

**Analyse des Osteoidgehalts im Schafmodell der steroidale, diätisch
und durch Ovariectomie induzierten Osteoporose**

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

vorgelegt von Mülke, Matthias Eduard Sebastian
aus Stuttgart - Bad Cannstatt

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Experimentellen Unfallchirurgie,
Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß

Gutachter: PD Dr. med. Thomas Karrasch

Tag der Disputation: 24.01.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	2
2.1	Anatomie des Knochens	2
2.2	Knochenumbau, Bone Remodeling	7
2.3	Knochenmetabolismus.....	8
2.4	Zellinteraktionen.....	11
2.5	Regulation des Knochenstoffwechsels	14
2.6	Osteoporose	18
3	Studiendesign und Hypothese.....	26
3.1	Studiendesign.....	26
3.2	Hypothesen und Zielsetzung	27
4	Material und Methoden.....	29
4.1	Versuchstiere	29
4.2	Tierhaltung und Diät.....	29
4.3	Steroidinjektionen.....	29
4.4	Operationen	30
4.5	Anfertigung von Knochenschnitten und -schliffen	34
4.6	Histologische Färbungen	37
4.7	Fluoreszenz-Markierung.....	37
4.8	Fotomikroskopie	37
4.9	Deskriptive Auswertung	38
4.10	Histomorphometrische Auswertung	39
4.11	Statistische Auswertung	45
5	Ergebnisse	46
5.1	Versuchsverlauf	46
5.2	Radiologische Beschreibung der Knochenqualität	48

5.3	Deskriptive Bewertung des Knochenstatus	49
5.4	Histomorphometrie Beckenkamm	60
5.5	Histomorphometrie Femur	64
5.6	Histomorphometrie Lendenwirbelkörper	68
5.7	Vergleich der anatomischen Regionen: mechanisch belastet vs. unbelastet	70
6	Diskussion	73
6.1	Saisonaler Rhythmus im Schaf	74
6.2	Variablen des Studienmodells	75
6.3	Optimierung der Histomorphometrie	78
6.4	Entnahmeort der Knochenproben	80
6.5	Trabekuläre Destruktion durch Steroide	81
6.6	Mineralisationsdefekt nach Dreifachtherapie	84
6.7	Einfluss der mechanischen Belastung auf die Trabekelarchitektur	86
7	Zusammenfassung	89
8	Summary	90
9	Abkürzungsverzeichnis	91
10	Abbildungsverzeichnis	94
11	Tabellenverzeichnis	95
12	Literaturverzeichnis	97
13	Anhang	113
13.1	Paraffin-Einbettung	113
13.2	Polymethylmethacrylat Einbettung	114
13.3	Färbeprotokoll Hämatoxylin-Eosin	115
13.4	Färbeprotokoll von Kossa / van Gieson:	116
13.5	Herstellung der Injektionslösungen für die Fluoreszenz-Marker	118
13.6	Probenzahl	119
13.7	Ergebnistabellen	120
13.8	Makros	128

Präsentationen, Publikationen, Preise	147
Ehrenwörtliche Erklärung	148
Danksagung	149

1 Einleitung

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung. Sie zeichnet sich durch eine verminderte Knochenmasse und gestörte Mikroarchitektur des Knochens aus mit der Folge einer vermehrten Instabilität und vermehrter Knochenbrüche [45]. Diese Fragilitätsfrakturen, die schon nach minimalen Traumata des alltäglichen Lebens auftreten, führen bei den Betroffenen zu erheblichen Schmerzen, Leiden, Einschränkung und sogar verminderter Lebenserwartung. Schätzungsweise litten im Jahr 2010 in Europa 22 Millionen Frauen und 5,5 Millionen Männer an Osteoporose mit einem neuen Auftreten von 3,5 Millionen Fragilitätsfrakturen. Die daraus resultierende wirtschaftliche Belastung wird auf 37 Milliarden Euro jährlich geschätzt [88]. Aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung sind die Zahlen weiter steigend.

Das Auftreten der Osteoporose ist multifaktoriell bedingt [174]. Als wichtigste Trigger werden der postmenopausale Hormonmangel [167], die Langzeit-Glukokortikoid-Einnahmen [44, 225], der Vitamin D-Mangel [157], die Immobilität [36] und der altersbedingte Knochenverlust [110] angenommen. Diese Trigger sorgen dafür, dass im sich stetig erneuernden Knochen ein Ungleichgewicht zwischen den knochen auf- und den knochenabbauenden Prozessen herrscht. Folge sind eine Abnahme der Knochenmasse, ein Wandel der Knochenmorphologie (Form und Mikroarchitektur) sowie eine Veränderung der Knocheneigenschaften (Dichte, Mineralisation, Kollagene und Mikrobrüche), welche gemeinsam in einer verminderten Knochenstärke münden [137].

Um die medizinische Behandlung der Osteoporose zu verbessern und die gesellschaftlichen Folgen zu mildern, ist es wichtig, den wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn voranzutreiben. Dazu ist es notwendig, weitere Erkenntnisse über die defizitäre Mineralisation im osteoporotischen Knochen zu gewinnen. Die aktuell benutzerabhängige und sehr zeitaufwändige Histomorphometrie bedarf der Etablierung neuer automatisierter Methoden. Außerdem mangelt es an einem bestmöglichen und umfassend umschriebenen Großtiermodell der Osteoporose zur Entwicklung und Testung neuer Knochenersatzstoffe und Implantatwerkstoffe.

Ziel dieser Studie ist es, mit Hilfe eines Großtiermodells im Schaf einen detaillierten Einblick in die Knochenarchitektur und die Knochenmineralisation in Abhängigkeit der bekannten Trigger der Osteoporose zu erhalten.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Anatomie des Knochens

2.1.1 Funktion des Knochens im Körper

Knochen erfüllen im Körper unterschiedlichste Aufgaben und Funktionen. Sie sind mit Bändern und Gelenken Teil des passiven Bewegungsapparats und ermöglichen die Übertragung von Muskelkraft auf nahe oder ferner gelegene Körperpartien. Sie können durch das Umschließen von Organen wie den Brusteingeweiden oder dem Gehirn Schutz bieten [62]. Eine weitere wichtige Rolle spielt der Knochen als Reservoir bei der Regulation der Kalzium- und Phosphathomöostase [62, 182]. Außerdem enthält der Knochen in seinem Inneren das rote Knochenmark, ein Teil des blutbildenden Systems [61].

Der Knochen verdankt seine enorme Druck- und Zugfestigkeit seiner verkalkten Knochenmatrix [232]. Bei mangelnder Mineralisation wird der Knochen weich und biegsam und es kann zu Wachstumsstörungen oder Deformationen kommen [176].

2.1.2 Makroskopischer Aufbau des Knochens

Der ausgewachsene Mensch besitzt in der Regel 210 abgrenzbare Knochen, die sich in ihrer Form und Funktion stark voneinander unterscheiden. Sie werden nach ihrer Morphologie in lange Knochen bzw. Röhrenknochen, kurze Knochen, platte Knochen und unregelmäßig geformte Knochen eingeteilt [61].

Makroskopisch lässt sich der Knochen in zwei Erscheinungsformen unterteilen (Abb. 1). Der kompakte Knochen (Compacta, Kortikalis) lässt sich als eine solide und feste Masse mit vielen Blutgefäßen beschreiben. Der spongiöse Knochen (Spongiosa, trabekulärer Knochen) stellt ein feines dreidimensionales System aus verzweigten Knochenbälkchen (Trabekeln) dar [232].

Das menschliche Knochengewebe ist zu 80 % als kompakter Knochen und 20 % als spongiöser Knochen organisiert [62]. Die Kortikalis wird von außen vom Periost umhüllt, während nach innen das Endost den Knochen vom Binnenraum abtrennt [232].

Röhrenknochen sind an den Extremitäten zu finden und besitzen einen speziellen Aufbau. In der Mitte liegt die lange röhrenförmige Diaphyse. Die Diaphyse besitzt eine dicke Kortikalis und umschließt einen mit meist gelbem Knochenmark und kaum Spongiosa gefüllten Hohlraum. Die beiden gelenktragenden Knochenenden der Röhrenknochen

werden Epiphyse genannt und enthalten viel Spongiosa umhüllt von einer dünnen Kortikalis [184]. Der wachsende Knochen hat eine knorpelige Wachstumsfuge (Epiphysenfuge), aus der das Längenwachstum resultiert [131]. Nach Abschluss des Längenwachstums verschließt sich die Epiphysenfuge und es bleibt lediglich die Epiphysenlinie zurück [62]. Die in unmittelbarer Nachbarschaft befindliche Metaphyse bildet den Übergang zur Diaphyse und enthält ebenfalls viel Spongiosa. Die Metaphyse ist ein meist verdickter Knochenabschnitt und besitzt viele Vorsprünge (Apophysen) zur Befestigung von Muskeln, Sehnen und Bändern [61].

Kurze Knochen wie die Handwurzelknochen, platte Knochen wie das Schulterdach und unregelmäßig geformte Knochen wie die Wirbel [61] sind vielseitig und haben keine allgemeingültige Gliederung wie die Röhrenknochen [184]. In ihrem Inneren befindet sich meist spongiöser Knochen, deren Zwischenräume wie bei der Epi- und Metaphyse mit rotem, blutbildenden Knochenmark gefüllt sind [61].

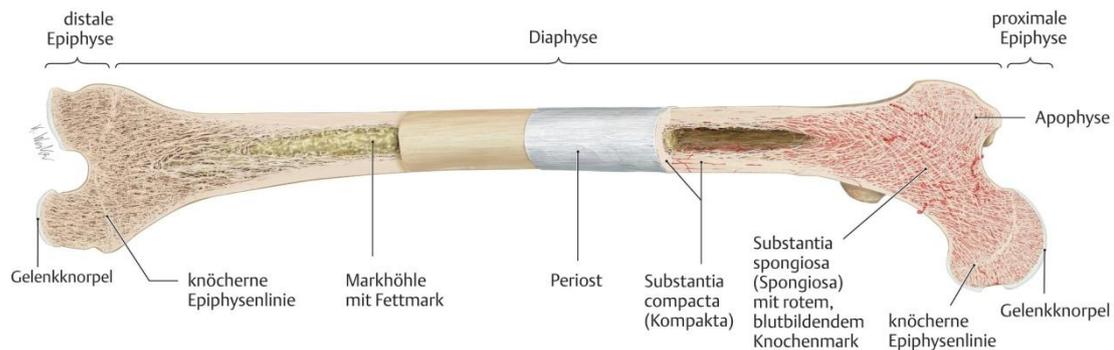


Abb. 1: Makroskopischer Aufbau eines langen Knochens.

Die Abbildung zeigt einen menschlichen Oberschenkelknochen (Femur). Sie beschreibt den makroskopischen Aufbau sowie die Gliederung eines Röhrenknochens. Aus Schünke et al. [189].

2.1.3 Mikroskopischer Aufbau des Knochens

Es gibt es vier Gruppen von Geweben. Knochen bzw. Knochengewebe sind dem Binde- und Stützgewebe zugeteilt. Binde- und Stützgewebe zeichnet sich dadurch aus, dass es wenige Zellen und einen großen Extrazellularraum aufweist, deren spezielle Zusammensetzung die biomechanischen Eigenschaften des Gewebes ausmacht [131].

Je nach histologischer Struktur unterscheidet man zwei Organisationsformen. Der Geflechtknochen tritt immer dann auf, wenn Knochen sehr schnell gebildet wird wie beispielsweise in der Entwicklung oder bei der Frakturheilung. Der höherwertige Lammellenknochen ersetzt den Geflechtknochen im Zuge des anschließenden Umbaus

[131]. Knochenlamellen sind etwa 3 - 7 μm dick, stehen untereinander in Verbindung und bestehen aus verkalkter Matrix (Abb. 2). In den linsenförmigen Aussparungen der Knochenlamellen liegen Osteozyten. In der Spongiosa haben Knochenlamellen eine unregelmäßige Orientierung, verlaufen aber fast parallel zur Oberfläche. Im kompakten Knochen unterliegen sie einer höheren Gliederung und sind in Form von Spezial-, Schalt- und Generallamellen vorzufinden. 4 - 20 Speziallamellen sind konzentrisch um längs verlaufende Blutgefäße bzw. den Havers-Kanal angeordnet (Abb. 2). Diese zylindrische Baueinheit hat einen Durchmesser von 100 - 400 μm , kann mehrere Zentimeter lang werden und wird Osteon genannt. Schaltlamellen sind die Reste alter durchgesetzter Osteone. Sie sind ein Zeichen des Knochenumbaus und sind wie Füllsubstanz zwischen intakten Osteonen zu finden. Generallamellen kleiden den kompakten Knochen an der äußeren und inneren Oberfläche aus [232].

Die Blutversorgung wird durch die Arteriae nutritiae übernommen, die von außen die Kortikalis durchläuft und in den Markraum führt. Arteriae nutritiae speisen die Mikrogefäße des Knochenmarks, die ebenfalls die gefäßlose Spongiosa ernähren. Die longitudinal in den Havers-Kanälen der Kortikalis verlaufenden Havers-Gefäße und deren Querverbindungen (Volkmann-Kanäle) werden von zentrifugal aus dem Knochenmark austretenden Gefäßen versorgt [131].

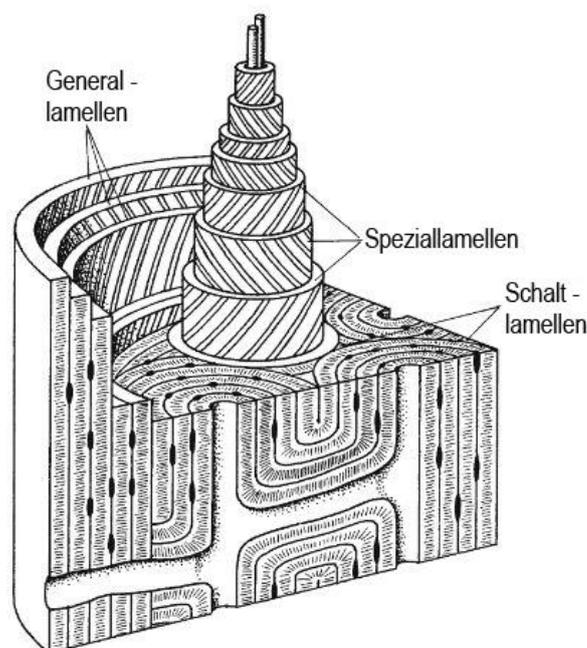


Abb. 2: Mikroskopischer Aufbau der Knochenlamellen.

In der Zeichnung ist die Architektur des Lammellenknochens mit Speziallamellen, Schaltlamellen und Generallamellen dargestellt. Aus Schiebler et al. [185].

2.1.4 Die extrazelluläre Matrix

Die Knochenmatrix, die für die besonderen Knocheneigenschaften verantwortlich ist, besteht zu 30 % aus organischem Material, zu 45 % aus anorganischem Material und zu 25 % aus Wasser [232].

Die organische extrazelluläre Matrix unterscheidet sich von dem des lockeren Bindegewebes durch seine hierarchische, parallel zueinander verlaufende Anordnung in Fibrillen. Die Fibrillen verlaufen helikal um das Zentrum eines Osteons. Kollagen Typ I macht 90 % des organischen Anteils aus [232]. Es sorgt für Zugfestigkeit und Elastizität des Knochens und bildet die Kalzifizierungsmatrix. Kollagen Typ V macht ca. 5 % des organischen Anteils aus. Es reguliert die Fibrillenbildung von Kollagen Typ I [62]. Weitere Matrixproteine sind Osteokalzin, Osteopontin, Osteonektin, Proteoglykane, Knochen-Sialoprotein, Thrombospondin und alkalische Phosphatase [62, 232].

Der anorganische Anteil besteht zum größten Teil aus Hydroxylapatit (HA)-Kristallen und nur aus wenig Kalziumcarbonat und amorphem Kalziumhydrogenphosphat. Verglichen mit HA ist Kalziumhydrogenphosphat besser löslich und sorgt für den schnellen Austausch von Kalzium mit den Körperflüssigkeiten. Das in dem Knochengewebe enthaltene Kalzium wiegt ungefähr ein Kilogramm. Weitere im Knochengewebe vorkommende Ionen sind Fluorid, Ziträt, Magnesium, Eisen, Zink, Kupfer, Strontium und Blei [62].

2.1.5 Knochenumbauende Zellen

Knochenumbauende Zellen lassen sich in knochenbildende und knochenabbauende Zellen unterteilen. Zu den knochenbildenden Zellen gehören Osteoblasten, endostale Saumzellen und Osteozyten, die sich alle von mesenchymalen Stammzellen ableiten. Die mesenchymale Stammzelle kann sich zur Osteoprogenitorzelle differenzieren, die im Endost oder Periost lokalisiert ist und eine gemeinsame Vorläuferzelle für die Knochenbildung und Knorpelbildung darstellt [62, 163].

Osteoblasten sind einkernige, fast kubische Zellen, die alle wesentlichen organischen Matrixkomponenten (Osteoid) des Knochens bilden. Osteoblasten liegen Zelle an Zelle auf der dem Knochenmark zugewandten Oberfläche des Osteoids. Osteoblasten bilden Zytokine, die sowohl die Osteoidbildung und Osteoblasten-Proliferation als auch die Osteoklastenaktivität und -differenzierung stimulieren. Osteoblasten besitzen Rezeptoren

für Parathormon (PTH), Kalzitriol (1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃) und Retinsäure (aktives Vitamin A), die alle regulatorischen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel nehmen [62]. Osteozyten machen 90 - 95 % der Knochenzellen eines Erwachsenen aus und leben im Gegensatz zu den anderen Knochenzellen über mehrere Jahrzehnte [26]. Aus von mineralisiertem Knochen umgebenen Osteoblasten können Osteozyten hervor gehen. Ihr Zytosoma liegt in sogenannten Lakunen und ihre dendritischen Zellfortsätze verlaufen in Canaliculi [62]. Darüber bilden Osteozyten ein großes Netzwerk, mit dem sie mit benachbarten Osteozyten und auf der Knochenoberfläche liegenden Zellen, wie Osteoblasten in Kontakt stehen [41]. Ernährt werden die Osteozyten über den Flüssigkeitsstrom in der perizellulären Matrix des Lakunen-Canaliculi-Systems [104, 228]. Osteozyten nehmen eine Schlüsselrolle im Knochenstoffwechsel ein und regulieren darüber hinaus auch noch weitere Organe [41, 47, 94]. Sie gelten als Mechanosensoren und sorgen dafür, dass der Knochen den Belastungen angepasst wird [144, 145, 171]. Die wohl bekanntesten von den Osteozyten ausgeschütteten Mediatoren sind Sclerostin (SCL), Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL), Osteoprotegerin (OPG), Fibroblast growth factor 23 (FGF23), Dickkopf-related protein 1 (DKK1), Stickstoffmonoxid und Prostaglandin E₂ [41]. Ihre genaueren Funktionsweisen werden in Kapitel 2.4 beschrieben.

Endostale Saumzellen bilden einen der inneren Knochenoberfläche aufliegenden flachen Zellsaum. Sie stehen miteinander und mit Osteozyten in Verbindung. Zwischen ihnen und dem mineralisierten Knochengewebe liegt eine schmale Schicht Osteoid. Endostale Saumzellen gelten als ruhende Osteoblasten, die erst auseinander weichen müssen, bevor Osteoklasten zur Bildung einer Erosionslakune den mineralisierten Knochen erreichen können [62].

Die demineralisierenden und Knochen abbauenden Osteoklasten [62] gehen aus Vorläuferzellen des monozytären Phagozytensystems hervor [131]. Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen (mit bis zu 25 Zellkernen), die in Erosionslakunen am trabekulären Knochen und in Erosionstunneln im kortikalen Knochen zu finden sind. Osteoklasten nehmen als knochenabbauende Zellen eine Schlüsselfunktion im Knochenumbau und der Kalziumfreisetzung ein [62]. Die Arbeitsweise der Osteoklasten greift auf Säuren zur Auflösung der Kalzium-Verbindungen, lysosomale Enzyme zur Zerlegung der organischen Matrix und Endozytose der Matrix-Fragmente zurück [131]. Hormone und zahlreiche weitere Faktoren nehmen Einfluss auf die Differenzierung und

Aktivität der Osteoklasten [62, 131, 209, 232]. Diese Einflüsse werden in den Kapiteln 2.4 und 2.5 vorgestellt.

2.2 Knochenumbau, Bone Remodeling

Auch wenn der Begriff Knochenumbau im deutschen unscharf definiert ist, so bezieht sich das englische Bone modeling auf das Anpassen der Knochenform und -masse an mechanische Belastung. Dagegen beschreibt der Begriff Remodeling das Ersetzen von beschädigten Knochen und wird im Weiteren beschrieben (Abb. 3) [131, 194].

Knochenumbau findet ständig in unserem Körper statt. Im Jahr werden ca. 10 % der Skelettmasse umgesetzt [131]. Denn auch physiologische Kräfte, die auf den Knochen wirken, führen zu Mikroschäden. Darum verliert der Knochen an mechanischer Stabilität und Osteozyten gehen in Apoptose [140]. Dieser Untergang führt im geschwächten Knochen zu einer Kolonialisierung von Osteoklasten und zum Beginn des Knochenumbaus [2].

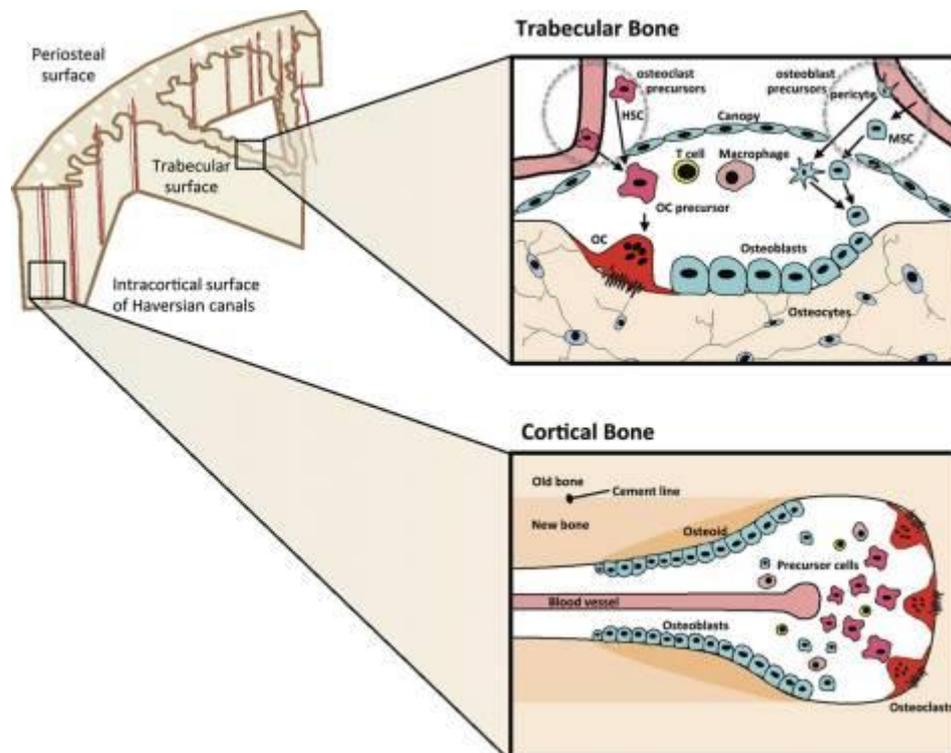


Abb. 3: Schematische Darstellung der BMU.

In der Abbildung ist der Aufbau der Basic multicellular unit im kortikalen und spongiosen Knochen dargestellt. Es zeigt die organisierte Anordnung von Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten in einer Erosionslücke bzw. in einem Erosionstunnel. Aus Sims et al. [203].

Durchgeführt wird der Umbau von gut organisierten Osteoklasten und Osteoblasten, die Basic Multicellular Unit (BMU) genannt werden. Eingeteilt werden kann diese BMU in eine Osteoklastenzone, in der Osteoklasten mineralisierte Matrix umsetzen, eine Umkehrzone, in der Makrophagen die zuvor abgeräumte Matrix beseitigen, und eine Osteoblastenzone, in der der entstandene Defekt wieder mit Osteoid bzw. anschließend mineralisierter Matrix aufgefüllt wird [232]. Am trabekulären Knochen findet dies in napfförmigen Vertiefungen, sogenannten Erosionslakunen, statt. Erosionslakunen sind 50 - 70 μm tief, bis zu 600 μm lang und wandern mit einer Geschwindigkeit von bis zu 40 $\mu\text{m}/\text{Tag}$. Im kompakten Knochen ist die BMU in Form von Erosionstunneln organisiert [62]. Erosionstunnel durchschreiten die mineralisierte Matrix wie ein Bohrkanal und hinterlassen ein bis zu mehreren Millimetern lang werdendes Osteon. Den Osteoklasten an der Spitze folgen in der Mitte Blutgefäße, Bindegewebe und Nerven. Diese umgeben mehrere Schichten an Osteoblasten, die zukünftig Speziallamellen des Osteons bilden werden [158, 232].

2.3 Knochenmetabolismus

Für den Erhalt der Knochenmasse ist ein Gleichgewicht zwischen Knochenbildung und -abbau entscheidend. Wie in Abb. 4 demonstriert, sind diese Umbauvorgänge nicht in jeder Lebensphase ausgeglichen und die Knochenmasse nicht konstant.

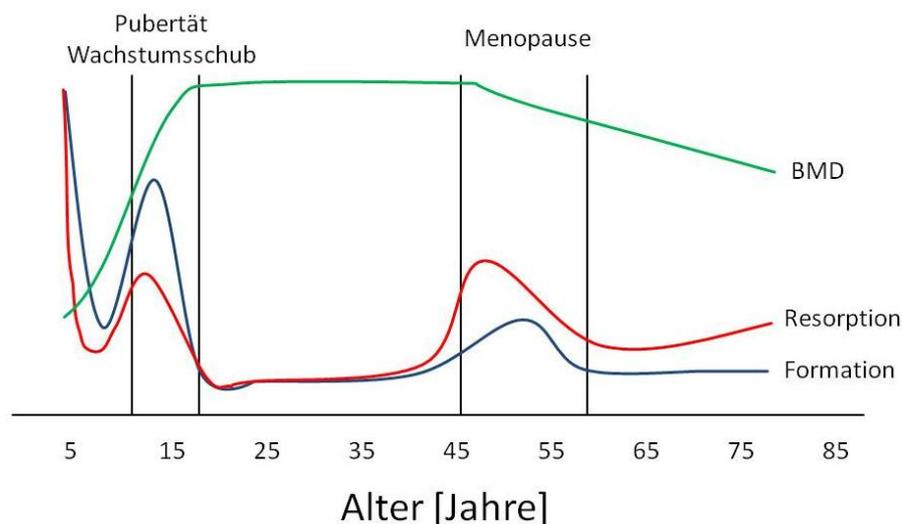


Abb. 4: Knochenauf- und -abbau im Verlauf des Lebens einer Frau.

Während der Jugend, bis zum Ende der Pubertät, überwiegt die Formation und deswegen steigt die BMD. Besonders in der Menopause, aber auch postmenopausal, gibt es ein deutliches Übergewicht auf Seiten der Resorption. Die Knochenmasse nimmt folglich ab und es kann zur Osteoporose kommen. **BMD** = Bone mineral density / Knochendichte. Modifiziert nach Kleerekoper et al. [113].

2.3.1 Knochenbildung

Das hauptsächlich aus Kollagen Typ I bestehende Osteoid, das von den Osteoblasten produziert und sezerniert wurde, muss für seine biomechanischen Eigenschaften mineralisiert werden. Dazu werden in die Kollagenfibrillen HA-Kristalle ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$) eingelagert (Abb. 5). Diese bestehen aus einem Produkt von Kalziumionen (Ca^{2+}) und anorganischen Phosphat (Pi). HA-Kristalle werden sowohl in Matrixvesikeln als auch durch epitaktische Mineralisierung im extrazellulären Raum gebildet [62].

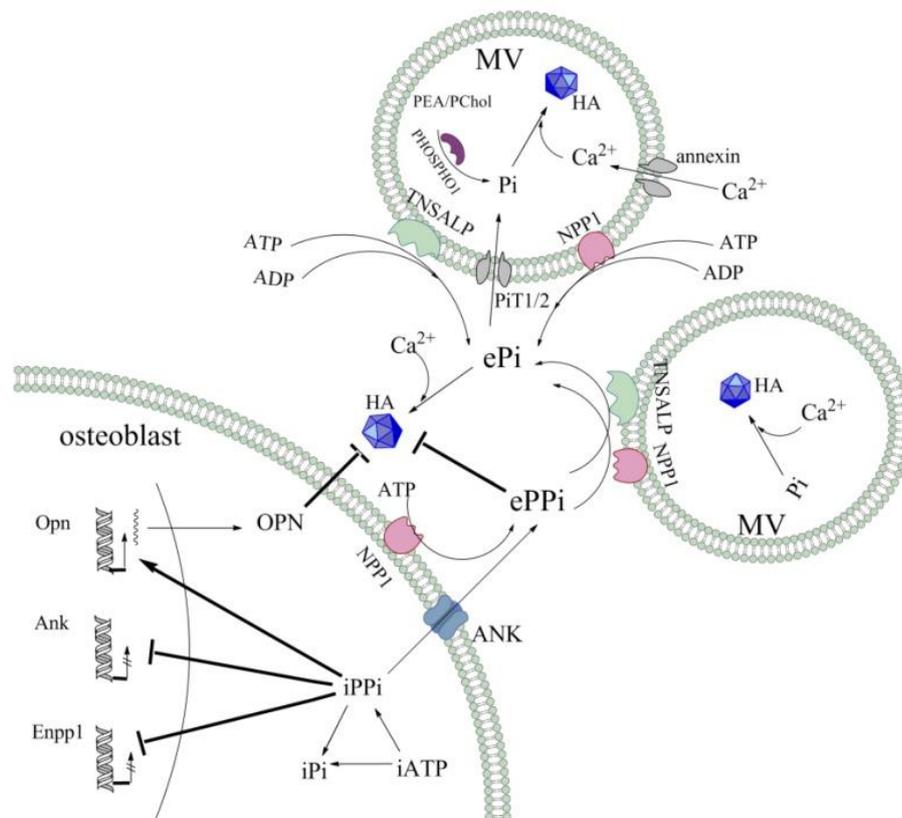


Abb. 5: Regulation der Hydroxylapatitbildung.

Hydroxylapatit-Kristalle (HA) wachsen sowohl in Matrixvesikeln (MV) als auch extrazellulär. Sie werden bei einer ausreichend hohen Konzentration von Ca^{2+} und Pi gebildet. Im MV sorgen der Kalziumkanal Annexin, der Phosphat-Transporter PiT1/2 sowie die Phosphatase PHOSPHO1 für diese Voraussetzungen. Extrazellulär sind es die Phosphatasen TNSALP und NPP1, die ATP, ADP oder Pi spalten und dadurch den Quotienten von Pi/PPi beeinflussen, der maßgeblich an der Promotion bzw. Inhibition der Mineralisierung beteiligt ist. Ebenfalls am Quotient mitwirkend ist der Pyrophosphat-Transporter ANK. Regulatorischen Einfluss auf die Mineralisation haben diverse Proteine der Small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein Familie wie OPN. **ADP** = Adenosindiphosphat; **Ank** = Progressive ankylosis gene, **ANK** = Progressive ankylosis protein, Pyrophosphat-Transporter; **Annexin** = Name einer Proteinfamilie, Kalziumkanal; **ATP** = Adenosintriphosphat; **Ca²⁺** = Kalziumion; **e-** = extrazellulär; **HA** = Hydroxylapatit-Kristall; **MV** = Matrixvesikel; **NPP1** = Ectonucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase 1; **OPN** = Osteopontin; **PHOSPHO1** = Phosphoethanolamine / phosphocholine phosphatase 1; **Pi** = anorganisches Phosphat; **PiT1/2** = Phosphate transporter 1/2; **PPi** = anorganisches Pyrophosphat; **TNSALP** = Tissue-nonspecific alkaline phosphatase. Aus Zhou et al. [244].

Matrixvesikel schnüren sich von der Knochen zugewandten Seite der Osteoblasten ab [214]. In ihnen reichern sich P_i durch das Spalten von Phosphoethanolamin (PEA) und Phosphocholin (PChol) durch eine Phosphatase (PHOSPHO1) und den Phosphattransporter (PiT1/2) an. Ca^{2+} strömt in das Innere des Vesikels durch den Kalziumkanal Annexin [244]. Durch die Anreicherung der beiden Ionen kann ein Mineralisationszentrum im Matrixvesikel entstehen [6]. Dieser erste HA-Kristall wächst weiter und sprengt die Vesikelmembran [7].

