

**Osteodensitometrische und histomorphometrische  
Untersuchungen des Osteoporoseverlaufs im senilen  
Rattenmodell**

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

vorgelegt von Alexander Hiob  
aus Wolfenbüttel

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Justus-Liebig-Universität Gießen  
Experimentelle Unfallchirurgie

Gutachter: PD Dr. med. Christian Fölsch

Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg Engel

Tag der Disputation: 23. Juni 2022

*Für meine Eltern*

*Für Isabell*

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Grundlagen .....</b>	<b>2</b>
1.1.1	Das Knochen- und Skelettsystem .....	2
1.1.1.1	<b>Bestandteile des Knochens .....</b>	<b>3</b>
1.1.1.2	<b>Architektur des Knochens .....</b>	<b>4</b>
1.1.2	Osteoporose.....	8
1.1.2.1	<b>Risikofaktoren der Ausprägung einer Osteoporose .....</b>	<b>9</b>
1.1.3	Osteoporosediagnostik .....	11
1.1.3.1	<b>Dual Energy X Ray Absorptiometry (DXA).....</b>	<b>12</b>
1.1.3.2	<b>Quantitative Computertomographie (QCT).....</b>	<b>13</b>
1.1.3.3	<b>Quantitative Ultraschallmessung (QUS) .....</b>	<b>14</b>
1.1.3.4	<b>Konventionelle Röntgendiagnostik.....</b>	<b>14</b>
1.1.4	Einteilungen der Osteoporose .....	15
1.1.5	Epidemiologie .....	21
1.1.6	Knochenstoffwechsel.....	22
1.1.7	Differentialdiagnosen der Osteoporose.....	28
1.1.8	Osteoporosetherapie .....	29
1.2	<b>Fragestellung und Zielsetzung.....</b>	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methodik .....</b>	<b>33</b>
2.1	<b>Studiendesign .....</b>	<b>33</b>
2.2	<b>Ethikvotum.....</b>	<b>33</b>
2.3	<b>Tiermodell und Gruppen.....</b>	<b>33</b>
2.4	<b>Tierhaltung und Stallung .....</b>	<b>34</b>
2.5	<b>Fütterung .....</b>	<b>35</b>
2.6	<b>Operationstechnik.....</b>	<b>36</b>
2.7	<b>Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA).....</b>	<b>38</b>
2.8	<b>Präparation und Entkalkung der Proben.....</b>	<b>40</b>
2.9	<b>Anfertigung der Paraffinschnitte .....</b>	<b>41</b>
2.10	<b>Herstellung der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen.....</b>	<b>43</b>
2.11	<b>Histomorphometrie .....</b>	<b>43</b>
2.12	<b>Statistische Auswertungen .....</b>	<b>46</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>

<b>3.1</b>	<b>Ergebnisse der DXA-Messungen</b> .....	<b>47</b>
3.1.1	Deskriptive Statistik der Untergruppen.....	47
3.1.2	Varianzanalysen innerhalb der Untergruppen.....	53
3.1.3	Varianzanalysen zwischen den Untergruppen.....	54
<b>3.2</b>	<b>Histomorphometrie HE-gefärbter Präparate</b> .....	<b>56</b>
3.2.1	Trabekuläre Dicke.....	56
3.2.2	Trabekuläre Fläche.....	59
3.2.3	Lichtmikroskopische Analysen.....	62
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b>Studiendesign</b> .....	<b>67</b>
<b>4.2</b>	<b>Tiermodell</b> .....	<b>67</b>
4.2.1	Vergleich der Ratte zu anderen Spezies.....	70
4.2.2	Defizitäre Diät als Ergänzung zur Ovariectomie.....	70
4.2.3	Radiologisch-diagnostische Methoden zur Untersuchung des Knochenstatus.....	71
4.2.3.1	Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA).....	72
4.2.3.2	Vergleich von DXA zur pqCT und $\mu$ CT.....	73
<b>4.3</b>	<b>Knochendichte und -masse mit deren Regulation von Auf- und Abbau</b> .....	<b>73</b>
4.3.1	Validität der Knochendichteparameter.....	74
<b>4.4</b>	<b>Bewertung der deskriptiven Lichtmikroskopie</b> .....	<b>76</b>
<b>4.5</b>	<b>Histomorphometrische Analyse der Trabekeldicke</b> .....	<b>78</b>
<b>4.6</b>	<b>Histomorphometrische Analyse der Trabekelfläche</b> .....	<b>80</b>
<b>4.7</b>	<b>Analyse der lichtmikroskopischen Untersuchung</b> .....	<b>82</b>
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerung</b> .....	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>90</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>98</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>100</b>
<b>11</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis/Glossar</b> .....	<b>101</b>
	<b>Verzeichnis akademischer Lehrer</b> .....	<b>104</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>105</b>

**Erklärung zur Dissertation..... 106**

### 1 Einleitung

Die Osteoporose erlangt in unserer Gesellschaft immer mehr an Bedeutung. In der Bevölkerung finden steigendes Alter, Lebenswandel und osteoporose-begünstigende Medikationen einen Platz in den Gründen für die zunehmende Zahl an behandlungsbedürftigen Osteoporosen. Hierbei ist nicht nur der sozioökonomische Faktor zu berücksichtigen, sondern auch das subjektive Empfinden dieser Erkrankung mit ihrer Folge des Aktivitätsverlustes durch beispielweise Wirbelkörper- oder Femurfrakturen. In einer alternden Gesellschaft mit steigendem Anspruch an der Teilhabe am Alltag und den Freizeitaktivitäten ist diesbezüglich auf eine gute und frühe Therapie der Osteoporose zu achten. Die Medizin sieht hierbei eine Herausforderung, welche es zu meistern gilt.

Die Osteoporose ist eine chronische Erkrankung, die beide Geschlechter betrifft. Pathognomonisch sind hierbei Knochensubstanzverlust, Schmerzen und pathologische Frakturen durch die verminderte Belastbarkeit des Knochens. Es überwiegt hierbei der Anteil an betroffenen Frauen mit einer von drei Frauen über dem 50. Lebensjahr im Gegensatz zu den Männern mit einem von fünf Männern über dem 50. Lebensjahr [9], [73].

Des Weiteren ist die Anzahl an Osteoporose leidenden Patienten in den nächsten Jahren progredient. Im Jahr 2009 wurde eine Schätzung von der Techniker Krankenkasse erhoben, in der rund 3,3 Millionen osteoporose-assoziierte Frakturen genannt wurden [24]. Bis zum Jahr 2050 werden schätzungsweise 8,1 Millionen Osteoporose-assoziierte Frakturen jährlich vorhergesagt, insbesondere sind dabei die postmenopausalen Frauen betroffen [9].

Auch wirtschaftliche Gesichtspunkte sind nennenswert. So werden die jährlichen Kosten der Therapie der Osteoporose und ihrer Folgen laut den deutschen Krankenversicherern auf insgesamt eine Milliarde Euro € bis zu fünf Milliarden Euro beziffert [9], [88], [93].

In den meisten zur Osteoporose verfassten Studien werden die den Beckenkamm umgebenden Regionen untersucht. Dies ist im klinischen Alltag ein eher untypischer Manifestationsort für eine Osteoporose [5], [90], [12]. Osteoporose-assoziierte Frakturen treten typischerweise am distalen Radius, den Wirbelkörpern und den proximalen Femora auf, so dass in dieser Arbeit die langen Röhrenknochen der unteren Extremität verwendet wurden [49], [106]. Mit diesem Hintergrund soll in dieser Arbeit ein valides Modell zur Induktion einer Osteoporose am senilen Rattenknochen erarbeitet und untersucht werden.

## 1.1 Grundlagen

### 1.1.1 Das Knochen- und Skelettsystem

Das menschliche Knochengewebe umfasst sowohl mechanische als auch metabolische Funktionen. Im Rahmen seiner mechanischen Funktion fungiert das Skelett als Stütze der Weichgewebe und als Schutz empfindlicher Organe. Ferner dient es als Ankerpunkte für Sehnen, Bänder und Gelenkkapseln. Dies ermöglicht es dem Menschen den aufrechten Gang sowie die Fortbewegung an Land. Die metabolische Funktion des Knochens findet sich hauptsächlich in der Kalzium- und Phosphathomöostase wieder. Zusätzlich ist der Knochen das Reservoir des blutbildenden Knochenmarks. Im Gleichgewichtszustand der Stoffwechselfunktion sind 99 % des im Körper vorhandenen Kalziums in der Knochenmatrix gebunden, allerdings lassen sich diese nach Bedarf mobilisieren. Je nach Anforderung kann so durch Auf- und Abbau des Knochens (Remodelling) Kalzium gebunden oder mobilisiert werden [38].

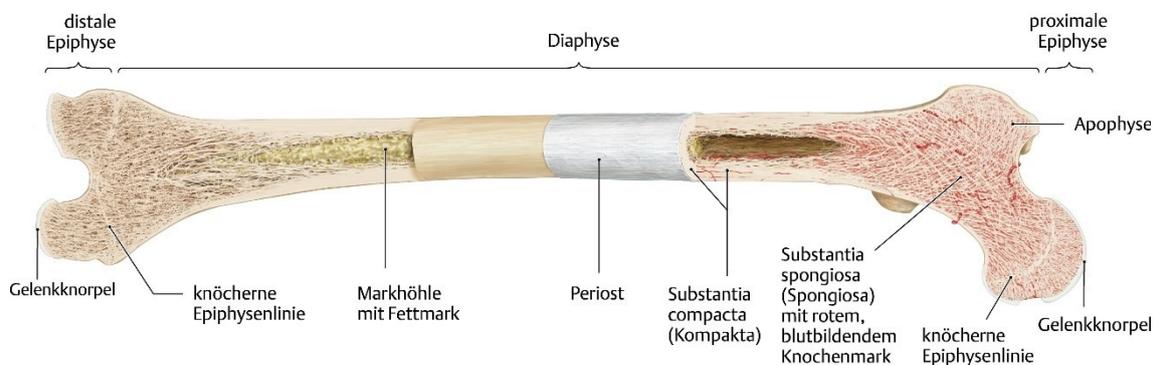
Im Kindesalter findet sich die Knochenreife und das Wachstum im Rahmen des Remodelling in einem naturgemäßen Aufbau der Knochensubstanz. Im Erwachsenenalter befindet sich der Knochenaufbau und -abbau in einem Gleichgewicht wohingegen im Senium die Kurve in Richtung Knochenabbau verschoben ist [55].

Das Konstrukt des Knochens hat mehrere Funktionen. Es muss einerseits das Eigengewicht und das des umgebenden Weichgewebes des Körpers tragen sowie standhalten, zum anderen sollte es möglichst leicht sein, dass eine problemlose Fortbewegung möglich ist. Ferner ist ein möglichst niedriger Energieverbrauch während der Bewegung anzustreben [81].

Somit hat sich beim Knochen eine Art Leichtbauweise mit der Architektur eines „Krans“ entwickelt. So hat sich neben der kompakten Hülle, der Kortikalis, eine kräfteaufnehmende Schwammstruktur in der Markhöhle des Knochens ausgebildet, die Spongiosa. Die einzelnen Bälkchen der Spongiosa schneiden sich nahezu im rechten Winkel und haben sich entlang der Spannungslinien der Kraftflüsse, den Trajekturen, angeordnet und daran ausgerichtet [108]. Hieraus wurde das Wolff'sche Transformationsgesetz formuliert [58], [108]. Es besagt, dass es auf der belasteten Seite des Knochens zu einer Zunahme der Drucktrabekel kommt. Im Bereich der Belastung abgewandten Seite des Knochens werden Zuglamellen ausgebildet. Allgemein zusammengefasst reagiert der Knochen in Regionen starker Krafteinleitung mit einer

Dichtezunahme (Hypertrophie) und in Zonen geringerer Belastung mit einer Dichteabnahme (Atrophie) [58], [108].

Die Knochen des Skeletts lassen sich grob in vier Typen einteilen. Hier finden sich zum einen die langen Röhrenknochen an den Extremitäten (Abb. 1), zum anderen zeigen sich kurze Knochen in den Hand- sowie Fußwurzeln, platte Knochen am Schädeldach bzw. dem Brustbein und letztendlich die Wirbelkörper der Wirbelsäule. Die in dieser Arbeit zur Untersuchung herangezogenen Knochen sind lange Röhrenknochen, welche sich ihrerseits in eine proximale sowie distale Epi- und Metaphyse als auch in einen dazwischenliegenden Schaftanteil, die Diaphyse, aufteilen. Im Kindesalter findet sich die Wachstumsfuge im epimetaphysären Übergang und verknöchert mit Einsetzen der Sexualhormoninkretion [92].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung eines langen Röhrenknochens.**

Am Beispiel eines langen Röhrenknochens lässt sich exemplarisch der typische Aufbau von Epiphyse und Diaphyse darstellen. Im Bereich des Übergangs der Epi- zur Diaphyse findet sich die Metaphyse, in der sich typischerweise im Wachstumsalter die Wachstumszonen des Knochens befinden (aus Via Medici; Thieme Verlag; [www.eref.thieme.de](http://www.eref.thieme.de)).

Die im Folgenden beschriebene Osteoporose manifestiert sich in der Kortikalis und in der Spongiosa, wobei der Spongiosa mit ihrem trabekulären Knochenbalkengeflecht der Hauptanteil der Stabilität des Knochens zugesprochen wird.

### 1.1.1.1 Bestandteile des Knochens

Die Zusammensetzung des Knochens zeigt sowohl zelluläre als auch azelluläre Anteile. Die zellulären Bausteine sind die Osteozyten, die azellulären Bestandteile werden Grundsubstanz oder Knochenmatrix genannt. Dies kann man sich wie die Verbundwerkstoffe aus dem Bereich der Technik vorstellen. Die Knochenmatrix besteht zu 35 % aus organischen und zu 65 % aus anorganischen Bestandteilen. Die anorganischen Bestandteile werden hauptsächlich aus dem Kalziumphosphatsalz

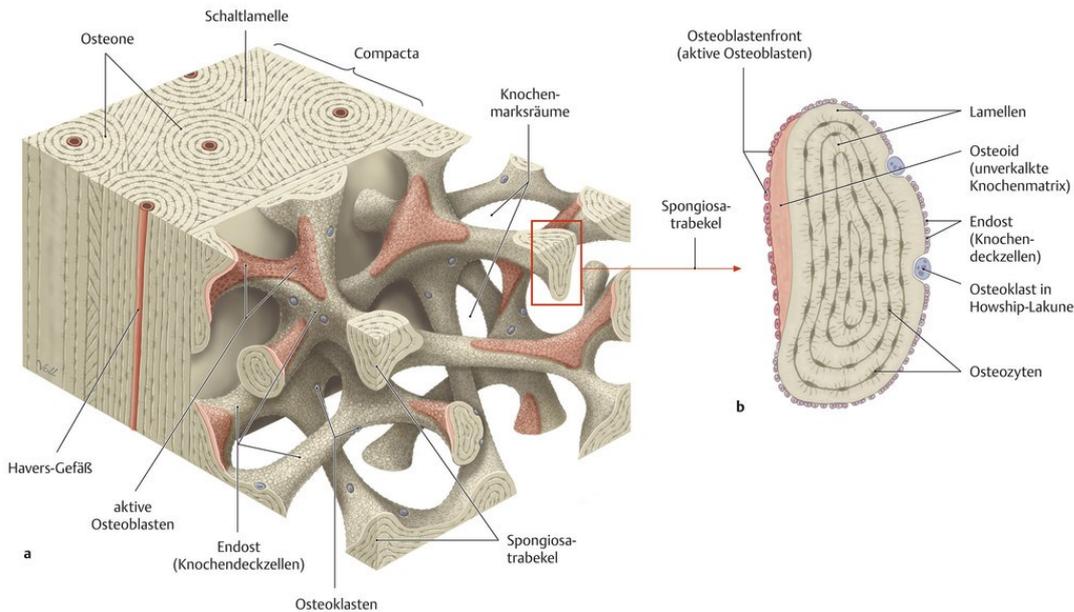
Hydroxylapatit  $[\text{Ca}_5[\text{OH}](\text{PO}_4)_3]$  gebildet. Hydroxylapatit ist das härteste Material des menschlichen Körpers und wird mit einer so genannten Mohshärte von 5 beschrieben. Daneben finden sich in der Matrix noch Magnesium, Strontium, Blei, Zink, Kupfer, Eisen sowie Fluor.

Neben den anorganischen Anteilen des Knochens wie Hydroxylapatit, welche die Steifigkeit bedingen, finden sich auch Stoffe zur Absorption einwirkender Kräfte. So sind zum Erlangen einer gewissen Flexibilität des Knochens organische Verbindungen in den Knochen eingelagert. Diese bestehen aus einer Kollagenmatrix. Der organische Anteil der Knochenmasse wird zu 90 % aus der Kollagenmatrix gebildet und besteht seinerseits wiederum hauptsächlich aus Kollagen Typ I. Neben dem Kollagen Typ I enthält der organische Anteil noch Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin, Knochensialoprotein, alkalische Phosphatase sowie Proteoglykane [105]. In der Folge sind dem Knochen hohe Torsions-, Zug-, Druck- und Biegekräfte erlaubt und sorgen dafür, dass unter physiologischen Umständen keine Frakturen auftreten.

### 1.1.1.2 Architektur des Knochens

Das Knochengewebe unterteilt sich in zwei Arten von Knochen, den Geflechtknochen und den Lamellenknochen. Der Geflechtknochen lässt sich als unreifes Knochengewebe bezeichnen, wie es sich im Knochenwachstum und bei der Frakturheilung findet. Dieser auch Faserknochen genannte unreife Knochen besteht zunächst aus einem losen, ungerichteten Geflechtwerk. Im Laufe des Wachstums richten sich die Fasern entlang der Trajektionslinien aus, mineralisieren und härten aus. Folglich entsteht aus dem anfangs weichen Faserknochen der Lamellenknochen. Bei dieser Art von Knochen handelt es sich nun um den ausdifferenzierten Typ beider Knochen. Hier zeigen sich die klaren Strukturen der Hülle mit der Substantia compacta und der schwammartig aufgebauten Substantia spongiosa.

Makroskopisch ist schon mit dem bloßen Auge die grobe Gliederung des Knochens zu erkennen. Die äußere Schicht wird als Kortikalis (Substantia compacta) und die schwammartige Innenschicht (Substantia spongiosa) bezeichnet [105] (Abb. 2).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung eines gesunden Knochens.**

a) Schematische Darstellung eines gesunden Knochens mit dem Aufbau von Kortikalis und Spongiosa. Es lässt sich hier sehr gut die Beziehung der Osteone mit den Schaltlamellen und Havers-Systemen erkennen. Ebenso kann die schwammartige Struktur des spongiösen Knochens abgebildet werden.

b) Im vergrößerten Ausschnitt (rechts) ist ein Beispiel einer möglichen Anordnung von Osteoklasten an einem Spongiosatrabekel dargestellt (aus Via Medici; Thieme Verlag; [www.eref.thieme.de](http://www.eref.thieme.de)).

Die Knochenbälkchen der Spongiosa, auch Trabekel genannt, orientieren sich dem Wolff'schen Transformationsgesetz folgend in ihrer Ausrichtung an den in den Knochen einwirkenden Zug- und Druckkräften und weisen so eine trajektorielle Ausrichtung auf. Kompakta und Spongiosa werden zu dem Knochentyp des Lamellenknochens gezählt. Die Kompakta wird ihrerseits nochmals außen von einer Hülle, dem *Periost* umgeben, welches sich in ein äußeres Stratum fibrosum und eine inneres, zellreiches Stratum osteogenicum aufteilt. Das Stratum fibrosum ist über Kollagenfibrillen, die so genannten Sharpey-Fasern, fest mit dem Kollagen des Knochens verbunden. Das Stratum osteogenicum beinhaltet Vorläuferzellen, welche im Wachstum bzw. in Situationen der Frakturheilung als Zellreservoir dienen, welche bei Bedarf aktiviert sowie mobilisiert werden können. Die Knochenoberfläche in der Markhöhle ist ebenfalls von einer Hülle bedeckt, dem *Endost*. Dieses Endost besteht aus einem einschichtigen Epithel mit einer zarten Extrazellulärmatrix, welche wie das Stratum osteogenicum des Periosts über osteogene Vorläuferzellen verfügt. Die Markhöhle befindet sich im Zwischenraum der Kompakta und den Trabekeln. In den Epi- und Metaphysen finden sich blutbildendes rotes Knochenmark, in der Diaphyse enthält sie gelbes Knochenmark (Fettmark).

In der histologischen Untersuchung des Lamellenknochens zeigt sich ein klarer, geordneter Aufbau in kleinen Untereinheiten, den *Osteonen* (Havers-Systeme). In ihrer Struktur sind diese zylindrisch-teleskopartig aufgebauten Zelleinheiten mit ihren in Längsrichtung des Knochens ausgerichteten konzentrischen Lamellen angeordnet. Diese Struktur dient als Namensgeber des Lamellenknochens. Die in die Osteozyten eingelagerten Osteone besitzen zentral einen blutgefäßtragenden Kanal (Haver'scher Kanal) mit einem begleitenden Nerven. Über horizontale Querverbindungen, den Volkmann-Kanälen, kommunizieren die einzelnen Osteone untereinander und bilden so im gesamten Knochen eine funktionelle Einheit. Weitere Lamellentypen komplettieren die komplexe Knochenstruktur und geben ihr sowohl Halt als auch Flexibilität. So sind der Vollständigkeit halber noch die äußeren Grenzlamellen zu nennen, welche die gesamte Zirkumferenz des Knochens durchlaufen, die Schaltlamellen als Verbindungen der Osteone untereinander und die Trabekellamellen in eben den Trabekeln.

Auf zellulärer Ebene sind im Knochen am häufigsten Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten und Osteoprogenitorzellen vertreten. Den Osteoblasten werden die aufbauenden Prozesse zugeschrieben, da sie die organischen Bestandteile der Knochengrundsubstanz synthetisieren und das Gerüst des Osteoids bilden. Osteoide stellen die nicht mineralisierte Knochengrundsubstanz aus Kollagen Typ I, Fibronectin, Osteocalcin und Proteoglykanen dar. Bei der Synthese der Osteoide finden sich die Osteoblasten epithelartig zusammen. Je nach Syntheseaktivität fallen diese lichtmikroskopisch bei niedriger Aktivität eher als flache („bone lining cells“) und bei hoher Aktivität als kubische Zellverbände auf [105]. Reguliert werden jene Prozesse hormonell (s. Abb. 3).

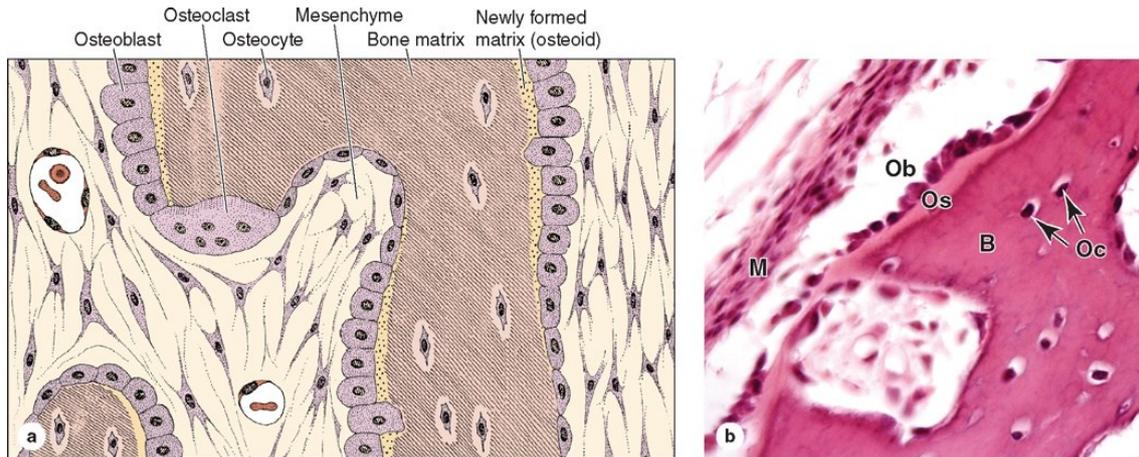
Im Rahmen der Mineralisierung lagert sich in die präformierten Strukturen Hydroxylapatit ein. Gesteuert wird der Prozess durch die alkalische Phosphatase. Im Zuge dessen ist eine große Menge an Proteinen notwendig, die durch das intrazelluläre endoplasmatische Retikulum zur Verfügung gestellt werden muss. So ist es nicht verwunderlich, dass es mit einer Hypertrophie reagiert und schon lichtmikroskopisch als raue Struktur ausgemacht werden kann. Im Rahmen des Anfärbeprozesses zeigt es eine deutliche Affinität zu basophilen Farbstoffen [105].

Nach der Mineralisierung zeigen sich die Osteoblasten ins Osteoid eingelagert in kleinen Lakunen zwischen den Lamellen des Osteons. Dabei erfahren sie eine Metamorphose mit der Ausbildung vieler filamentärer Zellausläufer, die die Osteozyten über „gap junctions“ durch kleine Kanäle, den Canaliculi, verbinden [74]. Somit sind etwa 15

Osteozyten in einer funktionellen Einheit verbunden und in der Lage Ionen, Aminosäuren, Nukleotide, Glucose oder Wasser auszutauschen bzw. zu teilen [113].

Die knochenabbauenden Prozesse finden hauptsächlich durch die Osteoklasten statt. Diese gehören dem mononukleär-phagozytären System an und liegen in der Zelllinie der Monozyten. So fusionieren die Progenitorzellen in der Osteoklastogenese zu Synzytien mit bis zu 50 Zellkernen. Die osteokatabolen Prozesse finden durch die Osteoklasten statt, indem sie mit Hilfe von einem Aktinfilament-Ring Osteopontin sezernieren, welches wie eine Versiegelung der Resorptionszone fungiert. Diese Resorptionszonen, oder auch Howship-Lakunen genannt, weisen einen niedrigen pH-Wert von 4-5 auf. Dies wird durch die Aktivierung der H<sup>+</sup>-ATPase Protonenpumpen bedingt. Zusätzlich werden lysosomale Enzyme, wie Cathepsin K, durch die Osteoklasten freigesetzt und die demineralisierte Knochenmatrix endozytiert. Hierzu benötigt der Osteoklast besonders viel Energie, welche durch die zahlreichen Mitochondrien bereitgestellt wird. Dementsprechend können die Zellstrukturen des Osteoklasten bei der lichtmikroskopischen Färbung azidophil angefärbt werden [105].

Die Regulationen der abbauenden Prozesse sind kompliziert und werden im Kapitel 1.1.4. ab Seite 21 detailliert ausgeführt. Auf zellulärer Ebene scheint es, dass die Osteoklasten den Havers-Kanal im zentralen Osteon weiten, wodurch sie sich entlang der Knochenstruktur vorarbeiten. Dahinter beginnt jedoch schon die Reorganisation mit einem erneuten Aufbau der Knochenmasse durch nachfolgende Osteoblasten [74]. Zu bedenken ist hierbei, dass ein Osteoklast im selben Zeitintervall zehnfach mehr Knochensubstanz destruieren kann, als ein Osteoblast zu synthetisieren vermag [105].



**Abbildung 3: Schematische Darstellung eines histologischen Schnittes eines Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Präparates eines Knochens.**

a): Schematische Darstellung eines histologischen Schnittes eines Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Präparates eines Knochens. Es werden hier die verschiedenen, abgebildeten Zellanteile, sowie die Knochenmatrix (bone matrix) aufgeführt.

b): In direkter Gegenüberstellung findet sich hier eine reale Abbildung eines Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Präparates eines Knochenschnittes. Zur Darstellung gelangen hier die mesenchymalen Zellen (M), die Osteoblasten (Ob) und das Osteoid (Os), sowie Osteozyten (Oc) in der Knochenmatrix (B) (aus Mescher, A. L.: Junqueira's basic histology 13<sup>th</sup> edition: [www.accessmedicine.com](http://www.accessmedicine.com)).

### 1.1.2 Osteoporose

Eine der in Zukunft bedeutenden Erkrankungen des Skelettsystems wird die Osteoporose darstellen. Typisch und pathognomonisch ist hierbei der Verlust von Knochensubstanz, welcher zumeist erst im hohen Alter oder im Rahmen extremer Osteoporoseformen bei jungen Patienten auffällig wird. Zu beachten ist der geschlechter- und altersspezifische Unterschied in der Ausprägung. Ein besonderes Augenmerk gilt der Osteoporose der postmenopausalen Frauen zu schenken, welche etwa dreimal häufiger an Osteoporose erkranken als gleichaltrige Männer. Dies liegt zum einen am nach der Menopause reduzierten Östrogenspiegel der Frauen und zum anderen an der niedrigeren „peak bone mass“ im Wachstum, sowie an einer höheren Lebenserwartung der Frauen. Die weiblichen Sexualhormone, vornehmlich das Östrogen, gelten als osteoprotektiv und beugen dem im Volksmund sogenannten „Knochenschwund“ vor.

Der im Laufe des Lebens maximale Wert der Knochensubstanz wird als „peak bone mass“ bezeichnet. Bei den meisten Personen findet sich die höchste Knochenmasse im Lebensalter der Mittzwanziger. Nach dem Zeitpunkt des Maximums der Knochenmenge nimmt diese im Rahmen des natürlichen Alterungsprozesses wieder ab. Die Rate der Abnahme ist durch mannigfaltige Prozesse des Körpers sowie den unterschiedlichen

Verhaltensweisen des Menschen beeinflusst. Als Folge der sich einstellenden Fragilität des Knochens wird hier die Diagnose der Osteoporose häufig nach spontan auftretenden Frakturen oder Frakturen bei inadäquaten Traumata gestellt. Auffällig wird die mangelnde Knochenqualität vor allem durch proximale Oberschenkelfrakturen, distale Radiusfrakturen und Wirbelkörperbrüche. Zudem gehen diese entsprechend mit einer Erhöhung der Morbidität und Mortalität einher. Unter Berücksichtigung des demografischen Wandels und den veränderten Lebensgewohnheiten in den Industrienationen wird die Zahl der Erkrankten exponentiell steigen und die Osteoporose in den kommenden Jahren zu den großen Volkskrankheiten, wie Diabetes oder Hypertonie, zählen. Die World Health Organisation (WHO) geht allein bezüglich der osteoporoseassoziierten Schenkelhalsfrakturen von einer Verdoppelung der jährlichen Fallzahlen im Zeitraum von 1990 bis 2025 aus [103], [106].

### **1.1.2.1 Risikofaktoren der Ausprägung einer Osteoporose**

Die begünstigenden Risikofaktoren zur Entstehung bzw. Verschlechterung einer Osteoporose können in beeinflussbare und nicht-beeinflussbare Faktoren unterteilt werden [19]. Zusätzlich finden sich osteoporose-induzierende bzw. begünstigende Erkrankungen (Abb. 4).

Einen beeinflussbaren Faktor stellt ein geringes Körpergewicht mit einem BMI < 20 dar. Ebenso ist eine übermäßige, oder auch eine fehlende, körperliche Aktivität ein begünstigender Faktor zur Ausbildung einer Osteoporose [21]. Allgemeingültig steht fest, dass der Mangel an Kalzium und Vitamin D über die Regelkreisläufe zu einer Minderung der Knochensubstanz führt [18], [63]. Auch spielt der Konsum von Nikotin und übermäßiger Alkoholgenuss bei der Osteoporoseentstehung eine Rolle [41]. Beeinflussbare Faktoren sind osteoporose-begünstigende Medikamente wie beispielsweise Glukokortikoide, Protonenpumpen-Inhibitoren, Vitamin-K-Antagonisten, Heparine und Schleifendiuretika [18], [41].

Zu den nicht-beeinflussbaren Faktoren können familiäre oder genetische Prädispositionen gezählt werden [27]. Einige Syndrome führen zu einem Hypogonadismus, so dass hier die osteoprotektive Wirkung der Sexualhormone nicht mehr zum Tragen kommt. Das Lebensalter und das Geschlecht wird ebenfalls zu den nicht-beeinflussbaren Faktoren gezählt [73].

Osteoporoseinduzierende und osteoporosebegünstigende Erkrankungen sind unter anderem Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Einen großen Stellenwert

nehmen hier endokrinologische Erkrankungen, wie Morbus Cushing, Diabetes mellitus Typ I, Hyperparathyreoidismus und Hyperthyreose oder aber auch eine Hypophyseninsuffizienz, ein [61]. Weiterhin führen Malabsorptionssyndrome mit der Minderaufnahme von Kalzium oder Vitamin-D zu einer osteoporosebegünstigenden Stoffwechsellage. Gleiches gilt für genetische Prädispositionen bei Marfan- oder Ehlers-Danlos-Syndrom, aber auch bei der Osteogenesis imperfecta. Ein weiterer nicht zu unterschätzender Faktor ist die häufig vorkommende und ebenso häufig unerkannte Depression mit ihrem Bewegungs- sowie Antriebmangel [87].

Weiterhin sind Faktoren wie eine Sturz-fördernde Umgebung mit unebenen Böden und freien Teppichkanten, sowie Fallneigung-fördernde Medikamente wie Sedativa, Neuroleptika, bestimmte Antihypertensiva, als auch Demenzerkrankungen, Morbus Parkinson, Patienten nach Apoplex mit Residuen oder ähnlichen neurologischen Erkrankungen. All dies führt letztlich zum Auftreten osteoporose-assoziiertes Frakturen [41].



**Abbildung 4: Eigene Darstellung der Einflussgrößen auf die Osteoporose.**

Es werden hier die wichtigsten Faktoren, welche die Osteoporose beeinflussen aufgeführt. Die Mannigfaltigkeit der Einflussfaktoren lässt die Darstellung schnell unübersichtlich werden, so dass sich hier auf die im Alltag wichtigsten beschränkt wurde.

### 1.1.3 Osteoporosediagnostik

Die Diagnostik der Osteoporose findet im klinischen Alltag heutzutage immer noch nicht den Stellenwert, der ihr zugeschrieben werden sollte. Häufig führen den Patienten Schmerzen im Bereich des unteren Rückens und hinteren Beckens zum Arzt. Bleibt die Osteoporose unerkannt, treten in der Folge Insuffizienzfrakturen mit Wirbelkörperbrüchen oder Sakrumfrakturen auf. Frakturen, welche spontan oder durch inadäquate Traumata auftreten, sind ein ernstzunehmender Hinweis für eine mögliche Osteoporose [95].

Wirbelkörperbrüche können über eine Sinterung zur Abkipfung der Wirbelsäulenachse führen. Als Folge entwickelt sich durch eine vermehrte Kyphose der Brustwirbelsäule ein so genannter „Witwenbuckel“ oder auch „Gibbus“. Bei fortschreitendem Höhenverlust der einzelnen Wirbelkörper, mit der damit verbundenen Reduktion der Körpergröße, bildet sich im Verlauf ein Tannenbaumphänomen (Abb. 5) aus. Hierbei legt sich die Rückenhaut wie die Wipfel eines Nadelbaums in Falten. Heutzutage kann die Osteoporose nicht nur anhand klinischer Phänomene, sondern auch mittels apparativer Diagnostik dargestellt und quantifiziert werden [14].



**Abbildung 5: Typisches Bild eines Tannenbaumphänomens.**

Bei Wirbelkörperbrüchen mit Verminderung der Gesamthöhe der Wirbelsäule wirft die Haut typische Falten auf, welche als Tannenbaumphänomen bezeichnet werden (aus Tillmann B. et al., Anatomie des Menschen, Thieme 1998).

