

Osteodensitometrische und histomorphometrische
Untersuchungen zur Induktion der Osteoporose im
Rattenmodell

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

vorgelegt von David Nicolas Johannes Weisweiler
aus Lüdinghausen

Gießen 2019

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Heiß

Gutachter:

PD Dr. med. Thomas Karrasch

Tag der Disputation

28.10.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Theoretische Grundlagen.....	2
1.1.1	Das Skelettsystem.....	2
1.1.2	Zusammensetzung und Struktur des Knochens	3
1.1.2.1	Organische und anorganische Bestandteile	3
1.1.2.2	Aufbau des Knochens	4
1.1.2.3	Die zellulären Anteile des Knochens	6
1.1.3	Physiologie des Knochens	8
1.1.3.1	Knochenhomöostase und Remodeling	8
1.1.3.2	Regulation der Bildung und des Abbaus der Knochenmasse	9
1.2	Osteoporose	12
1.2.1	Einführung und Definition	12
1.2.1.1	Densitometrische und metabolische Klassifikation der Osteoporose	13
1.2.1.2	Einteilung der verschiedenen Formen der Osteoporose	14
1.2.1.3	Epidemiologie der Osteoporose.....	17
1.2.1.4	Risikofaktoren für die Entwicklung einer Osteoporose	19
1.2.2	Diagnostik der Osteoporose	20
1.2.2.1	Diagnose mit Dual-Energy X-ray Absorptiometry	20
1.2.2.2	Quantitative Computertomographie (QCT).....	21
1.2.2.3	Quantitative Ultraschallmessung (QUS)	22
1.2.2.4	Konventionelles Skelettröntgen	22
1.2.2.5	Differenzialdiagnosen zur Osteoporose.....	22
1.2.2.6	Therapie und Prävention der Osteoporose.....	23
1.3	Hypothese und Zielsetzung	26
2	Material und Methoden	28
2.1	Tierversuchsmodell	28
2.1.1	Tierhaltung und –fütterung	29
2.1.2	Defizitäre Diät und Steroidbehandlung.....	30
2.1.3	Ovarektomie und Sham-Operation.....	30
2.1.3.1	Narkose.....	30
2.1.3.2	Sham-Operation und Ovarektomie	31
2.2	Dual-Energy X-ray Absorptiometry (DXA)	33
2.3	Präparation und Entkalkung der Knochenproben.....	35

2.3.1	Anfertigung der Paraffinschnitte	37
2.3.2	Anfertigung der Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbungen	38
2.4	Histomorphometrie	38
2.4.1	Digitalisierung der Präparate	39
2.4.2	Zusammensetzen der Einzelfotos	39
2.4.3	Digitale Aufarbeitung der Bilder.....	40
2.4.4	Halbautomatische Analyse mit GIMP	40
2.5	Flächenanalyse mit ImageJ	44
2.6	Statistische Auswertung	46
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Osteodensitometrie mit DXA	47
3.1.1	Osteodensitometrie Rattenkörper: Bone Mineral Density (BMD).....	47
3.1.2	Osteodensitometrie Wirbelsäule: Bone Mineral Density (BMD).....	48
3.1.3	Osteodensitometrie Femora: Bone Mineral Density (BMD)	49
3.1.4	Diät-Gruppe: BMD-Wert im Verlauf.....	50
3.1.5	Sham-Gruppe: BMD-Wert im Verlauf.....	52
3.1.6	Osteodensitometrie Rattenkörper: Bone Mineral Content (BMC)	53
3.1.7	Zusammenfassung der Osteodensitometrie-Ergebnisse	54
3.2	Histomorphometrie	54
3.2.1	Deskriptive Histologie der Kontroll-Gruppe	55
3.2.2	Deskriptive Histologie der 3 Monatsgruppen.....	56
3.2.2.1	Sham-Gruppe.....	56
3.2.2.2	Diät-Gruppe.....	57
3.2.2.3	Steroid-Gruppe.....	57
3.2.3	Deskriptive Histologie der 12 Monatsgruppen.....	58
3.2.3.1	Sham-Gruppe.....	58
3.2.3.2	Diät-Gruppe.....	59
3.2.4	Deskriptive Histologie der 14 Monatsgruppen.....	60
3.2.4.1	Sham-Gruppe.....	60
3.2.4.2	Diät-Gruppe.....	61
3.2.5	Analyse des Mineralisationsgrades des Osteoids.....	62
3.2.6	Histomorphometrische Analyse der Trabekelfläche.....	63
3.2.6.1	Histomorphometrie: Proximales Femur	63
3.2.6.2	Histomorphometrie: 3. Lendenwirbelkörper	65
3.2.7	Zusammenfassung: Histomorphometrie	66
4	Diskussion.....	67

4.1	Ovarektomierte Ratte in Kombination mit einer defizitären Diät als Modell der postmenopausalen Osteoporose	67
4.2	Sicherung des osteoporotischen Knochenstatus durch DXA	71
4.3	Sicherung des osteoporotischen postmenopausalen Knochenstatus im Kleintiermodell der Ratte durch DXA	75
4.4	Qualitätssicherung des densitometrisch gesicherten Tiermodells durch deskriptive Lichtmikroskopie	78
4.5	Evaluierung der H.E. Färbungen durch histomorphometrische Analysen der Trabekelfläche.....	81
4.6	Induktion einer Osteopenie durch eine Kombination aus Ovariectomie und einer Applikation von Dexamethason in der Ratte	83
4.7	Ausblick	85
5	Zusammenfassung	87
6	Summary.....	89
	Literaturverzeichnis	91
	Abbildungsverzeichnis	98
	Tabellenverzeichnis	99
	Abkürzungsverzeichnis	100
	Danksagung	102
	Lebenslauf	103
	Eidstattliche Erklärung	106

Einleitung

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die klinisch durch eine erhöhte Fragilität und mangelnde Knochenfestigkeit auffällt. Verschiedene Ursachen führen hierbei sowohl zu einer quantitativen Abnahme des Mineralsalzgehaltes als auch zu einer qualitativen Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochens mit dem Effekt, dass beim Patienten ein gesteigertes Frakturrisiko und damit einhergehend eine erhöhte Mortalität bestehen [Vilela et al. 2011].

Die Bedeutung der Osteoporose ist nicht nur aufgrund des demographischen Wandels zunehmend, sodass die WHO diese in die Liste der 10 wichtigsten Krankheiten aufgenommen hat [Götte 2001], sondern auch, weil einige häufig verordnete Medikamente wie beispielsweise Glukokortikoide, Protonenpumpeninhibitoren und Vitamin K Antagonisten eine Schwächung der Knochenstruktur bewirken [DVO-Leitlinie 2014]. Darüber hinaus ergab eine Einschätzung der WHO, dass die Osteoporose stärkeren negativen Einfluss auf die Lebensqualität hat als beispielsweise Hypertonus oder rheumatoide Arthritis [WHO Bericht, Brüssel 2004].

Grund dafür ist, bedingt durch die unzureichende Knochenfestigkeit, eine erhöhte Inzidenz und Prävalenz etwa von Wirbelkörperfrakturen oder Schenkelhalsfrakturen [DVO-Leitlinie 2014], die im Falle der letzteren teilweise mit aufwendigen Gelenkersatzoperationen behandelt werden müssen und dabei dem Patienten starke Belastungen und vitale Risiken zumuten. Sinterungsfrakturen der Wirbelkörper verursachen starke Schmerzen und führen zum Verlust der Körpergröße. Dazu kommt eine statische Dysbalance der Wirbelsäule mit kyphotischen Fehlhaltungen, welche wiederum zu chronischen Schmerzen, eingeschränkter Mobilität [Gold 2006] und restriktiven Ventilationsstörung der Lunge führen kann [Leech 1990].

Diagnostiziert werden kann die Osteoporose durch osteodensitometrische Verfahren und durch klassische histomorphometrische Analysen. Eine sehr wichtige Rolle bei der Osteodensitometrie spielt das DXA-Verfahren (*engl.* Dual-Energy X-ray Absorptiometry) und die quantitative Computertomographie (QCT). Beide Verfahren können sehr gute Hinweise auf das Vorliegen einer Osteoporose geben [Bartl 2011].

Nach derzeitigem Kenntnisstand beschränkt sich die Osteoporose allein auf den Menschen und den Affen. Verschiedene Studien zuvor haben mit Hilfe von Ovariectomie, Kalzium und Vitamin D armer Diät, Immobilisation und Medikamenten versucht einen osteoporotischen Knochenstatus im Tierversuch zu erzeugen, allerdings

gibt es bis heute kein definitiv etabliertes Tierversuchsmodell. Um zukünftig Diagnostik und Therapie zu verbessern, soll nun ein Tierversuchsmodell etabliert werden, dessen Standards und Qualitätssicherung dabei helfen sollen, neue Werkstoffe oder Pharmazeutika zu entwickeln, um die Präventionsmaßnahmen, und die Therapie der Osteoporose sowie die Versorgung von osteoporoseassoziierten Frakturen zu verbessern.

Im Kleintier (Ratte; Sprague Dawley) soll durch operative, diätetische und medikamentöse Einflussnahmen ein osteoporotischer Knochenstatus induziert werden und im Verlauf durch *in vivo* und letztendlich durch *ex vivo* Messungen gesichert werden. Die Ratte hat sich in verschiedenen Studien zuvor als geeignet erwiesen und zeigt dazu, gerade in Bezug auf den postmenopausalen Knochenverlust, große Analogie zum humanen Hormonhaushalt.

In dieser Arbeit soll geklärt werden, ob das DXA-Verfahren Hinweise auf eine in diesem Tiermodell durch Ovariectomie, Diät und Glukokortikoidapplikation induzierte Osteoporose geben und diese im Sinne von erniedrigter Knochendichte bestätigen kann. Als nächstes soll geprüft werden, welche Aussagen die zweidimensionale Histomorphometrie am Lichtmikroskop über den Knochenstatus machen kann. Hierbei wird insbesondere auf die Struktur und Stärke der Trabekel geachtet, um im nächsten Schritt Korrelationen zwischen DXA-Verfahren und der zweidimensionalen Histomorphometrie festzustellen. Abschließend soll dargelegt werden, welche Einflussnahme letztendlich bei der Ratte zur stärksten Ausprägung einer Osteoporose führt und mit welcher der beiden Methoden eine induzierte Osteoporose gesichert werden kann.

1.1 Theoretische Grundlagen

1.1.1 Das Skelettsystem

Die einzelnen Knochen erfüllen in ihrer Gesamtheit als Skelettsystem die Stützfunktion des Körpers und erlauben zusammen mit Knorpelgewebe, Bändern und Gelenken die passive Beweglichkeit des Bewegungsapparates. Des Weiteren hat der Knochen eine Schutzfunktion und umschließt in verschiedenen Körperhöhlen wichtige Organe wie beispielsweise das Gehirn im Schädel. Zusätzlich beinhalten einige Knochen das blutbildende Knochenmark. Als Reservoir für verschiedene Elektrolyte hat der Knochen ebenfalls eine wichtige Bedeutung für die Homöostase.

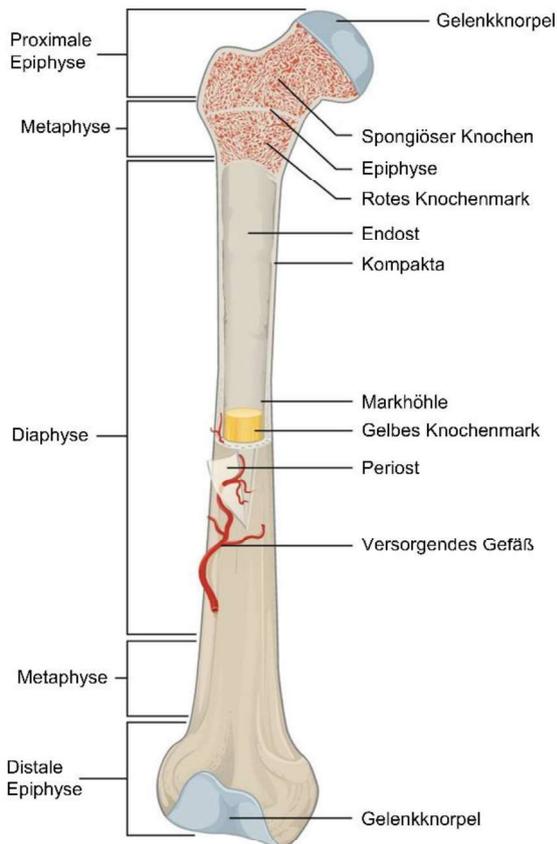


Abbildung 1: Funktioneller Aufbau eines langen Röhrenknochens mit Unterteilung in Epi-, Meta- und Diaphyse. Insbesondere im Bereich der Epi- und Metaphyse findet sich viel spongioser Knochen, bei dessen durch Osteoporose bedingten Schwächung es häufig zu Frakturen kommt [OpenStax cnx].

Grundsätzlich kann man die Knochen des Skeletts in vier verschiedene Haupttypen einteilen. Ossa longa findet man als lange Röhrenknochen an den Extremitäten, ossa brevia als kurze Knochen in den Handwurzelgelenken, ossa irregularia als Wirbelkörper und schließlich ossa plana als platte Knochen im Schädeldach und Brustbein. Die langen Röhrenknochen (Abbildung 1), die auch in dieser Arbeit untersucht werden, unterteilen sich zum einen in eine proximale und distale Epiphyse und zum anderen in den dazwischengelegenen Schaftanteil, der Diaphyse. Darüber hinaus kann man zwischen Epiphyse und Diaphyse noch die Metaphyse eingliedern [Schünke 2011]. Gerade in Epi- und Diaphyse findet sich der für die Osteoporose besonders relevante trabekuläre Knochen, bei dessen Schwächung in diesem Bereich

häufiger Frakturen auftreten. Bei den langen Röhrenknochen findet sich zwischen Epi- und Metaphyse noch die Epiphysenfuge. Hier findet das Längenwachstum der Röhrenknochen bis zum Abschluss der Geschlechtsreife statt. Anschließend verknöchert die Epiphysenfuge.

1.1.2 Zusammensetzung und Struktur des Knochens

1.1.2.1 Organische und anorganische Bestandteile

Grundsätzlich besteht der Knochen aus zellulären Anteilen und der Knochengrundsubstanz. Die Knochengrundsubstanz ist vergleichbar mit einem technischen Verbundwerkstoff und besteht zu 35% aus organischen und zu 65% aus anorganischen Anteilen. Die anorganischen Anteile bestehen hauptsächlich aus dem Kalziumphosphatsalz Hydroxylapatit $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$. Weitere anorganische Bestandteile sind Magnesium, Strontium, Blei, Zink, Kupfer, Eisen und Fluor. Hydroxylapatit ist in kristalliner Form mit einer Mohshärte von 5 das härteste Material

des menschlichen Körpers. Diese Festigkeit ist allerdings mit einer hohen Sprödigkeit verbunden, sodass Hydroxylapatit allein genommen den hohen Ansprüchen, die an einen Knochen gestellt sind, nicht gerecht werden würde. Aus diesem Grund ist eine flexible organische Kollagenmatrix in den Knochen eingearbeitet. Die Knochengrundsubstanz als biologischer Verbund ermöglicht erhebliche Torsions-, Zug-, Druck-, und Biegebelastungen. Diese Kollagenmatrix macht ungefähr 90% des organischen Anteils aus und besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I. Weitere organische Bestandteile sind Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin, Knochensialoprotein, alkalische Phosphatase und andere Proteoglykane [Welsch 2011].

1.1.2.2 *Aufbau des Knochens*

Man kann beim Knochen aufgrund der räumlichen Organisation der extrazellulären Matrix bereits mit bloßem Auge eine äußere Schicht, die Substantia compacta, und eine innere Schicht, die Substantia spongiosa, ausmachen [Ulfig 2011]. Sowohl Kompakta als auch Spongiosa zählt man im ausdifferenzierten Zustand zum Typus des Lamellenknochens. Die Kompakta umgibt als fester Mantel die Spongiosa und wird selbst außen von der Knochenhaut, dem Periost, umgeben. Das Periost hat zwei Anteile: außen das Stratum fibrosum, welches aus straffem kollagenem Bindegewebe besteht und über Kollagenfibrillen mit dem Kollagengeflecht des Knochens in Verbindung steht (Sharpey-Fasern), und innen das zellreiche Stratum osteogenicum mit seinen osteogenen Vorläuferzellen. Die Vorläuferzellen dienen als zelluläre Reserve bei Wachstum und Frakturheilung und werden in diesen Situationen mobilisiert. Von innen ist die gesamte Markhöhle des Knochens, sowohl Substantia compacta als auch Substantia spongiosa, vom Endost überzogen. Das Endost selbst besteht aus einer einschichtigen Zellschicht mit dünner Extrazellulärmatrix, welche ebenfalls wie das Stratum osteogenicum des Periosts osteogene Vorläuferzellen enthält. Die Substantia spongiosa ist ein schwammartiges Gerüst aus kleinen Knochenbälkchen, auch Trabekel genannt, deren Anordnung sich an den auf den Knochen einwirkenden Kräften orientiert (trajektorielle Anordnung). In den Zwischenräumen der Substantia spongiosa findet sich die Markhöhle, die das Knochenmark enthält. Die Spongiosa der Epi- und Metaphysen der langen Röhrenknochen beinhaltet rotes, blutbildendes Knochenmark. In den Diaphysen der langen Röhrenknochen findet sich hingegen das gelbe Knochenmark, dessen Farbe durch die Anwesenheit vieler Fettzellen verursacht wird.

Bei der Unterscheidung verschiedener Arten von Knochengewebe finden sich zum einen der Geflechtknochen und zum anderen der Lamellenknochen. Der Lamellenknochen beschreibt den ausdifferenzierten Typ des Knochengewebes und überwiegt im reifen

Knochen. Dieser kommt entweder als Substantia spongiosa oder Substantia compacta vor und zeichnet sich im Gegensatz zum Geflechtknochen durch eine erhöhte Festigkeit aus. Geflechtknochen (auch Faserknochen genannt) tritt zum Beispiel bei der Frakturheilung und beim Knochenwachstum auf. Das zunächst lose Geflechtwerk des Geflechtknochens richtet sich im Laufe des Wachstums oder der Frakturheilung in Richtung der Belastungstrajektorien aus und wird somit zum Lamellenknochen umgebaut.

Der Lamellenknochen (Abbildung 2) der Substantia compacta gliedert sich in funktionelle Untereinheiten: die Osteone. Die Osteone, auch Havers-Systeme genannt, sind teleskopartige, in Längsrichtung ausgerichtete zylindrische Strukturen und bestehen selbst wiederum aus konzentrischen Speziallamellen, in die Osteozyten eingelagert sind. Im Zentrum (Havers-Kanal) finden sich versorgende Blutgefäße und Nerven. Über horizontale Verzweigungen (Volkmann-Kanäle) verbinden sich die Gefäß- und

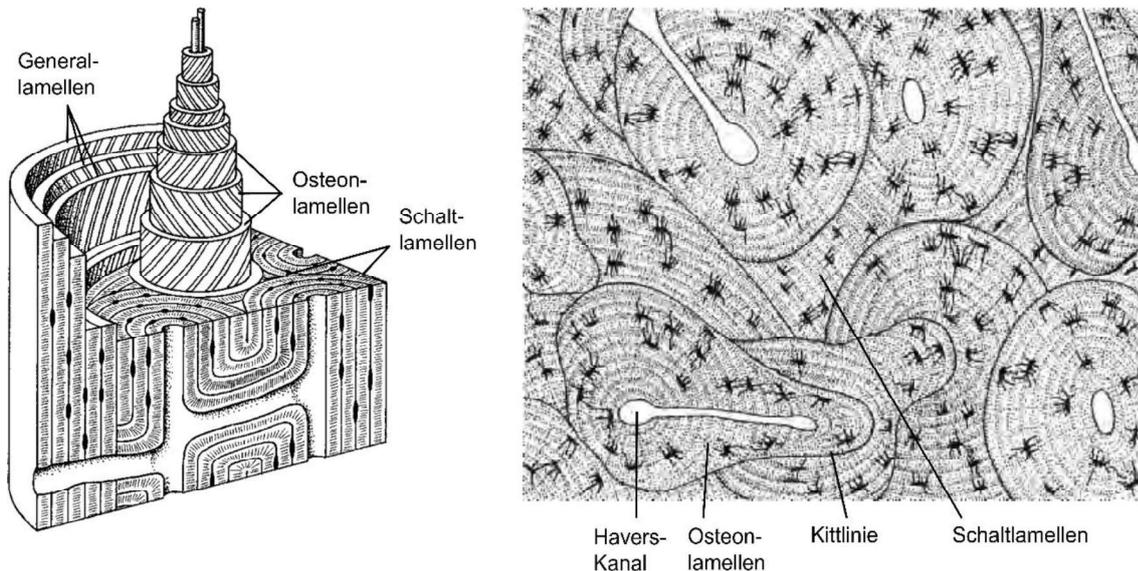


Abbildung 2: Struktur des Lamellenknochens. Generallamellen umschließen die einzelnen Osteonlamellen, die untereinander durch Schaltlamellen (Residuen abgebauter Osteone) verbunden sind. Gefäß-Nerven-Bündel verlaufen horizontal (Volkmann-Kanäle) und vertikal im Osteon (Havers-Kanäle) [Schiebler et. al 2007].

Nervenbündel untereinander und überbrücken dabei so die einzelnen Osteone. Außerhalb der Osteone finden sich noch weitere Lamellentypen: einmal die äußeren Generallamellen, welche die gesamte Zirkumferenz des Knochens durchlaufen, dann die Schaltlamellen, welche die Osteone untereinander verbindet, und schließlich die Trabekellamelle.

1.1.2.3 Die zellulären Anteile des Knochens

Die häufigsten Zellen im Knochen sind Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten und Osteoprogenitorzellen.

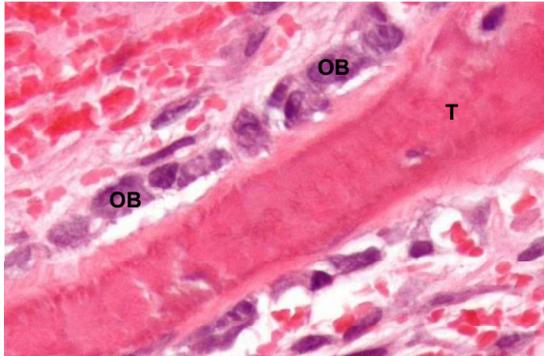


Abbildung 3: H.E. Färbung eines Trabekels (T) mit aufliegenden Osteoblasten (OB). Durch die Färbung haben diese sich vom Knochen gelöst. Im lebenden Knochen liegen diese direkt auf und sind untereinander fest verbunden. Osteoblasten synthetisieren die Knochengrundsubstanz [June 2006].

Osteoblasten tragen die Verantwortung für die Synthese der Knochengrundsubstanz. Dabei bilden sie zunächst die organischen Anteile des Knochens in Form des Osteoids. Osteoid stellt die nicht mineralisierte Knochengrundsubstanz dar, welche aus Kollagen Typ I und weiteren Proteinen wie Fibronectin, Osteocalcin und anderen Proteoglykanen besteht. In das Osteoid lagert sich anschließend beim Prozess der Mineralisierung mit Hilfe der alkalischen Phosphatase Hydroxylapatit ein. Der

Knochen erlangt erst nach Abschluss der Mineralisierung seine vollständige Festigkeit. Bei der Synthese des Osteoids organisieren sich die Osteoblasten epithelartig (siehe Abbildung 3) [June 2006] auf der Oberfläche des Knochens. Je nach Syntheseaktivität fallen diese lichtmikroskopisch bei niedriger Aktivität eher als flache („bone lining cells“) und bei hoher Aktivität als kubische Zellverbände auf [Welsch 2010]. Da für die Synthese des Osteoids (Kollagene) und die anschließende Mineralisierung (alkalische Phosphatase) große Mengen von Proteinen benötigt werden, stellt sich lichtmikroskopisch ein ausgedehntes, raues endoplasmatisches Retikulum mit deutlicher Affinität zu basophilen Farbstoffen dar [Ulfig 2011]. Die Aktivität der Osteoblasten wird über verschiedene Hormone und andere Stimuli reguliert.

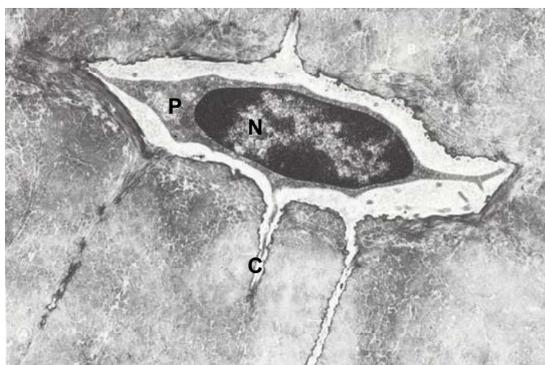


Abbildung 4: EM-Aufnahme eines im Knochen eingelagerten Osteozyten. Erkennbar sind Zellplasma (P), Zellkern (N) und die Canaliculi (C). Die Canaliculi verbinden die Osteozyten untereinander und ermöglichen so einen Zell-Zell Kontakt und Kommunikation [Visual Histology].

Osteozyten (Abbildung 4) entwickeln sich aus Osteoblasten, sobald diese ins Osteoid eingemauert werden und liegen dann in kleinen Lakunen zwischen den einzelnen Lamellen der Knochenmatrix. Sie durchlaufen dabei eine morphologische Veränderung und entwickeln an ihrer Zelloberfläche zahlreiche dünne fadenförmige Zellausläufer, die die einzelnen Osteozyten untereinander über „gap junctions“ verbinden [Mescher 2010].

Die Zellausläufer verlaufen dabei durch kleine Kanälchen, den sog. Canaliculi. Auf diese Weise entsteht ein Netzwerk, welches jeden Osteozyten mit ungefähr 15 anderen Osteozyten verbindet und so den Austausch von Ionen, Aminosäuren, Nukleotiden, Glucose und Wasser ermöglicht [Yellowley 2000].

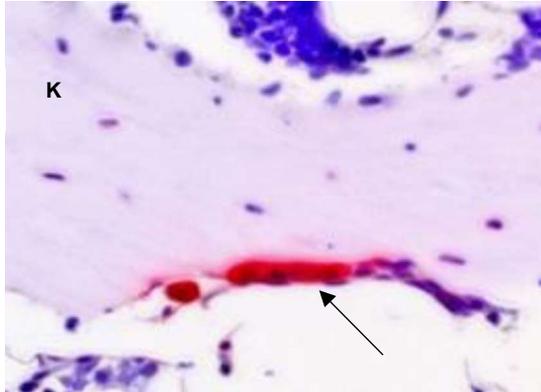


Abbildung 5: Enzymhistochemische Färbung der Tartrat-resistenten Phosphatase (TRAP) zum Nachweis der Osteoklastenaktivität. Der rot gefärbte Osteoklast (Pfeil) liegt direkt dem Knochen (K) auf und baut diesen in einer Resorptionslakune ab.

Osteoklasten (Abbildung 5) gehören zum mononukleär-phagozytären System und leiten sich von Monozyten ab. Bei der Osteoklastogenese fusionieren die Vorläuferzellen und bilden Synzytien mit bis zu 50 Zellkernen. Diese Riesenzellen haben die Aufgabe mineralisierte Knochengrundsubstanz abzubauen. Dafür bildet der Osteoklast mit Hilfe eines Aktinfilamentringes und des Versiegelungsproteines Osteopontin eine Resorptionszone in Form einer kleinen Lakune, der sogenannten

Howship-Lakune. In dieses Mikromilieu pumpt eine H^+ -ATPase Protonen und senkt innerhalb der Lakune den pH-Wert auf 4-5. Des Weiteren werden über Exozytose lysosomale Enzyme wie Cathepsin K sekretiert und gleichzeitig destruierte Matrixelemente über Endozytose aufgenommen. Lichtmikroskopisch findet sich beim aktiven Osteoklasten an der Knochengrundsubstanz zugewendeten Seite ein Bürstensaum („ruffled border“), der zur Oberflächenvergrößerung dient, um die Stoffwechselfvorgänge zu unterstützen [Lüllmann-Rauch 2009]. Beim Abbau der Knochengrundsubstanz verbraucht die Zelle viel Energie und ist folglich reich an Mitochondrien, die den Osteoklasten lichtmikroskopisch azidophil erscheinen lassen [Welsch 2010]. Beim Umbau eines Osteons erweitern die Osteoklasten ähnlich einem Bohrer, den Havers-Kanal und finden sich dementsprechend in den vorderen Anteilen. Kapillaren und Osteoblasten folgen diesem „Bohrkopf“ und reorganisieren das Osteon [Mescher 2010]. Insgesamt kann ein Osteoklast um den Faktor 10 mehr Knochengrundsubstanz abbauen, als ein Osteoblast in der gleichen Zeit synthetisieren könnte [Ulfig 2011]. Die Regulation der Osteoklasten ist kompliziert und wird im Kapitel 1.1.3.2 Regulation der Bildung und des Abbaus der Knochenmasse (S. 9) erläutert.

1.1.3 Physiologie des Knochens

1.1.3.1 Knochenhomöostase und Remodeling

Das Skelett hat nicht nur Stütz-, Schutz- und Fortbewegungsfunktion zu erfüllen, sondern spielt ebenfalls eine sehr wichtige Rolle als Mineraldepot für Kalzium, Phosphat und Magnesium. 99% des im Körper enthaltenen Kalziums sind als Hydroxylapatit im Knochen gebunden. Das entspricht beim Erwachsenen 1 – 1,5kg [Bartl 2011]. Um die Stütz-, Schutz- und Fortbewegungsfunktion aufrechtzuerhalten, sind ständige Reparaturvorgänge und Modifizierungen erforderlich. Die im Kindesalter zunächst stattfindende Modifizierung ist das Längenwachstum, welches in den nicht

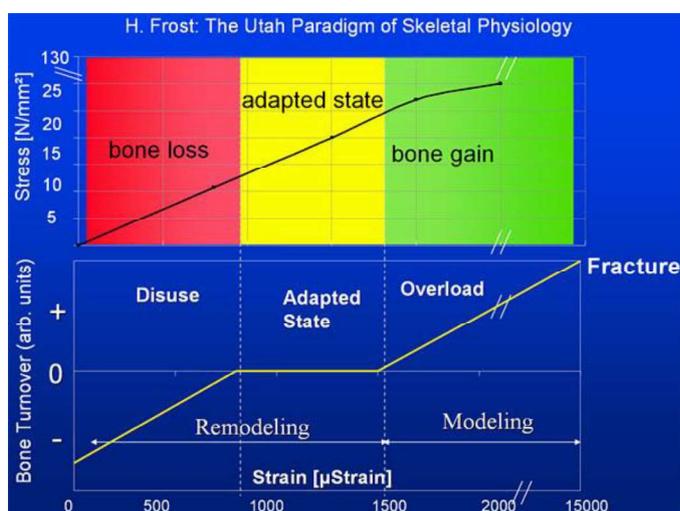


Abbildung 6: Wechselwirkung zwischen Knochenbelastung und Umsatz der Knochenmasse. Der Knochen reagiert als Mechanostat bei Mehrbelastung mit Knochenaufbau und umgekehrt bei Minderbelastung mit Knochenabbau. Bei Überbelastung kommt es zur Fraktur [Frost 2003].

verknöcherten Epiphysenfugen stattfindet. Eine weitere Modifikation ist die Ertüchtigung einer bereits etablierten Struktur, beispielsweise durch ein Dickenwachstum der Kompakta, um stärkeren Belastungen standzuhalten. Diese Fähigkeit, auf größere Lasten mit einer Steigerung der Knochenmasse durch Wachstum zu reagieren, nennt man Modeling [Ruimerman 2005]. Durch die Mitwirkung an der Elektrolythomöostase durch

Kalziumfreigabe würde der Knochen im Laufe der Zeit durch ständigen Mineralverlust und durch die gleichzeitig stattfindende Matrixalterung fortschreitend an Belastbarkeit verlieren. Um diesem Prozess entgegenzuwirken, wird die gesamte Knochengrundsubstanz kontinuierlich ausgewechselt. Diese ständige Erneuerung nennt man Remodeling [Bartl 2011]. Beim Modeling und Remodeling folgt der Knochen als Mechanostat (Abbildung 6) dem Wolff'schen Gesetz [Frost 2003]. Wolff formulierte, dass sich ein Knochen der jeweiligen Belastung durch Auf- und Abbau der Knochenmasse anpasst. Bei Minderbelastung ist ein Abbau und bei vermehrter Belastung ein Aufbau zu beobachten. Der Knochen reagiert allerdings auf Belastungsschwankungen nicht nur quantitativ, sondern zeigt zusätzlich eine qualitative architektonische Anpassung, bei der sich die Trabekel in Richtung der Trajektionslinien ausrichten und so dem Knochen eine einzigartige und dynamische Mikroarchitektur geben [Ruimerman 2005].

1.1.3.2 Regulation der Bildung und des Abbaus der Knochenmasse

Die Regulation über Bildung und Abbau der Knochenmasse ist kompliziert und immer noch nicht abschließend verstanden. Abbildung 7 soll einen ersten Überblick über die wichtigsten Einflussfaktoren geben.

Wie bereits im Kapitel 1.1.3.1 Knochenhomöostase und Remodeling erläutert, hat die mechanische Belastung einen sehr wichtigen Anteil an der Regulation der Knochenmasse. Weiteren Einfluss nehmen die Sexualhormone Östrogen und Testosteron. Sie wirken insgesamt stimulierend auf den Aufbau von Knochenmasse.

Östrogene bewirken zum einen den Verschluss der Epiphysenfugen und zum anderen eine Hemmung der Osteoklasten. Das Ausmaß der Hemmung wird deutlich, wenn man beispielsweise den in der Menopause stattfindenden physiologischen Abfall des Östrogens betrachtet, der bei vielen Frauen zu einem erheblichen Verlust von Knochenmasse aufgrund höherer Resorption führt [Nilas 1987].

Testosteron bewirkt als virilisierendes Hormon einen männlichen Phänotyp, der auch insgesamt über ein im Mittel größeres Skelett verfügt. Dabei beeinflusst Testosteron sowohl die Dicke der Kompakta [Danielsen 1992] als auch die Stärke der Trabekel [Filipović 2007].

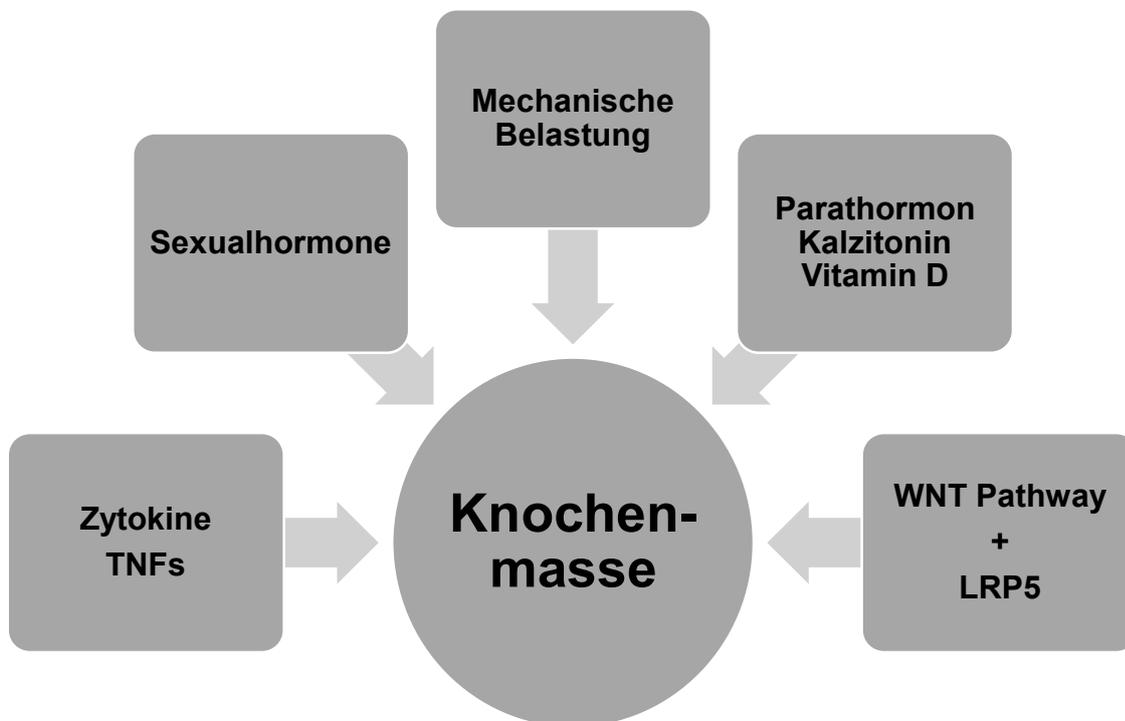


Abbildung 7: Auswirkung der wichtigsten Einflussfaktoren auf die Knochenmasse. Besonders hervorzuheben sind die Sexualhormone wie insbesondere das Östrogen, dessen wichtige Rolle bei der postmenopausalen Osteoporose zu Tage tritt. Ebenfalls wichtig sind die Einflussfaktoren, die den Kalziumstoffwechsel betreffen, also Parathormon, Kalzitinin und Vitamin D. Relativ neu ist die Erforschung des WNT Pathways.

Zytokine zeigen ebenfalls einen wichtigen Einfluss auf die Regulation der Knochenmasse. Proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF alpha scheinen einen osteokatabolen Effekt zu haben [McLean 2009].

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Knochenmasse ist das Parathormon. Das Parathormon (PTH) ist ein Peptidhormon, welches in den Nebenschilddrüsen gebildet wird. PTH reguliert sehr wichtige Funktionen, die die Kalziumhomöostase betreffen. Bei niedriger Kalzium-Konzentration im Blutplasma wird PTH vermehrt ausgeschüttet und bewirkt im Knochen eine schnelle Freisetzung von Kalzium. Allerdings werden nicht nur knöcherne Kalziumspeicher mobilisiert, sondern es wird auch zusätzlich die Rückresorption von Kalzium in Niere und Darm gefördert, sodass die Nettokalziumbilanz steigt. Gleichzeitig wird die Biosynthese von Kalzitriol induziert, sodass behauptet werden kann, dass PTH sowohl osteolytische als auch osteoprotektive (Kalzitriol, Rückresorption von Ca^{2+}) Eigenschaften aufzeigt [Bartl 2011].

Die Freisetzung von Kalzium bewirkt PTH zum einen durch eine Proliferation der Osteoklastenvorläufer und zum anderen an bereits ausdifferenzierten Osteoklasten durch Induktion osteolytischer Enzyme wie Kollagenase und weiterer lysosomaler Enzyme. Gleichzeitig wird die Membrandurchlässigkeit der Osteoklasten für Kalzium gesteigert. Aber auch an den Osteozyten scheint PTH eine Mobilisierung von Kalzium zu bewirken, indem es sie dazu veranlasst, Kalzium aus der unvollständig mineralisierten perilakunären Zone zu resorbieren [Parfitt 1976].

Die osteoprotektiven Eigenschaften des PTH finden sich in der bereits erwähnten Rückresorption von Kalzium in Darm und Nieren und in der Anregung der Synthese von Kalzitriol in den Nieren. Des Weiteren kann PTH die Osteoblastenapoptose vermindern und gleichzeitig durch Proliferation derselben die Osteoblastenzahl erhöhen mit dem Effekt, dass die Knochenmasse steigt [SwarthoutJT 2002].

Ein Grund für die breitgefächerte Wirkung des PTH wird mit der unterschiedlichen Dynamik der Freisetzung im Plasma erklärt. Eine kontinuierliche Ausschüttung fördert die katabolen Eigenschaften des PTH, während eine pulsative Freisetzung die anabolen Eigenschaften steigert [Bartl 2011].

Das fettlösliche Vitamin D ist ebenfalls essenziell für einen gesunden Knochen. Es wird über die Nahrung aufgenommen und weiter in Darm, Leber, Niere und Haut verstoffwechselt, bis es im Knochen seine Wirkung entfalten kann. Vitamin D wirkt auf den Kalziumhaushalt, indem es die Kalziumresorption im Darm erhöht und die Sekretion in der Niere vermindert. Außerdem verhilft es den Knochenzellen zu Differenzierung und Aktivität und fördert somit indirekt die Mineralisation, also den Einbau von Kalzium in den

Knochen [Bartl 2011]. Eine Metaanalyse der BMJ Group von 2011 zeigt, dass gerade im Knochenwachstum bei Kindern und jungen Erwachsenen Vitamin D von hoher Wichtigkeit für einen gesunden Knochenstatus ist, allerdings eine zusätzliche Supplementierung bei normalen Plasmaspiegeln keinen Vorteil in Bezug auf die Knochenmasse gibt [Winzenberg 2011].

Das Peptidhormon Kalzitonin wird in den C-Zellen der Schilddrüse gebildet und bewirkt bei Ausschüttung eine Senkung des Plasmakalziumspiegels und ist damit Gegenspieler des Parathormons. Dies geschieht zum einen durch eine Verminderung der Rückresorption von Kalzium in Darm und Nieren als auch durch eine Hemmung der Osteoklasten. Die klinische-therapeutische Relevanz dieser Hemmung ist allerdings fraglich [Adami 2005], da die Anhebung der Osteocyte-Masse minimal ist und darüber hinaus deutliche Nebenwirkungen von Kalzitonin die Anwendung weiter problematisch erscheinen lassen [Bartl 2011]. Allerdings gibt es Hinweise, dass bei glukokortikoidinduzierter Osteoporose Kalzitonin einen Knochenmassenverlust verhindern kann [Luengo 1994].

Ebenfalls entscheidend für eine ausgeglichene Regulation der Knochenmasse ist die Interaktion zwischen Osteoklasten und Osteoblasten, gesteuert durch das RANKL-Osteoprotegerin-Zytokinsystem [Bartl 2011]. Osteoblasten sezernieren M-CSF (macrophage colony stimulating factor), welches die Proliferation der Osteoklastenprogenitorzellen fördert. Des Weiteren produzieren Osteoblasten ein membrangebundenes Protein RANKL (receptor activator of Nuclear Factor- κ B Ligand) aus der Klasse der Tumornekrosefaktoren, welches mit dem RANK Rezeptor der inaktiven und undifferenzierten Osteoklasten interagiert. Bei der Bindung beider Proteine wird bei unreifen Osteoklasten eine Differenzierung und bei inaktiven Osteoklasten eine

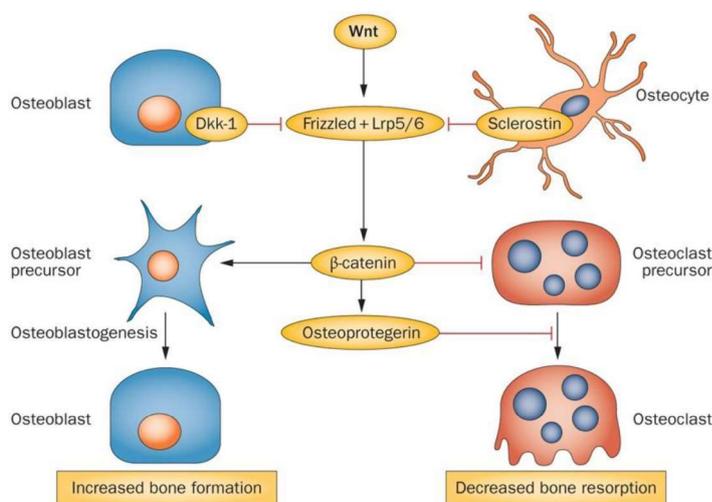


Abbildung 8: der WNT-Signalweg induziert die Osteoblastogenese und hemmt zusätzlich durch die Expression von OPG (Osteoprotegerin) die Osteoklastenaktivität. Resultat ist ein erhöhter Knochenaufbau [Canalis 2013].