Extrazellulär lagern sich die HA-Kristalle in Nischen der Kollagenfibrillen an [215]. Ob es eigene extrazelluläre Nukleations-Zentren gibt oder diese aus den in Matrixvesikeln entstandenen HA hervorgehen, wird derzeit noch kontrovers diskutiert [28, 118, 236]. Die weitere Mineralisation wird von einem geeigneten extrazellulären Verhältnis von P_i zu Pyrophosphat (PPi) (P_i/PP_i) bestimmt. Ein hoher Quotient fördert ein Fortschreiten der Mineralisation. Ein niedriger Quotient wirkt sich inhibierend aus [89]. Die Menge an extrazellulären PPi kann durch den ankylosis Protein-Transporter (ANK) und durch das Spalten von Adenosintriphosphat (ATP) durch eine Phosphodiesterase (NPP1) gesteigert werden. NPP1 sowie auch die alkalische Phosphatase (TNSALP) können aber von ATP, Adenosindiphosphat (ADP) oder PPi P_i abspalten [244].

Regulatorischen Einfluss auf die Mineralisation haben Proteine der Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein (SIBLING) Familie [71]. Hemmenden Einfluss haben matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE), Osteopontin und SCL. Mineralisation fördernd wirken dentin matrix protein 1 (DMP1), bone sialoprotein (BSP) und dentin sialophosphoprotein (DSPP). Jedoch variiert die Aktivität je nach Spaltung und posttranslationaler Modifikation [206, 223].

2.3.2 Knochenabbau

Knochenabbau bzw. -resorption ist ein entscheidender Teil des Knochenstoffwechsels. Ein Ungleichgewicht zwischen Resorption und Bildung können zu Erkrankungen wie der Osteopetrose (zu wenig Resorption) oder der Osteopenie (zu viel Resorption) führen. Verantwortlich für die Knochenresorption sind Osteoklasten. Nachdem Osteoklasten an die Knochenoberfläche gebunden haben, vergrößern sie ihre Oberfläche auf der knochen zugewandten Seite zu einer ruffled border und schließen diesen mit der sealing zone ab. Dadurch entsteht ein abgegrenzter Raum (Erosionslakune), in dem die Resorption stattfinden kann [205].

HA ist nur schwer löslich und es bedarf einer hohen Salzsäurekonzentration, um es zu mobilisieren [137]. Die Protonen gelangen durch eine ATPase in die Erosionslakune, die von der Spaltung von Wasser und Kohlenstoffdioxid zu Protonen und Bicarbonat durch eine zytoplasmatische Carboanhydrase profitiert [22, 220, 221]. Das Bicarbonat wird basolateral durch einen Chlorid-Bicarbonat-Austauscher abtransportiert. Das Chlorid verlässt den Osteoklasten über Chlorid-Kanäle in die Erosionslakune [84, 187]. Die organische Komponente des Knochens wird durch Cathepsin-K und weitere Metalloproteasen abgebaut, die über Exozytose in die Erosionslakune gelangen [205].

Die Abbauprodukte verlassen die Erosionslakune über Transzytose, sodass die Osteoklasten die Bindung an den mineralisierten Knochen nicht verlieren [179]. Kalziumionen verlassen über spezielle Kalzium-Kanäle ebenfalls die Erosionslakune [224].

2.4 Zellinteraktionen

Um die Knochenqualität zu optimieren, sind Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten in ständiger Kommunikation miteinander. Beispielsweise schütten Osteoblasten für die Differenzierung von Osteoklasten aus ihren Vorläuferzellen macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), RANKL und andere co-stimulierende Faktoren aus [210].

2.4.1 Receptor activator of nuclear factor- κ B, Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand und Osteoprotegerin

Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK), sein Ligand RANKL und OPG gehören zur Superfamilie der tumor necrosis factor (TNF) und der TNF-Rezeptoren. RANK befindet sich membrangebunden auf Osteoklasten und RANKL in seiner häufigeren Form membrangebunden auf Zellen der osteoblastischen Zelllinie (Osteoblasten und Osteoklasten), Immunzellen und Tumorzellen [200]. OPG, der dritte Mitspieler in den Interaktionen, ist löslich und wird hauptsächlich von Stomazellen des Knochenmarks, aber auch Zellen des Lymphsystems wie B-Zellen und dendritischen Zellen, ausgeschüttet [226, 239].

RANK-RANKL Interaktionen sind sehr potent in der Initialisierung der Osteoklasten-Differenzierung sogar unter minimalen *in vitro* Bedingungen [238]. Osteoklasten-Vorläuferzellen benötigen Wachstumsfaktoren wie M-CSF, um sich zu differenzieren und

RANK zu synthetisieren [172]. Wenn auch nur einer der Faktoren in einem genetischen Maus-Modell ausgeschaltet wird, kommt es zu Osteopetrose, eine Erkrankung mit verdickten Knochen und mit einer verringerten Zahl und Aktivität der Osteoklasten [226]. Durch das Binden von RANKL an RANK wird die Osteoklasten-Proliferation gefördert, ihre Aktivität erhöht und ihr Überleben verlängert [29].

OPG ist ein löslicher Faktor, der an RANKL bindet und dadurch die Interaktion von RANKL und RANK verhindert. Neben der dadurch resultierenden Hemmung der Osteoklastogenese scheint OPG eine weitere direkte Wirkung auf Osteoklasten zu haben [83, 202].

2.4.2 Sclerostin und Dickkopf-related protein

SCL ist ein Glykoprotein, dass auf den Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site (WNT)-Signalweg inhibierend einwirkt. Der Funktionsverlust des SCL-Gens führt klinisch zu einer gesteigerten Knochenformation mit massiv erhöhter Knochenmasse. Außerdem hat SCL einen negativen Einfluss auf die Mineralisation des Knochens. Durch Hormone, aber im Besonderen auch mechanische Belastung, kann die SCL-Ausschüttung der Osteozyten beeinflusst werden. Belastung führt zur verminderten Ausschüttung, fehlende Belastung zur vermehrten Ausschüttung [50, 59, 125, 128, 223].

DKK1 ist ebenfalls ein Inhibitor des WNT-Signalwegs und hat damit einen negativen Einfluss auf die Knochenformation. Neben der Möglichkeit der gezielten pharmakologischen Therapie einer Osteoporose scheint dieser Inhibitor auch an der Krankheitsentstehung mitzuwirken. Seine Expression wird durch Glucocorticoide verstärkt. Bei Patienten mit Osteoporose wurden erhöhte DKK1 Spiegel gefunden [5, 48, 164, 227].

2.4.3 Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site-Signalweg

Der WNT-Signalweg ist an vielen Orten des Körpers ein wichtiger Regulator. Er spielt beispielsweise eine wichtige Rolle in der Embryogenese, Organogenese und Tumorgenese. Im Knochen ist er ein bedeutender Aktivator der Osteoblastogenese. Der WNT-Signalweg kann in drei Hauptsignalwege eingeteilt werden. Der WNT-calcium pathway, der noncanonical WNT-planar cell polarity pathway und der canonical WNT/ β -catenin pathway (Abb. 6), auf den im Folgenden eingegangen wird [81].

Wenn eines der löslichen Glykoproteine der WNT-Familie an den Rezeptorkomplex bestehend aus frizzled (Fz) und low-density lipoprotein receptor related protein (LRP)-5 oder LRP-6 bindet, führt das zur Inaktivierung des degradation β -catenin complex. Dieser besteht aus der Glycogen synthetase kinase (GSK3 β), dem Tumor Suppressor Adenomatous-polyposis-coli (APC) und dem scaffolding protein Axin. Die Inaktivierung erfolgt über eine Phosphorylierung von GSK3 β . Dadurch bleibt β -catenin stabil und kann in dem Zellkern Gentranskription aktivieren. Dies fördert die Differenzierung von Osteoblasten-Vorläufern und verhindert die Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten. Außerdem werden negative Effekte auf die Osteoklastogenese über eine vermehrte OPG Expression vermittelt. Netto wird die Knochenbildung gefördert und die Knochenresorption gehemmt [15, 81].

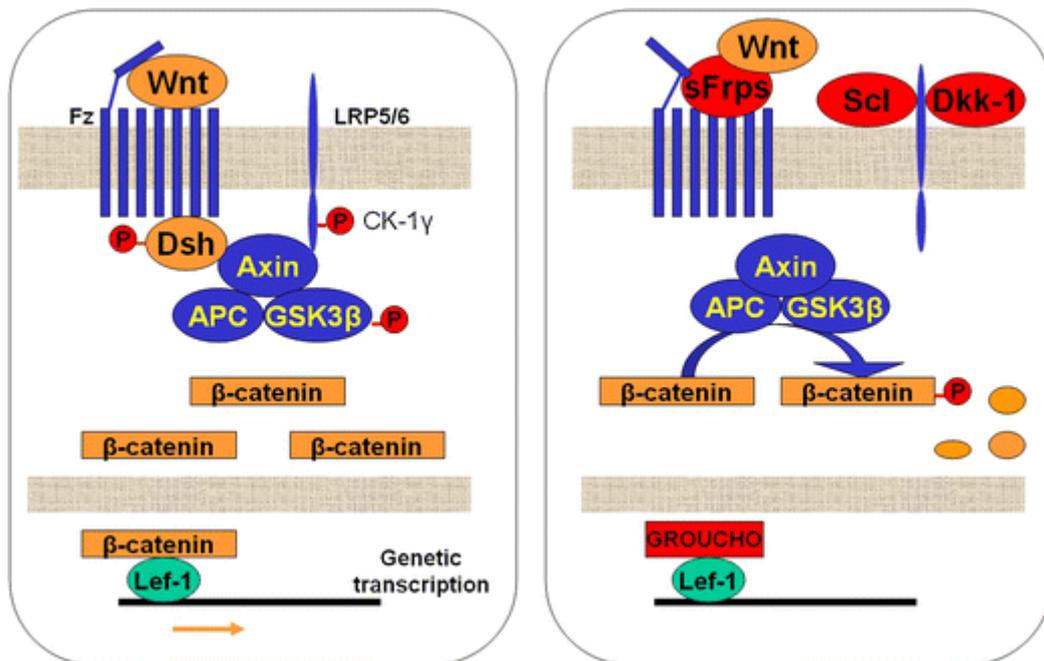


Abb. 6: Der aktive und der gehemmte Canonical WNT/ β -catenin-Signalweg.

Im linken Teil ist zu sehen, wie WNT an den Rezeptorkomplex aus Fz und LRP5 oder LRP6 bindet. Das führt zur Phosphorylierung von GSK3 β und ermöglicht β -catenin in den Zellkern zu gelangen. Dort aktiviert es die Genexpression und führt zur vermehrten Knochenbildung und verminderten Knochenresorption. Auf der rechten Seite binden sFrps, Scl und Dkk-1 an den Transmembranrezeptor. Dies aktiviert den Axin-APC- GSK3 β Komplex, der β -catenin phosphoryliert und dadurch das Passieren in den Zellkern verhindert. Die Folge ist eine verminderte Knochenbildung und eine vermehrte Knochenresorption. APC = Adenomatous polyposis coli, Dkk-1 = Dickkopf-related protein 1, Fz = Frizzeld, GSK3 β = Glykogen synthetase kinase 3 β , LRP5/6 = Low-density lipoprotein receptor related protein 5/6, Scl = Sclerostin, sFrps = Secreted Frizzled-related proteins, WNT = Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site. Aus Guañabens et al. [81].

Es gibt eine Reihe an Inhibitoren für WNT. Zu ihnen zählen SCL, DKK1 und secreted Frizzled-related proteins (sFrps). Sie binden LRP -5 bzw. LRP-6 und inaktivieren den

WNT-Signalweg über eine Aktivierung des Degradation β -catenin complex mit der Folge der Phosphorylierung von β -catenin. Dadurch kann β -catenin nicht mehr in den Zellkern gelangen und die Genexpression wird verhindert [15, 81].

2.5 Regulation des Knochenstoffwechsels

2.5.1 Kalziumphosphathaushalt

Die Konzentrationen von Kalzium und Phosphat beeinflussen sich gegenseitig. Zusammen bilden sie schwer lösliche Salze, die für die Mineralisation des Knochens von essentieller Bedeutung sind. Dadurch bildet der Knochen auch den größten Kalzium- und Phosphat-Speicher des menschlichen Körpers. Ihre Bilanz kann über die enterale Aufnahme und die renale Ausscheidung durch PTH, Kalzitriol und Kalzitonin reguliert und ihre Konzentration im Blut konstant gehalten werden [119].

2.5.1.1 Parathormon

PTH ist ein Peptidhormon, das in der Nebenschilddrüse gebildet wird. Seine Ausschüttung wird von einer niedrigen extrazellulären Kalziumkonzentration gefördert und durch eine hohe extrazelluläre Kalziumkonzentration gehemmt. PTH ist für die schnelle Anhebung des Kalzium-Plasmaspiegel verantwortlich. Es mobilisiert Kalzium aus dem Knochen durch Aktivierung von Osteoklasten und fördert die renale Rückresorption von Kalzium. Da Kalzium jedoch nur gemeinsam mit Phosphat aus dem Knochen freigesetzt werden kann und ein Ausfällen verhindert werden soll, fördert PTH die Phosphatausscheidung über die Niere und führt zu einem sinkenden Phosphat-Plasmaspiegel. Außerdem stimuliert PTH die Bildung von Vitamin D bzw. Kalzitriol, um dem Knochenmasseverlust langfristig entgegenzuwirken [77, 119].

Jedoch ist die Wirkungsweise von PTH komplexer. Denn je nach Dauer und Frequenz des PTH-Einflusses überwiegen anabole oder katabole Effekte. Der katabole Hauptmechanismus von PTH wird über die Zunahme des RANKL/OPG Quotienten über Osteozyten und Osteoblasten ausgelöst. Die anabolen Eigenschaften vermittelt PTH durch die verminderte Ausschüttung von SCL in Osteozyten und eine dadurch mögliche Entkoppelung des WNT-Signalwegs. Durch ein dauerhaft erhöhtes Level an PTH überwiegt der Katabolismus, der mit Symptomen des Hyperparathyreodismus vereinbar

ist. Bei intermittierenden PTH-Spitzen, wie bei der Therapie mit Teriparatid, überwiegen die anabolen Mechanismen [199].

2.5.1.2 Kalzitriol / 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃

1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃ bzw. Kalzitriol ist ein Steroidhormon und die physiologisch wirksame Form. Seine Vorstufe Vitamin D₃ wird über die Nahrung aufgenommen oder in der Haut mit Hilfe von Ultraviolettstrahlung gebildet. Weiter umgewandelt wird es in der Leber und der Niere zu Kalzitriol. Stimuliert wird die Bildung in der Niere durch PTH, Östrogene, Kalzitinin sowie durch niedrige Kalzium- und Phosphatspiegel. Seine Wirkung vermittelt Kalzitriol im Darm und der Niere durch eine Steigerung der Kalzium-Resorption. Durch das Binden von Kalzitriol an den Vitamin-D-Rezeptor (VDR), ein nukleärer Transkriptionsfaktor, wird eine vermehrte Expression der jeweiligen Ionenkanäle induziert [33, 34, 119].

Im Knochen selbst vermittelt Kalzitriol bei ausreichendem Kalziumangebot in unreifen Osteoblasten über den VDR eine vermehrte RANKL Synthese und damit katabole Effekte (Abb. 7). Im Gegensatz dazu führt Kalzitriol in reifen Osteoblasten zu einer verminderten RANKL und zu einer vermehrten OPG und Lipoprotein receptor related protein (LRP)-5 Expression. LRP-5 ist ein co-Rezeptor von Fz und interagiert mit dem WNT-Signalweg. Diese anti-katabolen und anabolen Effekte überwiegen die katabole Wirkung der unreifen Osteoblasten. Zusätzlich wird über den VDR die endokrine Funktion der Knochenzellen über FGF23 reguliert [34].

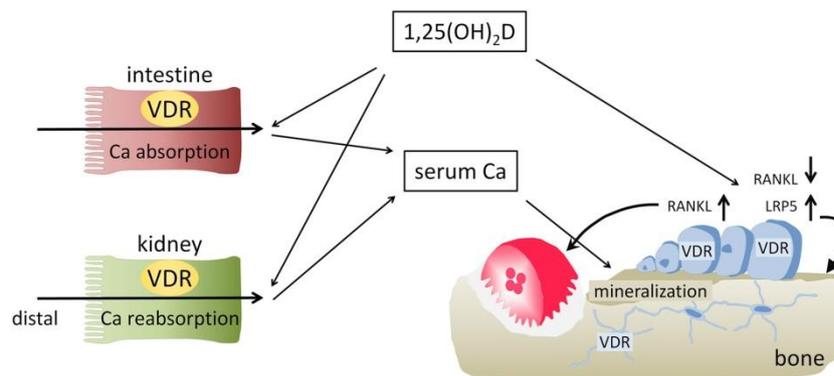


Abb. 7: Wirkung von Kalzitriol unter ausreichender Kalziumaufnahme.

Kalzitriol reguliert über den VDR die intestinale und renale Kalziumabsorption. Im Knochen vermittelt es in reifen Osteoblasten anabole Effekte mit RANKL Abfall und LRP5 Anstieg und in unreifen Osteoblasten katabole Effekte mit vermehrter RANKL Expression. Netto überwiegt die anabole Wirkung und Knochen wird mineralisiert. Es kommt zu einer Zunahme der Knochenmasse. **LRP5** = Low-density lipoprotein receptor related protein, **RANKL** = Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, **VDR** = Vitamin-D-Rezeptor. Aus Carmeliet et al. [34].

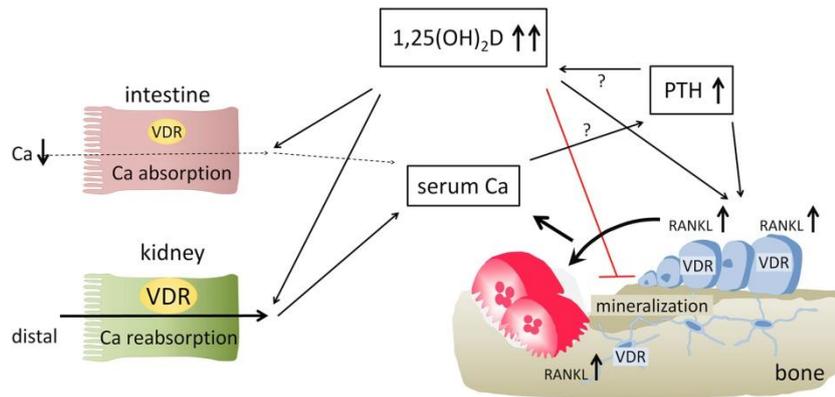


Abb. 8: Kalzitriol-Wirkung bei Kalziummangel.

Bei mangelndem intestinalen Kalziumangebot kann der Serumkalziumspiegel nicht alleine über die intestinale und renale Kalziumresorption konstant gehalten werden. Kalzitriol und PTH vermitteln in diesem Fall eine vermehrte Expression von RANKL. Dies führt zu einer vermehrten Osteoklasten-Aktivität und Kalzium Freisetzung aus dem Knochen. **PTH** = Parathormon, **RANKL** = Receptor activator of nuclear factor-κB ligand. Aus Carmeliet et al.[34].

Bei großem Kalziummangel priorisiert der Körper ein konstantes Serumkalziumlevel über Knochenmasse und -qualität. Dies führt dazu, dass vermittelt durch einen hohen Kalzitriol und PTH-Spiegel Knochen resorbiert wird (Abb. 8). Initialisiert wird das über einen hohen RANKL/OPG Quotient und ein erhöhtes Level an Mineralisationsinhibitoren wie Osteopontin und PPI [34].

Vitamin D-Mangel führt zur Mineralisationsstörung, bezeichnet als Rachitis beim Kind und Osteomalazie beim Erwachsenen [119].

2.5.1.3 Kalzitinin

Kalzitinin ist ein Peptidhormon und wird in den C-Zellen der Schilddrüse gebildet. Es wird bei hohen Kalziumspiegeln vermehrt und bei niedrigen Kalziumspiegeln vermindert ausgeschüttet. Kalzitinin reduziert die Aktivität von Osteoklasten durch das Binden an deren Rezeptor. Dadurch verschiebt sich die Balance zwischen Knochenauf- und -Abbau und es sinkt der Kalzium- und Phosphatspiegel durch die überwiegende Knochenbildung. Zudem stimuliert Kalzitinin die Bildung von Kalzitriol in der Niere [35, 77, 119].

Neue Studien zeigen, dass jedoch nicht nur ein erhöhter Kalzitinin-, sondern auch ein erniedrigter Kalzitinin Spiegel, die Knochenformation fördern [106].

2.5.2 Sexualhormone

Sexualhormone sind Steroidhormone, die in der Nebennierenrinde und im Ovar bzw. Hoden aus Cholesterin gebildet werden. Sie fördern die Ausbildung und Entwicklung der

weiblichen (Östrogene) bzw. männlichen (Androgene) Geschlechtsmerkmale. Ihre Synthese unterliegt der Kontrolle von Adrenocorticotropen Hormon (ACTH) in der Nebennierenrinde und luteinisierendes Hormon (LH) und follikelstimulierendes Hormon (FSH) in den Gonaden [234].

2.5.2.1 Östrogene

Das Leithormon und biologisch aktivste Substanz ist das Östradiol [233]. Die Wirkung der Östrogene im Knochen wird mit antagonistischen Effekten durch den Östrogenrezeptor α (ER α) und den Östrogenrezeptor β vermittelt [107]. Es scheint, dass der Östrogenrezeptor β in der Vermittlung der Östrogenwirkung im Knochen nur eine Nebenrolle spielt [86]. Östrogenrezeptoren wirken nicht nur im Zellkern über die Aktivierung bestimmter Gene [216], sondern regulieren auch außerhalb des Zellkerns Signalwege [85]. Trabekuläre Osteoklasten werden direkt über den ER α in ihrer Resorption gehemmt [139]. Endokortikal gelegene Osteoblasten-Vorläufer wirken durch den ER α ebenfalls in Anwesenheit von Östrogen negativ auf die Resorption [3]. Die hormonelle Wirkung wird aber auch stark durch Faktoren des Umfeldes beeinflusst und wirkt unterschiedlich in Kortikalis und Spongiosa [136]. In Abhängigkeit von der mechanischen Belastung verhilft der ER α erstaunlicherweise auch in Abwesenheit von Östrogen zu periostalen Knochenanlagerungen [1]. Vermittelt wird dies über Osteoblasten-Vorläufer durch Aktivierung des WNT-Signalwegs [12].

2.5.2.2 Androgene

Der wichtigste Vertreter der Androgene ist das Testosteron. In Versuchen an Nagetieren konnte gezeigt werden, dass Androgene über den Androgenrezeptor eine protektive Wirkung auf den trabekulären Knochen haben. Dabei spielen sowohl Osteoklasten als auch Osteoblasten eine Rolle [42, 136].

2.5.3 Glukokortikoide

Die wichtigsten Vertreter der Glukokortikosteroide sind das aktive Kortisol und das inaktive Kortison. Sie werden in der Nebennierenrinde gebildet und können von Leber und Niere ineinander umgewandelt werden. Ihre Ausschüttung wird durch die Hypothalamus-Hypophysen-Achse durch Corticotropin-releasing Hormone (CRH) und

ACTH reguliert. Es unterliegt einer zirkadianen Rhythmik. Stärkster Stimulus für die Kortisol-Ausschüttung ist Stress. Dazu zählen sowohl der physische Stress durch Arbeit oder eine Infektion als auch der psychische Stress [77, 120].

Die Wirkung dient vor allem der Mobilisation von Reserven in Stresssituationen. Es hemmt die Expression des Kalzitriol-Rezeptors und mindert die intestinale Absorption von Kalzium und Phosphat [120]. Zusätzlich fördert es die renale Kalziumausscheidung [77]. Innerhalb physiologischer Glukokortikoidspiegel vermitteln diese im Knochen positive Effekte auf Osteoblasten und die Knochenbildung. Jedoch führt der Glukokortikoidexzess zu einer verminderten Knochenformation durch das Aktivieren von DKK1 und dementsprechend die Hemmung des WNT-Signalwegs, eine anschließende Modulierung der MicroRNA-Expression und schließlich die Induktion der Apoptose in Osteoblasten und Osteozyten. Der Exzess erhöht die Knochenresorption durch erhöhte RANKL-Expression, verminderte OPG-Synthese und Verlängerung der Lebensspanne von Osteoklasten [116, 227].

2.6 Osteoporose

2.6.1 Definition und Diagnostik

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die sich durch eine geringe Knochenmasse und einen mikroarchitektonischen Zerfall des Knochengewebes auszeichnet, was wiederum mit einer Zunahme der Knochenfragilität und der Anfälligkeit für Frakturen einhergeht [45].

Die World Health Organization (WHO) definierte 1994 Diagnosekriterien, nach denen eine Osteoporose vorliegt, wenn die Knochenmineraldichte (Bone mineral density, BMD) um mehr als 2,5 Standardabweichungen im Vergleich zu jungen gesunden Frauen im Alter von 20 - 29 Jahren nach unten abweicht. Eine manifeste Osteoporose liegt vor, wenn zusätzlich noch eine osteoporotische Fraktur stattgefunden hat [235].

Die BMD ist ein Maß für die Knochenmasse pro Volumen (g/cm^3) oder Fläche (g/cm^2) [235]. Die am weitesten verbreitete Methode ist die Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA). Sie beruht auf der Absorption von Röntgenstrahlen und ist deshalb besonders sensitiv für den Kalziumgehalt des Gewebes, aus dem Knochen zu einem großen Teil besteht. Es wird dabei ein zwei-dimensionales Bild erzeugt, das nicht nur von der wirklichen Dichte, sondern auch von der Knochengröße und anderen

Störgrößen beeinflusst wird. Üblicherweise wird die BMD für die Osteoporose-Diagnostik in den Lendenwirbelkörpern (LWK) 1 - 4 oder im proximalen Femur bestimmt.

Die BMD wird meist in Standardabweichungen als T-Score oder Z-Score angegeben (Abb. 9). Der T-Score stellt den Messwert einem Kollektiv von jungen gesunden Individuen (20 - 29 Jahre) gegenüber. Der Z-Score vergleicht den Messwert mit einem Kollektiv gleichen Alters und Geschlechts [53, 88]. Alleine eine geringere BMD ist schon mit einer gesteigerten Mortalität bei Frauen und Männern verbunden [30, 74, 100].

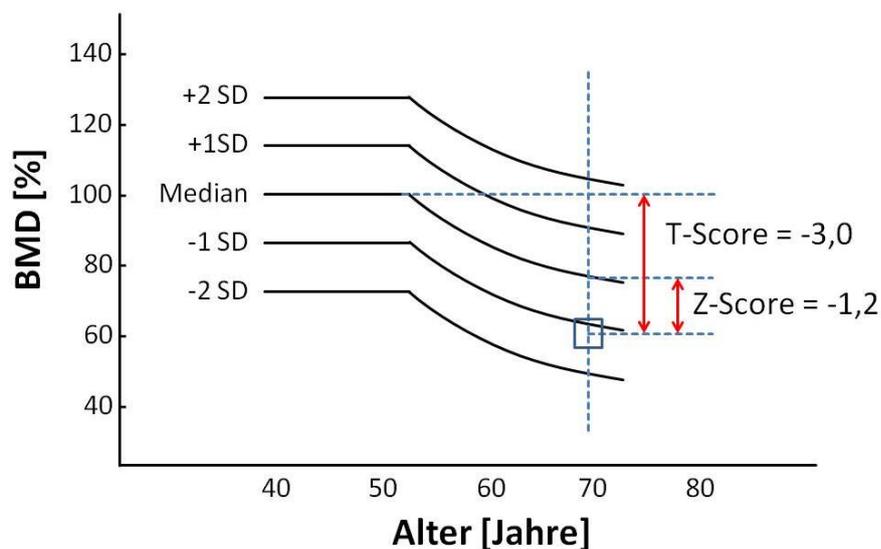


Abb. 9: Gegenüberstellung des T- und Z-Score.

Die Abbildung zeigt die Abnahme der BMD mit dem Alter. Eingezeichnet ist ein Messpunkt einer 70-jährigen Frau. Ihre BMD ist nur 1,2 Standardabweichung unter dem Mittelwert von Gleichaltrigen (Z-Score von -1,2). Vergleicht man ihren Wert jedoch mit dem von jungen gesunden Frauen, so ist sie 3 Standardabweichungen unter deren Mittelwert (T-Score von -3). **BMD** = Bone mineral density. Abbildung modifiziert nach Hernlund et al. [88].

Die klinische Konsequenz einer Osteoporose sind osteoporotische Frakturen bzw. Fragilitätsfrakturen. Als solche werden Knochenbrüche angesehen, die bei einem low energy trauma bzw. Bagatelltraumata entstehen. Verbunden mit einer niedrigen BMD treten diese an der Hüfte, der Wirbelsäule, dem Unter- oder Oberarm bei über 50-Jährigen auf, verbunden mit einer niedrigen BMD [88, 101, 235]. Um das Frakturrisiko eines Patienten abschätzen zu können, eignen sich Werkzeuge, wie beispielsweise das weltweit etablierte Fracture risk assesment tool (FRAX) -Modul, das aus BMD und klinischen Risikofaktoren eine 10-Jahres-Wahrscheinlichkeit einer Fraktur errechnet [105].

Es lassen sich verschiedene Arten der Osteoporose unterscheiden: eine primäre und sekundäre Form. Die primäre Osteoporose wird wiederum in eine postmenopausale bzw. Typ I Osteoporose und eine senile bzw. Typ II Osteoporose aufgeteilt.[80].

2.6.2 Epidemiologie

Die BEST-Studie veröffentlichte eine retrospektive Analyse von 2009 nach der die Osteoporose bei den über 50-Jährigen mit einer Prävalenz von 14 % in Deutschland auftritt. Jedoch wurde eine deutliche Häufung bei den Frauen (24 %) im Vergleich zu den Männern (6 %) gefunden. Des Weiteren ging hervor, dass pro Jahr 885 000 Personen in Deutschland an Osteoporose erkrankten [82].

In der EPOS-Studie wurde ein Anstieg an Erkrankten im höheren Lebensalter beschrieben. Sie postulierte eine Prävalenz der Osteoporose bei Frauen zwischen 50 und 60 Jahren von 15 %, die bei Frauen über 70 Jahre auf 45 % anstieg. Für Männer stieg sie von 2,4 % im Alter von 50 bis 60 Jahren auf 17 % für über 70 Jährige [183].

Das zu verhindernde Ereignis ist eine Fraktur, da sie mit einem Verlust an Lebensqualität und einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergeht [91, 138]. Jedoch traten in der BEST-Studie innerhalb des Beobachtungszeitraum von vier Jahren bei 52 % der Patienten mit Osteoporose mindestens eine osteoporotische Fraktur auf [82].

Weltweit kam es im Jahr 2000 zu neun Millionen osteoporotischen Frakturen, davon 1,6 Millionen der Hüfte, 1,7 Millionen des Unterarms und 1,4 Millionen klinisch auffällige Wirbelkörper-Frakturen [102]. Aus der Datenerhebung der International Osteoporosis Foundation und der European Federation of Pharmaceutical Industry and Associations von 2010 ging hervor, dass es zu 3,5 Millionen Instabilitätsfrakturen in der Europäischen Union mit Kosten von 37 Milliarden Euro kam. 66 % der Kosten fielen auf die Akutversorgung, 29 % auf die Langzeitpflege und nur 5 % auf die medikamentöse Prävention. Es wird erwartet, dass die Ausgaben bis zum Jahr 2025 um 25 % zunehmen [88].

Im Jahr 2009 wurden in deutschen Krankenhäusern 860 Millionen Euro für die Versorgung osteoporotischer Frakturen ausgegeben, das sind 36 % der Kosten aller Frakturversorgungen. Den größten Teil dieser Kosten machte die Versorgung der Hüftfrakturen aus [23].

Nach einer Simulation mit Daten aus dem Jahr 2010 sollen im Jahr 2050 die direkten Kosten von 898 Millionen Euro auf 4,7 Milliarden Euro steigen [24].

2.6.3 Primäre Osteoporose

Mit ca. 95 % ist die primäre Osteoporose die häufigste Form der Erkrankung [77]. Sie lässt sich weiter in drei Typen aufteilen: in die postmenopausale Osteoporose bzw. Typ I, in die senile Osteoporose bzw. Typ II und die idiopathische Osteoporose [80].

Ein mit dem Altern stattfindender Knochenmasseverlust führt zu Veränderungen der knöchernen Mikroarchitektur und einer Zunahme an Frakturen. In der Entstehung und dem Voranschreiten der Osteoporose spielen die Sexualhormone, vor allem Östrogen und Testosteron, bei Männern und Frauen eine wesentliche Rolle [170].

