der ODS Gruppe ( $p=0,033$ ) signifikant geringer als in der O Gruppe. Dargestellt sind die Tiere O5 und O7 aus der Ovariectomiegruppe und die Tiere ODS1 und ODS7 der Ovariectomie – Diät – Steroidtherapie – Gruppe zum Zeitpunkt acht Monate. Sowohl in der Vergrößerung als auch in den Übersichtsaufnahme ist zu erkennen, dass in der ODS Gruppe das Knochenvolumen durch eine Abnahme der Trabekeldicke, -vernetzung und -qualität abnimmt und aufgrund dessen der Anteil des Knochenvolumens am Gewebenvolumen insgesamt geringer wird.

Die Tiere der ODS Gruppe zeigten eine höheren Anteil der Osteocalcinfläche am Knochenvolumen zum Zeitpunkt drei Monate als die Tiere der anderen Gruppen (K:  $p=0,002$ , OVX:  $p=0,005$ , OD:  $p=0,003$ ) (Abb. 32, A). Zum Zeitpunkt der Euthanasie zeigte die ODS Gruppe einen wesentlich geringeren Anteil des Knochenvolumens an dem untersuchten Gewebenvolumen als die OVX Gruppe ( $p=0,033$ ) (Abb. 32, B) (Abb. 33).



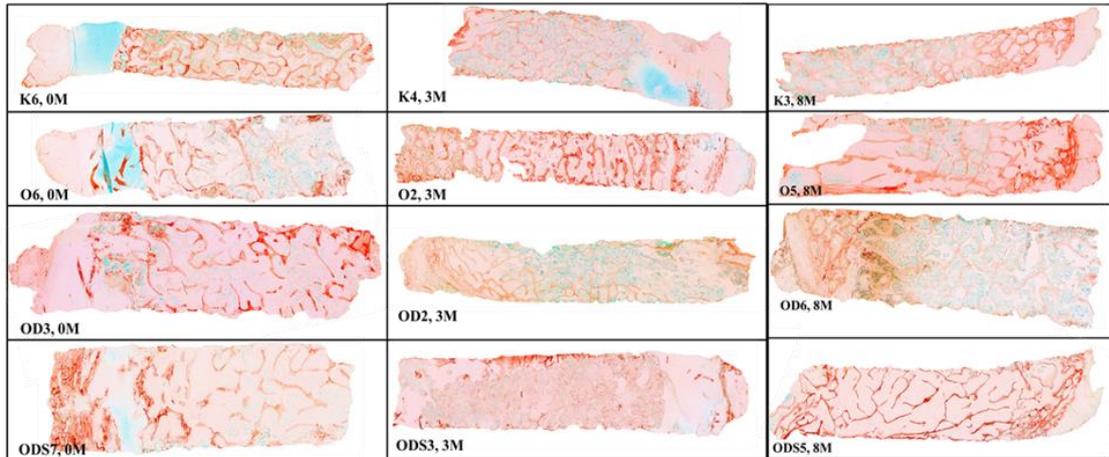
#### Abbildung 34: Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen im Versuchsverlauf

Nach acht Monaten zeigen die Gruppen K, OVX und ODS signifikante Unterschiede bei der absoluten Gewebefläche im Vergleich zu den vorherigen Untersuchungszeitpunkten (A). Bei der absoluten Knochenfläche zeigt sich dieser Unterschied nur in den Gruppen OVX und OD zwischen Versuchsbeginn und -ende. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen;  $*p \leq 0,05$  (Mann-Whitney-U Test bzw. Bonferroni post-hoc).

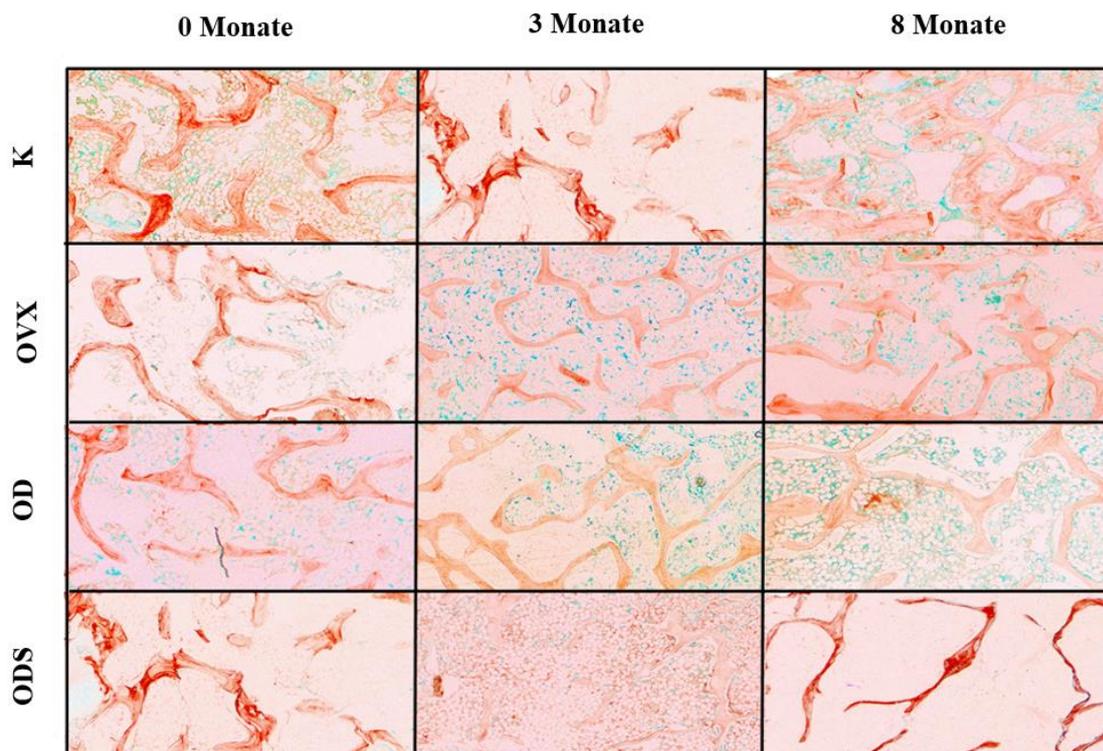
Die absolute Gewebefläche zeigte bei den Gruppen K, OVX und ODS zum Zeitpunkt 8 Monate sowohl im Vergleich zum Versuchsbeginn (0 Monate, K:  $p=0,014$ , OVX:  $p=0,007$ , ODS:  $p=0,003$ ) als auch zum Zeitpunkt drei Monate (K:  $p=0,011$ , OVX:  $p=0,018$ , ODS:  $p=0,011$ ) signifikante Unterschiede (Abb. 34, A). Es zeigte sich, dass die absolute Gewebefläche im Versuchsverlauf zunahm, sodass zum Zeitpunkt acht Monate in den Gruppen K, OVX und ODS eine signifikante Vergrößerung der Gewebefläche sowohl im Vergleich zum Zeitpunkt null Monate als auch zum Zeitpunkt drei Monate vorlag. Bei der absoluten Knochenfläche zeigte sich diese signifikante Steigerung nur zwischen Beginn und Ende des Versuchs in den Gruppen OVX ( $p=0,004$ ) und OD ( $p=0,016$ ) (Abb. 34, B). Zum Zeitpunkt drei Monate zeigte sich in der Gruppe ODS ein

erhöhter Anteil der Osteocalcinfläche an dem Knochenvolumen im Vergleich zu Beginn des Versuchs ( $p=0,02$ ). Dies ist auch im Vergleich des Euthanasiezeitpunktes mit dem Versuchsbeginn zu beobachten ( $p=0,001$ ) (8 Monate) (Abb. 34, C).

A



B



**Abbildung 35: Repräsentative Beckenkammbiopsien der durchschnittlichen Ergebnisse der Versuchsgruppen zu den drei Zeitpunkten in der Osteocalcinfärbung in der Übersichtsaufnahme (A) und in der Vergrößerung (B)**

Zu Versuchsbeginn (0 Monate) wiesen alle Versuchstiere einen gleichen Knochenstatus. Nach drei Monaten zeigten die ODS Tiere eine signifikante Erhöhung in dem Verhältnis des Osteocalcins zum Knochenvolumen (OC/BV). Das Verhältnis OC/BV ist in der Gruppe ODS höher als in den Gruppen K, OVX oder OD. Nach acht Monaten zeigte sich dies nur noch im Vergleich zwischen der OVX und der ODS Gruppe. T.Ar. und B.Ar. nahmen bei allen vier Gruppen nach acht Monaten im Vergleich zum Beginn (0 Monate) ab. Das Verhältnis T.Ar./B.Ar war nur zwischen der OVX und der ODS Gruppe nach acht Monaten signifikant gestiegen.

In Tabelle 15 sind die erhobenen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, welche durch die Osteocalcinfärbung erhoben wurden, aufgeführt.

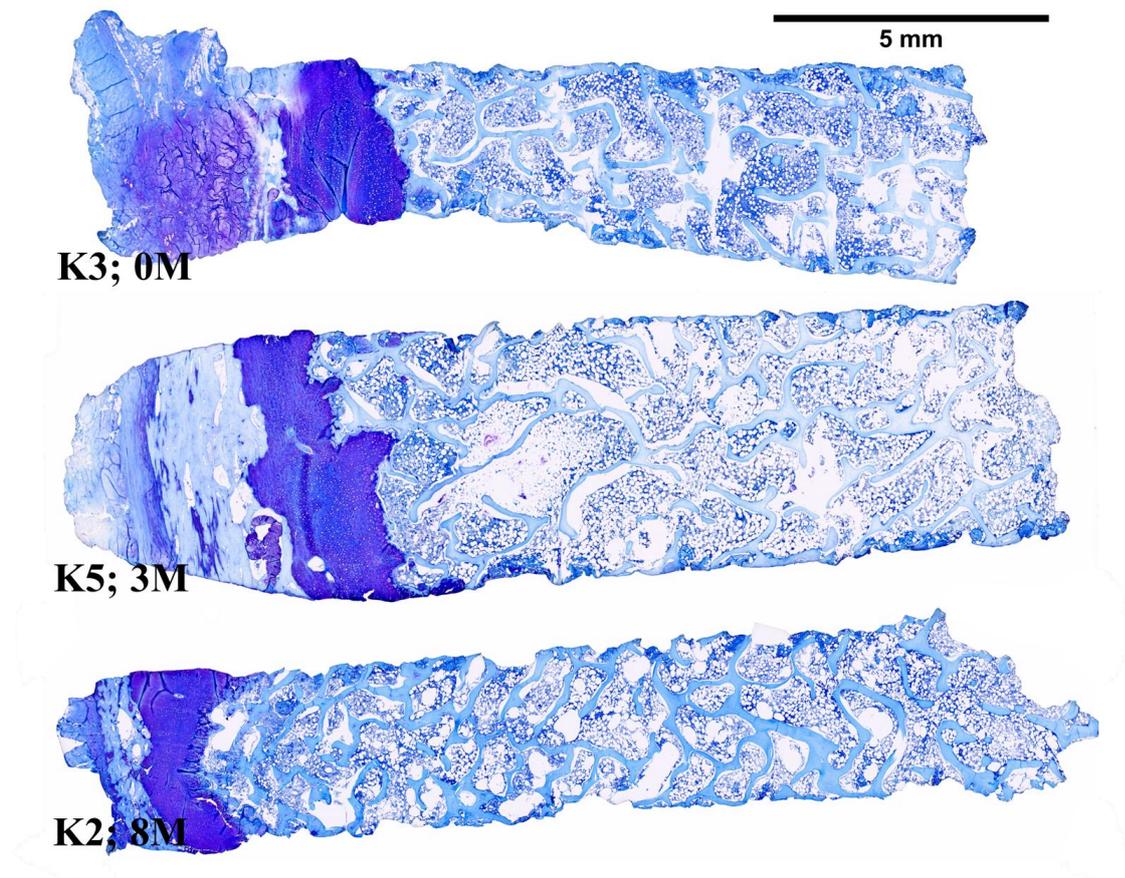
	0 Monate	3 Monate	8 Monate
<b>Kontrolle</b>	<b>n = 8</b>	<b>n = 8</b>	<b>n = 8</b>
T.Ar ( $\mu\text{m}^2$ )	645218,280( $\pm$ 237038,322)	597294,114( $\pm$ 221125,166)	1236329,664( $\pm$ 594087,588)
B.Ar ( $\mu\text{m}^2$ )	237323,713( $\pm$ 129361,4575)	194984,507( $\pm$ 57722,061)	348930,991( $\pm$ 187707,696)
BV/TV (%)	35,77( $\pm$ 9,29)	34,60( $\pm$ 10,45)	31,52( $\pm$ 13,54)
OC/BV (%)	27,73( $\pm$ 9,82)	27,36( $\pm$ 0,049)	52,44( $\pm$ 73,66)
<b>OVX</b>	<b>n = 5</b>	<b>n = 6</b>	<b>n = 7</b>
T.Ar ( $\mu\text{m}^2$ )	446379( $\pm$ 158874,581)	601008,651( $\pm$ 121214,501)	1356501,686( $\pm$ 647678,052)
B.Ar ( $\mu\text{m}^2$ )	150045,318( $\pm$ 38505,426)	207254,359( $\pm$ 60292,298)	518698,600( $\pm$ 242429,281)
BV/TV (%)	36,39( $\pm$ 10,83)	34,11( $\pm$ 5,20)	40,95( $\pm$ 14,86)
OC/BV (%)	33,66( $\pm$ 14,02)	27,72( $\pm$ 4,22)	30,35( $\pm$ 9,46)
<b>OD</b>	<b>n = 6</b>	<b>n = 8</b>	<b>n = 8</b>
T.Ar ( $\mu\text{m}^2$ )	478166,989( $\pm$ 174251,383)	848834,550( $\pm$ 266981,452)	1083327,666( $\pm$ 376347,365)
B.Ar ( $\mu\text{m}^2$ )	151881,527( $\pm$ 53566,237)	240666,396( $\pm$ 78469,721)	356445,543( $\pm$ 175682,912)
BV/TV (%)	34,21( $\pm$ 4,62)	29,33( $\pm$ 7,56)	32,01( $\pm$ 8,51)
OC/BV (%)	31,99( $\pm$ 4,37)	28,07( $\pm$ 6,89)	27,72( $\pm$ 6,76)
<b>ODS</b>	<b>n = 8</b>	<b>n = 8</b>	<b>n = 7</b>
T.Ar ( $\mu\text{m}^2$ )	512363,871( $\pm$ 126641,918)	707557,349( $\pm$ 303882,362)	1720944,649( $\pm$ 1030761,318)
B.Ar ( $\mu\text{m}^2$ )	191237,221( $\pm$ 77254,078)	194243,475( $\pm$ 76073,078)	308664,3896( $\pm$ 140256,358)
BV/TV (%)	38,53( $\pm$ 16,78)	29,81( $\pm$ 8,70)	21,87( $\pm$ 9,06)
OC/BV (%)	28,41( $\pm$ 0,7,73)	41,60( $\pm$ 9,46)	44,39( $\pm$ 4,22)

**Tabelle 15: Datentabelle Osteocalcin (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)**

Die Tabelle zeigt die erhobenen Daten der Osteblastenauswertung mittels Osteocalcin-Färbung anhand der Mittelwerte und der Standardabweichungen.

### 3.4.3 Semiquantitative Analyse mit Toluidinblau O

Bei der Erhebung der Ausgangswerte zum Beginn des Versuchs erfüllten die Tiere der ODS und OVX Gruppe hinsichtlich der Trabekelqualität die Erwartungen, während die anderen Gruppen hier etwas schlechtere Qualität zeigten. Die Mineralisation der Knochenmatrix war bei allen Tieren gleichermaßen gut ausgeprägt. Die Vernetzung der Trabekel war jedoch bei der OD Gruppe am besten ausgebildet, am schlechtesten in der OD Gruppe. Der Knochenzwischenraum wies bei allen vier Gruppen im Wesentlichen Fibroblasten und einzelne Adipozyten auf. Gelegentlich waren auch Blutgefäße auszumachen.

