

**OSTEOPOROSEINDUKTION IN ADULTEN KLEIN- UND GROSSTIERMODELLEN –  
MIKRO- UND NANO-COMPUTERTOMOGRAPHIE-BASIERTE  
EVALUATION DER KNOCHENARCHITEKTUR**

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin (FB 11)

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Jan Daniel Belikan

aus Bretten

Gießen 2021

Aus der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie und Kinderradiologie

unter der Leitung von Univ. Prof. Dr. med. Gabriele A. Krombach

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: PD Dr. med. Marian Kampschulte
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Markus Rickert

Tag der Disputation: 06.05.2021

## **MEINEN ELTERN**

„Ohne Achtung gibt es keine wahre Liebe.“

Immanuel Kant



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ZIEL DER ARBEIT</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Der Knochen</b> .....	<b>3</b>
<b>3.2</b>	<b>Die Osteoporose</b> .....	<b>8</b>
3.2.1	Definition.....	8
3.2.2	Ossäre Veränderung.....	9
3.2.3	Risikofaktoren und soziale/ sozial-ökonomische Tragweite.....	13
3.2.4	Tiermodelle.....	15
3.2.5	Techniken der Osteoporoseinduktion.....	16
<b>3.3</b>	<b>Die hochfokussierte Computertomographie</b> .....	<b>17</b>
3.3.1	Technische Prinzipien – Mikro- und Nano-Computertomographie.....	19
3.3.2	Morphometrie der ossären Mikroarchitektur und Knochenmineralisierung ....	22
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>Laboranalytik – Artikel, Geräte, Instrumente sowie Software</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>Die Tiermodelle</b> .....	<b>28</b>
4.2.1	Studiendesign .....	28
4.2.2	Versuchsdurchführung und Untersuchungsvorbereitung.....	33
<b>4.3</b>	<b>Mikro-CT zu den adulten Klein- und Großtiermodellen</b> .....	<b>38</b>
4.3.1	Akquisition der Daten.....	39
4.3.2	Datenrekonstruktion.....	40
4.3.3	Quantitative Bildanalyse .....	41
<b>4.4</b>	<b>Nano-CT zum adulten Großtiermodell</b> .....	<b>52</b>
4.4.1	Akquisition der Daten.....	52
4.4.2	Datenrekonstruktion.....	53
4.4.3	Quantitative Bildanalyse .....	54
<b>4.5</b>	<b>Statistische Auswertung und Bilddarstellung</b> .....	<b>57</b>

<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>59</b>
<b>5.1</b>	<b>Visuelle Bildinspektion des adulten Kleintiermodells</b> .....	<b>59</b>
<b>5.2</b>	<b>Quantitative Mikro-CT des adulten Kleintiermodells</b> .....	<b>63</b>
5.2.1	Distales Femur – Spongiosa .....	63
5.2.2	Distales Femur – Kortikalis .....	66
5.2.3	Proximale Tibia .....	68
5.2.4	Th 9 .....	72
<b>5.3</b>	<b>Visuelle Bildinspektion der Femora des Großtiermodells</b> .....	<b>75</b>
<b>5.4</b>	<b>Quantitative Mikro-CT des adulten Großtiermodells</b> .....	<b>77</b>
5.4.1	Proximales Femur – Referenzregionen der Spongiosa .....	77
5.4.2	Proximales Femur – Regions of interests der Spongiosa.....	79
5.4.3	Proximales Femur – Kortikalis .....	85
<b>5.5</b>	<b>Visuelle Bildinspektion der Trabekel des Großtiermodells</b> .....	<b>86</b>
<b>5.6</b>	<b>Quantitative Nano-CT des adulten Großtiermodells</b> .....	<b>88</b>
5.6.1	LWK 2 – Veränderung der Osteozyten innerhalb einer Gruppe.....	88
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>90</b>
<b>6.1</b>	<b>Synopsis</b> .....	<b>90</b>
<b>6.2</b>	<b>Diskussion der Methodik</b> .....	<b>91</b>
6.2.1	Tiermodelle.....	91
6.2.2	Computertomographie .....	95
<b>6.3</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b> .....	<b>98</b>
<b>6.4</b>	<b>Einschränkungen</b> .....	<b>108</b>
<b>6.5</b>	<b>Fazit und Ausblick</b> .....	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT</b> .....	<b>112</b>
<b>7.1</b>	<b>Deutsch</b> .....	<b>112</b>
<b>7.2</b>	<b>Englisch</b> .....	<b>114</b>

<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>116</b>
<b>8.1</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>116</b>
<b>8.2</b>	<b>Bildquellenverzeichnis</b> .....	<b>130</b>
<b>8.3</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>131</b>
<b>8.4</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>134</b>
<b>8.5</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>137</b>
<b>8.6</b>	<b>Tabellarische Zusammenstellung der statistischen Auswertung</b> .....	<b>139</b>
8.6.1	Adultes Kleintiermodell – Ergebnisse der deskriptiven Statistik.....	139
8.6.2	Adultes Großtiermodell – Ergebnisse der deskriptiven Statistik.....	147
8.6.3	Adultes Großtiermodell – Ergebnisgrafiken zu den LWK 2-Trabekel.....	156
<b>8.7</b>	<b>Software-Arbeitsprotokolle der Datenakquisition</b> .....	<b>159</b>
<b>9</b>	<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS</b> .....	<b>169</b>
<b>10</b>	<b>EHRENWÖRTLICHE „ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION“</b> .....	<b>170</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>171</b>
<b>12</b>	<b>CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>172</b>

## **1 EINLEITUNG**

Die Volkskrankheit Osteoporose ist ein globales Gesundheitsproblem [1]. Sie wird als Knochenschwund bezeichnet, was auf dem Verlust der Knochenmineraldichte und -stabilität beruht. Derzeit sind mehr als 200 Millionen Menschen daran erkrankt [2]. Vermehrte Krankenhausaufenthalte aufgrund osteoporotischer Frakturen und dadurch zunehmende Gesundheitskosten begründen den relevanten Forschungsbedarf an der Osteoporose [3], welche die häufigste chronisch-metabolische Knochenerkrankung ist [4].

Die demographische Entwicklung fordert die heutige und zukünftige Gesellschaft in unterschiedlichen Bereichen heraus. Durch die steigende Lebenserwartung nimmt der Anteil älterer Menschen zu, wodurch sich im Gesundheitssystem Konsequenzen ergeben [5]: Laut jüngsten Statistiken erleidet weltweit jeder fünfte Mann und jede dritte Frau im Laufe des Lebens eine osteoporotische Fraktur [2]. Bis 2050 soll die Gesamtzahl der Überfünzigjährigen einschließlich der an Osteoporose erkrankten Frauen um 40 % sowie der erkrankten Männer um 81 % in Deutschland innerhalb von 40 Jahren steigen [5].

Osteoporotische Knochenbrüche können bereits durch Mikrotraumata ausgelöst werden [4]. Unter der Gesamtheit aller Frakturen stehen die Hüftfrakturen mit den schwerwiegendsten Konsequenzen für die Betroffenen in Verbindung (hohe Letalitätsrate inklusive Komplikationen wie Infektion, Thrombose oder posttraumatische Immobilität etc.). Zusätzlich verursachen sie die teuersten Versorgungskosten [2].

Anhand frühzeitiger Diagnosen sowie durch rechtzeitige Behandlung des Knochenschwunds kann die osteoporotische Fraktur verhindert werden [6].

Bis vor einigen Jahrzehnten existierte noch kein geeignetes Tiermodell zur Imitation des humanen osteoporotischen Knochenstatus. Standardisierte, präklinische Forschungsmodelle sind jedoch essentiell, um in naher Zukunft die Frakturheilung und -behandlung am osteoporotischen Skelettsystem durch Bio- und Osteosynthesematerialien erforschen zu können.

## **2 ZIEL DER ARBEIT**

Das Ziel der vorgelegten Arbeit war es, die Auswirkungen auf den Knochenstatus durch die multiparametrische Osteoporoseinduktion am Klein- und Großtiermodell qualitativ sowie quantitativ zu evaluieren. Hierfür erfolgte die Durchführung von mikro- und nano-computertomographischen Untersuchungen im Ratten- sowie Schafmodell.

Das hierbei etablierte Rattenmodell basierte auf einer Gruppe scheinoperierter (Sham-OP), seneszenter Ratten sowie einer weiteren ovariectomierten (OVX) Gruppe. Das gesamte Kollektiv ließ sich in fünf Studiengruppen anhand weiterer diätetischer Intervention untergliedern. Im adulten Schafmodell wurden die femininen Versuchstiere in vier Interventionsgruppen aufgeteilt. Durch diätetische, operativ-hormonelle oder medikamentöse Manipulation sowie deren Kombination sollte ein osteoporotischer Knochenstatus erreicht werden. Mit Hilfe der laborinternen Kryo-Scan-Methode wurden Rohdatensätze der Untersuchungsobjekte des seneszenten Rattenmodells (distales Femur, proximale Tibia und Th 9-Wirbelkörper) sowie des adulten Schafmodells (proximales Femur) im Mikro-Computertomographen akquiriert. Knochenveränderungen wurden morphometrisch und densitometrisch nach Rekonstruktion und Bildverarbeitung quantifiziert. Nach mikroskopischer Probenaufarbeitung (Lendenwirbelkörper 2 Trabekel) fanden weitere Untersuchungen auf zellulärer Ebene mittels Nano-Computertomographie (Nano-CT/NCT) statt. Es galt folgende Nullhypothesen zu widerlegen:

1. Das Kleintiermodell der Ratten weist keine Veränderung des Knochenstatus (Morphometrie, Mineralisierung) in Bezug auf die Referenzgruppe auf.
2. Das vorliegende Kleintiermodell an seneszenten Ratten zeigt keine Veränderung des Knochenstatus (Morphometrie, Mineralisierung) im Vergleich zum vorläufigen Osteoporosemodell an juvenilen Ratten.
3. Das Großtiermodell der Schafe legt keine Veränderung des Knochenstatus (Morphometrie, Mineralisierung) in Bezug zum Kontrollkollektiv dar.

Die Forschungsarbeit wurde im Rahmen des Sonderforschungsbereiches Transregio 79 (SFB/TRR79) „Werkstoffe für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen“ durchgeführt, für welchen die Etablierung von osteoporotischen Tiermodellen unentbehrlich war.

### 3 LITERATURÜBERSICHT

#### 3.1 Der Knochen

Sonderformen des Binde- und Stützgewebes sind sowohl das Knorpel- als auch Knochengewebe. Letzteres gehört zu den festesten Geweben der humanen Spezies und setzt sich aus diversen organischen Substanzen sowie Mineralien zusammen. Ungefähr 99 % des Kalziums werden im Knochen gespeichert, wodurch dem Knochengewebe eine wichtige Funktion im Kalzium- und Phosphatmetabolismus zukommt. Das knöcherne Skelett dient als Stütz- und Schutzapparat für innere Organe wie z.B. das Gehirn. Ferner gewährleistet der Knochen Schutz für das blutbildende Knochenmark. Hinzu ist das Knochengerüst mechanisch sehr strapazierbar und durch Biege-, Druck-, Verdrehungs- sowie Zugfestigkeit charakterisiert [7].

#### **Anatomie und Morphologie**

Formell werden die desmale und chondrale Ossifikation unterschieden. Die direkte (desmale) Synthese von Knochengewebe geht aus multipotenten Mesenchymzellen hervor, welche sich zu Osteoblasten differenzieren. So entstehen z.B. die Clavicula oder Knochen des Schädels. Das restliche Skelett geht aus der indirekten (chondralen) Ossifikation hervor, bei der Knochen über die Matrize eines knorpeligen Gerüsts aus Mesenchym gebildet wird. Entweder ossifiziert der Skelettabschnitt peri- oder enchondral [7].

Makroskopisch gliedert sich der Knochen in die Substantia compacta und spongiosa. Erstere wird vom Periost und Endost begrenzt. Deren Grundeinheit bilden die Osteone. Das Osteon besteht aus mineralisierten Fasern, den Knochenlamellen, die zentral ein Gefäß aufweisen – auch Havers-System genannt. Neben der muskulären Kraftübertragung und dem ossären Wachstum dient die äußere Membran, das Periost, ebenso der Blutversorgung sowie der Frakturheilung. Die innere Hüllstruktur, das Endost, grenzt an das Knochenmark und ist mit dem trabekulären Knochengerüst (Substantia spongiosa) verbunden [8]. Aufgrund der höheren biomechanischen Belastung des Endosts (verglichen zur äußeren Membran) sowie Exposition von Zytokinen ist es vermehrten Umbauprozessen ausgesetzt. Gleiches gilt für die Substantia spongiosa, welche als netzartiges Bälkchensystem – in Form von vertikalen und horizontalen Knochenlamellen mit zahlreichen Knotenpunkten – organisiert ist und teilweise das Knochenmark durchzieht [9].

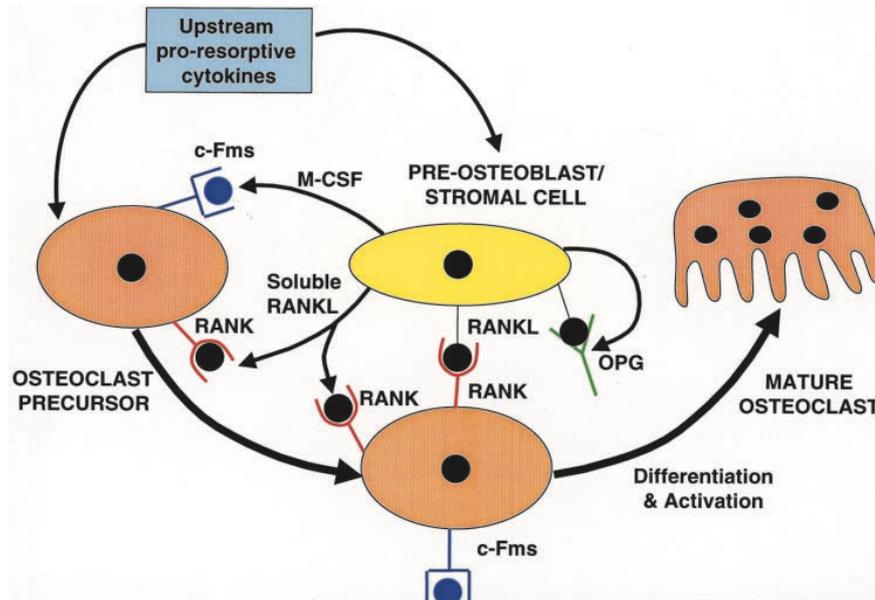
**Knochenzellen und -metabolismus**

Die Substantia compacta und spongiosa werden von hochspezialisierte Zellen wie Osteoblasten und Osteoklasten umhüllt, welchen die zentrale Schlüsselposition für die permanenten Umbauvorgänge obliegt [9]. Osteoblasten haben ihren Ursprung von mesenchymalen Stammzellen, den Osteoprogenitorzellen. Von diesen Vorläuferzellen stammen ebenso Adipozyten, Chondrozyten und Myozyten ab [10]. Entscheidend für die Differenzierung der reifen Osteoblasten aus Pro-Osteoblasten ist die Wnt/ $\beta$ -Signaltransduktionskaskade - ein Signalweg aus diversen Lipid-modifizierten Glykoproteinen. Dieser stimuliert die Pro-Osteoblasten, induziert die Osteoblastenentwicklung und inhibiert die Osteozytenapoptose sowie Osteoklasten. Summa summarum initiiert die Kaskade eine Verbesserung der Knochenstabilität und bietet Forschungsansatz für Knochenerkrankungen wie die Osteoporose [11].

Die Zellmorphologie der mononukleären Osteoblasten variiert von flach bis kubisch je nach Zellreifungsgrad, -aktivität sowie -lokalisation (peri- und endostal). In der Knochenformationsphase werden aktivierte Osteoblasten als kubisch beschrieben. Primär sezernieren sie extrazelluläre Knochenmatrixproteine – Glykoproteine, Kollagen Typ I, Proteoglykane sowie  $\gamma$ -carboxylierte Proteine [12]. Glykoproteine wie Osteonectin sind verantwortlich für ossäre Zellmigration, -adhäsion, -differenzierung und -proliferation. Weiter werden unter den sogenannten Sialoproteinen das Vitamin K-abhängige Osteocalcin sowie  $\gamma$ -carboxylierte Protein summiert, welche wesentlich zur Adhäsion zellulärer und nicht zellulärer Bestandteile beitragen [13]. Carboxyliertes Osteocalcin fördert die Ausfällung von Calcium-Phosphat-Komplexen im Knochen und dadurch die Knochenmineralisation. Es fungiert somit als Formationsmarker [14]. Neben der Hauptaufgabe der Osteoblasten – Knochenformation – steht die Knochenmineralisierung. Im Rahmen dieser Osteoidbildung initiieren sie die Hydroxylapatit-Formation, wofür enzymatische Regulatoren wie die alkalische Phosphatase (AP) verantwortlich sind. Die AP reguliert die Phosphoprotein-Phosphorylation und stellt konsekutiv einen membranadhärenten Biomarker der Knochenformation dar. Des Weiteren greifen die Osteoblasten in die Knochenresorption ein. Sie regulieren durch Einwirkung auf die Osteoklastendifferenzierung indirekt den Calciumhaushalt [15]. Ein humaner Osteoblast geht nach seinem maximal zehnwöchigen Lebenszeitraum in die Differenzierung zum Osteozyten oder in die Apoptose über. Die Osteozyten werden auch „bone lining cells“ genannt [12]. In diesem Endstadium findet eine Einlagerung in die Knochenmatrix sowie keine Osteoidbildung mehr statt. Untereinander stehen die Zellen über „gap junctions“, sogenannte porenbildende Proteinkomplexe, in Kontakt und regulieren als Mechanorezeptoren sowohl die knöchernen Formation als auch Resorption. Im Rahmen des Alt-

werdens und von Einflussfaktoren wie Glukokortikoidtherapie oder Östrogenmangel brechen die Proteinkomplexe auf, wodurch die Osteozyten in die apoptotische Phase übergehen. Folglich nimmt die Knochenstabilität ab [16-18].

Osteoklasten sind fusionierte hämatopoetische Stammzellen und damit polynukleäre Zellen, welche im Unterschied zu Osteoblasten ausdifferenziert sind. Sie stehen im Zentrum der Knochenresorption [19]. Für ihre Entwicklung sind die Zytokine „makrophage colony-stimulating factor“ (M-CSF) sowie „receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand“ (RANKL) entscheidend. Beide Zytokine werden von Osteoblasten und mesenchymalen Stammzellen exprimiert. Sie liegen gelöst oder membrangebunden vor [20]. Sowohl die Osteoklastenvorläufer als auch die reifen Osteoklasten interagieren über „receptor activator of NF- $\kappa$ B“ (RANK) mit RANKL. Hierdurch differenzieren sie aus [4]. Ebenso wichtig für die Differenzierung und Proliferation der Pro-Osteoklasten sowie für die Existenz der reifen Osteoklasten ist M-CSF [21]. Osteoprotegerin (OPG), ein regulatorisches Glykoprotein, gilt als Gegenspieler der Osteoklastengenese und -funktion. Nach der osteoblastischen Sekretion von OPG bindet es RANKL und inhibiert das Zusammenspiel zwischen den Knochen bildenden und zerstörenden Zellen, wodurch die Entwicklung reifer Osteoklasten gehemmt wird.



**Abbildung 1: Grobe Übersicht zur präosteoblastischen / stromalen Zellregulation der Osteoklastogenese.** Die Interaktion der Regulatoren wird als OPG/RANKL/RANK-System zusammengefasst. Für die Osteoklastenentwicklung sind Zytokine wie „makrophage colony-stimulating factor“ (M-CSF) sowie „receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand“ (RANKL) von Bedeutung. Diese werden von Osteoblasten / mesenchymalen Stammzellen exprimiert. Sowohl die Osteoklastenvorläufer als auch die reifen Osteoklasten interagieren über „receptor activator of NF- $\kappa$ B“ (RANK) mit RANKL bzw. über „Colony-stimulating factor-1 receptor“ (c-Fms) mit M-CSF. Hierdurch differenzieren sie aus. Das Glykoprotein Osteoprotegerin (OPG) gilt als Gegenspieler der Osteoklastengenese und -funktion. Nach der osteoblastischen Sekretion von OPG bindet es RANKL und inhibiert das Zusammenspiel zwischen den Knochen bildenden und zerstörenden Zellen. Schemata<sup>a</sup> von S. Khosla, Endocrine Research Unit, Mayo Clinic and Foundation, Rochester, Minnesota, USA [21].

Hinzu blockieren Östrogene die Osteoklastenaktivität, da sie stimulierend auf die OPG-Expression wirken. Diese Interaktion der Regulatoren bezüglich der Osteoklastengenese fasst man als OPG/RANKL/RANK-System zusammen [21-23]. Um Knochenresorption leisten zu können, binden Osteoklasten über Integrin-Rezeptoren an die ossäre Matrix –  $\beta_1$ -Integrine an Kollagene oder  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin an Sialoproteine und Osteopontin [9, 24]. Über Cathepsin K, Wasserstoff-Ionen und tartraresistente saure Phosphatase (TRAP) resorbieren die Osteoklasten enzymatisch den Knochen. Hierfür sezernieren sie die Stoffe in die nächstgelegene Resorptionslakune. Frei werdende Knochenmatrixbestandteile gelangen über Transportvorgänge in den Blutkreislauf [25]. Labordiagnostisch dienen Cathepsin K und TRAP als Marker der resorptiven Osteoklasteneigenschaft [26].

Bereits von Kindheit an finden permanente Umbauvorgänge am Knochen statt. Gewebeschäden, Schwankungen im Calcium-Phosphat-Haushalt oder Zellalterung sind hauptverantwortlich für die Dynamik am Knochengewebe [27]. Bedingt durch eine unterschiedlich verteilte Zellaktivität und Oberflächen-Volumen-Ratio werden pro Jahr 20 % der Substantia spongiosa und 5 % der Substantia compacta erneuert [28]. Die Knochenformation – das sogenannte „Modeling“ – steht in der Kindheit im Vordergrund. Das „Modeling“ ist durch eine Zunahme des Längenwachstums sowie veränderte Knochengeometrie & -größe gekennzeichnet. Beim Menschen verringert es sich spätestens ab der vierten Lebensdekade [29].

Der permanente Umbauprozess, auch als „Remodeling“ bezeichnet, ersetzt den primären Knochen schon ab dem ersten Lebensjahr [30]. Es trägt zum Erhalt der Knochenstabilität, -masse und -architektur bei [31]. Im Remodeling-Vorgang werden das lokale Bindegewebe mit versorgenden Blutgefäßen sowie Osteoblasten und Osteoklasten als zentrale Funktionseinheit „basic multicellular unit (BMU)“ zusammengefasst [32]. Insgesamt liegen im menschlichen Skelett ungefähr 35 Millionen BMUs vor [27]. Da jährlich ca. 10 % aktiviert werden, erfolgt pro Lebensdekade eine vollständige Erneuerung des humanen Skeletts [27]. Das „Remodeling“ durchläuft fünf Stadien: die Ruhe-, Aktivierungs-, Resorptions-, Formations- sowie Mineralisationsphase. Erstere ist von Osteozyten dominiert. Die Aktivierungsphase wird durch mechanische Druckunterschiede oder kleine Gewebeläsionen ausgelöst, wodurch diverse dendritische Zellen, aber auch „bone lining cells“ rekrutiert werden. Folglich werden die Adhäsion sowie der Differenzierungsprozess von Osteoklasten sichergestellt und die dritte Phase eingeleitet [33]. Diese dauert etwa zwei bis vier Wochen des kompletten „Remodelings“ [9] und wird durch den apoptotischen Zellzerfall der Osteoklasten beendet [34]. Es resultiert eine Resorptionslakune mit Monozyten, Osteozyten und Pro-Osteoblasten, welche in die vorletzte Phase übergehen. Die Formationsphase nimmt ca. zwanzig Wochen in Anspruch. Zunächst synthetisieren Pro-Osteoblasten „bone morphogenic proteins (BMPs)“. Im Anschluss produzieren Osteoblasten Kollagen und bauen im Bereich der Lakune neues Osteoid an. Die Mineralisationsphase beginnt frühestens vier Wochen später und beendet den „Remodeling-Prozess“ mit der Differenzierung von Osteozyten neben Osteoid [27].

Physiologischerweise greifen Vitamin-D-Metabolite, Parathormon (PTH), Parathormon-related-peptide (PTHrP) sowie Sexualhormone über die von Osteoblasten exprimierten Rezeptoren in den Knochenmetabolismus ein [35]. Ebenso stehen Knochenformation und -resorption im Gleichgewicht. Dennoch ist eine Dysbalance im Rahmen einer genetischen Unterfunktion der Osteoklasten (Osteopetrose/ Marmorknochenkrankheit)

möglich, was zu einer erhöhten Knochenmasse führt. Hingegen verursacht eine reduzierte Osteoblasten- oder vermehrte Osteoklastenaktivität eine Verringerung der ossären Masse, woraus eine Osteoporose inklusive gesteigertem Frakturrisiko resultieren kann [36].

## **3.2 Die Osteoporose**

### 3.2.1 Definition

Aktuell ist die Osteoporose als systemische Skeletterkrankung mit Zunahme der Knochenfragilität sowie der Frakturmeigung definiert. Ätiologisch liegen eine reduzierte Knochenmasse und mikroarchitektonische Schwächung des Knochengewebes vor. Nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) -Definition von 1994 wird eine Osteoporose diagnostiziert, sofern der Knochenmineralgehalt im Rahmen einer quantitativen dualen Röntgenabsorptiometrie (DXA) -Messung am proximalen Femur und/oder an der lumbalen Wirbelsäule um kleiner gleich -2,5 Standardabweichungen (SD) vom Durchschnittswert einer 20 bis 29 Jahre jungen Frau divergiert. Die gemessene Abweichung in SDs wird durch den T-Score ausgedrückt. Dies gilt für postmenopausale Frauen und männliche Wesen ab einem Alter von 50 Jahren. Ferner müssen bei der primären Osteoporose jegliche Erkrankungen mit einer verminderten Knochenmineraldichte (BMD - bone mineral density) ausgeschlossen sein [37]. Die erhobene BMD wird entweder zweidimensional – mittels DXA – als ossäre Masse pro Flächeneinheit oder dreidimensional – im Rahmen einer quantitativen Computertomographie (QCT) – als Knochenmenge pro Volumeneinheit dokumentiert [38]. Anhand des T-Scores klassifiziert die WHO vier Kategorien:

- Normale BMD: T-Score  $\geq -1$  SD
- Osteopenie/ verringerte BMD: T-Score  $-1 > x > -2,5$  SD
- Osteoporose: T-Score  $\leq -2,5$  SD
- Schwere Osteoporose: T-Score  $\leq -2,5$  SD &  $\geq 1$  Fraktur

Im klinischen Alltag wird bei einem T-Score von  $\leq -2,5$  SD von einer latenten Osteoporose gesprochen. Sobald eine Fraktur vorliegt, wird sie als manifest diagnostiziert [39].

Die Bezeichnung Z-Score dient zum Vergleich der BMD für andere Messtechniken und für spezifische Alters-, Geschlechts- sowie ethnischen Referenzpopulationen. Ein Z-

Score von -2 oder weniger wird als „unter -“ und ein solcher über -2 wird als „innerhalb der erwarteten Altersspanne“ definiert [6].

Der Knochenschwund lässt sich unter Berücksichtigung der Faktoren, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen, in zwei Hauptgruppen unterteilen: die primäre und sekundäre Osteoporose. Erstere liegt zu ca. 90 % vor und wird definitionsgemäß in die postmenopausale sowie senile Involutionsosteoporose eingeteilt. Ferner inkludiert sie die idiopathische Osteoporose, idiopathische juvenile Osteoporose und idiopathische Osteoporose junger Erwachsener. Die postmenopausale Typ-I-Osteoporose basiert vorwiegend auf einem Mangel an Östrogen und betrifft dadurch vermehrt Frauen. Zudem befällt sie vor allem den Trabekelknochen. Hingegen tritt die senile Typ-II-Osteoporose altersbedingt durch eine Insuffizienz der Osteoblasten auf. Somit steht sie im Zusammenhang mit dem Verlust von kortikaler sowie trabekulärer Knochenmasse. Hintergrund der sekundären Osteoporose sind zum Einen systemische Grunderkrankungen und hormonelle Dysfunktionen sowie zum Anderen medikamentöse Langzeittherapien, wie beispielsweise mit Glukokortikoiden oder Aromataseinhibitoren, und Immobilisation [6, 37-39].

Zur Vorhersage des Frakturrisikos und der Geschwindigkeit des Knochenverlusts bei unbehandelten Patienten dienen laut der „International Osteoporosis Foundation (IOF)“ biochemische Knochenumsatzmarker – „biochemical bone turnover marker (BTM)“. Sie umfassen für das „Remodeling“ zum Einen Resorptionsmarker, nämlich das Serum-C-terminale Telopeptid-Typ-I-Kollagen (s-CTX) und das Urin-N-Telopeptid (NTX), und zum Anderen Formationsmarker wie das Serum-Prokollagen-Typ-I-N-terminale Propeptid (s-PINP) [6].

### 3.2.2 Ossäre Veränderung

80 % der Knochenmasse sind beim ausgewachsenen Menschen kortikaler Knochen. Die relativen Anteile von spongösem und kortikalem Knochen unterscheiden sich in unterschiedlichen Skelettregionen. Im lumbalen Wirbelsäulenbereich findet man bis zu ungefähr 70 % trabekulären Knochen und im Schenkelhals sowie in der Diaphyse des Radius macht die Spongiosa etwa 50 % bzw. 5 % aus [39].

### **Makroskopischer Status**

Die Makroarchitektur bezieht sich auf die gesamte ossäre Geometrie und deckt Aspekte wie Knochenform und -größe ab [40]. Bereits vor über dreißig Jahren fand man geschlechtsbezogene morphologische Unterschiede heraus. Sowohl Frauen als auch

Männer durchlaufen eine endostale Knochenresorption sowie medulläre Expansion im Verlauf ihres Alterungsprozesses. Gleichzeitig weisen Männer eine subperiostale Ossifikationszone auf. Infolgedessen liegt beim männlichen Geschlecht eine geringere kortikale Knochenveränderung vor. Auf Seiten des weiblichen Geschlechts steht ein stärkerer Verlust der Spongiosa gegenüber, wodurch der Knochenmarkraum inklusive Fettmark deutlich zunimmt [41]. Neben der Veränderung der Kortikalisdicke spiegelt sich die Osteoporose ebenso in der intrakortikalen Porosität wider. Im Verlauf nimmt letztere deutlich zu [42, 43]. Dieser Umbau der Substantia compacta ist sehr relevant, da bereits minimale architektonische Veränderung die mechanische Knochenstabilität beeinflussen [44]. Zusammen mit der zunehmenden Porosität des kortikalen Knochens und der Trabekeldestruktion (Rarefizierung, Ausdünnung, geringere Verknüpfung/ architektonische Veränderung) ist dieser Prozess für den altersabhängigen Knochenverlust verantwortlich [39].

### **Pathophysiologie des osteoporotischen Knochenstoffwechsels**

Während des Alterns nimmt der Knochenumsatz bei Frauen sowie auch bei Männern stetig zu [45]. Normalerweise liegt der Beginn eines deutlichen Knochenschwunds bei Männern im Alter von 65 Jahren und bei Frauen im Alter von 50 Jahren [39]. Auf histologischer Ebene steht eine beeinträchtigte osteoblastische Knochenbildung der osteoklastischen Knochenresorption gegenüber. Diese Dysbalance wird durch eine verringerte Aktivität und Anzahl einzelner Osteoblasten [45] und zudem durch eine erhöhte Zellaktivität der Osteoklasten ausgelöst. Bei der Adhäsion der mehrkernigen Osteoklasten am Knochen kommt es zur Reorganisation des Zytoskeletts sowie der Zellmembran in vier verschiedene Domänen – die „Sealing Zone“, die „Ruffled Border“, die basolaterale und funktionelle sekretorische Einheit. Die „Ruffled Border“ wird durch einen dichten Ring von Filament-Aktin (F-Aktin) -reichen Podosomen der „Sealing Zone“ begrenzt, wodurch die Demineralisation der Knochenmatrix über Proteasen und Protonen stattfinden kann. Hierbei sind einige Vorgänge abhängig von Hydrolyaseenzymen der Guanosintriphosphat (GTP) -Familie. Nach Itzstein et al. steuern Ras homology (Rho) -GTPasen die Organisation von F-Aktin und Adhäsionsproteinen, um anschließend die Migration von phagischen Zellen zu beeinflussen. ADP-Ribosylierungsfaktor 6 (Arf6), Zellteilungskontrollprotein 42 (Cdc42), RhoA, *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac), sowie RhoU sind verantwortlich für den Podosomenverband und dessen Organisation im Sealing-Bereich. Die „Ruffled Border“ beinhaltet vesikuläre Transportwege, die von *Ras-like proteins from rat brain* (Rab) -GTPasen – vor allem lysosomales Rab7 – gesteuert werden. Die Aktivität der Ras-GTPasen bestimmt das Überleben der Osteoklasten. Die Funktion der GTPasen ist für

die posttranslationalen Prenylierung maßgebend. Sie ermöglicht die spezifische Lokalisation auf der Zielmembran [46].

Das bereits beschriebene Ungleichgewicht zwischen den knochenauf- und -abbauenden Zellen stellt einen essentiellen Pathomechanismus der Osteoporose dar [45]. Nach Raisz et al. gehören neben der übermäßigen Knochenresorption, mit resultierendem Knochenmassenverlust und mikroarchitektonischer Knochenstruktur, der verstärkte Abbau von Knochengewebe als Konsequenz einer nicht angemessenen Reaktion auf das „Remodeling“ sowie das Versagen im Laufe des Wachstums, eine optimale Skelettfestigkeit zu erreichen, dazu. Das „Remodeling“ findet sowohl an der Trabekeloberfläche als auch im Havers-System statt, wodurch eine massive Schwächung des Knochens entsteht. Im Wesentlichen bedingen die genannten Faktoren die Knochenfragilität und das gesteigerte Frakturrisiko des Knochenschwundes. Ebenfalls tragen ein Calcium- und Vitamin-D-Mangel sowie sekundärer Hyperparathyreoidismus zum Knochenmassenverlust bei [11, 47].

Nahezu 65 % des Skeletts machen die Knochenhauptbestandteile Calcium und Phosphat aus. Fast das gesamte Calcium (99 %) ist ossär fixiert. Das übrige Prozent des Calciums findet sich intra- oder extrazellulär. Davon liegen 9 % als Calciumkomplexe wie Calciumbicarbonat, 41 % proteingebunden und 50 % ionisiert vor [48]. Die Aufrechterhaltung eines konstanten extrazellulären ionisierten Calciumspiegels ist unerlässlich, weil das Elektrolyt auf viele biochemische Pfade einwirkt. Dieser Spiegel wird durch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den Calciumkonzentrationen im Darm, Knochen und Niere gesteuert. Die intestinale Nettoabsorption sowie der renale Netto-Calciumfluss sind bei gesunden, jungen Erwachsenen konstant [11, 39]. Bei einem Konzentrationsabfall des Calciums springen sogenannte Calcium Sensing Receptors (CaSR) der Nebenschilddrüse an und lösen daraufhin eine gesteigerte PTH-Sekretion aus [49]. Diese wird über einen negativen Feedbackmechanismus durch das 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibiert [50]. Den gleichen Effekt auf die PTH-Sekretion hat eine Hyperphosphatämie, welche jedoch meist Folge eines niedrigen Calciumspiegels ist. Zur Aufrechterhaltung der Calciumkonzentration wirkt PTH direkt ossär und renal sowie indirekt intestinal. Aus dem Knochen wird Calcium mobilisiert, über den Darm absorbiert und in der Niere tubulär vermehrt reabsorbiert [51]. Genau entgegengesetzt läuft dieser Mechanismus mit dem Phosphat [11].

Dem katabolen PTH-Effekt liegen zwei Phasen zugrunde: Zunächst bindet es an die Osteoblasten-Rezeptoren, wodurch eine Calciumpumpe aktiviert wird. Diese verschiebt Calcium aus dem „bone fluid“ in die extrazellulären Räume [48]. Hinzu kommt es län-

gerfristig zu einer Osteoklastenaktivierung und dadurch zur Freisetzung von Calcium und Phosphat [52]. Ferner sind beide extrazellulären Elektrolyte durch den Fibroblast Growth Factor 23 (FGF 23) reguliert. FGF 23 gilt als Hauptregulator der Phosphathomöostase [11].

Hall und Guyton et al. beschrieben das Calciferol (Vitamin D) als weiteren essentiellen Regulator des Calciumhaushalts [48]. Calcitriol – 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> – ist ein hormonell wirkender Metabolit des Vitamin-D-3s und verantwortlich für die intestinale Calciumresorption. Als Hauptregulator wird es renal gebildet und seine Synthese durch die extrazelluläre Konzentrationen von Calcium- und Phosphat, sowie Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1), FGF 23, Calcitonin, PTH und ebenso von sich selbst gesteuert [11, 39, 53]. Neben der vermehrten intestinalen Aufnahme steigert Calcitriol die renale Reabsorption von Calcium. In diesem Zusammenhang wird die PTH-Expression gehemmt. Das Vitamin D hat große Wirkung auf den Knochenmetabolismus sowie unter anderem auf die Stabilität des Knochens. Hinzu stimuliert es die Proteinsekretion von Osteoblasten wie AP, Osteocalcin und RANKL [54]. Im Rahmen eines Vitamin-D-Mangels resultiert durch die verringerte intestinale Calciumaufnahme und den möglichen sekundären Hyperparathyreoidismus eine reduzierte Knochenmineralisation, wodurch es zu einer Osteoporose mit gesteigertem Frakturrisiko führt [55].

Neben den erwähnten Mechanismen, die der Regulation des Knochenmetabolismus zugrunde liegen, sind Wechselwirkungen von lokalen Zytokinen, Transkriptions- und Wachstumsfaktoren sowie systemischen Hormonen mit anderen Knochenmarkzellen von Bedeutung. So spielt bei der Entstehung der Osteoporose die altersbedingte Veränderung des weiblichen Geschlechtshormons Östrogen eine wichtige Rolle [47]. Dieses Sexualhormon gilt als Schlüsselhormon für eine konstante Knochenmasse [56]. Es ist nicht nur essentiell, um die maximale Knochenmasse aufrechtzuerhalten, sondern auch, um das „Bone Mass“ von Frauen oder Männern überhaupt zu erreichen [39]. Wichtige Angriffspunkte des Östrogens sind das RANK und der dazugehörige Ligand RANKL, ebenso die Expression von Osteoprotegerin oder diversen Zytokinen sowie die Osteoklastenhemmung und Osteoblasten- bzw. Osteozytenstimulation [56]. Die Störung des Gleichgewichts zwischen Knochenbildung und -resorption durch einen Geschlechtshormonmangel überwiegt zu einem erhöhten Knochenumsatz und stellt die Hauptursache der Osteoporose bei über 50-jährigen Frauen und möglicherweise bei Männern dar. Sogar eine verkürzte Lutealphase kann beim weiblichen Geschlecht mit BMD-Veränderungen assoziiert sein. Zudem gehen Erkrankungen wie Anorexia nervosa oder eine sportbedingte Amenorrhoe mit einem Östrogenmangel bzw. geringer Knochenmasse einher. Aufgrund des Mangels werden im Knochenmark mehrere

Zytokine wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-  $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1) oder -6 freigesetzt, welche die Knochenresorption stimulieren und einen erheblichen Knochenverlust verursachen. Diese Erkenntnis wird durch Osteoprotegerin – ein Inhibitor der Osteoklastendifferenzierung und Teil der TNF-Rezeptor-Familie – bestärkt [39]. So resultiert aus der verminderten Östrogensynthese eine geringere Osteoprotegerin-Sekretion und dadurch eine vermehrte Resorption von Knochengewebe [57].

Im Laufe des Lebens initiiert Östrogen gemeinsam mit dem Growth Hormon (GH) und IGF-1 einen pubertären Wachstumsschub von ca. 4 Jahren. Hierbei nimmt die Skelettmasse um das Doppelte zu. Im Alter durchlaufen Frauen zwei bestimmte Phasen des Knochenverlusts, hingegen Männer nur eine. Beim weiblichen Geschlecht werden in der Postmenopause eine schnelle Frühphase von einer langsamen Spätphase differenziert. Die erste Phase beginnt mit dem Konzentrationsabfall der Sexualhormone und nimmt über eine Zeitspanne von etwa 6 Jahren ab. Diese Frühphase ist durch einen spongiösen Knochenverlust charakterisiert. Nach ungefähr fünf Jahren schließt sich daraufhin die zweite Phase bis zum Lebensende an. Die Spätphase ist durch einen sekundären Hyperparathyreoidismus, aufgrund eines östrogenbedingten Calciummangels, gekennzeichnet. Außerdem findet ein gesteigerter Abbau des kortikalen Knochens statt [56].

Neben Östrogen gilt Testosteron – ein weiteres Sexualhormon – als wichtiger Regulator für die Reifung des Skeletts. Das männliche Geschlechtshormon besitzt ähnliche Effekte wie das weibliche Sexualhormon auf den Knochenmetabolismus, jedoch beeinflusst es die Osteoblastendifferenzierung in anderen Stadien. Zudem stimuliert Testosteron das periostale Knochenwachstum und trägt somit zur Knochenstabilität bei [56].

### 3.2.3 Risikofaktoren und soziale/ sozial-ökonomische Tragweite

Nach der aktuellen Leitlinie des Dachverbands Osteologie e.V. von 2017 begünstigen multiple Risikofaktoren die Entwicklung einer Osteoporose und die damit einhergehenden Frakturen. Für einen klinischen Risikofaktor muss prospektiv ein  $\geq 1,5$ -faches Risiko für typische Frakturlokalisationen der Osteoporose wie Wirbelkörper, Hüfte, Ober- oder Unterarm vorgelegen haben. Diese Vielzahl von Einzelrisikofaktoren lassen sich in drei Rubriken gliedern: die allgemeinen Risiken, die Frakturrisiken durch eine medikamentöse Therapie sowie die Risiken im Rahmen von Grunderkrankungen [37].

Unter den allgemeinen Risiken lassen sich das Lebensalter, Geschlecht, Immobilität, Sturzneigung (auch bezüglich neurologischer Erkrankungen), Rauchen inklusive chro-

nisch obstruktive Lungenerkrankung, Alkoholabusus, Untergewicht sowie Natrium-, Calcium-, Folsäure-, Homozystein-, Vitamin-D, -K und B12-Mangel zusammenfassen. Demgegenüber gelten als medikamentöse Frakturrisiken die längerfristige Therapie mit Glukokortikoiden, Schleifendiuretika, Aromataseinhibitoren, Antidepressiva und -epileptika, Opiode, Protonenpumpenhemmer, Heparin, Gonadotropin-Releasing-Hormon-Agonisten und -Antagonisten sowie Kontrazeptiva. Spezielle Grunderkrankungen wie das Cushing-Syndrom, der Diabetes mellitus, der primäre Hyperparathyreoidismus, die Hyperthyreose, die Hypophyseninsuffizienz und die Rheumatoide Arthritis sowie die Alzheimer Erkrankung stellen die wichtigsten Risikofaktoren der dritten Rubrik dar [37].

Die Osteoporose und damit assoziierten Frakturen haben sozio-ökonomisch eine sehr große Relevanz. Sowohl in den Industrie- also auch Entwicklungsländern wird die Volkskrankheit mit zunehmendem Alter der Bevölkerung zu einer großen Belastung [39]. Beginnend mit dem Krankenhausaufenthalt zur Frakturversorgung führen Hüftfrakturen zu einer erheblichen Morbidität sowie Mortalität des Patienten und limitieren dessen Lebensqualität [58]. Gerade Menschen im höheren Alter kommen nach solch einem einschneidenden Ereignis nicht mehr ohne Gehilfen aus. Gut ein Viertel ist auf Plätze im medizinisch betreuten Wohnen angewiesen. Dennoch hat das Selbstmanagement einen großen Stellenwert. Neben der therapeutischen Basis aus adäquater Bewegung und gezielter Ernährung spielt die Motivation (evt. Selbsthilfegruppe) eine relevante Rolle [5, 59].

Costa et al. verzeichnete, dass nichtvertebrale Frakturen überwiegend sturzbedingt auftreten, wohingegen sich Wirbelkörperfrakturen bereits bei Alltagstätigkeiten ereignen können [59]. Hierbei belasten die steigenden Fallzahlen der Kliniken durch immens hohe Ausgaben das Gesundheitssystem. Eine Studie analysierte für 2009 diverse Frakturtypen und die damit verbundenen Gesamtkosten. Im stationären Bereich ergaben sich für alle Frakturen unterschiedlicher Ätiologie Jahresausgaben der Krankenhäuser von etwa 2,4 Milliarden Euro, wovon 36 % – 860 Millionen Euro – der Behandlung von Osteoporose geschuldet waren [60]. Hinzu kommen hohe Pflegekosten, die sich über Jahre hinweg auswirken [5, 59]. Zur präventiven Basis war bereits die Nützlichkeit eines BMD-Screenings der Allgemeinbevölkerung Gegenstand vieler Diskussionen [39]. Doch die einzige Möglichkeit, diesen Trend einzudämmen, besteht in einer Verbesserung der präventiven, diagnostischen sowie therapeutischen Maßnahmen durch neue und erkenntnisbringende Forschungsansätze.

### 3.2.4 Tiermodelle

Als biomedizinisches Modell wird ein getreues Abbild von biologischen Abläufen bzw. Strukturen definiert. In Bezug auf den Tierversuch sollten die Ergebnisse auf eine Zielspezies wie der Mensch übertragbar sein. Hierbei fungiert das Versuchstier als Äquivalent [61]. Trotz strenger Modellbedingungen, beispielsweise durch Standardisierung des Umfelds oder Bestimmung einer spezifischen Genetik des Tierstammes, liegt eine natürliche Variabilität von Merkmalen vor. Deshalb sind quantitative Versuchsergebnisse lediglich Wahrscheinlichkeitsaussagen, die auf dem Vergleich von Versuchsgruppen basieren. Zu ihrer Evaluierung werden statistische Methoden genutzt. Im nächsten Schritt müssen die Tierversuchsergebnisse der biomedizinischen Grundlagenforschung im Rahmen der klinischen Forschung am Menschen bestätigt und zum Nutzen geprüft werden. Auf diese Art und Weise sind alle gegenwärtigen Medikamente und Vakzine oder Behandlungs- sowie OP-Methoden entwickelt worden. Allerdings gibt es noch immer zahlreiche therapeutische Schwachstellen oder Wissenslücken über Krankheiten, die weitere Tierexperimente in der Zukunft begründen [62].

Die sozial-ökonomische Tragweite der Osteoporose begründet ihren relevanten Forschungsbedarf hinsichtlich der Etablierung von Tiermodellen, um bahnbrechende Behandlungsstrategien wie zum Einen neue Medikamente und zum Anderen neue Biomaterialien zur Versorgung von Knochenbrüchen zu erforschen. Mittlerweile sind einige Modelle von Versuchstieren beschrieben. Unter diesen Tiermodellen nimmt die Ratte einen hohen Stellenwert ein, da sie mit geringen Kosten, einer guten Praktikabilität und Verfügbarkeit verbunden ist sowie einen fortschrittlichen Wissenstand der Skelettphysiologie aufweist [63]. Ferner ist das ovine Großtiermodell in der Osteoporoseforschung von entscheidender Bedeutung. Schafe kommen dem humanen Knochenmetabolismus durch „Remodeling“/BMUs und -aufbau mit Substantia compacta und spongiosa sehr nahe. Außerdem stellen sie ein fügsames Zuchtvieh dar. Ähnlich wie das Kleintiermodell der Ratte ist das Schafmodell breit verfügbar und durch eine einfache sowie kostengünstige Tierhaltung gekennzeichnet [64, 65]. Für ein osteoporotisches Modell wurde die Eignung weiterer Tierspezies wie Maus, Kaninchen, Fisch sowie Schwein, Affe oder Hund beschrieben [61, 63, 66, 67].

Nach Hau et al. können Tiermodelle in fünf Gruppen eingeteilt werden, von denen die aufgelisteten Drei die Wichtigsten sind: das induzierte (experimentelle), das spontan-genetische sowie das transgene Tiermodell [61]. Im Folgenden wird auf die Osteoporoseinduktion eingegangen.

### 3.2.5 Techniken der Osteoporoseinduktion

Nach Lill et al. finden sich osteoporotische Knochenveränderungen nur bei der humanen Spezies. Zoologisch sind bislang keine Krankheitsbilder bekannt, die den Knochenschwund des Menschen weder hormonell oder metabolisch, noch anatomisch imitieren [68]. Die Entwicklung eines osteoporotischen Knochenstatus kann mittels verschiedenster Vorgehensweisen provoziert werden [69].

#### **Experimentelle Ovariectomie als Goldstandard**

Bei der Frau ist der Geschlechtshormonmangel in der Menopause verantwortlich für den Knochenschwund. Demnach lässt sich die Osteoporose durch einen Östrogenmangel mittels beidseitiger OVX am femininen Tier reproduzieren. In dieser Situation dominiert das „Remodeling“ – vor allem die gesteigerte resorptive Phase – an der Trabekeloberfläche, wodurch die Knochensubstanz verloren geht. Deutlich geringer ausgeprägt ist dieser Substanzverlust in der Kortikalis [66, 69]. Ein weitverbreitetes und geeignetes Tiermodell zur postmenopausalen Osteoporoseforschung stellt die OVX-Ratte dar [67, 69, 70]. Im Vergleich zum reifen menschlichen Skelettsystem haben junge Ratten einen abweichenden Knochenstoffwechsel. Bei der Ratte herrscht das „Remodeling“ erst nach dem Erreichen der „Peak-Bone-Mass“ vor. Diese Knochenreife ist mit frühestens 10 bis 12 Monaten erreicht und essentiell für den experimentellen Goldstandard als Basis der postmenopausalen Osteoporose [69, 71]. So zeigten Netto et al., dass ausgewachsene senile Ratten (56 Wochen alt) die altersbedingten Skelettveränderungen vielmehr aufweisen als Ratten im Alter von 26 Wochen [72]. In der Vergangenheit hat neben dem Kleintiermodell der Ratte das Schaf als Großtiermodell Beachtung gefunden. In diversen Studien an Schafen konnte durch eine kombinierte Intervention aus OVX, Glukokortikoiden sowie defizitärer Diät der humane Knochenverlust auf zellulärer Ebene imitiert werden [73]. Darüber hinaus erzielte die alleinige OVX bei polyöstrischen Merino-Landschafen Erfolg. So bestätigte sich die Eignung des Schafmodells für die Forschung an Osteoporose [74].

#### **Glukokortikoid-induzierte Osteoporose**

Die Gruppe der Steroidhormone beinhaltet unter anderem die Glukokortikoide, welche in der Nebennierenrinde (Zona fasciculata) physiologisch synthetisiert werden. Im Rahmen einer therapeutischen Substitution oder endogenen Überproduktion sind etliche Nebenwirkungen möglich. Die Osteoporose stellt eine der wichtigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen der Steroidtherapie dar [75]. Mehrere Mechanismen bedingen diesen Effekt: Zum Einen induzieren die Glukokortikoide eine Osteozytenapoptose, wodurch eine bis um das siebenfach erhöhte Reduktion der Knochenstärke ent-

steht. Zum Anderen nehmen die Osteoblastenzahl und -differenzierung ab, wodurch der Knochenaufbau stagniert [76-79]. Die Hochregulation von RANKL und niedrige OPG-Spiegel führen zu einer prolongierten Lebensdauer der Osteoklasten. Hierdurch steigt die Knochenresorption um ein Vielfaches an [80-82]. Ferner hat die beeinträchtigte Calciumaufnahme durch Glukokortikoide negative Auswirkung auf die Knochenmineralisierung [83]. So bestätigte Nitta et al. die Osteoporoseinduktion an weiblichen Ratten mittels Glukokortikoid-verursachtem Knochenverlust [84]. Ding et al. wies gleichermaßen nach, dass der Einsatz von Steroiden am femininen geschlechtsreifen Schaf innerhalb weniger Monate eine deutliche Reduktion des ossären Volumens bewirkt sowie zu einer mikroarchitektonischen Veränderung der Spongiosa und Kortikalis führt [85]. In diesem Zusammenhang sollte auf eine Kortisoninjektion geachtet werden, da Schafe im Vergleich zum Menschen keine Monogastrier sind. Die Metabolisierung der oral applizierten Medikamente wäre nicht mit der des Menschen vergleichbar [67].

### **Forcierte Osteoporose durch multiparametrisches Arbeiten**

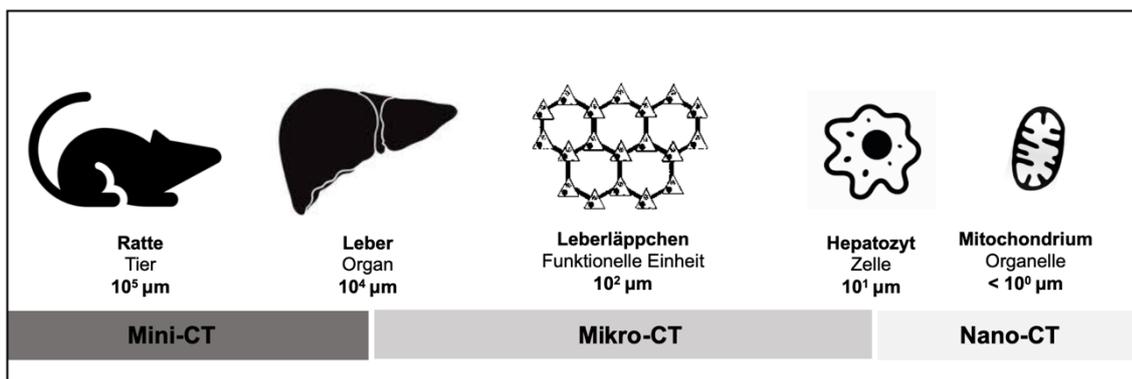
In der Forschung sind neben der OVX oder Steroidapplikation, eine Calcium- sowie Vitamin D-defizitäre Diät und deren Kombination gängige Methoden, um negativen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel auszuüben [68]. Die ovariectomierte Ratte gilt hierbei als Goldstandard [69-71, 86, 87]. Des Weiteren führen Tageslichtentzug sowie eine längerfristige Immobilisation zur verringerten Knochenmineralisierung und gesteigerten Knochenresorption. Die Aktivität kann sowohl chirurgisch in Form von Sehnen-, Nerven- oder Rückenmarksresektion, aber auch konservativ, beispielsweise durch Schienen, manipuliert werden [86]. Neben der hormonell-metabolischen Ätiologie können genetische Faktoren zur Pathogenese der Osteoporose beitragen. So spielen auch Knock-out-Experimente eine wesentliche Rolle im Bereich der Osteoporoseforschung [69, 81].

### **3.3 Die hochfokussierte Computertomographie**

Heutzutage kommen zur Visualisierung knochenspezifischer Osteoporoseveränderungen diverse diagnostische Verfahren zum Einsatz. Neben der quantitativen Sonographie (QUS) und DXA hat die QCT eine relevante Aussagekraft [37]. Im Folgenden wird aufgrund der Arbeitsrelevanz selektiv die Computertomographie (CT) erläutert:

Basierend auf der Entdeckung der X-Strahlen durch den Physiker W. C. Röntgen im November 1895 repräsentiert die CT eine der bedeutendsten Entdeckungen in der

Medizintechnik [88]. Hierfür wurden der Brite Godfrey Hounsfield und der Amerikaner Allan Cormack im Jahre 1979 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet [89]. Die CT ist ein dreidimensionales Bildgebungsverfahren bei dem Projektionsbilder mittels Röntgenstrahlen in fortlaufenden Blickwinkeln um die Z-Achse eines Objekts aufgenommen werden. Anschließend wird ein tomographischer Rekonstruktionsalgorithmus angewandt, um eine Serie zusammenhängender und überlagerungsfreier Dünnschichtbilder zu erzeugen. Diese transaxialen Schnittbilder bestehen aus Voxeln, wobei jedes Volumenelement einem Grauwert in Hounsfield-Einheiten entspricht [90]. Im Laufe der Weiterentwicklung war mit der Spiral-CT – um die 1990er – ein neuer Meilenstein in der technischen Bildgebung gesetzt. So konnten Datensätze während eines kontinuierlichen Tischvorschubs und einer fortlaufenden Röhren-Detektorrotation mittels spiralförmiger Abtastung des Scanvolumens akquiriert werden. Die Option der dreidimensionalen Objektdarstellung wurde durch bestimmte Bildverarbeitungsverfahren möglich. Im Jahre 1998 erschien durch die Erweiterung der Detektorreihen in der Gantry der erste Vierschicht-Spiralscanner. Hiermit konnten vier transaxiale Ebenen gleichzeitig erfasst werden [91]. Im klinischen Alltag sind zwischenzeitlich Multi-Slice-Systeme mit maximal 320 Schichtebenen sowie in Dual-Source-Technik möglich [89, 92]. Seit 1982 gewinnen in der biomedizinischen Forschung Computertomographen im Mikrometer- und Submikrometerbereich zunehmend an Bedeutung. Wie in Abbildung 2 dargestellt, können drei Ebenen der mikroskopischen CT anhand ihrer räumlichen Auflösung differenziert werden: die Mini-, Mikro- sowie Nano-CT [90].



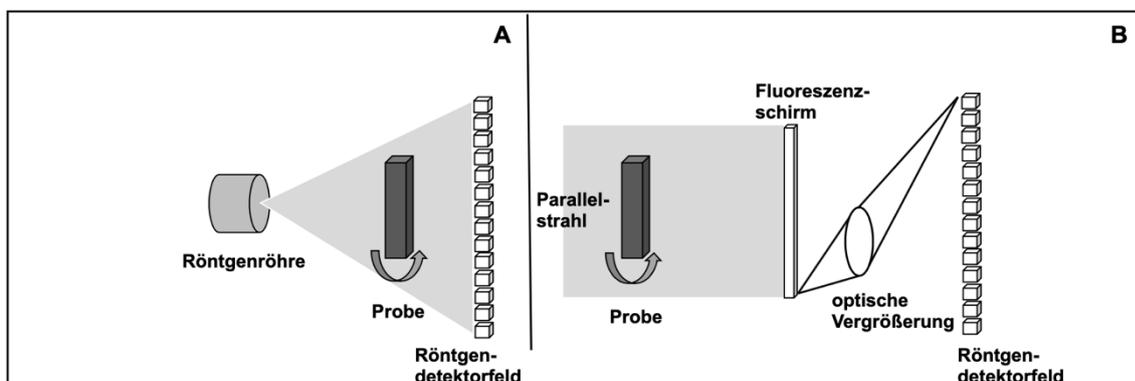
**Abbildung 2: Selektive Betrachtung der Computertomographie in der biomedizinischen Grundlagenforschung.** Illustration<sup>b</sup> angelehnt an Erik L. Ritman, Department of Physiology and Biomedical Engineering, Mayo Clinic, College of Medicine; Rochester, Minnesota, USA[90].