Die maximale Knochenmasse wird im Alter von 16 - 25 Jahren erreicht. Von da an nimmt sie bei Männern um 0,3 % und bei Frauen um 0,5 % pro Jahr ab (Abb. 10) [27].

Nach der Menopause kommt eine 5 - 10 Jahre andauernde Phase großen Knochenverlustes (high turnover) mit einer Abnahme von 20 - 30 % des trabekulären- und 5 - 10 % des kortikalen Knochens. Dieser folgt eine zweite Phase mit langsamen, aber bis zum Lebensende anhaltenden Knochenschwund (low turnover) [110].

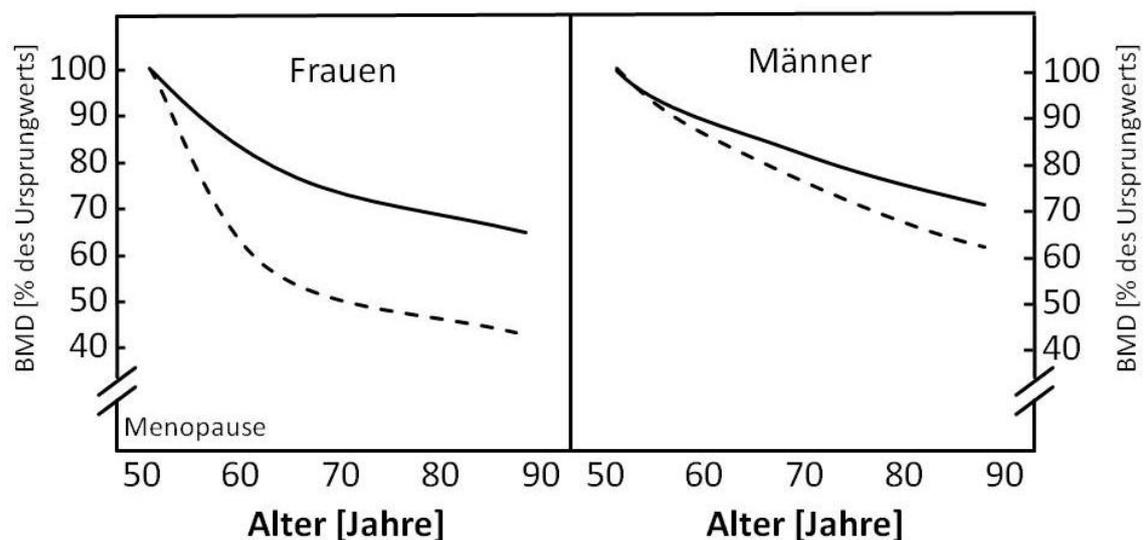


Abb. 10: Altersabhängiger Knochenverlust bei Männern und Frauen.

Die Abbildung zeigt DXA-Messungen mehrerer Querschnitts- und Longitudinalstudien. Sie verdeutlicht die geringere BMD der postmenopausalen Frau im Vergleich zum gleichaltrigen Mann. Durchgezogene Linie = kortikaler Knochen, gestrichelte Linie = trabekulärer Knochen. **BMD** = Bone mineral density, **DXA** = Dual Energy X-ray Absorptiometry. Abbildung modifiziert nach Khosla et al. [110].

Mit der Menopause fallen die Serumspiegel der Östrogene massiv ab und die Balance des Knochenmetabolismus gerät aus dem Gleichgewicht [60, 108]. Die BMU wird vermehrt mit einer verlängerten Resorptionsphase und einer verkürzten Bildungsphase aktiviert. Daraus resultiert ein um 90 % gesteigerter Knochenabbau und ein um nur 45 %

gesteigerter Aufbau [60, 75, 96, 135]. Es kommt zu einem vermehrten Freisetzen von Kalzium aus dem Knochen, das wiederum Kompensationsmechanismen aktiviert. Die Kalzium Clearance der Nieren steigt [54], die intestinale Kalziumaufnahme sinkt [76] und die PTH-Ausschüttung wird gehemmt [169]. Zusammengefasst resultiert eine negative Kalziumbilanz des Körpers mit Knochenmasseverlust [60].

Auch wenn Testosteron und Östrogen ein antiresorptives Potenzial besitzen, so konnte bei älteren Männern nachgewiesen werden, dass auch bei ihnen Östrogen den größeren Einfluss auf den Knochenstoffwechsel hat [70].

Die Ursache für die Entstehung einer senilen Osteoporose ist multifaktoriell. Neben dem Schwund im Alter spielt auch der diätische Kalziummangel eine große Rolle. Es kann einerseits an einem verminderten Appetit im Alter, der zu einer geringeren Aufnahme an Nahrungsmitteln und damit Kalzium führt, andererseits an Altersarmut liegen, die eine unausgeglichene Ernährung zur Folge hat. Kalziummangel kann aber auch durch einen Mangel an Vitamin D, sei es durch wenig Sonnenlicht, Mangelernährung oder durch eine Niereninsuffizienz, verstärkt werden. Inaktivität im Alter führt aber ebenfalls zu einem Verlust an Knochenmasse. Sollte die Inaktivität beispielsweise durch den Schmerz einer Wirbelkörperfraktur ausgelöst sein, so entsteht eine gefährliche Abwärtsspirale. Aber auch der Östrogenmangel im Alter ist wie bei der postmenopausalen Osteoporose ein verstärkender Faktor, wenn auch nicht der Hauptauslöser [27, 64, 124, 180, 211].

2.6.4 Sekundäre Osteoporose

Die sekundäre Osteoporose wird unscharf definiert als niedrige BMD oder erhöhte Frakturgefahr aus anderen Gründen als Alterung und postmenopausalem Status [69].

Die Liste an möglichen Gründen ist lang und umfasst Hypogonadismus, Medikation, Hyperthyreoidismus, Vitamin D-Mangel, primären Hyperparathyreoidismus, Organtransplantation, gastrointestinale Erkrankungen, hämatologische Erkrankungen, Cushing-Syndrom und idiopathische Hyperkalziurie [95].

Die Glukokortikoid-induzierte Osteoporose ist die häufigste sekundäre und dadurch auch iatrogene Form der Erkrankung [32, 230]. Im ersten Jahr verlieren Erkrankte 6 - 12 % an BMD und in jedem Folgejahr ca. 3 % [130]. Doch schon während der ersten drei Monate einer Glukokortikoid-Behandlung nimmt die Knochenqualität ab und das Frakturrisiko steigt, ohne dass dies durch einen Abfall der BMD in der Densitometrie (DXA) erkennbar ist [9, 193, 229]. Die Glukokortikoid-induzierte Osteoporose betrifft den kortikalen und

den spongiösen Knochen. Jedoch gibt es eine Prädilektion für Frakturen in Regionen mit viel spongiösen Knochen wie den lumbalen Wirbelkörpern [208]. Die Prävalenz für Frakturen bei Patienten mit dauerhafter Glukokortikoid-Einnahme liegt bei 30 - 50 %, wovon viele asymptomatisch sind [9, 178]. Neben den Frakturen sind Glukokortikoide die häufigste Ursache für nicht traumatische Osteonekrosen [134].

Der schädliche Effekt der Glukokortikoide auf den Knochen wird über eine verminderte Osteoblasto- und Osteoklastogenese, über eine vermehrte Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten und über eine verlängerte Lebensspanne von Osteoklasten vermittelt. Daraus resultiert nicht nur die vorherig beschriebene Abnahme der Knochenmasse, mit verminderter Trabekeldicke und -fläche, sondern ebenfalls ein verminderter Knochen-Turnover [51, 99, 231].

2.6.5 Frakturprophylaxe und Osteoporosetherapie

Da die BMD mit dem Alter abnimmt und eine osteoporotische Fraktur die Lebensqualität einschränkt und die Morbidität und Mortalität erhöht, gilt es eine gute Prophylaxe zu betreiben [113, 132, 142].

Die Osteoporose- und Frakturprophylaxe lässt sich in drei Säulen einteilen:

Zur ersten Säule "Aktivität und Stürze" gehören die Vermeidung von Immobilisation, die Förderung von Muskelkraft und Koordination und eine Risikoevaluation und Risikobeseitigung bei hohem Sturzrisiko. Zur zweiten Säule "Ernährung und Lebensstil" gehören Nikotinverzicht, Vermeidung von Untergewicht (Body-Mass-Index < 20 kg/m²) und bei mangelnder Zufuhr (1000 mg Kalzium als tägliche Gesamtzufuhr) bzw. geringer Sonnenlichtexposition (800 - 1000 IE Vitamin D₃ täglich oral) eine Supplementierung von Kalzium oder Vitamin D. In der dritten Säule "Medikamente überprüfen" soll eine Risiko-Nutzen-Abwägung Fraktur-begünstigender Medikamente wie Glukokortikoide, Antiepileptika, Antidepressiva, Glitazone, Neuroleptika, Protonenpumpeninhibitoren, sedierende Medikamente, Orthostase auslösende Medikamente und Thyroxin stattfinden [46].

Eine Basisdiagnostik sollte angestrebt werden, wenn das geschätzte 10-Jahres-Frakturrisiko 20 % übersteigt. Diese besteht aus Anamnese, klinischer Untersuchung, Osteodensitometrie, Laboruntersuchung und ggf. Röntgen oder anderer bildgebender Diagnostik [46].

Eine spezifische medikamentöse Therapie sollte eingeleitet werden, wenn das auf der Basis des Dachverband Osteologie-Score geschätzte 10-Jahres-Frakturrisiko von Schenkelhals oder Wirbelkörper größer als 30 % ist (Tab. 1). Außerdem wird ab einem T-Score < -2,0 in Kombination mit einer niedrig-traumatischen proximalen Femurfraktur, einer Schenkelhalsfraktur oder einer Fraktur der Lendenwirbelsäule eine medikamentöse Therapie eingeleitet. Die dritte Hauptindikation ist eine über drei Monate geplante oder erfolgte Hochdosis Glukokortikoid-Therapie (oral $\geq 7,5$ mg Prednisolonäquivalent), sowie die Therapie in Kombination mit multiplen Frakturen oder BMD < -1,5 [46].

Lebensalter [Jahre]		T-Score (Nur anwendbar auf DXA-Werte)				
Frau	Mann	-2,0 bis -2,5	-2,5 bis -3,0	-3,0 bis -3,5	-3,5 bis -4,0	< -4,0
50 - 60	60 - 70	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja
60 - 65	70 - 75	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja
65 - 70	75 - 80	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja
70 - 75	80 - 85	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
> 75	> 85	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

Tab. 1: Therapieentscheidung in Abhängigkeit der DXA-Werte.

Die Abbildung gibt wieder in welchem Alter, Geschlecht und DXA-Wert ein 10-Jahres Frakturrisiko von über 30 % angenommen werden kann. DXA = Dual Energy X-ray Absorptiometry. Abbildung modifiziert nach DVO Leitlinie 2017 [46].

Je nach Fraktur, Geschlecht und Osteoporoseform ist eine sichere Senkung des Frakturrisikos für Bisphosphonate, selektive ER-Modulatoren, Östrogene, Denosumab und rekombinantes PTH belegt [46]. Es lassen sich bei den Medikamenten zwei Funktionsweisen unterscheiden: eine antiresorptive und eine osteoanabole Therapie. Bei den zuvor genannten Wirkstoffgruppen ist nur das rekombinante PTH den osteoanabolen Substanzen zuzuordnen [77].

Bisphosphonate (Alendronat, Risedronat, Ibandronat und Zoledronat) sind Mittel der ersten Wahl und die am häufigsten verschriebenen Medikamente gegen Osteoporose [58]. Bei der Mineralisation des Knochens binden sie an HA und werden in Regionen mit besonders hohem turnover in den Knochen eingebaut. Bei Abbau des Knochens durch Osteoklasten fördern sie deren Apoptose und hemmen dadurch die Resorption [175]. Außerdem verhindern sie die Apoptose von Osteozyten und Osteoblasten [161]. Ihre mittlere Halbwertszeit im Knochen beträgt mehr als 10 Jahre [79].

Selektive ER-Modulatoren (Bazedoxifen und Raloxifen) sind synthetische, nicht steroidale Mittel, die eine agonistische und antagonistische Wirkung von Östrogen in

unterschiedlichen Geweben vermitteln. Sie sollen die Effekte des postmenopausalen Hormonmangels auf den Knochen vermindern [160].

Die Gabe von Östrogenen unterliegt aufgrund des erhöhten Risikos von Herzinfarkt, Schlaganfall, tiefe Beinvenenthrombose und Brustkrebs einer strengen Indikation. Östrogene besitzen eine antiresorptive und frakturrisikosenkende Wirkung [77].

Denosumab ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper, der an RANKL bindet und dadurch die Osteoklasten-Proliferation und -Aktivität hemmt, wodurch die Knochenresorption vermindert wird [191].

Teriparatid ist ein rekombinantes PTH und vermittelt eine Knochenformation und -resorption je nach Gabe. Bei durchgehender Gabe und dadurch dauerhaft erhöhten Serumspiegeln überwiegt die Resorption. Jedoch überwiegt bei intermittierender Gabe die Formation und es kommt zum Zuwachs an Knochenmasse [31, 92].

3 Studiendesign und Hypothese

3.1 Studiendesign

Bei der im folgenden vorgestellten Arbeit handelt es sich um eine randomisierte kontrollierte Studie am Schaf, in der die Behandlungen stufenweise gesteigert wurden.

Die 32 Merinolandschafe wurden kontrolliert und randomisiert in vier unterschiedliche Behandlungsgruppen eingeteilt (Abb. 11). Die erste Behandlungsgruppe, die Kontrolle (n = 8), erhielt eine Standarddiät. Die zweite Gruppe (OVX, n = 8) bekam neben der Standarddiät die Eierstöcke beidseits entfernt (bilaterale Ovariectomie). Gruppe drei (OVXD, n = 8) unterzog sich einer bilateralen Ovariectomie und einer Vitamin D- und kalziumarmen Diät. Die vierte Behandlungsgruppe (OVXDS, n = 8) erhielt neben den Maßnahmen von OVXD zusätzlich alle zwei Wochen Steroide injiziert.

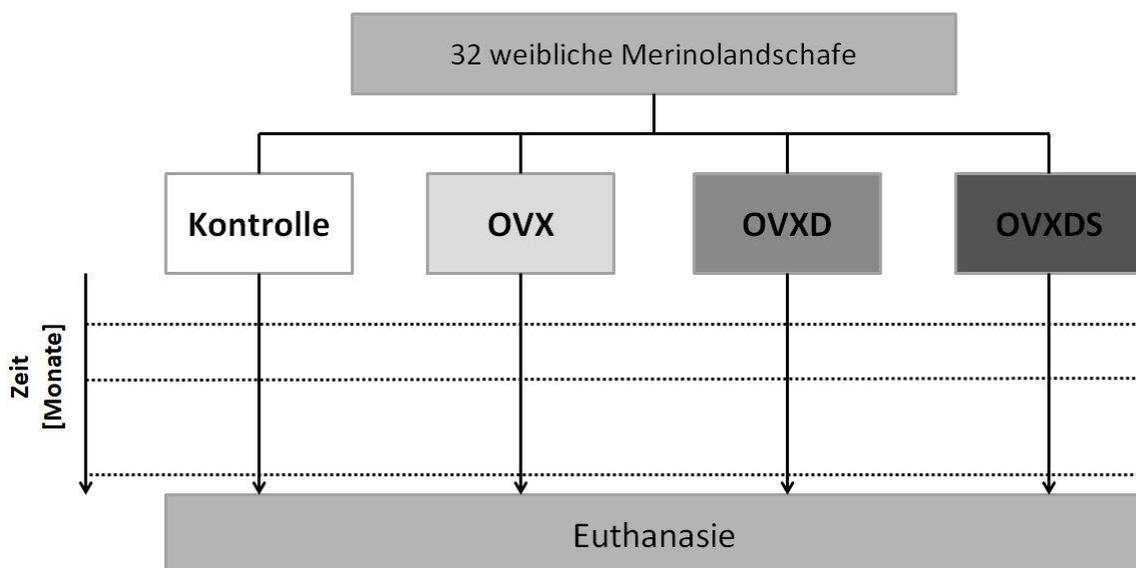


Abb. 11: Studiendesign zur Osteoporoseinduktion bei Schafen.

Die Versuchstiere wurden kontrolliert und randomisiert auf 4 Gruppen aufgeteilt. Die Behandlungen wurden stufenweise von der Kontrolle, zur Ovariectomie (OVX), zur speziellen Mangel diät (OVXD) und zu Steroidinjektionen (OVXDS) gesteigert. Somit unterzog sich die OVXD-Gruppe neben der Diät ebenfalls einer Ovariectomie und die OVXDS-Gruppe neben den Steroidinjektionen ebenfalls der Diät und der Ovariectomie. Zu den Zeitpunkten 0M, 3M und 8M wurden jeweils DXA-Messungen durchgeführt und Beckenkammbiopsien entnommen. Nach der Euthanasie wurden Femur-Kopf und LWK entnommen.

Aufgrund der Schwangerschaft (Gravidität) eines Schafes wurde dieses aus der Studie ausgeschlossen. Der Versuch lief von Ende Oktober 2012 bis Anfang Juli 2013. Dabei wurde nach der Ovariectomie zum Zeitpunkt von 0 Monaten (M), sowie nach 3M und nach 8M Knochenstanzen aus dem Beckenkamm entnommen und DXA-Messungen

durchgeführt. Zur Gewinnung von Proben der Lendenwirbelkörper (LWK) und des distalen Femurs wurden die Schafe nach 8M einer Euthanasie unterzogen.

3.2 Hypothesen und Zielsetzung

Die Osteoporose ist eine systemische Erkrankung, die sich durch eine verminderte Knochenstabilität mit erhöhter Frakturgefährdung auszeichnet. Ihre klinische Diagnose gelingt über die radiologische Messung (DXA oder quantitative Computertomographie) der Knochendichte. Sie zeichnet sich durch Frakturen bei minimalen Traumata aus. Ihre Genese wird als multifaktoriell beschrieben. Zu den bekannten Triggern gehören ein postmenopausaler Östrogenmangel, eine Langzeit-Glukokortikoid-Einnahme, sowie ein Vitamin D- und Kalziummangel. Ihre operative Versorgung gestaltet sich aufgrund einer hohen Rate an Lockerung der Osteosynthese und Pseudarthrosenbildung als erschwert. Zur Entwicklung, Untersuchung und Testung neuer Knochenersatzstoffe und Implantat-Materialien bedarf es eines etablierten Klein-, als auch Großtiermodells. Das Schaf eignet sich dabei aufgrund seiner dem Menschen ähnlichen Knochenstruktur, hormonellen Zyklus, sowie deren günstigen Verfügbarkeit und Unterbringung besonders gut.

In dieser experimentellen Studie wurde eine Stufentherapie zur Osteoporose-induktion bei Merinolandschafen durchgeführt. Es wurde untersucht, welchen Auslöser eine bilaterale Ovariectomie mit Herbeiführen eines Östrogenmangels auf die Knochenarchitektur und Mineralisation innerhalb eines Zeitraums von 8 Monaten hat.

In einer zweiten Behandlungsgruppe wurde den Schafen additiv eine kalzium- und Vitamin D-arme Diät zugeführt.

Die dritte Behandlungsgruppe erfuhr zu den bereits genannten Maßnahmen regelmäßige Glukokortikoidinjektionen. Neben der beim Menschen etablierten DXA-Messung wurde die Knochenqualität bzw. Mikroarchitektur histomorphometrisch ausgewertet.

Die Schwerpunkte der folgenden Arbeit liegen auf der histologischen Analyse der Knochenmineralisation, den regionalen Unterschieden und der Automatisierung der Auswertung.

Nachfolgend aufgelistete Hypothesen sollen überprüft werden:

- Eine bilaterale Ovariectomie führt innerhalb von acht Monaten zu keiner signifikanten Knochendestruktion beim Schaf.
- Durch einen Östrogenmangel, eine Mangeldiät und Steroidinjektionen lässt sich ein osteoporotischer Knochenstatus mit verminderter BMD und trabekuläre Destruktion innerhalb von 8 Monaten induzieren.
- Der durch die Dreifachtherapie induzierte osteoporotische Knochenstatus geht mit einem Mineralisationsdefekt einher, welcher durch eine geringere Mineralisationsrate und durch mehr Osteoid-Ablagerungen messbar ist.

Ziel dieser Arbeit ist es, neue Erkenntnisse über die Knochenmineralisation in einem osteoporotischen Schafmodell zu gewinnen. Mit Hilfe detaillierter Beschreibungen und eines erweiterten Verständnisses der Osteoporoseinduktion bei Schafen soll diese Studie dazu beitragen, neue Implantate und Knochenersatzmaterialien entwickeln, testen und verbessern zu können.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Die Versuche an den 32 weibliche Merinolandschafen, welche mit einem Durchschnittsalter von 5,5 Jahren von einem Schäfer aus der Nähe von Wiesbaden bezogen wurden, wurden in der zentralen Forschungseinrichtung der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main durchgeführt. Die Genehmigung gemäß § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes wurde durch das Regierungspräsidium Darmstadt am 27.09.2012 ausgestellt (Tierversuchsantrag Gen. Nr. F 31/36).

4.2 Tierhaltung und Diät

Die Standarddiät der Kontroll- und OVX-Gruppe begann zwei Wochen nach der Ovariectomie und enthielt neben dem Gras auf der Weide in den Wintermonaten Ergänzungsfutter (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Die Schafe der OVXD- und OVXDS-Gruppe wurden in Außenboxen der zentralen Forschungseinrichtung der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main gehalten. Sie wurden mit kalzium- und Vitamin D-reduziertem Spezialfutter (Nummer S6189-S010, SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) ernährt. Die Futtermenge beider Diäten war ausreichend für ausgewachsene Schafe und enthielten den gleichen Energiegehalt. Wasser stand den Versuchstieren frei zur Verfügung.

Über den gesamten Studienzeitraum wurden die Schafe von Tierärzten und -pflegern betreut. Zusätzlich zu den regelmäßigen Kontrollen erhielten die Versuchstiere eine prophylaktische Entwurmungskur mit 0,2 ml/kg Febantel (Rintal 2,5 % ad us. vet., Bayer AG, Leverkusen, Deutschland).

4.3 Steroidinjektionen

Alle zwei Wochen wurde den Schafen der OVXDS-Gruppe jeweils 320 mg Methylprednisolon (Depot-Medrate[®] ad us. vet. 40 mg/ml Injektionslösung, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) abwechselnd in die vordere oder hintere Extremität intramuskulär gespritzt.

4.4 Operationen

4.4.1 Vorbereitung

Zu den Zeitpunkten 0M, 3M und 8M wurden alle Schafe vor der Beckenkammstanzen-Entnahme und die Tiere der Gruppen OVX, OVXD und OVXDS vor der zusätzlich stattfindenden Ovariectomie nach 0M, in die zentrale Forschungseinrichtung nach Frankfurt gebracht und für 12 Stunden in Einzelboxen einer Nahrungskarenz unterzogen. Zur Prämedikation erhielten die Tiere 0,3 mg/kg Midazolam (Midazolam Rotexmedica 5 mg/ml, ROTEXMEDICA GmbH, Trittau, Deutschland), 1 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Ketavet[®] 10 mg/ml, Bela-Pharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland), 0,01 mg/kg Atropin (Atropinsulfat 0,5 mg/ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und 0,01 ml/kg Xylazin (Rompun[®] 2 %, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland). Nach Eintreten einer ausreichenden Wirkung der Prämedikation wurden die Tiere gewogen. Es folgte die Vorbereitung im Operationsfeld mit Rasur, Enthaarungscreme (Pilca Enthaarungscreme, DMV Diedrichs Markenvertrieb GmbH & Co. KG, Bad Pyrmont, Deutschland) und Sterilium[®] (BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland).

Vor jedem Eingriff wurde den Tieren zur Analgesie subkutan 0,01 mg/kg Buprenorphinhydrochlorid (TEMGESIC[®] Ampullen 0,3 mg, RB Pharmaceuticals GmbH, Mannheim, Deutschland) und zur Antibiotikaphylaxe intramuskulär 0,1 ml/kg Penicillin (Veracin[®] RS, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) injiziert.

4.4.2 Narkose

Die Narkose wurde in totaler intravenöser Anästhesie durchgeführt. Nach 0M und 3M wurde den Schafen ein peripherer Venenzugang (Vasofix[®] 17G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und nach 8M ein zentraler Venenkatheter (einlumiger ZVK, 14G, Arrow GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) gelegt. Die Narkoseeinleitung erfolgte intravenös mit 2 mg/kg Propofol (Propofol 2 %, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) und mit 2 µg/kg Fentanyl (Fentanyl-Hameln 50 µg/ml, hameln pharma plus GmbH, Hameln, Deutschland). Es erfolgte die Intubation. Im weiteren Verlauf wurde die Narkose über einen Propofol-Dauerperfusor mit einer Laufrate von 50 ml/h aufrechterhalten.

4.4.3 Dual Energy X-ray Absorptiometry Messung (DXA)

Zur Messung der BMD wurde von Mitarbeitern der experimentellen Unfallchirurgie zu den Zeitpunkten 0M, 3M und 8M vor der Ovariectomie bzw. vor den Beckenkammbiopsien die DXA-Messung angewandt. Die Messungen wurden an der zentralen Forschungseinrichtung in Frankfurt durchgeführt und erfolgten nach der in Kapitel 4.4.1 beschriebenen Prämedikation und der in Kapitel 4.4.2 erläuterten Intubationsnarkose. Für die Untersuchung wurden die Schafe in Bauchlage gebracht und an ihren Extremitäten fixiert (Abb. 12). Mit dem DXA-Gerät (Lunar Prodigy, GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland) wurden Rohdaten ermittelt, aus denen mit Hilfe der zugehörigen Software (enCORE Software Version 13.40, GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland) innerhalb einer gezeichneten Region of Interest (ROI) die BMD [g/cm^2] bestimmt wurde. Im Ergebnissteil werden die Daten der LWK und der Femura vorgestellt.



Abb. 12: DXA-Scan eines Schafs.

Die DXA-Messung wurden in Bauchlage und Intubationsnarkose durchgeführt. Die Extremitäten waren dabei mit Mullbinden fixiert.

4.4.4 Bilaterale Ovariectomie

Für die bilaterale Ovariectomie wurden die Tiere in Rückenlage gebracht und die Extremitäten mit Mullbinden fixiert. Die Desinfektion des Abdomens wurde mit

Braunol[®] (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) durchgeführt und im Anschluss steril abgedeckt. Der Zugang verlief über einen ca. 15 cm langen längsverlaufenden Schnitt bis auf die Linea alba. Es folgte die Eröffnung der Linea alba und des Peritoneums per Stichinzision und Erweiterung zur besseren Darstellbarkeit von Uterus, Tuben und Ovarien (Abb. 13A). Im Anschluss an die Mobilisation dieser Strukturen wurde die Ligatur der Ovarialgefäße mit resorbierbaren Nahtmaterial (Vicryl 4-0, Ethicon Johnson und Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) und das Absetzen der Ovarien durchgeführt (Abb. 13B). Die Bauchhöhle wurde noch vor der Adaptation und dem Verschluss der Muskel- und Hautschichten auf Blutungen überprüft (Abb. 13C).

4.4.5 Entnahme der Beckenkammstanzen

Die Entnahme der Beckenkammstanzen wurde nach 0M im Anschluss an die Ovariectomie aus dem linken Beckenkamm durchgeführt. Nach 3M wurden die Stanzen aus dem rechten Beckenkamm und nach 8M wieder aus dem linken Beckenkamm entnommen. Dazu wurden die Tiere jeweils in Rechts- bzw. in Linksseitenlage gelagert. Die Desinfektion und das Abdecken des Operationsgebiets erfolgten wie bei der Ovariectomie. Die Präparation durch die Haut und das subkutane Fettgewebe erfolgte über einen ca. 5 cm langen Schnitt bis auf die Crista iliaca bzw. die Spina iliaca anterior superior. Die Stanzen wurden mit Hilfe eines Bohrers (Durchmesser: 7,5 mm, Länge: 20 mm) aus der Crista iliaca leicht dorsal der Spina iliaca anterior superior gewonnen (Abb. 13 D-F). Zuletzt wurde die Operationswunde durch eine Sub- und Intrakutannaht verschlossen.

Durch die Entnahme der Beckenkammstanzen wurde es möglich, Zwischendaten bzw. Verlaufsparemeter zu bestimmen. Das reduzierte nicht nur dem 3R Prinzip folgend drastisch die Versuchstieranzahl, sondern verbessert auch die Qualität der Ergebnisse, da die Messwerte aller Zeitpunkte aus denselben Versuchstieren stammen.

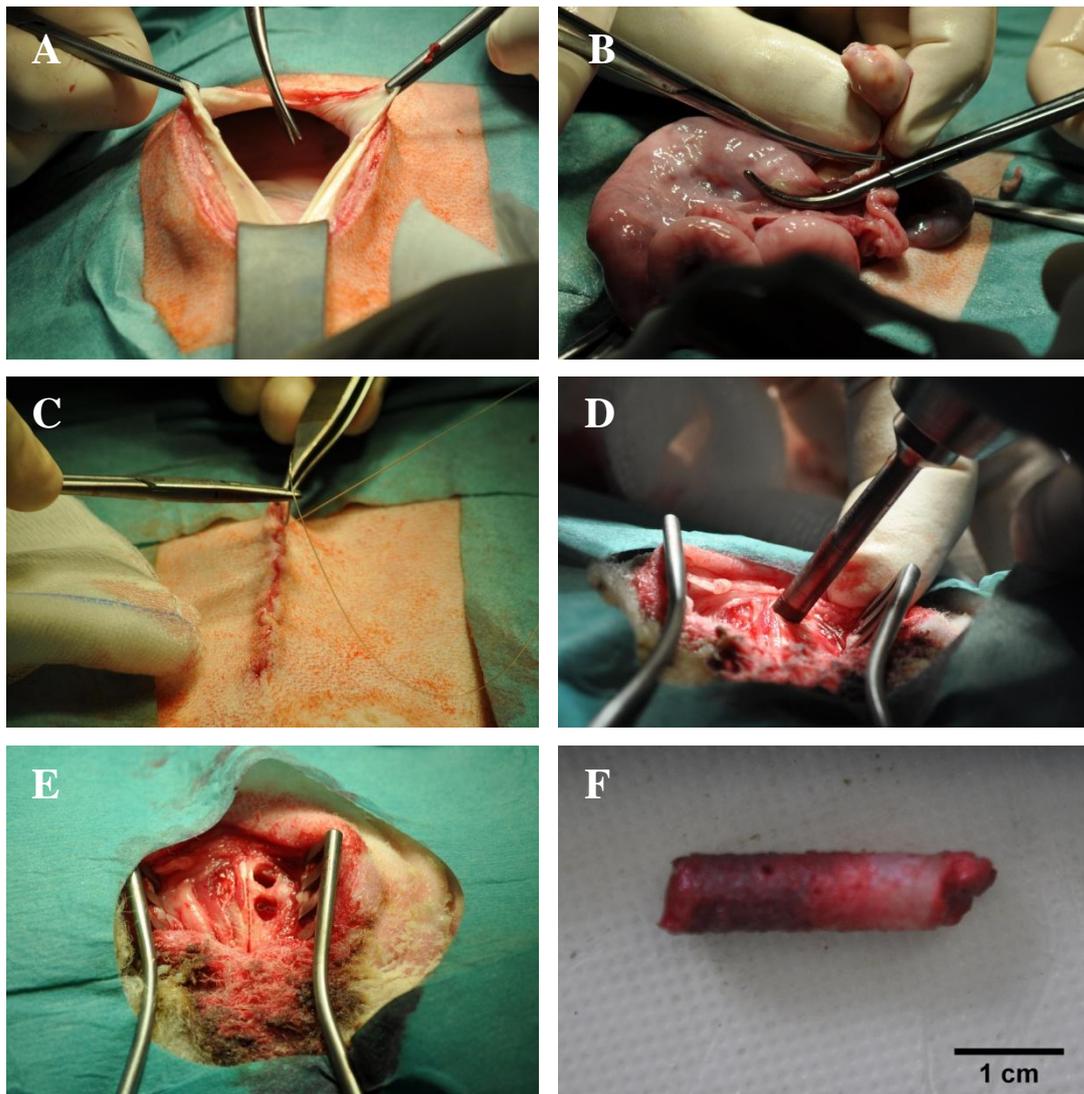


Abb. 13: Ovariectomie und Beckenkammbiopsie.

Die Abbildungen (A) - (C) wurden während der Ovariectomie aufgenommen. In den Bildern (D) - (F) ist die Entnahme der Beckenkammstanze dargestellt.