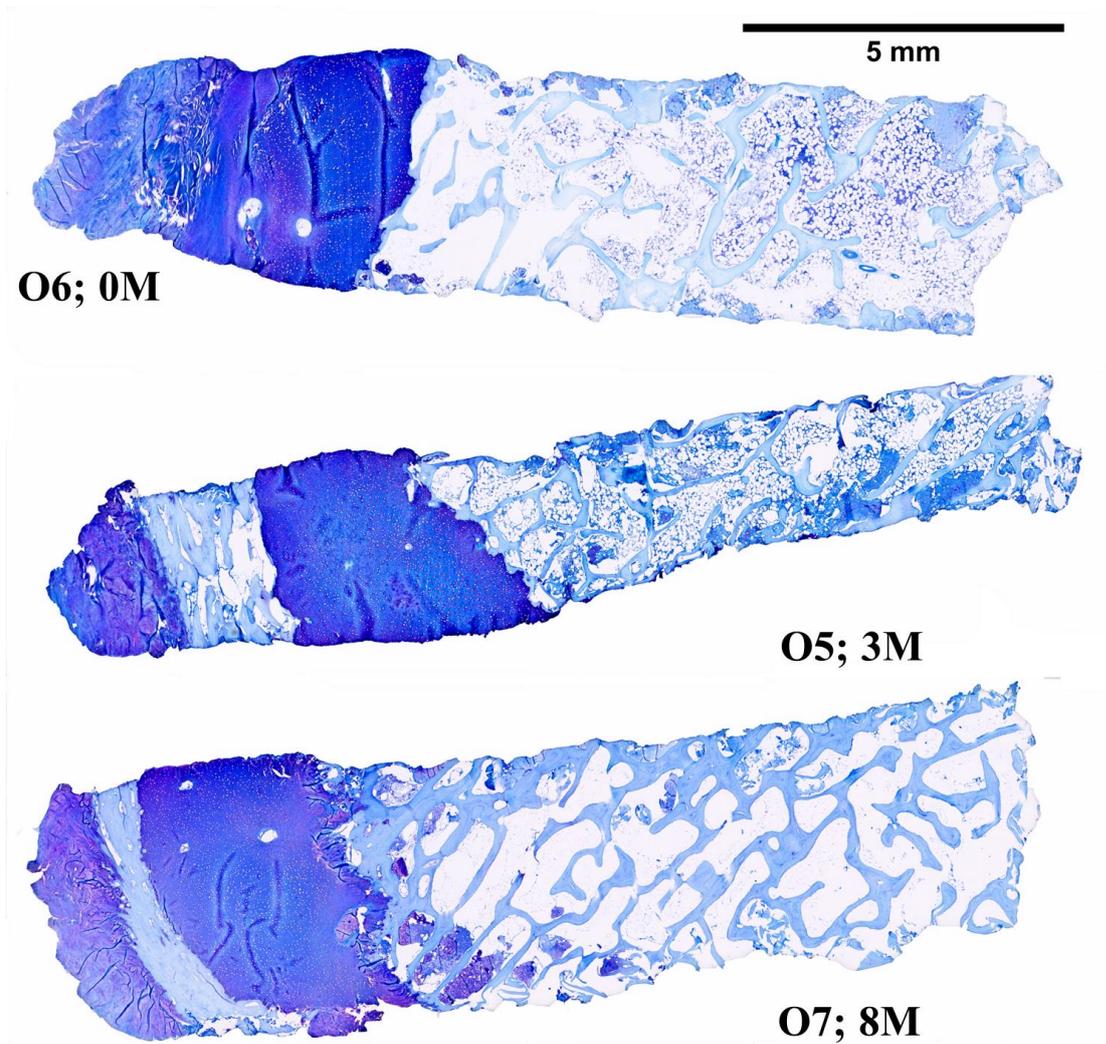


**Abbildung 36: Entwicklung der Knochenstruktur innerhalb der Kontrollgruppe in der Toluidinblau O – Färbung**

*In den ersten drei Monaten zeigte sich ein Verlust an Trabekelqualität und -vernetzung. Nach acht Monaten konnte annähernd die gleiche Knochenqualität wie zu Beginn des Versuchs beobachtet werden.*

Die Kontrollgruppe verlor entgegen den Erwartungen sowohl an Trabekelqualität als auch an struktureller Vernetzung in den ersten drei Monaten, wohingegen zwischen den Trabekeln eine hohe Zelldichte auszumachen war. Die Kortikalis wies bei allen Proben dieser Gruppe zum Zeitpunkt drei Monaten einen hohen Knorpelanteil auf.

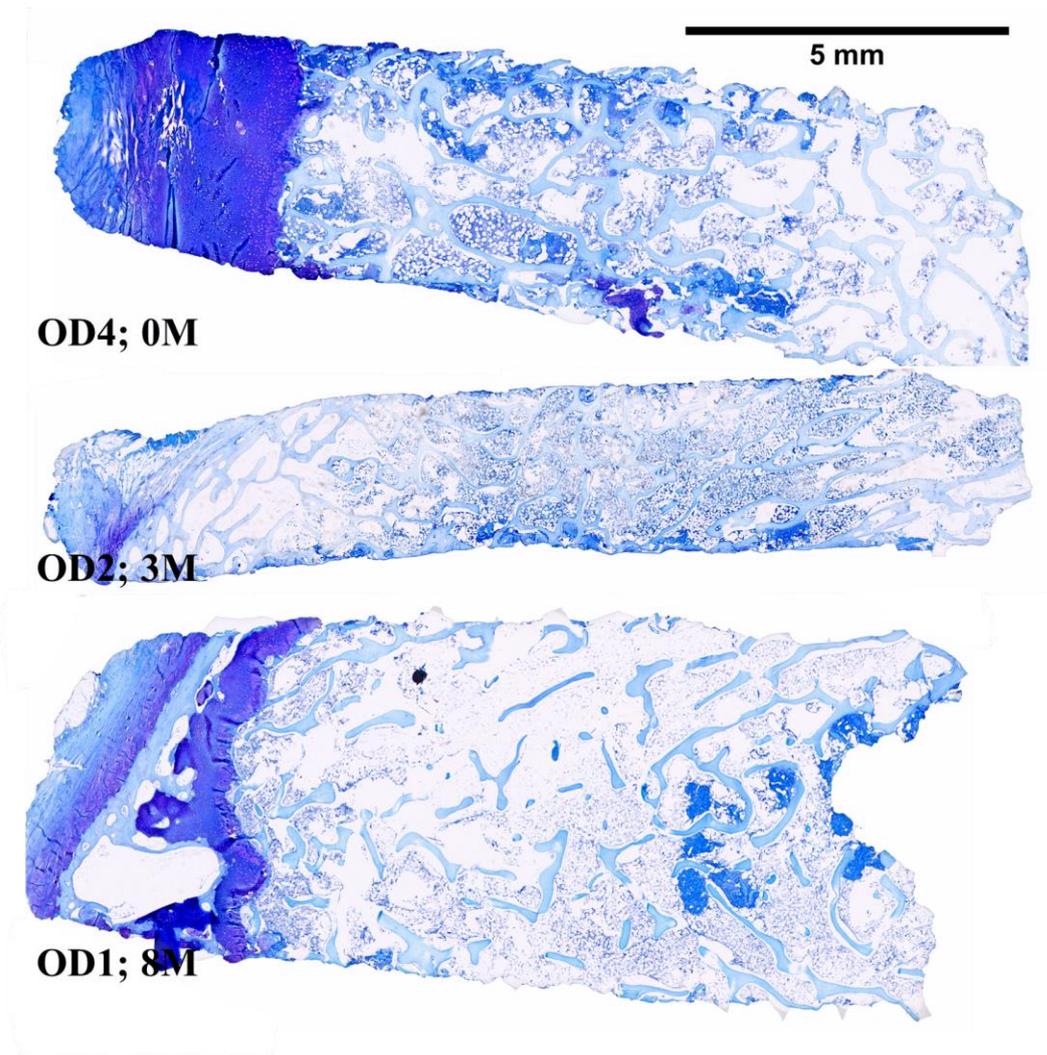
Nach acht Monaten wiesen die Proben im Wesentlichen dieselbe Qualität auf, wie zu Beginn des Versuches.



**Abbildung 37: Entwicklung der Knochenstruktur innerhalb der OVX Gruppe in der Toluidinblau O – Färbung**

*Die OVX Gruppe zeigte innerhalb der ersten drei Monate einen Verlust an Trabekeldicke und –vernetzung. Nach acht Monaten konnte eine ähnlicher Knochenstatus wie zu Beginn des Versuchs mit einem hohen Anteil an nicht mineralisiertem Osteoid beobachtet werden.*

Eine ähnliche Entwicklung im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die Tiere der OVX Gruppe. Nach drei Monaten war sowohl die Trabekeldicke als auch deren Vernetzung schlechter ausgebildet als zu Beginn des Versuchs. Aber auch bei dieser Gruppe näherte sich der Knochenstatus nach acht Monaten dem Ausgangsbild wieder an. Zudem war zum Zeitpunkt acht Monate viel unmineralisiertes Osteoid auszumachen. Daraus lässt sich schließen, dass die Gruppen K und OVX von Ende Oktober bis Anfang Februar an Knochenmasse und –qualität verloren, diese aber bis Ende Juni wiederaufbauten (Abb. 37).

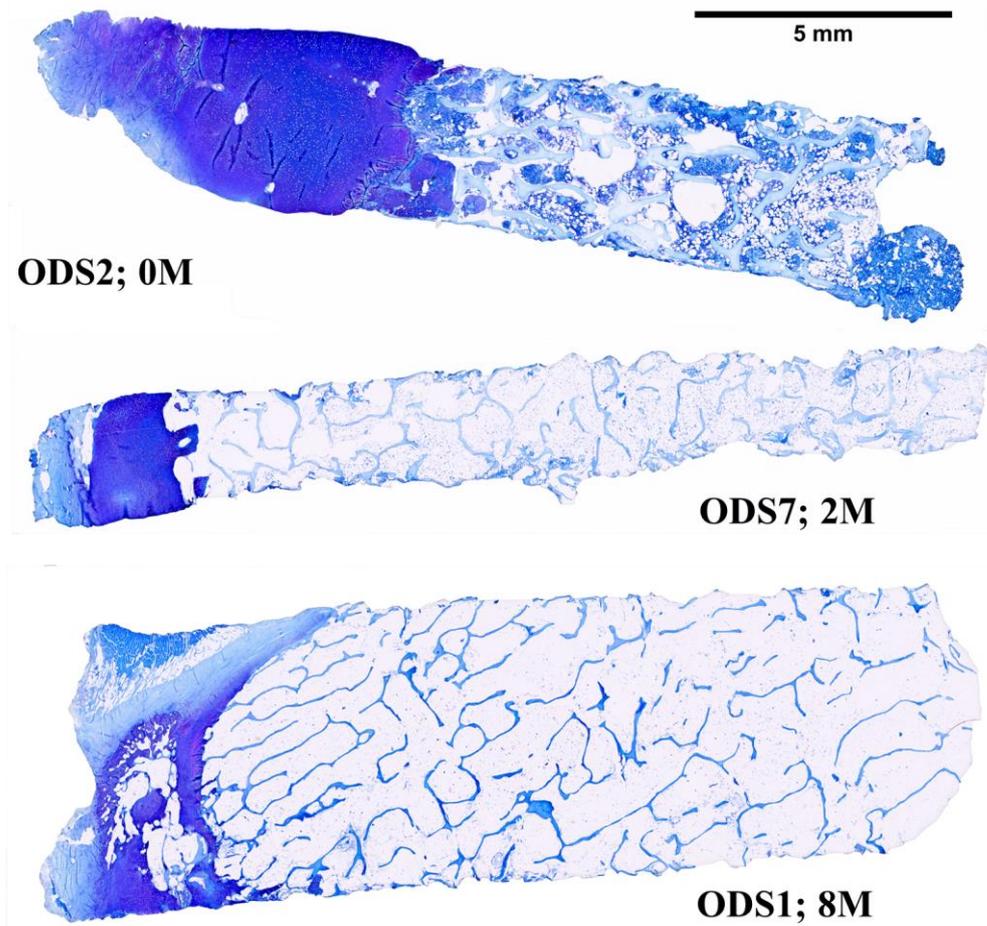


**Abbildung 38: Entwicklung der Knochenstruktur innerhalb der OD Gruppe in der Toluidinblau O – Färbung**

*Innerhalb der OD Gruppe zeigte sich nach drei Monaten dünne Trabekel, die jedoch eine höhere Vernetzung als zum Zeitpunkt 0M aufwiesen. Zum Zeitpunkt 8M verloren die Trabekel weiter an Dicke und auch die Vernetzung zeigte sich wesentlich schlechter als zu den Zeitpunkten 0M und 3M.*

Zum Zeitpunkt drei Monate zeigten die OD Tiere dünnere Trabekel als zu Beginn, jedoch wurde dies durch eine höhere Vernetzungsrate der Trabekel kompensiert. Der Knochenzwischenraum war mit zahlreichen Adipozyten angereichert, ebenso zeigten sich vermehrt Osteoklasten. Insgesamt machten die Proben einen Eindruck der erhöhten Aktivität mit viel Osteoid, vermehrten Blutgefäßen und Osteoklasten.

Nach acht Monaten zeigten sich sehr dünne Trabekel, die nun auch eine schlechte Vernetzung aufwiesen (Abb. 38). Es zeigten sich auch viele unterbrochenen Trabekel. Im Knochenzwischenraum zeigte sich eine geringe Zellpopulation, die größtenteils aus Adipozyten bestand.