### 3.3.1 Technische Prinzipien – Mikro- und Nano-Computertomographie

In der letzten Dekade haben sich in der Grundlagenforschung die Mikro-Computertomographie (Mikro-CT/ $\mu$ CT) und NCT für die Analyse sowie Quantifizierung von histologischen Proben technologisch etabliert [93, 94].

#### Mikro-Computertomographie

Das  $\mu$ CT-System basiert wie die CT auf der Schnittbildgebung durch Röntgenstrahlen, welche durch Mikro-/ Feinfokusröhren mit Reflektions- oder Transmissionsanoden erzeugt werden. Allerdings ist bei einer hochauflösenden Objektdarstellung mit einer isotropen Voxelgröße von 5 bis 50  $\mu$ m ein deutlicher Unterschied zu erkennen. In Abhängigkeit des  $\mu$ CT-Scanners definiert die Strahlenemission in Form von Fächer- oder Kegelstrahlgeometrie die Detektorart – entsprechend Zeilen- oder Flächendetektor [95]. Wie in Abbildung 3 schematisch zu erkennen, ist ein ex-vivo-Mikro-CT grundlegend aus der Strahlenquelle, dem Probenschlitten und Detektor sowie der essentiellen Hard- und Software aufgebaut [90]. Hier sind hingegen klinischer Multi-Slice-CTs die Strahlungsquelle und der Detektor ortsfest und die Probe rotiert selbst in definierten Winkelschritten im Verhältnis zur Röhre um die eigene Z-Achse. Das Untersuchungsobjekt wird mittels der Probenbühne/ -schlitten in bestimmter Distanz zwischen Röntgenröhre und Kamera positioniert.



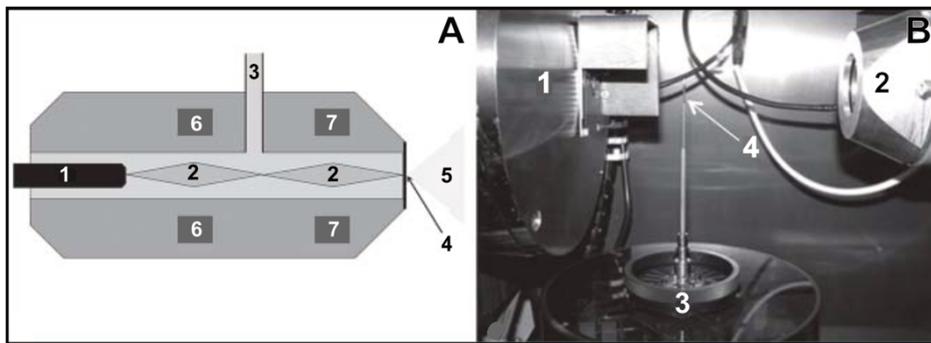
**Abbildung 3: Vereinfachtes Schema<sup>c</sup> der Mikro-CT.** Grundaufbau aller Mikro-Computertomographen sind die Röntgenröhre, der Prüfling sowie das Abbildungsgerät. Jede Methode birgt diverse Vorteile und Einschränkungen. **(A)** Dargestellt ist die konventionelle Röntgenkegelstrahlgeometrie. Die Probe projiziert sich vergrößert auf dem Röntgendetektorfeld. **(B)** Graphische Darstellung der optischen Vergrößerung einer kongruenten Aufnahme. Mithilfe einer optischen Linse oder einer faseroptischen Kopplung (hier nicht abgebildet) kann das Bild vergrößert werden. Angelehnt an Erik L. Ritman, Department of Physiology and Biomedical Engineering, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, Minnesota, USA[96].

Infolge des Probenabstands zum Fokus und der Objektgröße lässt sich eine variable geometrische Vergrößerung einstellen. Hierbei darf ein gewisser Abstand nicht unterschritten werden, um bei der Bildberechnung Unschärfen sowie Artefaktphänomene zu vermeiden. Ferner ist der maximale Zoomfaktor durch die Brennfleckgröße limitiert, denn nur durch eine hohe Strahlungsintensität in Kombination zu einem kleinen Fokus, kann eine optimale Bildauflösung erreicht werden. Allenfalls verringert sich die Röhrenleistung bei Reduktion der Fokusgröße aufgrund der thermischen Belastung, wodurch die erforderliche Strahlungsintensität nicht erzeugt werden kann [95]. In der mikroskopischen Bildgebung wird den genannten Problemen (Bildvergrößerung & -auflösung) durch eine längere Scanzeit und einen wesentlich geringeren Objektdurchmesser im Vergleich zum klinischen Alltag entgegengewirkt [97, 98].

Nach Strahlenemission bei einer Spannung zwischen 10 bis 150 kV und einer Stromstärke von 40 bis 100  $\mu\text{A}$  treffen die abgeschwächten Röntgenstrahlen auf eine aus Caesiumiodid sowie Thallium bestehenden Szintillatorschicht. Die dort registrierte Bildaufnahmeinformation wird in Lichtimpulse konvertiert und faseroptisch an den gekühlten Flachbilddetektor weitergesendet. Ein Frame-Grabber steht mit dem aus maximal  $2240^2$  Pixeln bestehenden Detektor in Verbindung, digitalisiert die analoge Information und übermittelt sie an das jeweilige Computersystem [95, 99-101]. Aus den digitalisierten Rohdaten wird per Feldkamp-Algorithmus mittels Rückprojektionstechnik sowie Konvolution ein Volumendatensatz mit isotroper Voxelgröße gespeichert [95, 102], welcher nach Rekonstruktion eine dreidimensionale Objektdarstellung ermöglicht [95].

## Nano-Computertomographie

Der oben genannten  $\mu$ CT steht der Nano-Computertomograph zur Mikrostrukturanalyse gegenüber. Vor der Entwicklung der ersten NCTs durch Bruker® im Jahre 2005 war die dreidimensionale Darstellung von sehr kleinen Objekten bislang nur mithilfe der Synchrotrontechnik möglich [95]. Wie der Abbildung 4 zu entnehmen, handelt es sich bei dem vorgestellten System um eine Transmissionsröhre, d.h. das Röntgenfenster und der Brennfleck fallen zusammen. Der Röhrengrunderbau ähnelt dem des  $\mu$ CTs: Zwischen der Strahlungsquelle mit dem Röntgenfenster und der Kameraeinheit befindet sich der auf der Drehbühne montierte Probenhalter.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Technik einer Nano-Computertomographie.** *Nicht maßstabsgetreu.* **(A)** Muster einer Transmissionsröhre: Die Hersteller spezifische Kathode (1) emittiert den Elektronenstrahl (2). Durch die Verbindung (3) zu einer stromabwärtigen Vakuumpumpe wird ein Vakuum in der Transmissionsröhre aufrechterhalten. Das Röntgenfenster sowie der Fokus bestehen aus einer Berylliumglasplatte mit einem aufgedampften Wolframüberzug (4). Bei der erzeugten Strahlung (5) handelt es sich nicht um ein kollimiertes Bündel - wie bei einer Sammellinse. Somit liegt hier keine auf den Detektor abgestimmte Kegelstrahlgeometrie vor. Hingegen hat die Strahlung einen der Herstellerangabe entsprechenden Öffnungswinkel. Durch regulierbare elektromagnetische Kondensator- (6) und Objektivlinsen (7) wird die Nanofokussierung des Röntgenstrahls ermöglicht. **(B)** Grunderbau einer Nano-Computertomographie: Zwischen der Röntgenröhre (1) mit dem Röntgenfenster und der Kameraeinheit (2) befindet sich die Drehbühne (3) mit montiertem Probenhalter (4). Die gewünschte geometrische Vergrößerung wird durch Verschieben entlang der Z-Achse erreicht, während die Probe durch seitliche und vertikale Bewegungen im Sichtfeld zentriert werden kann. Abbildung<sup>d</sup> von Kampschulte M et al. Nano-Computed Tomography: Technique and Applications. Fortschr Röntgenstr 2016[101].

Die Röntgenröhre des verwendeten NCTs „SkyScan\_2011“ hat kein konstantes Vakuum, weshalb eine Saugpumpe kontinuierlich ein stabiles Vakuum erzeugt. Der von der aus Lanthanhexaborid bestehende Glühkathode emittierte Elektronenstrahl wird durch zwei horizontal sowie vertikal verbundene Kondensorelektronenlinsen fokussiert. Die Anode besteht aus einer Berylliumglasplatte, welche mit Wolfram beschichtet ist. Hier erfolgt die Erzeugung von Röntgenstrahlung bei einer Spannung von 20 – 80 kV und einem Strom von 100 –200  $\mu$ A. Die Belichtungsgeometrie des Detektors ist analog zu der des Flachbilddetektor des Mikro-CTs. Eine maximale Ortsauflösung im Submikrometerbereich wird möglich, da das Untersuchungsobjekt näher am Brennfleck positioniert werden kann und der Durchmesser des nanofokussierten Brennflecks geringer als bei der klassischen  $\mu$ CT ist. Abhängig von der gewünschten räumlichen Auflösung können Fokusgrößen zwischen < 400 und 600  $\eta$ m realisiert werden. Allerdings ist zu beachten, dass die resultierende Wärmeenergie nicht aktiv umgeleitet werden kann, weshalb ein geringerer Röhrenstrom als in der  $\mu$ CT verwendet wird. Infolgedessen liegt eine reduzierte Photonendichte vor. Zusätzlich ist eine Signalverstärkung des Detektors aufgrund des geringeren Raumladungseffekts der Strahlungsquelle bei gleichzeitig niedrigerer Spannung erforderlich. Diese technischen Besonderheiten verursachen ein verstärktes Rauschen und Bildstörungen [101].

### 3.3.2 Morphometrie der ossären Mikroarchitektur und Knochenmineralisierung

Nach den Richtlinien für die Beurteilung von Knochenmorphometrie von Bouxsein et al. in Anlehnung an die Nomenklatur von der „American Society for Bone and Mineral Research“ (ASBMR) wird zur Datenquantifizierung und standardisierten Beschreibung Schwerpunkt auf die folgenden Strukturparameter gelegt: Knochenvolumenanteil (BV/TV) [%], Trabecular Number (Tb.N) [1/mm], Trabecular Thickness (Tb.Th) [mm] bzw. Cortical Thickness (Ct.Th) [mm] und Trabecular Separation (Tb.Sp) [mm] [103-106]. Additiv wird der Structure Model Index (SMI) beschrieben, um die Trabekelmorphometrie zu verdeutlichen [107]. Analog zur QCT im klinischen Alltag kann die Knochenmineraldichte „Bone mineral density“ oder die Gewebemineraldichte „Tissue mineral density“ (TMD) mittels synchroner Calciumhydroxyapatit-Phantom-Untersuchung bestimmt und hierdurch die Knochenmineralisierung valide verglichen werden [101, 108].

Zur Analyse der NCT werden ebenso morphometrische Variablen und ortsspezifische Grauwertparameter erhoben: Mean Grayscale Density Osteocyte, Mean Grayscale Density Mineralized Matrix, Grayscale Density Ratio R [109], Mean Osteocyte Volume

$[\mu\text{m}^3]$  und Mean Osteocyte Number  $[1/\mu\text{m}^3]$ . Zur übersichtlichen Erläuterung wird auf die Definition und Bedeutung der einzelnen Parameter tabellarisch eingegangen:

Tabelle 1: Strukturparameter der Spongiosa und Kortikalis für die Analyse der  $\mu$ CT

STRUKTUR-PARAMETER	DEFINITION
<b>BV/TV</b> [%]	Das segmentierte Volumen des trabekulären Knochens (Bone volume – BV) in $\text{mm}^3$ wird im Verhältnis zum Gesamtvolumen des Probenumfangs (Tissue volume – TV) in $\text{mm}^3$ mit Aussparung der Kortikalis als Knochen-volumenanteil (BV/TV) in % angegeben.
<b>BMD</b> [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ]	Zur parametrischen Darstellung des durchschnittlichen Mineralsalzgehaltes einer Volume of interest mit Knochenmark und Spongiosa wird die Knochenmineraldichte (Bone mineral density – BMD) in $\text{g}/\text{cm}^3$ verwendet. Bouxsein et al. beschrieb die BMD als durchschnittliche Knochen- und Weichgewebedichte.
<b>Tb.N</b> [1/mm]	Als Maß für die durchschnittliche Anzahl von Trabekeln pro Längeneinheit gilt die Trabecular Number (Tb.N), welche somit in 1/mm einheitlich dokumentiert wird. Über folgende zwei Formeln ist eine Berechnung möglich: $\text{Tb.N} = (\text{BV}/\text{TV})/\text{Tb.Th}$ oder $\text{Tb.N} = 1/(\text{Tb.Th} + \text{Tb.Sp})$ .
<b>Tb.Th</b> [mm]	Nach Hildebrand et al. wird die durchschnittliche Trabekeldicke (Trabecular thickness – Tb.Th) in Millimetern anhand multipler Messungen ausgehend von zufälligen Punkten des Trabekelgerüsts innerhalb des Probenumfangs kalkuliert. Algorithmisch werden mithilfe von Sphären innerhalb der Trabekel um die willkürlichen Punkte dreidimensionale Abstände berechnet. Der durchschnittliche Durchmesser aller unzähligen Kugeln repräsentiert die jeweilige Objektdicke.
<b>Tb.Sp</b> [mm]	Den Durchschnittsabstand der einzelnen Trabekel untereinander (Trabecular separation – Tb.Sp) in Millimetern wird prinzipiell analog der Kalkulation der Tb.Th bestimmt. Anatomisch stimmt sie mit der Dicke des intertrabekulären Knochenmarkraums überein.
<b>SMI</b>	Zur Quantifizierung der spongiösen Mikroarchitektur wurde von Hildebrand und Rüegsegger der Structure Model Index (SMI) eingeführt. Über Oberflächen- und Volumenwerte lässt sich der dimensionslose Strukturparameter berechnen. Der SMI ist eine Ratio zur standardisierten Angabe in welcher Ausprägung die Spongiosa aus Platten oder Stäben besteht. Bei einem Wert von 0 handelt es sich um ein Plattenmodell. Hingegen liegt eine Stabstruktur bei einem Wert von 3 und ein sphärisches Modell bei 4 vor. Zwischenwerte widerspiegeln das Vorliegen beider Geometrien. Bei Negativwerten können Knocheneinbuchtungen bzw. Areale, die mit mehr als die Hälfte von Knochen umgeben sind, vorkommen. Der SMI drückt die osteoporotische Knochenstrukturveränderung aus.
<b>Ct.Th</b> [mm]	Die Durchschnittsdicke der Kortikalis (Cortical thickness – Ct.Th) wird analog des Messverfahrens der mittleren Trabekeldicke ermittelt und in

	Millimetern angegeben.
<b>TMD</b> [g/cm <sup>3</sup> ]	Den mittleren Mineralsalzgehalt der Kortikalis, entsprechend eines Probenvolumens ohne Weichgewebe, spiegelt die Gewebemineraldichte (Tissue mineral density – TMD) in g/cm <sup>3</sup> wider.

Tabelle 2: Strukturparameter der zellulären Analyse der NCT

<b>STRUKTUR-PARAMETER</b>	<b>DEFINITION</b>
<b>mean grayscale density osteocyte</b>	Die Graustufenverteilung der Osteozytenlakunen wird willkürlich anhand multipler Zelllakunen (30 Stück pro Trabekelregion) nach Segmentierung und mithilfe Boolescher Algebra manuell über die Software bestimmt. Sie soll als Referenz dienen.
<b>mean grayscale density mineralized matrix</b>	Die perilakunäre Zone wird standardisiert als Saum von 6 Voxeln festgelegt. Die ermittelte Graustufenverteilung der umliegenden mineralisierten Matrix dient als Maß für spezifische Vorgänge innerhalb der osteoporotischen Knochenveränderungen.
<b>grayscale density ratio R</b>	Das Verhältnis R der Graustufenverteilung berechnet sich angelehnt an Pauwels et al. wie folgt: $R = \frac{\text{Durchschnittsgraustufe der mineralisierten Matrix} - \text{Durchschnittsgraustufe des Osteozyts}}{\text{Durchschnittsgraustufe der mineralisierten Matrix}}$ Dieses quantitative Maß R ermöglicht einen besseren Vergleich zwischen den zwei gemessenen Kontrastwerten der zwei morphologisch voneinander unabhängigen Bereiche.
<b>mean osteocyte volume</b> [μm <sup>3</sup> ]	Zur morphometrischen Analyse wird das zelluläre Durchschnittsvolumen der Osteozyten (Mean osteocyte volume) in Kubikmikrometern dokumentiert.
<b>mean osteocyte number</b> [1/μm <sup>3</sup> ]	Die mittlere Anzahl der Osteozyten pro μm <sup>3</sup> wird studienspezifisch pro trabekulärer Probe angegeben. Es wird ein zentraler von einem peripherem Trabekelbereich differenziert.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Laboranalytik – Artikel, Geräte, Instrumente sowie Software

Tabelle 3: Laboranalytik – Übersicht zu Artikel, Geräte, Instrumente sowie Software.

Laborartikel	Name & Charakteristika	Herkunft
	Formaldehyd-Lösung 3,5 – 3,7 % (neutral gepuffert mit Methanol stabilisiert)	Otto Fischer GmbH & Co KG. – Saarbrücken, Deutschland
	Isotone Kochsalzlösung 0,9 % (Infusionslösung, Natriumchlorid)	B BRAUN, Melsungen AG / Deutschland
	Trockeneis-Pellets (CO <sub>2</sub> )	Restbestand BFS, Giessen
	Parafilm <sup>®</sup> M <sup>®</sup> Laboratory Film	I Bemis <sup>®</sup> Company, INC.
	Cellstar <sup>®</sup> Tissue Culture Dishes	USA
	Injekt <sup>®</sup> 20 ml, Luer Solo	B BRAUN, Melsungen AG / Deutschland
	BD Microlance <sup>™</sup> 3 (20 G, 0,9 x 40 mm)	BD Becton Dickinson S.A. Fraga / E – Spanien
	Brozell Universal Boxen „extra saugstark“	Brod, Hanau / Deutschland
	Vasco <sup>®</sup> Nitril white M	B BRAUN, Melsungen AG / Deutschland
<b>Geräte &amp; Instrumente</b>		
	Mikro-CT – Scanner SkyScan 1173 (X-Ray Microscope – Microtomograph)	Bruker <sup>®</sup> microCT – Kontich, Belgien
	Nano-CT – Scanner SkyScan 2011 (X-Ray Nanotomograph)	Bruker <sup>®</sup> microCT – Kontich, Belgien
	Lupenleuchte ALCO (LED, 5 Dioptrien)	ALCO-Albert GmbH & Co.KG – Arnsberg, Deutschland
	Olympus Zoom-Stereomikroskop SZ61	OLYMPUS EUROPA HOL- DING GmbH – Hamburg, Deutschland
	neoLab – Pinzette DUMONT + (7-Inox-E)	Manufactures D’Outils Dumont SA – Montignez, Schweiz
	Anatomische Pinzette KLS Martin Stainless KBA (12 – 172 – 15 – 07)	Gebrüder Martin GmbH & Co. KG – Tuttlingen, Deutschland
	Mikroschere Medicon MedControl Stainless Steel	MEDICON eG – Tuttlingen, Deutschland
	Einwegskalpell FEATHER <sup>®</sup> disposable Scalpel Stainless Steel no. 11	FEATHER SAFETY RAZOR CO. Kita-Ku, Osaka, Japan

**Software**

<b><i>Bildrekonstruktionsprogramme</i></b>	
NRecon® Version 1.7.0.1	Bruker® microCT – Kontich, Belgien
NReconServer® Version 1.6.6.0	Bruker® microCT – Kontich, Belgien
GPUReconServer® Version 1.7.1.1	Bruker® microCT – Kontich, Belgien
<b><i>Bildanalyseprogramme</i></b>	
DataViewer® Version 1.5.4.0	Bruker® microCT – Kontich, Belgien
CTAnalyser® Version 1.17.7.1 +	Bruker® microCT – Kontich, Belgien
<b><i>Bilddarstellungsprogramme</i></b>	
CTvol® – Realistic 3D – Visualization Version 2.3.2.0	Bruker® microCT – Kontich, Belgien
Analyze® Version 11.0	Biomedical Imaging Resource Mayo Clinic Rochester, MN, USA
<b><i>Microsoft Office Home and Student 2016:</i></b>	
PowerPoint	© 2016 Microsoft Corporation, United States of America
Excel	© 2016 Microsoft Corporation, United States of America
Word	© 2016 Microsoft Corporation, United States of America
Microsoft Windows 7 Professional PAINT Version 6.1	© 2009 Microsoft Corporation, United States of America
Affinity Designer Version 1.6.1	© 2017 Serif (Europe) Ltd
IBM®SPSS® Statistics Version 23.0.0.2	IBM® Corporation – New York, United States of America
EndNote™X8	© 1988-2016 Thomson Reuters™, seit 2017 Clarivate Analytics – Boston, USA
Adobe Illustrator CS5	Adobe Systems Inc., USA

## **4.2 Die Tiermodelle**

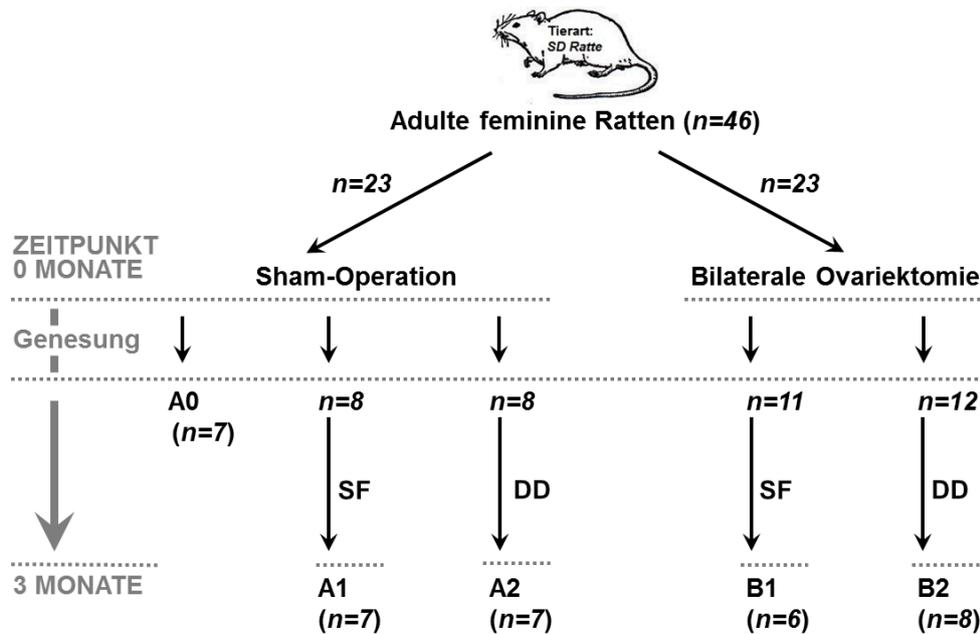
Die thematisierten tierexperimentellen Modelle waren durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert und fanden im Rahmen des SFB/TRR79 statt. Beide Projekte waren für das T1-Projekt unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. C. Heiß (Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Justus-Liebig-Universität (JLU) Gießen) genehmigt. Kooperationsbasierend realisierte das Zentralprojekt Z3 (Projektleiter PD Dr. med. Marian Kampschulte, Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Sektionsbereich experimentelle Radiologie, JLU Gießen) die hier vorliegenden Untersuchungen.

### **4.2.1 Studiendesign**

Die Tierversuchsvorhaben berücksichtigten die Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes nach § 8 Absatz 1 bzw. die rechtlichen Vorschriften der Tierschutz-Versuchstierverordnung nach § 30 in der jeweils geltenden Fassung und dienten wissenschaftlich begründet der Grundlagenforschung.

#### **Ratte**

Die Genehmigung für das Kleintiermodell „next generation RNA-sequencing (NGS) - Ratte“ erfolgte durch das Regierungspräsidium (RP) Darmstadt mit dem Identifikationszeichen V54-19c20/15-FU/1083. Das Untersuchungskollektiv umfasste 50 genehmigte weibliche Nagetiere von der Tierart Sprague Dawley® (SD) Ratte (CrI:CD(SD); Charles River Laboratories, Research Models and Services, Deutschland, Sandhofer Weg 7, Sulzfeld). Die Berechnung der Tieranzahl unter Beachtung einer Ausfallrate erfolgte mittels der Software „G\*Power“ (Version 3.1), um in allen Fällen eine statistische Robustheit der Testergebnisse zu gewährleisten.



**Abbildung 5: Experimentelles Studiendesign – Adultes Kleintiermodell "Ratte".** Der Studienbeginn ist als Zeitpunkt 0 Monate gesetzt. Wie dargestellt sind die seneszenten (Alter: 12-14 Monate) Sprague Dawley®-Ratten mehrmals randomisiert und separieren sich entsprechend des Eingriffs in Gruppe A (Sham-Operierten) sowie Gruppe B (Ovariectomierten). Nach einer 2 wöchigen Rekonvaleszenz untergliedern sie sich in fünf Studiengruppen: Die Sham-Gruppe A0 (7 Tiere) wird direkt euthanasiert, um einen ossären Status im Alter von 1 Jahr zu haben. Der Sham-Gruppe A1 (7 Tiere) und OVX-Gruppe B1 (6 Tiere) bietet man ein Standardfutter (SF; Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage) an. Die korrespondierenden Gruppen A2 (7 Tiere) und B2 (8 Tiere) erhalten zur Rekrudescenz des Knochenschwundes eine defizitäre Diät (DD; gekennzeichnet durch den Mangel an Vitamin D2/D3, Vitamin K, Calcium und Phosphor sowie soja- und phytoestrogenfrei). Nach 3 Monaten findet die Euthanasie des restlichen Tierkollektivs statt, um den individuellen Status auf unterschiedlicher Art zu quantifizieren. Hierbei gilt A1 als Referenzgruppe.

Wie der obigen Abbildung 5 zu entnehmen passierte die Gruppenteilung der durchschnittlich 12 Monate alten Ratten mehrstufig per Zufall. Nach entsprechender Randomisierung ergaben sich zunächst zwei gleichgroße Hauptgruppen: Gruppe A, die Sham-Operierten sowie Gruppe B, die Ovariectomierten. Die weitere Untergliederung erfolgte erneut per Losverfahren, wodurch sich die Versuchstiere wie folgt zuordneten:

- **Gruppe A0** Sham-Gruppe, Alter 12 Monate
- **Gruppe A1** Sham-Gruppe, Alter 15 Monate
- **Gruppe A2** Sham + Diät-Gruppe, Alter 15 Monate
- **Gruppe B1** OVX-Gruppe, Alter 15 Monate
- **Gruppe B2** OVX + Diät-Gruppe, Alter 15 Monate

Somit waren die Gruppen B1 und B2 dem Goldstandard der Osteoporoseinduktion ausgesetzt. Als weitere Maßnahme, die Osteoporose zu induzieren, verabreichte man den Interventionsgruppen A2 und B2 eine defizitäre Diät (DD). In diesem Studienrahmen diente die Gruppe A1 als Referenzgruppe der ungefähr 15 Monate alten Ratten.

Bereits bei der Tieraufzucht verstarben vier der genehmigten Nager. Weitere elf unterlagen postoperativ einem Tumor und konnten ebenso nicht in die Studie aufgenommen werden. Konsekutiv ergab sich die aufgeführte Gruppenverteilung. Zudem wurden nur nicht frakturierte Proben bei der Analyse berücksichtigt. Die Tabelle 4 gibt hierzu einen Überblick.

**Tabelle 4: Übersicht der Gruppenverteilung & des Probenumfangs zum Kleintiermodell "Ratte".**

<b>GRUPPEN</b>	<b>ANZAHL DER RAT- TEN</b>	<b>FEMORA RECHTS</b>	<b>TIBIAE RECHTS</b>	<b>TH 9</b>
<b>Gruppe A (Sham)</b>	<b>n=21</b>	<b>n=21</b>	<b>n=21</b>	<b>n=21</b>
A0 (Sham, 0 Monate)	n=7	n=7	n=7	n=7
A1 (Sham, 3 Monate)	n=7	n=7	n=7	n=7
A2 (Sham + defizitäre Diät, 3 Monate)	n=7	n=7	n=7	n=7
<b>Gruppe B (OVX)</b>	<b>n=14</b>	<b>n=14</b>	<b>n=14</b>	<b>n=14</b>
B1 (OVX, 3 Monate)	n=6	n=6	n=6	n=6
B2 (OVX + defizitäre Diät, 3 Monate)	n=8	n=8	n=8	n=8
<b>Insgesamt n<sub>ges</sub></b>	<b>n=35</b>	<b>n=35</b>	<b>n=35</b>	<b>n=35</b>

**Schaf**

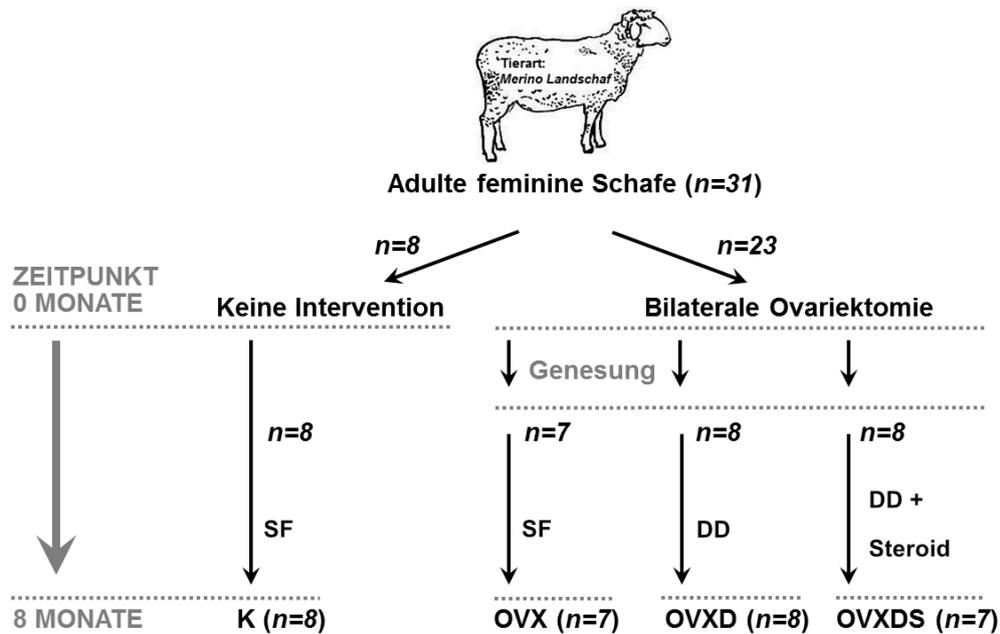
Die Genehmigung für das Großtiermodell „Schafmodell der Osteoporose“ erfolgte durch das RP Darmstadt mit dem Geschäftszeichen V54-19c20/15-F31/36. Das Untersuchungskollektiv setzte sich aus 32 genehmigten femininen Schafen vom Typ Merino Landschaf zusammen. Bei Letzteren handelte es sich um nicht eigens für das Versuchsvorhaben gezüchtete Tiere, sondern um von der ursprünglichen Herde ausgesondertes Vieh. Anhand der Fallzahlschätzung durch Dr. Pons-Kühnemann (Medizinstatistiker, Institut für Medizinische Informatik, Justus-Liebig-Universität Gießen) stellte

man die essentielle Tieranzahl, unter Berücksichtigung eines unvorhergesehenen Ausfalls, für eine valide Aussagekraft der statistischen Analyse sicher.

Zu Beginn der Studie verunglückte ein Tier. Die Landschafe hatten ein durchschnittliches Alter von 5,2 Jahren (spezifisches Alter siehe unten). Vorerst unterteilte man das Kollektiv zufällig in zwei unterschiedlich große Gruppen. Abgesehen von der Kontroll-Gruppe wurden die Schafe bilateral ovariektomiert, um nach erneuter Randomisierung die Interventionen für die Osteoporoseeinleitung zu differenzieren. Die folgende Abbildung 6 zeigt die randomisierte Verteilung der zur Verfügung stehenden Versuchstiere. Gemäß der Einteilung ergaben sich:

- **Gruppe K**                      Kontroll-Gruppe
- **Gruppe OVX**                    Ovariektomie-Gruppe
- **Gruppe OVXD**                Ovariektomie + Diät-Gruppe
- **Gruppe OVXDS**              Ovariektomie + Diät + Steroid-Gruppe

Als Ausgangspunkt dieser Studie diente die Gruppe K, die keiner Intervention ausgesetzt war. Neben der OVX verabreichte man den Gruppen OVXD sowie OVXDS eine spezielle DD. Die OVXDS-Gruppe beinhaltete zusätzlich eine zyklische Methylprednisoloninjektion, um eine Steroid-induzierte Osteoporose zu imitieren. Frühzeitig verstarb ein Schaf dieser Tiergruppe.



**Abbildung 6: Experimentelles Studiendesign – Adultes Großtiermodell "Schaf".** Als Zeitpunkt 0 Monate ist der Studienbeginn gesetzt. Entsprechend des Schemas sind die genehmigten Merino Landschafe (durchschnittliches Alter von 5,2 Jahren) mehrstufig randomisiert und unterteilen sich in vier Studiengruppen: Kontroll-Gruppe (K; 8 Tieren), Ovariectomie-Gruppe (OVX; 7 Tiere), Ovariectomie + Diät-Gruppe (OVXD; 8 Tiere) und Ovariectomie + Diät + Steroid-Gruppe (OVXDS; 7 Tiere). Anhand der individuellen Intervention wird eine Osteoporoseinduktion zugeführt: Als Basis werden die drei letzteren Gruppen (OVX, OVXD, OVXDS) bilateral ovariectomiert. Nach einer 2 wöchigen Genesungsphase erhalten die Gruppen OVXD und OVXDS zusätzlich eine defizitäre Diät (DD; Katalognummer S6189-S010; Sondermischung Schaf, ssniff-Spezialdiäten GmbH) in Calcium und Vitamin D2/3. Die anderen Beiden bekommen hingegen ein Standardfutter (SF) derselbigen Firma. Als dritte Intervention verabreicht man der OVXDS-Gruppe wöchentlich 160 mg Methylprednisolonacetat (Depot-Medrate®, 40 mg/ml Injektion; Pharmacia GmbH, Pfizer-Gruppe, Deutschland) intramuskulär. Nach einer 8 monatigen Einstellung wird das Untersuchungskollektiv euthanasiert und das Ausmaß der metabolisch induzierten Osteoporose quantifiziert. Als Ausgangspunkt dient die Kontroll-Gruppe.

Insgesamt 30 Merino Landschafe wurden zum Studienende euthanasiert. Bei diesem Versuchsvorhaben gab es kein Sham-Kollektiv als weitere Tiergruppe, da eine noch größere Anzahl an Großtieren nicht genehmigt worden wäre (siehe Punkt 6.6 Einschränkungen).

Bei der Probenentnahme kam es aufgrund des osteoporotischen Charakters der Knochenproben zu einer Fraktur. Folglich konnten bei der computertomographischen Analyse nachstehende Proben eingeschlossen werden:

Tabelle 5: Übersicht der Gruppenverteilung & des Probenumfangs zum Großtiermodell "Schaf".

GRUPPEN	ANZAHL DER SCHAFE	FEMORA LINKS	LWK 2 TRABEKEL
K – Gruppe	n=8	n=8	n=8
OVX – Gruppe	n=7	n=7	n=7
OVX – D – Gruppe	n=8	n=8	n=8
OVX – D – S – Gruppe	n=7	n=6	n=7
<b>Insgesamt n<sub>ges</sub></b>	<b>n=30</b>	<b>n=29</b>	<b>n=30</b>

#### 4.2.2 Versuchsdurchführung und Untersuchungsvorbereitung

##### Ratte

Im Rahmen der hiesigen Optimierung des juvenilen Vorläufermodells standen 35 weibliche SD-Ratten zur Verfügung. Diese hatten ein adultes Alter von im Durchschnitt 12 Monaten. Nach Ankunft der Tiere im Ort der Versuchstierhaltung und Durchführung – Zentrale Forschungseinrichtung, Fachbereich Medizin der J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main, Deutschland – wurden die Nager separiert in Double Decker IVC-Käfigen sowie Typ IIIH-Käfigsystemen eingestallt. Unter optimalen Rahmenbedingungen, d.h. spezifisch pathogenfrei (SPF), spezieller Klimatisierung mit kontinuierlicher Kontrolle der Luftfeuchtigkeit sowie einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 6.00 bis 18.00 Uhr, wurden sie gehalten. Den Tieren stand permanent das entsprechende Futter ad libitum und unbegrenzt Wasser zur Verfügung.

In dieser Arbeit galt der Tag der Eingriffe (Sham-OP oder OVX) als Zeitpunkt 0 Monate. Zu Beginn wurde das jeweilige Versuchstier in Vollnarkose dem Eingriff unterzogen. Für die Narkose diente eine intraperitoneale Mischinjektion (G26 Kanüle) mit 100 mg/kg Ketamin (Ketavet®, Zoetis Deutschland GmbH), 10 mg/kg Xylazin (Rompun®, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) und 1 mg/kg Midazolam (Rotexmedica® GmbH Arzneimittelwerk, Trittau), adaptiert an das Körpergewicht sowie gelöst in 0,9 prozentigem Natriumchloridlösung (Kochsalz Braun® 0,9 %, B. Braun Melsungen AG). Sowohl für die Gruppe A (Sham-Gruppen) als auch B (OVX-Gruppen) nutzten die Kollegen der Unfallchirurgie den standardisierten Zugang zu den Eierstöcken im Bereich der dorso-lateralen Lendenwirbelsäule. Die Kutis des Versuchsobjektes wurde in dieser Region

rasiert (Labornager-Rasierer, Model: Indulab 1574) und desinfiziert (Braunol®, B. Braun Melsungen AG). Im Anschluss wurde das Tier auf einer 38 °C warmen Heizmatte platziert und steril abgedeckt. Ein ungefähr 15 mm langer Schnitt gewährte kranial der Schenkelfalte und ventral der Wirbelsäule die Möglichkeit für einen Scherenschlag, um ein Pneumoperitoneum zu erzeugen. Eine Schnittverlängerung wurde unter Pinzetenschutz durchgeführt und vorsichtig der Uterus und die Adnexe herausgezogen. Nach der Freilegung des Ovars ligierte man die Gefäße, das umliegende Fettgewebe und den Eileiter, um abschließend den Eierstock abzutrennen. Der Bauchschnitt wurde mithilfe eines resorbierbaren Fadens und Einzelheften sowie die Kutis mittels Verschlussklammern verschlossen. Das gleiche Verfahren wurde kontralateral durchgeführt. Bei der Gruppe A wurden die Ovarien lediglich mobilisiert. Aufgrund dieser Sham-OP hatten operative Begleitfaktoren (z.B. perioperativer Narkosestress, Wundschmerz) Einfluss auf das gesamte Untersuchungskollektiv – speziell auf den Knochenmetabolismus.

Die postoperative Beobachtung erfolgte unter adäquater Schmerzmedikation (Metamizol 3,4 ml/500 ml Trinkwasser per os, Vetalgin®, Intervet International GmbH) und für 5 Tage in Einzelhaltung. Nach Vollendung der zweiten postoperativen Woche wurden die SD-Ratten innerhalb ihrer jeweiligen Versuchsgruppe weiterbehandelt. Die Gruppe A0 wurde direkt euthanasiert (Vorgehen siehe unten). Für die weiteren 90 Tage stand den Gruppen A1 und B1 ein Standardfutter (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage) frei zur Verfügung. Bei den Gruppen A2 und B2 wurde die Osteoporoseinduktion zusätzlich durch die Dezimierung einzelner Nährstoffe gefördert. Konsekutiv erhielten diese für den gleichen Zeitraum eine Spezialdiät (DD), welche sich durch einen Mangel an Vitamin D2/D3, Vitamin K, Calcium und Phosphor charakterisierte sowie phytoestrogen- und sojafrei war.

Zum Endpunkt des Versuches fand die Euthanasie der restlichen Ratten gruppenspezifisch statt. Hierfür verabreichte man jeder Ratte ein intraperitoneales Narkosegemisch aus 0,3 ml Ketamin (Ketavet®, Zoetis Deutschland GmbH), 0,1 ml Xylazin (Rompun®, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) und 0,1 ml Midazolam (Rotexmedica® GmbH Arzneimittelwerk, Trittau). Anschließend erfolgte die DXA-Messung sowie die Blutgewinnung durch eine subxiphoidale Herzpunktion. Die eigentliche Tötung durch einen Genickbruch sowie die Probenentnahme erfolgten durch den Tierversuchsleiter.

Neben der Blutentnahme und der Urinabnahme (über eine Zystozentese) für die Bestimmung biochemischer Parameter wurden histologische sowie bildgebende, aber auch biomechanische und molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt. Die

projektinternen, von Askina® Mull (B. Braun, Melsungen AG / Deutschland) umhüllten Knochenproben (Femur, Tibia und Wirbelkörper Th 9) wurden vor Ort auf Eis gelegt und im Anschluss bei einer konstanten Temperatur von – 80 °C im Tiefkühler aufbewahrt.

### **Schaf**

Nachfolgend ist das Versuchsvorhaben auf das Wesentliche für das Z3-Projekt beschränkt. Dem Tierversuchsantrag sind alle weiteren Projekte und mitwirkenden Institute zu entnehmen.

Repräsentativ für das osteoporotische Großtiermodell waren 30 feminine Merino Land-schafe, welche während der Forschungsperiode in der Zentralen Forschungseinrichtung (ZFE, Fachbereich Medizin der J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main, Deutschland) in einem überdachten Außenstall eingestallt waren. Sie wurden der entsprechenden Jahreszeit typischen Temperatur und der ortsabhängigen Tag-Nacht-Rhythmik ausgesetzt. Gruppenspezifische Nahrung, Wasser sowie Stroh ad libitum standen zur Verfügung. Auch in dieser Studie galt als Anfangszeitpunkt der Tag der bilateralen OVX der randomisierten Tiere. Aus der klinisch gesunden Viehherde ergaben sich vier Gruppen mit vergleichbarem Lebensalter. Für die jeweilige Gruppe betrug die Standzeit 8 Monate.

Die Kontroll-Gruppe hatte am Tag der Einstellung ein durchschnittliches Alter von 5,0 Jahren (Range: 3-9 Jahre) und lebte unter denselben Rahmenbedingungen wie die restliche Herde. Als Nahrung verabreichte man ein Standardfutter (Firma SNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Die Gruppe K stand stellvertretend für eine altersentsprechende physiologische Knochenarchitektur. Die restlichen Schafe wurden der bilateralen Ovariectomie unterzogen. Hierfür erhielten sie eine Prämedikation von 10 mg/kg Ketaminhydrochlorid (100 mg/ml Ketavet®, Bela-Pharm GmbH und Co KG, Vechta), 0,01 ml/kg 2% Rompun® (siehe oben), 0,3 mg/kg Rotexmedica® (5 mg/ml; siehe oben) und 0,01 mg/kg Atropinsulfat® (0,5 mg/ml, B. Braun Melsungen AG, Deutschland). Kontinuierlich überwachte man die Vitalparameter mittels Pulsoxymetrie, EKG, endexpiratorischer Kohlenstoffdioxid-Messung, arterieller Blutdruckmessung und intraoperativer Blutgasanalyse. Die Narkose wurde durch die intravenöse Verabreichung von 2 mg/kg Propofol (20 mg/ml Propofol®; Fresenius Kabi, Deutschland) und 2 mg/kg Fentanyl (50 mg/ml Fentanyl-hameln; Hameln Pharmaceuticals GmbH, Deutschland) eingeleitet. Unter Vollnarkose erfolgte ein medialer Zugang in einer Länge von ungefähr 15 cm kranial des Euters. Nach Durchtrennen der Linea alba und Präparation in die Tiefe wurde der Uterus und die Adnexe nach extraperitoneal luxiert,

um die zuführenden Gefäße sowie Eileiter zu ligieren. Anschließend exstipierte man die Eierstöcke, reponierte den Uterus in situ und machte die Bauchdecke mittels Faden- oder Klammernaht zu. Zur prä- und perioperativen Schmerzlinderung sowie bis zum sechsten postoperativen Tag bekamen die ovariectomierten Tiere 0,01 mg/kg Buprenorphinhydrochlorid subkutan (0,3 mg TEMGESIC® Ampullen, RB Pharmaceuticals GmbH, Deutschland) und 0,5 mg/kg Meloxicam (20 mg/ml Metacam®, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Deutschland). Eine intramuskuläre Antibiose war fünf Tage lang notwendig (0,1 ml/kg Penicillin alle 2 Tage, Veracin® RS, Albrecht GmbH, Aulendorf).

Die Gruppe OVX, welche im Durchschnitt ein Alter von 5,286 Jahren (Range: 3-9 Jahre) hatte, erhielt über die 8 Monate Standzeit keine weitere Intervention. Den 7 Versuchsschafen stand das Standardfutter zur Verfügung. Hingegen verabreichte man den übrig gebliebenen Gruppen (OVXD und OVXDS) nach einer zweiwöchigen Genesungsphase eine defizitäre Diät (Katalognummer S6189-S010; Sondermischung Schaf, 4 mm Pellets, ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) zweimal täglich nach Belieben. Diese kennzeichnete sich durch einen Mangel an Calcium sowie Vitamin D2 und D3, um einen höhergradigen Knochenschwund herbeizuführen. Das mittlere Alter der OVXD-Gruppe war 5,125 Jahre (Range: 3-8 Jahre) und das der OVXDS-Gruppe im Mittel 5,375 Jahre (Range: 3-9 Jahre). Bei der letzten Schar fanden 3 Arten der Osteoporoseinduktion Anwendung. Neben der hormonellen und diätetischen Induktion erhielt jedes Schaf ab der dritten Woche nach der bilateralen Ovariectomie alle zwei Wochen eine Dosis von 320 mg Methylprednisolonacetat intramuskulär (Depot-Medrate®, 40 mg/ml Injektion; Pharmacia GmbH, Pfizer-Gruppe, Deutschland) – im Wechsel in die vordere und hintere Extremität.

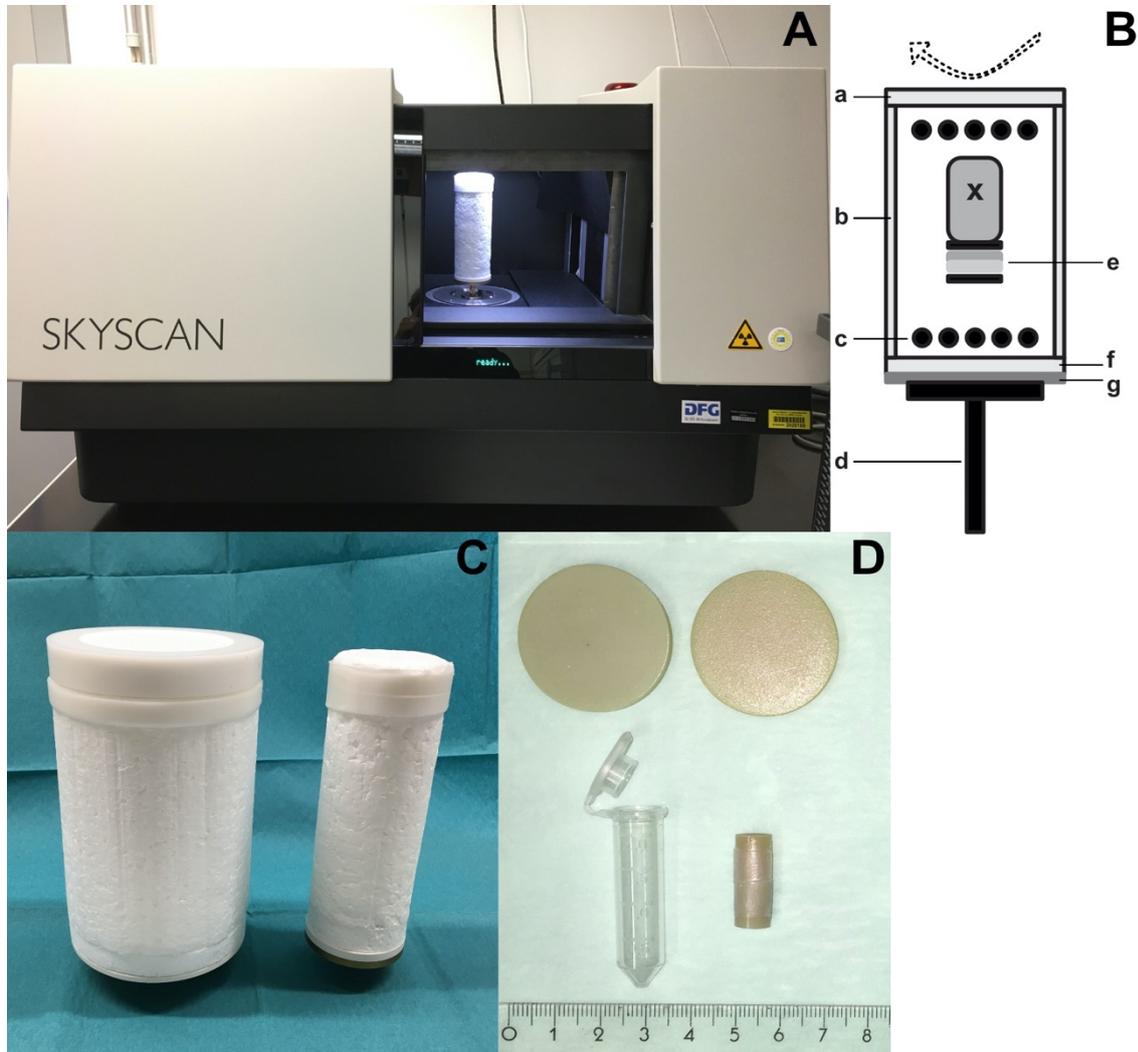
Zum Endzeitpunkt wiederholte man die Narkose, um entsprechende Tierproben gewinnen sowie Bildgebung durchführen zu können. Unter der intravenösen Gabe von 50 mg/kg Pentobarbital (Anestosal®, Pfizer, Mexico) wurde das komplette Untersuchungskollektiv schmerzlos euthanasiert. Die in dieser Arbeit analysierten proximalen Femora wurden unverzüglich nach der sorgfältigen Präparation mit Askina® Mull (siehe oben) umwickelt, auf Eis gelegt und bis zum Kryo-Scan im Tiefkühler aufbewahrt. Die Lendenwirbelkörper (LWK)-Präparate waren in der gelisteten Formaldehyd-Lösung fixiert und gelagert.

Die laborinterne Präparation der LWK-Trabekel erfolgte unter mikroskopischer Sicht mithilfe des Olympus® Zoom-Stereomikroskops. Dieses binokulare Gerät diente der vergrößerten Darstellung einzelner Spongiosa der Wirbelkörper. Hierfür platzierte man

die Schnittmatte inklusive Untersuchungsgut auf der Tischeinlage. Als technische Hilfsmittel wurden Präparierbesteck, eine mit 0,9 prozentiger Natriumchloridlösung (Kochsalz Braun® 0,9 %, B. Braun Melsungen AG) gefüllte Spritze zur Hochdruckspülung sowie eine Lichtquelle verwendet. Bei einem eingestellten Zoomtrieb von 2,5 präzierte man ein Trabekelstück in einer Größenordnung von kleiner 1 mm x 1 mm (Breite x Länge). Die in Formaldehyd getränkte Trabekelprobe wurde in einer von Wachsfolie (Parafilm® „M“) bedeckten Petrischale aufbewahrt.

#### 4.3 Mikro-CT zu den adulten Klein- und Großtiermodellen

Einen Überblick des anstehenden Untersuchungsverfahrens gibt die Abbildung 7.



**Abbildung 7: Untersuchungsverfahren - Mikro-Computertomographie.** Die nach der Tierethanasie präparierten Proben sind entsprechend konserviert. **(A)** Fotografie des Mikro-CTs SkyScan 1173 der Firma Bruker® Kontich, Belgien: Mittels der im Labor etablierten Methodik des Kryo-Scans werden das Femur, die Tibia und der Brustwirbel des NGS-Rattenmodells sowie das Femur des Schafmodells untersucht. Die gekammerte Probenbühne (siehe C) mit Untersuchungsobjekt ist für den Scan platziert. **(B)** Schema der Probenbühne: (x) Probe, (a) Styropordeckel, (b) Styroporzylinder, (c) Trockeneis, (d) Messingfuß, (e) gepaarte Kalibrierungsphantome, (f) Styroporboden, (g) Kunststoffplatte. Aufgrund der Übersichtlichkeit fehlen Parafilm®, EPS-Pasteile zur rotationsstabilen Befestigung sowie Mull. **(C)** Fotografie der gekammerten Probenbühnen für die Kryo-Scans: Bestehend aus einem Styroporzylinder, Messingfuß sowie dazwischenliegender Kunststoffplatte. Links: Probenbühne für große Knochenproben (Schaf); Höhe 19 cm, Durchmesser 11,8 cm. Rechts: Probenbühne für kleine Knochenproben

(Ratte); Höhe 18,5 cm, Durchmesser 6,7 cm. **(D)** Fotografie der Bruker®-Mikro-CT Knochenmineralgehalt-Kalibrierungsphantome. In der ersten Zeile findet sich ein Phantompaar mit 2 Calcium-Hydroxylapatit-Konzentrationen (links  $0,25 \text{ g/cm}^3$ ; rechts  $0,75 \text{ g/cm}^3$ ); Durchmesser von ca. 32 mm. Aufgrund der Strahlenaufhärtung muss eine probenadaptierte Phantomgröße gewählt werden (entsprechend Großtiermodell). In der zweiten Zeile rechts das etwa 4 mm durchmessende Phantompaar korrespondierend für das Kleintiermodell. Diese sind für den Scan mittels Parafilm® aufeinander fixiert und werden im Eppendorf-Reaktionsgefäß (links) mitgescannt.

### 4.3.1 Akquisition der Daten

Der verwendete Mikro-Computertomograph SkyScan\_1173 der Fa. Bruker® ist der weltweit erste hochenergetische Mikro-CT-Scanner. Als Hauptbestandteile des  $\mu$ CTs gelten die Mikrofokus-/ Reflexionsröhre mit Kegelstrahlgeometrie und der Röntgendetektor, welcher aus einem verzerrungsfreien Flachdetektor (Flat-Panel-Matrix von maximal  $2240 \times 2240$  Pixeln) besteht. Von folgenden technischen Faktoren ist die Erstellung der Datensätze abhängig: Geräteleistung, Stromstärke und Röhrenspannung sowie räumliche Auflösung bzw. Fokusgröße[99]. Zur Reduktion der Strahlenaufhärtungsartefakte diente ein Aluminiumfilter mit einer Stärke von 1 mm. Dieser war zwischen Röntgenröhre und Probe positioniert. Während des Scans befand sich der Prüfling auf der Probenbühne (Ratte: distales Femur, proximale Tibia und Brustwirbelkörper; Schaf: proximales Femur) zwischen der Mikrofokusröhre und dem Detektor.

Die in domo etablierte Scan-Methode kryokonservierter Proben umfasste die Fixierung des Prüflings innerhalb eines Styroporzylinders – siehe Abbildung 7 [110]. Dieses temperaturstabile Verfahren stellte eine Nichtdestruktivität der ossären Mikrostruktur während der kompletten Untersuchungszeit (exemplarisch Femur - Ratte: 1 h 15 min; Schaf: circa 1 h 56 min) sicher. Zudem war das Verfahren an den Empfehlungen von Bouxsein et al. orientiert, um eine adäquate Bildqualität / -auflösung kleiner Untersuchungsobjekte für eine standardisierte Strukturanalyse zu erreichen. Hierbei galt für Rattenproben eine isotrope Ortsauflösung von  $< 10 \mu\text{m}$  [103].

Die für die Probe entsprechende Zylindergröße (Ratte: Durchmesser 6,7 cm; Schaf: 11,8 cm) wurde gewählt und der Styroporbehälter mit notwendiger Menge an Trockeneis gefüllt. Die mit Mull umhüllte Knochenprobe wurde zentral durch EPS-Pasteile -röntgentransparentes Isolationsmaterial –fixiert und detektorabhängig positioniert. Dadurch wurde der umliegende Bereich von Kryokonservierungsmaterial ausgespart und das Untersuchungsobjekt blieb artefaktunanfällig. Zur optimalen Bildprojektion war

die Probe mittels der horizontal beweglichen Probenbühne und dem Probenhalter schrittweise justierbar. Hierbei sollte sich die Drehachse des Untersuchungsgutes entlang der senkrechten Detektormitte bewegen, um eine höchstmögliche Detektorausnutzung zu gewähren. Für eine standardisierte Datenakquisition sollte eine Proben-schiefelage oder -dislokation mittels Momentaufnahme ausgeschlossen werden.

Während des Scans drehte sich der Zylinder für 180° in determinierten Rotationsschritten (Ratte: 0,25°; Schaf: 0,20°) um seine eigene Achse. Zur Signal-Rausch-Verbesserung wurden pro Schritt vier Aufnahmen, sogenannte Frames, mit einer bestimmten Belichtungszeit pro Frame durchgeführt und gemittelt. Summiert ergab sich die oben genannte Aufnahmezeit.

### 4.3.2 Datenrekonstruktion

Nach dem Scan lagen TIFF-Rohdatensätze vor, die mittels der NRecon® Rekonstruktionssoftware (Version 1.7.0.1, Bruker® microCT – Kontich, Belgien) in isotroper Voxelgröße umgewandelt und multiplanar reformatiert werden konnten. Dies erfolgte über die Kommunikation zweier Server: NReconServer® (Version 1.6.6.0) und GPUReconServer® (Version 1.7.0.1). Das verwendete Programm errechnete aus den Rohdaten schrittweise (1.) Faltung 2.) Rückprojektion) die Schnittebenen bzw. dreidimensionalen Datensätze in individueller Grauwertskala (hier: 16-bit). Der implementierte Algorithmus war ein adaptierter Feldkamp-Davis-Kress-Algorithmus[111]. Dabei wurden beispielsweise Ringartefakte und Strahlenaufhärtung korrigiert sowie eine Gaußsche Regression durchgeführt[112, 113]. Nach einer mittleren Rekonstruktionszeit von 30 min lag ein Bitmap (BMP)-Datensatz pro Probe mit gruppenkonstanter isotroper Voxelgröße (Ratte: gerundet 9,96 µm; Schaf: 33,07 µm) vor.