Aktivierung und Bindung an den Knochen bewirkt [Lüllmann-Rauch 2009]. Allerdings besitzen Osteoblasten einen weiteren wichtigen Regulationsmechanismus über die Osteoklastenaktivität, dadurch dass diese ein weiteres Protein aus der Klasse der Tumornekrosefaktoren sezernieren können: das Osteoprotegerin (OPG) (Abbildung 8) [Canalis 2013]. Wie der Name bereits

vermuten lässt, bewirkt es eine Hemmung der Osteoklasten, indem OPG die RANK Rezeptoren der Präosteoklasten blockiert und so eine Aktivierung unterbindet. Ausgleichend werden beim Abbau der Knochengrundsubstanz durch Osteoklasten Wachstumsfaktoren wie Insulin-like growth factor freigesetzt (IGF-I und IGF-II), welche Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten fördern [Langdahl 1998]. Abschließend betrachtet, bildet das RANKL-Osteoprotegerin-Zytokinsystem einen der zentralen Regulationsmechanismen der Knochenmasse. Es wird dabei von vielen Zytokinen, Hormonen und Vitaminen beeinflusst und bietet damit wertvolle Zielpunkte für Medikamente [Bartl 2011].

Relativ neu ist die Erkenntnis, dass bestimmte Gene wie das LRP5-Gen (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gen) ebenfalls Einfluss auf die Regulation über die Bildung von Knochenmasse haben [Babij 2003]. Das Gen codiert für das gleichnamige Membranprotein LRP5, welches einen Komplex mit WNT und Frizzled bildet und auf diese Weise den Aufbau von Knochengrundsubstanz steigert [Harada 2003].

1.2 Osteoporose

1.2.1 Einführung und Definition

Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch einen Verlust von Knochenmasse und durch Unzulänglichkeiten in der Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist. Daraus resultierend zeigt der osteoporotische Patient klinisch eine erhöhte Fragilität der Knochen, die sowohl vom Alter als auch vom Geschlecht abhängt. In jungen Jahren zeigt sich das Bild der Osteoporose meistens subklinisch, während im Alter der Verlust an Knochenmasse zunimmt und damit einhergehend das Frakturrisiko signifikant steigt mit dem Resultat, dass Morbidität und Mortalität zunehmen.

Besonders häufig sind Frauen nach der Menopause betroffen. Nachdem der osteoprotektive Einfluss des Östrogens abgenommen hat, leiden postmenopausale Frauen ungefähr dreimal häufiger an Osteoporose als Männer. Hinzukommt, dass Frauen im Wachstum eine niedrigere „peak bone mass“ erreichen und darüber hinaus eine höhere Lebenserwartung haben.

Die mit der gesteigerten Knochenfragilität am häufigsten klinisch auftretenden osteoporoseassoziierten Frakturen sind Oberschenkelhalsfrakturen, Wirbelkörperfrakturen und distale Radiusfrakturen. Betrachtet man den demographischen Wandel in den Industrienationen, wird in Zukunft die Zahl der oben genannten Frakturen drastisch

zunehmen. Die World Health Organisation (WHO) geht beispielsweise allein bezüglich der Schenkelhalsfrakturen von einer Verdoppelung der Fallzahlen im Zeitraum von 1990 bis 2025 aus [WHO 2003].

Abschließend kann formuliert werden, dass Osteoporose ganz sicher zu den großen Volkskrankheiten wie Diabetes und Hypertonie gezählt werden muss und die Zukunft uns mit einer deutlich steigenden Anzahl an Patienten sowohl bei der Prävention als auch bei der Therapie der Erkrankung selbst und der daraus resultierenden traumatologischen Versorgung herausfordern wird.

1.2.1.1 Densitometrische und metabolische Klassifikation der Osteoporose

Die Osteoporose kann qualitativ nach der Höhe des Knochenumsatzes eingeteilt werden:

- Low turnover Osteoporose: niedriger Knochenumbau
- High turnover Osteoporose: hoher Knochenumbau

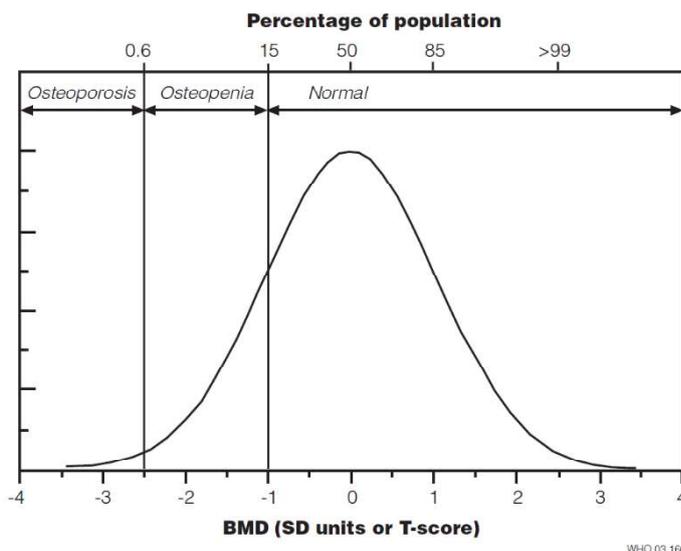


Abbildung 9: Densitometrische Klassifikation der Osteoporose mit Hilfe des T-Wertes. Der T-Wert beschreibt, wieviel Standardabweichungen der BMD des Patienten unterhalb des normalen Mittelwertes liegt. Der Mittelwert wird aus einer gesunden Grundgesamtheit gleichgeschlechtlicher 30-40 Jähriger errechnet. Ein T-Wert von -1 bis -2,5 definiert eine Osteopenie und bei einem T-Wert von unter -2,5 liegt eine Osteoporose vor [Kanis 2004].

Diagnostisch kann mit Hilfe von Knochenabbaumarkern wie Desoxypyridinolin und Cross-link-Telopeptide zwischen beiden Formen differenziert werden [Bartl 2011].

Von großer klinischer Relevanz ist die quantitative densitometrische Klassifikation mit Hilfe von DXA, die 1994 von der WHO standardisiert wurde (Abbildung 9).

Der T-Wert wird aus dem individuellen gemessenen Wert des Patienten bezogen auf die

peak bone mass einer Grundgesamtheit 30-40 jähriger geschlechtsgleicher Patienten errechnet, wobei beispielsweise ein T-Wert von -2 bedeutet, dass der Patient 2 Standardabweichung unter dem Mittelwert der Norm liegt.

Die WHO definiert demnach:

- Normal: T-Wert ≥ -1
- Osteopenie: T-Wert -1 bis $-2,5$
- Osteoporose: T-Wert $\leq -2,5$

Man spricht dann von einer schweren manifesten Osteoporose, sobald bei einem T-Wert von unter $-2,5$ auch noch eine oder mehrere Frakturen auftreten [WHO 1994].

1.2.1.2 Einteilung der verschiedenen Formen der Osteoporose

Osteoporose kann lokalisiert und generalisiert auftreten (Abbildung 10). Lokalisierte Formen der Osteoporose lassen sich etwa als Inaktivitätsosteoporose bei längerer Ruhigstellung einer Extremität beobachten. Ebenfalls sehr häufig ist diese lokale Form bei motorischen Lähmungen zu finden, wenn beispielsweise para- und tetraplegische Patienten an einen Rollstuhl gebunden sind und so die sonst so wichtige mechanische Belastung wegfällt und Knochenmasse konsequent abgebaut wird.

Eine weitere Form der lokalisierten Osteoporose ist bei der Sudeck'schen Heilentgleisung (complex regional pain syndrom; CRPS) zu beobachten. Neben Schwellung, Schmerz, Hypertrichosis und Hyperästhesie ist auch häufig eine Osteoporose zu beobachten [Mos 2008].

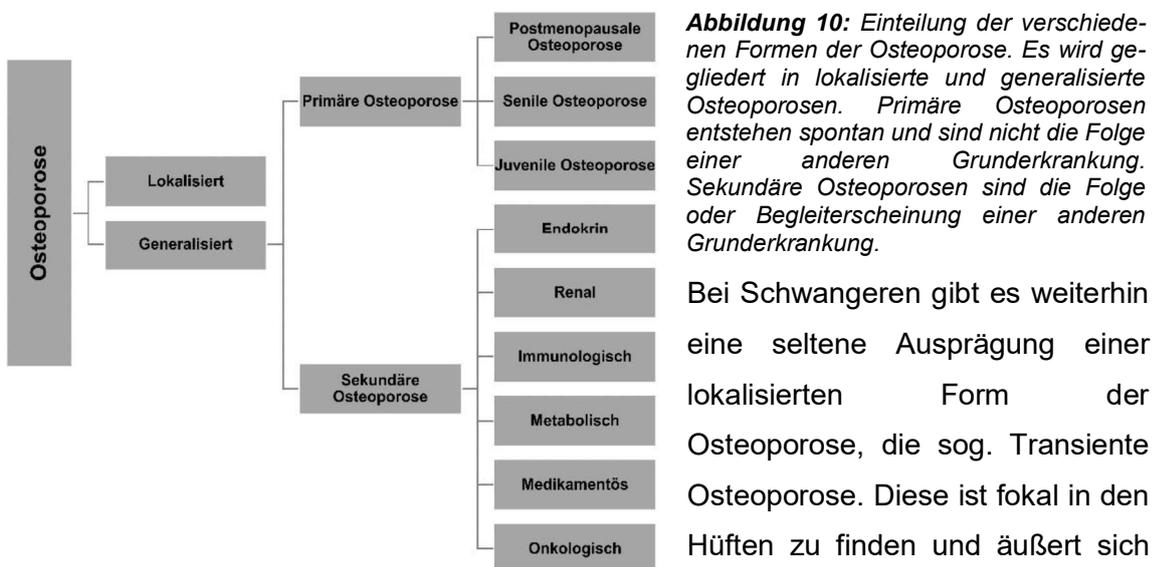


Abbildung 10: Einteilung der verschiedenen Formen der Osteoporose. Es wird gegliedert in lokalisierte und generalisierte Osteoporosen. Primäre Osteoporosen entstehen spontan und sind nicht die Folge einer anderen Grunderkrankung. Sekundäre Osteoporosen sind die Folge oder Begleiterscheinung einer anderen Grunderkrankung.

Bei Schwangeren gibt es weiterhin eine seltene Ausprägung einer lokalisierten Form der Osteoporose, die sog. Transiente Osteoporose. Diese ist fokal in den Hüften zu finden und äußert sich

klinisch durch Hüft- und Kreuzschmerzen. Allerdings ist der Zustand reversibel und meist nach einem Jahr vollständig zurückgebildet [Lübbe 2000].

Viel häufiger allerdings sind die systemischen generalisierten Osteoporosen. Hier kann man einmal nach Alter und Geschlecht klassifizieren oder aber auch nach der Höhe des Knochenumsatzes einteilen. Des Weiteren klassifiziert man auch nach der Ursache, ob

es sich um eine primäre (idiopathische) oder sekundäre (bekannte Ätiologie) Osteoporose handelt.

Die idiopathische juvenile Osteoporose ist eine seltene systemische Osteoporose, die nur bei präpubertären Kindern auftritt. Sie ist gekennzeichnet durch sehr frühen Beginn ohne bekannte Ursache mit Schmerzen in der Lendenwirbelsäule und der Hüfte. Der Verlauf ist häufig reversibel und kann durch Gabe von Vitamin D und Kalzium abgeschwächt werden [Enderle 2003].

Die idiopathische Osteoporose des jungen Mannes tritt zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr auf und ist assoziiert mit Nikotinabusus und insgesamt niedrigen freien Androgenspiegeln im Blutplasma [Bartl 2011; Pietschmann 2004].

Die häufigste Form der generalisierten primären Osteoporose ist hingegen die postmenopausale Osteoporose (Typ I Osteoporose). Diese tritt bei einem Drittel der Frauen nach der Menopause auf und ist durch einen Östrogenabfall mit einem bereits perimenopausalen Knochenabbau charakterisiert. Besonders häufig sind dabei klinisch die Lendenwirbelsäule und der Schenkelhals der Femora betroffen. Auffallend und im Unterschied zur senilen Osteoporose ist ein verstärkter Abbau des spongiösen Knochens zu beobachten [Bartl 2011]. Bei der postmenopausalen Osteoporose wird weiterhin zwischen einer frühen und einer späten Form differenziert. Beide Formen haben einen Knochenmasseverlust gemeinsam, wobei sich beide Formen in der Geschwindigkeit und Ursache des Knochenmasseverlustes unterscheiden. Bei der frühen Form, die in den ersten 10 Jahren nach der Menopause auftritt, sind sowohl Knochenaufbau als auch Knochenabbau erhöht, wobei aber die Knochenabbaurate höher ist und letztendlich einen schnellen Verlust an Knochenmasse bewirkt (high turnover osteoporosis). Bei der späten Form liegt ein normaler Knochenabbau in Kombination mit einem krankhaft erniedrigten Knochenaufbau vor. Der Knochenmasseverlust läuft bei der späten Form langsamer ab (low turnover osteoporosis).

Die primäre senile Osteoporose (Typ II Osteoporose) kann beide Geschlechter betreffen. Frauen sind dennoch zweimal häufiger betroffen als Männer. Der Verlust von Knochenmasse ist neben dem physiologischen Alterungsprozess durch weitere Ursachen bedingt. Dabei kommen zum einen altersbedingte Bewegungsarmut sowie ein Abfall an osteoprotektiven Sexualhormonen zum Tragen und zum anderen alimentäre Einflussfaktoren wie ein Vitamin D Mangel, häufig auch in Kombination mit einem Kalziummangel. Die senile Osteoporose tritt meistens nach dem 70. Lebensjahr auf. Der Übergang von postmenopausaler zur senilen Osteoporose kann fließend sein und beide Formen können sich dabei gegenseitig verstärken. Allerdings ist im Gegensatz zur

postmenopausalen Osteoporose bei der senilen Osteoporose auch der kortikale Knochen betroffen. Daraus resultiert, dass gerade bei dem an der senilen Osteoporose erkrankten Patienten ein erhöhtes Frakturrisiko im Bereich der Schenkelhalse, der distalen Radien und zuletzt auch der Wirbelkörper besteht, welches zusätzlich durch Gangunsicherheit und andere altersbedingte Erkrankungen gefördert wird.

Sekundäre Osteoporosen sind mit 5% der Fälle insgesamt deutlich seltener klinisch anzutreffen als die primären Formen, verursachen aber aufgrund ihres besonderen Schweregrades einen erheblichen überproportionalen therapeutischen Aufwand, da sie laut Bartl 2011 bis zu 20% der osteoporoseassoziierten Frakturen verschulden.

Die meisten sekundären Osteoporosen werden endokrinologisch verursacht. Ein gutes Beispiel dafür ist der Morbus Cushing. Durch erkrankungsbedingte oder iatrogene Hypercortisolämie wird eine vermehrte Expression von RANKL auf Osteoblasten bewirkt und gleichzeitig die Sekretion von OPG vermindert mit dem Resultat, dass Osteoklasten länger aktiv bleiben und später in die Apoptose gehen. Dazu vermindern Glukokortikoide über eine negative Rückkopplung die Ausschüttung osteoprotektiver Sexualhormone und bewirken darüber hinaus einen renalen und enteralen Kalziumverlust [Lange 2007]. Weitere endokrine Ursachen für eine Osteoporose können Hyperthyreose, Diabetes mellitus und Hyperparathyreoidismus sein.

Alimentäre Ursachen einer Osteoporose finden sich zum einen aufgrund einer altersbedingten Mangelernährung durch falsche Kost oder zum anderen bei gestörter gastrointestinaler Passage durch Malabsorptionssyndrome oder Operationen (Billroth OP). Die gestörte Aufnahme von Kalzium und Vitamin D haben dabei den entscheidenden Einfluss. Durch den Kalziummangel wird die Parathormon Ausschüttung stimuliert, welche wiederum Osteoklasten aktiviert, die anschließend Kalzium und Phosphat aus dem Knochen mobilisieren. Die Folge ist ein erhöhter Knochenabbau. Der zumeist parallel bestehende Vitamin D Mangel verschärft diese Problematik, da für die intestinale Kalziumresorption Vitamin D essenziell ist. Zu beobachten ist dies besonders bei älteren und pflegebedürftigen Patienten.

Bei der renal bedingten Osteoporose findet sich häufig ein sekundärer Hyperparathyreoidismus. Hier kommen zwei Faktoren zum Tragen. Erstens kann bei chronischer Niereninsuffizienz eine Störung der Kalzitriol Synthese auftreten und zweitens kann ein renaler Kalziumverlust und mangelnde Phosphatausscheidung therapieresistente Osteoporosen verursachen. Die gleichzeitige Hyperphosphatämie bewirkt, dass Phosphat freies Kalzium komplexiert und somit die bestehende Hypokalzämie verschärft. Hauptrisikogruppe sind dabei Patienten, die einer regelmäßigen Hämodialyse bedürfen [Bartl 2011].

Die Osteoporose bei Rheumatoider Arthritis hat verschiedene Ursachen. Durch immunologische Reaktionen kommt es zu einer verminderten Matrixsynthese im Knochen. Meist werden diese Reaktionen antiinflammatorisch mit Glukokortikoiden behandelt, wodurch sich die negativen Auswirkungen für den Knochen verschlimmern. Des Weiteren bereitet eine rheumatoide Arthritis häufig Schmerzen, die eine Schonung der betroffenen Gelenke bewirkt. Dadurch fehlt dem Knochen zusätzlich die mechanische Belastung als Stimulus für den Erhalt der Knochenmasse [Bartl 2011].

Neben Glukokortikoiden können viele weitere Medikamente die Entwicklung einer Osteoporose fördern. Allen ist gemein, dass sie durch Enzyminduktion den Vitamin D Metabolismus stören und/oder die gastrointestinale Kalziumaufnahme behindern. Wichtig zu nennen sind die Protonenpumpeninhibitoren, die alleine in Deutschland mit 2252,6 Millionen DDD (Defined Daily Dosis) pro Jahr mit zu den am häufigsten verschriebenen Medikamenten gehören. Antikoagulanzen wie Heparine und Vitamin-K-Antagonisten mit 486,3 Millionen DDD pro Jahr sind ebenfalls sehr häufig verordnete Substanzen, die dem Knochen schaden [Arzneiverordnungs-Report 2011].

Ein neoplastisches Geschehen kann ebenfalls verantwortlich für das Auftreten einer Osteoporose sein. Hierbei sind auf der einen Seite hämatologischen Erkrankungen, die das Knochenmark schädigen und auf der anderen Seite Metastasierungen solider Tumore zu nennen. Ein Beispiel für eine hämatologische neoplastische Erkrankung ist das Multiple Myelom. Dieses maligne Lymphom sezerniert Osteoklasten aktivierende Zytokine mit dem Resultat, dass Patienten in osteolytischen Zonen schwer zu versorgende Spontanfrakturen entwickeln und damit einhergehend gravierende Schmerzen und Verlust an Lebensqualität erleiden können [Straka 2010]. Des Weiteren können solide Tumore hämatogen in Knochen metastasieren und osteolytische Metastasen hervorrufen. Wachstumsfaktoren, wie TGF- β aus der Knochenmatrix, bewirken, dass Tumorzellen osteolytische Faktoren wie PTHrP (parathyroid hormone-related protein) und Interleukin-11 ausschütten [Guise 2003].

1.2.1.3 *Epidemiologie der Osteoporose*

Die Epidemiologie der Osteoporose in Deutschland wurde 2006 durch Häussler in der BoneEVA-Studie untersucht. Ergebnis dieser Studie war, dass hochgerechnet 7,8 Millionen Menschen mit einem Mindestalter von 50 in Deutschland an Osteoporose leiden. Das entspricht etwa einem Viertel der genannten Altersgruppe, wobei Frauen laut dieser Studie fünfmal häufiger betroffen sind [Häussler et al. 2006].

Age-specific incidence rates of hip, vertebral and Colles (forearm) fracture in Rochester, MN, USA^a

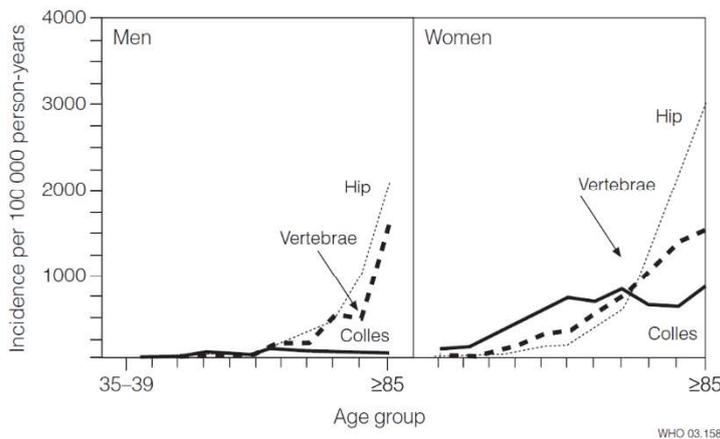


Abbildung 11: Alters- und geschlechtsspezifische Inzidenz für Oberschenkelhals-, Unterarm- und Wirbelkörperfrakturen erhoben durch die WHO in Rochester, MN, USA. Bei Frauen kommt es im Vergleich zu Männern schon früher zu allen drei genannten Frakturarten. Bis zum 70. Lebensjahr sind bei Frauen Unterarmfrakturen besonders häufig, gefolgt von Wirbelkörperfrakturen. Ab dem 70. Lebensjahr steigen Oberschenkelhalsfrakturen in ihrer Inzidenz sehr deutlich an und übertreffen dabei Wirbelkörper- und Unterarmfrakturen [Cooper 1992].

Um die Bedeutung der Erkrankung für das Gesundheitssystem und letztendlich auch für den Patienten zu unterstreichen, wurde zusätzlich das Frakturrisiko analysiert. 4,3% der 7,8 Millionen an Osteoporose erkrankten Patienten erlitten alleine 2003 eine Fraktur, die gerade im ambulanten Bereich leider selten einer Osteoporose als Grunderkrankung zugeordnet wurde [Häussler et al. 2006].

Die WHO analysierte ebenfalls das altersspezifische Risiko, eine Fraktur zu erleiden [WHO Technical Report Series 921 von 2003]. Das Risiko einer Fraktur im Alter steigt überproportional an (Abbildung 11). Vergleicht man diese Ergebnisse mit der BoneEVA Studie und den weiteren epidemiologischen Daten des WHO Berichts, so liegt es auf der Hand, dass viele Frakturen im Alter osteoporoseassoziiert sein müssen [Häussler et al. 2006]. Die Ergebnisse der Studien von Riggs et al. von 1995 und Cummings et al. von 2002 stützen die Ergebnisse des WHO Berichtes.

Prognostisch ist zudem eine Zunahme der Inzidenz von Osteoporose in den nächsten Jahren aufgrund des demographischen Wandels zu erwarten. Die BoneEva-Studie postuliert eine jährliche Zunahme von 13% der über 50-jährigen an Osteoporose leidenden Patienten [Hadji 2013]. Abschließend betrachtet wird deutlich, dass gerade im Hinblick auf die überalternde Bevölkerung in den Industrienationen die Osteoporose epidemiologisch eine erheblich zunehmende Bedeutung erlangt und dass das Bewusstsein für diese Volkskrankheit sowohl bei Ärzten als auch bei Patienten weiter geschärft werden muss.

1.2.1.4 Risikofaktoren für die Entwicklung einer Osteoporose

Die Risikofaktoren, die die Entstehung einer Osteoporose begünstigen, kann man wie folgt einteilen [Bartl 2011]:

- Beeinflussbare Risikofaktoren
- Nicht-beeinflussbare Risikofaktoren
- Osteoporose-induzierende Erkrankungen

Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren zählen:

- Zu geringes Körpergewicht (BMI<20)
- Übermäßige oder fehlende körperliche Aktivität
- Mangel an Kalzium und Vitamin D
- Die Fallneigung fördernde Umwelt wie z.B. Teppichkanten
- Nikotinabusus
- Alkoholabusus
- Hypogonadismus
- Direkt knochenschwächende Medikamente:
 - Glukokortikoide
 - Vitamin K Antagonisten
 - Heparine
 - Schleifendiuretika
 - Protonenpumpeninhibitoren

Zu den nicht-beeinflussbaren Risikofaktoren zählen:

- Familiäre Belastung und genetische Prädisposition
- Alter (physiologische Abnahme der Knochenmasse)
- Geschlecht (Frauen sind häufiger betroffen)

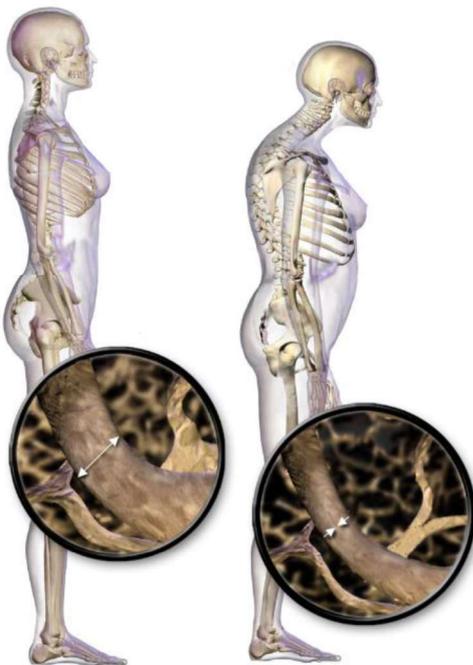
Zu den osteoporose-induzierenden Erkrankungen zählen:

- Rheumatische Erkrankungen
- Endokrinologische Erkrankungen
 - Morbus Cushing
 - Diabetes Typ I
 - Hyperparathyreoidismus
 - Hyperthyreose
 - Hypophyseninsuffizienz

- Malabsorptionssyndrome
- Hereditäre Erkrankungen
 - Marfan Syndrom
 - Ehlers-Danlos-Syndrom
 - Osteogenesis imperfecta
- Psychiatrische Erkrankungen: Depression

1.2.2 Diagnostik der Osteoporose

Frühklinisch fällt der osteoporotische Patient häufig durch akuten oder chronischen Rückenschmerz auf. In fortgeschrittenen Stadien treten Frakturen auf, wobei insbesondere Sinterungsfrakturen der Wirbelkörper zu einer Abnahme der Körpergröße führen. Bei der körperlichen Untersuchung zeigen sich dann Kyphosen. Der sogenannte



„Gibbus“ (Witwenbuckel) wird durch eine Keilwirbelbildung in der Hals- und Brustwirbelsäule hervorgerufen (Abbildung 12) [Blausen 2014]. Darüber hinaus kann das Tannenbaumphänomen zu finden sein. Das Tannenbaumphänomen beschreibt stehende Hautfalten im dorsolateralen Lendenwirbelsäulenbereich, die durch den Größenverlust verursacht werden. Ebenfalls sind Frakturen ohne adäquates Trauma ein wertvoller Hinweis auf das Vorliegen einer Osteoporose. Bei dergestalt auffälliger Klinik oder auch zur Prävention sollte dann diagnostisch nach einer Osteoporose gesucht werden. Neben körperlicher Untersuchung und ausführlicher Anamnese steht auch weiterführende apparative Diagnostik zur Verfügung.

Abbildung 12: Veränderungen der Körperhaltung und -statik durch Osteoporose. Verminderte Knochendichte und verschlechterte Mikroarchitektur führen zu Keilwirbeln mit Kyphosen (Gibbus), insbesondere der Brustwirbelsäule [Blausen 2014].

1.2.2.1 Diagnose mit Dual-Energy X-ray Absorptiometry

DXA (engl. Dual-Energy X-ray Absorptiometry) stellt eine Weiterentwicklung der Single Energy Densitometry (SXA) dar. Beim DXA werden zwei Röntgenstrahlen unterschiedlicher Energie erzeugt und durch das zu untersuchende Gewebe auf einen Detektor geworfen. Da die verschiedenen Gewebe je nach ihrer Festigkeit, Wasser- und

Mineralgehalt unterschiedliche Schwächungscharakteristiken für Röntgenstrahlen haben, können die jeweiligen Extinktionen der beiden Röntgenstrahlen mathematisch in Bezug gesetzt werden und anschließend so eine Aussage über die Beschaffenheit des Gewebes getroffen werden. Dabei wird ein zweidimensionales digitales Bild entworfen mit dem eine entsprechende Software die Bone Mineral Density (BMD) errechnen kann. Die BMD hat die Dimension g/cm^2 und ist demnach eine Flächendichte. Mit Hilfe dieses Wertes kann dann wie bereits im Kapitel 1.2.1.1 „Densitometrische und metabolische Klassifikation der Osteoporose“ der T-Score ermittelt und so eine Aussage über den Knochenstatus des Patienten getroffen werden.

Messorte beim DXA sind die proximalen Femora, die Lendenwirbelsäule und der distale Unterarm, also genau die Regionen, wo die meisten Osteoporose assoziierten Frakturen auftreten. Des Weiteren kann der gesamte Körper gescannt werden und so sehr genau der kortikale Knochen beurteilt werden, da 80% der Knochenmasse der Kortikalis zugeordnet sind. Auch Aussagen über die „weichen“ Gewebe wie Körperfettgehalt und Muskelmasse sind mit einem Ganzkörperscan möglich.

Allerdings hat DXA konstruktionsbedingt auch Nachteile. Zum einen wird eben eine Flächendichte errechnet, bei der die Weichteilgewebe oberhalb, im und unter dem Knochen ebenfalls in die Berechnung mit einfließen, sodass der ermittelte BMD zum Teil auch gewichtsabhängig ist. Ein weiterer Nachteil der Flächendichte ist, dass keine Aussage über die geometrische Qualität des Knochens gemacht werden kann und so gerade bei der Beurteilung der Trabekel Schwierigkeiten auftreten können [Marcus 2008]. Außerdem kann DXA, wenn ein zu niedriger BMD-Wert detektiert wurde, nicht zwischen einer High-Turnover und einer Low-Turnover Situation differenzieren.

Vorteile des DXA sind eine weitreichende Verfügbarkeit, gute Datenlage, geringe Strahlenbelastung ($1-5 \mu\text{Sv}$) und letztendlich auch ein günstiger Preis, sodass die Leitlinie der DVO DEXA als das Standardverfahren zur Diagnostik der Osteoporose festlegt [DVO Leitlinie 2014].

1.2.2.2 *Quantitative Computertomographie (QCT)*

Die QCT ist ebenfalls eine Möglichkeit zur nichtinvasiven Messung der BMD. Besonders häufig werden im QCT Wirbelkörper der Lendenwirbelsäule gemessen, da dort besonders sensitiv Veränderungen bezüglich der Knochenmasse festgestellt werden können. Vorteil des QCTs ist, dass man eine echte Volumendichte erhält und gleichzeitig die geometrische Qualität von Spongiosa und Kompakta beurteilen kann. Nachteilig ist die höhere Strahlenbelastung ($60 \mu\text{Sv}$) als beim DEXA, die aber insgesamt deutlich

niedriger als beim herkömmlichen CT ist, und dass das proximale Femur mit den Standardgeräten nicht beurteilt werden kann [Markus 2008].

1.2.2.3 *Quantitative Ultraschallmessung (QUS)*

Eine weitere Methode zur Beurteilung des Knochenstatus stellt die quantitative Ultraschallmessung (QUS) dar. Anhand der Charakteristik von Absorption, Reflexion und deren Geschwindigkeiten stehen verschiedene Parameter zur Beurteilung des Knochens zur Verfügung. Gemessen wird dabei an Körperstellen, die leicht zugänglich sind, wie Phalangen, Kalkaneus und der distale Radius.

Vorteile sind die einfache Handhabung und die fehlende Strahlenbelastung, sodass sich die QUS hervorragend als Screening Methode eignen würde. Nachteilig ist, dass Ergebnisse bezüglich der Knochenmasse an den Phalangen nur bedingt zum Beispiel auf die Lendenwirbelsäule übertragen lassen, sodass hier DXA und QCT bei einem Verdacht auf Osteoporose die Diagnostik weiterführen müssen [Bartl 2011].

1.2.2.4 *Konventionelles Skelettröntgen*

Das Standardröntgenbild in 2 Ebenen gibt nur sehr spät Hinweise auf das Vorliegen einer Osteoporose. Dennoch kann das konventionelle Röntgen gute Hinweise auf bereits erlittene Frakturen liefern oder Skoliosen der Wirbelsäule erkennen. Des Weiteren können Dichteminderungen und eine Ausdünnung der Substantia compacta beobachtet werden.

1.2.2.5 *Differenzialdiagnosen zur Osteoporose*

Zu den wichtigsten Differenzialdiagnosen zählen andere generalisierte und lokale Osteopathien sowie die Osteomalazie.

Zu den lokalen Osteopathien zählen die Osteomyelitis, die Knochennekrose und der Morbus Paget. Alle drei Erkrankungen führen zu einem lokalen Strukturverlust des Knochens mit Schmerzen und erhöhter Frakturanfälligkeit. Zu den generalisierten Osteopathien zählt die Ostitis fibrosa, bei der durch einen Hyperparathyreoidismus Osteoklasten soweit stimuliert werden, dass zystische Hohlräume im Knochen entstehen, die mit Bindegewebe aufgefüllt als braune Tumoren imponieren.

Bei der Osteomalazie (bei Kindern Rachitis genannt) liegt eine unvollständige Mineralisierung der Knochengrundsubstanz vor. Hervorgerufen wird die Osteomalazie

durch einen Vitamin D Mangel häufig in Kombination mit einem Kalziummangel. Klinisch fällt der Patient, wie bei der Osteoporose auch, durch lokale Knochenschmerzen, pathologische Frakturen und Gehstörungen auf. Im Gegensatz zur Osteoporose sind durch die mangelnde Mineralisierung der Knochengrundsubstanz die Knochen weich und biegsam, sodass in der Bildgebung abnorme Knochenverbiegungen auffallen können. Durch die Hypokalzämie kann auch häufig eine Tetanie beobachtet werden. Ursachen für eine Osteomalazie können sein:

- Vitamin D Mangel oder Stoffwechselstörung
- Renale Funktionsstörung
 - Phosphatdiabetes
 - De-Toni-Debré-Fanconi-Syndrom
- Phosphatasemangel (Hypophosphatasie)

Die Osteomalazie führt ebenfalls wie die Osteoporose zu erniedrigten Knochendichteparametern beim DXA, da das Osteoid unvollständig mineralisiert ist. Bei der Osteoporose ist die Knochengrundsubstanz hingegen mineralisiert aber insgesamt dennoch vermindert. Bei älteren Patienten und postmenopausalen Frauen können eine Osteoporose und Osteomalazie in Kombination auftreten.

1.2.2.6 *Therapie und Prävention der Osteoporose*

Da bei Therapie und Prävention der Osteoporose sehr ähnliche Optionen zur Verfügung stehen, werden diese hier gemeinsam dargestellt. Man unterteilt dabei grundsätzlich in pharmakologische und nicht-pharmakologische Maßnahmen (Tabelle 1). Welche Maßnahmen wann getroffen werden, richtet sich, unter besonderer Berücksichtigung des Frakturrisikos des Patienten, nach der individuellen Risiko-Nutzen Abschätzung des behandelnden Arztes. Wichtig dabei ist eine Abschätzung des osteoporoseassoziierten Frakturrisikos:

Risikofaktoren für das Auftreten osteoporose-assoziiierter Frakturen [Bartl 2011]:

- Fallneigung fördernde Umwelt wie Teppichkanten
- In der Vorgeschichte aufgetretene atraumatische oder niedrigtraumatische Frakturen
- Demenz und andere neurologische Systemerkrankungen
- Fallneigung fördernde Medikamente:
 - Sedativa
 - Neuroleptika

- Antihypertensiva

Nicht-pharmakologische Maßnahmen beschreiben neben dem Ausschalten beeinflussbarer Risikofaktoren auch diätetische Maßnahmen. Eine Kalzium- und Vitamin D reiche Ernährung hilft, den Knochen zu festigen und kann wirksam gegen eine Progredienz der Osteoporose sein.

Nicht Pharmakologisch	Diätetische Maßnahmen		Lebensalter in Jahren		T-Wert
	Körperliche Belastung	Kontrolle Körpergewicht	Frau	Mann	
Pharmakologisch	Sturzprophylaxe		<50	<60	-4,0
	Schmerztherapie		50-60	60-70	-4,0
	Bisphosphonate		60-65	70-75	-3,5
	Östrogene und SERM		65-70	75-80	-3,0
Denosumab / PTH		70-75	80-85	-2,5	
		>75	>85	-2,0	

Tabelle 1: Bei der Therapie und Prävention der Osteoporose gibt es neben Lebensstiländerungen und Ausschalten beeinflussbarer Risikofaktoren wichtige pharmakologische Maßnahmen wie Bisphosphonate, Denosumab und PTH

Tabelle 2: Schwellenwerte der T-Werte bei der die DVO Leitlinie von 2014 eine medikamentöse Therapie begonnen werden sollte [DVO Leitlinie 2014].

Die Körperliche Aktivität steigert neben der Knochenstabilität auch Muskelkraft und Balance, sodass Stürze verhindert werden können. Zur weiteren Sturzprophylaxe sind neben geeignetem Schuhwerk und einer Kontrolle des Visus ein hindernisfreies Wohnumfeld oder bei einer bestehenden schweren Fallneigung das Tragen von Hüftprotektoren sinnvoll. Des Weiteren sollte die Medikation des Patienten kritisch und verantwortungsvoll auf sturzfördernde Pharmaka untersucht und deren Risiko/Nutzen Verhältnis reevaluiert werden und dann, wenn möglich und notwendig, auf weniger sturzfördernde Medikamente umgestellt werden. Sind die nicht medikamentösen Maßnahmen erschöpft oder ergibt sich, wie die DVO Leitlinie von 2014 empfiehlt, ein 10 Jahres Risiko von Wirbelkörper- und proximalen Femurfrakturen von über 30%, dann sollte mit einer spezifischen medikamentösen Therapie begonnen werden. Fällt die Abschätzung des Frakturrisikos schwer, formuliert als weitere Hilfe die Leitlinie Schwellenwerte der T-Werte der Knochendichte für die Lendenwirbelsäule, das proximale Gesamtfemur und den Oberschenkelhals, bei deren Überschreitung eine Therapie dringend in Erwägung gezogen werden sollte (Tabelle 2).

Die Indikation passt sich außerdem noch an das Vorliegen der bereits genannten Risikofaktoren an, speziell an bereits erlittenen Frakturen. Hier kann eine spezifische medikamentöse Therapie auch begonnen werden, wenn der Schwellenwert des T-Wertes bisher noch nicht erreicht wurde. Die DVO Leitlinie von 2014 nennt

auszugsweise weitere folgende Risikofaktoren, die die Therapieschwelle mit beeinflussen:

1. Allgemeine Risiken
 - a. Periphere Fraktur nach dem 50. Lebensjahr
 - b. Singuläre Wirbelkörperfraktur 1. Grades
 - c. Familiäre Prädisposition
 - d. Immobilität
 - e. Stürze
 - f. Nikotinabusus
 - g. Erhöhte Abnahme der Knochendichte ab 5% in zwei Jahren
2. Erkrankungen
 - a. Hyperkortisolismus
 - b. Hyperparathyreoidismus
 - c. Hypophyseninsuffizienz
 - d. Diabetes mellitus Typ I
 - e. Rheumatoide Arthritis
 - f. Epilepsie
 - g. Hypogonadismus
3. Medikamentöse Therapien
 - a. Intensivierte Glukokortikoidtherapie
 - b. Antiandrogene Therapie
 - c. Aromatasehemmer

Grundsätzlich sind bei der medikamentösen Therapie zwei Strategien möglich. Einerseits bietet die Verwendung sogenannter Antiresorptiva (Medikamente, die den Knochenabbau hemmen) eine gute klinisch bereits erprobte Möglichkeit weiteren Knochenmasseverlust zu verhindern. Andererseits stehen auch Medikamente zur Verfügung, die direkt osteoanabol wirken (Tabelle 3).

Zu den Antiresorptiva zählen die Bisphosphonate, SERM (selektive Östrogen Rezeptor Modulatoren), Östrogen und das Denosumab. Bisphosphonate legen sich an die Knochenoberfläche und verhindern zum einen den Knochenabbau durch Osteoklasten. Zum anderen haben Bisphosphonate einen direkt toxischen Effekt auf die Osteoklasten und induzieren eine frühere Apoptose. SERMs (Raloxifen) und Östrogene hemmen die Osteoklasten direkt und führen ebenfalls zu einer erhöhten Knochenmasse. Das seit 2010 in der Europäischen Union zugelassene Denosumab verfolgt einen neuen Wirkungsansatz. Denosumab bindet als monoklonaler Antikörper an RANKL und

verschiebt so die Balance von RANK/RANKL und OPG in Richtung des osteoprotektiven OPGs und vermindert so Anzahl und Aktivität der Osteoklasten.

Zu den direkt osteoanabolen Medikamenten zählen das Parathormon mit seinem synthetischen Derivat Teriparatid sowie Fluoride, Strontium und anabole Geschlechtshormone wie Testosteron.

	Weniger Wirbelkörper-Frakturen	Weniger periphere Frakturen	Weniger proximale Femurfrakturen
Alendronat	A	A	A
Bazedoxifen	A	B	-
Denosumab	A	A	A
Ibandronat	A	B	-
Raloxifen	A	-	-
Risedronat	A	A	A
Zoledronat	A	A	A
Teriparatid*	A	B	-
Östrogene*	A	A	A
Strontiumranelat *	A	A	B

Tabelle 1: Übersicht der aktuellen zugelassenen Präparate mit deren Therapieeffizienz zur Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen mit dem jeweiligen Evidenzgrad. Es sollte immer eine Basistherapie mit Kalzium und Vitamin D erfolgen. Bei einigen Präparaten bestehen noch Zulassungsbeschränkungen [DVO Leitlinie 2014].