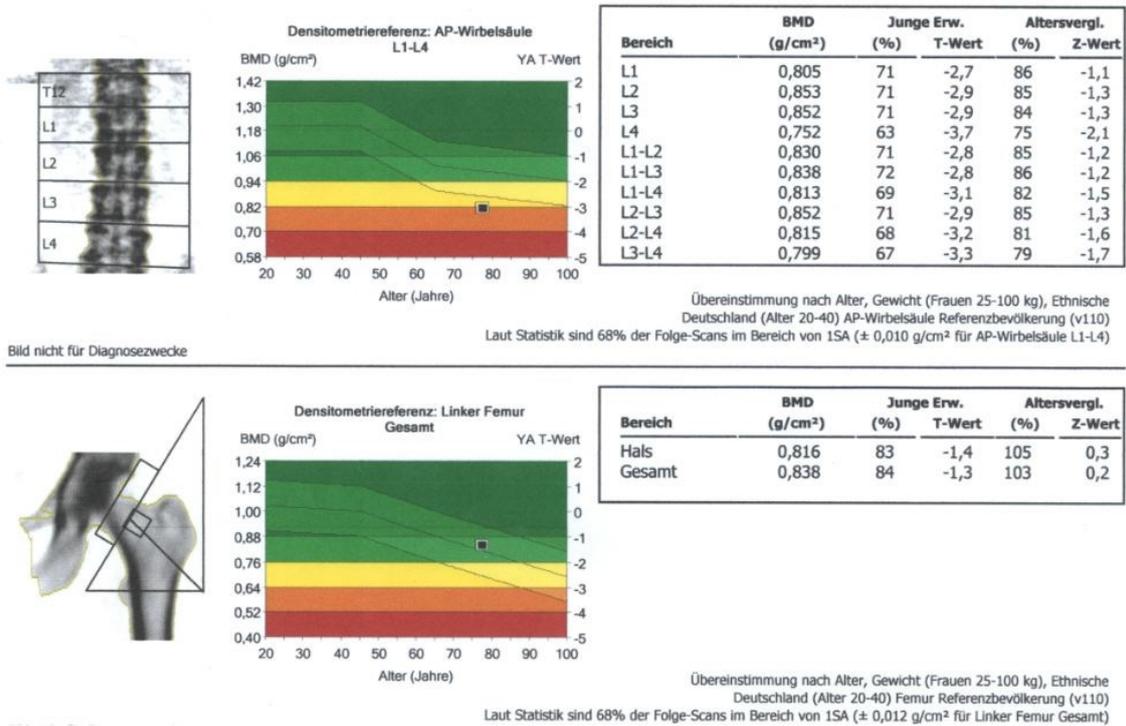
### 1.1.3.1 Dual Energy X Ray Absorptiometry (DXA)

Bei der Dual-Energy-X-Ray-Absorptiometry-Methode wird ein Schwächungsindex von Röntgenstrahlen definierter Energie verwendet. Dabei werden zwei Röntgenstrahlen verschiedener Energie durch ein Gewebe gesandt und die verbleibende Energie gemessen sowie auf einem Messblatt dargestellt (Abb. 6). Da die unterschiedlichen Gewebe des menschlichen Körpers eine für sie eigene Röntgenstrahlen-Schwächungscharakteristik aufweisen, kann eine Aussage über die Beschaffenheit der durchstrahlten Gewebe getroffen werden. Hierbei spielen der Wasser- und Mineralgehalt eine zentrale Rolle. Typische Stellen des Körpers zur Durchführung einer standardisierten Messung finden sich hierbei an den proximalen Femora im Bereich der Schenkelhalse sowie an der Lendenwirbelsäule. Seltener wird der distale Unterarm verwendet [8]. Zufällig gewählt sind diese Regionen nicht, da auch hier im klinischen Alltag die meisten osteoporose-assoziierten Frakturen lokalisiert sind.

Bei genanntem Verfahren wird ein zweidimensionales digitales Bild erzeugt und über eine entsprechende Software die Bone Mineral Density (BMD) errechnet. Die BMD stellt eine Flächendichte dar und wird in  $\text{g}/\text{cm}^2$  abgebildet. Anhand der mit der DXA ermittelten Werten lässt sich der T-Score (T-Wert) zur Einteilung und Quantifizierung der Osteoporose erheben.

Ganzkörperuntersuchungen sind zwar möglich, werden allerdings nur bei speziellen Fragestellungen herangezogen. Beispielsweise kann dies vonnöten sein, wenn eine sehr genaue Aussage über die Beschaffenheit der Kortikalis getroffen werden soll [8]. Ebenso können hiermit das weiche Muskelgewebe oder Fettmassen beurteilt werden. Da diese Gewebe unmittelbar an den Knochen grenzen, entsteht hier eine erste Fehlerquelle im Rahmen der DXA-Messung. Sie kommen dementsprechend bei der Schwächung der DXA-Strahlen zum Tragen und führen zu einer zusätzlichen Schwächung der detektierten Strahlung. Somit ist der BMD auch als gewichtsabhängig anzusehen. Ebenso kann in der mittels DXA-Messung durchgeführten zweidimensionalen Darstellung keine Aussage über die Trabekelstruktur getroffen werden [8].

Vorteile der DXA sind eine weitreichende Verfügbarkeit, eine gute Datenlage, eine geringe Strahlenbelastung ( $1\text{-}5 \mu\text{Sv}$ ) und letztendlich auch ein günstiger Preis, sodass die Leitlinie der Deutschen Vereinigung für Orthopädie DVO die DXA-Messung als das Standardverfahren zur Diagnostik der Osteoporose festlegt hat [24].



**Abbildung 6: Ergebnisblatt einer Knochendichtemessung eines 60-jährigen Manns mit einer Gendefekt bedingten Osteoporose.**

Zu sehen ist ein T-Score von -3,1 in der Lendenwirbelsäule und -1,3 im proximalen Femur (aus: <https://www.nuklearmedizininstadtpalais.de/leistungsspektrum/6-2/knochendichtemessung/>).

### 1.1.3.2 Quantitative Computertomographie (QCT)

Bei der quantitativen Computertomographie (QCT) werden ebenfalls die Schwächungscharakteristika der einzelnen Gewebe zur Beurteilung des Mineralsalzgehaltes des Knochens herangezogen. Zusätzlich können bei der QCT-Untersuchung eine Volumendichte ermittelt und die geometrische Qualität des Knochens in den einzelnen Abschnitten von Kortikalis und Spongiosa abgebildet werden. Da der Knochen hinsichtlich seiner Struktur, besonders im Bereich der Lendenwirbelsäule, sensibel reagiert, erfolgt die QCT-Messung eben in dieser Region [104]. Die QCT ist hinsichtlich des Weichgewebes weniger störanfällig als die DXA-Messung. Im Gegensatz zur DXA ist Messungengenauigkeit geringer, da die Bildauflösung der QCT besser ist und die einzelnen Volumenelemente zur Messung der Knochendichte genauer definiert werden können. Weichgewebe kann somit ausgespart werden und kommt nicht zur Abbildung [8].

Bei der QCT muss allerdings die höhere Strahlenbelastung von im Mittel 60 µSv beachtet werden. Diese ist zwar immer noch deutlich geringer als bei einer herkömmlichen CT-

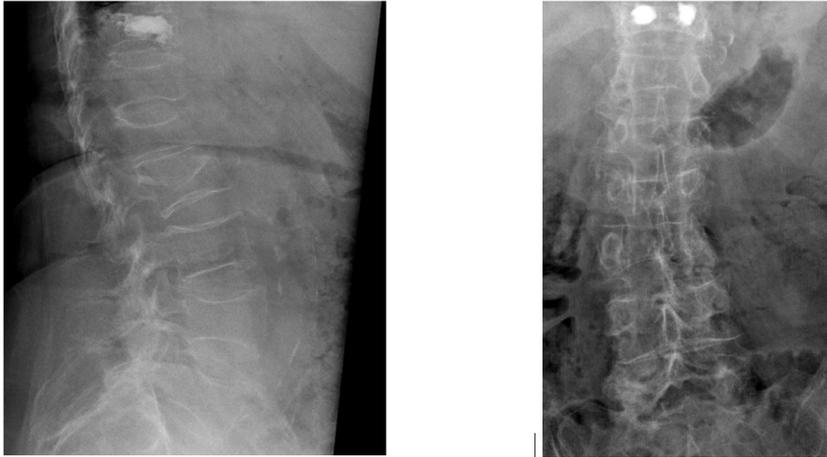
Untersuchung, aber immerhin höher als bei der konventionellen DXA-Untersuchung. Ferner kann anhand dieser Methode der Schenkelhals nicht beurteilt werden, sondern nur die Lendenwirbelsäule [8].

### **1.1.3.3 Quantitative Ultraschallmessung (QUS)**

Eine Methode ohne Anwendung von Röntgenstrahlen stellt die Messung per Ultraschall dar. Es erfolgen sowohl das Aussenden eines Ultraschallimpulses definierter Energie als auch die Detektion des Reflektierten Impulses über einen Piezokristall im Schallkopf des Ultraschallgerätes. Anhand der verschiedenen Absorptionen, Reflexionen und der Frequenzbeugung des reflektierten Ultraschallimpulses, ist es möglich das untersuchte Gewebe in seiner Qualität zu beschreiben. Da der Ultraschallimpuls nur eine verhältnismäßig geringe Reichweite im Gewebe aufweist, lassen sich hier die oberflächennahen Strukturen untersuchen. Somit beschränkt sich diese Methode auf die Phalangen, den Kalkaneus oder den Radius. Die Ergebnisse an diesen Körperstellen sind jedoch nicht auf den Bereich der Wirbelsäule oder die proximalen Oberschenkelknochen übertragbar, so dass die Aussage zur Knochenqualität am Ende letztendlich durch eine DXA- oder QCT-Messung erfolgen muss [6].

### **1.1.3.4 Konventionelle Röntgendiagnostik**

Die konventionelle Röntgenaufnahme des Knochens wird bereits seit über 100 Jahren angewandt, zeigt allerdings erst bei sehr fortgeschrittener Osteoporose Hinweise auf einen Mineralsalzverlust. Ebenso kann mit dieser Methode keine Quantifizierung des Osteoporosegrades erfolgen [8]. Bei dieser Methode werden elektromagnetische Strahlen fächerförmig von der Röntgenkathode auf ein Filmmedium ausgestrahlt. Heutzutage sind die Röntgenfilme durch digitale Empfänger verdrängt worden. Die abgegebene Energie ist, im Gegensatz zur DXA-Methode, monoenergetisch und erlaubt somit keine Differenzierung der durchstrahlten Gewebe, sondern bildet nur eine Abschwächung des Röntgenstrahls ab. So wird ein zweidimensionales Bild des durchstrahlten Objekts erzeugt [45]. Dennoch ist die konventionelle Röntgenuntersuchung als Screeningmethode bei Frakturverdacht durch keine andere Untersuchung abgelöst worden und hat somit ihren Stellenwert nicht verloren (Abb. 7). Bei radiologischem Verdacht auf eine Osteoporose können dementsprechend aussagekräftigere Diagnostikmodalitäten, wie die DXA-Messung oder eine QCT, veranlasst werden [52].



**Abbildung 7: Röntgenuntersuchung der LWS in 2 Ebenen.**

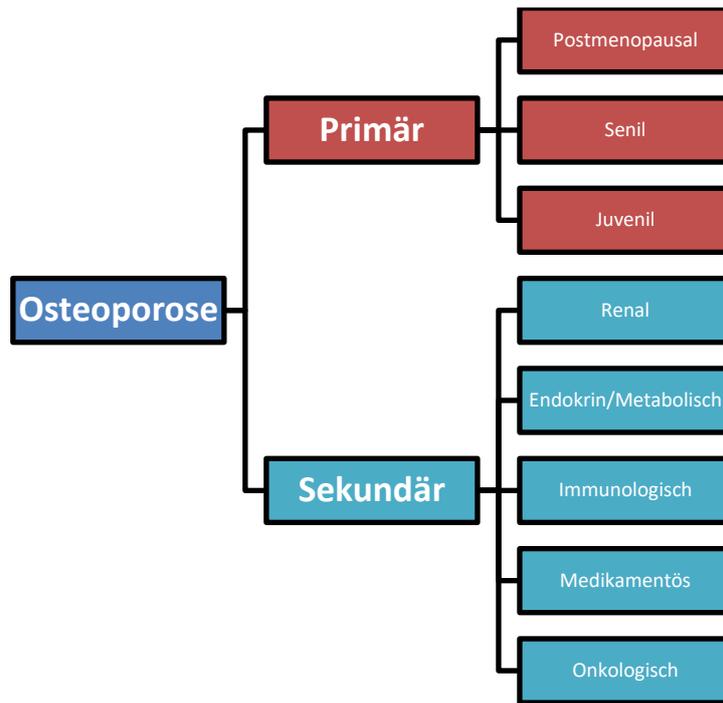
In der Abbildung findet sich eine Röntgenuntersuchung einer Lendenwirbelsäule in 2 Ebenen. Zusehen sind neben den Degenerationen eine frische Deckplattenfraktur des zweiten Lendenwirbels, eine alte Deckplattenfraktur des ersten Lendenwirbels, sowie eine durch Ballonkyphoplastie versorgten Wirbelkörperfraktur des 11. Brustwirbels (aus eigenem Bildmaterial).

### **1.1.4 Einteilungen der Osteoporose**

Die Einteilung der Osteoporose ist mannigfaltig und daher nicht standardisiert, wobei sich jedoch einige Einteilungen als allgemeingültig durchgesetzt haben. Diese sollen im Folgenden beschrieben werden (Abb. 8).

Zunächst ist eine Einteilung Osteoporose nach der Rate des Knochenumsatzes möglich. Dabei wird eine „low turnover“-Osteoporose mit einem niedrigen Knochenumbau und eine „high turnover“-Osteoporose mit einer hohen ossären Umsatzrate unterschieden. Somit ist diese Einteilung als eine qualitative Einteilung anzusehen. Diagnostisch können beide Formen unter Zuhilfenahme der Knochenabbaumarker Desoxyypyridinolin und Cross-link-Telopeptid differenziert werden [6], [18].

Weiterhin ist eine Klassifikation der Osteoporose in primäre (etwa 95 % der Fälle) sowie sekundären Formen (etwa 5 % der Fälle) möglich.



**Abbildung 8: Übersicht zur Einteilung der Osteoporoseformen nach Vorgaben der WHO.**

Die Osteoporose beruht auf multiplen Ursachen. Grob unterscheiden lässt sie sich in eine primäre Osteoporose ohne definierbare Ursache und in eine sekundäre Osteoporose mit einem bedingenden Faktor [106].

Im klinischen Alltag erfolgt die Einteilung der Osteoporose nach Quantifikation durch die 1994 durch die WHO eingeführte standardisierte Anwendung der Osteodensitometrie (DXA) [106]. Zum Vergleich werden Punktetabellen zu altersspezifischen Durchschnittswerten oder bevorzugt Wertetabellen der Grundgesamtheit im Alter der maximalen Knochenmasse (peak bone mass) zur Differenzierung herangezogen. Der im Rahmen der DXA-Messung ermittelte Wert wird als T-Score angegeben und beschreibt die Differenzen von der Standardabweichung der Grundgesamtheit. Die WHO definierte einen T-Score  $> -1$  als normal, Werte im Bereich von  $-1$  bis  $-2,5$  werden als Osteopenie angesehen. Eine manifeste Osteoporose liegt nach Ansicht der WHO bei T-Score Werten  $< -2,5$  vor (Tab. 1) [106]. Eine schwere manifeste Osteoporose besteht bei zusätzlichem Auftreten osteoporose-assoziiertes Frakturen.

Tabelle 1: Darstellung der Schweregrade anhand des T-Scores nach Vorgaben des Dachverbandes Osteologie [24].

Schweregrad	Knochendichte	Strategie
Normal	< 10 % Verlust T-Score > -1 SD	Prävention
Osteopenie	10-15 % Verlust T-Score -1 SD bis -2,5 SD	Prävention
Osteoporose	> 25 % Verlust T-Score < -2,5 SD	Therapie
Schwere Osteoporose	Osteoporose mit Frakturen	Therapie

Weiterhin kann die Osteoporose nach ihrer Lokalisation eingeteilt werden, wobei die Leitlinien des Dachverbandes Osteologie lokalisierte Formen von generalisierten Formen unterscheiden [24]. Den weitaus größten Teil stellen generalisierte Formen dar. Die lokalisierten Typen werden in der Regel durch Inaktivität hervorgerufen, so dass sie bevorzugt bei längerer Ruhigstellung einer Gliedmaße oder bei plegischen Patienten auftreten. Dieser Prozess ist durch das Wolff'sche Transformationsgesetz zu erklären, welches im Kapitel 1.1.1 beschrieben wurde. Eine Sonderform der lokalisierten Osteoporose stellt das „complex regional pain syndrome“, oder veraltet auch Morbus Sudeck, dar. Hierbei sind neben der lokalen Osteoporose zusätzlich Schmerzen in den entsprechenden Gliedmaßen und trophische Störungen der Haut vorhanden [76]. Selten werden auch bei Schwangeren lokale Formen der Osteoporose im Bereich der Hüften und des Beckens festgestellt. Diese schmerzhafte Form der Osteoporose bildet sich jedoch meist im Laufe eines Jahres nach Entbindung vollständig zurück und kann somit als transiente Form der Osteoporose angesehen werden [66], [69].

Eine weitere gebräuchliche Klassifikation teilt die Osteoporose ihrer Ursache nach ein. So werden primäre als auch sekundäre Formen beschrieben. Als Beispiele für idiopathische Osteoporosen sollen hier die seltene idiopathische juvenile Osteoporose und die idiopathische Osteoporose des jungen Mannes aufgeführt werden. Die idiopathische juvenile Osteoporose ist in der Regel bei präpubertären Kindern zu finden und manifestiert sich mit Schmerzen in der Lendenwirbelsäule. Die hier vorliegende Osteoporose ist häufig reversibel und kann gut mit der Gabe von Vitamin D- sowie Kalzium-Präparaten behandelt werden. Selten ist die therapeutische Gabe von Bisphosphonaten indiziert, welche sich dann auf die schweren Osteoporosen beschränkt [65].

Die idiopathische Osteoporose des jungen Mannes, welche zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr auftritt, präsentiert sich häufig mit ähnlichen Symptomen oder manifestiert sich durch pathologische Frakturen. Es scheint, dass sowohl Nikotinabusus als auch niedrige freie Androgenspiegel im Blutplasma eine entscheidende Rollen spielen [6], [82].

Die häufigste Unterform der primären Osteoporose ist allerdings die postmenopausale Osteoporose. Diese ist durch einen Östrogenmangel bedingt und findet sich bei einem Drittel der Frauen nach den Wechseljahren. Hierbei sind besonders der Oberschenkelhals und die Lendenwirbelsäule betroffen, so dass im klinischen Alltag dort häufig osteoporose-assoziierte Frakturen auftreten. Die postmenopausale Osteoporose ist besonders durch einen verstärkten Abbau der Spongiosa charakterisiert [6].

Sie wird ferner in zwei Formen unterteilt. Die frühe Form setzt in den ersten zehn Jahren nach der Menopause ein. Dabei zeigt sich ein erhöhter ossärer Umsatz mit vermehrtem Knochenauf- und abbau zu Gunsten der destrukturierenden Prozesse. Dies ist ein Beispiel für eine „high-turnover“-Osteoporose.

Im Rahmen der späten Form der postmenopausalen Osteoporose liegt ein normaler Knochenabbau mit einem verlangsamten Knochenaufbau vor, so dass letztendlich ein Substanzverlust im Sinne einer Osteoporose resultiert. Diese Form stellt die klassische „low turnover“-Osteoporose mit Auflösung der trabekulären Strukturen dar. Beiden Formen liegt jedoch ein Knochenmasseverlust mit einer konsekutiven Schwächung der Knochenarchitektur zugrunde. Die genannten Typen werden der Typ-I-Osteoporose zugerechnet und betreffen in aller Regel das weibliche Geschlecht in der Postmenopause [13], [18].

Die Typ-II-Osteoporose kann beide Geschlechter betreffen, gilt als typische senile Osteoporose und tritt vornehmlich im achten Dezennium auf [18], [86]. Charakteristisch ist der Substanzverlust sowohl in Kortikalis als auch Spongiosa. Bei dieser Form sind Frauen doppelt so häufig betroffen wie Männer. Ursächlich sind neben dem normalen Substanzverlust des Knochens durch den physiologischen Alterungsprozess der im Senium häufige Bewegungsmangel sowie der Abfall der osteoprotektiven Sexualhormone. Ferner findet sich auch ein Vitamin D- und Kalziumdefizit, so dass ein ernährungsbedingter Einfluss zum Tragen kommt. Beide Formen können parallel vorliegen, einen fließenden Übergang finden und sich verstärken. So ist zu beachten, dass die senile Osteoporose, im Gegensatz zur postmenopausalen Osteoporose, sowohl die Trabekel als auch die Kortikalis betrifft. Dies macht deutlich, dass das

Frakturrisiko bei Vorliegen einer senilen Osteoporose um einiges höher liegt als bei der postmenopausalen Form [86].

Klinisch schwerer zum Tragen kommt allerdings die sekundäre Osteoporose, die zwar insgesamt seltener ist, jedoch aufgrund der Fragilität des Knochen mit bis zu 20 % an den osteoporose-assoziierten Frakturen beiträgt [6].

Als Ursache liegen der sekundären Osteoporose in der Regel endokrinologische Erkrankungen zu Grunde. Als Paradebeispiel ist hier der Morbus Cushing mit erhöhten Kortisolspiegeln zu nennen. Hinsichtlich des Knochenstoffwechsels spielt es keine Rolle, ob der erhöhte Kortisolspiegel endogen oder iatrogen bedingt ist. Die Folge ist eine vermehrte Expression von RANKL-Proteinen auf der Osteoblastenmembran bei gleichzeitiger verminderter Sekretion von OPG-Proteinen. Im Zuge dessen zeigt sich eine verlängerte Aktivität der Osteoklasten, womit es dabei zu einem erhöhten Knochenabbau kommt. Ferner tragen Glukokortikoide zu einer verminderten Freisetzung von Sexualhormonen bei, was mit einer herabgesetzten Osteoprotektion einhergeht. Zusätzlich verstärken Glukokortikoide den Effekt, indem sie den renalen und enteralen Verlust von Kalzium begünstigen [61].

Bei der renal bedingten Osteoporose des dialysepflichtigen Patienten findet sich häufig ein sekundärer Hyperparathyreoidismus. Nicht nur die gestörte Kalzitriolsynthese des chronisch Nierenkranken spielt hierbei eine Rolle, auch der vermehrte renale Kalziumverlust und die Retention von Phosphat begründen den gestörten Knochenstoffwechsel mit einer vermehrten Demineralisierung. Zusätzlich führt das freie Phosphat zu einer Komplexbildung mit freiem Kalzium im Blutplasma und fungiert somit als Chelatbildner. Damit bedingt Phosphat neben dem vorliegenden Kalziummangel darüber hinaus zu einer Minderverfügbarkeit des noch vorhandenen Kalziums und aggraviert die bestehende Hypokalziämie [6].

Auch Hyperthyreose, Diabetes mellitus sowie primärer Hyperparathyreoidismus sind als typische und häufige Ursachen sekundärer Osteoporosen verantwortlich. Ein nicht zu unterschätzender Faktor spielt die Ernährung. Dabei sind nicht nur eine unzureichende Alimentation, sondern auch fehlerhafte Nutrition durch gastrointestinale Passagestörungen oder Malabsorptionssyndrome zu nennen. Es findet sich dabei meist eine gestörte Aufnahme von Kalzium und Vitamin D. Im Rahmen des Regelmechanismus bei vermindertem Kalziumspiegel im Blutplasma tritt eine vermehrte Ausschüttung von Parathormon auf. In Folge dessen stellt sich eine Stimulation der Osteoklastenaktivität mit Liberation von Kalzium aus dem kristallinen Knochen ein [21].

Nicht nur Glukokortikoide sind als medikamentöse Ursache der Osteoporose zu nennen. Viele häufig eingesetzte Medikamente können eine Teilhabe an der Ausprägung der Osteoporose haben. Diesbezüglich sollte dem verschreibenden Arzt das Nebenwirkungsprofil der Präparate bekannt sein. Verallgemeinernd kann hier davon gesprochen werden, dass alle Präparate mit Einfluss auf die Osteoporoseausprägung als Enzyminduktoren fungieren und folglich Einfluss auf den Vitamin-D-Stoffwechsel besitzen bzw. die Kalziumaufnahme stören. Zu den am häufigsten verschriebenen einflussnehmenden Medikamenten gehört die Gruppe der Protonenpumpeninhibitoren.

Als Vergleichsparameter zur Abschätzung der konsumierten Medikamentenmenge wurde von der WHO die so genannte „defined daily dose“ (DDD) eingeführt [3]. Die DDD ist die angenommene mittlere Tagesdosis eines Wirkstoffes. Bei der DDD handelt es sich um eine rechnerische Größe, die zum Zwecke der Arzneimittelverbrauchsforschung entwickelt wurde. Unter Berücksichtigung von Produkteigenschaften des verordneten Wirkstoffs kann damit die tagesbezogene theoretische Einnahmedauer eines Medikaments errechnet werden. Sie darf somit nicht mit der therapeutisch empfohlenen oder tatsächlich verschriebenen Dosis verwechselt werden.

Hinsichtlich der Protonenpumpeninhibitoren liegt diese bei 2252,6 Millionen Tagesdosen pro Jahr und ist somit oft ein unbeachteter Faktor. Dicht folgen Heparine und Vitamin-K-Antagonisten [21]. Auch im Rahmen von Neoplasien ist die Ausbildung einer Osteoporose feststellbar. Einerseits kann dies durch verabreichte Medikamente bedingt sein, zum anderen ist auch die Neoplasie selbst ein Auslöser. Ein hier zu nennendes Beispiel sei das Multiple Myelom aus dem Formenkreis der hämatologischen Erkrankungen [47]. Im Rahmen dieses malignen Lymphoms werden Zytokine sezerniert, welche die Osteoklastenaktivität lokal anregen. Somit entstehen Osteolysen, welche im Krankheitsverlauf rekurrent für pathologische Frakturen sorgen. Diese Brüche sind mitunter schwierig zu versorgen, da progredient osteolytische Zonen vorliegen. Ferner verursachen diese osteolytischen Bereiche eine Schmerzsymptomatik, welche unweigerlich zu einer herabgesetzten Lebensqualität führt [97]. Ebenso können solide Tumore, beispielsweise durch eine Infiltration und Schädigung des Knochenmarks selbst oder aufgrund ossärer Metastasierung mit lokal auftretenden osteoporotischen Arealen, Einfluss auf die Entwicklung einer Osteoporose haben. Dies wird häufig durch vom Tumor exprimierte Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  oder das osteolytisch wirkende PTHrP (parathyroid hormone-related proteins) hervorgerufen. Ebenso ist das bei Neoplasien häufig vorkommende Interleukin-11 für die Ausbildung einer Osteoporose verantwortlich [40].

### 1.1.5 Epidemiologie

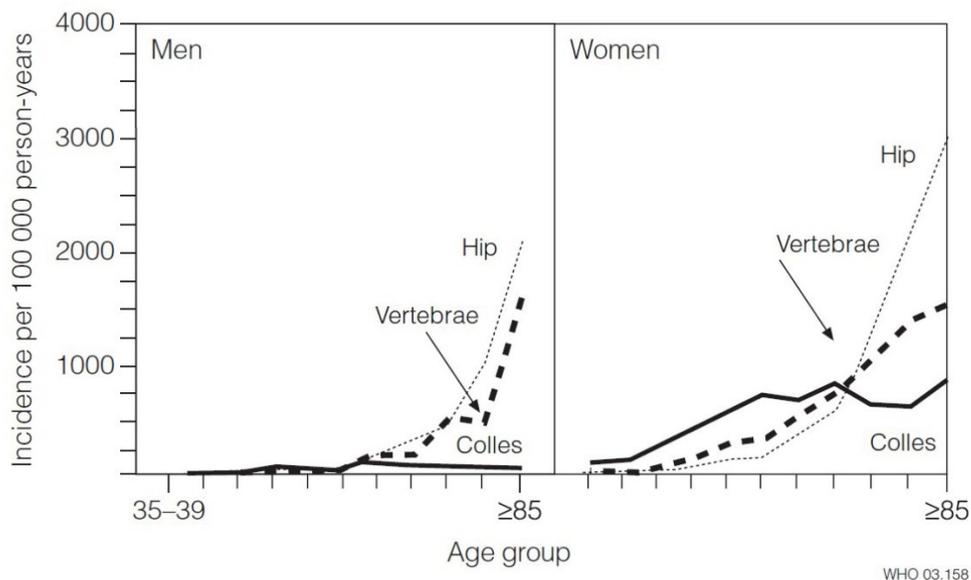
Im Jahr 2013 wurde von Häussler eine epidemiologische Studie zur Osteoporose im Rahmen der „BoneEVA“-Studie durchgeführt [41]. Dabei stellte er fest, dass bei 7,8 Millionen Bürgern in Deutschland mit einem Mindestalter von 50 Jahren eine manifeste Osteoporose vorlag. Laut dieser Untersuchung sind Frauen fünfmal häufiger betroffen als Männer. Nach seinen Ergebnissen fanden sich bei 4,3 % der 7,8 Millionen an Osteoporose erkrankten Probanden eine osteoporose-assoziierte Fraktur. Diese Frakturen wurden allerdings selten der Osteoporose als Grunderkrankung, sondern anderen Ursachen, wie zum Beispiel einer Fallneigung, zugeschrieben. Häussler postulierte daraus, dass noch kein ausreichendes Bewusstsein für die Problematik der Osteoporose als „Volkskrankheit“ bestünde. Die „BoneEVA“-Studie stellt zudem eine jährliche Zunahme der an Osteoporose leidenden Patienten von 13 % im Alter über 50 Jahren [41].

Die WHO analysierte das altersspezifische Risiko eine Fraktur zu erleiden. Es wurde berichtet, dass das Frakturrisiko im Alter überproportional ansteigt [20] (Tab. 2). Sowohl Burge als auch Wright belegten dies in ihren Untersuchungen [17], [109]. Beispielsweise wird in der Studie von Burge 2007 von einer Steigerung der hüftgelenknahen Frakturen von rund 13.000 Fällen pro Jahr bei den < 50 jährigen Frauen auf über 84.000 Fällen jährlich bei den >75 jährigen Frauen berichtet (Tab. 2).

**Tabelle 2: Übersicht der osteoporose-assoziierten Frakturen nach Art, Geschlecht und Patientenalter** (aus Burge; Incidence and Economic Burden of Osteoporosis-Related Fractures in the United States).

Stratum	Number of fractures per fracture type					Total
	Hip	Vertebral	Wrist	Pelvic	Other	
<b>Women</b>						
Age (years)						
50–64	13,420	57,562	136,624	5,532	159,043	372,180
65–74	25,288	85,020	88,072	15,596	84,963	298,938
75–84	84,274	142,892	70,317	43,059	105,394	445,937
≥85	99,771	103,156	31,815	38,469	65,576	338,788
Race						
White	201,123	347,739	285,973	88,973	366,360	1,290,168
Black	6,995	13,838	15,030	5,004	18,057	58,923
Hispanic	8,175	15,417	15,045	5,276	17,755	61,668
Other	6,460	11,636	10,781	3,403	12,805	45,085
Total	222,753	388,630	326,828	102,655	414,976	1,455,843
<b>Men</b>						
Age (years)						
50–64	6,605	29,217	49,564	8,194	140,919	234,499
65–74	9,780	39,358	9,174	6,699	65,239	130,250
75–84	26,814	52,418	5,798	11,797	33,055	129,882
≥85	30,659	37,803	5,597	5,433	20,730	100,222
Race						
White	63,685	132,428	53,286	25,709	202,744	477,852
Black	2,880	10,453	7,606	2,413	25,173	48,525
Hispanic	4,345	9,487	5,661	2,269	19,372	41,134
Other	2,947	6,429	3,579	1,733	12,654	27,341
Total	73,857	158,796	70,132	32,124	259,943	594,852
Overall total	296,610	547,426	396,961	134,779	674,919	2,050,695

Diese Studien postulieren, dass ein großer Teil der Frakturen im Senium osteoporoseassoziiert sein müssen [41]. Weitere Analysen in diesem Bereich deuten in die gleiche Richtung. So finden sich bei Cummings et al. 2002 und Riggs et al. 1995 Ergebnisse, welche sich mit den Kernaussagen des WHO Berichts aus dem Jahr 2004 decken [23], [87]. Dahingehend ist zu erwarten, dass die Osteoporose volkswirtschaftlich sowie medizinisch in den kommenden Jahren eine große Herausforderung darstellen wird [20] (Abb. 9)



**Abbildung 9: Frakturinzidenz in den westlichen Industrienationen.**

Die Untersuchung einer Population in Rochester, Minnesota, USA durch Cooper et al. 1992 zeigt den geschlechtsspezifischen Unterschied von Radiusfrakturen (Colles), Wirbelkörper (Vertebrae) und proximale Femurfrakturen (Hip) auf und lässt mit der gleichzeitig angegebenen Inzidenz auf die volkswirtschaftliche sowie individuelle Belastung schließen. In den westlichen Industrienationen ähneln sich diese Werte, so dass hier auch auf die Inzidenz in Deutschland geschlossen werden kann (Cooper, C; Melton, L.J. (1992): Epidemiology of osteoporosis. Trends Endocrinol Metab 3(6)224-229).

### 1.1.6 Knochenstoffwechsel

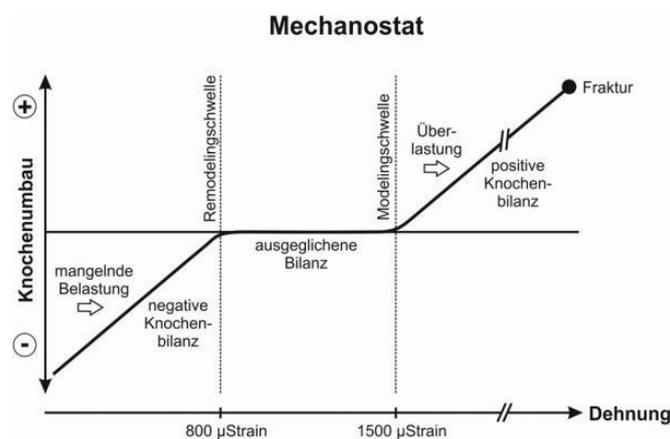
Der Knochen dient dem Körper nicht nur als Stütze, sondern besitzt einen komplexen Stoffwechsel. Dabei ist er als das Reservoir von Kalzium, Phosphat und Magnesium anzusehen, welche überwiegend in der Knochenmatrix gebunden sind. 99 % des im Körper enthaltenen Kalzium befindet sich im Hydroxylapatit des Knochens, was etwa 1-1,5 g des gesamten Körpergewichts entspricht [6].

Im Laufe des Lebens erfährt der Knochen einen stetigen Wandel hinsichtlich Form und Funktion. So verändert sich die Größe während der Phase des Wachstums, ein Prozess,

der als *Modifikation* bezeichnet wird. Die Längenzunahme der Röhrenknochen spielt sich dabei in den Epiphysenfugen ab. Im Zuge dessen erfährt der Knochen eine Zunahme der Belastung, was sich zugleich in der Ausbildung einer kräftigen, äußeren Hülle (Kortikalis) widerspiegelt. Die Fähigkeit des Knochens, sich einer steigenden Belastung durch eine Zunahme der Knochenmasse anzupassen, nennt sich *Modelling* [91].

Der Prozess des stetigen Umbaus wird als *Remodelling* bezeichnet. Dies ist notwendig, da der Knochen einem andauernden Verlust an Knochenmatrix und einer Alterung entgegensieht. Die daraus folgende Minderbelastbarkeit wird durch den fortwährenden Umbau (Remodelling) der einzelnen Komponenten durch die ständige Erneuerung der Knochenmatrix vermieden [6]. Die Auf- und Abbauprozesse folgen dem Wolff'schen Transformationsgesetz [108].

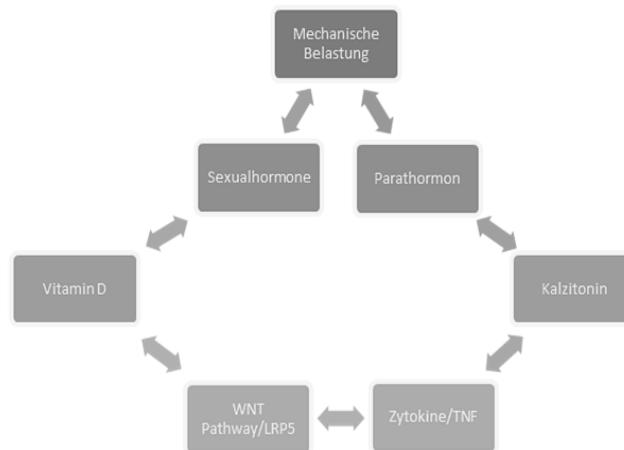
Kersch-Schindl stellte die Beziehung zwischen *Knochenaufbau* in einer Belastungsphase dem *Knochenabbau* in einer Entlastungsphase gegenüber. Diesbezüglich beschrieb er den Knochen als Mechanostat und visualisierte genannten Mechanismus in einem Graphen [53] (Abb. 10). Ferner zeigt der Knochen nicht nur eine Anpassung der Masse an die geforderten Belastungen, er bringt zusätzliche Stabilität in die Struktur, in dem sich die Trabekel an den in den Knochen eingeleiteten Zug- sowie Druckkräfte ausrichten und sich somit sein Trabekelgeflecht in Trajektionslinien ausrichtet [33], [91].



**Abbildung 10: Darstellung eines Mechanostats.**

Das Mechanostat beschreibt den Zusammenhang von Knochendehnung (strain) bzw. -belastung und positiver sowie negativer Knochenbilanz. Angegeben sind hier an den Enden der ausgeglichenen Bilanz die Schwellen zum Remodelling und Modelling (aus Kersch-Schindl K; Journal für Mineralstoffwechsel 2012; 19(4):159-162).

Die überaus komplizierte Regulation von Knochenauf- und abbauprozessen ist nicht nur durch eine physikalische Belastung bedingt (Abb. 11). Ebenso spielen hormonelle Einflüsse eine große Rolle. Insbesondere sind hier die Sexualhormone zu nennen, welche stimulierend auf den ossären Stoffwechsel wirken und somit den Knochenaufbau begünstigen bzw. dessen Knochenabbau entgegenwirken. Der Epiphysenschluß ist beispielsweise durch den Einfluss von Östrogenen bedingt. Weiterhin hemmen Östrogene die Osteoklastenaktivität, was sich besonders postmenopausal bemerkbar macht und eine Ursache der postmenopausalen Osteoporose darstellt [78].



**Abbildung 11: Einflussgrößen auf die Entwicklung der Knochenmasse.**

Als Oberpunkt ist die mechanische Belastung aufgeführt, die als Hauptfaktor des Aufbaus der Knochenmasse in der Jugend und im jungen Erwachsenenalter fungiert. Die Erforschung des WNT-LRP5-Pathway ist Gegenstand aktueller Forschungen [16].