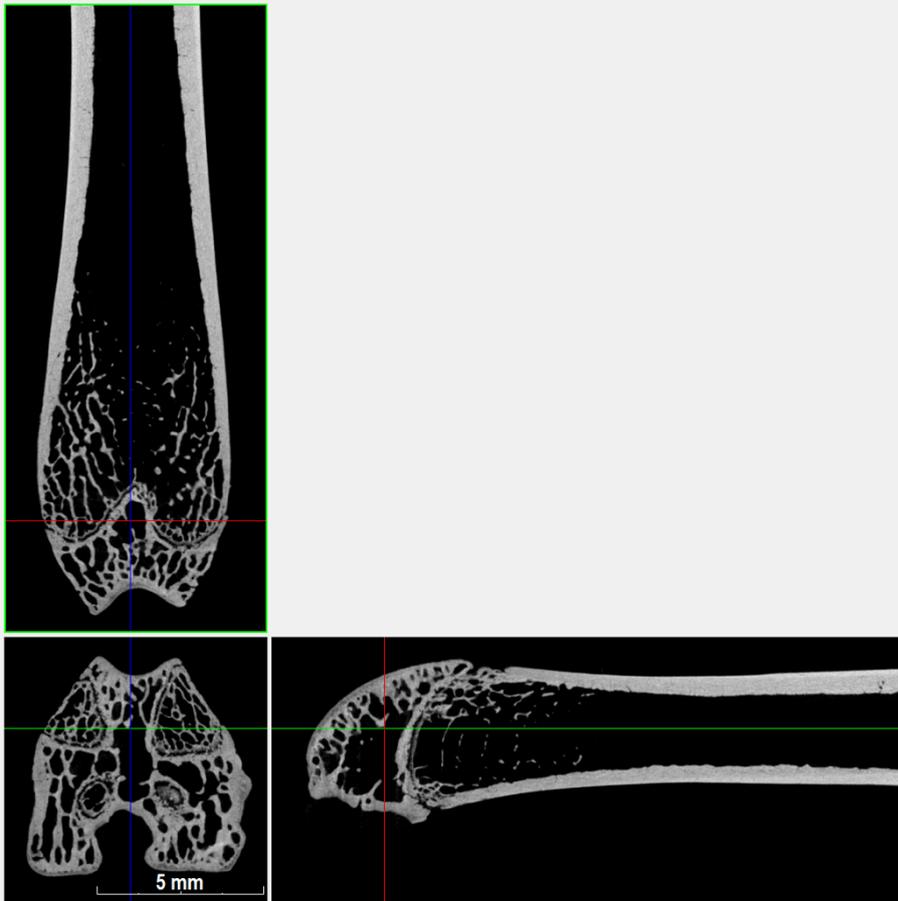
Im Anhang unter Punkt 8.7 finden sich proben- und gruppenspezifische Logfiles der Computertomographen in kopierter Form. Diese beinhalten alle technischen Einzelheiten in Bezug auf die jeweiligen Scans. Die tabellarische Übersicht zur Datenakquisition und -rekonstruktion am Ende des Abschnittes 4.4 umfasst die genauen Einstellungen.

#### 4.3.3 Quantitative Bildanalyse

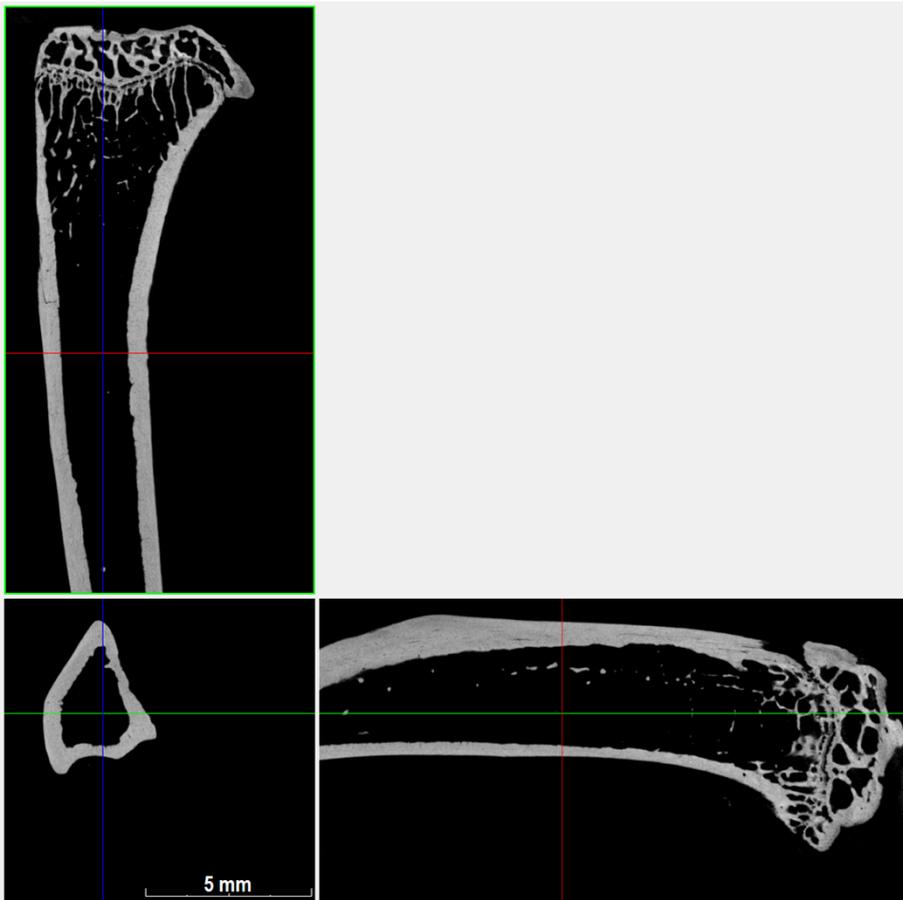
Für die digitale Bildverarbeitung und letztendlich Quantifizierung der dreidimensionalen Datensätze bzw. der Knochenmorphometrie und -mineralisierung wurden die Bildanalyseprogramme DataViewer® (Version 1.5.4.0) sowie CTAnalyser® (CTAn; Version 1.17.7.1 +) der Fa. Bruker® (Kontich, Belgien) verwendet.

##### **DataViewer®**

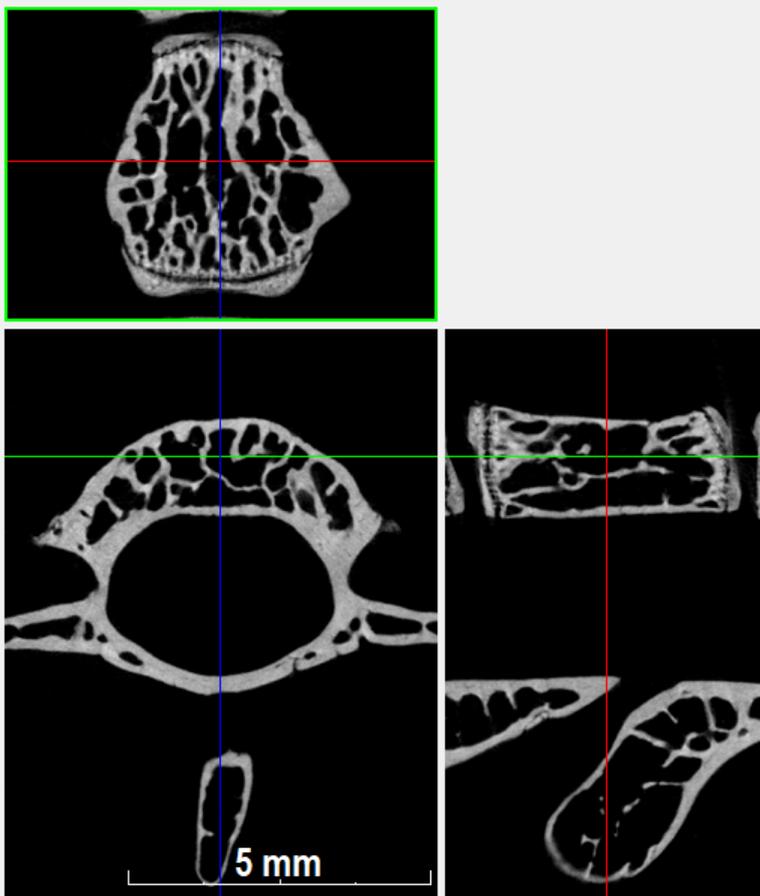
Der erste Schritt nach Laden des Datensatzes und Ziel der Software war die Modifizierung der Daten für eine standardisierte Bildverarbeitung. Dazu stellte man in allen drei Ebenen (x,y,z) ein möglichst zentrales Schnittbild ein, um die Probe anatomisch korrekt auszurichten. Primär galt, jede Objektrotation in der axialen Ebene parallel zum waagrechteten Bildrand des DataViewers® durchzuführen, d.h. eine gedachte horizontale Linie durch die anteriore oder posteriore Probenseite verläuft planparallel zur Horizontalen des Bildfensters. Anschließend folgte die Begradigung der Knochenprobe entlang der Z-Achse im sagittalen und koronaren Bild:



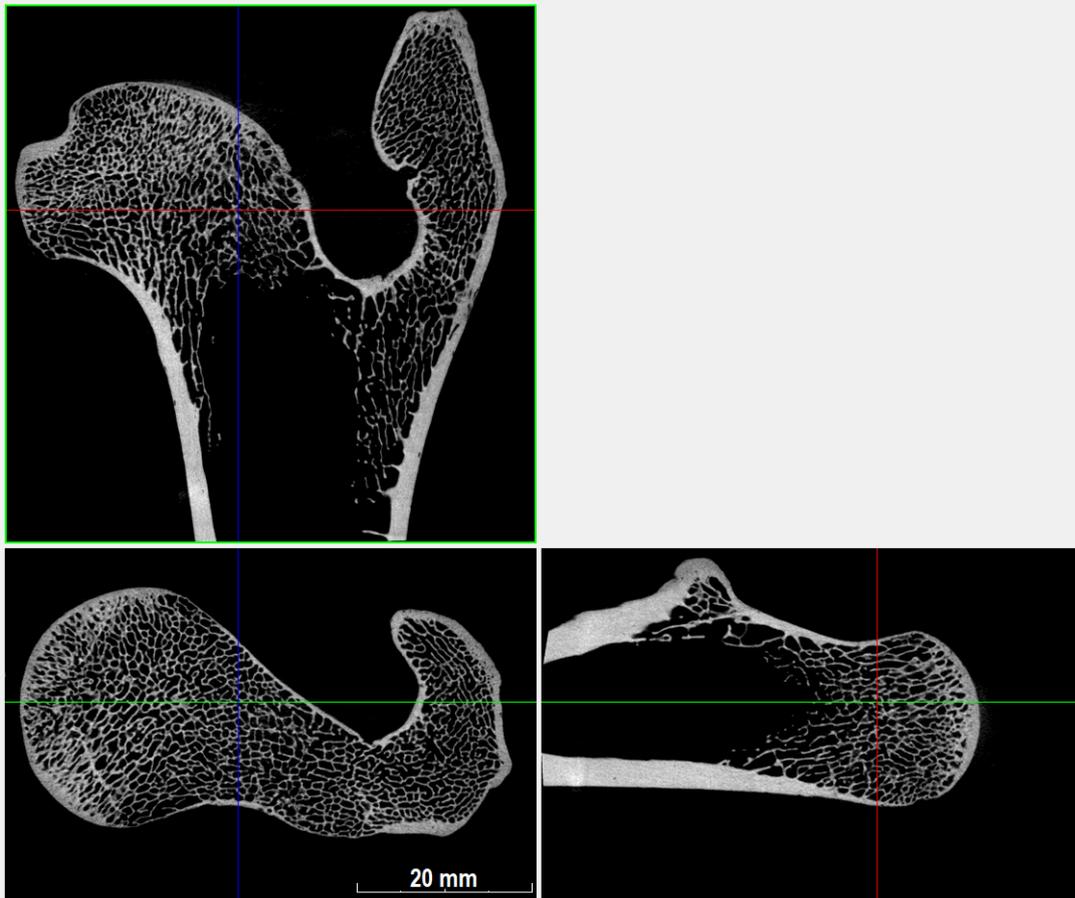
**Abbildung 8: DataViewer - Softwareaufnahme 1 zur Veranschaulichung der standardisierten Objektrotation.** Die Softwareaufnahme zeigt eine exemplarische 3D-Darstellung des distalen Femurs (Kleintiermodell). Erste Zeile Koronarebene; zweite Zeile Transaxialebene mit Maßstabsleiste links und Sagittalebene rechts. Die farbkodierten Linien (rot, blau, grün) zeigen die korrespondierenden Schnittebenen. Koronar bildet sich die distale Femurmetaphyse im unteren Bildabschnitt ab. Für die korrekt anatomische Ausrichtung wird das Femur zunächst in der axialen Ebene um 180° gedreht. Konsekutiv steht die Facies patellaris des distalen Femurs parallel zur oberen Bildhorizontalen und der laterale Femurkondylus, die Fossa intercondylaris sowie der mediale Femurkondylus (von links nach rechts im transaxialen Schnittbild) sind zum unteren Bildrand gleichgerichtet. Abschließend Begradigung der Knochenprobe entlang der Z-Achse im sagittalen und koronaren Bild.



**Abbildung 9: DataViewer - Softwareaufnahme 2 zur Veranschaulichung der standardisierten Objektrotation.** Die Softwareaufnahme zeigt eine exemplarische 3D-Darstellung der proximalen Tibia (Kleintiermodell). Erste Zeile Koronarebene; zweite Zeile Transaxialebene mit Maßstabsleiste links und Sagittalebene rechts. Die farbkodierten Linien (rot, blau, grün) zeigen die korrespondierenden Schnittebenen. Für die korrekt anatomische Ausrichtung bedingt die rotationsstabile Scanposition der Tibia zunächst eine Rotation um  $180^\circ$  in der Frontalebene. Somit bildet sich die proximale Tibiametaphyse koronar im oberen Bildbereich ab und verläuft parallel zum oberen Bildrand. Im sagittalen Schnitt steht eine gedachte Linie durch die Epiphysenfuge planparallel zum vertikalen Rand. Axial kommt die Tibiakante nach einer  $180^\circ$ -Drehung ventral zu liegen. Abschließend Begradigung der Knochenprobe entlang der Z-Achse im sagittalen und koronaren Bild.



**Abbildung 10: DataViewer - Softwareaufnahme 3 zur Veranschaulichung der standardisierten Objektrotation.** Die Softwareaufnahme zeigt eine exemplarische 3D-Darstellung des Brustwirbels Th 9 (Kleintiermodell). Erste Zeile Koronarebene; zweite Zeile Transaxialebene mit Maßstabsleiste links und Sagittalebene rechts. Die farbkodierten Linien (rot, blau, grün) zeigen die korrespondierenden Schnittebenen. Für die korrekt anatomische Ausrichtung wird in der transaxialen Ansicht der Wirbelkörper mit seinem Processus spinosus zum unteren und mit seiner Vorderkante zum oberen Bildrand gleichgerichtet justiert. Die lateralen Kanten des Corpus vertebrae stehen somit parallel zum vertikalen Bildrand. Zur Begradigung der Knochenprobe werden die Boden- und Deckplatte koronar sowie sagittal die ventrale Wirbelkörperkante zur Horizontalen rotiert.



**Abbildung 11: DataViewer - Softwareaufnahme 4 zur Veranschaulichung der standardisierten Objektrotation.** Die Softwareaufnahme zeigt eine exemplarische 3D-Darstellung des proximalen Femurs (Großtiermodell). Erste Zeile Koronarebene; zweite Zeile Transaxialebene mit Maßstabsleiste links und Sagittalebene rechts. Die farbigen Linien (rot, blau, grün) zeigen die korrespondierenden Schnittebenen. Für die korrekt anatomische Ausrichtung wird das Femur, aufgrund der rotationsstabilen Scanposition, in der koronaren Schnittebene um 180° gedreht, sodass die Diaphyse im unteren Bildabschnitt zu liegen kommt. Rotation des Trochanter majors im axialen Bild nach lateral und abschließende Begradigung der Knochenprobe entlang der Z-Achse im sagittalen und koronaren Bild.

Über die Implementierung eines entsprechenden Softwaretools („Save transaxial images as a dataset“) wurde ein optischer Quader zur kortikal-nahen Probeneingrenzung verwendet. Der rotierte Datensatz wurde somit komprimiert und stand für die Bildverarbeitung im CTAn® zur Verfügung.

**CT-Analyser® - Bestimmung des Probenumfangs**

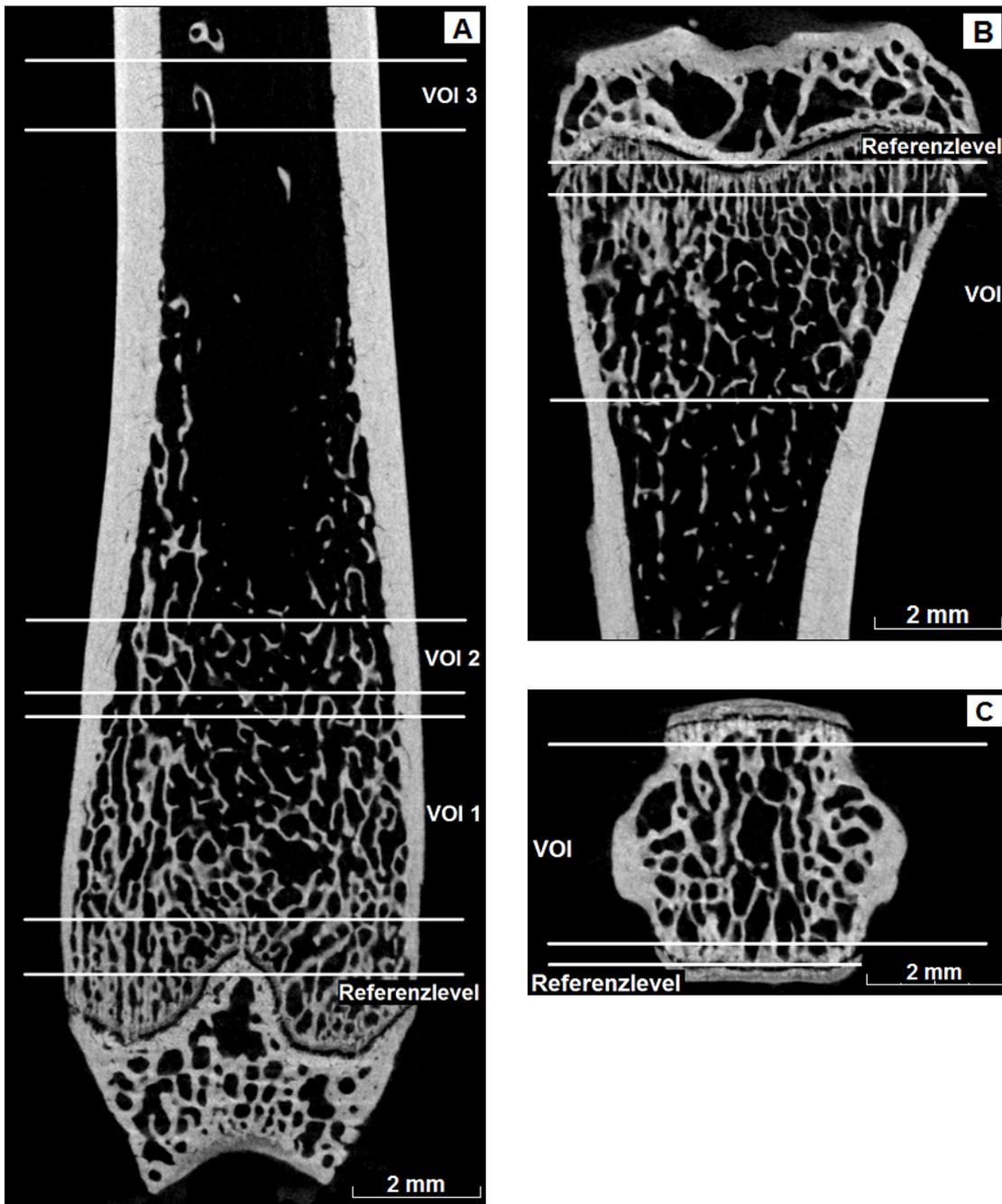
Anhand des optimierten Datensatzes konnte der Probenumfang gruppenspezifisch ermittelt, aber vor allem standardisiert festgelegt und quantifiziert werden. Der Ermittlung der Region of interest (ROI) ging zunächst das Festlegen des Probenvolumens (Volume of interest/ VOI) voraus. Hierfür suchte man in den transaxialen Schnittbildern das jeweilige Referenzlevel optisch auf (siehe Abbildung 12). Beim Kleintiermodell spielte die Wachstumsplatte des Knochens eine essentielle Rolle: Der primären Spongiosa (dichtes fadenförmiges Netzwerk) grenzten Bereiche mit geringer Röntgendichte (charakteristisch für Knorpel) an. Zur Bestimmung des Referenzlevels wurde die Schichthöhe benötigt, bei der sich zum ersten Mal eine Knorpelbrücke oder -verbindung über den Knochenquerschnitt zeigte.

Entlang der Z-Achse folgte direkt angrenzend der probenadaptierte Offset (definierte Menge an Schnittbildern vom Referenzlevel bis Beginn des Probenumfangs). Für die Analysen der Spongiosa exkludierte dieser Bereich die primäre Spongiosa, die für die Quantifizierung der ausgereiften (sekundären) Spongiosa nicht notwendig war. Für die Kortikalisregionen galt der Offset lediglich zur Festlegung des standardisierten Probenumfangs.

**Tabelle 6: Übersicht der probenadaptierten VOIs und Offsets für das adulte Kleintiermodell.** Tabellarisch zu entnehmen sind die Schnittanzahlen der VOIs und Offsets für die untersuchten Knochenproben. Bei einer Schichtdicke von ca. 9,96 µm berechnen sich folgende Distanzen entlang der Z-Achse. Die variierende Höhe der vertebralen Probe bestimmt das individuelle Ende des VOI, d.h. eine differierende Schnittanzahl bei standardisiertem Offset.

<b>Probe</b>	<b>VOI Schnittanzahl</b>	<b>VOI Distanz (ca.)</b>	<b>Offset Schnittanzahl</b>	<b>Offset Distanz (ca.)</b>
Femur - Trabekel	301	3,00 mm	100	1,00 mm
Femur – Kortikalis 1	101	1,01 mm	420	4,18 mm
Femur – Kortikalis 2	101	1,01 mm	1220	12,15 mm
Tibia - Trabekel	301	3,00 mm	50	0,50 mm
Th 9 - Trabekel	variabel		35	0,35 mm

Die Abbildung 12 auf der folgenden Seite visualisiert die probenspezifische Festlegung des VOI für das adulte Kleintiermodell.



**Abbildung 12: Übersicht zur Bestimmung des VOI für das adulte Kleintiermodell.** Die abgebildeten coronaren Schnittbilder der ossären Rattenproben verdeutlichen die standardisierte Probeneinteilung. **(A)** Distales Femur: Das Referenzlevel spiegelt die optisch festgelegte Wachstumsplatte wider. Die Distanz zum jeweiligen VOI ist einheitlich definiert, um die gewünschte Struktur vollständig zu erfassen. Bis zu Beginn des VOI1 wird die primäre Spongiosa exkludiert. Das VOI1 zeigt das für die Quantifizierung relevante Probenvolumen der metaphysennahen Trabekel. Das VOI2 umfasst die metaphysennahe (Kortikalis 1) und das VOI3 die mittlediaphysäre Kortikalis (Kortikalis 2). Transaxial betrachtet werden endostal und periostal Grenzen gesetzt. **(B)** Proximale Tibia: Das Referenzlevel stellt die in der axialen Ebene optisch ermittelte Epiphysenfuge dar. Die Distanz bis zum Probenvolumen VOI schließt

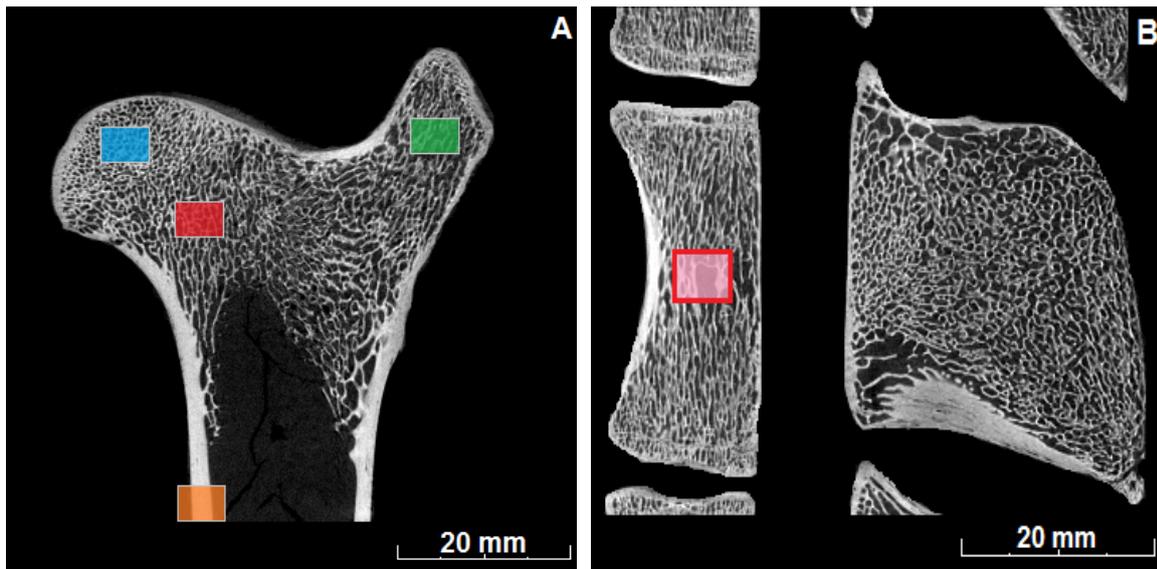
unreife Trabekel aus. Es wird die eingrenzende Spongiosa analysiert. **(C)** Th 9: Das VOI inkludiert die gesamten Trabekel nach einem standardisierten Offset bis proximal der vertebralen Deckplatte. Die Offset-Länge garantiert die zur Quantifizierung bedeutsame reife Spongiosa. Das Referenzlevel entspricht der vertebralen Bodenplatte.

Beim adulten Großtiermodell wurden drei spongiöse und ein kortikales VOI im Femur bestimmt. Tabelle 7 gibt die genaue Lokalisation und Ausdehnung wider.

**Tabelle 7: Übersicht der probenadaptierten VOIs und Offsets für das adulte Großtiermodell.** Tabellarisch zu entnehmen sind die Schnittanzahlen der VOIs und Offsets für die untersuchten Knochenproben. Der Offset für das VOI des Caput femoris geht vom Zentrum der Fovea capitis aus. Es folgt das VOI nach distal. Als Ausgangspunkt des collaren VOI dient der Unterrand der Fovea capitis. Sowohl der Offset als auch das VOI erstrecken sich nach distal. Letzteres gilt auch für das VOI des Trochanter majors, welche die Trochanter Spitze als Referenzlevel hat. Das kortikale VOI der Femurdiaphyse wird standardisiert vom Unterrand der Gelenkfläche des Femurkopfes ermittelt.

<b>Probe</b>	<b>VOI Schnittanzahl</b>	<b>VOI Distanz (ca.)</b>	<b>Offset Schnittanzahl</b>	<b>Offset Distanz (ca.)</b>
Caput femoris	151	4,99 mm	75	2,48 mm
Collum femoris	151	4,99 mm	100	3,31 mm
Trochanter femoris	151	4,99 mm	300	9,92 mm
Femur Kortikalis	151	4,99 mm	800	26,46 mm

Die Abbildung 13 stellt die probenspezifische Festlegung des VOI für das adulte Großtiermodell dar.



**Abbildung 13: Übersicht zur Bestimmung des VOI für das adulte Großtiermodell.** Die dargestellten coronaren Schnittbilder der Knochenproben des Großtiermodells zeigen die standardisiert festgelegten Bereiche. **(A)** Proximales Femur: Visualisierung der Regionen im Oberschenkelknochen: Blau schattiert ist das VOI des Caput femoris, rot das des Collum femoris sowie grün das des Trochanter majors. Die diaphysäre Kortikalisregion ist orange markiert. **(B)** LWK 2: Das im Zentrum des Wirbelkörpers rot kodierte Areal verdeutlicht den Bereich der Trabekelpräparation. Zur Darstellung im Submikrometerbereich ist in Abhängigkeit des Detektors eine Probe von 1 mm x 1 mm (Breite x Länge) notwendig.

### CT-Analyser® - Bestimmung der Region of interest

Essentiell für die anschließende Analyse des festgelegten Probenumfangs war die Ermittlung der Messregion in der Transversalebene. Nur anhand der ROI konnte sichergestellt werden, dass irrelevante Grauwertbereiche innerhalb des definierten VOI exkludiert wurden. Zur Konkretisierung der gruppenspezifischen ROI wurde für das Kleintiermodell teilweise eine automatisierte Segmentierung des Herstellers implementiert[114]. Diese beinhaltete vorerst eine Binarisierung des VOI über ein globales Schwellenwertverfahren. Bei der vorliegenden Grauwertskala von 256 Einheiten war Null als weiß und 255 als schwarz definiert. Anhand eines repräsentativen Schnittbildes konnte somit das Objekt (Knochen) über den visuell ermittelten Schwellenwert festgelegt werden. Für die hier durchgeführte gruppenspezifische Bildsegmentierung galt generalisiert ein mittlerer Schwellenwert von 75. Darüber hinaus wurden folgende Anwendungen bei der maschinellen ROI-Berechnung durchgeführt und individuell pro Gruppe adaptiert (siehe auch 8.7): Limitation auf das größte Objekt, Rauschsignalent-

fernung sowie Operatoren der Dilatation, Schrumpfung und Booleschen Algebra. Unter der Booleschen Algebra versteht man eine mathematische Logik. Grundlegend beruht sie auf binären Operatoren und mengentheoretischen Verknüpfungen. Als logische Operatoren gibt es die Konjunktion "UND", die Negation "NICHT" sowie Disjunktion "ODER". Der Durchschnitt, das Komplement und die Vereinigung stellen Verknüpfungsmethoden der Algebra dar. Aufgrund der komplexen Anatomie der Vertebrae fand hier eine manuelle Segmentierung (Freihandzeichnung Schicht für Schicht) der Spongiosa statt. Beim Großtiermodell wurde eine quadratische ROI-Fläche (5 x 5 mm) zum standardisierten Interpolieren des VOI genutzt. Die ROI des Caput femoris wurde 3 mm medial des Randes der Fovea capitis und die des Femurhalses 5 mm medial des bogenförmigen Strukturwechsels der Trabekel festgelegt. Das VOI des Trochanter lag stets zentral und die der Kortikalis bei sechs Uhr in der Transversalebene. Entsprechend wurden modifizierte Bitmap-Datensätze für die Quantifizierung abgespeichert.

**CT-Analyser® - Berechnung der Strukturparameter**

Nach abgeschlossener Bildverarbeitung zur Festlegung der Messregion wurde der neue Datensatz mit dem zu messenden VOI für die morphometrische Quantifizierung binarisiert. Bei der Schnittbildumwandlung von der Grauwertdarstellung in das Binärbild – mit Knochen und Nicht-Knochen – sollte möglichst wenig Strukturinformation verloren gehen, wofür eine Kombination der Schwellenwertfunktionen des CTAns Verwendung fand. Das optimale Binärbild kam über die Verwendung der Verfahren nach Rosenfeld sowie Waarsing zustande. Ersteres steht für eine globale Schwellenwertmethode[115], welche additiv durch das lokal adaptive Schwellenwertverfahren mittels Boolescher Algebra ergänzt wird [116, 117]. Konsekutiv kam nur die gewünschte Knochenstruktur (Spongiosa oder Kortikalis) der Untersuchungsgüter der Mikro-CT zur Darstellung.

Probenadaptiert[103] galt für die konstanten Schwellenwerte bei einem maximalen Grauwert von 255:

<b>Probe:</b>	<b>Schwellenwert - global:</b>	<b>- adaptiv:</b>
• Kleintiermodell – Femur	120	75
• Kleintiermodell – Tibia	110	75
• Kleintiermodell – Th 9	95	65
• Großtiermodell – Gruppe K	110	80
• Großtiermodell – Gruppe OVX	110	80
• Großtiermodell – Gruppe OVXD	110	80
• Großtiermodell – Gruppe OVXDS	90	65

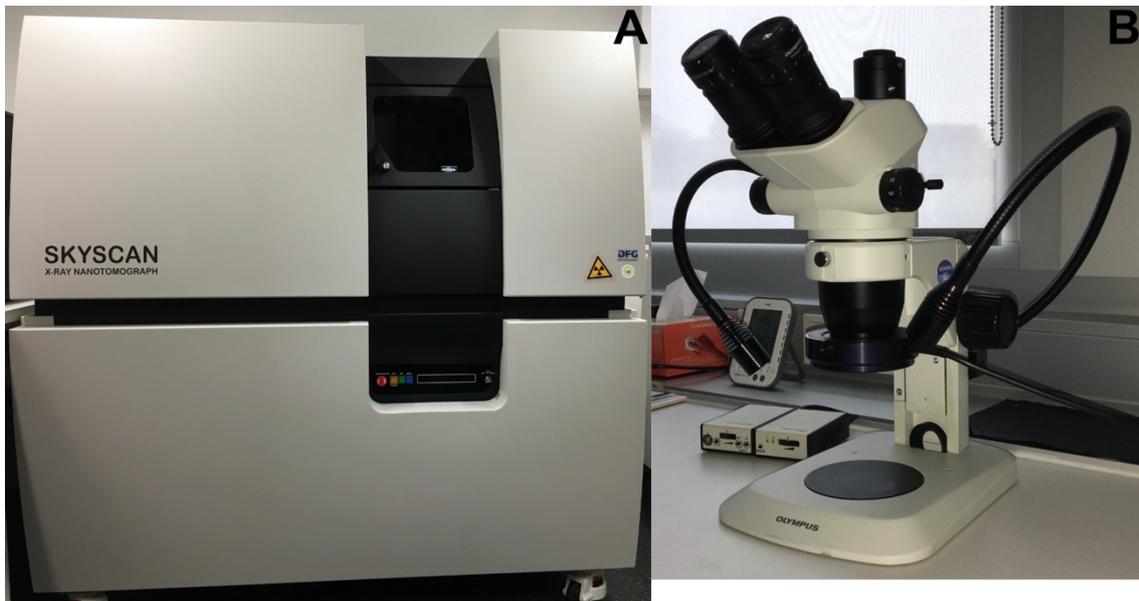
Für die gruppenspezifische Berechnung der in der Einleitung beschriebenen Strukturparameter wurde der modifizierte binarisierte Bitmap-Datensatz durch die CTAn-Software analysiert. Angelehnt an die Leitlinie für die Beurteilung der ossären Mikroarchitektur nach Bouxsein et al. wurde in dieser Arbeit die Knochenmorphometrie durch folgende Parameter charakterisiert[103]: BV/TV in %, Tb.N in  $\text{mm}^{-1}$ , Tb.Th bzw. Ct.Th und Tb.Sp in mm sowie SMI (siehe Tabelle 1).

### **CT-Analyser® - Beurteilung der Knochenmineralisierung**

Hauptsächlich wurde die  $\mu\text{CT}$  zur Generierung von Strukturparametern verwendet. Weiterführend stand sie zur Bestimmung der Gewebemineraldichte zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde die TMD von der BMD differenziert, die beide mit Hilfe des Programms CT-Analyser® ermittelt wurden. Basierend auf der Intensität der Röntgenstrahldämpfung wurde der Abschwächungskoeffizient in den bei der Rekonstruktion festgelegten bit-Grauwert umgewandelt. Die Graustufen innerhalb des definierten Objektvolumens wurden durch den Vergleich mit einem Referenzmaterial (hier: Calcium-Hydroxylapatit in zwei vom Hersteller abhängigen Dichten;  $a = 0,25 \text{ g/cm}^3$  und  $b = 0,75 \text{ g/cm}^3$ ) kalibriert, d.h. das Prinzip der Dichtekalibrierung war die Äquivalenz der Röntgenabsorption relativ zum Referenzmaterial bei identischer Röntgeneinstellung und demselben Scanner [118]. Konsekutiv sollte die Mikro-CT entsprechend des Schemas B der Abbildung 7 erfolgen. Die korrekte Durchführung der Methode zur Quantifizierung der Mineraldichte kann der Firmenanleitung „Bone mineral density (BMD) and tissue mineral density (TMD) calibration and measurement...“ entnommen werden[108]. Für die Interpretation des mittleren Dichtewertes aller Voxel innerhalb des ROI-Datensatzes galt, dass sich die BMD zum Ausdruck eines VOI mit Knochenmark und Spongiosa sowie die TMD für ein VOI ohne Weichgewebe (kortikaler Knochen) eignete. Bouxsein et al. differenzierten die BMD, als durchschnittliche Knochen- und Weichgewebedichte, von der TMD, welche nur die Dichte mineralisierten Gewebes definierte [118]. Die Verfälschung der BMD wurde durch den Ausschluss von Lufteinschlüssen innerhalb des VOI sichergestellt. Abschließend folgte die statistische Evaluierung der in Excel (© 2016 Microsoft Corporation, USA) tabellarisch dargestellten Ergebnisse.

#### 4.4 Nano-CT zum adulten Großtiermodell

In der Grundlagenforschung stellt die NCT einen technischen Fortschritt der hochauflösenden Schnittbildgebung dar[101]. Zur Darstellung der präparierten LWK-Trabekel im Submikrometerbereich wurde in dieser Arbeit das Nano-CT SkyScan 2011 der Firma Bruker® (Kontich, Belgien) des Labors für Experimentelle Radiologie Gießen verwendet. Verweisend auf den Abschnitt 4.3, fanden beim adulten Großtiermodell bzw. bei den LWK 2-Trabekel die gleichen Programme in der Bildverarbeitung Anwendung. Darüber hinaus liegt ein kollektivbezogenes Logfile der NCT in der Appendix vor (siehe Punkt 8.7). Die Tabelle 8 umfasst Determinanten der Datenakquisition und -rekonstruktion. Einen Eindruck von den verwendeten Geräten gibt die Abbildung 14.



**Abbildung 14: Untersuchungsverfahren - Nano-Computertomographie. (A)** Abbildung des Nano-CTs SkyScan 2011 der Firma Bruker® Kontich, Belgien: Die konservierten Trabekel werden mittels einer Parafilm®-Hülle vor Austrocknung geschützt. Bewegungsstabilität gewährt die Probenbefestigung am Messingfuß. **(B)** Abbildung des Olympus® Zoom-Stereomikroskops SZ61: Freilegung einzelner Trabekel (Größe: 1 mm x 1 mm, limitiert durch Detektorgröße) unter 2,5-fachen Zoomtrieb und mithilfe von Präparierbesteck.

##### 4.4.1 Akquisition der Daten

Der verwendete Nano-Computertomograph SkyScan 2011 ist der weltweit erste Labor- $\eta$ CT-Scanner mit einer nahezu äquivalenten Auflösung wie die der Synchrotron-

Tomographie. Die Fokusgröße liegt im Bereich von  $< 400 \text{ nm}$ . Neben der Mikrofokus-/Transmissionsröhre (vakuumstabiles Lanthanhexaborid als Glühkathodenmaterial) mit Fächerstrahlgeometrie sind der Probenschlitten und die hochauflösende Charge-coupled-Device (CCD)-Kamera als gekühlter Röntgendetektor (Matrix von höchstens  $1024 \times 1280$  Pixeln mit Einzelphotonenempfindlichkeit) Hauptbestandteil der Funktionseinheit. Diese ist in ein Gehäuse eingebaut, welches mit einer Vakuumpumpe, einem Druckluftkompressor und einem Rechner zur Systemkontrolle und Datenrekonstruktion verbunden ist [101, 119]. Zahlreiche technische Gerätefaktoren, wie die Röhrenspannung, die Stromstärke, die Geräteleistung, die Belichtungszeit pro Frame sowie der Rotationsschritt, beeinflussten die probenadaptierte Datenakquisition der Schaftrabekel des Lendenwirbelbereichs.

Das in Formaldehyd konservierte Trabekelpräparat war von Parafilm® umhüllt, um einen Schutz vor Austrocknung sicherzustellen. Dieses Konstrukt wurde unter Verwendung von Formmasse am Messingfuß des Probenhalters bewegungsstabil fixiert und anschließend die Position mittels einer Einzelaufnahme kontrolliert sowie gegebenenfalls bei Schiefelage adjustiert. Während des Scans durchdrangen die Röntgenstrahlen den am Probenhalter befestigten Prüfling, der zwischen der Röntgenröhre und der CCD-Kamera platziert war. Der maximale Durchmesser des Untersuchungsgutes (hier: Breite  $1 \text{ mm}$ , Länge  $1 \text{ mm}$ ) war durch die Detektorgröße sowie gewünschte Ortsauflösung limitiert, was ebenso den Präparationsaufwand beeinflusste. Die projizierte Probe des LWK 2-Trabekels sollte die Detektorränder bestmöglich nicht überragen, um keine Bildartefakte bzw. Einbußen der Bildauflösung zu erhalten. Für eine standardisierte Datengewinnung rotierte das Präparat für  $180^\circ$  in Rotationsschritten von jeweils  $0,20^\circ$  um seine Achse. Um ein minimales Signal-Rausch-Verhalten sicherstellen zu können, wurden pro Schritt sechs Aufnahmen gemacht.

### 4.4.2 Datenrekonstruktion

Der vorliegende TIFF-Rohdatensatz des gescannten Trabekelobjekts wurde analog zur Erläuterung in Abschnitt 4.3.2 rekonstruiert. In diesem Fall betrug die Rekonstruktionszeit zur Umwandlung in transaxiale Schnittbilder im Durchschnitt  $6,32 \text{ min}$ . Eine isotrope Voxelgröße von  $700 \text{ nm}$  definierte den Bilddatensatz nach der Datenrekonstruktion.

#### 4.4.3 Quantitative Bildanalyse

Es fanden die oben beschriebenen Bildanalyseprogramme für die digitale Bildverarbeitung und Quantifizierung der Zelllakunen der Osteozyten Verwendung (siehe Punkt 4.3.3).

##### **DataViewer®**

In diesem Fall wurde direkt nach dem Laden des rekonstruierten BMP-Datensatzes ein standardisiertes VOI eines Trabekels festgelegt: Für eine identische Trabekelrotation stellte man in den drei Schnittebenen die jeweils mittigste Schicht des Objekts ein. Ziel war primär die Ausrichtung des Trabekelhauptstamms parallel der Z-Achse, um Trabekelausläufer koronar und sagittal entlang ihrer Längsachse senkrecht anzuschneiden. Somit war morphologisch ein Knotenpunkt des Trabekels (Trabekelkreuzung) miterfasst. Das spezifische VOI wurde über das Softwaretool („Save transaxial images as a dataset“) mittels des Quaders (definierte Größe von 400 x 700 x 700 Voxelkantenlängen; Probenvolumen von ca.  $67,271 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ ) begrenzt. Für die standardisierte Ausrichtung des Quaders galt, dass der Trabekelhauptstamm im Zentrum des VOI verlief. Der komprimierte Datensatz (standardisiertes VOI) stand entsprechend für die Bildverarbeitung im CT-Analyser® zur Verfügung.

##### **CT-Analyser®**

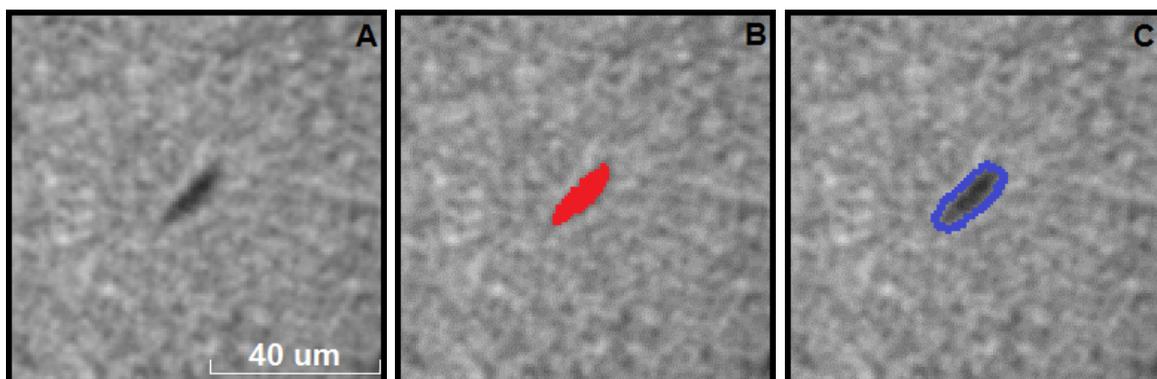
Im Rahmen der Quantifizierung der Osteozytenlakunen und ortsspezifischen Grauwertdichte wurden folgende Parameter erhoben (siehe Tabelle 1): zelluläre Durchschnittsvolumen, mittlere Anzahl der Osteozyten pro  $\mu\text{m}^3$ , Graustufenverteilung der Zellakune sowie der umliegenden mineralisierten Matrix und das zugehörige Verhältnis beider Dichten. Um einen fundierten Vergleich zwischen den festgelegten Regionen der Dichtemessung zu ermöglichen, wurde die quantitative Relation R eingeführt. In Anlehnung an Pauwels et al. ergab sich [109]:

$$R = \frac{\text{Durchschnittsgraustufe der mineralisierten Matrix} - \text{Durchschnittsgraustufe des Osteozyts}}{\text{Durchschnittsgraustufe der mineralisierten Matrix}}$$

Die Grundlage für die Ermittlung der Kenngrößen war zunächst die VOI-Verarbeitung im CTAn®. Hierfür wurden die Trabekelpräparate gruppenspezifisch mit Hilfe einer probenadaptierten Arbeitsliste automatisch segmentiert (Anwendung von Segmentationsalgorithmen zur Rauschsignalentfernung sowie Trabekelunterteilung anhand Boolescher Algebra) und binarisiert. Es galten folgende Schwellenwerte:

Probe:	Schwellenwert - global:
• Gruppe K	90
• Gruppe OVX	95
• Gruppe OVXD	100
• Gruppe OVXDS	95

Im Dreidimensionalen ergaben sich drei diverse Regionen zur Analyse: die gesamte Probe mit allen Zelllakunen, den Trabekelkern (inneres Drittel), der die zentralen Osteozyten inkludierte und den Trabekelrand (äußere zwei Drittel), der die peripheren Zellen beinhaltete. Ein Trabekeldrittel war als 40 Pixel im zweidimensionalen Schnittbild definiert. Im Anschluss an die morphometrische Quantifizierung erfolgte über die Verwendung der drei Messregionen des Trabekels die manuelle Dichtebestimmung der Zelllakunen und perilakunären Region (siehe Abbildung 15). Standardisiert wurden willkürlich mindestens 30 Osteozyten pro Region aufgesucht und einzelne Volume of interests mit einer Kantenlänge von 90  $\mu\text{m}$  um die Lakunen gesetzt. Über einen globalen Schwellenwert von durchschnittlich 130 und boolescher Operatoren wurden die Zelllakune als Objekt sowie die mineralisierte Matrix als Saum von 6 Voxel binarisiert. Konsekutiv war die Dichteerfassung in durchschnittlichen Graustufen möglich. Die Abbildung 15 visualisiert das Vorgehen.



**Abbildung 15: Analytik zur Messung der Grauwertverteilung. (A)** VOI-Darstellung einer Zelllakune eines Osteozyten. **(B)** Die Region der Osteozytenlakune ist rot markiert. Sie dient der Messung der Grauwertverteilung im Osteozyten. **(C)** Essentiell zur Bestimmung der Grauwertverteilungsratio R ist die umliegende mineralisierte Matrix. Hier der blau kodierte Bereich.

Sämtliche Parameter wurden tabellarisch in Excel (© 2016 Microsoft Corporation, USA) dargestellt, um abschließend die statistische Analyse durchführen zu können.

Die Tabelle 8 umfasst Determinanten der Datenakquisition und -rekonstruktion.

**Tabelle 8: Übersicht zur Datenakquisition & -rekonstruktion.** Gegenübergestellt sind die zu den einzelnen Versuchen verwendeten Computertomographen mit dazugehöriger Einstellung für Bildakquisition & -rekonstruktion.

SCANNER	MIKRO-CT_ SKYSCAN_1173	MIKRO-CT_ SKYSCAN_1173	NANO-CT_ SKYSCAN_2011
Tierversuch	Ratten (Femur, Tibia & Th 9)	Schafe (Femur)	Schafe (LWK 2-Trabekel)
Typ	High Energy mikro-CT	High Energy mikro-CT	High Resolution nano-CT
Röntgenquelle (möglicher Bereich)	U=80 kV (40 - 130 kV) I=100 µA (≤ 300 µA)  P=8 W	U=130 kV (40 - 130 kV) I=60 µA (≤ 300 µA)  P=8 W	U=50 kV (20 – 80 kV) I=160 µA (100 - 200 µA)  P=8 W
	Mikrofokus- Reflexionsröhre < 5 µm	Mikrofokus- Reflexionsröhre < 5 µm	Nanofokus- Transmissionsröhre < 400-600 nm
	Kegelstrahlgeometrie	Kegelstrahlgeometrie	Fächerstrahlgeometrie
Röntgendetektor	Flachdetektor Matrix: 2240 x 1836 Pixel	Flachdetektor Matrix: 2240 x 2016 Pixel	CCD Matrix: 1024 x 1280 Pixel
Filter	1 mm Aluminium vor Röntgenröhre	0,25 mm Kupfer vor Röntgenröhre	KEIN FILTER
Grauwerttiefe	16 Bit	16 Bit	16 Bit
Rotationsschritt	0,25°	0,20°	0,20°
Einzelbilder/ Rotation	4	4	6
Belichtungs- zeit/Einzelbild	750 ms	1150 ms	2000 ms
Random- Movement	20°	20°	nicht angewandt

<b>Flat-Field-Korrektur</b>	angewandt	angewandt	angewandt
<b>Pixelgröße</b>	9,96 µm	33,07 µm	700 ηm
<b>Durchschnittliche Scandauer</b>	1 h 15 min 47 s ( <i>Femur</i> ) 1 h 12 min 37 s ( <i>Th 9</i> ) 1 h 12 min 38 s ( <i>Tibia</i> )	1h 56 min 19 s	3 h 12 min 37 s
<b>Bildformat</b>	TIFF (Tagged Image File Format)	TIFF (Tagged Image File Format)	TIFF (Tagged Image File Format)
<b>Probenkonservierung</b>	Mullbinde, Trockeneis, Probenröhrchen, Styropor & Kryoscan-Behälter	Mullbinde, Trockeneis, Probenröhrchen, Styropor & Kryoscan-Behälter	Formaldehyd-getränkt in Parafilm, Probenhalter
<b>Nachabgleich</b>	+1 ( <i>Femur</i> ) -2 ( <i>Th 9</i> ) +3 ( <i>Tibia</i> )	+0,50	+2
<b>Mittlere Rekonstruktionszeit (total)</b>	25,18 min ( <i>Femur</i> ) 21,12 min ( <i>Th 9</i> ) 36,97 min ( <i>Tibia</i> )	29,18 min	6,32 min
<b>Dateityp</b>	BMP (Bitmap)	BMP (Bitmap)	BMP (Bitmap)
<b>Glättungs-Kernel</b>	2 (Gaussian-Regression)	2 (Gaussian-Regression)	2 (Gaussian-Regression)
<b>Ringartefakt-korrektur</b>	6 ( <i>Femur</i> ) 5 ( <i>Th 9</i> ) 5 ( <i>Tibia</i> )	6	12
<b>Strahlen-aufhärtungs-korrektur</b>	35 %	35 %	45 %

#### **4.5 Statistische Auswertung und Bilddarstellung**

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse aller Quantifizierungen und Analysen wurde das Softwareprogramm IBM® SPSS® Statistics (Version 23.0.0.2, IBM Corporation – New York, USA) verwendet. Basierend auf dem metabolischen Status des Untersuchungstieres wurde eine gruppenspezifische und deskriptiv-explorative Datenanalyse durchgeführt. In die Analyse wurden nur nicht-frakturierte Proben inkludiert. Die Hypothesentestung erfolgte über die Kruskal-Wallis-Analyse bei unabhängigen Stichproben. Nach Anpassung der statistischen Signifikanz (Post-Hoc-Analyse zwischen

den jeweiligen Testgruppen) über die Dunn-Bonferroni-Methode wurde die Nullhypothese entsprechend abgelehnt oder beibehalten.

Hierbei gilt ein Signifikanzniveau von  $\alpha < 0,05$ . In dieser Arbeit wurden Signifikanzangaben als \* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$ , \*\*\* für  $p < 0,001$  und n.-s. für nicht signifikant abgekürzt. Die gezielt paarige Korrelation sowie der partielle Vergleich zur Referenzgruppe wurden mit „I“ dargestellt. Hingegen wurde die multiple Korrelation mit „[“ veranschaulicht. Vereinzelt gruppenspezifische Ausreißer wurden kreis-/ sternförmig markiert. Die Visualisierung erfolgte in farbig kodierten Boxplots-Diagrammen, wobei die X-Achse die Kollektivgruppen und die Y-Achse den analysierten Parameter beinhaltete. Formell finden sich sämtliche Statistikdaten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (MW  $\pm$  SD) wieder.

Insbesondere in den Sozialwissenschaften und der Psychologie, aber auch immer mehr in der Medizin gewinnt die Effektstärke in statistischen Auswertungen Bedeutung. Der Grund für die Verwendung von Effektstärkemaßen ist die Darstellung der Relevanz/ Ausmaß eines Zusammenhangs. Empirisch fundiert wird die berechnete Effektstärke über das dimensionslose Maß der Korrelation R oder Cohen's D als kleiner, mittlerer oder großer Effekt beschrieben. In dieser Arbeit wurde der statistische Effekt aufgrund der umfangreichen Ergebnisdarstellung nicht quantifiziert. Allerdings gilt, dass ein kleiner p-Wert mit einer hohen Effektstärke assoziiert ist.

Zur Visualisierung des gesamten Untersuchungskollektivs wurden diverse Bilder mit Hilfe der Programme CTvol® Realistic 3D-Visualization (Version 2.3.2.0, Bruker® microCT, Kontich, Belgien) und Analyze® (Version 11.0, Biomedical Imaging Resource Mayo Clinic Rochester, MN, USA) generiert. Als Grundlage für die dreidimensionale Bilddarstellung diente der entsprechende Datensatz multiplanarer Rekonstruktionen, welche die Software algorithmisch interpolierte. Konsekutiv wurden Voxelinheiten überbrückt. Das genaue Vorgehen war der jeweiligen Herstelleranleitung zu entnehmen. Die Bilder der Abbildungen 16, 17, 18 und 23 wurden als Volume-Rendering-Model über Analyze® erstellt. Analyze® griff hierbei auf eine interpolative Gradient-Shading-Methode zurück[120]. Bei der Abbildung 24 handelt es sich um das 3D-Surface-Rendering-Verfahren. Zur Isoflächendarstellung verwendete die CTvol®-Software den Marching-Cubes-Algorithmus von Lorensen et al. (Lorensen WE, Cline HE (1987) Marching cubes: a high resolution 3d surface construction algorithm. Computer graphics 21 (4): 163-169) [121].

## 5 ERGEBNISSE

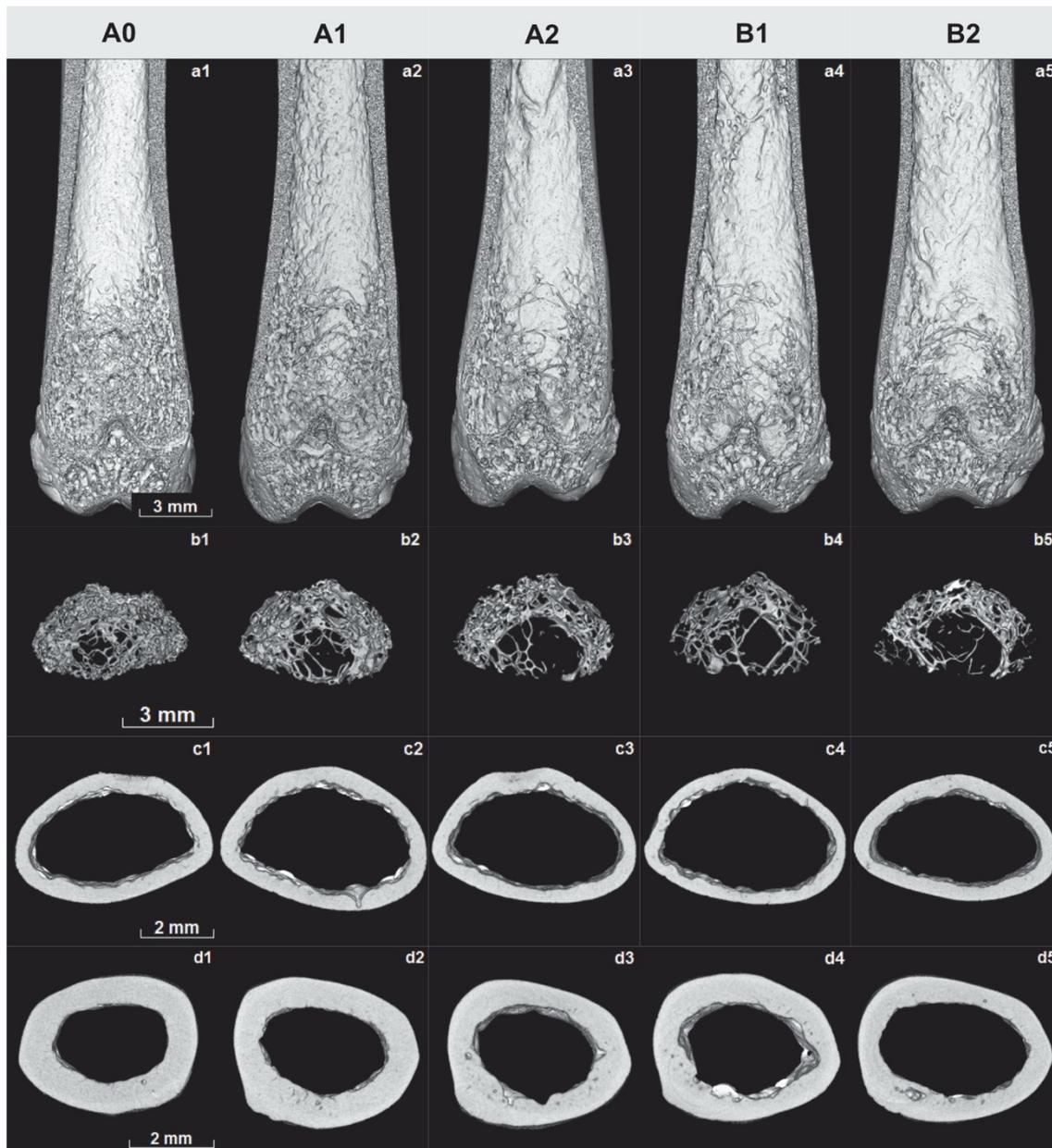
### 5.1 Visuelle Bildinspektion des adulten Kleintiermodells

Insgesamt zeigen die 3D-Volume-Rendering-Grafiken der folgenden Abbildungen 16, 17 und 18 eine deutliche Veränderung der Spongiosa, aber auch der Kortikalis. Im Rückblick auf die Feinpräparation aller ossären Proben ließ sich die zunehmende Brüchigkeit des Knochens zwischen den Kollektivgruppen nachvollziehen. Bereits bei der Entfernung des Weichteilmantels zur Freilegung des Skelettabschnittes musste dies berücksichtigt werden, um keine sekundären Frakturen zu verursachen.