1.3 Hypothese und Zielsetzung

Die Krankheit Osteoporose, definiert als systemische Skeletterkrankung, beschränkt sich nach derzeitigem Kenntnisstand auf Menschen und weitere Spezies. Daraus resultierend ergeben sich Probleme bei der Etablierung und Qualitätssicherung eines geeigneten Tierversuchmodells, um die gegenwärtig bestehenden Defizite hinsichtlich der Erforschung der Pathogenese und Pathophysiologie der Osteoporose zu beseitigen. Wie bereits im Kapitel „Epidemiologie der Osteoporose“ erläutert, besteht große Notwendigkeit neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten zu ergründen, um in Zukunft auf steigende Patientenzahlen effektiv und effizient schon in der Prophylaxe reagieren zu können. Deswegen ist die Etablierung und Qualitätssicherung eines geeigneten Kleintiermodells notwendig, um koordinierte und vergleichbare Forschung zu ermöglichen und um letztendlich neue Behandlungsmöglichkeiten beim erkrankten prötischen Knochen zu finden.

Zielsetzung dieser Arbeit ist, zum einen ein geeignetes Kleintier zur Induktion der häufigsten und relevantesten humanen Osteoporosen zu finden, und zum anderen mit radiologischen und histologischen Untersuchungsmethoden die Osteoporose bei

diesem Lebewesen zu quantifizieren und qualifizieren. Dabei hat sich in verschiedenen vorangegangenen experimentellen Studien die Ratte als geeignetes Kleintier herausgestellt, da sie ein den Frauen ähnliches Hormonprofil aufweist und zusätzlich einfacher in der Haltung ist.

Im Speziellen sollen folgende Hypothesen überprüft werden:

- Im Kleintiermodell Ratte kann durch eine bilaterale Ovariectomie in Kombination mit einer multidefizitären Diät ein Knochenstatus im Sinne einer postmenopausalen High-Turnover Osteoporose hervorgerufen werden und dieser dann mit DXA und Histomorphometrie quantifiziert sowie qualifiziert werden.
- Nach längerer Standzeit der Versuchstiere kann im gleichen Modell ein Knochenstatus beobachtet werden, der mit dem einer senilen Low-Turnover Osteoporose vergleichbar ist.
- Durch eine Glukokortikoidapplikation im Kleintier Ratte wird eine steroidinduzierte Osteoporose hervorgerufen.
- Multidefizitäre Diät, Glukokortikoidapplikation und lange Standzeit führen zu einer Abnahme der mit DXA ermittelten Knochenmasse.
- Multidefizitäre Diät, Glukokortikoidapplikation und lange Standzeiten führen zu einer histomorphometrisch messbaren Ausdünnung des Trabekelwerks.

Durch Ovariectomie, Glukokortikoide und Diät ist es nun das Ziel der Arbeitsgruppe, bei der Ratte die häufigsten Pathogenesen der humanen Osteoporose zu simulieren, zu sichern und an eindeutigen Parametern festzumachen.

In dieser Arbeit werden Daten bezüglich der histomorphologischen Veränderungen und der Auswirkungen auf die Knochendichte mit Hilfe der Dual X-Ray Absorptiometrie (DXA) erhoben und ausgewertet. Es wird überprüft, ob die genannten Methoden in der Lage sind, hinsichtlich DXA und Histomorphometrie eindeutig eine postmenopausale, steroidinduzierte und senile Osteoporose im Rattenmodell zu induzieren und zu sichern.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuchsmodell

Für die Untersuchung des Zusammenhanges von Osteodensitometrie und Histomorphometrie bei osteoporotischen Ratten wurden im Rahmen des Teilprojektes T1 des SFB/Transregio 79 (DFG: Deutsche Forschungsgemeinschaft) insgesamt 80, 10 Wochen alte weibliche Ratten vom Typ Sprague Dawley (CrI:CD(SD); Charles River Laboratories, Research Models and Services Germany GmbH, Sulzfeld, Deutschland) gekauft. Der Tierversuchsantrag entsprach den derzeit geltenden deutschen Gesetzen und wurde durch das Regierungspräsidium Gießen, Veterinärdezernat (Schanzenfeldstraße 8, 35578 Wetzlar, Deutschland) genehmigt (Aktenzeichen: 89/2009).

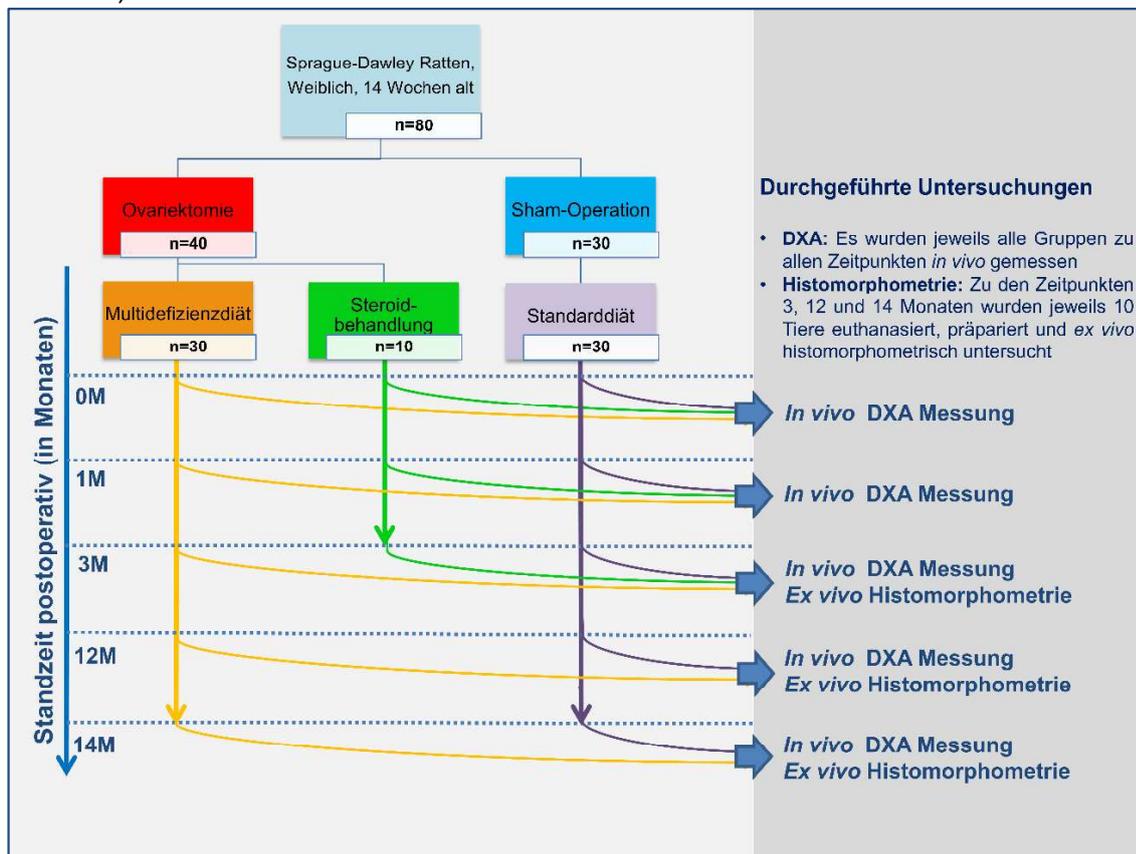


Abbildung 13: Zeitlicher Ablauf der DXA Messungen und Histomorphometrie. 14 Wochen alte Sprague-Dawley Ratten wurden randomisiert auf zwei Gruppen aufgeteilt und operiert: Ovariectomie-Gruppe (rot) und die Sham-Gruppe (hellblau). Der Zeitpunkt der Operationen wurde als Startzeitpunkt (0 Monate) gesetzt. Die Sham-Gruppe erhielt eine Standarddiät (lila) mit einer Standzeit von 14 Monaten. Die Ovariectomie-Gruppe wurde weiter unterteilt in eine Diätgruppe (orange) mit einer Standzeit von 14 Monaten und eine Steroidgruppe (grün) mit einer Standzeit von 3 Monaten. Zu den Zeitpunkten 0, 1, 3, 12 und 14 Monate wurden *in vivo* DXA Messungen aller Tiere vorgenommen. Zu den Zeitpunkten 3, 12 und 14 Monate wurden jeweils 10 Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt euthanasiert und *ex vivo* histomorphometrisch nachuntersucht.

In einem Alter von 10 Wochen wurden die Versuchstiere im Zentralen Tierlaboratorium der Justus-Liebig-Universität Gießen (Frankfurter Straße 105, 35392 Gießen, Deutschland) eingestallt. Anschließend wurden die Tiere randomisiert in drei Gruppen aufgeteilt (Abbildung 13). Die Kontrollgruppe diente als Referenz und bestand aus 10 Tieren. Kurz nach der Einstellung wurde die Kontrollgruppe *in vivo* DXA gemessen und danach euthanasiert, präpariert und *ex vivo* histomorphometrisch untersucht. Die anderen beiden Gruppen bestanden aus der Sham-Gruppe und der Ovariectomie-Gruppe. Die Sham-Gruppe wurde nach einer Eingewöhnungszeit von 4 Wochen einer Sham-Operation (=Scheinoperation, hier: Laparotomie) unterzogen, damit die Versuchstiere möglichst ähnliche Stressoren wie die der Ovariectomie-Gruppe erfahren und so mögliche Auswirkungen der Interventionen auf den Knochenstatus gleich gehalten werden. Die Sham-Gruppe erhielt nach Abschluss der Operation ein Standardfutter. Die Ovariectomie-Gruppe wurde ebenfalls nach einer Eingewöhnungszeit von 4 Wochen einer bilateralen Ovariectomie unterzogen und anschließend randomisiert in zwei Untergruppen nämlich Steroid-Gruppe und Diät-Gruppe unterteilt. Die Steroid-Gruppe erhielt im Abstand von zwei Wochen eine subkutane Injektion von Dexamethason mit einer Dosis von 0,3mg/kg Körpergewicht. Die Diät-Gruppe erhielt eine Vitamin D₃-, Vitamin K-, kalzium-, phosphatarmer Multidefizienzdiät. Um den weiteren zeitlichen Ablauf zu verdeutlichen, wurde der Zeitpunkt der Operationen als Startzeitpunkt *post interventionem* gewertet (t=0 Monate). Alle genannten Zeitangaben beziehen sich auf diesen Startzeitpunkt. Bei der Sham-Gruppe und der Diät-Gruppe war eine Standzeit von 14 Monaten vorgesehen. Die Versuchstiere der Steroid-Gruppe hatten eine kürzere Standzeit von 3 Monaten. Zur Datenerhebung wurden *in vivo* DXA Messungen aller Gruppen an den Zeitpunkten 0, 1, 3, 12 und 14 Monate durchgeführt (Ausnahme Steroid-Gruppe mit Standzeit von 3 Monaten). Für die histomorphometrischen Untersuchungen wurden zu den Zeitpunkten 3, 12 und 14 Monate jeweils 10 Tiere pro Gruppe euthanasiert und präpariert.

2.1.1 Tierhaltung und –fütterung

Für die gesamte Versuchsdauer wurden die Ratten artgerecht und fachgerecht im Zentralen Tierlaboratorium der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten. Die Haltung erfolgte in Gruppen von 3 - 4 Tieren in mit Holzspänen ausgestreuten Makrolonkäfigen Typ III und IV (EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH und Co.KG, Emmendingen; EBECO E.Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel; Tecniplast S.p.a., Buguggiate, Italien) aus einer Polycarbonatwanne mit einem aus Gitterstäben geformten Deckel. Die Fütterung war nicht begrenzt, erfolgte aber den jeweiligen Vorgaben der

Versuchsgruppe. Das anfängliche unter Standardlaborbedingungen gemessene durchschnittliche Gewicht betrug zwischen 250-290g. Identisches Leitungswasser und das für die Gruppe entsprechende Futter (Diätfutter oder Standardfutter: Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage) stand jederzeit ebenfalls ad libitum zur Verfügung. Bei der Zusammensetzung des Diätfutters wurde der Vitamin D3-, Vitamin K-, Kalzium- und Phosphatgehalt auf ein notwendiges Minimum reduziert. Die Raumtemperatur lag bei 22°C (+/- 2°C) und die relative Luftfeuchtigkeit betrug 50% (+/- 5%) und zusätzlich wurde der Tag-Nacht-Rhythmus durch ein automatisch gesteuertes Lichtprogramm simuliert mit einer 12 stündigen Beleuchtung von 6:00 – 18:00 Uhr am Tag.

2.1.2 Defizitäre Diät und Steroidbehandlung

Nach zwei Wochen Heilungszeit folgte die Steroidbehandlung der Steroid-Gruppe. Im Abstand von zwei Wochen bis zur Euthanasie erhielten die Ratten eine Injektion von 0,3 mg/kg Körpergewicht Dexamethason-21-isonicotinat (Voren® Depot, Fa. Böhringer Ingelheim GmbH, Ingelheim, Deutschland) in die Nackenfalte.

Um den Effekt einer Mangelernährung auf den Knochenstatus zu untersuchen, wurde zusätzlich die Ernährung der Diät-Gruppe auf ein spezielles Diätfutter umgestellt. Dieses hatte in seiner Zusammensetzung im Vergleich zum Standardfutter keine kalorischen Unterschiede, allerdings 0% Vitamin D2/D3, 15% Calcium, 7% Phosphor, 50% Vitamin K und 75% Kalium und enthielt weder Soja noch Phytoöstrogene. Zur Verfügung gestellt wurde dieses Futter von der Altromin Spezialfutter GmbH (Altromin-C1034 und C100, Fa. Altromin-Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland).

2.1.3 Ovariectomie und Sham-Operation

2.1.3.1 Narkose

Die für die Operationen notwendige Immobilisation wurde erreicht durch eine Vollnarkose mit intravenöser Applikation einer Mischspritze mit 62.5 mg/kg Körpergewicht Ketamine (Hostaket®, Fa. Hoechst, Bad Soden, Deutschland) und 7.5 mg/kg Körpergewicht Xylazine (Rompun® 2%, Fa. Bayer Health Care AG, Leverkusen, Deutschland), gelöst in körperwarmer 0,9% NaCl-Lösung, erreicht. Für die intravenöse Applikation wurde eine G26 Kanüle in eine Schwanzvene der Tiere gelegt.

2.1.3.2 *Sham-Operation und Ovariectomie*

Zur Vorbereitung wurde die Haut dorsobilateral rasiert (Rasierer für Labornager, Indulab Model 1574) und mit einem Povidon-Iod-haltigen alkoholfreien Hautantiseptikum (Braunol®, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Um eine Unterkühlung zu verhindern, wurde die Ratte auf eine Heizmatte mit maximal 38°C gelegt. Um Netzhautschäden und Austrocknung der Augen zu vermeiden, wurde kranial ein Sichtschutz aus rotgefärbtem Plexiglas für die Ratte installiert und die Augen mit Panthenolsalbe geschützt.

Für die Operation wurde das Operationsgebiet steril abgedeckt und dann kranial der Schenkelfalte über der Lendenwirbelsäule mit einer Schere ein etwa 1 cm langes und etwa 0,5 cm großes Stück Haut herausgeschnitten und anschließend weiter stumpf das Bindegewebe zwischen Haut und Muskelgewebe freipräpariert (Abbildung 14; A). Beim Erreichen des Peritoneums wurde dieses mit einer Pinzette gegriffen und angehoben und dann unter Sicht ein Scherenschlag durchgeführt, sodass Luft in die Bauchhöhle eindringt (Abbildung 14; B). Anschließend wurde durch Spreizen der Pinzette die Öffnung zur Bauchhöhle weiter präpariert, bis Uterus und Ovar sichtbar wurden. Uterus und Ovar wurden dann mit dem umliegenden Fettgewebe mit einer zweiten Pinzette nach außen gezogen (Abbildung 14; C). Das so freigelegte Ovar wurde unterhalb ligiert und so die Gefäßversorgung abgebunden (Abbildung 14; D). Anschließend wurde das Ovar entfernt. Je nach Größe des Bauchschnittes wurde dieser mit einem resorbierbaren 5-0 Faden (Vicryl UPS = 1,0 metric) mit 2 - 3 Einzelknopfnähten verschlossen. Beim anderen Ovar wurde ebenfalls nach dem gleichen Prinzip verfahren. Bei der Sham-Operation wurde genauso verfahren, nur dass hier die Ovarien freigelegt und anschließend wieder zurück in die Bauchhöhle verlagert wurden. Durch diese Scheinoperationen sollen Begleitfaktoren wie Operation, Narkose, Schmerz und Stress, welche potentiell Auswirkung auf die Knochendichte haben könnten, in allen Versuchsgruppen gleichermaßen herbeigeführt werden. Da Metallklammern die an die Operation angeschlossene DXA-Messung stören würden, wurde zunächst ein temporärer Wundverschluss mit 3-0 Prolene (Ethicon Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt Deutschland) Fäden gewählt. Nach Abschluss der DXA Messung wurde die Hautwunde mit 3-4 Michel-Klammern (10x 3 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) verschlossen und sorgsam nochmals desinfiziert. Postoperativ wurden die Versuchstiere bis zum Erlangen des vollen Bewusstseins in einer warmen und sauberen Umgebung gehalten. Zur Narkoseausleitung wurde zusätzlich eine subcutane Injektion von Atipamezolhydrochlorid (Antisedan®, Pfizer GmbH, Berlin) vorgenommen und die Tiere im 10 Minuten Intervall in Hinblick auf Atemfrequenz, Temperatur und Vigilanz

überwacht. Um einer eventuellen Aspiration von Einstreu vorzubeugen, wurden die Tiere erst bei ausreichender Bewusstseinslage wieder in die Käfige zurückgebracht. Anschließend wurden Allgemeinbefinden, Aktivität, Körpergewicht sowie der Heilungsverlauf der OP Wunde von Tierärzten und Pflegern überwacht und dokumentiert. Zur Linderung der postoperativen Schmerzen wurde den Tieren das Schmerzmittel Metacam subcutan (Meloxicam®, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein) drei bis fünf Tage postoperativ nach Bedarf verabreicht. Bei reizlosen Wundverhältnissen wurden die Wundklammern eine Woche postoperativ wieder entfernt.

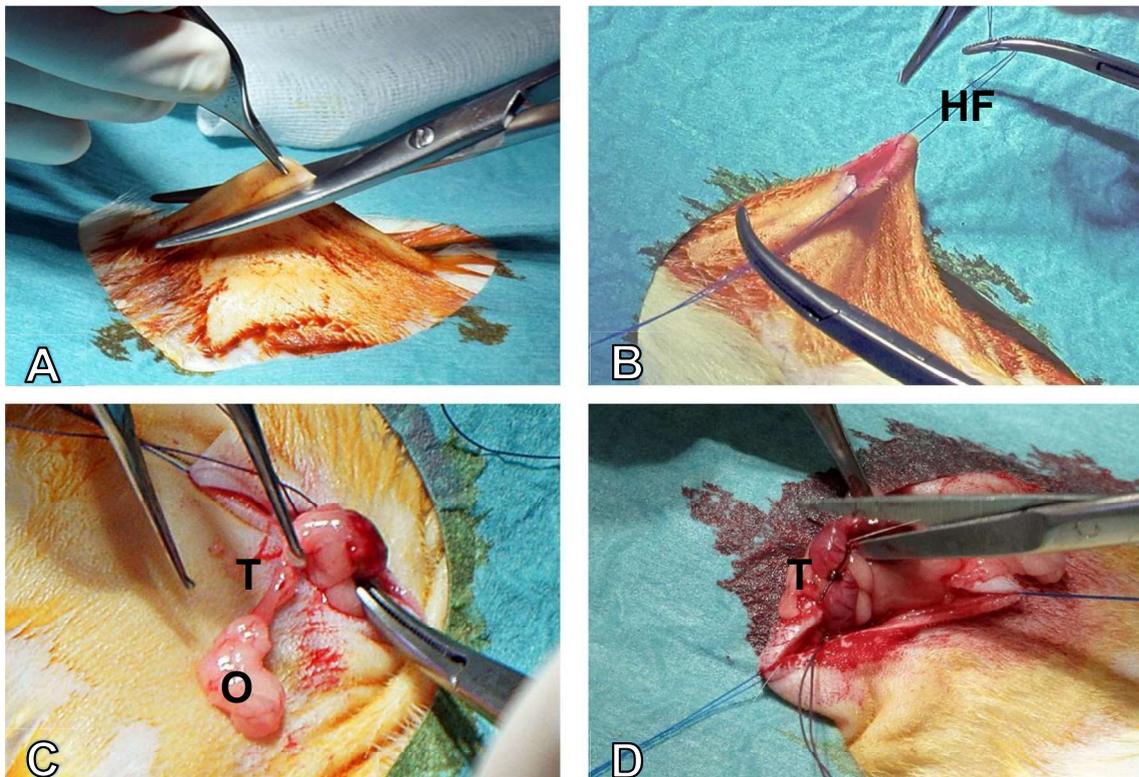


Abbildung 14: Vorgehensweise bei der Ovariectomie und Sham-Operation. (A) zeigt das steril abgedeckte Operationsgebiet. Die rasierte und mit Braunol desinfizierte Haut wird mit einer Pinzette gehalten und mit einer Schere eingeschnitten. (B) stellt den Hautschnitt dar, welcher mit zwei installierten Haltefäden (HF) fixiert wird. In (C) ist ein Ovar (O) aus der Bauchhöhle freigelegt worden. Die Tube (T) ist ebenfalls zu erkennen. Bei der Sham-Operation wurden die Ovarien in die Bauchhöhle zurückgelagert. Bei der Ovariectomie (D) wurden die Ovarien an der Tube ligiert und mit der Schere abgetrennt.

2.2 Dual-Energy X-ray Absorptiometry (DXA)

Zur Bestimmung des Knochenstatus nimmt als radiologisches Verfahren die Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) einen wichtigen Stellenwert ein. Hierbei wird sich die unterschiedliche gewebeabhängige Resorption von Röntgenstrahlen verschiedener Wellenlängen zu Nutze gemacht. Beim Durchtritt durch Gewebe unterschiedlicher

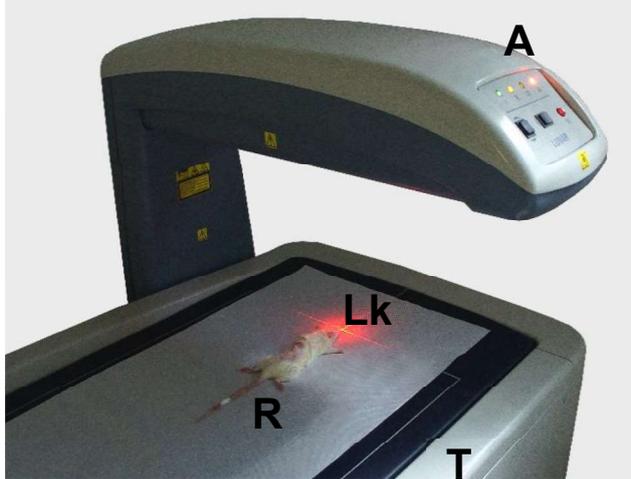


Abbildung 15: DXA Messung einer Ratte mit dem Lunar Prodigy®. Die Ratte (R) wurde auf dem Tisch (T) des Gerätes am rötlichen Laserkreuz (Lk) möglichst gerade alle Extremitäten von sich streckend ausgerichtet. Der Arm (A) mit der Strahlenquelle fährt während der Messung über das Versuchstier. Der Detektor ist unter dem DXA-Tisch platziert und fährt parallel mit dem Arm von kranial nach kaudal.

Dichte zeigen zwei Röntgenstrahlen eine jeweils eigene Schwächungscharakteristik. Ein Detektor erfasst anschließend die Röntgenstrahlen und mit Hilfe entsprechender Software und Computerberechnung kann aufgrund der charakteristischen Abschwächung der Röntgenstrahlen eine Aussage über die Gewebeart gemacht werden. Dabei wird ein zweidimensionales Bild erstellt, bei dem die verschiedenen Messwerte als Flächendichte (g/cm^2) dargestellt werden.

Die DXA Messung verlangt für die Gewinnung scharfer Bilder eine kurzzeitige Immobilisation, sodass eine Anästhesie notwendig war. Die Durchführung der Anästhesie erfolgte durch intraperitonealen Injektion einer Mischspritze bestehend aus 4 mg/kg KG Xylacin (Rompun® 2%, CEVA Tier-gesundheit GmbH, Düsseldorf) und 100 mg/kg KG Ketamin (bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta) gelöst in körperwarmem 0,9% NaCl. Die so narkotisierte Ratte wurde auf dem Bauch liegend alle Extremitäten von sich streckend mit dem Kopf nach vorne auf das Gerät vorsichtig hingelegt. Als Unterlage dienten handelsübliche Auflagen für Behandlungsliegen, um Wärmeverlust zu verhindern und um spontanen Urinabgang aufzufangen. Um weiteren Wärmeverlust zu verhindern, wurde zusätzlich die Raumluft mit einem Heizlüfter erwärmt. Beim Ausrichten der Ratte wurde sorgsam darauf geachtet, eine möglichst gerade am Laserkreuz des DXA Gerätes orientierte Wirbelsäule zu erreichen. Anschließend wurde der gesamte Körper mit einem DXA Gerät (Lunar Prodigy®, GE Healthcare, Deutschland) gescannt und mit der entsprechenden enCORE Software (GE Healthcare, v. 13.40) analysiert.

Der Messvorgang wurde im Kleintiermodus (unter 2 kg) mit einer durchschnittlichen Dauer von 3 - 4 Minuten pro Versuchstier durchgeführt. Die Strahlenbelastung ist dabei mit einer durchschnittlichen Dosis von 1,8 µGy sehr gering (Tabelle 4). Vor jeder

Spannung in kV	76
Strom in mA	0,15
Dosis in µGy	1,8

Messung wurden fachgerecht eine Kalibrierung und ein Selbstcheck (Qualitätssicherung) durchgeführt. Anhand des Zeitplanes in Abbildung 13 wurden die DXA Messungen durchgeführt. Die

Tabelle 2: Energiefluss der Strahlenquelle in kV und mA und Strahlungsintensität in µGray (µGy) pro DXA gemessene Ratte.

Tiere wurden direkt nach der OP gemessen, um eine weitere Narkose für den Zeitpunkt t=0 zu vermeiden. Die für die Euthanasie vorgesehenen Tiere wurden ebenfalls vor der Tötung gemessen.

Patient:	TB-Nr. 3611, Ratte Ohrmarke 87	Patientenkennung:	Sham	A
Geburtsdatum:	10.07.2011 1 Jahr	Überweisender Arzt:	286g	
Größe / Gewicht:	27,0 cm 0,2 kg	Gemessen:	02.08.2012 09:13:02 (13,40)	
Geschl. / Ethn.:	Weiblich Weiß	Analysiert:	21.08.2012 11:41:04 (13,40)	

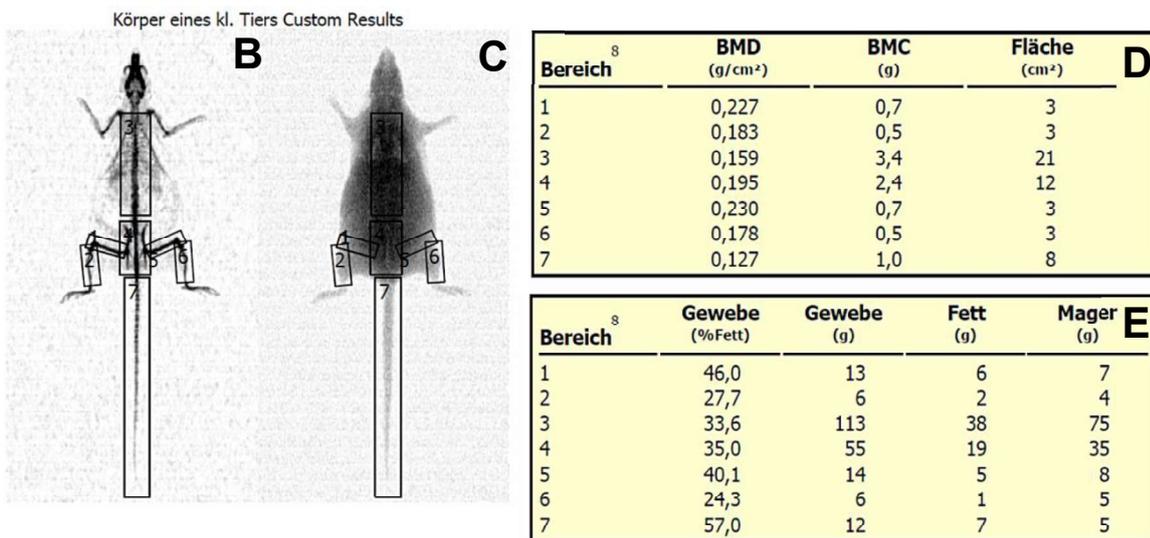


Abbildung 16: Beispiel eines DXA Analysebogens erstellt durch die enCORE Software (GE Healthcare, v. 13.40). (A) zeigt die Infoleiste des Versuchstieres mit Alter, Identifizierungsnummer, Datum und aktuellem Gewicht. In (B) ist das zweidimensionale Hartgewebefenster dargestellt mit den verschiedenen ROIs durchnummeriert von 1-7. Die Auflösung ist hoch genug, um einzelne knöchernen Strukturen klar zu erkennen. Die entsprechenden Hartgewebeparameter sind in (D) als BMD, BMC und Fläche dargestellt. Analog dazu ist das Weichteilfenster in (C) zu sehen mit den dazugehörigen Weichteilparametern in (E).

Für die Analyse der ermittelten zweidimensionalen Bilder wurden verschiedene Regions of Interest (ROIs) festgelegt (Abbildung 16). Diese ROIs haben eine definierte und konstante Fläche, die auf die verschiedenen Skelettanteile der Ratte projiziert wurden. Nach jeder Messung erfolgte die manuelle Analyse durch genaue standardisierte Ausrichtung der ROIs am Skelett der Ratte. Die Software ist nun in der Lage für jeden ROI einzeln folgende Messwerte zu ermitteln:

- Knochendichte als Bone Mineral Density (BMD) in g/cm²
- Knochenmineralgehalt Bone Mineral Content (BMC) in g

- Körperfettanteil in %

Die ROIs wurden anhand anatomischer Landmarken wie folgt bestimmt: die Femora wurden von den Femurkondylen bis zum Femurkopf, die Tibiae vom Sprunggelenk bis zum Tibiaplateau und die Wirbelsäule wurde von Beginn der Beckenkämme bis zur Schulterhöhe gemessen. Die Beckenregion wurde gänzlich erfasst, sodass das proximale Femur sowie die kaudalen Teile der Lendenwirbelsäule mitgemessen wurden. Am Schluss wurde der gesamte Körper analysiert, sodass insgesamt 7 Messbereiche festgelegt wurden.

Anzahl DXA-Messungen pro Gruppe und Zeitpunkt

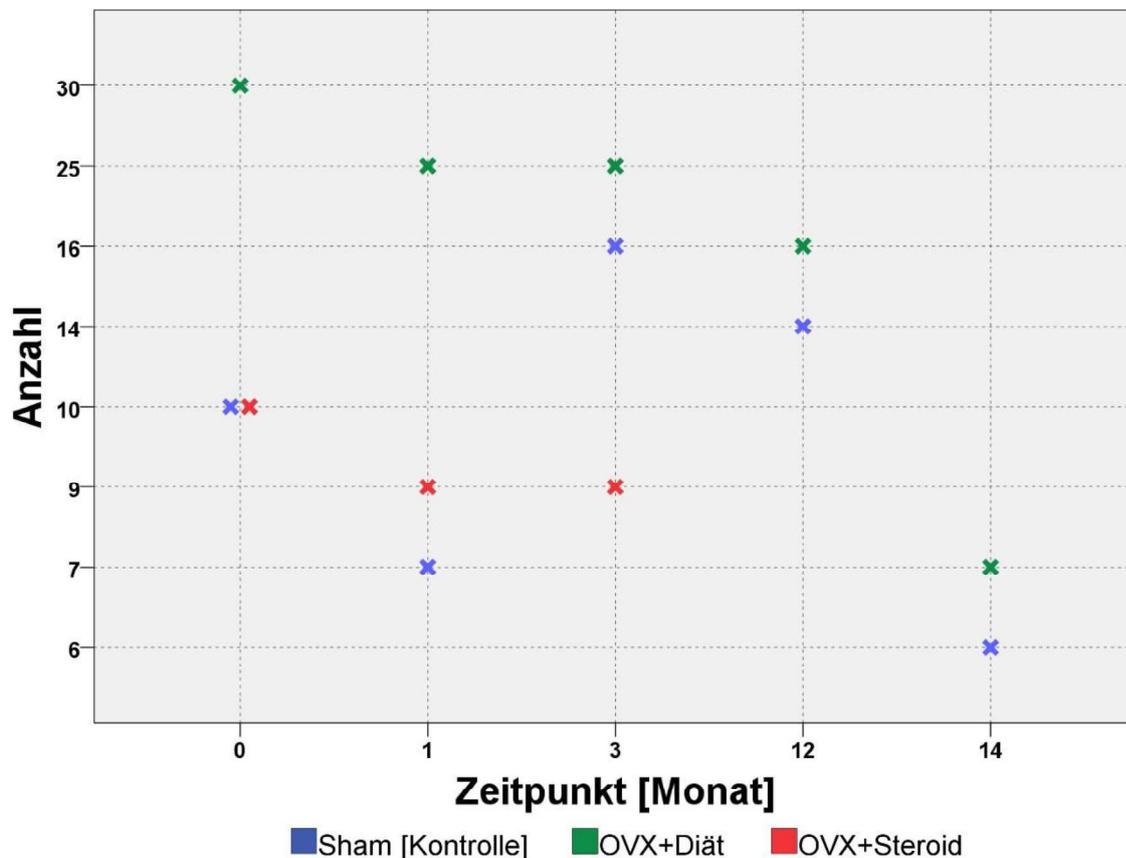


Abbildung 17: Anzahl der durchgeführten DXA-Messungen pro Gruppe und Zeitpunkt. Da zu den Zeitpunkten 3, 12 und 14 Monate jeweils 10 Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt für die histomorphometrische Analyse euthanasiert wurden, sank die Anzahl der durchgeführten Messungen zu jedem späteren Zeitpunkt.

2.3 Präparation und Entkalkung der Knochenproben

Am Ende der jeweiligen Standzeiten wurden die Versuchstiere jeweils einzeln in einen luftdichten Käfig mit Anschluss an eine CO₂ Gasflasche gebracht und mit einem Fluss von 3 - 4 l/min durch eine schmerzlose CO₂-Narkose euthanasiert. Nach eindeutiger Feststellung des Todes wurde begonnen, die Tiere zu präparieren. Hierfür wurden die

Extremitäten mit einer Schere vom Körper getrennt. In sorgsamer Handarbeit wurde mit einem Skalpell Fell, Muskulatur und anderes Gewebe vom Knochen sauber entfernt. Für die Histomorphometrie wurden das linke Femur und der 3. Lendenwirbelkörper vorbereitet. Zur Präparierung des Wirbelkörpers wurde die Wirbelsäule an den angrenzenden Bandscheiben durchtrennt. Anschließend wurden Muskulatur, Rückenmark, Reste der Bandscheibe und der Wirbelbogen entfernt. Das Femur wurde zur besseren Handhabung in einem Kunststoff auf Basis eines Polymethacrylsäuremethylester (PMMA, Technovit® 3040, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) mit dem distalen Ende eingebettet und in einer Knochensäge (EXAKT 310, EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt) in longitudinaler Richtung durchsägt, um eine spätere Dekalzifizierung zu erleichtern (Abbildung 18). Das distale eingebettete Ende wurde verworfen. Als Vorbereitung für die anstehende Entkalkung wurden die Knochenfragmente 24 Stunden in einer 4 % Paraformaldehydlösung nach Lilli im Kühlschrank fixiert.

Um die für die Histomorphometrie notwendigen Präparate herzustellen, mussten zunächst aus den bisher gewonnen Proben Paraffinschnitte hergestellt werden. Hierfür wurden die Knochenproben für 24 Stunden in 4 %iger Paraformaldehydlösung in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH-Wert zwischen 7,2 - 7,4 im Kühlschrank fixiert. Danach erfolgte eine sechsmalige Waschung der Proben mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH-Wert zwischen 7,2 - 7,4 und die Einbettung in dafür vorgesehene Kassetten. Um eine spätere Herstellung von dünnen Schnittpräparaten am Mikrotom durchzuführen, war eine Entkalkung der Proben in 3,4 %iger EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) mit 10

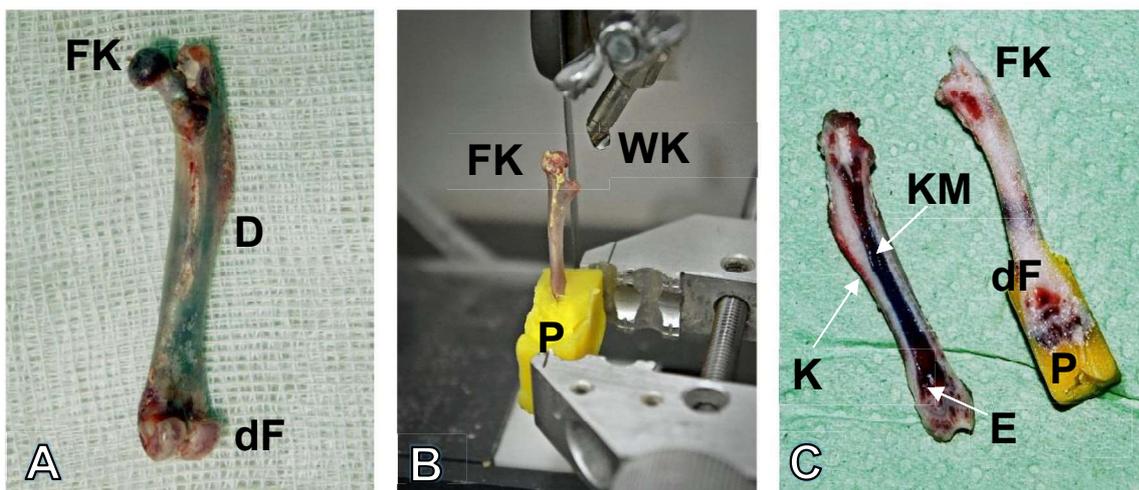


Abbildung 18: Vorgehensweise bei der Durchführung eines longitudinalen Schnittes des Rattenfemurs zur Vorbereitung für die Entkalkung. In (A) ist ein präpariertes Rattenfemur zu sehen mit dem proximalen Femurkopf (FK), der Diaphyse (D) und dem distalen Ende (dF). Das distale Ende wurde anschließend in Polymethacrylsäuremethylester (PMMA; P) eingebettet, um eine Fixierung in der Bandsäge zu ermöglichen (B). Um eine Erhitzung zu verhindern, wurde während des Schneidevorgangs das Präparat mit Wasser gekühlt (WK). (C) zeigt den fertigen Schnitt. Sichtbar sind das Knochenmark (KM), die Kompakta (K) und die Epiphyse (E) im distalen Femur.

%iger Tris-Lösung (Entkalkungszeit ca. 3 Wochen, Lösungswechsel alle zwei Tage) notwendig.

2.3.1 Anfertigung der Paraffinschnitte

Nach abgeschlossener Entkalkung wurden die Proben eine Stunde unter fließendem Leitungswasser gewaschen und wurden anschließend für die Einbettung in Paraffin in den Einbettungsautomaten (Leica TP1050, Leica Biosystems Nussloch GmbH,

Medium	Dauer
70 % Alkohol	2 Stunden
80 % Alkohol	2,5 Stunden
96 % Alkohol	2 Stunden
100 % Alkohol	3 Stunden
100 % Alkohol	3 Stunden
100 % Alkohol	3 Stunden
Xylol	60 Minuten
Xylol	45 Minuten
Xylol	45 Minuten
Paraffin	40 Minuten
Paraffin	40 Minuten
Paraffin	40 Minuten

Nussloch, Deutschland) gegeben. Der Einbettungsautomat folgte dabei dem in Tabelle 5 dargestellten Entwässerungsschema. Für den Schneideprozess am Mikrotom wurden die Proben in ein Metallförmchen mit Paraffin gegeben und auf einer Kälteplatte zum Aushärten gebracht. Danach wurden mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM355S Coolcutsystem Fa. Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland) Paraffinschnitte mit einer Stärke von 5 µm hergestellt.

Tabelle 3: Entwässerungsschema des Einbettungsautomaten Leica TP1050 für die Herstellung der Paraffinschnitte.

Über eine Wasserrutsche gelangten die Paraffinschnitte in ein 44°C warmes Wasserbad, in dem diese sich durch die Wärme ausdehnten, um eine faltenfreie Fixierung zu erleichtern (Abbildung 19). Getrocknet wurden die so gewonnenen Paraffinschnitte bei 37 °C im Wärmeschrank auf mit APES (3-Amino-propyltriethoxysilan) beschichtete Objekt-trägern (Fa. R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland).

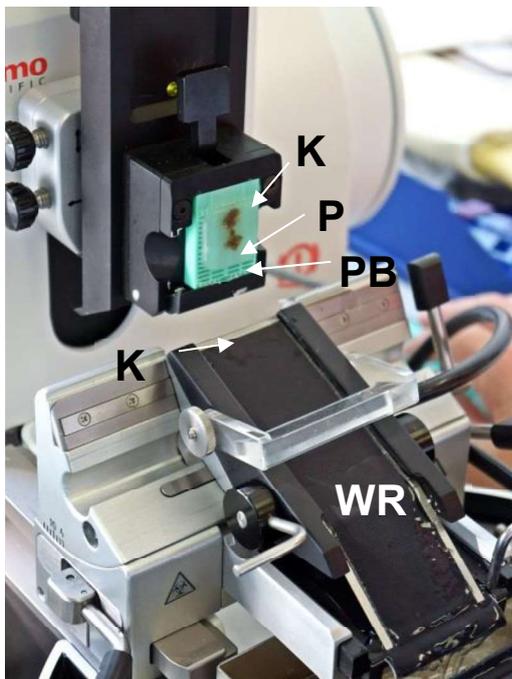


Abbildung 19: Schneiden eines Wirbelkörperpräparates am Rotationsmikrotom Microm HM355S. Der in einer Kassette (K) eingespannte Paraffinblock (PB) mit einem zweigeteilten Wirbelkörperpräparat (P) bewegt sich auf und ab an der fest fixierten Schneideklinge entlang (K). Die so gewonnenen 5 µm dicken Paraffinschnitte werden auf einer Wasserrutsche (WR) in ein Auffangbecken gegeben.

2.3.2 Anfertigung der Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbungen

Für die histologische Auswertung wurden die Paraffinschnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Hierfür wurden diese mit Xylol (Merck KGaA, Darmstadt) entparaffiniert und in der absteigenden Alkoholreihe in die wässrige Phase überführt. Die Färbung wurde mit Mayers Hämalaun (Merck KGaA, Darmstadt) durchgeführt. Zur Waschung wurde zunächst destilliertes Wasser verwendet und anschließend 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser nachgespült. Für die Eosinfärbung wurde vor und nach dem Eintauchen des Objektträgers in 1% Eosinlösung mit destilliertem Wasser gewaschen. Darauffolgend wurden die Schnitte ca. 16-25 Minuten in die aufsteigende Alkoholreihe gegeben und mit DePex (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) eingedeckelt. Hämatoxylin färbt typischerweise basophile Zellstrukturen wie Zellkerne (DNA und RNA) blauviolett an. Eosin hingegen färbt azidophile Plasmaproteine gelbrötlich an.