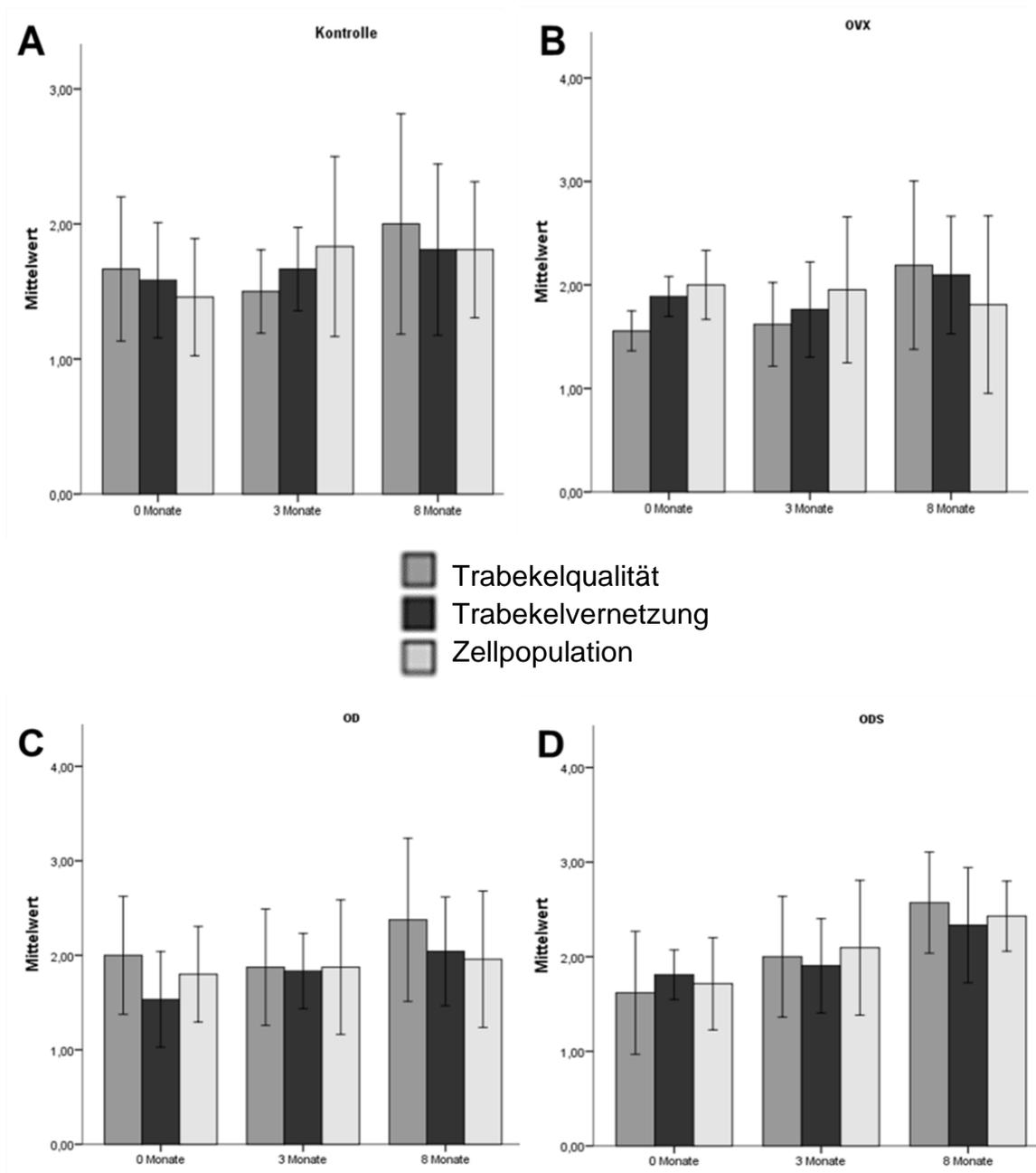


**Abbildung 39: Entwicklung der Knochenstruktur innerhalb der ODS Gruppe in der Toluidinblau O-Färbung**

*Die Proben der ODS Gruppe zeigte eine schnelle und kontinuierliche Verschlechterung der Trabekeldichte, -struktur und deren -vernetzung. Zwischen den Zeitpunkten 0M und 3M war die Veränderung dabei wesentlich deutlicher als zwischen 3M und 8M.*

Eine kontinuierliche Verschlechterung in allen Bereichen und damit den Erwartungen entsprechend, konnte bei der ODS Gruppe beobachtet werden. Zu Versuchsbeginn zeigten sie einen ähnlichen Knochenstatus wie die anderen drei Gruppen. Bereits nach drei Monaten zeigten sich sehr dünne, brüchig wirkende Trabekel. Darunter auch viele vereinzelte Trabekel, die keine Verbindung zu anderen Trabekeln zu haben schienen. Die Zellpopulation war sehr gering ausgeprägt, wenn doch Zellen vorhanden waren, handelte es sich meist um große Adipozyten.

Im weiteren Verlauf verschlechterte sich sowohl die Trabekelqualität als auch deren Vernetzung weiter, jedoch waren die Veränderungen zwischen Zeitpunkt 3M und Zeitpunkt 8M wesentlich geringer als zwischen den ersten beiden Zeitpunkten (Abb. 39). Zusätzlich war auch eine Abnahme des kortikalen Anteils an den Beckenkammstanzen im Verlauf zu beobachten.

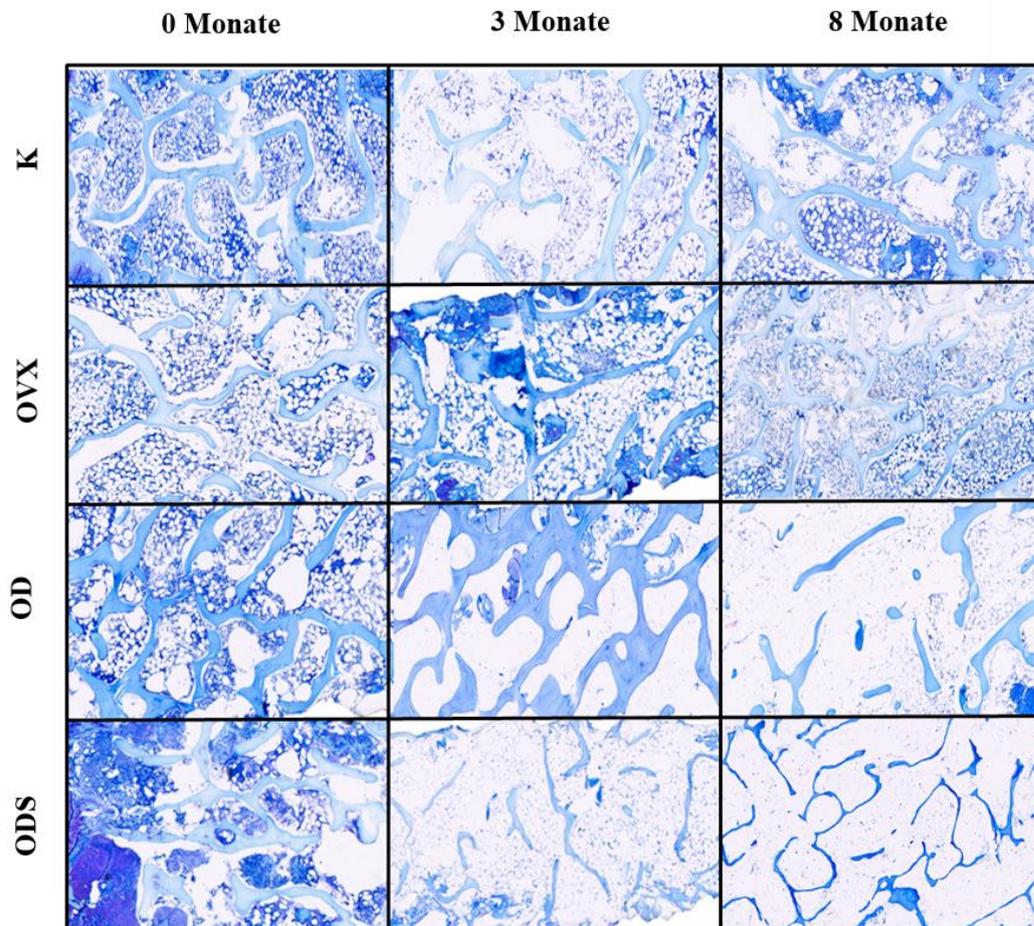


#### Abbildung 40: Beurteilung des Knochenstatus mittels Toluidinblau O

In den ersten drei Monaten zeigten die Gruppen K und OVX entgegen der Erwartungen eine Verschlechterung des Knochenstatus, diese regenerierten sich bis zum Zeitpunkt 8M jedoch wieder (A, B). Der Knochenstatus der Gruppe OD erfüllte zum Zeitpunkt 3M die Erwartungen, nach 8 Monaten war der Knochenstatus sogar schlechter, als ohne eine Glukokortikoidgabe zu erwarten war. Der Knochenstatus der Gruppe ODS verschlechterte sich in Trabekelqualität,- vernetzung und der Zellpopulation im Knochenzwischenraum kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum.

Die Gruppen K und OVX zeigten gegen die Erwartungen eine Verschlechterung des Knochenstatus in den ersten drei Monaten, dieser normalisierte sich zum Ende hin wieder weitestgehend (Abb. 40, A + B). Nach acht Monaten nahm die Trabekelqualität deutlicher ab (Abb. 40, C). In der ODS Gruppe konnte eine kontinuierliche Abnahme der Trabekelqualität,- vernetzung und der Zellpopulation im Knochenzwischenraum

beobachtet werden (Abb. 40, D). Dargestellt sind jeweils die beobachteten Veränderungen bezogen auf den zu erwartenden Knochenstatus je Versuchsgruppe und Zeitpunkt. Dabei entspricht der Wert 2 der jeweils gesetzten Norm. Hierfür wurde jeweils eine repräsentative Probe jeder Gruppe zu den unterschiedlichen Zeitpunkten als Vergleichsobjekt herangezogen (Abb. 41).



**Abbildung 41: Detailansicht repräsentativer Beckenkammbiopsien der durchschnittlichen Ergebnisse der Versuchsgruppen zu den drei Zeitpunkten in der Toluidinblau O-Färbung**

Die Kontrollgruppe (K) und die Ovariectomie-Gruppe (OVX) hatten nach drei Monaten einen geringfügig schlechteren Knochenstatus als zu Beginn (0 Monate), dies zeigte sich u.a. in einer geringeren Trabekeldicke. Vergleicht man diese beiden Gruppen zum Beginn (0 Monate) und zum Ende (8 Monate), konnte ein fast identischer Knochenstatus beobachtet werden. Die Ovariectomie-Diättherapie-Gruppe (OD) zeigte nach drei Monaten teilweise dünnere Trabekel als zu Beginn, jedoch mit einer höheren Vernetzungsrate der Trabekel. Insgesamt zeigten die Proben eine erhöhte Aktivität mit viel Osteoid, vermehrten Blutgefäßen und Osteoklasten. Nach acht Monaten Versuchsverlauf zeigte sich ein schlechter Knochenstatus mit ausgedünnten Trabekeln, geringer Trabekelvernetzung und wenig Zellen in dem Knochenzwischenraum. Eine kontinuierliche Verschlechterung in Trabekeldicke, -vernetzung und Zellpopulation konnte bei der Ovariectomie-Diät-Steroidtherapie-Gruppe (ODS) beobachtet werden. Nach drei Monaten zeigten sich sehr dünne, brüchig wirkende Trabekel ohne ausgeprägte Vernetzung. Im weiteren Versuchsverlauf verschlechterte sich sowohl die Trabekelqualität als auch deren Vernetzung weiter, jedoch waren die Veränderung zwischen Zeitpunkt 3M und Zeitpunkt 8M wesentlich geringer als zwischen den ersten beiden Zeitpunkten.

## 4 Diskussion

Im Rahmen des Teilprojekts T1 am Standort Gießen des Sonderforschungsbereichs/Transregio 79 (SFB/TRR 79) sollte durch verschiedene Induktionsverfahren ein osteoporotischer Knochenstatus beim Großtiermodell Schaf induziert und untersucht werden. Die Evaluierung eines geeigneten Tiermodells bietet einzigartige Möglichkeiten *in vivo* die Entstehung einer Krankheit und deren Folgen zu beobachten und zu verstehen, sowie mögliche Therapien zu entwickeln. In der Osteoporoseforschung ist zudem ein geeignetes Tiermodell zur Erprobung neuer Knochenersatzmaterialien und Implantate dringend erforderlich.

In der vorliegenden experimentellen Studie wurden zu diesem Zweck 31 hessische Merinolandschafe in eine Kontrollgruppe (n=8) und in drei experimentelle Gruppen aufgeteilt. Diese drei Gruppen wurden alle bilateral ovariektomiert, zwei erhielten eine Vitamin – D – und kalziumarme Diät und eine Gruppe erhielt zusätzlich regelmäßige Glukokortikoidgaben. Die Untersuchungszeitpunkte lagen zu Beginn des Versuchs, bei drei Monaten und bei acht Monaten zum Zeitpunkt der Euthanasie.

Um die Veränderungen der Knochendichte im Verlauf und zum Ende des Versuches beurteilen zu können, wurde mittels Dual–energy–X–Ray absorptiometry (DEXA) die Knochenmineraldichte (BMD) an der Lendenwirbelsäule, dem rechten Radius und dem Becken bestimmt. Vor allem in den ersten drei Monaten war ein rapider Verlust an Knochenmineraldichte (BMD) in der ODS Gruppe zu beobachten, der sich bis zum Ende des Versuchs geringer, aber kontinuierlich fortsetzte.

Die zellulären Veränderungen des Knochenstoffwechsels wurden durch die enzymhistochemische Färbung der Osteoklasten und der immunhistochemischen Färbung in den Beckenkammbiopsien histomorphometrisch beurteilt. Zusätzlich wurde, anhand eines semiquantitativen Verfahrens, an mit Toluidinblau O gefärbten Proben aus dem Beckenkamm, die Struktur der Trabekel, deren Qualität und Vernetzung analysiert. Hier zeigte sich insbesondere nach drei Monaten Behandlungsdauer in der ODS Gruppe sowohl ein signifikant höhere Osteoklasten-, und Osteoblastenaktivität, als auch eine deutliche Verschlechterung des trabekulären Knochens in den Beckenkammbiopsien.

In der folgenden Diskussion wird auf die angewandte Methodik und die Ergebnisse der radiologischen und histomorphometrischen Untersuchungen genauer eingegangen und anschließend in einen breiteren Kontext gestellt und analysiert.

## 4.1 Methodik

### 4.1.1 Knochendichtemessung

Im heutigen klinischen Alltag haben sich folgende vier radiologische Verfahren zur Diagnostik der Osteoporose etabliert:

1. konventionelles Röntgen
2. Dual-energy-X-Ray absorptiometry (DEXA)
3. quantitative Computertomographie
4. Osteosonografie

Das konventionelle Röntgen ist am einfachsten und am schnellsten durchzuführen. Im klinischen Alltag findet diese Methode ihre Anwendung vor allem in der Diagnostik von osteoporotischen Frakturen als auch für die Abgrenzung der Osteoporose gegenüber anderen Erkrankungen beispielsweise die Osteomalazie, die die Knochendichte beeinflussen können. Für die Diagnostik von einer Osteopenie oder Osteoporose im Anfangsstadium ist sie jedoch unbrauchbar (Lewiecki, 2005), da erst ein Knochenmineralverlust von 30 bis 40 % nachgewiesen werden kann.

Die Methode der quantitativen Computertomographie bietet momentan die einzige Möglichkeit die Knochenmineraldichte volumetrisch in  $\text{g}/\text{cm}^3$  zu ermitteln. Zudem ist die Unterscheidung von trabekulärem und kortikalem Knochen möglich (Prevrhal und Genant, 1999).

Nachteilig ist, dass die Messung zum einen von dem Knochen umgebendem Gewebe, als auch in hohem Maße vom Fettgehalt der zu untersuchenden Region beeinflusst wird. Dadurch entsteht der sogenannte „Fettfehler“, der durch den im Alter zunehmenden Fettanteil im Knochen entsteht. Dies führt dazu, dass der Knochenmineralgehalt (BMD) unterschätzt und somit der Verlust des BMDs überschätzt wird. Dieser Fehler kann bis zu 30 % betragen (Felsenberg und Gowin, 1999). Eine Verminderung des Effektes kann durch alters- und geschlechtsbezogene Korrekturwerte vermindert werden, wobei die individuelle Varianz des Fettanteils jedoch nicht berücksichtigt wird (Reinbold et al. 1986). Zusätzlich kann durch die calciumdichte Bildgewinnung mittels Doppel-Energie-Technik dieser Fehler auf bis 5 % reduziert werden (Jergas und Schmid, 2005).

Die Diagnose der Osteoporose beruht heutzutage im Wesentlichen auf den Ergebnissen der Dual-X-Ray Absorptiometry (DEXA), diese bilden ebenfalls die Grundlage für die Stadieneinteilung der Osteoporose durch die World Health Organisation (WHO). Im Gegensatz zum QCT misst sie nur in der zweidimensionalen Ebene, sodass eine

Flächendichte ermittelt ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) wird. Ein weiterer Nachteil ist, dass nicht zwischen Kortikalis und Spongiosa unterschieden wird.

Während der Messungen musste darauf geachtet werden, dass es zu keiner Überlagerung von Knochen kam und die Wirbelsäule möglichst gerade lag, damit es nicht zur Überlagerung von Wirbelkörper kam und die Unterscheidung zwischen Bandscheibe und Wirbelkörper erleichtert wurde. Dies hätte zu falsch hohen Werten der BMD führen können. Im klinischen Alltag kann dies durch strukturelle Veränderungen durch Spondylarthrosen, Osteochondrosen oder auch degenerativ bedingte Verformungen geschehen, ebenso wie durch Knochenersatzmaterialien, wie Implantate oder auch Knochenzement im Rahmen von Kyphoplastien. Vorteile dieser Methode sind laut Blake und Fogelman (2002) eine gute Reproduzierbarkeit, stabile Kalibrierung, eine im Vergleich geringe Strahlendosis und kurze Untersuchungszeiten, eine gute Korrelation zum Frakturrisiko und das Vorhandensein eines großen Vergleichskollektivs. Durch die Verwendung dieser Methode in zahlreichen experimentellen und klinischen Studien ist die Datenlage zur Auswertungen der DEXA Messungen umfangreich.