Die Entwicklung eines größeren und schwereren Skeletts beim Mann wird, im Vergleich zur Frau, von einem höheren Testosteronspiegel ausgelöst [30]. Es finden sich einige positive Einflüsse auf den Knochenaufbau. Zu nennen sind zum einen die Zunahme der Dicke der Kompakta [25], andererseits auch die Verstärkung der Trabekelstruktur.

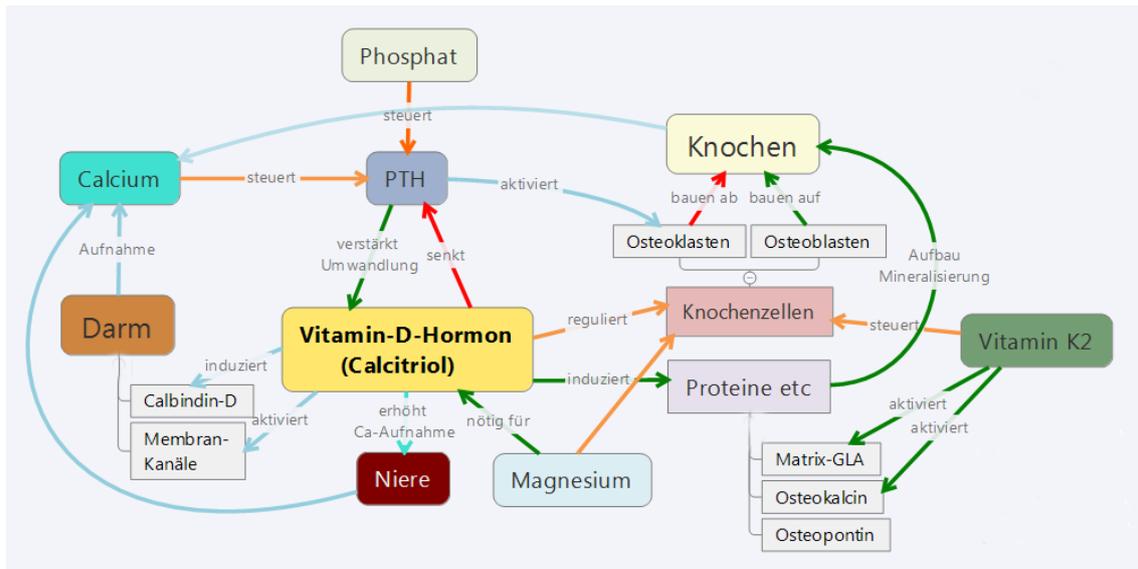
Weitere hormonelle Einflüsse auf den Knochenstoffwechsel werden vom Parathormon (PTH) ausgeübt. Dieses wird als Polypeptid in den vier Nebenschilddrüsen gebildet und ist bei der Freisetzung von Kalzium aus dem Knochen bzw. beim Einlagern des Kalziums in den Knochen beteiligt. Hierbei wird eine Induktion der Proliferation der Osteoklastenvorläuferzellen hervorgerufen [6]. Weiterhin werden bereits ausdifferenzierte Osteoklasten angeregt, Kollagenasen und lysosomale Enzyme zu exprimieren und mit einer folgenden Erhöhung der Membrandurchlässigkeit für Kalzium für dessen Abbau aus dem Knochen zu sorgen. Weiterhin wird vermutet, dass

Parathormon an den Osteozyten selbst für eine Mobilisation von Kalzium aus den unvollständig mineralisierten perilakunären Lakunen sorgt [80].

Ebenso werden gleichzeitig bei niedrigen Kalziumspiegeln im Blut, und in Folge dessen einer erhöhten Konzentration von Parathormon, die Resorption von Kalzium in den Nieren sowie im Darm gefördert. Im gleichen Regelzyklus wird bei hohen Parathormonspiegeln die Ausschüttung von Kalzitriol eingeleitet, so dass neben den osteolytischen Effekten durch das Parathormon gleichzeitig Gegenregelmechanismen entstehen, welche als osteoprotektiv zu bezeichnen sind [6].

Neben der Rückresorption von Kalzium und der Induktion der Synthese von Kalzitriol finden sich noch weitere osteoprotektive Eigenschaften des Parathormons. So ist Gegenstand der aktuellen Untersuchungen, dass es unter Parathormoneinfluss zu einer verminderten Osteoblastenapoptose, sowie zu einer Erhöhung der Proliferationsrate der Osteoblasten kommen soll. Dies führt im Endeffekt zu einer steigenden Knochenmasse [98]. Ebenso spielt die Art der Freisetzung von Parathormon eine Rolle auf den Knochenstoffwechsel. Eine kontinuierliche Inkretion von diesem führt zum katabolen Stoffwechsel mit den osteolytischen Eigenschaften des Hormons, wohin gegen eine pulsatile Ausschüttung die anabolen Eigenschaften des Parathormons hervorhebt (Abb. 12) [6].

Weiterhin spielt Vitamin D eine große Rolle für den Knochenstoffwechsel. Vitamin D ist ein fettlösliches Vitamin, welches über den Darm aufgenommen wird und in Niere, Leber bzw. Haut moduliert sowie aktiviert wird. Nach dessen Aktivierung kann es in den Kalziumhaushalt eingreifen. Die Rückresorption von Kalzium im Darm als auch die verminderte Ausscheidung in den Nieren erhöht den Kalziumspiegel im Blut. Ferner moduliert es die Osteozyten und regt deren Aktivität zur Differenzierung an, was indirekt die Mineralisation des Knochens mit Einbau von Kalzium in die Kristallstruktur des Knochens fördert [6]. In einer Metaanalyse einer Arbeitsgruppe des British Medical Journals aus dem Jahr 2011 wurde aufgezeigt, dass bei Kindern im Knochenwachstumsalter und bei jungen Erwachsenen Vitamin D eine essentielle Rolle für einen gesunden Knochenstatus spielt. Eine zusätzliche alimentäre Supplementierung bei normwertigen Plasmaspiegeln hat jedoch keinen Benefit hinsichtlich der Knochenmasse ergeben [107].



**Abbildung 12: Regelmechanismen des Knochenmetabolismus.**

Schematisch wird hier der komplexe Regelkreis des Knochenmetabolismus mit seinen Einflussgrößen und Interaktionen beschrieben. Die Darstellung ist aufgrund der Komplexität der Zusammenhänge stark vereinfacht, spiegelt jedoch die für den klinischen Alltag nennenswerten Aspekte wider (aus [www.vitamind.net](http://www.vitamind.net), 30.04.2018).

Als weiterer Einflussfaktor zählt Kalzitinin, welches in den C-Zellen der Schilddrüse gebildet wird. Die Ausschüttung des Peptidhormons führt zu einer Senkung des Plasmakalziumspiegels und zeigt sich somit als Gegenspieler des Parathormons. Als Mechanismus fungieren hierbei die Rückresorption von Kalzium in Darm und Nieren, sowie die direkte Hemmung der Osteoklastenfunktion. Eine klinisch-therapeutische Relevanz dieser Hemmung ist laut Adami 2005 allerdings fragwürdig [1]. Die Anhebung der Knochenmasse wird in diesem Fall als minimal beschrieben und die Nebeneffekte des Kalzitonins lassen die Anwendung als therapeutisches Präparat fraglich erscheinen [6]. Bei der glukokortikoid-induzierten Osteoporose gibt es allerdings Hinweise, dass Kalzitinin einen Knochenmasseverlust verhindern kann [67].

Die Osteohomöostase wird durch das Zusammenspiel von Osteoklasten und Osteoblasten bedingt. Gesteuert wird dies durch ein Regulatorprotein, dem RANKL-Osteoprotegerin-Zytokinsystem [6] (Abb. 13). Osteoblasten sezernieren hierbei M-CSF (macrophage colony stimulating factor) und regen so die Proliferation der Osteoklastenprogenitorzellen an. Das membrangebundene Protein RANKL (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand) wird ebenfalls von den Osteoblasten exprimiert. Dieses Protein ist der Klasse der Tumornekrosefaktoren zugeordnet und interagiert mit dem RANK-Rezeptor der inaktiven sowie undifferenzierten Osteoklasten und bewirkt bei der Bindung beider Proteine eine Aktivierung der Osteoklastentätigkeit mit Bindung an

den Knochen, sowie eine Differenzierung unreifer Osteoklasten [68]. Osteoblasten verfügen aber mit ihrem Protein Osteoprotegerin (OPG) jedoch über den weit größeren Einfluss auf die Regulation der Osteoklastentätigkeit [19].

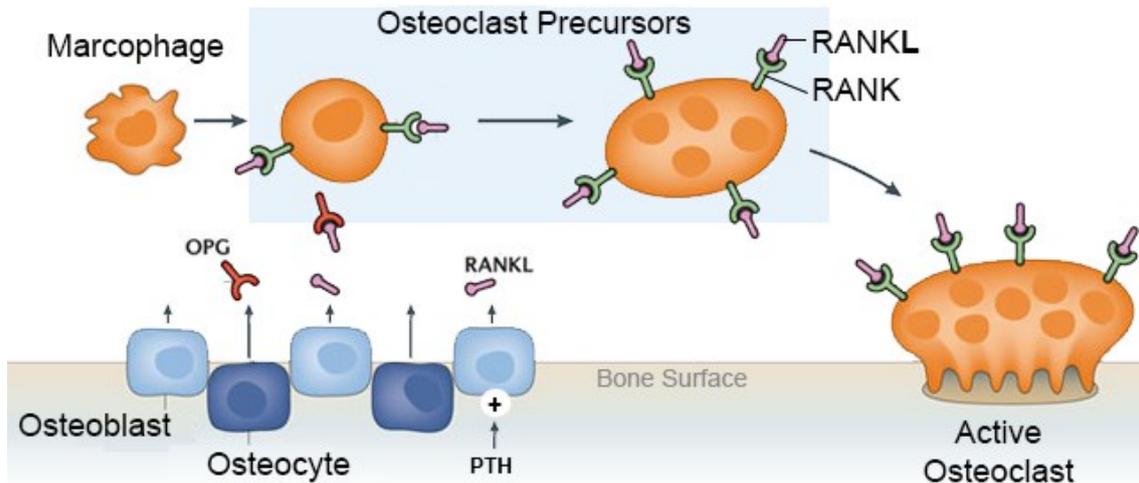


Abbildung 13: Schema des RANKL/RANK-OPG-Pathway.

Aus Makrophagen bilden sich unter Einfluss von RANK und RANKL über Osteoklastenvorläuferzellen reife Osteoklasten. Osteoprotegerin (OPG) wirkt hierbei als inhibierender und RANKL/RANK als stimulierender Faktor (aus [www.orthobullets.com/basic-science/9010/bone-signaling-and-rankl](http://www.orthobullets.com/basic-science/9010/bone-signaling-and-rankl)).

Osteoprotegerin ist ein weiteres Protein, welches den Tumornekrosefaktoren zugeordnet wird. Es bewirkt eine Hemmung der Osteoklasten, indem es die RANK-Rezeptoren der Präosteoklasten besetzt und blockiert. Somit wird eine Aktivierung verhindert. Die Osteoblastenförderung und Aktivierung wird wiederum beim Knochenabbau durch Osteoklasten durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren induziert. Hierbei sind insbesondere die Insulin-like growth factor IGF-I und IGF-II zu nennen [60]. Abschließend betrachtet kann das RANKL-Osteoprotegerin-Zytokinsystem als das zentrale Steuerelement des Knochenstoffwechsels angesehen werden. Dies wird in Zukunft voraussichtlich der Angriffspunkt für Medikamente und Forschungsschwerpunkt der Osteoporose sein [6].

Anhand der Gewinnung neuer Informationen des RANKL/RANK-OPG-Pathways rückt die Genforschung immer mehr in den Fokus der Wissenschaft. Diesbezüglich liegt der Schwerpunkt auf der Erforschung des LRP5-Gens (low-density-lipoprotein receptor-related protein 5). Dieses Gen soll Einfluss auf die Regulation der Bildung von Knochenmasse haben [4]. Zytokine zeigen ebenfalls einen wichtigen Einfluss auf die

Regulation der Knochenmasse. Auch proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF alpha wird ein osteokataboler Effekt zugeschrieben [72].

### 1.1.7 Differentialdiagnosen der Osteoporose

Im Rahmen der Abklärung einer Osteoporose sollten auch Differentialdiagnosen mit ähnlicher Symptomatik, jedoch anderer Genese in Betracht gezogen werden, um zeitgerecht eine geeignete Therapie einleiten zu können. Die Differentialdiagnosen der Osteoporose beinhalten andere generalisierte und lokale Osteopathien. Zu nennen sind die Osteomalazie, Frakturen, Tumoren sowie weitere schmerzhaft neuromuskuläre Erkrankungen.

An wichtigen und häufigen lokalen Osteopathien sind hier die infektbedingte Osteomyelitis, die aseptische Knochennekrose und der Morbus Paget, mit seinem unstrukturierten Knochenumbau, zu nennen. All diese Erkrankungen begleitet ein Strukturverlust mit konsekutiver Schwächung der Knochenarchitektur. Ebenso zeigt sich eine erhöhte Frakturanfälligkeit und eine damit verbundene Schmerzsymptomatik.

Eine generalisierte Osteopathie findet sich beispielhaft bei der Ostitis fibrosa im Rahmen eines Hyperparathyreoidismus mit einer erhöhten Aktivität der Osteoklasten. Im Zuge dessen entstehen zystische Hohlräume im Knochen, welche durch Bindegewebe ersetzt werden und sowohl klinisch-makroskopisch als auch histopathologisch als die typischen braunen Tumoren imponieren [99].

Der Osteomalazie liegt eine unvollständige Mineralisierung der Knochenmatrix zu Grunde. Passiert dies vor der Pubertät, wird die Erkrankung als Rachitis bezeichnet. Ursächlich für diese Form der Knochenpathologie ist eine Minderversorgung mit Vitamin D und Kalzium. Auch hier finden sich als klinische Symptome lokale Knochenschmerzen und pathologische Frakturen. In späten Formen dieser Erkrankung zeigen sich inspektorisch Achsabweichungen der Gliedmaße, insbesondere an den stärker belasteten unteren Extremitäten, welche durch den weicheren Knochen aufgrund unzureichender Mineralisierung entstehen. Seltener geht die Osteomalazie mit einer hypokalziämiebedingten Tetanie einher. Ursächlich kann hier ein Vitamin-D-Mangel oder eine andere metabolische Störung mit Einfluss auf die Knochenstoffwechsellage sein. Weiterhin findet sich die Osteomalazie unter anderem bei renaler Funktionsstörung im Rahmen von chronischen Niereninsuffizienzen mit Dialysepflichtigkeit und dem hierbei auftretenden sekundären Hyperparathyroidismus [2].

### 1.1.8 Osteoporosetherapie

Der grundlegende Pfeiler der Osteoporosetherapie ist die Prävention osteoporose-assoziiierter Frakturen und Frakturfolgen. Hierbei muss der Arzt ein individuelles Risikoprofil für den Patienten erstellen und diesbezüglich bei der Therapieentscheidung zwischen Risiko und Nutzen abwägen. Es stehen pharmakologische und nicht-pharmakologische Maßnahmen zur Verfügung, welche in Abbildung 14 aufgeführt sind.



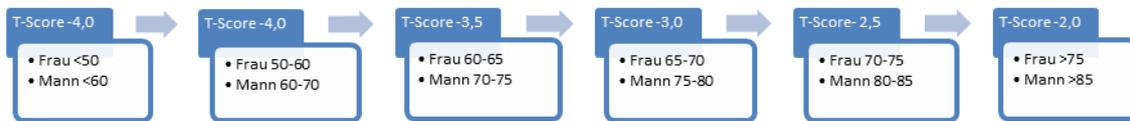
**Abbildung 14: Maßnahmen zur Osteoporoseprävention.**

Aufgeführt sind hier die Faktoren der Prävention der Osteoporose. Zu beachten ist hierbei, dass die Faktoren alle samt beeinflussbar sind [11], [56], [57].

Zu den nicht-pharmakologischen Maßnahmen zählen neben der Vermeidung sturzfördernder Faktoren auch die Umstellung der Alimentation. Als prophylaktisch wirkende und therapieunterstützende Ernährung gelten Nahrungsmittel mit einem hohen Gehalt an Kalzium und Vitamin D. Eine vermehrte körperliche Aktivität unterstützt die Sturzprohylaxe zusätzlich. Im Rahmen dieser körperlichen Belastung werden außerdem Balance und Koordination geschult, sowie Ausdauer und Kraft verbessert. Dadurch lässt sich die Sturzprohylaxe aktiv fördern [26].

Zudem werden die osteokatabolen Effekte bei körperlicher Belastung zurückgedrängt und eine Osteoporose entwickelt sich deutlich langsamer. Passiv kann mit geeignetem Schuhwerk, barrierefreier Umgebung und Verbesserung der Sicht mit beispielsweise Sehhilfen in die Sturzprohylaxe eingegriffen werden. Bei einer bestehenden nicht-kompensierbaren Sturzneigung haben sich Hüftprotektoren als sinnvoller Schutz vor hüftgelenksnahen Frakturen erwiesen [57]. Der Sturzprohylaxe gehören auch die Optimierung und Reevaluation der Dauermedikation der an Osteoporose leidenden Patienten an. Folglich sind Fallneigung-provozierende Medikamente kritisch zu überdenken und entsprechend einzusetzen. Nach Ausschöpfung aller nicht-pharmakologischen Maßnahmen oder bei bestehendem 10-Jahres-Risiko für Wirbelkörper- und proximale Femurfrakturen von über 30 %, sollte mit einer spezifischen medikamentösen Therapie begonnen werden [18], [24]. Ist das Frakturrisiko allerdings

nur schwer abzuschätzen, so weist die DVO-Leitlinie [24] von 2017 auf die DXA-Messung mit dem so ermittelten T-Wert hin (Abb. 15).



**Abbildung 15: Alters- und geschlechtsabhängiger T-Score.**

Der Beginn der medikamentösen, antiresorptiven Therapie ist unter anderem vom Alter und vom erreichten T-Score abhängig. Das Schaubild zeigt die Indikationsschwellen der DVO-Leitlinie von 2017.

Der T-Wert allein ist jedoch nicht maßgebend für den Beginn der medikamentösen Osteoporosetherapie. Finden sich osteoporose-assoziierte Frakturen, kann die Therapie auch dann schon begonnen werden, wenn die T-Wert-Schwelle zur medikamentösen Therapie noch nicht erreicht wurde. Die DVO Leitlinie [24] von 2017 beschreibt weitere Einflussgrößen, welche die Schwelle für den T-Wert herabsetzen. Die wichtigsten Einflussgrößen sollen im Folgenden beschrieben werden.

Hierzu zählen unter anderem periphere Frakturen nach dem 50. Lebensjahr oder auch singuläre Wirbelkörperfrakturen 1. Grades. Ferner wird eine familiäre Prädisposition dazu gezählt. Immobilität und Stürze sind ebenso wie Nikotinabusus und eine Abnahme der Knochendichte um 5 % in 2 Jahren zu erwähnen.

Einflussnehmende Erkrankungen sind zum Beispiel Hyperkortisolismus oder ein Hyperparathyreoidismus mit seinen osteokatabolen Eigenschaften und der typischen klinischen Trias „Stein-, Bein- und Magenpein“. Auch die Hypophyseninsuffizienz mit Verminderung der Sexualhormoninkretion oder ein Diabetes mellitus Typ I gehören zur Gruppe der Erkrankungen mit Risiko der Ausprägung einer Osteoporose. Hinzu gezählt werden ferner die Rheumatoide Arthritis, Epilepsie oder auch der Hypogonadismus [31].

Bei der medikamentösen Therapie zur Herabsetzung der Schwelle des T-Wertes zählen intensivierete Glukokortikoidtherapie, antiandrogene Therapie oder die Therapie mit Aromatasehemmern [24].

Die pharmakologische Therapie verfolgt zwei grundlegend unterschiedliche Ansätze. Zum einen kommen hauptsächlich Antisorptiva zur Anwendung [11], [18], [64]. Dies sind Medikamente, die den Knochenabbau hemmen sollen. Zum anderen können Therapeutika in Betracht gezogen werden, welche direkt osteoanabol wirken. Diese

Medikamentengruppe dient als Reservepräparatreservoir bei therapierefraktärer Osteoporose (Tab. 3).

In der Gruppe der Antiresorptiva finden sich Medikamente wie Bisphosphonate, SERM (selektive Östrogen Rezeptor Modulatoren), Östrogen oder spezifische Antikörper wieder. Die Gruppe der Bisphosphonate wirkt über eine direkte Anlagerung an die Knochenoberfläche und hemmt so die Osteoklastenaktivität [64], [89]. Zusätzlich wirken sie toxisch auf Osteoklasten. Die Osteoklasten können jedoch direkt gehemmt werden. Dies erfolgt zum Beispiel durch die SERM sowie Östrogene und erhöht somit ebenfalls die Knochenmasse. Eine neue Klasse von Antiresorptiva stellen monoklonale Antikörper dar [18]. 2010 wurde das Denosumab in der Europäischen Union zugelassen [56]. Dieser Antikörper bindet an RANKL und sorgt für eine Verschiebung der Homöostase des Kreislaufs von RANK/RANKL und OPG hin zum OPG und dessen osteoprotektive Wirkung [43].

Als Reservemedikation finden sich osteoanabole Medikamente wie das Parathormonanalogen Teriparatid oder auch Fluoride. Ferner verfügt Strontium über die Eigenschaft Knochen wieder aufbauen zu können [90]. Auch Geschlechtshormone wie Testosteron kommen als Ersatz- bzw. Reservepräparat zum Einsatz [24].

**Tabelle 3: Übersicht der Wirkweise der einzelnen Antiresorptiva.**

Stoffgruppe/Wirkstoff	Wirkweise
Bisphosphonate	Direkte Anlagerung an Knochenoberfläche
SERM	Direkte Osteoklastenhemmung
Östrogen	Direkte Osteoklastenhemmung
Denosumab	RANKL-Antikörper
Teriparatid (Parathormonanalogen)	Indirekte Osteoblastenaktivierung
Strontiumranelat	Direkte Steigerung des Mineralgehalts und der Masse des Knochens

## 1.2 Fragestellung und Zielsetzung

In der von Bauer et al. beschriebenen experimentellen Tierstudie wurde ein Verfahren zur standardisierten Induktion einer Osteoporose bei juvenilen Ratten etabliert und beschrieben [7]. Da dort das unreife Skelett der juvenilen Ratte unter metabolischen Stress gesetzt wurde, fanden sich Ergebnisse mit einer deutlichen rachitischen Komponente des Knochens. Folglich wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit darauf geachtet, dass das Skelett der Ratte ausgereift war, bevor es metabolisch-katabolem Stress ausgesetzt wurde. Es kamen dieselben Induktoren unter denselben Bedingungen

wie bei den juvenilen Ratten zur Anwendung, so dass hier gegebenenfalls Unterschiede aufgedeckt werden konnten.

Die Behandlung erfolgte durch Ovariectomie (OVX), Diät (Diet) und die Kombination aus Glukokortikoiden mit Diät (OVXD) und bildeten die häufigsten Ursachen der humanen Osteoporose ab. Zur Auswertung gelangten in dieser Arbeit vornehmlich die Daten der DXA-Messungen im Ganzkörper-Scan, sowie die histomorphometrische Auswertung der trabekulären Fläche und trabekulären Dicke, im linken Femur und der linken Tibia der Versuchstiere. Zusätzlich erfolgten eine lichtmikroskopische Sichtung und Interpretation der Knochenschnitte. Die Ergebnisse wurden innerhalb der einzelnen Gruppen im zeitlichen Verlauf und zwischen den einzelnen Gruppen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten ausgewertet sowie im Vergleich zu der Literatur bezüglich der juvenilen Tiere diskutiert.

Die Zielsetzung mit der Formulierung von Hypothesen lautet daher wie folgt:

- Zeigt sich kein (Nullhypothese) / ein (Alternativhypothese) signifikanter Unterschied in der Ausprägung einer Osteoporose des Skeletts seniler Ratten in der Versuchsanordnung im zeitlichen Verlauf innerhalb bzw. zwischen den Gruppen?
- Zeigt sich kein (Nullhypothese) / ein (Alternativhypothese) signifikanter Unterschied in der Entwicklung einer Osteoporose bei senilen Ratten im Vergleich zu gleich behandelten juvenilen Ratten?
- Finden sich kein (Nullhypothese) / ein (Alternativhypothese) unterschiedliches Ergebnis bei Heranziehen der DXA-Messung bzw. der histomorphometrischen Auswertung?
- Liegen Störgrößen vor, welche die DXA-Messung / histomorphometrische Auswertung im Kleintiermodell beeinflussen?

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Studiendesign

Die vorliegende experimentelle Arbeit wurde als prospektiv-randomisierte Studie ohne Verblindung aufgebaut. Die Osteoporoseinduktion ist durch Alimentation, Ovariectomie und Dexamethasongabe in unterschiedlicher Kombination untersucht worden.

Zum einen erfolgte die Quantifizierung der Osteoporose durch DXA-Messungen der Tiere aller Gruppen, andererseits kamen histomorphometrische Analysen zur Trabekeldicke, sowie -fläche zur Auswertung. Als festgesetzte Zeitpunkte der Datenerhebung der DXA-Messung galt die Einstellung ( $t=0$ ) und 12 Monate Standzeit ( $t=1$ ). Die Kontrollgruppe wurde nach Einstellung und DXA-Messung euthanasiert und histomorphometrisch untersucht, so dass folglich nur Daten vom Zeitpunkt  $t=0$  vorliegen. Um histomorphometrische Untersuchungen durchführen zu können, mussten die verbleibenden Tiere nach der DXA-Messung zum Zeitpunkt  $t=1$  euthanasiert und entsprechend präpariert werden. Bei allen Tieren wurden hierfür Präparate von Tibia und Femur gewählt.

### 2.2 Ethikvotum

Die hier durchgeführten Untersuchungen erfolgten im Rahmen des Teilprojektes T1 des SFB/Transregio 79 (DFG: Deutsche Forschungsgemeinschaft) an insgesamt 47 weiblichen, 12 Monate alten Ratten vom Typ Sprague Dawley (CrI:CD(SD)). Diese wurden von der Firma Charles River Laboratories (Research Models and Services Germany GmbH, Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Der Tierversuchsantrag entsprach den derzeit geltenden deutschen Gesetzen und wurde durch das Regierungspräsidium Gießen, Veterinärdezernat (Schanzenfeldstraße 8, 35578 Wetzlar, Deutschland) genehmigt (Aktenzeichen: 89/2009).

### 2.3 Tiermodell und Gruppen

Im ersten Jahr erhielten alle Versuchstiere eine normale Nutrition, alle Versuchstiere durchlebten 5 Schwangerschaften mit Würfen von Jungtieren, welche gesäugt wurden. Nach 12 Monaten erfolgte die Einstellung in die Tierhaltung der Justus-Liebig-Universität in Gießen (Frankfurter Straße 105, 35392 Gießen, Deutschland) mit anschließender

Randomisierung in die einzelnen Untergruppen. Randomisiert wurde in eine Kontrollgruppe (Referenzgruppe), eine Scheinoperationsgruppe (Sham), eine Diätgruppe (Diet) mit defizienter Nutrition und Steroidgabe, eine Ovariectomiegruppe (OVX), sowie eine Gruppe mit kombinierter defizienter Nutrition, Ovariectomie und Steroidgabe (OVXD).

2 Wochen nach Einstellung erfolgte bei allen Tieren eine *in-vivo*-DXA-Messung sowie die Definition des Zeitpunkts  $t=0$ . Die Kontrollgruppe wurde anschließend euthanasiert, präpariert und *ex vivo* histomorphometrisch untersucht. 4 Wochen nach der Einstellung unterzogen sich die Tiere der verbliebenen Gruppen der Ovariectomie bzw. Scheinoperation. Im Folgenden wurden die ovariectomierten Tiere erneut randomisiert, wobei die Aufteilung in eine Diätgruppe (OVX) sowie in eine Steroidgruppe (OVXD) mit zusätzlicher Applikation von Dexamethason vorgenommen wurde. Die Steroidgruppe (Diät) erhielt dann im Abstand von zwei Wochen eine subkutane Injektion von Dexamethason mit einer Dosierung von 0,3 mg/kg Körpergewicht. Der Diät-Gruppe wurde eine Vitamin D3-, Vitamin K-, kalzium- und phosphatarmer Multidefizienzdiät verabreicht, der Sham-Gruppe eine normale Nahrung. Eine Scheinoperation erfolgte bei einem weiteren Teil der Ratten, um entsprechende Stressfaktoren auszuüben und so äquivalente Voraussetzungen für die folgenden Untersuchungen zu schaffen.

### 2.4 Tierhaltung und Stallung

Über den gesamten Versuchszeitraum wurden die Ratten art- und fachgerecht im Zentralen Tierlaboratorium der Justus-Liebig-Universität Gießen (Frankfurter Straße 105, 35392 Gießen, Deutschland) betreut. Die Haltung erfolgte in Kleingruppen von 3 - 4 Tieren in mit Holzspänen beschickten Makrolonkäfigen vom Typ III sowie IV (EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH und Co.KG, Emmendingen; EBECO E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel; Tecniplast S.p.a., Buguggiate, Italien), welche aus einer Polycarbonatschale und einem aus Gitterstäben geformten Deckel (Abb. 16) bestanden.



**Abbildung 16: Käfighaltung in der Stallung.**

Beispiel der Käfighaltung in der Stallung unter Standardbedingungen. Der jeweiligen Kategorie entsprechendes Futter sowie Getränke stehen jeder Zeit zur Verfügung. Temperatur und Luftfeuchte werden konstant gehalten und der Tag-/Nachtrhythmus durch zeitgeschaltete Leuchten simuliert.

Die jeweiligen Futtermengen waren unbeschränkt. Das zu Beginn gemessene durchschnittliche Gewicht betrug 225 g (Range 172-284 g unter Standardlaborbedingungen). Flüssigkeit wurde durch die Gabe von Leitungswasser zur Verfügung gestellt und das für die Gruppe entsprechende Futter (Diätfutter oder Standardfutter: Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage) stand jederzeit ebenfalls nach Bedarf zur Verfügung. Bei der Zusammensetzung des Diätfutters wurde der Vitamin D<sub>3</sub>-, Vitamin K-, Kalzium- und Phosphatgehalt auf ein notwendiges Minimum reduziert.

Die Raumtemperatur lag bei 22°C (+/- 2°C) und die relative Luftfeuchtigkeit betrug 50 % (+/- 5 %). Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch ein automatisch gesteuertes Lichtprogramm mit einer 12-stündigen Beleuchtung von 6:00 Uhr bis 18:00 Uhr simuliert. Die Raumluft wurde vor Einleitung in die Stallung gefiltert, so dass hier eine keimfreie Umgebung entstand.

## 2.5 Fütterung

Nach der Ovariectomie mit zwei Wochen Heilungszeit folgte der Beginn der Steroidbehandlung in der Steroid-Gruppe (OVXD). Im zweiwöchigen Abstand bis zum Erreichen der Euthanasie erhielten die Tiere eine Injektion von 0,3 mg/kg Körpergewicht (KG) Dexamethason-21-isonicotinat (Voren® Depot, Fa. Boehringer Ingelheim GmbH, Ingelheim, Deutschland) in die Nackenfalte.

Die zusätzliche Mangelernährung in der Diätgruppe wurde durch die Fütterung mit einem speziellen Diätfutter eingeleitet. Dieses wies in seiner Zusammensetzung im Vergleich zum Standardfutter keine kalorischen Unterschiede auf, allerdings waren 0 % Vitamin D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>, 15 % Calcium, 7 % Phosphor, 50 % Vitamin K sowie 75 % Kalium enthalten. Ferner war das Futter Soja- und Phytoöstrogene-frei. Hergestellt wurde dieses Futter

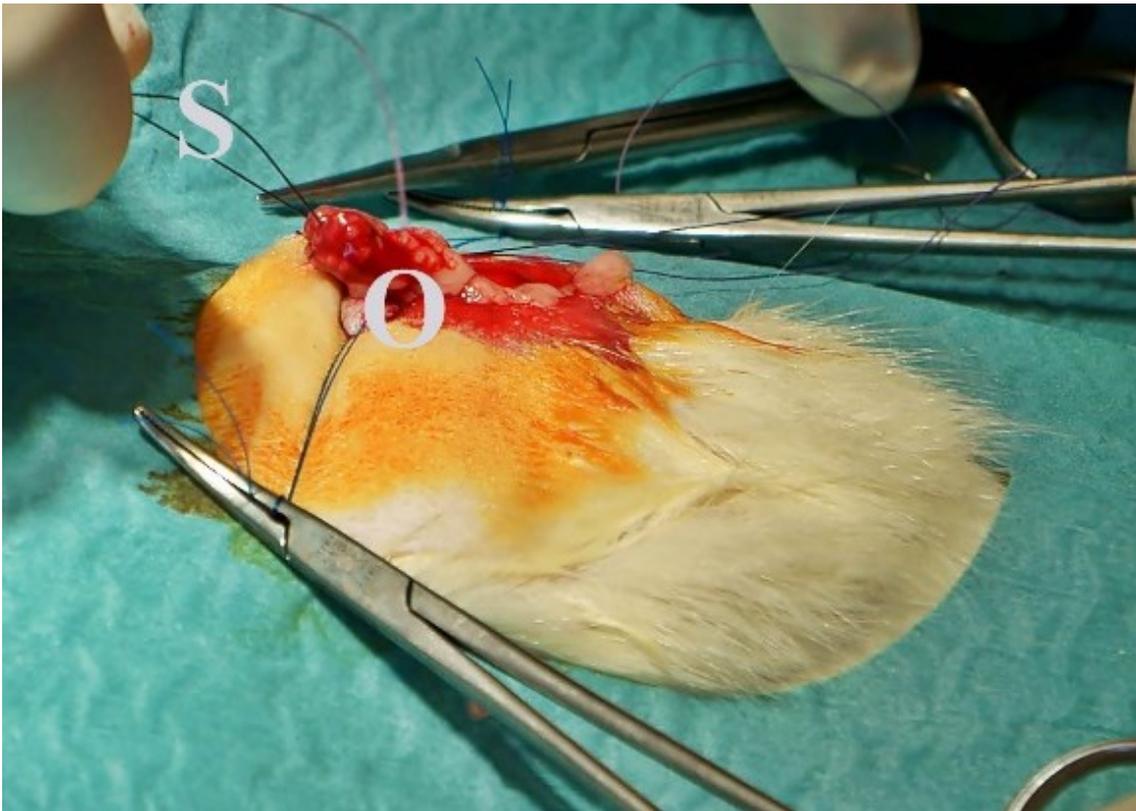
von der Altromin Spezialfutter GmbH (Altromin-C1034 und C100, Fa. Altromin-Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland).

### 2.6 Operationstechnik

Die für die Operationen durchgeführte Vollnarkose erfolgte durch eine intravenöse Gabe von 62,5 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Hostaket®, Fa. Hoechst, Bad Soden, Deutschland) und 7,5 mg/kg Körpergewicht Xylazine (Rompun® 2 %, Fa. Bayer Health Care AG, Leverkusen, Deutschland) gelöst in körperwarmer 0,9 % NaCl-Lösung. Für die intravenöse Applikation wurde eine G26-Kanüle in eine Schwanzvene der Tiere gelegt.

Präoperativ wurde die Haut zunächst dorsobilateral rasiert (Rasierer für Labornager, Indulab Model 1574) und mit einem Povidon-Iod-haltigen alkoholfreien Hautantiseptikum (Braunol®, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Der Wärmehalt erfolgte durch Lagerung des Tieres auf einer Wärmematte mit maximal 38°C. Um Netzhautschäden der Augen zu vermeiden, wurde kranial ein Sichtschutz aus rotgefärbtem Plexiglas für die Ratte installiert. Zusätzlich wurden die Augen mit Panthenolsalbe vor Austrocknung geschützt.

Das Eröffnen der Haut erfolgte nach sterilem Abdecken des Operationsgebietes im Bereich der Lendenwirbelsäule oberhalb der Schenkelfalte mit einer Schere auf etwa 1 cm mal 0,5 cm Größe. Die weitere Präparation erfolgte stumpf im Bindegewebe zwischen Haut und Muskelgewebe (Abb. 17). Beim Erreichen des Peritoneums wurde dieses mit einer Pinzette gegriffen, angehoben sowie unter Sicht ein Scherenschlag durchgeführt, so dass die Eröffnung durch Spreizen mit der Pinzette gelang. Uterus und Ovar waren somit zugänglich. Nach dem Herausziehen von Uterus sowie Ovar aus der Bauchhöhle mit Hilfe einer zweiten Pinzette konnten das Ovar nun durch Ligieren der zuführenden Strukturen abgesetzt werden.



**Abbildung 17: Intraoperative Darstellung einer Ovariectomie.**

Intraoperative Darstellung der Ovariectomie. „O“ zeigt die eventrierten und angeschlungenen Ovarien. Über eine Stichligatur (S) werden diese abgesetzt. Der verbleibende Gefäßstiel wird zurück in das Rattenabdomen gelegt und die Wunde anschließend verschlossen sowie erneut desinfiziert.