2.4 Histomorphometrie

Ziel der histomorphometrischen Auswertung ist die möglichst genaue Bestimmung des prozentualen Anteils der Trabekelfläche in einem klassischen HE-Schnitt. Hierfür wurde ein eigens entwickeltes Protokoll aus einer Kombination verschiedener kostenloser Software genutzt, welches eine halbautomatische, standardisierte und reproduzierbare Analyse der Knochenproben ermöglichte. Zusammengefasst sind folgende Schritte durchgeführt worden:

1. Digitalisierung der HE-gefärbten Knochenschnitte am Fotomikroskop Axioplan 2 Imaging (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) und der hochauflösenden Digitalkamera DC500 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim)
2. Zusammensetzen der einzelnen Bilder mit Microsoft Image Composite Editor (ICE) Version 1.4.4 64-bit
3. Aufarbeiten der Bilder zur einfacheren späteren Bearbeitung mit PhotoScape Version 3.6.2 von MOOII TECH 32-bit
4. Halbautomatisches Einfärben der Trabekel und Festlegung des ROIs mit GIMP (GNU Image Manipulation Program, Fa. The GIMP Team) Version 2.8.0 freie GNU Lizenz 64-bit
5. Automatische Flächenanalyse mit ImageJ Version 1.45s ImageJ (ImageJ 1.45s, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) mit Java 1.6.0_20 64-bit

2.4.1 Digitalisierung der Präparate

Für die rechnergestützte Histomorphometrie und Auswertung der H.E Schnitte ist eine Digitalisierung der Präparate notwendig. Die Digitalisierung erfolgte unter Zuhilfenahme des Fotomikroskop Axioplan 2 Imaging (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) und der hochauflösenden Digitalkamera DC500 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim). Nach anfänglicher Betrachtung der Präparate in kleiner Vergrößerung um eine korrekte Färbung, Einbettung und Zustand zu überprüfen, wurden diese mit dem 5x Objektiv fotografiert und im Tagged Image File Format (TIFF) gespeichert.

2.4.2 Zusammensetzen der Einzelfotos

Da der maximale Bildausschnitt des Lichtmikroskops es nicht möglich machte, ein gesamtes Präparat in einem Bild zu fotografieren, mussten die einzelnen Bilder zu einem Bild zusammengesetzt werden. Hierfür wurden die Fotos mit Hilfe der kostenlosen Software von Microsoft dem Image Composite Editor (ICE) Version 1.4.4 zusammengesetzt (Abbildung 20 A-B).

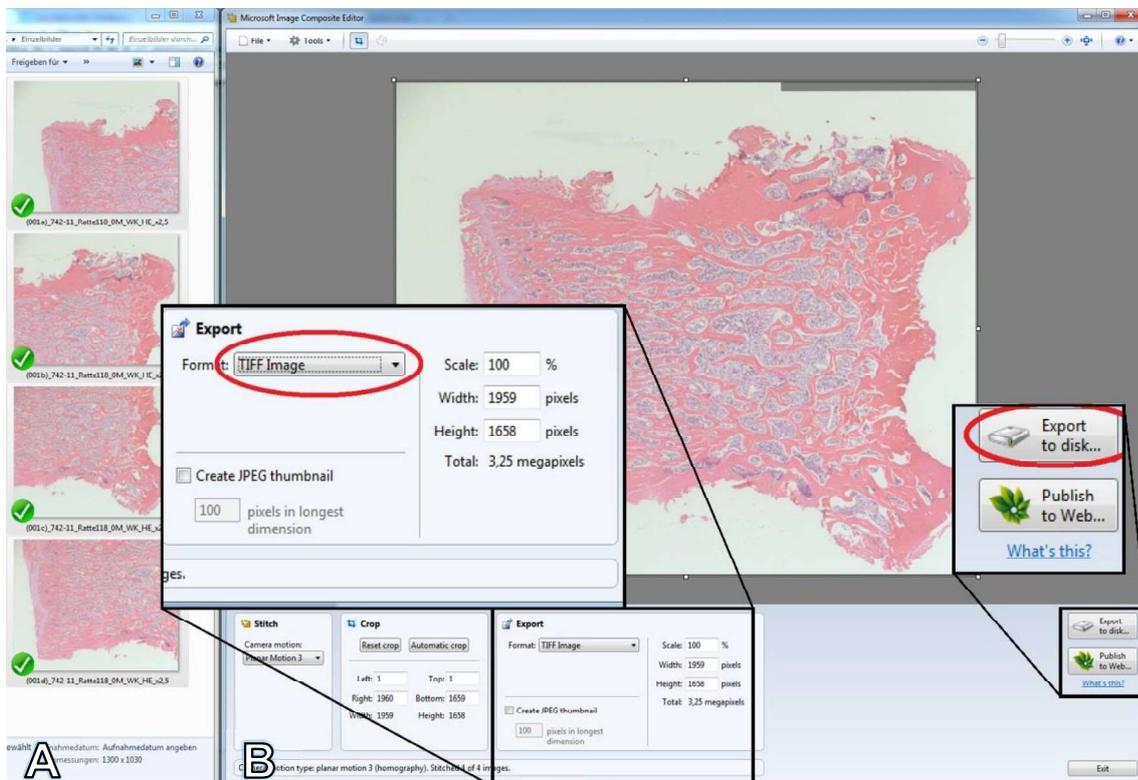


Abbildung 20: Darstellung der automatischen Zusammensetzung der einzelnen Teilbilder eines Wirbelkörperpräparates mit dem Microsoft Image Composite Editor (ICE) Version 1.4.4. (A) zeigt die vier Teilbilder, bei deren Digitalisierung am Fotomikroskop auf genügend Überschneidungsfläche geachtet wurde, um das spätere Zusammensetzen fehlerfrei zu gestalten. Das fertig zusammengesetzte Bild (B) wurde auf Fehlerfreiheit überprüft und anschließend im Tagged Image File Format (TIFF) gespeichert.

2.4.3 Digitale Aufarbeitung der Bilder

Um eine spätere halbautomatische histomorphometrische Analyse zu vereinfachen, wurden die Fotos zur Farb- und Kontrastverstärkung mit einem standardisierten Profil mit einer Stapelverarbeitung mit Hilfe der Software PhotoScape Version 3.6.2 von MOOII TECH aufgebessert. Jedes Foto wurde so exakt mit denselben Softwareoptionen behandelt, um Verfälschungen zu vermeiden. Die Aufbesserung des Kontrastes und der Farbsättigung erleichtert die Einfärbung der Trabekel in Schritt 4 (Abbildung 21 A-C).

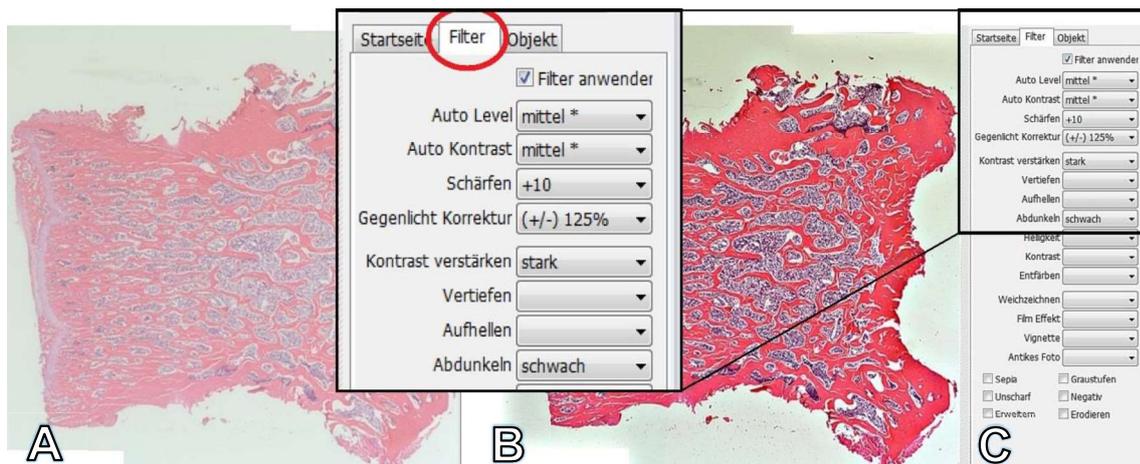


Abbildung 21: Digitale Aufbereitung der zusammengesetzten Bilder mit Hilfe der Software PhotoScape Version 3.6.2 von MOOII Tech zur Erleichterung der späteren halbautomatischen Analyse mit GIMP. (A) zeigt das unbearbeitete mit Microsoft ICE zusammengesetzte Bild. Das Ergebnis der automatischen Stapelverarbeitung ist in (B) zu sehen. Jedes Bild wurde exakt mit demselben Filter behandelt, um Verfälschungen zu vermeiden. Eine deutliche Anhebung der Farbsättigung und des Kontrastes ist zu erkennen. Die Einstellungen wurden in der Programmleiste (C) einmalig vorgenommen.

2.4.4 Halbautomatische Analyse mit GIMP

Auf der Suche nach einer standardisierten, reproduzierbaren und effizienten Methode zur teilautomatischen Bestimmung des prozentualen Anteils der Trabekelfläche fiel die Wahl auf die Bildbearbeitungssoftware „GIMP“. Freie Lizenz und einfache Bedienung beeinflussten zusätzlich die Entscheidung und ermöglichten so das Analysieren der histologischen Präparate am eigenen Computer. Dabei wurde folgendermaßen verfahren: Zuerst wurden die Trabekel mit Hilfe des „Zauberstab“ Tools markiert (Abbildung 22 A-B). Das „Zauberstab“ Tool markiert gleichfarbige, zusammenhängende Strukturen innerhalb eines Bildes. Dabei zeigt das Tool eine gewisse Toleranz für Farbdifferenzen, die individuell für die Farbgebung des Schnittes unter „Schwellenwert“ eingestellt werden können. Regelmäßig wurde ein Wert zwischen 25,0 und 35,0 eingestellt. Nach sorgfältiger Überprüfung der Markierung aller Trabekel wurden diese schwarz (Farbcode: 0) gefärbt.

Diese Schwarzfärbung erleichtert eine definitive Zuordnung der Trabekel und ermöglicht im späteren Schritt eine Herausfilterung des Knochenmarkes mit Hilfe eines Schwellenwertes (Abbildung 22). Hierfür wurde das Bild zunächst in ein Schwarz-Weiß-Bild mit einer 8-bit Graustufentiefe konvertiert. Anschließend konnte durch das Setzen des bereits erwähnten Schwellenwertes alle anderen Farben bis auf Schwarz herausgefiltert werden, sodass nur die reinen Trabekel als Struktur erschienen und alle übrigen Strukturen weiß gefärbt wurden. Dieser Schritt erleichterte zudem die Überprüfung auf fehlerhaft gesetzte Markierungen.

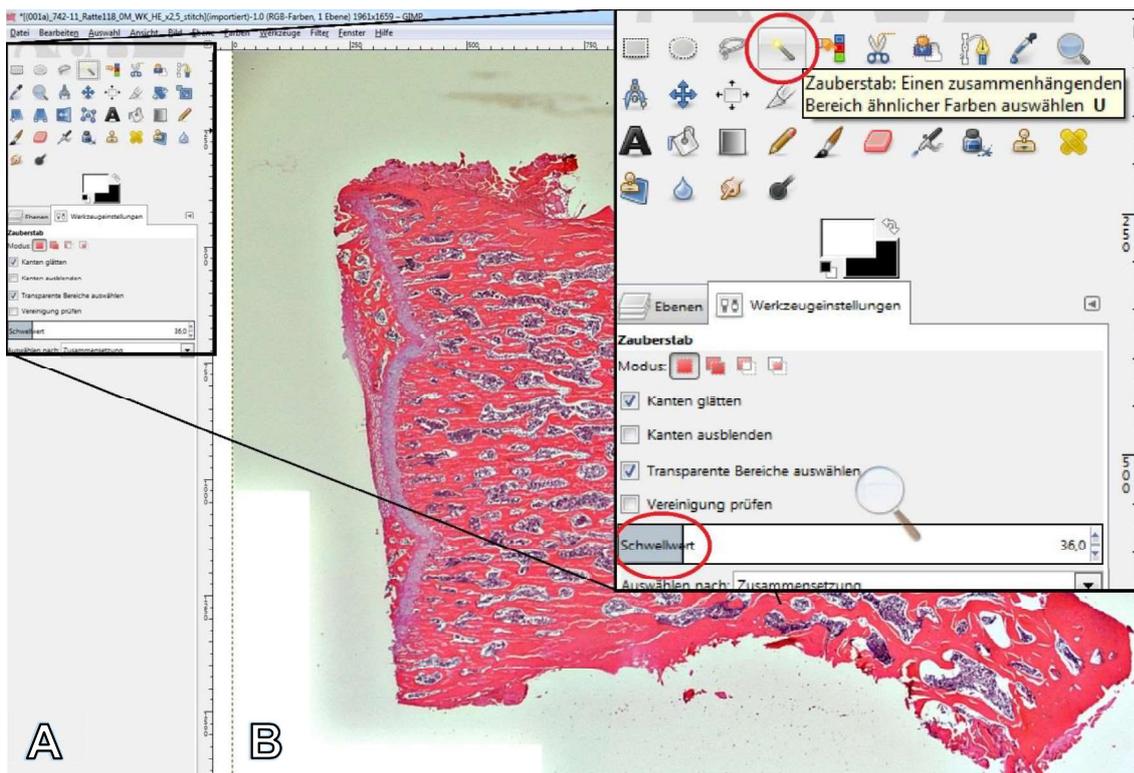


Abbildung 22: Bildliche Darstellung der Vorgehensweise bei der halbautomatischen Analyse mit GIMP (GNU Image Manipulation Program, Fa. The GIMP Team) Version 2.8.0. Ein HE-gefärbtes Wirbelkörperpräparat (B) wurde in die Software geladen. Links die Werkzeugleiste (A), bei der verschiedene Werkzeuge ausgewählt und in ihren Einstellungen geändert werden können. Das Zauberstab-Tool vermag gleichfarbige Strukturen zu markieren. Dabei zeigt es eine gewisse Toleranz gegenüber Farbdifferenzen. Diese Toleranz kann in den Werkzeugeinstellungen unter „Schwellenwert“ geändert werden.

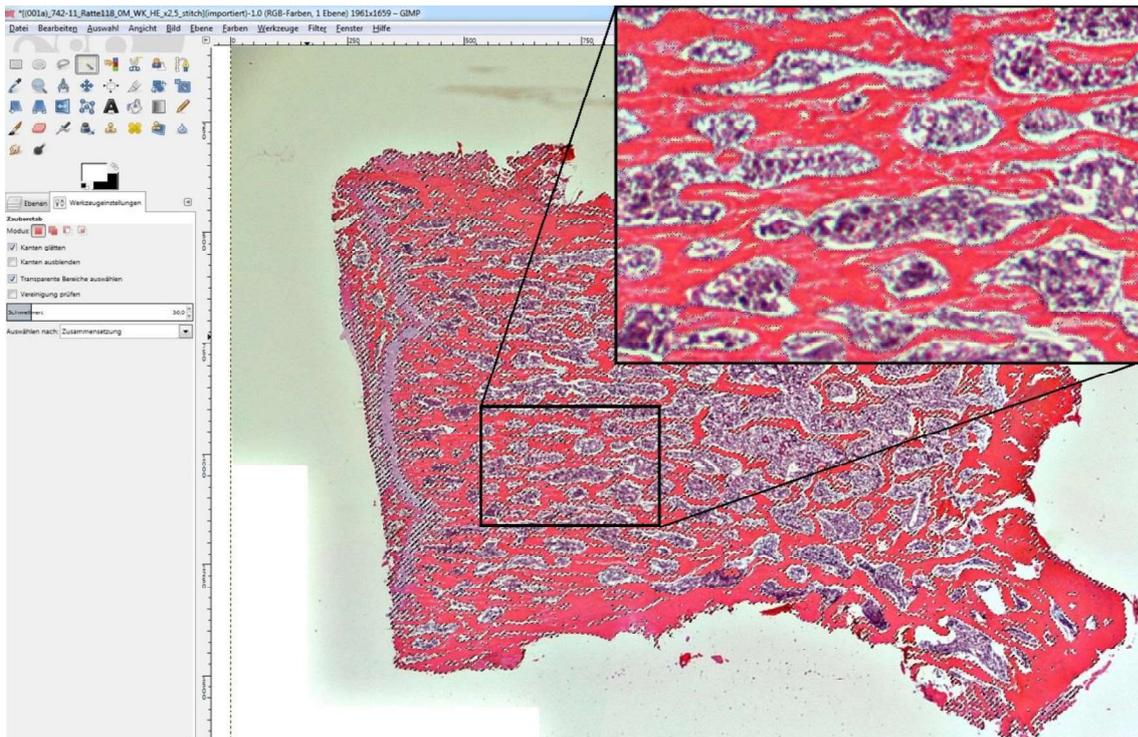


Abbildung 23: Markierung der Trabekel eines Wirbelkörperpräparates mit Hilfe des Zauberstab-Tools. Die markierten Strukturen werden dann mit einer gestrichelten Linie eingerahmt. Wenn ein Trabekel nicht komplett markiert wurde, kann mit Hilfe der Umschalt-Taste eine Markierung hinzugefügt werden, ohne dass bereits bestehende Markierungen verloren gehen. Je nach Farbgebung und Farbintensität des Präparates kann der Schwellenwert leicht verändert werden.

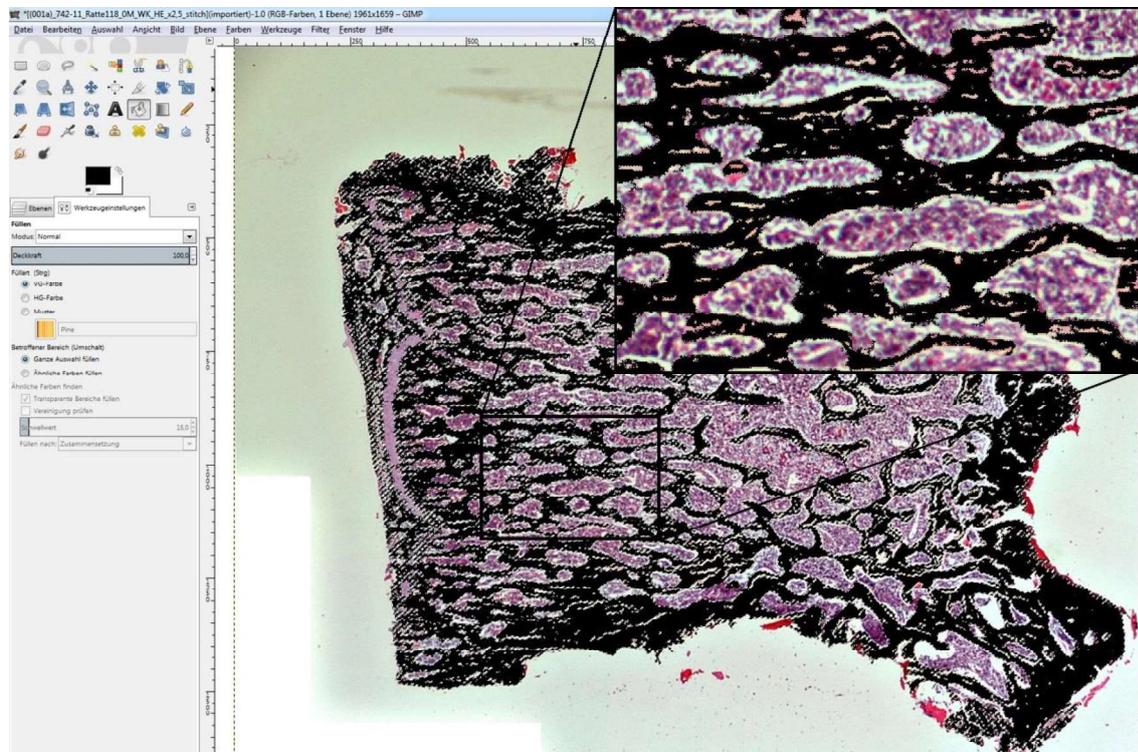


Abbildung 24: Einfärbung der markierten Trabekel. Die im Schritt vorher durch das Zauberstab-Tool erstellte gestrichelte Linie markiert die Trabekel. Nun kann mit Hilfe des Farbfüller-Werkzeuges nur innerhalb dieser Markierungen gefärbt werden, sodass andere Anteile des Bildes in ihrer Originalfarbe erhalten bleiben. Als Markierungsfarbe für das Farbfüller-Werkzeug wurde schwarz gewählt, da diese Farbe im gefärbten Präparat nicht vorkommt. Als Ergebnis sind nun die vorher rötlichen Trabekel schwarz gefärbt. Das Knochenmark bleibt violett angefärbt.

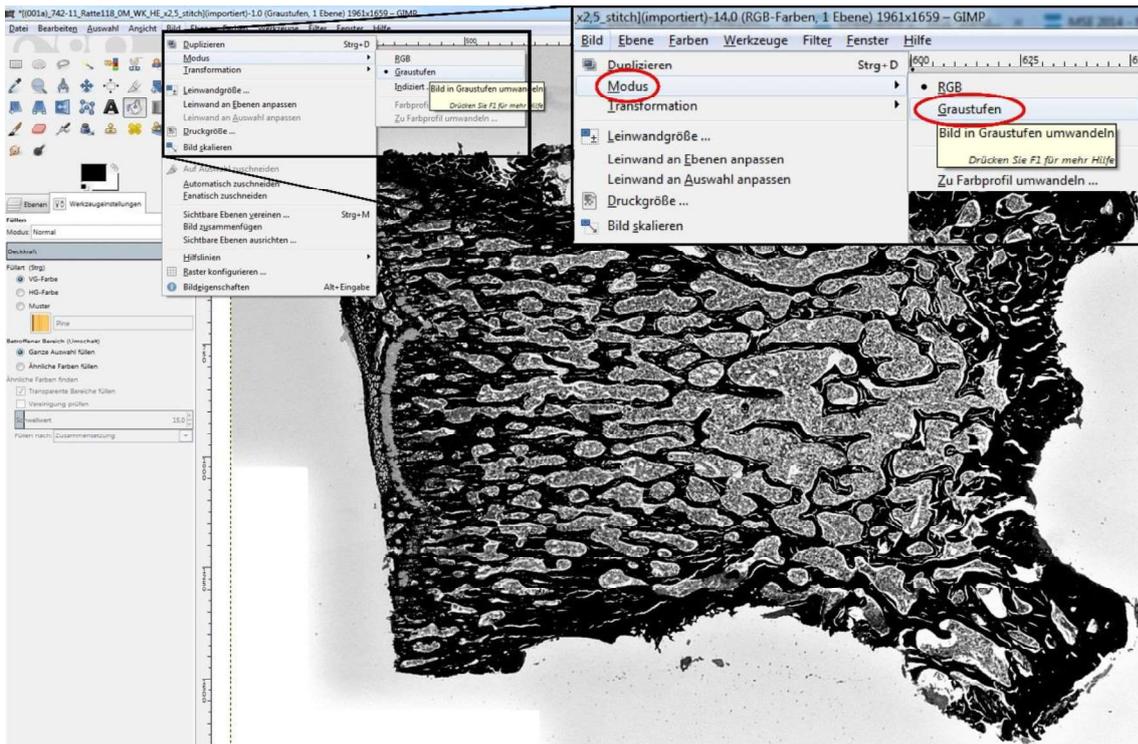


Abbildung 25: Transformation in 8-bit Grauwerte. Das im Schritt vorher eingefärbte Wirbelkörperpräparat wird nun im Menü „Bild“ unter dem Reiter „Modus“ in Graustufen transformiert. Zum einen reduziert dieses die Datenmenge des Bildes und zum anderen vereinfacht dies gleichzeitig im darauffolgenden Schritt das Setzen des Schwellenwertes. Als Ergebnis bleiben die Trabekel in Schwarz, während alle anderen Strukturen wie das Knochenmark des Präparates jetzt grau erscheinen.

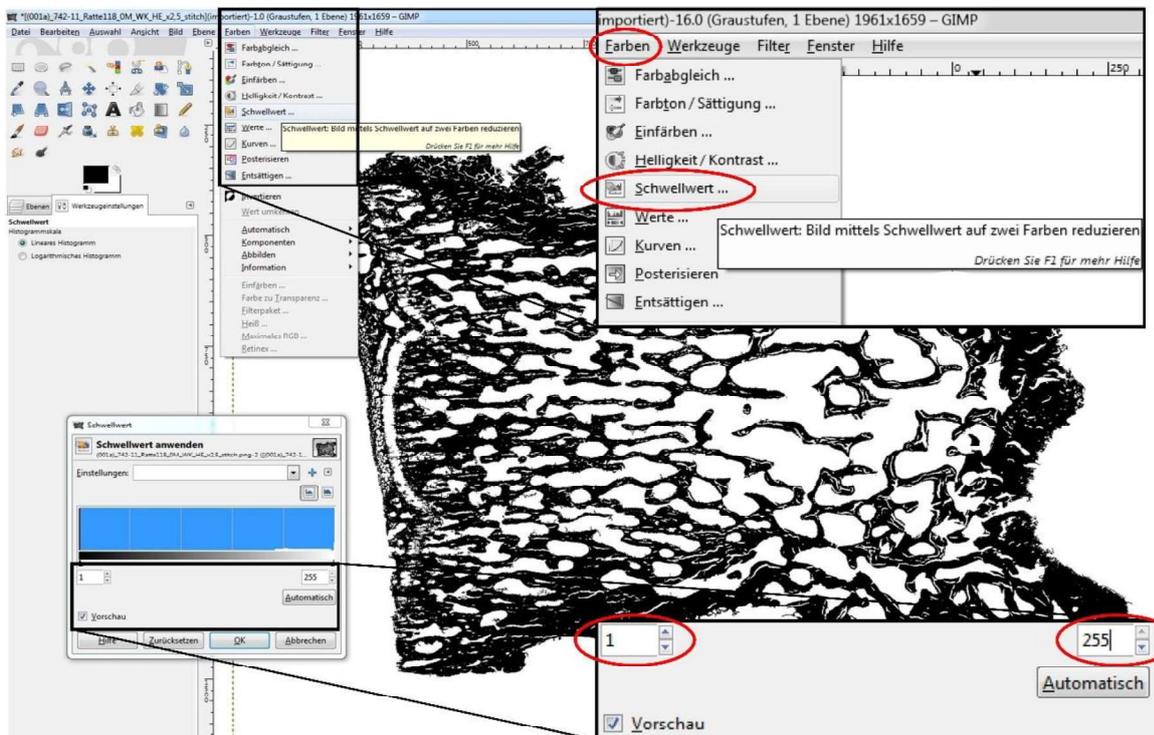


Abbildung 26: Setzen des Schwellenwertes. Das 8-bit Grauwert Bild stuft in 255 Grauwerte ab. Wobei der Wert „0“ schwarz und der Wert „255“ weiß darstellt. Jetzt wird mit Hilfe eines Schwellenwertes das Bild in ein reines Schwarz-Weiß-Bild umgewandelt. Der Schwellenwert wird so eingestellt, dass die Grauwerte von 1-255 als Weiß erscheinen und lediglich der Wert 0 schwarz bleibt. Als Ergebnis bleiben die Trabekel schwarz gefärbt und andere nicht vorher schwarz gefärbte Strukturen (Knochenmark, Wachstumsfuge) werden herausgefiltert und sind nicht mehr direkt sichtbar. Mit diesem Schritt kann gleichzeitig sichergestellt werden, dass keine falschen Markierungen gesetzt wurden.

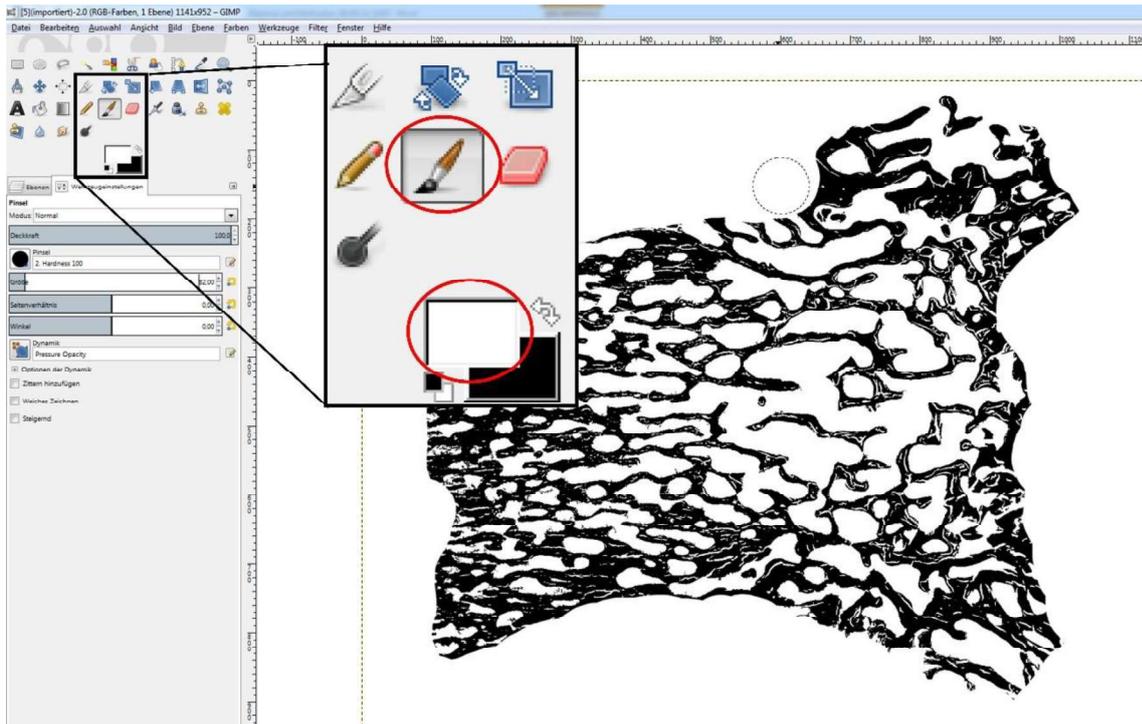


Abbildung 26: Manuelles Entfernen der Kompakta und Festlegung des ROIs. Durch die Schritte zuvor wurde ebenfalls die Kompakta markiert, da diese an die Trabekel unmittelbar angrenzt und dazu im HE-gefärbten Präparat die gleiche Färbung aufzeigt. Da die schwarz gefärbte Kompakta die Berechnung der prozentualen Trabekelfläche im nächsten Schritt stört, muss diese mit dem Pinsel Werkzeug weiß gefärbt werden. Dabei sollten alle anderen Strukturen außer der Trabekel weiß gefärbt werden. Übrig bleibt der ehemalige Markraum des Knochens mit den Trabekeln.

Mit Hilfe dieser halbautomatischen Analyse mittels GIMP können die Trabekel der digitalisierten Präparate präzise hervorgehoben werden. Zudem ist diese Bearbeitung schneller als die Markierung der Trabekel per Hand und darüber hinaus bei Beachtung des Protokolls auch vom Experimentator unabhängig. Alle Präparate wurden nach dem zuvor genannten Protokoll bearbeitet und so für die Flächenanalyse mit ImageJ vorbereitet.

2.5 Flächenanalyse mit ImageJ

Für die automatische Flächenanalyse wird das mit GIMP erstellte Bild als TIFF gespeichert und in ImageJ geladen (Version 1.45s ImageJ (ImageJ 1.45s, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) mit Java 1.6.0_20 64-bit). Anschließend erfolgte die Festlegung des ROIs, dessen Pixel mit Hilfe eines Histogramms bestimmt werden sollten. Da Pixel das kleinste Flächenelement eines Bildes darstellen und deren Größe innerhalb eines Bildes nicht variiert, ist das Verhältnis von weißen und schwarzen

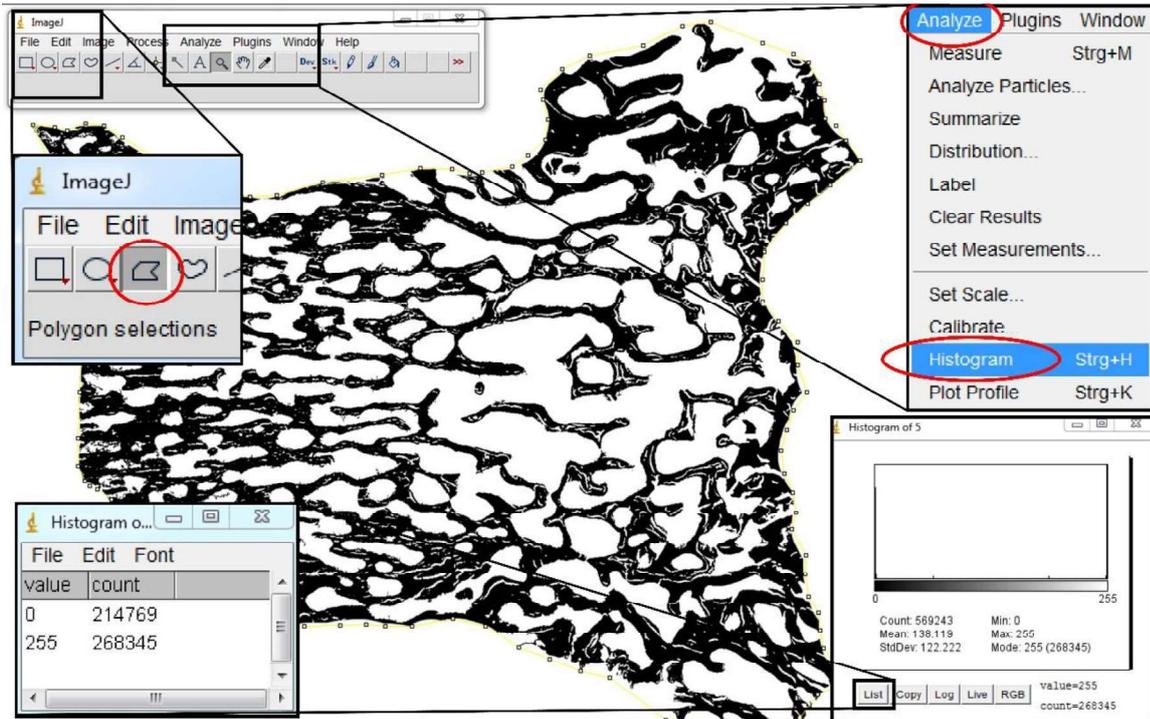


Abbildung 27: Festlegung des ROIs und Erstellen des Histogramms mit ImageJ. Die vorher bearbeitete Bilddatei wird nun in ImageJ geladen, um ein Histogramm zu erstellen. Relevant sind dabei nur die Trabekel und die Fläche des ehemaligen Markraumes, weswegen ein ROI festgelegt werden muss. Hierfür wird mit der Maus der gesamte Markraum mit seinen Trabekeln umfahren. Im ROI-Manager wird dieser festgelegte Bereich gespeichert. Jetzt kann unter dem Reiter „Analyze“ das Histogramm aufgerufen werden, welches nur die Pixel des vorher festgelegten ROIs enthält. Der Wert „0“ stellt schwarz und der Wert „255“ weiß dar. Insgesamt hat der ROI 483114 Pixel von denen 214769 schwarz sind. Das ergibt einen prozentualen Anteil der Trabekel von 44,45%.

Pixeln im Endeffekt Ausdruck des prozentualen Anteils der Trabekelfläche des Markraumes. Hierfür wurden die Gesamtpixel des ROIs bestimmt und der Anteil der schwarzen Pixel an den Gesamtpixeln des ROIs als Trabekelfläche in Prozent gesetzt.

Anzahl der histomorphometrisch untersuchten Präparate

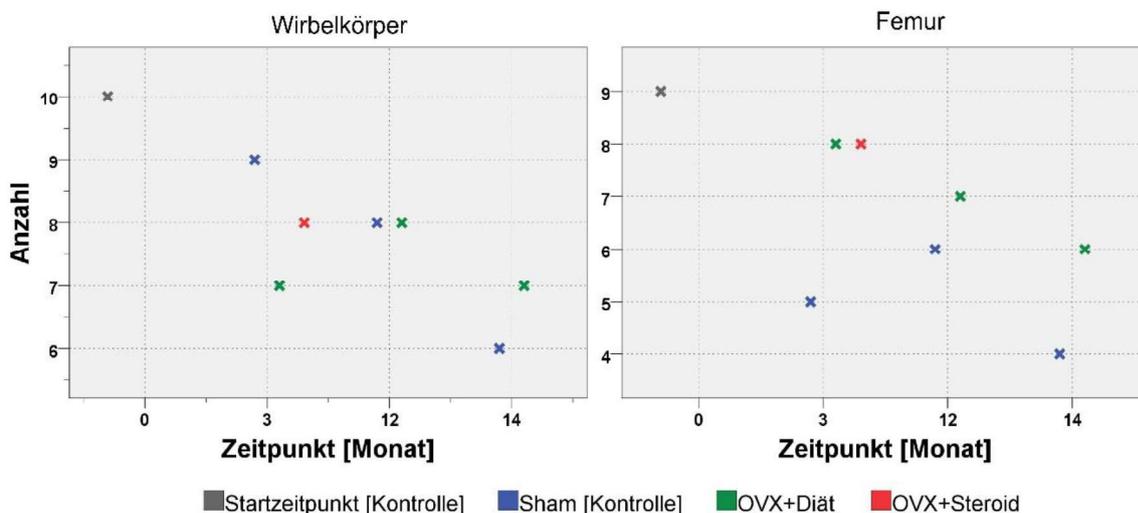


Abbildung 28: Anzahl der histomorphometrisch untersuchten Präparate für Wirbelkörper (dunkelgrau) und Femur (hellgrau) der Kontrollgruppe, Sham-Gruppe (blau), Diät-Gruppe (grün) und Steroid-Gruppe (rot). Durch Beschädigung mancher Präparate unterscheidet sich die Anzahl, da diese nicht verwertet werden konnten.

Durch den Verlust von Versuchstieren oder Beschädigung von Präparaten differiert die Anzahl der histomorphometrisch untersuchten Präparate.

2.6 Statistische Auswertung

Sowohl die Daten der DXA-Messung als auch der Histomorphometrie wurden zunächst in dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2010 von Microsoft® Version 14.0.6129 zusammengetragen und für die Analyse mit SPSS® Statistics (IBM SPSS Statistics 20, Fa. IBM, Ehningen, Deutschland) vorbereitet.

Als statistischer Test wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit SPSS durchgeführt mit einem Post-Hoc-Test nach Bonferroni. Diese Testkombination benötigt als elementare Voraussetzungen eine Varianzhomogenität und eine Normalverteilung. Für die Überprüfung der Normalverteilung wurde eine explorative Datenanalyse mit dem Shapiro-Wilk Signifikanztest angefertigt und für die Sicherstellung der Varianzhomogenität ein Brown-Forsythe Test angewandt. Bei dem Vergleich der Zeitpunkte $t= 12$ und $t= 14$ Monate zwischen der Sham- und Diätgruppe wurde ein Mann-Whitney U Test durchgeführt, da nur zwei Stichproben zur Verfügung standen.

Zur Überprüfung einer wissenschaftlichen Vermutung wird diese in verschiedenen statistischen Hypothesen formuliert. Die Nullhypothese besagt, dass kein Unterschied zwischen zwei Versuchsgruppen besteht, während die Alternativhypothese Gegenteiliges behauptet. Bei Gruppenvergleichen werden häufig statistische Test angewendet, die versuchen die Nullhypothese abzulehnen. Dabei wird ein Signifikanzniveau festgelegt (p-Wert), welches als Fehler 1. Art die Wahrscheinlichkeit angibt, dass die Nullhypothese irrtümlich zurückgewiesen wurde.

Im Ergebnisteil werden zur Überprüfung der Signifikanzen die p-Werte angegeben. In dieser Arbeit werden Werte kleiner oder gleich 0,05 als signifikant bezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Osteodensitometrie mit DXA

Die osteodensitometrische Messung der Ratten wurden *in vivo* durchgeführt. Bei der anschließenden Analyse wurden verschiedene „Regions of Interest“ (ROI) festgelegt.

1. Gesamter Körper, um besondere Rückschlüsse auf den kortikalen Knochen zu treffen
2. Wirbelsäule, klinisch bedeutsam wegen des Auftretens von Wirbelkörperfrakturen beim Menschen
3. Proximale Femora, klinisch bedeutsam wegen des Auftretens von Schenkelhalsfrakturen beim Menschen

3.1.1 Osteodensitometrie Rattenkörper: Bone Mineral Density (BMD)

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der DXA Analyse bezüglich des BMD-Wertes des gesamten Körpers der Ratte dargestellt (Abbildung 30). Die vorher durchgeführte explorative Datenanalyse zeigt keine signifikante Abweichung zur Normalverteilung. Dargestellt werden die BMD Mittelwerte der entsprechenden Gruppen als Box-Plot. Der Vergleich der Mittelwerte aller ROIs zeigt sich anfangs zum Zeitpunkt $t=0$ sehr homogen und es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Allerdings ist bereits nach einem Monat ein hochsignifikanter Abfall ($p < 0,001$) des BMD in der OVX + Diät Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen zu beobachten. Die mit Dexamethason behandelte Versuchsgruppe verhält sich konstant hinsichtlich des BMD Wertes ohne signifikante Änderung des BMD-Wertes nach einem Monat ($p = 0,683$) und nach drei Monaten ($p = 0,874$). Innerhalb der Sham Gruppe nimmt der BMD-Wert bis zum Zeitpunkt $t=12$ nahezu linear zu und scheint anschließend wieder leicht abzufallen. Dieser Abfall ist allerdings nicht signifikant ($p = 0,201$). Der Unterschied zwischen der Sham Gruppe und der OVX + Diät Gruppe ist zu den Zeitpunkten $t=1, 3, 12$ und 14 hochsignifikant ($p < 0,001$).