Aufgrund der genannten Vorteile und der Tatsache, dass die DEXA – Messung den Goldstandard in der Osteoporosediagnostik darstellt, wurde die Knochendichtemessung in der vorliegenden Arbeit mit eben dieser Methode durchgeführt.

Eine weitere Untersuchungsmethode, die im klinischen Alltag angeboten wird, ist die Osteosonografie. Diese Ultraschalluntersuchung wird am distalen Radius durchgeführt und basiert auf der Geschwindigkeit, mit der die Ultraschallwellen durch den Knochen gelangen. Daraus errechnet sich eine Steifigkeit des Knochens. Diese korreliert gut mit der Wahrscheinlichkeit eines Knochenbruchs im untersuchten Areal.

Der Ultraschall kann als Detektion von Risikopatienten dienen. Karjalainen et al. (2018) konnte bei 30 % seiner beschwerdefreien Probanden mittels Ultrasound ein Risiko für eine verminderte Knochenmineraldichte erfassen und anschließend in der DEXA–Messung eine verminderte BMD quantifizieren. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass der Ultraschall im Bereich des Calcaneus eine ähnliche Vorhersagekraft bezüglich einer Oberschenkelhalsfraktur hat wie die mittels DEXA gemessene BMD im Bereich der Wirbelsäule (Nieh et al., 1997). Eine Quantifizierung der Knochenmineraldichte ist mithilfe des Ultraschalls jedoch nicht möglich. Aufgrund der fehlenden Strahlenbelastung, der relativ geringen Kosten und des einfachen Transports des Geräts kann der Ultraschall als gutes Screening verwendet werden. Es sind jedoch anschließende Untersuchungen durch DEXA oder QCT nötig, um den Knochenstatus zu

verifizieren und einen Verlust an BMD, und damit verbunden eine Osteopenie oder Osteoporose zu diagnostizieren.

Ein weiterer Nachteil des Ultraschalls ist, dass nur periphere Knochen, welche einen geringen Weichteilmantel haben untersucht werden können, sodass sich in dieser Studie gegen diese Methode entschieden wurde.

#### 4.1.2 Histomorphometrie

Die Histomorphometrie bietet die Möglichkeit komplexe Prozesse der trabekulären und zellulären Verhältnisse des Knochens von mikroskopischen Bildern mithilfe digitaler Software beschreiben und auswerten zu können. Die Untersuchungsmethode bietet somit eine Möglichkeit die subjektive deskriptive Analyse des Knochenstatus zu erweitern und zu objektivieren.

Eine grundlegende Einschränkung dieser Methodik ist, dass sich die Auswertung auf eine Schnittebene des Knochenpräparats beschränkt und dementsprechend zweidimensionale Ergebnisse liefert (Parfitt et al., 1987). Diese Ergebnisse müssen zum besseren Verständnis des real vorliegenden Knochenstatus dementsprechend in einem dreidimensionalen Zusammenhang gesehen werden. Die zweidimensionalen Parameter werden weitestgehend in dreidimensionalen Werten wiedergegeben, beispielsweise erhobene Längen in Flächen und berechnete Flächen in Volumen. Dementsprechend muss eine Analysemethodik konzipiert werden, um die Genauigkeit, die Objektivierbarkeit und die Reproduzierbarkeit sicher stellen zu können.

Um die Veränderungen der Knochenstruktur objektiv beurteilen zu können, wurde ein Gradingssystem zur Beurteilung der veränderten Trabekelqualität, Trabekelvernetzung und der Zellenquantität und -qualität im Knochenzwischenraum in der Toluidinblau O-Färbung genutzt. Mithilfe der Histomorphometrie kann das Verhältnis der Knochenfläche zu der Gewebefläche (BV/TV) bestimmt werden. Dies wird häufig herangezogen, um die Entwicklung der Spongiosa in einem Knochen zu beschreiben (Dempster et al., 2013). In einem osteoporotischen Knochen kann hiermit der Verlust an mineralisiertem Knochen gut dargestellt werden.

In der Verantwortung des Untersuchers liegt es, durch möglichst präzises Arbeiten, regelmäßige Kontrollen und die Randomisierung der Proben, die Subjektivität zu minimieren, welche durch die Auswahl der zu untersuchenden Bildausschnitte vorliegt. Eine Kontrolle der semi-automatisierten Messung der Knochenflächen durch ImageJ war

erforderlich aufgrund dessen, dass die Flächen teilweise falsch erfasst wurden und dies korrigiert werden musste.

Das Osteocalcin wird von den Osteoblasten sezerniert und gehört zu der nicht kollagenen, extrazellulären Knochenmatrix. Die Osteocalcinfärbungen korreliert mit der Osteoblastenaktivität, gibt jedoch keine Rückschlüsse auf die Osteoblastenanzahl. Hierdurch kann durch diese Methode nicht beurteilt werden, ob die verschiedenen Behandlungsmethoden der Studie eine Auswirkung auf die Apoptoserate der Osteoblasten haben.

Dies könnte ein in weiteren Studien zu untersuchendem Aspekt sein, da bei der Entwicklung einer glukokortikoidinduzierten Osteoporose die Apoptose, die Autophagie und die Proliferation eine wichtige Rolle spielt (Wang et al., 2014).

Durch den enzymhistochemischen Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase kann ein Rückschluss auf die Osteoklastenaktivität gezogen werden (Rico, 1993). Diese Enzyme werden von den Osteoklasten produziert und spielen eine entscheidende Rolle bei dem Abbau der Knochenmatrix. Eine schnelle Erhöhung der Osteoklastenaktivität wurde in der frühen Phase nach Beginn einer hochdosierten, kurzweiligen Glukokortikoidtherapie im Menschen beschrieben (Wang et al., 2014). Dies korreliert mit dem signifikanten Anstieg der N.Oc/BV in den ersten drei Monaten der Triplebehandlung.

Weinstein et al. (1998) beschreibt eine Erhöhung der Osteoklastenanzahl, obwohl die Vorläuferzellen abnehmen. Er geht davon aus, dass die einzelnen Osteoklasten später in die Apoptose gehen. Eine Reduktion der Makrophagendifferenzierung zu Osteoklasten wurde durch Kim et al. (2006) gesehen.

## 4.2 Ergebnisse

### 4.2.1 Kontrolle

Die Tiere der Kontrollgruppe dienten dazu, mögliche Veränderungen der Knochenmineraldichte im saisonalen Verlauf des Versuches unabhängig von jeglicher Therapie zu dokumentieren. Es konnte einen kontinuierlichen Anstieg der Knochenmineraldichte (BMD) nachgewiesen werden. Ringe et al. (1995) führte dies darauf zurück, dass die ehemaligen Mutterschafe, während ihren Schwangerschaften und der nachfolgenden Stillzeit, den erhöhten Kalziumbedarf aus dem Knochen gedeckt haben und somit die BMD abnahm. Da dieser Bedarf während des Versuches nicht mehr

bestand, konnte der Kalziumspeicher wieder aufgefüllt werden und die BMD regeneriert werden. Darauf weist ein konstant sinkendes N.Oc/BV über acht Monate und eine damit verbundene geringer Knochenresorption hin. Die Osteoblastenaktivität bleibt dahingegen konstant, wodurch der Knochenaufbau leicht überwiegt.

Entgegengesetzt hierzu wird beschrieben, dass es bei Schafen in den Wintermonaten zu einem Absinken des Östrogenspiegels und damit verbunden zu einem Absinken der BMD (Arens et al., 2007). Histomorphometrisch spiegelte sich dies in einer leichten Abnahme des Knochenanteiles am Gesamtvolumen und der ausgedünnten Trabekel in den ersten drei Monaten wider, wobei diese Veränderungen statistisch nicht signifikant waren. Das Merinolandschaf weist jedoch ein fast ganzjährigen Ovulationszyklus auf, wodurch die Unterschiede in den Östrogenspiegel geringgehalten werden (O'Connell, 1999) und daraus resultierend auch die Schwankungen der BMD. Ähnliche Schwankungen der BMD konnte ebenfalls in einer Gruppe von Frauen in New England im Jahresverlauf, aufgrund jahreszeitlich bedingten Veränderungen der Hormonspiegel, beschrieben werden (Rosen et al., 1994).

In der vorliegenden Studie überwiegt der Wiederaufbau der BMD durch die Mehrspeicherung des Kalziums. Dies konnten auch Arens et al. (2007) und Schorlemmer et al. (2003) in ihren Untersuchungen beobachten.

Hinzu kommt, dass die steigenden Östrogenspiegel im Frühjahr den Knochenaufbau zunehmend fördern und keine erneute Schwangerschaft den Kalziumbedarf steigert und einer steigenden BMD entgegenwirkt. Daraus lässt sich schließen, dass der Untersuchungszeitraum alle vier Jahreszeiten umfassen sollte, um den Effekt der saisonalen Veränderungen der BMD der Schafe auf die Untersuchungsergebnisse zu minimieren. Ebenso sollte es sich bei allen Versuchstieren um Tiere handeln, bei denen die letzte Schwangerschaft ähnlich lange zurück liegt, damit bei allen Tieren entweder das Phänomen der hormonbedingten Abnahme der BMD oder die erhöhte Kalziumspeicherung und damit ein Aufbau der BMD im gleichen Maße die Messungen beeinflussen.

#### 4.2.2 Ovariectomie

Innerhalb dieser Gruppe konnten keinerlei signifikante Unterschiede im Versuchszeitraum erhoben werden. Chavassieux et al. (1993) konnte sechs Monate nach durchgeführter Ovariectomie eine signifikante Abnahme der BMD im Bereich des Femurs detektieren.

Es zeigte sich, dass die alleinige Ovariectomie nach drei Monaten am rechten Radius und der Lendenwirbelsäule eine Abnahme der BMD bewirken konnte, während sie im Bereich des Beckens stabil war. Zum Zeitpunkt der Euthanasie zeigten sich jedoch normalisierte Werte der BMD im Vergleich zum Studienbeginn. Zum Zeitpunkt der Euthanasie stiegen in den drei untersuchten Knochen die Werte wieder an, im Bereich des Radius waren sie sogar minimal höher als zu Beginn des Versuchs. Die anfängliche Abnahme führten wir auf den plötzlichen Hormonmangel zurück.

Bezüglich dieser Entwicklung zeigten mehrere Studien widersprüchliche Ergebnisse. Sigrist et al. (2006) erhoben die BMD mittels DEXA im Abstand von drei Monaten bis 18 Monate postoperativ nach Ovariectomie. Zum einen konnten zwar Verluste der BMD nachgewiesen werden, jedoch ohne signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe. Zum anderen konnte ein Reboundeffekt mit steigender BMD nach 17 Monaten aufgezeigt werden. Dies wurde auf eine extragonadale Östrogenproduktion zurückgeführt. Diese Hypothese wird durch Beobachtungen von Turner et al. (1995b) gestützt. In einer Studie wies diese Forschungsgruppe einen steigenden Östrogenspiegel bei ovariectomierten Schafen nach. Ovariectomierten Schafe wurden zusätzlich verschieden dosierte Östrogen-träger implantiert und deren Östrogenspiegel verglichen. Interessanter Weise konnten nach 12 Monaten kein signifikanter Unterschied im Östrogenspiegel zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Es konnte beobachtet werden, dass die Synthese von  $17\beta$ -Östradiol bei Schafen nach einer durchgeführten Ovariectomie nicht sistiert (Johnson et al., 1997).

Eine Stabilisierung und Regeneration der BMD nach 6 Monaten beschreiben auch Pogada (2006) et al. und MacLeay et al. (2004). Sie führen es darauf zurück, dass zwar die Knochenresorption ansteigt, dies jedoch durch einen erhöhten Knochenaufbau und -umbau dekompensiert wird.

In unserer Studie nehmen die Parameter der Knochenresorption (N.Oc/BS, N.Oc/TV, N.Oc/BV, Oc.S/BS) konstant im Verlauf ab, während auch hier die Parameter des Knochenaufbaus zunächst leicht sinken und sich dann auf einem weitestgehend konstantem Niveau einpendeln. Dies spiegelte sich in der Histomorphometrie wider, in dem anfängliche die BV/TV in den ersten drei Monaten um -14,61 % abnahm, um anschließend um +23,68 % in den folgenden fünf Monaten erneut anzusteigen. Die Trabekeldicke entwickelte sich korrespondierend.

Dahingegen zeigten sich signifikant niedrigere BMD – Werte in der Lendenwirbelsäule sowohl nach sechs als auch nach 12 Monaten in einer Studie von Turner und Mallinckrodt

(Turner et al. 1995b). Fini und Giavaresi wiesen ebenfalls einen signifikanten Verlust nach, jedoch erst nach 12 bzw. 24 Monaten (Fini et al., 2000). Nach 45 Wochen konnte Hornby et al. (1995) eine signifikant niedrige BMD in Ganzkörperscans nachweisen. Zi-xiang et al. (2007) konnte dies bereits nach 12 Monaten beobachten.

Eine Erklärung könnten die unterschiedlichen Geschwindigkeiten des Knochenumbaus in den verschiedenen Knochen sein. So ist der Knochenumbau in der Lendenwirbelsäule, die in den meisten Studien als Messpunkt verwendet wurde, wesentlich schneller als beispielweise im Becken. Aufgrund dessen können Veränderungen der BMD in der Lendenwirbelsäule schneller beobachtet werden als in der für die Knochenstrukturanalyse verwendeten Beckenkammbiopsien (Turner et al., 1995b).

Insgesamt lässt sich der Einfluss auf den Knochenstoffwechsel durch den veränderten Hormonhaushalt nach durchgeführter Ovariectomie aufzeigen. Die Induktion einer Osteoporose kann durch die alleinige Ovariectomie jedoch nicht erreicht werden.

Einige Studien konnten zwar signifikante Verluste der BMD nachweisen, doch ist die Reproduzierbarkeit nicht gegeben.

Die beschriebenen Zeitpunkte, an denen die BMD signifikant gesunken ist, variieren zwischen 6 bis 24 Monaten, wodurch bei Standzeiten der Schafe von 6 Monaten bis zu zwei Jahren sehr zeitaufwändig und kostenintensiv erscheint. Zudem kann nicht garantiert werden, dass dieser signifikante Verlust der BMD mit Sicherheit eintritt, was durch die widersprüchlichen Ergebnisse der unterschiedlichen Studien aufgezeigt wurde.

### 4.2.3 Ovariectomie und defizitäre Diättherapie

Mehrere Studien haben aufgezeigt, dass eine defizitäre Diät ergänzend zu der durchgeführten Ovariectomie, einen Zusatzeffekt auf den Knochenmetabolismus hat. Hornby et al. (1995) begrenzten die Kalzium- und Phosphataufnahme der ovariectomierten Tiere und erreichten nach 45 Wochen einen signifikanten Verlust der BMD. Lill et al. (2002) verwendeten ebenfalls eine Vitamin – D – und kalziumreduzierte Diät.