Das Vorgehen war auf beiden Seiten identisch. Der Wundverschluß erfolgte mit einem resorbierbaren Faden der Stärke 5-0 (Vicryl UPS = 1,0 metric) mit 2 bis 3 Einzelknopfnähten.

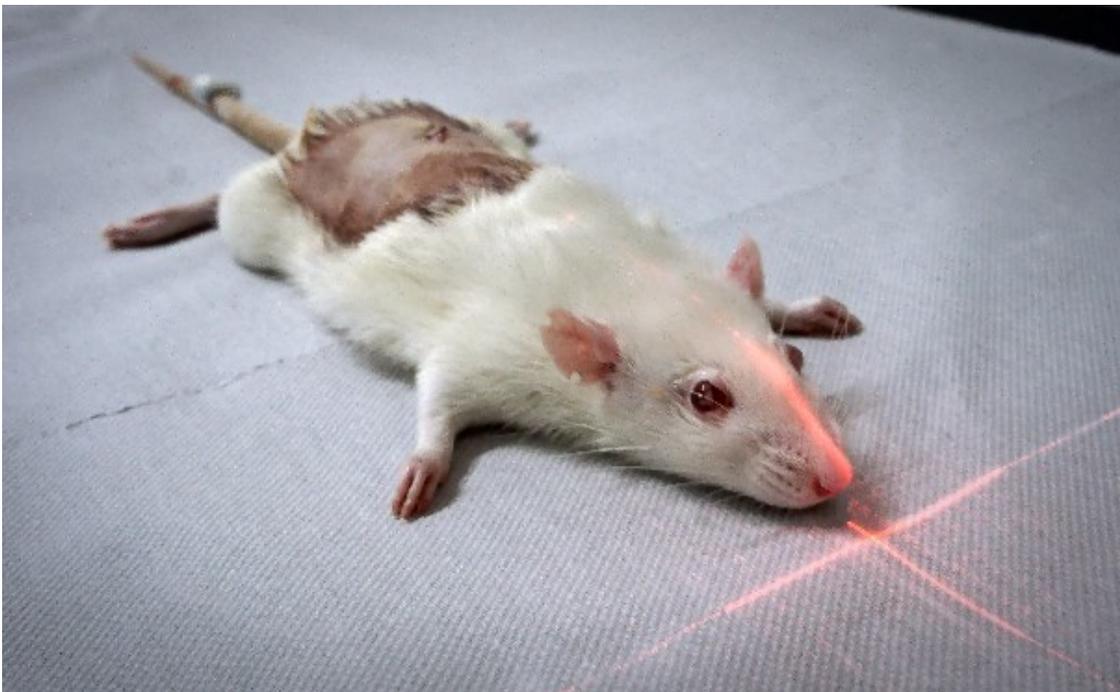
Um den Stress einer Ovariectomie zu simulieren, wurde bei der Sham-Operation beinahe genauso verfahren: Der Unterschied bestand jedoch darin, dass die Ovarien nach Freilegen und Herausziehen aus der Bauchhöhle wieder zurück verlagert wurden.

Die postoperative Überwachung erfolgte in einer warmen und sauberen Umgebung bis zur Wiedererlangung des vollen Bewusstseins, um eine Aspiration von Einstreu zu vermeiden. Ferner wurden den Tieren im 10 Minuten Intervall hinsichtlich Atemfrequenz, Temperatur sowie Vigilanz überwacht und ihnen zur Narkoseausleitung zusätzlich eine subkutane Injektion von Atipamezolhydrochlorid (Antisedan®, Pfizer GmbH, Berlin) appliziert. Die weitere Überwachung und Dokumentation von Allgemeinbefinden, Aktivität, Körpergewicht sowie Heilungsverlauf übernahmen spezielle geschulte Tierärzte und Pfleger. Zur Linderung der postoperativen Schmerzen wurde den Tieren subkutan das Schmerzmittel Metacam (Meloxicam®, Boehringer Ingelheim Pharma

GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein) drei bis fünf Tage postoperativ nach Bedarf verabreicht.

### 2.7 Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA)

Um scharfe Bilder während der DXA-Messung zu erhalten, und so eine korrekte Auswertung durchführen zu können, bedurfte es einer Immobilisation der Ratten mittels Sedierung. Diese erfolgte durch intraperitoneale Applikation von 4 mg/kg KG Xylacin (Rompun® 2 % CEVA Tier-Gesundheit GmbH, Düsseldorf) und 100 mg/kg KG Ketamin (bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta) gelöst in körperwarmer 0,9 % NaCl-Lösung. Nach Sedierung der Tiere lagen diese auf dem Bauch, alle Extremitäten gestreckt sowie mit dem Kopf voran auf dem Detektor. Dabei wurde sorgsam darauf geachtet, dass die Wirbelsäulen der Ratten gerade am Detektorkreuz des DXA-Gerätes ausgerichtet wurden (Abb. 18 und 19). Als Unterlage dienten handelsübliche Auflagen für Behandlungsliegen um Wärmeverlust zu vorzubeugen und etwaigen spontanen Urinabgang aufzufangen. Anschließend wurde der gesamte Körper mit einem DXA-Gerät (Lunar Prodigy®, GE Healthcare, Deutschland) untersucht, abgelichtet und die so entstandenen Rohbilddaten mit der entsprechenden enCORE Software (GE Healthcare, v. 13.40) berechnet sowie analysiert.



**Abbildung 18: Sedierte und gebettete Ratte zur DXA-Messung.**

Sedierte Ratte bäuchlings ausgebreitet zur DXA-Messung. Hier findet sich ein Tier nach der Ovariectomie mit rasiertem Rücken. An diesem Beispiel lässt sich gut die exakte Ausrichtung per Laser-Fadenkreuz des Scanners gut erkennen, welcher eine standardisierte Lagerung der Tiere ermöglicht.

Der Messvorgang wurde im Kleintiermodus für Körpergewichte unter zwei kg durchgeführt. Die durchschnittliche Messdauer lag bei drei bis vier Minuten pro Versuchstier. Die Strahlenbelastung beläuft sich dabei auf eine mittlere Dosis von 1,8  $\mu\text{Gy}$  und ist als sehr gering anzusehen. Vor jeder Messung erfolgte eine fachgerechte Kalibrierung sowie ein Selbstcheck im Rahmen der Qualitätssicherung. Die Tiere wurden unmittelbar nach der OP gemessen, um eine weitere Narkose zum Zeitpunkt  $t=0$  zu vermeiden. Zum Zeitpunkt  $t=1$  nach 12 Monaten wurden die Tiere erneut sediert, mittels DXA-Messung untersucht sowie anschließend euthanasiert.



**Abbildung 19: Messung einer Ratte durch das DXA-Gerät.**

Übersichtsaufnahme eines DXA-Scanners (Lunar Prodigy®) kurz vor der Aufnahme. Im Gerät befindet sich eine bereits sedierte und gelagerte Ratte. Gut zu erkennen sind der Arm mit der Röntgenröhre, welche die beiden Röntgenstrahlen mit definierter Energie abgibt und die sich im Tisch befindende Detektoreinheit darstellt.

Die Analyse der ermittelten zweidimensionalen Bilder erfolgte durch das Festlegen verschiedener Regions of Interest (ROIs) (Abb. 20). Die Fläche der jeweiligen ROIs der vorliegenden Arbeit ist untersucherunabhängig definiert worden und konstant bemessen. Dafür wurde zuvor Flächen, beispielsweise für die Extremitäten, die Wirbelsäulenanteile oder den gesamten Körper, festgelegt und an die jeweiligen anatomischen Gegebenheiten der Tiere ausgerichtet. Die hier verwendete Software war in der Lage, Messwerte für jeden ROI bezüglich Knochendichte (Bone Mineral Density

(BMD) in  $\text{g}/\text{cm}^2$ , Mineralsalzgehalt (Bone Mineral Content (BMC) in g) sowie Körperfettanteil (in %) zu berechnen.

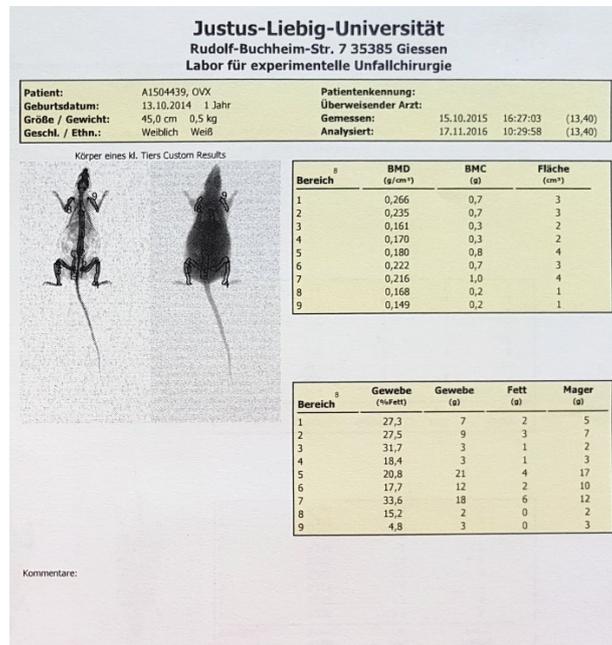


Abbildung 20: Datenausgabeblatt einer DXA-Messung mit gesetzten ROI bei der Ratte.

Die Festlegung und Ausrichtung der ROIs erfolgte durch Bestimmung anatomischer Landmarken. Die Femora wurden von den Femurkondylen bis zum Femurkopf, die Tibiae vom Sprunggelenk bis zum Tibiaplateau und die Wirbelsäule von Beginn der Beckenkämme bis zur Schulterhöhe gemessen. Die Erfassung der Beckenregion erfolgte hemilateral, so dass neben dem proximalen Femur auch die kaudalen Teile der Lendenwirbelsäule mit einbezogen waren. Die ROI des gesamten Körpers wurde durch die Nasenspitze, die Schwanzspitze und die Enden der Extremitäten begrenzt.

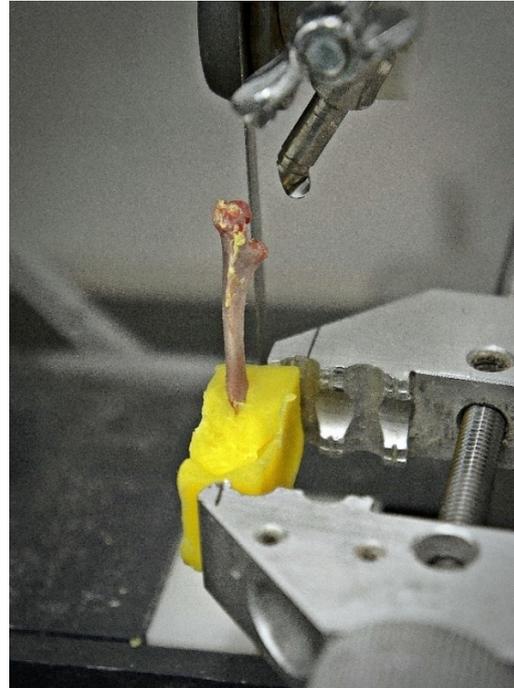
## 2.8 Präparation und Entkalkung der Proben

Zur Herstellung von Paraffinschnitten für die Histomorphometrie-Auswertung wurden die entsprechenden Knochenproben nach 24-stündiger Fixierung im Kühlschrank des Labors für experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen in einer Lösung aus 4 %iger Paraformaldehydlösung mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 7,2 - 7,4) sechsmalig mit reinem 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 7,2 - 7,4) gewaschen. Für die spätere Herstellung von dünnen Schnittpräparaten am Mikrotom war eine Entkalkung der Proben in 3,4 %iger EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) gemischt

mit 10 %iger Tris-Lösung (Entkalkungszeit ca. 3 Wochen, Lösungswechsel alle zwei Tage) notwendig.

### 2.9 Anfertigung der Paraffinschnitte

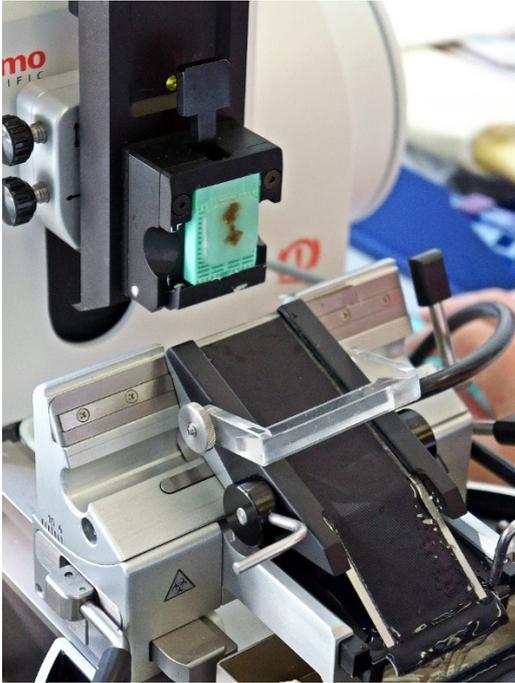
Zum Zeitpunkt  $t=1$  nach 12 Monaten Standzeit wurden die Versuchstiere im Anschluss an die DXA-Messung für die folgende Präparation euthanasiert. Dies geschah jeweils einzeln durch eine schmerzlose  $\text{CO}_2$ -Narkose in einem luftdichten Käfig mit Anschluss an eine  $\text{CO}_2$ -Gasflasche ( $\text{CO}_2$ -Fluss 3 - 4 l/min). Nach eindeutiger Feststellung des Todes wurde die Präparation durch Trennen der Extremitäten vom Rumpf mit einer Schere begonnen. In nächsten Schritt wurde jedes Gewebe sorgsam vom Knochen getrennt, so dass saubere Knochenstrukturen zur weiteren Vorbereitung vorlagen.



**Abbildung 21:** Knochensäge mit in Paraffin gebettetem Femur.

Für die folgende Auswertung der Histomorphometrie wurden anschließend die linke Tibia und das linke proximale Femur in einem Polymethacrylsäuremethylester Kunststoff (PMMA, Technovit® 3040, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) mit dem distalen Ende eingebettet und mit einer Knochensäge (EXAKT 310, EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt) in longitudinaler Richtung durchsägt, um eine spätere Dekalzifizierung durchzuführen zu können (Abb. 21). Die distal eingebetteten Enden wurden verworfen. Die Fixierung der Knochenfragmente erfolgte in einer 4 %igen Paraformaldehyd-Natriumpuffer-Lösung nach Lilli über 24 Stunden im Kühlschrank, im Rahmen dessen eine Entkalkung des ossären Gewebes eintrat.

Zur Paraffinschnittherstellung konnte nach Beendigung der Entkalkung die Herstellung des Präparates durch den Einbettungsautomaten (Leica TP1050, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) erfolgen.



**Abbildung 22: Mikrotom zur Herstellung der Paraffinschnitte.**

Hierzu wurden die Proben zuvor eine Stunde unter klarem, fließendem Leitungswasser gewaschen. Der

Einbettungsautomat folgte dabei dem in Tabelle 4 dargestellten Entwässerungs-Schema. Als nächster Schritt war ein Aushärten der Proben auf einer Kälteplatte notwendig. Die Proben wurden in ein Metallförmchen gelegt, damit sie nicht an der Kälteplatte haften bleiben.

Die Schnitte wurden mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM355S Coolcutsystem Fa. Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland) hergestellt. Die einzelnen Paraffinschnitte wiesen vor der Fixierung auf einem Objektträger die Stärke von 5 µm auf. Über eine Wasserrutsche gelangten die so entstandenen Paraffinschnitte in ein 44°C warmes Wasserbad (Abb. 22).

In diesem dehnten sich die Schnitte aus und erlaubten so eine faltenfreie Fixierung auf mit APES-(3-Amino-propyltriethoxysilan) beschichteten Objektträgern (Fa. R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland). Zuletzt wurden die hergestellten Präparate bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet.

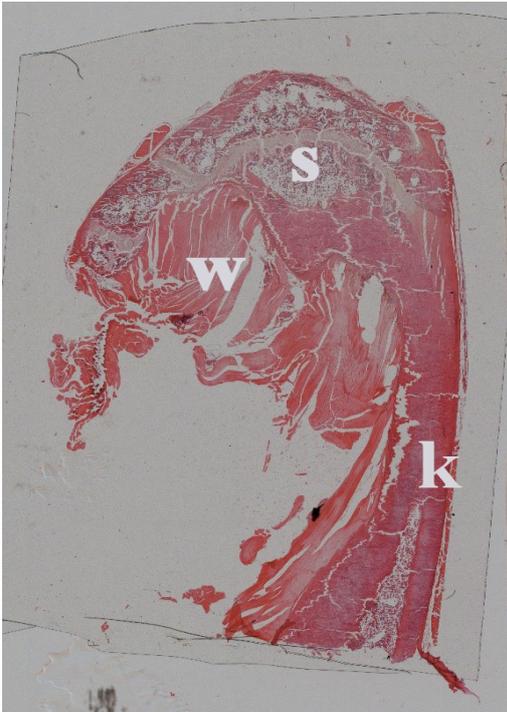
**Tabelle 4: Entwässerungsschema für Paraffinschnitte.**

Entwässerungsschema der Präparate zur Herstellung der Paraffinschnitte im Einbettungsautomaten Leica TP1050.

Medium	Dauer der Waschung
Ethanol 70 %	2 Stunden
Ethanol 80 %	2,5 Stunden
Ethanol 96 %	2 Stunden
Ethanol 100 %	3-mal je 3 Stunden
Xylol	Einmal 60, dann 2-mal je 45 Minuten
Paraffin	3-mal je 40 Minuten

### 2.10 Herstellung der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen

Nach Fertigstellung der Paraffinschnitte wurden diese mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die mit Xylol (Merck KGaA, Darmstadt) entparaffinisierten Präparate wurden zur Vorbereitung der Färbung in einer absteigenden Alkoholreihe in die wässrige Phase überführt. Als Färbelösung diente Mayers Hämalaun (Merck KGaA, Darmstadt).



**Abbildung 23:** Dünnschnitt eines in Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparat eines Rattenfemurs.

Differenziert wird zwischen Kortikalis (k) und Spongiosa (s) sowie Weichgewebe (w).

Die nachfolgende Waschung erfolgte zunächst mit destilliertem Wasser und sich anschließender Nachspülung unter fließendem Leitungswasser über 10 Minuten. Für die folgende Eosinfärbung wurde vor und nach dem Eintauchen des Objektträgers in die vorliegende 1%ige Eosinlösung mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Schnitte waren dann für ca. 16-25 Minuten in die aufsteigende Alkoholreihe zu geben. Anschließend erfolgte die Fertigstellung durch Eindeckelung mit DePex (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) (Abb. 23).

### 2.11 Histomorphometrie

Die histomorphometrische Auswertung sollte eine möglichst genaue Bestimmung des prozentualen Anteils der Trabekelfläche in einem klassischen HE-Schnitt abbilden. Das diesbezügliche Vorgehen orientierte sich an einem eigens hierfür entwickelten Protokoll aus einer Kombination verschiedener kostenloser Software-Programme. Dementsprechend konnte eine standardisierte und reproduzierbare Analyse der Knochenproben erfolgen.

Folgende drei Schritte wurden zur Analyse der gefärbten Präparate vorgenommen:

1. Erfassung und Digitalisierung der HE-gefärbten Knochenschnitte am Fotomikroskop Axioplan 2 Imaging (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) und der hochauflösenden Digitalkamera DC500 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim).
2. Zusammensetzung der erhaltenen Einzelbilder zu einem größeren, zusammengehörigen Bild pro Präparat mit Hilfe des Programmes Microsoft Image Composite Editor (ICE) Version 1.4.4 64-bit.
3. Anschließende automatische Flächenanalyse mit dem Programm ImageJ Version 1.45s ImageJ (ImageJ 1.45s, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) mit Java 1.6.0\_20 64-bit durchgeführt.

Im Folgenden werden die drei Schritte ausführlich dargelegt:

Um die histomorphometrisch Auswertung der HE-Schnitte mit dem Programm ImageJ durchführen zu können, ist im Vorfeld eine Digitalisierung der Präparate notwendig. Dies wurde durch das Fotografieren der Präparate auf einem Objektträger mit dem Fotomikroskop Axioplan 2 Imaging (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) und der hochauflösenden Digitalkamera DC500 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) ermöglicht. Nach Überprüfen der gewünschten Güte der Präparate wurden diese mit dem 5x-Objektiv fotografiert und im Tagged Image File Format (TIFF) gespeichert.

Aufgrund der Vergrößerung des Mikroskopes ließen sich die einzelnen Präparate nicht *in toto* fotografieren. Somit bedurfte es der Zusammensetzung der Einzelbilder pro Präparat zu einem Gesamtbild. Hierfür wurden die Fotos mit Hilfe der kostenlosen Software Microsoft Image Composite Editor (ICE) Version 1.4.4 zusammengefügt.

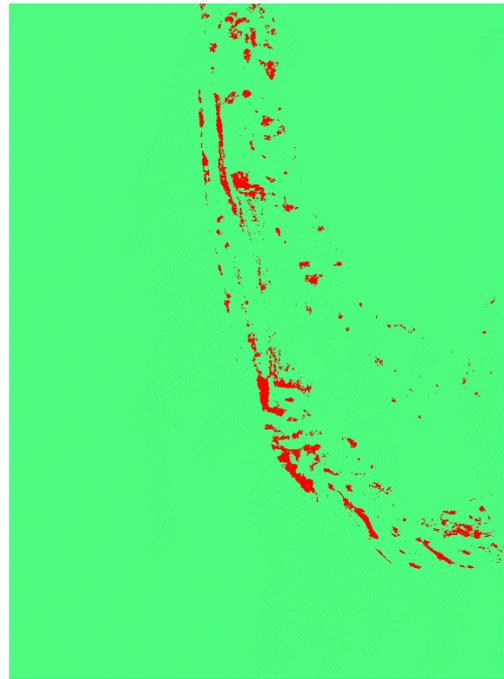
Die Flächenanalyse der trabekulären Strukturen der als TIFF gespeicherten Präparat-Fotografien erfolgt mit dem Computerprogramm ImageJ (Version 1.45s ImageJ, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, betrieben über Java 1.6.0\_20 64-bit). Das Programm sollte trabekuläre Strukturen eigenständig erkennen. Manuell legte der Untersucher je 15 Farbstufen für trabekuläre Strukturen sowie das restliche Gewebe im grün-rot-farbkonvertierten Präparat-Abbildes fest. In der weiteren Bildbearbeitung zeigte das Programm Trabekelfläche bzw. -dicke auf. Zusätzlich wurden Anteile aller anderen Gewebe zusammengefasst und dokumentiert, so dass sich der prozentuale Anteil der Trabekel ermitteln ließ. Nach genannter Vorbereitung des Programms wurde dieser Analysealgorithmus hinterlegt, so dass alle Bilder der Präparate danach berechnet werden konnten.

Das Computerprogramm ImageJ zerlegte das Gesamtbild eines Präparates in 16-25 Teile, färbte das Bild zunächst rot-grün und war im Folgenden in der Lage, den Anteil der rotgefärbten Pixel über die Gesamtpixelzahl zu ermitteln.

Pixel sind das kleinste Flächenelement eines digitalen Bildes. Deren Größe innerhalb eines Bildes ist nicht variabel. Dementsprechend ist anzunehmen, dass das Verhältnis von roten und grünen Pixeln als Ausdruck des prozentualen Anteils der Trabekelfläche des Markraumes gelten kann. Im gleichen Zuge wurden so die Dicken der rot gefärbten Trabekel ermittelt (Abb. 24).

Durch den Verlust von Versuchstieren oder die Beschädigung von Präparaten unterscheidet sich die Anzahl der histomorphometrisch untersuchten und ausgewerteten Präparate.

Es wurde weiterhin eine klassische lichtmikroskopische Untersuchung der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparate vorgenommen. Hierbei wurde das Augenmerk auf die Beschaffenheit der kortikalen Strukturen, der Ausbildung und Konfiguration des Trabekelwerks, sowie der Beschaffenheit des Knochenmarks gelegt. Die Auswertung erfolgte diesbezüglich als Deskription und im Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander. Eine statistische Auswertung erfolgte nicht, da lediglich das makroskopische Erscheinungsbild zur Beschreibung kam. Im Zuge dieses Auswertungsmodus wurde allerdings zwischen Kortikalis und Trabekel unterschieden, so dass die Trabekelfläche prozentual beschrieben werden konnte.



**Abbildung 24: Durch ImageJ bearbeiteter Bildausschnitt eines Paraffinschnittes.**

Durch ImageJ bearbeiteter Bildausschnitt nach dem Anlernen des Programms zur Differenzierung der Gewebeanteile. Knöcherner Anteile lassen sich rot, alle anderen Gewebe grün darstellen, so dass hier Trabekelfläche und Trabekeldicke durch das Programm erfasst werden können.

### 2.12 Statistische Auswertungen

Zur Vorbereitung der statistischen Auswertungen war es zunächst notwendig, eine Exceltabelle der erhaltenen Daten aus der DXA-Messung und der Histomorphometrie anzulegen. Dies erfolgte mit Excel 2010 von Microsoft® Version 14.0.6129. Die folgenden Analysen wurden mit PSPP® Statistics (GNU Operating Systems PSPP Version 1.0.1, Fa. Free Software Foundation, 51 Franklin Street, Fifth Floor, Boston MA 021110-1335, USA) durchgeführt.

Die statistischen Testungen erfolgten durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit einem Post-Hoc-Test nach Bonferroni [35]. Voraussetzung für das Testverfahren einer ANOVA sind eine Varianzhomogenität sowie eine Normalverteilung. Zur Überprüfung der Normalverteilung wurde eine explorative Datenanalyse mit dem Shapiro-Wilk-Signifikanztest gemacht und die Varianzhomogenität durch den Brown-Forsythe-Test bestätigt.

Es wurden in dieser Arbeit die üblichen statistischen Hypothesen zur wissenschaftlichen Vermutung eines Unterschiedes zwischen den einzelnen Gruppen aufgestellt. Die Nullhypothese besagt, dass kein Unterschied besteht, während bei der Alternativhypothese Differenzen festgestellt werden [84].

In den hier durchgeführten Versuchen werden statistische Test angewendet, die Belege für die Annahme bzw. die Ablehnung der Nullhypothese aufführen. Hierbei wird ein Signifikanzniveau festgelegt (p-Wert), welches die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der die Nullhypothese irrtümlich als falsch angenommen wurde. In dieser Arbeit werden Werte kleiner oder gleich  $p=0,05$  als signifikant betrachtet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der DXA-Messungen

Im Rahmen der Knochendichtebestimmung mittels DXA-Messung wurden die Tiere der unterschiedlichen Gruppen zu den Zeitpunkten t=0 und t=1 gemessen, was jeweils den Zeiten vor Beginn der spezifischen Fütterungen bzw. nach Abschluss der Zeitperiode von 12 Monaten entsprach.

Um repräsentative Daten hinsichtlich des Knochenstatus zu erhalten, erfolgte die Analyse der Daten zur Ganzkörperuntersuchung. Die zuvor durchgeführte explorative Datenanalyse zeigte keine signifikanten Abweichungen von der Normalverteilung auf und die Mittelwerte ließen geringe Abweichungen von den Medianen erkennen. Analysiert wurden die Knochenmineraliendichte (BMD), der Knochenmineralgehalt (BMC) sowie die Masse des Fettgewebes.

##### 3.1.1 Deskriptive Statistik der Untergruppen

Zunächst erfolgte die Beschreibung der DXA-Messwerte innerhalb der einzelnen Tiergruppen zu den Zeiten t=0 und t=1. Diesbezüglich wurden die Parameter BMD, BMC und Fett verwendet.

In der Kontrollgruppe fand sich der Mittelwert des BMD zum Zeitpunkt t=0 bei 0,18 g/cm<sup>2</sup> mit einer Standardabweichung von 0,01 g/cm<sup>2</sup> (Range: 0,18-0,20), der des BMC bei 8,86 g (SD: 1,05; Range 7,7-10,4) und für den Fettanteil lag er bei 21,29 g (SD: 7,56; Range 24-46). Für diese Referenzgruppe liegen nur Werte zum Zeitpunkt t=0 vor, da diese Tiere zur Gewebeuntersuchung eingeschlachtet und präpariert wurden. Die weiteren Gruppen konnten zu 2 Zeitpunkten analysiert werden.

Tabelle 5: BMD-Werte der DXA-Messung zum Zeitpunkt t=0.

<b>BMD t=0</b>	<b>Diät</b>	<b>OVX</b>	<b>OVXD</b>	<b>Sham</b>	<b>Control</b>
Maximal	0,207	0,205	0,216	0,206	0,198
3.Quartile	0,2025	0,196	0,2005	0,202	0,1865
Median	0,1895	0,192	0,1935	0,193	0,18
Mittelwert	0,19	0,19	0,19	0,19	0,18
1.Quartile	0,1845	0,1895	0,19075	0,186	0,178
Minimal	0,173	0,185	0,178	0,183	0,176
SD	0,02	0,01	0,01	0,1	0,01

Tabelle 6: BMD-Werte der DXA-Messung zum Zeitpunkt t=1.

BMD t=1	Diät	OVX	OVXD	Sham
Maximal	0,214	0,204	0,192	0,22
3.Quartile	0,1865	0,18975	0,18325	0,2115
Median	0,179	0,1855	0,18	0,206
Mittelwert	0,18	0,18	0,18	0,20
1.Quartile	0,176	0,18275	0,17725	0,1895
Minimal	0,169	0,181	0,172	0,184
SD	0,01	0,02	0,01	0,01

In der Sham-Gruppe fanden sich Mittelwerte beim BMD von 0,19 g/cm<sup>2</sup> (SD: 0,01; Range 0,18-0,20) zum Zeitpunkt t=0 und 0,20 g/cm<sup>2</sup> (SD: 0,01; Range 0,18-0,22) zum Zeitpunkt t=1. Hinsichtlich des BMC zeigte sich bei t=0 ein Wert von 8,81 g (SD: 0,91; Range 8-11) sowie bei t=1 von 9,43 g (SD: 1,12; Range 8,1-11,5). Die Fettmasse fand sich mit einem mittleren Wert von 33,43 g (SD: 7,09; Range 15-37) zum Zeitpunkt t=0 und 34,71 g (SD:10,97; Range 23-54) zum Zeitpunkt t=1. Dies bedeutet, dass eine leichte Zunahme der Knochendichte und des Knochenmineralgehaltes beobachtet werden konnte. Das Fettgewebe hat ebenfalls insgesamt zugenommen.

Bei der Betrachtung der OVX-Gruppe stellte sich der BMD mit einem Mittelwert von 0,19 g/cm<sup>2</sup> (SD: 0,01; Range 0,18-0,20) zum Zeitpunkt t=0 und 0,18 g/cm<sup>2</sup> (SD: 0,02; Range 0,18-0,20) zum Zeitpunkt t=1 dar. Im Durchschnitt fand sich für den BMC ein Wert von 9,5 g (SD: 0,75; Range 8,8-11,1) bei t=0. Zum Zeitpunkt t=1 stellte er sich mit 10,7 g (SD: 1,53; Range 9,1-13) dar. Das Fettgewebe lag zu Beginn zum Zeitpunkt t=0 mit einem mittleren Wert von 34,27 g (SD: 13,75; Range 20-62) und im Verlauf bei t=1 mit 80,33 g (SD: 41,74; Range 11-129) vor. In dieser Gruppe fand sich dementsprechend eine minimale Abnahme des BMD über den Beobachtungszeitraum bei leichter Zunahme der Werte des Mineralgehaltes des Knochens und deutlicher Zunahme des Fettanteils.

Der Mittelwert des BMD der OVXD-Gruppe zum Zeitpunkt t=0 lag bei 0,19 g/cm<sup>2</sup> (SD: 0,01; Range 0,18-0,22) sowie 0,18 g/cm<sup>2</sup> (SD: 0,01; Range 0,17-0,19) zum Zeitpunkt t=1. Bei Betrachtung des BMC fand sich dieser mit 10,05 g (SD: 1,55; Range 7,8-12,9) bei t=0 und 11,59 g (SD: 1,79; Range 9,2-13,8) zum Zeitpunkt t=1. Der durchschnittliche Fettgewebsanteil betrug bei t=0 35,08 g (SD: 17,08; Range 15-81), zum Zeitpunkt t=1 hingegen 102,62 g (SD: 38,46; Range 58-151). Somit zeigte sich, dass in dieser Gruppe die Knochendichte über den Zeitraum von 12 Monaten leicht abnahm und der Knochenmineralgehalt sowie das Fettgewebe zu nahmen.

Betrachtet man die Gruppe der Proben mit alleiniger Defizienzernährung (Diätgruppe), fand sich der Mittelwert der BMD-Werte bei 0,19 g/cm<sup>2</sup> (SD: 0,02; Range 0,16-0,21) zum Zeitpunkt t=0 und 0,18 g/cm<sup>2</sup> (SD: 0,01; Range: 0,16-0,21) zum Zeitpunkt t=1. Der BMC stellte sich mit durchschnittlich 10,72 g (SD: 1,20; Range 9,6-12,8) bei t=0 und 12,33 g (SD: 1,47; Range 10,4-14,9) zum Untersuchungszeitpunkt t=1 dar. Im Mittel lag der Fettgehalt zu Beginn bei 47,62 g (SD: 24,81; Range 26-94) und zum Zeitpunkt t=1 bei 97,0 g (SD: 36,93; Range 34-140). Das bedeutet, dass in der Gruppe der Tiere mit der Spezialdiät eine leichte Abnahme der Knochendichte und eine Zunahme des Mineralsalzgehaltes und des Fettgewebes beobachtet werden konnte. Die einzelnen Werte sind der Übersicht halber in folgenden Tabellen sowie Box-Whisker-Plots veranschaulicht und zusammengefasst (Tab. 5-10, Abb. 25-30).

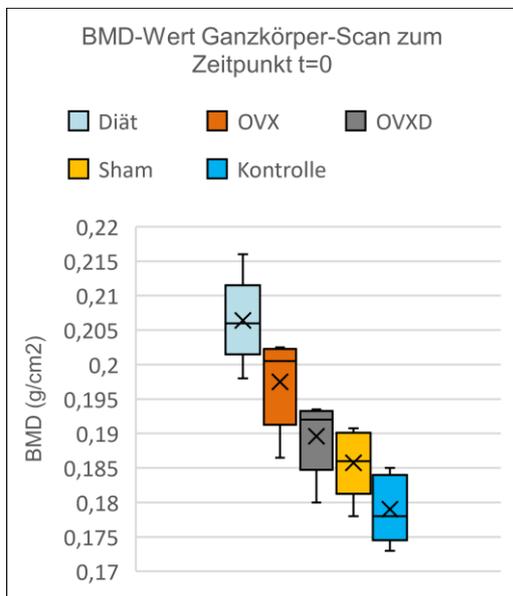


Abbildung 25: Box-Plot-Darstellung der BMD-Werte zum Zeitpunkt t=0.

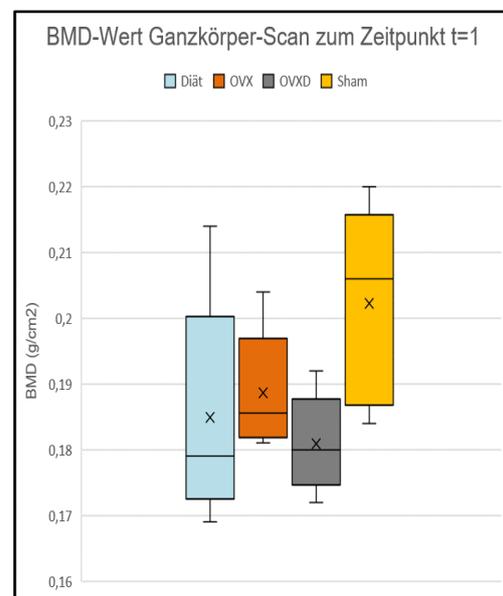


Abbildung 26: Box-Plot-Darstellung der BMD-Werte zum Zeitpunkt t=1.

Die Zusammenschau der abgebildeten Gruppen zeigt eine nahezu homogene Ausgangslage zum Beginn der Einstellung. Signifikante Differenzen fanden sich daher weder bei der Knochendichte und beim Mineralsalzgehalt, noch beim Körperfettanteil. Die Diät-Gruppe zeigte zu Beginn den höchsten und die Kontrollgruppe den geringsten BMD-Wert. Betrachtet man den Mineralsalzgehalt des Knochens, so ist dieser zu Beginn des Beobachtungszeitraums in der OVXD-Gruppe am höchsten und ebenfalls bei der Kontrollgruppe am niedrigsten. Der höchste Körperfettanteil findet sich in der ersten

Messung zum Zeitpunkt t=0 in der Diätgruppe und lässt sich mit den niedrigsten Werten in der Kontrollgruppe feststellen.

Zum Ende der Standzeit zeigte die Shamgruppe als einzige einen Anstieg der Knochendichte (BMD), alle anderen Gruppen fielen in den gemessenen Werten. Einen Anstieg des Mineralsalzgehaltes (BMC) des Knochens ließ sich über die Dauer des Experimentes bei allen Gruppen finden. Ebenso ließ sich eine Zunahme des Körperfetts in allen Gruppen beobachten.