(A) Über einen ca. 15 cm langen Hautschnitt wurde die Linea alba und das Peritoneum parietale eröffnet.

(B) Uterus, Tuba und Ovar wurden mobilisiert und es erfolgt die Ligatur eines Ovars.

(C) Nach der bilateralen Ovariectomie erfolgt der mehrschichtige Wundverschluss zuletzt mittels Intrakutannaht.

(D) Nach der Präparation bis auf den Beckenkamm erfolgt die Entnahme der Stanzen mit einem Hohlfräsen-Bohrer.

(E) Hier zeigen sich zwei Bohrlochdefekte nach Entnahme von Beckenkammstanzen.

(F) Abgebildet ist eine entnommene Beckenkammstanze mit ihren Anteilen aus (von links nach rechts) Spongiosa, Kortikalis und den aufgelagerten Muskel- bzw. Periostresten.

4.4.6 Postoperative Nachsorge

Bis zum Wiedererlangen der Spontanatmung wurden die Schafe im Operationssaal überwacht. Erst bei vollständigem Bewusstsein wurden sie aus ihren Einzelboxen wieder auf die Weide bzw. in ihre Ställe gelassen. Die Wundheilung und der Allgemeinzustand

wurden zwei Wochen lang täglich durch Veterinärmediziner/-innen und -pfleger/-innen überprüft.

Die postoperative Antibiotikaphylaxe mit 0,1 ml/kg Penicillin (Veracin[®] RS, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) wurde dreimal im Abstand von zwei Tagen intramuskulär injiziert. Die Schmerzen wurden durch tägliche Gaben von 0,5 mg/kg Meloxicam (Metacam[®] 20 mg/ml ad. us. vet., Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland) intramuskulär und zweimal täglich 0,01 mg/kg Buprenorphinhydrochlorid (TEMGESIC[®] Ampullen 0,3 mg RB Pharmaceuticals GmbH, Mannheim, Deutschland) subkutan gelindert. Die Schmerztherapie wurde von dem Tierarzt bzw. der Tierärztin bedarfsgerecht ausgeschlichen.

4.4.7 Euthanasie und Biopsieentnahme

Die Euthanasie wurde unter Narkose im Anschluss an die Beckenkammstanzen-Entnahme durchgeführt. Sie erfolgte durch die intravenöse Gabe von 50 mg/kg Pentobarbital (Anestestal[®], Pfizer, Mexiko-Stadt, Mexiko).

Nach dem Feststellen des Todes durch den Tierarzt bzw. die Tierärztin wurden die Femora und die LWK 2 bis 5 entnommen. Für die histologische Weiterverarbeitung wurden aus den Wirbelkörpern eine transversale und aus den Femurköpfen eine koronare Scheibe herausgesägt. Die weiterführenden histologischen Aufbereitungen erfolgten in der experimentellen Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

4.5 Anfertigung von Knochenschnitten und -schliffen

Für die histologische Untersuchung des Knochenmetabolismus wurden aus den Beckenkammstanzen Paraffinschnitte und Polymethylmethacrylat (PMMA)-Schnitte und aus den Lendenwirbelkörpern (LWK) und Femur-Präparaten Paraffinschnitte und PMMA-Schliffe hergestellt.

4.5.1 Paraffineinbettung

Die Knochenproben wurden über 48 Stunden bei 4 °C in 4 % Paraformaldehydlösung (0335.3, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 0,1 molare Masse Natriumphosphatpufferlösung (pH 7,2 – 7,4) (1.06580.1000 di-sodium hydrogen phosphate & 1.06346.1000 sodium dihydrogen phosphate, Merck Chemical GmbH,

Schwalbach, Deutschland) fixiert. Durch sechsmaliges Auswaschen mit einer 0.1 molare Masse Natriumphosphatpufferlösung wurden die Proben von der Fixierlösung gereinigt. In 3,4%iger Ethylendiamintetraessigsäure (1.084.181, Titriplex III EDTA, Merck Chemical GmbH, Schwalbach, Deutschland) / 10%iger Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Lösung (4855.2 Tris base, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden die Proben 4 Wochen lang entkalkt, dabei wurde die Lösung alle 2 Tage gewechselt. Darauf folgte das Abwaschen unter fließendem Leitungswasser und das Einbringen der Proben in den Einbettungsautomaten (Leica TP1050, Leica Biosystems Nußloch GmbH, Nußloch, Deutschland).

Dieser entwässerte durch eine aufsteigende Alkoholreihe und überführte durch das Intermedium Xylol die Proben in heißes, flüssiges Paraffin (Tab. 2 im Anhang auf S. 113).

Zuletzt wurden die Proben mit flüssigem Paraffin übergossen und bei -20 °C auf einer Kälteplatte zum Erstarren gebracht.

4.5.2 Polymethylmethacrylat-Einbettung (Technovit® 9100)

Im Unterschied zur Paraffineinbettung, entfällt bei der PMMA-Einbettung die Entkalkung. Das ermöglicht genauere Untersuchungen der Knochenmineralisation.

Die Fixierung der Proben erfolgte wie bei der Einbettung in Paraffin mit in 4 % Paraformaldehydlösung in 0,1 molare Masse Natriumphosphatpufferlösung (pH 7,2 - 7,4) bei 4 °C über 48 h und anschließenden mehrmaligen Auswaschen mit 0,1 molare Masse Natriumphosphatpufferlösung.

Das Entwässern, das Prä- und das Infiltrieren erfolgte wie in folgender Tab. 3 im Anhang auf S. 114 beschrieben. Bei jedem Schritt wurde drei bis vier Mal täglich für zehn Minuten ein Unterdruck von 200 mbar im Exsikkator erzeugt. Anschließend folgt die Polymerisation.

Polymerisation:

Die infiltrierte Probe wurde in einem Einbettförmchen im gekühlten Exsikkator mit dem Polymerisationsgemisch übergossen. Nach fünf bis zehn Minuten Unterdruck wurde erneut das Polymerisationsgemisch in das Förmchen hinzugegeben. Luftdicht durch Parafilm verschlossen polymerisierten die Proben zwei Tage bei -4 °C. Danach konnten die Proben langsam wieder auf Raumtemperatur erwärmt werden.

Eine Komponentenliste sowie eine Beschreibung der Zubereitung befindet sich im Anhang auf S. 114.

4.5.3 Herstellung von Knochenschnitten

Mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM355S Coolcutsystem, Thermo Scientific, Waltham, MA) wurden 5 µm dicke Schnitte aus den probenenthaltenden Paraffin- bzw. PMMA-Blöcke geschnitten und über eine Wasserrutsche in ein 42 °C warmes Wasserbad überführt. Aus diesem konnten geeignete Schnitte auf Objektträger (SuperFrost Plus Objektträger, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgebracht und bei 37 °C über mehrere Stunden getrocknet werden.

4.5.4 Herstellung von Knochenschliffen

Mit Hilfe des Trennschleifsystem 310 CL (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland) wurden die in PMMA eingebetteten Knochenproben grob zurechtgesägt, um sie anschließend mit der Vakuum-Klebevorrichtung (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland) und dem Kleber aus Technovit 4000 (64708458, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) auf einen Plexiglas-Objektträger (304150, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) aufzubringen. Bevor die Gegenseite mit der Präzisionsklebepresse (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland) auf ein Glasobjektträger mit Präzisionskleber (405 110, T7210 Präzisionskleber, patho-service GmbH, Oststeinbek, Deutschland) festgeklebt wurde, musste sie mit Hilfe des Mikroschleifsystem 400CS (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland) mit grober Körnung bis auf den gewünschten Knochenabschnitt abgeschliffen werden.

Im Anschluss wurde die andere Seite, mit dem Plexiglas-Objektträger, mit dem Trennschleifsystem abgesägt. Durch das Mikroschleifsystem konnte nun das Präparat mit feiner werdenden Körnungen bis auf eine Enddicke von 15 - 25 µm geschliffen werden. Zuletzt wurde der Knochenschliff noch poliert, um ihn später färben oder zur Fluoreszenz-Mikroskopie verwenden zu können.

4.6 Histologische Färbungen

4.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung wurde an den paraffingebetteten Schnittpräparaten jeder Region und jedes Zeitpunktes als erste Übersichtsfärbung eingesetzt. Sie ermöglichte eine erste Gewebisdifferenzierung und deskriptive Analyse vorzunehmen. Die Kernfärbung durch das Hämatoxylin lässt die Zellkerne blauviolett erscheinen. Das Zytoplasma zeigt sich in Rottönen [121]. Dabei färbt sich Knochen dunkelrot, Knochenmark und Knorpel violett und Muskeln rot. Das verwendete Färbeprotokoll befindet sich im Anhang auf S. 115 (Tab. 4).

4.6.2 Von Kossa / van Gieson Färbung

Die von Kossa / van Gieson Färbung wurde an den nicht entkalkifizierten PMMA gebetteten Knochenschnitten und -schliffen durchgeführt. Sie eignet sich zur Darstellung von Osteoid mit guter Abgrenzung zum mineralisierten Knochen. Die von Kossa Färbung dient dem indirekten Nachweis von Kalzium und färbt damit den mineralisierten Knochen schwarz. Die van Gieson Färbung, eine simultane Färbung von Säurefuchsin mit Pikrinsäure im Überfluss, dient der selektiven Darstellung von Kollagenfasern, Muskeln und Zytoplasma. Es präsentieren sich Muskeln und Osteoid in dunkelrot, Knorpel in hellrot und Knochenmark in rot-gelb [121]. Das verwendete Färbeprotokoll befindet sich im Anhang auf S. 116 (Tab. 5) und S. 117 (Tab. 6).

4.7 Fluoreszenz-Markierung

Es wurden aus jeder Behandlungsgruppe drei Tiere randomisiert, die 15 Tage vor der Probenentnahme 8M Alizarin und 14 und 7 Tage vor der Entnahme Calcein gewichtsadaptiert subkutan injiziert bekamen. Die Herstellung der Injektionslösung erfolgte unter sterilen Kautelen. Das Protokoll zur Herstellung der Injektionslösung befindet sich im Anhang auf S. 118.

4.8 Fotomikroskopie

Von den von Kossa / van Gieson gefärbten Beckenkammschnitten wurden Übersichtsbilder mit einer Vergrößerung von 5x fotografiert. Von den Femur- und LWK-

Schliffen der gleichen Färbung wurden Übersichten in 2,5-facher Vergrößerung erstellt. Verwendet wurden dazu das Fotomikroskop Axioplan 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) mit der Digitalkamera Leica DC 500 (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) und der Fotomikroskopsoftware AxioVision (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland). Das anschließende Zusammenfügen der Einzelbilder erfolgte mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop CS 2 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA).

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde an dem Fotomikroskop Leica DM5500 (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit der Digitalkamera Leica DCF 7000 T (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) und der Fotomikroskopsoftware Leica Application Suite X, 1.9.13747 (LAS X, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Verwendet wurde neben dem Hellfeld der Texas-Red-Filter (Exzitation: 559 ± 17 nm, Emission: 630 ± 34.5 nm) der Green-Fluorescent-Protein-Filter (Exzitation: 469 ± 17.5 nm, Emission: 525 ± 19.5 nm). Von jedem fluoreszenzmarkierten Präparat wurden fünf randomisierte Abschnitte fotografiert, in denen die unterschiedlichen Fluoreszenz-Banden gut zu erkennen waren. An diesen Stellen wurden in 40-facher Vergrößerung kleine Übersichten aus 2 x 2 Einzelbildern erstellt.

4.9 Deskriptive Auswertung

4.9.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur deskriptiven Beschreibung des Knochenstatus aller Bereiche und Zeiten wurde die Übersichtsfärbung HE gewählt. Im Fokus stand dabei die Dicke der Knorpelspange und der Kortikalis, die Verteilung von Fett im Knochenmark und besonders die Vernetzung und Dicke des trabekulären Knochens.

Die Auswertung erfolgte unter unterschiedlichen Vergrößerungen am Lichtmikroskop. Jedes Merkmal wurde, sofern vorhanden, in eine von vier Kategorien einer Ordinalskala eingeteilt.

4.9.2 von Kossa / van Gieson Färbung

Die deskriptive Analyse der von Kossa / van Gieson gefärbten Knochenpräparate galt der Evaluation der Färbung und der Beschreibung von Merkmalen und Auffälligkeiten. Ein

genauerer Ranking einzelner Parameter entfiel aufgrund der zuvor durchgeführten deskriptiven Auswertung der HE-Schnitte und der folgenden histomorphometrischen Bestimmung einiger Knochen-Charakteristika. Die deskriptive Beschreibung wurde an den Präparaten aller Gruppen und aller Zeitpunkte bei unterschiedlichen Vergrößerungen unter dem Lichtmikroskop vorgenommen.

4.10 Histomorphometrische Auswertung

Die im folgenden verwendete Nomenklatur bezieht sich auf das 2013 veröffentlichte Update der American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) zur standardisierten Nomenklatur der Knochen-Histomorphometrie [52]. Aufgrund der Qualität mancher Proben oder Färbungen wurden Einzelne von der Auswertung ausgeschlossen. Eine Tabelle mit Auflistung der verwendeten Probenanzahl pro Region, Gruppe und Zeitpunkt befindet sich im Anhang auf S. 119 (Tab. 7).

4.10.1 Manuelle Auswertung Osteoid

Um den Anteil an Osteoid und mineralisierten Knochen in dem von Kossa / van Gieson gefärbten Gewebe bestimmen zu können, wurden die zusammengefügte Übersichtsbilder mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramm ImageJ bzw. Fiji (2.0.0-rc-19/1.49m, Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD) [177, 186] und dem darin integrierbaren Plugins Trainable Weka Segmentation (Version: 2.1.5) [11] weiter verarbeitet.

Mit dem Ziel diese Bildbearbeitung zu verbessern bzw. überhaupt zu ermöglichen, wurden zuerst die Kontraste um 0,3 % erhöht und das Übersichtsbild in unterschiedlich viele kleinere Bilder pro Zeile und Reihe geteilt, die jeweils eine Datengröße von unter 25 MB besaßen. Anschließend wurde in dem Plugin Trainable Weka Segmentation einmalig ein Classifier erstellt. Mit Hilfe dieses Classifiers ist es möglich, mehrere Klassen (classes) zu erstellen und diese bestimmten Beispielbereichen eines Bildes zu zuordnen. Abb. 14 zeigt diesen Vorgang, in dem für diese Auswertung fünf Klassen (Hintergrund, Knochenmarkfläche, Osteoidfläche (O.Ar), mineralisierte Knochenfläche (Md.Ar) und Muskelfläche / Knorpelfläche) erstellt wurden.

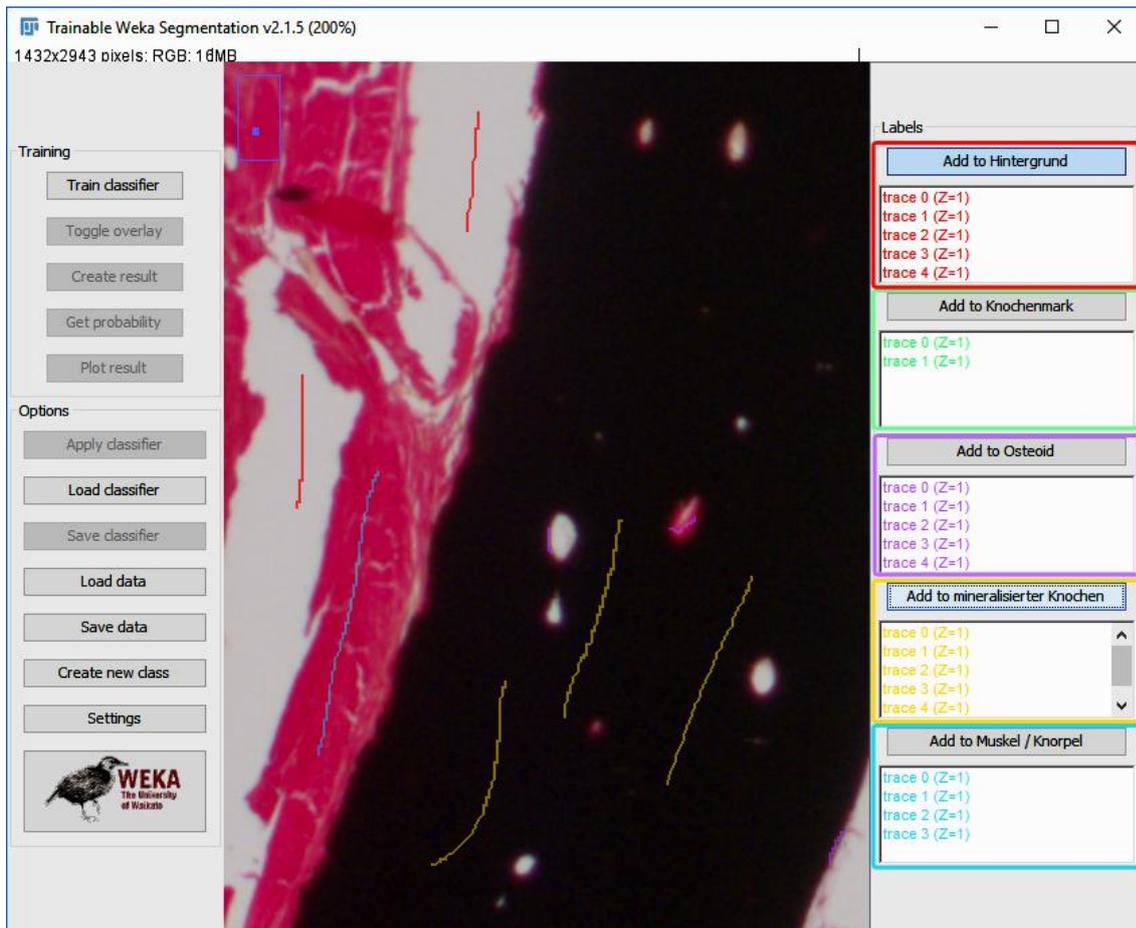


Abb. 14: Erstellen eines Classifiers.

Um dem Plugin Trainable Weka Segmentation die Zuordnung von Bildfarben und Klassen zu ermöglichen, mussten mehrere Beispielbereiche mit einer Freihandlinie markiert werden.

rot = Hintergrund, grün = Knochenmark, violett = Osteoid, gelb = mineralisierter Knochen, blau = Muskeln und Knorpel.

Nach dem Erstellen, Überprüfen und Speichern dieses Classifiers konnte dieser auf alle Bilder einer Färbung angewendet werden, um somit vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Der folgende Rechenprozess des Plugins lieferte zwei grafische Ergebnisse. Ein mehrfarbiges Bild, in dem alle Flächen der gleichen Klasse in der gleichen Farbe erscheinen (Abb. 15). In diesem Fall wurde also ein fünf-farbiges Bild (Classified image) erstellt. Die andere grafische Form besteht aus so vielen Bildern wie Klassen erstellt wurden (Abb. 16). In jedem dieser Bilder ist jeweils die Fläche einer Klasse weiß und der Rest des Bildes schwarz (Probability maps).

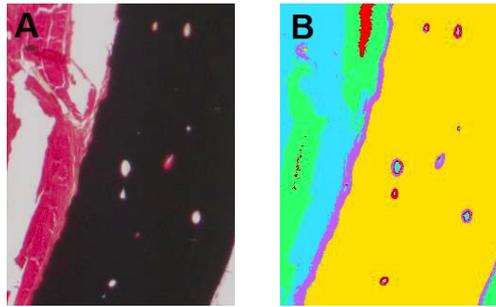


Abb. 15: Classified image.

Zu sehen ist das Originalbild (A) und das Classified image (B). Osteoid (O.Ar) ist in A rot und in B violett. Der mineralisierte Knochen (Md.Ar) ist in (A) schwarz und in (B) gelb.

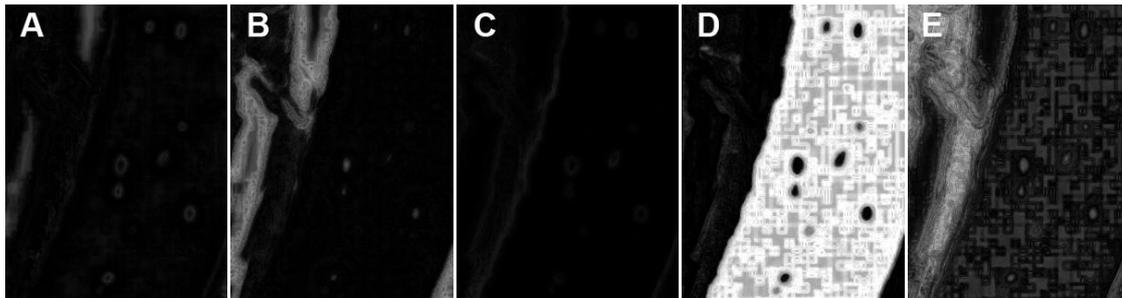


Abb. 16: Probability maps.

In jeder der 5 Probability maps ist die jeweilige Klasse weiß und der Rest schwarz.

A = Hintergrund, B = Knochenmark, C = Osteoid (O.Ar), D = mineralisierter Knochen (Md.Ar), E = Muskeln und Knorpel.

Mit Hilfe der Funktion Combine mussten zunächst die klassifizierten Einzelbilder in Übersichtsbilder zusammengesetzt werden. Anschließend konnte ein ROI eingezeichnet werden, der nur die Spongiosa einschloss. Alles außerhalb des ROI wurde weggeschnitten.

Mit der nun gewonnenen Bildinformation konnte mit Hilfe des Plugins Weka Stats [148, 149] der Anteil einer jeden Klasse am Bild bestimmt werden. Um den durch unterschiedliche Präparat- und Bildgröße entstehenden Fehler zu korrigieren, wurde im Anschluss die Osteoidfläche (O.Ar) auf die Trabekelfläche (Tb.Ar) normalisiert.

4.10.2 Manuelle Auswertung prozentualer Trabekelfläche, -dicke und -abstand

Für die folgende Auswertung wurden die zuvor erstellten Probability maps der Osteoid- und der mineralisierten Knochenfläche in ImageJ bzw. Fiji (2.0.0-rc-64/1.51s, Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD)[177, 186] mit der Merge Channels Funktion übereinandergelegt und der Bildtyp erst in RGB und anschließend in 8-bit geändert. Die Make Binary Funktion erstellte ein binäres Bild, dass im nächsten Schritt zur Ermöglichung der späteren Rechenprozesse in der Pixelzahl auf ein sechzehntel reduziert wurde. Zur Festlegung der zu analysierenden Region wurde ein ROI um die

Trabekel enthaltende Spongiosa gelegt (Abb. 17A). Alles außerhalb des ROIs wurde weggeschnitten und schwarz gefärbt, sodass nur die weiß gefärbten Trabekel und nicht auch die weiß gefärbte Kortikalis in die Berechnung einfließen (Abb. 17B). Die Trabekeldicke (Tb.Th) wurde durch das Plugin BoneJ (Version 1.4.2)[57] errechnet (Abb. 17C). Der Trabekelabstand (Tb.Sp) wurde über die gleiche Funktion des Plugins bestimmt, nur dass zuvor das Bild invertiert und erst anschließend der Teil außerhalb des ROIs ausgeschnitten wurde (Abb. 17D).

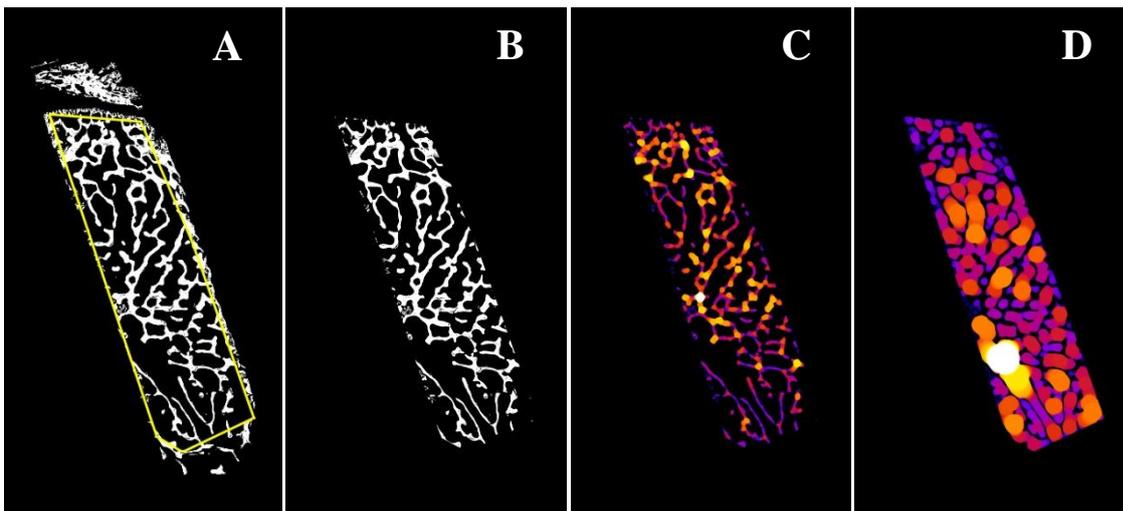


Abb. 17: Bestimmung der Trabekelparameter.

(A) zeigt ein binäres Bild, in dem sich Knochen (mineralisiert und Osteoid) weiß präsentiert. Der durch eine gelbe Linie markierte ROI grenzt den kortikalen Knochen aus und wurde auf (B) angewandt. (C) und (D) zeigen die grafische Darstellung der Berechnung von Tb.Th und Tb.Sp.

Zur Berechnung der Trabekelfläche (Tb.Ar) wurde erneut das zuvor erstellte binäre Bild verwendet, in dem der ROI bereits eingezeichnet, der Rest ausgeschnitten und die Trabekel weiß dargestellt waren. Mit Hilfe der Measure Funktion wurde die Fläche des ROIs bestimmt und durch das Plugin Weka Stats [148, 149] wurde der Trabekelflächenanteil am gesamten Bild errechnet. Durch das Teilen des Trabekelflächenanteils durch den Anteil des ROIs am Gesamtbild ergab sich die prozentuale Trabekelfläche innerhalb des ROIs (Tb.Ar/T.Ar).

4.10.3 Automatisierung der Auswertung

Um den manuellen Aufwand für die Auswertung der vielen Bilder zu reduzieren, wurde nach einer Möglichkeit der Stapelverarbeitung gesucht.

Mit Hilfe der Aufnahmefunktion von ImageJ war es möglich, die zuvor manuell eingegebenen Befehle anzuzeigen. Die Ausgabe der notwendigen Funktionsaufrufe erfolgte in der Programmiersprache ImageJ Macro, eine Sprache ähnlich zu JavaScript. Mit Hilfe der Befehls- und Funktionsaufrufausgabe wurden Makros erstellt, mit denen nicht nur das gleiche Bild, sondern auch ein anderes bzw. direkt ein ganzer Stapel anderer Bilder verarbeitet werden konnten. Dabei wurde jeder Dateiname durch eine Variable ersetzt, die je nach verarbeitetem Bild den jeweiligen Namen annahm. Des Weiteren wurden Befehle eingeführt, die, wie eine Dauerschleife nach dem Verarbeiten des einen Bildes, das Nächste öffneten, nach Speicherpfaden fragten und weitere Wahlmöglichkeiten schafften [151].

Außerdem wurde zur Berechnung der Trabekelparameter die Probability maps durch die Classified images ersetzt, da das Erstellen des binären Bildes über die set Threshold Funktion, sich als weniger fehleranfällig erwies. Diese Änderung ist nicht in die Datenerhebung eingeflossen, präsentiert sich aber in dem anhängenden Makro.

4.10.4 Automatisierte Auswertung

Um alle Ergebnisse zu erhalten, war es nun mit Hilfe der erstellten Makros möglich, den manuellen Arbeitsaufwand auf einen Bruchteil zu reduzieren.

Die unter 4.10.1 beschriebenen Schritte mussten einmal bis zur Erstellung eines Classifiers durchgeführt werden. Es sollten alle zu verarbeitenden Bilddateien in einem Ordner gespeichert werden. Anschließend konnte das Makro auto_Trainable_Weka_Segmentation ausgeführt werden. Nach Eingabe der abgefragten Speicherpfade und Optionen erhielt der Benutzer nach der Dauer der Berechnungen die Classified images und eine Ergebnistabelle mit den Flächenanteilen in den jeweiligen Bildern.

Bevor die Berechnung der Trabekelparameter starten konnte, sollten einmal in den ersten Zeilen des nächsten Makros (ROI_zeichen) die Optionen Speicherpfad, Auflösung des Fotomikroskops (Pixel/ μm), Pixel des Bildes reduziert und Threshold individuell angepasst werden. Der Threshold entsprach in diesem Fall den Nummern (von 0, 1, 2...etc.) der Klassen, die in vorigen Berechnungen für den Knochen (Md.Ar und O.Ar) gewählt wurden. Vor dem Starten des Makros sollten alle zu berechnenden Classified images in ImageJ geöffnet werden. Es folgte ein ständiger Wechsel zwischen ROI

zeichnen und dem Abspielen des Makros bis alle Bilder mit dem gewünschten ROI versehen wurden.

Zuletzt konnte das Makro Trabekel_Dicke_Abstand_Fläche gestartet werden, das erneut den Speicherpfad und einige Optionen erfragte. Als Ergebnis wurden die berechneten Zahlenwerte, dargestellt in Excel-Tabellen, und die abgespeicherten Ergebnisbilder erhalten.

Der Quellcode der erstellten Makros befindet sich im Anhang (ab S. 128). Auf Basis einer überarbeiteten Version wurde ein Benutzermanual erstellt und die erarbeitete Vorgehensweise bereits veröffentlicht. Sie kann unter [133] eingesehen werden.

4.10.5 Mineralisationsrate nach Fluorochrommarkierung

Zur Auswertung der Mineralisationsrate (MAR) wurden PMMA-gebettete, ungefärbte Schnitte des Beckenkamms und Schliffe des Femur zum Zeitpunkt 8M verwendet. Die in 40-facher Vergrößerung durchgeführte Fluoreszenzmikroskopie zeigte drei Banden. Es waren eine Rote von dem 15 Tage vor Euthanasie injizierten Alizarin und zwei Grüne, von dem 14 und 7 Tage vor Euthanasie injizierten Calcein zu sehen.

Um die MAR innerhalb 7 bzw. 8 Tagen zu messen, wurde der Abstand der beiden grünen bzw. der roten und der grünen Bande gemessen (Abb. 18). Dieser geteilt durch die Anzahl der Tage ergab dann die MAR pro Tag. Die Berechnung wurde mit dem ImageJ Plugin Distance between Polylines [147] durchgeführt. Durch das Plugin war es möglich, den senkrecht auf einer direction line stehenden mittleren Abstand zweier mehrteiliger Linien zu messen. Da jedoch die meisten Banden nicht gerade, sondern geschwungen verliefen, musste diese Messung mehrfach durchgeführt werden, um den mittleren Abstand zweier fluoreszierenden Banden zu bestimmen. Zur Korrektur wurde die Länge jeder Einzelmessung bestimmt und mit dessen Gewichtung an der Gesamtlänge verrechnet.