Die Kombination aus der bilateralen Ovariectomie und der defizitären Diät zeigten in Bezug auf die BMD im Bereich der Lendenwirbelsäule eine abnehmende Tendenz, sodass sie im Gesamten um -11,34 % abnahm. Am rechten Radius stieg sie zunächst, zeigte aber zum Versuchsende eine sinkende Tendenz. In der Analyse der Knochenstruktur ist interessanter Weise nach Versuchsende ein vermehrtes Knochenvolumen zu beobachten, die Anzahl der Osteoklasten pro Knochenvolumen und

die Osteoklastenoberfläche im Verhältnis zur Knochenoberfläche sinken. Gleichzeitig ist die Osteoblastenaktivität leichtgradig geringer (-0,35%) als am Anfang der Studie. Dies bedeutet, dass mit zunehmender Versuchsdauer der Knochenabbau verlangsamt wird, jedoch der Knochenaufbau nicht erhöht wird. Diese Werte lassen darauf schließen, dass die fehlende Kalziumquelle in der Nahrung sowohl dem Erholungseffekt der Skelettknochen, der in den Kontrolltieren zu beobachten ist, entgegenwirkt, als auch den Rebound-Effekt der alleinigen Ovariectomie innerhalb des Versuchszeitraumes von acht Monaten verhindert. Jedoch ist aufgrund der am Versuchsende erhobenen Ergebnisse eine Erholung des Knochenstatus ähnlich der ersten beiden Gruppen bei längerer Versuchsdauer eventuell möglich, sollte der Knochenabbau weiter verlangsamt und gleichzeitig und der Knochenaufbau regeneriert werden.

Eine weitere Möglichkeit einer speziellen Diät in Kombination mit einer Ovariectomie untersuchte MacLeay et al. (2004). Sie wählten eine Diät, die eine metabolische Azidose in den Schafen auslöste. Bereits nach 90 Tagen konnte in der DEXA – Untersuchung eine Verminderung der BMD um -10,19 % nachgewiesen werden (MacLeay et al., 2004).

Zusätzlich könnte die defizitäre Diät mit einem speziellen Trinkwasser kombiniert werden, um den Effekt zu verstärken. So konnte Simon et al. (2014) eine verminderter BMD durch Verminderung der Mineralisation von trabekulärem und kortikalem Knochen bei Schafen nachweisen, in deren Trinkwasser ein hoher Fluorid- und ein niedriger Calciumgehalt vorlag.

#### 4.2.4 Ovariectomie, defizitäre Diättherapie und Glukokortikoide

Durch die Tripelinduktion in dieser Gruppe konnten ausgeprägte und signifikante Veränderungen in der Knochenmineraldichte und der Knochenstruktur erzeugt werden. Insgesamt hatten die Tiere am Ende des Versuches eine signifikant niedrigere BMD als zu Beginn der Studie und auch im Vergleich mit den Tieren der anderen drei Untersuchungsgruppen.

Typisch für die glukokortikoidinduzierte Osteoporose konnte ein typischer zweiphasiger Verlauf nachgewiesen werden. In den ersten drei Monaten zeigte sich ein deutlich erhöhter Knochenumsatz, ein sogenanntes High Turnover. In den ersten drei Monaten minimierte sich die BMD durchschnittlich um -16,55 %, in den folgenden fünf Monaten verlangsamte sich die Entwicklung und der weitere Verlust betrug im Mittel -3% und es entwickelte sich ein sogenanntes Low- Turnover. Es konnte insgesamt ein Verlust der Knochenmineraldichte um -23,81 % erreicht werden. Dabei ist zu beobachten, dass in der

Wirbelsäule, mit einem durchschnittlichen Verlust der BMD nach acht Monaten von -35,36 %, ein deutlicher größerer Effekt erzielt werden konnte als im Bereich des distalen Radius (-18,08 %) und im Bereich des Beckens (-17,98 %).

Diesen Unterschied zwischen der Wirbelsäule und den peripheren Knochenarealen zeigten diverse andere Studien. So konnten Turner et al. (1995a) und Lill et al. (2002) bei ovariectomierten Schafen eine signifikante Abnahme der BMD sechs, sieben oder zehn Monate postoperativ in der Lendenwirbelsäule feststellen, jedoch nicht im peripheren Skelett (distaler Radius, Calcaneus und Tibia). Im Gegensatz hierzu beschrieben Goldhahn et al. (2005) im distalen Radius bereits nach 12 Wochen einen signifikanten Verlust der BMD von durchschnittlich 22,6 %.

Hinsichtlich der Knochenstruktur zeigen sich histomorphometrisch ebenfalls signifikante Veränderungen. Bereits nach drei Monaten ist die Zahl der Osteoklasten sowohl bezogen auf das Knochenvolumen (N.Oc/BV) als auch auf die Knochenoberfläche (N.Oc/BS) deutlich gestiegen. Die N.Oc/BV weist auch einen signifikant höheren Wert als die OVX Gruppe auf. Zum Zeitpunkt der Euthanasie sind die N.Oc/BV, die N.Oc/TV und die N.Oc/BS in dieser Gruppe im Vergleich zu den Ausgangsdaten signifikant erhöht. Ebenso ist die Oberfläche der Osteoklasten pro Knochenoberfläche (Oc.S/BS) erhöht.

Die Glukokortikoidinjektion stimuliert die Osteoklastenaktivität und steigert somit die Knochenresorption. Parallel ist jedoch auch eine signifikante Erhöhung des Knochenaufbaus zu beobachten. Das gemessene Osteocalcin bezogen auf das Knochenvolumen ist sowohl bereits nach drei Monaten als auch nach acht Monaten in der ODS Gruppe wesentlich gesteigert.

Zarrinkalam et al. (2012) verabreichten einer Gruppe 54 mg Dexamethason/Woche über drei Monaten, einer anderen über sechs Monate und verglichen sie mit einer Kontrollgruppe. Hier konnte sowohl in der drei Monatsgruppe als auch in der sechs Monatsgruppe ein deutlicher Verlust an BMD an der Lendenwirbelsäule (L2–L5) von -21,7 % bzw. -37,5 % aufgezeigt werden. Ebenso nahm das BV/TV (-22,1 % bzw. -29,2 %) und die Trabekeldicke (-26,7 % bzw. -33,4 %) ab (Zarrinkalam et al. 2009). Lill et al. (2002) wählte einen Zeitrahmen von 20 Wochen, in denen zunächst 120 mg Methylprednisolon/Woche über 14 Wochen und anschließend 200 mg Methylprednisolon/Woche über weitere acht Wochen injiziert wurden, danach wurden diese abgesetzt, die defizitäre Diät jedoch weitergeführt. Die im QCT und am distalen Radius und der Tibia gemessene BMD zeigten nach 22 Wochen der Behandlung signifikante Veränderungen im trabekulären Knochen (-17,8 %). Nach insgesamt sieben

Monaten Standzeit zeigte sich weiterhin eine signifikant niedrigere BMD in der Lendenwirbelsäule im Vergleich zu den Kontrolltieren. Zu diesem Zeitpunkt wurden auch signifikante Verminderungen bei der Trabekelanzahl, -dicke und dem BV/TV gefunden.

Im Menschen ist bei der glukokortikoidinduzierten Osteoporose sowohl eine Trabekelausdünnung als auch eine reduzierte Anzahl an Trabekeln beschrieben worden (Aaron et al., 1989).

In unserer Studie zeigten sich ebenfalls sehr dünne und brüchig wirkende Trabekel sowohl nach drei als auch nach acht Monaten. Die Vernetzung wurde zunehmend weniger, sodass viele einzelne Trabekel auszumachen waren, die keine Verbindungen untereinander vorwiesen. Ähnlich dieser Studie wies auch Schorlemmer et al. (2003) bei ovariektomierten und mit Glukokortikoiden behandelten Schafen, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, eine Reduktion der Trabekeldicke nach. Zaririnkalam et al. (2009) beschrieb nach sechs Monaten zwar eine signifikante Abnahme der Trabekeldicke, jedoch ohne Verlust der Trabekelanzahl oder deren -vernetzung. Dies konnte Augat et al. (2003) ebenfalls aufzeigen.

#### *Nebenwirkungen den Glukokortikoidinjektionen*

Bei der Induktion der Osteoporose durch Glukokortikoidinjektionen müssen die Nebenwirkungen der Behandlung auf die Tiere aufgrund der ethischen Verantwortung gegenüber den Tieren bedacht werden, der Rechtfertigung der Versuche gegenüber der Öffentlichkeit und den Verlust an Tieren und die Behandlungskosten von Begleiterkrankungen niedrig zu halten.

Die Nebenwirkungen reichten von Alopezie, über Abszesse bis hin zu septischen Verläufen (Lill et al., 2002). Egermann et al. (2008) untersuchten den Einfluss der Intervalle zwischen den einzelnen Glukokortikoidinjektionen und die Höhe der Einzeldosis, ohne jedoch die Gesamtdosis zu reduzieren, bei weiterhin bestehendem adäquaten Verlust der BMD der Schafe.

Es zeigte sich, dass weniger Injektionen mit höheren Einzeldosen im gleichen Zeitraum die Rate der Nebenwirkungen reduzieren können, ohne den Verlust an BMD zu beeinflussen.

Ähnliche Ergebnisse erlangte Klopfenstein et al. (2007), jedoch verzeichnete sie in der Gruppe ohne Komplikationen (500 mg/Injektion alle drei Wochen) auch einen

niedrigeren Verlust der BMD. Hier zeigte die Gruppe, in der die Injektionen im wöchentlichen Abstand gegeben wurden, nur eine Alopezie als Nebenwirkung. In der Gruppe der täglichen niedrig dosierten Gaben mussten zwei Tiere frühzeitig, aufgrund Lungen- und Hautabszessen, euthanisiert werden,

Auch die eigenen Ergebnisse zeigen, dass weniger Injektionen mit höheren Dosen (320 mg/14Tage) keine schwerwiegenden Nebenwirkungen hervorbringen, jedoch einen signifikanten Verlust der BMD erzielen. Als Nebenwirkung der Glukokortikoidbehandlung konnte eine ausgeprägte Alopezie beobachtet werden. Es entwickelten sich keine Abszesse oder Infektionen

Alle Gruppen wiesen ein durchschnittliches Alter von 5,5 Jahren und damit ein ausgereiftes Skelett auf. Eine Studie ergab, dass Schafe zwischen sechs bis zehn Jahren einen natürlichen Verlust an Knochenmineraldichte und daraus resultierend einen Stabilitätsverlust der Knochen aufweisen (Maenz et al., 2019). Dies steht jedoch im Widerspruch mit den Beobachtungen von Egermann et al. (2008). Sie zeigte auf, dass zwei Drittel der Nebenwirkungen bei Schafen auftraten, welche älter als sieben Jahre waren.

Es muss also abgewogen werden, welches Durchschnittsalter der Versuchstiere erzielt werden soll, um den natürlichen Verlust an BMD zu nutzen und so die Injektionsdosen verringern zu können. Zugleich muss bedacht werden, dass Gruppen mit höherem Durchschnittsalter ein erhöhtes Risiko haben, an Nebenwirkungen zu leiden und damit das Tierwohl gefährdet wird, als auch der Verlust an Versuchstieren zu befürchten ist.

In dieser Studie konnte mit Hilfe einer Behandlung aus Ovariectomie, defizitärer Diät und einer Glukokortikoidbehandlung eine signifikante Minderung der Knochenmineraldichte (-17,98%) und ein osteoporotischer Knochenstatus im Schaf erzielt werden. Um dieses Tiermodell zur Erprobung von Knochenersatzmaterialien und Implantaten heranziehen zu können, muss gewährleistet sein, dass dieser Knochenstatus für einen adäquaten Zeitraum beibehalten werden kann. Goldhahn et al. (2005) weist nach Beendigung der Steroidbehandlung eine erneute Zunahme der BMD im distalen Radius nach, diese erfolgt jedoch wesentlich langsamer (0,22 %/Woche) als der Abbau unter der Behandlung (1,75 %/Woche im Durchschnitt). Es dauerte vier Monate, bis die initiale BMD wieder erreicht wurde.

In einem Wirbelkörper konnte Zarrinkalam et al. (2012) keine wesentlichen Veränderungen des osteoporotischen Knochenstruktur drei Monate nach Beendigung der

Glukokortikoidbehandlung beobachten. Die BMD war weiterhin um -23 % niedriger als zu Beginn der Studie. Ebenso war die BV/TV -23 % und die Trabekeldicke -23 % geringer als zum Ausgangszeitpunkt.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass nach Beendigung der Osteoporoseinduktion der osteoporotische Knochenstatus lang genug erhalten bleiben muss, um die Evaluation von Knochenersatzmaterialien und Implantate zu ermöglichen.

### 4.3 Das Schaf im Vergleich zu anderen Tiermodellen

Bei der Wahl eines geeigneten Tiermodells müssen viele Aspekte beachtet werden. Dazu gehören allgemeine Voraussetzungen, die bei jedem Tiermodell bedacht werden müssen. Dazu zählen die Möglichkeit der Haltung und Versorgung der Tiere, die Kosten, die dadurch entstehen und am wichtigsten die Relevanz der Ergebnisse für den Menschen. Dabei muss die Pathophysiologie nicht exakt wiedergegeben werden, sondern vergleichbar zu der des Menschen sein. Hinzu kommen die Faktoren, die je nach Fragestellung zu beachten sind (Hughes und Lang, 1978):

- Anatomie, Physiologie und Biochemie des Tieres
- Gewohnheiten der Nahrungsaufnahme
- Genetische Charakteristika, Lebenserwartung und Alter
- Fortpflanzung
- Umweltfaktoren
- Immunologie

Das Krankheitsbild der Osteoporose beschränkt sich in der Natur fast ausschließlich auf den Menschen. Zudem entsteht die Osteoporose nicht durch einen bestimmten Faktor, sondern durch ein Zusammenspiel vieler Faktoren wie dem Hormonstatus der postmenopausalen Frau, dem Kalziumhaushalt oder auch der Mobilität eines Menschen. Dies geschieht zudem nicht akut, sondern schleichend über einen längeren Zeitraum.

Das Tiermodell eröffnet uns die Möglichkeit durch die künstliche Induktion der Osteoporose den Pathomechanismus der Entwicklung einer Osteoporose ausgehend von einem gesunden Knochen zu erforschen. Dadurch können neue Medikamente in einem kürzeren Zeitraum erprobt werden und die Möglichkeit Implantate in osteoporotischen Knochen zu testen.

### *Ratte*

Die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) verlangt, dass für eine Medikamentenzulassung in der Osteoporosetherapie, diese zunächst an einem Modell der ovariectomierten Ratte und anschließend an einem zweiten (Groß-)Tiermodell erprobt wird.

Dies hat zur Folge, dass die ovariectomierte Ratte, das am häufigsten eingesetzte Tiermodell der Osteoporoserecherche ist (Kalu, 1991).

Für dieses Modell spricht die einfache Anschaffung, Haltung und auch der zeitliche Aspekt. Eine Ratte erreicht ihre maximale Knochenmasse (peak bone mass) im Alter von 10 Monaten, dies erleichtert die Planung einer Studie bezüglich der angesetzten Dauer.

Aufgrund dessen, dass die Ratte naturgemäß keine Menopause durchläuft, dient die Ovariectomie zur konsequenten und schnellen Induktion eines vergleichbaren Hormonstatus. Der Knochen einer ovariectomierten Ratte reflektiert vergleichsweise den postmenopausalen Knochenstatus aufgrund des Hormonmangels und zeigt auch ähnliche Reaktionen auf therapeutische Interventionen wie der menschliche Knochen (Kimmel, 1996). Obwohl auch der Knochenaufbau erhöht wird, kann die erhöhte Resorptionsrate nicht mehr vollständig kompensiert werden, sodass diese überwiegt (Kalu, 1991). Hierdurch nimmt die Knochenmasse nach der Ovariectomie rapide ab und setzt sich im späteren Verlauf auf einem geringeren Niveau kontinuierlich fort. Im Gegensatz zur postmenopausalen Frau zeigt sich hier jedoch keine Neigung zu Spontanfrakturen, diese müssen mittels mechanischer Intervention herbeigeführt werden. Im Vergleich zum Schaf reagieren Ratten wesentlich sensitiver auf die Hormonmangelsituation. Eine Erklärung hierfür könnte in der Tatsache liegen, dass Ratten ganzjährig Ovulationszyklen durchlaufen, während bei Schafen der Organismus solche Hormonmangelzustände aufgrund des Östrogenmangels in den Wintermonaten kennt und Regulationsmechanismen entgegen eines zu hohen Verlustes an Knochenmasse entwickelt hat. Dies könnte eine Erklärung für die geringen Auswirkungen der alleinigen Ovariectomie auf den Knochenstatus des Schafes sein.