**Tabelle 7: BMC-Werte der DXA-Messung zum Zeitpunkt t=0.**

<b>BMC t=0</b>	<b>Diät</b>	<b>OVX</b>	<b>OVXD</b>	<b>Sham</b>	<b>Control</b>
Maximum	12,8	11,1	12,9	11	10,4
3. Quartile	11,65	9,75	11	9,05	9,2
Median	10,3	9,2	10	8,3	8,7
Mittelwert	10,72	9,5	10,05	8	8,86
1. Quartile	9,7	9,15	8,975	8,3	8,25
Minimum	9,6	8,8	7,8	8	7,7
SD	1,20	0,75	1,55	0,91	1,05

**Tabelle 8: BMC-Werte der DXA-Messung zum Zeitpunkt t=1.**

<b>BMC t=1</b>	<b>Diät</b>	<b>OVX</b>	<b>OVXD</b>	<b>Sham</b>
Maximum	14,9	13	13,8	11,5
3. Quartile	12,9	11,7	13,225	9,75
Median	12,1	10,15	11,5	9,4
Mittelwert	12,33	10,7	11,59	9,43
1. Quartile	11,55	9,725	10,4	8,75
Minimum	10,4	9,1	9,2	8,1
SD	1,47	1,53	1,79	1,12

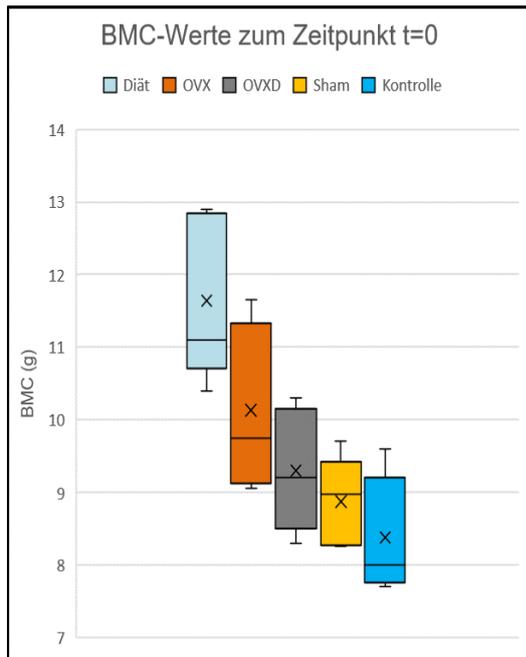


Abbildung 27: Box-Plot Darstellung der BMC-Werte zum Zeitpunkt t=0.

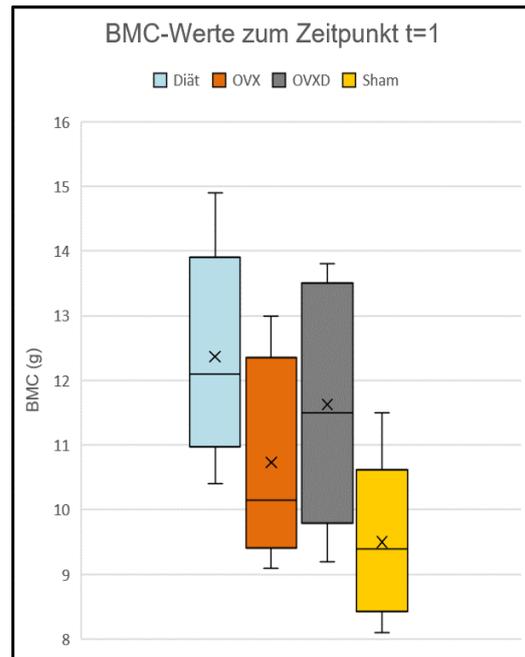


Abbildung 28: Box-Plot Darstellung der BMC-Werte zum Zeitpunkt t=1.

Wie auch bei der Erhebung der BMD-Werte zeigten sich die Werte des BMC nahezu homogen. Den höchsten BMC zu Beginn hatte die Diätgruppe (Abb. 28), den niedrigsten BMC-Werte die Kontroll-Gruppe. Im Verlauf stieg der BMC aller Gruppen an. Hierbei konnte beobachtet werden, dass in der Diätgruppe der stärkste Anstieg mit 1,8 g vorlag. In der OVXD-Gruppe lag dieser bei 1,5 g, in der Sham-Gruppe bei 1,1 g und in der OVX-Gruppe bei 0,95 g. Zum Ende der Standzeit stellte sich die Diät-Gruppe mit den höchsten und die Sham-Gruppe mit den niedrigsten Werten des Mineralsalzgehaltes des Knochens dar.

Tabelle 9: Fett-Werte der DXA-Messung zum Zeitpunkt t=0.

Fett (g) t=0	Diät	OVX	OVXD	Sham	Control
Maximum	94	62	81	37	46
3. Quartile	61,25	41,5	36	22,5	36
Median	38,5	29	31,5	18	32
Mittelwert	47,62	34,27	35,08	33,43	21,29
1. Quartile	27,75	25	25,5	17	30
Minimum	26	20	15	15	24
SD	24,81	13,75	17,08	7,09	7,56

Tabelle 10: Fett-Werte der DXA-Messung zum Zeitpunkt t=1.

Fett (g) t=1	Diät	OVX	OVXD	Sham
Maximum	140	129	151	54
3. Quartile	126,5	107,5	143,5	39,5
Median	108,5	83,5	94	31
Mittelwert	97	80,33	102,62	34,71
1. Quartile	92	65,5	76,25	28
Minimum	34	11	11	23
SD	36,93	41,74	38,46	10,97

Die Fettgewebsanteile zeigten sich zum Zeitpunkt t=0 analog zu den Werten des BMD und BMC mit einem höchsten Fettgewebsanteil in der Diät-Gruppe, sowie mit dem geringsten Körperfettanteil in der Kontroll-Gruppe (Tab. 9). Alle Gruppen wiesen eine Steigerung der Fettmasse auf. Hierbei stellte sich die Diät-Gruppe im Median mit dem höchsten Wert und die Sham-Gruppe mit dem geringsten zum Zeitpunkt t=1 dar (Tab. 10). Die Diätgruppe ließ eine Zunahme um 70 g beobachten, die OVXD-Gruppe nahm 62,5 g zu, die OVX-Gruppe 54,5 g und die Sham-Gruppe 13 g.

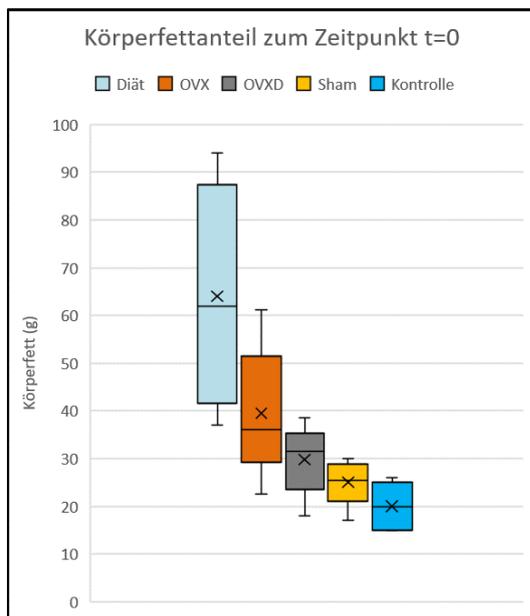


Abbildung 29: Box-Plot Darstellung der Fett-Werte zum Zeitpunkt t=0.

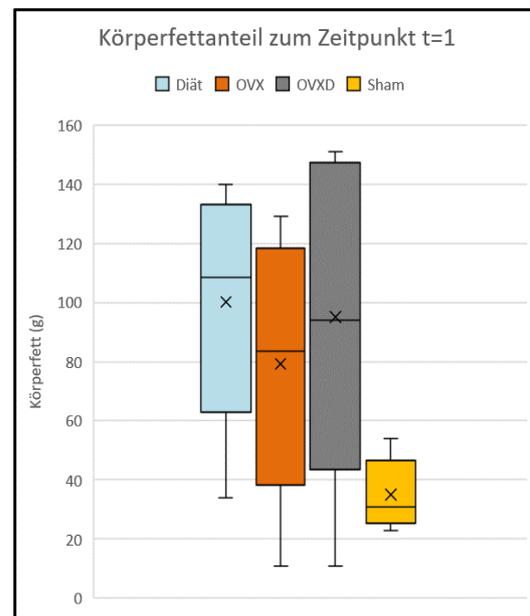


Abbildung 30: Box-Plot Darstellung der Fett-Werte zum Zeitpunkt t=1.

### 3.1.2 Varianzanalysen innerhalb der Untergruppen

Die Varianzanalysen der Sham-Gruppe zeigten einen p-Wert von  $p=0,25$  (Probengröße bei  $t=0$  und  $t=1$  von 7) bei Vergleich der BMD-Daten im zeitlichen Verlauf. Die Berechnung des BMC wies einen p-Wert von 0,28 bei der genannten Probengröße auf. Die Differenz der Körperfettwerte war nicht signifikant mit  $p=0,02$ .

Im Rahmen der ANOVA-Durchführung der OVX-Gruppe stellte sich ein p-Wert von 0,19 bei Betrachtung des BMD mit einer Probengröße von  $t=0$  von 11 und  $t=1$  von 6 Tieren dar. Der BMC zeigte signifikante Unterschiede mit einem p-Wert von 0,04. Ebenfalls signifikant zeigte sich das Ergebnis der Körperfettanalyse ( $p=0,003$ ).

Innerhalb der OVXD-Gruppe zeigte der BMD einen signifikanten p-Wert von 0,002 (Probengröße  $t=0$ : 12 Tiere und  $t=1$ : 8 Tiere). Ferner lagen gleichfalls signifikante Werte beim BMC mit einem p-Wert von 0,05 vor. In dieser Gruppe zeigte sich zudem noch ein hoher Anteil an Tieren, welche extrem an Körpergewicht zugenommen hatten. Dies ließ sich statistisch hochsignifikant mit einem p-Wert von 0,0004 abbilden.

Bei den Tieren der Diätgruppe fanden sich die Ergebnisse des p-Wertes beim BMD mit 0,30 bei einer Probengröße von  $t=0$  von 8 Ratten und  $t=1$  von 7 Ratten. In dieser Gruppe verendeten Tiere im Verlauf, so dass 7 Tiere zur Auswertung gelangten. Signifikante Differenzen lieferten die Analysen des BMC ( $p=0,03$ ) und des Fettgewebes ( $p=0,008$ ).

Zusammengefasst lassen sich somit folgende Sachverhalte beschreiben:

Die Sham-Gruppe zeigte ein signifikant steigendes Körperfett über die Standzeit auf, wobei die Knochendichte und der Knochenmineralsalzgehalt zwar minimal anstiegen, aber keine Signifikanz erkennen ließen.

Die Tiere der OVX-Gruppe hatten keine signifikante Änderung der Knochendichteparameter. Hinsichtlich des Mineralsalzgehaltes und des Fettgewebes zeigten sich hier statistisch signifikante Änderungen mit einer darstellbaren Zunahme des Mineralsalzgehaltes bei deutlicher Zunahme des Körperfetts über den Zeitraum der Versuchsanordnung.

Die Ergebnisse der OVXD-Gruppe fielen hinsichtlich der Knochendichte, des Knochenmineralsalzgehaltes und des Körperfetts signifikant aus. Dargestellt werden konnte eine signifikante Abnahme der Knochendichte bei gleichzeitiger signifikanter Zunahme des Mineralsalzgehaltes und des Fettgewebeanteils. Beobachtet werden

konnte allerdings auch, dass in dieser Gruppe 6 Tiere große Weichgewebstumoren im Bereich des Beckens bzw. der Hinterläufe aufwiesen.

In der Gruppe der Tiere der Diätgruppe ließ sich keine signifikante Abnahme der Knochendichte feststellen. Diese ist über den Zeitraum der Standzeit minimal angestiegen. Signifikante Differenzen ließen sich mit einem Anstieg des Mineralsalzgehaltes und des Fettgewebes feststellen. Diese Gruppe zeigte eine Gruppenstärke von 8 Tieren zu Beginn und 7 Tieren nach Ende der Standzeit, da Tiere über den Zeitraum verstorben sind.

### **3.1.3 Varianzanalysen zwischen den Untergruppen**

Nach Analyse der einzelnen Gruppen hinsichtlich BMD, BMC und Fettgewebe, erfolgte ein Vergleich des BMD und BMC der Gruppen untereinander. Dies geschah durch eine Gegenüberstellung der verschiedenen Gruppen zu den definierten Zeitpunkten  $t=0$  und  $t=1$ . So fanden sich 6 Kombinationen zu je zwei Zeitpunkten, welche durch eine ANOVA untersucht wurden und im Folgenden beschrieben werden. Die Darstellung sollte eine mögliche Differenz der Werte der Osteoporose-bestimmenden Parameter zum Ende der Standzeit aufzeigen.

Bei der Gegenüberstellung von Diät-Gruppe und OVX-Gruppe fand sich beim BMD der ANOVA-Analyse ein p-Wert von 0,67 zum Zeitpunkt  $t=0$  ( $n=8$  bzw.  $n=11$ ) und 0,54 zum Zeitpunkt  $t=1$  ( $n=7$  bzw.  $n=6$ ). Die Wertepaare des BMC zeigten  $p=0,15$  zum Zeitpunkt  $t=0$  und  $p=0,07$  zum Zeitpunkt  $t=1$ . Für das Gruppenpaar Diät-/OVX-Gruppe bedeutete es, dass zu Beginn der Standzeit keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Knochendichte und des Mineralsalzgehaltes gab. Zum Ende wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede beobachtet.

Beim Vergleich der Diät-Gruppe mit der OVXD-Gruppe fand sich ein p-Wert von 0,49 zum Zeitpunkt  $t=0$  ( $n=8$  bzw.  $n=12$ ) und 0,56 zum Zeitpunkt  $t=1$  ( $n=7$  bzw.  $n=8$ ) bei der Untersuchung des BMD. Die Überprüfung des BMC fand sich hier mit Werten für  $p=0,31$  zum Zeitpunkt  $t=0$  und einem p-Wert von 0,40 zum Zeitpunkt  $t=1$ . Die Werte der Paarung Diät-/OVXD-Gruppe zeigten zum Zeitpunkt  $t=0$  und  $t=1$  nur minimale Unterschiede auf. Somit ließ sich zwischen den beiden Gruppen keine Signifikanz zu Beginn und zum Ende der Versuchsanordnung verzeichnen.

Für die Varianzanalysen der Diät-Gruppe gegenüber der Sham-Gruppe fand sich ein p-Wert von 0,66 zum Zeitpunkt  $t=0$  ( $n=8$  bzw.  $n=7$ ) und 0,03 zum Zeitpunkt  $t=1$  ( $n=7$  bzw.

n=7). Hinsichtlich des BMC zeigte sich ein p-Wert von 0,004 zu Beginn bei t=0 und bei t=1 ein p-Wert von 0,001. Zwischen den Gruppen Diät und Sham ließen sich zum Zeitpunkt t=0 zur Einstellung keine Unterschiede in der Knochendichte erkennen, wohl aber zum Zeitpunkt t=1. Die Knochendichte ist in der Shamgruppe gestiegen und in der Diätgruppe nahezu unverändert geblieben. Signifikante Unterschiede des Mineralsalzgehaltes ließen sich zum Ende der Versuchsanordnung beobachten, da dieser bei der Diätgruppe deutlich im Vergleich zur Sham-Gruppe anstieg.

Im Vergleich der OVX-Gruppe mit der OVXD-Gruppe ließ sich für den BMD ein p-Wert von 0,65 zum Zeitpunkt t=0 (n=11 bzw. n=12) und 0,07 zum Zeitpunkt t=1 (n=6 bzw. n=7) feststellen. Werte mit einem p von 0,30 zum Zeitpunkt t=0 und p= 0,34 fanden sich hier bei der Analyse des BMC. Es zeigte sich somit weder eine signifikante Änderung der Knochendichte, als auch eine Änderung der Mineralsalzgehalte zwischen diesen Gruppen.

Hinsichtlich des BMD fand sich für die ANOVA der OVX-/Sham-Gruppenauswertung ein p-Wert von 0,85 zum Zeitpunkt t=0 (n=11 bzw. n=7) und 0,06 zum Zeitpunkt t=1 (n=6 bzw. n=7). Der BMC wurde hier bei t=0 mit einem p-Wert von 0,09 und einem p=0,11 bei t=1 ermittelt. Der Vergleich der Parameter der Gruppen OVX und Sham zeigte keine signifikanten Unterschiede zum Beginn und zum Ende der Versuchsanordnung auf.

Als Letztes erfolgte die ANOVA für die vergleichende Betrachtung der Gruppen OVXD und Sham und zeigten mit einen p-Wert von 0,84 zum Zeitpunkt t=0 (n=12 bzw. n=7) und p=0,001 zum Zeitpunkt t=1 (n=8 bzw. n=7) für die Analyse des BMD auf. Bei Betrachtung des BMC fanden sich ein p-Wert von 0,07 bei t=0 und bei t=1 ein p-Wert von 0,01. Die vergleichende Betrachtung der Gruppen OVXD und Sham zeigte, dass die Knochendichte sich zu Beginn des Versuchs homogen darstellte und fiel in der OVXD-Gruppe über den Versuchszeitraum ab. In der Shamgruppe konnte ein Anstieg der Knochendichte verzeichnet werden und führte so zu signifikanten Werten. Eine homogene Ausgangssituation fand sich auch hinsichtlich des Mineralsalzgehaltes. Dieser stieg in der OVXD-Gruppe nur minimal an, in der Sham-Gruppe zeigte sich hingegen eine deutliche Zunahme des Mineralsalzgehaltes, welche sich jedoch nicht signifikant abzeichnete.

Die Kontrollgruppe ist, wie vorangegangen schon beschrieben, nur zu einem Zeitpunkt untersucht worden, da nach der Einstellung die Euthanasie erfolgte.

Zusammengefasst ließen sich folgende Beobachtungen beschreiben:

Es finden sich signifikante Werte in der Paarung Sham-Diät mit signifikanten Unterschieden des Mineralsalzgehaltes zum Zeitpunkt t=1, da dieser bei der Diätgruppe deutlich im Vergleich zur Sham-Gruppe anstieg.

In der Gruppenanalyse OVXD gegen Sham zeigte sich in der Shamgruppe ein Anstieg der Knochendichte mit nahezu gleichbleibenden Werten in der OVXD-Gruppe zum Zeitpunkt t=1 und führte so zu signifikanten Werten. Ebenso konnte dies in der Analyse des Mineralsalzgehaltes des Knochens beobachtet werden. Dieser stieg in der OVXD-Gruppe nur minimal an, in der Sham-Gruppe zeigte sich hingegen eine deutliche Zunahme des Mineralsalzgehaltes.

### **3.2 Histomorphometrie HE-gefärbter Präparate**

Nach Präparation und Färbung wurden die Proben grafisch aufgearbeitet sowie gemäß der Beschreibung in Kapitel 2 Material und Methoden, ab Seite 49, sowohl zur Analyse der trabekulären Fläche als auch trabekulären Dicke vorbereitet und ausgewertet. Ferner erfolgte die lichtmikroskopische Beurteilung der Unterschiede der einzelnen Gruppen. Die statistische Auswertung und lichtmikroskopischen Beschreibungen sind im Folgenden für die einzelnen Gruppen aufgeführt.

#### **3.2.1 Trabekuläre Dicke**

Die einzelnen Gruppen wurden zunächst nach einfacher deskriptiver Statistik beschrieben und gliederten sich wie folgt:

Der Mittelwert der trabekulären Dicke fand sich in der Kontrollgruppe bei 35990  $\mu\text{m}$  (SD: 34601; Range 4875-158653  $\mu\text{m}$ ). In der Diät-Gruppe lag der Durchschnittswert bei 4647  $\mu\text{m}$  (SD: 64041; Range 2779-654199  $\mu\text{m}$ ). Betrachtete man nun die OVX-Gruppe zeigte sich die trabekuläre Dicke im Mittel bei 31077  $\mu\text{m}$  (SD: 23353,74, Range 2791-148596  $\mu\text{m}$ ). Bezüglich der OVXD-Gruppe stellte sich ein Mittelwert von 30881  $\mu\text{m}$  (SD: 2681,42; Range 6084-91678  $\mu\text{m}$ ) dar. Die Sham-Gruppe hatte einen Mittelwert von 26343  $\mu\text{m}$  (SD: 6647,84; Range 6089-76468  $\mu\text{m}$ ) (Tab. 11 und Abb. 31). Somit liegen Werte der einzelnen Versuchsgruppen vor, die sowohl gegen die Kontrollgruppe, als auch gegeneinander verglichen werden konnten.

Tabelle 11: Trabekuläre Dicke der Histomorphometrie.

Gruppe	Minimum (µm)	Mittelwert (µm)	Maximum (µm)	Standardabweichung
Diät	2779	46477	654199	64041
OVX	2791	31077	148596	23354
OVXD	6084	30881	91678	2681
Sham	6089	26343	76468	6648
Kontrolle	4875	35990	158653	34601

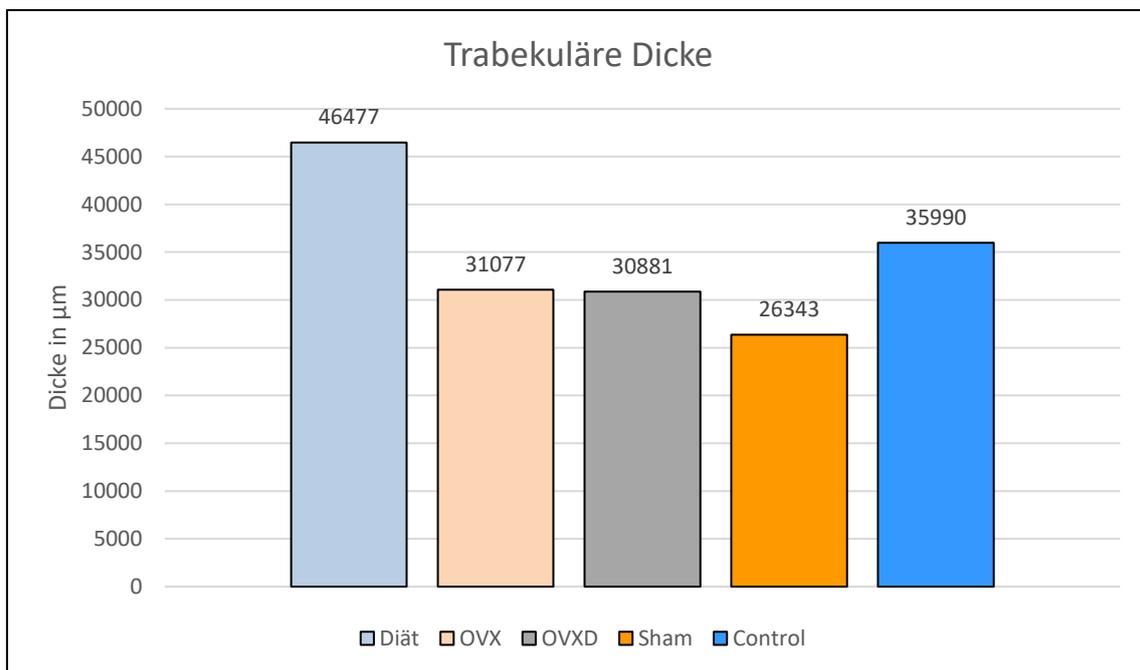


Abbildung 31: Darstellung der trabekulären Dicke in der histomorphometrischen Auswertung.

Zum Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander erfolgte die Varianzanalyse durch die einfaktorielle ANOVA. Als Probengröße wurde die Summe der angefertigten Knochenschnitte der jeweiligen Gruppen zu Grunde gelegt, um statistisch valide Ergebnisse zu erhalten. Verglichen wurden im Folgenden die Werte der trabekulären Dicke der einzelnen Gruppen. Der Übersicht halber sind die unterschiedlichen Gruppen einzeln aufgeführt und danach zusammenfassend beschrieben.

**Kontrolle - OVX:**

Bei der Gegenüberstellung der Kontrollgruppe mit der OVX-Gruppe fand sich ein p-Wert von 0,06 bei einer Probengröße von 158 bzw. 168.

### **Kontrolle - Diät:**

Für die ANOVA Kontrollgruppe-Diätgruppe zeigte sich ein p-Wert von 0,05 bei einer Probengröße von 158 Schnitten in der Kontrollgruppe und 202 Schnitten in der Diätgruppe.

### **Kontrolle - OVXD:**

Einen p-Wert von 0,05 ergab die vergleichende Varianzanalyse der Kontrollgruppe mit der OVXD-Gruppe. Hierbei lag die Probengröße für die Kontrollgruppe bei 158 Schnitten, die der OVXD-Gruppe bei 116.

### **Kontrolle - Sham:**

Betrachtet man den Vergleich der Kontrollgruppe mit der Sham-Gruppe, ergab sich ein p-Wert von 0,001 bei einer Probengröße 158 bzw. 79.

### **Diät – OVX:**

Ebenso ließ sich bei der gegenüberstellenden Varianzanalyse der Diät-Gruppe mit der OVX-Gruppe ein signifikantes Ergebnis von  $p=0,003$  mit einer Probengröße 202 bzw. 168 feststellen.

### **Diät – OVXD:**

Anders stellte es sich bei der Berechnung von Diät-Gruppe im Vergleich zur OVXD-Gruppe mit einem p-Wert von 0,01 bei der Probengröße 202 bzw. 116 Schnitten dar.

### **Diät – Sham:**

Ein signifikantes Ergebnis fand sich wiederum im Vergleich Diät-Gruppe zur Scheinoperation-Gruppe mit  $p= 0,006$  bei einer Probengröße 202 bzw. 79.

### **OVX – OVXD:**

Die Analyse der OVX-/OVXD-Daten zeigte einen p-Wert von 0,93 bei einer Probengröße 168 bzw. 116.

### **OVX – Sham:**

Des Weiteren zeigte die Gegenüberstellung der Gruppen OVX mit Sham kein signifikantes Ergebnis auf. Hier fand sich ein p-Wert von 0,10 bei einer Probengröße von 168 bzw. 79.

**OVXD – Sham:**

Zwischen diesen Gruppen fand sich mit einem  $p=0,06$  bei einer Probengröße von 116 bzw. 79 im Rahmen der vergleichenden Analyse der OVXD-Gruppe mit der Sham-Gruppe ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

Zusammenfassend sind signifikante Werte bei den Gruppenpaarungen Kontrolle-Diät, Kontrolle-OVXD, Kontrolle-Sham, Diät-OVX, Diät-OVXD und Diät-Sham festgestellt worden. Hochsignifikante Unterschiede fanden sich in den Gruppenpaarungen Kontrolle-Sham, Diät-OVX und Diät-Sham. Die Gruppenpaarungen Kontrolle-OVX, OVX-OVXD, OVX-Sham und OVXD-Sham ließen keine signifikanten Unterschiede erkennen. So konnte beschrieben werden, dass die trabekuläre Dicke der Diätgruppe insgesamt die höchsten Werte aufwies, gefolgt von der Kontrollgruppe, OVX, OVXD und der Shamgruppe mit den niedrigsten Werten.

**3.2.2 Trabekuläre Fläche**

Die Analyse der Präparate der einzelnen Gruppen unter dem Gesichtspunkt der trabekulären Fläche wurde, ebenso wie die Analyse der trabekulären Dicke, zunächst in einfacher deskriptiver Statistik dargestellt sowie die verschiedenen Therapieformen gegeneinander im Folgenden durch eine ANOVA ausgewertet.

Der Mittelwert der Kontrollgruppe fand sich bei  $166948 \mu\text{m}^2$  (SD: 110700,53; Range 4896-307934  $\mu\text{m}^2$ ). Der Anteil der Trabekel beläuft sich auf 6,6 %. In der Diätgruppe lag der ermittelte Durchschnittswert bei  $272279 \mu\text{m}^2$  (SD: 72662,67; Range 178625-382792  $\mu\text{m}^2$ ), wobei sich ein prozentualer Anteil von 16,7 % Trabekelfläche zeigte. Bei den Tieren, bei denen die Ovariectomie durchgeführt wurde, konnte ein Mittelwert von  $203425 \mu\text{m}^2$  (SD: 135648,93; Range 90946-492335  $\mu\text{m}^2$ ) und ein trabekulärer Flächenanteil von 8,6 % festgestellt werden. Die Gruppe der ovariectomierten Ratten mit zusätzlicher Dexamethason Gabe zeigte im Schnitt  $244173 \mu\text{m}^2$  (SD: 319196,51; 56839-1085066  $\mu\text{m}^2$ ). In der Auswertung findet sich ein Prozentsatz von 16,1 % trabekulärer Fläche. Der Mittelwert in der Scheinoperationgruppe lag bei  $100890 \mu\text{m}^2$  (SD: 75782,22; Range 177-230563  $\mu\text{m}^2$ ) mit einem trabekulären Anteil von 5,2 % (Tab. 12 und Abb. 32).

Der Übersicht halber sind die unterschiedlichen Gruppen einzeln aufgeführt und danach zusammenfassend beschrieben.

Tabelle 12: Trabekuläre Fläche der Histomorphometrie.

Gruppe	Minimum ( $\mu\text{m}^2$ )	Mittelwert ( $\mu\text{m}^2$ )	Maximum ( $\mu\text{m}^2$ )	Standardabweichung
Diät	178625	272279	382792	72663
OVX	90946	203425	492335	135649
OVXD	56839	244173	1085066	319197
Sham	177	100890	230563	75782
Control	4896	166948	307934	110701

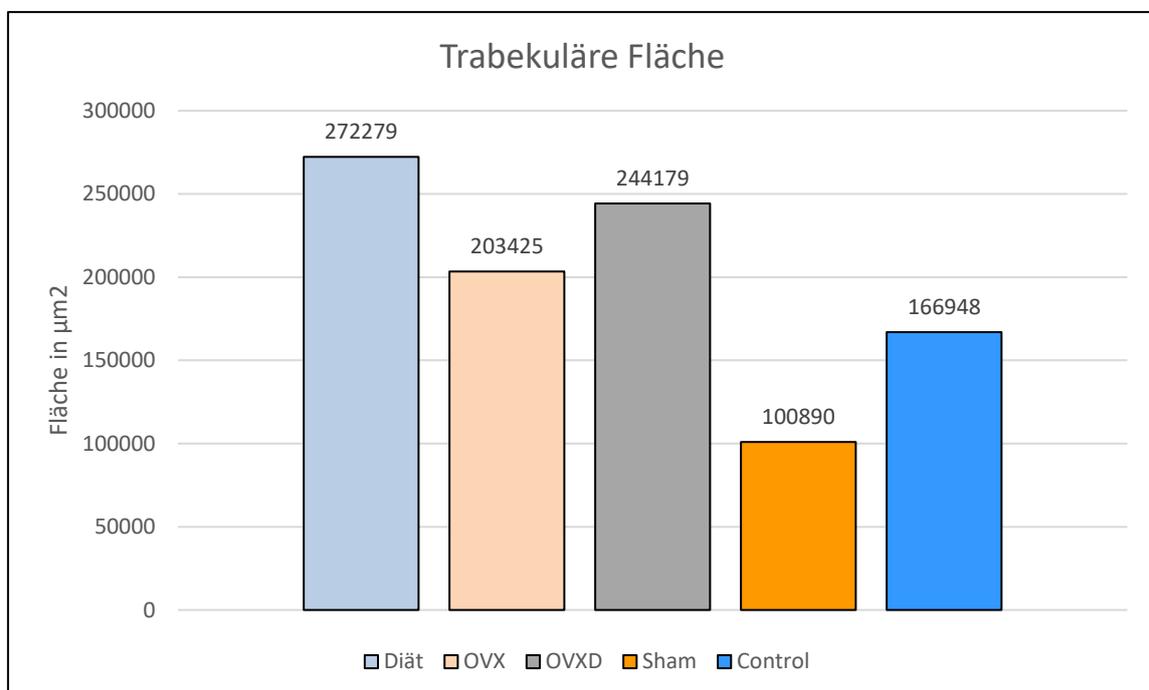


Abbildung 32: Darstellung der trabekulären Fläche in der histomorphometrischen Auswertung.

**Control - OVX:**

Die Analyse der Kontroll-Gruppe zur OVX-Gruppe ergab einen p-Wert von 0,36 bei einer Probengröße von 158 bzw. 168.

### **Control - Diät:**

Für den Vergleich der Kontroll-Gruppe mit der Diät-Gruppe fand sich ein p-Wert von 0,16 bei einer Probengröße von 158 bzw. 202.

### **Control - OVXD:**

Der Unterschied der Mittelwerte von Kontrollgruppe zur OVXD-Gruppe zeigte einen p-Wert von 0,25 bei einer Probengröße von 158 bzw. 116.

### **Control - Sham:**

Die vergleichende ANOVA der Daten aus der Kontroll- mit der Scheinoperationgruppe kam mit einem hochsignifikanten p-Wert von 0,005 bei einer Probengröße von 158 bzw. 79 zur Darstellung.

### **Diät – OVX:**

Der Vergleich der Diät-Gruppe mit der OVX-Gruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied bei einem p-Wert von 0,70 mit einer Probengröße von 202 bzw. 168.

### **Diät – OVXD:**

Des Weiteren fand sich  $p=0,70$  im Vergleich der Diät-Gruppe zur OVXD-Gruppe bei einer Probengröße von 202 bzw. 116.

### **Diät – Sham:**

In der ANOVA dieses Gruppenpaares fand sich ein hochsignifikanter p-Wert von 0,002 bei einer Probengröße von 202 bzw. 79.

### **OVX – OVXD:**

Keinen Unterschied hingegen zeigte die Untersuchung der Gruppen OVX und OVXD mit  $p=0,10$  bei einer Probengröße von 168 bzw. 116.

### **OVX – Sham:**

Ein hochsignifikanter Wert fand sich im Vergleich der OVX- zur Scheinoperation-Gruppe mit einem p-Wert von 0,003 bei einer Probengröße von 168 bzw. 79.

### **OVXD – Sham:**

Letztlich zeigte sich in der vergleichenden ANOVA der Gruppe OVXD/Sham kein signifikantes Ergebnis mit einem p-Wert von 0,48 bei einer Probengröße von 116 bzw. 79.

Zusammenfassend sind signifikante Werte bei den Gruppenpaarungen Kontrolle-Sham, Diät-Sham und OVX-Sham festgestellt worden. Diese waren zugleich hochsignifikant. Die Gruppenpaarungen Kontrolle-OVX, Kontrolle-OVXD, Diät, OVXD, OVX-OVXD und OVXD-Sham ließen keine signifikanten Unterschiede erkennen. So lässt sich feststellen, dass die trabekuläre Fläche der Diätgruppe insgesamt die höchsten Werte aufwies, gefolgt von der OVXD-Gruppe, der OVX-Gruppe, der Kontrollgruppe und der Shamgruppe mit den niedrigsten Werten.

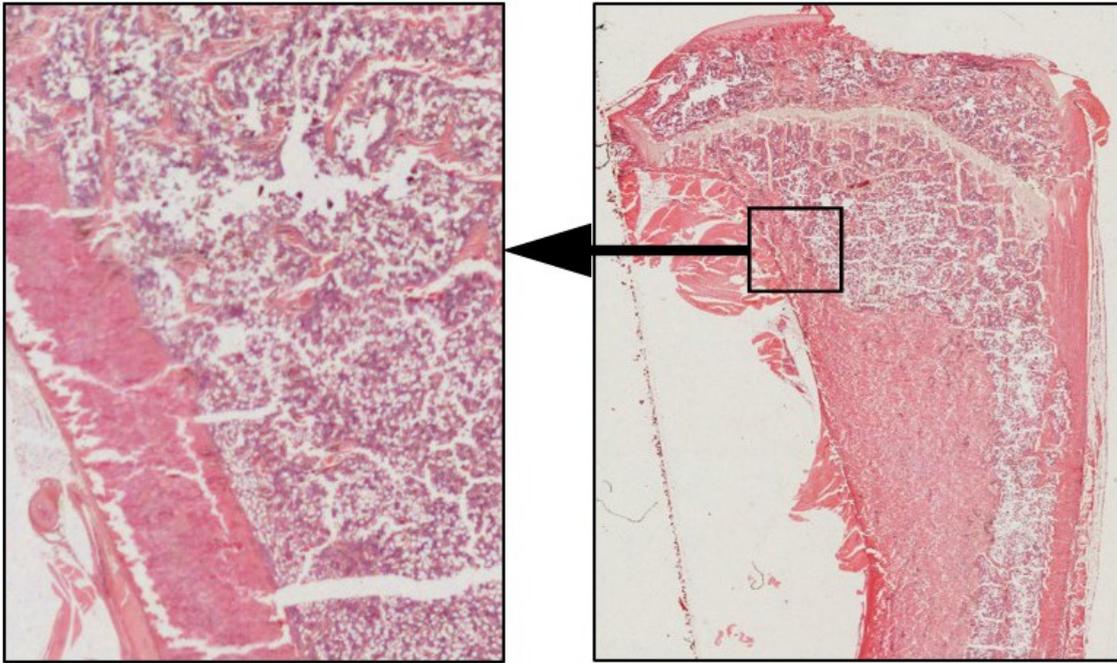
Demnach finden sich hochsignifikante Werte bei der Auswertung der trabekulären Dicke und der trabekulären Fläche jeweils in den Gruppenpaarungen Kontrolle-Sham und Diät-Sham.