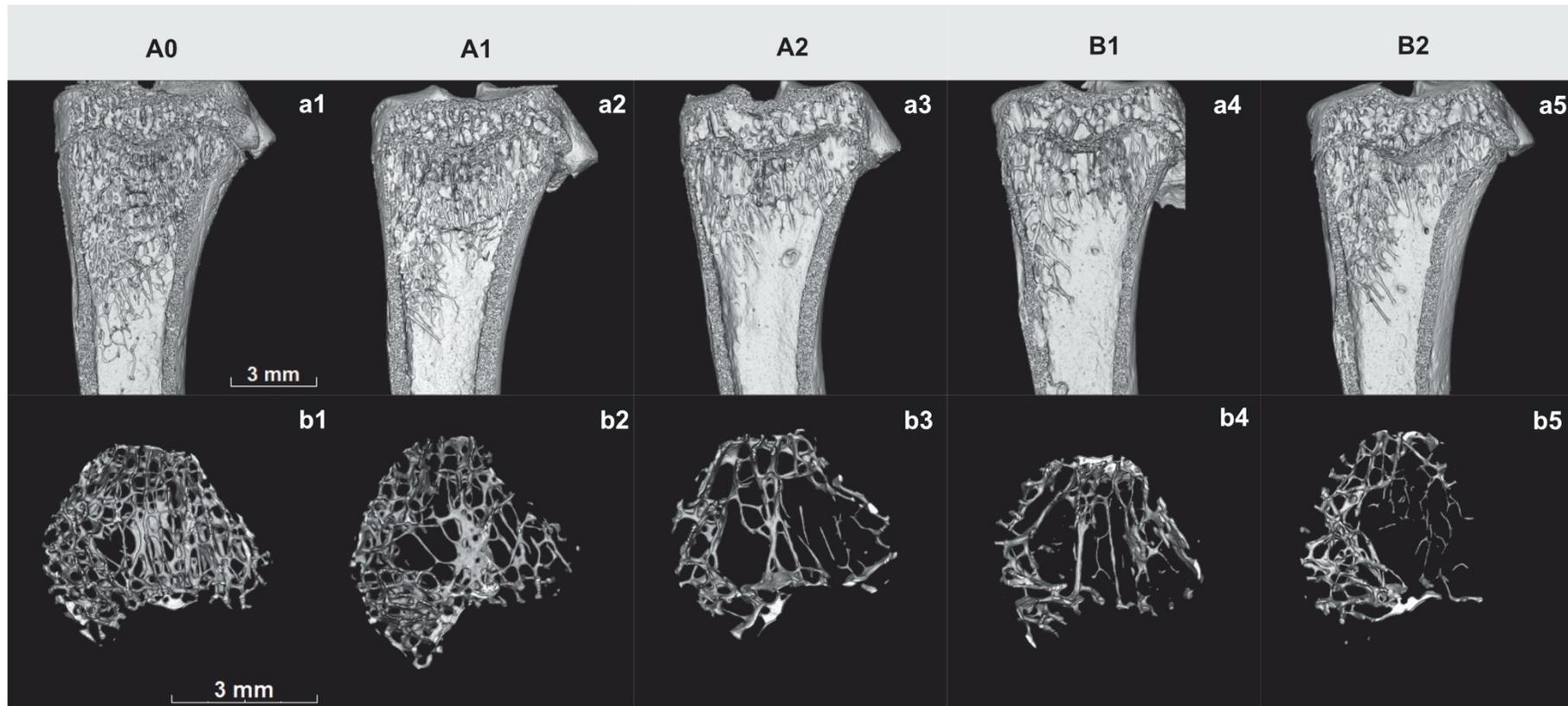
Bereits die Femurübersicht-Darstellung (siehe Abbildung 16) in Zeile a macht zahlreiche Knochenveränderungen erkenntlich. Bildmorphologisch erscheint die Dicke der Substantia compacta im Bereich der Metaphyse unverändert, jedoch ist eine progrediente Ausdünnung der Substantia compacta im Bereich der Diaphyse von der Grafik a1 zu a5 eindeutig. Die dreidimensionalen Bilder der Zeile c und d spiegeln diesen Eindruck wider. Darüber hinaus verzeichnet Zeile b einen starken mikroarchitektonischen Wandel. Von links nach rechts ist ein zunehmender Verlust von Knochenmasse anhand der Rarefizierung der Trabekel wahrnehmbar. Hinzu stellt sich die Spongiosa weniger vernetzt dar und ihre metaphysäre Ausdehnung entlang der Z-Achse ist regredient – siehe Zeile a.

Korrespondierend hierzu verhält sich die proximale Tibia (siehe Abbildung 17). Die Bildfolge von a1 zu a5 (bzw. b1 zu b5) zeigt den Rückgang des spongiösen Knochens. Konsekutiv reduziert sich die Trabekelanzahl und die Distanz zwischen den Trabekeln nimmt zu.

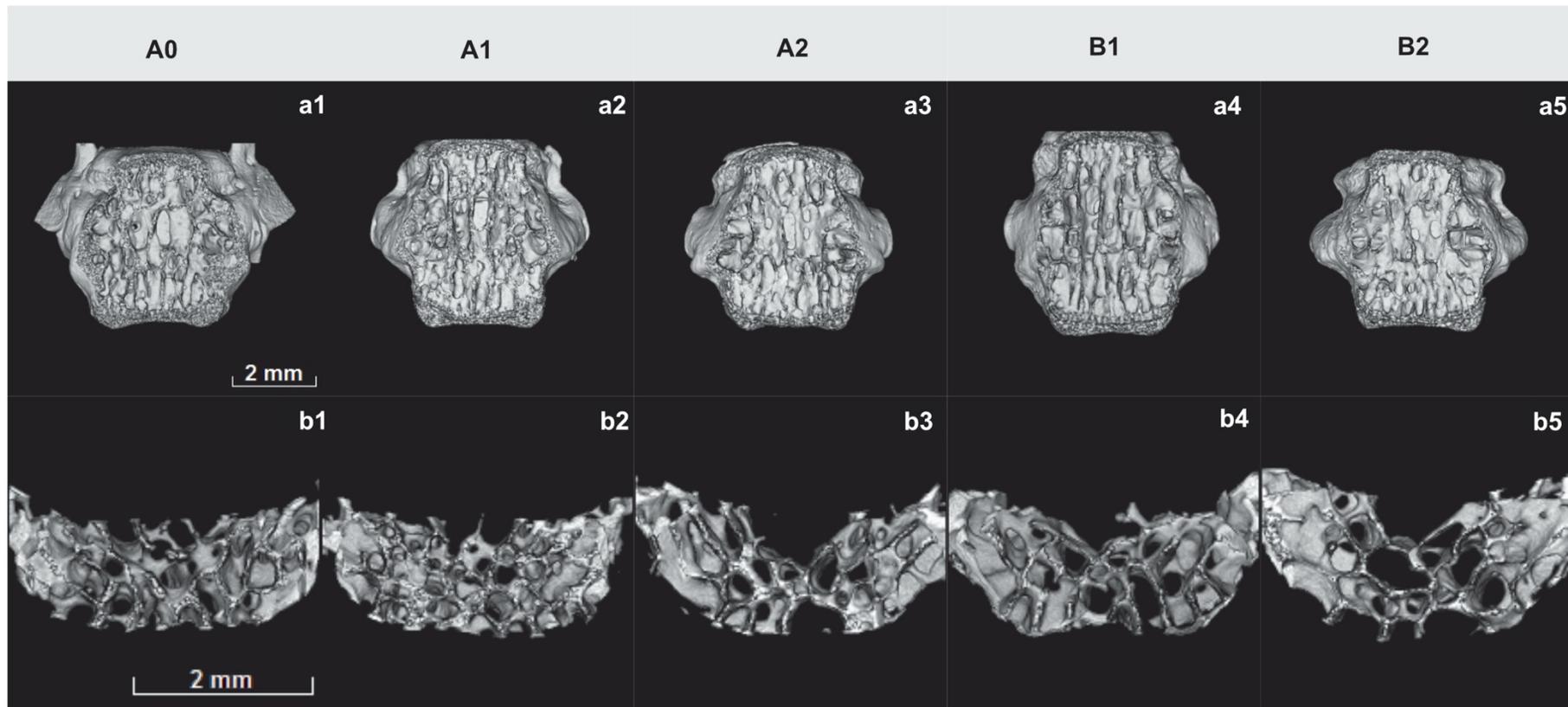
In der Visualisierung der vertebralen VOIs (siehe Abbildung 18) sind ebenso morphologische Veränderungen befundbar. Ausgehend von Zeile b zeigt sich im Verlauf der Grafiken eine starke Abnahme des Knochenvolumens, der Trabekeldicke und der -vernetzung, d.h. es liegt auch hier eine progrediente Spongiosararefizierung vor. Ein deutlicher Unterschied des intertrabekulären Abstands ist auffällig. Die korrespondierende Kongruenz der Gruppe A0 und A1 verändert sich sprunghaft zum restlichen Kollektiv, d.h. das Trabekelgerüst kommt bei den Gruppen A2, B1 und B2 instabiler zum Ausdruck. Hierbei hebt sich die letzte Gruppe nochmals deutlich ab.



**Abbildung 16: Vergleichende Visualisierung der Volume of interests der Femora des adulten Kleintiermodells.** Repräsentative 3D-Volume-Rendering-Grafiken verdeutlichen den metabolischen Einfluss auf die Knochenarchitektur. Die Spalten zeigen die Untersuchungsgruppen (von links nach rechts: **A0** = Sham 0 Monate, **A1** = Sham 3 Monate, **A2** = Sham + DD 3 Monate, **B1** = OVX 3 Monate, **B2** = OVX + DD 3 Monate). Zeile **a** beinhaltet die koronare Femurübersicht (median angeschnitten) und **b** das trabekuläre VOI1 in der axialen Ebene. Die beiden letzten Reihen visualisieren die kortikalen Messvolumina von transaxial (VOI2 in **c**, VOI3 in **d**). Spalte 1 informiert über den konstanten Maßstab pro bildspezifischer Zeile. Morphologische Veränderungen sind kategorisch zu erkennen: Zeile **a** und **b** zeigen eine deutliche Rarefizierung der Trabekel sowie Abnahme der Spongiosavernetzung von A0 zu B2 auf. Den Verlust des Knochenvolumens spiegelt Reihe **d** ebenso wider. Hier kommt die gleichgeordnete Ausdünnung der Kortikalis zum Vorschein.



**Abbildung 17: Vergleichende Visualisierung der Volume of interests der Tibia des adulten Kleintiermodells.** Die 3D-Volume-Rendering-Darstellungen veranschaulichen den gruppenspezifischen ossären Umbau durch die metabolisch induzierte Osteoporose. Das Tierkollektiv ist von links nach rechts gruppiert - **A0** = Sham 0 Monate, **A1** = Sham 3 Monate, **A2** = Sham + DD 3 Monate, **B1** = OVX 3 Monate, **B2** = OVX + DD 3 Monate. Reihe **a** zeigt die proximale Tibia von frontal in der Medianebene und Zeile **b** beinhaltet das Messvolumen der Spongiosa von axial. Der ersten Spalte ist der reihenhomogene Maßstab zu entnehmen. Die Knochenmorphologie lässt fast kongruente Veränderung zum Oberschenkelknochen erkennen.



**Abbildung 18: Vergleichende Visualisierung der Volume of interests der Th 9 des adulten Kleintiermodells.** Um den Einfluss der Osteoporoseinduktion darzustellen, wurden 3D-Volume-Rending-Grafiken erstellt. Die Tiergruppen (**A0** = Sham 0 Monate, **A1** = Sham 3 Monate, **A2** = Sham + DD 3 Monate, **B1** = OVX 3 Monate, **B2** = OVX + DD 3 Monate) sind entsprechend der Spalten separiert. Zeile **a** beinhaltet die frontale Wirbelkörperübersicht (median angeschnitten). In der Reihe **b** folgt das komplette VOI der Spongiosa von axial. Die Bilder zeigen morphologische Veränderungen (von links nach rechts): Das Knochenvolumen, die Trabekeldicke sowie -vernetzung nehmen ab und die Spongiosa rarefiziert progredient.

## 5.2 Quantitative Mikro-CT des adulten Kleintiermodells

Am Ende jedes Subkapitels erfolgt die graphische Darstellung der quantitativen Ergebnisse in Form von Boxplots-Diagrammen mit Signifikanzangaben in Bezug auf die Referenzgruppe A1. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse zwischen A0 und A1 wurde stets die Signifikanzberechnung eingezeichnet. Der Übersicht wegen wurden nur die p-Werte des restlichen Untersuchungskollektivs zu A1 markiert.

### 5.2.1 Distales Femur – Spongiosa

#### **Veränderung der ossären Mikroarchitektur zwischen den Untergruppen**

Über den Studienzeitraum fiel insgesamt ein Rückgang des quantitativen Knochenvolumenanteils (**BV/TV**) in Prozent auf, d.h. zwischen den Kollektivgruppen lag eine abnehmend gestufte Reduktion der BV/TV vor. Bereits zwischen den Gruppen A0 und A1 war eine Tendenz zu erkennen ( $17,7 \pm 2,02$  (A0) vs.  $15,3 \pm 4,91$  (A1), n.-s.). Die Femora der Gruppe A2 wiesen einen mittleren Knochenvolumenanteil von  $14,7 \pm 5,90$  % (n.-s.) auf und setzten den Trend fort. Die Sham-Tiere verzeichneten somit keinen signifikanten Rückgang. Hingegen maß die Gruppe B1 einen signifikanten Unterschied ( $15,3 \pm 4,91$  (A1) vs.  $8,03 \pm 3,04$  (B1),  $p = 0,0384$ ). Die progrediente Reduktion des Knochenvolumenanteils brachte eine deutlichere Signifikanz zwischen den Gruppen A1 und B2 mit sich ( $15,3 \pm 4,91$  (A1) vs.  $7,16 \pm 1,01$  (B2),  $p = 0,0116$ ).

Die drei monatige Standzeit führte zu keinem Unterschied der mittleren Trabekelanzahl **Tb.N** (pro Millimeter) von der Gruppe A0 zur Gruppe A1 ( $2,05 \pm 0,198$  (A0) vs.  $2,05 \pm 0,684$  (A1), n.-s.). Der gruppenspezifische Vergleich unter den Tieren nach 3 Monaten lieferte eine zunehmende Abnahme der Tb.N. Zwischen der A1- und A2-Gruppe lag eine nicht signifikante Minderung vor ( $2,05 \pm 0,684$  (A1) vs.  $1,76 \pm 0,669$  (A2), n.-s.). Die restlichen Gruppenvergleiche verzeichneten signifikante Unterschiede ( $(2,05 \pm 0,684$  (A1) vs.  $0,946 \pm 0,327$  (B1),  $p = 0,0156$ ) und  $(2,05 \pm 0,684$  (A1) vs.  $0,825 \pm 0,119$  (B2),  $p < 0,0028$ ). Konsekutiv erreichte die OVX + DD-Gruppe die minimalste Anzahl der Trabekel mit der entsprechend maximalsten Signifikanz beim Vergleich zur Referenzgruppe.

Die durchschnittliche Trabekeldicke (**Tb.Th**) in Millimeter zeigte insgesamt keine signifikante Veränderung. In der statistischen Auswertung stellte sich A0 mit einer mittleren Tb.Th von  $0,0863 \pm 0,00861$  mm dar. Eine diskrete, aber nicht signifikante Minderung wies A1 auf ( $0,0863 \pm 0,00861$  (A0) vs.  $0,0751 \pm 0,00816$  (A1), n.-s.). Nach einer leich-

ten Zunahme der Dicke zwischen A1 und A2 ( $0,0751 \pm 0,00816$  (A1) vs.  $0,0834 \pm 0,00689$  (A2), n.-s.), blieb sie im weiteren Verlauf fast konstant. Somit lag bei den Gruppen B1 und B2 auch kein signifikanter Unterschied vor (A1 vs. B1, n.-s. und A1 vs. B2, n.-s.).

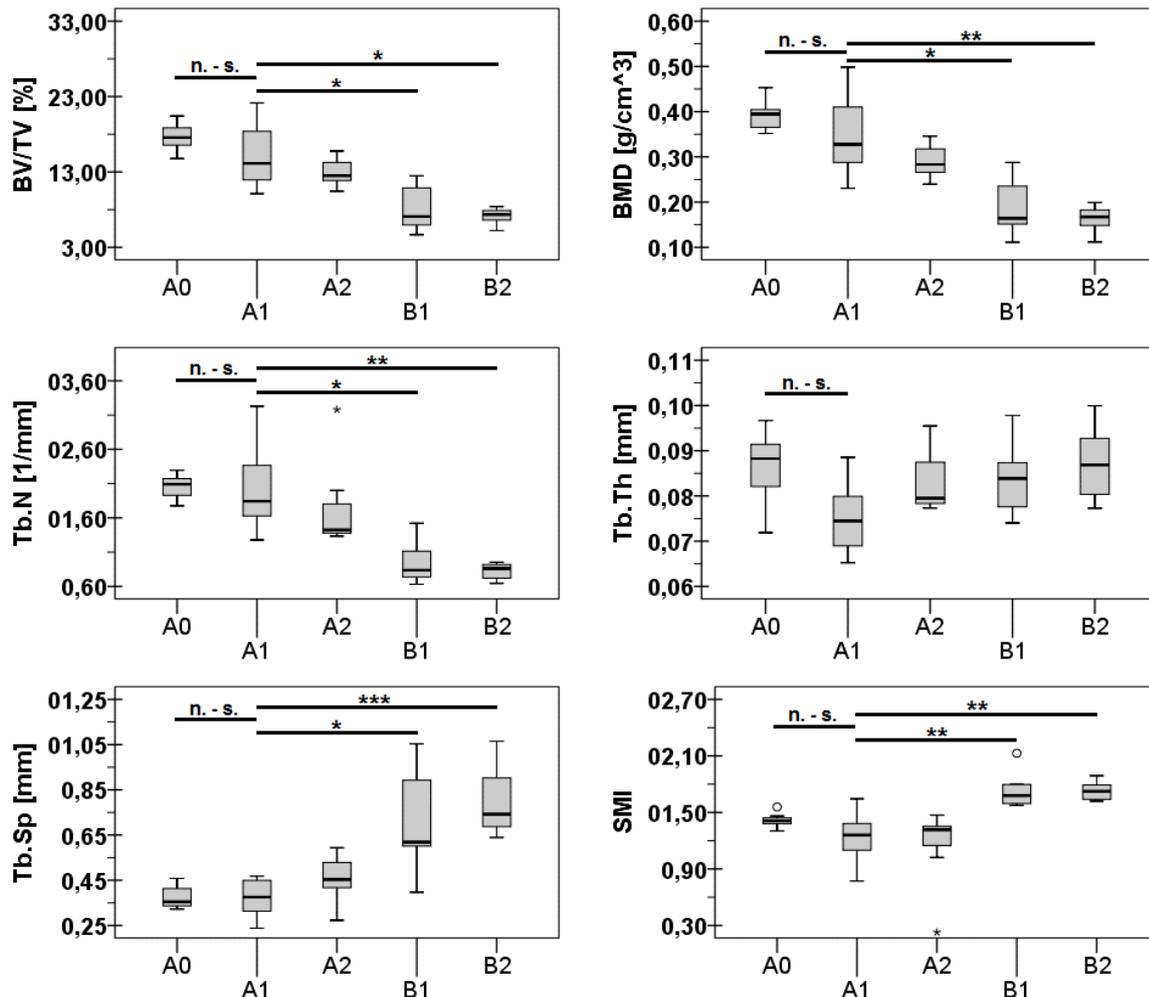
Eine hoch signifikante Zunahme des Durchschnittsabstandes der einzelnen Trabekel untereinander (**Tb.Sp**, in Millimetern) war bei der B2-Gruppe im Vergleich zur Referenzgruppe A1 nachweisbar ( $0,373 \pm 0,0917$  (A1) vs.  $0,796 \pm 0,166$  (B2),  $p < 0,0008$ ). Ein weiterer signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen den Tieren der A1-Gruppe zu denen der OVX-Gruppe ( $0,373 \pm 0,0917$  (A1) vs.  $0,697 \pm 0,235$  (B1),  $p = 0,036$ ). Nach dem Untersuchungszeitraum war eine geringe Zunahme der Distanz zwischen einzelnen Knochenbälkchen erkennbar ( $0,377 \pm 0,0541$  (A0) vs.  $0,373 \pm 0,0917$  (A1), n.-s.) und ( $0,373 \pm 0,0917$  (A1) vs.  $0,459 \pm 0,112$  (A2), n.-s.). Die Distanzzunahmen waren jedoch nicht signifikant.

Die bildmorphologischen Unterschiede der Mikroarchitektur (siehe Abbildung 16) werden durch den **SMI** (relative Strukturanordnung der Spongiosa, Structure Model Index) verdeutlicht. Zwischen den sham-operierten Tieren lag eine minimale Reduktion ohne signifikante Relevanz vor ( $1,42 \pm 0,0790$  (A0) vs.  $1,23 \pm 0,282$  (A1), n.-s.) sowie ( $1,23 \pm 0,282$  (A1) vs.  $1,15 \pm 0,427$  (A2), n.-s.). Hingegen waren deutlich signifikante Anstiege von der Referenzgruppe zu den OVX-Gruppen zu verzeichnen ( $1,23 \pm 0,282$  (A1) vs.  $1,74 \pm 0,204$  (B1),  $p < 0,0072$ ) und ( $1,23 \pm 0,282$  (A1) vs.  $1,73 \pm 0,0958$  (B2),  $p < 0,0012$ )).

### **Veränderung der Knochenmineralisierung**

Korrespondierend zum relativen Knochenvolumen verhielt sich die Knochen- und Weichgewebedichte (**BMD**) in  $\text{g/cm}^3$ , d.h. zwischen den Tiergruppen (A0 bis B2). Die statistische Analyse ergab für die Gruppe A0 eine mittlere BMD von  $0,391 \pm 0,0350 \text{ g/cm}^3$ . Nach einer Standzeit von 3 Monaten verzeichnete die Sham-Gruppe eine minimale Abnahme ohne signifikanten Unterschied ( $0,391 \pm 0,0350$  (A0) vs.  $0,350 \pm 0,105$  (A1), n.-s.). Zwischen den Sham-Gruppen nach drei Monaten lag ebenso ein nicht signifikanter Rückgang des Mineralsalzgehaltes vor ( $0,350 \pm 0,105$  (A1) vs.  $0,323 \pm 0,115$  (A2), n.-s.). Der Vergleich zu den ovariektomierten Tieren zeigte eine signifikante Reduktion der BMD (A1 vs. B1,  $p = 0,0388$ ). Bei erneut minimalem Rückgang maß die Gruppe B2 eine hochgradig signifikante Veränderung der Knochen- und Weichgewebedichte ( $0,350 \pm 0,105$  (A1) vs.  $0,163 \pm 0,0280$  (B2),  $p < 0,0092$ ).

Zusammengefasst führte die Osteoporoseinduktion zu signifikanten Veränderungen der Knochenstruktur sowie Mineraldichte der Rattenfemora zwischen der Referenzgruppe A1 (Sham-Gruppe 3 Monate) zum gesamten Tierkollektiv der Gruppe B (OVX- und OVX + DD-Gruppe 3 Monate). Somit ließen diese Ergebnisse auf einen suszeptiblen Knochenumbau im Rahmen der Osteoporoseinduktion mittels OVX und defizitärer Diät am Kleintier Ratte schließen.



**Abbildung 19: Ergebnisse der statistischen Analyse der Femurspongiosa des adulten Kleintiermodells.** Parametrisch dargestellt sind: Knochenvolumenanteil (BV/TV), Knochen- und Weichgewebedichte (BMD), mittlere Trabekelanzahl (Tb.N), durchschnittliche Trabekeldicke (Tb.Th), Durchschnittsabstand der einzelnen Trabekel untereinander (Tb.Sp) sowie relative Strukturanordnung der Spongiosa (SMI). Die Tiergruppen (A0 = Sham 0 Monate, A1 = Sham 3 Monate, A2 = Sham + DD 3 Monate, B1 = OVX 3 Monate, B2 = OVX + DD 3 Monate) sind in den Diagrammen grau kodiert. Für eine übersichtliche Ergebnisdarstellung sind statistische Charakteristika dem Kapitel 4.5, Erläuterungen zu den Parametern der Tabelle 1 sowie relevante Signifikanzangaben dem Kapitel 8.6.1 zu entnehmen.

### 5.2.2 Distales Femur – Kortikalis

Um mögliche Veränderungen der Kortikalis zu detektieren, waren zwei standardisierte Regionen definiert geworden. Der metaphysennahen Knochenrinde, auch Substantia corticalis genannt, wurde dem mittlediaphysäre Kortikalis-VOI, die Substantia compacta, gegenübergestellt. Die Entwicklung wurde in Bezug auf die Referenzgruppe A1 und über den gesamten Zeitraum betrachtet.

Insgesamt wies die Substantia corticalis für die durchschnittliche Dicke der Kortikalis (**Ct.Th 1**) in Millimeter keine wesentliche Veränderung auf und bewegte sich in einem Bereich von  $0,421 \pm 0,0428$  (A2) bis  $0,456 \pm 0,0232$  (B2). Zwischen den Tiergruppen waren somit keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen (A0 vs. A1, A1 vs. A2, A1 vs. B1 sowie A1 vs. B2; n.-s.). In den ersten drei Monaten nach der Schein-OP blieb die Kortikalis nahezu konstant ( $0,444 \pm 0,0364$  (A0) vs.  $0,446 \pm 0,0170$  (A1), n.-s.). Zwischen den ovariectomierten Tieren lag eine diskrete Zunahme der Ct.Th vor ( $0,441 \pm 0,0822$  (B1) vs.  $0,456 \pm 0,0232$  (B2), n.-s.).

Hingegen war bei der diaphysären Kortikalisregion eine progrediente Abnahme der Ct.Th 2 nachweisbar. Konsekutiv stellte sich die maximal erreichte Signifikanz zwischen den Gruppen A1 und B2 dar ( $0,705 \pm 0,0341$  (A1) vs.  $0,593 \pm 0,0522$  (B2),  $p < 0,0024$ ). Es lag eine weitere signifikante Reduktion der Kompaktadicke vor ( $0,705 \pm 0,0341$  (A1) vs.  $0,606 \pm 0,0527$  (B1),  $p = 0,0232$ ). In der restlichen statistischen Analyse fielen für die durchschnittliche Dicke nicht signifikante Abnahmen auf ( $(0,712 \pm 0,0303$  (A0) vs.  $0,705 \pm 0,0341$  (A1), n.-s.) und  $(0,705 \pm 0,0341$  (A1) vs.  $0,648 \pm 0,0367$  (A2),  $p = 0,24$ )).

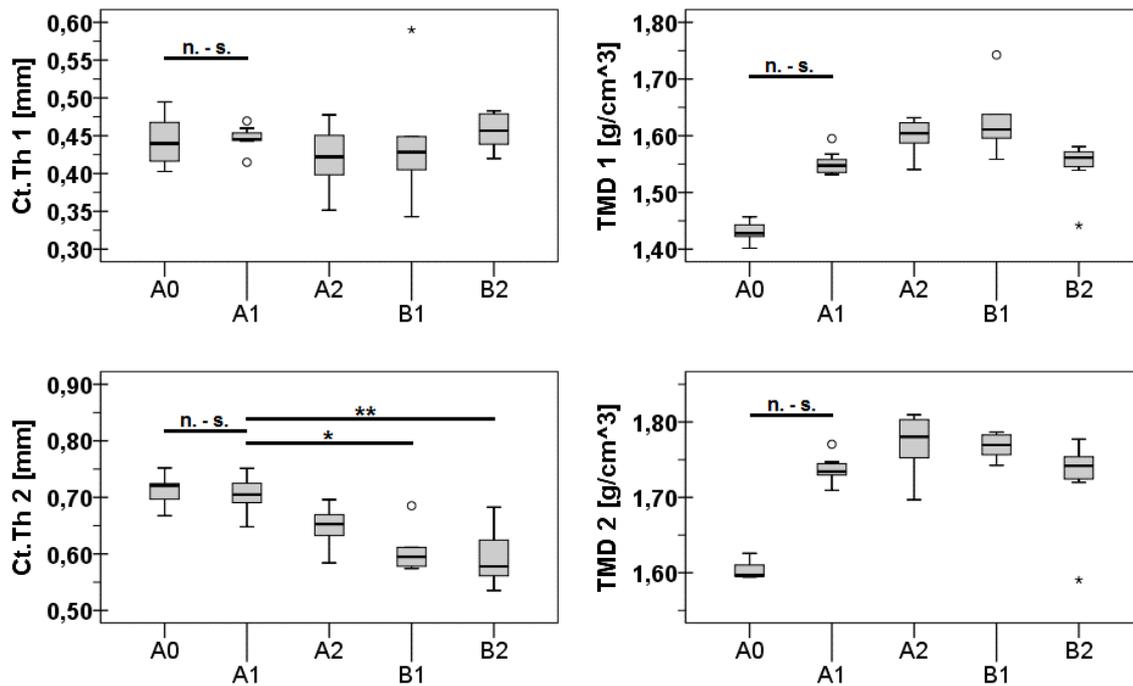
Zunächst fiel eine kontinuierliche, jedoch nicht signifikante Erhöhung der Mineralsalzdichte der Kortikalis (**TMD 1**, in  $\text{g/cm}^3$ ) im Bereich der Substantia corticalis auf ( $(1,43 \pm 0,0192$  (A0) vs.  $1,55 \pm 0,0229$  (A1), n.-s.),  $(1,55 \pm 0,0229$  (A1) vs.  $1,60 \pm 0,0321$  (A2),  $p = 0,12$ ) sowie  $(1,55 \pm 0,0229$  (A1) vs.  $1,63 \pm 0,0627$  (B1),  $p = 0,06$ )). Zwischen den Gruppen B1 und B2 nahm die TMD wiederum etwas ab und wies somit keinen signifikanten Unterschied auf ( $1,55 \pm 0,0229$  (A1) vs.  $1,55 \pm 0,0447$  (B2), n.-s.).

Die TMD 2 der Substantia compacta verhielt sich sehr ähnlich, jedoch in einem minimalst höheren Wertebereich. Nach einer nicht signifikanten Zunahme zwischen A0 und A1 ( $1,60 \pm 0,0123$  (A0) vs.  $1,74 \pm 0,0189$  (A1),  $p = 0,1384$ ), stieg die Mineralsalzdichte zwischen den Sham-Tieren erneut diskret an ( $1,74 \pm 0,0189$  (A1) vs.  $1,77 \pm 0,0410$  (A2),  $p = 0,324$ ) bis sich zwischen den Gruppen A2 und B1 ein Plateau einstellte. Innerhalb der Gruppen der OVX-Ratten war eine nicht signifikante Reduktion der TMD zu

verzeichnen ( $(1,74 \pm 0,0189$  (A1) vs.  $1,77 \pm 0,0166$  (B1),  $p = 0,308$ ) und  $(1,74 \pm 0,0189$  (A1) vs.  $1,73 \pm 0,0576$  (B2), n.-s.)).

Bei Betrachtung der TMD 1 und 2 stach ein deutlicher, nicht signifikanter Unterschied zwischen A0 und der Referenzgruppe A1 in das Auge. Basierend auf den unterschiedlichen Ergebnissen für die Rangsummen sowie der Berücksichtigung aller parameter-spezifischen Daten zur Berechnung der Streuung rief die statistische Analyse bzw. der paarweise Vergleich diesen grenzwertig hohen Unterschied hervor.

Zusammengefasst führte die Osteoporoseinduktion zu einer signifikanten Ausdünnung der Kortikalis im Bereich der Femurdiaphyse von der Referenzgruppe A1 (Sham-Gruppe 3 Monate) zum gesamten Tierkollektiv der Gruppe B (OVX- und OVX + DD-Gruppe 3 Monate). Somit ließen diese Ergebnisse auf einen suszeptiblen Knochenumbau im Rahmen der Osteoporoseinduktion mittels OVX und defizitärer Diät am Kleintier Ratte schließen.



**Abbildung 20: Ergebnisse der statistischen Analyse der Kortikalisregionen des adulten Kleintiermodells.** Parametrisch sind die durchschnittliche Dicke (Ct.Th) sowie die Mineralsalzdichte (TMD) der Kortikalis dargestellt. Die Auswertung des metaphysennahen VOI2 ist in der ersten (Ct.Th 1; TMD 1) und die des mittlediaphysären VOI3 in der zweiten Zeile (Ct.Th 2; TMD 2) zu finden. Die Tiergruppen (A0 = Sham 0 Monate, A1 = Sham 3 Monate, A2 = Sham + DD 3 Monate, B1 = OVX 3 Monate, B2 = OVX + DD 3 Monate) sind in den Kastengrafiken grau kodiert. Für eine übersichtliche Ergebnisdarstellung sind statistische Charakteristika dem Kapitel 4.5, Erläuterungen zu den Parametern der Tabelle 1 sowie relevante Signifikanzangaben dem Kapitel 8.6.1 zu entnehmen.

### 5.2.3 Proximale Tibia

#### Veränderung der ossären Mikroarchitektur zwischen den Untergruppen

Im Gesamten stellte sich eine deutliche Abnahme der **BV/TV** [%] zwischen den Untersuchungsgruppen des Rattenkollektivs dar. Beginnend bei einem Knochenvolumenanteil von  $17,0 \pm 2,44$  % der Gruppe A0 war kontinuierlich eine weitere nicht signifikante Reduktion zu verzeichnen ( $17,0 \pm 2,44$  (A0) vs.  $15,9 \pm 5,75$  (A1), n.s.), ( $15,9 \pm 5,75$  (A1) vs.  $14,3 \pm 5,48$  (A2), n.s.) sowie ( $15,9 \pm 5,75$  (A1) vs.  $11,2 \pm 2,73$  (B1),  $p = 0,512$ ). Zwischen den Gruppen A1 und B2 lag jedoch ein hoch signifikanter Unterschied vor ( $15,9 \pm 5,75$  (A1) vs.  $8,13 \pm 1,20$  (B2),  $p < 0,006$ ).

Nach einer diskreten Zunahme der Durchschnittszahl der Trabekel [1/mm] ( $2,00 \pm 0,319$  (A0) vs.  $2,02 \pm 0,755$  (A1), n.s.) war vorerst eine nicht signifikante Abnahme der

**Tb.N** erkennbar ( $(2,02 \pm 0,755$  (A1) vs.  $1,58 \pm 0,653$  (A2), n.-s.) und  $(2,02 \pm 0,755$  (A1) vs.  $1,18 \pm 0,297$  (B1),  $p = 0,116$ )). Der konstante Rückgang führte zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen A1 und B2 ( $2,02 \pm 0,755$  (A1) vs.  $0,875 \pm 0,139$  (B2),  $p < 0,0012$ ).

Während der Standzeit von 3 Monaten reduzierte sich die **Tb.Th** [mm] zwischen der Sham-Gruppen A0 und A1 nicht signifikant ( $0,0850 \pm 0,00556$  (A0) vs.  $0,0793 \pm 0,00808$  (A1), n.-s.). Zwischen den Gruppen A1 und A2 lag eine nicht signifikante Zunahme der mittleren Trabekeldicke vor ( $0,0793 \pm 0,00808$  (A1) vs.  $0,0917 \pm 0,00824$  (A2),  $p = 0,14$ ). Ein erneuter und signifikanter Anstieg der Gruppe B1 stellte die maximale Zunahme der Tb.Th dar ( $0,0793 \pm 0,00808$  (A1) vs.  $0,0950 \pm 0,00598$  (B1),  $p = 0,004$ ). Wiederum nahm die Durchschnittsdicke der Gruppe B2 minimal ab. Allerdings lag weiterhin ein signifikanter Unterschied vor ( $0,0793 \pm 0,00808$  (A1) vs.  $0,0931 \pm 0,00615$ (B2),  $p = 0,0128$ ).

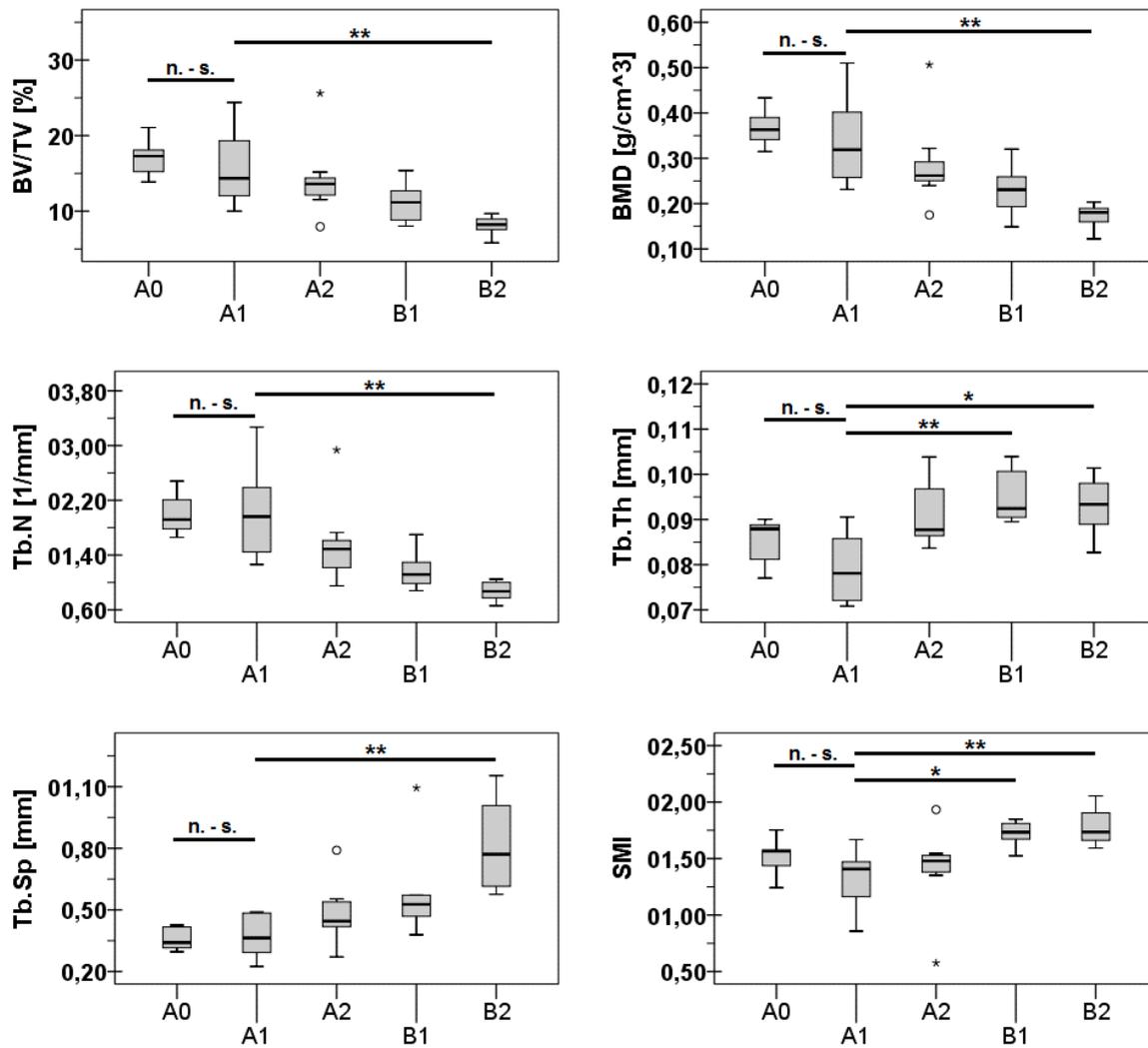
Die **Tb.Sp** [mm] zeigte eine langsame Zunahme von A0 zu B1 ohne signifikante Veränderungen ( $(0,361 \pm 0,0574$  (A0) vs.  $0,376 \pm 0,113$  (A1), n.-s.),  $(0,376 \pm 0,113$  (A1) vs.  $0,489 \pm 0,161$  (A2),  $p = 0,964$ ) und  $(0,376 \pm 0,113$  (A1) vs.  $0,595 \pm 0,254$  (B1),  $p = 0,216$ )). Zwischen der Gruppe A1 und B2 war jedoch ein hoch signifikanter Anstieg der intertrabekulären Distanz zu verzeichnen ( $0,376 \pm 0,113$  (A1) vs.  $0,815 \pm 0,218$  (B2),  $p < 0,0012$ ).

Nach einem nicht signifikanten „Ab und Auf“ des **SMI** zwischen dem gruppierten Sham-Kollektiv ( $1,51 \pm 0,163$  (A0) vs.  $1,31 \pm 0,287$  (A1) und  $1,31 \pm 0,287$  (A1) vs.  $1,40 \pm 0,409$  (A2), n.-s.) maßen die OVX-Gruppen signifikante Zunahmen ( $(1,31 \pm 0,287$  (A1) vs.  $1,72 \pm 0,117$  (B1),  $p < 0,0148$ ) und  $(1,31 \pm 0,287$  (A1) vs.  $1,78 \pm 0,169$  (B2),  $p < 0,0024$ )). Die Bildkorrelation mittels des Structure Model Index spiegelte die Veränderung der ossären Mikroarchitektur (siehe Abbildung 17) ersichtlich wider.

### **Veränderung der Knochenmineralisierung**

Die gruppenspezifische Durchschnitts-**BMD** [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ] der Tibiae verhielt sich nahezu identisch zum ausgewerteten relativen Knochenvolumen. Zwischen den Gruppen A0, A2 oder B1 und A1 lag kein signifikanter Unterschied vor ( $(0,368 \pm 0,0406$  (A0) vs.  $0,340 \pm 0,113$  (A1), n.-s.),  $(0,340 \pm 0,113$  (A1) vs.  $0,290 \pm 0,105$  (A2), n.-s.) und  $(0,340 \pm 0,113$  (A1) vs.  $0,230 \pm 0,0594$  (B1),  $p = 0,366$ ). Die ovariectomierten Tiere der Gruppe B2 erreichten eine signifikante Reduktion der Mineralsalzdichte ( $0,340 \pm 0,113$  (A1) vs.  $0,173 \pm 0,0263$  (B2),  $p < 0,0048$ ).

Zusammengefasst führte die Osteoporoseinduktion zu signifikanten Veränderungen der Knochenstruktur sowie Mineraldichte der Rattentibiae zwischen der Referenzgruppe A1 (Sham-Gruppe 3 Monate) und Gruppe B2 (OVX + DD-Gruppe 3 Monate). Außerdem lag eine signifikante Zunahme der Trabekeldicke sowie des SMIs zur Gruppe B1 vor. Somit ließen diese Ergebnisse auf einen suszeptiblen Knochenumbau im Rahmen der Osteoporoseinduktion mittels OVX und defizitärer Diät am Kleintier Ratte schließen.



**Abbildung 21: Ergebnisse der statistischen Analyse der Tibiaspongiosa des adulten Kleintiermodells.** Parametrisch dargestellt sind: Knochenvolumenanteil (BV/TV), Knochen- und Weichgewebedichte (BMD), mittlere Trabekelanzahl (Tb.N), durchschnittliche Trabekeldicke (Tb.Th), Durchschnittsabstand der einzelnen Trabekel untereinander (Tb.Sp) sowie relative Strukturordnung der Spongiosa (SMI). Die Tiergruppen (A0 = Sham 0 Monate, A1 = Sham 3 Monate, A2 = Sham + DD 3 Monate, B1 = OVX 3 Monate, B2 = OVX + DD 3 Monate) sind in den Grafiken grau kodiert. Für eine übersichtliche Ergebnisdarstellung sind statistische Charakteristika dem Kapitel 4.5, Erläuterungen zu den Parametern der Tabelle 1 sowie relevante Signifikanzangaben dem Kapitel 8.6.1 zu entnehmen.

5.2.4 Th 9

**Veränderung der ossären Mikroarchitektur zwischen den Untergruppen**

Der quantitative Knochenvolumenanteil (**BV/TV**) in Prozent nahm über den vollständigen Studienzeitraum stetig ab. Der Vergleich der Sham-Gruppen zeigte im Gegensatz zu dem der OVX-Gruppen keine signifikante Reduktion auf ((41,8 ± 4,60 (A0) vs. 41,1 ± 5,29 (A1), n.-s.) und (41,1 ± 5,29 (A1) vs. 33,9 ± 6,23 (A2), p = 0,2876)). Die Gruppe B1 maß einen signifikanten Rückgang der BV/TV (41,1 ± 5,29 (A1) vs. 30,1 ± 3,63 (B1), p < 0,0464), welcher von B2 übertroffen wurde (41,1 ± 5,29 (A1) vs. 26,1 ± 4,34 (B2), p < 0,0008).

Ausgehend von A0 nahm die **Tb.N** [1/mm] diskret zu (3,22 ± 0,270 (A0) vs. 3,26 ± 0,302 (A1), n.-s.). In Bezug auf die Referenzgruppe verzeichneten die restlichen Gruppen eine progrediente Minderung der mittleren Trabekelanzahl ((3,26 ± 0,302 (A1) vs. 2,91 ± 0,304 (A2), p = 0,4) und (3,26 ± 0,302 (A1) vs. 2,76 ± 0,208 (B1), p = 0,08)), wovon die B2-Gruppe mit einer hoch signifikanten Abnahme herausstach (3,26 ± 0,302 (A1) vs. 2,48 ± 0,290 (B2), p < 0,0008).

Für die **Tb.Th** [mm] war im Gesamten eine zunehmende Ausdünnung nachweisbar. Zwischen den Gruppen A0 und A1 lag eine nicht signifikante Abnahme vor (0,130 ± 0,00921 (A0) vs. 0,126 ± 0,00698 (A1), n.-s.). Ebenso für die Gruppe A2 mit einer mittleren Trabekeldicke von 0,116 ± 0,00806 mm (A1 vs. A2, p = 0,3224). Im Gegensatz dazu fiel der Vergleich zu den B-Gruppen zunehmend signifikant aus ((0,126 ± 0,00698 (A1) vs. 0,109 ± 0,00820 (B1), p = 0,0316) und (0,126 ± 0,00698 (A1) vs. 0,105 ± 0,00984 (B2), p < 0,0032)).

Ausgehend von A0 lag eine progrediente Zunahme des Durchschnittsabstandes der einzelnen Trabekel untereinander [mm] vor. Nach einem kontinuierlichen und diskreten Anstieg der **Tb.Sp** ((0,230 ± 0,0191 (A0) vs. 0,233 ± 0,0248 (A1), n.-s.), (0,233 ± 0,0248 (A1) vs. 0,276 ± 0,0253 (A2), p = 0,1) sowie (0,233 ± 0,0248 (A1) vs. 0,281 ± 0,0187 (B1), p = 0,14)), stellte sich zwischen den Gruppen A1 und B2 ein hoch signifikanter Unterschied dar (0,233 ± 0,0248 (A1) vs. 0,310 ± 0,0304 (B2), p < 0,0008).

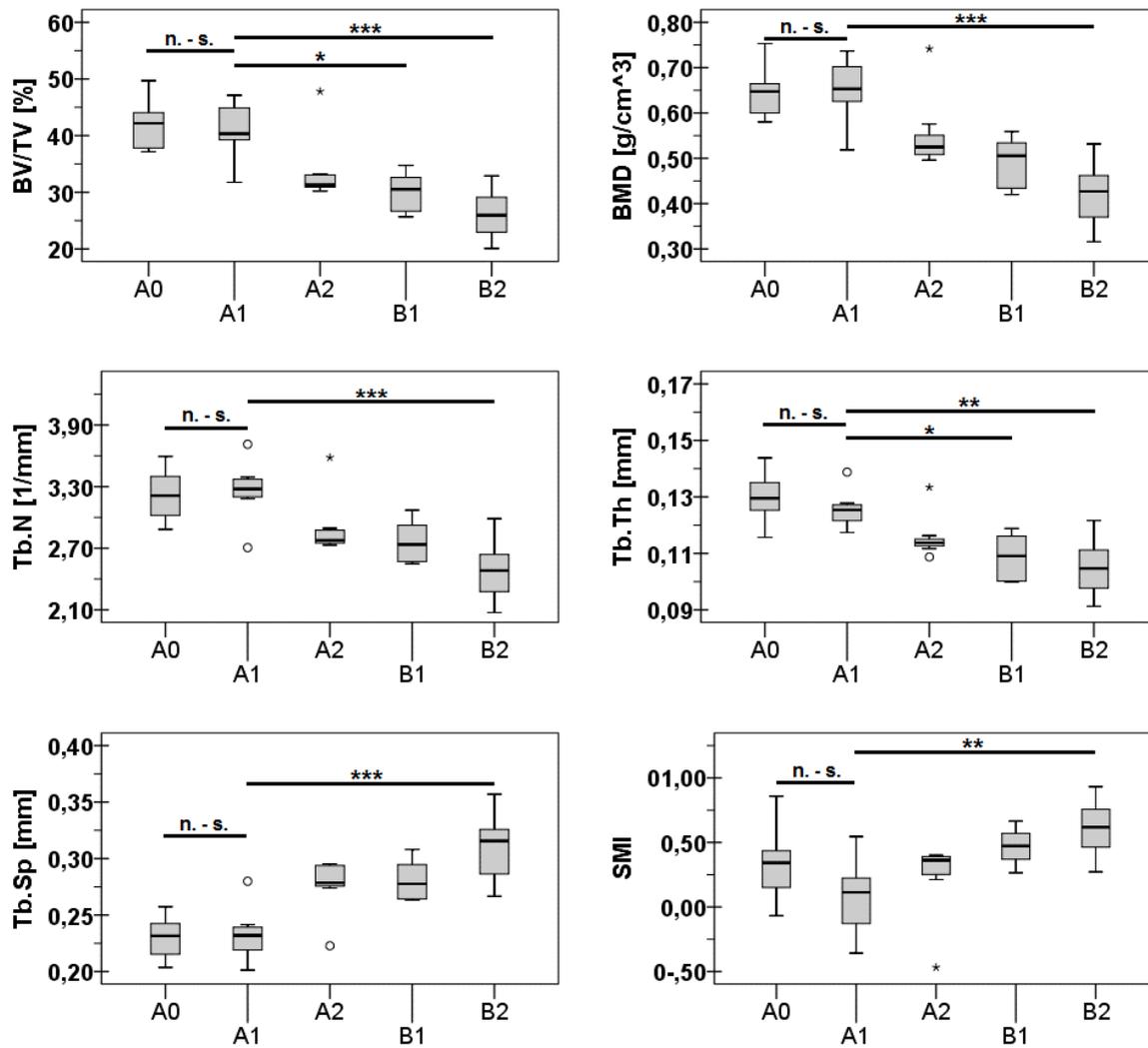
Innerhalb der Standzeit von drei Monaten nahm der **SMI** zwischen den beiden Sham-Gruppen A0 und A1 nicht signifikant ab (0,330 ± 0,310 (A0) vs. 0,0704 ± 0,309 (A1), p = 0,668). Des Weiteren zeigte der Gruppenvergleich eine progrediente, nicht signifikante Zunahme des SMI ((0,0704 ± 0,309 (A1) vs. 0,226 ± 0,313 (A2), n.-s.) und (0,0704 ± 0,309 (A1) vs. 0,469 ± 0,144 (B1), p = 0,072)). Die Gruppe B2 wies einen

signifikanten Unterschied zum Referenzkollektiv A1 auf ( $0,0704 \pm 0,309$  (A1) vs.  $0,610 \pm 0,209$  (B2),  $p < 0,0024$ ).

### **Veränderung der Knochenmineralisierung**

Zwischen den Gruppen A0 und A1 erfuhr die **BMD** [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ] der Th 9 zunächst einen minimalen, nicht signifikanten Anstieg ( $0,644 \pm 0,0593$  (A0) vs.  $0,652 \pm 0,0748$  (A1), n.s.). Gruppenweise fiel im weiteren Verlauf eine deutliche Reduktion der Mineralsalzdichte auf ( $0,652 \pm 0,0748$  (A1) vs.  $0,554 \pm 0,0866$  (A2),  $p = 0,34$ ) und ( $0,652 \pm 0,0748$  (A1) vs.  $0,493 \pm 0,0571$  (B1),  $p = 0,0556$ ). Der Vergleich zwischen den Gruppen A1 und B2 zeigte schließlich eine hoch signifikante Abnahme der BMD ( $0,652 \pm 0,0748$  (A1) vs.  $0,421 \pm 0,0701$  (B2),  $p < 0,0004$ ).

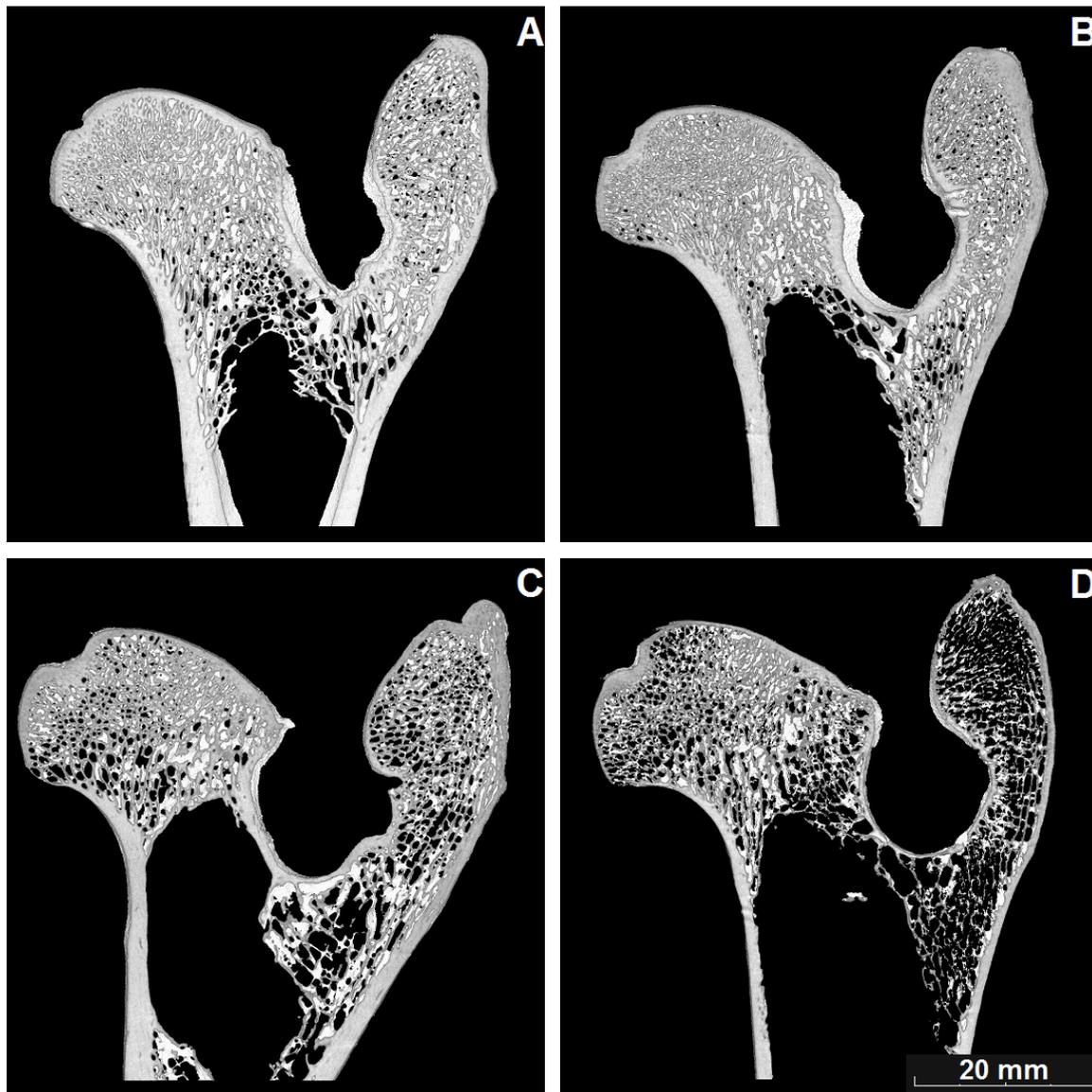
Zusammengefasst lagen hoch signifikanten Veränderungen der Knochenstruktur sowie Mineraleichte der Wirbelkörper Th 9 zwischen der Referenzgruppe A1 (Sham-Gruppe 3 Monate) und Interventionsgruppe B2 (OVX + DD-Gruppe 3 Monate) vor. Zudem nahmen die BV/TV sowie Tb.Th von der Gruppe A1 zu B1 signifikant ab. Somit ließen diese Ergebnisse auf einen suszeptiblen Knochenumbau im Rahmen der Osteoporoseinduktion mittels OVX und defizitärer Diät am Kleintier Ratte schließen.



**Abbildung 22: Ergebnisse der statistischen Analyse der Spongiosa der Th 9 des adulten Kleintiermodells.** Parametrisch dargestellt sind: Knochenvolumenanteil (BV/TV), Knochen- und Weichgewebedichte (BMD), mittlere Trabekelanzahl (Tb.N), durchschnittliche Trabekeldicke (Tb.Th), Durchschnittsabstand der einzelnen Trabekel untereinander (Tb.Sp) sowie relative Strukturordnung der Spongiosa (SMI). Die Tiergruppen (A0 = Sham 0 Monate, A1 = Sham 3 Monate, A2 = Sham + DD 3 Monate, B1 = OVX 3 Monate, B2 = OVX + DD 3 Monate) sind in den Diagrammen grau kodiert. Für eine übersichtliche Ergebnisdarstellung sind statistische Charakteristika dem Kapitel 4.5, Erläuterungen zu den Parametern der Tabelle 1 sowie relevante Signifikanzangaben dem Kapitel 8.6.1 zu entnehmen.

### 5.3 Visuelle Bildinspektion der Femora des Großtiermodells

Die 3D-Volume-Rendering-Grafiken der Abbildung 23 visualisieren den metabolischen Einfluss auf die Knochenarchitektur des Schafkollektives. Alle vier Darstellungen (A bis D) zeigen exemplarisch ein gruppenspezifisches proximales Femur (**A** = Kontroll-Gruppe, **B** = OVX-Gruppe, **C** = OVX + DD-Gruppe, **D** = OVX + DD + Steroid-Gruppe). Sie betonen die knochenmorphologischen Veränderungen: Vor allem im Bereich des Femurhalses und Trochanters liegt eine progrediente Abnahme des Knochenvolumens und konsekutiv eine Rarefizierung der Trabekel sowie eine regrediente Spongiosaver-netzung vor. Im Verlauf von A nach D zeigt die Kortikalisdicke eine Tendenz zur Aus-dünnung und die ossäre Mineralisierung eine Reduktion. Die trabekulären Referenzre-gionen des Kontrolltieres weisen intern Differenzen in dem Knochenvolumen, der Tra-bekelanzahl, -dicke, -abstand sowie -anordnung auf.



**Abbildung 23: Vergleichende Visualisierung der proximalen Femora des adulten Großtiermodells.** Repräsentative 3D-Volume-Rending-Grafiken betonen den metabolischen Einfluss auf die Knochenarchitektur. Alle vier Darstellungen zeigen exemplarisch ein gruppenspezifisches proximales Femur (**A** = Kontroll-Gruppe, **B** = OVX-Gruppe, **C** = OVX + DD-Gruppe, **D** = OVX + DD + Steroid-Gruppe) als koronares Model aus ca. 20-40 Schichten. Der in D angegebene Maßstab ist einheitlich. Knochenmorphologische Veränderungen sind in alphabetischer Reihenfolge und ortsspezifisch zu erkennen.