Problematisch bei der Ratte ist zudem das Fehlen eines Havers-Systems, das mit dem des Menschen zu vergleichen wäre, und dass die Ergebnisse nur sehr eingeschränkt auf diesen zu übertragen wären. Nicht zuletzt ist die Anatomie der beschränkende Faktor der Ratte, denn durch die geringe Körpergröße können keine Implantate, die auch für den Menschen geeignet wären, an ihr getestet werden. Hinzu kommt das geringe Blutvolumen, was die mehrfache Untersuchung von Blutproben erschwert.

### *Primaten*

Primaten haben generell wesentliche Vorteile gegenüber anderen Tierarten in Bezug auf Modelle für menschliche Erkrankungen. Sie ähneln dem Menschen bezüglich ihrer Anatomie, der Organfunktion und sogar dem monatlichen weiblichen Hormonzyklus und der Menopause (Walker, 1995). Ihre Knochen besitzen einen ähnlichen Aufbau der Osteone und damit verbunden ein Remodelling, sodass erhobene Erkenntnisse wesentlich besser auf den Menschen übertragen werden können. Im Gegensatz zu Schafen ist die Versuchsdurchführung mit Primaten wesentlich schwieriger, insbesondere bei der Haltung und der nötigen Haltungsdauer bis zum möglichen Untersuchungszeitpunkt. Affen erreichen ihre maximalen Knochenmasse (peak bone mass) erst mit neun Jahren, wodurch meist jüngere Affen herangezogen werden und die Osteoporose an einem unausgereiften Skelett induziert wird. Dies kann wiederum die Ergebnisse verfälschen (Jerome et al., 1994). Die Haltung der Affen erweist sich ebenfalls als problematisch, da diese als Gruppe gehalten werden müssen, in denen es durch Rivalitätskämpfen zu schwerwiegenden Verletzungen kommen kann, besonders wenn man einen osteoporotischen Knochenstatus induziert. Ebenfalls zu bedenken ist, die öffentliche Skepsis gegenüber Affen als Versuchstiere, die bei einem Nutztier wie dem Schaf nicht so vorhanden ist. In der Bundesrepublik Deutschland und der gesamten Europäischen Union sind die Versuche an Menschenaffen grundsätzlich verboten.

### *Minipigs*

Schweine bringen für die Osteoporoseforschung hinsichtlich des Hormonstatus gute Voraussetzungen mit sich. Ihr Zyklus hat eine durchschnittliche Länge von 18 bis 21 Tagen und findet während des ganzen Jahres statt. Dies stellt auch ein Vorteil im Gegensatz zum Schaf dar, da diese eine anöstrische Phase im Winter durchlaufen und dadurch keinen ganzjährig vergleichbaren Hormonzyklus vorweisen.

Mosekilde et al. wiesen bei vier Monate alten Minipigs eine signifikant erniedrigte Knochendichte (BMD) nach sechs Monaten in der Lendenwirbelsäule nach. Die Kombination aus Ovariectomie und defizitäre Diät senkte die BMD sowohl in der Lendenwirbelsäule als auch im Radius und im Femur. In beiden Gruppen kam es zu einer signifikanten Steigerung der Knochenresorption und in diesem Zusammenhang zu erodierten Trabekeln (Mosekilde et al., 1993). In einer anderen Studie wurden

ausgewachsene Minipigs verwendet, die bereits eine Trächtigkeit durchgemacht haben. Sie wurden zunächst mit 1 mg/kg KG/Tag für acht Wochen und anschließend mit 0,5 mg/kg KG/ Tag Prednisolon über acht bzw. 15 Monate behandelt. Es konnten sowohl nach acht als auch nach 15 Monate eine signifikant geringere BMD gezeigt werden (Scholz-Ahrens et al., 2007). Die Körpergröße vereinfacht auch die wiederholte Entnahme von Probenmaterial wie Blut oder Urin, und sie ermöglicht eine Anwendung von Osteosynthesematerial. Dies beweist, dass das Minipig als osteoporotisches Tiermodell geeignet ist. Problematisch ist hier die Haltung, da Schweine teilweise sehr aggressiv sein können und einen hohen Lärmpegel erzeugen.

### *Hunde und Katzen*

Beide Tierarten sind leicht zu beschaffen und einfach zu halten. Sie eignen sich im Vergleich zum Schaf wesentlich besser zur Verabreichung von oralen Medikamenten, da sie wie der Mensch nur einen Magen besitzen. Bei Schafen handelt es sich im Gegensatz dazu um Wiederkäuer, was die Aufnahme und die Verstoffwechslung von oralen Medikamenten beispielsweise in der Osteoporosetherapie beeinflusst und deren Erprobung verfälscht.

Bei Hunden kommt hinzu, dass sie, anders als der Mensch, nur zweimal im Jahr eine Ovulation durchlaufen und im restlichen Jahr der Östrogenspiegel sehr niedrig ist. Dadurch sind sie als Modell der postmenopausalen Osteoporose auszuschließen. Martin et al. stellten bei ovariektomierten Hunden keine Veränderung in der Kompakta, jedoch ein Knochendichteverlust von bis zu 15 % in der Kortikalis fest. Die Knochen wiesen aber keine erhöhte Brüchigkeit auf (Martin et al., 1987). Bei heranwachsenden Katzen kann entweder durch eine kalziumarme oder auch eine phosphatreiche Ernährung ein osteopenischer Knochenstatus erzielt werden. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass es nach einer Ovariektomie sowohl bei Hunden als auch bei Katzen nicht zu osteoporotischen Frakturen kommt (Turner, 2001).

Ein weiteres Problem stellt die öffentliche Einstellung gegenüber von Hunden und Katzen dar, da sie als Haustiere sehr verbreitet sind und dadurch viele Menschen emotional mit ihnen verbunden sind.

### *Das Schaf*

Schafe sind gutmütige, leicht zu haltende Tiere. Sie sind in großer Zahl zugänglich und können in Gruppen gehalten werden, ohne viel Stress ausgesetzt zu sein (Newman et al., 1995).

Ein wichtiger Aspekt bezüglich der Knochendichte bei Schafen ist es, dass sie saisonalen Schwankungen unterliegt, da sie im Winter eine anöstrische Phase durchlaufen und dementsprechend einem Hormonmangel unterliegen. Die Knochendichte ist in dieser Zeit geringer als in den polyöstrischen Sommermonaten (Arens et al., 2007). Die Knochendichte von Schafen ist dabei wesentlich höher als die des Menschen. In den Lendenwirbelkörpern liegt die Knochendichte bei rund 180 mg/cm<sup>3</sup>, während sie bei Schafen ca. 440 mg/cm<sup>3</sup> beträgt (Aerssens et al., 1998).

Dass die Knochendichte auch im Schaf hormonellen Einflüssen unterliegt, konnte auch dadurch bewiesen werden, dass die Knochendichte unter Östrogentherapie signifikant ansteigt (Turner et al., 1995a). Der Schafsknochen weist insgesamt mehr Gemeinsamkeiten in Bezug auf den strukturellen Aufbau, die Morphologie und der Knochenumwandlung mit dem menschlichen Knochen auf als beispielsweise die Ratte (Duque et al., 2011).

Reinwald und Burr (2008) gaben zu bedenken, dass ein Nachteil des Schafs im großen Unterschied des Gastrointestinaltraktes zu dem des Menschen besteht. Durch den komplexen Aufbau des Magens können orale Medikamente nur bedingt getestet werden. So kann ein der induzierter Knochenstatus zur Testung von Knochenersatzmaterialien und Implantaten verwendet werden, jedoch nicht zur Testung von oralen Medikamenten in der Osteoporosebehandlung.

Durch seine anatomischen Voraussetzungen ist das Schaf nicht nur zur Untersuchung des Pathomechanismus der Osteoporose geeignet, sondern bietet auch die Möglichkeit neue Knochenersatzmaterialien und Implantate zu erproben. Ebenso ist die wiederholte Gewinnung von Probenmaterial wie Blut, Urin und auch Knochenproben gesichert.

## 4.4 Fazit

In unserer Studie konnte durch die Kombination aus einer bilateralen Ovariectomie, einer defizitären Diät und der Behandlung mit Glukokortikoiden eine deutliche Abnahme der Knochendichte erreicht werden. Sie betrug in der Lendenwirbelsäule bis zu 36 % und ist damit wesentlich höher als beim Menschen. Durch die alleinige Ovariectomie, die die

postmenopausale Menge an Östrogen simulieren sollte, konnten keine signifikanten Veränderungen induziert werden. Schafe durchlaufen im Winter regelmäßig einen natürlichen Hormonmangel und können dadurch besser auf den Hormonmangel, welcher durch die Ovariectomie ausgelöst wird, reagieren. Dies zeigt der Abfall der Knochendichte in der Gruppe der alleinig ovariectomierten Schafe in den ersten drei Monaten und die darauffolgende Normalisierung. Ein weiteres Problem ist, dass es sich bei den Schafen um Zuchtschafe handelte und diese an einen häufigen Mehrbedarf an Kalzium gewöhnt sind, wodurch das Kalzium, das dieser Gruppe in ausreichenden Maßen zur Verfügung stand, vermehrt in den Knochen eingebaut werden konnte und so einem Knochenabbau entgegengewirkt werden konnte. Dies bestätigt sich auch durch die Entwicklung der Knochendichte in der Kontrollgruppe. Diesem Effekt konnte durch die Kombination mit einer kalziumarmen Diät entgegengewirkt werden.

Ein wichtiges Merkmal der Osteoporose ist auch der Verlust an Knochenfestigkeit und damit verbunden ein erhöhtes Frakturrisiko. Ein Schaf der ODS Gruppe erlitt zum Ende des Versuchs zwar einen Oberschenkelhalsbruch, jedoch konnte nicht erörtert werden, ob dies eine Verletzung aufgrund eines Unfalls während der Haltung oder eine spontane Fraktur aufgrund des osteoporotischen Knochenstatus war. Ein Grund für die fehlende Neigung zu Spontanfrakturen könnte die generell höhere Knochendichte beim Schaf als beim Mensch sein, sodass Schafsknochen trotz einer signifikanten Erniedrigung der Knochenmineraldichte nicht brechen. Dies hat zur Folge, dass die benötigten Frakturen für die Erprobung von Knochenersatzmaterialien künstlich herbeigeführt werden müssen. Es können aufgrund der Anatomie Knochenersatzmaterialien getestet werden, die denen, die bei Menschen verwendet werden in Größe, Gewicht und Form ähneln. Bei der Induktion der Osteoporose muss die Schwankung des Hormonspiegels aufgrund der Jahreszeiten bedacht werden. Man sollte die natürliche Verminderung der Knochenmineraldichte in den Wintermonaten bei der Planung des Versuchszeitpunkts ausnutzen, sodass eventuell geringere Dosen an Glukokortikoiden verwandt werden können und damit die Nebenwirkung verringert werden können.

Schlussendlich kann im Schafsmodell ein Knochenstatus induziert werden, der dem osteoporotischen Knochenstatus beim Menschen nahekommt. Hierzu bedarf es einer Kombinationstherapie aus Ovariectomie, kalziumarmer Diät und einer Therapie mit Glukokortikoide. Zusätzlich ist auf einen ausreichend langen Versuchszeitraum zu achten, um einen ausgeprägten Verlust an Knochendichte zu erreichen. Eine alleinige

Ovariectomie war in dieser Studien nicht ausreichend, um einen signifikanten Verlust an Knochenmineraldichte über zu erreichen. Dem Verlust an Knochenmineraldichte, der durch die Kombination aus einer Ovariectomie und eine kalziumarmen Diät erreicht werden konnte, ist nicht ausgeprägt genug, da im Schaf Regulationsmechanismen bestehen, die diesem entgegenwirken.

Im Vergleich zu anderen Großtiermodellen kann hierdurch die Osteoporose und damit verbunden Knochenersatzmaterialien und Implantate im Schaf evaluiert werden. Abschließend müssen die erhobenen Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden und in klinischen Studien am Patienten getestet werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die aufgrund eines Verlusts an Knochenfestigkeit zu spontanen Frakturen, die ohne adäquate Traumata entstehen, führen kann. Aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung ist in den nächsten Jahren mit einem deutlichen Anstieg dieses Krankheitsbildes und ihren Folgeerscheinungen zu rechnen. Die Versorgung der Frakturen mit heutigen Knochenersatzmaterialien und Implantaten gestaltet sich nicht immer einfach, da sie in der geschwächten Knochenstruktur nur schlecht Halt finden.

Mit dieser Studie sollte ein geeignetes Großtiermodell für die Erforschung der Osteoporose gefunden werden, dass sowohl ein menschenähnlicher Knochenmetabolismus als auch eine für die Erprobung von Knochenersatzmaterialien und Implantaten geeigneten Knochenstatus aufweist. Der Knochenverlust sollte mit einer alleinigen bilateralen Ovariectomie (n=8), einer Ovariectomie in Kombination mit einer kalzium- und phosphatarmen sowie Vitamin-D-freien Diät (n=7) oder mit einer Injektion von 500 mg/kg KG Methylprednisolon alle 14 Tage zusätzlich zur Ovariectomie und der defizitären (n=8) induziert werden. Um die Auswirkungen auf den Knochenstatus zu quantifizieren wurden zu Beginn, nach drei und nach acht Monaten via Dual-energy-X-Ray absorptiometry (DEXA) die Knochenmineraldichte an der Lendenwirbelsäule, dem distalen Radius und am Femur gemessen. Mittels verschiedener histomorphometrischen Analysen wurden die Veränderungen der Knochenstruktur und die Veränderungen auf zellulärer Ebene analysiert. In dieser Studie konnte aufgrund der erzielten Ergebnisse nachgewiesen werden, dass eine alleinige Ovariectomie und deren Kombination mit einer defizitären Diät über einen Zeitraum von acht Monaten zwar einen Einfluss auf den Knochenmetabolismus haben, jedoch keine Osteoporose induzieren. Der Knochenstatus verschlechterte sich jeweils in den ersten drei Monaten, erholte sich aber nach acht Monaten weitestgehend. Die additive Glukokortikoidbehandlung konnte ein osteoporotischen Knochenstatus erzeugen. Zum Ende der Studie zeigten sich signifikante Unterschiede zu den anderen Untersuchungsgruppen. Dabei kam es an der Lendenwirbelsäule zu einem Knochendichteverlust von circa 35 %. Beeinflusst wurden auch die Knochenstruktur und der zelluläre Metabolismus in Bezug auf den Knochenumbau. Die Anzahl der Osteoklasten bezogen auf das Knochenvolumen (N.Oc/BV) und die Knochenoberfläche (N.Oc/BS) waren signifikant erhöht, ebenfalls vergrößerte sich die Osteoklastenoberfläche im Vergleich zur Knochenoberfläche. Gleichzeitig steigerte sich auch die Osteoblastenaktivität. Die Trabekel wirkten dünn sowie brüchig und verloren ihre Vernetzung untereinander. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass neben der Knochenresorption auch der Knochenaufbau stimuliert wurde, dass sich das Gleichgewicht jedoch zu Gunsten des Knochenabbaus verschob. Hieraus konnte bewiesen werden, dass durch die dreifache Behandlung der Tiere mit der bilateralen Ovariectomie, defizitären Diät und der Glukokortikoidinjektionen, ein geeignetes Modell für die Osteoporose im Schaf zu induzieren war.

## 6 Summary

Osteoporosis is a systemic skeletal disease with a loss of bone strength and can lead to spontaneous fractures without adequate trauma. The authors should expect a significant increase of the incidence and its consequences because of the increasing life expectancy. The treatment of these fractures is not always easy, because of the osteoporotic bone structure.

The aim of this study was to establish and to evaluate a large animal model for the study of osteoporosis. It should have a human-like bone metabolism, as well as an anatomy which is suitable for testing of bone replacement materials and implants.