### **3.2.3 Lichtmikroskopische Analysen**

Die Untersuchung der Kontrollgruppe erfolgte zum Zeitpunkt  $t=0$ , da diese Tiere zu Beginn der Standzeit euthanasiert wurden. Die Präparate der anderen Gruppe wurden zum Zeitpunkt  $t=1$  angefertigt. Dies entspricht dem Ende der Standzeit von 12 Monaten. Nach der Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeichnen sich zellkernhaltige Strukturen lila ab, was dem Knochenmark entspricht. Trabekelstrukturen und Kortikalis kommen in der Farbe hellrot zur Darstellung. Fettanteile bleiben ungefärbt und finden sich als Vakuolenstruktur im Knochenmark.

#### **Kontrollgruppe:**

In den histologischen Schnitten der Kontrollgruppe ließ sich eine homogen strukturierte Kortikalis erkennen. Diese war kräftig ausgebildet und setzte sich in einer gleichmäßigen Trabekelstruktur fort. Die Trabekel waren in ihrer Konfiguration allerdings schmal ausgebildet, so dass sich insgesamt eine Trabekelfläche von 6,6 % finden ließ. Die bekannte Ausrichtung der Trabekel an den Trajektionslinien war eindeutig zu erkennen. Die Epiphysenfugen waren regelmäßig und physiologisch konfiguriert. Fettzellen fanden sich kaum zwischen den reichlich vorhandenen Knochenmarkzellen (Abb. 33).

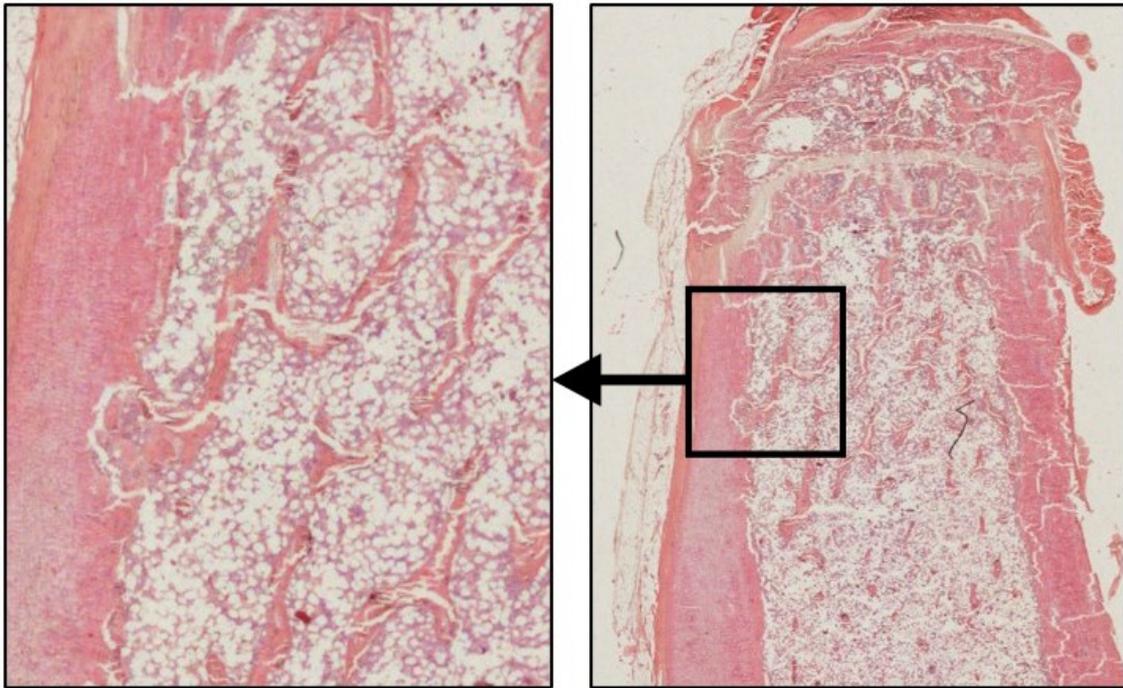


**Abbildung 33: HE-gefärbte Knochenschnitte von der Tibia der Kontrollgruppe.**

In der HE-gefärbten Abbildung erkennt man rötlich gefärbte Knochenstrukturen und lila gefärbtes Knochenmark. Fettanteile finden sich nahezu nicht. Im rechten Bild erkennt man die anatomische Struktur einer distalen Tibia mit der blass rosa gefärbten, querverlaufenden Epiphysenfuge im oberen Teil des Bildes.

**Diätgruppe:**

Bezüglich der Trabekel- und Kortikalisstruktur war in dieser Gruppe eine schwächere Kortikalis als in der Kontrollgruppe zu finden (Abb. 34). Die Trabekel zeigten sich unregelmäßig und verdickt. Eine Anordnung nach den Trajektionslinien ist noch zu erkennen. Insgesamt waren es weniger Trabekel, welche jedoch verdickt erschienen. Dies führte zu einer Trabekelfläche von 16,7 %. Die Epiphysenfugen waren grober als in der Kontrollgruppe, allerdings in physiologischer Ausrichtung. Das Knochenmark wies eine deutliche Verfettung auf.

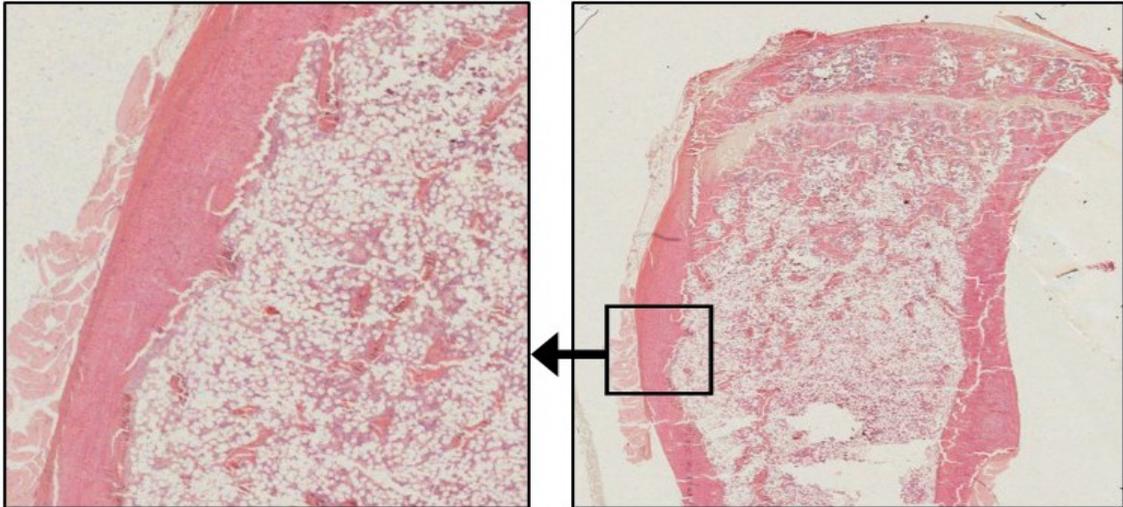


**Abbildung 34: HE-gefärbte Präparate der Tibia der Diätgruppe.**

Zu den vergrößerten Trabekelstrukturen zeigen sich klein-vakuolige Fettzellen im Knochenmarkanteil. Die Kortikalisstruktur erscheint aufgelockert.

### **OVX-Gruppe:**

Die knöchernen Strukturen der Tiere der OVX-Gruppe wiesen eine unregelmäßige Kortikalis mit deutlicher Ausdünnung auf (Abb. 35). Die trabekulären Anteile waren mit einer Fläche von 8,6 % dünn ausgebildet und ebenfalls sehr unregelmäßig verteilt. Die Epiphysenfugen zeigten sich vergrößert. Die trabekuläre Ausrichtung war physiologisch, erschien jedoch unregelmäßig und im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert. Auch in dieser Gruppe ließ sich eine ausgeprägte fettige Degeneration des Markraumes beobachten.

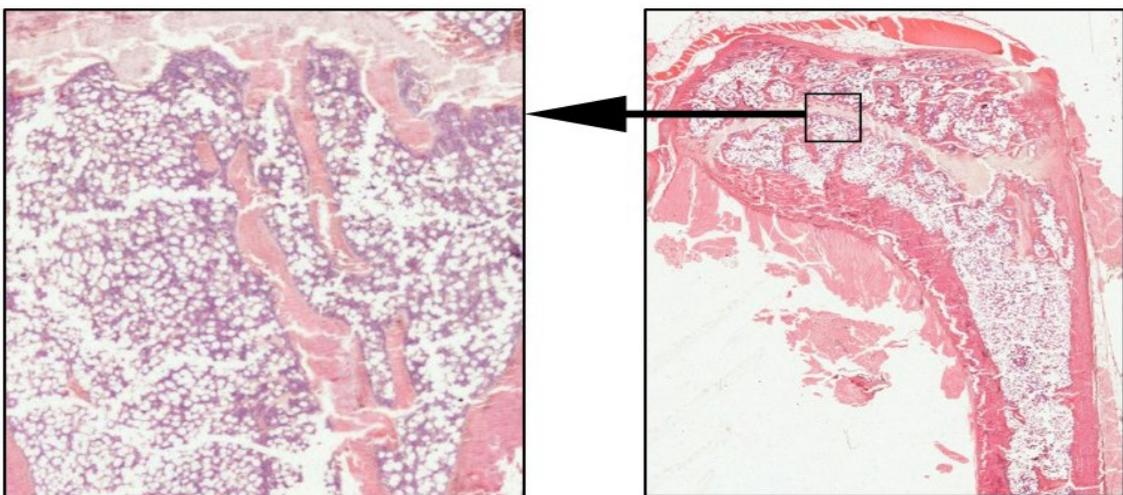


**Abbildung 35: HE-gefärbte Knochenschnitte der Tibia der OVX-Gruppe.**

Die Kortikalis ist unregelmäßig strukturiert, es findet sich reichlich fettige Degeneration des Knochenmarks. Trabekuläre Strukturen sind erhalten und erkennbar. Die blass rosa gefärbte Epiphysenfuge im oberen Anteil des rechten Bildes zeigt sich von grober Binnenstruktur.

**OVXD-Gruppe:**

In der OVXD-Gruppe fanden sich ähnlich konfigurierte Trabekel wie in der OVX-Gruppe (Abb. 36). Insgesamt erschienen diese aber von gröberer Struktur, so dass die trabekuläre Fläche 16,1 % einnahm. Die unregelmäßige Anordnung war auch hier zu finden. Die Epiphysenfugen waren rechtwinklig zur krafttragenden Achse ausgerichtet, erschienen allerdings aufgelockert. Zwischen den vielen Knochenmarkszellen zeigten sich reichlich Fettvakuolen.

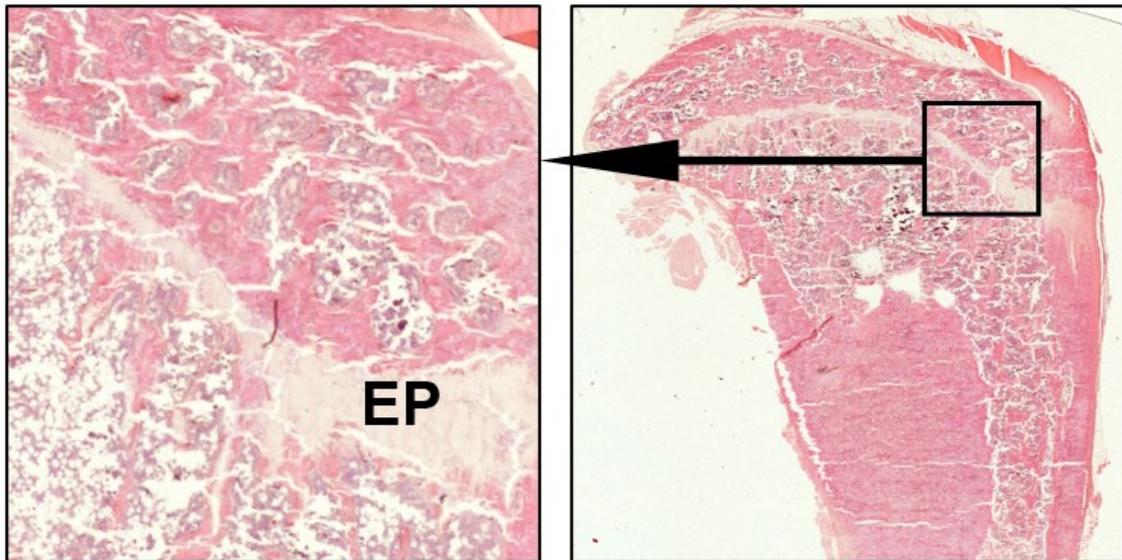


**Abbildung 36: HE-gefärbte Knochenschnitte der Tibia der OVXD-Gruppe.**

Auch in dieser Abbildung finden sich die klein-vakuoligen Fettzellen zwischen dem Knochenmark. Es ist ein Anschnitt der Epiphysenfuge abgebildet (blass rosafarbenes Band im oberen Bildausschnitt). Im diaphysären Anteil des Knochens fehlen trabekuläre Strukturen nahezu gänzlich.

**Sham-Gruppe:**

Die Kortikalis war kräftig und von homogener Struktur geprägt (Abb. 37). Die Trabekel waren in Traktorenrichtung angeordnet und reichlich vorhanden. Mit einer trabekulären Fläche von 5,2 % ließen sich schmale Trabekelstrukturen finden. Die Epiphysenfugen waren zart und in physiologischer Ausrichtung zu finden. Insgesamt zeigten sich in der lichtmikroskopischen Begutachtung wenige Unterschiede zur Kontrollgruppe. Das Knochenmark zeigte eine mäßige Verfettung mit klein konfigurierten Fettzellen.



**Abbildung 37: HE-gefärbte Präparate der Tibia der Sham-Gruppe.**

Es zeigt sich in dieser Gruppe eine altersentsprechende Konfiguration von Trabekeln und Kortikalis. Fettzellen zeigten sich homogen verteilt von nicht übermäßiger Zahl. Quer durch das Bild verläuft eine Epiphysenfuge (EP).

## 4 Diskussion

Die Osteoporose stellt die Gesellschaft vor einer großen Herausforderung, wobei die gesellschaftlichen, medizinischen und volkswirtschaftlichen Gesichtspunkte zu bedenken sind. Die aktuellen Therapieansätze weisen in eine gute Richtung, weiterhin ist jedoch wenig über die Pathomechanismen der Osteoporose-Ausprägung bekannt. Für die Gewinnung neuer Erkenntnisse ist auf die Erforschung der Osteoporose im Tiermodell nicht zu verzichten. Zur Etablierung eines validen Tiermodells leistete die Arbeit von Bauer 2015 bereits gute Ergebnisse [7]. Diesbezüglich werden in der vorliegenden Arbeit die eigenen experimentellen Ergebnisse diskutiert und mit denen weiterer vorangegangener Studien genannter Forschungsgruppen gegenübergestellt.

### 4.1 Studiendesign

Neben Randomisierung und doppelter Verblindung wird die prospektive Beobachtung als Gütekriterien für die Durchführung einer Studie angesehen [50]. In vorliegender experimenteller Arbeit wurde das Design einer prospektiven, einfach verblindeten, randomisierten Studie gewählt. Die Randomisierung erfolgte durch Einteilung der Tiere in die 5 Gruppen Kontrolle, Diät, OVX, OVXD sowie Sham. Den Tieren war die durchgeführte Therapie nicht bekannt und die Beobachtung war prospektiv. Somit sind zwei Gütekriterien erfüllt worden. Um eine doppelte Verblindung herzustellen, wäre eine Injektion einer Flüssigkeit unbekanntes Inhalts bei allen Tieren notwendig gewesen, so dass während des Versuchs die Applikation von Dexamethason nicht bekannt gewesen wäre. Ebenso hätte eine verblindete Fütterung erfolgen müssen. Somit hätten die Tiere allerdings einzeln gehalten werden müssen, was einen deutlichen Mehraufwand in der Pflege der Tiere und der Größe des Stalls bedeutet hätte. Mit der hier durchgeführten Gruppenhaltung wurde somit ein Kompromiss zwischen Wirtschaftlichkeit, Ethik und wissenschaftlichem Anspruch eingegangen [50].

### 4.2 Tiermodell

Harrison et al. beschrieb schon 1960, dass die Kombination einer Ovariectomie mit einer multidefizienten Diät sich besonders gut eignet, um einen postmenopausalen Zustand zu simulieren [44]. Laut Bruyère et al. kommt dieses Rattenmodell dem des Menschen sehr nahe [15]. Bei der Ratte kann sowohl eine valide Datenerhebung mittels DXA-

Messung stattfinden, als auch nach erfolgter Euthanasie eine histomorphometrische Untersuchung durchgeführt werden. Dies beschreibt Yamauchi et al. in seinen Ausführungen zur Untersuchung des Kleintiermodells durch die DXA-Methode, als auch Anliker et al. in der Beschreibung des Monitorings der Osteoporose in der Laboratoriumsmedizin [2], [111]. Gleichzeitig ist die Haltung aufgrund der Größe der Tiere in einer Stallung leicht zu standardisieren. Dies zeigt, dass das gewählte Kleintiermodell Vorzüge in der Untersuchung der Osteoporoseinduktion aufweist und dementsprechend verwendet wurde.

Es gilt allerdings zu bedenken, dass die Ratte bei der Erforschung der Osteoporose gewisse Risiken birgt. Zum einen kann in der nativen Ratte die senile und postmenopausale Osteoporoseentwicklung nicht ohne weiteres untersucht werden, da die Tiere ihren Sexualzyklus bis zum Tode fortsetzen [100]. Ferner ist die Lebenserwartung des Menschen überproportional gestiegen, so dass die Häufigkeit und Ausprägung der Osteoporose beim Menschen überproportional hoch erscheinen mag. Einen senilen und postmenopausalen Zustand erreicht man laut Bruyère et al. im Kleintiermodell der Ratte nur durch eine Ovariectomie in Kombination mit der oben beschriebenen Multidefizienzdiät und der Glukokortikoidapplikation [15].

Um valide Studien produzieren und reproduzieren zu können, ist die Auswahl eines passenden Tiermodells nicht unerheblich. Es ist zu beachten, dass der Knochen sowohl im Tiermodell als auch beim menschlichen Skelett ein ähnliches Verhalten hinsichtlich bone modelling und remodelling besitzt. Dies führt Thompson et al. in seinen Richtlinien für die Osteoporoseerforschung ausführlich aus [100]. Die Richtlinien der amerikanischen FDA (Food and Drug Administration) von 1995 weisen darauf hin, dass zur Durchführung einer Studie im Rahmen von Medikamentenentwicklung oder Erforschung neuer Osteoporosetherapien keine Spezies allein die vollständigen Eigenschaften des menschlichen Knochenstoffwechsels abbilden kann [48]. Somit sind mindestens zwei Spezies bezüglich der Knochenqualität zu untersuchen, ein Kleintier- und ein Großtiermodell. Als Kleintiermodell wird hier von der FDA und von Thompson et al. die ovariectomierte Ratte empfohlen [48], [100]. Um international vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden auch in vorliegender Arbeit Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Da die Empfehlung der Ratte als Kleintiermodell ausgesprochen wurde, finden sich in der aktuellen Literatur zudem viele Erkenntnisse über deren Physiologie und Pharmakologie bei der Osteoporose.

Wie bei Frauen und bei Ratten zeigt sich ein ähnlicher Sexualzyklus mit mehreren Spontanovulationen im Jahr. Ratten weisen allerdings den Unterschied auf, dass sie

diese bis zum Tod fortführen und somit auf natürlichem Wege in keinen postmenopausalen Zustand gelangen. Um jenen zu erzielen, sind drastische Maßnahmen, wie beispielsweise die Ovariectomie, notwendig. Durch die Abwesenheit östrogenbedingter Osteoklastenhemmung findet sich eine erhöhte ossäre Resorption mit Knochenmasseverlust bei gleichbleibender Knochentransformation [51]. Somit kann ein ähnlicher Zustand wie bei der postmenopausalen Frau hervorgerufen werden. In der Literatur finden sich Quellen, welche den Knochenmasseverlust als biphasisch beschreiben [29]. So besagen die Forschergruppen um Lelovas et al. und Wronski et al., dass nach drei Monaten ein rapider Knochenmasseverlust zu beobachten sei, welcher dann zunächst auf osteopenem Niveau stabil bleibt, um nach 9 Monaten erneut einzusetzen [62], [110]. Dieser zweite Knochenmasseschwund sei allerdings insgesamt langsamer als jener nach 3 Monaten sowie insgesamt verhältnismäßig niedriger ausgeprägt als beim Menschen. Dies konnte durch die Arbeiten von El Khassawna et al. bestätigt werden [54]. In der ersten Phase sei der rapide Knochenverlust auf den Verlust der Trabekel zurückzuführen und im Folgenden finde sich bei längeren Standzeiten ein Knochenmasseverlust des kortikalen Knochens [28], [51]. Beschrieben werden Unterschiede des kortikalen und trabekulären Remodellings ovariektomierter Ratten. Hier zeigen mikroskopische Untersuchungen von Grynypas et al. und Turner et al. nur wenige Havers-Systeme mit BMUs in der Kortikalis der Tiere [39], [102]. Die Arbeit von Francisco zeigte, dass im trabekulären Knochen hingegen sehr viele BMU vorliegen, so dass hier hauptsächlich das Remodelling erfolgt [32]. Der genannte Zustand entspricht grundsätzlich dem der postmenopausalen Frau. Wird die Ratte betrachtet, berichtet Govindarajan et al., so findet sich ein verhältnismäßig geringerer Knochenverlust als beim Menschen [36]. Somit müssen weitere Maßnahmen getroffen werden, um einen äquivalenten Knochenverlust herbeizuführen.

Während der Knochenumsatz der Ratte in den ersten neun bis 12 Monaten deutlich dynamische Prozesse erfährt, scheint der ossäre Stoffwechsel nach dem 12. Monat Lebenszeit konstant zu verlaufen [54]. Ab diesem Zeitpunkt findet sich das Remodelling als vorherrschender Prozess. Nur wenige Studien sind mit Tieren im Zeitraum nach dem 12. Lebensmonat durchgeführt worden, so dass in dieser Arbeit bewusst der Zeitraum des Seniums gewählt wurde. Ferner ist Lelovas et al. zu Folge die Interpretation der Ergebnisse unter Berücksichtigung des späten oder ausbleibenden Epiphysenschluß der langen Röhrenknochen zu beachten [62].

#### 4.2.1 Vergleich der Ratte zu anderen Spezies

Die Osteoporoseforschung bedient sich vieler unterschiedlicher Spezies. Hauptsächlich zu nennen sind Schafe, Affen, Ziegen, Meerschweinchen, Ratten und Mäuse. Die genannten Kleintiere werden aufgrund der einfachen und kostengünstigen Haltung sowie der geringeren ethischen Bedenken bevorzugt [29], [102]. Turner et al. sieht besondere Eignung in den Ratten als Tiermodell durch die standardisierte Stallung mit einer einfachen Kontrolle äußerer Störfaktoren und guter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse [102]. Ferner wird diese durch die kommerzielle Züchtung genetisch ähnlicher Tiere unterstützt. Nachteile bei der Erforschung einiger Interventionen oder im Rahmen der Testung neuer Materialien ist durch die geringe Körpergröße der Tiere bedingt, so dass diesbezüglich auf größere Spezies zurückgegriffen wird [29], [100].

Die Ratte ist als Spezies für die Osteoporoseforschung dahingehend ausreichend geeignet, als dass ein Kompromiss zwischen Körpergröße und Haltung bzw. Ökonomie besteht. Dies berichtet Grynopas et al. in seinen Ausführungen zur Knochenqualität im Tiermodell der Osteoporoseforschung [39]. Auch ist es möglich, Interventionen oder Eingriffe mit dem Setzen von Knochendefekten, Knochenbruchversorgung durch intramedulläre Schienung oder Plattenosteosynthesen bis hin zum Fixateur externe durchzuführen. Die kleinen Dimensionen der Tiere weisen laut Zhao et al. allerdings eine gewisse Ungenauigkeit auf, so dass größere Versuchsreihen notwendig sein können oder letztendlich, der biomechanischen Vergleichbarkeit halber, auf größere Spezies zurückgegriffen werden muss [114]. Eine weitere häufig verwendete Spezies findet sich mit den Mäusen. Über die genetisch veränderten „Knock-out“-Mäuse bietet sich beispielweise die Möglichkeit Gendefekte zu simulieren sowie zu untersuchen. Matsushita et al. stellte fest, dass die geringe Lebensdauer der Tiere längere Beobachtungszeiträume terminiert, so dass die Osteoporoseforschung Mäuse nur sehr limitiert einsetzt [71].

#### 4.2.2 Defizitäre Diät als Ergänzung zur Ovariectomie

Da die Ernährung ebenfalls einen Einfluss auf die Ausprägung der Osteoporose hat, sind im Tiermodell diätetische Maßnahmen ein Mittel, Osteoporose zu induzieren. Dabei sollte Govindarajan et al. zu Folge die Applikation von kalzium-, Vitamin-D- sowie phosphatarmem Futter erfolgen [36]. Zusätzlich sollte dieses phytoöstrogenfrei sein. Phytoöstrogene finden sich häufig in hoher Konzentration in Sojaprodukten und können eine Sexualhormonstoffwechselsituation hervorrufen, welche den Effekt der

Ovariectomie abschwächt oder aufhebt [44]. Harrison et al. berichtet, dass viele im Handel erhältliche Tierfutter auf Sojaproteinen basieren, so dass zur Versuchsdurchführung Spezialfuttermittel notwendig werden. Diese werden mittlerweile kommerziell hergestellt und sind im Spezialhandel erhältlich [44]. Die Arbeitsgruppe von Han et al. fand heraus, dass eine alleinige Diät jedoch keine Osteoporose induzieren kann, sondern lediglich eine Osteomalazie hervorruft. Dementsprechend empfiehlt Han et al. die Fütterung grundsätzlich mit anderen Maßnahmen zu kombinieren [42].

In eigener Studie wurde die Ovariectomie mit einer multidefizienten Diät kombiniert, um eine Osteoporose hervorzurufen. Dies erfolgte basierend auf der Grundlagenforschung von Bruyère, welcher die Auswirkungen der oben beschriebenen Effekte untersuchte und feststellte, dass dies der Situation der postmenopausalen sowie senilen menschlichen Stoffwechselsituation entspricht [15]. Ferner wird durch die Multidefizienzdiät die fehlende Sonnenlichtexposition mit damit verbundenem Vitamin-D-Mangel simuliert [46]. Osteoporosebedingte Bewegungsarmut findet sich häufig bei älteren Menschen und führt zu einer Malabsorption oder Minderresorption von Kalzium im Darm sowie den Nieren. So finden sich in den Ausführungen von Nordin et al. zum Stoffwechsel des Kalziums und der Osteoporose Beschreibungen, dass ältere Menschen häufig mit einem sekundären Hyperparathyreoidismus auffallen [79].

### **4.2.3 Radiologisch-diagnostische Methoden zur Untersuchung des Knochenstatus**

Eine vergleichbare Beschreibung des Osteoporosegrades, welche sich als Standard durchgesetzt hat, ist der T-Score oder T-Wert. Dieser wird mittels Osteodensitometrie erhoben. Die WHO hat dieses Verfahren aufgrund der Einfachheit und flächendeckenden Verfügbarkeit 1994 als Goldstandard der Osteoporosedagnostik definiert [106]. Die Messung erfolgt *in vivo*, wobei eine schnelle Aussage über den Knochenstatus und die Knochendichte getroffen werden kann. Zur Auswertung stehen dem Untersucher die Ergebnisse großer Datenbanken zur Verfügung. Es werden definierte Körperbereiche examiniert sowie die ermittelten Knochenparameter statistisch aufgearbeitet. Die Messung der Bone Mineral Density (BMD in  $\text{g/cm}^2$ ) zeigt eine Flächendichte, deren Wert anschließend zum Mittelwert einer Stichprobe gesunder prämenopausaler Frauen in statistischen Bezug gesetzt wird. Die Einteilung erfolgt in Standardabweichungen zur Norm und diese werden als T-Wert sowie Z-Wert angegeben. Der T-Wert beschreibt die Abweichung zur Grundgesamtheit gesunder

Frauen, der Z-Wert die zur gleichen Altersgruppe. Als Definition für eine manifeste Osteoporose wurde von der WHO ein T-Wert von kleiner -2,5 festgesetzt [106].

Ein Nachteil wird von Duque et al. aufgeführt und besagt, dass für die Ratte keine Datenlagen bzw. große Datenbanken des T-Scores wie beim Menschen vorhanden sind. Erwähnt wird dies auch in der Arbeit von Cummings und Melton im Lancet 2002 [23]. Diesbezüglich können nur absolute Werte genannt werden, was eine Referenz zur gesunden Population schwierig werden lässt [28]. Somit können in vorliegender experimenteller Arbeit lediglich Vergleiche zu ähnlich konzipierten Arbeiten gezogen werden und diese mutmaßlich auf den Menschen übertragen werden.

### 4.2.3.1 Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA)

Die Ermittlung der Knochendichteparameter erfolgt durch die Osteodensitometrie mittels Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA). Dieses Verfahren bietet viele Möglichkeiten, zeigt aber auch Grenzen auf. Die hierbei gemessene Absorption der zwei unterschiedlich-energetischen Röntgenstrahlen im Gewebe lässt eine gewisse Differenzierung zwischen Weich- und Hartgewebe zu. Zur Diagnostik hat diesbezüglich Bartl et al. 2011 zusammengefasste Ausführungen beschrieben [6]. Er ordnet den Knochen dem Hartgewebe, die restlichen Körperstrukturen dem Weichgewebe zu. Mit dieser Methode kann allerdings weder das Weich- noch das Hartgewebe weiter differenziert werden. Dies kommt bei einer ausgeprägten Arthrose mit massiven Verknöcherungen oder beispielsweise bei Metallimplantaten im Bereich der Messung zum Tragen, so dass hier ein höherer T-Wert ermittelt wird als das Knochengewebe tatsächlich hätte [6].

Die DXA-Messung hat sich zum Goldstandard der Osteoporosedagnostik entwickelt [8]. Beim Kleintier hingegen liefert dieses Verfahren zwar valide Werte, jedoch muss zwingend darauf geachtet werden, dass die Gerätschaften über einen Kleintiermodus verfügen. Des Weiteren merkt Yamauchi et al. an, dass eine Messungengenauigkeit ohne Differenzierungsmöglichkeit von Kortikalis und Spongiosa bei Interpretation der Daten zu berücksichtigen ist [111]. Die DVO-Leitlinien von 2017 führen hinsichtlich des Rattenmodells auf, dass die DXA aufgrund kurzer Aufnahmezeit von 3-4 Minuten *in vivo* beim sedierten Tier angewendet werden kann. Dabei weist sie eine geringe Strahlenbelastung von 1-5  $\mu\text{Sv}$  auf [24]. Diese Methode kam in dieser Arbeit zur Anwendung und konnte, wie in der aktuellen Literatur beschrieben wurde, valide Daten liefern.

#### 4.2.3.2 Vergleich von DXA zur pqCT und $\mu$ CT

Weitere Möglichkeiten der *in-vivo*-Messung der Knochenqualität wurden im Kapitel „Einleitung“ aufgeführt. Hierbei stellen die periphere quantitative Computertomographie (pqCT) sowie die Mikro-Computertomographie ( $\mu$ CT) neue Verfahren dar, welche ebenfalls auf der Absorptionsmessung von Röntgenstrahlen definierter Energie beruhen. Zu diesen Verfahren hat Bartl et al. Übersichten erarbeitet [6]. Mit Hilfe der sich um das zu untersuchende Objekt drehenden Röntgenröhren-Detektor-Einheit ist eine dreidimensionale Darstellung der knöchernen und weichteiligen Strukturen möglich. Bei der pqCT ist die erzielte Auflösung gering und keine sichere Differenzierung der trabekulären Strukturen möglich. Ward et al. berichtet, dass die Strahlenbelastung geringer als bei der  $\mu$ CT ist [104]. Das Verfahren der pqCT erlaubt allerdings die Differenzierung von Kortikalis und Spongiosa.

Bezüglich der Strahlenhygiene ist der aktuelle Stand der Forschung Duque et al. zu Folge, hinsichtlich der Ausprägung krankhafter Veränderungen des Gewebes durch Röntgenstrahlung, nicht abgeschlossen [28]. Somit bleibt laut der WHO zur Osteoporoseforschung und -diagnostik vorerst die DXA-Messung als Goldstandard [106].

### 4.3 Knochendichte und -masse mit deren Regulation von Auf- und Abbau

Eine manifeste Osteoporose liegt bei einem T-Wert von  $<-2,5$  vor. Kanis et al. hat dies in seiner Arbeit zur Diagnose der Osteoporose bestätigt [52]. Die maximale Knochenmasse des Menschen wird im Alter von 25-30 Jahren erreicht. Darauf folgend nimmt sie laut den Ausführungen von Bartl et al. physiologischerweise jährlich um etwa 1 % ab [6]. Somit wird klar, dass ein Aufbau einer hohen peak-bone-mass in der Jugend ebenfalls zur Prophylaxe einer Osteoporose dienen kann. El Khassawna et al. berichtet, dass die „peak-bone-mass“ sich bei Ratten im Alter von sechs bis neun Monaten findet und den Höhepunkt der adoleszenten Knochenmasse kennzeichnet [54]. Im Rahmen des natürlichen Masseabbaus findet sich ein Zeitpunkt, ab dem osteoporose-assoziierte Frakturen auftreten können. Entsprechend wird dies als Frakturschwelle bezeichnet. Ein drastischerer Knochenmasseverlust postmenopausaler Frauen ist aufgrund des Östrogenmangels zu verzeichnen. So berichtet Sornay-Rendu et al. 2007, dass in einer solchen Stoffwechsellage dieser bis zu 4 % jährlich betragen kann [96]. Studien von Bartl et al. und Duque et al. haben gezeigt, dass neben hormonell bedingten Einflüssen

Umwelteinflüsse einen größeren Einfluss auf die Knochendichte haben [6], [28]. Erste Hinweise ließen sich diesbezüglich schon in Dequekers Zwillingsstudien im Jahr 1987 finden [27]. Somit wurde bei der Einnistung der Tiere dieser Studie darauf geachtet, die Umweltfaktoren auszuschalten. Da die Untersuchung des senilen Tiermodells erfolgen sollte, wurde der Beobachtungszeitraum erst in ihrem sicheren Senium nach 12 Monaten Lebenszeit begonnen.

#### 4.3.1 Validität der Knochendichteparameter

Zur Analyse der erhobenen Parameter wurde in vorliegender experimenteller Arbeit zunächst die Streuung untersucht. Hier zeigte sich, dass die Mittelwerte und die Mediane dicht beieinander lagen. Somit war von einer homogenen Verteilung gemäß einer Gauß-Kurve auszugehen. Die Voraussetzung zur durchführbaren, sowie aussagekräftigen Varianzanalyse war gegeben. Auch fanden sich in der ersten DXA-Messung nach Einnistung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, was ebenfalls eine vergleichbare Ausgangslage bestätigte. Diese Gütekriterien werden von Kabisch et al. für randomisierte Studien gefordert und in dieser Arbeit erfüllt [50].

Bei den DXA-Messungen wurden neben den Knochendichteparametern noch Parameter für die Knochenmasse und die Weichgewebeanteile erhoben. Diesbezüglich fanden sich differierende Signifikanzen, welche jedoch in Zusammenschau die vorliegenden Gegebenheiten darlegen konnten.

So lagen bei der DXA-Untersuchung signifikante Unterschiede der BMD-Werte zwischen den Gruppen Diät und Sham ( $p=0,03$ ) zum Zeitpunkt  $t=1$  sowie OVXD und Sham ( $p=0,01$ ) zum Zeitpunkt  $t=1$  vor. Im zeitlichen Verlauf innerhalb aller Gruppen zeigten sich hingegen keine signifikanten Unterschiede. Diese Tatsache fand sich in keiner anderen aktuellen Studie.

Beim BMC stellten sich im zeitlichen Verlauf innerhalb der Diät- ( $p=0,03$ ), OVX- ( $p=0,04$ ) und OVXD-Gruppe ( $p=0,05$ ) signifikante Werte dar. Zu erwähnen ist, dass die Werte stiegen und nicht erwartungsgemäß abgefallen sind. In der Diätgruppe stiegen diese um 17,4 %, in der OVX-Gruppe um 10,3 %, in der OVXD-Gruppe um 15 % und in der Sham-Gruppe um 8 % an. Der Vergleich der Diätgruppe mit der Sham-Gruppe brachte ebenfalls signifikante Ergebnisse mit einem  $p=0,004$  zum Zeitpunkt  $t=0$  und  $p=0,001$  zum Zeitpunkt  $t=1$  hervor. Ein weiteres signifikantes Ergebnis lag zum Zeitpunkt  $t=1$  beim Vergleich der OVXD- mit der Sham-Gruppe ( $p=0,01$ ) vor.