BMD (Bone Mineral Density) gesamter Körper

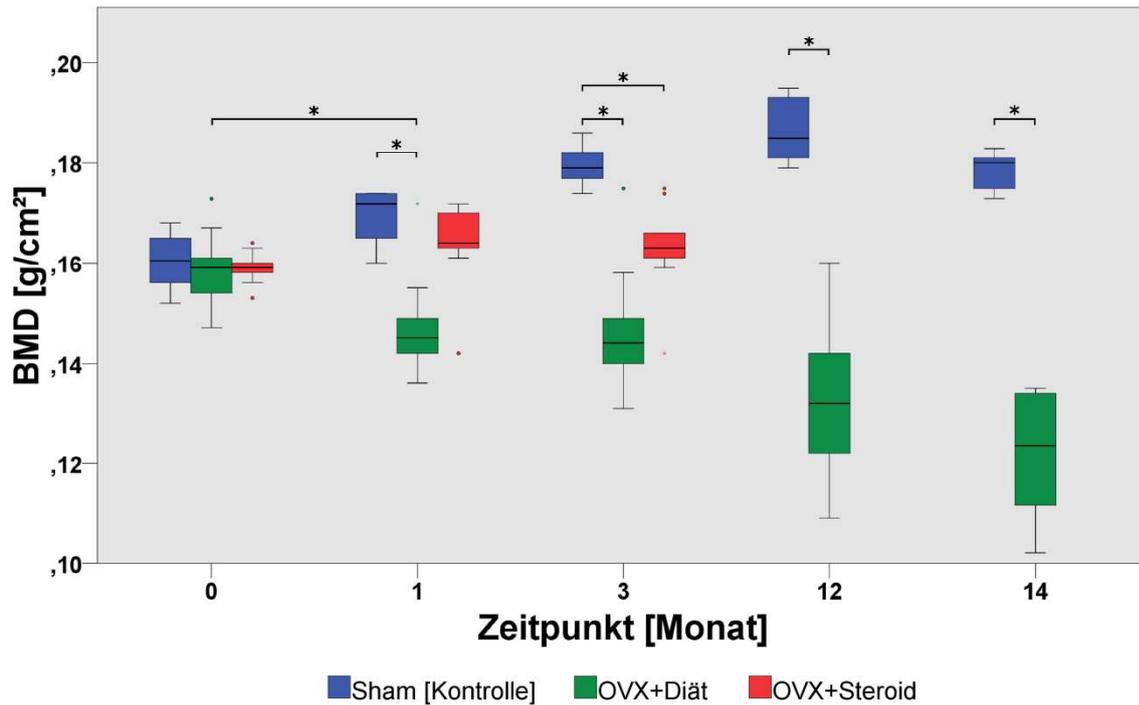


Abbildung 29: Box-Plot der BMD-Mittelwerte des gesamten Körpers der Sham-Gruppe (blau), Diät-Gruppe (grün) und der Steroid-Gruppe (rot). Zum Zeitpunkt $t=0$ bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Bereits einen Monat post interventionem besteht ein signifikanter Unterschied der BMD-Mittelwerte zwischen der Sham-Gruppe und der Diät-Gruppe. Dieser Unterschied vergrößert sich weiter zu den Zeitpunkten 3, 12 und 14 Monate. Die Steroid-Gruppe verhält sich hinsichtlich des BMD-Wertes konstant.

3.1.2 Osteodensitometrie Wirbelsäule: Bone Mineral Density (BMD)

Ein klinisch relevanter Manifestationsort der Osteoporose beim Menschen ist die Wirbelsäule. Um die Qualität des Tierversuchsmodells weiter herauszuarbeiten, wurde der BMD-Wert der verschiedenen Gruppen für die Lenden- und Brustwirbelsäule ermittelt (Abbildung 31). Eine Differenzierung zwischen Lenden- und Brustwirbelsäule ist aufgrund der Größe der Versuchstiere nur allzu ungenau durchführbar und deshalb verzichtbar. Die Darstellung erfolgt als Box-Plot. Die vorher durchgeführte explorative Datenanalyse zeigt keine signifikante Abweichung zur Normalverteilung.

Bei genauer Betrachtung des ROIs „Wirbelsäule“ lassen sich die bereits oben für den ROI „gesamter Körper“ ermittelten Ergebnisse übertragen. Der für den BMD gemessene Ausgangswert bei $t=0$ ist homogen und es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Bereits nach einem Monat fällt der BMD-Wert der Diät-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe signifikant ab ($p<0,001$). Dieser signifikante Unterschied bleibt bis zum Ende der Versuchszeit bestehen. Der BMD-Wert der Diät-Gruppe zeigt im weiteren Veruchsaablauf keine wesentlichen Änderungen, während der BMD-Wert der

Sham-Gruppe signifikant weiter steigt ($t= 3$ Monat, $p<0,001$) und um den Zeitpunkt $t= 3$ Monate den Zeitpunkt der maximalen Knochendichte (peak bone mass) erreicht. Erst zum Zeitpunkt $t= 14$ Monate fällt der BMD-Wert der Sham-Gruppe wieder ab ohne Nachweis einer Signifikanz ($p= 0,102$). Die Steroid-Gruppe zeigt hinsichtlich des BMD einen konstanten Verlauf des gemessenen Wertes.

BMD (Bone Mineral Density) Wirbelsäule

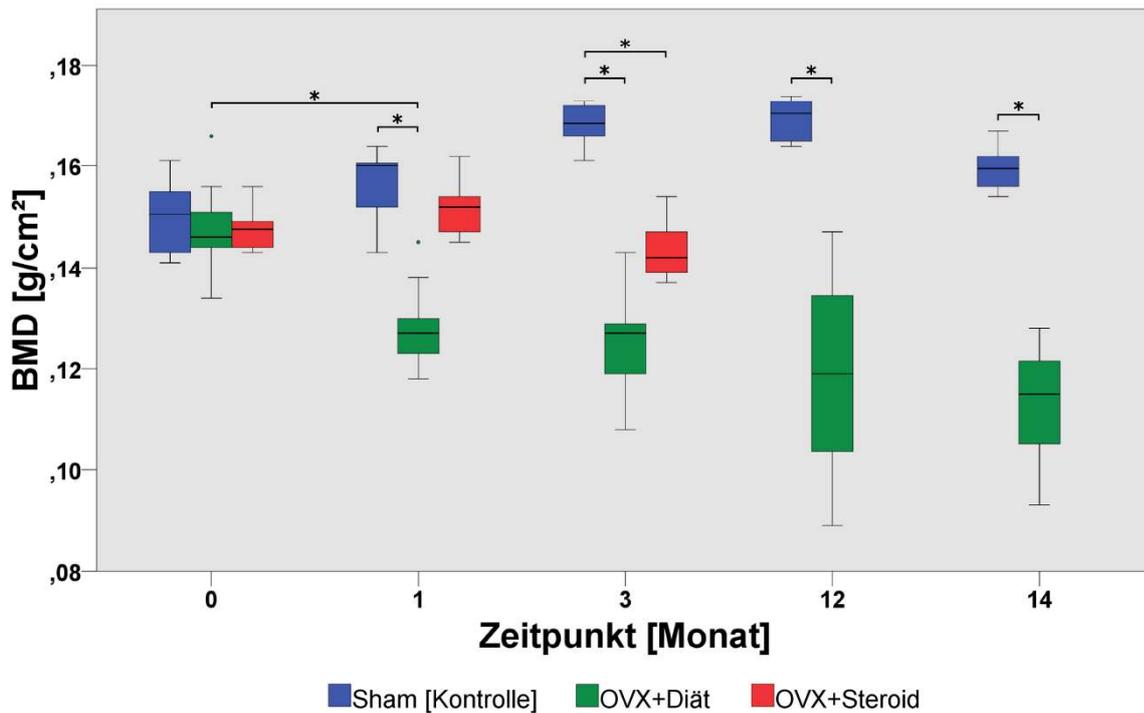


Abbildung 30: Box-Plot der BMD-Mittelwerte der Wirbelsäule der Sham-Gruppe (blau), Diät-Gruppe (grün) und der Steroid-Gruppe (rot). Zum Zeitpunkt $t= 0$ bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Bereits nach einem Monat fällt der BMD Wert der Diät-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe signifikant ab. Dieser signifikante Unterschied bleibt bis zum Ende der Versuchszeit bestehen. Die Steroid-Gruppe verhält sich hinsichtlich des BMD-Wertes konstant.

3.1.3 Osteodensitometrie Femora: Bone Mineral Density (BMD)

Ein weiterer klinisch relevanter Manifestationsort der Osteoporose beim Menschen ist das Femur. Für die Analyse des BMD in den ROI „Femora“ wurden beide Femora gemessen und die Werte anschließend mathematisch gemittelt. Die Darstellung erfolgt als Box-Plot (Abbildung 32). Die vorher durchgeführte explorative Datenanalyse zeigt keine signifikante Abweichung zur Normalverteilung. Auch hier ist der Verlauf des BMD Wertes der verschiedenen Gruppen analog zu den beiden bereits analysierten ROIs „gesamter Körper“ und „Wirbelsäule“. Anfangs besteht auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen. Der BMD-Wert der Diät-Gruppe fällt hier ebenso zum Zeitpunkt $t= 1$ Monat signifikant ab ($p<0,001$), bleibt anschließend zum Messzeitpunkt $t= 3$ Monate gleichbleibend ($p= 1,00$) und zeigt zu den späteren

Messzeitpunkten t= 12 (p<0,001) und t= 14 Monate den typisch deutlicheren Abfall. Die Steroid-Gruppe zeigt einen über drei Monate nahezu gleichbleibenden BMD-Wert, während der BMD-Wert der Sham-Gruppe bezogen auf den Ausgangswert bis t= 12 Monate konstant zunimmt (p<0,001) und mit anschließend abnehmender Tendenz stagniert (p= 0,33).

BMD (Bone Mineral Density) Mittelwert Femora

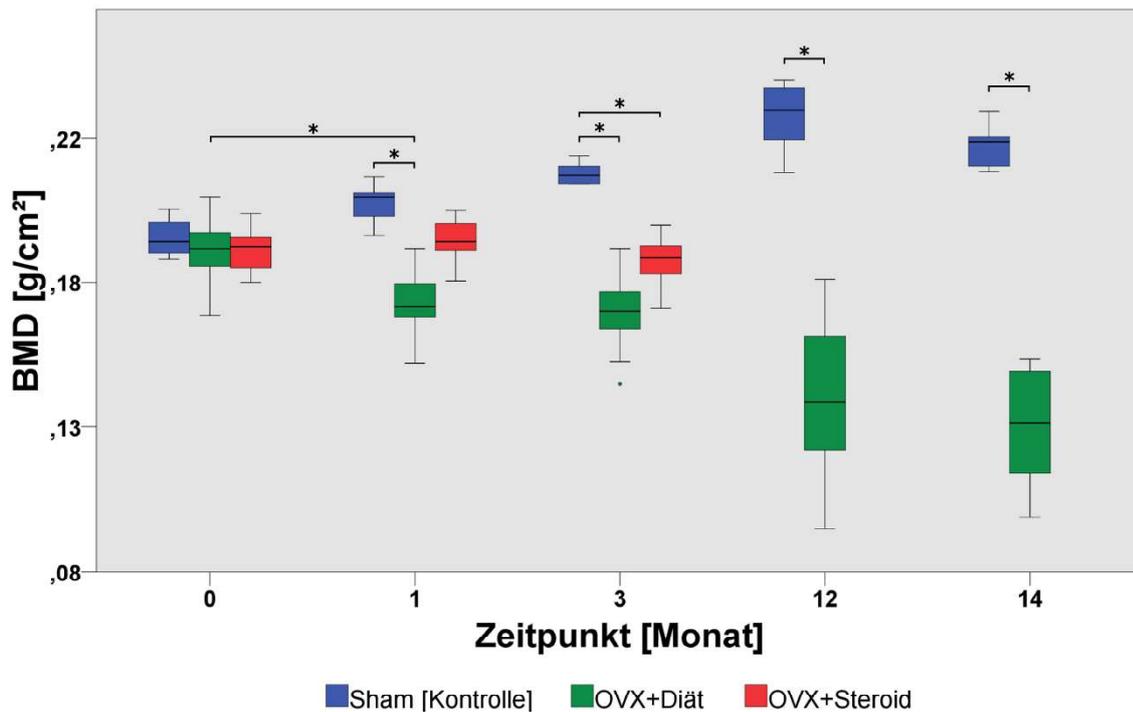


Abbildung 31: Box-Plot der BMD-Mittelwerte der Femora rechts und links der Sham-Gruppe (blau), Diät-Gruppe (grün) und der Steroid-Gruppe (rot). Zum Zeitpunkt 0 Monate verhält sich der BMD-Wert homogen. Nach einem Monat fällt die Diät-Gruppe analog zur Wirbelsäule und ROI „gesamter Körper“ im Vergleich zur Sham-Gruppe im BMD Wert signifikant ab. Auch bei den später gemessenen Zeitpunkten bleibt dieser signifikante Unterschied (p<0,001) bestehen.

3.1.4 Diät-Gruppe: BMD-Wert im Verlauf

Der erhebliche Verlust an Knochenmasse innerhalb der Diät-Gruppe über den Versuchszeitraum soll im Folgenden genauer untersucht werden. Dabei soll dieser Rückgang quantifiziert werden und die drei ROIs „gesamter Körper“, „Wirbelsäule“ und „Femora“ miteinander verglichen werden (Abbildung 33). Nach einem Monat *post interventionem* ist in allen gemessenen ROIs ein starker prozentualer Verlust der Knochendichte zu beobachten. Dieser Abfall der Knochendichte verläuft allerdings nicht über den gesamten Beobachtungszeitraum linear, sondern zum Zeitpunkt t= 3 Monate ist ein deutlicher Rückgang des Knochendichteverlustes zu erkennen. Erst am Ende des Beobachtungszeitraumes zeigen alle ROIs einen erneuten Anstieg der Geschwindigkeit des Knochendichteverlustes. Außerdem fällt auf, dass der Verlust an Knochendichte

auch im Verlauf unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Nach einem Monat erleidet die Wirbelsäule den größten Verlust mit 14%.

Prozentualer Verlust des BMD-Wertes aller ROI

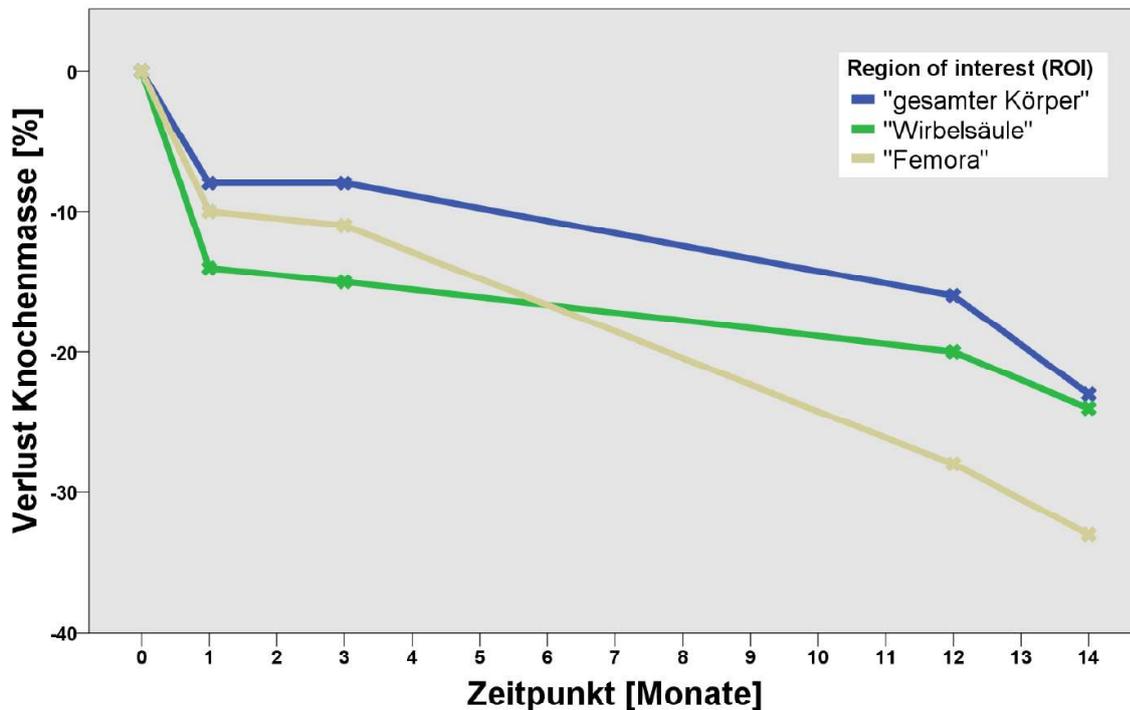


Abbildung 32: Verlauf des prozentualen Verlustes des BMD-Wertes der Diät-Gruppe. Die Prozentzahl ist bezogen auf den jeweiligen Messzeitpunkt im Vergleich zum Ausgangswert ($t=0$ Monate) der gemessenen ROI. Die im ROI „Wirbelsäule“ (grün) ermittelte Knochenmasse erleidet zunächst bis zum Zeitpunkt $t=3$ Monate den größten prozentualen Verlust an Knochendichte. Die im ROI „Femora“ (beige) bestimmte BMD-Wert nimmt bis zum Zeitpunkt $t=3$ Monate vergleichsweise weniger stark ab, zeigt aber zu den späteren Messzeitpunkten den größten prozentualen Verlust an Knochendichte. Im ROI „gesamter Körper“ (blau) ist der Verlust zu allen Zeitpunkten am geringsten ausgeprägt.

Der weitere auftretende Verlust an Knochendichte wird anschließend geringer und beträgt zum Zeitpunkt $t=3$ Monate 15%, zum Zeitpunkt $t=12$ Monate 20% und zum Endzeitpunkt $t=14$ Monate 24%. Die beiden Femora verlieren nach einem Monat 10% und nach drei Monaten 11% Knochendichte. Besonders beachtet werden muss der darauffolgende Abfall der Knochendichte, der von 11% ausgehend, zum Zeitpunkt $t=12$ Monate 28% und zum Zeitpunkt $t=14$ Monate 33% beträgt. Zu diesen Zeitpunkten zeigen die Femora außerdem mit insgesamt 33% die stärkste prozentuale Abnahme der Knochendichte aller gemessenen ROI. Etwas außen vor steht der ermittelte prozentuale Verlust an Knochendichte des ROI „gesamter Körper“, der zu allen Zeitpunkten am geringsten ausgeprägt ist ($t=1;3$ Monate 8%, $t=12$ Monate 16% und $t=14$ Monate 23%).

3.1.5 Sham-Gruppe: BMD-Wert im Verlauf

Prozentualer Verlauf des BMD-Wertes aller ROI

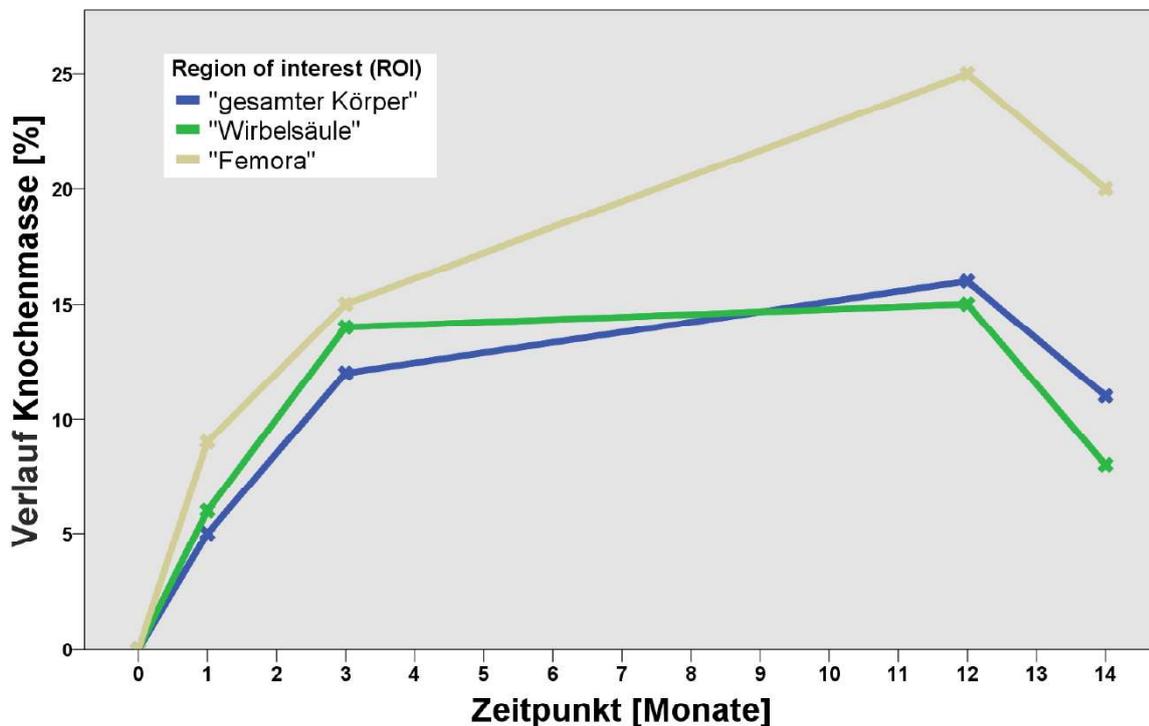


Abbildung 33: Vergleich des Verlaufes der prozentualen Verlustwerte des BMD-Wertes der verschiedenen ROI der Sham-Gruppe. Die Prozentzahl ist bezogen auf den jeweiligen Messzeitpunkt im Vergleich zum Ausgangswert $t=0$ Monate. Verglichen werden die ROIs „gesamter Körper“ (blau), „Wirbelsäule“ (grün) und „Femora“ (beige). Gemeinsam ist bei allen ROI ein deutlicher Zuwachs des BMD-Wertes bis zum Zeitpunkt $t=3$ Monate zu beobachten. Der Effekt der langen Standzeit macht sich dadurch bemerkbar, dass in allen ROI nach 12 Monaten ein Abfall der Knochendichte zu erkennen ist. Im ROI „Femora“ ist der größte Zuwachs von insgesamt 25% an Knochendichte zu beobachten, besonders deutlich erkennbar bei Betrachtung des Zeitpunktes $t=12$ Monate.

Dem erheblichen Verlust an Knochenmasse innerhalb der Diät-Gruppe sollen nun auch eine differenzierte Betrachtung und ein Vergleich der gemessenen ROIs der Sham-Gruppe folgen (Abbildung 34). Zum einen ist so eine Gegenüberstellung zur Diät-Gruppe möglich und zum anderen soll der Effekt der langen Standzeit auf die Knochenmasse der verschiedenen ROIs untersucht werden. Wie auch bei der Diät-Gruppe werden die bereits bekannten ROIs „gesamter Körper“, „Wirbelsäule“ und „Femora“ miteinander verglichen.

Nach einem Monat *post interventionem* ist ein deutlicher Anstieg der Knochendichte innerhalb aller ROI zu beobachten („gesamter Körper“ 5%, „Wirbelsäule“ 6% und „Femora“ 9%), der sich bis zum Zeitpunkt $t=3$ Monate weiter fortsetzt („gesamter Körper“ 12%, „Wirbelsäule“ 14% und „Femora“ 15%). Anschließend verlangsamt sich der Anstieg für die ROIs „Wirbelsäule“ und „gesamter Körper“. Ausnahme stellt hier „Femora“ dar, wo ein weiterer Anstieg von 15% auf 25% bezogen auf den Ausgangswert bis zum

Zeitpunkt t=12 Monate zu beobachten ist. Zum Ende des Versuchszeitraums verlieren bezogen auf den Ausgangswert alle ROI gemeinsam an Knochendichte („gesamter Körper“ 11%, „Wirbelsäule“ 8% und „Femora“ 20%), sodass die lange Standzeit der Ratten einen Effekt auf die Knochendichte zu haben scheint. Beim Vergleich des ROIs „Femora“ von Diät-Gruppe und Sham-Gruppe fällt auf, dass bei der Diät-Gruppe dort mit 33% der stärkste Verlust an Knochendichte zu verzeichnen ist, während bei der Sham-Gruppe hier ein deutlicher Zuwachs von 25% bis zum Zeitpunkt t=12 Monate und anschließend beim Zeitpunkt t=14 Monate nur ein schwacher Verlust um 5 Prozentpunkte zu beobachten ist.

3.1.6 Osteodensitometrie Rattenkörper: Bone Mineral Content (BMC)

Der BMC (Bone Mineral Content) dient als wichtiger Marker für das Knochenwachstum, da er im Gegensatz zum BMD keine Flächendichte, sondern den absoluten Mineralgehalt widerspiegelt. Aus diesem Grund soll das Hauptaugenmerk auf den ROI „gesamter Körper“ gelegt werden. Der Vergleich der über allen ROI ermittelten Mittelwerte bezüglich des BMC lässt für den Zeitpunkt t=0 keinen signifikanten

BMC (Bone Mineral Content) gesamter Körper

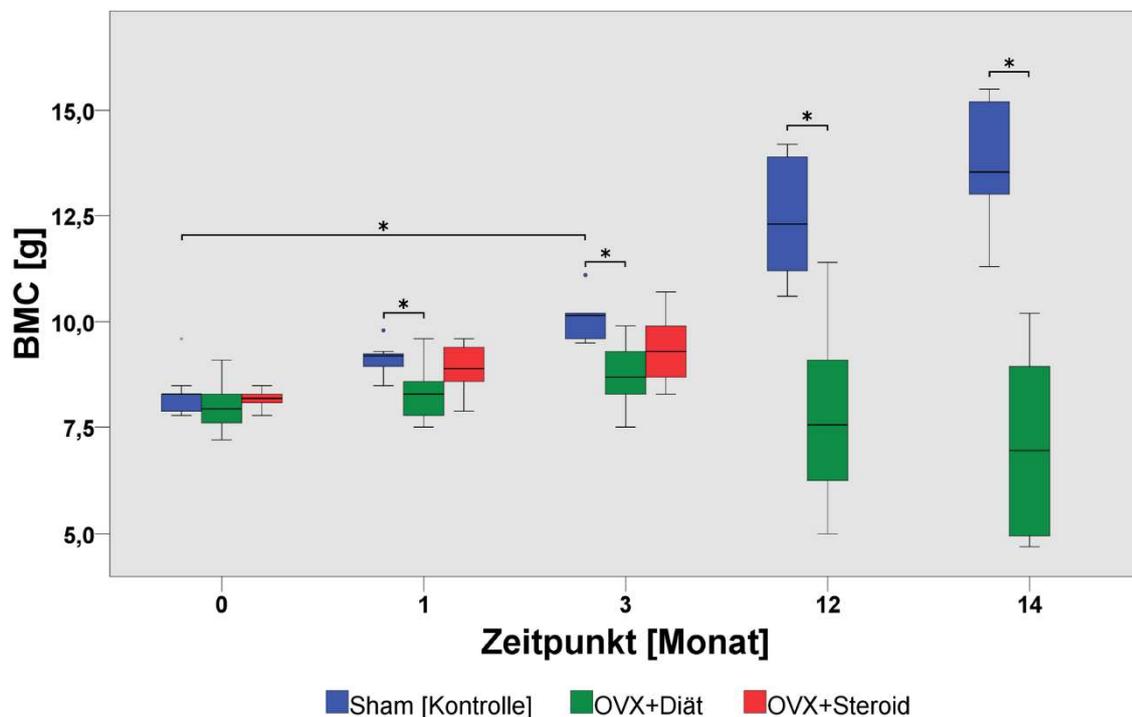


Abbildung 34: Box-Plot der BMC-Mittelwerte des gesamten Körpers der Sham-Gruppe (blau), Diät-Gruppe (grün) und der Steroid-Gruppe (rot). Der Startzeitpunkt ist homogen. Der BMC-Wert der Sham-Gruppe legt kontinuierlich über die Versuchszeit zu. Der BMC-Wert der Diät-Gruppe steigert sich bis zum Zeitpunkt t= 3 Monate unwesentlich und nimmt danach ab. Der BMC-Wert der Steroid-Gruppe steigt langsamer als der BMC-Wert der Sham-Gruppe.

Unterschied beobachten (Abbildung 35). Die Ausgangswerte zeigen sich homogen. Im weiteren Verlauf steigt der BMC jeweils bezogen auf den Ausgangswert für die Sham-Gruppe nahezu linear an ($t= 3$ Monate $p= 0,01$; $t= 12$ Monate $p<0,001$) und erreicht seinen Spitzenwert mit einer Zunahme des BMC von 5,4g für $t=14$ Monate ($p<0,001$). Im Gegensatz dazu zeigt die Diät-Gruppe bezüglich des BMC in den ersten 3 Monaten einen relativ konstanten Wert, der aber zu den späteren Zeitpunkten $t=12$ und $t=14$ Monate deutlich abnimmt (signifikanter Unterschied zwischen $t=3$ Monate und $t=14$ Monate mit $p= 0,002$). Bereits zu dem Zeitpunkt $t=1$ Monat bestehen hochsignifikante Unterschiede ($p=0,01$) zwischen der Sham-Gruppe und der in der Knochenmineralgehalt deutlich schwächeren Diät-Gruppe. Die Steroid-Gruppe lässt sich analog zum BMD wieder zwischen der Sham-Gruppe und der Diät-Gruppe einordnen. Zum Zeitpunkt $t=1$ Monat lässt sich hier im Gegensatz zur Diät-Gruppe kein signifikanter Unterschied im BMC-Wert im Vergleich zur Sham-Gruppe messen ($p= 0,606$).

3.1.7 Zusammenfassung der Osteodensitometrie-Ergebnisse

Die dargestellten Ergebnisse rechtfertigen die Aussage, dass es durch Ovariectomie und defizitäre Diät zu einem erheblichen Verlust von Knochenmasse und Knochendichte gekommen ist. Bereits nach einem Monat kommt es in der Diät-Gruppe zu signifikanten Verlusten von BMD und BMC im Vergleich zur Sham-Gruppe. Auch nach längerer Standzeit aggraviert diese Einbuße. Dabei zeigen beide Femora hier die größte Empfindlichkeit auf die durchgeführte Intervention.

Des Weiteren wird bei der Sham-Gruppe nach 14 Monaten ein Rückgang der Knochendichte in allen ROI beobachtet. Hieraus ergibt sich, dass die lange Standzeit ebenfalls einen Effekt auf die Knochenmasse hat. Dennoch hatte die Sham-Gruppe zu allen Messzeitpunkten ab einem Monat eine höhere Knochendichte als die Diät-Gruppe.

3.2 Histomorphometrie

Die histomorphometrische Analysen der Rattenknochen wurden *ex vivo* anhand von HE-Schnitten durchgeführt. Dabei wurden das Femur und der dritte Lendenwirbelkörper untersucht. Besonderes Augenmerk wurde bei der histomorphometrischen Analyse auf die Trabekelfläche gelegt. Als Ausgangswert diente eine Kontrollgruppe von 10 Tieren, die ohne Behandlung euthanasiert wurde. Zu den Zeitpunkten 3, 12 und 14 Monate wurden Präparate der Sham-Gruppe und Diät-Gruppe gewonnen und analysiert. Für die

Steroid-Gruppe standen lediglich Präparate für den Zeitpunkt t=3 Monate zur Verfügung. Alle Präparate wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

3.2.1 Deskriptive Histologie der Kontroll-Gruppe

Die Tiere der Kontroll-Gruppe wurden direkt nach der Einstellung euthanasiert und das Femur sowie der dritte Lendenwirbelkörper für die Histologie vorbereitet. Die Kontroll-Gruppe soll als Ausgangspunkt dienen, an der der Effekt der Behandlung der anderen Gruppen verglichen werden soll. Bei der Betrachtung der H.E. gefärbten Schnitte vom linken Femur und dritten Lendenwirbelkörper ist zunächst eine korrekte Färbung des Präparates zu erkennen (Abbildung 36). Die Trabekel und die Kompakta färben sich eosinophil (magenta), während sich die zellulären Anteile besonders im Knochenmark basophil (blauviolett) anfärben. Osteoid und die Epiphysenfuge stellen sich in violetter Farbe dar. Bei Betrachtung des Knochenstatus sind eine starke und kräftige Kompakta und ein dichtes regulär verzweigtes Trabekelwerk zu erkennen. Die Kontroll-Gruppe zeigt also einen gesunden regelrechten Knochenstatus.

Kontroll-Gruppe: Startzeitpunkt, proximales Femur, 3. Lendenwirbelkörper

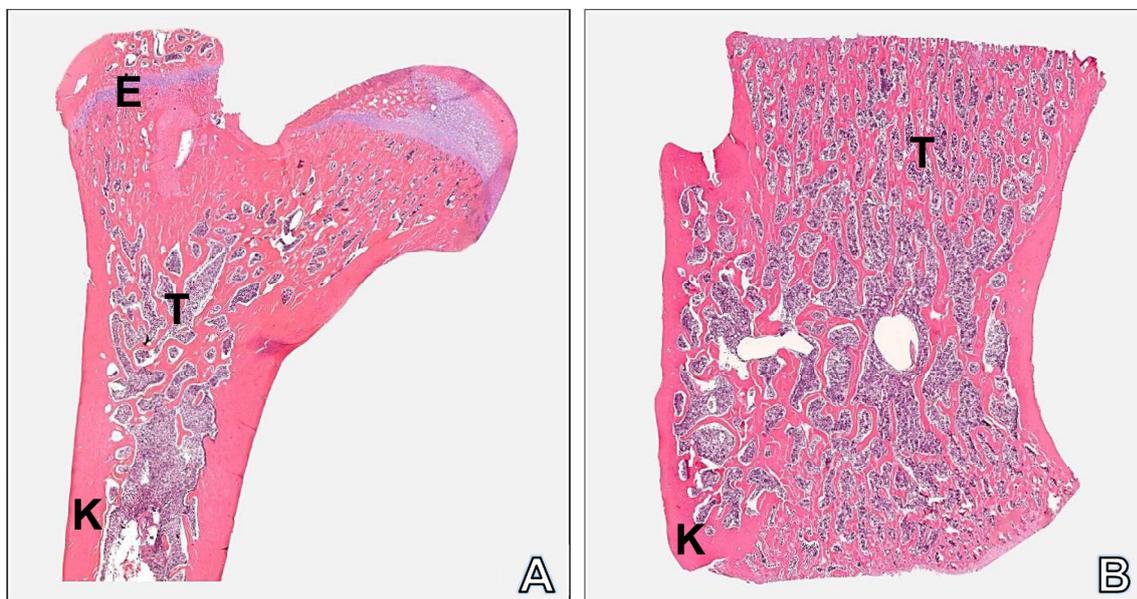


Abbildung 35: H.E. Färbung des linken proximalen Femurs (A) und des dritten Lendenwirbelkörpers (B) der Kontroll-Gruppe zum Startzeitpunkt. Zusammengesetztes Bild aus mehreren Einzelfotos aufgenommen in x5 Vergrößerung. Die Kontrollgruppe erfuhr keine Behandlung und dient als Ausgangspunkt für den Vergleich mit den Präparaten der Versuchsgruppe. Sowohl beim Femur als auch beim Wirbelkörper sind eine starke Kompakta (K) und ein dichtes Trabekelwerk (T) zu erkennen. Da es sich um Jungtiere handelt, ist eine Epiphysenfuge in Abbildung 36 A (E) zu sehen. Insgesamt handelt es sich hierbei um einen gesunden Knochenstatus.

3.2.2 Deskriptive Histologie der 3 Monatsgruppen

Nach drei Monaten wurden jeweils 10 Ratten der Sham-Gruppe, Diät-Gruppe und Steroid-Gruppe euthanasiert und wieder das linke Femur und der dritte Lendenwirbelkörper für die Histologie vorbereitet. Gefärbt wurden die Präparate mit Hämatoxylin-Eosin.

3.2.2.1 Sham-Gruppe

Bei Betrachtung des proximalen Femurs der Sham-Gruppe nach 3 Monaten zeigt sich eine starke Kompakta und ein gesundes dichtes Trabekelwerk mit regelhaftem Knochenmark (Abbildung 37). Die Trabekel sind im Bereich des Femurhalses anhand der trajektorialen Linien ausgerichtet und untereinander dicht verzweigt. Beim Wirbelkörper hat sich die Kompakta im Vergleich zur Kontroll-Gruppe bei weiterhin bestehenden dicht verzweigtem Trabekelwerk verstärkt. Die Epiphysenfuge des Trochanter majores hat sich bereits verschlossen, während die Epiphysenfuge des Femurkopfes weiterhin besteht. Die Epiphysenfuge des Femurkopfes hat sich allerdings im Vergleich zur Kontroll-Gruppe verschmälert. Insgesamt ist nach 3 Monaten in der Sham-Gruppe ein gesunder Knochenstatus zu beobachten.

Sham-Gruppe: Zeitpunkt 3 Monate, proximales Femur, 3. Lendenwirbelkörper

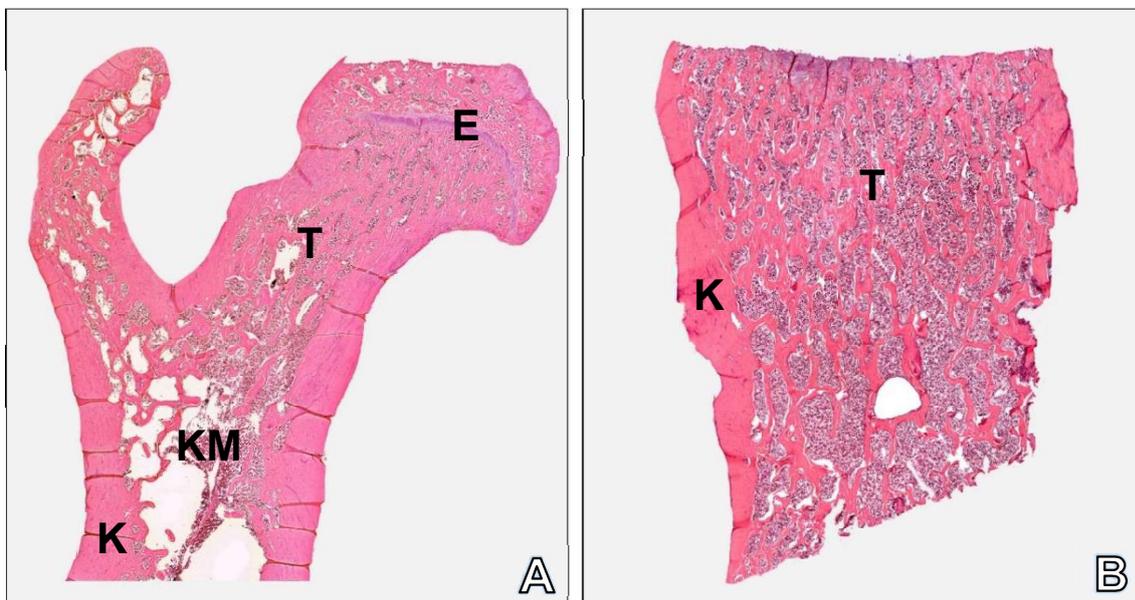


Abbildung 37: H.E. Färbung des linken proximalen Femurs (A) und des dritten Lendenwirbelkörpers (B) der Sham-Gruppe zum Zeitpunkt 3 Monate. Zusammengesetzt aus Einzelfotos aufgenommen in x5 Vergrößerung. Beim proximalen Femur sind eine starke Kompakta (K) und ein gesundes dichtes Trabekelwerk (T) mit regelhaftem Knochenmark (KM) zu erkennen. Die Epiphysenfuge (E) des Trochanter majores ist bereits verschlossen. Die Epiphysenfuge des Femurkopfes besteht weiterhin und hat sich im Vergleich zum Zeitpunkt $t = 0$ Monate verschmälert. Beim Wirbelkörper hat sich die Kompakta verstärkt und das Trabekelwerk bleibt weiterhin dicht und regelmäßig. Insgesamt handelt es sich hierbei um einen gesunden Knochenstatus.

3.2.2.2 Diät-Gruppe

Bei Betrachtung des proximalen Femurs der Diät-Gruppe nach 3 Monaten zeigt sich eine im Vergleich zur Sham-Gruppe verschmälerte Kompakta (Abbildung 38). Die Struktur der Trabekel erscheint aufgelockerter und ungeordneter. Die Trabekel sind weiterhin anhand der trajektoriiellen Linien organisiert. Die Epiphysenfugen des Trochanter majors und des Femurkopfes sind noch nicht verschlossen. Beim 3. Lendenwirbelkörper ist ebenfalls eine dünnere Kompakta zu erkennen, bei einem deutlich aufgelockerten Trabekelwerk. Dabei fällt besonders auf, dass die Trabekel untereinander weniger verzweigt sind als bei der Sham-Gruppe zum gleichen Versuchszeitpunkt.

Diät-Gruppe: Zeitpunkt 3 Monate, proximales Femur, 3. Lendenwirbelkörper

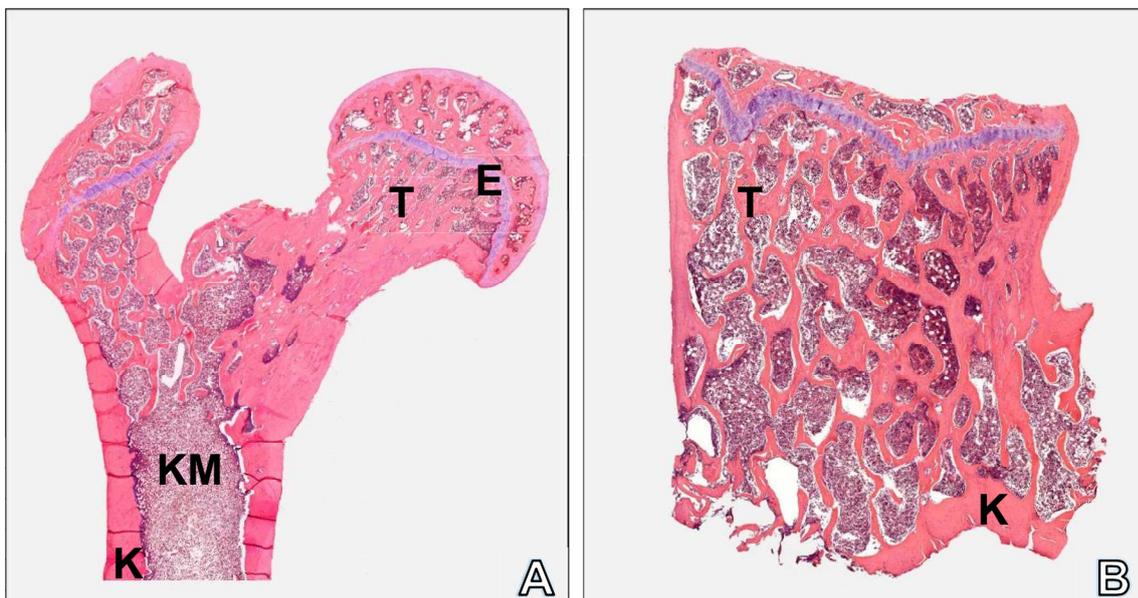


Abbildung 36: H.E. Färbung des linken proximalen Femurs (A) und des dritten Lendenwirbelkörpers (B) der Diät-Gruppe zum Zeitpunkt 3 Monate. Zusammengesetzt aus Einzelfotos aufgenommen in x5 Vergrößerung. Die Kompakta (K) hat sich im Vergleich zur Sham-Gruppe etwas verschmälert, die Struktur der Trabekel (K) scheint ungeordneter und aufgelockerter. Epiphysenfuge (E) von Trochanter major und Femurkopf sind noch nicht verschlossen.

3.2.2.3 Steroid-Gruppe

Nach 3 Monaten zeigen sich im proximalen Femur und im 3. Lendenwirbelkörper bei der Steroid-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe eine deutlich verschmälerte Kompakta bei einem ausgedünnten Trabekelwerk (Abbildung 39). Des Weiteren ist eine Verfettung des Knochenmarkes zu beobachten, bei der die zellulären Anteile des Markraumes weitestgehend durch Fettzellen verdrängt worden sind. Im Vergleich zu den anderen 3 Monatsgruppen ist in dieser Gruppe Trabekelwerk am dünnsten.