The bone loss was induced by a bilateral ovariectomy (n = 8), an ovariectomy in combination with a calcium and low-phosphate and vitamin-D free diet (n = 7) or with an injection of 500 mg/kg body weight per methylprednisolone in addition to the bilateral ovariectomy and the deficient diet (n = 8). The differences in bone mineral density were quantified by Dual-energy-X-Ray absorptiometry (DEXA) bone mineral density at the lumbar spine, distal radius and the femur at the beginning, after three and eight months. The changes in bone structure and at the cellular level were analyzed by different histomorphometric methods.

Based on the results, in this study was demonstrated that an ovariectomy and its combination with a deficient diet over a period of eight months, caused differences at bone metabolism, but not in an osteoporotic way. The bone status deteriorated in the first three months but recovered after eight months.

The combined treatment consisting of ovariectomy, deficient diet and glucocorticoids showed the desired effect and could produce an osteoporotic bone status in this group. At the end of the study, the sheep of this group showed significant differences from the other study groups. There was a loss of bone mineral density at the lumbar spine up to 35 % and at the distal radius and the pelvis, there was in each case a loss of 18 %. There were also some effects at the bone structure and the cellular metabolism in terms of bone remodeling. The number of osteoclasts relative to the bone volume (N.Oc/BV) and the bone surface (N.Oc/BS) was significantly increased, also the osteoclast surface increased as compared to the bone surface. At the same time also, the Osteocalcin produced by the osteoblasts increased in proportion to the bone surface. The trabecular looked thin and brittle and lost their interconnection. These results suggested that the bone resorption was stimulated as well as the bone formation, but the balance between them shifted in favor of bone resorption.

It can be concluded that it was possible to induce a suitable model for osteoporosis on sheep through the triple treatment of the animals with bilateral ovariectomy, deficient diet and glucocorticoids. The sheep could be used to develop special osteosynthesis directly in an osteoporotic bone.

## 7 Literaturverzeichnis

Aaron J E, Frances R M, Peacock M, Makius N B (1989). Contrasting microanatomy of idiopathic and corticosteroid-induced osteoporosis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 243: 294–305.

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

American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Glucocorticoid-Induced Osteoporosis (2001). Recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Arthritis & Rheumatism* 44: 1496–1503.

Arens D, Sigrist I, Alini M, Schawalder P, Schneider E, Egermann M (2007). Seasonal changes in bone metabolism in sheep. *Veterinary journal (London, England 1997)* 174: 585–591.

Augat P, Schorlemmer S, Gohl C, Iwabu S, Ignatius A, Claes L (2003). Glucocorticoid-treated sheep as a model for osteopenic trabecular bone in biomaterials research. *Journal of biomedical materials research. Part A* 66: 457–462.

Aulmueller G (2007). *Duale Reihe Anatomie*, Thieme Stuttgart, New York, NY

Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J, Nilsson S (1998). Differential response of estrogen receptor  $\alpha$  and estrogen receptor  $\beta$  to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol Pharmacol* 54: 105–112.

Bartl R (2011). *Osteoporose. Prävention, Diagnostik, Therapie; 12 Tabellen*. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. Thieme Stuttgart, New York, NY

Blake G M, Fogelman I (2002). Dual Energy X-Ray Absorptiometry and Its Clinical Application. *Seminars in Musculoskeletal Radiology* 06: 207–218.

Boron W, Boulpaep E (2016). *Medical Physiology*, Elsevier, Urban und Fischer, München

Bundesselbsthilfverband für Osteoporose e.V. (2013). *Osteoporose - Daten und Fakten*.

Cabrera D, Wolber F M, Dittmer K, Rogers C, Ridler A, Aberdein D, Parkinson T, Chambers P, Fraser K, Roy N, Kruger M (2018). Glucocorticoids affects bone mineral density and bone remodelling in OVX sheep: A pilot study. *Bone reports* 9: 173–180.

Chapuy M C, Arlot M E, Duboeuf F, Brun J, Crouzet B, Arnaud S, Delmas P D, Meunier P J (1992). Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. *The New England journal of medicine* 327: 1637–1642.

Chavassieux P, Pastoureau P, chapuy M C, Delmas D, Meunier P J (1993). Glucocorticoid induced inhibition of osteoblastic bone formation in ewes: A biochemical and histomorphometric study. *Osteoporosis Int.* 3: 97–192.

Chavassieux P, Buffet A, Vergnaud P, Garnero P, Meunier P J (1997). Short-Term effects of corticosteroid on trabecular bone remodelling in old ewes. *Bone* 20: 451–455.

Cummings S R, Nevitt M C, Browner W S, Stone K, Fox K M, Ensrud K E, Cauley J, Black D, Vogt T M (1995). Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *The New England journal of medicine* 332: 767–773.

Dachverband Osteologie e.V. DVO-Leitlinie 2017 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und bei Männern. Langfassung

- Dempster D W, Compston J E, Drezner M K (2012). Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *The Journal of Bone and Mineral Research*. 2013;28(1): 2–17.
- Duque G, Watanabe K (2011). Osteoporosis research: Animal models. Springer, London, New York
- Egermann M, Goldhahn J, Holz R, Schneider E, Lill C A (2008). A sheep model for fracture treatment in osteoporosis: benefits of the model versus animal welfare. *Laboratory Animals* 42: 453–464.
- Felsenberg D, Gowin W (1999). Knochendichtemessung mit Zwei-Spektren-Methoden. *Der Radiologe* 39: 186–193.
- Fini M, Pierini G, Giavaresi G, Biagini G, Mattioli Belmonte MM, Nicoli Aldini N, Rocca M, Martini L, Giardino R (2000). The ovariectomized sheep as a model for testing biomaterials and prosthetic devices in osteopenic bone: a preliminary study on iliac crest biopsies. *The International Journal of Artificial Organs* 23: 275–81.
- Glüer C C, Steiger P, Selvidge R, Elliesen-Kliefoth K, Hayashi C, Genant H K (1990). Comparative assessment of dual-photon absorptiometry and dual-energy radiography. *Radiology* 174: 223–228.
- Goldhahn J, Jenet A, Schneider E, Lill C A (2005). Slow rebound of cancellous bone after mainly steroid-induced osteoporosis in ovariectomized sheep. *Journal of Orthopaedic Trauma* 19(1): 23–28.
- Hauschka P V, Lian J B, Cole D E, Gundberg C M (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological Reviews* (Vol.69 no.3): 990–1047.
- Heinegård D, Oldberg A (1989). Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB Journal* 3 (9): 2042–2051.
- Herold G (Hg.) (2019). Innere Medizin. Köln. 776–779.
- Hofbauer L C, Zeitz U, Schoppet M, Skaliczy M, Schüler C, Stolina M, Kostenuik P J, Erben R G (2009). Prevention of glucocorticoid-induced bone loss in mice by inhibition of RANKL. *Arthritis and rheumatism* 60: 1427–1437.
- Hornby S B, Ford S L, Mase C A, Evans G P (1995). Skeletal changes in the ovariectomized ewes. *Bone* 17: 389–394.
- Hughes H C, Lang C M (1978). Basic principles in selecting animal species for research projects. *Clinical toxicology* 13: 611–621.
- Hughes D E, Dai A, Tiffée J C, Li H H, Mundy G R, Boyce B F (1996). Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- $\beta$ . *Nature Medicine* 2: 1132–1136.
- Humphrey E L, Williams J H H, Davie M W J, Marshall M J (2006). Effects of dissociated glucocorticoids on OPG and RANKL in osteoblastic cells. *Bone* 38: 652–661.
- Jabbar S, Drury J, Fordham J N, Datta H K, Francis R M, Tuck S P (2011). Osteoprotegerin, RANKL and bone turnover in postmenopausal osteoporosis. *Journal of clinical pathology* 64: 354–357.

Jackson R D, LaCroix A Z, Gass M, Wallace R B, Robbins J, Lewis C E, Bassford T, Beresford S A, Blanchette P, Bonds D E, Brunner R L, Brzyski R G, Caan B, Cauley J A, Chlebowski R T, Cummings S R, Granek I, Hays J, Heiss G, Hendrix S L, Howard B V, Hsia J, Hubbell F A,

Jergas M, Schmid G (2005). Radiologische Diagnostik der Osteoporose. *Radiologie up2date* 5: 29–46.

Jerome C P, Carlson C S, Register T C, Bain F T, Jayo M J, Weaver D S, Adams M R (1994). Bone functional changes in intact, ovariectomized, and ovariectomized, hormone-supplemented adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) evaluated by serum markers and dynamic histomorphometry. *Journal of bone and mineral research* 9: 527–540.

Johnson K C, Judd H, Kotchen J M, Kuller L H, Langer R D, Lasser N L, Limacher M C, Ludlam S, Manson J E, Margolis K L, McGowan J, Ockene J K, O'Sullivan M J, Phillips L, Prentice R L, Sarto G E, Stefanick M L, Van Horn L, Wactawski-Wende J, Whitlock E, Anderson G L, Assaf A R, Barad D (2006). Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. *The New England journal of medicine* 354: 669–683.

Johnell O, Kanis J A, Odén A, Sernbo I, Redlund-Johnell I, Petterson C, De Leat C, Jönsson B (2004). Fracture risk following an osteoporotic fracture. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 1: 175–179.

Johnson R B; Gilbert J A, Cooper R C, Dai X, Newton B I, Tracy R R, West W F, DeMoss T L, Myers P J, Streckfus C F (1997). Alveolar bones loss one year following ovariectomy sheep. *Journal of Periodontology* 68: 864–871.

Kalu D N (1991). The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral* 15: 175–191.

Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, Nakamaru Y, Hiroi E, Hiura K, Kameda A, Yang N N, Hakeda Y, Kumegawa M (1997). Estrogen Inhibits Bone Resorption by Directly Inducing Apoptosis of the Bone-resorbing Osteoclasts. *Journal of Experimental Medicine* 186: 489–495.

Kanis J A (1994). Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Synopsis of a WHO report. *Osteoporosis Int.* 4: 368–381.

Kanis J A, Johansson H, Oden A, Johnell O, Laet C, Eisman J A, McCloskey E V, Mellstrom D, Melton L J 3rd, Pols H A, Reeve J, Silman AJ, Tenenhouse A (2004). A family history of fracture and fracture risk: a meta-analysis. *Bone* 35: 1029–1037.

Karjalainen J P, Riekkinen O, Kröger H (2018). Pulse-echo ultrasound method for detection of post-menopausal women with osteoporotic BMD. *Osteoporosis Int.* 29(5): 1193–1199.

Kim H J, Zhao H, Kitaura H, Bhattacharyya S, Brewer J A, Muglia L J, Teitelbaum S L (2006). Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast. *Journal of Clinical Investigation*, 116: 2152–2160.

Kimmel DB (1996). Animal models for in vivo experimentation in osteoporosis research. San Diego: Academic Press. *Osteoporosis*: 671–690.

Klopfenstein Bregger M D, Schawalder P, Rahn B, Eckhardt C, Schneider E, Lill C (2007). Optimization of corticosteroid induced osteoporosis in ovariectomized sheep: A bone

histomorphometric study. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 20(01): 18–23.

Kohrt W M, Jr S J Birge (1995). Differential effects of estrogen treatment on bone mineral density of the spine, hip, wrist and total body in late postmenopausal women. *Osteoporosis Int.* 5: 150–155.

La Vecchia C, Negri E VA, Levi F, Baron J A (1991). Cigarette Smoking, Body Mass and Other Risk Factors for Fractures of the Hip in Women. *International Journal of Epidemiology* 20: 671–677.

Lewiecki E M (2005). Update on bone density testing. *Current Osteoporosis Reports* 3 (4), S. 136–142.

Lill C A, Fluegel A K, Schneider E (2002). Effect of ovariectomy, malnutrition and glucocorticoid application on bone properties in sheep: A pilot study. *Osteoporosis Int.* 13: 480–486.

Lill C A, Gerlach U V, Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E (2002). Bone changes due to glucocorticoid application in an ovariectomized animal model for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporosis Int.* 13: 407–414.

LoCasco V, Bonucci E, Imbimbo B, Ballanti P, Adami S, Milani S, Tartarotti D, DellaRocca C (1990). Bone loss in response to long-term glucocorticoid therapy. *Bone and Mineral* 8: 39–51.

Macdonald B R, Gowen M (1993). The cell biology of bone. *Baillière's Clinical Rheumatology* 7: 421–443.

MacLeay J M, Olson J D, Enns R M, Les C M, Toth C A, Wheeler D L, Turner A S (2004). Dietary-Induced Metabolic Acidosis Decreases Bone Mineral Density in Mature Ovariectomized Ewes. *Calcified Tissue International* 75: 431–437.

Maenz S, Brinkmann O, Hasenbein I, Braun C, Kunisch E, Horbert V, Gunella F, Sachse A, Bischoff S, Schubert H, Jandt K D, Bossert J, Driesch D, Kinne R W, Bungartz M (2020). The old sheep: a convenient and suitable model for senile osteopenia. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*: 1435–5604.

Martin R B, Butcher R L, Sherwood L L, Buckendahl P, Boyd R D, Farris D, Sharkey N, Dannucci G. (1987). Effects of ovariectomy in beagle dogs. *Bone* 8: 23–31.

Mazess R, Collick B, Trempe J, Barden H, Hanson J (1989). Performance evaluation of a dual-energy X-ray bone densitometer. *Calcified Tissue International* 44: 228–232.

Møller U K, Streym S V, Mosekilde L, Rejnmark L (2012). Changes in bone mineral density and body composition during pregnancy and postpartum. A controlled cohort study. *Osteoporosis Int.* 23: 1213–1223.

Mosekilde L, Weisbrode S E, Safron J A, Stills H F, Jankowsky M L, Ebert D C, Danielsen C C, Sogaard C H, Franks A F, Stevens M L, et al. (1993). Calcium-restricted ovariectomized sinclair S-1 minipigs. An animal model of osteopenia and trabecular plate perforation. *Bone* 14: 379–382.

National Institute of Health Consensus Development Conference Statement (2000). Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy.

Newman E, Turner A S, Wark J D (1995). The potential of sheep for the study of osteopenia. Current status and comparison with other animal models. *Bone* 16: 277–284.

- Nieh C F, Bojvin C M, Langton C M (1997). The role of ultrasound in the assesment of osteoporosis: A review. *Osteoporose Int.* 7(1): 7–22.
- Nishida S, Yamaguchi A, Tanizawa T, Endo N, Mashiba T, Uchiyama Y, Suda T, Yoshiki S, Takahashi H E (1994). Increased bone formation by intermittent parathyroid hormone administration is due to the stimulation of proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone marrow. *Bone* 15: 717–723.
- O'Brien C A, Jia D, Plotkin L I, Bellido T, Powers C C, Stewart S A, Manolagas S C, Weinstein R S (2004). Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology* 145: 1835–1841.
- O'Connell S L (1999). The sheep as an experimental model of osteoporosis, PhD Thesis, Department of Medicine, University of Melbourne, Melbourne, Australia
- Pacifici R (1996). Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *Journal of bone and mineral research* 11: 1043–1051.
- Parfitt A M, Drezner M K, Glorieux F H, Kanis J A, Malluche H, Meunier P J, Ott S M, Recker R R (1987). Bone histomorphometry. Standardization of nomenclature, symbols, and units: Report of the asbmr histomorphometry nomenclature committee. *Journal of bone and mineral research* 2: 595–610.
- Pogoda P, Egermann M, Schnell J C, Priemel M, Schilling A F, Alini M, Schinke T, Rueger J M, Schneider E, Clarke I, Amling M (2006). Leotin inhibits bone formation not only in rodents, but also in sheep. *Journal of bone and mineral research* 21(10): 1591–1599.
- Prevrhal S, Genant H K (1999). Quantitative Computertomographie. *Der Radiologe* 39: 194–202.
- Ravn P, Cizza G, Bjarnason N H, Thompson D, Daley M, Wasnich R D, McClung M, Hosking D, Yates A J, Christiansen C (1999). Low body mass index is an important risk factor for low bone mass and increased bone loss in early postmenopausal women. Early Postmenopausal Intervention Cohort (EPIC) study group. *Journal of bone and mineral research* 14: 1622–1627.
- Reid I R (2000). Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Baillière's best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 14: 279–298.
- Reinbold W D, Genant H K, Reiser U J, Harris S T, Ettinger B (1986). Bone mineral content in early-postmenopausal and postmenopausal osteoporotic women. Comparison of measurement methods. *Radiology* 160: 469–478.
- Reinwald S, Burr D (2008). Review of nonprimate, large animal models for osteoporosis research. *Journal of Bone and Mineral Research* 23, 9: 1353–1368.
- Rico H, Villa F L (1993). Serum tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) as a biochemical marker of bone remodeling. *Calcified Tissue International* 52(2): 149-50.
- Riggs BL, Khosla S, Meltron LJ 3rd. (2000). Sex steroids and the construction and conversation of the adult skeleton. *Endocrine Reviews* 23(3): 279-302.
- Ringe J D (Hg.) (1995). Osteoporose: postmenopausale Osteoporose, senile Osteoporose, sekundäre Osteoporose, Osteoporose des Mannes. Thieme Stuttgart, New York, NY
- Rosen C J, Morrison A, Zhou H (1994): Elderly women in nothern New England exhibit seasonal changes in bone mineral density and calciotropic hormones. *Journal of bone and mineral research* 25: 83–92.