## 5.4 Quantitative Mikro-CT des adulten Großtiermodells

Sämtliche quantitativen Ergebnisse liegen als graphische Darstellung am Ende jedes Subkapitels in Form von Boxplots-Diagrammen vor. Für die gezielt paarige sowie multiple Korrelation gilt, dass lediglich signifikante Unterschiede mittels entsprechender Markierung (siehe Kapitel 4.5) visualisiert wurden. Im folgenden Subkapitel 5.4.1 sind die trabekulären Regionen der Kontroll-Gruppe auf der Horizontalachse aufgetragen und in den Diagrammen grau kodiert. In den Subkapiteln 5.4.2 und 5.4.3 ist das Untersuchungskollektiv auf der Abszissenachse gruppiert (K = Kontroll-Gruppe, OVX = OVX-Gruppe, OVXD = OVX + DD-Gruppe, OVXDS = OVX + DD + Steroid-Gruppe) und in den Diagrammen grau kodiert. Für eine übersichtliche Ergebnisdarstellung sind statistische Charakteristika dem Kapitel 4.5 und Erläuterungen zu den Parametern der Tabelle 1 zu entnehmen. Die folgenden Abschnitte beinhalten sämtliche Signifikanzangaben und weitere Statistikwerte sind unter 8.6.2 tabellarisch aufgeführt.

### 5.4.1 Proximales Femur – Referenzregionen der Spongiosa

Anhand der folgenden Analyse sollten Differenzen zwischen drei Hauptregionen der proximalen Femora – Femurkopf, -hals und Trochanter major – der adulten Kontrolltiere quantifiziert werden.

#### **Unterschiede der ossären Mikroarchitektur zwischen den Kontrollregionen**

Der Vergleich des quantitativen Knochenvolumenanteils (**BV/TV**) [%] wies signifikante Unterschiede auf. Zwischen den Kontrollregionen des Collum femoris und des Trochanter majors maß die angepasste Signifikanz  $p = 0,022$  bei einer mittleren BV/TV des Collums von  $42,0 \pm 4,38$  % und des Trochanter von  $27,4 \pm 4,73$  %. Noch deutlicher unterschied sich die Kontrollregion des Femurkopfes von der des Trochanter majors ( $47,9 \pm 6,59$  (Caput) vs.  $27,4 \pm 4,73$  (Trochanter),  $p < 0,0001$ ). Hingegen stellte sich der Vergleich des Caputs und Collums nicht signifikant dar ( $p = 0,472$ ).

Die mittlere **Tb.N** [1/mm] verzeichnete eine signifikante Abnahme zwischen den Kontrollregionen des Caput femoris und des Trochanter majors ( $1,83 \pm 0,185$  (Caput) vs.  $1,41 \pm 0,225$  (Trochanter),  $p = 0,002$ ). Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen Caput und Collum femoris sowie Femurhals und Trochanter major vor (Caput vs. Collum,  $p = 0,132$  und Collum vs. Trochanter,  $p = 0,504$ ).

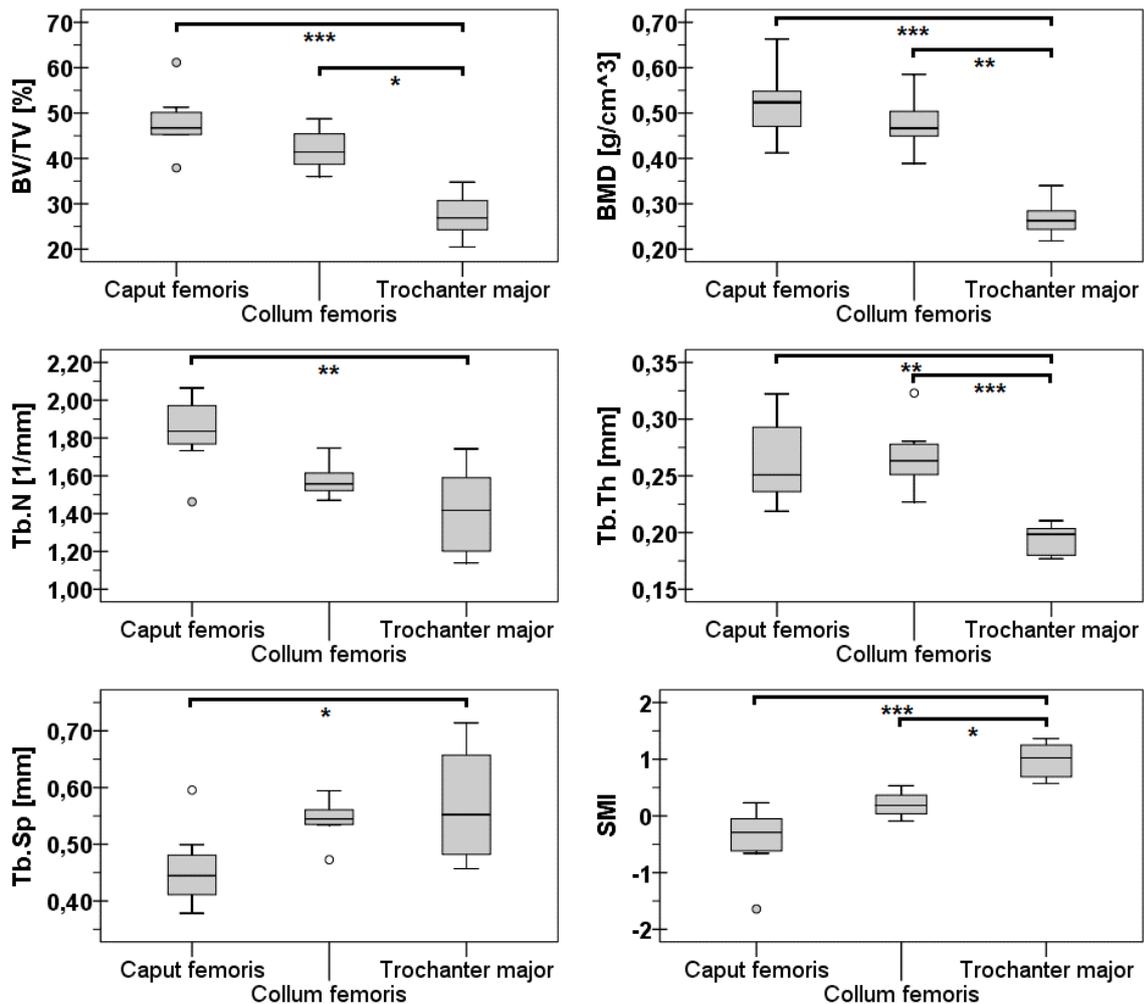
Die durchschnittliche Trabekeldicke (**Tb.Th**) des Caputs maß  $0,263 \pm 0,0371$  mm, die des Collums  $0,270 \pm 0,0283$  mm und die des Trochanter  $0,194 \pm 0,0132$  mm. Konsekutiv stellte sich der Vergleich zwischen Caput und Collum femoris als nicht signifikant dar. Hingegen lagen signifikante Abnahmen der Tb.Th zwischen Caput und Trochanter ( $p = 0,004$ ) sowie Collum und Trochanter ( $p < 0,001$ ) vor.

Lediglich die mittlere **Tb.Sp** [mm] des Femurkopfes zu der des Trochanter majors variierte signifikant ( $0,456 \pm 0,0691$  (Caput) vs.  $0,569 \pm 0,0965$  (Trochanter),  $p = 0,033$ ). Die restlichen Vergleiche wiesen keinen signifikanten Unterschied auf ( $0,456 \pm 0,0691$  (Caput) vs.  $0,544 \pm 0,0348$  (Collum),  $p = 0,059$  sowie  $0,544 \pm 0,0348$  (Collum) vs.  $0,569 \pm 0,0965$  (Trochanter), n.-s.).

Insgesamt spiegelte der quantitative **SMI** die strukturellen Unterschiede der Kontrollregionen wider. Zwischen Caput und Collum lag eine nicht signifikante Zunahme vor ( $-0,412 \pm 0,581$  (Caput) vs.  $0,202 \pm 0,220$  (Collum),  $p = 0,269$ ). Die weitere Erhöhung des SMI zwischen Collum und Trochanter war als signifikant zu verzeichnen ( $p = 0,033$ ). Entsprechend war der Vergleich von Caput zu Trochanter hoch signifikant ( $-0,412 \pm 0,581$  (Caput) vs.  $0,983 \pm 0,306$  (Trochanter),  $p < 0,0001$ ).

#### **Unterschiede der Knochenmineralisierung zwischen den Kontrollregionen**

Die durchschnittliche **BMD** [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ] verhielt sich kongruent zur BV/TV. Somit lag zwischen Femurkopf und -hals kein signifikanter Unterschied vor ( $0,520 \pm 0,0771$  (Caput) vs.  $0,477 \pm 0,0577$  (Collum), n.-s.). Der Vergleich der Kontrollregion des Collums und Trochanter stellte sich als signifikant dar ( $0,477 \pm 0,0577$  (Collum) vs.  $0,268 \pm 0,0368$  (Trochanter),  $p = 0,008$ ). Die maximal erreichte Signifikanz maß  $p < 0,0001$  und war zwischen Caput und Trochanter zu verzeichnen.



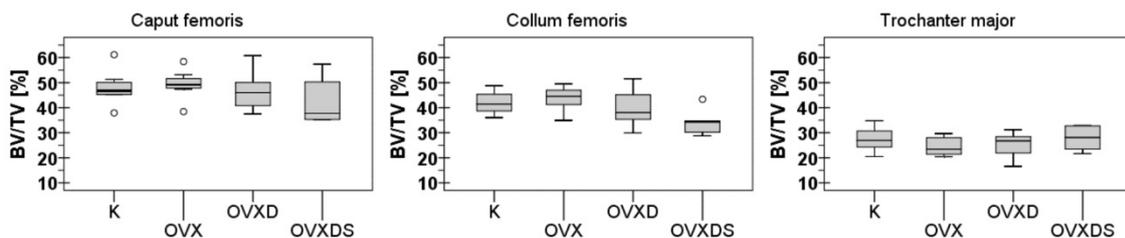
**Abbildung 24: Ergebnisse der statistischen Analyse der Kontrollregionen der Femurspongiosa des adulten Großtiermodells.** Parametrisch dargestellt sind: Knochenvolumenanteil (BV/TV), Knochen- und Weichgewebedichte (BMD), mittlere Trabekelanzahl (Tb.N), durchschnittliche Trabekeldicke (Tb.Th), Durchschnittsabstand der einzelnen Trabekel untereinander (Tb.Sp) sowie relative Strukturordnung der Spongiosa (SMI).

#### 5.4.2 Proximales Femur – Regions of interests der Spongiosa

##### Veränderung der BV/TV zwischen den Untergruppen

Im Gesamten zeigte der Vergleich der **BV/TV [%]** zwischen den drei ROIs der proximalen Femora einen erkennbaren Trend auf. Ausgehend von der Region des Femurkopfes war eine progrediente Reduktion des relativen Knochenvolumens nachweisbar, wobei im Bereich des Trochanter majors die durchschnittliche BV/TV am geringsten ausfiel. Alle drei Regionen veränderten sich zwischen den Untersuchungsgruppen jedoch nicht signifikant. Im Bereich des Caput femoris wies der Vergleich zwischen der

Kontroll- und OVX-Gruppe eine diskrete Zunahme auf ( $47,9 \pm 6,59$  (Kontrolle) vs.  $49,3 \pm 6,08$  (OVX)). Fortan war eine kontinuierliche Abnahme der BV/TV zu verzeichnen ( $47,9 \pm 6,59$  (Kontrolle) vs.  $46,5 \pm 7,49$  (OVXD),  $47,9 \pm 6,59$  (Kontrolle) vs.  $42,3 \pm 9,30$  (OVXDS),  $p = 0,0555$ ). Entsprechend verhielt sich die statistische Auswertung des Collum femoris. Zwischen den Referenz- und OVX-Tieren lag eine minimale Erhöhung des Knochenvolumenanteils vor ( $42,0 \pm 4,38$  (Kontrolle) vs.  $43,6 \pm 5,28$  (OVX), n.-s.). Anschließend ergab sich ein nicht-signifikanter Rückgang innerhalb der Gruppen mit OVX ( $(42,0 \pm 4,38$  (Kontrolle) vs.  $39,8 \pm 7,38$  (OVXD), n.-s.) und  $42,0 \pm 4,38$  (Kontrolle) vs.  $34,3 \pm 5,09$  (OVXDS),  $p = 0,0555$ ). Die quantitative BV/TV des Trochanter majors veränderte sich nicht wesentlich. Nach einer minimalen Reduktion ( $27,4 \pm 4,73$  (Kontrolle) vs.  $24,6 \pm 3,85$  (OVX) und  $27,4 \pm 4,73$  (Kontrolle) vs.  $25,3 \pm 5,10$  (OVXD), n.-s.) stieg sie erneut an ( $27,4 \pm 4,73$  (Kontrolle) vs.  $27,8 \pm 5,01$  (OVXDS), n.-s.).

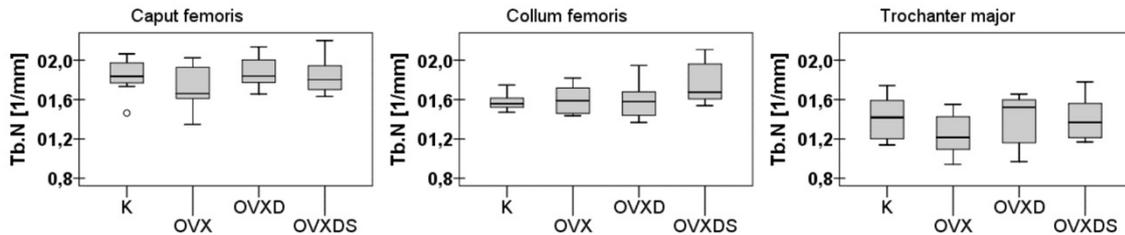


**Abbildung 25: Ergebnisse der statistischen Analyse der Femurspongiosa (BV/TV) des adulten Großtiermodells.** Parametrisch dargestellt ist der Knochenvolumenanteil (BV/TV).

### Veränderung der Tb.N zwischen den Untergruppen

Über den vollständigen Studienzeitraum von 8 Monaten war regional für die mittlere **Tb.N** [1/mm] kein signifikanter Unterschied erkennbar. Die Quantifizierung ergab für den Femurkopf die höchsten und für den Trochanter major die geringsten Werte. Im Gruppenvergleich bewegte sich die mittlere Trabekelanzahl des Caput femoris kaum ( $1,83 \pm 0,185$  (Kontrolle),  $1,73 \pm 0,241$  (OVX),  $1,88 \pm 0,163$  (OVXD) und  $1,85 \pm 0,205$  (OVXDS)). Das Gleiche galt für den Femurhals ( $1,58 \pm 0,0861$  (Kontrolle),  $1,60 \pm 0,159$  (OVX),  $1,59 \pm 0,185$  (OVXD) und  $1,76 \pm 0,223$  (OVXDS)). Konsekutiv war ein niedrigeres Wertenniveau für die durchschnittliche Tb.N des Trochanter majors zu verzeichnen. Es war kein signifikanter Unterschied nachweisbar ( $1,41 \pm 0,225$  (Kontrolle) vs.  $1,25 \pm$

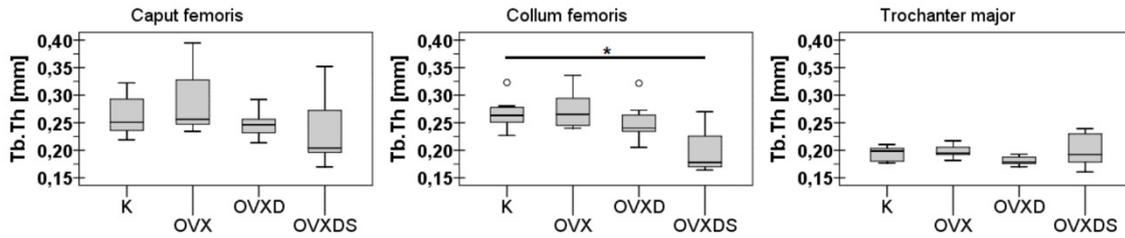
0,228 (OVX),  $1,41 \pm 0,225$  (Kontrolle) vs.  $1,40 \pm 0,279$  (OVXD) sowie  $1,41 \pm 0,225$  (Kontrolle) vs.  $1,41 \pm 0,231$  (OVXDS), n.-s.).



**Abbildung 26: Ergebnisse der statistischen Analyse der Femurspongiosa (Tb.N) des adulten Großtiermodells.** Parametrisch dargestellt ist die mittlere Trabekelanzahl (Tb.N).

### Veränderung der Tb.Th zwischen den Untergruppen

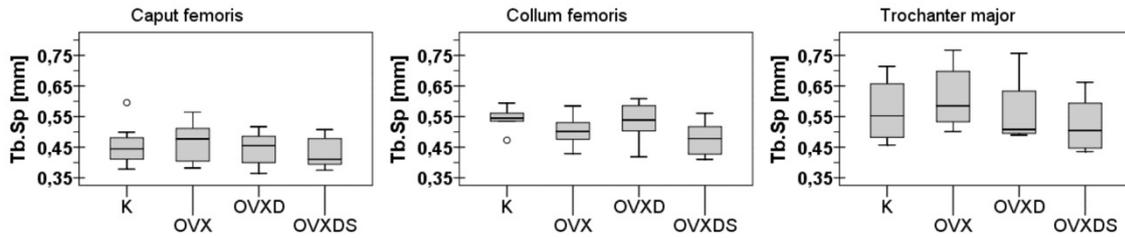
Die durchschnittliche Trabekeldicke [mm] wies pro VOI ein unterschiedliches Verhalten auf. Im Bereich des Femurkopfes nahm die **Tb.Th** zwischen der Kontroll- und OVX-Gruppe nicht signifikant zu ( $0,263 \pm 0,0371$  (Kontrolle) vs.  $0,291 \pm 0,0618$  (OVX), n.-s.). Zwischen den restlichen Gruppen stellte sich ein regredienter, aber nicht signifikanter Verlauf dar ( $0,263 \pm 0,0371$  (Kontrolle) vs.  $0,247 \pm 0,0234$  (OVXD) und  $0,263 \pm 0,0371$  (Kontrolle) vs.  $0,233 \pm 0,0674$  (OVXDS), n.-s.). Das Collum femoris maß hingegen eine signifikante Abnahme der Trabekeldicke zwischen der Kontroll- und OVXDS-Gruppe ( $0,270 \pm 0,0283$  (Kontrolle) vs.  $0,200 \pm 0,0418$  (OVXDS),  $p = 0,016$ ). Die statistische Analyse der OVXD-Gruppe ergab eine nicht signifikante Reduktion der Tb.Th ( $0,270 \pm 0,0283$  (Kontrolle) vs.  $0,250 \pm 0,0345$  (OVXD),  $p = 0,654$ ). Zwischen den Kontroll- und OVX-Tieren lag eine diskrete Dickenzunahme vor ( $0,270 \pm 0,0283$  (Kontrolle) vs.  $0,274 \pm 0,0382$  (OVX), n.-s.). Im Bereich des Trochanter majors kam es zu einer auffälligen Ausdünnung der Knochenbälkchen. Für diese Trabekel war keine signifikante Veränderung nachweisbar ( $0,194 \pm 0,0132$  (Kontrolle) vs.  $0,198 \pm 0,0124$  (OVX),  $0,194 \pm 0,0132$  (Kontrolle) vs.  $0,181 \pm 0,00780$  (OVXD) sowie  $0,194 \pm 0,0132$  (Kontrolle) vs.  $0,199 \pm 0,0306$  (OVXDS), n.-s.).



**Abbildung 27: Ergebnisse der statistischen Analyse der Femurspongiosa (Tb.Th) des adulten Großtiermodells.** Parametrisch dargestellt ist die durchschnittliche Trabekeldicke (Tb.Th).

### Veränderung der Tb.Sp zwischen den Untergruppen

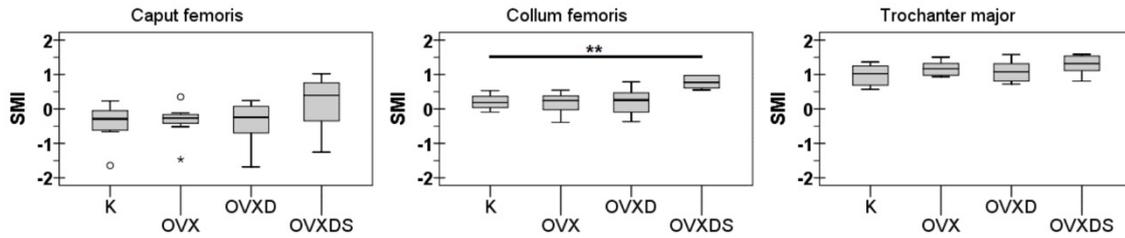
Ausgehend vom Caput femoris war eine progrediente Zunahme des Durchschnittsabstandes der einzelnen Trabekel untereinander zu verzeichnen. Die mittlere **Tb.Sp** [mm] erreichte im Bereich des Trochanter majors ihre größte Ausdehnung. Pro Region lagen diskrete nicht signifikante Unterschiede zwischen den Kollektivgruppen vor. Im Bereich des Femurkopfes variierten die Durchschnittswerte zwischen  $0,465 \pm 0,0701$  mm (OVX) und  $0,429 \pm 0,0550$  mm (OVXDS). In Bezug auf die Kontroll-Gruppe ( $0,456 \pm 0,0691$  mm) waren sämtliche Vergleiche nicht signifikant. Ähnliches galt für das Collum femoris. Hier bewegte sich die mittlere Tb.Sp in einem Wertebereich von  $0,544 \pm 0,0348$  mm (Kontrolle) und  $0,479 \pm 0,0597$  mm (OVXDS). Wie erwähnt erreichten die Tiere der OVX-Gruppe in dem VOI des Trochanter majors die maximalste Durchschnittsdistanz der Trabekel untereinander. Dort fanden sich eine nicht signifikante und progrediente Zunahme zwischen der Kontroll- und OVX-Gruppe ( $0,569 \pm 0,0965$  (Kontrolle) vs.  $0,616 \pm 0,109$  (OVX), n.-s.). Die statistische Auswertung ergab für die restlichen Gruppen eine nicht signifikante Reduktion der Tb.Sp ( $0,569 \pm 0,0965$  (Kontrolle) vs.  $0,565 \pm 0,103$  (OVXD) und  $0,569 \pm 0,0965$  (Kontrolle) vs.  $0,525 \pm 0,0880$  (OVXDS), n.-s.).



**Abbildung 28: Ergebnisse der statistischen Analyse der Femurspongiosa (Tb.Sp) des adulten Großtiermodells.** Parametrisch dargestellt ist der Durchschnittsabstand der einzelnen Trabekeln untereinander (Tb.Sp).

### Veränderung des SMI zwischen den Untergruppen

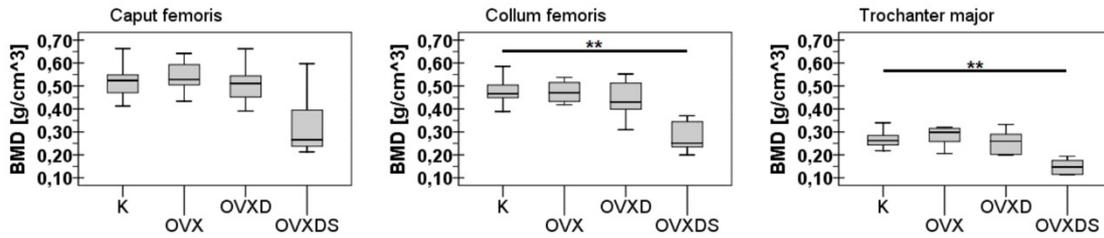
Insgesamt war eine steigende Tendenz des quantitativen **SMIs** zwischen den Femurbereichen sowie den Tiergruppen erkennbar. Die strukturelle Anordnung der Trabekel war im Femurkopf, -hals und Trochanter major verschieden. Zudem erfuhren die gruppenspezifischen Schafe einen trabekulären Umbau. Durch die Osteoporoseinduktion sah man einen SMI-Anstieg von der Kontroll- zur OVXDS-Gruppe. Im Bereich des Caput femoris unterschied sich die relative Spongiosastrukturordnung minimalst zwischen den Gruppen K, OVX und OVXD ( $-0,412 \pm 0,581$  (Kontrolle) vs.  $-0,362 \pm 0,554$  (OVX) und  $-0,412 \pm 0,581$  (Kontrolle) vs.  $-0,396 \pm 0,638$  (OVXD), n.-s.). Der Vergleich zwischen den Kontroll- und OVXDS-Tieren zeigte eine nicht signifikante Zunahme des SMIs ( $-0,412 \pm 0,581$  (Kontrolle) vs.  $0,161 \pm 0,833$  (OVXDS), n.-s.). Ein ähnliches Verhalten des SMI war im Femurhals nachweisbar. Der Index zeigte zwischen den Kontroll-, OVX- und OVXD-Kollektiven nicht signifikante Abweichungen ( $0,202 \pm 0,220$  (Kontrolle) vs.  $0,158 \pm 0,324$  (OVX) sowie  $0,202 \pm 0,220$  (Kontrolle) vs.  $0,219 \pm 0,391$  (OVXD), n.-s.). Hingegen lag eine stark signifikante SMI-Erhöhung zwischen der Kontroll- und OVXDS-Gruppe vor ( $0,202 \pm 0,220$  (Kontrolle) vs.  $0,774 \pm 0,199$  (OVXDS),  $p < 0,006$ ). Im Trochanter major fiel ein höherer Wertebereich des SMIs auf und die Gruppen unterschieden sich nicht signifikant untereinander ( $0,983 \pm 0,306$  (Kontrolle) vs.  $1,17 \pm 0,223$  (OVX) und  $0,983 \pm 0,306$  (Kontrolle) vs.  $1,09 \pm 0,305$  (OVXD), n.-s.), obwohl die relative Strukturordnung der Knochenbälkchen zunahm ( $0,983 \pm 0,306$  (Kontrolle) vs.  $1,28 \pm 0,300$  (OVXDS), n.-s.).



**Abbildung 29: Ergebnisse der statistischen Analyse der Femurspongiosa (SMI) des adulten Großtiermodells.** Parametrisch dargestellt ist die relative Strukturordnung der Spongiosa (SMI).

### Veränderung der Knochenmineralisierung zwischen den Untergruppen

Die Mineralsalzdichte zeigte ein ähnliches Verhalten wie der Knochenvolumenanteil der korrespondierenden Region. Nach einer diskreten Zunahme der durchschnittlichen **BMD** [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ] zwischen der Kontroll- und OVX-Gruppe im Kopfbereich des Femurs ( $0,520 \pm 0,0771$  (Kontrolle) vs.  $0,543 \pm 0,0726$  (OVX), n.-s.), nahm die Knochenmineralisierung nicht signifikant ab ( $0,520 \pm 0,0771$  (Kontrolle) vs.  $0,508 \pm 0,0821$  (OVXD) und  $0,520 \pm 0,0771$  (Kontrolle) vs.  $0,329 \pm 0,146$  (OVXDS), n.-s.). Bei den Regionen des Collum femoris war eine progrediente Reduktion der BMD zu verzeichnen ( $0,477 \pm 0,0577$  (Kontrolle) vs.  $0,475 \pm 0,0486$  (OVX) und  $0,477 \pm 0,0577$  (Kontrolle) vs.  $0,443 \pm 0,0811$  (OVXD), n.-s.). Zwischen der Kontroll- und OVXDS-Gruppe lag ein hoch signifikanter Unterschied vor ( $0,477 \pm 0,0577$  (Kontrolle) vs.  $0,275 \pm 0,0677$  (OVXDS),  $p = 0,0025$ ). Das Wertenniveau der BMD des Trochanter majors befand sich zwischen  $0,281 \pm 0,0464 \text{ g}/\text{cm}^3$  (OVX) und  $0,149 \pm 0,0320 \text{ g}/\text{cm}^3$  (OVXDS). Der statistische Vergleich in Bezug auf das Referenzkollektiv zeigte eine signifikante Abnahme der BMD zwischen der K- und OVXDS-Gruppe ( $0,268 \pm 0,0368$  (Kontrolle) vs.  $0,149 \pm 0,0320$  (OVXDS),  $p < 0,006$ ).



**Abbildung 30: Ergebnisse der statistischen Analyse der Femurspongiosa (BMD) des adulten Großtiermodells.** Parametrisch dargestellt ist die Knochen- und Weichgewebedichte (BMD).

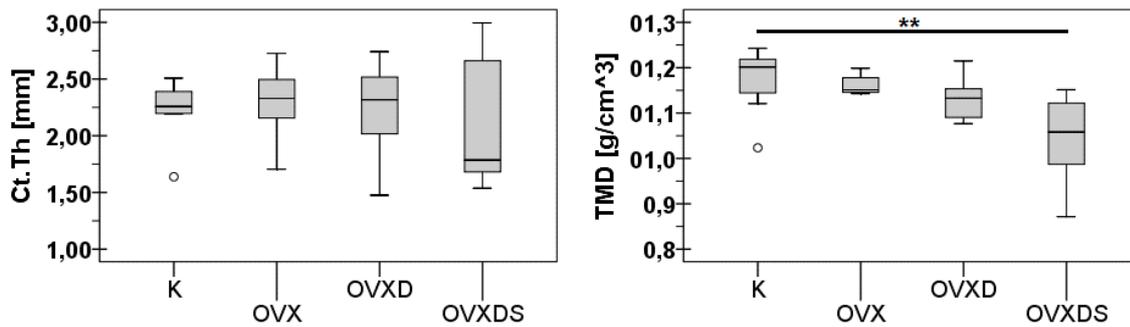
#### 5.4.3 Proximales Femur – Kortikalis

##### Veränderung der Cortical Thickness zwischen den Untergruppen

Insgesamt lag kein signifikanter Unterschied der durchschnittlichen Dicke der Kortikalis (**Ct.Th**, in Millimeter) zwischen den Untersuchungsgruppen vor. Im graphischen Verlauf war zwischen den Tieren der Kontroll-, OVX- sowie OVXD-Gruppe keine wesentliche Veränderung nachweisbar ( $2,23 \pm 0,263$  (Kontrolle) vs.  $2,29 \pm 0,335$  (OVX) und  $2,23 \pm 0,263$  (Kontrolle) vs.  $2,24 \pm 0,402$  (OVXD), n.-s.). Zwischen der Kontroll- und OVXDS-Gruppe war eine deutliche, nicht signifikante Ausdünnung der Knochenrinde zu verzeichnen ( $2,23 \pm 0,263$  (Kontrolle) vs.  $2,07 \pm 0,601$  (OVXDS), n.-s.).

##### Veränderung der Knochenmineralisierung zwischen den Untergruppen

Die kortikale Mineralsalzdichte (**TMD**, in  $\text{g/cm}^3$ ) zeigte zwischen den Gruppen K, OVX und OVXD eine geringe, jedoch nicht signifikante Abnahme ( $(1,17 \pm 0,072$  (Kontrolle) vs.  $1,16 \pm 0,023$  (OVX), n.-s.) und  $(1,17 \pm 0,072$  (Kontrolle) vs.  $1,13 \pm 0,046$  (OVXD),  $p = 0,206$ )). Die TMD der OVXDS-Tiere maß  $1,04 \pm 0,102 \text{ g/cm}^3$  und stellte sich signifikant reduziert zu der der Kontrolltiere dar (Kontrolle vs. OVXDS,  $p = 0,009$ ).



**Abbildung 31: Ergebnisse der statistischen Analyse der femoralen Kortikalis des adulten Großtiermodells.** Parametrisch sind die durchschnittliche Kortikalisdicke (Ct.Th) und die kortikale Mineralsalzdichte (TMD) dargestellt.

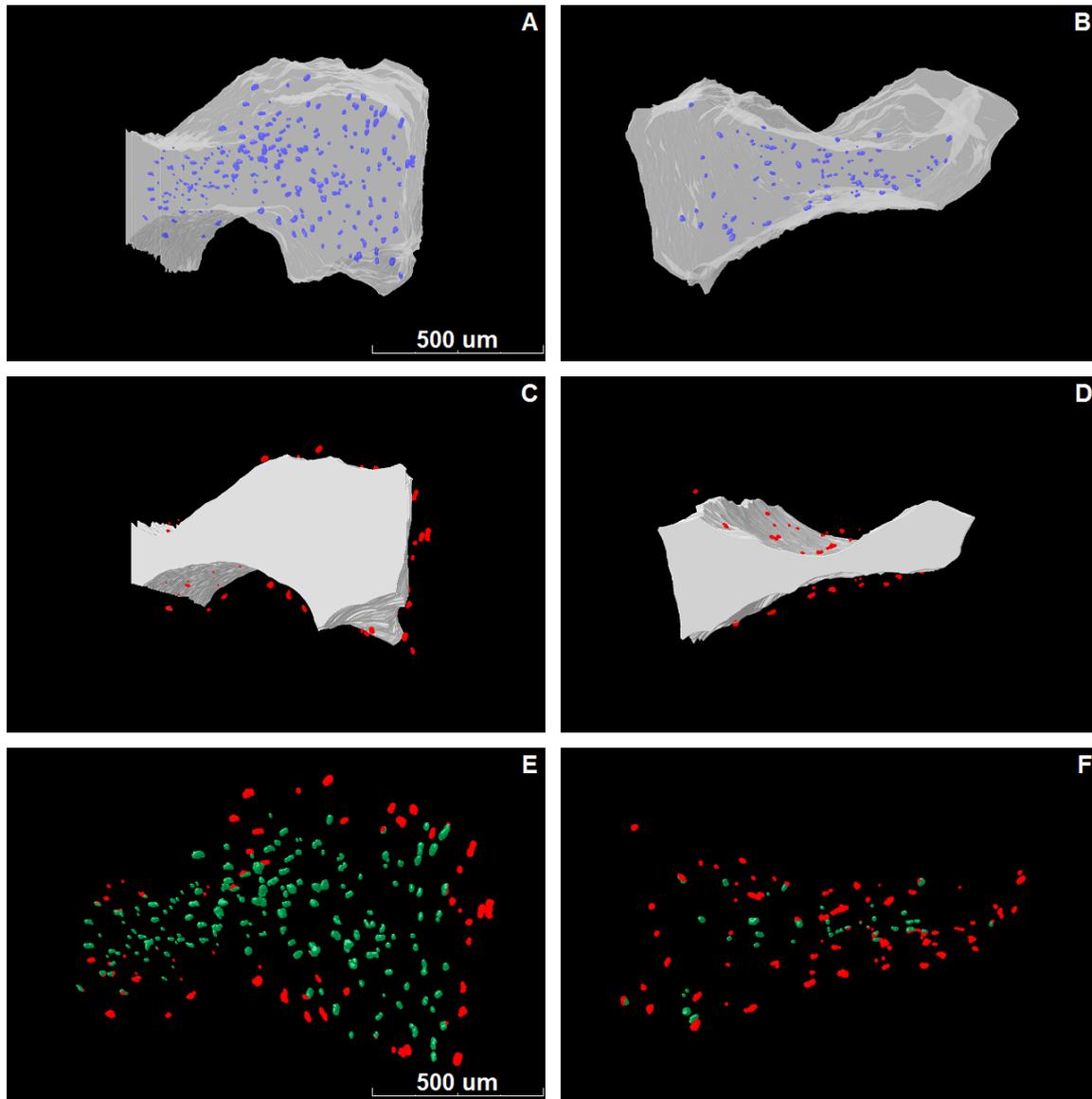
Zusammengefasst lagen signifikante Veränderungen der Knochenstruktur im Bereich des Collum femoris (BMD, Tb.Th, SMI) sowie der diaphysären Kortikalis (TMD) zwischen der Kontroll- und OVXDS-Gruppe vor. Somit ließen diese Ergebnisse auf einen suszeptiblen Knochenumbau im Rahmen der Osteoporoseinduktion mittels OVX, defizitärer Diät und Steroiden am Großtier Schaf schließen.

### 5.5 Visuelle Bildinspektion der Trabekel des Großtiermodells

Die NCT diente der Darstellung der Zellakunen der Osteozyten im Submikrometerbereich bei einer isotropen Voxelkantenlänge von 700  $\eta\text{m}$ . Die Abbildung 32 visualisiert zwei exemplarische Trabekelpräparate als 3D-Surface-Rendering-Grafik. In der Übersicht fällt direkt ein Unterschied der Trabekeldicke auf, wobei die der Interventionsgruppe (rechte Spalte; B, D und F), bedingt durch die forcierte Osteoporoseinduktion, geringer ist. Bei detaillierter Betrachtung der Zellakunen ist zwischen den Gruppen und/ oder unter Ortsbezug hervorstechend, dass bei der OVXDS-Gruppe die mittlere Anzahl aller Osteozyten geringer als bei der Kontroll-Gruppe (links) scheint. Darüber hinaus differiert in der OVXDS-Gruppe das durchschnittliche Lakunenvolumen von der peripheren zur zentralen Zone. Weitere bildmorphologische Unterschiede sind für ein vergleichbares Volumen pro Ortsspezifität nicht wesentlich erkennbar.

Kontrolle

OVX-Diät-Steroid



**Abbildung 32: Vergleichende Visualisierung der LWK 2-Trabekel des adulten Großtiermodells.** Die Gegenüberstellung der 3D-Surface-Rendering-Darstellungen zweier Trabekelabschnitte (Kontroll-Gruppe links: Grafik A, C & E; OVX-Diät-Steroid-Gruppe rechts: Grafik B, D & F) visualisiert das methodische Vorgehen und die Ergebnisse der Analyse. Für die ersten vier Bilder gilt der in A und für die letzten Zwei der in E angegebene Maßstab. Die präparierten Trabekelregionen werden von axial betrachtet und sind einheitlich rotiert. **(A, B)** Die VOIs zeigen die mineralisierte Knochenmatrix (grau, leicht transparent) um die gesamten Zelllakunen (blau). **(C, D)** Die grafische Darstellung des Trabekelkerns (grau, intransparent) erfolgt unter Aussparung der peripheren Trabekelzone von 40 Pixeln. Die graue Knochenmatrix inkludiert die zentralen Osteozyten. Rot markiert sind die umliegenden peripheren Zelllakunen. **(E, F)** Die gesamten Osteozyten des Trabekelabschnittes sind bei Aussparung der mineralisierten Knochenmatrix hervorgehoben. Wie in C & D werden die peripheren Osteozytenlakunen rot dargestellt. Alle zentralen Lakunen sind in grün kenntlich gemacht.

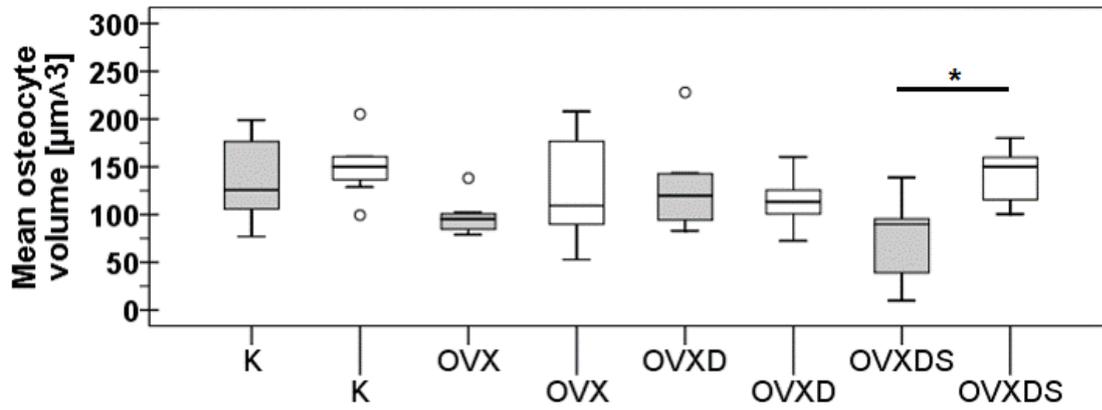
## 5.6 Quantitative Nano-CT des adulten Großtiermodells

Die quantitativen Ergebnisse werden am Ende des Subkapitels mittels graphischer Darstellung in Form von Boxplots-Diagrammen veranschaulicht. Für die paarige Korrelation gilt, dass lediglich signifikante Unterschiede mittels entsprechender Markierung (siehe Kapitel 4.5) visualisiert wurden.

### 5.6.1 LWK 2 – Veränderung der Osteozyten innerhalb einer Gruppe

Insgesamt bestätigte die statistische Analyse der LWK 2-Trabekel teilweise den visuellen Bildeindruck (siehe Abbildung 32). Denn das zelluläre Durchschnittsvolumen der Osteozyten (**mean osteocyte volume**) [ $\mu\text{m}^3$ ] unterschied sich signifikant innerhalb der OVXDS-Gruppe von zentral zu peripher ( $p < 0,0186$ ). Das mittlere Volumen der zentralen Zelllakunen war signifikant kleiner ( $72,6 \pm 46,2$  (OVXDS, zentral) vs.  $140,2 \pm 29,6$  (OVXDS, peripher)) als das der im äußeren Drittel gelegenen Osteozyten. Ebenso war ein geringeres Volumen der zentralen Zelllakunen bei den Schafen der Kontroll- und OVX-Gruppe zu verzeichnen, allerdings ohne signifikanten Unterschied (((Kontrolle, zentral) vs. (Kontrolle, peripher), n.-s.) und ((OVX, zentral) vs. (OVX, peripher),  $p = 0,476$ ))). Zwischen den ortsspezifischen Osteozyten der OVXD-Gruppe lag ein nicht signifikanter Unterschied vor. Die zentralen Lakunen maßen ein größeres mittleres Volumen als die Peripheren ( $128,1 \pm 46,2$  (OVXD, zentral) vs.  $114,1 \pm 25,7$  (OVXD, peripher), n.-s.).

Zusammenfassend zeigten die Graustufenverteilungen der Zelllakunen (**mean grayscale density osteocyte**) oder der umliegenden mineralisierten Matrix (**mean grayscale density mineralized matrix**) sowie deren Relation R (**grayscale density ratio**) und die durchschnittliche Zelllakunenanzahl (**mean osteocyte number**) [ $1/\mu\text{m}^3$ ] keine weiteren signifikanten Unterschiede im Gruppen- und/oder ortsspezifischen Vergleich auf. Hierzu sind unter den Subkapiteln 8.6.2 und 8.6.3 weitere Ergebnisgrafiken sowie Statistikwerte aufgeführt. Erläuterungen zu den Parametern sind der Tabelle 2 zu entnehmen.



**Abbildung 33: Ergebnis der statistischen Analyse des Durchschnittsvolumen der Osteozytenlakunen nach Ortsspezifität innerhalb der Gruppen der LWK 2-Trabekel des adulten Großtiermodells.** Parametrisch dargestellt ist das zelluläre Durchschnittsvolumen (mean osteocyte volume). Das Untersuchungskollektiv ist auf der Abszissenachse gruppiert – K = Kontroll-Gruppe, OVX = OVX-Gruppe, OVXD = OVX + DD-Gruppe, OVXDS = OVX + DD + Steroid-Gruppe. Graphisch sind die gruppenspezifischen Zellakunen entsprechend ihrer Lokalisation farbig kodiert: grau für die zentralen und weiß für die peripheren Osteozyten. Für eine übersichtliche Ergebnisdarstellung sind statistische Charakteristika dem Kapitel 4.5 und Erläuterungen zu den Parametern der Tabelle 2 zu entnehmen. Weitere Statistikwerte sind unter 8.6.2 tabellarisch aufgeführt.

## 6 DISKUSSION

### 6.1 Synopsis

Beim **adulten Kleintiermodell** erkannte man visuell eine geringere Ausdehnung der femoralen und tibialen Spongiosa entlang der Z-Achse, eine Spongiosararefizierung sowie geringere Trabekelvernetzung von der Tiergruppe A0 zu B2. Die mittlere Dicke der Substantia compacta fiel bei den OVX-Tieren betont geringer aus. Visuell differierte die intertrabekuläre Distanz der Wirbelkörper von B2 auffallend zu den beiden anderen Untersuchungsregionen. Im quantitativen Vergleich der Spongiosaprobe zeigte sich sowohl femoral, tibial als auch vertebral eine signifikante Abnahme des Knochenvolumenanteils zwischen der Referenzgruppe und den ovariectomierten Ratten. Korrespondierend verminderte sich die Knochenmineralisierung signifikant. Zudem war bei den OVX-Gruppen die Trabekelanzahl signifikant reduziert und infolgedessen der intertrabekuläre Abstand signifikant zunehmend. Die signifikante Zunahme des SMI spiegelte die wechselnde Spongiosamorphologie von konkav planen zu konvex stabförmigen Strukturen wider. Im gesamten Vergleich stellte man die deutlichsten Unterschiede im Bereich der Brustwirbelkörper (Th 9) fest. Zusätzlich stellte man eine signifikante Trabekelausdünnung fest. Vergleichend zur Referenzgruppe war diaphysennah die mittlere Kortikalisdicke von der Gruppe B1 signifikant und von der Gruppe B2 hoch signifikant verschmälert. Insgesamt fanden sich im Verlauf keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Sham-Tiere ohne weitere Intervention (siehe A0 zu A1). Letztlich führte die alleinige Schein-OP trotz multipler Stressoren zu keiner signifikanten Knochenveränderung im seneszenten Alter, wohingegen sich die Ovariectomie, welche in der Literatur als Goldstandard gilt, zur Induktion eines Knochenschwundes am adulten Kleintier als geeignet erwies.

Visuell zeigte das **adulte Großtiermodell** morphologisch ähnliche Knochenveränderungen der analysierten Regionen (Femurkopf, -hals und Trochanter major) von den Interventionsgruppen (K-, OVX-, OVXD- und OVXDS) auf. Die durchschnittliche BV/TV verringerte sich bei allen Interventionsgruppen von Femurkopf zu -hals und Trochanter major nicht signifikant. Im Bereich des Femurhalses und des Trochanter majors lag ein hoch signifikanter Unterschied der BMD zwischen der K- und OVXDS-Gruppe vor. Vergleichend zur Kontrollgruppe nahm die mittlere Trabekeldicke der OVXDS-Gruppe im Collum femoris signifikant ab. Ein signifikanter Anstieg des SMIs wurde im Collum femoris zwischen der K- und OVXDS-Gruppe festgestellt. In der Trochanterregion war die Tb.N am geringsten. Auch keine signifikanten Veränderungen verzeichnete die

Tb.Sp. Das Untersuchungskollektiv zeigte zudem eine nicht signifikante Abnahme der mittleren Kortikalisdicke zwischen den Interventionsgruppen auf. Die kortikale Mineralsalzdichte reduzierte sich signifikant (K- vs. OVXDS-Gruppe). Zusammengefasst lagen signifikante Knochenstrukturveränderungen im Bereich des Collum femoris (BMD, Tb.Th, SMI) sowie der diaphysären Kortikalis (TMD) zwischen der Kontroll- und OVXDS-Gruppe vor. Es kann von einem suszeptiblen Knochenumbau mittels OVX, defizitärer Diät und Steroiden am Großtiermodell ausgegangen werden.

Die 3D-Surface-Rendering-Grafiken der Nano-CTs visualisierten eine Ausdünnung der durchschnittlichen Anzahl aller Zelllakunen bei der OVXDS-Gruppe. Bei der selbigen schienen die Osteozyten in der peripheren Zone größer als im Zentrum des Trabekels. Die statistische Analyse bestätigte einen signifikanten Unterschied des mittleren Osteozytenvolumens innerhalb der OVXDS-Gruppe von zentral zu peripher. In der peripheren Zone betrug das Durchschnittsvolumen etwa  $140,2 \mu\text{m}^3$  und war somit signifikant größer als zentral. Im Gruppen- und/oder ortsspezifischen Vergleich lagen keine weiteren signifikanten Unterschiede der Graustufenverteilung, deren Verhältnis oder der durchschnittlichen Zelllakunenanzahl vor.

## **6.2 Diskussion der Methodik**

### 6.2.1 Tiermodelle

In der präklinischen Forschung müssen klinisch relevante Tiermodelle spezifische Voraussetzungen erfüllen. Grundlegend soll das genutzte Versuchstier in den Eigenschaften der zu untersuchenden humanen Pathologie ähneln [122]. Als Vorteil brachten Nagetiere eine kürzere Aufzucht sowie Beobachtungsdauer mit sich, wodurch geringere Kosten im Vergleich zu Großtiermodellen entstanden [123, 124]. Zudem ist das Genom von kleinen Nagern mehr erforscht als von anderen Untersuchungstieren [125]. Nach Erben et al. kann das Skelettsystem der Ratte dem der humanen Spezies gleichgesetzt werden. Die Knochenumbauvorgänge und zelluläre Aktivität ähneln sich unter Berücksichtigung wesentlicher Aspekte. Der Knochenstoffwechsel juveniler Ratten weicht von dem Remodelingprozess des Menschen ab. Zudem divergiert die Aktivität der fünf Stadien – Ruhe-, Aktivierungs-, Resorptions-, Formations- und Mineralisationsphase – in verschiedenen Skelettregionen. D.h. der Remodelingprozess setzt in unterschiedlichen Regionen zu einem anderen Alter/ Zeitpunkt ein. Erben et al. wiesen einen prozentualen Remodeling-Anteil von 70% in der Lendenwirbelsäule sowie 21% in der proximalen Tibia bei 3 Monate alten Ratten nach. Hingegen stieg er auf 91%

bzw. 66% im Alter von 12 Monaten an [71]. Netto et al. bestätigten die altersbedingte Skelettveränderung an der ausgewachsenen senilen Ratte, was relevant für die Osteoporoseforschung am Kleintiermodell ist [126].

Die Spezies der Nagetiere durchläuft in keiner Altersstufe eine Menopause [127]. Primär erfolgt die Induktion der postmenopausalen Osteoporose durch den Mangel an Östrogen, welcher im Tiermodell mittels bilateraler OVX imitiert werden konnte [69, 70]. Die OVX steigerte das Remodeling, welches betont an der Spongiosa und in gewissem Maße an der Kortikalis stattfand [66, 70, 127]. Egermann et al. und Miller et al. beschrieben einen weiteren Unterschied zur postmenopausalen Frau. In der Spätphase des Östrogenmangels bleibt die Osteoblastenfunktion einer osteoporotischen Ratte nahezu erhalten [128, 129]. Hingegen sind die zunehmende Anzahl und Aktivität von Osteoklasten der vorherrschende Mechanismus für den altersbedingten Knochenchwund [130]. Der Ansatz der OVX wurde entweder singulär oder in Kombination mit einer multidefizitären Ernährung – Vit-D- und -K- sowie Calcium- und Phosphorarm – angewandt, um forciert die Osteoporose zu induzieren [130, 131]. Durchaus kam der Knochenstatus des Sham-Kollektives in Kombination mit einer Mangelernährung dem Effekt der obigen Alternative sehr nahe [130].

Bahnbrechend war die Entwicklung der In-vivo-Mikrocomputertomographie. Sie ermöglicht es, Knochenveränderungen im zeitlichen Verlauf im Rahmen einer Längsschnittstudie frühzeitiger zu erfassen und ferner die Anzahl der Versuchstiere zu reduzieren. [132]. Unser Studienprotokoll sah allerdings eine Ex-vivo-Querschnittsstudie im adulten Alter von durchschnittlich 15 Monaten vor, um ein seneszentenes Rattenmodell für die Erforschung der Osteoporose zu entwickeln. Netto et al. wiesen in ihrer Arbeit darauf hin, dass weibliche Ratten im Alter von 13 Monaten kein zufriedenstellendes Modell altersbedingter Knochenveränderungen darstellten. Sie beobachteten 6 bzw. 36 Wochen alte Ratten über einen Zeitraum von 20 Wochen. Beide Alterskollektive erhielten nach Belieben ein Standardfutter für ausgewachsene Nagetiere, das die empfohlenen Mengen an Calcium, Phosphor und Vitamin D beinhaltet. Doch eine Reduktion der BMD im Bereich des Femurs wurde nicht erfasst. Sie schlussfolgerten, dass ungefähr ein Jahr alte Ratten ein frühes Stadium der altersbedingten Knochenveränderungen abbilden [126]. Wir verwendeten als Referenzgruppe sham-operierte Tiere im Alter von ca. 15 Monaten (siehe Kollektiv A1). Im Vergleich zum 12 Monate alten Sham-Kollektiv (A0 vs. A1) waren durchweg keine signifikanten Unterschiede erkennbar, jedoch nahmen die BV/TV sowie Tb.Th im Bereich der Femur-, Tibia- und Th 9-Spongiosa innerhalb der Standzeit von 3 Monaten tendenziell ab. Im Gegensatz zur Veröffentlichung von Netto et al. [126] reduzierte sich die Knochenmineralisierung (BMD) in den analy-

sierten Regionen des Femurs und der Tibia. Die Dicke der mittdiaphysären Kompakta (Ct.Th 2) verringerte sich, wohingegen die metaphysennahe Kortikalisdicke (Ct.Th 1) etwas zunahm.

Die Arbeitsgruppe um El Khassawna et al. beobachtete an einem vergleichbaren Kleintiermodell der juvenilen Ratte (Alter von 3 Monaten), dass die scheinoperierten Tiere nach einer Standzeit von 3 Monaten in der Tibia einen zunehmenden Knochenvolumenanteil sowie einen größeren Durchmesser der diaphysären Kompakte im Vergleich zur Kontrollgruppe hatten. Sie schlussfolgerte ein weiteres ossäres Wachstum der unreifen Tiere zu diesem Versuchszeitpunkt [131]. Das progrediente Knochenwachstum konnten Perilli et al. im Rahmen eines analogen In-vivo-Studiensettings an 2 Monate jungen, sham-operierten SD-Ratten bestätigen [133]. Unter Berücksichtigung der murinen Knochenreife bei einem Alter von ca. 11-12 Monaten war das jetzige Studiendesign unseres Rattenmodells optimiert. Fortan liegt ein ossäres „Remodeling“ vor [69, 71].

Vergleichend zum Rattenskelett konvergieren die ovinen Knochen mehr mit der Makrostruktur eines Menschen. Es ist unentbehrlich ein Großtiermodell zu etablieren [68]. In der Regel werden Schafe trotz ihrer genetischen Nähe zur humanen Spezies weniger ethisch bedenklich als Haustiere oder nichtmenschliche Primaten angesehen. Ferner sind Schafe gelehrig und leicht handzuhaben [64, 134-137], aber relativ kostenintensiv [135]. Pierce et al. bestätigten, dass das Schaf der humanen Knochenstruktur sehr nahekam. Es bot die Vorteile, ein dem Menschen ähnliches Körpergewicht zu haben und sich durch entsprechende Knochengröße für die Erforschung menschlicher Prothesenimplantation zu eignen [136]. Im Gegensatz zu Rattenknochen [128], welche äquivalente Resorptionshöhlen besitzen [138], weisen Schafe eine Knochenstruktur mit Havers-System auf. Adulte Schafe führen ein Remodeling-Prozess mit BMU durch, wodurch eine große Ähnlichkeit zum humanen Knochenmetabolismus vorliegt [139].

Bei der Etablierung eines osteoporotischen Schafmodells sollten nach Arens et al. alle den Knochenmetabolismus beeinflussenden Faktoren berücksichtigt werden. Aus diesem Grund werteten sie die BMD, Trabekelstruktur sowie biochemische Knochenmarker und Östrogenspiegel über 18 Monate quantitativ und qualitativ aus, um saisonale Veränderungen der Knochenmasse beim Schaf zu detektieren. Hierbei wurden die niedrigsten BMDs bei erhöhten Östrogenspiegel im Winter beobachtet. Im Frühjahr/Sommer konnte ein signifikanter Anstieg analysiert werden [140]. Das in unserem Studiendesign vorliegende Merino-Landschaf gehört zu einer der wenigen Rassen, welche asaisonal polyöstrisch ist [74]. Hierdurch konnten die jahreszeitliche Hormonschwän-

kung und ihre Auswirkung auf die Knochenmasse keinen relevanten Störfaktor unseres Großtiermodells darstellen.

Zur Beurteilung des Knochenzustandes findet in den meisten präklinischen Studien zu Osteoporose die DXA-Messung Verwendung [141]. Beim Menschen wird die Diagnose mittels des T-Scores in Bezug auf einen gesunden 30-jährigen Patienten gestellt [39]. Für ein fortschrittliches Tiermodell ist die Etablierung einer Referenz-BMD vor Induktion der Osteoporose am Versuchstier notwendig. Denn die BMD-Wertebereiche sind nicht mit dem des Menschen vergleichbar. Die Arbeitsgruppe um El Khassawna et al. ging dieser Motivation nach. Sie versuchten durch das Einführen einer Baseline eine zuverlässige Alternative für die ovine Kontrollgruppe zu gründen. Somit würde die Anzahl der benötigten Tiere in zukünftigen Experimenten reduziert und der nächste klinische Schritt gegangen [141]. Der deutlichere Aufwand von Tierversuchen am Schaf und die Kostenintensivität könnten in gewissem Maße gesenkt werden [135].

Das dieser Arbeit zugrundeliegende Studienprotokoll sah eine Kombination aus OVX, Mangelernährung und Steroidinjektion zur Induktion des Knochenschwundes vor. Die alleinige OVX- oder Steroidbehandlung ist zum forcierten Herbeiführen einer Osteoporose limitiert [4, 135, 142-144]. Beispielsweise berichteten Newton et al. erst nach einer 12-monatigen Standzeit von signifikanten Veränderungen der Knochenarchitektur und der BMD im Beckenknochen ovariectomierter Dorset-Fleischschafe [74].

Vergleichend zu anderen Studienprotokollen waren über den kompletten Versuchszeitraum die Steroidpräparate sowie -mengen divergent. Wir verwendeten 320 mg Methylprednisolonacetatlösung alle 2 Wochen über eine Standzeit von 8 Monaten (Gesamtdosis ca. 5100 mg/ Tier). Hingegen applizierten Lill et al. etwa 3280 mg Methylprednisolonacetatlösung und in den letzten sechs Wochen 1200 mg Methylprednisolonsuspension pro Schaf. Die Suspension hat gegenüber der Lösung einen größeren Effekt auf den Knochenverlust [144], was für den Unterschied der Ergebnisse verantwortlich sein könnte. Der postmenopausale oder senile Knochenstatus wurde durch die Glukokortikoide verstärkt. Im Rahmen der Beeinträchtigung des Skelettstoffwechsels erhöhte sich die Morbidität von Osteoporose und das Risiko assoziierter Frakturen [135, 145].

Der klinische Gesundheitszustand der Tiere sollte bei einer Steroidtherapie nicht in den Hintergrund rücken und die nachteiligen Auswirkungen bedacht werden. In einem Review von Egermann et al. wurden gesundheitlichen Veränderungen von mehreren ovinen Großtierstudien erfasst. Neben einer Alopezie oder Abszessen wurden von letalen Infektionen mit Organversagen berichtet. Hierbei korrelierte die Dosis mit dem Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen [146]. Nach Lill et al. bestand die

Notwendigkeit, die Anzahl der Steroidinjektionen zu verringern. Ein signifikanter Knochenmassenverlust war dennoch erzielbar. Beispielsweise waren in der Schweiz mehr als 80% aller Schafe mit *Mycobacterium pseudotuberculosis* infiziert [144]. Der Versuchsaufbau des vorliegenden Großtiermodells wurde im Rahmen der Ergebnisse sowie im Vergleich zu anderen Studien bestätigt [82, 134, 144-147]. Die Empfehlung zur Glukokortikoidverabreichung (Wirkstoff, Dosis, Applikation und Dauer) beachtete man weitestgehend [135].