Zunächst erscheinen die Ergebnisse nicht schlüssig. Werden weitere Parameter herangezogen, lassen sich die Befunde zusammenführen. Der BMD ist stark Body-Mass-Index abhängig und bei einem hohen Weichgewebeanteil, respektive Fettanteil, im Körper nicht aussagekräftig. Diese Fehlerquelle beschreibt auch Glastre et al. [34]. Diesbezüglich sind die Werte des BMC repräsentativer, da hier der Fettgewebeanteil nicht so sehr zum Tragen kommt und zu vernachlässigen ist. Es ist damit zu erklären, dass der BMC im Gegensatz zum BMD den absoluten Mineralsalzgehalt widerspiegelt und nicht eine Flächendichte angibt [34].

Werden die Signifikanzen der Fettgewebsanteile innerhalb jeweiliger Gruppen im zeitlichen Verlauf betrachtet, zeigte sich eine deutliche Zunahme des Fettgewebes in allen Gruppen ( $p=0,02$  bis zu  $p=0,0004$ ). Dies beschrieben auch die Untersuchungen von Bauer et al. 2015 und Shou et al. 2020 [7], [94]. Die Korrelation der Fett-Werte mit einerseits den Werten aus BMD und andererseits denen des BMC zeigte, dass der BMC anscheinend anfälliger hinsichtlich des Einflusses vorhandener Weichteile ist. Bei signifikanter Zunahme des Fettgewebes stellte sich der BMC mit zunehmenden Werten dar, wohingegen die Werte des BMD nicht-signifikant fielen. Einzig die Werte der Sham-Gruppe stellten sich mit einem Anstieg des BMD bei  $t=1$  dar.

Es fanden sich in allen Gruppen Tiere mit insgesamt 6 Tieren mit Weichteiltumoren, welche einen Einfluss auf die DXA-Messung hatten. Yamamuchi et al. beschreibt den Einfluss der Weichgewebe auf die Messung, wie in dieser Arbeit beobachtet wurde und Nakazawa et al. und Thompson et al. berichteten, dass Sprague-Dawley-Ratten dafür bekannt sind in 41,6 % bis 95,8 % spontan Weichteiltumoren an Becken und Hinterläufen zu bekommen [77], [101], [111]. Insbesondere finden sich in maturen Ratten diese Tumoren. Die häufigsten Entitäten stellten hierbei Keimzelltumoren und Adenokarzinome der Glandulae mammaria dar [77], [101]. Weiterhin gibt Lelovas et al. zu bedenken, dass bei Ratten die Wachstumsfugen nicht oder erst in sehr fortgeschrittenem Lebensalter schließen und die Tiere ein lebenslanges Wachstum zeigen [62]. Somit ist die Knochenmasse bei der Interpretation absolut zunehmend, in Relation aber differenziert zu betrachten. Das konnte in dieser Arbeit ebenfalls beobachtet werden.

Zusammenfassend kann berichtet werden, dass durch die DXA-Messung keine eindeutige Aussage über die Induktion einer Osteoporose statistisch belegbar nachgewiesen werden konnte. Es fand sich ein quantitativ erhöhter Mineralsalzgehalt. Ferner zeigten sich keine Analogien zur humanen Situation aus den Untersuchungen der WHO des Jahres 2004 [106].

In vorliegender experimenteller Arbeit fanden sich im senilen Rattenmodell keine klassischen Zeichen der Osteoporose, wohingegen in der Versuchsreihe von Bauer et al. mit jungen Tieren ein rachitischer Aspekt des Knochens beobachtet werden konnte [7]. Böcker et al. und Govindarajan et al. sahen den Grund darin, dass die postmenopausale Situation vor der Ausreifung des Knochens der jungen Tiere hergestellt wurde [10], [36].

Ferner zeigte sich in der vorangegangenen Untersuchung Bauers et al. eine Rarefizierung des gesamten Knochens, einschließlich Kompakta [7]. Dies ließ sich hingegen in den eigenen Befunden im senilen Modell nicht abbilden. In vorliegender Untersuchung lag der Substanzverlust vornehmlich in der Spongiosa vor. Dargelegt wird dies im Folgenden in der Diskussion der eigenen histomorphometrischen und lichtmikroskopischen Ergebnisse.

Anliker et al. zufolge finden sich 80 % der Knochenmasse in der Kortikalis wieder [2]. Dies ist auch die Beobachtung in der vorliegenden experimentellen Arbeit. Zudem begann die Beobachtungszeit mit 12 Monaten Lebenszeit der Tiere, was ihrer „peak-bone-mass“ entspricht. Es ist weiterhin zu beachten, dass Ratten ein lebenslanges Wachstum bei offenen Epiphysenfugen aufzeigen. Duque et al. und Levolas et al. beschreiben diese Tatsache in ihren Arbeiten [28], [62]. Dies lässt auch die weiterhin hohen Werte von BMD und BMC logisch erscheinen.

Betrachtet man die Untersuchung an senilen Ratten, so fanden sich im Gegensatz zu den jungen Ratten, keine eindeutigen Abnahmen der Knochendichte-Parameter. Diesbezüglich lässt sich nur bei der ovariectomierten Steroidgruppe (OVXD) eine Signifikanz im zeitlichen Verlauf mit einem abnehmenden BMD ( $p=0,002$ ) finden. Dies ist als Zeichen der Osteoporoseausprägung gewertet worden.

#### **4.4 Bewertung der deskriptiven Lichtmikroskopie**

Die Osteodensitometrie ist gemäß Kanis et al. ein unverzichtbares Werkzeug im klinischen Alltag, um die Detektion einer Osteoporose adäquat umsetzen zu können [52]. Die Untersuchung der zellulären Ebenen wird, den Ausführungen Khuranas nach, durch die Lichtmikroskopie ermöglicht [55].

Der Knochen erscheint nicht als ein leicht anfälliges Organ hinsichtlich äußerer Einflüsse. Er reagiert allerdings äußerst sensibel auf Hypovitaminose von Vitamin D, Kalziummangel sowie Inaktivität. Um solch eine Situation zu generieren, wurden im

vorliegenden Rattenmodell sowohl eine defiziente Diät und Ovariectomie als auch Ovariectomie mit Steroidgabe inklusive defiziente Diät angewandt. Bruyere et al., Lips et al. und Nordin et al. haben diesbezüglich in ihren Arbeiten berichtet, dass die genannten Methoden geeignet sind Osteoporose zu induzieren [15], [63], [79]. In einer vorangegangenen Studie von El Khassawna et al. 2013 wurde die lichtmikroskopische Beschreibung mit Darstellung von rarefizierendem und verplumptem Trabekelwerk beschrieben [54]. Dies galt als Ausdruck der Osteomalazie wie bei der Rachitis des unreifen Skeletts. Diese Beobachtungen konnten in der vorliegenden experimentellen Arbeit nicht gemacht werden. Ursächlich scheint hier zu sein, dass die Untersuchungen am reifen Rattenskelett erfolgten und nicht an heranwachsenden Ratten. Lelovas et al. hat dies in seinen Studien ebenfalls festgestellt [62].

In vorliegender Untersuchung fand sich nach einem Beobachtungszeitraum von 12 Monaten eine Rarefizierung des Trabekelwerks mit einer alle Gruppen betreffende uneinheitliche Ausprägung der Verplumpung der Trabekel. Dies lässt sich daran ablesen, dass keine Gruppe bezüglich der Trabekeldicke signifikant differiert. Signifikante Tendenzen hinsichtlich einer insgesamt dünner ausgeprägten Trabekelstruktur mit einem mittleren Trabekeldurchmesser von 30881 µm finden sich bei den Tieren der OVXD-Gruppe und bestätigen somit die Induktion einer Osteoporose. Gemäß Duque et al. ist zu bedenken, dass bedacht werden muss, dass die DXA-Messung für die Trabekeldicke nicht zwischen Kortikalis und Trabekel unterscheiden kann und Pietschmann et al. beschreibt, dass die Kortikalis bei der Ratte nahezu unbeeinträchtigt von der Osteoporoseentwicklung bleibt [28], [83]. Dies wird ebenfalls in den Untersuchungen von Morris et al. 1992, Laib et al. 2000 und Yang et al. 2003 beschrieben [59], [75], [112]. Zusätzlich findet sich aber auch in der Shamgruppe eine Ausdünnung des Trabekelwerkes bei Reduktion der Fläche, welche allerdings in der DXA nicht deutlich zum Tragen kommt. Die Sham-Gruppe ist die einzige Gruppe mit einer Verminderung der Trabekelfläche.

Zu beachten ist weiterhin, dass die Untersuchungen in genannten Studien am jungen Rattenskelett erfolgten und dementsprechend nur bedingt auf die senilen Tiere übertragbar sind.

Im dabei angewendeten Tiermodell können jedoch Analogien zum Menschen beschrieben werden, da Untersuchungen von Lips et al. 2001 bewiesen, dass der alternde Mensch häufig an einem Vitamin D-Mangel mit sekundärem Hyperparathyreoidismus leidet und dieser Zustand durch Ovariectomie und Diät in den Tieren der vorliegenden experimentellen Arbeit hervorgerufen wurde [63].

## 4.5 Histomorphometrische Analyse der Trabekeldicke

In der Auswertung der HE-gefärbten Präparate der Histomorphometrie wurde sowohl ein Augenmerk auf die Absolutwerte der Trabekeldicke als auch auf die Verhältnisse der Trabekelfläche gelegt. Die Auswertung der Daten wurde zum einen deskriptiv sowie andererseits durch ANOVA zwischen den Gruppen zum Zeitpunkt  $t=1$  durchgeführt. Als Referenz diente die Kontrollgruppe, welche direkt nach Einstellung zum Zeitpunkt  $t=0$  euthanasiert und präpariert wurde. Die Kontrollgruppe liegt im Zeitraum der peak-bone-mass zu Beginn des natürlichen Abfalls der Trabekelfläche der Tiere. Dieser Zeitpunkt konnte in den vorangegangenen Arbeiten von Bauer et al. und Egermann et al. bestätigt werden [7], [29]. So fand sich laut Pietschmann et al. 2007 zusätzlich eine Besonderheit der Sprague-Dawley-Ratten, welche darin besteht, dass die Kortikalis bei der Ausdünnung des Trabekelwerkes anscheinend unbeeinflusst bleibt [83]. Dies wird auf das ausbleibende Remodelling bei Nagetieren zurückgeführt. Diese Prozesse sind jedoch gering und nicht signifikant, so dass dies zwar erwähnt werden muss, jedoch vernachlässigt werden kann. Der Zeitpunkt des Eintritts einer Osteoporose würde, nach den Untersuchungen von Pietschmann et al. 2007, die Lebensdauer der Tiere weit übersteigen [83]. In der vorliegenden experimentellen Arbeit zeigt sich jedoch genau diese Besonderheit mit verschiedener Ausprägung der Rarefizierung des Trabekelwerkes bei erhaltener Trabekelarchitektur mit einer kaum sichtbar veränderten Kortikalisstruktur.

Bei den Tieren der einzelnen Gruppen ließ sich diese Aussage bestätigen, so dass zwischen einigen Gruppen signifikante Unterschiede in der trabekulären Dicke bestanden. Zu finden waren diese Unterschiede zwischen den Gruppen Diät - OVX ( $p=0,003$ ), Diät - OVXD ( $p=0,01$ ) und im Vergleich der Diät mit der Sham-Gruppe ( $p=0,006$ ). Erstaunlicherweise zeigte sich eine hochsignifikante Abnahme der Trabekeldicke bei der Sham-Gruppe mit  $p=0,001$ , so dass man hier postulieren kann, dass sich im senilen Rattenmodell in dieser Gruppe eine natürliche Osteoporose einstellte. Des Weiteren nahm die trabekuläre Dicke in der OVXD-Gruppe in Vergleich zur Kontrollgruppe ab ( $p=0,05$ ), was der erwarteten Induktion einer Osteoporose entspricht.

Die Gewichtszunahme der DXA-Messung der vorliegenden Untersuchung lässt indirekt auf eine Bewegungsarmut durch Unwillen an Aktion schließen, was ebenfalls mit dem Leiden an Osteoporose in Zusammenhang gesehen wird. Dieses Verhalten wurde auch in den vorangegangenen Arbeiten von Bauer et al. 2015 und Francisco et al. 2011 beobachtet [7], [32]. Bauer et al. fand weiterhin heraus, dass die Tiere, analog zum

Menschen, an einer Hyperinsulinämie und vermehrtem Adreno-Kortikotropen-Hormon-Spiegel litten [7]. In Franciscos et al. Studie waren die Tiermodell mit 44 Wochen zwar deutlich jünger, zeigten allerdings ebenfalls die in der eigenen Studie vermutete Bewegungsarmut auf [32]. In der Arbeit von Bauer et al. fanden sich nach einer Beobachtungszeit von 12 und 14 Monaten eine Vermehrung der Adipozyten im Knochenmark mit einer signifikanten Rarefizierung der Trabekelstrukturen und kompensatorischer Verdickung der verbliebenen Trabekel [7]. Histologisch wurde bei Govindarajan et al. das Bild einer Osteomalazie beschrieben [37].

Eine mögliche Erklärung lieferte die Untersuchungen von Cui et al. 1997 [22]. Dabei beschrieb er, dass die Steroidapplikation Einfluss auf den Fettstoffwechsel mit einer konsekutiven Hyperlipidämie hat. Dies bewirkt die Adipogenese. Bewiesen wurde dies durch die Behandlung pluripotenter Stammzellen aus dem Knochenmark, welche mit Dexamethason zur Ausdifferenzierung in reife Adipozyten und somit zur Verringerung der Ausdifferenzierung der Osteoblasten führte. Im Resultat endet dies in einer primären Schädigung des Knochens durch fehlende Osteoblasten und sekundär in einer Verdrängung der Osteoblasten und der Trabekelstrukturen durch die Fettzellen selbst. Klinische Relevanz findet dies in der Entität aseptischer Knochenmarknekrosen, welche histopathologisch ein solches Bild bieten [22]. Eine Verfettung des Knochenmarks ließ sich auch in vorliegender Arbeit beobachten und wurde in Folge des gerade beschriebenen als Alterungsprozesses im Rahmen einer Osteoporose als solche gewertet.

In der vorangegangenen Studie von Bauer 2015 et al. wurden die Präparate weiter aufgearbeitet und mittels Versilberung mit der „von Kossa-Methode“ angefertigt [7]. Das Ergebnis war der Nachweis einer unvollständig mineralisierten Knochengrundsubstanz. Dies zeigten auch Untersuchungen von Govindarajan et al. und El Khassawna et al. [36] [54]. 2014 wurde von Govindarajan et al. eine vermehrte Kollagen-I-Synthese bei der Behandlung von Ratten mit Ovariectomie in Kombination mit einer defizitären Diät festgestellt [36]. Diese Erkenntnisse können nicht ohne weiteres auf die Tiere dieser Arbeit übertragen werden, da die Untersuchung hier am reifen Rattenskelett erfolgte. Ferner sind zur Überprüfung möglicher Analogien dementsprechende weitere Färbungen notwendig, die nicht Gegenstand dieser experimentellen Arbeit waren. Allerdings sind Ähnlichkeiten vorhanden, welche auf einen gleichen Mechanismus der Knochenmarkstransformation schließen lassen.

Manolagas et al. hat dies ausführlich in seiner Arbeit beschrieben [70]. Die Produktion von Interleukin-6 durch stromale osteoblastische Zellen, sowie die Reaktion von

Knochenmarkszellen auf Zytokine, wie Interleukin-6 und Interleukin-11, wird durch Sexualhormone reguliert. Wenn die Gonadenfunktion verloren geht nimmt die Bildung von Osteoklasten sowie Osteoblasten im Knochenmark zu, wobei beide Veränderungen offensichtlich durch eine Zunahme der Produktion von Interleukin-6 und möglicherweise durch eine Zunahme der Reaktion von Knochenmark-Vorläuferzellen nicht nur durch Interleukin-6 vermittelt werden, sondern auch durch andere Zytokine mit osteoklastogenen und osteoblastogenen Eigenschaften. Die zelluläre Aktivität des Knochenmarks wird auch durch den Alterungsprozess verändert. Insbesondere kann im Senium die Fähigkeit des Knochenmarks verringert sein, Osteoblastenvorläufer zu bilden [70]. Der Zusammenhang zwischen der Dysregulation der Osteoklasten- oder Osteoblastenentwicklung im Knochenmark und der Störung des Gleichgewichts zwischen Knochenresorption und Knochenbildung, die zum Knochenverlust führt, kann die in vorliegender experimenteller Arbeit beobachteten Befunde erklären.

Nach Ansicht von Rauch et al. 2010 konnte als Ursache der Rarefizierung des Trabekelwerkes eine Hemmung des Transkriptionsfaktors AP-1 in den Osteoblasten dingfest gemacht werden [85]. AP-1 ist verantwortlich für die Bildung von Interleukin-11 und als zentrales Steuerelement der Osteoblastenausdifferenzierung zu sehen [85]. Bei Vorhandensein von Kortikosteroiden wird die Ausschüttung von Interleukin-11 herunterreguliert, was letztendlich zu einer gestörten Osteoblastenfunktion mit inadäquater Osteogenese führt [85]. Die eigenen Ergebnisse zeigten ebenfalls eine Rarefizierung des Trabekelwerkes am osteoporotischen Knochen mit teils verplumpten Bereichen. Jedoch findet sich kein so stark rarefiziertes Trabekelwerk, wie in den anderen Studien. Dies liegt mit ziemlicher Sicherheit am späten Beginn des Beobachtungszeitraums nach dem Zeitpunkt der peak-bone-mass, nachdem sich schon eine normale Knochenarchitektur ausgebildet hat.

### **4.6 Histomorphometrische Analyse der Trabekelfläche**

Die histomorphometrische Analyse der Trabekelfläche ist analog zur Analyse der Trabekeldicke zu sehen. Hier wurden die Parameter in gleicher Weise erhoben und ausgewertet. Betrachtet man die trabekuläre Fläche, wiesen bis auf die Sham-Gruppe alle Gruppen eine signifikante Erhöhung der Fläche im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Die Werte lagen mit  $203425 \mu\text{m}^2$  in der OVX-Gruppe,  $244173 \mu\text{m}^2$  in der OVXD-Gruppe und  $272279 \mu\text{m}^2$  in der Defizienzdiät-Gruppe deutlich über dem Ausgangswert von  $166948 \mu\text{m}^2$  in der Kontrollgruppe. Signifikant war hierbei die Erhöhung der trabekulären Fläche, bis auf die Sham-Gruppe, in allen Gruppen. In der Sham-Gruppe fand sich ein

erwähnenswerter Abfall der Fläche von  $100890 \mu\text{m}^2$ , so dass man hier von einer Beobachtung der natürlichen Osteoporose des Rattenknochens sprechen kann. Dieser Abfall war mit  $p=0,005$  ebenfalls signifikant. Die Betrachtung ist bei der Analyse der Trabekelfläche, wie auch bei der Trabekeldicke, differenziert zu betrachten. Es ist hier ebenfalls zu beachten, dass das Diagnostikinstrument der DXA laut Duque et al. nicht zwischen Kortikalis und Trabekelwerk unterscheiden kann [28].

Die Beobachtungen erklären sich durch eine Minderung der Gesamtanzahl der Trabekel, wobei die einzelnen Trabekel insgesamt sowohl inhomogen strukturiert als auch verplumpt und mit grober in der Struktur waren. Die neu formierte spongiöse Struktur führte zu einer Erhöhung der Gesamtfläche. Einzig in der Sham-Gruppe zeigten sich die Trabekel zarter, was die Verminderung der Fläche erklärt. Die Zunahme war dabei nicht zwischen allen Gruppen einheitlich ausgeprägt. So fanden sich signifikante Unterschiede zum Zeitpunkt  $t=1$  zwischen den Gruppen Diät - OVXD ( $p=0,04$ ), Diät - Sham ( $p=0,000025$ ) und OVX - Sham ( $p=0,003$ ). Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich mit der Untersuchung der WHO von 2004 [106]. Hier wird ebenfalls der Verlust an spongiösem Knochen mit Rarefizierung und Verplumpung des Trabekelwerkes beschrieben. Weiterhin ist die Tatsache zu bedenken, dass zwar die trabekulären Strukturen schwinden, die Kortikalis der Sprague-Dawley-Ratten Pietschmann et al. zu Folge nicht in den Prozess der Osteoporose einbezogen ist [83]. Die Kortikalisstrukturen kamen bei der Ermittlung der Trabekelfläche zum Tragen, da auch das Auswertungsprogramm ImageJ<sup>®</sup>, wie schon erwähnt, nicht zwischen Kortikalis und Spongiosa differenzieren kann.

In einer vorangegangenen Untersuchung von El Khassawna et al. 2013 fand sich ein Knochen mit rachitischen Aspekt [54]. Dies liegt an der Tatsache, dass die Osteoporose bei diesen Tieren mit unreifem Knochen induziert wurde. In vorliegender Arbeit hingegen wurde die Osteoporoseinduktion an reifen Rattenskeletten begonnen. Bartl et al. und Hyppönen et al. berichten, dass beim Menschen im Alter häufig Mischformen von Osteoporose, Osteomalazie und sekundärem Hyperparathyreoidismus vorliegen [6], [46]. Diesbezüglich kann postuliert werden, dass die unterschiedlichen Ergebnisse der trabekulären Fläche sowie der trabekulären Dicke auf diese Tatsache zurückzuführen sind.

## 4.7 Analyse der lichtmikroskopischen Untersuchung

Die Auswertung der lichtmikroskopischen Analyse der Präparate zeigte, dass die Kortikalisstrukturen der einzelnen Gruppen kaum Unterschiede aufzeigten. Dies ist im Einklang mit den Ausführungen von Pietschmann et al., die beschrieben, dass die Kortikalisstruktur der in dieser Arbeit verwendeten Sprague-Dawley-Ratten in der Regel unbeeinflusst von osteoporotischen Prozessen bleibt [83].

In der lichtmikroskopischen Betrachtung konnte allerdings die Kortikalis von der Trabekelfläche differenziert werden. So ließ sich in der Kontrollgruppe eine Trabekelfläche von 6,6 % finden. Die Diätgruppe zeigte eine Fläche von 16,7 %, die OVX-Gruppe eine von 8,7 % und die OVXD-Gruppe eine Fläche von 16,1 % auf. Die Trabekelfläche der Sham-Gruppe fand sich mit 5,2 %. Insgesamt ließ sich eine gute Beurteilung der Morphologie erstellen, in der sich eine weitestgehend erhaltene Trabekelarchitektur mit unterschiedlicher Veränderung der Trabekelstruktur beobachten ließ. So waren Sham- und Kontrollgruppe wesentlich unbeeinflusst von Veränderungen, wohingegen die OVXD-Gruppe deutliche Veränderungen im Sinne einer osteoporotisch veränderten Struktur aufwies. Die Arbeiten von El Khassawna et al. und Govindarajan et al. zeigten eine ähnliche Beobachtung [36], [54]. Andere Studien beschreiben allerdings eine Rarefizierung mit konsekutiver Ausdünnung des Trabekelwerks. So benennen Morris et al., Laib et al. und Yang et al. genau dieses morphologische Erscheinungsbild. Im Rahmen dieser Studien wurden jedoch deutlich jüngere Tiere im Alter von 12 bis 44 Wochen untersucht und die Ausbildung eines adulten Knochens war noch nicht abgeschlossen [59], [75], [112].

Das typische Erscheinungsbild einer senilen Osteoporose mit einer ausgeprägten Markraumverfettung fand sich in den Präparaten der OVX- und OVXD-Gruppe. Die Diätgruppe zeigte ebenfalls eine deutlich Markraumverfettung. In der Arbeit von Cui et al. konnten die in der eigenen Arbeit erhobenen Befunde bestätigt werden [22]. Dabei wurde beschrieben, dass eine Kortikoidapplikation zu einer Hyperlipidämie führt und eine Fetteinlagerung in das Knochenmark begünstigt.

## **5 Schlussfolgerung**

Bei der beschriebenen und diskutierten Datenlage ist die Alternativhypothese mit einer nachweisbaren Osteoporose am senilen Rattenskelett in der OVXD- und Sham-Gruppe anzunehmen.

Die trabekulären Strukturen wiesen sowohl eine Rarefizierung, ähnlich der bei Osteoporose, als auch eine Verplumpung auf. Dies bedeutet, dass die Trabekelstruktur abnahm und gleichzeitig grober wurde. Insgesamt führte es zu einer Zunahme der Dicke und Fläche bei gleichzeitiger Abnahme der trabekulären Gesamtzahl. Bei Steroidgabe findet sich eine primäre Schädigung des trabekulären Knochens sowie eine Induktion der Adipogenese, welche sich ebenfalls im Knochenmark finden lässt. Es kann angenommen werden, dass dies ebenso durch eine Fettleibigkeit hervorgerufen werden kann, da alle Tiere in diesem Versuch massiv an Gewicht zunahmten und eine Verdrängung der trabekulären Strukturen zu finden war. Die Fettleibigkeit mit Bewegungsarmut könnte zusätzlich durch die Haltung in Käfigen begünstigt sein. Der makroskopische Aspekt der Knochenpräparate zeigte das eindeutige Bild eines osteoporotischen Knochens. Untermauern lässt sich dies mit der Abnahme der trabekulären Dicke in der OVXD- und Sham-Gruppe, wobei nur in der Sham-Gruppe eine zusätzliche Abnahme der Trabekelfläche zu finden war, da die Trabekelstruktur in der OVXD-Gruppe verplumpt zu finden war.

Im Zuge der DXA-Messung ist die Masse des Weichgewebes zu beachten. Da die Tiere insgesamt mit einer Gewichtszunahme reagierten, kann die DXA-Messung schon außerhalb der Toleranzgrenzen des BMI liegen. Für Ratten gibt es diesbezüglich keine Referenzwerte. Es kann angenommen werden, dass das Körpergewicht aufgrund der Osteoporose mit konsekutiver Bewegungsarmut stieg, die DXA-Messung dadurch allerdings nicht eindeutig verwertbar wurde.

Abschließend kann in dieser experimentellen Arbeit eine Induktion der Osteoporose am senilen Rattenknochen mit einer signifikanten Abnahme der Knochendichte und der Trabekeldicke in der OVXD-Gruppe beobachtet werden. Die Sham-Gruppe zeigte den natürlichen Osteoporoseverlauf der Tiere. Die anderen Gruppen wiesen ebenfalls genannte Veränderungen auf. In der statistischen Auswertung konnten diese jedoch nicht signifikant belegt werden.

### 6 Zusammenfassung

Abschließend kann in dieser experimentellen Arbeit von einer Induktion der Osteoporose am senilen Rattenknochen mit einer signifikanten Abnahme der Knochendichte und der Trabekeldicke in der OVXD-Gruppe gesprochen werden. Die Shamgruppe ließ den natürlichen Osteoporoseverlauf der Tiere beobachten.

Die Osteoporose spielt in den westlichen Industrienationen eine immer größere Rolle und ist gleichzeitig eine der am häufigsten nicht ausreichend wahrgenommenen Krankheiten der alternden Bevölkerung. In dieser experimentellen Arbeit sollte herausgearbeitet werden, ob es Unterschiede bezüglich einer Osteoporoseentwicklung zwischen und innerhalb der einzelnen Gruppen gab. Ebenso galt es zu Vergleichen, ob Unterschiede zu gleich behandelten jungen Ratten vorlagen. Die Durchführung erfolgte hier an senilen Ratten, um die gesetzten Einflüsse und Reize am reifen Skelett zu analysieren.

Es wurden insgesamt 47 weibliche Ratten des Typus Sprague-Dawley im Alter von 12 Monaten in unterschiedliche Gruppen randomisiert. Zum Eintritt in den Beobachtungszeitraum haben die Tiere 5 Würfe von Jungtieren durchlebt und wurden mit handelsüblichem Futter ernährt. Ab dem Zeitpunkt des Eintritts in den Versuch wurde eine multidefiziente Diät appliziert und gemäß der Randomisierung in die Gruppen zusätzlich eine Ovariectomie, eine Ovariectomie mit Dexamethasongabe und eine Scheinoperation zur Simulation der Stressfaktoren einer Ovariectomie durchgeführt.

Die Kontrolle erfolgte durch eine DXA-Untersuchung in Sedierung 2 Wochen nach der Operation und nach 12 Monaten Beobachtungszeit. Eine Kontrollgruppe wurde unmittelbar nach der Einstellung euthanasiert und nach der DXA-Messung zur Histomorphometrie präpariert. Alle anderen Gruppen wurden im Anschluß an die Euthanasie nach 12 Monaten Beobachtungszeitraum präpariert und Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Präparate von linkem Femur sowie linker Tibia der Histomorphometrie durch das ImageJ<sup>®</sup>-Programm zugeführt sowie hinsichtlich trabekulärer Fläche und Dicke ausgewertet.

Die Auswertung der DXA-Messung hat für den BMD ergeben, dass eine nahezu homogene Ausgangslage zum Beginn der Einstellung vorlag. Signifikante Differenzen fanden sich weder bei der Knochendichte (BMD) und beim Mineralsalzgehalt (BMC), noch beim Körperfettanteil. Die Diät-Gruppe zeigte zu Beginn den höchsten und die Kontrollgruppe den geringsten BMD. Betrachtet man den Mineralsalzgehalt des Knochens, so ist dieser zu Beginn der Standzeit in der OVXD-Gruppe am höchsten und

bei der Kontrollgruppe am niedrigsten. Der höchste Körperfettanteil ist in der ersten Messung zum Zeitpunkt  $t=0$  in der Diätgruppe zu finden und lässt sich mit den niedrigsten Werten in der Kontrollgruppe feststellen. Im Verlauf fallen die Werte der Knochendichte in der OVXD-Gruppe signifikant ab.

Im Zuge der DXA-Messung ist die Masse des Weichgewebes zu beachten. Da die Tiere insgesamt mit einer Gewichtszunahme reagierten, kann die DXA-Messung schon außerhalb der Toleranzgrenzen des BMI liegen. Für Ratten gibt es diesbezüglich keine Referenzwerte. Es kann angenommen werden, dass das Körpergewicht aufgrund der Osteoporose mit konsekutiver Bewegungsarmut stieg, die DXA-Messung dadurch allerdings nicht eindeutig verwertbar wurde. Somit ist das Weichgewebe als Störfaktor zu benennen.

Zum Ende der Standzeit zeigte die Sham-Gruppe als einzige einen Anstieg der Knochendichte, alle anderen Gruppen fielen in den gemessenen Werten. Einen Anstieg des Mineralsalzgehaltes des Knochens ließ sich über die Dauer des Experimentes bei allen Gruppen finden. Ebenso ließ sich eine Zunahme des Körperfetts in allen Gruppen beobachten.

Zum Vergleich der einzelnen Gruppen in der histomorphometrischen Auswertung untereinander erfolgte die Varianzanalyse durch die einfaktorielle ANOVA. Als Probengröße wurde die Summe der angefertigten Knochenschnitte der jeweiligen Gruppen zu Grunde gelegt, um statistisch valide Ergebnisse zu erhalten. Verglichen wurden die Werte der trabekulären Dicke der einzelnen Gruppen.

So finden sich hochsignifikante Werte bei der Auswertung der trabekulären Dicke und der trabekulären Fläche jeweils in den Gruppenpaarungen Kontrolle-Sham und Diät-Sham. Betrachtet man die trabekuläre Dicke und Fläche ist eine Osteoporoseentwicklung in der Sham-Gruppe zu postulieren.

Die Auswertung der Lichtmikroskopie der Knochenschnitte erfolgte deskriptiv. In allen Gruppen fand sich eine verschieden stark ausgeprägte Markraumverfettung als Zeichen des Alterungsprozesses. Insbesondere wurde dies in den Gruppen OVX und OVXD festgestellt. Die größte Rarefizierung des Trabekelwerkes mit Markraumverfettung fand sich in der OVXD-Gruppe als Ausdruck einer postmenopausalen Osteoporose. In der Sham-Gruppe ließ sich mit einer Rarefizierung des Trabekelwerkes ohne wesentliche fettige Markraumdegeneration ein natürlicher Altersprozess beobachten. Der makroskopische Aspekt der Knochenpräparate zeigte das eindeutige Bild eines osteoporotischen Knochens. Untermauern lässt sich dies mit der Abnahme der

trabekulären Dicke in der OVXD- und Sham-Gruppe, wobei nur in der Sham-Gruppe eine zusätzliche Abnahme der Trabekelfläche zu finden war, da die Trabekelstruktur in der OVXD-Gruppe verplumpt erschien.

Bei der hier beschriebenen und diskutierten Datenlage ist die Alternativhypothese mit einer nachweisbaren Osteoporose am senilen Rattenskelett in der OVXD und der Sham-Gruppe anzunehmen. Der Vergleich zum juvenilen Rattenknochen kann nicht ohne weiteres beantwortet werden, da es im juvenilen Knochen zu einer rachitischen und nicht zu einer osteoporotischen Veränderung kommt. Die lichtmikroskopischen und histomorphometrischen Daten zu den DXA-Ergebnissen zeigen differierende Ergebnisse, lassen sich allerdings bei genauer Betrachtung in einer verminderten Trabekelstruktur zusammenführen und bestätigen somit die Alternativhypothese für diese Fragestellung.

## 7 Summary

In conclusion, this experimental work can be said to induce osteoporosis on the senile rat bone with a significant decrease in bone density and trabecular thickness in the OVXD group. The sham group observed the natural course of osteoporosis in the animals.

Osteoporosis is playing an increasingly important role in western industrialized nations and is at the same time one of the most frequently under-recognized diseases of the aging population. The aim of this experimental work was to find out whether there were differences in the development of osteoporosis between and within the individual groups. It was also necessary to compare whether there were any differences from young rats treated equally. This was carried out on senile rats to analyze the influences and stimuli on the mature skeleton.

In total, 47 female Sprague-Dawley rats aged 12 months were randomized into different groups. At the start of the observation period, the animals had 5 litters of young animals and were fed with commercially available feed. From the time of entering the trial, a multideficient diet was administered and, according to the randomization into the groups, an additional ovariectomy, an ovariectomy with dexamethasone administration and a sham operation to simulate the stress factors of an ovariectomy were performed.

The control was carried out by means of a DXA examination in sedation 2 weeks after the operation and after 12 months of observation. A control group was euthanized immediately after placement and prepared for histomorphometry after DXA measurement. All other groups were prepared after euthanasia after a 12-month observation period and hematoxylin-eosin-stained specimens from the left femur and left tibia were subjected to histomorphometry by the ImageJ® program and evaluated for trabecular area and thickness.

The evaluation of the DXA measurement showed for the BMD that there was an almost homogeneous starting position at the beginning of the installation. Significant differences were found neither in the bone density (BMD) and in the mineral salt content (BMC), nor in the body fat percentage. The diet group initially showed the highest and the control group the lowest BMD. If one looks at the mineral salt content of the bone, it is highest in the OVXD group at the beginning of the service life and lowest in the control group. The highest percentage of body fat is found in the first measurement at time  $t=0$  in the

diet group and can be found with the lowest values in the control group. Over the course of time, the values of bone density in the OVXD group decrease significantly.

The mass of the soft tissue must be taken into account in the course of the DXA measurement. Since the animals reacted with an overall weight gain, the DXA measurement can be outside the tolerance limits of the BMI. There are no reference values for rats in this regard. It can be assumed that the body weight increased with consecutive lack of exercise due to osteoporosis, but the DXA measurement was therefore not reliable. The soft tissue is therefore to be named as a disruptive factor.

At the end of the service life, the Sham group was the only one to show an increase in bone density; all other groups fell in the measured values. An increase in the mineral salt content of the bones was found in all groups over the duration of the experiment. An increase in body fat was also observed in all groups.

To compare the individual groups in the histomorphometric evaluation with each other, the analysis of variance was carried out by the one-way ANOVA. The sum of the bone sections of the respective groups was used as the sample size in order to obtain statistically valid results. The trabecular thickness values of the individual groups were compared.

Highly significant values can be found in the evaluation of the trabecular thickness and the trabecular area in the control-sham and diet-sham groups. If one looks at the trabecular thickness and area, osteoporosis development in the Sham group can be postulated.

The light microscopy of the bone sections was evaluated descriptively. In all groups there was a varying degree of intracellular obesity as a sign of the aging process. In particular, this was found in the groups OVX and OVXD. The greatest rarefication of the trabecular meshwork with intramedullary canal fat was found in the OVXD group as an expression of postmenopausal osteoporosis. In the Sham group, a natural aging process was observed with a re-identification of the trabecular mechanism without significant fatty marrow degeneration. The macroscopic aspect of the bone specimens showed the clear picture of an osteoporotic bone. This can be substantiated by the decrease in the trabecular thickness in the OVXD and Sham group, whereby an additional decrease in the trabecular area was only found in the Sham group, since the trabecular structure in the OVXD group appeared to be plumped up.