- Russow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2008). *Duale Reihe Biochemie*, Thieme, Stuttgart, New York, NY
- Sapir-Koren R, Livshits G (2014). Osteocyte control of bone remodeling: is sclerostin a key molecular coordinator of the balanced bone resorption-formation cycles? *Osteoporosis international* 25(12): 2685–2700.
- Scholz-Ahrens K E, Dellling G, Stampa B, Helfenstein A, Hahne H-J, Acil Y, Timm W, Barkmann R, Hassenpflug J, Schrezenmeir J, Glüer C C (2007). Glucocorticosteroid-induced osteoporosis in adult primiparous Gottingen miniature pigs. Effects on bone mineral and mineral metabolism. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 293: E385–E395.
- Schorlemmer S, Gohl C, Iwabu S, Ignatius A, Claes L, Augat P (2003). Glucocorticoid Treatment of Ovariectomized Sheep Affects Mineral Density, Structure, and Mechanical Properties of Cancellous Bone. *Journal of bone and mineral research* 18: 2010–2015.
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. Prometheus Lernatlas der Anatomie, Thieme, München, New York, NY
- Sigrist I M, Gerhardt C, Alini M, Schneider E, Egermann M (2006). The long-term effects of ovariectomy on bone metabolism in sheep. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 25: 28–35.
- Simon M J, Beil F T, Rüter W, Busse B, Koehne T, Steiner M, Pogoda P, Ignatius A, Amling M, Oheim RR (2014). High fluorid and low calcium levels in drinking water is associates with loe bone mass, reduced bon equality and fragility fractures in sheep. *Osteoporos Int.* 25(7): 1891–903.
- Turner A S, Alvis M, Myers W, Stevens M L, Lundy M W (1995a). Changes in bone mineral density and bone-specific alkaline phosphatase in ovariectomized ewes. *Bone* 17 : S395–S402.
- Turner A S, Mallinckrodt C H, Alvis M R, Bryant H U (1995b). Dose-response effects of estradiol implants on bone mineral density in ovariectomized ewes. *Bone* 17: S421–S427.
- Turner A S (2001). Animal models of osteoporosis - necessity and limitations Vol. 1. *European Cells and Materials*: 66–81.
- Walker M L (1995). Menopause in female rhesus monkeys. *American Journal of Primatology* 35: 59–71.
- Wang D B, Kinoshita C, Kinoshita Y, Morrison R S (2014). p53 and mitochondrial function in neurons. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1842,1186–1197.
- Weinstein R S , Jilka R L, Parfitt A M, Manolagas S C (1998). Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of ostoblasts and osteocytes by potential mechanisms of their deleterious effects on bone glucocorticoids. *Journal of Clinical Invastigation* 102: 274–282.
- Zarrinkalam M R, Beard H, Schultz C G, Moore R J (2009). Validation of the sheep as a large animal model for the study of vertebral osteoporosis. *European Spine Journal* 18 (2): 244–253.
- Zarrinkalam M-R, Schultz CG, Parkinson IH, Moore RJ (2012). Osteoporotic characteristics persist in the spine of ovariectomized sheep after withdrawal of corticosteroid administration. *Journal of Osteoporosis*: 182–509.
- Zi-xiang Wu, Wei Lei, Yun-yu Hu, Hai-qiang Wang, Shi-yong Wan, Zhen-sheng Ma, Hong-xun Sang, Suo-chao Fu, Yi-sheng Han (2007). Effect of ovariectomy an BMD, micro-architecture and biochanics of cortical and cancellous bones in a sheep model. *Medical Engineering & Physics* 30 (2008): 1112–1118.

## 8 Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
B.Ar	Knochenfläche
Bidest	doppelt destilliertes Wasser
BMC	Bone mineral content
BMD	Bone mineral density
BMI	Body mass index
B.Pm	Knochenumfang
BS	Knochenoberfläche
bspw.	beispielsweise
BS/TV	Knochenoberfläche/Gewebevolumen
BV	Knochenvolumen
BV/TV	Knochenvolumen/Gewebevolumen
C, C°	Celsius, Gradeinheit auf der Celsiusskala
CA	Carboanhydrase
Cl <sup>-</sup>	Chloridionen
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cm, cm <sup>2</sup>	Zentimeter, Quadratzentimeter
DEQCT	Dual – Energy QCT
DEXA	dual-energy X-ray absorptiometry
DVO	Dachverband Osteologie e.V.
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E2	Östradiol – 17 – β
FDA	Food and Drug Administration

FGF 23	Fibroblast growth factor 23
Frz	Frizzled–Rezeptor
FV	Fettvakuole
g	Gramm
H <sup>+</sup>	Wasserstoff–Ionen
H <sub>2</sub> O	Wasserstoffdioxid, Wasser
IE	Insulineinheiten / Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
K	Kontrollgruppe
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
LRP5/6	lipoprotein receptor-related protein 5/6
M	Monate
m, m <sup>2</sup>	Meter, Quadratmeter
max.	maximal
M-CSF	macrophage colony factor
min	Minuten
min.	minimal
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mol	Mol
mmol	Millimol
n	Anzahl
N.Oc	Osteoklastenanzahl
N.Oc/BS	Osteoklastenanzahl/Knochenoberfläche
N.Oc/TV	Osteoklastenanzahl/Gewebevolumen
N.Oc/BV	Osteoklastenanzahl/Knochenvolumen
OC	Osteocalcin
Oc.Ar	Osteocalcinfläche
Oc.S	Osteoklastenoberfläche
Oc.S/BS	Osteoklastenoberfläche/Knochenoberfläche

Oc.V	Osteocalcinvolumen
Oc.V/BV	Osteocalcinvolumen/Knochenvolumen
OD	Ovariectomie + defizitäre Diät
ODS	Ovariectomie + defizitäre Diät + Glukokortikoide
OPG	Osteoprotegerin
OVX	Ovariectomie
pH	potential Hydrogenii
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Phosphat
Proc.	Processus/Processi
PTH	Parathormon
RANK	receptor activator of NF κB
RANKL	receptor activator of NF κB ligand
RUNX2	runt-related transcription factor 2
QCT	quantitative Computertomographie
Tab.	Tabelle
T.Ar.	Gewebefläche
TBS	Tris-NaCl-Puffer
TP	Zeitpunkt
TRAP	Tartrat resistente alkalische Phosphatase
TV	Gewebevolumen
SEQCT	Single – Energy QCT
SFB/TRR 79	Sonderforschungsbereich/Transregio 79
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vitamin – D	1,25 – Dihydroxy – Vitamin D
WEKA	Waikato Environment for Knowledge Analysis
WHO	World Health Organization
Wnt/Frz/β-Catenin	Wingless - Int-1/Frizzled-Rezeptor/β-Catenin
WP	Waschpuffer
0M	Zeitpunkt 0 Monate
3M	Zeitpunkt 3 Monate
8M	Zeitpunkt 8 Monate
§	Paragraf
%	Prozent
µg	Mikrogramm

µm Mikrometer

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Makroskopischer Aufbau eines Röhrenknochens am Beispiel des Femurs	3
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung eines Wirbelkörpers	4
<b>Abbildung 3:</b> Mikroskopischer Aufbau der Kompakta	5
<b>Abbildung 4:</b> Resorptionslakune zwischen einem Osteoklasten und der Knochenoberfläche	8
<b>Abbildung 5:</b> Aufbau der Epiphysenfuge	10
<b>Abbildung 6:</b> Signaltransduktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten via RANK/RANKL/OPG-System	12
<b>Abbildung 7:</b> Schematische Darstellung des Remodellings	14
<b>Abbildung 8:</b> Überblick über die hormonelle Regulation des Kalzium- und Phosphathaushalts	15
<b>Abbildung 9:</b> Studiendesign	27
<b>Abbildung 10:</b> Durchführung der DEXA-Messung	28
<b>Abbildung 11:</b> Präoperative Vorbereitung zur Ovariectomie	30
<b>Abbildung 12:</b> Ablauf der Ovariectomie	31
<b>Abbildung 13:</b> Ablauf der Beckenkammbiopsien	32
<b>Abbildung 14:</b> Knochenzylinder nach der Beckenkammbiopsie	32
<b>Abbildung 15:</b> TRAP – Färbung	37
<b>Abbildung 16:</b> Übersichtsaufnahmen der Osteocalcinfärbungen	39
<b>Abbildung 17:</b> Übersichtsaufnahmen mit Toluidinblau O	40
<b>Abbildung 18:</b> Osteoklasten – Identifizierungskriterien	41
<b>Abbildung 19:</b> Osteoklastenoberfläche (Oc.S) und Knochenoberfläche (BS)	42
<b>Abbildung 20:</b> Messung der Knochenoberfläche	42
<b>Abbildung 21:</b> Auswertung Osteocalcin mittels trainable WEKA Segmentation	44
<b>Abbildung 22:</b> Einstufung der Knochenqualität mittels Toluidinblau O	46
<b>Abbildung 23:</b> Hautveränderung bei den Tieren der ODS Gruppe	49
<b>Abbildung 24:</b> Signifikante Veränderungen der BMD gemessen am rechten Radius	53

<b>Abbildung 25:</b> Signifikante Veränderungen der BMD gemessen an der Lendenwirbelsäule	55
<b>Abbildung 26:</b> Signifikante Veränderung der BMD gemessen im Bereich des Beckens	56
<b>Abbildung 27:</b> Repräsentative Übersichtsaufnahmen der durchschnittlichen Ergebnisse der Versuchsgruppen zu den drei Zeitpunkten in der TRAP Färbung (5fach Vergrößerung)	58
<b>Abbildung 28:</b> Signifikante Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen im Versuchsverlauf	59
<b>Abbildung 29:</b> Signifikante Unterschiede innerhalb der ODS Gruppe zu den drei Zeitpunkten	60
<b>Abbildung 30:</b> Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu den drei Zeitpunkten	61
<b>Abbildung 31:</b> Verhältnis Osteocalcin/Knochenvolumen in der ODS Gruppe im Vergleich zwischen Beginn (0M) und zum Zeitpunkt drei Monate (3M) in der Osteocalcin-Färbung	64
<b>Abbildung 32:</b> Unterschiede zwischen den Gruppen im Versuchsverlauf	65
<b>Abbildung 33:</b> Vergleich der OVX und ODS Gruppe zum Euthanasiezeitpunkt (8M)	66
<b>Abbildung 34:</b> Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen im Versuchsverlauf	67
<b>Abbildung 35:</b> Repräsentative Beckenkammbiopsien der durchschnittlichen Ergebnisse der Versuchsgruppen zu den drei Zeitpunkten in der Osteocalcinfärbung in der Übersichtsaufnahme (A) und in der Vergrößerung (B)	68
<b>Abbildung 36:</b> Entwicklung der Knochenstruktur innerhalb der Kontrollgruppe in der Toluidinblau O-Färbung	70
<b>Abbildung 37:</b> Entwicklung der Knochenstruktur innerhalb der OVX Gruppe in der Toluidinblau O-Färbung	71
<b>Abbildung 38:</b> Entwicklung der Knochenstruktur innerhalb der OD Gruppe in der Toluidinblau O-Färbung	72
<b>Abbildung 39:</b> Entwicklung der Knochenstruktur innerhalb der ODS Gruppe in der Toluidinblau O-Färbung	73
<b>Abbildung 40:</b> Beurteilung des Knochenstatus mittels Toluidinblau O	74

<b>Abbildung 41:</b> Detailansicht repräsentativer Beckenkammbiopsien der durchschnittlichen Ergebnisse der Versuchsgruppen zu den drei Zeitpunkten in der Toluidinblau O-Färbung	75
---	----

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Einteilung der Osteoporose anhand des osteodensitometrischen Befundes	22
<b>Tabelle 2:</b> Einteilung und Gruppengröße der Versuchsgruppen	25
<b>Tabelle 3:</b> Zusammensetzung der Standarddiät der Gruppen K und OVX	33
<b>Tabelle 4:</b> Zusammensetzung der defizitären Diät der Gruppen OD und ODS	34
<b>Tabelle 5:</b> Protokoll des Paraffin – Einbettautomaten TP 1050	36
<b>Tabelle 6:</b> Die Umrechnungstabelle von den ermittelten Pixelwerten zu Mikrometer	40
<b>Tabelle 7:</b> Parameter der Histomorphometrie	43
<b>Tabelle 8:</b> Gruppenaufteilungen	48
<b>Tabelle 9:</b> Anzahl der auswertbaren Proben je Untersuchung und Zeitpunkt	50
<b>Tabelle 10:</b> Durchschnittliches Körpergewicht in kg der Versuchsgruppen im Verlauf	51
<b>Tabelle 11:</b> Knochenmineralgehalt (BMD) in $\text{g}/\text{cm}^2$ am rechten Radius zu den verschiedenen Zeitpunkten (0, 3 und 8 Monate)	53
<b>Tabelle 12:</b> Knochenmineralgehalt (BMD) in $\text{g}/\text{cm}^2$ an der Lendenwirbelsäule zu den verschiedenen Zeitpunkten (0, 3 und 8 Monate)	54
<b>Tabelle 13:</b> Knochenmineralgehalt (BMD) in $\text{g}/\text{cm}^2$ im Bereich des Beckens zu den verschiedenen Zeitpunkten (0, 3 und 8 Monate)	56
<b>Tabelle 14:</b> Datentabelle TRAP (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)	63
<b>Tabelle 15:</b> Datentabelle Osteocalcin (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)	69

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

### Erklärung zur Dissertation

„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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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

## **Danksagung**

Ich möchte die Gelegenheit nutzen all denjenigen zu danken, die mich in der ganzen Zeit unterstützt und die diese Promotion möglich gemacht haben.

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Heiß für die Möglichkeit zur Promotion und im Rahmen des Sonderforschungsbereichs/Transregio 79 an dieser Studie mitwirken zu dürfen, meinen Dank aussprechen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitenden des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie in Gießen. Insbesondere danke ich hier Prof. Dr. rer. nat. Thaqif El Khassawna für die Beantwortung meiner Fragen und die Einarbeitung in wissenschaftliches Arbeiten. Für die tatkräftige Unterstützung und das Heranführen an das Arbeiten in einem Labor danke ich ganz herzlich Anette Stengel und Ida Oberst.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitenden der Zentralen Forschungseinrichtung der Goethe Universität Frankfurt für die Betreuung und Versorgung unserer Schafe.

Mein größter Dank geht an meine Familie: An meine Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht und mich immer unterstützt und ermutigt haben, und an meinen großen Bruder, der mir immer mir Rat und Tat zu Seite steht.

Abschließend danke ich meinem Ehemann für die Unterstützung in den letzten Zügen dieser Dissertation und in der Vorbereitung für die Disputation.