Oheim et al. resümierten, dass es kein perfektes Osteoporose-, sondern eine Vielzahl von Modellen gibt, die sich für die Beantwortung spezifischer Fragen eignen. Die Angemessenheit eines Tiermodells wird jedoch nicht nur in Bezug auf die Ähnlichkeit mit der menschlichen Physiologie und der Krankheit selbst definiert, sondern auch in Bezug auf Anschaffung, Kosten, Wohnbedürfnisse, Handhabung und insbesondere ethische Belange und Tierschutz [137].

### 6.2.2 Computertomographie

Im Jahr 1982 publizierten S. D. Dover und J. C. Elliot erstmals die Anwendung der CT im Submillimeterbereich [148]. Bis heute haben die Mikro- und Nano-CT einen fortan progredienten Stellenwert in der biomedizinischen Grundlagenforschung und waren in den letzten Jahrzehnten nicht mehr wegzudenken [149, 150].

#### **Mikro-Computertomographie**

Die  $\mu$ CT leistet schon mehr als dreißig Jahre einen Beitrag zur Erforschung der Osteoporose in der Grundlagenforschung [151, 152]. Aufgrund ihrer Nicht-Destruktivität und Reliabilität ist die Mikro-CT inzwischen zur Quantifizierung histomorphometrischer Parameter der ossären Mikroarchitektur etabliert. Sie ergänzt die Histologie und ist in der Lage, auf Grund der hohen Auflösung im Submillimeterbereich, Standardwerte für den trabekulären und kortikalen Knochen zu analysieren [133, 153-156]. Über die dreidimensionale Darstellung sind Strukturveränderungen der ossären mineralisierten Matrix reproduzier- und standardisiert detektierbar [116, 135]. Patel et al. bestätigten die Eignung des Mikro-CTs zur quantitativen sowie qualitativen Analyse der Knochenmikroarchitektur [154, 157]. Auf diese Art und Weise konnten Knochengebiete kleinster Versuchstiere dreidimensional erfasst werden. Der vom  $\mu$ CT generierte 3D-Datensatz bildete das Gewebe entsprechend realistisch ab. Durch die Segmentierung war eine separate Darstellung der Kortikalis sowie Spongiosa möglich, was die Voraussetzung zur Beurteilung des Grades der Knochenminderung war [70, 156].

Die sequenzielle Untersuchung von Präparaten ist notwendig zur Erforschung zusammenhängender patho- und/ oder physiologischer Prozesse. Hierbei sollten nicht-destruktive Methoden vor destruierenden Techniken (Biomechanik, Histopathologie, Molekularbiologie) erfolgen. Aufgrund dieser strukturellen Befunderhebung konnte das Versuchstierkollektiv möglichst geringgehalten werden. Ferner erlaubte die optimale Probennutzung eine Befundkonstellation aller Modalitäten eines Untersuchungsobjekts [110]. Die Grundvoraussetzung hierfür war eine adäquate Präparatkonservierung, die jegliche Untersuchungsmodalität respektierte bzw. das nachstehende Analyseverfahren nicht beeinflusste [103].

Eine aktive Probenaufarbeitung wie Schneiden oder Entwässern war für das nicht-destruktive Verfahren nicht notwendig. Zudem war ein Schutz vor passiver Destruktion der intrinsischen Probenstruktur durch eine konstante Konservierungsmethode geboten. In diesem Kontext stellt die  $\mu$ CT ein etabliertes Verfahren dar [110]. Neben der gängigen Methode, chemisch fixierte Präparate zu scannen, besteht mittlerweile die Möglichkeit, kryokonservierte Proben computertomographisch im Mikrometerbereich zu untersuchen [158]. Um bei längeren Untersuchungszeiten keine Strukturveränderung oder Bewegungsartefakte zu verursachen, ist eine thermische Isolation essentiell [159-161]. Ohne Entwärmung passt sich die Temperatur der Probe den Umgebungsverhältnissen an und hat eine Probendestruktion zur Folge. Die kryostatische mikro-CT setzt somit einen konstanten Thermostabilisator bzw. thermische Isolation und aktive Kühlung voraus [110]. Mittels dieser nicht-destruktiven Methode bleiben sowohl molekulare und biomedizinische Material-/ Gewebeeigenschaften als auch der charakteristische dreidimensionale Aufbau erhalten, um nachstehende Untersuchungen wie Immunhistochemie, Enzym-linked Immunosorbent Assay oder Polymerase-Kettenreaktion weiterhin zu ermöglichen [110].

Die bisher beschriebenen kryostatischen Mikro-CTs umfassten etwa 4 Prozent ( $34 \text{ cm}^3$ ) [162] des Kammervolumens von unserer Arbeitsgruppe ( $829 \text{ cm}^3$ ) [110]. Dieser Fortschritt bietet die Möglichkeit, Objekte wie einen Lendenwirbelkörper mit angrenzenden Bandscheibenfächern eines Schafes zu scannen. Nichtsdestotrotz waren der Computertomographie durch die vorliegende Technik Grenzen gesetzt. Die individuelle/ abhängige Pixelanzahl des Bilddetektors limitierte die Größe der Probe sowie Auflösung. Zudem lagen erheblich längere Scanzeiten als im Klinikalltag vor [110]. Die hohe Strahlenbelastung einer Untersuchung stellt einen negativen Aspekt dar. Dennoch wird eine recht hohe Strahlendosis für Labortiere akzeptiert [163]. Ein weiteres Defizit dieser radiographischen Technik war der geringe Weichteilkontrast, wodurch sich Forschungsansätze in den vergangenen Jahren auf hohe Kontrastobjekte wie Knochen

fokussierten [164]. Trotz der mikro-computertomographischen Sensitivität zur Detektion von Knochenstruktur- bzw. Knochendichteänderungen, ist die Messung dynamischer Vorgänge wie das zelluläre „Remodeling“ nicht möglich [165]. D.h. die Darstellung der zellulären Funktion ist mittels Mikro-CT nicht praktikierbar. Somit kann die Histologie auf dieser Ebene bislang nicht ersetzt werden [166, 167]. Womöglich offerierte die NCT das essentielle Potential?

### **Nano-Computertomographie**

Die Synchrotron-Technik gilt bislang als kosten- und zeitintensives Verfahren für die Analyse im Submikrometerbereich [95]. Aber auch die Rasterelektronenmikroskopie liefert eine Auflösung im Submikrometerbereich. Allerdings wurde sie bisher nur bei demineralisiertem Gewebe angewandt [168]. In jüngster Vergangenheit wurde die Innovation der Nano-CT als einen Meilenstein und potentielle Alternative der CT-Technologie in der biomedizinischen Forschung beschrieben. Im Vergleich zur  $\mu$ CT mit 5-10 Mikrometer/Pixel reicht die Detailerkennung in der NCT bis unter 200 Nanometer/Pixel [95, 156]. Bisher war der Einsatz der Nano-CTs auf Gebiete wie die Materialwissenschaft [169] und die biomedizinische Forschung beschränkt [93, 170, 171]. In neueren Studien von Kampschulte et al. wurde die NCT speziell zur Analyse von ossären Präparaten und pulmonalem Parenchym verwendet. CT-basierend wollten sie die Histomorphometrie im Submikrometerbereich darstellen [101]. Die Arbeitsgruppen um Langheinrich et al. und Stolz et al. zeigten das Potenzial der Nano-Computertomographie: Sie analysierten die lokale Mikrozirkulation der Nieren und des Gehirns mittels Bildgebung im Nanobereich, womit sich die Eignung des Nano-CTs zur qualitativen sowie quantitativen Analyse hochauflösender Weichteildetails v.a. von vaskulärem und auch kapillarem Gewebe bestätigte. Unter anderem konnten Plaquareale Kontrastmittel gestützt detektiert und volumetriert werden [93, 171-173]. Khoury et al. belegten diese Erkenntnisse anhand ihrer computertomographischen Forschungspraktiken an muskuloskelettalem Gewebe [152]. Auch Yang et al. beschrieben zur Darstellung von Weichteil- bzw. Gefäßstrukturen, also suffizienten Gewebedifferenzierung, eine primäre Kontrastmittelapplikation in das Gewebe [174].

Die Datenakquisition der präparierten Knochen trabekel bei ca. 700 nm erfolgte aufgrund der mineralisierten Knochenmatrix ohne Kontrastmitteleinsatz. Die mineralisierten und nicht-mineralisierten Knochenanteile wurden segmentiert sowie qualitativ und quantitativ ausgewertet. Die Visualisierung der trabekulären Mikroarchitektur bzw. Osteozytenlakunen und vaskulären Kanäle in der Spongiosa konnte mittels dieser Bildgebung realisiert werden [101]. Bei dieser Methodik war die

Probengröße ebenso durch die Röntgendetektorfeldfläche des CT-Geräts stark limitiert. Entsprechend der gewünschten Auflösung sollte das Probenvolumen wenige Kubikmillimeter nicht überschreiten. So musste das Untersuchungsobjekt präzise präpariert werden. Zwischenzeitlich wurden Lösungsansätze wie technische Offset-Scans oder Rekonstruktionsalgorithmen zur Artefaktreduktion entwickelt [101, 174]. Hierbei lagen sehr lange Untersuchungszeiten und eine Scanfrequenz von ungefähr zwei bis drei Proben pro Tag vor [101].

Im Vergleich des Nano- gegenüber des Synchrotron-CTs lassen sich die Grenzflächen zweier Objekte, aufgrund der höheren Kontrastauflösung des Synchrotron-Scans, besser identifizieren. Im Nanobereich glänzt die Synchrotron-CT durch geringe Strahlenaufhärtung, wohingegen die NCT eine höhere Ortsauflösung erzielt [170]. Grundsätzlich bieten Synchrotronquellen einen um mehrere Größenordnungen höheren Photonenfluss als herkömmliche Röntgenröhren, wodurch eine Bilderzeugung mit hoher räumlicher Auflösung ermöglicht wird [156]. Die NCT-Technologie stellt trotz gewisser Nachteile ein der Histologie gegenüberstehendes Verfahren dar [174].

### **6.3 Diskussion der Ergebnisse**

#### **Adultes Kleintiermodell „Ratte“**

Boyd et al. quantifizierten mittels In-vivo-Mikro-CT die Tibiametaphysen von 20 weiblichen Wistar-Ratten über einen Zeitraum von 6 Monaten. Sie randomisierten 20 8 Monate alte Versuchstiere in 2 gleichgroße Gruppen, wobei die eine einer Schein-Operation und die andere einer OVX-Operation unterzogen wurde. Monatlich akquirierten sie einen Datensatz der proximalen Tibia und analysierten Knochenparameter. Die Knochenveränderungen der Sham-Tiere im Alter von 12 und 14 Monaten ähnelten sich denen unseres Referenzkollektives. Die BV/TV und der SMI nahmen nicht signifikant ab. Die Tb.Sp stieg nicht signifikant an [132]. Die Gruppe A2 unseres Studienkollektives, welcher eine defizitäre Diät ad libitum verabreicht wurde, zeigte zu A1 keine signifikanten Unterschiede auf. Die soja- und phytoestrogenfreie Mangelernährung mit einer Dezimierung von Vitamin D2/D3, Vitamin K, Calcium sowie Phosphor verursachte eine weitere Knochenstrukturveränderung. Das Knochenvolumen nahm in den langen Röhrenknochen ab, wobei das Trabekelgerüst an Knochenbälkchen verlor und einen geringeren Mineralsalzgehalt aufwies. Paradoxe Weise wurde der Durchmesser der Trabekel größer, wobei deren Verlust trotzdem eine Zunahme des intertrabekulären

Abstands verursachte. Boyd et al., aber auch Mathavan et al., vermuteten, dass das Ausdünnen der Trabekel zum vollständigen Verlust dünnerer Strukturen führte, gefolgt von einer zunehmend dickeren Spongiosa [132, 175]. Eine weitere Diskrepanz fanden wir in den kortikalen Regionen. Im Gruppenvergleich dünnte sich die Kompakta zunehmend aus, wobei ein höherer Mineralisierungsgrad vorlag (Gruppe A2 mit  $1,77 \text{ g/cm}^3$  in der mitteldiaphysären Kortikalis am größten).

In den Tibiae der OVX-Gruppe (B1) reagierten die metaphysären Trabekel mit einer fast signifikanten Reduktion der BV/TV, BMD und Tb.N sowie deutlichen Zunahme der Tb.Sp. Darüber hinaus nahmen die durchschnittliche Trabekeldicke hoch signifikant und der SMI signifikant zu. Ein ähnliches Verhalten wurde in der Gruppe A2 detektiert und auf die vollständige Ausdünnung/ das Fehlen von dünner Spongiosa zurückgeführt, wodurch nur noch mächtige Knochenbälkchen dominierten. Korrespondierend zeigte das ovariektomierte Tierkollektiv (Alter von 14 Monaten) von Boyd et al. eine signifikante Zunahme des SMIs. Hingegen nahmen die BV/TV, Tb.N und Tb.Th signifikant ab sowie die Tb.Sp im Vergleich zum Referenzkollektiv (Sham 14 Monate) signifikant zu. Folglich bestätigten Boyd et al., dass sich die Scheintiere erheblich weniger als das OVX-Kollektiv änderten. Der Östrogenmangel aufgrund einer OVX-Operation hatte somit einen starken Einfluss auf die Veränderung der Knochenarchitektur in der Tibiametaphyse der Ratte [132]. Mathavan et al. beschrieben ähnliche Beobachtungen von 30 Wochen jungen SD-Ratten, die 18 Wochen post-OVX mittels Mikro-CT untersucht wurden [175]. Auch Mavropoulos et al. untersuchten 40 6 Monate junge SD-Ratten. Die proximalen Tibiae der zwei randomisierten Gruppen (Sham, OVX) wurden nach 4 Monaten quantifiziert und vergleichbare signifikante Veränderungen der histomorphometrischen Parameter (BV/TV, Tb.N, Th.Th und Tb.Sp) detektiert [176].

Bei einem vergleichbaren Rattenmodell von El Khassawna et al. zur Induktion des Knochenschwundes mittels OVX und Multidefizienzdiet wurden 32 feminine SD-Ratten im juvenilen Alter von 3 Monaten in drei Gruppen à elf Tiere randomisiert. Ein Referenzkollektiv wurde direkt euthanasiert. Die verbliebene Sham- bzw. OVX-Gruppe erhielt über eine 3-monatige Standzeit eine Standard- bzw. multidefizitäre Diät (kongruent zur vorliegenden Diät). Bei der Auswertung der proximalen Tibiametaphyse zeigten El Khassawna et al., dass die Spongiosa der OVX-Diät-Tieren signifikant geringere Werte der BV/TV und Tb.N sowie signifikant höhere Werte der Tb.Sp und des SMIs aufwies [131]. Diese morphologischen Veränderungen fanden sich tendenziell am vorliegenden Kleintiermodell bei einem durchschnittlichen Kollektivalter von 15 Monaten wieder. D.h. die adulten Tiere der B2-Gruppe hatten im Vergleich zum Referenzkollektiv A1 signifikant verringerte BV/TV, BMD und Tb.N sowie signifikant höhere Tb.Sp,

Tb.Th und SMI. El Khassawna et al. bestimmten zudem den Mineralisierungsprozess über den Regulator Opn, welcher von den Osteoblasten vor der Mineralablagerung sezerniert wurde. Die signifikant angestiegenen Opn-Spiegel in der OVXD-Gruppe ließen auf einen Syntheseanstieg von extrazellulärem Matrixprotein durch unreife Osteoblasten schließen. Das Vorhandensein von Osteoid bei demselben Kollektiv und das Fehlen von Osteoid bei der Sham-Gruppe legten die Akkumulation von nicht mineralisierter Knochenmatrix nahe. In Zusammenschau mit den erhöhten BGP- sowie PTH-Werten deuteten die Veränderungen diagnostisch auf eine Osteomalazie hin [131]. Das Versuchsvorhaben zielte jedoch auf ein Osteoporosemodell ab und somit waren weitere Forschungsansätze an der Ratte notwendig.

In einer späteren Veröffentlichung publizierten El Khassawna et al. Ergebnisse eines SD-Rattenmodells, bei dem wiederum ein Vergleich zwischen scheinoperierten sowie bilateral ovariektomierten und eine Multidefizienzdiät erhaltenden Tieren (Eingriffsalter etwa 3 Monate) stattfand. In diesem Studiendesign wurden Beobachtungen an Th 10-Wirbelkörpern nach einer Standzeit von 12 und 14 Monaten erhoben. Hierbei wiesen die ehemals unreifen, juvenilen Nagetiere eine signifikante Reduktion der BV/TV und Tb.N sowie eine signifikante Zunahme der Tb.Sp sowie des SMI nach 12-monatiger Intervention im Vergleich zur Sham-Gruppe auf [130]. Wir detektierten am adulten Tier (Untersuchungskollektiv B2; Th 9-Wirbelkörper) nach 3 Monaten Standzeit ähnliche Messergebnisse. Vergleichend zum Referenzkollektiv fielen unsere Messergebnisse etwas weniger signifikant aus. Ein Grund könnte die kürzere Studiendauer von 3 Monaten gewesen sein. Hierbei ließen sich morphologische Knochenveränderungen wie in anderen Osteoporosetiermodellen [135, 154, 175, 177] sowie eine signifikant reduzierte Mineralsalzdichte nachweisen. Die stärkste Ausprägung lag regional in den Wirbelkörpern vor. Diese Beobachtungen lassen spekulieren, dass der Knochenverlust nicht nur von der Behandlungsdauer abhängt, sondern auch zwischen verschiedenen Skelettstellen ein unterschiedliches Ausmaß hat. El Khassawna et al. beschrieben einen Peak der BV/TV bei den korrespondierenden Sham-Tieren im Alter von ca. 15 Monaten [130]. D.h. innerhalb des Jahres kam es zu einem weiteren Knochenwachstum des juvenilen Kollektivs bzw. Erreichen der „Peak-Bone-Mass“. Dieses Phänomen wurde in der vorliegenden Arbeit durch adulte SD-Ratten für einen senilen Knochenstatus vermieden. Entsprechend beobachtete man einen kontinuierlichen Abwärtstrend der BV/TV bei den scheinoperierten Gruppen. In den Wirbelkörpern des A2-Kollektivs wurden Veränderungen der Mikroarchitektur detektiert, die für einen Knochenschwund sprachen. Neben einer fast signifikanten Reduktion der BV/TV, BMD und Tb.N lag hier eine Abnahme des mittleren Trabekeldurchmessers vor. Entsprechend stiegen der

dimensionslose SMI auf 0,226 und die Tb.Sp auf einen Mittelwert von 276  $\mu\text{m}$  an. Nach Hildebrand und Rüegsegger dominierten noch platte Strukturen das Spongiosagerüst, wobei ein Umbau zu einem Stabmodell stattfand [107]. Auf histologischer Ebene mittels Masson-Goldner-Trichrom-Färbung belegten Daghma et al. den Verlust von Trabekeln sowie deren Ausdünnung im Wirbelkörper [178].

El Khassawna et al. untersuchten am obigen Rattenmodell die RANKL-Konzentration im Serum, um Auswirkungen des Östrogenmangels zu beobachten. Im Vergleich zur Sham-Gruppe zeigte sich eine stets signifikante Erhöhung des Proteins [130]. Damit ist der experimentelle Goldstandard der OVX bestätigt [69, 71, 86, 87]. RANKL fördert wiederum die Osteoklastengenesse [21-23, 179], was sich methodisch durch eine höhere TRAP-positive Trabekeloberfläche bei den OVX-Diät-Tieren widerspiegelte [130]. Hinzu zeigten Govindarajan et al. eine signifikante Zunahme der Osteoblasten pro Trabekelfläche in der analysierten proximalen Tibia des gleichen Kleintiermodells [179]. In Zusammenschau dessen wurde eine Imitation der postmenopausalen Osteoporose am Vorläufermodell erreicht, da pathophysiologisch eine synchrone Aktivitätszunahme der Osteoblasten vorlag und es dadurch zu einem ossären „high turnover“ führte. Neben den typischen Auswirkungen auf die Mikroarchitektur und zelluläre Matrix lagen biomechanische Eigenschaften einer Osteoporose vor [179]. Zudem wurde durch die Multidefizienzdiät ein sekundärer Hyperparathyreoidismus ausgelöst, was zusätzlich eine verstärkte Knochenresorption und „Remodeling“ mit konsekutivem Knochenverlust induzierte [55, 179].

Bislang beschrieben Studien mit alleiniger OVX keine Serumspiegelveränderung des PTH. Folglich konnte die Calcium- und Vit-D-arme Ernährung in den beschriebenen Rattenmodellen die Ursache gewesen sein [179]. Die Arbeitsgruppe um Gao et al. bestätigten den Einfluss einer calciumarmen Diät auf juvenile OVX-SD-Ratten. Im Vergleich zum Sham- bzw. OVX-Kollektiv wurden eine signifikante Abnahme der BMD, Tb.Th, Tb.N und eine Zunahme der Tb.Sp in den proximalen Femora zwölf Wochen nach dem Eingriff festgestellt. Die Forschungsgruppe suggerierte bis zu 50 % Zeiterparnis durch die kombinierte Osteoporoseinduktion [87]. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen fand sich nach Govindarajan et al. sowie Gao et al. das Ausmaß der Osteoporoseinduktion betont in den langen Röhrenknochen und nicht vertebral [87, 179].

Um die Auswirkungen einer Steroidtherapie am postmenopausalen Tier zu erforschen, untersuchten Ren et al. 62 SD-Ratten (3 Monate alt), welche in 5 Gruppen unterteilt wurden (Kontrolle, Sham, Steroid, OVX und OVX-Steroid). Nach drei Monaten wurden mittels DXA und Mikro-CT Standardparameter zur Analyse der L4-Wirbelkörper wie die

BMD, BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp oder SMI erhoben. Sie zeigten, dass eine Ovariectomie in Kombination mit Steroiden einen schwereren Knochenverlust an der Ratte als die Ovariectomie oder Steroide allein hervorrief [180]. Dieser Effekt konnte auf eine Kombination von unterdrückter Knochenbildung und erhöhter Knochenresorption im Zusammenhang mit einem Östradioldefizit zurückzuführen sein [155, 180, 181]. Zhang et al. belegten den Glukokortikoideffekt. Zudem merkten sie an, dass bei anderen Tierarten – wie Schaf oder Kaninchen – die alleinige OVX für eine suffiziente Osteoporoseentwicklung nicht ausreichte [135].

Zusammengefasst spielen im Studienprotokoll der post-OVX-Zeitraum bis zur Analyse der Knochenproben, die Größe sowie Lokalisation des VOI und das Rattenalter eine zentrale Rolle, da hierdurch eine potentielle Datenvariabilität generiert wird [135, 175]. In vielen Publikationen bleibt die Frage offen, inwieweit die ossäre Mikroarchitektur zerstört sein muss, um einem humanen Analogon zu entsprechen und präklinische Tests von Knochenersatz- bzw. Osteosynthesematerialien am Tier durchführen zu können. Nach Sakata et al. ist jedoch belegt, dass die vertebrale Frakturheilung im Rahmen der tierexperimentellen Osteoporose durch bilaterale Ovariectomie negativ beeinflusst wird [182].

### **Adultes Großtiermodell „Schaf“**

Die ausgewachsenen Schafe eigneten sich für das Versuchsvorhaben. Ihre Ähnlichkeit der strukturellen sowie mechanischen Eigenschaft zum gesunden Menschenknochen bestätigten sich durch die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit. Im Vergleich der drei Femurregionen (Caput und Collum femoris sowie Trochanter major) des ovinen Kontrollkollektivs ergaben sich signifikante Unterschiede. Zwischen der Kopf- und Trochanterregion fielen alle Parameter der Trabekelmorphometrie (BV/TV, Tb.Th., Tb.N, Tb.Sp, SMI) sowie die BMD signifikant unterschiedlich aus, was für eine mehr vernetzte und damit auch dichtere Spongiosa im Femurkopf sprach. Hingegen lag im Trochanter major ein Spongiosaaufbau mit überwiegend stabförmigen Trabekeln vor. Diese architektonischen Besonderheiten der ossären Mikrostruktur des proximalen Femurs bestätigten Osborne et al.: In den ersten fünfzehn Lebensjahren des Menschen bilden sich fünf unterschiedliche Trabekelgruppen aus. Sie differenzierten: mediale und laterale Hauptspongiosa, mediale und laterale Sekundärtrabekel sowie die einfache Spongiosa der Trochantergruppe [183]. Die zusätzlichen signifikanten Unterschiede zwischen der Hals- und Trochanter-VOI (BV/TV, BMD, Tb.Th und SMI) belegten Osborne et al.'s Erkenntnis, dass im Oberschenkelhals mehr Trabekelarten als in der Trochanterregion verlaufen. Diese spezifische Trabekelstrukturanordnung bedingt mechanisch

stabile sowie aber auch instabile Regionen (z.B. Ward'sche Dreieck) im gesunden Knochen [184]. Stiehl et al. beschrieben die Trabekelarchitektur im Trochanter als wenig konsistent [185]. Es dominieren die zwei fächerförmig auseinandergehenden Hauptgruppen im Femurkopf, welche eine dichte sowie vernetzte Spongiosa ausmachen – die primären Druckstreben. Morphologisch strahlen sie pilzförmig zur Gelenkfläche des Femurkopfes aus [185].

Für ein erhöhtes Frakturrisiko ist neben der Hüftgeometrie (längere Hüftachse, größerer Halsschaftwinkel sowie Schenkelhalsdurchmesser) [186, 187] die Knochenmineralisierung (BMD) entscheidend [187]. Die signifikant erniedrigte BMD des Femurhalses und Trochanter majors spiegelte die erhöhte Auftretenswahrscheinlichkeit von Frakturen lokoregionär wider. Zudem stand das gesamte Trabekelgerüst (Druck- und Zugtrabekel [185]) unter genetischen, hormonellen und ernährungsbedingten Einflussfaktoren und war durch Krankheiten beeinflusst [183]. Stiehl et al. beschrieben einen zunehmenden Verlust der trabekulären Zugknochen im Ward-Dreieck mit zunehmender Osteoporose beim Menschen [185].

Die Forschungsgruppe um Zarrinkalam et al. hatte als Ziel, ein Knochenverlustmodell an ausgewachsenen Schafen (3 Jahre) mit osteoporosetypischen Merkmalen des Menschen zu etablieren. Hierbei wurde die Dreifachintervention der zugrundeliegenden Arbeit aus OVX, Diät und intramuskulärer Steroidinjektion (wöchentlich 54 mg Dexamethason + 1,5 ml Dexamethason-Natriumphosphat) angewandt. Sie fokussierten eine relativ kurze Standzeit (6 Monate), um die unerwünschten Arzneimittelwirkungen einer chronischen Steroidbehandlung zu minimieren. Für eine Werte-Baseline wurden direkt zwei Schafe euthanasiert. Nach 3 und 6 Monaten analysierten sie jeweils 5 behandelte Schafe und verglichen das behandelte Kollektiv zu 2 Sham-Tieren. Nach einem halben Jahr zeigten die proximalen Femora histomorphometrisch eine signifikante Abnahme ( $p < 0,01$ ) der BV/TV im Vergleich zur Sham-Gruppe. Tb.Th, Tb.Sp und Tb.N waren nicht signifikant verschieden. Die per DXA ermittelte BMD der Femora ergab unter Berücksichtigung der saisonalen Schwankungen stets signifikant verringerte Werte (Reduktion von 13,9 bzw. 29,1 % gegenüber der Baseline;  $p < 0,05$ ) in der Interventionsgruppe. Die lumbale BMD fiel weniger signifikant als femoral aus. Zudem lag eine signifikante Femurschaftausdünnung von 27 bzw. 30 % ( $p < 0,01$ ; im Vergleich zur Baseline 0 Monate) vor [134]. Basierend auf diesen Ergebnissen war der Einfluss der Behandlung am proximalen Femur stärker ausgeprägt als an der Lendenwirbelsäule. Diesen ortsspezifischen Effekt belegen vorherige Publikationen [144]. Auch Kielbowicz et al. konnten an der gleichen Tierrasse (Merinoschaf) den Einfluss der OVX und Steroidinjektion auf die Knochenarchitektur im Femurkopf belegen [188].

Klinische Studien zeigen, dass die Knochenbrüchigkeit mit einer Abnahme der BMD korreliert. Zarrinkalam et al. unterstützten diese Aussage anhand ihrer Ergebnisse und der analysierten biomechanischen Eigenschaft [134]. Dennoch beschrieben Pearce et al. einen wesentlichen Unterschied der Knochendichte zwischen Menschen und Schaf. Die Schafknochen wiesen eine 3- bis 4-mal höhere Dichte und damit eine höhere Festigkeit auf [136]. Haffner-Luntzer et al. sahen darin eine Schwierigkeit in der Umsetzung von Forschungsergebnissen in die klinische Praxis, insbesondere in Bezug auf Implantattests [189].

Im Rahmen der Qualitätssicherung des Schafmodells analysierten wir die unterschiedlichen Regionen des proximalen Femurs, um die in der Literatur beschriebene Frakturhäufigkeit von an Osteoporose erkrankten Menschen im Oberschenkelhals und etwas weniger häufig im Trochanter major [190] zu überprüfen. Das OVXDS-Kollektiv zeigte in der Region des Collum femoris eine signifikante Abnahme der Knochenmineralisierung im Vergleich zu den Kontrolltieren ( $p = 0,0025$ ). Korrespondierend reduzierte sich die BV/TV mit zunehmender Interventionsstufe. Zugleich fand eine signifikante Ausdünnung der Trabekel ( $p = 0,016$ ) sowie ein architektonischer Umbau von platten zu stabförmigen Knochenbälkchen statt (signifikante Zunahme des SMI  $p < 0,006$ ). Die daraus resultierende mechanische Belastbarkeit des Knochens wird an laufenden Studien mittels Frakturtests ermittelt. Im Vergleich zwischen der Kontroll- und Dreifachinterventionsgruppe nahm die trochantäre BMD etwas weniger signifikant als im Collum femoris ab ( $p < 0,006$ ). Insgesamt fiel die Mineralisierung hier niedriger aus. Hingegen war im Caput femoris ein Abwärtstrend der BV/TV, BMD und Tb.Th sowie ein geringer SMI-Anstieg zu erkennen. Im Vergleich zum Menschen konnten Nicks et al. die Femurkopffrakturen entsprechend selten zählen [191].

Die Behandlung von Ratten mit Glukokortikoiden führt zu einer Knochenresorption im Endostalenbereich [134]. Derselbe Effekt könnte für die beobachtete Wirkung im Oberschenkelschaft der behandelten Schafe Grund sein. Die mittlere Ct.Th nahm von 2,23 (Kontrolltiere) auf 2,07 mm (OVXDS-Tiere) ab. Parallel verringerte sich die TMD kontinuierlich bis zu einer signifikanten Reduktion im OVXDS-Kollektiv ( $p = 0,009$ ). Zarrinkalam et al. beschrieben einen vergleichbaren Unterschied der kortikalen Femurschaftausdünnung [134]. Konsekutiv wuchs der Markraumdiameter des Femurschafts [134] und Frakturen werden begünstigt. Laut Stiehl et al. gleicht sich der Verlust der Knochenfestigkeit (TMD) durch die geometrische Vergrößerung aus [185]. Dennoch betonten Ding et al., dass die Kombination aus OVX, Mangelernährung und Glukokortikoidtherapie einen stärkeren Effekt auf die Spongiosa als auf den kortikalen Knochen hat [85].

Basierend auf einer Pilotstudie [68] kam die nachfolgende Schafstudie von Lill et al. den Kriterien für ein Osteoporosemodell zur Frakturbehandlung hinsichtlich mechanischer und morphometrischer Knocheneigenschaften nah. Sie rekrutierten 32 feminine Schweizer Bergschafe und teilten sie entsprechend der Zugehörigkeit ihres Alters gleichmäßig auf (ca. 4 Jahre alte Kontroll- gegenüber etwa 8 Jahre alten Interventions-tiere). Das ältere Kollektiv wurde ovariektomiert, einer Vit-D und calciumarmen Diät sowie periodischen, intramuskulären Methylprednisoloninjektion (Woche 1 bis 14 jeweils 120 mg, ab Woche 15 200 mg/ wöchentlich) ausgesetzt. Nach 7 Monaten ergab sich eine signifikant reduzierte BMD der LWK 4 ( $p < 0,01$ ) bzw. des distalen Radius ( $p < 0,001$ ) gegenüber der Kontrollgruppe. Die Mikro-CT-Auswertung der Femurköpfe zeigte im Vergleich zwischen der Kontroll- und OVXDS-Gruppe eine signifikant ( $p < 0,05$ ) verringerte BV/TV, signifikant ( $p < 0,05$ ) dünnere Trabekel (Tb.Th) sowie eine verbreiterte intertrabekuläre Distanz und nahezu konstante Trabekelanzahl. Die LWK 4-Quantifizierung ergab einen signifikanten Knochenverlust [144]. Wir beobachteten im Caput femoris einen nicht signifikanten Abwärtstrend der BV/TV, BMD und Tb.Th von den Kontroll- zu den höchst behandelten Tieren. Die SMI-Ratio stieg nicht signifikant an. Allerdings fielen die Effekte auf den Femurhals und Trochanter major signifikant aus. Diese Diskrepanz könnte entweder auf der abweichenden Steroiddosis, auf der anderen Schafrasse, auf dem durchschnittlich jüngeren Tieralter oder auf der abweichenden Gruppengröße (16 versus 7 Schafe) basieren. Das Alter der Schweizer Bergschafe stützte sich auf den WHO-Kriterien sowie der klinischen Situation: eine Kontrollgruppe für junge Erwachsene (Alter 3–5 Jahre) mit dem notwendigen Peak-Bone-Mass und repräsentativ eine ältere Schafpopulation (Alter 7–9 Jahre) für die osteoporotische Gruppe [144]. Allerdings appellierten Pearce et al., das Alter der Schafe innerhalb einer Studie konstant zu halten. Altersunterschiede können den Vergleich zwischen den Studien erschweren, denn auch die Schafe weisen einen variablen Knochenaufbau während ihres Lebens auf [136].

Lill et al. vermuteten bei den Femurkopfbiospien einen geringeren Einfluss der Tb.N auf die mechanische Versagenslast und Steifheit [144], passend zu unseren nicht signifikanten Ergebnissen der Tb.N aller drei Femurregionen. Lill et al. resümierten, dass der osteoporose-ähnliche Knochenstatus an den untersuchten Großtieren geglückt war. Die menschliche Osteoporose ist als eine BMD-Reduktion von mehr als 2,5 Standardabweichungen (ungefähr 25%) definiert [60, 146]. Sie erreichten eine Senkung der BMD um ca. 40%. Zudem sprach die Knochenarchitekturveränderungen dafür [144].

Summa summarum bestätigte sich die Suszeptibilität des ovinen Großtiermodells für die Entwicklung des Knochenschwundes. In gewissem Maße könnte es für die Erpro-

bung neuer chirurgischer Strategien zur Behandlung von Knochenbrüchen nutzen. Es stellte sich die Frage, ob die Auswirkungen der Osteoporoseinduktion auf zellulärer Ebene mittels NCT detektierbar wäre und den bisherigen Forschungsstand belegten?

Die Knochenmatrix des beschriebene murinen Kleintiermodells zur Erforschung der Osteoporose zeigte ein ausgewogenes Kollagennetzwerk und ein häufigeres Auftreten von Osteozyten beim Sham- im Vergleich zum OVX-Kollektiv. Bei den ovariectomierten Nagern war knapp die Hälfte aller Osteozytenlakunen in der nicht-mineralisierten Matrix der vertebrealen Spongiosa gelegen. Sie wurden von einem mineralisierten Saum umgeben [178]. Morphologisch wiesen die Arbeitsgruppe um Daghma et al. eine regelrechte Anordnung spindelförmiger Osteozyten in der Sham-Gruppe nach. Hingegen lagen kugelförmige Zelllakunen bei den OVX-Tieren aufgelöst vor [178]. El Khassawna et al. bestätigten den Umbau des Netzwerks der Zelllakunen an bilateral ovariectomierten und diätetisch behandelten SD-Ratten. Hierfür untersuchten sie die Th 10-Wirbelkörper mikroskopisch nach Rhodamin-Färbung [130].

In diesem Zusammenhang fanden unsere Untersuchungen auf zellulärer Ebene mittels NCT statt, um nach mikroskopischer Probenaufarbeitung Veränderungen der Osteozyten bzw. der mineralisierten Trabekelmatrix des Schafmodells darzustellen. Ebenso bestärkte uns die Behauptung von Hesse et al., dass die Synchrotron-Mikro-CT ein geeignetes Instrument zur Beurteilung der 3D-Morphologie der Osteozytenlakunen und der Knochenmatrixdichte sei. Sie verwendeten die Technik, um im Submikrometerbereich die Graustufenverteilung und die Zelllakunen von menschlichen Knochenproben aus Kiefer, Femur und Tibia morphologisch zu untersuchen. Bei einer Ortsauflösung von 350 nm isotroper Voxelkantenlänge wurden signifikante Unterschiede der lakunären Volumenverteilung (Kiefer 277  $\mu\text{m}^3$ , Femur 224  $\mu\text{m}^3$ , Tibia 194  $\mu\text{m}^3$ ) in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation gezeigt. Im Vergleich eines mit Bisphosphonaten therapierten Osteoporose- zu einem Kontrollkollektiv konnte eine signifikante Abnahme der lakunären Mineraleichte gemessen werden [192].

Im Rahmen unserer Arbeit konnten computertomographisch ebenso strukturelle Veränderungen in Bezug auf das mittlere Osteozytenvolumen der ovinen LWK 2-Trabekel nachgewiesen werden. Innerhalb der OVXDS-Gruppe waren die zentralen im Vergleich zu den peripheren Zelllakunen signifikant kleiner (72,6 vs. 140,2  $\mu\text{m}^3$ ,  $p < 0,0186$ ). Nach Hesse et al. könnte die unterschiedliche mechanische Beanspruchung und zelluläre Remodeling-Rate dafür verantwortlich sein [192]. Zudem ist die Verteilung der Osteozyten nicht nur für die mechanische Signalerfassung in der Knochenmatrix entscheidend, sondern auch für den einfachen Zugang zum Mineralspeicher [177, 193].

Die Durchschnittsvolumina der Osteozyten der Merino-Landschafe lagen bei einem Wertebereich von ca. 148 bis 185  $\mu\text{m}^3$  und damit sogar in der humanen Norm (100 – 400  $\mu\text{m}^3$ ) [192]. Folglich wurde Pierce et al. Beobachtung, dass das Schaf in Gewicht und Knochengröße der humanen Knochenstruktur sehr nahekommt, gestützt [136]. Im weiteren Kollektiv- und/oder ortsspezifischen Vergleich ergaben die Graustufenverteilungen, deren Ratio oder die mittlere Zelllakunenanzahl keine weiteren signifikanten Unterschiede. Den fundierten Mineralaustausch durch Diffusion aus dem lakunokanalikulären Netzwerk (LCN) in die Knochenmatrix [168] konnte unsere Methodik nicht belegen, womöglich basierend auf der geringen Größe der dendritischen Kanäle von ca. 100-550 nm [156, 177].

Zarrinkalam et al. berichteten von signifikant weniger Zelllakunen ( $p < 0,01$ ) in lumbalen Knochenproben am osteoporotischen Großtiermodell. Die Arbeitsgruppe untersuchte den Erfolg einer 6-monatigen multiparametrischen Osteoporoseinduktion (OVX, calciumdefizitäre 0,2% Diät und intramuskulärer Dexamethasoninjektion von 54 mg/kg wöchentlich) an 10 ausgewachsenen Merino-Landschafen (3 Jahre). Lichtmikroskopisch wurde die Osteozytenanzahl pro Trabekelfläche anhand von Gewebeproben der Lendenwirbelsäule erfasst. Hierbei betrug die mittlere Lakunenanzahl pro Trabekelfläche ( $1/\text{mm}^2$ ) beim Kontrolltier ca. 330/ $\text{mm}^2$  und beim OVXDS-Schaf etwa 260/ $\text{mm}^2$ . Zudem wurden histologisch signifikante Unterschiede der BV/TV, Tb.Th, Tb.N sowie Tb.Sp beim OVXDS-Kollektiv nachgewiesen, was einen an Osteoporose erkrankten Knochen belegte. Die Apoptose der Osteozyten wäre zum Einen auf die Glukokortikoidtherapie, den Hormonmangel sowie die Immobilisierung und zum Anderen auf eine Mikrorissbildung in der kanalikulären Zone zurückzuführen [73]. Wir stellten eine nicht signifikante, tendenzielle Abnahme der Lakunenanzahl (Kontroll- bzw. OVXDS-Gruppe im Mittel  $2,3 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^3$  bzw.  $1,97 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^3$  Osteozytenlakunen) fest.

Wäre somit die Methode der Elektronen- oder Lichtmikroskopie zur Analyse der Knochenmatrix besser geeignet? Die meisten dieser Techniken erzeugen nur zweidimensionale Bilder. Dadurch ist ein vollständiges Verständnis des komplexen Netzwerks nur schwer zu erhalten. Denn das LCN sollte mit einer 3D-Bildgebungsmodalität bzw. ausreichend hohen räumliche Auflösung untersucht werden [156]. Auch im technischen Vergleich von Labor- und Synchrotron-CT glänzte Letztere durch eine bessere Kontrastauflösung sowie geringere Strahlenaufhärtung im Nanobereich [170]. Hierdurch würden kleinere Unterschiede der Zellmorphologie und die Gewebemineralisierung detektiert. Folglich wäre eine detailgetreue Segmentierung des LCNs mittels Synchrotron-NCT möglich und bei hoher Auflösung eine durchschnittliche Anzahl von etwa 41 Kanälchen pro Osteozyten sogar automatisch quantifizierbar [194]. Allenfalls belegten

Kampschulte et al. und Khoury et al. den Einsatz der NCT zur Detektion und morphologischen Darstellung der Osteozytenlakunen sowie trabekulären Gefäßkanäle. Somit ermöglichte das NCT-Verfahren die 3D-Visualisierung der spongiösen Mikroarchitektur im Submikrometerbereich [101, 152].

#### **6.4 Einschränkungen**

In Publikationen über osteoporotische Kleintiermodelle wandte man bis vor kurzem fast ausschließlich das Querschnittstudiendesign an. In diesen Studien wurden die ovariectomierten oder medizinisch behandelten Versuchstiere zu verschiedenen Zeitpunkten gruppiert euthanasiert, um die Quantifizierung der Mikroarchitektur in vitro mittels Histologie oder Mikro-CT durchführen zu können. Neuere Entwicklungen in der Mikro-CT-Technologie ermöglichen die kompakte Durchführung von Längsschnittstudien mittels moderner In-vivo-Systeme. Die methodischen Vorteile für Längsschnittstudien sind eine geringere Tieranzahl, da jedes Tier als eigene Kontrolle fungiert und insofern die gruppeninterne Variabilität reduziert. Zudem werden die Kosten für Einstallung, Pflege und Futter gesenkt [133]. Boyd et al. zeigten, dass Knochenveränderungen im Rahmen eines Längsschnittansatzes früher detektierbar waren. Sie hatten die Messdaten des verwendeten In-vivo-Studiendesigns an ovariectomierten und scheinoperierten Ratten erneut statistisch als Querschnittsansatz (ohne Messwiederholungen) analysiert. Hierbei ergab die In-vivo-Analyse signifikante Veränderungen bei den Sham-Tieren, die durch die zweite In-vitro-Analyse nicht nachgewiesen wurden. Zudem wurden die morphologischen Knochenveränderungen des OVX-Kollektives früher festgestellt [132].

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen trotz gewisser Einschränkungen den Nutzen bzw. die Reproduzierbarkeit des osteoporotischen Großtiermodells. Vergleichend zum Kleintiermodell gab es beim Großtiermodell aus Tierschutzgründen keine scheinoperierten Schafe. Ein Sham-Kollektiv wurde aufgrund der zu hohen Versuchstieranzahl für den Tierversuch nicht genehmigt. Zudem sollte man beachten, dass der Mensch im Gegensatz zum Schaf sowie auch zur Ratte ein Biped ist. Nach Turner et al. könnte der Verlust von Östrogen bei Quadrupeden eine andere Auswirkung auf die Knochenmasse haben. Sie wird nicht nur hormonell, sondern auch durch biomechanische Kräfte reguliert [195].

In der Vergangenheit wurden nach Hesse et al. hauptsächlich die konfokale Mikroskopie zur 3D-Darstellung des LCNs verwendet, welche jedoch eine begrenzte Auflösung

von 300 nm bei einer Eindringtiefe von 60 µm hat [168]. Als Alternative etablierte sich die CT im Submikrometerbereich und ermöglicht die Visualisierung von Osteozytenlakunen [101]. Derzeit ist jedoch die hochauflösende Synchrotron-Nano-CT unter Phasenkontrast führend und generiert detailgetreue Bildgebung bei einer isotropen Voxelgröße von bis zu 60 nm. Hinzu ist die Phasenbildgebung im Vergleich zur konventionellen Abschwächungstomografie um mehrere Dimensionen empfindlicher gegenüber Massendichteänderungen [168]. Technisch relevant für die hochauflösende CT ist die adaptierbare Fokus-Objekt-Distanz (FOD), d.h. geometrische Vergrößerung. Hierbei können durch die Überschreitung des Messfeldes Bildartefakte auftreten. Als Folge werden die Grauwerte an den Bildgrenzen fehlkalibriert. Um dem zu entgehen, ist die Probenpräparation im Submillimeterbereich unabdingbar. Nur welche Präparatgröße wäre repräsentativ für das jeweilige Gewebe? Um diese Limitation zu beherrschen, wurden die Detektorgrößenoptimierung, der Offset-Scan (horizontale Detektorverschiebung zur Detektorvergrößerung) sowie der Einsatz von explorativen Rekonstruktionsalgorithmen diskutiert [196-198]. Für die kryostatische Untersuchung kleinerer Objekte gilt zu beachten, dass klein- im Vergleich zu großvolumigen Präparaten ein schlechteres Volumen-Oberflächen-Verhältnis und dadurch eine geringere Wärme-/Kältespeicherkapazität besitzen. Der frühzeitige Auftauvorgang führt zu Bildverzerrung und Bewegungsartefakten [110].

## 6.5 Fazit und Ausblick

In dieser Forschungsarbeit sollten die Auswirkungen auf den Knochenstatus durch die multiparametrische Osteoporoseinduktion am Klein- und Großtiermodell qualitativ sowie quantitativ evaluiert werden. Der Fokus lag auf der nicht-destruierenden computer-tomographischen Analyse der veränderten Knochenmikroarchitektur.

Zusammengefasst müssen die anfänglich formulierten Nullhypothesen allesamt verworfen werden. Denn

1. das murine Kleintiermodell wies ossäre Veränderungen in Bezug auf die Referenzgruppe auf.
2. das Kleintiermodell an seneszenten Ratten zeigte vergleichend zum vorläufigen Osteoporosemodell an juvenilen Ratten ossäre Veränderungen auf.
3. das ovine Großtiermodell wies ossäre Veränderungen in Bezug zum Kontrollkollektiv auf.

Im Unterschied zu den korrespondierenden juvenilen Ratten des vergleichbaren vorläufigen Rattenmodells wiesen die adulten Kleintiere deutlichere Knochenstrukturveränderungen (siehe femorale Diaphysenausdünnung; proximale Tibia) auf. Quantitativ zeigten die analysierten Th 9-Wirbelkörper gegenüber den Wirbelkörpern der juvenilen, ovariectomierten und mit Glukokortikoiden behandelten Ratten des Vorläufermodells eine geringere Knochenmasse sowie stärkere Veränderung der Mikroarchitektur. Diese Ergebnisse lassen auf einen suszeptiblen Knochenumbau im Rahmen der Osteoporoseinduktion mittels OVX und defizitärer Diät an der Ratte schließen. In Zusammenschau führt die in der vorliegenden Arbeit gewählte Methodik zu einem seneszenten Rattenmodell. In weiteren Untersuchungen sollte der Knochenmetabolismus auf hormoneller und zellulärer Ebene betrachtet werden, um den Knochenstatus von einer Osteomalazie abgrenzen zu können. Neben der metabolischen Osteoporoseinduktion könnte man als potentielle Alternative die Entwicklung eines genetisches Kleintiermodells, speziell mit Hilfe von Knock-out-Ratten, mit phänotypischer Osteoporose diskutieren. Vorausgesetzt wäre ein gewisses Maß an Knowhow um zusätzliche Erkenntnisse über die Pathogenese der Osteoporose zu erlangen. Der Nutzen eines solchen Tiermodells wäre das Wegfallen multipler Faktoren wie das Narkose- und Operationsrisiko, Pharmazeutika bzw. Immunsuppressiva (Glukokortikoide) sowie die Multidefizienzdiät. Aufgrund der differenten Osteoporoseformen müssten möglicherweise unterschiedliche Knock-out-Modelle etabliert werden.

Das Schafmodell baute auf den bekannten Osteoporosemodellen am Kleintier mittels Kombinationsinduktion durch OVX, Multidefizienzdiät und Glukokortikoiden auf. Die quantitative Auswertung stellte osteoporose-ähnliche Knochenveränderungen in der OVX-Diät-Steroid-Gruppe dar, was ebenso auf einen suszeptiblen Knochenumbau schließen lässt. Vergleichend zum Kleintiermodell erzielte das Kombinationsschema aus OVX und Diät am Großtier Schaf einen geringeren Effekt. Man sollte berücksichtigen, dass ein differenter Knochenmetabolismus vorlag und eine längere Standzeit dieses Tierkollektivs gegebenenfalls zu einem ähnlichen ossären Status führen könnte. Im Submikrometerbereich konnte der Steroideffekt, eine signifikante Osteozytenapoptose, mittels einer signifikanten Reduktion der mittleren Lakunenanzahl nicht detektiert werden. Dennoch fiel das Durchschnittsvolumen der peripheren Osteozytenlakunen (etwa  $140,2 \mu\text{m}^3$ ) signifikant größer im Vergleich zur zentralen Trabekelzone aus. Im Rahmen der Osteoporoseinduktion mittels Methylprednisolongabe sollten die zahlreichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen beachtet und die Mengen an Glukokortikoiden für präklinischen Studien überarbeitet werden.

Insbesondere die Gruppe B2 des Klein- sowie die Dreifachinterventionsgruppe des Großtiermodells eignen sich zur weiteren Erforschung der Osteoporosetherapie bzw. Entwicklung sowie Testung neuer Bio- und Osteosynthesematerialien. Zudem legen die beschriebenen Tierstudien eine Basis für Metaanalysen und damit z.B. die Grundlage zur Erforschung einer Baseline der BMD für das Großtier Schaf. Dementsprechend bedarf die systemische Skeletterkrankung Osteoporose auch weiterhin präklinische Forschungsansätze, um zukünftig ein optimales Regime in der Therapie, aber auch Prophylaxe zu führen.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT

### 7.1 Deutsch

Die Volkskrankheit Osteoporose ist ein globales Gesundheitsproblem. Vermehrte Krankenhausaufenthalte aufgrund osteoporotischer Frakturen und dadurch zunehmende Kosten begründen den relevanten Forschungsbedarf an der Osteoporose. Das Ziel der vorliegenden Studien war die Evaluierung seneszenten Grundlagenmodelle (murines Klein-; ovines Großtiermodell) nach multiparametrischer Osteoporoseinduktion für die künftige Erforschung der systemischen Skeletterkrankung.

Das Tierkollektiv der 46 adulten femininen Sprague Dawley®-Ratten (Durchschnittsalter von 12 Monaten) unterteilte sich nach mehrmaliger Randomisierung in fünf Subgruppen: (1) Sham-Gruppe, direkt euthanasiert mit 0M (Monaten), (2) Sham-Gruppe 3M (Referenzgruppe), (3) Sham-Diät(D)-Gruppe 3M, (4) Ovariectomierte (OVX) Gruppe 3M und (5) OVXD-Gruppe 3M. Zur Quantifizierung der Knochenmikroarchitektur der kryo-konservierten Femora, Tibiae und Th 9-Wirbelkörper wurden Mikro-CTs (SkyScan 1173, Bruker®, Kontich, Belgium) durchgeführt. Die räumliche Ortsauflösung lag bei 9,96 µm pro Pixelkantenlänge. Die 31 weiblichen Merino-Landschafe (mittleres Lebensalter von 5,5 Jahren) untergliederten sich nach mehrstufiger Randomisierung in vier Gruppen: Kontroll-, OVX-, OVX-Diät- und OVX-Diät-Steroid-Gruppe. Die proximalen Femurproben wurden bei einer Ortsauflösung von 33,07 µm im Mikro-CT kryogescannt. Zudem wurden unter mikroskopischer Sicht einzelne Trabekel aus den in Formaldehyd fixierten LWK 2-Proben präpariert und im NCT (SkyScan 2011, Bruker®, Kontich, Belgium) bei einer isotropen Voxelkantenlänge von 700 nm untersucht. Die digitale Bildverarbeitung der rekonstruierten Rohdatensätze (Rekonstruktionssoftware NRecon®) erfolgte mit Hilfe von den Bildanalyseprogrammen DataViewer® sowie CTAnalyser®. Klassische Parameter wie BV/TV, Tb.N, Tb.Th bzw. Ct.Th, Tb.Sp, SMI sowie für die Knochenmineralisierung BMD bzw. TMD wurden zur Beurteilung der Spongiosa und Kortikalis erhoben. Die zelluläre Analyse der Trabekel basierte auf der Quantifizierung der Graustufenverteilung der Osteozytenlakunen bzw. umliegenden mineralisierten Matrix sowie Durchschnittsvolumen und -anzahl der Osteozyten.

Im quantitativen Vergleich der Spongiosaproben des *adulten Kleintiermodells* zeigte sich sowohl femoral, tibial als auch vertebral eine signifikante Abnahme der BV/TV zwischen der Referenzgruppe und den ovariectomierten Ratten. Korrespondierend verminderte sich die BMD signifikant. Bei den OVX-Gruppen war die Tb.N signifikant reduziert. Zudem zeigten die ovariectomierten Ratten tibial eine signifikante Zunahme

und vertebral eine signifikante Abnahme der Tb.Th. In allen Bereichen nahm die Tb.Sp des OVX- bzw. OVX-Diät-Kollektives signifikant zu. Die wechselnde Spongiosamorphologie von konkav planen zu konvex stabförmigen Strukturen spiegelte der signifikante SMI-Wertanstieg wider. Insgesamt fielen diese Ergebnisse in den Th 9-Wirbelkörpern am deutlichsten aus. Vergleichend zur Referenzgruppe war diaphysennah die mittlere Ct.Th von der OVX-Gruppe signifikant und von der OVX-Diät-Gruppe hoch signifikant verschmälert. Trotz multipler Stressoren fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den seneszenten Sham-Gruppen ohne weitere Intervention. Beim *adulten Großtiermodell* verringerte sich die durchschnittliche BV/TV bei allen Interventionsgruppen von Femurkopf- zu -hals und Trochanter major nicht signifikant. Im Bereich des Femurhalses und Trochanter majors lag ein hoch signifikanter Unterschied der BMD zwischen der K- und OVXDS-Gruppe vor. Vergleichend zur Kontrollgruppe nahm die mittlere Tb.Th der OVXDS-Gruppe im Caput femoris signifikant ab. Ein signifikanter Anstieg des SMIs wurde im Collum femoris zwischen der K- und OVXDS-Gruppe beschrieben. In der Trochanterregion war die Tb.N am geringsten. Femoral lag keine signifikante Abnahme der mittleren Ct.Th zwischen den Interventionsgruppen vor. Hingegen reduzierte sich die TMD signifikant (K- vs. OVXDS-Gruppe). Die NCT-Analyse der Osteozytenlakunen ergab im Submikrometerbereich die geringste durchschnittliche Zellanzahl bei der OVXDS-Gruppe. Hinzu waren die selbigen Osteozyten in der peripheren Zone mit einem Durchschnittsvolumen von  $140 \mu\text{m}^3$  signifikant größer als die Zentralen.

Zusammenfassend ermöglichte die Erhebung dreidimensionaler Volumendatensätze mittels des nicht-destruktiven Verfahrens der Mikro-/ Nano-CT die Quantifizierung und Visualisierung der Knochenmorphometrie/ -densitometrie sowie Zelllakunen. Man stellte einen suszeptiblen Knochenumbau durch die Kombination des Goldstandards der OVX mit einer Multidefizienzdiät und/ oder Glukokortikoidapplikation fest. Somit könnte eine metabolisch reproduzierbare Osteoporoseinduktion angenommen werden. Die beschriebenen Tiermodelle könnten für innovative Forschungsvorhaben zur Frakturheilung, auch kombiniert mit Biomaterialien oder Osteosyntheseimplantaten, genutzt werden.

## 7.2 Englisch

Osteoporosis, a typical widespread disease, is a global health issue. Increased hospitalisations, due to osteoporotic fractures, and related increased in costs justify the relevant need for research in osteoporosis. The aim of the present studies was to evaluate these senescent basic models (murine small-; ovine large animal model), received a multiparametric induction of osteoporosis, for the future research of systemic skeletal disease.

After repeated randomization the animal collective of 46 adult female Sprague Dawley® rats (average age of 12 months) was divided into the following five groups: (1) Sham operated group (directly euthanized at 0M (M=month) (2) Sham operated group 3M (reference group) (3) sham operated combined with multi-deficient diet (D) group 3M (4) ovariectomized (OVX) group 3M and (5) ovariectomized combined with multi-deficient diet group (OVXD) 3M. Micro-CT scans (SkyScan 1173, Bruker®, Kontich, Belgium) were performed to quantify the bone microarchitecture of the cryoconserved femora, tibiae and vertebral bodies Th 9. The spatial resolution measured 9.96 µm isotropic voxel side length. After repeated randomization the 31 female merino landsheep (average age of 5.5 years) were divided into the following four groups: Control- (K), OVX-, OVXD- and OVXD-steroid (OVXDS) group. Spicemens of proximal femur were cryoscanned by a spatial resolution of 33.07 µm isotropic voxel side length. In addition, individual trabeculae of lumbar vertebrae, fixed in formaldehyde, were dissected under microscope, then examined in the Nano-CT-scanner (SkyScan 2011, Bruker®, Kontich, Belgium) with an isotropic voxel side length of 700 nm. Digital image processing of the reconstructed raw data sets (reconstruction software NRecon®) was carried out using image analysis programs (DataViewer® and CTAnalyser®). Typical bone parameters such as BV/TV, Tb.N, Tb.Th, Tb.Sp, SMI, Ct.Th and BMD or TMD were collected to evaluate cancellous bone, cortex and bone mineralization. The cellular analysis of lumbar trabecular bone was based on quantification of the grayscale distribution of the osteocyte lacunae, respectively the mineralized matrix as well as the mean osteocyte volume and number.