With the data situation described and discussed here, the alternative hypothesis with a detectable osteoporosis on the senile rat skeleton in the OVXD and the Sham group can

be assumed. The comparison to the juvenile rat bone cannot be answered easily since there is a rachitic and not an osteoporotic change in the juvenile bone. The light microscopic and histomorphometric data for the DXA results show different results, but can be brought together in a reduced trabecular structure on closer inspection and thus confirm the alternative hypothesis for this question.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Adami S, Passeri M, Ortolani S, Brogгинi M, Carratelli L, Caruso I, Gandolini G, Gnessi L, Laurenzi M, Lombardi A, Norbiato G, Pryor-Tillotson S, Reda C, Romanini L, Subrizi D, Wei L, Yates AJ (1995). Effects of oral alendronate and intranasal salmon Calcitonin on bone mass and bioche. *Bone* 17:383–390. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(95\)00262-6](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(95)00262-6)
2. Anliker M, Bieglmayer C, Dimai HP, Gasser RW, Kudlacek S, Obermayer-Pietsch B, Schmidt-Gayk H, Sottara E, Woloszczuk W, Zwettler E, Griesmacher A (2009). Laboratory diagnostics in the prevention, differential diagnosis, and monitoring of osteoporosis 1. *LaboratoriumsMedizin* 33. <https://doi.org/10.1515/JLM.2009.029et>
3. ATC/DDD Version 2021. <https://www.dimdi.de/dynamic/.downloads/arzneimittel/atcddd/atc-ddd-amtlich-2021.pdf>.
4. Babij P, Zhao W, Small C, Kharode Y, Yaworsky PJ, Boussein ML, Reddy PS, Bodine PV, Robinson JA, Bhat B, Marzolf J, Moran RA, Bex F (2003). High Bone Mass in Mice Expressing a Mutant LRP5 Gene. *J Bone Miner Res* 18:960–974. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.6.960>
5. Bala Y, Farlay D, Chapurlat RD, Boivin G (2011) Modifications of bone material properties in postmenopausal osteoporotic women long-term treated with alendronate. *Eur J Endocrinol* 165:647–55. <https://doi.org/10.1530/EJE-11-0333>
6. Bartl R, Bartl C, Baum K (2011) Osteoporose : Prävention ; Diagnostik ; Therapie ; 12 Tabellen. Thieme
7. Bauer NB, Khassawna T El, Goldmann F, Stirn M, Ledieu D, Schlewitz G, Govindarajan P, Zahner D, Weisweiler D, Schliefer N, Böcker W, Schnettler R, Heiss C, Moritz A (2015). Characterization of bone turnover and energy metabolism in a rat model of primary and secondary osteoporosis. *Exp Toxicol Pathol* 67:287–296. <https://doi.org/10.1016/J.ETP.2015.01.004>
8. Bazzocchi A, Ponti F, Albisinni U, Battista G, Guglielmi G, (2016). DXA: Technical aspects and application. *Eur J Radiol* 85:1481–1492. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2016.04.004>
9. Bleibler F, Konnopka A, Benzinger P, Rapp K, König H-H (2013). The health burden and costs of incident fractures attributable to osteoporosis from 2010 to 2050 in Germany—a demographic simulation model. *Osteoporos Int* 24:835–847. <https://doi.org/10.1007/s00198-012-2020-z>
10. Böcker W, El Khassawna T, Bauer N, Brodsky K, Weisweiler D, Govindarajan P, Schlewitz G, Kampschulte M, Dürselen L, Thormann U, Szalay G, Schnettler R, Langheinrich AC, Heiss C (2014). Short-term glucocorticoid treatment causes spinal osteoporosis in ovariectomized rats. *Eur Spine J* 23:2437–2448. <https://doi.org/10.1007/s00586-014-3463-z>
11. Bone HG, Hosking D, Devogelaer J-P, Tucci JR, Emkey RD, Tonino RP, Rodriguez-Portales JA, Downs RW, Gupta J, Santora AC, Liberman UA (2004). Ten Years' Experience with Alendronate for Osteoporosis in Postmenopausal Women. *N Engl J Med* 350:1189–1199. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030897>
12. Borah B, Dufresne T, Nurre J, Phipps R, Chmielewski P, Wagner L, Lundy M, Boussein M, Zebaze R, Seeman E (2010). Risedronate reduces intracortical

- porosity in women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 25:41–47. <https://doi.org/10.1359/jbmr.090711>
13. Boskey AL, DiCarlo E, Paschalis E, West P, Mendelsohn R (2005). Comparison of mineral quality and quantity in iliac crest biopsies from high- and low-turnover osteoporosis: an FT-IR microspectroscopic investigation. *Osteoporos Int* 16:2031–2038. <https://doi.org/10.1007/s00198-005-1992-3>
  14. Briggs AM, Wrigley TV, Tully EA, Adams PE, Greig AM, Bennell KL (2007). Radiographic measures of thoracic kyphosis in osteoporosis: Cobb and vertebral centroid angles. *Skeletal Radiol* 36:761–767. <https://doi.org/10.1007/s00256-007-0284-8>
  15. Bruyère O, Malaise O, Neuprez A, Collette J, Reginster J-Y (2007). Prevalence of vitamin D inadequacy in European postmenopausal women. *Curr Med Res Opin* 23:1939–1944. <https://doi.org/10.1185/030079907X219562>
  16. Bullock WA, Pavalko FM, Robling AG (2019) Osteocytes and mechanical loading: The Wnt connection. *Orthod Craniofac Res* 22:175–179. <https://doi.org/10.1111/ocr.12282>
  17. Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A (2007). Incidence and Economic Burden of Osteoporosis-Related Fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res* 22:465–475. <https://doi.org/10.1359/jbmr.061113>
  18. Camacho PM, Petak SM, Binkley N, Clarke BL, Harris ST, Hurley DL, Kleerekoper M, Lewiecki EM, Miller PD, Narula HS, Pessah-Pollack R, Tangpricha V, Wimalawansa SJ, Watts NB (2016). American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology clinical practice. *Endocr Pract* 22:1–42. <https://doi.org/10.4158/EP161435.GL>
  19. Canalis E (2013) Wnt signalling in osteoporosis: mechanisms and novel therapeutic approaches. *Nat Rev Endocrinol* 9:575–583. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.154>
  20. Cooper C, Melton LJ (1992) Epidemiology of osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab* 3:224–9
  21. Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, Lindsay R (2014). Clinician’s Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporos Int* 25:2359–2381. <https://doi.org/10.1007/s00198-014-2794-2>
  22. Cui Q, Wang GJ, Balian G (1997) Steroid-induced adipogenesis in a pluripotential cell line from bone marrow. *J Bone Joint Surg Am* 79:1054–63
  23. Cummings SR, Melton LJ (2002) Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 359:1761–1767. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08657-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08657-9)
  24. Dachverband Osteologie e.V. (DVO) - DVO Leitlinie 2017. [http://www.dv-osteologie.org/dvo\\_leitlinien/dvo-leitlinie-2017](http://www.dv-osteologie.org/dvo_leitlinien/dvo-leitlinie-2017). Zugegriffen: 09. April 2018 Dachverband Osteologie e.V. (DVO) - DVO Leitlinie 2017.
  25. Danielsen CC, Mosekilde L, Andreassen TT (1992) Long-term effect of orchidectomy on cortical bone from rat femur: Bone mass and mechanical properties. *Calcif Tissue Int* 50:169–174. <https://doi.org/10.1007/BF00298796>
  26. Delmas PD (2002) Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 359:2018–2026. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08827-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08827-X)
  27. Dequeker J, Nijs J, Verstraeten A, Geusens P, Gevers G (1987). Genetic determinants of bone mineral content at the spine and radius: A twin study. *Bone* 8:207–209. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(87\)90166-9](https://doi.org/10.1016/8756-3282(87)90166-9)

28. Duque G, Watanabe K (2011) Osteoporosis research : animal models. Springer
29. Egermann M, Goldhahn J, Schneider E (2005) Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int* 16:S129–S138. <https://doi.org/10.1007/s00198-005-1859-7>
30. Filipović B, Šošić-Jurjević B, Ajdžanović V, Trifunović S, Manojlović-Stojanoski M, Ristić N, Nestorović N, Milošević V, Sekulić M (2007). The effect of orchidectomy on thyroid C cells and bone histomorphometry in middle-aged rats. *Histochem Cell Biol* 128:153–159. <https://doi.org/10.1007/s00418-007-0307-5>
31. Fitzpatrick LA (2002) Secondary Causes of Osteoporosis. *Mayo Clin Proc* 77:453–468. <https://doi.org/10.4065/77.5.453>
32. Francisco JI, Yu Y, Oliver RA, Walsh WR (2011) Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. *J Orthop Res* 29:189–196. <https://doi.org/10.1002/jor.21217>
33. Frost HM (2003) Bone's mechanostat: A 2003 update. *Anat Rec* 275A:1081–1101. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10119>
34. Glastre C, Braillon P, David L, Cochat P, Meunier PJ, Delmas PD (1990). Measurement of Bone Mineral Content of the Lumbar Spine by Dual Energy X-Ray Absorptiometry in Normal Children: Correlations with Growth Parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1330–1333. <https://doi.org/10.1210/jcem-70-5-1330>
35. Glickman ME, Rao SR, Schultz MR (2014) False discovery rate control is a recommended alternative to Bonferroni-type adjustments in health studies. *J Clin Epidemiol* 67:850–7. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2014.03.012>
36. Govindarajan P, Böcker W, El Khassawna T, Kampschulte M, Schlewitz G, Huerter B, Sommer U, Dürselen L, Ignatius A, Bauer N, Szalay G, Wenisch S, Lips KS, Schnettler R, Langheinrich A, Heiss C (2014). Bone matrix, cellularity, and structural changes in a rat model with high-turnover osteoporosis. *Am J Pathol* 184:765–77. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.11.011>
37. Govindarajan P, Khassawna T, Kampschulte M, Böcker W, Huerter B, Dürselen L, Faulenbach M, Heiss C (2013). Implications of combined ovariectomy and glucocorticoid (dexamethasone) treatment on mineral, microarchitectural, biomechanical and matrix properties of rat bone. *Int J Exp Pathol* 94:387–398. <https://doi.org/10.1111/iep.12038>
38. Graber LW, Vanarsdall RL, Vig KWL, Huang GJ (1985) Orthodontics : current principles and techniques.
39. Grynpas MD, Chachra D, Lundon K (2000) Bone quality in animal models of osteoporosis. *Drug Dev Res* 49:146–158. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2299\(200003\)49:3<146::AID-DDR5>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2299(200003)49:3<146::AID-DDR5>3.0.CO;2-Y)
40. Guise TA, Chirgwin JM (2003) Transforming Growth Factor-Beta in Osteolytic Breast Cancer Bone Metastases. *Clin Orthop Relat Res* 415:S32–S38. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000093055.96273.69>
41. Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, Steinle T, Verheyen F, Linder R (2013). The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. *Dtsch Arztebl Int* 110:52–7. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2013.0052>
42. Han SM, Szarzanowicz TE, Ziv I (1998) Effect of ovariectomy and calcium deficiency on the ultrasound velocity, mineral density and strength in the rat femur. *Clin Biomech* 13:480–484. [https://doi.org/10.1016/S0268-0033\(98\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S0268-0033(98)00019-9)

43. Hanley DA, Adachi JD, Bell A, Brown V (2012) Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes. *Int J Clin Pract* 66:1139–1146. <https://doi.org/10.1111/ijcp.12022>
44. Harrisson E, Adjei A, Ameho C, Yamamoto S, Kono S (1998). The Effect of Soybean Protein on Bone Loss in a Rat Model of Postmenopausal Osteoporosis. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 44:257–268. <https://doi.org/10.3177/jnsv.44.257>
45. Hughes E, Tyrrell PNM, Cassar-Pullicino VN (2020) *The Radiograph*. Springer, Berlin, Heidelberg, S 3–13
46. Hyppönen E, Power C (2007) Hypovitaminosis D in British adults at age 45 y: nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *Am J Clin Nutr* 85:860–868. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.3.860>
47. Jaffe S, Harris; N L, Stein H (2001) *Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues - World Health Organization - Google Books*, 3rd Edition. IARC Press, Lyon
48. Jee WS, Yao W (2001) Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1:193–207
49. Johnell O, Kanis JA (2006) An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 17:1726–1733. <https://doi.org/10.1007/s00198-006-0172-4>
50. Kabisch M, Ruckes C, Seibert-Grafe M, Blettner M (2011) Randomized controlled trials: part 17 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int* 108:663–8. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2011.0663>
51. Kalu DN (1991) The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15:175–191. [https://doi.org/10.1016/0169-6009\(91\)90124-I](https://doi.org/10.1016/0169-6009(91)90124-I)
52. Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltsev N (2009). The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 9:1137–1141. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650090802>
53. Kerschman-Schindl K (2012) *Journal für Mineralstoffwechsel : Zeitschrift für Physiologie, Pathophysiologie und Klinik des Mineralstoffwechsels*. Krause & Pachernegg
54. El Khassawna T, Böcker, Wolfgang, Govindarajan P, Schliefer N, Hürter B, Kampschulte M, Schlewitz G, Alt V, Lips KS, Faulenbach M, Möllmann H, Zahner D, Dürselen L, Ignatius A, Bauer N, Wenisch S, Langheinrich AC, Schnettler R, Heiss C (2013). Effects of multi-deficiencies-diet on bone parameters of pe. *PLoS One* 8:e71665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071665>
55. Khurana JS (2009) *Bone pathology*. Humana Press. ISBN 978-1-59745-347-9
56. Kiesswetter U (2015) Kongressbericht: Denosumab (Prolia®): Die ersten 5 Jahre im klinischen Alltag. *J für Miner Muskuloskelettale Erkrankungen* 22:60–61
57. Korhonen N, Niemi S, Parkkari J, Sievänen H, Palvanen M, Kannus P. (2013). Continuous decline in incidence of hip fracture: Nationwide statistics from Finland between 1970 and 2010. *Osteoporos Int* 24:1599–1603. <https://doi.org/10.1007/s00198-012-2190-8>
58. Kummer B (1956) Eine vereinfachte Methode zur Darstellung von Spannungstrajektorien, gleichzeitig ein Modellversuch für die Ausrichtung und Dichteverteilung der Spongiosa in den Gelenkenden der Röhrenknochen. *Z Anat Entwicklungsgesch* 119:223–234. <https://doi.org/10.1007/BF00523592>

59. Laib A, Barou O, Vico L, Lafage-Proust MH, Alexandre C, Rügsegger P, (2000). 3D micro-computed tomography of trabecular and cortical bone architecture with application to a rat model of immobilisation osteoporosis. *Med Biol Eng Comput* 38:326–332. <https://doi.org/10.1007/BF02347054>
60. Langdahl, Kassem, Moller, Eriksen (1998) The effects of IGF-I and IGF-II on proliferation and differentiation of human osteoblasts and interactions with growth hormone. *Eur J Clin Invest* 28:176–183. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.1998.00265.x>
61. Lange U, Müller-Ladner U (2007) Glukokortikoid-induzierte Osteoporose. *Z Rheumatol* 66:129–138. <https://doi.org/10.1007/s00393-007-0151-y>
62. Lelovas P, Xanthos T, Thoma S Lyritis GP, Donta IA (2008). The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research.
63. Lips P (2001) Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 22:477–501. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.4.0437>
64. Liu X, Qu X, Nie T, Zhai Z, Li H, Ouyang Z, Qin A, Zhang S, Zhang S, Fan Q, Tang T, Yu Z, Dai M (2007). The Beneficial Effects of Bisphosphonate-enoxacin on Cortical Bone Mass and Strength in Ovariectomized Rats. *Front Pharmacol* 8:355. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00355>
65. Lorenc RS (2002) Idiopathic Juvenile Osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 70:395–397. <https://doi.org/10.1007/s00223-001-0045-y>
66. Lübke K, Riedel H (2000) Transiente regionale Osteoporose in der Schwangerschaft - Transient regional osteoporosis during pregnancy -. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 60:380–385. <https://doi.org/10.1055/s-2000-7387>
67. Luengo M, Pons F, Martinez de Osaba MJ, Picado C (1994) Prevention of further bone mass loss by nasal calcitonin in patients on long term glucocorticoid therapy for asthma: a two year follow up study. *Thorax* 49:1099–102. <https://doi.org/10.1136/THX.49.11.1099>
68. Lüllmann-Rauch R (2012) Taschenlehrbuch Histologie : 10 Tabellen. Thieme
69. Maliha G, Morgan J, Vrahas M (2012) Transient osteoporosis of pregnancy. *Injury* 43:1237–41. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2012.03.009>
70. Manolagas SC, Jilka RL (1995) Bone Marrow, Cytokines, and Bone Remodeling — Emerging Insights into the Pathophysiology of Osteoporosis. *N Engl J Med* 332:305–311. <https://doi.org/10.1056/NEJM199502023320506>
71. Matsushita M, Tsuboyama T, Kasai R, Okumura H, Yamamuro T, Higuchi K, Higuchi K, Kohno A, Yonezu T, Utani A, Umezawa M, Takeda T, (1986). Age-related changes in bone mass in the senescence-accelerated mouse (SAM). SAM-R/3 and SAM-P/6 as new murine models for senile osteoporosis. *Am J Pathol* 125:276–83
72. McLean RR (2009) Proinflammatory cytokines and osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 7:134–139. <https://doi.org/10.1007/s11914-009-0023-2>
73. Melton LJ, Atkinson EJ, O'Connor MK, O'Fallon W, Riggs BL (1998). Bone Density and Fracture Risk in Men. *J Bone Miner Res* 13:1915–1923. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.12.1915>
74. Mescher AL Junqueira's basic histology : text and atlas, Twelfth Ed. Mescher, Anthony
75. Morris HA, Porter SJ, Durbridge TC, Moore RJ, Need AG, Nordin BE (1992). Effects of oophorectomy on biochemical and bone variables in the rat. *Bone Miner* 18:133–42. [https://doi.org/10.1016/0169-6009\(92\)90853-6](https://doi.org/10.1016/0169-6009(92)90853-6)

76. de Mos M, Huygen FJPM, Dieleman JP, Koopman JSHA, Stricker BHC, Sturkenboom MCJM (2008). Medical history and the onset of complex regional pain syndrome (CRPS). *Pain* 139:458–466. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2008.07.002>
77. Nakazawa M, Tawaratami T, Uchimoto H, Kawaminami, A Uueda M, Ueda A, Shinoda Yasuhiko Iwakura K, Kura K, Sumi N (2001). Spontaneous Neoplastic Lesions in Aged Sprague-Dawley Rats. *Exp Anim* 50:99–103. <https://doi.org/10.1538/expanim.50.99>
78. Nilas L, Christiansen C (1987) Bone Mass and Its Relationship to Age and the Menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 65:697–702. <https://doi.org/10.1210/jcem-65-4-697>
79. Nordin BE (1997) Calcium and osteoporosis. *Nutrition* 13:664–86. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(97\)83011-0](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(97)83011-0)
80. Parfitt AM (1976) The actions of parathyroid hormone on bone: relation to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis, and metabolic bone disease. Part IV of IV parts: The state of the bones in uremic hyperparathyroidism--the mechanisms of skeletal resistance to PTH in renal failure and pseudohypoparathyroidism and the role of PTH in osteoporosis, osteopetrosis, and osteofluorosis. *Metabolism* 25:1157–88. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(76\)90024-X](https://doi.org/10.1016/0026-0495(76)90024-X)
81. Pauwels F (1948) Die Bedeutung der Bauprinzipien des Stütz- und Bewegungsapparates für die Beanspruchung der Röhrenknochen. *Z Anat Entwicklungsgesch* 114:129–166. <https://doi.org/10.1007/BF00523560>
82. Pietschmann P, Kudlacek S, Peterlik M (2004) *Journal für Mineralstoffwechsel : Zeitschrift für Physiologie, Pathophysiologie und Klinik des Mineralstoffwechsels.* Krause & Pacherneegg
83. Pietschmann P, Skalicky M, Kneissel M, Rauner M, Hofbauer G, Stupphann D, Viidik A (2007). Bone structure and metabolism in a rodent model of male senile osteoporosis. *Exp Gerontol* 42:1099–1108. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2007.08.008>
84. du Prel J-B, Hommel G, Röhrig B, Blettner M (2009) Confidence interval or p-value?: part 4 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int* 106:335–9. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2009.0335>
85. Rauch A, Seitz S, Baschant U, Schilling AF, Illing A, Stride B, Kirilov M, Mandic V, Takacz A, Schmidt-Ullrich R, Ostermay S, Schinke T, Spanbroek R, Zaiss MM, Angel PE, Lerner UH, David JP, Reichardt HM, Amling M, Schütz G, Tuckermann JP (2010). Glucocorticoids suppress bone format. *Cell Metab* 11:517–31. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.005>
86. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ (1998) A Unitary Model for Involutional Osteoporosis: Estrogen Deficiency Causes Both Type I and Type II Osteoporosis in Postmenopausal Women and Contributes to Bone Loss in Aging Men. *J Bone Miner Res* 13:763–773. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.5.763>
87. Riggs BL, Melton LJ (1995) The worldwide problem of osteoporosis: Insights afforded by epidemiology. *Bone* 17:S505–S511. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(95\)00258-4](https://doi.org/10.1016/8756-3282(95)00258-4)
88. Ringe JD, Faber H, Dorst A (2001) Alendronate Treatment of Established Primary Osteoporosis in Men: Results of a 2-Year Prospective Study. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5252–5255. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.11.7988>

89. Roschger P, Lombardi A, Misof B, Maier G, Fratzl-Zelman N, Fratzl P, Klaushofer K (2010). Mineralization density distribution of postmenopausal osteoporotic bone is restored to normal after long-term alendronate treatment: qBEI and sSAXS data from the fracture intervention trial long-t. *J Bone Miner Res* 25:48–55. <https://doi.org/10.1359/jbmr.090702>
90. Roschger P, Manjubala I, Zoeger N, Meirer F, Simon R, Li C, Fratzl-Zelman N, Misof BM, Paschalis EP, Strelci C, Fratzl P, Klaushofer K (2009). Bone Material Quality in Transiliac Bone Biopsies of Postmenopausal Osteoporotic Women After 3 Years Strontium Ranelate Treatment. *J Bone Miner Res* 25:091019190442039–35. <https://doi.org/10.1359/jbmr.091028>
91. Ruimerman R, Hilbers P, van Rietbergen B, Huiskes R (2005) A theoretical framework for strain-related trabecular bone maintenance and adaptation. *J Biomech* 38:931–941. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.03.037>
92. Schulte E, Schumacher U, Schünke M (2014) Prometheus - LernAtlas der Anatomie : allgemeine Anatomie und Bewegungssystem ; 183 Tabellen. Thieme
93. Schwabe U (2011) Arzneiverordnungen 2010 im Überblick. In: *Arzneiverordnungs-Report 2011*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 3–42
94. Shou J, Chen P-J, Xiao W-H (2020) Mechanism of increased risk of insulin resistance in aging skeletal muscle. *Diabetol Metab Syndr* 12:14. <https://doi.org/10.1186/s13098-020-0523-x>
95. Siris ES, Adler R, Bilezikian J, Bolognese M, Dawson-Hughes B, Favus MJ, Harris ST, Jan de Beur SM, Khosla S, Lane NE, Lindsay D, Nana AD, Orwoll ES, Saag K, Silverman S, Watts NB (2014). The clinical diagnosis of osteoporosis: a position statement from the National Bone Health Allianc. *Osteoporos Int* 25:1439–1443. <https://doi.org/10.1007/s00198-014-2655-z>
96. Sornay-Rendu E, Boutroy S, Munoz F, Delmas PD (2007) Alterations of Cortical and Trabecular Architecture Are Associated With Fractures in Postmenopausal Women, Partially Independent of Decreased BMD Measured by DXA: The OFELY Study. *J Bone Miner Res* 22:425–433. <https://doi.org/10.1359/jbmr.061206>
97. Straka C, Abedinpour F, Fischer N, Wacker A (2010) Multiples Myelom. *Der Onkol* 16:232–241. <https://doi.org/10.1007/s00761-010-1810-1>
98. Swarthout JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC (2002) Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene* 282:1–17. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00798-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00798-3)
99. Taxel P, Kenny A (2000) Differential diagnosis and secondary causes of osteoporosis. *Clin Cornerstone* 2:11–19. [https://doi.org/10.1016/S1098-3597\(00\)90002-4](https://doi.org/10.1016/S1098-3597(00)90002-4)
100. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ (1995) FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 17:S125–S133. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(95\)00285-L](https://doi.org/10.1016/8756-3282(95)00285-L)
101. Thompson SW, Huseby RA, Fox MA, Davis CL, Hunt RD (1961). Spontaneous Tumors in the Sprague-Dawley Rat. *JNCI J Natl Cancer Inst* 27:1037–1057. <https://doi.org/10.1093/jnci/27.5.1037>
102. Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, Sibonga JD (2001). Animal Models For Osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord* 2:117–127. <https://doi.org/10.1023/A:1010067326811>

103. Wade SW, Strader C, Fitzpatrick LA, Anthony MS, O'Malley CD (2014). Estimating prevalence of osteoporosis: examples from industrialized countries. *Arch Osteoporos* 9:182. <https://doi.org/10.1007/s11657-014-0182-3>
104. Ward KA, Link TM, Adams JE (2016) Tools for Measuring Bone in Children and Adolescents. In: *Bone Heal. Assess. Pediatr.* Springer International Publishing, Cham, S 23–52
105. Welsch U (2010) *Lehrbuch Histologie.* Elsevier, Urban & Fischer
106. WHO scientific group on the assessment of osteoporosis at primary health care level summary meeting report Brussels Belgium 57 May 2004 | Arthritis Research UK. <https://www.arthritisresearchuk.org/external-resources/2012/09/17/16/11/who-scientific-group-on-the-assessment-of-osteoporosis-at-primary-health-care-level-summary-2004.aspx>. Zugegriffen: 09. April 2018
107. Winzenberg T, Powell S, Shaw KA, Jones G (2011) Effects of vitamin D supplementation on bone density in healthy children: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 342:c7254. <https://doi.org/10.1136/BMJ.C7254>
108. Wolff J (1899) Die Lehre von der functionellen Knochengestalt. *Arch für Pathol Anat und Physiol und für Klin Med* 155:256–315. <https://doi.org/10.1007/BF01994769>
109. Wright NC, Looker AC, Saag KG, Curtis JR, Delzell ES, Randall S, Dawson-Hughes B (2014). The recent prevalence of osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the femoral neck or lumbar spine. *J Bone Miner Res* 29:2520–6. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2269>
110. Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M (1989) Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 45:360–366. <https://doi.org/10.1007/BF02556007>
111. Yamauchi H, Kushida K, Yamazaki K, Inoue T (2009) Assessment of spine bone mineral density in ovariectomized rats using DXA. *J Bone Miner Res* 10:1033–1039. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650100707>
112. Yang J, Pham S, Crabbe D (2003) Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture. *Dentomaxillofacial Radiol* 32:247–251. <https://doi.org/10.1259/dmfr/12560890>
113. Yellowley CE, Li Z, Zhou Z, Jacobs CR, Donahue HJ (2010). Functional Gap Junctions Between Osteocytic and Osteoblastic Cells. *J Bone Miner Res* 15:209–217. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.2.209>
114. Zhao Z, Yang D, Ma X, Zhao H, Nie C, Si Z (2009). Successful Repair of a Critical-Sized Bone Defect in the Rat Femur with a Newly Developed External Fixator. *Tohoku J Exp Med* 219:115–120. <https://doi.org/10.1620/tjem.219.115>

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines langen Röhrenknochens. ....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines gesunden Knochens. ....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines histologischen Schnittes eines Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Präparates eines Knochens. ....	8
Abbildung 4: Eigene Darstellung der Einflussgrößen auf die Osteoporose. ....	10
Abbildung 5: Typisches Bild eines Tannenbaumphänomens. ....	11
Abbildung 6: Ergebnisblatt einer Knochendichtemessung eines 60-jährigen Manns mit einer Gendefekt bedingten Osteoporose. ....	13
Abbildung 7: Röntgenuntersuchung der LWS in 2 Ebenen. ....	15
Abbildung 8: Übersicht zur Einteilung der Osteoporoseformen nach Vorgaben der WHO. ....	16
Abbildung 9: Frakturinzidenz in den westlichen Industrienationen. ....	22
Abbildung 10: Darstellung eines Mechanostats. ....	23
Abbildung 11: Einflussgrößen auf die Entwicklung der Knochenmasse. ....	24
Abbildung 12: Regelmechanismen des Knochenmetabolismus. ....	26
Abbildung 13: Schema des RANKL/RANK-OPG-Pathway. ....	27
Abbildung 14: Maßnahmen zur Osteoporoseprävention. ....	29
Abbildung 15: Alters- und geschlechtsabhängiger T-Score. ....	30
Abbildung 16: Käfighaltung in der Stallung. ....	35
Abbildung 17: Intraoperative Darstellung einer Ovariectomie. ....	37
Abbildung 18: Sedierte und gebettete Ratte zur DXA-Messung. ....	38
Abbildung 19: Messung einer Ratte durch das DXA-Gerät. ....	39
Abbildung 20: Datenausgabeblatt einer DXA-Messung mit gesetzten ROI bei der Ratte. .....	40
Abbildung 21: Knochensäge mit in Paraffin gebettetem Femur. ....	41
Abbildung 22: Mikrotom zur Herstellung der Paraffinschnitte. ....	42
Abbildung 23: Dünnschnitt eines in Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparat eines Rattenfemurs. ....	43
Abbildung 24: Durch ImageJ bearbeiteter Bildausschnitt eines Paraffinschnittes. ....	45
Abbildung 25: Box-Plot-Darstellung der BMD-Werte zum Zeitpunkt t=0. ....	49
Abbildung 26: Box-Plot-Darstellung der BMD-Werte zum Zeitpunkt t=1. ....	49
Abbildung 27: Box-Plot Darstellung der BMC-Werte zum Zeitpunkt t=0. ....	51
Abbildung 28: Box-Plot Darstellung der BMC-Werte zum Zeitpunkt t=1. ....	51

Abbildung 29: Box-Plot Darstellung der Fett-Werte zum Zeitpunkt t=0.....	52
Abbildung 30: Box-Plot Darstellung der Fett-Werte zum Zeitpunkt t=1.....	52
Abbildung 31: Darstellung der trabekulären Dicke in der histomorphometrischen Auswertung.....	57
Abbildung 32: Darstellung der trabekulären Fläche in der histomorphometrischen Auswertung.....	60
Abbildung 33: HE-gefärbte Knochenschnitte von der Tibia der Kontrollgruppe. ....	63
Abbildung 34: HE-gefärbte Präparate der Tibia der Diätgruppe. ....	64
Abbildung 35: HE-gefärbte Knochenschnitte der Tibia der OVX-Gruppe.....	65
Abbildung 36: HE-gefärbte Knochenschnitte der Tibia der OVXD-Gruppe. ....	65
Abbildung 37: HE-gefärbte Präparate der Tibia der Sham-Gruppe. ....	66

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der Schweregrade anhand des T-Scores nach Vorgaben des Dachverbandes Osteologie [24]. .....	17
Tabelle 2: Übersicht der osteoporose-assoziierten Frakturen nach Art, Geschlecht und Patientenalter (aus Burge; Incidence and Economic Burden of Osteoporosis-Related Fractures in the United States).....	21
Tabelle 3: Übersicht der Wirkweise der einzelnen Antiresorptiva. ....	31
Tabelle 4: Entwässerungsschema für Paraffinschnitte. ....	42
Tabelle 5: BMD-Werte der DXA-Messung zum Zeitpunkt t=0.....	47
Tabelle 6: BMD-Werte der DXA-Messung zum Zeitpunkt t=1.....	48
Tabelle 7: BMC-Werte der DXA-Messung zum Zeitpunkt t=0.....	50
Tabelle 8: BMC-Werte der DXA-Messung zum Zeitpunkt t=1.....	50
Tabelle 9: Fett-Werte der DXA-Messung zum Zeitpunkt t=0. ....	51
Tabelle 10: Fett-Werte der DXA-Messung zum Zeitpunkt t=1. ....	52
Tabelle 11: Trabekuläre Dicke der Histomorphometrie. ....	57
Tabelle 12: Trabekuläre Fläche der Histomorphometrie.....	60

## 11 Abkürzungsverzeichnis/Glossar

%	Prozent
®	Registrierter Markenname
°C	Grad Celsius
μCT	Mikro-Computertomographie
μGy/μGray	Mikrogray
μSv	Mikrosievert
2D	Zweidimensional
ANOVA	<i>engl.</i> Analysis of Variance
AP-1	<i>engl.</i> Activator Protein 1
APES	3-Amino-propyltriethoxysilane
BMC	<i>engl.</i> Bone Mineral Content in g
BMD	<i>engl.</i> Bone Mineral Density in g/cm <sup>2</sup>
BMI	<i>engl.</i> Body Mass Index
BMJ	<i>engl.</i> British Medical journal
BMU	<i>engl.</i> Basic Multicellular Unit
Bone matrix	Knochengrundsubstanz
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
Control	<i>engl.</i> Kontrolle
CRPS	<i>engl.</i> Chronic Regional Pain Syndrome
CT	Computertomographie
DDD	<i>engl.</i> Defined Daily Doses
Diet	<i>engl.</i> Ernährung
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DVO	Dachverband Osteologie e.V.
DXA/DEXA	<i>engl.</i> Dual Energy X-ray Absorptiometry
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FDA	<i>engl.</i> Food and Drug Administration

g	Gramm
GIMP	<i>engl.</i> GNU Image Manipulation Program
HE	Hämatoxylin-Eosin
ICE	<i>engl.</i> Microsoft Image Composite Editor
IGF	<i>engl.</i> Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt
l	Liter
LRP5-Gen	<i>engl.</i> Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein 5 Gen
M	Molarität
mA	Milliampere
M-CSF	<i>engl.</i> Macrophage Colony-stimulating Factor
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
n	Anzahl
Newly formed matrix	Neugebildete Grundsubstanz
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
OVXD	Ovariectomie mit Ernährung
OVX	Ovariectomie
PMMA	Polymethacrylsäuremethylester
pqCT	Periphere Quantitative Computertomographie
PTH	Parathormon
PTHrP	<i>engl.</i> Parathyroid Hormone-related Protein
QCT	Quantitative Computertomographie
QUS	Quantitative Ultraschallmessung
RANK	<i>engl.</i> Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B

RANKL	<i>engl.</i> Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand
ROI	<i>engl.</i> Region of Interest
SERM	Selektive Östrogen Rezeptor Modulatoren
SFB	Sonderforschungsbereich
Sham	<i>engl.</i> Scheinoperation
SXA	<i>engl.</i> Single Energy Densitometry
TGF- $\beta$	<i>engl.</i> Transforming Growth Factor Beta
TIFF	<i>engl.</i> Tagged Image File Format
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	<i>engl.</i> World Health Organisation
$\mu$ m	Mikrometer

## Verzeichnis akademischer Lehrer

In Alzenau:

Dörrhöfer, Haake, Mappes, Pütz, Riemann, Röder

In Aschaffenburg:

Beeckmann, Ebeling, Mayer, Otremba, Schäfer, Wenderoth

In Gießen:

Alt, Biehl, Braun, Eicher, Heiß, Schäfer, Schiefer, Szalay, Thormann, Unzeitig,

In Hanau:

Adelmann, Bacher, Beichert, Braun, Brederlau, Classen, Dragoudacis, Drost,  
Eberhardt, Gerlach, Gruß, Häufler, Kraus, Köhler, Möhr, Schaub, Schilling, Schlosser,  
Schramm, Schwind, Steigerwald, Strippel, Polak, Reichert-Eckhardt, Wetjen, Wolff

In Lübeck:

Behnke, Bruch, Bürk, Horvath, Jürgens, Kiene, Kleemann, Mailänder, Mittelstädt,  
Paech, Renken, Russlies, Schulz, Wellm, Wenzl,

In Marburg:

El-Zayad, Efe, Frink, Fuchs-Winkelmann, Kühne, Ruchholz, Schneider, Schmitt,  
Strüwer, Peterlein, Ziering,

In Offenbach:

Gerstmann, Gundlach, Kern, Kasperek, Kiefl, Medwedowski, Pfeffer, Tarhan, Wenzel

### Danksagung

Als erstes möchte ich meinen Eltern einen großen Dank aussprechen, dass sie mich nicht nur in der Kindes- als auch Schulzeit förderten sowie auf allen Wegen unterstützten, sondern mir auch das Studium ermöglichen und mich diesbezüglich begleitet haben.

Dank gilt bei der Anfertigung der Arbeit auch meinem Chef und Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß für die Unterstützung und Ratschläge, sowie für die motivierenden Worte in einer angenehmen Arbeitsatmosphäre, so dass ich die Dissertation zügig vollenden konnte. Ebenso sind hier Herr Prof. Dr. rer. nat. Thaqif El Khassawna als mein Betreuer, Frau Prof. Dr. Lips als Laborleiterin und Herr Dr. Biehl zu nennen, die immer ein offenes Ohr für Fragen und stets mit Rat zur Seite standen. Frau Deeksha Malhan war ebenfalls immer ein hilfsbereiter Ansprechpartner hinsichtlich der Fragen in den labor- und EDV-bezogenen Problemen über den Zeitraum der Dissertation. Weiterhin möchte ich die Betreuer der Tierhaltung erwähnen, welche in meiner Abwesenheit für das Wohl der Tiere sorgten.

Auch meine Freunde Nicolas, Stefan und Rebecca sind in der Zeit des Schreibens der Arbeit mitunter zu kurz gekommen und sollen hier genannt werden.

Letztendlich gilt mein besonderer Dank Isabell, die mir in allen Höhen und Tiefen Kraft sowie Motivation gab, mir immer zur Seite stand und mich dabei nie allein ließ. Stets hielt sie gute Worte und Ratschläge parat und ermöglichte es mir diese Arbeit anzufertigen.

## Erklärung zur Dissertation

### Ehrenwörtliche Erklärung

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

---

Ort/Datum

Unterschrift