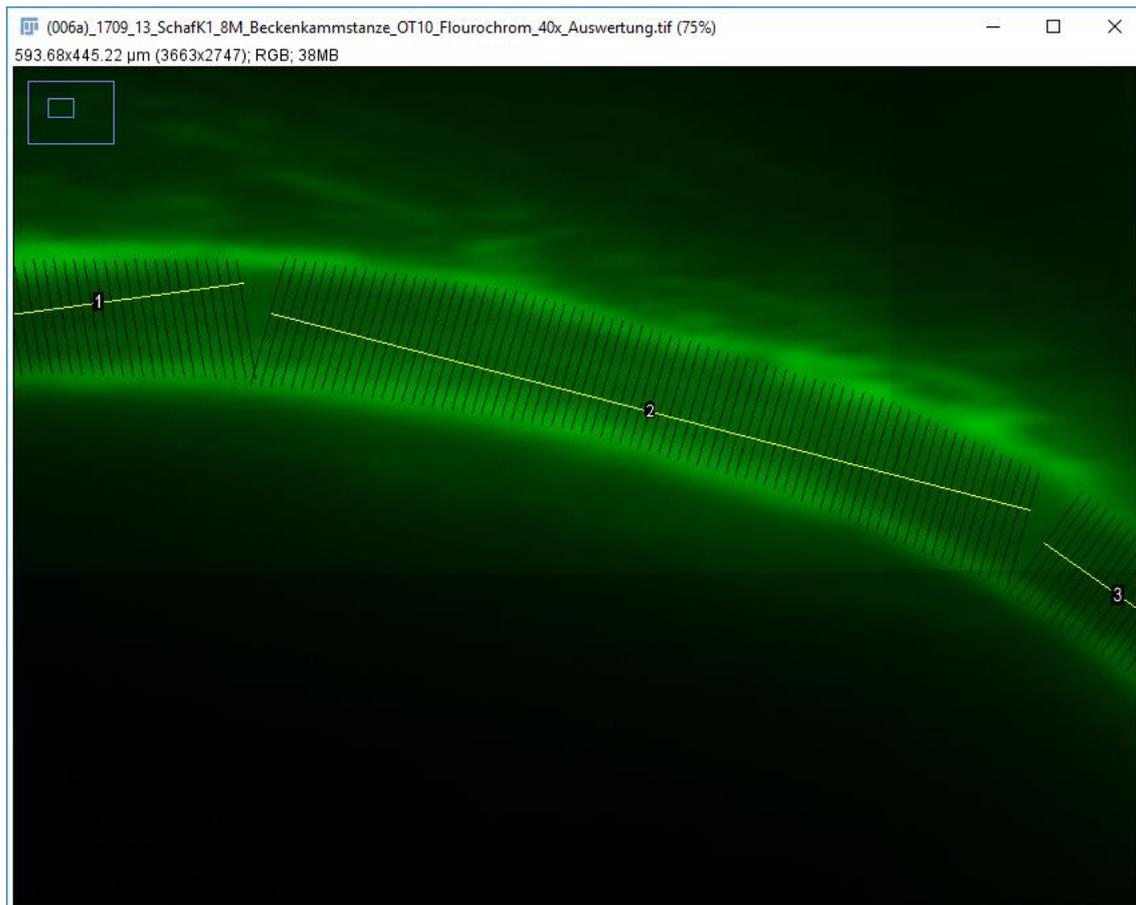


Abb. 18: Berechnung der Mineralisationsrate (MAR).

Die zwei grünen Fluoreszenzbanden entstehen durch das zweimalige Injizieren des Calcein im Abstand von 7 Tagen. Für die Auswertung der MAR wurde sowohl der Abstand der Banden als auch die Länge der jeweiligen Messung in vielen Teilmessungen bestimmt.

4.11 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden die gewonnenen Ergebnisse in Excel Tabellen (Microsoft Office Excel 2007, Microsoft, Redmond, WA) gespeichert und zusammengefasst. Die Auswertung wurde mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS (IBM SPSS Statistics 24, IBM, Armonk, NY) durchgeführt.

Da die explorative Datenanalyse bei keiner der Messwerte eine Normalverteilung zeigte, wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test bei allen Parametern durchgeführt. Das Signifikanzniveau der exakten zweiseitigen Berechnung wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Zur grafischen Aufbereitung der Ergebnisse wurden die Mittelwerte der Gruppen mit einem Standardfehler (Fehlerbalken = ± 1 Standardfehler) in SPSS als Balkendiagramme dargestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Versuchsverlauf

5.1.1 Allgemeines

Von den 32 kontrolliert randomisierten Merinolandschafen wurde eines, das der OVX-Gruppe zugeteilt war, aufgrund seiner Gravidität schon vor Versuchsbeginn ausgeschlossen.

Die Ovariectomie und Probenentnahme zum Zeitpunkt 0M verlief komplikationslos. Nach der Narkose für die Probenentnahme 3M litt eines der Versuchstiere unter einer insuffizienten Spontanatmung. Nach einer längeren Beatmungsphase erwachte es wieder und erholte sich unter einer strengeren Nachbeobachtung gut.

Im weiteren Verlauf fiel bei den Tieren der OVXDS-Gruppe ein schlechterer Allgemeinzustand auf. Zum einen wurde dieser Eindruck durch eine rissige Haut geprägt, die bei einem der Tiere eine großflächige Wunde über der rechten Flanke bescherte, welche mittels Hautnaht verschlossen werden musste. Zum anderen nahm die Behaarung bzw. die Wolle ab und fiel aus, sodass zum Versuchsende hin einige Tiere eine Alopezie aufwiesen.

Ein Schaf der OVXDS-Gruppe verstarb zwei Wochen vor der Euthanasie und wurde aufgrund der schon eingetretenen Leichenstarre von der Probenentnahme ausgeschlossen. Ein Weiteres derselben Gruppe erlitt eine Fraktur des Oberschenkelhalses. Bei diesem Tier wurde die Euthanasie um 2 Wochen vorgezogen.

5.1.2 Gewichtsentwicklung

Die Gewichtsentwicklung der Versuchstiere wurde vor den drei Beckenkammbiopsie-Entnahmen nach ausreichender Prämedikation durch Wiegen festgehalten. Zu Versuchsbeginn wogen alle Schafe im Durchschnitt 61,7 kg ($n = 31$) (Abb. 19). Die Tiere der Kontrollgruppe wogen im Durchschnitt zum Zeitpunkt 0M 63,3 kg und nahmen innerhalb der ersten drei Monaten (3M) 6 kg und in den folgenden fünf Monaten (8M) 0,4 kg zu. Das mittlere Gewicht der OVX-Gruppe betrug zum Versuchsbeginn 62,6 kg, nahm dann bis zum nächsten Wiegen um 3,8 kg zu, um dann in den folgenden Monaten 3,6 kg abzunehmen. Die OVXD-Gruppe startete bei 62,6 kg. Sie erhöhten ihr Gewicht um 6,2 kg, um dann wieder 1,3 kg zu verlieren. In der OVXDS-Gruppe nahmen die Tiere zu den

58,5 kg Startgewicht 1,8 kg Körpergewicht zu. Zum Zeitpunkt 8M wogen sie wieder 0,2 kg weniger.

Zusammenfassend nahmen die Tiere aller Gruppen in den ersten 3M zu und wogen nach 8M trotz häufiger Gewichtsabnahme noch mehr als am Ausgangspunkt 0M. Eine Tabelle mit den erhobenen Messwerten befindet sich im Anhang auf S.120 (Tab. 8).

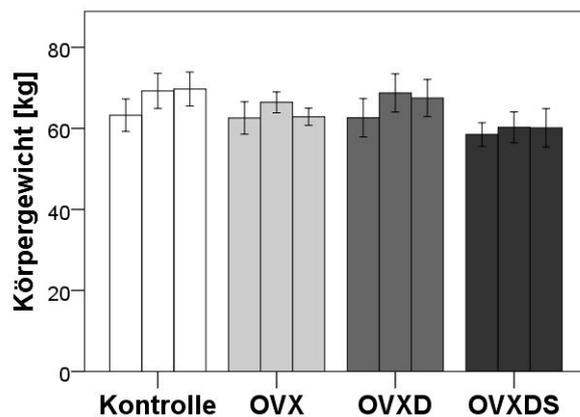


Abb. 19: Gewichtsverlauf.

In der Abbildung sind nebeneinander jeweils das mittlere Gewicht jeder Gruppe zu den Zeitpunkten 0M, 3M und 8M dargestellt.

5.1.3 Altersunterschiede

Die 32 weiblichen Merinolandschafe, mit einem Durchschnittsalter von 5,5 Jahren, waren zu Versuchsbeginn zwischen 3 und 9 Jahre alt. Diese 32 Schafe wurden kontrolliert randomisiert auf die vier Gruppen aufgeteilt. Aufgrund des Ausschlusses eines Schafes wegen bestehender Gravidität konnte ein Altersunterschied zwischen den Gruppen zum Zeitpunkt 0M festgestellt werden.

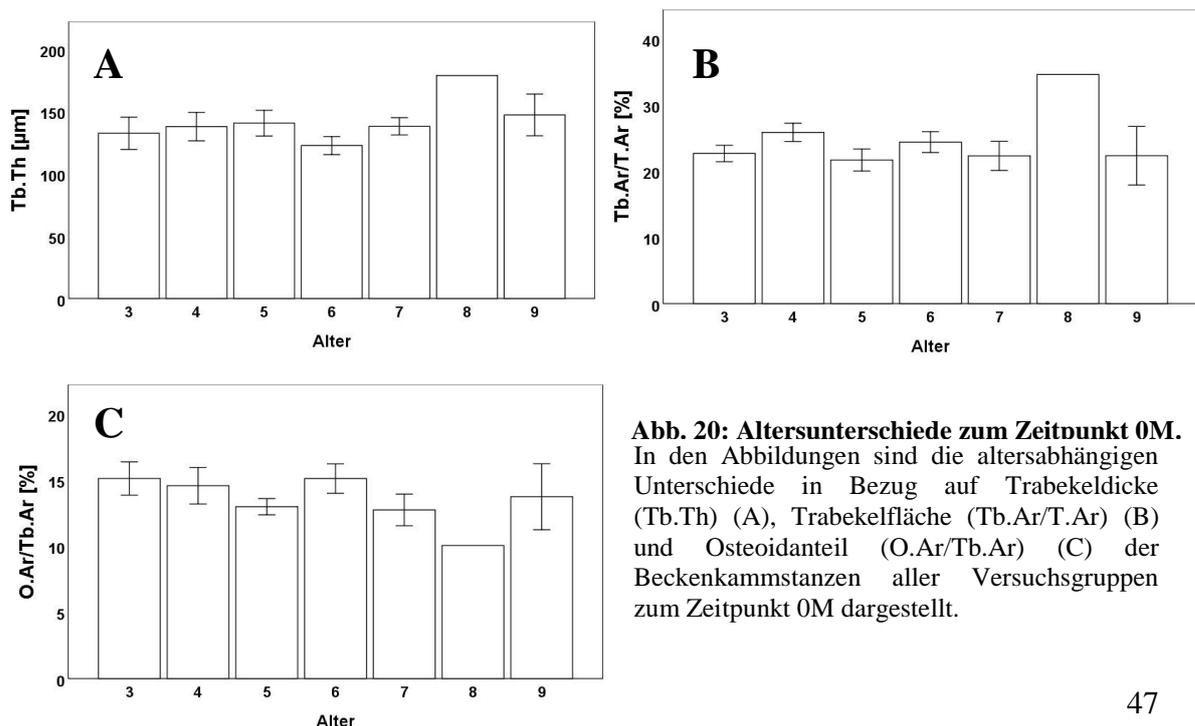


Abb. 20: Altersunterschiede zum Zeitpunkt 0M.

In den Abbildungen sind die altersabhängigen Unterschiede in Bezug auf Trabekeldicke (Tb.Th) (A), Trabekelfläche (Tb.Ar/T.Ar) (B) und Osteoidanteil (O.Ar/Tb.Ar) (C) der Beckenkammstanzen aller Versuchsgruppen zum Zeitpunkt 0M dargestellt.

Zur Erhebung altersabhängiger Unterschiede wurden die Beckenkammstanzen aller Versuchsgruppen des Zeitpunktes 0M nach Alter aufgeteilt und auf Differenzen der Trabekelfläche (Tb.Ar/T.Ar), der Trabekeldicke (Tb.Th) und des Osteoidanteils (O.Ar/Tb.Ar) überprüft (Abb. 20). Es konnten keine signifikanteren Unterschiede zwischen den einzelnen Altersgruppen festgestellt werden.

5.2 Radiologische Beschreibung der Knochenqualität

Mit Hilfe der DXA-Messung konnte die Knochenqualität im Verlauf der experimentellen Untersuchung *in vivo* beschrieben werden. Dazu wurde zu den Zeitpunkten 0M, 3M und 8M von Mitarbeitern der Experimentellen Unfallchirurgie die BMD bestimmter Skelettregionen ermittelt. Im Folgenden werden die Ergebnisse des Femurs und der LWK vorgestellt. Eine Tabelle mit den erhobenen Messwerten und eine mit den signifikanten p-Werten befinden sich im Anhang ab S.127 (Tab. 31 + Tab. 32).

5.2.1 Femur

Bei Versuchsbeginn war die im Femur gemessene BMD aller Gruppen sehr nah beieinander. Die mittleren BMD-Werte lagen zwischen 1,15 g/cm² (Kontrollgruppe) und 1,20 g/cm² (OVXD-Gruppe). Nach 3M der Behandlung zeigte die OVXDS-Gruppe (0,91 g/cm²) signifikant niedrigere Werte als die Kontroll- (1,15 g/cm²), die OVX- (1,18 g/cm²) und die OVXD-Gruppe (1,13 g/cm²). Das gleiche Bild spiegelten die Messungen nach 8M wieder. Die OVXDS-Gruppe (0,81 g/cm²) erwies signifikant niedrigere BMD-Messwerte als alle anderen Gruppen (Kontrollgruppe: 1,19 g/cm², OVX-Gruppe: 1,24 g/cm² und OVXD-Gruppe: 1,18 g/cm²) (Abb. 21A).

Betrachtet man nun den Verlauf der einzelnen Gruppen, so stellt der Betrachter fest, dass die Kontroll-, die OVX- und die OVXD-Gruppe konstant auf einem Messniveau blieben und nur die OVXDS-Gruppe eine signifikante Abnahme der BMD zwischen 0M und 3M und zwischen 0M und 8M aufwies (Abb. 21A).

5.2.2 Lendenwirbelkörper

Die Messungen der LWK erbrachten ähnliche Ergebnisse wie die Messungen des Femurs. Die Initialmessung nach 0M zeigte dicht beieinander liegende Knochendichten (zwischen 1,11 g/cm² Kontrollgruppe und 1,15 g/cm² OVXDS-Gruppe). Nach 3M war die BMD

von der OVXDS-Gruppe (0,81 g/cm²) signifikant geringer als die von der Kontroll- (1,10 g/cm²), der OVX- (1,08 g/cm²) und der OVXD-Gruppe (1,04 g/cm²). 5M später wies die OVXDS-Gruppe (0,75 g/cm²) erneut die signifikant geringsten Messwerte auf (Kontrollgruppe: 1,15 g/cm², OVX-Gruppe: 1,11 g/cm² und OVXD-Gruppe: 1,01 g/cm²) (Abb. 21B).

Beim Betrachten des Verlaufs der einzelnen Gruppen fällt auf, dass lediglich die OVXDS-Gruppe eine signifikante Abnahme der BMD nach 3M und 8M im Vergleich zu 0M aufwies, während alle anderen Gruppen konstant auf einem Messniveau blieben (Abb. 21B).

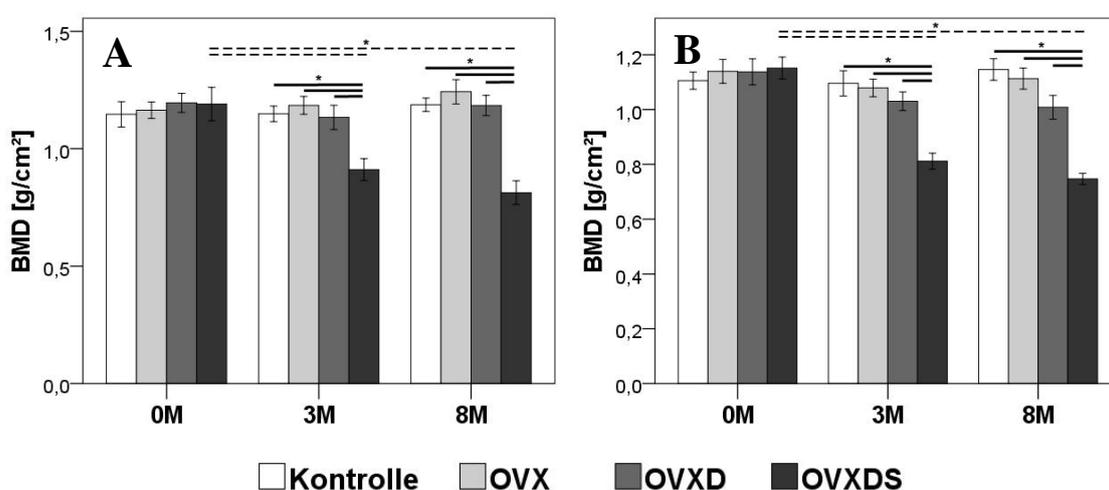


Abb. 21: Knochendichtemessungen (BMD) von Femur und LWK.

Die OVXDS-Gruppe wies im Femur (A) und LWK (B) eine signifikante Abnahme der BMD nach 3M und 8M verglichen mit 0M auf. Ebenso waren die Messwerte in beiden Skelettregionen nach 3M und 8M der OVXDS-Gruppe signifikant geringer als die der anderen Gruppen (Mann-Whitney-U, * $p \leq 0,05$).

5.3 Deskriptive Bewertung des Knochenstatus

5.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mit der HE-Färbung konnte ein Überblick über die Knochenqualität gewonnen werden. In einem ordinalen Rating wurden die Kortikalisdicke, die Knorpelspangendicke, die Fettmenge im Knochenmark und die Trabekelbreite und -vernetzung jeweils einem von vier Ausprägungsgraden zugeteilt.

5.3.1.1 Beckenkamm

Die Präparate waren entsprechend dem Bohrdefekt in unterschiedliche Bereiche einteilbar. Den größten Bereich machte die Spongiosa mit dem sie umgebenden Knochenmark aus. An einem Ende des länglichen Zylinders waren eine Knochen- (Kortikalis-) und / oder Knorpelspanne aufgelagert. Diese variierten in ihrer Dicke Gruppen und Zeitpunkt unabhängig. Noch weiter apikal waren Muskelreste zu sehen. Je nach Bohrkanal war teilweise auf der Gegenseite oder an einer Längsseite des Präparates ebenfalls kortikaler Knochen vorzufinden (Abb. 22).

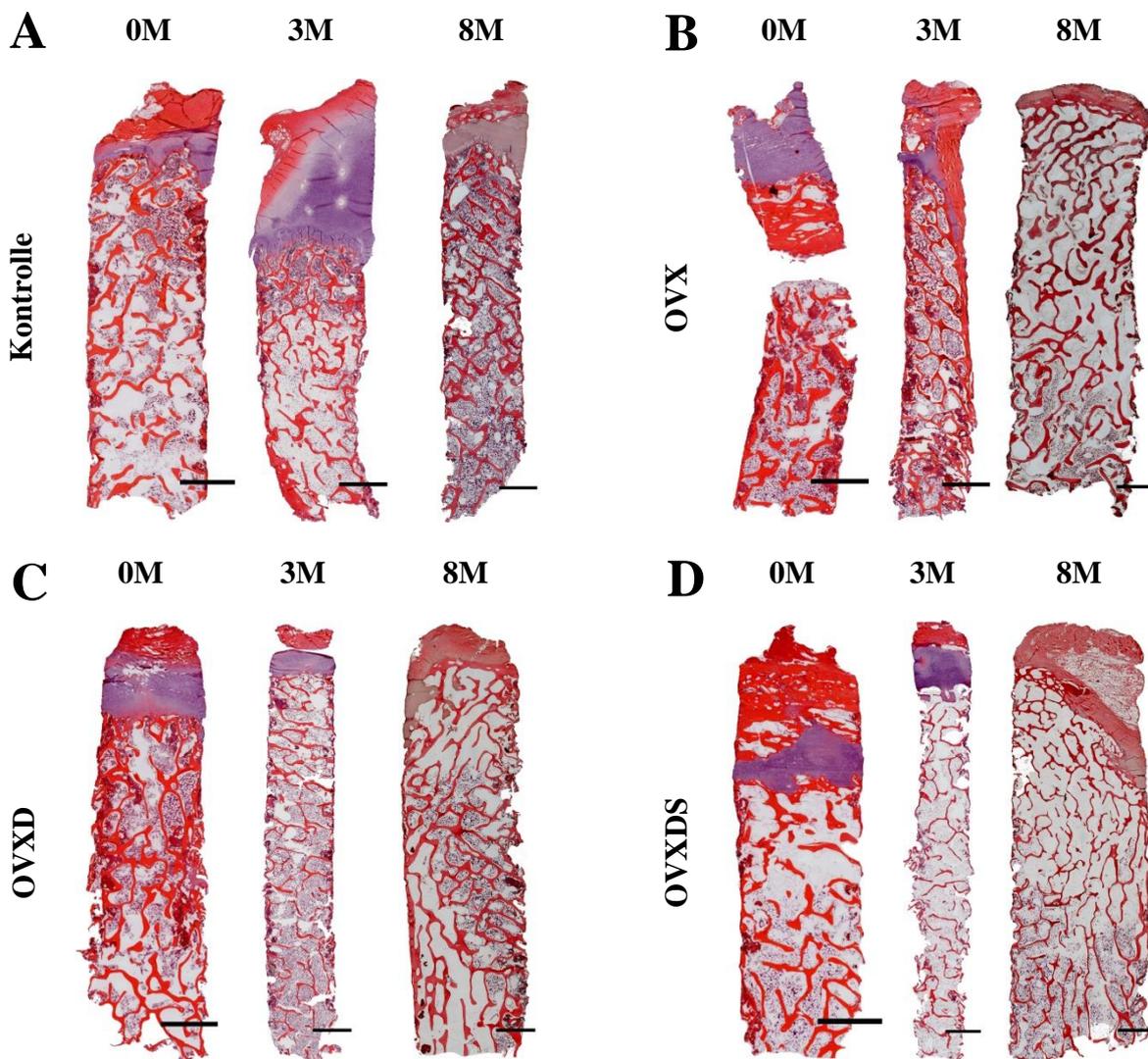


Abb. 22: Übersicht der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Beckenkammstanzen.

Die Übersichtsbilder der Beckenkammstanzen wurden nach Gruppen sortiert. Während bei der Kontroll- (A), der OVX- (B) und der OVXD-Gruppe (C) kaum Veränderungen über die Zeit zu erkennen sind, zeigt sich die OVXDS-Gruppe (D) mit einer deutlich geringeren Trabekeldicke. Ebenso ist ab dem Zeitpunkt 3M der OVXDS-Gruppe nur noch eine geringe Zellzahl (überwiegend Fettzellen) im Knochenmark vorzufinden.

Knochen + Muskel = dunkelrot, Knorpel + Knochenmark = violett, Zellkerne = blauviolett; Maßstabsbalken \cong 2 mm.

In der Kontrollgruppe waren zum Zeitpunkt 0M die Trabekel dick und gut miteinander vernetzt. Die Vernetzung zeigte sich nahe der Kortikalis ausgeprägter als ab einem gewissen Abstand. Das Knochenmark präsentierte sich in einem ausgewogenen Verhältnis zwischen rotem Knochenmark und Fettzellen. Nach 3M ließ sich in der Kontrollgruppe ein sehr ähnliches Bild wiederfinden. Jedoch fiel in einzelnen Präparaten auf, dass bei geringerer Trabekeldicke die Trabekelvernetzung ausgeprägter war und wiederum in anderen Präparaten genau umgekehrt. Auch hier zeigte sich die rote Knochenmark- und Fettzellverteilung ausgeglichen. Nach 8M konnte bei unverändertem Knochenmark eine gering größere Trabekeldicke und -vernetzung festgestellt werden (Abb. 22A + Abb. 23).

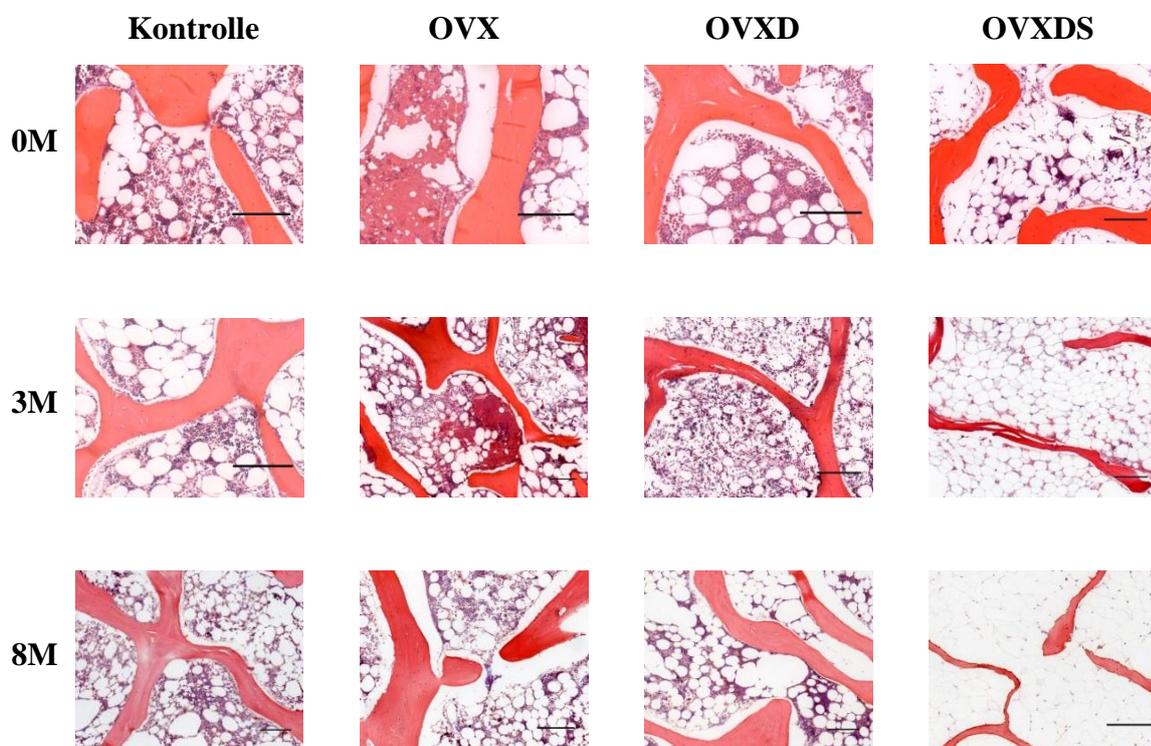


Abb. 23: Bildausschnitte der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Beckenkammstanzen.

Für die vergrößerte Darstellung der Beckenkammstanzen sind Ausschnitte mit enthaltenen Trabekeln und Knochenmark gewählt worden. Im Vergleich zwischen den Zeitpunkten innerhalb der jeweiligen Gruppe zeigt sich in der Kontroll-, der OVX- und der OVXD-Gruppe keine Veränderungen in der Trabekeldicke sowie ein konstantes Verhältnis von Zellen zu ausgelösten Fettvakuolen. In der OVXDS-Gruppe sind deutlich dünnere Trabekel nach 3M und 8M zu sehen. Zusätzlich enthält das Knochenmark neben Fettzellen kaum weitere Zellen.

Knochen = dunkelrot, Zellkerne = blauviolett Hintergrund bzw. ausgelöste Fettvakuolen = weiß; Maßstabsbalken \cong 200 μ m.

In den Behandlungsgruppen OVX und OVXD zeigte sich ein vergleichbares Bild wie in der Kontrollgruppe. Zum Zeitpunkt 0M waren die Trabekel dick und gut vernetzt mit regelrechtem Verhältnis zwischen rotem und gelbem Knochenmark. Nach 3M konnte

auch in der OVX- und der OVXD-Gruppe in einzelnen Präparaten eine geringere Trabekeldicke bei ausgeprägterem Netzwerk und umgekehrt vorgefunden werden. Die Knochenmarksverteilung zeigte sich vergleichbar. Nach 8M konnte in der OVX- und der OVXD-Gruppe eine gering größere Trabekeldicke und -vernetzung verglichen mit der OVX- und der OVXD-Gruppe zum Zeitpunkt 3M und verglichen mit der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 8M festgestellt werden, ohne dass feststellbare Unterschiede im Knochenmark vorlagen (Abb. 22B/C + Abb. 23).

Die OVXDS-Gruppe wies zum Zeitpunkt 0M bei dicken und gut vernetzten Trabekeln ebenfalls eine ausgewogene Knochenmarksverteilung auf. Nach 3M präsentierten sich in den HE-Schnitten der OVXDS-Gruppe dünnere Trabekel mit geringerer Vernetzung verglichen mit der OVXDS-Gruppe zum Zeitpunkt 0M und verglichen mit allen anderen Gruppen zum Zeitpunkt 3M. Außerdem ließ sich ein enormes Übergewicht an Fettzellen im Knochenmark feststellen. Nach 8M zeigte sich in der OVXDS-Gruppe ein vergleichbares Bild wie nach 3M mit geringer Trabekeldicke und -vernetzung sowie ein von Fettzellen ausgefülltes Knochenmark (Abb. 22D + Abb. 23).

5.3.1.2 Femur

Die Präparate bildeten das distale Femur mit dem Knorpel, der Kortikalis, dem Markraum und die Spongiosa der Epi- und der Metaphyse ab. Die HE gefärbten Femurschnitte verglichen den Zeitpunkt 8M zwischen den Gruppen (Abb. 24). Die Trabekel der Kontrollgruppe waren sehr dick, deutlich dicker als die im Beckenkamm. Nahe der Kortikalis waren sie reich vernetzt. Im Bereich der Metaphyse verliefen die Trabekel größtenteils parallel zur Kortikalis mit deutlich weniger Quervernetzung. Knochenmark war nur vereinzelt in Bereichen der Metaphyse vorzufinden, weshalb auf einen Vergleich des Knochenmarks zwischen den Gruppen im Weiteren verzichtet wurde.

Die OVX- und die OVXD-Gruppe spiegelten die Trabekelparameter der Kontrollgruppe wieder. Die OVXDS-Gruppe zeigte deutlich dünnere und weniger vernetzte Trabekel, wobei die geringe Dicke drastischer ausfiel als die geringere Vernetzung.

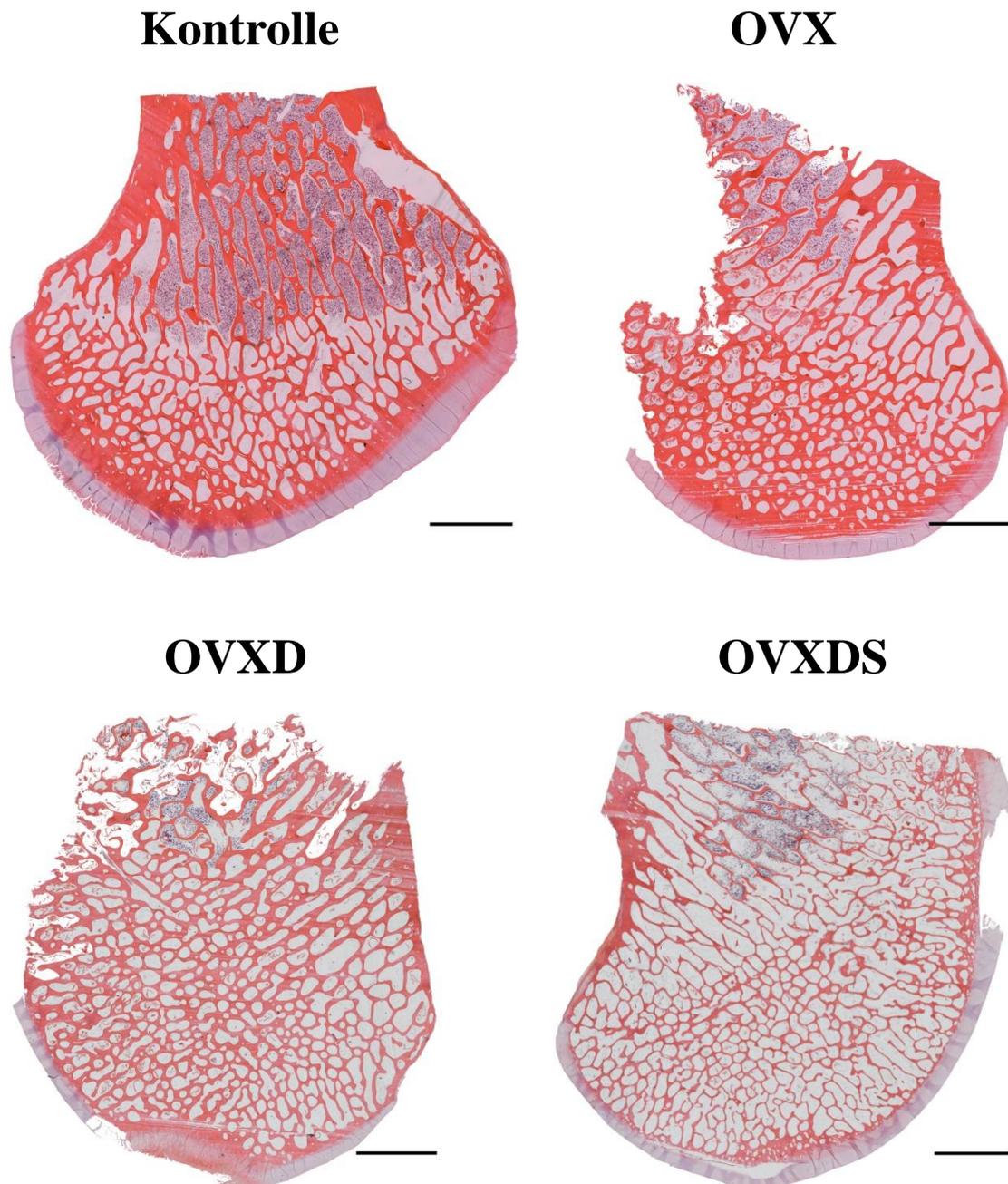


Abb. 24: Übersichtsbilder der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Femurkondylen.