Steroid-Gruppe: Zeitpunkt 3 Monate, proximales Femur, 3. Lendenwirbelkörper

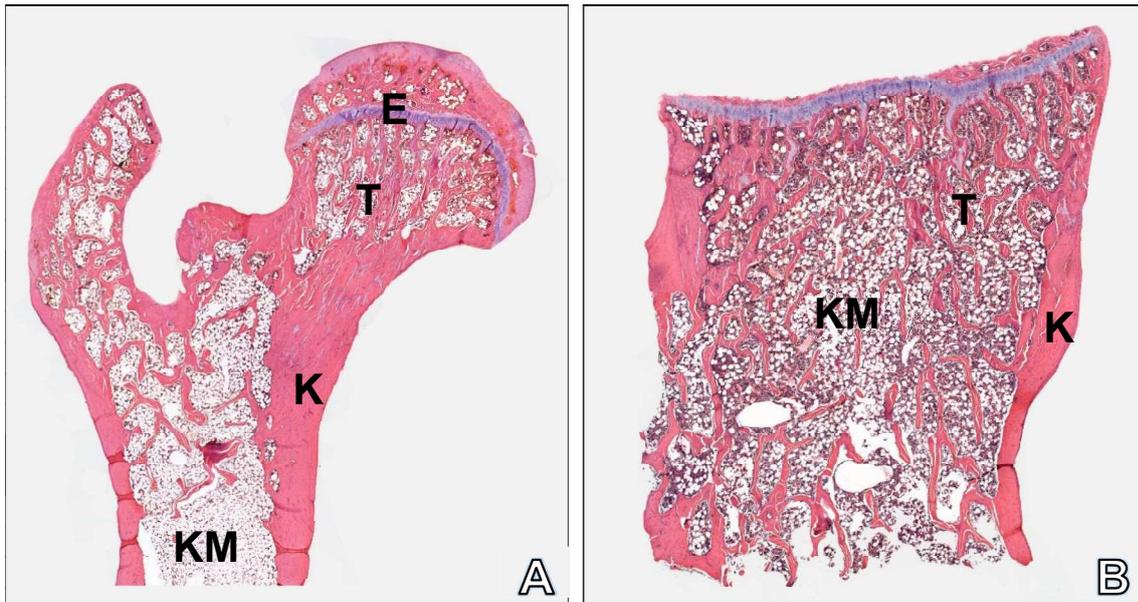


Abbildung 37: H.E. Färbung des linken proximalen Femurs (A) und des dritten Lendenwirbelkörpers (B) der Steroid-Gruppe zum Zeitpunkt 3 Monate. Zusammengesetzt aus Einzelfotos aufgenommen in x5 Vergrößerung. Beim proximalen Femur ist eine Auflockerung der Trabekel (T) zu erkennen. Die zellulären Anteile des Markraumes (KM) wurden durch Fettzellen verdrängt. Beim Wirbelkörper sind ebenfalls Verfettung des Knochenmarkes (KM) und eine Rarefizierung der Trabekel (T) zu beobachten.

3.2.3 Deskriptive Histologie der 12 Monatsgruppen

Nach 12 Monaten wurden jeweils 10 Ratten der Sham-Gruppe und Diät-Gruppe euthanasiert und wieder das linke Femur sowie der dritte Lendenwirbelkörper für die Histologie vorbereitet. Gefärbt wurden die Präparate mit Hämatoxylin-Eosin.

3.2.3.1 Sham-Gruppe

Bei Betrachtung des proximalen Femurs der Sham-Gruppe nach 12 Monaten zeigt sich weiterhin eine kräftige Kompakta bei einem verzweigten und dichten Trabekelwerk (Abbildung 40). Die Epiphysenfuge des Trochanter majors hat sich verschlossen. Im Knochenmark finden sich nur vereinzelt Fettzellen. Auch beim dritten Lendenwirbelkörper beobachtet man ein dichtes Trabekelwerk, welches in Richtung der axialen Belastung ausgerichtet ist. Allerdings sind die Trabekel im Vergleich zum Zeitpunkt t= 3 Monate etwas dünner geworden.

Zusammenfassend beobachtet man nach 12 Monaten im proximalen Femur und im dritten Lendenwirbelkörper einen gesunden Knochenstatus.

Sham-Gruppe: Zeitpunkt 12 Monate, proximales Femur, 3. Lendenwirbelkörper

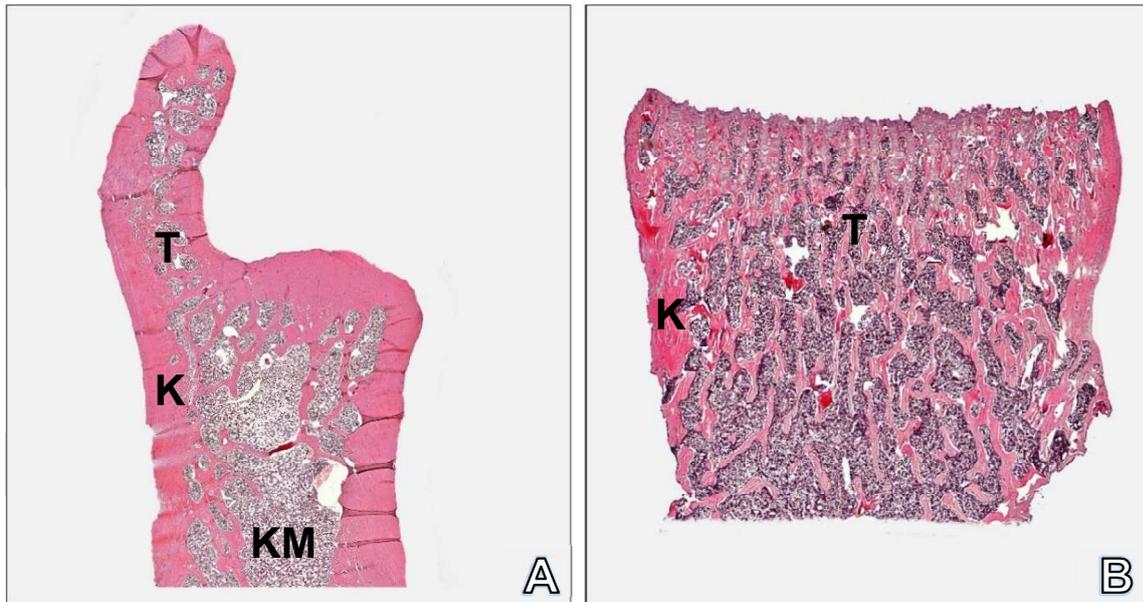


Abbildung 38: H.E. Färbung des linken proximalen Femurs (A) und des dritten Lendenwirbelkörpers (B) der Sham-Gruppe zum Zeitpunkt 12 Monate. Beim Femur ist eine häufig verzweigte dichte Trabekelstruktur (T) besonders im Trochanter zu erkennen. Das proximale Femur wurde bei der Präparation beschädigt. Beim Wirbelkörper ist das Trabekelwerk ebenfalls sehr dicht und häufig verzweigt und in Richtung der axialen Belastung ausgerichtet. Insgesamt sind die Trabekel im Vergleich zum Zeitpunkt $t=3$ Monate etwas dünner und weniger geworden.

Bei der Betrachtung des proximalen Femurs der Diät-Gruppe nach 12 Monaten zeigt sich im Vergleich zur Sham-Gruppe eine deutliche Verdickung der Trabekel bei fast vollständiger Verdrängung des Markraumes. Die Struktur der Trabekel ist gestört und die typische Schwammstruktur des spongiösen Knochens ist kaum noch zu erkennen. Die Ausrichtung des Trabekelnetzwerkes folgt nicht den trajektorialen Linien. Wie in Abbildung 41 (A) zu erkennen ist, es bei der Präparation des sehr empfindlichen Knochens zum Bruch einzelner Trabekel gekommen. Bei der Vorbereitung des proximalen Femurs für die Histologie zeigt sich bereits makroskopisch ein weicher und empfindlicher Knochen.

Die Trabekel des 3. Lendenwirbelkörpers der Diät-Gruppe haben sich nach 12 Monaten rarefiziert und sind weniger verzweigt. Allerdings haben sich die wenig verbliebenen Trabekel kompensatorisch verdickt. Die Kompakta ist im Vergleich zur Sham-Gruppe deutlich verschmälert. Im Markraum des proximalen Femurs und des Lendenwirbelkörpers sind nur vereinzelt Fettzellen zu finden. Dadurch, dass Ratten ein lebenslanges Größenwachstum aufzeigen, sind in beiden Präparaten noch die Epiphysenfugen offen.

Diät-Gruppe: Zeitpunkt 12 Monate, proximales Femur, 3. Lendenwirbelkörper

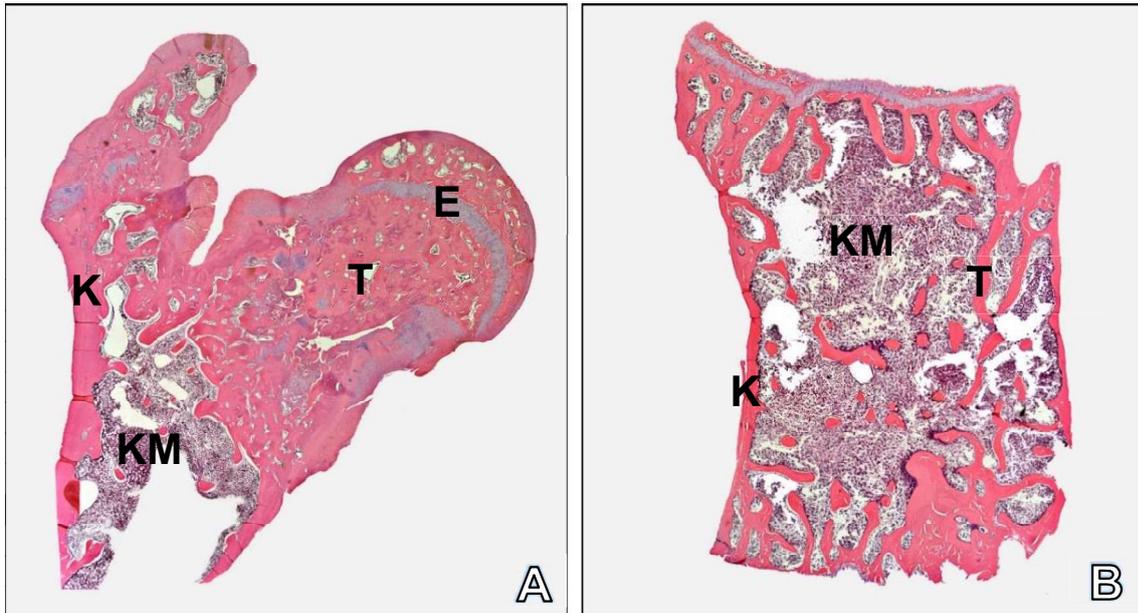


Abbildung 39: H.E. Färbung des linken proximalen Femurs (A) und des dritten Lendenwirbelkörpers (B) der Diät-Gruppe zum Zeitpunkt 12 Monate. Im Vergleich zum Zeitpunkt $t=3$ Monate haben sich die Trabekel (T) deutlich verdickt. Es ist kaum noch eine für den spongiösen Knochen typische Schwammstruktur zu erkennen. Bei der Präparation der sehr empfindlichen Knochen ist es sogar zu einzelnen Trabekelbrüchen gekommen. Beim Wirbelkörper ist eine Rarefizierung der Trabekel (T) zu erkennen, die dafür aber kompensatorisch verdickt sind. Insgesamt sind die Trabekel weniger verzweigt.

3.2.4 Deskriptive Histologie der 14 Monatsgruppen

Nach 14 Monaten wurden jeweils 10 Ratten der Sham-Gruppe und Diät-Gruppe euthanasiert und wieder das linke Femur und der dritte Lendenwirbelkörper für die Histologie vorbereitet. Gefärbt wurden die Präparate mit Hämatoxylin-Eosin.

3.2.4.1 Sham-Gruppe

Nach 14 Monaten ist weiterhin im proximalen Femur und im dritten Lendenwirbelkörper der Sham-Gruppe ein dichtes Trabekelwerk bei starker Kompakta zu erkennen (Abbildung 42). Im Vergleich zu den vorangegangenen Zeitpunkten hat sich das Trabekelwerk etwas aufgelockert. Im Wirbelkörperpräparat finden sich vereinzelt Fettzellen. Insgesamt ist der Knochenstatus gesund.

Sham-Gruppe: Zeitpunkt 14 Monate, proximales Femur, 3. Lendenwirbelkörper

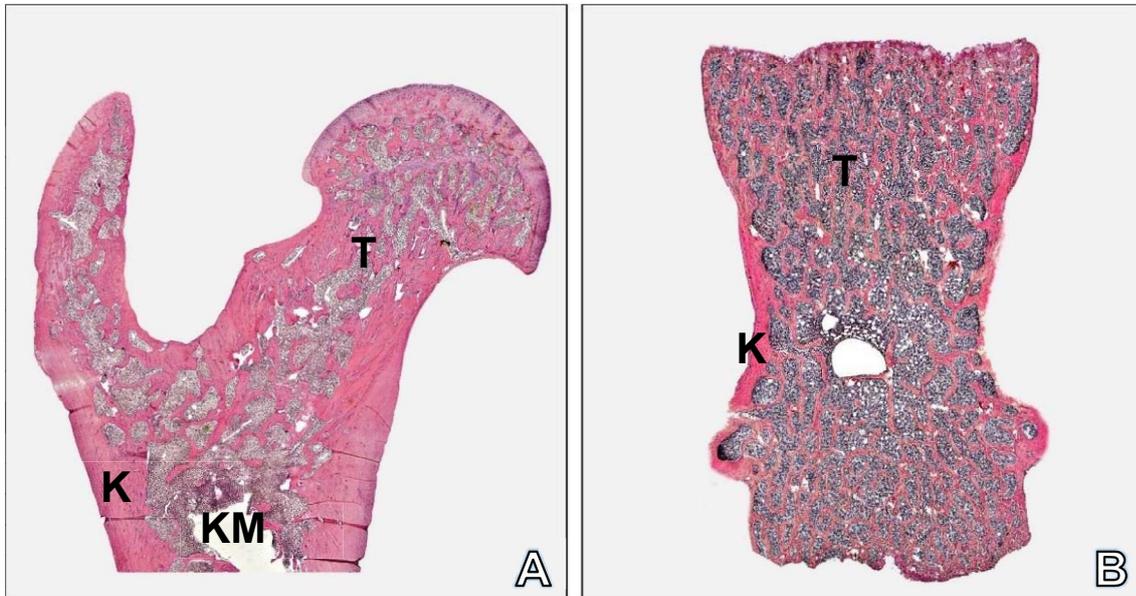


Abbildung 40: H.E. Färbung des linken proximalen Femurs (A) und des dritten Lendenwirbelkörpers (B) der Sham-Gruppe zum Zeitpunkt 14 Monate. Beim Femur fallen eine starke Kompakta (K) und ein regelmäßiges und dichtes Trabekelwerk (T) auf. Beim Wirbelkörper ist das Trabekelwerk (T) ebenfalls dicht und häufig verzweigt. Im Vergleich zum Zeitpunkt t=12 Monate sind wenige Veränderungen zu erkennen.

3.2.4.2 Diät-Gruppe

Bei Betrachtung des proximalen Femurs der Diät-Gruppe nach 14 Monaten fällt analog zu den Beobachtungen zum vorangegangenen Zeitpunkt eine dünne Kompakta mit einem strukturell gestörten Trabekelwerk auf (Abbildung 43). Die Trabekel sind wucherartig verändert und verdrängen den Markraum ohne dabei einer trajektorialen Ausrichtung zu folgen. Im Wirbelkörper ist die Rarefizierung der Trabekel weiter vorangeschritten. Darüber hinaus ist eine Verfettung des Knochenmarkes zu erkennen. Bei der deskriptiven Histologie lässt sich für das proximale Femur der Diät-Gruppe nach 14 Monaten zusammenfassen, dass es durch die Behandlung zu einer Ausdünnung der Kompakta mit wucherartig veränderten trabekulären Netzwerk gekommen ist. Beim Lendenkörperpräparat kommt es zu einer deutlichen Rarefizierung der Trabekel mit kompensatorischer Verdickung derselben bei einer gleichzeitigen Verfettung des Markraumes.

Diät-Gruppe: Zeitpunkt 14 Monate, proximales Femur, 3. Lendenwirbelkörper

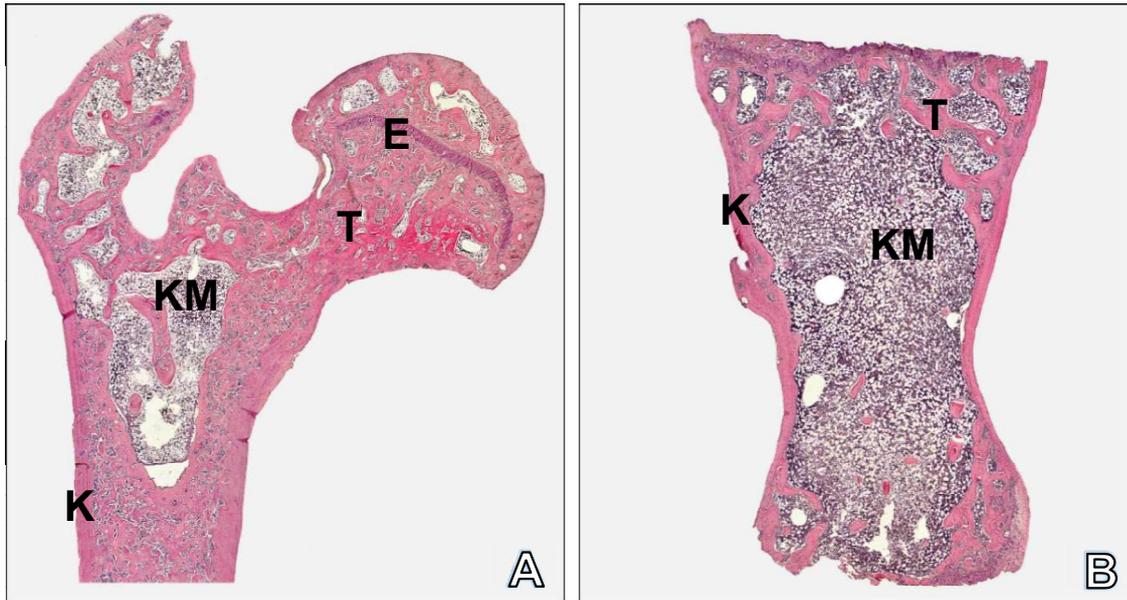


Abbildung 41: H.E. Färbung des linken proximalen Femurs (A) und des dritten Lendenwirbelkörpers (B) der Diät-Gruppe zum Zeitpunkt 14 Monate. Beim Femur sind die Trabekel (T) in ihrer Struktur gestört. Es findet keine trajektorielle Ausrichtung der Trabekel mehr statt und die Abgrenzung von Kompakta (K) und Spongiosa fällt gerade am Oberschenkelhals schwer. Die wucherartig veränderten Trabekel (T) verdrängen den Markraum (KM). Im Wirbelkörper ist eine Rarefizierung der Trabekel (T) zu erkennen. Die verbleibenden Trabekel (T) sind kompensatorisch verdickt. Es ist eine Verfettung des Markraumes (KM) zu erkennen.

3.2.5 Analyse des Mineralisationsgrades des Osteoids

Zur Anfertigung der in dem Kapitel 3.2.6 Histomorphometrische Analyse der Trabekelfläche analysierten Präparate wurden die Paraffinschnitte vorher entkalkt, sodass keine Aussage über den Mineralisationsgrad des Osteoids getroffen werden kann. Aus diesem Grund wurden von Kossa Färbungen von Trabekeln des Femurs von Sham- und Diät-Gruppe durchgeführt (Abbildung 44). In der Versilberung nach Kossa färbt sich die mineralisierte Knochengrundsubstanz schwarz und das unmineralisierte Osteoid magentafarben. Nach 3, 12 und 14 Monaten zeigen sich die Trabekel der Sham-Gruppe vollständig mineralisiert. In der Diät-Gruppe kann nach 3 Monaten kein relevanter Unterschied bezüglich des Mineralisierungsgrades der Knochengrundsubstanz festgestellt werden. Zu den Zeitpunkten 12 und 14 Monaten zeigt sich jedoch zunehmend eine unvollständig mineralisierte Knochengrundsubstanz bei kompensatorisch verdickten Trabekeln dar.

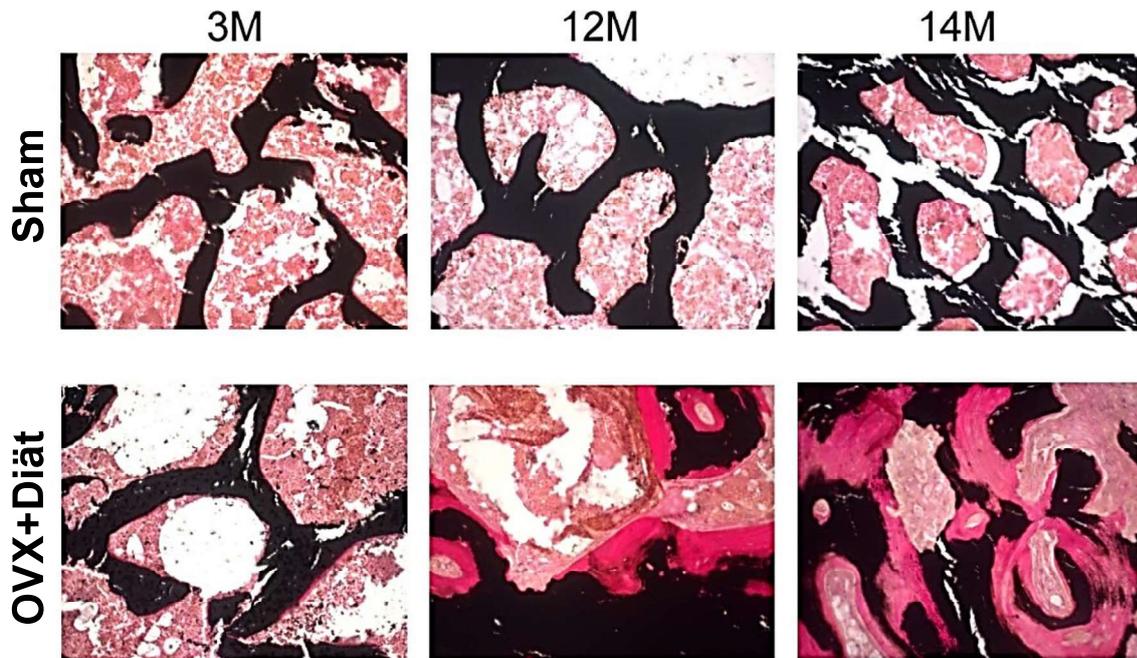


Abbildung 42: Von Kossa Färbung von Trabekeln des Femurs von Sham-Gruppe und Diät-Gruppe nach 3, 12 und 14 Monaten Standzeit. Mineralisierte Knochengrund-substanz wird schwarz dargestellt, während unvollständig mineralisiertes Osteoid magenta angefärbt ist. Nach 12 und 14 Monaten zeigen sich die Trabekel der Diät-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe verdickt aber unvollständig mineralisiert. Diese osteomalatisch veränderten Bereiche erklären sich durch die defizitäre Diät mit dem daraus resultierenden Kalzium- und Vitamin D Mangel.

3.2.6 Histomorphometrische Analyse der Trabekelfläche

Die deskriptive Histologie hat bereits die Veränderungen des Knochenstatus aufgegriffen, die jetzt weiter histomorphometrisch analysiert und statistisch ausgewertet werden soll. Im Vordergrund steht hierbei der Vergleich der Trabekelfläche in Prozent, da diese standardisiert und reproduzierbar durch die bereits im Kapitel 2.4.4 halbautomatische Analyse mit GIMP (S. 40) vorgestellte Methode ermittelt werden kann.

3.2.6.1 Histomorphometrie: Proximales Femur

Zum Startzeitpunkt zeigt die Kontrolle einen prozentualen Anteil der Trabekelfläche von ca. 42%. Nach drei Monaten *post interventionem*, wo bereits im DXA ein deutlicher Abfall der Knochendichte zu beobachten war, ist auch in der Histomorphometrie ein signifikanter Abfall der Trabekelfläche in der Diät-Gruppe auf 36% ($p= 0,044$) und in der Steroid-Gruppe auf 32% ($p= 0,028$) im Vergleich zur Sham-Gruppe zu beobachten

Histomorphometrie: Proximales Femur

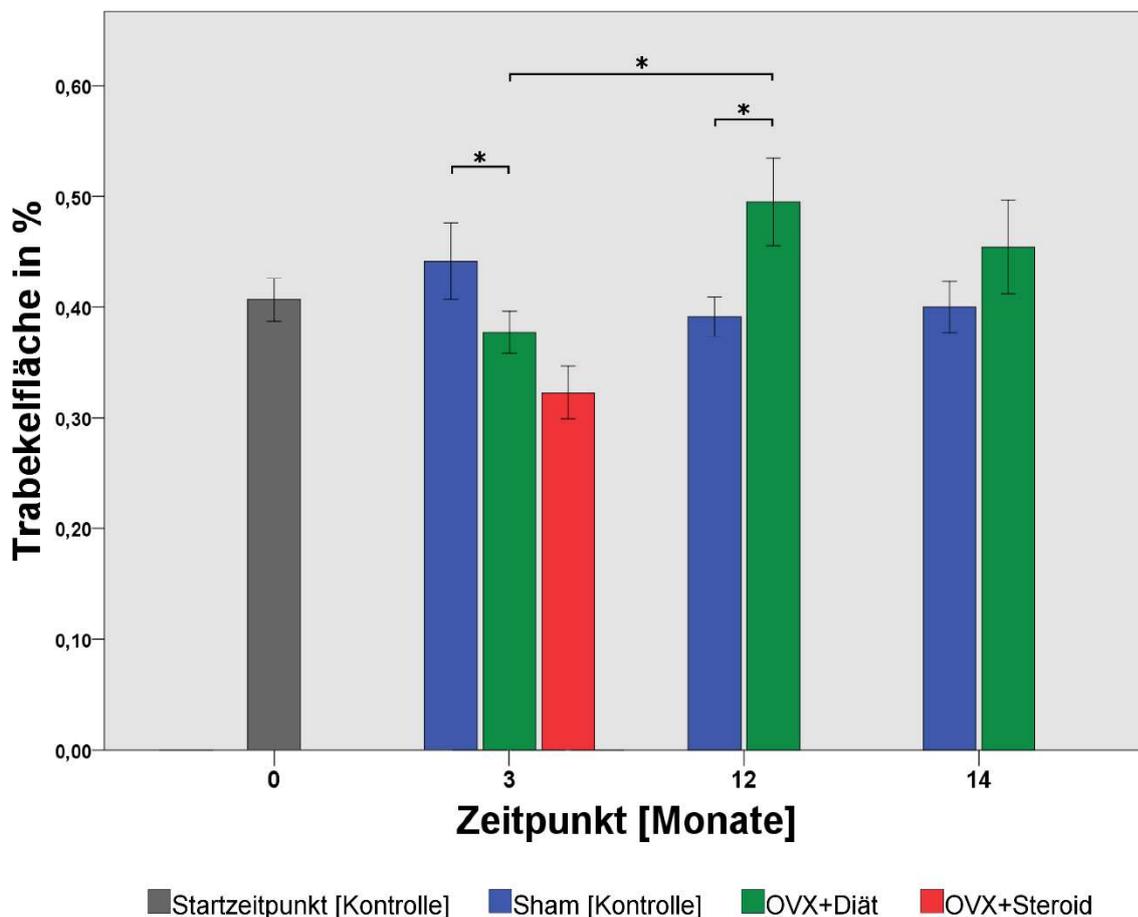


Abbildung 43: Prozentuale Bestimmung der Trabekelfläche des proximalen Femurs der Kontroll-Gruppe (grau), Sham-Gruppe (blau), Diät-Gruppe (grün) und Steroid-Gruppe (rot). Zum Startzeitpunkt machen die Trabekel ca. 40% der Fläche des Markraumes aus. Zum Zeitpunkt t= 3 Monate zeigt die Sham-Gruppe signifikant die höchste prozentuale Trabekelfläche, während die Steroid-Gruppe die niedrigste prozentuale Trabekelfläche aufweist. Besonders auffallend ist der deutliche Anstieg der Trabekelfläche zum Zeitpunkt t= 12 Monate innerhalb der Diät-Gruppe, die signifikant höher ist als die der Sham-Gruppe. Zum Zeitpunkt t= 14 Monate gleicht sich dieser Unterschied wieder etwas aus.

(Abbildung 45). Die Steroid-Gruppe hat hier die niedrigste Trabekelfläche. Zum Zeitpunkt t= 12 Monate fällt besonders der signifikante ($p= 0,048$) Anstieg der Trabekelfläche von 36% auf 50% in der Diät-Gruppe auf. Als Reaktion auf die Rarefizierung der Trabekel zum Zeitpunkt t= 3 Monate zeigen die weniger vorhandenen Trabekel nun als Kompensation ein deutliches Dickenwachstum. Dieser Befund deckt sich ebenfalls mit den aus der deskriptiven Histologie gewonnenen Erkenntnissen.

Zum Zeitpunkt t= 14 Monate gleicht sich dieser Unterschied etwas aus, wobei der Mittelwert der Diät-Gruppe (43%) immer noch größer ist als der der Sham-Gruppe (41%). Allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant ($p= 0,363$).

3.2.6.2 *Histomorphometrie: 3. Lendenwirbelkörper*

Zum Startzeitpunkt zeigt die Kontroll-Gruppe für den dritten Lendenwirbelkörper eine prozentuale Trabekelfläche von ca. 38% (Abbildung 46). Nach drei Monaten zeigt die Sham-Gruppe mit 34% signifikant ($p=0,032$) die höchste prozentuale Trabekelfläche im Vergleich zur Diät-Gruppe (30%) und Steroid-Gruppe (22%). Die Steroid-Gruppe zeigt hier die niedrigste prozentuale Trabekelfläche. Nach 12 Monaten ist auch, wie beim Femur, in der Diät-Gruppe eine signifikant höhere ($p=0,002$) Trabekelfläche gemessen worden.

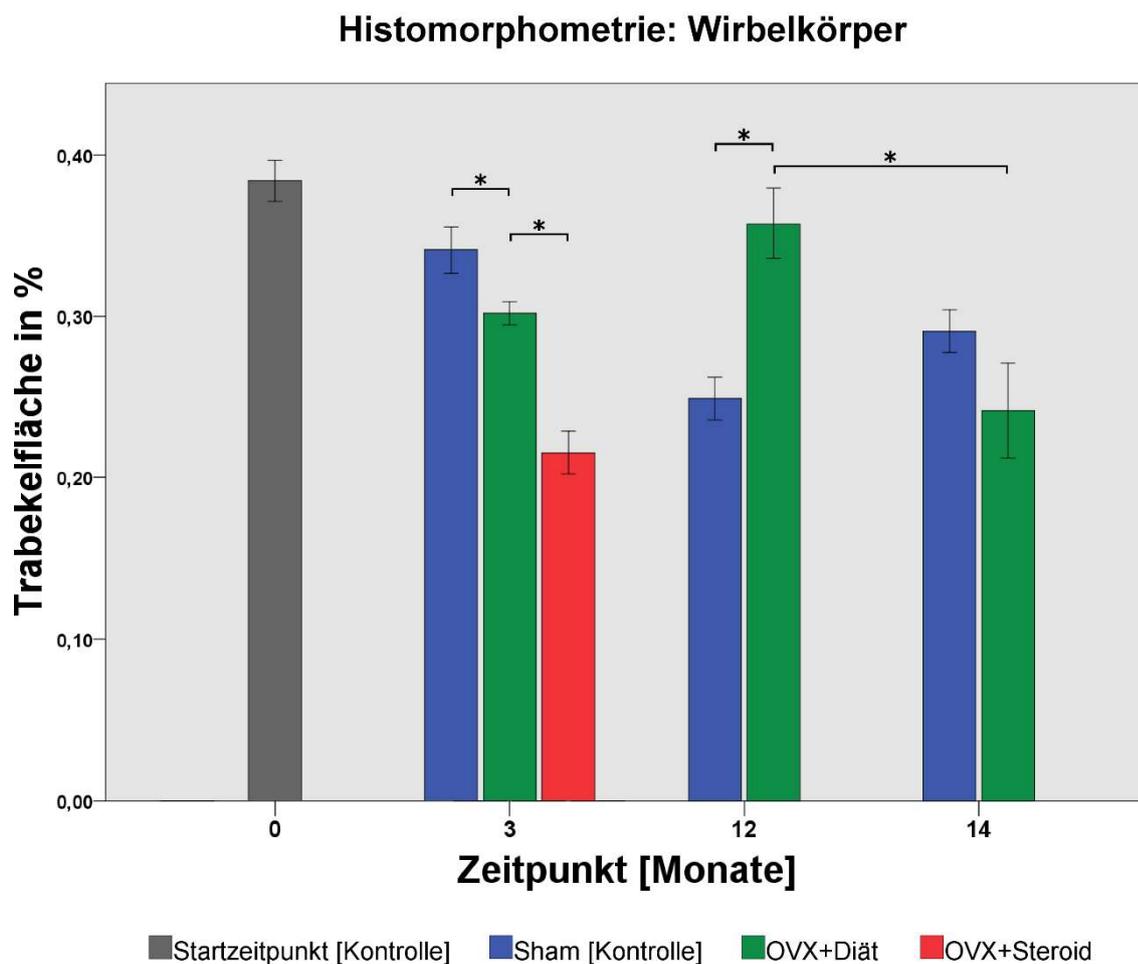


Abbildung 44: Prozentuale Bestimmung der Trabekelfläche des dritten Lendenwirbelkörpers der Kontroll-Gruppe (grau), Sham-Gruppe (blau), Diät-Gruppe (grün) und Steroid-Gruppe (rot). Zum Startzeitpunkt machen die Trabekel 38% der Fläche des Markraumes aus. Zum Zeitpunkt $t=3$ Monate zeigt die Sham-Gruppe signifikant ($p=0,032$) die höchste prozentuale Trabekelfläche, während die Steroid-Gruppe wie auch beim Femur die niedrigste prozentuale Trabekelfläche aufweist. Zum Zeitpunkt $t=12$ Monate zeigt die Diät-Gruppe wie beim Femur die signifikant ($p=0,002$) höchste prozentuale Trabekelfläche. Zum Zeitpunkt $t=14$ Monate gleicht sich dieser Unterschied auch hier wieder etwas aus.

Wie auch beim Femur passen die gewonnenen Erkenntnisse zu den Befunden der deskriptiven Histologie, wo ein Dickenwachstum der im Vergleich zur Sham-Gruppe weniger vorhandenen Trabekel zur Kompensation stattfindet. Zum Zeitpunkt $t=14$ Monate gleichen sich die Trabekelflächen von Sham-Gruppe (30%) und Diät-Gruppe

(28%) wieder etwas an, wobei der Mittelwert der Sham-Gruppe (30%) etwas größer ist ($p= 0,546$). Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant. Besonders zu erwähnen ist, dass die Diät-Gruppe im Zeitraum von 12 bis 14 Monate an Trabekelfläche verliert ($p= 0,07$).

3.2.7 Zusammenfassung: Histomorphometrie

Beim Vergleich der Histomorphometrie des proximalen Femurs mit dem dritten Lendenwirbelkörper fallen Parallelen auf. Zum Startzeitpunkt zeigen beide Kontrollgruppen mit 42% und 38% ähnlich hohe prozentuale Anteile der Trabekelfläche. Zum Zeitpunkt $t= 3$ Monate zeigen beide Messorte eine Analogie bezüglich des Anteils der Trabekelfläche: allen voran die Sham-Gruppe mit der signifikant ($p= 0,032$) höchsten Trabekelfläche gefolgt von der Diät-Gruppe, die die signifikant ($p= 0,032$) niedrigere Trabekelfläche aufweist. Schlusslicht ist die Steroid-Gruppe mit der am niedrigsten gemessenen Trabekelfläche. Besonders erwähnenswert sind die Ergebnisse zum Messzeitpunkt $t= 12$ Monate. Hier zeigt die Diät-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe bei beiden Messzeitpunkten eine signifikant ($p= 0,002$) höhere Trabekelfläche. Die deskriptive Histologie zeigt eine Rarefizierung der Trabekel mit kompensatorischer Verdickung, sodass letztendlich in der histomorphometrischen Analyse mehr prozentuale Trabekelfläche gemessen werden konnte. Zum Zeitpunkt $t= 14$ Monate scheinen sich jedoch die verdickten Trabekel wieder auszudünnen, sodass die histomorphometrische Analyse eine Angleichung der Sham-Gruppe und Diät-Gruppe ergibt.

4 Diskussion

Der demographische Wandel unserer alternden Gesellschaft schreibt der Krankheit Osteoporose wachsende Bedeutung zu. Um für Osteoporose gefährdete oder bereits erkrankte Patienten auch in Zukunft eine gute Lebensqualität zu ermöglichen, sind neue Möglichkeiten sowohl in Prävention als auch der Therapie des frakturierten systemisch erkrankten Knochens dringend notwendig. Leider ist verhältnismäßig wenig über die Pathophysiologie der Osteoporose oder Frakturheilung im osteoporotischen Knochen bekannt. Für die Entwicklung neuer Medikamente und Werkstoffe ist eine Erforschung im Tiermodell unerlässlich. Es gibt einige Tiermodelle mit unterschiedlichen Ansätzen, doch es existiert bisher noch kein definitiv etabliertes, durch verschiedene Methoden gesichertes und reproduzierbares Tiermodell. Schwerpunkt der Diskussion ist die Evaluierung des in der tierexperimentellen Arbeit genutzten Kleintiermodells durch DXA-Messung und histomorphometrische Analysen.

4.1 Ovariectomierte Ratte in Kombination mit einer defizitären Diät als Modell der postmenopausalen Osteoporose

Zunächst soll dargelegt werden, warum sich die ovariectomierte Ratte in Kombination mit einer defizitären Diät zur Induktion eines Zustandes besonders eignet, der einer postmenopausalen Osteoporose beim Menschen sehr nahekommt. Dabei sollen ebenfalls die Vorzüge der Ratte als Spezies im Kleintiermodell zur Osteoporoseinduktion hervorgehoben werden, sowie die Möglichkeiten, den erreichten osteoporotischen Knochenstatus durch DXA, klassische Lichtmikroskopie und Histomorphometrie zu sichern.

Tiermodelle zur Erforschung der Osteoporose

Die Erforschung der Osteoporose stellt viele Tiermodelle vor einige Schwierigkeiten, da nach dem derzeitigen Kenntnisstand eine senile und postmenopausale Osteoporose als Erkrankung in dieser Häufigkeit nur den Menschen betrifft. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der im Vergleich zu Tieren überproportional angestiegenen menschlichen Lebenserwartung und darin, dass viele Tiere nicht in die Menopause kommen, sondern ihren Sexualzyklus bis zum Tod fortsetzen [Thompson et al 1995]. Um also im Tier einen mit einem humanen osteoporotischen Knochenstatus vergleichbaren Zustand zu induzieren, benötigt es drastischer Maßnahmen wie einer Ovariectomie, defizitären Diät und der Applikation von Glukokortikoiden.

Bei der Auswahl eines passenden Tiermodells ist eine sichere Reproduzierbarkeit der Erkrankung nach humanem Vorbild von höchster Wichtigkeit. Säugetiere zeigen bei der Adaptierung ihrer Knochenqualität an die jeweilige Beanspruchung grundsätzlich zwei Wege auf: bone modeling und bone remodeling. Im adulten menschlichen Skelett wird die Knochenqualität via bone remodeling angepasst, dabei sind Knochenformation und Knochenresorption zeitlich und lokal in einer festen Sequenz aneinandergelockt. Im Gegensatz dazu sind beim bone modeling diese beiden Prozesse der Resorption und Formation voneinander unabhängig und laufen parallel über einen langen Zeitraum ab. Bei der Auswahl eines angepassten Tiermodells muss also darauf geachtet werden, welche Art der Knochenadaptation die vorliegende Spezies aufweist, wobei es durchaus möglich ist, dass beim bone modeling im juvenilen Alter als hauptsächlicher Prozess vorliegt und dann später beim Heranwachsen in bone remodeling wechselt.

Die Auswahl des geeigneten Tiermodells muss demnach für die formulierten Ziele der Studie angepasst sein. Die Richtlinien der FDA (Food and Drug Administration) von 1995 schreibt zur Entwicklung neuer Medikamente und Therapien der Osteoporose, dass keine Spezies allein wohl die vollständige Charakteristik einer menschlichen Osteoporose ausbilden wird. Die Richtlinie empfiehlt mindestens zwei Spezies (Kleintier und Großtier) bezüglich Knochenqualität bei der Effektivität neuer Behandlungsmöglichkeiten zu testen. Als Kleintier empfiehlt die FDA die ovariectomierte Ratte [Thompson et al 1995].

Die ovariectomierte Ratte als Modell der postmenopausalen Osteoporose

Die ovariectomierte Ratte ist auch aufgrund der Empfehlung der FDA das meist genutzte Tiermodell zur Erforschung der Pathophysiologie der Osteoporose, sodass bereits sehr viele Erkenntnisse über Physiologie und Pharmakologie in der Literatur zu Laborratten existieren und in der Literatur und in den Laboren auf einen großen Erfahrungsschatz zurückgegriffen werden kann.

Weibliche Ratten sind genauso wie Frauen polyöstrisch, das heißt, sie verfügen über eine Spontanovulation mit mehreren Sexualzyklen pro Jahr, die sie bis zum Tod fortführen. Um einen Vergleich mit der humanen Menopause zu erzielen, müssen die Tiere daher ovariectomiert werden. Dies schafft ähnliche hormonelle Verhältnisse wie bei der postmenopausalen Frau. Durch die Ovariectomie wird, wie Kalu 1991 zeigte, ein Knochenmasseverlust hervorgerufen, der durch eine erhöhte Knochenresorption aufgrund einer schwächeren Hemmung der Osteoklasten durch Östrogene bedingt ist,

während die Knochenformation gleich bleibt. Dies entspricht der Situation einer humanen postmenopausalen Osteoporose.