Quantitatively, the trabecular bone samples of the adult rat model showed a significant decrease in BV/TV between the reference group and the OVX in femur, tibia and vertebral body. Correspondingly, the BMD decreased significantly. The Tb.N was significantly reduced in the OVX groups. Furthermore, Tb.Th of ovariectomized rats increased significantly in tibia when compared to reference group. In contrast, a signifi-

cant decrease of Tb.Th was vertebral. The Tb.Sp of the OVX or OVX diet collective increased significantly in all regions. The changing of trabecular bone morphology from concave plan to convex rod-shaped structures was reflected by the significant increase of SMI. Altogether, these results were most pronounced in Th 9. In comparison to the reference group, Ct.Th of diaphysis was significantly reduced in the OVX- and high significantly decreased in the OVXD-group. Despite multiple stressors, there were no significant differences between the senescent sham groups without further intervention. In the adult large animal model, the BV/TV didn't significantly decrease in all intervention groups from femoral head to neck and trochanter major. The BMD between K- and OVXDS-group showed a high significant difference in the area of the femoral neck and trochanter. Compared to the control group, the Tb.Th of the OVXDS-group in the caput femoris decreased significantly. A significant increase in SMI was described in the column femoris between the K- and OVXDS-groups. Tb.N was lowest in the trochanter region. Between the intervention groups, there was no significant decrease of the Ct.Th in the femur. In contrast, the TMD was significantly reduced (K vs. OVXDS group). In the submicrometer range the nano-CT analysis of osteocyte lacunae showed the lowest average number of cells in the OVXDS-group. In addition, the same osteocytes of the peripheral zone were significantly larger (mean volume of 140  $\mu\text{m}^3$ ) than the central ones.

In summary, the collection of three-dimensional volume data sets using the non-destructive method of micro-/ nano-CT enabled the quantification and visualization of bone morphometry/ densitometry as well as osteocyte lacunae. Susceptible bone remodeling was detected by combining the goldstandard of OVX with multi-deficient diet and/ or steroid treatment. Thus, a metabolically reproducible induction of osteoporosis could be expected. Both animal models could be used for innovative research projects on fracture healing, also combined with biomaterials or osteosynthesis implants.

## 8 ANHANG

### 8.1 Literaturverzeichnis

1. McClung, M., R. Baron, and M. Bouxsein, *An update on osteoporosis pathogenesis, diagnosis, and treatment*. Bone, 2017. **98**: p. 37.
2. Adams, A.L., et al., *Osteoporosis and Hip Fracture Risk From Routine Computed Tomography Scans: The Fracture, Osteoporosis, and CT Utilization Study (FOCUS)*. J Bone Miner Res, 2018. **33**(7): p. 1291-1301.
3. Haussler, B., et al., *Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study*. Osteoporos Int, 2007. **18**(1): p. 77-84.
4. El Khassawna, T., et al., *Osteocyte Regulation of Receptor Activator of NF-kappaB Ligand/Osteoprotegerin in a Sheep Model of Osteoporosis*. Am J Pathol, 2017. **187**(8): p. 1686-1699.
5. Bleibler, F., et al., *The health burden and costs of incident fractures attributable to osteoporosis from 2010 to 2050 in Germany--a demographic simulation model*. Osteoporos Int, 2013. **24**(3): p. 835-47.
6. Sozen, T., L. Ozisik, and N.C. Basaran, *An overview and management of osteoporosis*. Eur J Rheumatol, 2017. **4**(1): p. 46-56.
7. Benninghoff-Drenckhahn, *Anatomie (Band 1): Benninghoff, Drenckhahn, Anatomie*. Vol. 17. Auflage. 2003. 968 Seiten.
8. (Herausgeber), v.H.E.K.H.-G.L., *Anatomie der Haustiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. Vol. 7. Auflage. November 2018: Thieme.
9. Clarke, B., *Normal bone anatomy and physiology*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3 Suppl 3**: p. S131-9.
10. Gimble, J.M., et al., *Playing with bone and fat*. J Cell Biochem, 2006. **98**(2): p. 251-66.
11. Gonciulea, A. and S.J. de Beur, *The dynamic skeleton*. Rev Endocr Metab Disord, 2015. **16**(2): p. 79-91.
12. KJohn P. Bilezikian, L.G.R., Gideon A. Rodan, *Principles of Bone Biology*. Second Edition ed. Vol. Volume 1. 2002.
13. Price, P.A., J.G. Parthemore, and L.J. Deftos, *New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone GLA protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease*. J Clin Invest, 1980. **66**(5): p. 878-83.

14. Bieglmayer, C., et al., *Biomarkers of bone turnover in diagnosis and therapy of osteoporosis: a consensus advice from an Austrian working group*. Wien Med Wochenschr, 2012. **162**(21-22): p. 464-77.
15. Mackie, E.J., *Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(9): p. 1301-5.
16. Plotkin, L.I., et al., *Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation*. J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 7317-25.
17. Plotkin, L.I., S.C. Manolagas, and T. Bellido, *Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 8648-57.
18. Caetano-Lopes, J., H. Canhao, and J.E. Fonseca, *Osteoblasts and bone formation*. Acta Reumatol Port, 2007. **32**(2): p. 103-10.
19. Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey, *Osteoclast differentiation and activation*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 337-42.
20. Teitelbaum, S.L., Y. Abu-Amer, and F.P. Ross, *Molecular mechanisms of bone resorption*. J Cell Biochem, 1995. **59**(1): p. 1-10.
21. Khosla, S., *Minireview: the OPG/RANKL/RANK system*. Endocrinology, 2001. **142**(12): p. 5050-5.
22. Udagawa, N., et al., *Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function*. Endocrinology, 2000. **141**(9): p. 3478-84.
23. Hofbauer, L.C., et al., *Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells*. Endocrinology, 1999. **140**(9): p. 4367-70.
24. Ross, F.P. and S.L. Teitelbaum, *alphavbeta3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology*. Immunol Rev, 2005. **208**: p. 88-105.
25. Saftig, P., et al., *Functions of cathepsin K in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice*. Adv Exp Med Biol, 2000. **477**: p. 293-303.
26. Ballanti, P., et al., *Tartrate-resistant acid phosphate activity as osteoclastic marker: sensitivity of cytochemical assessment and serum assay in comparison with standardized osteoclast histomorphometry*. Osteoporos Int, 1997. **7**(1): p. 39-43.
27. Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil, I., et al., *Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2006. **11**(2): p. E151-7.

28. Dodds, R.A., et al., *Comparative metabolic enzymatic activity in trabecular as against cortical osteoblasts*. Bone, 1989. **10**(4): p. 251-4.
29. Kobayashi, S., et al., *Trabecular minimodeling in human iliac bone*. Bone, 2003. **32**(2): p. 163-9.
30. Parfitt, A.M., *The coupling of bone formation to bone resorption: a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis*. Metab Bone Dis Relat Res, 1982. **4**(1): p. 1-6.
31. Manolagas, S.C., *Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis*. Endocr Rev, 2000. **21**(2): p. 115-37.
32. Parfitt, A.M., *Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone*. J Cell Biochem, 1994. **55**(3): p. 273-86.
33. Roodman, G.D., *Cell biology of the osteoclast*. Exp Hematol, 1999. **27**(8): p. 1229-41.
34. Reddy, S.V., *Regulatory mechanisms operative in osteoclasts*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2004. **14**(4): p. 255-70.
35. Nandeesh, U.K.a.B.N., *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*. 2012: © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
36. Cohen, M.M., Jr., *The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates*. Am J Med Genet A, 2006. **140**(23): p. 2646-706.
37. e.V., D.O., *Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen gesellschaften e.V.* 2017. **Langfassung - AWMF-Register-Nr.: 183/001**.
38. Group, K.J.o.b.o.t.W.H.O.S., *ASSESSMENT OF OSTEOPOROSIS AT THE PRIMARY HEALTH CARE LEVEL*. 2007. p. 337.
39. WHO Scientific Group on the Prevention and Management of Osteoporosis (2000: Geneva, S., *PREVENTION AND MANAGEMENT OF OSTEOPOROSIS: report of a WHO scientific group.*, ed. W.-. Geneva. 2003.
40. Griffith, J.F. and H.K. Genant, *Bone mass and architecture determination: state of the art*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2008. **22**(5): p. 737-64.
41. Ruff, C.B. and W.C. Hayes, *Sex differences in age-related remodeling of the femur and tibia*. J Orthop Res, 1988. **6**(6): p. 886-96.
42. Brouwers, J.E., et al., *Effects of PTH treatment on tibial bone of ovariectomized rats assessed by in vivo micro-CT*. Osteoporos Int, 2009. **20**(11): p. 1823-35.

43. Jiang, Y., et al., *Recombinant human parathyroid hormone (1-34) [teriparatide] improves both cortical and cancellous bone structure*. *J Bone Miner Res*, 2003. **18**(11): p. 1932-41.
44. Donnelly, E., et al., *Contribution of mineral to bone structural behavior and tissue mechanical properties*. *Calcif Tissue Int*, 2010. **87**(5): p. 450-60.
45. Marie, P.J. and M. Kassem, *Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets*. *Eur J Endocrinol*, 2011. **165**(1): p. 1-10.
46. Itzstein, C., F.P. Coxon, and M.J. Rogers, *The regulation of osteoclast function and bone resorption by small GTPases*. *Small GTPases*, 2011. **2**(3): p. 117-130.
47. Raisz, L.G., *Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(12): p. 3318-25.
48. GUYTON, A.a.H., J., *Textbook of medical physiology*. Chapter 79: Parathyroid Hormone, Calcitonin, Calcium and Phosphate Metabolism, Vitamin D, Bone, and Teeth., ed. Edition. 2010: © Saunders 2011.
49. Grant, F.D., P.R. Conlin, and E.M. Brown, *Rate and concentration dependence of parathyroid hormone dynamics during stepwise changes in serum ionized calcium in normal humans*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990. **71**(2): p. 370-8.
50. Silver, J., R. Kilav, and T. Naveh-Many, *Mechanisms of secondary hyperparathyroidism*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. **283**(3): p. F367-76.
51. DiBartola, S., P., *Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice.*, ed. t. ed. 2005: Saunders/Elsevier, St. Louis, Mo. 720.
52. Datta, N.S. and A.B. Abou-Samra, *PTH and PTHrP signaling in osteoblasts*. *Cell Signal*, 2009. **21**(8): p. 1245-54.
53. Lehmann, B. and M. Meurer, *Vitamin D metabolism*. *Dermatol Ther*, 2010. **23**(1): p. 2-12.
54. Anderson, P.H., et al., *Bone CYP27B1 gene expression is increased with high dietary calcium and in mineralising osteoblasts*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010. **121**(1-2): p. 71-5.
55. Lips, P. and N.M. van Schoor, *The effect of vitamin D on bone and osteoporosis*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2011. **25**(4): p. 585-91.
56. Riggs, B.L., S. Khosla, and L.J. Melton, 3rd, *Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton*. *Endocr Rev*, 2002. **23**(3): p. 279-302.
57. Kohli, S.S. and V.S. Kohli, *Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications*. *Indian J Endocrinol Metab*, 2011. **15**(3): p. 175-81.

58. Morin, S., et al., *Mortality rates after incident non-traumatic fractures in older men and women*. Osteoporos Int, 2011. **22**(9): p. 2439-48.
59. Costa, A.G., et al., *When, where and how osteoporosis-associated fractures occur: an analysis from the Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women (GLOW)*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83306.
60. Bleibler, F., et al., *[Cost of fractures in German hospitals--what role does osteoporosis play?]*. Gesundheitswesen, 2014. **76**(3): p. 163-8.
61. Jann Hau and Gerald L. Van Hoosier, J., *Handbook of Laboratory Animal Science - Second Edition*, in *Animal Models*. by CRC Press LLC. p. 264.
62. GREHN-KRAFT, I., *Etablierung eines porcinen Großtiermodells zur sekundären und infektionsbedingt verzögerten sekundären Wundheilung*, in *INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen*. 2016, VVB LAUFERSWEILER VERLAG: Giessen, Germany. p. 3-6 von 146.
63. Turner, R.T., et al., *Animal models for osteoporosis*. Rev Endocr Metab Disord, 2001. **2**(1): p. 117-27.
64. Turner, A.S., *The sheep as a model for osteoporosis in humans*. Vet J, 2002. **163**(3): p. 232-9.
65. Oheim, R., et al., *Sheep model for osteoporosis: sustainability and biomechanical relevance of low turnover osteoporosis induced by hypothalamic-pituitary disconnection*. J Orthop Res, 2013. **31**(7): p. 1067-74.
66. Jee, W.S. and W. Yao, *Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2001. **1**(3): p. 193-207.
67. Reinwald, S. and D. Burr, *Review of nonprimate, large animal models for osteoporosis research*. J Bone Miner Res, 2008. **23**(9): p. 1353-68.
68. Lill, C.A., A.K. Fluegel, and E. Schneider, *Effect of ovariectomy, malnutrition and glucocorticoid application on bone properties in sheep: a pilot study*. Osteoporos Int, 2002. **13**(6): p. 480-6.
69. Pavlos P Lelovas, T.T.X., 2 Sofia E Thoma,1 George P Lyritis,1 and Ismene A Dontas1,2, *The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research*. Comparative Medicine, 2008. **Vol 58, No 5**: p. 424 - 430.
70. Yoon, K.H., et al., *The Change of Bone Metabolism in Ovariectomized Rats : Analyses of MicroCT Scan and Biochemical Markers of Bone Turnover*. J Korean Neurosurg Soc, 2012. **51**(6): p. 323-7.
71. Erben, R.G., *Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: modeling or remodeling?* Anat Rec, 1996. **246**(1): p. 39-46.

72. Claudia Cardoso Netto<sup>1</sup>, V.C.C.V., Lizanka Paola Figueiredo Marinho<sup>2</sup>, Sherry Agellon<sup>3</sup>, Hope Weiler<sup>3</sup>, Mário Roberto Maróstica Jr.<sup>1</sup>, *Are skeletally mature female rats a suitable model to study osteoporosis?* Arq Bras Endocrinol Metab., 2012: p. 6.
73. Zarrinkalam, M.R., et al., *Changes in osteocyte density correspond with changes in osteoblast and osteoclast activity in an osteoporotic sheep model.* Osteoporos Int, 2012. **23**(4): p. 1329-36.
74. Newton, B.I., et al., *The ovariectomized sheep as a model for human bone loss.* J Comp Pathol, 2004. **130**(4): p. 323-6.
75. Herdegen, T., *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie.* Vol. 3. 2013, Rüdigerstraße 14 | 70469 Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
76. Weinstein, R.S., et al., *Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis, vascularity, hydration, and strength in aged mice.* Aging Cell, 2010. **9**(2): p. 147-61.
77. O'Brien, C.A., et al., *Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength.* Endocrinology, 2004. **145**(4): p. 1835-41.
78. Liu, Y., et al., *Prevention of glucocorticoid-induced apoptosis in osteocytes and osteoblasts by calbindin-D28k.* J Bone Miner Res, 2004. **19**(3): p. 479-90.
79. Manolagas, S.C., *Corticosteroids and fractures: a close encounter of the third cell kind.* J Bone Miner Res, 2000. **15**(6): p. 1001-5.
80. Weinstein, R.S., et al., *Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone.* J Clin Invest, 1998. **102**(2): p. 274-82.
81. Komori, T., *Animal models for osteoporosis.* Eur J Pharmacol, 2015. **759**: p. 287-94.
82. Andreasen, C.M., et al., *A reversal phase arrest uncoupling the bone formation and resorption contributes to the bone loss in glucocorticoid treated ovariectomised aged sheep.* Bone, 2015. **75**: p. 32-9.
83. Canalis, E., et al., *Perspectives on glucocorticoid-induced osteoporosis.* Bone, 2004. **34**(4): p. 593-8.
84. Nitta, T., et al., *Glucocorticoid-induced secondary osteopenia in female rats: a time course study as compared with ovariectomy-induced osteopenia and response to salmon calcitonin.* Jpn J Pharmacol, 1999. **79**(3): p. 379-86.

85. Ding, M., et al., *Glucocorticoid induced osteopenia in cancellous bone of sheep: validation of large animal model for spine fusion and biomaterial research*. Spine (Phila Pa 1976), 2010. **35**(4): p. 363-70.
86. Castaneda, S., et al., *Characterization of a new experimental model of osteoporosis in rabbits*. J Bone Miner Metab, 2008. **26**(1): p. 53-9.
87. Gao, X., et al., *Establishing a rapid animal model of osteoporosis with ovariectomy plus low calcium diet in rats*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(8): p. 5123-8.
88. Zenger, I., *Die Geschichte der Computertomographie bei Siemens - Ein Rückblick*, S.H.H.S.H. GmbH, Editor. 2015.
89. Goodman, L.R., *The Beatles, the Nobel Prize, and CT scanning of the chest*. Radiol Clin North Am, 2010. **48**(1): p. 1-7.
90. Ritman, E.L., *Current status of developments and applications of micro-CT*. Annu Rev Biomed Eng, 2011. **13**: p. 531-52.
91. Flohr, T., B. Ohnesorge, and S. Schaller, *[Current status and future potentials of multislice computed tomography]*. Radiologe, 2004. **44**(2): p. 113-20.
92. Hu, H., et al., *Four multidetector-row helical CT: image quality and volume coverage speed*. Radiology, 2000. **215**(1): p. 55-62.
93. Langheinrich, A.C., et al., *Atherosclerosis, inflammation and lipoprotein glomerulopathy in kidneys of apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice*. BMC Nephrol, 2010. **11**: p. 18.
94. Kampschulte, M., et al., *Quantitative 3D micro-CT imaging of human lung tissue*. Rofo, 2013. **185**(9): p. 869-76.
95. Engelke, K., et al., *[Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure]*. Radiologe, 1999. **39**(3): p. 203-12.
96. Ritman, E.L., *Micro-computed tomography-current status and developments*. Annu Rev Biomed Eng, 2004. **6**: p. 185-208.
97. Langheinrich, A.C., et al., *[Micro-computed tomography of the vasculature in parenchymal organs and lung alveoli]*. Rofo, 2004. **176**(9): p. 1219-25.
98. Kalender, W.A., *Computertomographie - Grundlagen, Gerätetechnologie, Bildqualität, Anwendung*. Vol. 2. überarbeitete Auflage. 2006.
99. 2018, C.B. SKYSCAN 1173 Röntgen-Mikro-CT - Übersicht - SkyScan\_1173 Bruker. August 28, 2018; Available from: <https://www.bruker.com/de/products/microtomography/micro-ct-for-sample-scanning/skyscan-1173/overview.html>.

100. 2018, C.B., *Bruker microCT method note: Workflow SkyScan 1173*. **1**: p. 7.
101. Kampschulte, M., et al., *Nano-Computed Tomography: Technique and Applications*. Rofo, 2016. **188**(2): p. 146-54.
102. L. A. Feldkamp, L.C.D., and J. W. Kress, *Practical cone-beam algorithm*. J. Opt. Soc. Am. A, 1984. **Vol. 1, No. 6**: p. 612-619.
103. Bouxsein, M.L., et al., *Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography*. J Bone Miner Res, 2010. **25**(7): p. 1468-86.
104. Parfitt, A.M., et al., *Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee*. J Bone Miner Res, 1987. **2**(6): p. 595-610.
105. 2018, C.B., *Morphometric parameters measured by Skyscan™ CT- analyser software.*, Bruker-MicroCT, Editor. p. 49.
106. Hildebrand, T. and P. Ruegsegger, *A new method for model independent assessment of thickness in three-dimensional images*. Journal of Microscopy, 1997. **185**(1): p. 65-67.
107. Hildebrand, T. and P. Ruegsegger, *Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index*. Comput Methods Biomech Biomed Engin, 1997. **1**(1): p. 15-23.
108. 2018, C.B., *Bone mineral density (BMD) and tissue mineral density (TMD) calibration and measurement by micro-CT using Bruker-MicroCT CT-Analyser - Method note*. p. 1-30.
109. Pauwels, E., et al., *An exploratory study of contrast agents for soft tissue visualization by means of high resolution X-ray computed tomography imaging*. J Microsc, 2013. **250**(1): p. 21-31.
110. Kampschulte, M., et al., *The development and validation of micro-CT of large deep frozen specimens*. Scanning, 2015. **37**(1): p. 63-72.
111. 2018, C.B., *NRecon User Manual*. July, 2016: p. 1-27.
112. al., F.e., *Practical cone-beam algorithm*. J. Opt. Soc. Am. A, June 1984. **Vol. 1, No. 6**: p. 612-619.
113. Feldkamp, L.A., L.C. Davis, and S. Webb, *Comments, with reply, on ;Tomographic reconstruction from experimentally obtained cone-beam projections' by S. Webb, et al.* IEEE Trans Med Imaging, 1988. **7**(1): p. 73-4.
114. 2018, C.B., *Bruker-MicroCT method note: Automated trabecular and cortical bone selection*. p. 1-18.

115. Azriel Rosenfeld, A.K., *Digital Picture Processing, Volume 1/2*  
*2nd Edition*. p. 435.
116. Tamminen, I.S., et al., *Reproducibility and agreement of micro-CT and histomorphometry in human trabecular bone with different metabolic status*. *J Bone Miner Metab*, 2011. **29**(4): p. 442-8.
117. Waarsing, J.H., et al., *Detecting and tracking local changes in the tibiae of individual rats: a novel method to analyse longitudinal in vivo micro-CT data*. *Bone*, 2004. **34**(1): p. 163-9.
118. 2018, C.B., *Bruker microCT ACADEMY - Density Measurement*. August 2014. **Volume 1**(Issue 6): p. 1-3.
119. 2018, C.B., *SkyScan2011 x-ray nanotomograph - overview and specifications - Bruker microCT*.
120. © 1999 - 2010 Analyze Direct, I.-B., Mayo Clinic, *Analyze 10.0 Essential Training Guide*. p. 1-147.
121. 2018, C.B., *SkyScan\_CT-Volume (version 2.0) - The user's guide*. October 10, 2008: p. 1-27.
122. Wessler, S., *The issue of animal models of thrombosis*. *Ann N Y Acad Sci*, 1989. **556**: p. 366-70.
123. Alt, V., et al., *A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures*. *Acta Biomater*, 2013. **9**(6): p. 7035-42.
124. Peng, Z., et al., *The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis*. *Bone*, 1994. **15**(5): p. 523-32.
125. Einhorn, T.A., *The cell and molecular biology of fracture healing*. *Clin Orthop Relat Res*, 1998(355 Suppl): p. S7-21.
126. Netto, C.C., et al., *Are skeletally mature female rats a suitable model to study osteoporosis?* *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2012. **56**(4): p. 259-64.
127. Kalu, D.N., *The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss*. *Bone Miner*, 1991. **15**(3): p. 175-91.
128. Egermann, M., J. Goldhahn, and E. Schneider, *Animal models for fracture treatment in osteoporosis*. *Osteoporos Int*, 2005. **16 Suppl 2**: p. S129-38.
129. Miller, S.C. and T.J. Wronski, *Long-term osteopenic changes in cancellous bone structure in ovariectomized rats*. *Anat Rec*, 1993. **236**(3): p. 433-41.

130. El Khassawna, T., et al., *Impaired extracellular matrix structure resulting from malnutrition in ovariectomized mature rats*. *Histochem Cell Biol*, 2015. **144**(5): p. 491-507.
131. El Khassawna, T., et al., *Effects of multi-deficiencies-diet on bone parameters of peripheral bone in ovariectomized mature rat*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e71665.
132. Boyd, S.K., et al., *Monitoring individual morphological changes over time in ovariectomized rats by in vivo micro-computed tomography*. *Bone*, 2006. **39**(4): p. 854-62.
133. Perilli, E., et al., *Detecting early bone changes using in vivo micro-CT in ovariectomized, zoledronic acid-treated, and sham-operated rats*. *Osteoporos Int*, 2010. **21**(8): p. 1371-82.
134. Zarrinkalam, M.R., et al., *Validation of the sheep as a large animal model for the study of vertebral osteoporosis*. *Eur Spine J*, 2009. **18**(2): p. 244-53.
135. Zhang, Z., et al., *Animal models for glucocorticoid-induced postmenopausal osteoporosis: An updated review*. *Biomed Pharmacother*, 2016. **84**: p. 438-446.
136. Pearce, A.I., et al., *Animal models for implant biomaterial research in bone: a review*. *Eur Cell Mater*, 2007. **13**: p. 1-10.
137. Oheim, R., et al., *Can we induce osteoporosis in animals comparable to the human situation?* *Injury*, 2016. **47 Suppl 1**: p. S3-9.
138. Nunamaker, D.M., *Experimental models of fracture repair*. *Clin Orthop Relat Res*, 1998(355 Suppl): p. S56-65.
139. Oheim, R., et al., *Large animal model for osteoporosis in humans: the ewe*. *Eur Cell Mater*, 2012. **24**: p. 372-85.
140. Arens, D., et al., *Seasonal changes in bone metabolism in sheep*. *Vet J*, 2007. **174**(3): p. 585-91.
141. Heiss, C., et al., *A New Clinically Relevant T-Score Standard to Interpret Bone Status in a Sheep Model*. *Med Sci Monit Basic Res*, 2017. **23**: p. 326-335.
142. Cabrera, D., et al., *Glucocorticoids affect bone mineral density and bone remodelling in OVX sheep: A pilot study*. *Bone Rep*, 2018. **9**: p. 173-180.
143. Wu, Z.X., et al., *Effect of ovariectomy on BMD, micro-architecture and biomechanics of cortical and cancellous bones in a sheep model*. *Med Eng Phys*, 2008. **30**(9): p. 1112-8.
144. Lill, C.A., et al., *Bone changes due to glucocorticoid application in an ovariectomized animal model for fracture treatment in osteoporosis*. *Osteoporos Int*, 2002. **13**(5): p. 407-14.

145. Dias, I.R., et al., *Preclinical and Translational Studies in Small Ruminants (Sheep and Goat) as Models for Osteoporosis Research*. Curr Osteoporos Rep, 2018. **16**(2): p. 182-197.
146. Egermann, M., et al., *A sheep model for fracture treatment in osteoporosis: benefits of the model versus animal welfare*. Lab Anim, 2008. **42**(4): p. 453-64.
147. Schorlemmer, S., et al., *Glucocorticoid treatment of ovariectomized sheep affects mineral density, structure, and mechanical properties of cancellous bone*. J Bone Miner Res, 2003. **18**(11): p. 2010-5.
148. Elliott, J.C. and S.D. Dover, *X-ray microtomography*. J Microsc, 1982. **126**(Pt 2): p. 211-3.
149. Schambach, S.J., et al., *Application of micro-CT in small animal imaging*. Methods, 2010. **50**(1): p. 2-13.
150. Stock, S.R., *MicroComputed Tomography: Methodology and Applications*, C. Press, Editor. 2008, ISBN 9781420058765. p. 348.
151. Feldkamp, L.A., et al., *The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography*. J Bone Miner Res, 1989. **4**(1): p. 3-11.
152. Khoury, B.M., et al., *The use of nano-computed tomography to enhance musculoskeletal research*. Connect Tissue Res, 2015. **56**(2): p. 106-19.
153. Perilli, E., I.H. Parkinson, and K.J. Reynolds, *Micro-CT examination of human bone: from biopsies towards the entire organ*. Ann Ist Super Sanita, 2012. **48**(1): p. 75-82.
154. Kim, G.J., et al., *Image of the Micro-Computed Tomography and Atomic-Force Microscopy of Bone in Osteoporosis Animal Model*. J Nanosci Nanotechnol, 2018. **18**(10): p. 6726-6731.
155. Xu, W., et al., *Quantitative study of osteoporosis model based on synchrotron radiation*. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2015. **2015**: p. 6378-81.
156. Peyrin, F., et al., *Micro- and nano-CT for the study of bone ultrastructure*. Curr Osteoporos Rep, 2014. **12**(4): p. 465-74.
157. Patel, V., et al., *MicroCT evaluation of normal and osteoarthritic bone structure in human knee specimens*. J Orthop Res, 2003. **21**(1): p. 6-13.
158. Turner, C.H. and D.B. Burr, *Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial*. Bone, 1993. **14**(4): p. 595-608.
159. Maran, A., et al., *Measurement of gene expression following cryogenic mu-CT scanning of human iliac crest biopsies*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2003. **3**(1): p. 83-8.

160. McElderry, J.D., M.R. Kole, and M.D. Morris, *Repeated freeze-thawing of bone tissue affects Raman bone quality measurements*. J Biomed Opt, 2011. **16**(7): p. 071407.
161. Tan, J.S. and S. Uppuganti, *Cumulative multiple freeze-thaw cycles and testing does not affect subsequent within-day variation in intervertebral flexibility of human cadaveric lumbosacral spine*. Spine (Phila Pa 1976), 2012. **37**(20): p. E1238-42.
162. Kantor, B., et al., *Cryostatic micro-computed tomography imaging of arterial wall perfusion*. Scanning, 2002. **24**(4): p. 186-90.
163. Kohlbrenner, A., et al., *In vivo micro tomography*. Adv Exp Med Biol, 2001. **496**: p. 213-24.
164. Bag, S., et al., *[Current concepts for experimental micro-CT in small animals]*. Rofo, 2010. **182**(5): p. 390-403.
165. Akhter, M.P., et al., *Transmenopausal changes in the trabecular bone structure*. Bone, 2007. **41**(1): p. 111-6.
166. Burghardt, A.J., T.M. Link, and S. Majumdar, *High-resolution computed tomography for clinical imaging of bone microarchitecture*. Clin Orthop Relat Res, 2011. **469**(8): p. 2179-93.
167. Langheinrich, A.C., et al., *Acute rat lung injury: feasibility of assessment with micro-CT*. Radiology, 2004. **233**(1): p. 165-71.
168. Hesse, B., et al., *Canalicular network morphology is the major determinant of the spatial distribution of mass density in human bone tissue: evidence by means of synchrotron radiation phase-contrast nano-CT*. J Bone Miner Res, 2015. **30**(2): p. 346-56.
169. Cnudde, V., et al., *High-resolution X-ray CT for 3D petrography of ferruginous sandstone for an investigation of building stone decay*. Microsc Res Tech, 2011. **74**(11): p. 1006-17.
170. Oliver Brunke, S.B., *Vergleich zwischen Labor-CT und Synchrotron-basierter Computer- tomographie mit sub-Mikrometer-Auflösung*, p.x.-r. GE Sensing & Inspection Technologies, Wunstorf, Deutschland, Editor. p. 4.
171. Stolz, E., et al., *Angioarchitectural changes in subacute cerebral venous thrombosis. A synchrotron-based micro- and nano-CT study*. Neuroimage, 2011. **54**(3): p. 1881-6.
172. Kampschulte, M., et al., *Quantitative CT imaging of the spatio-temporal distribution patterns of vasa vasorum in aortas of apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice*. Atherosclerosis, 2010. **212**(2): p. 444-50.

173. Langheinrich, A.C., et al., *Evaluation of the middle cerebral artery occlusion techniques in the rat by in-vitro 3-dimensional micro- and nano computed tomography*. BMC Neurol, 2010. **10**: p. 36.
174. Yang, X., et al., *High resolution in vivo micro-CT with flat panel detector based on amorphous silicon*. J Xray Sci Technol, 2010. **18**(4): p. 381-92.
175. Mathavan, N., et al., *Characterising bone material composition and structure in the ovariectomized (OVX) rat model of osteoporosis*. Calcif Tissue Int, 2015. **97**(2): p. 134-44.
176. Mavropoulos, A., et al., *Normal masticatory function partially protects the rat mandibular bone from estrogen-deficiency induced osteoporosis*. J Biomech, 2014. **47**(11): p. 2666-71.
177. Varga, P., et al., *Synchrotron X-ray phase nano-tomography-based analysis of the lacunar-canalicular network morphology and its relation to the strains experienced by osteocytes in situ as predicted by case-specific finite element analysis*. Biomech Model Mechanobiol, 2015. **14**(2): p. 267-82.
178. Daghma, D.E.S., et al., *Computational segmentation of collagen fibers in bone matrix indicates bone quality in ovariectomized rat spine*. J Bone Miner Metab, 2018. **36**(3): p. 297-306.
179. Govindarajan, P., et al., *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, 2014. **184**(3): p. 765-77.
180. Ren, H., et al., *Effects of combined ovariectomy with dexamethasone on rat lumbar vertebrae*. Menopause, 2016. **23**(4): p. 441-50.
181. Sun, X., et al., *Transient Effect of 17beta-estradiol on Osteoporosis in Ovariectomized Rats Accompanied with Unilateral Disuse in the Early Phase*. Int J Med Sci, 2015. **12**(5): p. 423-31.
182. Sakata, M., et al., *Osteoporotic effect on bone repair in lumbar vertebral body defects in a rat model*. J Orthop Surg (Hong Kong), 2018. **26**(2): p. 2309499018770349.
183. Osborne, D., et al., *The development of the upper end of the femur, with special reference to its internal architecture*. Radiology, 1980. **137**(1 Pt 1): p. 71-6.
184. Christopher, J.J. and S. Ramakrishnan, *Assessment and classification of mechanical strength components of human femur trabecular bone using texture analysis and neural network*. J Med Syst, 2008. **32**(2): p. 117-22.
185. Stiehl, J.B., D. Jacobson, and G. Carrera, *Morphological analysis of the proximal femur using quantitative computed tomography*. Int Orthop, 2007. **31**(3): p. 287-92.

186. Brownbill, R.A. and J.Z. Ilich, *Hip geometry and its role in fracture: what do we know so far?* Curr Osteoporos Rep, 2003. **1**(1): p. 25-31.
187. Gnudi, S., et al., *Proximal femur geometry to detect and distinguish femoral neck fractures from trochanteric fractures in postmenopausal women.* Osteoporos Int, 2002. **13**(1): p. 69-73.
188. Kielbowicz, Z., et al., *The experimental osteoporosis in sheep--clinical approach.* Pol J Vet Sci, 2015. **18**(3): p. 645-54.
189. Haffner-Luntzer, M., et al., *Review of Animal Models of Comorbidities in Fracture-Healing Research.* J Orthop Res, 2019. **37**(12): p. 2491-2498.
190. Glinkowski, W., et al., *The Increase of Osteoporotic Hip Fractures and Associated One-Year Mortality in Poland: 2008-2015.* J Clin Med, 2019. **8**(9).
191. Nicks, K.M., et al., *Three-dimensional structural analysis of the proximal femur in an age-stratified sample of women.* Bone, 2013. **55**(1): p. 179-88.
192. Hesse, B., et al., *Alterations of mass density and 3D osteocyte lacunar properties in bisphosphonate-related osteonecrotic human jaw bone, a synchrotron microCT study.* PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88481.
193. Hesse, B., et al., *Accessing osteocyte lacunar geometrical properties in human jaw bone on the submicron length scale using synchrotron radiation  $\mu$ CT.* J Microsc, 2014. **255**(3): p. 158-68.
194. Dong, P., et al., *A new quantitative approach for estimating bone cell connections from nano-CT images.* Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2013. **2013**: p. 3694-7.
195. Turner, C.H., *Homeostatic control of bone structure: an application of feedback theory.* Bone, 1991. **12**(3): p. 203-17.
196. Xia, Y., et al., *Scaling calibration in region of interest reconstruction with the 1D and 2D ATRACT algorithm.* Int J Comput Assist Radiol Surg, 2014. **9**(3): p. 345-56.
197. Sen Sharma, K., et al., *Scout-view assisted interior micro-CT.* Phys Med Biol, 2013. **58**(12): p. 4297-314.
198. Sen Sharma, K., et al., *Interior micro-CT with an offset detector.* Med Phys, 2014. **41**(6): p. 061915.

## 8.2 Bildquellenverzeichnis

- a. Khosla, S., Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, 2001. **142**(12): p. 5050-5.
- b. Angelehnt an Ritman, E.L., Current status of developments and applications of micro-CT. *Annu Rev Biomed Eng*, 2011. **13**: p. 531-52.
- c. Angelehnt an Ritman, E.L., Micro-computed tomography-current status and developments. *Annu Rev Biomed Eng*, 2004. **6**: p. 185-208.
- d. Kampschulte, M., et al., Nano-Computed Tomography: Technique and Applications. *Rofo*, 2016. **188**(2): p. 146-54.

8.3 Abkürzungsverzeichnis**A**

AP.....	<i>Alkalische Phosphatase</i>
Arf6.....	<i>ADP-Ribosylierungsfaktor 6</i>
ASBMR.....	<i>American Society for Bone and Mineral Research</i>

**B**

BMD.....	<i>Knochenmineraldichte</i>
BMP.....	<i>Bitmap (Bildformat)</i>
BMPs.....	<i>bone morphogenic proteins</i>
BMU.....	<i>basic multicellular unit</i>
BTM.....	<i>biochemical bone turnover marker</i>
BV.....	<i>Bone volume</i>
BV/TV.....	<i>Knochenvolumenanteil</i>

**C**

CaSR.....	<i>Calcium Sensing Receptor</i>
CCD.....	<i>Charge-coupled Device</i>
Cdc42.....	<i>Zellteilungskontrollprotein 42</i>
CT.....	<i>Computertomographie</i>
Ct.Th.....	<i>Cortical Thickness</i>
CTAn.....	<i>CTAnalyser® (der Fa. Bruker®)</i>

**D**

DD.....	<i>defizitäre Diät</i>
DFG.....	<i>Deutsche Forschungsgemeinschaft</i>
DXA.....	<i>duale Röntgenabsorptiometrie</i>

**E**

EPS.....	<i>Extrudiertes Polystyrol</i>
----------	--------------------------------

**F**

F-Aktin.....	<i>Filament-Aktin</i>
FGF 23.....	<i>Fibroblast Growth Factor 23</i>
FOD.....	<i>Fokus-Objekt-Distanz</i>

**G**

GH..... *Growth Hormon*  
 GmbH..... *Gesellschaft mit beschränkter Haftung*  
 GPU..... *Graphics Processing Unit*  
 GTP..... *Guanosintriphosphat*

**I**

IGF-1..... *Insulin-like Growth Factor 1*  
 IL-1..... *Interleukin-1*  
 IOF..... *International Osteoporosis Foundation*

**J**

JLU..... *Justus-Liebig-Universität*

**L**

LCN..... *lakunokanalikuläres Netzwerk*  
 LWK..... *Lendenwirbelkörper*

**M**

M-CSF..... *macrophage colony-stimulating factor*  
 Mikro-CT/ $\mu$ CT..... *Mikro-Computertomographie*

**N**

n.-s..... *nicht signifikant*  
 Nano-CT/NCT..... *Nano-Computertomographie*  
 NGS..... *next generation RNA-sequencing*  
 NTX..... *Urin-N-Telopeptid*

**O**

OPG..... *Osteoprotegerin*  
 OVX..... *Ovarektomie*

**P**

PTH..... *Parathormon*  
 PTHrP..... *Parathormon-related-peptide*

**Q**

QCT.....*quantitative Computertomographie*  
 QUS.....*quantitative Sonographie*

**R**

Rab.....*Ras-like proteins from rat brain*  
 Rac.....*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*  
 RANK.....*receptor activator of NF-kB*  
 RANKL.....*receptor activator of NF-kB ligand*  
 Rho.....*Ras homology*  
 ROI.....*Region of interest*  
 RP.....*Regierungspräsidium*

**S**

s-CTX.....*Serum-C-terminale Telopeptid-Typ-I-Kollagen*  
 SD.....*Sprague Dawley, Standardabweichung*  
 SFB/TRR79.....*Sonderforschungsbereich Transregio 79*  
 Sham-OP.....*Scheinoperation*  
 SMI.....*Structure Model Index*  
 SPF.....*spezifisch pathogenfrei*  
 s-PINP.....*Serum-Prokollagen-Typ-I-N-terminale Propeptid*

**T**

Tb.N.....*Trabecular Number*  
 Tb.Sp.....*Trabecular Separation*  
 Tb.Th.....*Trabecular Thickness*  
 TMD.....*Tissue mineral density/ Gewebemineraldichte*  
 TNF-  $\alpha$ .....*Tumornekrosefaktor-alpha*  
 TRAP.....*tartraresistente saure Phosphatase*  
 TV.....*Tissue volume*

**V**

VOI.....*Volume of interest/ Messvolumen*

**W**

WHO.....*Weltgesundheitsorganisation*

#### 8.4 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Grobe Übersicht zur präosteoblastischen / stromalen Zellregulation der Osteoklastogenese.....</b>	<b>6</b>
<b>Abbildung 2: Selektive Betrachtung der Computertomographie in der biomedizinischen Grundlagenforschung.....</b>	<b>18</b>
<b>Abbildung 3: Vereinfachtes Schema<sup>c</sup> der Mikro-CT. ....</b>	<b>19</b>
<b>Abbildung 4: Schematische Darstellung der Technik einer Nano-Computertomographie. ....</b>	<b>21</b>
<b>Abbildung 5: Experimentelles Studiendesign – Adultes Kleintiermodell "Ratte".</b>	<b>29</b>
<b>Abbildung 6: Experimentelles Studiendesign – Adultes Großtiermodell "Schaf". .....</b>	<b>32</b>
<b>Abbildung 7: Untersuchungsverfahren - Mikro-Computertomographie. ....</b>	<b>38</b>
<b>Abbildung 8: DataViewer - Softwareaufnahme 1 zur Veranschaulichung der standardisierten Objektrotation.....</b>	<b>42</b>
<b>Abbildung 9: DataViewer - Softwareaufnahme 2 zur Veranschaulichung der standardisierten Objektrotation.....</b>	<b>43</b>
<b>Abbildung 10: DataViewer - Softwareaufnahme 3 zur Veranschaulichung der standardisierten Objektrotation.....</b>	<b>44</b>
<b>Abbildung 11: DataViewer - Softwareaufnahme 4 zur Veranschaulichung der standardisierten Objektrotation.....</b>	<b>45</b>
<b>Abbildung 12: Übersicht zur Bestimmung des VOI für das adulte Kleintiermodell. .....</b>	<b>47</b>
<b>Abbildung 13: Übersicht zur Bestimmung des VOI für das adulte Großtiermodell. .....</b>	<b>49</b>
<b>Abbildung 14: Untersuchungsverfahren - Nano-Computertomographie. ....</b>	<b>52</b>
<b>Abbildung 15: Analytik zur Messung der Grauwertverteilung.....</b>	<b>55</b>
<b>Abbildung 16: Vergleichende Visualisierung der Volume of interests der Femora des adulten Kleintiermodells. ....</b>	<b>60</b>
<b>Abbildung 17: Vergleichende Visualisierung der Volume of interests der Tibia des adulten Kleintiermodells. ....</b>	<b>61</b>
<b>Abbildung 18: Vergleichende Visualisierung der Volume of interests der Th 9 des adulten Kleintiermodells. ....</b>	<b>62</b>
<b>Abbildung 19: Ergebnisse der statistischen Analyse der Femurspongiosa des adulten Kleintiermodells. ....</b>	<b>65</b>

Abbildung 20: Ergebnisse der statistischen Analyse der Kortikalisregionen des adulten Kleintiermodells. ....	68
Abbildung 21: Ergebnisse der statistischen Analyse der Tibiaspongiosa des adulten Kleintiermodells. ....	71
Abbildung 22: Ergebnisse der statistischen Analyse der Spongiosa der Th 9 des adulten Kleintiermodells. ....	74
Abbildung 23: Vergleichende Visualisierung der proximalen Femora des adulten Großtiermodells. ....	76
Abbildung 24: Ergebnisse der statistischen Analyse der Kontrollregionen der Femurspongiosa des adulten Großtiermodells. ....	79
Abbildung 25: Ergebnisse der statistischen Analyse der Femurspongiosa (BV/TV) des adulten Großtiermodells. ....	80
Abbildung 26: Ergebnisse der statistischen Analyse der Femurspongiosa (Tb.N) des adulten Großtiermodells. ....	81
Abbildung 27: Ergebnisse der statistischen Analyse der Femurspongiosa (Tb.Th) des adulten Großtiermodells. ....	82
Abbildung 28: Ergebnisse der statistischen Analyse der Femurspongiosa (Tb.Sp) des adulten Großtiermodells. ....	83
Abbildung 29: Ergebnisse der statistischen Analyse der Femurspongiosa (SMI) des adulten Großtiermodells. ....	84
Abbildung 30: Ergebnisse der statistischen Analyse der Femurspongiosa (BMD) des adulten Großtiermodells. ....	85
Abbildung 31: Ergebnisse der statistischen Analyse der femoralen Kortikalis des adulten Großtiermodells. ....	86
Abbildung 32: Vergleichende Visualisierung der LWK 2-Trabekel des adulten Großtiermodells. ....	87
Abbildung 33: Ergebnis der statistischen Analyse des Durchschnittsvolumen der Osteozytenlakunen nach Ortsspezifität innerhalb der Gruppen der LWK 2-Trabekel des adulten Großtiermodells. ....	89
Abbildung 34: Ergebnisse der statistischen Analyse der gesamten Osteozytenlakunen und Grauwertverteilungen zwischen den Gruppen der LWK 2-Trabekel des adulten Großtiermodells. ....	156
Abbildung 35: Ergebnisse der statistischen Analyse der ortsspezifischen Osteozytenlakunen und Grauwertverteilungen zwischen den Gruppen der LWK 2-Trabekel des adulten Großtiermodells. ....	157

**Abbildung 36: Ergebnisse der statistischen Analyse der Osteozytenlakunen und Grauwertverteilungen nach Ortsspezifität innerhalb der Gruppen der LWK 2-Trabekel des adulten Großtiermodells. .... 158**

## 8.5 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Strukturparameter der Spongiosa und Kortikalis für die Analyse der <math>\mu</math>CT.....</b>	<b>24</b>
<b>Tabelle 2: Strukturparameter der zellulären Analyse der NCT .....</b>	<b>25</b>
<b>Tabelle 3: Laboranalytik – Übersicht zu Artikel, Geräte, Instrumente sowie Software.....</b>	<b>26</b>
<b>Tabelle 4: Übersicht der Gruppenverteilung &amp; des Probenumfangs zum Kleintiermodell "Ratte".....</b>	<b>30</b>
<b>Tabelle 5: Übersicht der Gruppenverteilung &amp; des Probenumfangs zum Großtiermodell "Schaf".....</b>	<b>33</b>
<b>Tabelle 6: Übersicht der probenadaptierten VOIs und Offsets für das adulte Kleintiermodell.....</b>	<b>46</b>
<b>Tabelle 7: Übersicht der probenadaptierten VOIs und Offsets für das adulte Großtiermodell.....</b>	<b>48</b>
<b>Tabelle 8: Übersicht zur Datenakquisition &amp; -rekonstruktion.....</b>	<b>56</b>
<b>Tabelle 9: Ergebnisse der explorativen Statistik der Femurspongiosa des Untersuchungskollektivs "Adultes Kleintiermodell".....</b>	<b>139</b>
<b>Tabelle 10: Ergebnisse der explorativen Statistik der Kortikalisregionen des Untersuchungskollektivs "Adultes Kleintiermodell".....</b>	<b>141</b>
<b>Tabelle 11: Ergebnisse der explorativen Statistik der Tibiaspongiosa des Untersuchungskollektivs "Adultes Kleintiermodell".....</b>	<b>143</b>
<b>Tabelle 12: Ergebnisse der explorativen Statistik der Spongiosa der Th 9 des Untersuchungskollektivs "Adultes Kleintiermodell".....</b>	<b>145</b>
<b>Tabelle 13: Ergebnisse der deskriptiven Statistik der Spongiosa des Caput femoris des Untersuchungskollektivs "Adultes Schafmodell".....</b>	<b>147</b>
<b>Tabelle 14: Ergebnisse der deskriptiven Statistik der Spongiosa des Collum femoris des Untersuchungskollektivs "Adultes Schafmodell".....</b>	<b>149</b>
<b>Tabelle 15: Ergebnisse der deskriptiven Statistik der Spongiosa des Trochanter majors des Untersuchungskollektivs "Adultes Schafmodell".....</b>	<b>151</b>
<b>Tabelle 16: Ergebnisse der deskriptiven Statistik der femoralen Kortikalis des Untersuchungskollektivs "Adultes Schafmodell".....</b>	<b>152</b>
<b>Tabelle 17: Ergebnisse der deskriptiven Statistik der gesamten Osteozytenlakunen der LWK 2-Trabekel des Untersuchungskollektivs "Adultes Schafmodell".....</b>	<b>153</b>

**Tabelle 18: Ergebnisse der deskriptiven Statistik der peripheren Osteozytenlakunen der LWK 2-Trabekel des Untersuchungskollektivs "Adultes Schafmodell"..... 154**

**Tabelle 19: Ergebnisse der deskriptiven Statistik der zentralen Osteozytenlakunen der LWK 2-Trabekel des Untersuchungskollektivs "Adultes Schafmodell"..... 155**

## 8.6 Tabellarische Zusammenstellung der statistischen Auswertung

### 8.6.1 Adultes Kleintiermodell – Ergebnisse der deskriptiven Statistik

**Tabelle 9: Ergebnisse der explorativen Statistik der Femurspongiosa des Untersuchungskollektivs "Adultes Kleintiermodell".** Dargestellt sind Hypothese bezogene Strukturparameter mit gerundeten Werten. Für eine Übersichtliche Ergebnisdarstellung sind studienspezifische Fallzahlen dem Kapitel 2.2 zu entnehmen.

Strukturparameter	Gruppe	Mittelwert	Minimum	Maximum	Median	Standardabweichung	Interquartilbereich	Angep. Signifikanz zu A1
<b>BV/TV [%]</b>	A0	17,7	14,8	20,4	17,6	2,02	4,13	n.-s.
	A1	15,3	10,1	22,2	14,1	4,91	11,5	-
	A2	14,7	10,4	27,5	12,5	5,90	4,45	n.-s.
	B1	8,03	4,68	12,5	7,10	3,04	5,64	<b>0,0384</b>
	B2	7,16	5,22	8,41	7,35	1,01	1,38	<b>0,0116</b>
<b>BMD [g/cm<sup>3</sup>]</b>	A0	0,391	0,352	0,453	0,395	0,0350	0,0529	n.-s.
	A1	0,350	0,231	0,498	0,328	0,105	0,233	-
	A2	0,323	0,240	0,573	0,283	0,115	0,0867	n.-s.
	B1	0,186	0,111	0,288	0,164	0,0645	0,107	<b>0,0388</b>
	B2	0,163	0,112	0,199	0,167	0,0280	0,0413	<b>0,0092</b>
<b>Tb.N [1/mm]</b>	A0	2,05	1,78	2,30	2,09	0,198	0,433	n.-s.
	A1	2,05	1,28	3,23	1,84	0,684	1,14	-
	A2	1,76	1,33	3,18	1,42	0,669	0,649	n.-s.
	B1	0,946	0,632	1,52	0,837	0,327	0,506	<b>0,0156</b>
	B2	0,825	0,646	0,954	0,861	0,119	0,242	<b>0,0028</b>

<b>Tb.Th</b> [mm]	A0	0,0863	0,0719	0,0967	0,0883	0,00861	0,0153	n.-s.
	A1	0,0751	0,0653	0,0885	0,0745	0,00816	0,0118	-
	A2	0,0834	0,0773	0,0955	0,0795	0,00689	0,0106	n.-s.
	B1	0,084	0,0740	0,0978	0,0839	0,00834	0,0132	n.-s.
	B2	0,0871	0,0773	0,0100	0,0869	0,00802	0,0151	n.-s.
<b>Tb.Sp</b> [mm]	A0	0,377	0,323	0,458	0,355	0,0541	0,108	n.-s.
	A1	0,373	0,238	0,468	0,376	0,0917	0,192	-
	A2	0,459	0,273	0,594	0,453	0,112	0,206	n.-s.
	B1	0,697	0,397	1,05	0,619	0,235	0,383	<b>0,036</b>
	B2	0,796	0,639	1,065	0,742	0,166	0,296	<b>0,0008</b>
<b>SMI</b>	A0	1,42	1,30	1,56	1,41	0,0790	0,0813	n.-s.
	A1	1,23	0,772	1,64	1,26	0,282	0,376	-
	A2	1,15	0,229	1,47	1,32	0,427	0,333	n.-s.
	B1	1,74	1,58	2,13	1,68	0,204	0,289	<b>0,0072</b>
	B2	1,73	1,62	1,89	1,72	0,0958	0,161	<b>0,0012</b>

**Tabelle 10: Ergebnisse der explorativen Statistik der Kortikalisregionen des Untersuchungskollektivs "Adultes Kleintiermodell".** Dargestellt sind Hypothese bezogene Strukturparameter mit gerundeten Werten. Für eine Übersichtliche Ergebnisdarstellung sind studienspezifische Fallzahlen dem Kapitel 2.2 zu entnehmen.

Strukturparameter	Gruppe	Mittelwert	Minimum	Maximum	Median	Standardabweichung	Interquartilbereich	Angepasste Signifikanz zu A1
<b>Kortikalis 1</b>								
<b>Ct.Th [mm]</b>	A0	0,444	0,403	0,495	0,440	0,0364	0,0820	n.-s.
	A1	0,446	0,415	0,469	0,445	0,0170	0,0171	-
	A2	0,421	0,352	0,478	0,422	0,0428	0,0668	n.-s.
	B1	0,441	0,343	0,590	0,428	0,0822	0,0947	n.-s.
	B2	0,456	0,420	0,483	0,457	0,0232	0,0424	n.-s.
<b>TMD [g/cm<sup>3</sup>]</b>	A0	1,43	1,40	1,46	1,43	0,0192	0,0328	n.-s.
	A1	1,55	1,53	1,60	1,55	0,0229	0,0357	-
	A2	1,60	1,54	1,63	1,60	0,0321	0,0513	0,12
	B1	1,63	1,56	1,74	1,61	0,0627	0,0775	0,06
	B2	1,55	1,44	1,58	1,56	0,0447	0,0307	n.-s.
<b>Kortikalis 2</b>								
<b>Ct.Th [mm]</b>	A0	0,712	0,668	0,752	0,721	0,0303	0,0539	n.-s.
	A1	0,705	0,648	0,751	0,705	0,0341	0,0487	-
	A2	0,648	0,584	0,696	0,653	0,0367	0,0490	0,24
	B1	0,606	0,574	0,685	0,595	0,0414	0,0527	<b>0,0232</b>
	B2	0,593	0,535	0,682	0,578	0,0522	0,0862	<b>0,0024</b>

TMD [g/cm <sup>3</sup> ]	A0	1,60	1,59	1,63	1,60	0,0123	0,0206	0,1384
	A1	1,74	1,71	1,77	1,73	0,0189	0,0201	-
	A2	1,77	1,70	1,81	1,78	0,0410	0,0664	0,324
	B1	1,77	1,74	1,79	1,77	0,0166	0,0308	0,308
	B2	1,73	1,59	1,78	1,74	0,0576	0,0326	n.-s.

**Tabelle 11: Ergebnisse der explorativen Statistik der Tibiaspongiosa des Untersuchungskollektivs "Adultes Kleintiermodell".** Dargestellt sind Hypothese bezogene Strukturparameter mit gerundeten Werten. Für eine Übersichtliche Ergebnisdarstellung sind studienspezifische Fallzahlen dem Kapitel 2.2 zu entnehmen.

Strukturparameter	Gruppe	Mittelwert	Minimum	Maximum	Median	Standardabweichung	Interquartilbereich	Angep. Signifikanz zu A1
<b>BV/TV [%]</b>	A0	17,0	13,9	21,1	17,3	2,44	3,62	n.-s.
	A1	15,9	10,0	24,4	14,3	5,75	12,6	-
	A2	14,3	7,95	25,6	13,6	5,48	3,65	n.-s.
	B1	11,2	8,02	15,4	11,2	2,73	4,75	0,512
	B2	8,13	5,80	9,68	8,24	1,20	1,58	<b>0,006</b>
<b>BMD [g/cm<sup>3</sup>]</b>	A0	0,368	0,315	0,433	0,363	0,0406	0,0679	n.-s.
	A1	0,340	0,231	0,510	0,319	0,113	0,249	-
	A2	0,290	0,175	0,506	0,262	0,105	0,0821	n.-s.
	B1	0,230	0,149	0,320	0,231	0,0594	0,0923	0,366
	B2	0,173	0,122	0,204	0,181	0,0263	0,0388	<b>0,0048</b>
<b>Tb.N [1/mm]</b>	A0	2,00	1,66	2,48	1,92	0,319	0,630	n.-s.
	A1	2,02	1,26	3,27	1,96	0,755	1,39	-
	A2	1,58	0,950	2,93	1,49	0,653	0,620	n.-s.
	B1	1,18	0,880	1,70	1,12	0,297	0,436	0,116
	B2	0,875	0,660	1,047	0,872	0,139	0,259	<b>0,0012</b>
<b>Tb.Th [mm]</b>	A0	0,0850	0,0770	0,0901	0,0879	0,00556	0,0123	n.-s.
	A1	0,0793	0,0708	0,0906	0,0781	0,00808	0,01560	-
	A2	0,0917	0,0837	0,104	0,0877	0,00824	0,0172	0,14

	B1	0,0950	0,0895	0,104	0,0924	0,00598	0,0112	<b>0,004</b>
	B2	0,0931	0,0827	0,101	0,0934	0,00615	0,00993	<b>0,0128</b>
<b>Tb.Sp</b> <b>[mm]</b>	A0	0,361	0,296	0,426	0,341	0,0574	0,119	n.-s.
	A1	0,376	0,225	0,490	0,364	0,113	0,235	-
	A2	0,489	0,271	0,791	0,446	0,161	0,156	0,964
	B1	0,595	0,379	1,09	0,527	0,254	0,256	0,216
	B2	0,815	0,576	1,15	0,771	0,218	0,407	<b>0,0012</b>
<b>SMI</b>	A0	1,51	1,24	1,75	1,57	0,163	0,195	n.-s.
	A1	1,31	0,857	1,67	1,41	0,287	0,520	-
	A2	1,40	0,576	1,93	1,48	0,409	0,193	n.-s.
	B1	1,72	1,53	1,85	1,73	0,117	0,185	<b>0,0148</b>
	B2	1,78	1,59	2,05	1,73	0,169	0,315	<b>0,0024</b>

**Tabelle 12: Ergebnisse der explorativen Statistik der Spongiosa der Th 9 des Untersuchungskollektivs "Adultes Kleintiermodell".** Dargestellt sind Hypothese bezogene Strukturparameter mit gerundeten Werten. Für eine Übersichtliche Ergebnisdarstellung sind studienspezifische Fallzahlen dem Kapitel 2.2 zu entnehmen.