Die Übersichtsbilder stammen aus dem zum Zeitpunkt 8M gewonnenen Femurpräparaten. Insbesondere in dem Beispielbild der Kontrollgruppe ist mit dem Abstand zur knorpelbeschichteten Kortikalis die abnehmende Trabekelvernetzung bzw. der zunehmende Trabekelabstand deutlich abgebildet. Die geringste Trabekeldicke zeigte sich in der OVXDS-Gruppe.

Knochen = dunkelrot, Knorpel + Knochenmark = violett, Zellkerne = blauviolett; Maßstabsbalken \cong 2 mm.

5.3.1.3 Lendenwirbelkörper

Die LWK-Präparate zeigten die Spongiosa, den Markraum und die Kortikalis der LWK. Teilweise war der Übergang zum Wirbelbogen mit angeschnitten. Die Präparate stammten alle von der Entnahme nach 8M Versuchsverlauf (Abb. 25). Die Trabekel der Kontrollgruppe waren dicker als die der Beckenkammstanzen, wenn auch weniger dick

als die Trabekel im Femur. Die Trabekel bildeten ein wabenartiges enges Geflecht, welches sich deutlich enger als in den anderen beiden Regionen präsentierte. Die Zwischenräume waren reich an rotem Knochenmark.

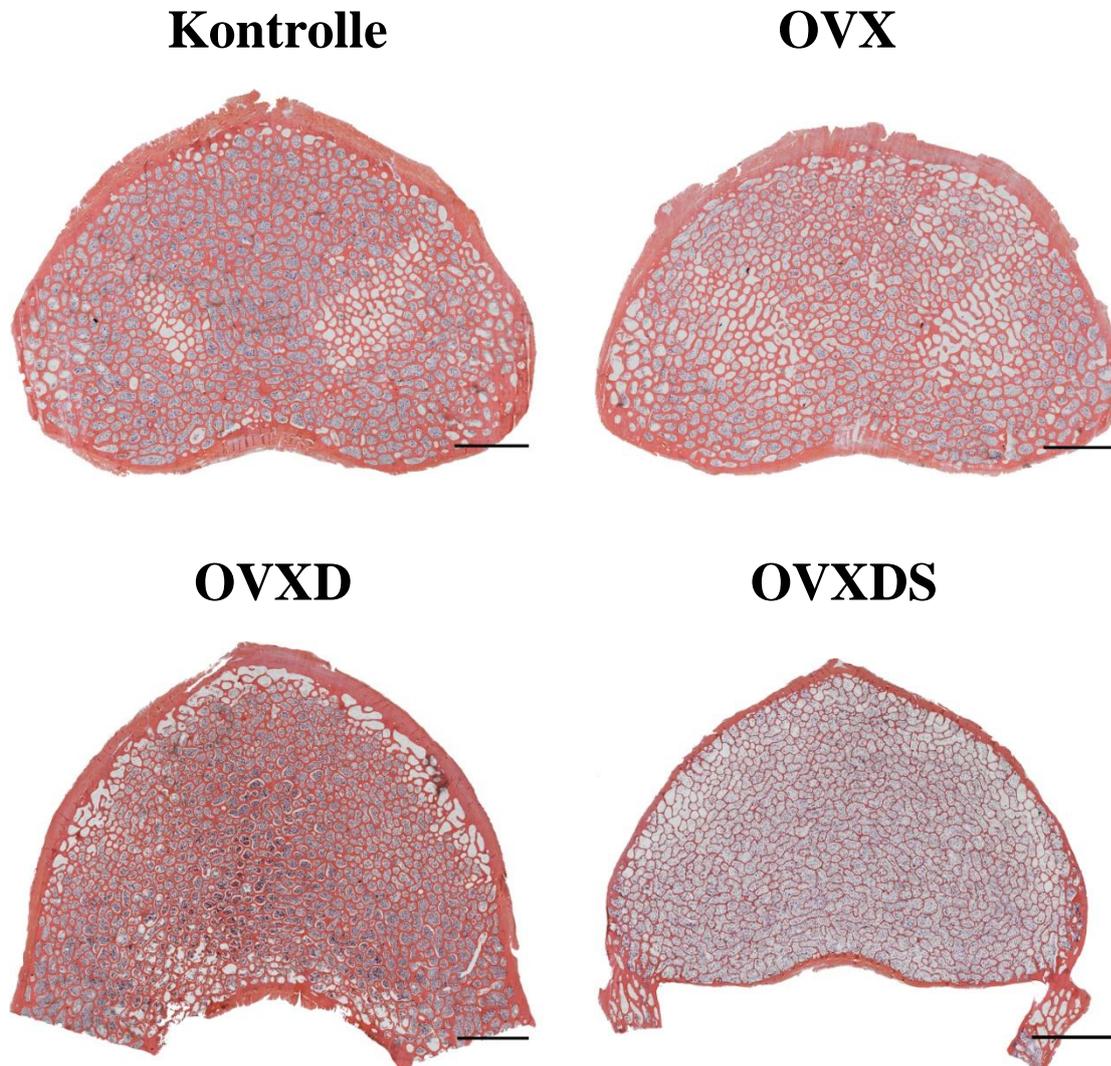


Abb. 25: Übersichtsbilder der Hämatoxylin-Eosin gefärbten LWK.

In der Abbildung sind nebeneinander Übersichtsbilder der LWK einer jeden Gruppe zum Zeitpunkt 8M dargestellt. In der Kontroll-, der OVX- und der OVXD-Gruppe zeigen sich dicke Trabekel mit viel roten Knochenmark (zellkernreicher / violett gefärbter intertrabekulärer Raum). Im LWK der OVXDS-Gruppe fallen die Trabekel dünner aus als in den anderen Gruppen. Zusätzlich ist das Knochenmark der OVXDS-Gruppe von Fettzellen durchsetzt, weshalb die Gesamtzahl an Zellkernen im Knochenmark gering ausfällt und das Knochenmark blass erscheint.

Knochen = dunkelrot, Knorpel + Knochenmark = violett, Zellkerne = blauviolett; Maßstabsbalken \cong 2 mm.

In der OVX-Gruppe zeigte sich eine minimal geringere Trabekeldicke und -vernetzung als in der Kontrollgruppe. Jedoch fielen im Vergleich zu der Kontrollgruppe deutlich mehr Fettzellen im Knochenmark auf.

Die Trabekeldicke und -vernetzung der OVXD-Gruppe waren verglichen mit der Kontrollgruppe ebenfalls minimal kleiner. Das Knochenmark zeigte sich, wie in der Kontrollgruppe, ausgeglichen verteilt. Die OVXDS-Gruppe präsentierte sich erneut mit deutlich geringeren Trabekelparametern verglichen mit der Kontrollgruppe, auch wenn die geringere Trabekeldicke deutlich drastischer ausfiel als die geringere Trabekelvernetzung. Der Anteil an Fettzellen im Knochenmark zeigte sich in der OVXDS-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe sehr hoch.

5.3.2 Von Kossa / van Gieson Färbung

Nach der zuvor durchgeführten deskriptiven Analyse der HE gefärbten Schnitte wurde in den von Kossa / van Gieson gefärbten Präparaten besonders auf das Osteoid geachtet und der Osteoidanteil verglichen. Die Beobachtungen der zuvor beschriebenen Trabekelparameter konnten auch in dieser Färbung bestätigt werden (Abb. 26 + Abb. 27).

5.3.2.1 Beckenkamm

In den Beckenkammstanzen waren der Bereich der Spongiosa mit dem dazwischen liegenden Markraum und der Bereich des apikalen Teils der Stanze mit Knochen, Knorpel und / oder Muskel zu unterscheiden. Die weiteren Beobachtungen beziehen sich auf den erst genannten Bereich.

In der Kontrollgruppe (Abb. 26A) zeigten sich zum Zeitpunkt 0M erneut breite und gut vernetzte Trabekel. Ein hauchdünner Osteoidsaum war auf der Hälfte bis Dreiviertel der mineralisierten Knochenoberfläche zu sehen. Außerdem ließen sich Erosionslakunen mit umliegender Mehranreicherung von Osteoid vorfinden. Das Knochenmark war zwischen blutbildenden Zellen und ausgelösten Fettvakuolen ausgewogen verteilt (Abb. 27). Nach 3M ließ sich in der Kontrollgruppe erneut ein vergleichbares Bild vorfinden. In den von Kossa / van Gieson gefärbten Beckenkammstanzen zeigten sich nach 8M geringfügig breitere Trabekel mit minimal weniger Osteoid .

In der OVX-Gruppe zeigten sich nach 0M, 3M und 8M vergleichbare Trabekelparameter und Osteoidverteilungen wie in der Kontrollgruppe (Abb. 26B + Abb. 27).

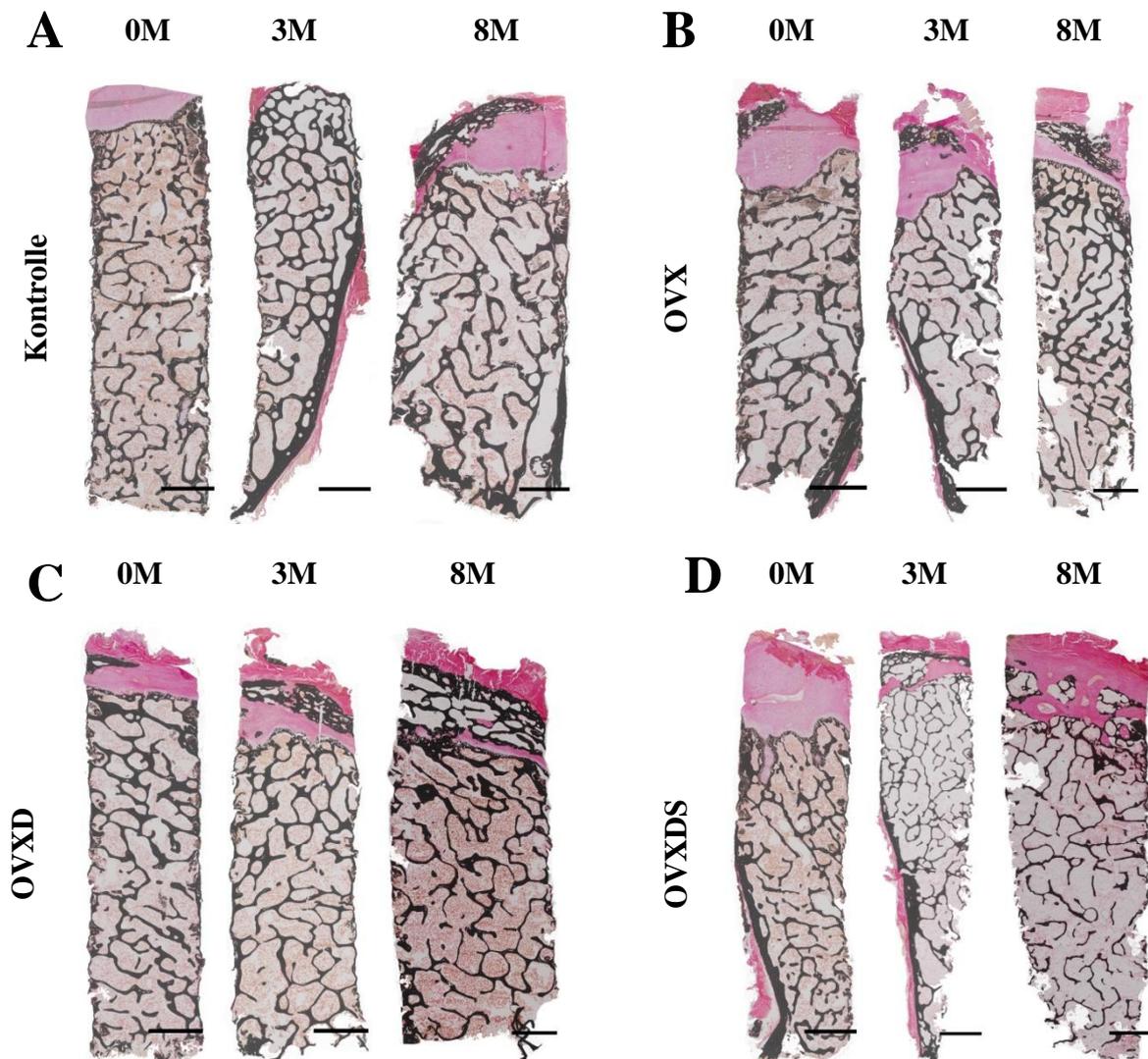


Abb. 26: Übersicht der von Kossa / van Gieson gefärbte Beckenkammstanzen.

Die Übersichtsbilder der Beckenkammstanzen wurden nach Gruppen und Zeitpunkten sortiert. Während man bei der Kontroll- (A), der OVX- (B) und der OVXD-Gruppe (C) kaum Veränderungen über die Zeit erkennen konnte, war in der OVXDS-Gruppe (D) eine deutliche Trabekeldestruktion zu erkennen. mineralisierter Knochen = schwarz, Knorpel = hellrot, Muskel = dunkelrot; Maßstabsbalken \cong 2 mm.

In der OVXD-Gruppe konnte zum Zeitpunkt 0M ebenfalls nur ein hauchdünner Osteoidsaum auf großen Teilen der Trabekeloberfläche mit einzelnen Stellen einer breiteren Osteoidbande festgestellt werden (Abb. 26C + Abb. 27). Nach 3M ließen sich in der OVXD-Gruppe geringfügig mehr Stellen mit einem breiteren Osteoidband finden verglichen mit der OVX- und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 3M und verglichen mit der OVXD-Gruppe zum Zeitpunkt 0M. Die Beobachtungen in der OVXD-Gruppe nach 8M folgten derer in der Kontroll- und der OVX-Gruppe nach 8M mit geringfügig weniger Osteoid (Abb. 27).

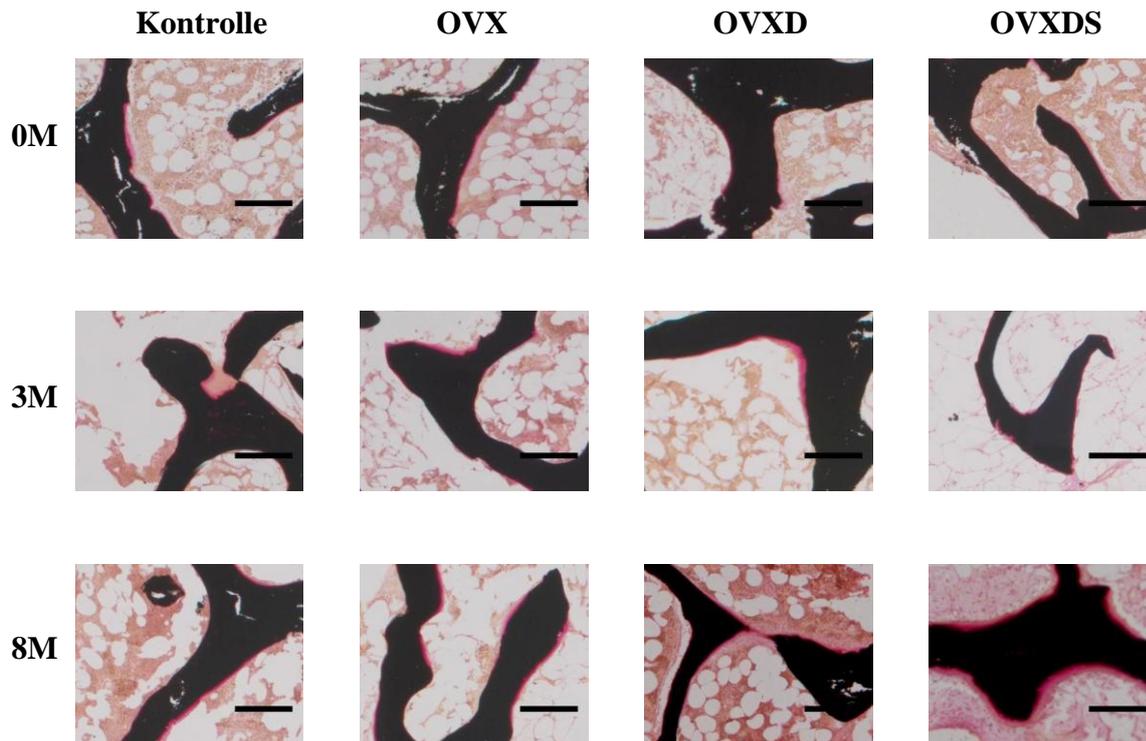


Abb. 27: Bildausschnitte der von Kossa /van Gieson gefärbten Beckenkammstanzen.

In den Bildausschnitten ist das dem mineralisierten Knochen anliegende Osteoid gut zu erkennen. In der OVXDS-Gruppe nach 8M fiel ein erhöhter Osteoidgehalt auf, der nach 3M noch nicht in diesem Maße vorzufinden war.

mineralisierter Knochen = schwarz, Osteoid = kräftig-rot, Knochenmark = blass-rot; Maßstabsbalken \cong 200 μ m.

Zum Zeitpunkt 0M zeigte sich in der OVXDS-Gruppe ein vergleichbarer Anblick wie in allen anderen Gruppen zum Zeitpunkt 0M mit breiten und gut vernetzten Trabekeln bei nur wenig Osteoidflächen (Abb. 26D + Abb. 27). Nach 3M war in der OVXDS-Gruppe eine deutliche Trabekeldestruktion mit dünneren und weniger verzweigten Trabekeln im Vergleich zu allen anderen Gruppen nach 3M und im Vergleich zu der OVXDS-Gruppe nach 0M zu erkennen. Neben dem dünnen und großflächig aufliegenden Osteoidsaum ließen sich nun mehr Flächen mit breiter Osteoidbande vorfinden verglichen mit allen anderen Gruppen zum Zeitpunkt 3M und verglichen mit der OVXDS-Gruppe zum Zeitpunkt 0M. Zum Zeitpunkt 8M konnte in der OVXDS-Gruppe erneut eine Trabekeldestruktion und Osteoidzunahme im Vergleich zu der OVXDS-Gruppe nach 3M festgestellt werden (Abb. 26D + Abb. 27). Hier zeigte sich mehr mineralisierte Knochenoberfläche mit dem dünnen Osteoidsaum bedeckt, der dazu auch noch breiter erschien. Des Weiteren fielen besonders zwei Präparate auf, in denen fast der gesamte mineralisierte Knochen mit einer dicken Schicht von Osteoid überzogen war.

5.3.2.2 Femur

Die Präparate des Femurs zeigten einen Querschnitt durch die distale Epi- und Metaphyse nach 8M Behandlung (Abb. 28). Es waren von außen nach innen Knorpel, Kortikalis und Spongiosa mit dem sie umgebenden Markraum zu erkennen. Die deskriptiv in der HE-Färbung durchgeführte Trabekelanalyse konnte in der von Kossa / van Gieson Färbung bestätigt werden.

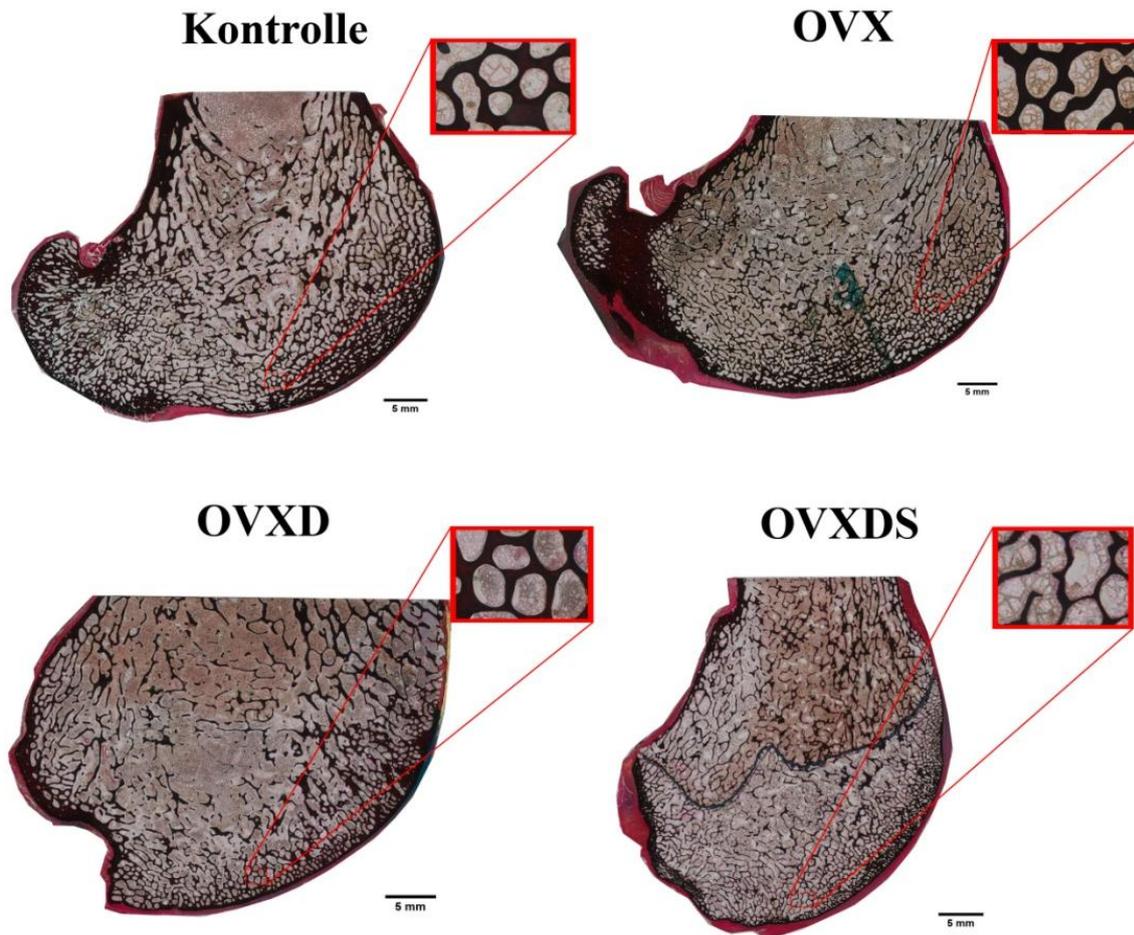


Abb. 28: Übersichtsbilder der von Kossa / van Gieson gefärbten Femurkondylen.

Die Übersichtsbilder stammen aus dem zum Zeitpunkt 8M gewonnenen Femurpräparaten. Mit zunehmenden Abstand zur Kortikalis zeigte sich der Trabekelabstand in allen Gruppen größer werdend. In der OVXDS-Gruppe konnte die geringste Trabekeldicke erhoben werden. mineralisierter Knochen = schwarz, Muskeln und Knorpel = rot, Knochenmark = braun bis grau; Maßstabsbalken \cong 5 mm.

Die deskriptive Analyse des Osteoids im Femur spiegeln die Beobachtungen in den Beckenkammstanzen wider. In der OVXD-Gruppe war geringfügig mehr Osteoid verglichen mit der OVX- und der Kontrollgruppe vorzufinden. In der OVXDS-Gruppe

war erneut der dem Knochen aufliegende dünne Osteoidsaum etwas breiter und bedeckte mehr Knochenoberfläche als in den anderen Gruppen (Abb. 28).

5.3.2.3 Lendenwirbelkörper

Die histologischen Schliffe der LWK bildeten nicht nur den gesamten LWK, sondern auch den Wirbelbogen und zum Teil die Querfortsätze ab (Abb. 29).

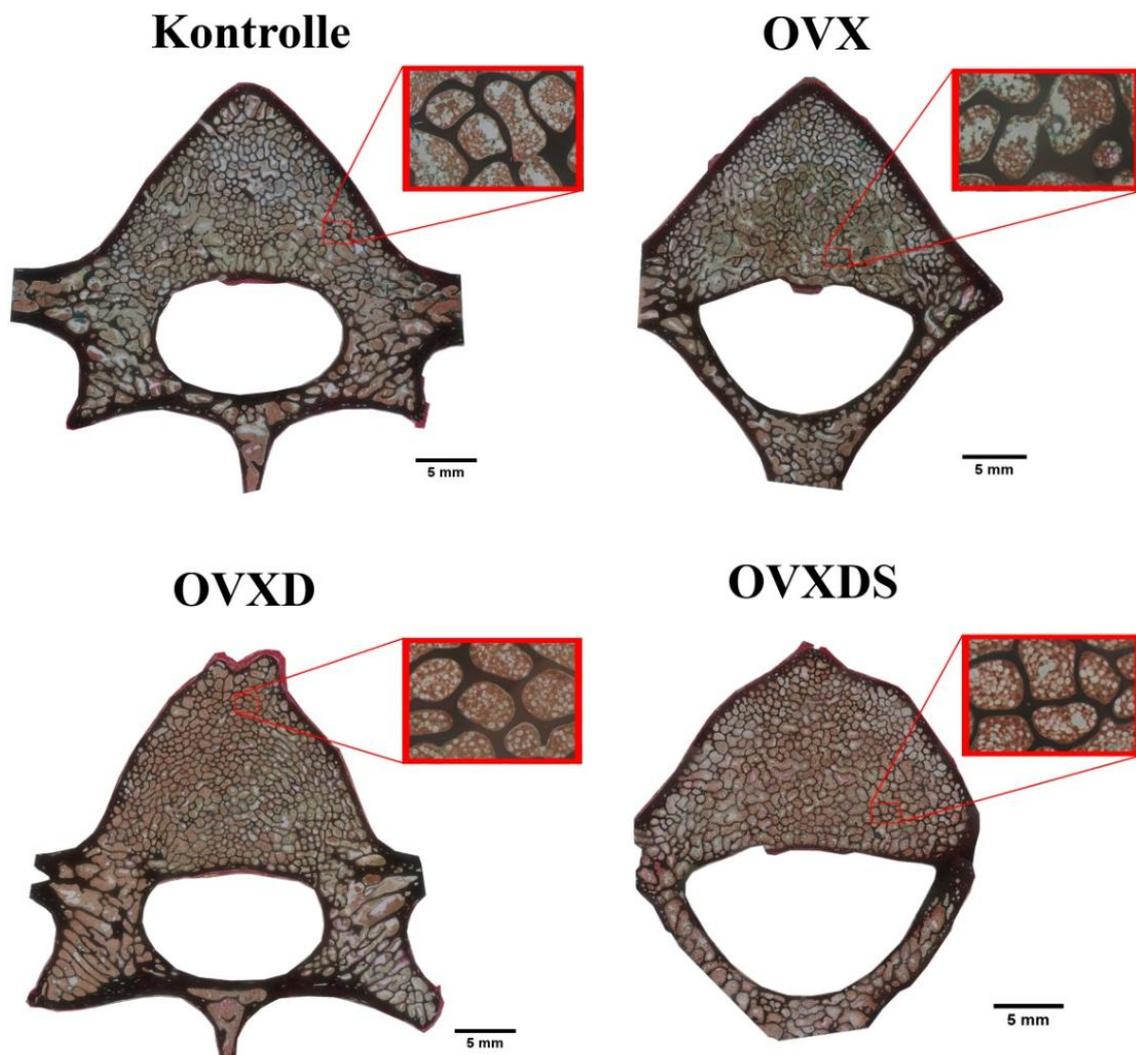


Abb. 29: Übersichtsbilder der von Kossa / van Gieson gefärbten LWK.

Es sind nebeneinander Übersichtsbilder der LWK einer jeden Gruppe zum Zeitpunkt 8M dargestellt. Aus der Übersicht ließen sich keine markanten Unterschiede zwischen der Kontroll-, der OVX- und der OVXD-Gruppe feststellen. Die mikroskopisch beschreibbare Abnahme der Trabekeldicke und Vernetzung der OVXDS-Gruppe sind aus der Übersicht nur eingeschränkt erkennbar.

mineralisierter Knochen = schwarz, Muskeln = rot, Knochenmark = braun bis grau; Maßstabsbalken \cong 5 mm.

Die von der Kortikalis umgebene Spongiosa war als reich verzweigtes Netzwerk zu erkennen. Ihre Dicke und Verzweigung wich in der OVXDS-Gruppe deutlich von dem der anderen Gruppen ab. Der Osteoidgehalt unterschied sich zwischen der Kontroll-, der

OVX- und der OVXD-Gruppe nur kaum. Lediglich die OVXDS-Gruppe zeigte erneut einen etwas breiteren und mehr mineralisierten Knochen bedeckenden Osteoidsaum (Abb. 29).

5.4 Histomorphometrie Beckenkamm

5.4.1 Histomorphometrie der Trabekelparameter

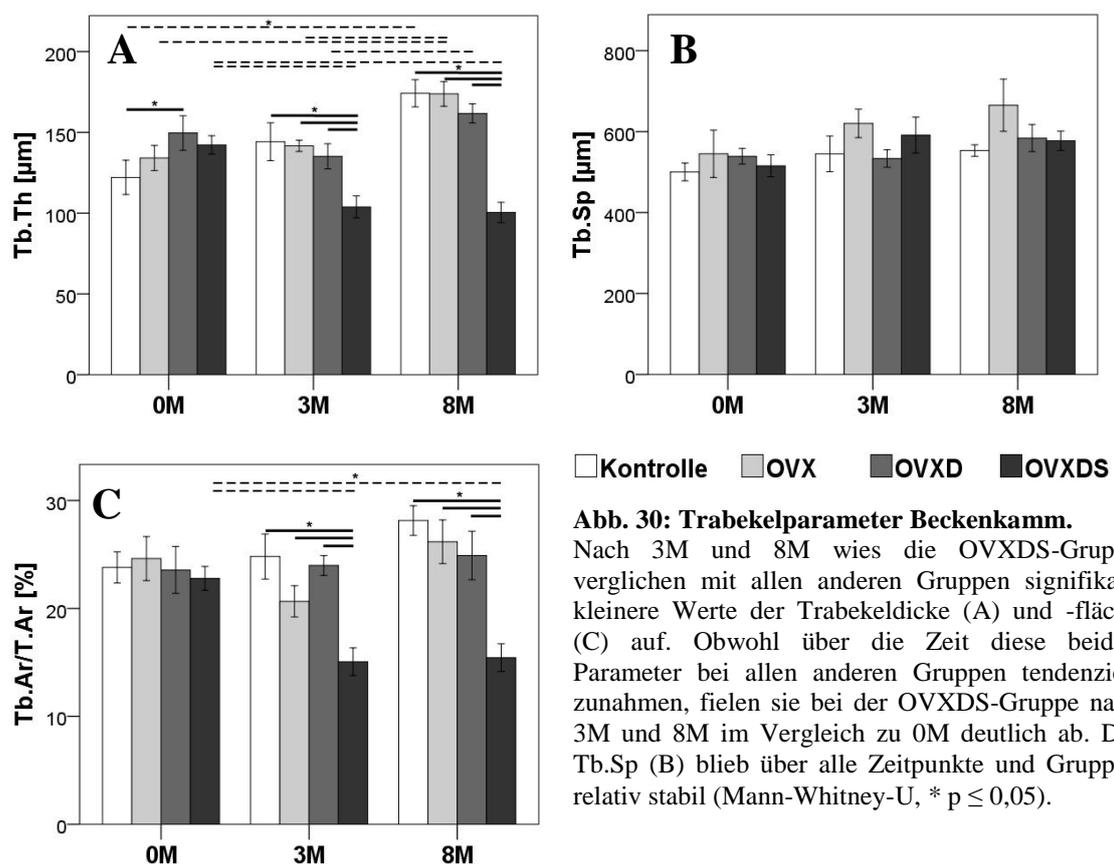
Die quantitative Analyse der Trabekelparameter erfolgte an den von Kossa / van Gieson gefärbten Präparaten aller Regionen und Zeitpunkte. Bestimmt wurden die Trabekeldicke (Tb.Th), der Trabekelabstand (Tb.Sp) und der prozentuale Anteil der Trabekelfläche zur Gesamtfläche (Tb.Ar/T.Ar). Diese Parameter ermöglichen es, Veränderungen des trabekulären Knochens genauer zu beschreiben. Tabellen mit den erhobenen Messwerten und signifikanten p-Werten befindet sich im Anhang ab S.120 (Tab. 9 - Tab. 14).