Der Knochenmasseverlust durch die Ovariectomie verläuft bei der Ratte laut Egermann et al. 2005 biphasisch. Ein rapider Verlust von Knochenmasse ist bei der ovariectomierten Ratte nach drei Monate zu beobachten, der sich anschließend auf osteopenem Niveau stabilisiert [Wronski 1989; Egermann 2005]. Nach 9 Monaten setzt ein erneuter aber langsamer ablaufender Knochenmasseverlust ein, der aber insgesamt niedriger als beim Menschen ist. Wie Kalu 1991 und Duque 2011 zeigten, ist der rapide Verlust von Knochenmasse zunächst auf den Verlust von trabekulären Knochen zurückzuführen, da erst längere Standzeiten nach Ovariectomie einen Knochenmasseverlust des kortikalen Knochens bedingen [Kalu 1991; Duque et al 2011]. Grynopas 2000 und Turner 2001 untersuchten dies genauer und stellten fest, dass das Modell der ovariectomierten Ratte weitere Limitierungen erfährt und dass es Unterschiede im kortikalen und trabekulären Remodeling bei der Ratte gibt [Grynopas et al 2000; Turner et al 2001]. In der Ratte finden sich im kortikalen Knochen nur wenige Havers-Systeme mit BMU's im Gegensatz zum trabekulären Knochen, wo nicht nur aufgrund der großen Oberfläche viele BMU's zu finden sind und so dort deutlich häufiger ein Remodeling stattfindet. Resultat ist, dass der trabekuläre Knochen durch den Östrogenmangel deutlich empfindlicher und früher als der kortikale Knochen mit einem Knochenmasseverlust reagiert.

Dies entspricht grundsätzlich der Situation einer postmenopausalen Osteoporose beim Menschen, wo laut Sornay-Rendu 2007 es ebenfalls zu einem Verlust von trabekulären Knochenmasse kommt [Sornay-Rendu et al 2007]. Dennoch ist der allein durch Ovariectomie bewirkte Knochenmasseverlust bei einer Ratte nicht so hoch wie beim Menschen, sodass weitere Interventionen neben einer Ovariectomie nötig sind, um den Knochenstatus einer humanen Osteoporose zu erreichen.

Das Skelett der Ratte zeigt die Besonderheit, dass Art und Weise der Knochenadaptation nach 3 bis 9 Monaten je nach Typus des Knochens wechseln. Ab einem Alter von 12 Monaten kann allerdings sicher davon ausgegangen werden, dass bone remodeling als vorherrschender Prozess vorliegt. Kritisch betrachtet gibt es nur wenige Studien, die dieses Faktum bei der Induktion der Osteoporose bei der Ratte beachten. Viel häufiger wird mit den Interventionen begonnen, während bone modeling noch als vorherrschender Prozess vorliegt. Ein weiterer Unterschied zum Menschen ist, dass Ratten die Möglichkeit des Längenwachstums von Knochen auch nach der Geschlechtsreife noch lange beibehalten und sich die Wachstumsfugen erst sehr spät oder sogar bei manchen langen Röhrenknochen sich überhaupt nicht schließen, wie

auch auf den H.E. gefärbten Knochenschnitten im Kapitel 3.2.1 Deskriptive Histologie der Kontroll-Gruppe (S. 55) ebenfalls bei den in dieser Studie untersuchten Ratten zu erkennen ist. Allerdings ist der Umfang dieses Wachstums bei der Ratte nicht sehr groß, sodass bei densitometrischen Untersuchungen keine Anpassung erforderlich ist [Levolas 2008].

Vor- und Nachteile des Rattenmodelles im Vergleich zu anderen Speziesmodellen

Viele verschiedene Spezies wurden als Tiermodell für die Erforschung der Osteoporose eingesetzt wie zum Beispiel Schafe, Affen, Ziegen, Meerschweinchen, Ratten und Mäuse [Egermann 2005]. Kleintiere wie die Ratte erfreuen sich zur Erforschung der Osteoporose nicht nur wegen ihrer einfachen und kostengünstigen Haltung großer Beliebtheit, sondern auch wegen der im Vergleich zu Großtieren weniger großen ethischen Bedenken. Des Weiteren kann ein möglicher Einfluss von Umweltfaktoren durch eine standardisierte Käfighaltung sehr gering gehalten werden. Die Beliebtheit von Kleintieren, insbesondere der Ratte, bewegte Firmen schon lange, durch spezielle Züchtung entsprechende Tiere mit großer genetischer Ähnlichkeit kommerziell anzubieten. Nachteilig ist allerdings, dass aufgrund der kleinen Körpergröße weniger interventionellen Möglichkeiten zur Verfügung stehen und Probleme bei der Testung von neuen Implantaten, Werkstoffen und Biomaterialien auftreten können.

Für die Erforschung der Osteoporose ist die Ratte geeignet, da aufgrund der Körpergröße im Vergleich zu Mäusen viele verschiedene Methoden und Eingriffe bis zum Setzen künstlicher Knochendefekte zur Erforschung der Frakturheilung durchführbar sind. Ein wesentlicher Vorteil bei Mäusen ist jedoch zurzeit die Möglichkeit mit Hilfe von "Knock-out Mäusen" bestimmte Gene auszuschalten, und so ein breites Spektrum an Interventionen zu ermöglichen. Dem gegenüber steht jedoch die eingeschränkte Lebenserwartung von Knock-Out Mäusen [Matsushita 1986], sodass Schwierigkeiten auftreten können, überhaupt ein ausreichendes Skeletalter zu erreichen. Allerdings bestehen aufgrund der Körpergröße bei Kleintieren natürlich auch Grenzen. Die kleinen Dimensionen bewirken eine höhere Anfälligkeit für Ungenauigkeiten, sodass mitunter eine größere Anzahl an Versuchstieren benötigt wird, um statistische Unterschiede zu erfassen. Dennoch sind Eingriffe wie eine intramedulläre Schienung, Verplattung und sogar ein Fixateur externe möglich [Zhao 2009]. Kompliziertere Operationen, bei denen beispielsweise neue Werkstoffe oder Materialien ausführlicher getestet werden sollen, bedürfen weiterhin eines Großtierversuches, da anatomische Gegebenheiten und mechanische Belastung

erheblich näher an die humanen Verhältnisse herankommen. Aber auch hier können Erfahrungen, die im Kleintier Ratte gesammelt wurden, zum Teil auf ein Großtiermodell übertragen werden und so sehr häufig einen wertvollen Beitrag zum Erfolg einer Studie leisten.

Die defizitäre Diät als sinnvolle Ergänzung zur Ovariectomie

Diätetische Maßnahmen sind ebenfalls ein wichtiges Werkzeug, um in Versuchstieren einen osteoporotischen Knochenstatus zu induzieren. Sinnvoll sind Diäten mit wenig Kalzium, Vitamin D, Phosphat und ohne Phytoöstrogene. Letztere können den Effekt einer Ovariectomie abschwächen oder gar aufheben, da in kommerziell erhältlichem Tierfutter sehr häufig Sojaproteine mit besonders hohem Gehalt an Phytoöstrogenen verarbeitet werden [Harrison et al. 1998]. Eine alleinige Diät bewirkt, wie Harrison 1960 zeigte, sowohl beim Menschen als auch beim Tier das Auftreten einer Osteomalazie, sodass eine defizitäre Diät nur in Kombination mit anderen Maßnahmen zur Osteoporoseinduktion sinnvoll scheint [Harrison 1960]. Zudem stellte Han et al. 1998 fest, dass eine alleinige Diät keine signifikante Auswirkung auf den BMD Wert ermittelt durch Q-CT zu haben scheint [Han et al. 1998].

Die Kombination einer Ovariectomie mit einer defizitären Diät ist eine etablierte Intervention und entspricht in ihrer Auswirkung bei der Ratte der klinischen Situation einer senilen und postmenopausalen Osteoporose beim Menschen [Bryère et al 2007]. Häufig tritt beim älteren Menschen neben dem physiologischen Abfall der Sexualhormone zusätzlich durch Mangel an Sonnenlicht eine Hypovitaminose D auf [Hyppönen 2007 et al.]. Der Vitamin D Mangel bewirkt eine schwächere Resorption von Kalzium in Darm und Nieren und wird häufig noch zusätzlich durch eine falsche Ernährung verstärkt, sodass ältere Menschen häufig durch einen sekundären Hyperparathyreoidismus auffallen [Nordin 1997]. Um sich also dem Bild der humanen Osteoporose anzunähern, ist die defizitäre Diät bei der Ratte kein Kompromiss, sondern eine sinnvolle Ergänzung.

4.2 Sicherung des osteoporotischen Knochenstatus durch DXA

DXA als radiologisch-diagnostische Methode zum in vivo Monitoring und Sicherung des osteoporotischen Knochenstatus

Nicht ohne Grund hat die WHO die Osteodensitometrie mittels DXA als Goldstandard für die Diagnose der Osteoporose festgelegt. Als preiswerte und ubiquitär verfügbare

Methode mit geringer Strahlenbelastung kann schnell *in vivo* eine Aussage über Knochenstatus und -dichte gemacht werden. Schon seit geraumer Zeit gibt es große Datenbanken mit repräsentativen Stichproben, mit der die ermittelten Knochenparameter des Patienten verglichen werden. Entscheidend hierbei ist, wie viele Standardabweichungen die Knochendichte des Patienten von der Stichprobe abweicht. Diese Abweichungen werden als T- und Z-Werte formuliert, wobei der T-Wert die Standardabweichung im Vergleich zu jungen gesunden Frauen darstellt und der Z-Wert die Standardabweichung zur gleichen Altersgruppe misst. 1994 definierte die WHO, dass bei einem T-Wert kleiner als -2,5 die Diagnose Osteoporose gestellt wird.

Dual Energy X-ray absorptiometry (DXA): Möglichkeiten und Grenzen

DXA ist ein röntgendiagnostisches Verfahren bei dem zwei Röntgenstrahlen unterschiedlicher Energie durch das zu untersuchende Gewebe gebracht werden und anschließend von einem Detektor erfasst werden. Röntgenstrahlen werden je nach Härte (Energie) unterschiedlich vom Gewebe resorbiert, sodass je nach Gewebe eine individuelle Restmenge der jeweiligen Röntgenstrahlung vom Detektor erfasst wird. Mit entsprechender Software und Rechenleistung kann nun eine Aussage über die Beschaffenheit und Dichte der Gewebe gemacht werden. Dabei wird wie bei einem Standardröntgenbild ein zweidimensionales Bild erzeugt und die verschiedene Intensität der Grautöne spiegelt die Dichte der Gewebe wider. Des Weiteren kann durch die Verwendung zweier Röntgenstrahlen verschiedener Härte zwischen einem Weichteilfenster und einem Hartgewebefenster differenziert werden. Die Strahlenbelastung ist dabei mit ungefähr 5–7 μSv sehr gering. Messorte sind entweder der gesamte Körper oder die Regionen von großer klinischer Relevanz, wie das proximale Femur oder die Wirbelsäule. Der Ganzkörperscan ermöglicht zudem Aussagen über die Fett-, Muskel- und Knochenmasse und wird deswegen auch bei ernährungsmedizinischen Fragestellungen genutzt. Die Knochendichtemessung bestimmter Regionen hat den Vorteil einer höheren Auflösung, sodass auch im Rahmen der Möglichkeiten von DXA zwischen kortikalen und spongiösen Knochen differenziert werden kann. Ergebnis einer Messung speziell bei der Diagnostik der Osteoporose ist die Bone Mineral Density (BMD) mit der Einheit g/cm^2 (Flächendichte), die anschließend zum Mittelwert einer Stichprobe gesunder prämenopausaler Frauen in statistischen Bezug gesetzt wird. Liegt der ermittelte BMD-Wert 2,5 Standardabweichungen unterhalb dieses Mittelwertes, spricht man definitionsgemäß von einer Osteoporose.

Maximale Knochendichte/ -masse und deren Regulation von Auf- und Abbau

Die Osteoporose ist als Erkrankung gekennzeichnet durch eine qualitative Verschlechterung der Trabekel in ihrer Architektur sowie durch eine quantitative Verminderung der Knochenmasse. Letztere kann ermittelt werden durch DXA und definiert die Osteoporose als Abfall der Knochendichte um 2,5 Standardabweichungen unter dem statistischen Mittelwert gesunder prämenopausaler Frauen [Kanis: WHO 1994]. Die Regulation von Auf- und Abbau von Knochenmasse steht unter vielen intrinsischen und extrinsischen Beeinflussungsfaktoren. Besonders entscheidend ist die in der Adoleszenz erreichte „peak bone mass“, also die im Wachstum erreichte maximale Knochenmasse. Der Mensch erreicht die maximale Knochendichte in einem Alter von ca. 25-30 Jahren, die Ratte nach 6-9 Monaten. Dies entspricht auf die jeweilige Lebenserwartung bezogen einen in etwa gleichen Lebenszeitpunkt. Danach schließt sich bei beiden Geschlechtern ein zunächst physiologischer Verlust der Knochenmasse im Bereich von ungefähr 1% jährlich an. Unterschreitet die Knochenmasse einen kritischen Punkt, die sog. Frakturschwelle, wird die Osteoporose klinisch manifest. Demnach ist eine in jungen Jahren erreichte hohe maximale Knochendichte von entscheidender Bedeutung, um das Risiko einer osteoporosebedingten Fraktur im Alter zu verringern. Nach Erreichen der Menopause ist jedoch bei Frauen, hervorgerufen durch den Abfall des Östrogenspiegels, ein deutlich höherer Verlust von Knochenmasse mit 4% jährlich zu beobachten, so dass gerade postmenopausale Frauen besonders häufig von osteoporosebedingten Frakturen betroffen sind. Deshalb ist es für beide Geschlechter von essentieller Bedeutung, in jungen Jahren eine ausreichende maximale Knochendichte zu erreichen, und diese zu erhalten. Neben genetischen Faktoren spielen auch beeinflussbare Faktoren wie Bewegung und Ernährung eine entscheidende Rolle, wobei Zwillingsstudien [Dequeker 1987] darauf hinweisen, dass Umweltfaktoren den größeren Einfluss auf die Knochendichte haben [Duque 2011; Bartl 2011].

Herausforderungen bei der Osteodensitometrie mittels DXA im Kleintier

Während sich beim Menschen DXA als preiswertes und schnell verfügbares Verfahren zum Goldstandard zur Diagnose von Osteoporose entwickelt hat, birgt die DXA Messung im Kleintier, bedingt durch die kleine Körpergröße der Versuchstiere, neue Herausforderungen. Yamauchi et al. zeigte 1997, dass DXA im Kleintier Ratte eine wertvolle Methode darstellt, den Knochenstatus *in vivo* zu messen. Um trotz der Körpergröße eine ausreichende Auflösung zu garantieren, sollten die verwendeten DXA-Geräte einen Kleintiermodus aufweisen. Die Vorteile des Kleintier DXA's sind eine

schnelle Messung in ca. 3-4 Minuten, die *in vivo* durchgeführt werden kann, sodass keine Euthanasie notwendig ist und die Versuchstiere über einen längeren Zeitraum mehrmals gemessen werden können. Da das Versuchstier während der Messung immobilisiert sein muss, ist eine Sedierung erforderlich, die aber insgesamt wenig Stress für das Tier bedeutet. Ein Nachteil von DXA ist, dass die ermittelten Bilder zweidimensional bleiben und trotz des Kleintiermodus die Auflösung nicht hoch genug ist, um zwischen kortikalem und spongiossem Knochen im Kleintier zu unterscheiden. Ein weiterer Nachteil ist, dass bisher für die Ratte keine ausreichend große Stichprobe vorhanden ist, um einen T-Score zu generieren. Als Ausblick für die Zukunft wäre dieses aber ein zu lösendes Problem, wenn beispielsweise alle weltweit getätigten Messungen von Kontrolltieren in einer Datenbank gesammelt und ausgewertet werden würden. Eine solche Datenbank hätte großen Mehrwert für die Etablierung und Qualitätssicherung eines DXA gestützten Kleintiermodells für die Osteoporoseforschung. Zudem könnten theoretisch auch in einigen Bereichen Kontrollgruppen nicht mehr notwendig sein, sodass Tiere verschont und Kosten gespart werden könnten.

Vergleich von DXA mit anderen röntgendiagnostischen Verfahren: pQCT und μ CT

Periphere quantitative Computertomographie (pQCT) und Mikro-CT (μ CT) arbeiten nach einem ähnlichen Prinzip: Röntgenstrahlen werden aus verschiedenen Winkeln durch das Gewebe gebracht und so abgeschwächt sowie von einem Detektor erfasst und anschließend von einem Computer in ein dreidimensionales Bild umgewandelt. Das pQCT kann *in vivo* angewendet werden, erlaubt aber durch die niedrige Auflösung nur schlecht eine Aussage über den trabekulären Knochen, zeigt dafür aber niedrigere Strahlenbelastung als das μ CT. Das μ CT kann *ex vivo* und *in vivo* angewendet werden, wobei die Auflösung der dreidimensionalen Pixel (Voxel) *ex vivo* höher ist als *in vivo*. Nichtsdestotrotz ist die Auflösung des *in vivo* Scans hoch genug, um bei der Analyse zwischen kortikalem und spongiossem Knochen zu unterscheiden. Nachteil dieser relativ neuen Methode ist die hohe Strahlenbelastung, die bei häufigen *in vivo* Messungen zu Gewebsveränderungen führen könnte. Wie gravierend die Auswirkungen sind, ist Bestandteil der aktuellen Forschung [Duque 2011].

4.3 Sicherung des osteoporotischen postmenopausalen Knochenstatus im Kleintiermodell der Ratte durch DXA

Das röntgendiagnostische Verfahren DXA hat sich in Klinik und Praxis als Goldstandard durchgesetzt und vermag *in vivo* die Knochendichte mit niedriger Strahlenbelastung zu ermitteln. Mit der Entwicklung von DXA-Geräten, die auch beim Kleintier eine genügend hohe Auflösung generieren, bietet sich die Möglichkeit, speziell bei der Ratte ein osteoporotisches Tierversuchsmodell zu etablieren.

Homogene Ausgangssituation als Grundlage für eine belastbare Verlaufsanalyse der Knochendichteparameter

Ein qualitativ hochwertiges und belastbares Tierversuchsmodell muss darlegen, dass es zum Startzeitpunkt vor jeglicher Intervention keinerlei Unterschiede bezüglich der Knochendichteparameter zwischen den einzelnen Versuchsgruppen gibt. Um die Qualität des hier verwendeten Tierversuchsmodells zu unterstreichen, soll zunächst ein Blick auf die initialen Knochendichteparameter geworfen werden. Zum Startzeitpunkt *prä interventionem* lag der Ausgangswertes des BMD-Wertes in allen beobachteten ROI gleich. Die Mediane der jeweiligen Gruppen liegen dicht beieinander und es finden sich keine signifikanten Unterschiede. Die Messung zum Startzeitpunkt soll eine gleiche Ausgangsposition garantieren und mögliche Verfälschungen und deren Auswirkungen auf die späteren Messergebnisse aufdecken. Zudem liegt eine Normalverteilung mit niedriger Streuung der Messergebnisse vor. Diese homogene Ausgangssituation wurde durch strikte Randomisierung und gleiche Umweltbedingungen bei der Aufzucht der Ratten erreicht und ermöglicht so den Grundstein für eine valide und belastbare Verlaufsanalyse der Knochendichteparameter.

Osteodensitometrisch gesicherter und zur humanen postmenopausalen Osteoporose äquivalenter Knochenstatus im Kleintiermodell der Ratte

Ein Tierversuchsmodell, welches versucht, der humanen postmenopausalen Osteoporose gerecht zu werden, sollte nicht nur quantitativ eine niedrige Knochendichte aufzeigen, sondern auch in Dynamik und Lokalisation des Knochendichteverlustes mit der humanen Situation bei einer Osteoporose übereinstimmen. Als Referenz soll an dieser Stelle die Untersuchung der WHO von 2003 gewählt werden, bei der die Inzidenz von Frakturen in postmenopausalen Frauen untersucht wurde. Optimal wäre eine

quantitative und chronologische Analogie des Knochendichteverlustes im Tiermodell zur Frakturinzidenz der postmenopausalen Frauen.

In der ovariectomierten Diätgruppe fällt der BMD-Wert nach einem Monat signifikant ($p > 0,001$) in allen beobachteten ROI ab. Prozentual am deutlichsten ist der Verlust in der Wirbelsäule mit 14%. Hier scheinen Diät und Ovariectomie die hauptsächlich aus trabekulären Knochen bestehende Wirbelsäule besonders zu betreffen. Interessanterweise deckt sich diese Auffälligkeit mit Beobachtungen der WHO 2003 beim Menschen (Abbildung 11), bei der bei Frauen in der frühen Phase der postmenopausalen Osteoporose besonders häufig Wirbelkörperfrakturen auftreten [WHO Technical Report Series 921 von 2003]. Am geringsten ist der prozentuale Verlust bezogen auf den ROI „gesamter Körper“. Bei der Ganzkörpermessung wird die Mehrheit der gemessenen Knochenmasse durch den kortikalen Knochen bedingt, dessen Mineralgehalt im kompletten Skelett größer ist als der des trabekulären Knochens. Analog zur postmenopausalen Osteoporose scheint das in dieser Arbeit verwendete Tierversuchsmodell mit einer Kombination aus Ovariectomie und Diät zunächst den trabekulären Knochen zu betreffen.

Nach 3 Monaten *post interventionem* ist in allen gemessenen ROI ein ähnlicher BMD-Wert gemessen worden. Das Rattenskelett in der Diätgruppe zeigt eine Stabilisierung auf osteopenem Niveau und deckt sich so mit den Feststellungen Egermanns et al. 2005. Die Unterschiede zur Sham-Gruppe bleiben signifikant ($p > 0,001$).

Erst nach 12 Monaten ist ein erneutes Absinken des BMD-Wertes zu beobachten. Allerdings ist dieser Verlust nicht in allen ROI gleich. Besonders die Femora verlieren deutlich an Knochendichte und zeigen zu diesem Zeitpunkt den größten prozentualen Verlust bezogen auf den Ausgangswert 0 Monate. Auch hier deckt sich diese Beobachtung mit den Analysen der WHO von 2003 und Beobachtungen von Riggs et al. von 1995 und Cummings et al. von 2002, bei der zu späteren Zeitpunkten ein deutlicher Anstieg der proximalen Femurfrakturen ermittelt wurde. Ebenfalls wurde auch ein deutlicher Verlust von Knochendichte im ROI „gesamter Körper“ gemessen, sodass formuliert werden kann, dass Ovariectomie und Diät bei der Ratte nach 12 Monaten auch zu einem deutlichen Verlust von Knochendichte im kortikalen Knochen führen.

Zum Endzeitpunkt 14 Monate *post interventionem* schreitet der Verlust von Knochendichte in allen ROI weiter voran, im Vergleich zu den Zeitpunkten 3 und 12 Monate aber etwas schneller. Klinisch zeigten die Tiere im Vergleich zur Sham-Gruppe Bewegungsarmut und Apathie, sodass von erneuten Messungen zu späteren Zeitpunkten aus ethischen Gesichtspunkten Abstand genommen wurde. Die DXA-Messungen zu dem Zeitpunkt 14 Monate zeigten bei einigen Tieren deutliche Skoliosen

mit vorwiegend kyphotisch versteiften Brust- und Lendenwirbelsäulen, sodass diese teilweise nicht gerade liegend gemessen werden konnten. Die durchgeführte Intervention scheint auch die Tiere in ihrer tatsächlichen Lebensweise zu beeinflussen und sie zeigen ein ähnliches Erscheinungsbild, wie an Osteoporose erkrankte Menschen, die durch Knochenschmerzen und durch bereits aufgetretene schmerzhaftes Wirbelkörperfrakturen ebenfalls häufig einen verständlichen Unwillen zur Bewegung aufzeigen.

Zusammenfassend lässt sich formulieren, dass das Tiermodell eine quantitative und dynamische Analogie des Knochendichteverlustes zur humanen postmenopausalen Osteoporose zeigt. Eine Kombination aus defizitärer Diät und Ovariectomie führt nach dem durchgeführten bereits genannten Protokoll zu einem deutlichen Verlust von Knochendichte. Dabei zeigt sich der Verlust zunächst am deutlichsten in der vorwiegend aus trabekulären Knochen bestehenden Wirbelsäule und zum Endzeitpunkt der Messung am größten in den Femora. Die Ergebnisse zeigen dabei eine deutliche Analogie zu den Beobachtungen der WHO bezüglich der Frakturinzidenz bei Frauen nach der Menopause, wo zunächst Wirbelkörperfrakturen und später proximale Femurfrakturen auftraten. Darüber hinaus waren die Versuchstiere in ihrer Lebensweise im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich beeinflusst. Das Tiermodell zeigt eine quantitative und dynamische Analogie des Knochendichteverlustes zur humanen postmenopausalen Osteoporose.

Senile Osteopenie im Kleintiermodell der Ratte gesichert durch DXA

Als Kontrolle zur Diät-Gruppe erhielt die Sham-Gruppe eine Sham-Operation nach ähnlicher Vorgehensweise wie bei der Ovariectomie, um Stress und Belastung für beide Gruppen gleich zu halten. Dennoch stieg die Knochendichte in allen gemessenen ROI einen Monat *post interventionem* signifikant an ($p=0,029$). Der beobachtete Anstieg setzte sich nahezu linear bis zum Zeitpunkt 12 Monate fort. Nach 12 Monaten erreichte die Sham-Gruppe ihre „peak bone mass“ mit dem Zeitpunkt der maximalen Knochendichte und zeigt keine Abweichungen bezüglich dieses Zeitpunktes zur Literatur [Duque 2011]. Die ROI stiegen im Vergleich untereinander gleichmäßig an. Nach weiteren zwei Monaten sanken die Mediane der gemessenen BMD-Werte in allen ROI etwas ab, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant ($p=0,201$). Dennoch beschreibt diese Beobachtung den Beginn einer senilen Osteopenie, bei der durch den physiologischen Alterungsprozess die Knochendichte im Laufe der Zeit abnimmt. Extrapoliert man die Abnahme der Knochendichte, würde allerdings die dafür benötigte

Zeit bis zum Auftreten eines tatsächlich osteoporotischen Knochenstatus die Lebenserwartung der Ratte übertreffen.

BMC als Marker für das Knochenwachstum im Tierversuchsmodell

Der BMC (Bone Mineral Content) dient als wichtiger Marker für das Knochenwachstum, da er im Gegensatz zum BMD keine Flächendichte darstellt, sondern den absoluten Mineralgehalt des Skelettes. Damit ist er aber abhängig von Körpergröße und Körpergewicht, stellt aber dennoch einen wertvollen Parameter zur Beurteilung des Knochenstatus dar [Glastre et al. 1990]. Da hier besonders das ganze Skelett von Interesse ist und sich zudem in den durchgeführten Analysen alle gemessenen ROIs analog verhielten, sollen nur die Ergebnisse des ROIs „gesamter Körper“ dargestellt und diskutiert werden.

Zu Beginn starten alle Gruppen homogen ohne signifikante Unterschiede. Analog zum BMD ist in der Sham-Gruppe ein nahezu linearer Anstieg des BMC zu beobachten, mit dem Unterschied, dass beim Vergleich des Endzeitpunktes, der Median beim BMC nicht signifikant ansteigt, hingegen jedoch der BMD-Wert abnimmt. Dies ist damit zu erklären, dass bei Ratten die Wachstumsfugen nicht schließen und diese ein lebenslanges Wachstum zeigen [Levolas 2008]. Bei der Diät-Gruppe zeigt sich der BMC-Wert bis zum Zeitpunkt 3 Monate homogen ohne signifikante Unterschiede der Zeitpunkte untereinander, aber in Bezug zum steigenden Körpergewicht können die Ratten lediglich den Mineralgehalt konstant halten, sodass sich, wie der BMD-Wert zeigt, die Mineralmasse auf ein größeres Skelett verteilt. Erst zu den späteren Zeitpunkten sinken die Mediane und zeigen den größten signifikanten Unterschied zur Sham-Gruppe. Ursächlich dafür ist wohlmöglich der schon länger bestehende Vitamin D Mangel in Kombination mit einer Hypokalzämie, der bei den Ratten einen sekundären Hyperparathyreoidismus hervorgerufen hat, mit dem Versuch, die plasmatische Kalziumhomöostase auf Kosten des Knochens instand zu halten [Nordin 1997]. Zur Verdeutlichung des Unterschiedes fällt bei der Betrachtung der jeweils erreichten Mediane auf, dass der Median der Diät-Gruppe nur die Hälfte des Medians der Sham-Gruppe erreicht.

4.4 Qualitätssicherung des densitometrisch gesicherten Tiermodells durch deskriptive Lichtmikroskopie

Die Osteodensitometrie mittels DXA ist ein wichtiger Blickwinkel, aus dem ein Knochenstatus begutachtet werden muss, doch ersetzt sie gerade in der Forschung

nicht klassische Methoden wie die Lichtmikroskopie, da hier Strukturen bis auf zelluläre Ebene verfolgt werden können und durch spezielle Färbungen genaue Gewebsanalysen möglich sind. Zur weiteren Qualitätssicherung wurde deshalb in dieser Arbeit eine lichtmikroskopische deskriptive Analyse der gleichen Versuchstiere *ex vivo* anhand von HE gefärbten Schnitten durchgeführt. Untersucht wurden das Femur und der dritte Lendenwirbelkörper.

„Osteoporomalazie“ durch Kombination einer Ovariectomie und defizitären Diät bei der Ratte

Hypovitaminose D und Kalziummangel haben, wie viele Studien zeigen konnten, sehr häufig drastische Auswirkungen auf den Knochenstatus beim Menschen [Nordin 1997; Lips et al. 2001; Bryère et al. 2007]. Es liegt deswegen auf der Hand, bei dem Versuch eine möglichst äquivalente Situation in der Ratte zu induzieren, zusätzlich zur Ovariectomie eine defizitäre Diät in Kombination einzusetzen. Besonderes Augenmerk soll bei der folgenden deskriptiven Histologie auf die Kompakta, Trabekelfläche sowie das Knochenmark gelegt werden.

Nach einer Standzeit von drei Monaten zeigt sich im Vergleich zur Sham-Gruppe sowohl im Femur als auch in der Wirbelsäule eine Rarefizierung der Trabekel, allerdings mit der Besonderheit, dass die verbliebenen Trabekel verdickt sind. Die Sham-Gruppe zeigt auch insgesamt ein deutlich feineres und quervernetzteres Trabekelwerk. Die kompensatorische Verdickung der Trabekel erscheint kontraintuitiv, da in der Literatur zusätzlich zur Rarefizierung auch von einer Ausdünnung gesprochen wird [Morris et al. 1992; Laib et al. 2000; Yang et al. 2003]. Zu beachten ist, dass die vorliegenden Paraffinschnitte demineralisiert sind und dementsprechend keine Aussage über den Mineralisationsgrad der Knochenmatrix gemacht werden kann. Dennoch kann lichtmikroskopisch von dem typischen Erscheinungsbild einer Osteoporose gesprochen werden.

Nach einer Standzeit von 12 und 14 Monaten aggravierten die bereits beobachteten Veränderungen weiter. Dazu sind vermehrt Adipozyten im Knochenmark zu finden. Im Femur zeigen sich die Trabekel kompensatorisch derart verdickt, dass kaum noch ein trabekuläres Netzwerk auszumachen ist. Histologisch passt diese Erscheinung zu dem Bild einer Osteomalazie mit dicken Trabekeln und einer nur unvollständig mineralisierten Knochengrundsubstanz. Zur weiteren Differenzierung können H.E. gefärbte und entmineralisierte Paraffinschnitte keine ausreichende Erkenntnis bringen, sodass El Khassawna et al. 2013 weiterführende Untersuchungen mit der Anfertigung von „von

Kossa“ gefärbten Versilberungen durchführte. Bei der von Kossa Färbung wird die mineralisierte Knochengrundsubstanz schwarz angefärbt, während sich unmineralisiertes Osteoid magenta darstellt. Als Ergebnis zeigten die von Kossa gefärbten Präparate eine unvollständig mineralisierte Knochengrundsubstanz nach 12 und 14 Monaten Standzeit [El Khassawna et al. 2013]. Diese Untersuchung deckt sich mit Ergebnissen von Zhang 2009 und Govindarajan 2014, wo ovariectomisierte und mit einer defizitären Diät behandelte Ratten eine vermehrte Kollagen I Synthese aufzeigten.

Durch die defizitäre Diät litten die Ratten der Diät-Gruppe unter einem Kalzium- und Vitamin D Mangel und entwickelten eine Osteomalazie mit einem sekundären Hyperparathyreoidismus. Kritisch betrachtet könnte nun angeführt werden, dass dieses Erscheinungsbild, bestehend aus einer Mischkomponente aus Osteoporose und Osteomalazie, dem humanen Phänotyp der Osteoporose nicht gerecht wird. Doch wie Untersuchungen von Lips et al. 2001 gezeigt haben, gibt es eindeutige Evidenz dafür, dass der alternde Mensch sehr häufig an einem Vitamin D Mangel in Kombination mit einem sekundären Hyperparathyreoidismus leidet, sodass insgesamt von einer sinnvollen Annäherung an den humanen Phänotyp gesprochen werden kann [Lips et al. 2001]. Der ausgeprägte osteomalatische Effekt der defizitären Diät könnte mit dem frühen Beginn der diätetischen Intervention erklärt werden. Zu Beginn der Intervention waren die Versuchstiere 14 Wochen alt und somit deutlich vor ihrer „peak bone mass“, welche ungefähr in einem Alter von 6 - 9 Monaten erreicht wird. Diesem Kritikpunkt kann allerdings entgegengehalten werden, dass auch im jugendlichen Alter und sogar bei Kindern eine Hypovitaminose D häufig ist, wie Untersuchungen von Ghada El-Hajj Fuleihan et al. 2001, Rovner et al. 2008 und Mithal et al. 2009 zeigten. Hinzu kommt, dass der klinische Goldstandard DXA zwischen einer Osteoporose, Osteomalazie oder einer Mischform nicht unterscheiden kann, da strikt die Mineraleichte des Knochens gemessen wird und so keinerlei Aussage über den Mineralisationsgrad der Knochenmatrix gemacht werden kann. Des Weiteren sind diagnostische Biopsien mit Hilfe von Knochenstanzen gerade bei der primären Osteoporose eher eine Seltenheit, sodass es denkbar ist, dass eine gewisse Anzahl von Patienten mit der Diagnose Osteoporose eigentlich von einer Mischform von Osteomalazie und Osteoporose („Osteoporomalazie“) betroffen sind.

4.5 Evaluierung der H.E. Färbungen durch histomorphometrische Analysen der Trabekelfläche

Die deskriptive Histologie hat bereits Veränderungen im Knochenstatus aufgegriffen, die durch die Histomorphometrie genauer analysiert und statistisch ausgewertet wurden. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf den Vergleich der prozentualen Trabekelfläche innerhalb der verschiedenen Gruppen gelegt.

„Peak bone mass“ und Beginn einer senilen Osteopenie in der Kontrollgruppe

Bei der Kontroll-Gruppe handelt es sich um juvenile Tiere mit einem Alter von 10 Wochen, die also noch nicht ihren Zeitpunkt der maximalen Knochendichte erreicht haben („peak bone mass“). Nach drei Monaten Standzeit steigt der prozentuale Anteil der Trabekelfläche in der Sham-Gruppe signifikant an. Dies deckt sich mit Erkenntnissen aus der Literatur nach der Ratten nach ca. 6-9 Monaten ihre „peak bone mass“ erreichen, sodass dieser Anstieg als regelrecht zu bewerten ist [Egermann et al. 2005].

Nach einer Standzeit von 12 Monaten fällt der prozentuale Anteil der Trabekelfläche in der Sham-Gruppe wieder ab. Nach dieser Zeit setzt auch in der Ratte der physiologische Alterungsprozess mit dem einhergehenden Verlust an Knochenmasse und Ausdünnung des Trabekelwerkes ein. Die DXA Analysen zeigen jedoch hier keinen Abfall der Knochenmasse. Diese Besonderheit beobachtet ebenfalls Pietschmann et al. 2007 bei der Untersuchung von senilen Sprague Dawley Ratten mit Hilfe eines pQCTs. Dadurch, dass bei Ratten und anderen Nagetieren intrakortikales Remodeling fehlt, kommt es zu einem altersbedingten Abfall der Trabekelfläche, während der kortikale Knochen, wie Pietschmann darlegt, keinen Verlust an Zirkumferenz und Stärke verzeichnet. Betrachtet man zusätzlich die Tatsache, dass die Hauptmasse des Knochens die Kortikalis ausmacht und DXA als zweidimensionales Verfahren hier zwischen Trabekeln und Kortikalis nicht unterscheiden kann, ist es ersichtlich, dass diese Veränderungen nicht detektiert werden können. Der Abfall der Trabekelfläche ist allerdings vergleichsweise gering ausgeprägt und zeigt sich zum Zeitpunkt 14 Monaten hinsichtlich des prozentualen Anteils der Trabekelfläche sogar konstant, sodass bis zum Erreichen eines voll ausgeprägten histologischen Erscheinungsbildes einer Osteoporose die Lebenserwartung der Ratte überschritten wird.

Osteoporose und Osteoporomalazie durch Ovariectomie in Kombination mit defizitärer Diät der Ratte durch Histomorphometrie quantifiziert

Die Diät-Gruppe zeigt nach drei Monaten im Vergleich zur Kontrollgruppe in beiden ROIs einen signifikant niedrigeren Anteil an Trabekelfläche. Diese Beobachtung deckt sich mit der deskriptiven Histologie und den zusätzlich durchgeführten „von Kossa“ Färbungen, bei denen nach dieser Zeit noch keine osteomalatischen Veränderungen nachgewiesen werden können und sich die Knochengrundsubstanz noch vollständig mineralisiert zeigt. Diese Beobachtung entspricht der gängigen Ansicht eines osteoporotischen Knochenstatus mit Rarefizierung und Ausdünnung der Trabekel.

In der Diät-Gruppe steigt nach einer Standzeit von 12 Monaten der prozentuale Anteil der Trabekelfläche in beiden ROIs signifikant an. Wie bereits erwähnt, zeigen sich in der deskriptiven Histologie die Trabekel mit einer deutlichen kompensatorischen Verdickung osteomalatisch verändert. Eine mögliche Erklärung ist, dass eine Reaktion des Organismus auf den Kalzium- und Vitamin D Mangel durch die defizitäre Diät stattgefunden hat, die eine Osteoblastenstimulation zur Synthese von extrazellulärer Matrix zur Folge hat. Durch den Mangel an Kalzium kann diese letztendlich nicht mineralisiert werden und erscheint in den H.E.-Schnitten als deutlich verdickt. Da der alternde Mensch häufig Mischformen einer Osteoporose, Osteomalazie und sekundären Hyperparathyreoidismus aufweist, kommt auch dieses Erscheinungsbild der humanen Situation nahe [Hyppönen et al. 2007, Bartl et al. 2011].

Nach einer Standzeit von 14 Monaten nimmt die Trabekelfläche innerhalb der Diät-Gruppe im proximalen Femur nicht signifikant ab ($p=1,00$), zeigt aber zum Endzeitpunkt immer noch mehr Trabekelfläche als die Sham-Gruppe. Im Lendenwirbelkörper jedoch beobachtet man nach einer Standzeit von 14 Monaten in der Diät-Gruppe schon in der deskriptiven Histologie eine derartig starke zentrale Rarefizierung der Trabekel im Wirbelkörper, dass nur noch vereinzelte verdickte Trabekel kortikal zu finden sind. Zentral ist der Lendenwirbelkörper nahezu komplett trabekulär ausgehöhlt. Insgesamt zeigt hier die Diät-Gruppe eine niedrigere Trabekelfläche als die Sham-Gruppe und verliert signifikant zum vorigen Messzeitpunkt. Besonders wenn man die Beobachtungen aus beiden Methodiken zusammenfügt, wird klar, dass einige wenige, wohlgermerkt dickere, Trabekel die gesamte intrakortikale Kraftübertragung leisten. Treten bei einem solchen Knochenstatus trabekuläre Mikrofrakturen auf, ist ein statischer Kollaps des Wirbelkörpers, wie er auch beim Menschen zu beobachten ist, wahrscheinlich.

4.6 Induktion einer Osteopenie durch eine Kombination aus Ovariectomie und einer Applikation von Dexamethason in der Ratte

Kortikosteroide verändern den Knochenmetabolismus in dem Sinne, dass sie in erster Linie den Knochenaufbau bei nahezu gleichbleibenden Knochenabbau hemmen und so beim Menschen bei Langzeitbehandlungen einen osteoporotischen Knochenstatus erzeugen. Die Behandlung mit Kortikosteroiden allein bewirkt bei der Ratte keinen nennenswerten Verlust an Knochendichte, sondern muss mit einer defizitären Diät oder Ovariectomie kombiniert werden [Egermann et al. 2005]. Die Kombination aus Ovariectomie und Kortikosteroiden kommt laut Egermann et al. sogar beim Schaf dem osteoporotischen Knochenstatus des Menschen am nächsten, allerdings haben Kortikosteroide ein breit gefächertes Wirkungsspektrum und bringen neben einer Immunsuppression und verminderter Kalziumaufnahme noch weitere Stoffwechselveränderungen mit sich. Um bei der Ratte eine Osteoporose durch Kortikosteroide zu induzieren, muss neben dem geeigneten Steroid auch die passende Dosis gewichtsadaptiert sowie die Art und Weise (parenteral oder enteral) sowie Häufigkeit der Applikation beachtet werden.

Unzureichender Effekt einer Ovariectomie in Kombination mit einer Applikation von Dexamethason auf die Knochendichte in der Ratte

Die Auswirkung einer Kombination aus Ovariectomie und einer Applikation von Dexamethason auf die Knochendichte sollte für einen Zeitraum von drei Monaten untersucht werden. Nach einem Monat *post interventionem* steigt der Median der gemessenen BMD-Werte etwas an. Allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant. Die Messung nach weiteren zwei Monaten zeigt einen ähnlichen Wert im Vergleich zu dem Messzeitpunkt nach einem Monat. Alle drei gemessenen ROI verhalten sich gleich und zeigen im Vergleich zur Sham-Gruppe signifikant niedrigere BMD-Werte. Bei der Gegenüberstellung zur Diät-Gruppe zeigen sich die BMD-Werte nach einem und drei Monaten signifikant höher, sodass der Effekt des Dexamethasons auf die Knochendichte nicht ganz den Effekt einer defizitären Diät zu haben scheint. Kritisch betrachtet hat das gewählte Glukokortikoid in der durchgeführten Applikation bei der Ratte nicht die Auswirkungen wie beim Menschen, dessen Knochen deutlich empfindlicher reagieren. Als Ausblick auf die Zukunft und als Vorbereitung für weitere Untersuchungen wurde ein Pilot-Projekt von drei Tieren durchgeführt, die ebenfalls nach dem gleichen Protokoll mit der Besonderheit behandelt wurden, dass anstatt des Dexamethasons das

Glukokortikoid Prednisolon appliziert wurde. Aber auch hier zeigen erste Untersuchungen nicht den gewünschten Effekt auf die Knochendichte.

Rarefizierung der Trabekel und Verfettung des Knochenmarkes analysiert durch klassische deskriptive Lichtmikroskopie und Histomorphometrie

In der Steroid-Gruppe nach einer Standzeit von drei Monaten fallen im Vergleich zur Sham-Gruppe dünne und rarefizierte Trabekel auf. Die Rarefizierung ist zentral im Knochen am ausgeprägtesten mit einer zusätzlichen Abnahme der Quervernetzungen und zeigt so ebenfalls wie bei der Diät-Gruppe das typische Erscheinungsbild einer Osteoporose. Rauch et al. 2010 konnten die Ursache der Rarefizierung und Ausdünnung in der Hemmung des Transkriptionsfaktor AP-1 in Osteoblasten finden. AP-1 induziert die Bildung von Interleukin 11, welches die Osteoblastenausdifferenzierung steuert. Wird AP-1 durch Kortikosteroide herunterreguliert, ist das Resultat eine insuffiziente Funktion der Osteoblasten mit gestörter Osteogenese [Rauch et al. 2010].