Strukturparameter	Gruppe	Mittelwert	Minimum	Maximum	Median	Standardabweichung	Interquartilbereich	Angep. Signifikanz zu A1
<b>BV/TV [%]</b>	A0	41,8	37,2	49,7	42,2	4,60	7,23	n.-s.
	A1	41,1	31,8	47,1	40,3	5,29	7,96	-
	A2	33,9	30,2	47,8	31,3	6,23	2,48	0,2876
	B1	30,1	25,7	34,7	30,5	3,63	6,74	<b>0,0464</b>
	B2	26,1	20,1	32,9	25,9	4,34	7,53	<b>0,0008</b>
<b>BMD [g/cm<sup>3</sup>]</b>	A0	0,644	0,580	0,753	0,647	0,0593	0,0839	n.-s.
	A1	0,652	0,519	0,737	0,653	0,0748	0,118	-
	A2	0,554	0,496	0,742	0,525	0,0866	0,0739	0,34
	B1	0,493	0,420	0,559	0,506	0,0571	0,110	0,0556
	B2	0,421	0,316	0,532	0,427	0,0701	0,115	<b>0,0004</b>
<b>Tb.N [1/mm]</b>	A0	3,22	2,88	3,59	3,21	0,270	0,564	n.-s.
	A1	3,26	2,71	3,71	3,28	0,302	0,212	-
	A2	2,91	2,73	3,58	2,78	0,304	0,142	0,4
	B1	2,76	2,55	3,07	2,74	0,208	0,396	0,08
	B2	2,48	2,07	2,99	2,48	0,290	0,432	<b>0,0008</b>
<b>Tb.Th [mm]</b>	A0	0,130	0,116	0,144	0,130	0,00921	0,0135	n.-s.
	A1	0,126	0,117	0,139	0,125	0,00698	0,00880	-
	A2	0,116	0,109	0,133	0,114	0,00806	0,00455	0,3224

	B1	0,109	0,0999	0,119	0,109	0,00820	0,0167	<b>0,0316</b>
	B2	0,105	0,0912	0,122	0,105	0,00984	0,0157	<b>0,0032</b>
<b>Tb.Sp</b> <b>[mm]</b>	A0	0,230	0,204	0,257	0,232	0,0191	0,0288	n.-s.
	A1	0,233	0,201	0,280	0,232	0,0248	0,0251	-
	A2	0,276	0,223	0,295	0,279	0,0253	0,0208	0,1
	B1	0,281	0,263	0,308	0,278	0,0187	0,0340	0,14
	B2	0,310	0,267	0,357	0,316	0,0304	0,0519	<b>0,0008</b>
<b>SMI</b>	A0	0,330	-0,0669	0,858	0,342	0,310	0,483	0,668
	A1	0,0704	-0,357	0,545	0,114	0,309	0,515	-
	A2	0,226	-0,467	0,402	0,363	0,313	0,182	n.-s.
	B1	0,469	0,265	0,666	0,472	0,144	0,251	0,072
	B2	0,610	0,272	0,931	0,619	0,209	0,310	<b>0,0024</b>

## 8.6.2 Adultes Großtiermodell – Ergebnisse der deskriptiven Statistik

**Tabelle 13: Ergebnisse der deskriptiven Statistik der Spongiosa des Caput femoris des Untersuchungskollektivs "Adultes Schafmodell".** Dargestellt sind Hypothese bezogene Strukturparameter mit gerundeten Werten. Für eine Übersichtliche Ergebnisdarstellung sind studienspezifische Fallzahlen dem Kapitel 2.2 zu entnehmen.

Strukturparameter	Gruppe	Mittelwert	Minimum	Maximum	Median	Standardabweichung	Interquartilbereich	Angep. Signifikanz zu K
<b>BV/TV [%]</b>	Kontrolle	47,9	37,9	61,1	46,7	6,59	5,46	-
	OVX	49,3	38,4	58,4	49,2	6,08	5,74	n.-s.
	OVX-Diät	46,5	37,5	60,7	46,0	7,49	11,1	n.-s.
	OVX-Diät-Steroid	42,3	35,2	57,4	37,7	9,30	16,8	n.-s.
<b>BMD [g/cm<sup>3</sup>]</b>	Kontrolle	0,520	0,412	0,663	0,524	0,0771	0,0996	-
	OVX	0,543	0,434	0,642	0,529	0,0726	0,125	n.-s.
	OVX-Diät	0,508	0,391	0,662	0,511	0,0821	0,105	n.-s.
	OVX-Diät-Steroid	0,329	0,213	0,598	0,266	0,146	0,214	n.-s.
<b>Tb.N [1/mm]</b>	Kontrolle	1,83	1,46	2,06	1,84	0,185	0,230	-
	OVX	1,73	1,35	2,02	1,66	0,241	0,367	n.-s.
	OVX-Diät	1,88	1,66	2,13	1,84	0,163	0,275	n.-s.
	OVX-Diät-Steroid	1,85	1,63	2,20	1,80	0,205	0,322	n.-s.
<b>Tb.Th [mm]</b>	Kontrolle	0,263	0,219	0,322	0,251	0,0371	0,0696	-
	OVX	0,291	0,234	0,395	0,256	0,0618	0,107	n.-s.
	OVX-Diät	0,247	0,214	0,292	0,246	0,0234	0,0311	n.-s.
	OVX-Diät-Steroid	0,233	0,170	0,352	0,204	0,0674	0,103	n.-s.

<b>Tb.Sp [mm]</b>	Kontrolle	0,456	0,378	0,595	0,445	0,0691	0,0936	-
	OVX	0,465	0,382	0,565	0,477	0,0701	0,136	n.-s.
	OVX-Diät	0,445	0,364	0,517	0,455	0,0550	0,102	n.-s.
	OVX-Diät-Steroid	0,429	0,373	0,507	0,410	0,0520	0,0959	n.-s.
<b>SMI</b>	Kontrolle	-0,412	-1,64	0,232	-0,288	0,581	0,606	-
	OVX	-0,362	-1,46	0,349	-0,267	0,554	0,397	n.-s.
	OVX-Diät	-0,396	-1,68	0,243	-0,242	0,638	0,881	n.-s.
	OVX-Diät-Steroid	0,161	-1,25	1,02	0,397	0,833	1,40	n.-s.

**Tabelle 14: Ergebnisse der deskriptiven Statistik der Spongiosa des Collum femoris des Untersuchungskollektivs "Adultes Schafmodell".** Dargestellt sind Hypothese bezogene Strukturparameter mit gerundeten Werten. Für eine Übersichtliche Ergebnisdarstellung sind studienspezifische Fallzahlen dem Kapitel 2.2 zu entnehmen.

Strukturparameter	Gruppe	Mittelwert	Minimum	Maximum	Median	Standardabweichung	Interquartilbereich	Angep. Signifikanz zu K
<b>BV/TV [%]</b>	Kontrolle	42,0	36,0	48,7	41,4	4,38	7,87	-
	OVX	43,6	34,9	49,5	44,5	5,28	10,1	n.-s.
	OVX-Diät	39,8	29,9	51,5	38,1	7,38	12,5	n.-s.
	OVX-Diät-Steroid	34,3	28,8	43,3	34,3	5,09	7,05	0,0555
<b>BMD [g/cm<sup>3</sup>]</b>	Kontrolle	0,477	0,389	0,585	0,467	0,0577	0,0679	-
	OVX	0,475	0,418	0,537	0,471	0,0486	0,0970	n.-s.
	OVX-Diät	0,443	0,309	0,552	0,430	0,0811	0,132	n.-s.
	OVX-Diät-Steroid	0,275	0,200	0,371	0,251	0,0677	0,125	<b>0,0025</b>
<b>Tb.N [1/mm]</b>	Kontrolle	1,58	1,47	1,75	1,56	0,0861	0,112	-
	OVX	1,60	1,44	1,82	1,59	0,159	0,339	n.-s.
	OVX-Diät	1,59	1,37	1,95	1,58	0,185	0,260	n.-s.
	OVX-Diät-Steroid	1,76	1,54	2,11	1,67	0,223	0,408	n.-s.
<b>Tb.Th [mm]</b>	Kontrolle	0,270	0,227	0,323	0,263	0,0283	0,0310	-
	OVX	0,274	0,240	0,336	0,265	0,0382	0,0768	n.-s.
	OVX-Diät	0,250	0,205	0,322	0,240	0,0345	0,0341	0,654
	OVX-Diät-Steroid	0,200	0,164	0,270	0,178	0,0418	0,0683	<b>0,016</b>
<b>Tb.Sp [mm]</b>	Kontrolle	0,544	0,473	0,594	0,545	0,0348	0,0305	-
	OVX	0,504	0,429	0,585	0,502	0,0513	0,0746	n.-s.

	OVX-Diät	0,540	0,419	0,609	0,539	0,0615	0,0906	n.-s.
	OVX-Diät-Steroid	0,479	0,410	0,561	0,478	0,0597	0,105	n.-s.
<b>SMI</b>	Kontrolle	0,202	-0,0900	0,533	0,186	0,220	0,416	-
	OVX	0,158	-0,391	0,542	0,244	0,324	0,498	n.-s.
	OVX-Diät	0,219	-0,368	0,789	0,257	0,391	0,666	n.-s.
	OVX-Diät-Steroid	0,774	0,548	0,972	0,771	0,199	0,379	<b>0,006</b>

**Tabelle 15: Ergebnisse der deskriptiven Statistik der Spongiosa des Trochanter majors des Untersuchungskollektivs "Adultes Schafmodell".** Dargestellt sind Hypothese bezogene Strukturparameter mit gerundeten Werten. Für eine Übersichtliche Ergebnisdarstellung sind studienspezifische Fallzahlen dem Kapitel 2.2 zu entnehmen.

Strukturparameter	Gruppe	Mittelwert	Minimum	Maximum	Median	Standardabweichung	Interquartilbereich	Angep. Signifikanz zu K
<b>BV/TV [%]</b>	Kontrolle	27,4	20,5	34,8	26,9	4,73	7,93	-
	OVX	24,6	20,5	29,7	23,4	3,85	7,65	n.-s.
	OVX-Diät	25,3	16,5	31,2	26,8	5,10	8,65	n.-s.
	OVX-Diät-Steroid	27,8	21,7	32,9	28,1	5,01	9,75	n.-s.
<b>BMD [g/cm<sup>3</sup>]</b>	Kontrolle	0,268	0,218	0,340	0,263	0,0368	0,0440	-
	OVX	0,281	0,206	0,320	0,298	0,0464	0,0910	n.-s.
	OVX-Diät	0,254	0,200	0,333	0,260	0,0497	0,0891	n.-s.
	OVX-Diät-Steroid	0,149	0,114	0,194	0,147	0,0320	0,0656	<b>0,006</b>
<b>Tb.N [1/mm]</b>	Kontrolle	1,41	1,14	1,74	1,42	0,225	0,455	-
	OVX	1,25	0,942	1,55	1,22	0,228	0,457	n.-s.
	OVX-Diät	1,40	0,970	1,66	1,52	0,279	0,551	n.-s.
	OVX-Diät-Steroid	1,41	1,17	1,78	1,37	0,231	0,412	n.-s.
<b>Tb.Th [mm]</b>	Kontrolle	0,194	0,177	0,211	0,198	0,0132	0,0262	-
	OVX	0,198	0,182	0,217	0,195	0,0124	0,0209	n.-s.
	OVX-Diät	0,181	0,170	0,193	0,178	0,00780	0,0130	n.-s.
	OVX-Diät-Steroid	0,199	0,161	0,239	0,192	0,0306	0,0580	n.-s.
<b>Tb.Sp [mm]</b>	Kontrolle	0,569	0,457	0,714	0,552	0,0965	0,181	-
	OVX	0,616	0,501	0,767	0,585	0,109	0,239	n.-s.

	OVX-Diät	0,565	0,489	0,757	0,508	0,103	0,168	n.-s.
	OVX-Diät-Steroid	0,525	0,435	0,662	0,504	0,0880	0,167	n.-s.
<b>SMI</b>	Kontrolle	0,983	0,571	1,37	1,02	0,306	0,586	-
	OVX	1,17	0,933	1,50	1,17	0,223	0,438	n.-s.
	OVX-Diät	1,09	0,725	1,58	1,08	0,305	0,558	n.-s.
	OVX-Diät-Steroid	1,28	0,810	1,59	1,32	0,300	0,509	n.-s.

**Tabelle 16: Ergebnisse der deskriptiven Statistik der femoralen Kortikalis des Untersuchungskollektivs "Adultes Schafmodell".** Dargestellt sind Hypothese bezogene Strukturparameter mit gerundeten Werten. Für eine Übersichtliche Ergebnisdarstellung sind studienspezifische Fallzahlen dem Kapitel 2.2 zu entnehmen.

Strukturparameter	Gruppe	Mittelwert	Minimum	Maximum	Median	Standardabweichung	Interquartilbereich	Angep. Signifikanz zu K
<b>Ct.Th [mm]</b>	Kontrolle	2,23	1,64	2,51	2,26	0,263	0,217	-
	OVX	2,29	1,71	2,73	2,33	0,335	0,473	n.-s.
	OVX-Diät	2,24	1,48	2,74	2,32	0,402	0,561	n.-s.
	OVX-Diät-Steroid	2,07	1,54	2,99	1,79	0,601	1,10	n.-s.
<b>TMD [g/cm<sup>3</sup>]</b>	Kontrolle	1,17	1,02	1,24	1,20	0,072	0,0875	-
	OVX	1,16	1,14	1,20	1,15	0,023	0,0474	n.-s.
	OVX-Diät	1,13	1,08	1,21	1,13	0,046	0,0708	0,206
	OVX-Diät-Steroid	1,04	0,872	1,15	1,06	0,102	0,171	<b>0,009</b>

**Tabelle 17: Ergebnisse der deskriptiven Statistik der gesamten Osteozytenlakunen der LWK 2-Trabekel des Untersuchungskollektivs "Adultes Schafmodell".** Dargestellt sind Hypothese bezogene Strukturparameter mit gerundeten Werten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit fehlen Signifikanzangaben zur komplexen Hypothesentestung und studienspezifische Fallzahlen sind dem Kapitel 2.2 zu entnehmen.

Strukturparameter	Gruppe	Mittelwert	Minimum	Maximum	Median	Standardabweichung	Interquartilbereich
<b>Mean grayscale density osteocyte</b>	Kontrolle	0,182	0,164	0,190	0,182	0,00815	0,00864
	OVX	0,182	0,170	0,200	0,185	0,0110	0,0176
	OVX-Diät	0,185	0,150	0,200	0,187	0,0155	0,0152
	OVX-Diät-Steroid	0,191	0,175	0,200	0,195	0,00880	0,0133
<b>Mean grayscale density mineralized matrix</b>	Kontrolle	0,261	0,249	0,268	0,261	0,00555	0,00521
	OVX	0,252	0,234	0,266	0,250	0,0128	0,0270
	OVX-Diät	0,256	0,244	0,271	0,255	0,0105	0,0214
	OVX-Diät-Steroid	0,259	0,239	0,276	0,256	0,0126	0,0202
<b>Grayscale density ratio</b>	Kontrolle	0,302	0,244	0,375	0,301	0,0400	0,0510
	OVX	0,276	0,248	0,317	0,274	0,0232	0,0292
	OVX-Diät	0,277	0,216	0,430	0,260	0,0683	0,0681
	OVX-Diät-Steroid	0,263	0,226	0,316	0,261	0,0309	0,0545
<b>Mean osteocyte number [1/<math>\mu\text{m}^3</math>]</b>	Kontrolle	0,0000230	0,00002	0,00003	0,0000228	0,00000279	0,00001
	OVX	0,0000176	0,00001	0,00002	0,0000170	0,00000379	0,00001
	OVX-Diät	0,0000189	0,00001	0,00003	0,0000173	0,00000550	0,00001
	OVX-Diät-Steroid	0,0000197	0,00001	0,00003	0,0000199	0,00000510	0,00001
<b>Mean osteocyte volume [<math>\mu\text{m}^3</math>]</b>	Kontrolle	184,6	148,2	290,1	166,9	48,9	59,2
	OVX	147,9	91,9	284,7	144,1	65,3	58,1

	OVX-Diät	156,8	110,6	260,4	148,8	48,2	58,5
	OVX-Diät-Steroid	158,4	118,9	183,9	164,6	26,6	53,2

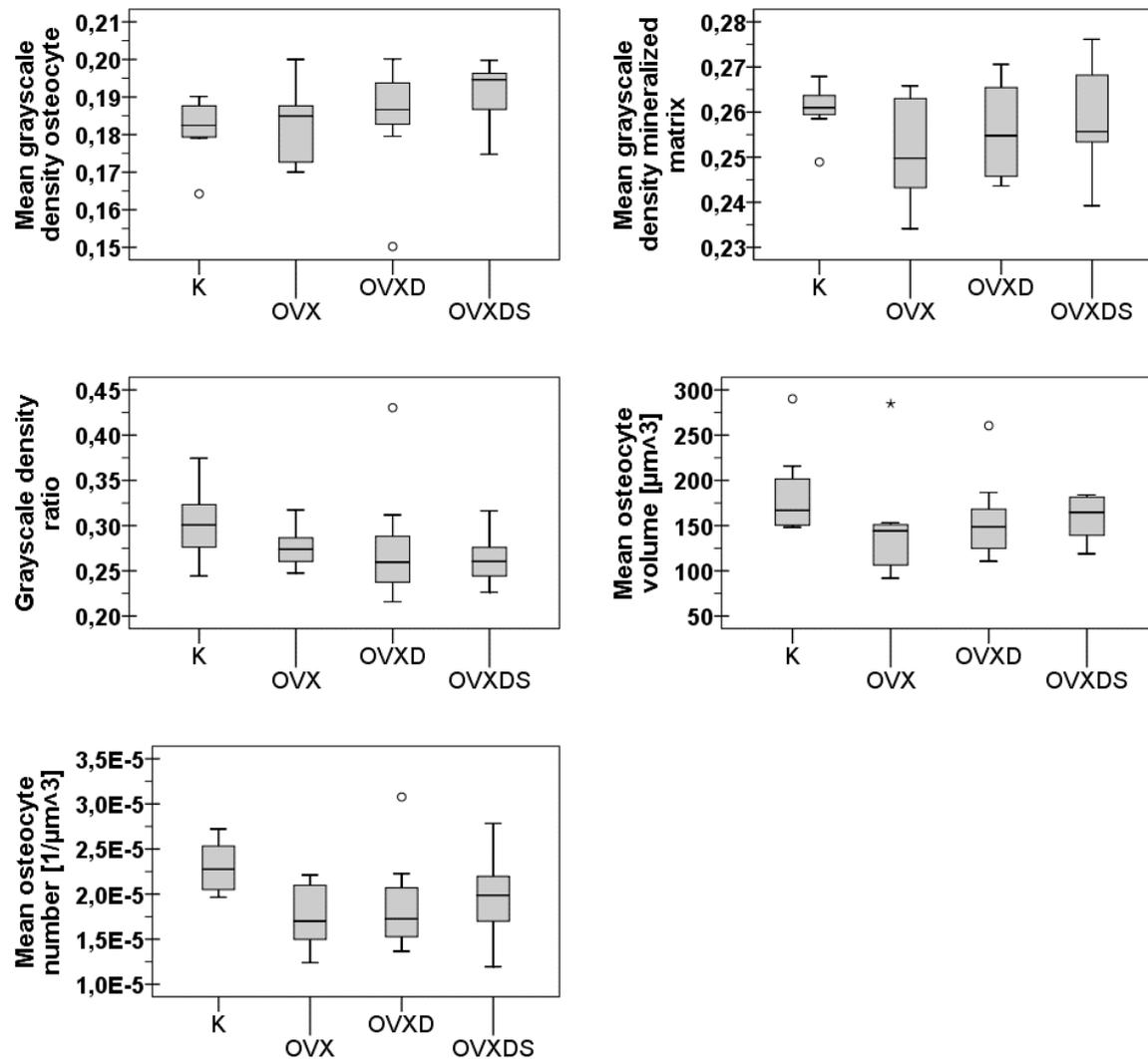
**Tabelle 18: Ergebnisse der deskriptiven Statistik der peripheren Osteozytenlakunen der LWK 2-Trabekel des Untersuchungskollektivs "Adultes Schafmodell".** Dargestellt sind Hypothese bezogene Strukturparameter mit gerundeten Werten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit fehlen Signifikanzangaben zur komplexen Hypothesentestung und studienspezifische Fallzahlen sind dem Kapitel 2.2 zu entnehmen.

Strukturparameter	Gruppe	Mittelwert	Minimum	Maximum	Median	Standard-abweichung	Interquartil-bereich
<b>Grayscale density ratio</b>	Kontrolle	0,304	0,243	0,386	0,299	0,0452	0,0660
	OVX	0,271	0,228	0,314	0,269	0,0293	0,0506
	OVX-Diät	0,267	0,211	0,422	0,256	0,0661	0,0444
	OVX-Diät-Steroid	0,249	0,214	0,299	0,237	0,0306	0,0519
<b>Mean osteocyte number [1/μm<sup>3</sup>]</b>	Kontrolle	0,0000249	0,00002	0,00003	0,0000243	0,00000394	0,00001
	OVX	0,0000173	0,00001	0,00003	0,0000162	0,00000542	0,00001
	OVX-Diät	0,0000226	0,00001	0,00004	0,0000212	0,00000723	0,00001
	OVX-Diät-Steroid	0,0000222	0,00001	0,00003	0,0000215	0,00000514	0,00001
<b>Mean osteocyte volume [μm<sup>3</sup>]</b>	Kontrolle	149,8	99,5	205,2	145,0	30,1	28,0
	OVX	129,1	52,9	208,1	109,3	58,5	108,4
	OVX-Diät	114,1	72,6	160,3	113,5	25,7	28,2
	OVX-Diät-Steroid	140,2	100,6	180,3	150,0	29,6	46,2

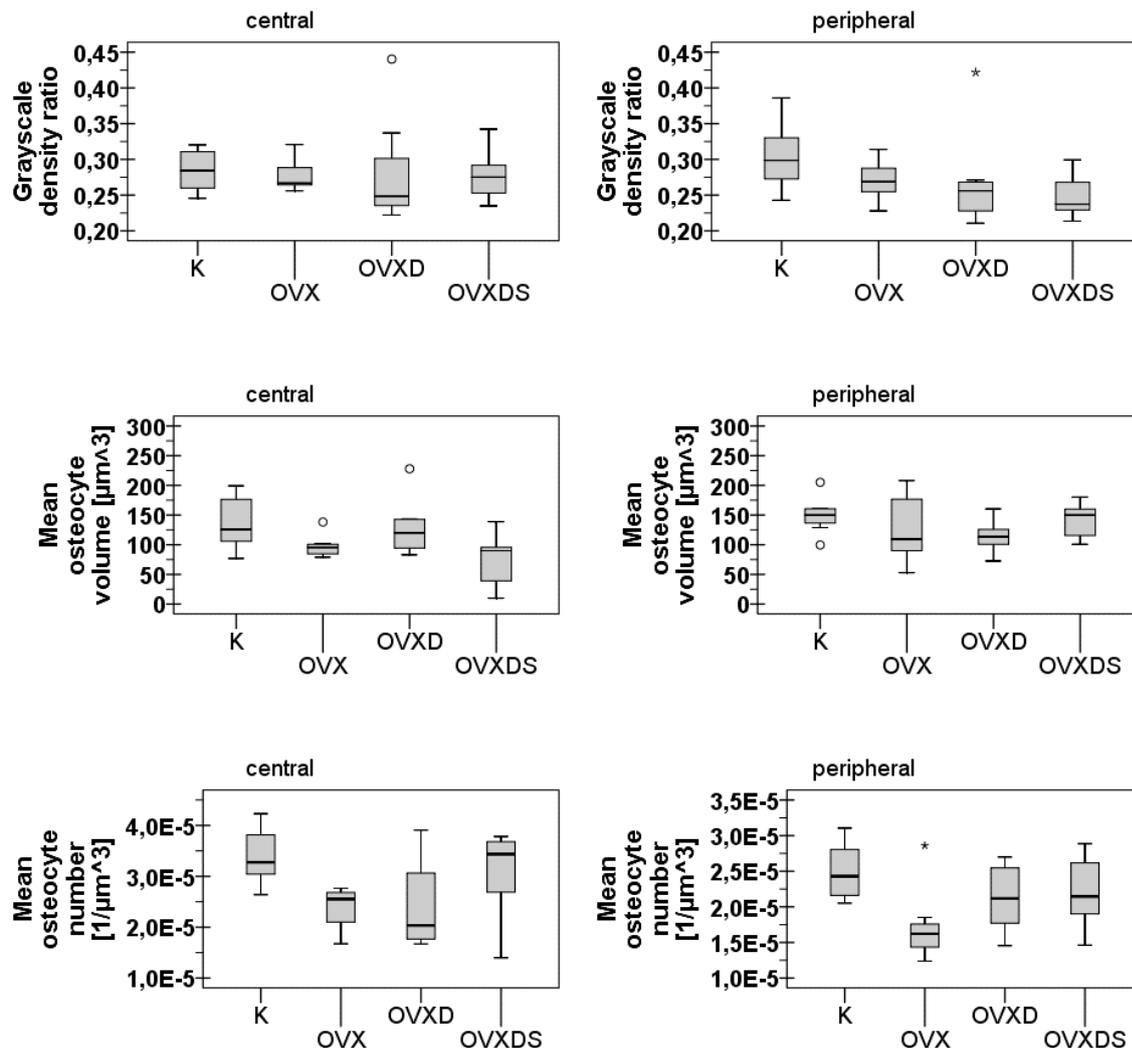
**Tabelle 19: Ergebnisse der deskriptiven Statistik der zentralen Osteozytenlakunen der LWK 2-Trabekel des Untersuchungskollektivs "Adultes Schafmodell".** Dargestellt sind Hypothese bezogene Strukturparameter mit gerundeten Werten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit fehlen Signifikanzangaben zur komplexen Hypothesentestung und studienspezifische Fallzahlen sind dem Kapitel 2.2 zu entnehmen.

Strukturparameter	Gruppe	Mittelwert	Minimum	Maximum	Median	Standardabweichung	Interquartilbereich
<b>Grayscale density ratio</b>	Kontrolle	0,285	0,246	0,320	0,284	0,0294	0,0586
	OVX	0,278	0,256	0,321	0,267	0,0242	0,0401
	OVX-Diät	0,279	0,222	0,440	0,248	0,0742	0,0865
	OVX-Diät-Steroid	0,277	0,235	0,342	0,275	0,0365	0,0581
<b>Mean osteocyte number [1/<math>\mu\text{m}^3</math>]</b>	Kontrolle	0,0000339	0,00003	0,00004	0,0000327	0,00000563	0,00001
	OVX	0,0000310	0,00002	0,00008	0,0000255	0,0000215	0,00001
	OVX-Diät	0,0000241	0,00002	0,00004	0,0000204	0,00000918	0,00002
	OVX-Diät-Steroid	0,0000354	0,00001	0,00007	0,0000344	0,0000186	0,00002
<b>Mean osteocyte volume [<math>\mu\text{m}^3</math>]</b>	Kontrolle	136,4	76,9	199,0	125,8	44,6	87,0
	OVX	97,6	78,9	138,2	95,4	19,8	17,6
	OVX-Diät	128,1	83,1	228,0	119,9	46,2	52,4
	OVX-Diät-Steroid	72,6	9,95	138,9	89,9	46,2	79,8

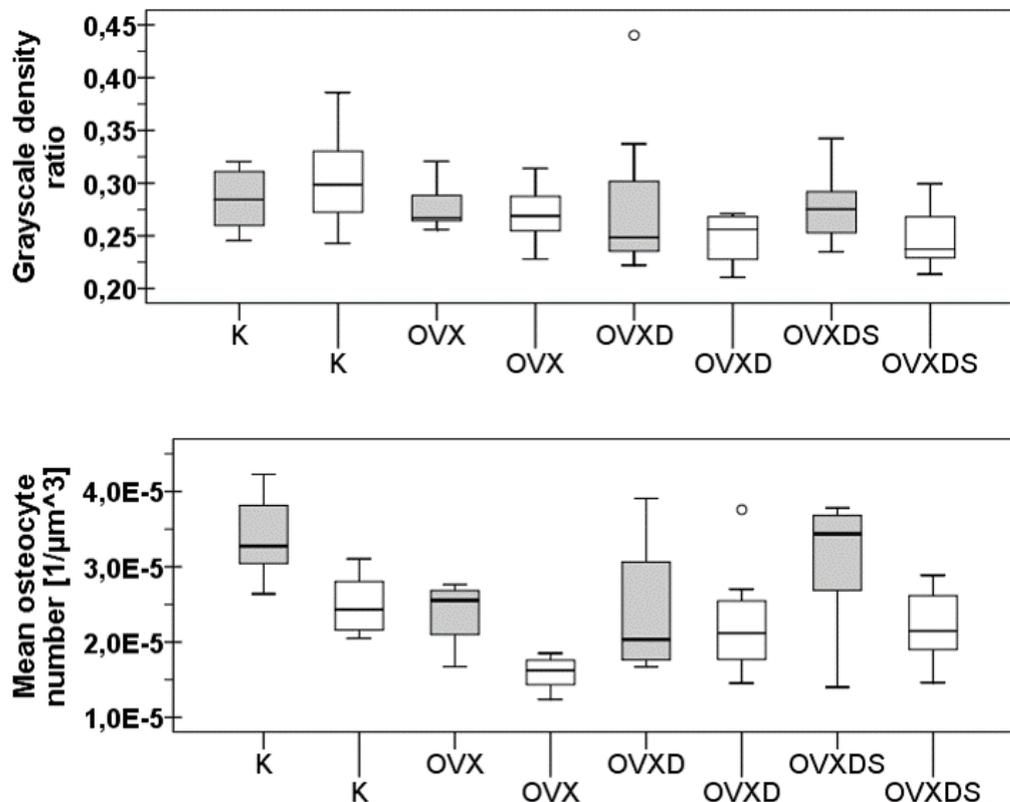
8.6.3 Adultes Großtiermodell – Ergebnisgrafiken zu den LWK 2-Trabekel



**Abbildung 34: Ergebnisse der statistischen Analyse der gesamten Osteozytenlakunen und Grauwertverteilungen zwischen den Gruppen der LWK 2-Trabekel des adulten Großtiermodells.** Parametrisch dargestellt sind: Graustufenverteilung der Zellokune (mean grayscale density osteocyte) sowie der umliegenden mineralisierten Matrix (mean grayscale density mineralized matrix) und zugehörige Relation R (grayscale density ratio), zelluläre Durchschnittsvolumen (mean osteocyte volume) und mittlere Anzahl der Osteozyten pro  $\mu\text{m}^3$  (mean osteocyte number). Das Untersuchungskollektiv ist auf der Abszissenachse gruppiert – K = Kontroll-Gruppe, OVX = OVX-Gruppe, OVXD = OVX + DD-Gruppe, OVXDS = OVX + DD + Steroid-Gruppe – und in den Diagrammen grau kodiert. Für eine übersichtliche Ergebnisdarstellung sind statistische Charakteristika dem Kapitel 4.5 und Erläuterungen zu den Parametern der Tabelle 2 zu entnehmen. Weitere Statistikwerte sind unter 8.6.2 tabellarisch aufgeführt.



**Abbildung 35: Ergebnisse der statistischen Analyse der ortsspezifischen Osteozytenlakunen und Grauwertverteilungen zwischen den Gruppen der LWK 2-Trabekel des adulten Großtiermodells.** Parametrisch dargestellt sind: Relation R der Graustufenverteilung (grayscale density ratio), zelluläre Durchschnittsvolumen (mean osteocyte volume) und mittlere Anzahl der Osteozyten pro  $\mu\text{m}^3$  (mean osteocyte number). Das Untersuchungskollektiv ist auf der Abszissenachse gruppiert – K = Kontroll-Gruppe, OVX = OVX-Gruppe, OVXD = OVX + DD-Gruppe, OVXDS = OVX + DD + Steroid-Gruppe – und in den Diagrammen grau kodiert. Die linke Spalte beinhaltet die Datenanalyse bezüglich der zentralen Zelllakunen. Korrespondierend hierzu finden sich rechts die Peripheren. Für eine übersichtliche Ergebnisdarstellung sind statistische Charakteristika dem Kapitel 4.5 und Erläuterungen zu den Parametern der Tabelle 2 zu entnehmen. Weitere Statistikwerte sind unter 8.6.2 tabellarisch aufgeführt.



**Abbildung 36: Ergebnisse der statistischen Analyse der Osteozytenlakunen und Grauwertverteilungen nach Ortsspezifität innerhalb der Gruppen der LWK 2-Trabekel des adulten Großtiermodells.** Parametrisch dargestellt sind die Relation R der Graustufenverteilung (grayscale density ratio) und die mittlere Anzahl der Osteozyten pro  $\mu\text{m}^3$  (mean osteocyte number). Das Untersuchungskollektiv ist auf der Abszissenachse gruppiert – K = Kontroll-Gruppe, OVX = OVX-Gruppe, OVXD = OVX + DD-Gruppe, OVXDS = OVX + DD + Steroid-Gruppe. Graphisch sind die gruppenspezifischen Zelllakunen entsprechend ihrer Lokalisation farblich kodiert – grau für die zentralen und weiß für die peripheren Osteozyten. Für eine übersichtliche Ergebnisdarstellung sind statistische Charakteristika dem Kapitel 4.5 und Erläuterungen zu den Parametern der Tabelle 2 zu entnehmen. Weitere Statistikwerte sind unter 8.6.2 tabellarisch aufgeführt.

## 8.7 Software-Arbeitsprotokolle der Datenakquisition

Es folgen probenadaptierte Logfiles der Computertomographen in kopierter Form:

- **T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_Femur\_re\_rec.log**

<p>[System]</p> <p>Scanner=SkyScan1173</p> <p>Instrument S/N=10C05012</p> <p>Hardware version=A</p> <p>Software=Version 1. 6 (build 18)</p> <p>Home directory=C:\Skyscan</p> <p>Source Type=Hamamatsu 130/300</p> <p>Camera=FlatPanel Sensor</p> <p>Camera Pixel Size (um)=50.0</p> <p>CameraXYRatio=0.9520</p> <p>Incl.in lifting (um/mm)=0.5300</p> <p>[Acquisition]</p> <p>Data directory=C:\Results\T1-Rat-te\T1_Rat_1_1_Sham_0M_Femur_re\RAW_tif</p> <p>Filename Prefix=T1_Rat_1_1_Sham_0M_Femur_re_</p> <p>Number of Files= 960</p> <p>Source Voltage (kV)= 80</p> <p>Source Current (uA)= 100</p> <p>Number of Rows= 2240</p> <p>Number of Columns= 1568</p> <p>Image crop origin X= 336</p> <p>Image crop origin Y=0</p> <p>Camera binning=1x1</p> <p>Image Rotation=-0.0630</p> <p>Gantry direction=CC</p> <p>Number of connected scans=1</p>	<p>Image Pixel Size (um)=9.957262</p> <p>Object to Source (mm)=73.787</p> <p>Camera to Source (mm)=364.000</p> <p>Vertical Object Position (mm)=70.000</p> <p>Optical Axis (line)=1118</p> <p>Filter=Al 1.0mm</p> <p>Image Format=TIFF</p> <p>Depth (bits)=16</p> <p>Screen LUT=0</p> <p>Exposure (ms)= 750</p> <p>Rotation Step (deg)=0.250</p> <p>Frame Averaging=ON (4)</p> <p>Random Movement=ON (20)</p> <p>Use 360 Rotation=NO</p> <p>Partial width=70</p> <p>FF updating interval=450</p> <p>Geometrical Correction=OFF</p> <p>Camera Offset=OFF</p> <p>Median Filtering=OFF</p> <p>Flat Field Correction=ON</p> <p>Rotation Direction=CC</p> <p>Scanning Trajectory=ROUND</p> <p>Type Of Motion=STEP AND SHOOT</p> <p>Study Date and Time=Feb 09, 2016 10:54:19</p> <p>Scan duration=01:12:44</p> <p>Maximum vertical TS=5.0</p> <p>[Reconstruction]</p> <p>Reconstruction Program=NRecon</p>
--	---

Program Version=Version: 1.6.10.4  
 Program Home Directory=C:\Program Files\Skyscan\NRecon  
 Reconstruction engine=GPUReconServer  
 Engine version=Version: 1.6.10  
 Reconstruction from batch=Yes  
 Postalignment=4.00  
 Reconstruction servers= FB11-10581  
 Dataset Origin=SkyScan1173  
 Dataset Prefix=T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_Femur\_re\_  
 Dataset Directory=D:\Results\SFB\_Projekt\T1\Förderperiode-2\Ratten\Gruppe\_1\_Sham\_0M\T1\_A15044\_45\_Rat\_1\T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_Femur\_re\RAW\_tif  
 Output Directory=D:\Results\SFB\_Projekt\T1\Förderperiode-2\Ratten\Gruppe\_1\_Sham\_0M\T1\_A15044\_45\_Rat\_1\T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_Femur\_re\2d\_bmp  
 Time and Date=Feb 09, 2016 17:55:30  
 First Section=200  
 Last Section=2121  
 Reconstruction duration per slice (seconds)=0.462019  
 Total reconstruction time (1922 slices) in seconds=888.000000  
 Section to Section Step=1  
 Sections Count=1922  
 Result File Type=BMP  
 Result File Header Length (bytes)=1134  
 Result Image Width (pixels)=1212  
 Result Image Height (pixels)=1164  
 Pixel Size (um)=9.96075  
 Reconstruction Angular Range (deg)=240.00  
 Use 180+=OFF  
 Angular Step (deg)=0.2500  
 Smoothing=1  
 Smoothing kernel=2 (Gaussian)  
 Ring Artifact Correction=5  
 Draw Scales=OFF  
 Object Bigger than FOV=OFF  
 Reconstruction from ROI=ON  
 ROI Top (pixels)=1316  
 ROI Bottom (pixels)=149  
 ROI Left (pixels)=200  
 ROI Right (pixels)=1412  
 ROI reference length=1568  
 Filter cutoff relative to Nyquist frequency=100  
 Filter type=0  
 Filter type description=Hamming (Alpha=0.54)  
 Undersampling factor=1  
 Threshold for defect pixel mask (%)=0  
 Beam Hardening Correction (%)=35  
 CS Static Rotation (deg)=0.00  
 Minimum for CS to Image Conversion=0.000000  
 Maximum for CS to Image Conversion=0.030000  
 HU Calibration=OFF  
 BMP LUT=0  
 Cone-beam Angle Horiz.(deg)=12.082794  
 Cone-beam Angle Vert.(deg)=17.195156  
 [File name convention]  
 Filename Index Length=4  
 Filename Prefix=T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_Femur\_re\_\_re\_c

- **T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_Tibia\_re\_rec.log**

[System]

Scanner=SkyScan1173  
 Instrument S/N=10C05012  
 Hardware version=A  
 Software=Version 1. 6 (build 18)  
 Home directory=C:\Skyscan  
 Source Type=Hamamatsu 130/300  
 Camera=FlatPanel Sensor  
 Camera Pixel Size (um)=50.0  
 CameraXYRatio=0.9520  
 Incl.in lifting (um/mm)=0.5300

[Acquisition]

Data directory=C:\Results\T1-Rat-te\T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_Tibia\_re\RAW\_tif

Filename Prefix=T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_Tibia\_re\_

Number of Files= 960  
 Source Voltage (kV)= 80  
 Source Current (uA)= 100  
 Number of Rows= 2240  
 Number of Columns= 2240  
 Image crop origin X= 0  
 Image crop origin Y=0  
 Camera binning=1x1  
 Image Rotation=-0.0630  
 Gantry direction=CC  
 Number of connected scans=1  
 Image Pixel Size (um)=9.957262  
 Object to Source (mm)=73.787  
 Camera to Source (mm)=364.000

Vertical Object Position (mm)=91.000  
 Optical Axis (line)=1118  
 Filter=Al 1.0mm  
 Image Format=TIFF  
 Depth (bits)=16  
 Screen LUT=0  
 Exposure (ms)= 750  
 Rotation Step (deg)=0.250  
 Frame Averaging=ON (4)  
 Random Movement=ON (20)  
 Use 360 Rotation=NO  
 Partial width=64  
 FF updating interval=450  
 Geometrical Correction=OFF  
 Camera Offset=OFF  
 Median Filtering=OFF  
 Flat Field Correction=ON  
 Rotation Direction=CC  
 Scanning Trajectory=ROUND  
 Type Of Motion=STEP AND SHOOT  
 Study Date and Time=Feb 09, 2016 09:06:12  
 Scan duration=01:12:38  
 Maximum vertical TS=5.0  
 [Reconstruction]  
 Reconstruction Program=NRecon  
 Program Version=Version: 1.6.10.4  
 Program Home Directory=C:\Program Files\Skyscan\NRecon  
 Reconstruction engine=GPUReconServer  
 Engine version=Version: 1.6.10  
 Reconstruction from batch=Yes  
 Postalignment=3.00

Reconstruction servers= FB11-10581  
 Dataset Origin=SkyScan1173  
 Dataset Prefix=T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_Tibia\_re\_  
 Dataset Directory=D:\Results\SFB\_Projekt\T1\Förderperiode-2\Ratten\Gruppe\_1\_Sham\_0M\T1\_A15044\_45\_Rat\_1\T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_Tibia\_re\RAW\_tif  
 Output Directory=D:\Results\SFB\_Projekt\T1\Förderperiode-2\Ratten\Gruppe\_1\_Sham\_0M\T1\_A15044\_45\_Rat\_1\T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_Tibia\_re\2d\_bmp  
 Time and Date=Feb 09, 2016 18:32:31  
 First Section=167  
 Last Section=2071  
 Reconstruction duration per slice (seconds)=1.164304  
 Total reconstruction time (1905 slices) in seconds=2218.000000  
 Section to Section Step=1  
 Sections Count=1905  
 Result File Type=BMP  
 Result File Header Length (bytes)=1134  
 Result Image Width (pixels)=2104  
 Result Image Height (pixels)=2104  
 Pixel Size (um)=9.96075  
 Reconstruction Angular Range (deg)=240.00  
 Use 180+=OFF  
 Angular Step (deg)=0.2500  
 Smoothing=1  
 Smoothing kernel=2 (Gaussian)  
 Ring Artifact Correction=5  
 Draw Scales=OFF  
 Object Bigger than FOV=OFF  
 Reconstruction from ROI=ON  
 ROI Top (pixels)=2198  
 ROI Bottom (pixels)=93  
 ROI Left (pixels)=61  
 ROI Right (pixels)=2166  
 ROI reference length=2240  
 Filter cutoff relative to Nyquist frequency=100  
 Filter type=0  
 Filter type description=Hamming (Alpha=0.54)  
 Undersampling factor=1  
 Threshold for defect pixel mask (%)=0  
 Beam Hardening Correction (%)=35  
 CS Static Rotation (deg)=0.00  
 Minimum for CS to Image Conversion=0.000000  
 Maximum for CS to Image Conversion=0.030000  
 HU Calibration=OFF  
 BMP LUT=0  
 Cone-beam Angle Horiz.(deg)=17.195156  
 Cone-beam Angle Vert.(deg)=17.195156  
 [File name convention]  
 Filename Index Length=4  
 Filename Prefix=T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_Tibia\_re\_\_rec

- **T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_TH8\_9\_10\_rec.log**

[System]

Scanner=SkyScan1173  
 Instrument S/N=10C05012  
 Hardware version=A  
 Software=Version 1. 6 (build 18)  
 Home directory=C:\Skyscan  
 Source Type=Hamamatsu 130/300  
 Camera=FlatPanel Sensor  
 Camera Pixel Size (um)=50.0  
 CameraXYRatio=0.9520  
 Incl.in lifting (um/mm)=0.5300

[Acquisition]

Data directory=C:\Results\T1-Rat-  
 te\T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_TH8\_9\_10\RA  
 W\_tif

Filename Prefix=T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_TH8\_9\_10\_

Number of Files= 960  
 Source Voltage (kV)= 80  
 Source Current (uA)= 100  
 Number of Rows= 2240  
 Number of Columns= 2016  
 Image crop origin X= 112  
 Image crop origin Y=0  
 Camera binning=1x1  
 Image Rotation=-0.0630  
 Gantry direction=CC  
 Number of connected scans=1  
 Image Pixel Size (um)=9.957262  
 Object to Source (mm)=73.787  
 Camera to Source (mm)=364.000

Vertical Object Position (mm)=89.500  
 Optical Axis (line)=1118  
 Filter=Al 1.0mm  
 Image Format=TIFF  
 Depth (bits)=16  
 Screen LUT=0  
 Exposure (ms)= 750  
 Rotation Step (deg)=0.250  
 Frame Averaging=ON (4)  
 Random Movement=ON (20)  
 Use 360 Rotation=NO  
 Partial width=90  
 FF updating interval=450  
 Geometrical Correction=OFF  
 Camera Offset=OFF  
 Median Filtering=OFF  
 Flat Field Correction=ON  
 Rotation Direction=CC  
 Scanning Trajectory=ROUND  
 Type Of Motion=STEP AND SHOOT  
 Study Date and Time=Feb 09, 2016  
 13:25:37  
 Scan duration=01:12:37  
 Maximum vertical TS=5.0

[Reconstruction]

Reconstruction Program=NRecon  
 Program Version=Version: 1.6.10.4  
 Program Home Directory=C:\Program  
 Files\Skyscan\NRecon  
 Reconstruction engine=GPUReconServer  
 Engine version=Version: 1.6.10  
 Reconstruction from batch=Yes  
 Postalignment=-2.00

Reconstruction servers= FB11-10581  
 Dataset Origin=SkyScan1173  
 Dataset Prefix=T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_TH8\_9\_10\_  
 Dataset Directory=D:\Results\SFB\_Projekt\T1\Förderperiode-2\Ratten\Gruppe\_1\_Sham\_0M\T1\_A15044\_45\_Rat\_1\T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_TH8\_9\_10\RAW\_tif  
 Output Directory=D:\Results\SFB\_Projekt\T1\Förderperiode-2\Ratten\Gruppe\_1\_Sham\_0M\T1\_A15044\_45\_Rat\_1\T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_TH8\_9\_10\2d\_bmp  
 Time and Date=Feb 09, 2016 18:53:42  
 First Section=240  
 Last Section=1885  
 Reconstruction duration per slice (seconds)=0.769745  
 Total reconstruction time (1646 slices) in seconds=1267.000000  
 Section to Section Step=1  
 Sections Count=1646  
 Result File Type=BMP  
 Result File Header Length (bytes)=1134  
 Result Image Width (pixels)=1624  
 Result Image Height (pixels)=1624  
 Pixel Size (um)=9.96075  
 Reconstruction Angular Range (deg)=240.00  
 Use 180+=OFF  
 Angular Step (deg)=0.2500  
 Smoothing=1  
 Smoothing kernel=2 (Gaussian)  
 Ring Artifact Correction=5  
 Draw Scales=OFF  
 Object Bigger than FOV=OFF  
 Reconstruction from ROI=ON  
 ROI Top (pixels)=1902  
 ROI Bottom (pixels)=276  
 ROI Left (pixels)=137  
 ROI Right (pixels)=1763  
 ROI reference length=2016  
 Filter cutoff relative to Nyquist frequency=100  
 Filter type=0  
 Filter type description=Hamming (Alpha=0.54)  
 Undersampling factor=1  
 Threshold for defect pixel mask (%)=0  
 Beam Hardening Correction (%)=35  
 CS Static Rotation (deg)=170.00  
 Minimum for CS to Image Conversion=0.000000  
 Maximum for CS to Image Conversion=0.030000  
 HU Calibration=OFF  
 BMP LUT=0  
 Cone-beam Angle Horiz.(deg)=15.497667  
 Cone-beam Angle Vert.(deg)=17.195156  
 [File name convention]  
 Filename Index Length=4  
 Filename Prefix=T1\_Rat\_1\_1\_Sham\_0M\_TH8\_9\_10\_\_re  
 c

- **T1\_K1\_68489\_Femur\_li\_prox\_  
\_rec.log**

[System]

Scanner=SkyScan1173  
 Instrument S/N=10C05012  
 Hardware version=A  
 Software=Version 1. 6 (build 14)  
 Home directory=C:\Skyscan  
 Source Type=Hamamatsu 130/300  
 Camera=FlatPanel Sensor  
 Camera Pixel Size (um)=50.0  
 CameraXYRatio=0.9520  
 Incl.in lifting (um/mm)=0.5300

[Acquisition]

Data directory=C:\Results\T1\_Schafe\T1\_K1\_68489\_Femur\_li\_prox\RAW\_tif  
 Filename Prefix=T1\_K1\_68489\_Femur\_li\_prox\_ Pre-  
 Number of Files= 1200  
 Source Voltage (kV)= 130  
 Source Current (uA)= 60  
 Number of Rows= 2240  
 Number of Columns= 2016  
 Image crop origin X= 112  
 Image crop origin Y=0  
 Camera binning=1x1  
 Image Rotation=-0.0530  
 Gantry direction=CC  
 Number of connected scans=1  
 Image Pixel Size (um)= 33.07  
 Object to Source (mm)=245.063  
 Camera to Source (mm)=364.000  
 Vertical Object Position (mm)=45.000

Optical Axis (line)=1118  
 Filter=brass 0.25mm  
 Image Format=TIFF  
 Depth (bits)=16  
 Screen LUT=0  
 Exposure (ms)= 1150  
 Rotation Step (deg)=0.200  
 Frame Averaging=ON (4)  
 Random Movement=ON (20)  
 Use 360 Rotation=NO  
 Partial width=90  
 FF updating interval=448  
 Geometrical Correction=OFF  
 Camera Offset=OFF  
 Median Filtering=OFF  
 Flat Field Correction=ON  
 Rotation Direction=CC  
 Scanning Trajectory=ROUND  
 Type Of Motion=STEP AND SHOOT  
 Study Date and Time=Apr 02, 2014 13:31:50  
 Scan duration=01:56:19  
 [Reconstruction]  
 Reconstruction Program=NRecon  
 Program Version=Version: 1.6.9.4  
 Program Home Directory=C:\Program Files\Skyscan\NRecon  
 Reconstruction engine=GPUReconServer  
 Engine version=Version: 1.6.9  
 Reconstruction from batch=Yes  
 Postalignment=0.50  
 Reconstruction servers= FB11-10581  
 Option for additional F4F float format=OFF

Dataset Origin=SkyScan1173

Dataset Prefix=T1\_K1\_68489\_Femur\_li\_prox\_

Dataset Directory=D:\Results\SFB\_Projekt\T1\Osteoporose\_Schafe\_17102012\Femur\_li\Femur\_li\_prox\T1\_K1\_68489\_Femur\_li\_prox\RAW\_tif

Output Directory=D:\Results\SFB\_Projekt\T1\Osteoporose\_Schafe\_17102012\Femur\_li\Femur\_li\_prox\T1\_K1\_68489\_Femur\_li\_prox\2d\_bmp

Time and Date=Apr 03, 2014 10:03:09

First Section=150

Last Section=2087

Reconstruction duration per slice (seconds)=0.903509

Total reconstruction time (1938 slices) in seconds=1751.000000

Section to Section Step=1

Sections Count=1938

Result File Type=BMP

Result File Header Length (bytes)=1134

Result Image Width (pixels)=2016

Result Image Height (pixels)=1368

Pixel Size (um)=33.07316

Reconstruction Angular Range (deg)=240.00

Use 180+=OFF

Angular Step (deg)=0.2000

Smoothing=2

Smoothing kernel=2 (Gaussian)

Ring Artifact Correction=6

Draw Scales=OFF

Object Bigger than FOV=OFF

Reconstruction from ROI=ON

ROI Top (pixels)=1681

ROI Bottom (pixels)=312

ROI Left (pixels)=2

ROI Right (pixels)=2019

ROI reference length=2016

Filter cutoff relative to Nyquist frequency=100

Filter type=0

Filter type meaning(1)=0: Hamming (Ramp in case of optical scanner); 1: Hann; 2: Ramp; 3: Almost Ramp;

Filter type meaning(2)=11: Cosine; 12: Shepp-Logan; [100,200]: Generalized Hamming, alpha=(iFilter-100)/100

Undersampling factor=1

Threshold for defect pixel mask (%)=0

Beam Hardening Correction (%)=35

CS Static Rotation (deg)=40.00

Minimum for CS to Image Conversion=0.000000

Maximum for CS to Image Conversion=0.009000

HU Calibration=OFF

BMP LUT=0

Cone-beam Angle Horiz.(deg)=15.493632

Cone-beam Angle Vert.(deg)=17.190693

[File name convention]

Filename Index Length=4

Filename Prefix=T1\_K1\_68489\_Femur\_li\_prox\_\_rec

- **Na-no\_T1\_K1\_68489\_L2\_1a\_rec.log**

[System]

Scanner=Skyscan2011  
 Instrument S/N=008  
 Hardware version=2.3  
 Software=Version 2. 7 (build 1)  
 Home Directory=C:\SkyScan  
 Source Type=Tohken/0.3um  
 Camera Pixel Size (um)=10.45  
 Camera X/Y Ratio=1.0000

[Acquisition]

Source Voltage (kV)= 50  
 Source Current (uA)= 160  
 Optical Axis (line)= 390  
 Filter=No filter  
 Object to Source (mm)=10.200  
 Camera to Source (mm)=152.240

Data Directory=D:\results\Kampschulte\Nano-T1-L2-  
 Tra-  
 bekel\Nano\_T1\_K1\_68489\_L2\_1a\RAW\_tif

Filename Prefix=Nano\_T1\_K1\_68489\_L2\_1a\_

Number Of Files= 926  
 Number Of Rows= 1024  
 Number Of Columns= 1280  
 Image Pixel Size (um)=0.70  
 Image Format=TIFF  
 Depth (bits)=16  
 Screen LUT=0  
 Exposure (ms)=2000  
 Frame Averaging=ON (6)

Rotation Step (deg)=0.200  
 Use 360 Rotation=NO  
 Flat Field Correction=ON  
 Rotation Direction=CC  
 Type of Detector Motion=STEP AND SHOOT  
 Scanning Trajectory=ROUND  
 Study Date and Time=Sep 22, 2015 15:37:21  
 Scan duration=03:12:37  
 Maximum vertical TS=2.0  
 Maximum horizontal TS=8.0  
 TS modified at=September22,15:46:51 --- 926 of 926 projections

[Reconstruction]

Reconstruction Program=NRecon  
 Program Version=Version: 1.6.10.4  
 Program Home Directory=C:\Program Files\Skyscan\NRecon  
 Reconstruction engine=GPUReconServer  
 Engine version=Version: 1.6.10  
 Reconstruction from batch=Yes  
 Postalignment=2.00  
 Reconstruction servers= FB11-10581  
 Dataset Origin=Skyscan2011  
 Dataset Prefix=Nano\_T1\_K1\_68489\_L2\_1a\_  
 Dataset Directory=N:\T1\_Schafe\L2\_16mm\_Bloecke\Nano-CT\Nano-T1-L2-  
 Trab-  
 ekel\Kontrolle\Nano\_T1\_K1\_68489\_L2\_1a\RAW\_tif  
 Output Directory=\\Fb11-10247\results\_1\SFB\_Projekt\T1-Schafe\WK\_L2\_16mm\_Bloecke\Nano-CT\Nano-T1-L2-  
 Trab-  
 ekel\Kontrolle\Nano\_T1\_K1\_68489\_L2\_1a\2d\_bmp\_neu



## 9 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

## Originalarbeiten:

- I. V. Mutsenko, S. Knaack, L. Lauterboeck, D. Tarusin, B. Sydykov, R. Cabisco, D. Ivnev, **J. Belikan**, A. Beck, D. Dipresa, A. Lode, T. El Khassawna, M. Kampschulte, R. Scharf, A.Y. Petrenko, S. Korossis, W.F. Wolkers, M. Gelinsky, B. Glasmacher, O. Gryshkov. *Effect of 'in air' freezing on post-thaw recovery of Callithrix jacchus mesenchymal stromal cells and properties of 3D collagen-hydroxyapatite-scaffolds*, *Cryobiology* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.01.015>.
- II. Die Ergebnisse des vorliegenden Studienkollektivs des Kleintiermodells sind Teil der in Vorbereitung befindlichen Publikation mit dem Arbeitstitel „*Ovariectomized senile rats as a model of post-menopausal osteoporosis: establishment and characterization*“ von Deeksha Malhan, Fathi Hassan, Sabine Stoetzel, Reem Jamous, Elena Neumann, Marian Kampschulte, **Jan Belikan**, Gabriele A Krombach, Lutz Dürselen, Anita Ignatius, Felix Schulze, Angela Rösen-Wolff, NataliBauer, Agnes Gläsel, David Ledieu, Christoph Biehl, Christian Heiss und Thaqif El Khassawna.

## Poster / Vorträge:

- I. **Jan D. Belikan**, Thaqif El Khassawna, Christian Heiß, Gabriele A. Krombach, Marian Kampschulte (2020). *Genveränderte Knochenmikroarchitektur: Eine Mikro-CT-basierte Studie am TPH2-Knockout-Rattenmodell*. Poster – Wissenschaft, 101. Deutscher Röntgenkongress (2020).
- II. D. Malhan, S. Kern, M. Kampschulte, **J. Belikan**, F. Schulze, A. Rösen-Wolff, C. Heiss, T. El Khassawna (2018). *Lower bone quality and bone matrix degradation seen in senile rat osteoporotic model*. doi: 10.3205/18dkou716, meeting abstract, Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2018).
- III. D. E. S. Daghma, M. Bader, P. Peeva, N. Alenina, M. Kampschulte, **J. Belikan**, T. El Khassawna, C. Heiss (2018). *Tryptophan hydroxylase 2: a potential marker for bone mass regulation*. doi: 10.3205/18dkou530, meeting abstract, Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2018).

**10 EHRENWÖRTLICHE „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

## **11 DANKSAGUNG**

In diesem Abschnitt möchte ich meinen herzlichen Dank für die Entstehung dieser Arbeit aussprechen, denn ein vertrautes sowie gemeinschaftliches Arbeiten ist essentiell:

An allererster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. med. Marian Kampschulte. Durch seine Zusage wurde mir der lehrreiche Weg zur Dissertation ermöglicht. Seine wissenschaftliche Begeisterung überzeugt mich bis heute, weshalb meine Leidenschaft zur experimentellen Radiologie fortan besteht. Allzeitig unterstützte er mich tatkräftig und half mir durch seine persönlichen Anregungen zum Ziel. Ich weiß Deine Betreuung zu schätzen – vielen Dank.

Genauso bedanke ich mich recht herzlich bei unserer MTA, Frau Gunhild Martels. Mit ihrer kompetenten Beratung, fachlichen Unterstützung und vor allem präzisen Anfertigung der Mikro- sowie Nano-Computertomographie-Datensätze hatte sie eine unentbehrliche Basis für diese Promotionsschrift gelegt. Darüber hinaus sorgte sie stets für eine angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor. Herzlich möchte ich mich bei Frau Uni.-Prof. Dr. med. Gabriele A. Krombach für die Möglichkeit, in Ihrer Abteilung zu promovieren, bedanken. Herrn Dr. Martin Hardt, Leiter der Imaging Unit des Biomedizinischen Forschungszentrum Seltersberg, bedanke ich mich für die Nutzung der Räumlichkeiten im Rahmen der Trabekelpräparation. Herrn Dr. Johannes Herrmann bin ich für die Statistikberatung und das akribische Hinterfragen einzelner Testergebnisse sehr dankbar.

Ferner gilt ein Dank für die finanzielle Förderung der Tierversuche durch den Sonderforschungsbereich/Transregio 79 sowie die Deutsche Forschungsgemeinschaft, aber auch an Herrn PD Dr. rer. nat. Thaqif ElKhasawna des Labors für experimentelle Unfallchirurgie sowie Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß als Direktor der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie.

Schlussendlich möchte ich den größten Dank meiner Frau, Hannah Sophie Belikan, meinen Geschwistern, Miriam Meißner und Dr. med. Patrick Belikan, sowie meinen Eltern, welche mir die medizinische Laufbahn überhaupt ermöglicht hatten, widmen: Jegliche Eurer Motivation, aber auch ehrliche Einschätzung war eine zuverlässige Hilfe. Eure seelische und moralische Unterstützung in allen Lebenslagen ist unersetzbar!

**12 CURRICULUM VITAE**

Der Lebenslauf wurde aus der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the paper.