Zum Zeitpunkt 0M betragen die mittlere Tb.Th im Beckenkamm der Kontrollgruppe 122 μm , der OVX-Gruppe 134 μm , der OVXD-Gruppe 150 μm und der OVXDS-Gruppe 142 μm . Somit bestand eine Signifikanz zwischen der Kontroll- und der OVXD-Gruppe. Zum Zeitpunkt 3M war die mittlere Tb.Th von der OVXDS-Gruppe (104 μm) signifikant kleiner als die der anderen Gruppen (Kontrollgruppe: 144 μm , OVX-Gruppe: 142 μm und OVXD-Gruppe: 135 μm). Beim Vergleich zwischen der Kontroll-, der OVX- und der OVXD-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Nach 8M hatte die OVXDS-Gruppe (100 μm) erneut die signifikant dünnsten Trabekel. Unter der Kontroll-, der OVX- und der OVXD-Gruppe war keine Signifikanz zu erheben (Kontrollgruppe: 174 μm , OVX-Gruppe: 174 μm und OVXD-Gruppe: 162 μm) (Abb. 30A).

Beim Vergleich innerhalb der Gruppe zwischen den Zeitpunkten stellte sich heraus, dass nach 3M bei der OVXDS-Gruppe eine signifikant kleinere Tb.Th bestand als nach 0M. Die Kontroll- und die OVX-Gruppe hatten nach 8M signifikant höhere Messergebnisse und die OVXDS-Gruppe signifikant kleinere verglichen mit 0M. Zwischen den Zeitpunkten 3M und 8M bestanden Signifikanzen bei der OVX- und der OVXD-Gruppe. Die im Vergleich größeren Werte wurden nach 8M gemessen (Abb. 30A).

Die Tb.Sp aller Gruppen wiesen zum Zeitpunkt 0M vergleichbare Werte auf (Kontrollgruppe: 501 μm , OVX-Gruppe: 546 μm , OVXD-Gruppe: 539 μm und OVXDS-Gruppe: 516 μm). Nach 3M hatte die OVX-Gruppe (620 μm) gefolgt von der OVXDS-Gruppe (534 μm) die größten Trabekelabstände (Kontrollgruppe: 545 μm und OVXD-Gruppe: 592 μm). Diese erhobenen Unterschiede erwiesen sich jedoch als statistisch nicht signifikant. Zum Zeitpunkt 8M zeigte die OVX-Gruppe erneut die höchsten Werte (665 μm), jedoch mit einer großen Streuung und keiner Signifikanz (Kontrollgruppe: 553 μm , OVXD-Gruppe: 584 μm und OVXDS-Gruppe: 578 μm) (Abb. 30B).

Beim Vergleich zwischen den Zeitpunkten war lediglich bei der OVX-Gruppe ein nicht signifikanter Anstieg auszumachen. In keiner der Gruppen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten in Bezug auf die Tb.Sp erhoben werden (Abb. 30B).



Beim Vergleich der Tb.Ar/T.Ar fiel zum Zeitpunkt 0M kein großer Unterschied zwischen den Gruppen auf (Kontrollgruppe: 23,8 %, OVX-Gruppe: 24,6 %, OVXD-Gruppe: 23,6 % und OVXDS-Gruppe: 22,8 %). Nach 3M wies die OVXDS-Gruppe (15,1 %) verglichen mit allen anderen Gruppen (Kontrollgruppe: 24,8 %, OVX-Gruppe: 20,7 %

und OVXD-Gruppe: 24,0 %) die signifikant kleinste Trabekelfläche auf. Zwischen der Kontroll-, der OVX- und der OVXD-Gruppe waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Dieses Verhältnis bildete sich nach 8M erneut ab. Die OVXDS-Gruppe (15,4 %) zeigte erneut die signifikant kleinsten Werte. Zwischen der Kontroll- (28,1 %), der OVX- (26,2 %) und der OVXD-Gruppe (24,9 %) konnte kein signifikanter Unterschied erhoben werden (Abb. 30C).

Beim Vergleich der Zeitpunkte innerhalb der jeweiligen Gruppe bezogen auf den Messwert Tb.Ar/T.Ar fielen lediglich die signifikant kleineren Werte in der OVXDS-Gruppe nach 3M und 8M verglichen mit 0M auf. Die Kontroll-, die OVX- und die OVXD-Gruppe zeigten keine signifikanten Differenzen zwischen den jeweiligen Zeitpunkten (Abb. 30C).

5.4.2 Histomorphometrische Darstellung des Osteoidgehalts

Die histomorphometrische Analyse des Osteoidanteils wurde an den von Kossa / van Gieson gefärbten Präparaten des Beckenkamms, des Femurs und der LWK durchgeführt. In 5-facher bzw. 2,5-facher Vergrößerung wurden die Osteoidfläche (O.Ar) und die mineralisierte Knochenfläche der Spongiosa bestimmt. Die Normalisierung der O.Ar erfolgte auf die Trabekelfläche (Tb.Ar). Die Tabellen mit den erhobenen Messwerten und signifikanten p-Werten befindet sich im Anhang ab S.123 (Tab. 15 + Tab. 16).

Die zum Zeitpunkt 0M in den Beckenkammstanzen gemessenen Osteoidanteile pro Knochenfläche der vier Gruppen lagen alle sehr nah beieinander (Kontrollgruppe: 15,08 %, OVX-Gruppe: 15,29 %, OVXD-Gruppe: 13,00 % und OVXDS-Gruppe: 13,13 %) (Abb. 31).

Nach 3M der Behandlungen maß der Osteoidanteil pro Knochenfläche von der OVXDS-Gruppe (16,37 %) signifikant mehr als von der Kontroll- (11,93 %), der OVX- (13,18 %) und der OVXD-Gruppe (12,85 %).

8M nach Versuchsbeginn hatte die OVXDS-Gruppe (20,08 %) signifikant mehr O.Ar/Tb.Ar verglichen mit allen anderen Behandlungsgruppen des gleichen Untersuchungszeitpunkts (Kontrollgruppe: 10,44 %, OVX-Gruppe: 10,16 % und OVXD-Gruppe: 12,22 %).

Beim Vergleich der Zeitpunkte innerhalb der einzelnen Gruppen zeigte sich in der OVX-Gruppe nach 8M signifikant weniger Osteoid als nach 0M und 3M. Innerhalb der der

OVXDS-Gruppe gab es zwischen allen Messpunkten einen signifikanten Anstieg der Werte (Abb. 31).

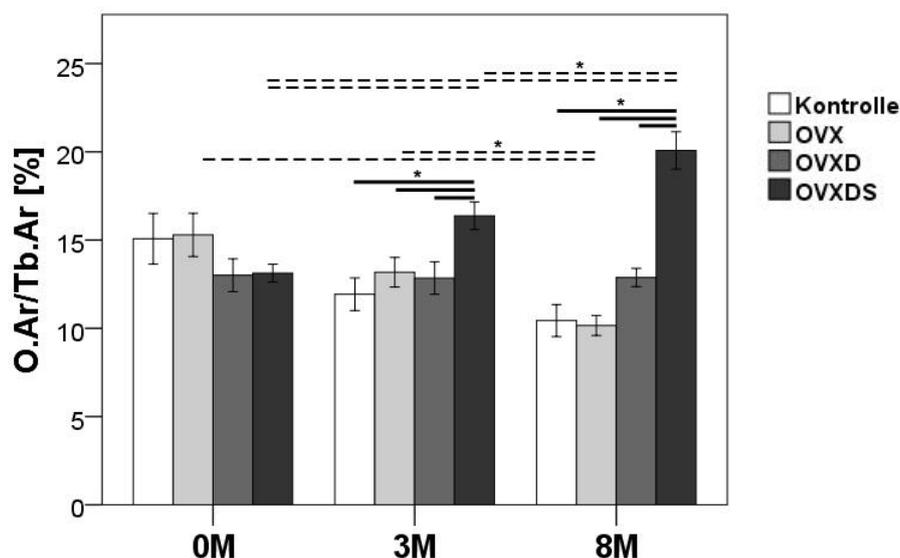


Abb. 31: O.Ar/Tb.Ar im Beckenkamm.

Die Abbildung zeigt die Messwerte der O.Ar/Tb.Ar in den Beckenkammstanzen zum Zeitpunkt 0M, 3M und 8M. Der Osteoidanteil nach 3M und 8M in der OVXDS-Gruppe erreichte signifikant höhere Werte verglichen mit allen anderen Gruppen zum gleichen Zeitpunkt. Im Vergleich der Zeitpunkte erreichte die OVX-Gruppe nach 8M signifikant kleinere Werte als nach 0M oder 3M. Der Osteoidanteil der OVXDS-Gruppe wies zum Zeitpunkt 3M signifikant größere Werte als nach 0M auf. Nach 8M zeigte sich die O.Ar/Tb.Ar der OVXDS-Gruppe noch höher mit einer signifikanten Differenz verglichen mit dem Zeitpunkt 0M und 3M (Mann-Whitney-U, * $p \leq 0,05$).

5.4.3 Bestimmung der Mineralisationsrate mittels Fluoreszenzmarkierung

Die Erhebung der MAR wurde an drei durch Randomisierung bestimmten Schafen jeder Gruppe durchgeführt, die in einem 7- bzw. 8-tägigen Intervall in den letzten Wochen vor der Euthanasie (8M) Fluoreszenzfarbstoffe injiziert bekamen. Die ungefärbten und nicht entkalkten PMMA-Proben von Beckenkamm und Femur wurden mithilfe von Fluoreszenzfiltern unter dem Mikroskop abfotografiert (Abb. 36) und histomorphometrisch ausgewertet. Eine Tabelle mit den erhobenen Messwerten und eine mit den signifikanten p-Werten befindet sich im Anhang ab S.124 (Tab. 17 + Tab. 18). Im Folgenden werden die Ergebnisse aus dem Beckenkamm vorgestellt.

Nach 8M Behandlung zeigten die Kontroll- ($1,88 \mu\text{m/d}$), die OVX- ($1,98 \mu\text{m/d}$) und die OVXD-Gruppe ($1,92 \mu\text{m/d}$) eine annähernd gleiche MAR im Beckenkamm. Lediglich die mittlere MAR der OVXDS-Gruppe ($1,48 \mu\text{m/d}$) blieb um ca. $0,45 \mu\text{m/d}$ dahinter. Zwischen diesen Messungen konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden (Abb. 32).

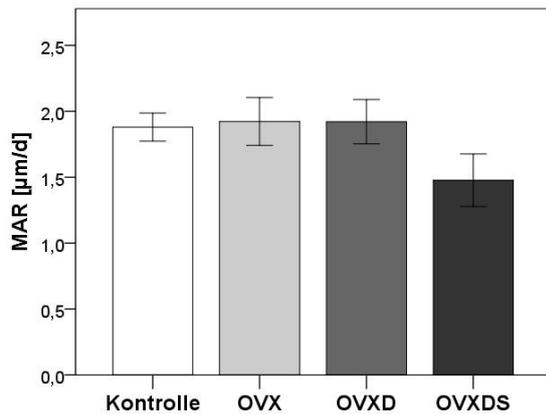


Abb. 32: Mineralisationsrate (MAR) im Beckenkamm.

In den Beckenkammschnitten wurde die geringste MAR in der OVXDS-Gruppe gemessen, jedoch wiesen sie keine statistische Signifikanz auf (Mann-Whitney-U, * $p \leq 0,05$).

5.5 Histomorphometrie Femur

5.5.1 Histomorphometrie der Trabekelparameter

Die quantitative Analyse der Trabekelparameter erfolgte an den von Kossa / van Gieson gefärbten Präparaten aller Regionen und Zeitpunkte. Bestimmt wurden die Trabekeldicke (Tb.Th), der Trabekelabstand (Tb.Sp) und der prozentuale Anteil der Trabekelfläche zur Gesamtfläche (Tb.Ar/T.Ar). Diese Parameter ermöglichen es, Veränderungen des trabekulären Knochens genauer zu beschreiben. Tabellen mit den erhobenen Messwerten und signifikanten p-Werten befinden sich im Anhang ab S.120 (Tab. 9 - Tab. 14). Im Folgenden werden die quantitativen Ergebnisse des Femurs nach 8M Behandlung vorgestellt.

Nach 8M des Versuchsprotokolls zeigte sich in der OVXDS-Gruppe des Femurs die kleinste Tb.Th (Kontrollgruppe: 300 µm, OVX-Gruppe: 379 µm, OVXD-Gruppe: 326 µm und OVXDS-Gruppe: 170 µm). (Abb. 33A). Jedoch erwiesen sich die Unterschiede aufgrund der kleinen Probengröße als nicht signifikant.

Die Tb.Sp im Femur verteilte sich von der Kontroll- bis zur OVXD-Gruppe mit zunehmenden Werten (Kontrollgruppe: 629 µm, OVX-Gruppe: 865 µm und OVXD-Gruppe: 909 µm). Der Messwert der OVXDS-Gruppe (809 µm) lag zwischen dem Wert der Kontroll- und der OVX-Gruppe. Doch auch hier konnte keine Signifikanz zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abb. 33B).

Die Werte der Tb.Ar/T.Ar nach 8M im Femur wurden mit Zunahme der Behandlungen von Gruppe zu Gruppe kleiner (Kontrollgruppe: 34,2 %, OVX-Gruppe: 29,7 %, OVXD-Gruppe: 25,3 % und OVXDS-Gruppe: 15,7 %). Auch diese Differenzen konnten nicht mit einer statistischen Signifikanz belegt werden (Abb. 33C).

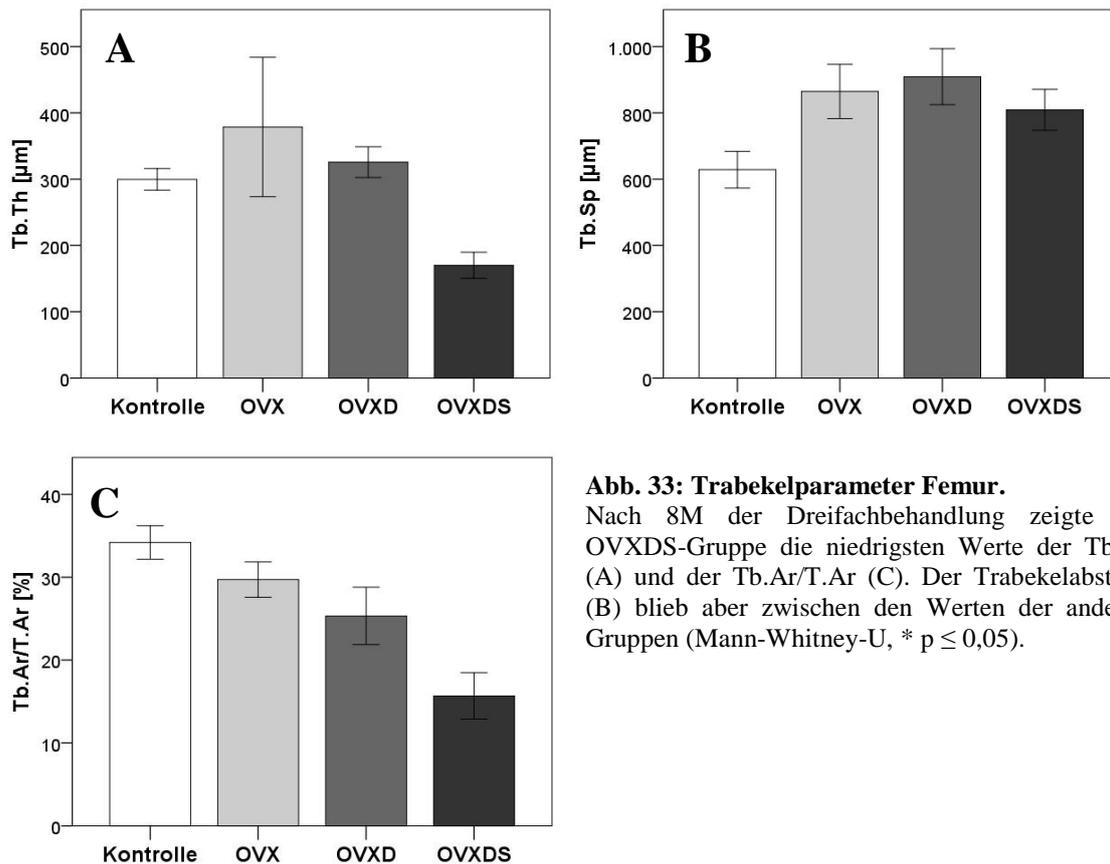


Abb. 33: Trabekelparameter Femur.

Nach 8M der Dreifachbehandlung zeigte die OVXDS-Gruppe die niedrigsten Werte der Tb.Th (A) und der Tb.Ar/T.Ar (C). Der Trabekelabstand (B) blieb aber zwischen den Werten der anderen Gruppen (Mann-Whitney-U, * $p \leq 0,05$).

5.5.2 Histomorphometrische Darstellung des Osteoidgehalts

Die histomorphometrische Analyse des Osteoidanteils wurde an den von Kossa / van Gieson gefärbten Präparaten des Beckenkamms, des Femurs und der LWK durchgeführt. In 5-facher bzw. 2,5-facher Vergrößerung wurden die Osteoidfläche (O.Ar) und die mineralisierte Knochenfläche der Spongiosa bestimmt. Die Normalisierung der O.Ar erfolgte auf die Trabekelfläche (Tb.Ar). Tabellen mit den erhobenen Messwerten und signifikanten p-Werten befindet sich im Anhang ab S.123 (Tab. 15 + Tab. 16). Im Folgenden sind die Ergebnisse des Femurs beschrieben.

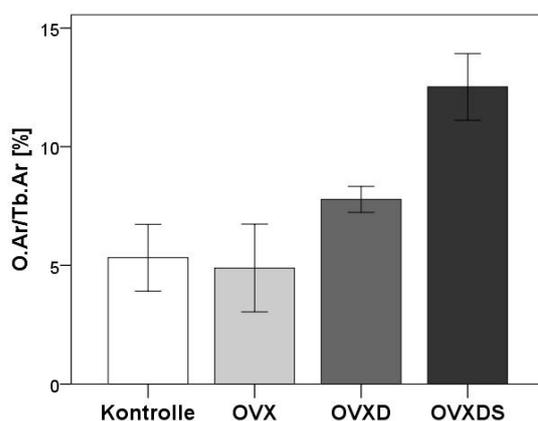


Abb. 34: O.Ar/Tb.Ar im Femur.

Die Abbildung zeigt die Messungen der O.Ar/Tb.Ar im Femur nach 8M. Verglichen mit der Kontroll- und der OVX-Gruppe sind die Werte in der OVXD-Gruppe erhöht. Die OVXDS-Gruppe zeigte die höchsten Messwerte in dieser Region, wenn auch nicht signifikant (Mann-Whitney-U, * $p \leq 0,05$).

Nach 8M Behandlung ordneten sich die Osteoidwerte im Femur in der Reihenfolge der Stufentherapie an. Dabei wies die Kontrollgruppe die geringsten und die OVXDS-Gruppe die höchsten Messwerte auf (Kontrollgruppe: 5,7 %, OVX-Gruppe: 5,9 %, OVXD-Gruppe: 8,6 % und OVXDS-Gruppe: 15,6 %). Eine exakte Signifikanz war in dem zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test nicht zu erheben (Abb. 34).

5.5.3 Bestimmung der Mineralisationsrate mittels Fluoreszenzmarkierung

Die Erhebung der MAR wurde an drei durch Randomisierung bestimmten Schafen jeder Gruppe durchgeführt, die in einem 7- bzw. 8-tägigen Intervall in den letzten Wochen vor der Euthanasie Fluoreszenzfarbstoffe injiziert bekamen. Die ungefärbten und nicht entkalkten PMMA-Proben von Beckenkamm und Femur wurden mithilfe von Fluoreszenzfiltern unter dem Mikroskop abfotografiert (Abb. 36) und histomorphometrisch ausgewertet. Tabellen mit den erhobenen Messwerten und mit den signifikanten p-Werten befindet sich im Anhang ab S.124 (Tab. 17 + Tab. 18). Im Folgenden werden die Messungen des Femurs vorgestellt.

In der OVXDS-Gruppe wurde im Femur die geringste MAR erhoben (1,02 $\mu\text{m}/\text{d}$). Dieser Unterschied war im Femur im Vergleich zu der Kontroll- (1,53 $\mu\text{m}/\text{d}$), der OVX- (1,95 $\mu\text{m}/\text{d}$) und der OVXD-Gruppe (1,90 $\mu\text{m}/\text{d}$) signifikant. Zwischen den drei anderen Gruppen ließen sich keine Signifikanzen feststellen (Abb. 35).

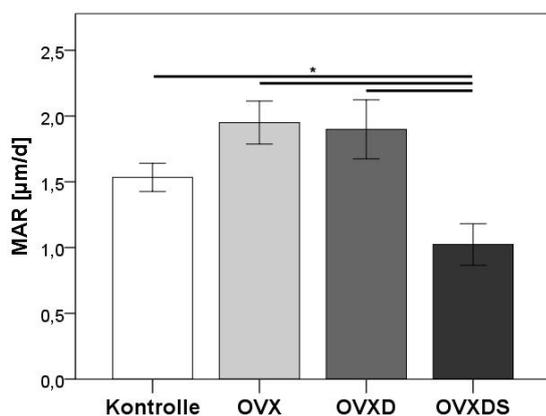


Abb. 35: Mineralisierungsrate (MAR) im Femur. In der zum Zeitpunkt 8M gemessenen MAR im Femur zeigte die OVXDS-Gruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen die signifikant geringsten Messwerte (Mann-Whitney-U, * $p \leq 0,05$).

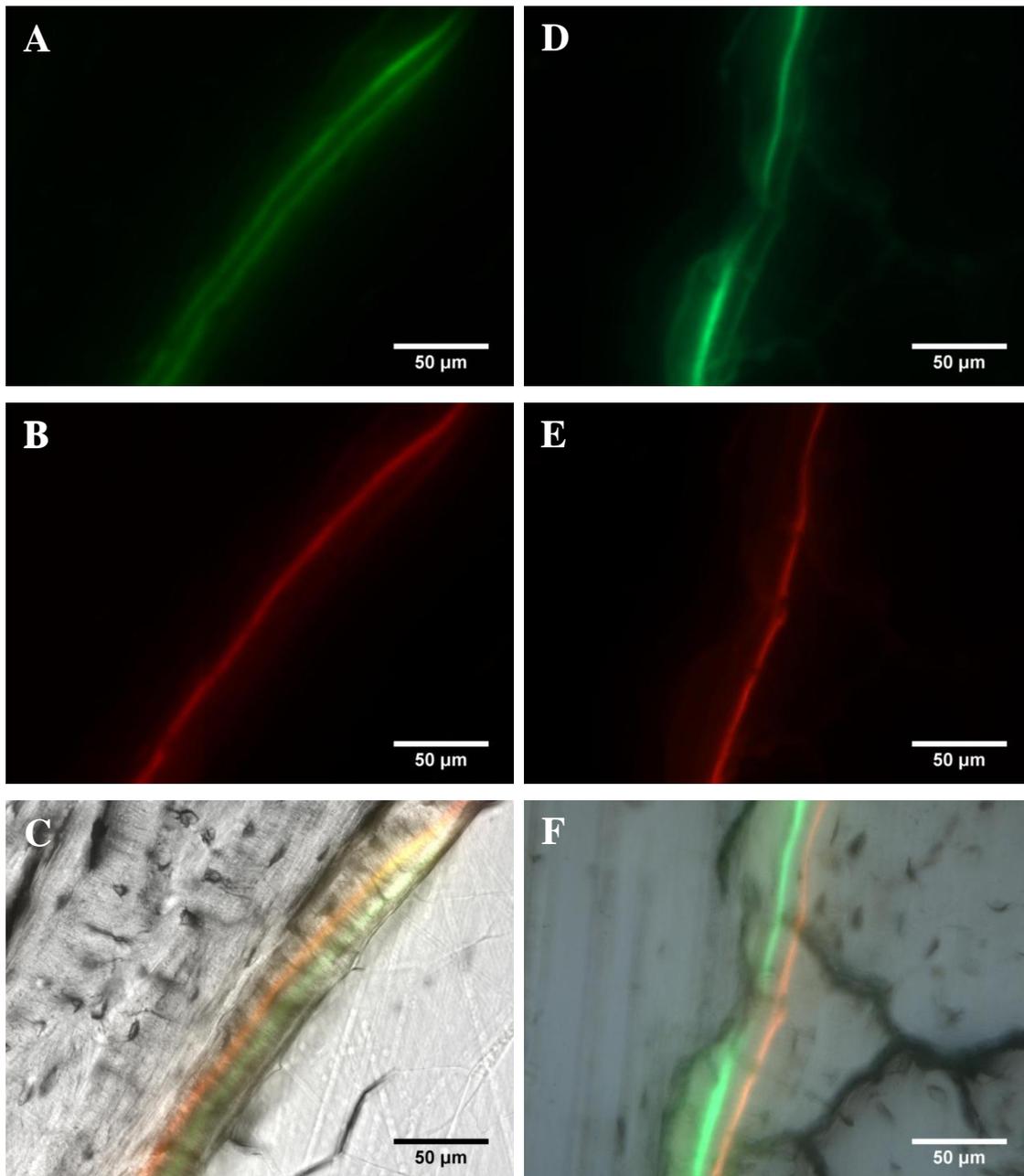


Abb. 36: Bestimmung der Mineralisierungsrate (MAR) in der Fluoreszenzmikroskopie.

Die Abbildungen (A) - (C) zeigen die unterschiedlichen Kanäle eines Femurschliffes der Kontrollgruppe. (D) - (F) zeigen die gleiche Skelettregion, gehören aber zu der OVXDS-Gruppe.

In (A) und (D) sind die grünen Calceinbanden, in (B) und (E) die roten Alizarinbanden und in (C) und (F) die beiden Fluoreszenzbanden in einem Bild der Hellfeldmikroskopie zu sehen. Die, einen Tag nach der Alizarinmarkierung erfolgte, erste Calceininjektion war in der Kontrollgruppe zu sehen und bei der OVXDS-Gruppe nur selten oder schwach zu finden. Ebenfalls war die eintägige MAR aus diesen beiden Banden nur schwer zu bestimmen, weshalb die MAR aus dem Abstand der beiden grünen Calceinmarkierungen oder der roten Alizarinmarkierung und der zweiten grünen Calceinbande bestimmt wurde (sieben bzw. achttägiges Intervall).

5.6 Histomorphometrie Lendenwirbelkörper

5.6.1 Histomorphometrie der Trabekelparameter

Die quantitative Analyse der Trabekelparameter erfolgte an den von Kossa / van Gieson gefärbten Präparaten aller Regionen und Zeitpunkte. Bestimmt wurden die Trabekeldicke (Tb.Th), der Trabekelabstand (Tb.Sp) und der prozentuale Anteil der Trabekelfläche zur Gesamtfläche (Tb.Ar/T.Ar). Diese Parameter ermöglichen es, Veränderungen des trabekulären Knochens genauer zu beschreiben. Tabellen mit den erhobenen Messwerten und signifikanten p-Werten befindet sich im Anhang ab S.120 (Tab. 9 - Tab. 14). Es folgen die Ergebnisse aus den Messungen im LWK zum Zeitpunkt 8M.

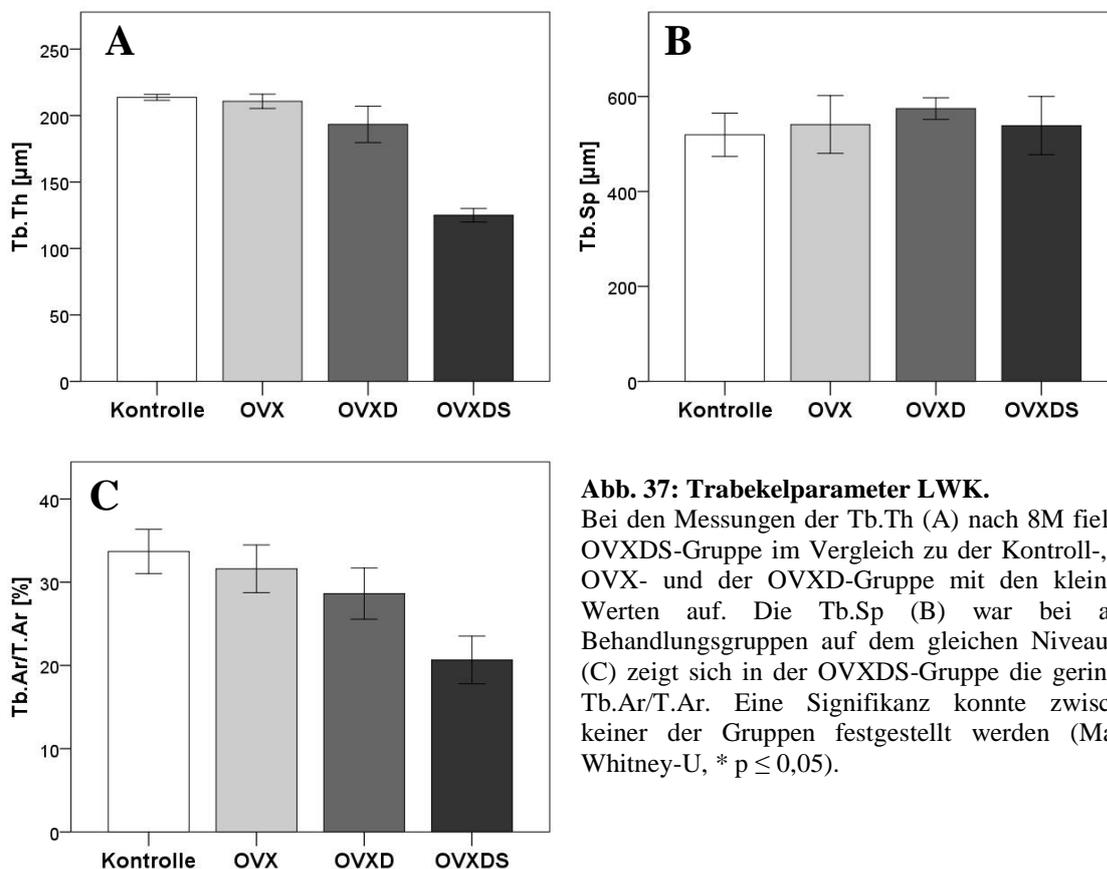


Abb. 37: Trabekelparameter LWK.

Bei den Messungen der Tb.Th (A) nach 8M fiel die OVXDS-Gruppe im Vergleich zu der Kontroll-, der OVX- und der OVXD-Gruppe mit den kleinsten Werten auf. Die Tb.Sp (B) war bei allen Behandlungsgruppen auf dem gleichen Niveau. In (C) zeigt sich in der OVXDS-Gruppe die geringste Tb.Ar/T.Ar. Eine Signifikanz konnte zwischen keiner der Gruppen festgestellt werden (Mann-Whitney-U, * $p \leq 0,05$).

Die Trabekelparametermessung der Tb.Th im LWK war nach 8M bei den Gruppen Kontrolle (214 μm), OVX (211 μm) und OVXD (193 μm) sehr dicht beieinander. Im Vergleich zu den anderen Gruppen zeigte lediglich die OVXDS-Gruppe mit 125 μm eine geringere Tb.Th, wenn auch nicht signifikant (Abb. 37A).

Die Kontroll- (519 μm), die OVX- (541 μm), die OVXD- (575 μm) und die OVXDS-Gruppe (539 μm) zeigten in Bezug auf die Tb.Sp im LWK ein sehr ähnliches Messniveau (Abb. 37B).

Beim Vergleich der Tb.Ar/T.Ar zwischen den Gruppen fiel auf, dass die OVXDS-Gruppe (20,7 %) im LWK die kleinsten Messergebnisse lieferte. Die Kontroll- (33,7 %), die OVX- (31,6 %), die OVXD- (28,6 %) und die OVXDS-Gruppe verband kein signifikanter Unterschied (Abb. 37C).

5.6.2 Histomorphometrische Darstellung des Osteoidgehalts

Die histomorphometrische Analyse des Osteoidanteils wurde an den von Kossa / van Gieson gefärbten Präparaten des Beckenkamms, des Femurs und der LWK durchgeführt. In 5-facher bzw. 2,5-facher Vergrößerung wurden die Osteoidfläche (O.Ar) und die mineralisierte Knochenfläche der Spongiosa bestimmt. Die Normalisierung der O.Ar erfolgte auf die Trabekelfläche (Tb.Ar). Tabellen mit den erhobenen Messwerten und signifikanten p-Werten befindet sich im Anhang ab S.123 (Tab. 15 + Tab. 16). Es folgen die Ergebnisse der LWK.

In den LWK-Schliffpräparaten zeigte die OVXDS-Gruppe nach 8M die größte O.Ar/Tb.Ar (14,6 %). Die Werte von der Kontroll- (6,0 %), der OVX- (5,2 %) und der OVXD-Gruppe (5,2 %) blieben dagegen deutlich enger beieinander. Ein signifikanter Unterschied war nicht zu ermitteln (Abb. 38).