Darüber hinaus erkennt man schon in der Übersicht eine deutlich sichtbare Verfettung des Knochenmarkes. Der Markraum erscheint durch die leeren Fettvakuolen hell und die Adipozyten haben die restlichen zellulären Bestandteile des Knochenmarkes verdrängt. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass sich die Steroidapplikation auf den Fettstoffwechsel der Ratte auswirkt und eine Hyperlipidämie bewirkt mit der Konsequenz einer vermehrten Adipogenese auch im Knochenmark. Diese Beobachtungen decken sich mit der Erkenntnis von Cui et al. 1997. Cui et al. behandelten pluripotente, aus Knochenmark gewonnene Stammzellen mit Dexamethason und konnte dort ebenfalls eine Adipogenese nachweisen. Die Differenzierung der Stammzellen zu Adipozyten ging zu Lasten der Osteoblastendifferenzierung, sodass neben der primär knochenschädigenden Wirkung durch Hemmung der Osteoblastendifferenzierung auch von einer sekundären Schädigung durch Verdrängung der Osteoblasten ausgegangen werden muss [Cui et al. 1997]. Die Verfettung des Knochenmarkes tritt beim Menschen klinisch durch das Auftreten von aufwändig therapierbaren Osteonekrosen in Erscheinung und ist demnach nicht eine reine histologische Besonderheit ohne klinische Relevanz.

In der Histomorphometrie zeigt die Steroid-Gruppe nach 3 Monaten signifikant die niedrigste Trabekelfläche, obwohl in der Osteodensitometrie hier nicht die niedrigste Knochendichte detektiert wird. Die Knochenmatrix scheint hier durch die fehlende defizitäre Diät vollständig mineralisiert und eine osteomalatische Komponente ist nicht anzutreffen. Dadurch, dass Osteoporose definiert durch die WHO eine

osteodensitometrische Diagnose ist, wurde der Effekt von Dexamethason über 3 Monate hinausgehend nicht mehr untersucht. Abschließend soll an dieser Stelle formuliert werden, dass Glukokortikoide als Intervention ergänzend zu einer defizitären Diät und Ovariectomie dennoch sinnvoll zu sein scheinen.

4.7 Ausblick

Die stetig wachsende Anzahl der an Osteoporose erkrankten Patienten mit ihren komplexen und schlecht heilenden Frakturen stellt die heutige Medizin vor die anspruchsvolle Aufgabe, auch diese Frakturen suffizient zu versorgen, und damit dem Patienten Mobilität und Lebensqualität zu erhalten. Essenziell zur Bewältigung dieser Herausforderung sind belastbare, gesicherte und verlässlich reproduzierbare Tierversuchsmodelle. Der Knochen stellt ein strukturell außerordentlich komplexes Konstrukt dar mit mannigfaltiger Regulation und Reaktion auf endogene sowie exogene Reize, dass zurzeit *in vitro* Zellkulturen ohne Tierversuche allenfalls ergänzend sinnvoll erscheinen.

Wie die FDA bereits darlegte, kann kein einzelnes Tierversuchsmodell die vollständige Charakteristik einer humanen Osteoporose abbilden. Die Erfahrungen, Ergebnisse und Techniken aus dem Kleintiermodell der Ratte dienen dabei als wertvolle Grundlage für ein qualitativ hochwertiges Großtiermodell [Thompson et al. 1995]. Nicht nur aufgrund der größeren ethischen Bedenken, sondern auch wegen eines deutlich umfangreicheren Kosten- und Arbeitsaufwandes sind Schwächen im Studiendesign bei Großtiermodellen nicht akzeptabel, sodass das Kleintiermodell mit seinen Erkenntnissen wegbereitend ist. Konkret ausgehend von dieser Studie könnte beispielsweise ein Schafmodell etabliert werden, in dem durch eine Triple-Therapie bestehend aus Ovariectomie, defizitärer Diät und Steroidapplikation eine Osteoporose induziert wird.

Dem Großtiermodell kommt insbesondere die Aufgabe zu, die Entwicklung neuer Werkstoffe und Materialien für den osteoporotischen Knochen zu ermöglichen. Aufgrund der Größe können Materialbelastung und Biomechanik besser der humanen Situation angepasst werden. Außerdem können *in vivo* im Großtier Gewebeproben durch Biopsien und Knochenstanzen gewonnen werden, oder größere Operationen am Knochen durchgeführt werden. Insbesondere die Alterstraumatologie wird mit ihren zukünftig immer steigenden Frakturzahlen einen großen Bedarf an wirkungsvollen Osteosyntheseverfahren sowie Knochenersatzmaterialien haben, da osteoporotische Frakturen häufiger komplexe Trümmerfrakturen aufgrund eines Low-Energy-Traumas darstellen, bei denen zusätzlich durch eine altersbedingte nachlassende Vitalität es immer schwieriger werden wird, eine suffiziente Frakturheilung im metaphysärem

Bereich zu erreichen. Am wünschenswertesten wäre natürlich eine adäquate Prävention von osteoporotischen Frakturen, sei es durch Änderung des Lebensstiles oder pharmazeutische Intervention. Dennoch bleiben belastbare und reproduzierbare Tierversuchsmodelle die Grundlage der Frakturversorgung bei dem an Osteoporose leidenden Patienten in der modernen und zukünftigen Traumatologie.

5 Zusammenfassung

Osteoporose betrifft ein Viertel der Bevölkerung ab dem 50. Lebensjahr. Ziel der prospektiven experimentellen Studie ist die Etablierung eines Tierversuchsmodelles zur Osteoporoseinduktion in der Ratte durch Ovariectomie und defizitäre Diät gesichert durch Osteodensitometrie mittels Dual-X-ray-absorptiometry (DXA) und klassischer Histomorphometrie am Lichtmikroskop.

80 weibliche Sprague Dawley Ratten wurden im Alter von 14 Wochen in vier Gruppen aufgeteilt. Gruppe 1 (n= 30) stellte die Sham-Gruppe dar, wurde einer Scheinoperation (Sham-OP) unterzogen und erhielt Standardfutter. Gruppe 2 (n= 30) wurde zur Simulation einer Menopause ovariectomiert und erhielt ein Kalzium-, Phosphor- und Vitamin D3-armes Spezialfutter (Diät-Gruppe). Gruppe 3 wurde ebenfalls ovariectomiert und erhielt Standardfutter. In einem Zeitintervall von 2 Wochen wurden 0,3 mg/kg Körpergewicht Dexamethason (Voren-Depot®) s.c. appliziert (Steroid-Gruppe). Die Kontroll-Gruppe (n=10) wurde zum Anfang der Studie euthanasiert und gemessen um Daten zum Zeitpunkt t= 0 zu gewinnen. Sham- und Diät-Gruppe wurden über 14 Monate beobachtet und es wurden zu den Zeitpunkten t= 1 (Zeitpunkt der Operationen), 3, 12 und 14 Monate DXA Messungen angefertigt. Für die DXA Messungen war eine Kurznarkose mit Medetomidinhydrochlorid (Domitor®) gewichtsadaptiert erforderlich. Des Weiteren wurden jeweils 10 Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt euthanasiert und für die Histomorphometrie vorbereitet. Die Trabekelfläche wurde in anschließend angefertigten HE-Schnitten mit Hilfe der Software GIMP und ImageJ bestimmt. Die Analyse der DXA-Messungen erfolgte mit enCORE. Untersucht wurden mit beiden Verfahren die Wirbelkörper und die Femora.

Die Analyse der DXA Daten zeigte bezogen auf die Wirbelsäule zu den Zeitpunkten t=1, 3, 12 und 14 Monate einen hochsignifikant ($p < 0,001$) niedrigeren Wert der Knochendichte ermittelt als Bone Mineral Density (BMD) in g/cm^2 in der Diätgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der BMD fiel ebenfalls signifikant bereits einen Monat *post interventionem* um 14% ab und erreichte zum Endzeitpunkt der Studie einen Rückgang um 24% und hat einen um 29% niedrigeren Wert als die Kontrollgruppe gleichen Alters. Analog verhielt sich der BMD der beiden Femora. Hier erreichte die Diätgruppe sogar einen 44% kleineren Wert am Endzeitpunkt. Bei der Histomorphometrie der Wirbelkörper und der proximalen Femora war nach 3 Monaten zunächst eine signifikant kleinere

Trabekelfläche bei der Diätgruppe im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Im weiteren Verlauf stieg die Trabekelfläche bei der Diätgruppe jedoch deutlich an und erreichte nach 12 Monaten einen signifikant höheren Wert. Nach 14 Monaten war dieser Unterschied nicht mehr zu beobachten.

Eine Kombination aus bilateraler Ovariectomie und defizitärer Diät bewirkte 3 Monate *post interventionem* bei jungen gesunden Ratten einen signifikanten Abfall der Knochendichte gemessen als BMD mit weiterer Abnahme im Verlauf. Prozentual war der Verlust an Knochendichte in allen gemessenen klinisch relevanten ROIs so ausgeprägt, dass von einem osteoporotischen Knochenstatus ausgegangen werden kann.

Nach 12 und 14 Monaten *post interventionem* bestätigten die histologischen Analysen in der Diät-Gruppe besonders im proximalen Femur einen osteomalatischen Effekt. Eine Kombination aus bilateraler Ovariectomie und einer Steroidapplikation von Dexamethason führte zwar zu einer signifikant niedrigeren Knochendichte im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, blieb aber hinter den Erwartungen zurück. Allerdings zeigte die histomorphometrische Analyse hier das dünnste Trabekelwerk.

Zur weiteren Etablierung der Ratte als Standardkleintierversuchsmodell in der Osteoporoseforschung muss ein statistisch verlässlicher T-Wert ermittelt werden. Hierbei müssten alle weltweit getätigten DXA-Messungen in einer Open Access Datenbank zusammengefasst werden.

Gegebenenfalls ist eine Anpassung des Startzeitpunktes der Intervention erforderlich, um den osteomalatischen Effekt der defizitären Diät zu vermindern. Zur weiteren Darstellung des Kalziumgehaltes sollten weitere Färbemethoden wie „von Kossa“ mit eingebunden werden, sowie weitere andere technische Analysemethoden wie beispielsweise die Raman-Spektroskopie.

Beim Transfer ins Großtiermodell, unter Berücksichtigung der aus dem Kleintiermodell gewonnenen Erfahrungen, sollte eine Triple-Therapie aus bilateraler Ovariectomie, defizitärer Diät und Steroidapplikation eingesetzt werden, um einen osteoporotischen Knochenstatus zu erreichen.

6 Summary

Osteoporosis is a systemic skeletal disease with rising prevalence in postmenopausal women but also in the senescent men with direct effect on the quality of life of our patients and great impact on our modern healthcare systems in our overaging society. The aim of the study was the establishment of osteoporotic small animal rat model validated by the clinical gold standard method Dual-Energy X-ray Absorptiometry (DXA) and a classical histomorphometrical analysis by light microscopy.

80 female Sprague-Dawley rats with an age of 18 weeks were randomly divided into four groups. The sham-group was only laparotomized to simulate the same stressful conditions as for the treatment group. For the simulation of menopause rats were treated with a bilateral ovariectomy and an additional deficient diet with low phosphate, calcium and vitamin D (diet-group) or steroid application 0,3 mg/kg bodyweight of dexamethasone every two weeks (steroid-group). The control-group was euthanized directly at the beginning of the study to maintain data for timepoint t= 0. DXA scans of important skeletal sites were performed at the beginning and after 1 (timepoint of operation), 3, 12 and 14 months to investigate with the help of enCORE software the impact on radiological bone density parameters such as BMD (bone mineral density) and BMC (bone mineral content). Furthermore at each time point rats were euthanized and prepared for histomorphometrical analysis. Concerning the histomorphometrical analysis trabecular area from proximal femur and lumbar vertebra was analyzed with a special self-developed protocol combining software like GIMP and ImageJ for fast half-automated, standardized and reproducible data acquisition.

As a result BMD and BMC values in comparison to sham-group were significantly lower in the diet-group already three months after treatment with decreasing momentum at further time points. BMD and BMC values for the sham-group increased permanently reaching its peak at 12 months but is then about to begin a slight decrease at the end of observation. The steroid-groups shows no great changes in BMD and BMC values keeping a steady level. Nevertheless after 3 months there was a significant difference in comparison to sham-group.

Three months after treatment steroid-group and diet-group showed significant lower trabecular area compared to sham-group. Considering the facts that the steroid-group presented a steady BMD-value and the definition of osteoporosis is validated by bone densitometry there was no follow up of histomorphometrical analysis for the steroid-

group for time point 12 and 14 month after treatment. 12 month after treatment diet-group showed significant higher trabecular area compared to sham-group due to the early performed diet leading to combined phenotype of osteoporosis and osteomalacia (“osteoporomalacia”). 14 month after treatment both groups converged slightly while the diet-group still keeping a little bit more trabecular area. Further performed stainings with v. Kossa indicated decalcified bone tissue 12 and 14 month after treatment and verifying the compounding effect of osteomalacia.

In accordance with the facts that deficiency of calcium and vitamin D is common in elderly and even in period of growth this animal model still representing a comparable bone status observed in the human suffering from osteoporosis.

Literaturverzeichnis

Adami, S.; Passeri, M.; Ortolani, S.; Brogгинi, M.; Carratelli, L.; Caruso, I.; Gandolini, G.; Gnessi, L.; Laurenzi, M.; Lombardi, A. (1995): Effects of oral alendronate and intranasal salmon calcitonin on bone mass and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone* 17 (4), 383–390.

Babij, Philip; Zhao, Weiguang; Small, Clayton; Kharode, Yogendra; Yaworsky, Paul J.; Bouxsein, Mary L.; Reddy, Padmalatha S.; Bodine, Peter V. N.; Robinson, John A.; Bhat, Bheem; Marzolf, James; Moran, Robert A.; Bex, Frederick (2003): High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *J Bone Miner Res* 18 (6), 960–974.

Bartl, R.; Bartl, C.; unter Mitarbeit von Baum K. (2011): Osteoporose. Prävention; Diagnostik; Therapie. 4. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme.

Brecht, J.G.; Schädlich P.K. (2000): Burden of illness imposed by osteoporosis in Germany. *Eur J Health Econ* (1), 26–32.

Bruyère, O.; Malaise, O.; Neuprez, A.; Collette, J.; Reginster, J.-Y (2007): Prevalence of vitamin D inadequacy in european postmenopausal women. *Curr Med Res Opin* 23 (8), 1939–1944.

Canalis, E. (2013): Wnt signalling in osteoporosis: mechanisms and novel therapeutic approaches. *Na Re Endocrinol* 9 (10), 575–583.

Cooper, C.; Melton, L. J. (1992): Epidemiology of osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab* 3 (6), 224–229.

Cui, Q.; Wang, G-J; Balian, G. (1997): Steroid-induced adipogenesis in a pluripotential cell line from bone marrow. *J Bone Joint Surg* 79 (7), 1054–1063.

Cummings, Steven R.; Melton, L. Joseph (2002): Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 359 (9319), 1761–1767.

Dachverband Osteologie e.V. (DVO) - DVO Leitlinie 2014. Im Internet: http://www.dv-osteologie.org/dvo_leitlinien/osteoporose-leitlinie-2014 Stand 24.07.2016.

Danielsen, C. C.; Mosekilde, L.; Andreassen, T. T. (1992): Long-term effect of orchidectomy on cortical bone from rat femur: bone mass and mechanical properties. *Calcif Tissue Int* 50 (2), 169–174.

Deller, Thomas; Welsch, Ulrich (2010): Lehrbuch Histologie. 3. Aufl. München: Elsevier, Urban et Fischer.

Dequeker, J.; Nijs, J.; Verstraeten, A.; Geusens, P.; Gevers, G. (1987): Genetic determinants of bone mineral content at the spine and radius: A twin study. *Bone* 8 (4), 207–209.

Duque, G.; Watanabe, K. (2011): Osteoporosis research. Animal models. London, New York: Springer.

Egermann, M.; Goldhahn, J.; Schneider, E. (2005): Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int* 16 (S02), 129–138

El Khassawna, T.; Böcker, W.; Govindarajan, P. Schlieffe, N.; Hürter, B.; Kampschulte, M.; Schlewitz, G.; Alt, V.; Lips, K. S.; Faulenbach, M.; Möllmann, H.; Zahner, D.; Dürselen, L.; Ignatius, A.; Bauer, N.; Wenisch, S.; Langheinrich, A. C.; Schnettler, R.; Heiss, C.; Vanacker, J.-M. (2013): Effects of multi-deficiencies-diet on bone parameters of peripheral bone in ovariectomized mature rat. *PLoS ONE* 8 (8), e71665.

Filipović, B.; Sosić-Jurjević, B.; Ajdzanović, V.; Trifunović, S.; Manojlović-Stojanoski, M.; Ristić, N.; Nestorović, N.; Milosević, V.; Sekulić, M. (2007): The effect of orchidectomy on thyroid C cells and bone histomorphometry in middle-aged rats. *Histochem Cell Biol* 128 (2), 153–159.

Frost, H. M. (2003): Bone's mechanostat: A 2003 update. *Anat Rec* 275 (2), 1081–1101.

Fuleihan, G. E.; Nabulsi, M.; Choucair, M.; Salamoun, M.; Shahine, C. H.; Kizirian, A.; Tannous, R. (2001): Hypovitaminosis D in healthy schoolchildren. *Pediatrics* 107 (4), e53-e53.

Glastre, C.; Brailon, P.; David, L.; Cochat, P.; Meunier, P. J.; Delmas, P. D. (1990): Measurement of bone mineral content of the lumbar spine by dual energy X-Ray absorptiometry in normal children: Correlations with growth parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 70 (5), 1330–1333.

Govindarajan, P.; Böcker, W.; El Khassawna, T.; Kampschulte, M.; Schlewitz, G.; Huerter, B.; Sommer, U.; Dürselen, L.; Ignatius, A.; Bauer, N.; Szalay, G.; Wenisch, S.; Lips, K. S.; Schnettler, R.; Langheinrich, A.; Heiss, C. (2014): Bone matrix, cellularity, and structural changes in a rat model with high-turnover osteoporosis induced by combined ovariectomy and a multiple-deficient diet. *Am J Pathol* 184 (3), 765–777.

- Gold, D. T. (1996):** The clinical impact of vertebral fractures: Quality of life in women with osteoporosis. *Bone* 18 (3), 185–189.
- Götte, S.; Dittmar, K. (2001):** Epidemiologie und Kosten der Osteoporose. *Der Orthopäde* 30 (7), 402–404.
- Grynblas, M. D.; Chachra, D.; Lundon, K. (2000):** Bone quality in animal models of osteoporosis. *Drug Dev Res* 49 (3), 146–158.
- Guise, T. A.; Chirgwin, J. M. (2003):** Transforming growth factor-beta in osteolytic breast cancer bone metastases. *Clin Orthop Rel Res* (4), 32-38.
- Han, S.M; Szarzanowicz, T.E; Ziv, I. (1998):** Effect of ovariectomy and calcium deficiency on the ultrasound velocity, mineral density and strength in the rat femur. *Clin Biomech* 13 (7), 480–484.
- Harada, S.; Rodan, G. A. (2003):** Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423 (6937), 349–355.
- Harrison, M.; Fraser, R. (1960):** bone structure and metabolism in calcium-deficient rats. *J Endocrinol* 21 (2), 197–205.
- Harrison, E.; Adjei, A.; Ameho, C.; Yamamoto, S.; Kono, S. (1998):** The effect of soybean protein on bone loss in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Nutr Sci Vitaminol* 44 (2), 257–268.
- Haussler, B.; Gothe, H.; Mangiapane, S.; Glaeske, G.; Pientka, L.; Felsenberg, D. (2006):** Versorgung von Osteoporose-Patienten in Deutschland - Ergebnisse der BoneEVA-Studie *Deutsches Ärzteblatt A* 103 (39), 2542–2547.
- Hyppönen, E.; Power, C. (2007):** Hypovitaminosis D in British adults at age 45 y: nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *Am J Clin Nutr* 85 (3), 860–868.
- Kalu, D. N. (1991):** The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15 (3), 175–191.
- Kanis, J. A.; Melton, L. J.; Christiansen, C.; Johnston, C. C.; Khaltaev, N. (1994):** The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 9 (8), 1137–1141.
- Laib, A.; Barou, O.; Vico, L.; Lafage-Proust, M. H.; Alexandre, C.; Rügsegger, P. (2000):** 3D micro-computed tomography of trabecular and cortical bone architecture with

application to a rat model of immobilisation osteoporosis. *Med Biol Eng Comput* 38 (3), 326–332.

Langdahl, B. L.; Kassem, M.; Møller, M. K.; Eriksen, E. F. (1998): The effects of IGF-I and IGF-II on proliferation and differentiation of human osteoblasts and interactions with growth hormone. *Eur J Clin Invest* 28 (3), 176–183.

Lange, U.; Müller-Ladner, U. (2007): Glukokortikoid-induzierte Osteoporose. *Z Rheumatol* 66 (2), 129–138.

Leech, J. A.; Dulberg, C.; Kellie, S.; Pattee, L.; Gay, J. (1990): Relationship of lung function to severity of osteoporosis in women. *Am Rev Respir Dis* 141 (1), 68–71.

Lelovas, P.; Xanthos, T.; Thoma, Sofia E.; Lyritis, G. P.; Dontas, I. A. (2008): The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 58 (5), 424–430.

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

Lübbe, K.; Riedel, H. (2000): Transiente regionale Osteoporose in der Schwangerschaft. *Geburtsheilkunde und Frauenheilkunde* 60 (7), 380–385.

Luengo, M.; Pons, F.; Martinez de Osaba, M. J.; Picado, C. (1994): Prevention of further bone mass loss by nasal calcitonin in patients on long term glucocorticoid therapy for asthma: a two year follow up study. *Thorax* 49 (11), 1099–1102.

Lüllmann-Rauch, R. (2012): Taschenlehrbuch Histologie. 4. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme.

Marcus, Robert (2008): Osteoporosis. 3. Aufl. Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press.

Matsushita, M; Tsuboyama, T.; Kasai, R.; Okumura, H.; Yamamuro, T.; Higuchi, K.; Higuchi, K.; Kohno, A.; Yonezu, T.; Utani, A.; Umezawa, M.; Takeda, T. (1986): Age-related changes in bone mass in the senescence-accelerated mouse (SAM): SAM-R/3 and SAM-P/6 as new murine models for senile osteoporosis. *Am J Pathol* 125 (2), 276–283.

Mescher, A. L.: Junqueira's basic histology. Text and atlas. Thirteenth edition.

Mithal, A.; Wahl, D. A.; Bonjour, J-P; Burckhardt, P.; Dawson-Hughes, B.; Eisman, J. A. et al. (2009): Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteopor Int* 20 (11), 1807–1820.

Morris, H.A.; Porter, S.J.; Durbridge, T.C.; Moore, R.J.; Need, A.G.; Nordin, B.E.C. (1992): Effects of oophorectomy on biochemical and bone variables in the rat. *Bone Miner* 18 (2), 133–142.

Mos, M. de; Huygen, F. J. P. M.; Dieleman, J. P.; Koopman, J. S. H. A.; Stricker, B. H. Ch; Sturkenboom, M. C. J. M. (2008): Medical history and the onset of complex regional pain syndrome (CRPS). *Pain* 139 (2), 458–466.

Nilas, L.; Christiansen, C. (1987): Bone mass and its relationship to age and the menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 65 (4), 697–702.

Nordin, B.E. (1997): Calcium and osteoporosis. *Nutrition* 13 (7-8), 664–686.

Parfitt, A. M. (1976): The actions of parathyroid hormone on bone: relation to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis, and metabolic bone disease. Part I of IV parts: mechanisms of calcium transfer between blood and bone and their cellular basis: morphological and kinetic approaches to bone turnover. *Metab Clin Exp* 25 (7), 809–844.

Pietschmann, P.; Kudlacek, S.; Peterlik, M. (2004): Pathogenese und Therapie der Osteoporose beim Mann. *J Miner stoffwechs* 11 (2), 12–14.

Pietschmann, P.; Skalicky, M.; Kneissel, M.; Rauner, M.; Hofbauer, G.; Stupphann, D.; Viidik, A. (2007): Bone structure and metabolism in a rodent model of male senile osteoporosis. *Exp gerontol* 42 (11), 1099–1108.

Pietschmann, P.; Rauner, M.; Sipos, W.; Kersch-Schindl, K. (2009): Osteoporosis: an age-related and gender-specific disease – a mini-review. *Gerontology* 55 (1), 3–12.

Prevention and management of osteoporosis. Report of a WHO Scientific Group (2003): Geneva: World Health Organization (WHO technical report series, 921). Im Internet: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42841/1/WHO_TRS_921.pdf Stand: 24.07.2016

Rauch, A.; Seitz, S.; Baschant, U.; Schilling, A. F.; Illing, A.; Stride, B.; Kirilov, M.; Takacz, A.; Schmidt-Ullrich, R.; Ostermay, S. (2010): Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell metabolism* 11 (6), 517–531.

Riggs, B. L.; Melton, L. J. (1995): Osteoporosis. Etiology, diagnosis and management. 2. Aufl. Philadelphia: Lippincott-Raven.

Riggs, B. L.; Melton, L. J. (1995): The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. *Bone* 17 (5), 505–511

Rovner, A. J.; O'Brien, K. O. (2008): Hypovitaminosis D among healthy children in the United States: a review of the current evidence. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 162 (6), 513–519.

Ruimerman, R. (2005): Modeling and remodeling in bone tissue. Eindhoven: Technische Universiteit Eindhoven (IPA dissertation series, 2005-02).

Schiebler, T. H.; Korf, H.-W. (2007): Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie 10. Aufl. Steinkopff

Schünke, M.; Schulte, E.; Schumacher, U. (2011): Prometheus Lernatlas der Anatomie. 3. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme.

Schwabe, U.; Paffrath, D. (2011): Arzneiverordnungs-Report 2011. Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare. Springer Berlin Heidelberg.

Sornay-Rendu, El.; Boutroy, S.; Munoz, F.; Delmas, P. D. (2007): Alterations of cortical and trabecular architecture are associated with fractures in postmenopausal women, partially independent of decreased BMD measured by DXA: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 22 (3), 425–433.

Straka, C.; Abedinpour, F.; Fischer, N.; Wacker, A. (2010): Multiples Myelom. *Onkologie* 16 (3), 232–241.

Swarthout, J.T.; D'Alonzo, R. C.; Selvamurugan, N.; Partridge, N. C. (2002): Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene* 282 (1-2), 1–17.

Thompson, D. D.; Simmons, H. A.; Pirie, C. M.; Ke, H. Z. (1995): FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 17 (4), 125–133.

Turner, R. T.; Maran, A.; Lotinun, S.; Hefferan, T.; Evans, G. L.; Zhang, M.; Sibonga, J. D. (2001): Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord* 2 (1), 117–127.

Ulfig, N. (2011): Kurzlehrbuch Histologie. 3. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme.

Vilela, P.; Nunes, T. (2011): Osteoporosis. *Neuroradiology* 53 (S1), 185–189.

WHO Scientific group on the assesement of osteoporosis at primary health care level, Brussels May 2004. Im Internet: <http://www.who.int/chp/topics/Osteoporosis.pdf>
Stand 24.07.2016.

Winzenberg, T.; Powell, S.; Shaw, K. A.; Jones, G. (2011): Effects of vitamin D supplementation on bone density in healthy children: systematic review and meta-analysis. *Br Med J* 342 (1), c7254.

Wirth, C. J. (2002): Orthopädie und orthopädische Chirurgie. Stuttgart, New York: Thieme.

Wronski, T. J.; Dann, L. M.; Scott, K. S.; Cintrón, M. (1989): Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 45 (6), 360–366.

Yamauchi, H.; Kushida, K.; Yamazaki, K.; Inoue, T. (1995): Assessment of spine bone mineral density in ovariectomized rats using DXA. *J Bone Miner Res* 10 (7), 1033–1039.

Yang, J.; Pham, S. M.; Crabbe, D. L. (2003): Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture. *Dentomaxillofacial Radiology* 32 (4), 247–251.

Yellowley, C. E.; Li, Z.; Zhou, Z.; Jacobs, C. R.; Donahue, H. J. (2000): Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 15 (2), 209–217.

Zhao, Z.; Yang, D.; Ma, X.; Zhao, H.; Nie, C.; Si, Z. (2009): Successful repair of a critical-sized bone defect in the rat femur with a newly developed external fixator. *Tohoku J Exp Med* 219 (2), 115–120.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktioneller Aufbau eines langen Röhrenknochens.	3
Abbildung 2: Struktur des Lamellenknochens	5
Abbildung 3: H.E. Färbung eines Trabekels mit aufliegenden Osteoblasten.....	6
Abbildung 4: EM-Aufnahme eines im Knochen eingelagerten Osteozyten	6
Abbildung 5: Enzymhistochemische Färbung der Tartrat-resistenten Phosphatase	7
Abbildung 6: Wechselwirkung zwischen Knochenbelastung und Knochenmasse	8
Abbildung 7: Auswirkung der wichtigsten Einflussfaktoren auf die Knochenmasse	9
Abbildung 8: WNT-Signalweg.....	11
Abbildung 9: Densitometrische Klassifikation der Osteoporose.....	13
Abbildung 10: Einteilung der verschiedenen Formen der Osteoporose	14
Abbildung 11: Inzidenz für Oberschenkelhals-, Unterarm- und Wirbelkörperfrakturen	18
Abbildung 12: Veränderungen der Körperhaltung und –statik durch Osteoporose	20
Abbildung 13: Zeitlicher Ablauf der DXA Messungen und Histomorphometrie.....	28
Abbildung 14: Vorgehensweise bei der Ovariectomie und Sham-Operation.....	32
Abbildung 15: DXA Messung einer Ratte mit dem Lunar Prodigy®.....	33
Abbildung 16: Beispiel eines DXA Analysebogens erstellt durch die enCORE Software.....	34
Abbildung 17: Anzahl der durchgeführten DXA-Messungen pro Gruppe und Zeitpunkt	35
Abbildung 18: Durchführung eines longitudinalen Schnittes des Rattenfemurs	36
Abbildung 19: Schneiden eines Wirbelkörperpräparates am Rotationsmikrotom.....	37
Abbildung 20: Darstellung der automatischen Zusammensetzung der einzelnen Teilbilder eines Wirbelkörperpräparates mit dem Microsoft Image Composite Editor	39
Abbildung 21: Digitale Aufbereitung der zusammengesetzten Bilder mit Hilfe der Software PhotoScape	40
Abbildung 22: Bildliche Darstellung der Vorgehensweise bei der halbautomatischen Analyse mit GIMP	41
Abbildung 23: Markierung der Trabekel eines Wirbelkörperpräparates mit Hilfe des Zauberstab-Tools.....	42
Abbildung 24: Einfärbung der markierten Trabekel eines Wirbelkörperpräparates	42
Abbildung 25: Setzen des Schwellenwertes	43
Abbildung 26: Transformation in 8-bit Grauwerte	43
Abbildung 27: Manuelles Entfernen der Kompakta und Festlegung des ROIs.....	44
Abbildung 28: Festlegung des ROIs und Erstellen des Histogramms mit ImageJ.....	45
Abbildung 29: Anzahl der histomorphometrisch untersuchten Präparate.....	45
Abbildung 30: Box-Plot der BMD-Mittelwerte des gesamten Körpers	48
Abbildung 31: Box-Plot der BMD-Mittelwerte der Wirbelsäule.....	49
Abbildung 32: Box-Plot der BMD-Mittelwerte der Femora	50
Abbildung 33: Verlauf des prozentualen Verlustes des BMD-Wertes der Diät-Gruppe.....	51
Abbildung 34: Vergleich des Verlaufes der prozentualen Verlustwerte des BMD-Wertes der verschiedenen ROI der Sham-Gruppe	52

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 35: Box-Plot der BMC-Mittelwerte des gesamten Körpers	53
Abbildung 36: H.E. Färbung des linken proximalen Femurs und des dritten Lendenwirbelkörpers der Kontroll-Gruppe zum Startzeitpunkt.....	55
Abbildung 37: H.E. Färbung des linken proximalen Femurs und des dritten Lendenwirbelkörpers der Diät-Gruppe zum Zeitpunkt 3 Monate.....	57
Abbildung 38: H.E. Färbung des linken proximalen Femurs und des dritten Lendenwirbelkörpers der Sham-Gruppe zum Zeitpunkt 3 Monate.....	56
Abbildung 39: H.E. Färbung des linken proximalen Femurs und des dritten Lendenwirbelkörpers der Steroid-Gruppe zum Zeitpunkt 3 Monate.....	58
Abbildung 40: H.E. Färbung des linken proximalen Femurs und des dritten Lendenwirbelkörpers der Sham-Gruppe zum Zeitpunkt 12 Monate.....	59
Abbildung 41: H.E. Färbung des linken proximalen Femurs und des dritten Lendenwirbelkörpers der Diät-Gruppe zum Zeitpunkt 12 Monate.....	60
Abbildung 42: H.E. Färbung des linken proximalen Femurs und des dritten Lendenwirbelkörpers der Sham-Gruppe zum Zeitpunkt 14 Monate.....	61
Abbildung 43: H.E. Färbung des linken proximalen Femurs und des dritten Lendenwirbelkörpers der Diät-Gruppe zum Zeitpunkt 14 Monate.....	62
Abbildung 44: Von Kossa Färbung von Trabekeln des Femurs von Sham-Gruppe und Diät-Gruppe nach 3, 12 und 14 Monaten Standzeit.	63
Abbildung 45: Prozentuale Bestimmung der Trabekelfläche des proximalen Femurs	64
Abbildung 46: Prozentuale Bestimmung der Trabekelfläche des dritten Lendenwirbelkörpers	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Therapie und Prävention der Osteoporose: Pharmakologische und nicht pharmakologische Maßnahmen	24
Tabelle 2: Schwellenwerte der T-Werte bei der die DVO Leitlinie von 2014 eine medikamentöse Therapie begonnen werden sollte	24
Tabelle 3: Übersicht der aktuellen zugelassenen Präparate.....	26
Tabelle 4: Energiefluss der Strahlenquelle in kV und mA und Strahlungsintensität in μ Gray pro DXA gemessene Ratte.....	34
Tabelle 5: Entwässerungsschema des Einbettungsautomaten Leica TP1050 für die Herstellung der Paraffinschnitte.	37

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
®	<i>engl.</i> Registered Trade Mark
°C	Grad Celsius
μCT	Mikro-Computertomographie
μGy/μGray	Mikrogray
μSv	Mikrosievert
2D	Zweidimensional
ANOVA	<i>engl.</i> Analysis of variance
AP-1	<i>engl.</i> Activator Protein 1
APES	3-Amino-propyltriethoxysilane
BMC	<i>engl.</i> Bone Mineral Content
BMD	<i>engl.</i> Bone Mineral Density
BMI	<i>engl.</i> Body mass Index
BMJ	<i>engl.</i> British medical journal
BMU	<i>engl.</i> basic multicellular unit
cm	Zentimeter
CRPS	<i>engl.</i> complex regional pain syndrom
CT	Computertomographie
DDD	<i>engl.</i> defined daily doses
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DVO	Dachverband Osteologie e.V.
DXA/DEXA	<i>engl.</i> Dual-Energy X-ray Absorptiometry
E	Epiphysenfuge
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazellularmatrix
FDA	<i>engl.</i> Food and Drug Administration
g	Gramm
g/cm ²	Gramm pro Quadratcentimeter
GIMP	<i>engl.</i> GNU Image Manipulation Program
HE	Hämatoxylin-Eosin
ICE	<i>engl.</i> Microsoft Image Composite Editor
IGF	<i>engl.</i> Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
K	Kortikalis

kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KM	Knochenmark
kV	Kilovolt
l	Liter
LRP5-Gen	<i>engl.</i> Low-density lipoprotein receptor-related protein
M	Molarität
mA	Milliampere
M-CSF	<i>engl.</i> Macrophage colony-stimulating factor
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
OVX	Ovariectomie
p	<i>engl.</i> p-value von probability
PMMA	Polymethacrylsäuremethylester
pQCT	Periphere Quantitative Computertomographie
PTH	Parathormon
PTHrP	<i>engl.</i> parathyroid hormone-related protein
QCT	Quantitative Computertomographie
QUS	Quantitative Ultraschallmessung
RANK	<i>engl.</i> receptor activator of Nuclear Factor- κ B
RANKL	<i>engl.</i> receptor activator of Nuclear Factor- κ B Ligand
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>engl.</i> Region of Interest
SERM	selektive Östrogen Rezeptor Modulatoren
SFB	Sonderforschungsbereich
SXA	<i>engl.</i> Single Energy Densitometry
t	<i>engl.</i> <i>timepoint</i>
T	Trabekel
TGF-β	<i>engl.</i> Transforming growth factor beta
TIFF	<i>engl.</i> Tagged Image File Format
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	<i>engl.</i> World Health Organisation
μm	Mikrometer

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Heiß sowohl für die Vergabe des Themas als auch für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit bedanken. Die regelmäßigen Treffen mit Ihren Anregungen und Unterstützungen bei einer stets freundlichen und wohlwollenden Atmosphäre ermöglichten konstruktive Arbeit.

Zudem möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Katrin Susanne Lips bedanken, die mich bei der Arbeit im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen stets tatkräftig unterstützt hat. Besonders Frau Annette Stengel und Frau Julia Sparer haben mit ihrem Wissen, Erfahrungen und Fähigkeiten sehr gute Arbeit bei der Herstellung bei der in dieser Arbeit verwendeten Präparate geleistet.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Thaqif El Khassawna aussprechen, welcher mit hervorragender Kritik und guten Anregungen mir stets ein starker Ansprechpartner war. Unsere Zusammenarbeit hat mir über die Jahre bei einem freundschaftlichen Verhältnis immer sehr viel Freude bereitet.

Auch bei meinen Mitdoktorandinnen Britta Hürter, Katharina Brodsky und Nathalie Schlieffe möchte ich mich bedanken für die kurzweilige Atmosphäre und die guten Gespräche besonders bei der Arbeit mit den Versuchstieren. Ebenfalls möchte ich auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie und dem Zentralen Tierlabor ganz herzlich danken.

Danken möchte ich auch der DFG für die finanzielle Unterstützung und die Bereitstellung der Sachmittel im Rahmen der Forschungsgruppe SFB/Transregio 79 (Teilprojekt T1). Zuletzt geht mein Dank an meine Freunde, welche mir während und nach dem Studium immer wieder neue Kraft geschenkt haben.

Ein ganz großer Dank geht an meine zukünftige Ehefrau Laura, welche mir immer liebevoll den Rücken gestärkt hat und mich stets ermunterte und aufbaute.

Ganz besonders möchte ich auch meiner Familie danken, welcher ich diese Arbeit auch widmen möchte. Meine Eltern und Großeltern, welche mir überhaupt erst das Studium und die Promotion ermöglicht haben und auch an meinen Bruder, welcher geduldig jedes Wort und jedes Komma dieser Arbeit überprüft hat. Abschließen möchte ich an dieser Stelle mit einem Zitat von Giuseppe Mazzini (* 22.06.1805, † 10.03.1872): „Die Familie ist das Vaterland des Herzens.“

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Vorträge und Posterpräsentationen:

D. Weisweiler, T. El Khassawna, W. Böcker, L. Schroeter, M. Kampschulte, R. Schnettler, C. Heiß (2014): Comparison of in vivo and ex vivo measurements of bone density parameter by dual X-ray absorptiometry in sheep model of osteoporosis;
Postervortrag: Materials Science and Engineering Congress 2014; 23-25 Sept in Darmstadt, Germany

D. Weisweiler, G. Schlewitz, P. Govindarajan, T. El Khassawna, K. S. Lips, W. Böcker, C. Heiß, R. Schnettler (2013): Untersuchung des Zusammenhanges von Knochendichte bestimmt durch Dual-X-ray-absorptiometry und lichtmikroskopischer Histomorphometrie bei osteoporotischen Ratten;
Postervortrag: DKOU - Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2013; 22 - 25.10 Oktober in Berlin, Germany

D. Weisweiler, T. El Khassawna, W. Böcker, R. Schnettler, C. Heiß (2015): Das Beste beider Welten: Forschung und Klinik - Wie kann durch gutes Management der Zusammenarbeit ein Nutzen gewonnen werden und dieser wenn möglich vergrößert werden?;
Vortrag: 63. Jahrestagung der Norddeutschen Orthopäden- und Unfallchirurgenvereinigung e. V. 18.- 20. Juni 2015 in Hamburg

Teile dieser Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Bauer N.; El Khassawna T.; Goldmann F.; Stirn M.; Ledieu D.; Schlewitz G.; Govindarajan P.; Zahner D.; Weisweiler D.; Schliefske N.; Böcker W.; Schnettler R.; Heiss C.; Moritz A. (2015): Characterization of bone turnover and energy metabolism in a rat model of primary and secondary osteoporosis. *Exp Toxicol Pathol* 67 (4), S. 287–296

Böcker W.; El Khassawna T.; Bauer N.; Brodsky K.; Weisweiler D.; Govindarajan P.; Schlewitz G.; Kampschulte M.; Dürselen L.; Thormann U.; Szalay G.; Schnettler R.; Langheinrich AC.; Heiss C. (2014): Short-term glucocorticoid treatment causes spinal osteoporosis in ovariectomized rats. *Eur Spine J* 23 (11), S. 2437–2448

El Khassawna T.; Böcker W.; Brodsky K.; Weisweiler D.; Govindarajan P.; Kampschulte M.; Thormann U.; Henss A.; Rohnke M.; Bauer N.; Müller R.; Deutsch A.; Ignatius A.; Dürselen L.; Langheinrich A.; Lips KS.; Schnettler R.; Heiss C. (2015): Impaired extracellular matrix structure resulting from malnutrition in ovariectomized mature rats. *Histochem Cell Biol* 144 (5), S. 491–507

Govindarajan P.; Schlewitz G.; Schliefske N.; Weisweiler D.; Alt V.; Thormann U.; Lips KS.; Wenisch S.; Langheinrich AC.; Zahner D.; Hemdan NY.; Böcker W.; Schnettler R.; Heiss C. (2013): Implications of combined ovariectomy/multi-deficiency diet on rat bone with age-related variation in bone parameters and bone loss at multiple skeletal sites by DEXA. *Med Sci Monit* 19, S. 76–86

Malhan D.; Muelke M.; Rosch S.; Schaefer AB.; Merboth F.; Weisweiler D.; Heiss C.; Arganda-Carreras I.; El Khassawna T. (2018): An optimized approach to perform bone histomorphometry. *Front Endocrinol* 9, S. 666

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