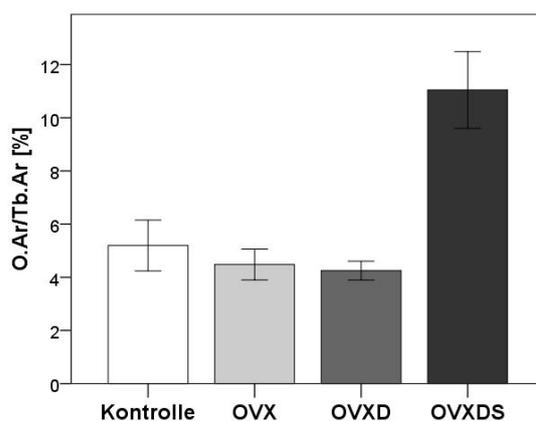


Abb. 38: O.Ar/Tb.Ar im LWK.

Die Abbildung zeigt die Messwerte der O.Ar/Tb.Ar nach 8M im LWK. Der Mittelwert der OVXDS-Gruppe stellt sich hier als zwei bis drei Mal so groß wie die der Kontroll-, der OVX- und der OVXD-Gruppe dar. Bei einer geringen Probenzahl konnte jedoch keine Signifikanz nachgewiesen werden (Mann-Whitney-U, * $p \leq 0,05$).

5.7 Vergleich der anatomischen Regionen: mechanisch belastet vs. unbelastet

In den vorangegangenen Abschnitten wurden Gruppen und Zeitpunkte innerhalb einer Probenlokalisierung gegenübergestellt. In den folgenden Absätzen geht es darum, die Messwerte zwischen den unterschiedlichen Biopsieregionen zu vergleichen. Dabei gibt es den unbelasteten Beckenkamm, das unter vertikaler Belastung stehende Femur und die bei Schafen unter horizontaler Belastung stehenden LWK. Es folgen sowohl die Vergleiche der einzelnen Regionen, als auch der Vergleich zwischen unbelasteten (Beckenkamm) und belasteten Regionen (Femur und LWK). Alle Vergleiche beziehen sich auf den Entnahmezeitpunkt 8M. Tabellen mit den erhobenen Messwerten und signifikanten p-Werten befindet sich im Anhang ab S.124 (Tab. 19 - Tab. 30).

5.7.1 Beckenkamm vs. Lendenwirbelkörper

Beim Vergleich der Tb.Th nach 8M wiesen die LWK deutlich höhere Messwerte auf als die Beckenkammpräparate. Die mittleren Werte der jeweiligen Gruppen der LWK lagen ca. 30 μm über denen der Beckenkämme. Dieser Unterschied erwies sich innerhalb der Kontroll- und der OVX-Gruppe als signifikant (Abb. 39A). Die Messungen der Tb.Ar/T.Ar zeigten in jeder Behandlungsgruppe im LWK höhere Mittelwerte als im Beckenkamm. Jedoch wiesen sie keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 39B). Beim Betrachten der O.Ar/Tb.Ar der OVX-, der OVXD- und der OVXDS-Gruppe zeigten die Beckenkammschnitte verglichen mit den LWK-Schliffen die signifikant höheren Messwerte. Dabei war der Osteoidanteil in den Beckenkammschnitten in allen Behandlungsgruppen circa doppelt so hoch wie in derselben Behandlungsgruppe im LWK. Auch die O.Ar/Tb.Ar der Kontrollgruppe erwies sich im Beckenkamm nahe dem doppelten Wert der O.Ar/Tb.Ar im LWK, wenn auch ohne nachweisbare Signifikanz (Abb. 39C).

5.7.2 Beckenkamm vs. Femur

Zum Zeitpunkt 8M waren die Tb.Th in den Femurschliffen signifikant größer als in den Beckenkammschnitten in allen vier Gruppen. Dabei vielen die mittleren Messwerte der Tb.Th verglichen mit den Beckenkammschnitten in den Femurschliffen meist doppelt so hoch aus. Trotz einer breiten Streuung konnten die höchsten Mittelwerte der Tb.Ar in der

OVX-Gruppe der Femurschliffe nachgewiesen werden (Abb. 39A). Die Messwerte der Tb.Ar/T.Ar wiesen in beiden Regionen in der Kontrollgruppe die größten Werte auf. Außerdem zeigten sich die Werte in beiden Regionen mit jeder Behandlungsstufe kleiner werdend. Auch wenn die Mittelwerte der Tb.Ar/T.Ar im Vergleich der Behandlungsgruppen zwischen den Regionen im Femur größer ausfielen, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Regionen nachgewiesen werden (Abb. 39B). Die Mittelwerte der O.Ar/Tb.Ar zeigten sich im Beckenkamm nahezu doppelt so hoch als im Femur. Eine signifikante Differenz konnte jedoch nur in der OVX-Gruppe nachgewiesen werden (Abb. 39C).

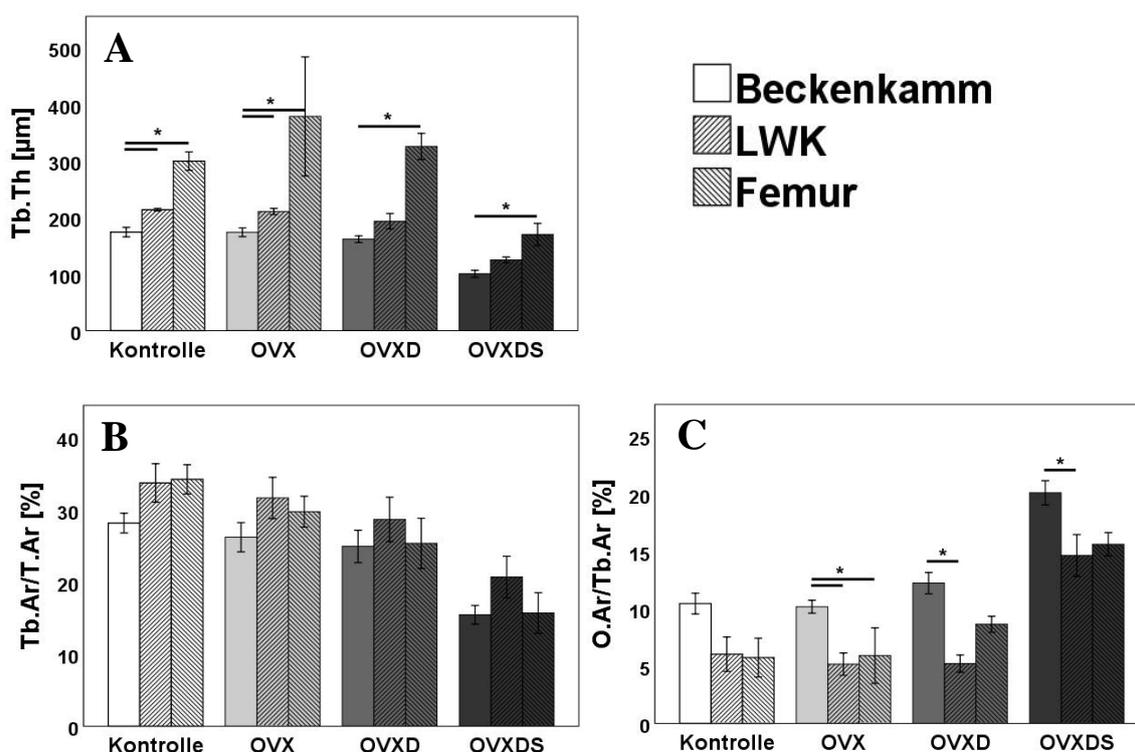


Abb. 39: Vergleich der anatomischen Regionen: Beckenkamm, LWK und Femur.

Die Tb.Th (A) erwies sich nach 8M im Femur in allen Behandlungsgruppen signifikant größer als im Beckenkamm. Beim Vergleich der Regionen in Bezug auf die Tb.Ar/T.Ar (B) zeigte sich nur in der Kontrollgruppe zwischen dem Beckenkamm und dem LWK ein signifikanter Unterschied. Verglichen mit dem Beckenkamm erzielten die OVX-, die OVXD- und die OVXDS-Gruppe der LWK signifikant tiefere Messwerte der O.Ar/Tb.Ar (C) (Mann-Whitney-U, * $p \leq 0,05$).

Lendenwirbelkörper vs. Femur

Im Vergleich der Tb.Th nach 8M lagen die Mittelwerte der Femurpräparate in den jeweiligen Gruppen 1,5 mal höher als die der LWK-Präparate. Mitbedingt durch eine kleine Probenzahl konnte keine Signifikanz festgestellt werden (Abb. 39A). Dem gegenüber stehen die Messungen der Tb.Ar/T.Ar, die in den Gruppen OVX, OVXD und

OVXDS verglichen mit den Femurschliffen in den LWK-Schliffen die geringfügig höheren Werte erzielten. Auch diese Differenzen durften nicht als signifikant eingestuft werden. Die Tb.Ar/T.Ar der Kontrollgruppe war in beiden Skelettregionen auf dem gleichen Niveau (LWK: 33,7 % und Femur: 34,2 %) (Abb. 39B) angesiedelt. Die O.Ar/Tb.Ar der Kontrollgruppe unterschieden sich im LWK und Femur allenfalls geringfügig (LWK: 6,0 % und Femur: 5,7 %). In der OVX-, der OVXD- und der OVXDS-Gruppe lagen die Messwerte im Femur oberhalb denen der LWK, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb. 39C).

5.7.3 unbelastet (Beckenkamm) vs. belastet (Femur und Lendenwirbelkörper)

In Bezug auf die Tb.Th waren beim Vergleich der unbelasteten Beckenkammregion mit den belasteten Regionen in allen vier Gruppen signifikant höhere Werte in den belasteten Regionen zu erheben (Abb. 40A). Beim Betrachten der Tb.Ar/T.Ar zeigten sich beim Vergleich der Regionen der Kontrollgruppe signifikant höhere Werte in den belasteten Regionen. Die Mittelwerte der Tb.Ar/T.Ar der belasteten Regionen lagen ebenfalls in der OVX-, der OVXD- und der OVXDS-Gruppe oberhalb der Mittelwerte in der unbelasteten Region, jedoch ohne nachweisbare Signifikanz (Abb. 40B). Die O.Ar/Tb.Ar verhielt sich gegenteilig und war in allen vier Gruppen in der unbelasteten Region signifikant größer (Abb. 40C).

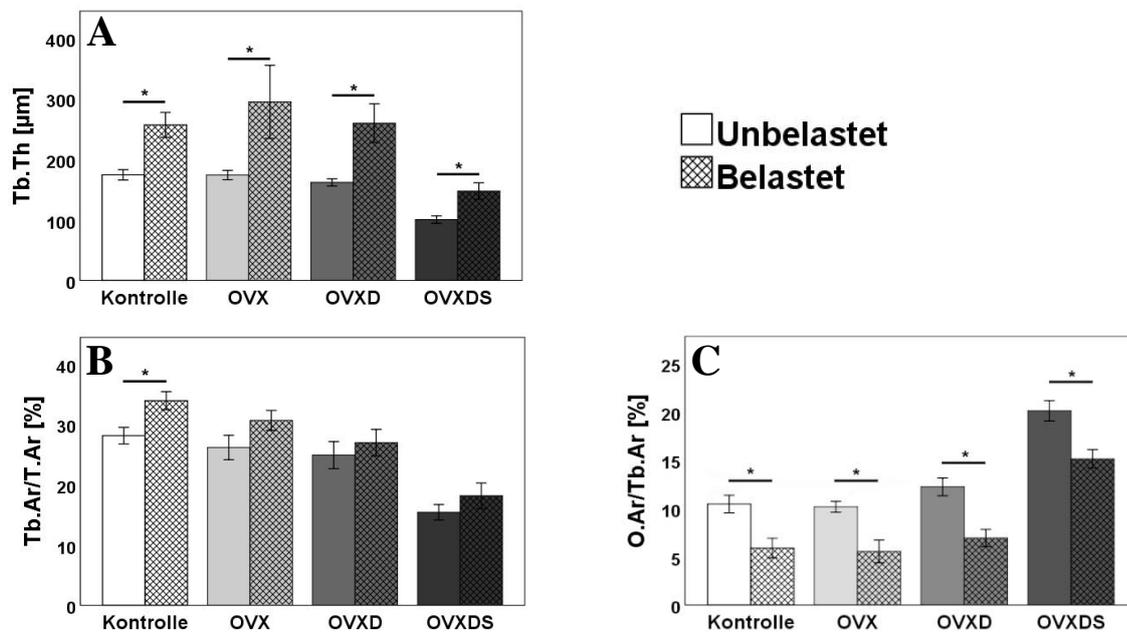


Abb. 40: Unbelastete vs. Belastete Regionen.

Sowohl in der Tb.Th (A) als auch in der O.Ar/Tb.Ar (C) unterschieden sich die unbelasteten von den belasteten Regionen in allen Behandlungsgruppen signifikant. Die Tb.Ar/T.Ar (B) zeigte nur in der Kontrollgruppe signifikante Differenzen (Mann-Whitney-U, * $p \leq 0,05$).

6 Diskussion

Die Behandlung und Frakturversorgung von an Osteoporose leidenden Patientinnen ist in unserer alternden Gesellschaft eine wachsende Aufgabe der medizinischen Versorgung. Trotz Verwendung neuester Knochenimplantate versagen diese häufig im osteoporotischen Knochen. Die Folgen einer insuffizienten Versorgung spiegeln sich in der hohen Mortalität der Patientinnen mit osteoporotischen Frakturen wider. Um dem entgegen zu wirken, ist die Entwicklung neuer Knochenimplantate und Ersatzstoffe in einem systemisch erkrankten Knochen von größter Bedeutung. Um dem Anspruch gerecht zu werden, sind den Leitlinien der U. S. Food and Drug Administration folgend geeignete Klein- und Großtiermodelle vonnöten, die den menschlichen an Osteoporose erkrankten Knochen nachahmen [213]. Dabei bietet sich das Schaf als Großtiermodell besonders an, da sein Skelett dem des Menschen in Größe, Gewicht und Struktur sehr ähnelt. Zudem sind Schafe ruhige bzw. fügsame Tiere, einfach zu halten und kostengünstig auch in großer Menge zu erwerben [155]. Durch diese Eigenschaften ist es möglich, Implantate zu testen, Knochenbiopsien am Beckenkamm zu entnehmen als auch Blut- und Urinproben zu gewinnen. Der initiale plexiforme Knochen junger Schafe wird durch Knochenremodeling mit der BMU in einen Lamellenknochen mit einem bereits nach ca. einem Jahr gut entwickelten Haversian-System umgewandelt. Dieser Lamellenknochen ist dem menschlichen Knochen in Mikro- und Makrostruktur sehr ähnlich. Jedoch ist die BMD und der BMC des Schafsknochens deutlich höher. Ebenfalls unterscheidet sich der menschliche Ovulationszyklus mit einer mittleren Dauer von 28 Tagen und einem Östrogenpeak von 300 - 600 pg/ml von dem eines Schafes, welcher eine mittlere Dauer von 17 Tagen und einen Östrogenpeak von 8 - 10 pg/ml aufweist. Dies spiegelt den geringeren Einfluss von Östrogen auf den Knochenmetabolismus des Schafes wider. Ein weiterer großer Unterschied, der für die Testung von Arzneimittelwirkungen wichtig ist, stellt der sich vom Menschen stark unterscheidende Aufbau des Gastrointestinaltrakts eines Wiederkäuers dar [155, 217].

Der dieser Studie zugrunde liegenden Tierversuch wurde der 3R-Regel (Refine, Replace, Reduce) sowie den Animal Research Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) - Guidelines angepasst [112]. Es wurde in denselben Tieren sowohl die Osteoporoseinduktion als auch die Frakturheilung zu unterschiedlichen Zeitpunkten histologisch untersucht. Außerdem wurde jedes Schaf radiologisch, serologisch und biomechanisch analysiert. Die im Folgenden präsentierten Erkenntnisse beziehen sich auf

die in der Histologie gewonnen Ergebnisse der Trabekelparameter und Mineralisation nach 0M, 3M und 8M aus dem Versuchsprotokoll.

Auch wenn in Kleintiermodellen die Osteoporose mehrheitlich durch eine reine Ovariectomie induziert wird, so ist der Erfolg der alleinigen Ovariectomie im Schaf umstritten. Manche Studien zeigen nach 3M und 6M eine veränderte Knochenstruktur, auch wenn andere Studien diese Veränderung nach 6M und längeren Zeiträumen nicht bestätigen. Bereits 2002 haben Lill et al. in einer Pilotstudie von acht Schafen die Kombination einer Ovariectomie mit einer Diät (kalzium- und Vitamin D-arm) und/oder Steroiden durch radiologische Untersuchungen beschrieben [126]. Histologische Ergebnisse für den Erfolg einer Dreifachtherapie, jedoch mit rein kalziumarmer Diät ohne Vitamin D-Entzug, beschrieben Zarrinkalam et al. 2009 [241]. In dieser Studie wurde aufgrund der bereits vorliegenden Studien eine Stufentherapie aus Ovariectomie, kalzium- und Vitamin D-armer Diät und Steroidinjektionen gewählt. Die Kombination dieser Behandlungen erreichte in der vorliegenden experimentellen Studie bereits nach 3M einen osteoporotischen Knochenstatus, der radiologisch und histomorphometrisch nachgewiesen werden konnte. Es zeigte sich eine trabekuläre Destruktion mit Abnahme der Trabekelfläche und -dicke, jedoch blieb eine Zunahme des Trabekelabstandes aus. Außerdem konnte sowohl statisch als auch dynamisch in dieser Versuchsgruppe ein Mineralisationsdefekt aufgezeigt werden. Die Analyse der Ergebnisse aus verschiedenen Skelettregionen lässt ebenfalls Rückschlüsse auf den Einfluss der Belastung auf die Entwicklung eines osteoporotischen Knochenstatus zu.

6.1 Saisonaler Rhythmus im Schaf

Beim Betrachten der Kontrollgruppe im zeitlichen Verlauf fällt auf, dass auch diese im Versuchsverlauf gewissen Schwankungen unterlag. Im Vergleich zu 0M und 3M waren besonders die 8M-Werte der Trabekeldicke und -fläche erhöht und der Osteoidgehalt vermindert. Jedoch ist diese Tendenz nicht nur in der Kontroll-, sondern auch in der OVX- und der OVXD-Gruppe festzustellen. Eine mögliche Erklärung dafür können die verschiedenen Jahreszeiten der Probenentnahme sein. Die Studie wurde von Ende Oktober bis Anfang Juli durchgeführt. Somit fällt der Zeitpunkt 0M in den Herbst, 3M in den Winter und 8M in den Sommer. Die erhöhten Trabekelparameter decken sich mit den Ergebnissen, die Arens et al. 2007 [10] veröffentlichten. Hier wurden saisonale

Unterschiede der BMD im Schaf von bis zu 5,1 % zwischen Winter mit den niedrigsten Werten und Frühling sowie Sommer mit den höchsten Werten beobachtet [10]. Diese jahreszeitabhängige Schwankung lässt sich auch bei postmenopausalen Frauen wiederfinden [18, 166]. Mögliche Ursachen können die Varianz der körperlichen Aktivität und die Sonnenstrahlung mit Auswirkung auf den Hormonhaushalt sein. Interessanterweise sind solche saisonalen Unterschiede keine alleinige Beobachtung des Großtiermodells, sondern lassen sich auch bei Kleintiermodellen wie beispielsweise bei Mäusen nachweisen [49]. Daher ist es in jedem Tiermodell wichtig, unterschiedliche Ergebnisse durch veränderte Testvariablen von saisonalen Einflüssen trennen zu können. Um sicher zu stellen, dass in dieser Studie erbrachte Ergebnisse nicht aufgrund saisonaler Schwankungen auftraten, ist immer ein Vergleich zu anderen Versuchsgruppen zu dem selben Zeitpunkt möglich. Hierbei fiel die Wahl auf das Merinolandschaf, da es im Vergleich zu anderen Schafen geringere saisonale Unterschiede aufweist [207].

6.2 Variablen des Studienmodells

6.2.1 Ovariectomie

Die Ovariectomie ist in Tierexperimenten eine verbreitete Methode zum Auslösen eines Östrogenmangels. Insbesondere in Kleintiermodellen mit Ratten oder Mäusen führt sie zur Entstehung eines Knochenmasseverlustes [103, 219]. Im Großtiermodell des Schafes ist die Auswirkung dieser Operation divergent. Während manche Studien einen Knochenmasseverlust beschreiben, so propagieren andere, keine Auswirkung auf die Knochenmasse beobachtet zu haben [13, 198, 218]. Eine mögliche Ursache dieses Phänomens könnte der geringe Östrogenpeak des weiblichen Zyklus bei Schafen von lediglich 8 - 10 pg/ml sein. Der Basisöstrogenspiegel wird bei Schafen mit 2 - 3 pg/ml angegeben. Auch durch eine Ovariectomie soll dieser Basalspiegel kaum erniedrigt werden. Als Grund wird eine extragonadale Produktion von Östrogen im Fettgewebe angenommen [168].

Eine genauere Untersuchung des Östrogenspiegels nach der Ovariectomie im Schaf von Sigrist et al. 2007 [198] über einen Zeitraum von 12 Monaten zeigte, dass der Spiegel einer saisonalen Rhythmik in der Kontrollgruppe unterliegt. Nach einer Ovariectomie sank der Östrogenspiegel in den ersten drei Monaten auf nicht messbare Werte, um sich anschließend erneut den saisonalen Werten der Kontrollgruppe anzugleichen [198]. Diese

Beobachtung stärkt erneut die zuvor genannte Hypothese einer extragonadalen Östrogenproduktion im Schaf. Außerdem lässt es die Schlussfolgerung zu, dass die alleinige Ovariectomie im Langzeitexperiment eines Schafes nicht für die Induktion einer postmenopausalen Osteoporose geeignet ist. Um einen dem Menschen ähnelnden Effekt zu erreichen, müssten zusätzlich Aromatasehemmer oder eine Mangeldiät zusammen mit Glukokortikoiden eingesetzt werden. Eine Untersuchung der extragonadalen Östrogenproduktion könnte zudem weitere Erkenntnisse über Pathomechanismen der Osteoporoseentstehung beim Schaf erbringen.

Dennoch zeigten Sigrist et al. 2007 [198] einen geringen Knochenmasseverlust innerhalb der ersten drei Monate durch die Ovariectomie. Dies ging mit einem erhöhten Knochenmetabolismus einher [198]. Jedoch waren diese im Serum messbaren Knochenmetabolismusmarker in unserem Tierexperiment zwischen der Kontroll- und der OVX-Gruppe nicht nachweisbar [122].

6.2.2 Diät mit Vitamin D- und Kalziummangel

Während die Versuchsgruppen OVXD und OVXDS über den gesamten Versuchsablauf kalzium- und Vitamin D-reduziertes Futter erhielten, konnten die Tiere der Gruppen Kontrolle und OVX in den warmen Monaten auf der Weide fressen und erhielten in den Wintermonaten Ergänzungsfutter mit normalen Kalzium- und Vitamin D-Gehalt. Obwohl es bekannt ist, dass Vitamin D nicht nur aus der Nahrung stammt, sondern endogen mit Hilfe von Sonneneinstrahlung synthetisiert wird [90, 93, 117], zeigten sich in den serologischen Untersuchungen der Gruppen OVXD und OVXDS teils signifikant verminderte Vitamin D-Werte im Vergleich zu den Gruppe Kontrolle und OVX. Interessanterweise lagen die serologischen Vitamin D-Werte der OVXDS-Gruppe signifikant unter den Werten der OVXD-Gruppe [122]. Diese Ergebnisse bestätigen nicht nur den Erfolg der diätischen Vitamin D-Therapie, sondern implizieren, dass regelmäßige Steroidinjektionen die Vitamin D-Spiegel im Schaf senken. In retrospektiven Studien konnte dieser Effekt auch beim Menschen gefunden werden. Bei Kindern mit Asthma bronchiale konnte eine inverse Korrelation zwischen der verabreichten Dexamethasonmenge und dem Vitamin D-Serumspiegel festgestellt werden [192].

Ein niedriger Vitamin D-Spiegel sowie Kalziummangel gehören zu den bekannten Stimuli eines sekundären Hyperparathyreodismus. Dieser verstärkt durch hohe PTH-Spiegel die Knochenresorption und damit die Freisetzung von Kalzium und

Phosphat. Außerdem bewirkt es in der Niere eine Retention von Kalzium und vermehrte Ausscheidung von Phosphat [162]. Die Hypothese, einen sekundären Hyperparathyreodismus in der OVXD- und der OVXDS-Gruppe ausgelöst zu haben, bestätigten die verminderten Kalzium- und vermehrten Phosphatmessungen im Urin der Schafe nach 3M und 8M [122].

Ebenfalls konnte in einem vorangegangenen Experiment unserer Arbeitsgruppe durch die Kombination aus bilateraler Ovariectomie und Mangeldiät (Vitamin D-, Kalzium-, Phosphat-, Vitamin K- und Vitamin C-Mangel) bei Ratten ein sekundärer Hyperparathyreodismus mit signifikanter PTH-Erhöhung ausgelöst werden [16].

6.2.3 Steroidinjektionen

In dieser Studie wurde den Schafen der Dreifachtherapiegruppe 320 mg Methylprednisolon alle 2 Wochen verabreicht. Dabei ist die systemische Glukokortikoidwirkung mit vielen Nebenwirkungen verbunden, weswegen dieses Studienmodell häufig kritisiert wird. Von den acht Schafen der OVXDS-Gruppe verstarb eines frühzeitig, ein anderes erlitt kurz vor Versuchsende eine proximale Femurfraktur und bei einem Teil der Schafe bildete sich eine Alopezie aus. Klopffstein Bregger et al. 2007 [114] untersuchten die Nebenwirkungen der Steroidinjektionen je nach Applikationsrhythmus im Schafmodell der Osteoporose. Sie verabreichten jedem Versuchstier die gleiche absolute Glukokortikoiddosis. Diese wurde je nach Versuchsgruppe in tägliche Injektionen, eine Injektion alle drei Tage, eine Injektion alle drei Wochen und täglichen Injektionen mit hoher initialer Dosis und stufenweiser Reduktion der Einzelapplikationsdosis aufgeteilt. Es zeigten sich in allen Gruppen die gleichen knöchernen Veränderungen. Jedoch waren in der Gruppe mit den Injektionen alle drei Wochen die geringsten Nebenwirkungen festzustellen [114]. Demzufolge wurde auch in unserem Studienmodell die Glukokortikoidgabe in wenigen Applikationen (alle 2 Wochen) mit höherer Dosis (320 mg Methylprednisolon) durchgeführt.

Eine komplette Alternative zu den regelmäßigen Steroidinjektionen im Schafmodell bietet die Möglichkeit, über einen erhöhten intracerebroventrikulären Leptinspiegel Osteoporose bzw. eine Osteopenie zu induzieren [63]. Neusten Studienerkenntnissen zufolge kann dies durch eine Durchtrennung der Hypothalamus-Hirnanhangsdrüsen-Achse erreicht werden. Dies kombiniert mit der bilateralen Ovariectomie führte bei Beil et al. 2012 [17] im Schafmodell nach 12 Monaten zu einer Osteopenie mit geringem

Knochenmetabolismus. Die Vorteile gegenüber dem vorliegenden Modell sind die geringeren systemischen Nebenwirkungen durch die Steroide. Nachteile sind die vergleichsweise geringeren trabekulären Destruktionen, die hohen Operationskosten sowie deren Aufwand [17]. Jedoch bleibt festzuhalten, dass das in unserer Studie verwendete Osteoporosemodell der Pathophysiologie der Osteoporoseentstehung im Menschen näherkommt. Inwiefern dieses alternative Studienmodell sich gegenüber dem hier vorgestellten Modell als vorteilhaft erweist, bleibt abzuwarten, insbesondere, da alle Studien hierzu bis jetzt nur aus einer Arbeitsgruppe aus Hamburg und Ulm stammen [17, 21, 153, 154, 201].

6.2.4 Einfluss des Alters auf den Knochenstatus bei Schafen

Die Versuchstiere dieser Studie hatten ein Durchschnittsalter von 5,5 Jahren. Die jüngsten Tiere waren 3 Jahre alt, die ältesten 9 Jahre. In dieser Studie fielen keine altersabhängigen Unterschiede der Trabekeldicke oder -fläche oder des Osteoidgehalts zwischen den Tieren auf. Das deckt sich mit den Erkenntnissen von Lill et al. 2003, die zwischen zwei Versuchsgruppen mit einem Alter von 3 - 5 und 7 - 9 Jahren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede feststellen konnten [127].

6.3 Optimierung der Histomorphometrie

Um über histologische Schnitte nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Aussagen treffen zu können, bedarf es der Histomorphometrie. Jedoch sollten solche Aussagen bzw. Beobachtungen nicht an Einzelfällen, sondern möglichst an einem größeren Kollektiv festgestellt werden. Dies bedeutet, dass die mit großem Aufwand verbundene Histomorphometrie aufgrund der Probenzahl weiter ausgedehnt werden muss. Diesen Ansprüchen folgend wurden auch in der hier vorgestellten Studie deskriptive Beobachtungen quantifiziert.

Die Histomorphometrie folgt den ASBMR-Standards und schließt das Loch zwischen der zweidimensionalen Histologie und dem dreidimensionalen Goldstandard der Knochenforschung, der Micro-Computertomographie (μ CT). Sie bietet einen tieferen Einblick in zelluläre Abläufe, ermöglicht die Detektion von Biomarkern und lässt uns die Mineralisation nachverfolgen. Sie ist Grundbestandteil der Knochenforschung und zeigt

zudem eine signifikant hohe Korrelation mit μ CT-Untersuchungen an menschlichen Knochenbiopsien [52, 78, 146].

Wichtige Grundlage für eine fehlerarme Histomorphometrie ist die Wahl einer geeigneten Färbung und Software. Durchgeführt wurden die meisten quantitativen Analysen dieser Studie an von Kossa / van Gieson gefärbten Präparaten mit starken Kontrasten zwischen den einzelnen zu bestimmenden Geweben/Bereichen. Die digitale Auswertung wurde mit ImageJ sowie dem darin integrierten Plug-Ins wie Trainable Weka Segmentation und BoneJ durchgeführt (Siehe 4.10, S. 39).

ImageJ ist eine Java gestützte und Plattform übergreifende Open-Source-Software des National Institut of Health mit vielen integrierbaren Plug-Ins zur Bildbearbeitung [177, 186]. ImageJ beinhaltet viele unterschiedliche Funktionen, wie das Definieren einer ROI, das Messen von Längen und den Zellen-Zähler. Arganda-Carreras et al. 2017 entwickelten ein benutzerfreundliches Plug-In namens Trainable Weka Segmentation zum quantitativen Segmentieren von mikroskopischen Bildern [11]. Doube et al. 2010 veröffentlichten BoneJ, welches ein Plug-In zur Berechnung von Trabekelparametern aus computertomographischen Bildern darstellt [57].

Um die repetitiven, manuell durchzuführenden Arbeitsschritte nach initialer Kalibrierung zu vermeiden, wurden zwei selbstgeschriebene Makros verwendet. Diese ermöglichten die semi-automatische Auswertung ganzer Ordner voller Präparate der gleichen Färbung. Die beschriebene Methode bzw. das Makro wurde mit unterschiedlichen Färbungen wie HE, Toluidin blau, Trichrom Masson Goldner, von Kossa / van Gieson und ausgewählten immunhistochemischen Färbungen sowie mit verschiedenen Vergrößerungen getestet. Um die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit dieser Methode zu evaluieren, wurde von zwei Benutzern an unterschiedlichen Arbeitsplätzen eine Gruppe von Bildern ausgewertet und mit der manuellen Bildauswertung mittels GIMP verglichen. Außerdem wurde ein einzelnes Bild achtmal segmentiert. Die Ergebnisse von Tb.Ar./T.Ar waren nicht signifikant abweichend [133].

Die zuvor beschriebene Methode ist eine sehr zeitsparende Variante, jedoch nicht die einzig Mögliche. Auf der Suche nach einer softwaregestützten Histomorphometrie sind sowohl kommerzielle als auch frei zugängliche Programme zu finden. Zum einen existiert die schon zuvor erwähnte Methode in GIMP, zum anderen lässt sich alternativ Adobe Photoshop nutzen. Dabei werden ausgewählte Bereiche im jeweiligen Programm markiert und anschließend die markierte Fläche mit ImageJ bestimmt [20, 65]. Der Vorteil daran ist, dass der Benutzer in jedem Bild selbst die Zuordnung vornimmt. Der Nachteil ist

jedoch, dass diese Zuordnung sehr zeitintensiv ist und die benutzerabhängige Varianz der Auswertung zunimmt.

Eine optimierte Methode entwickelten Zhang et al. 2016 [243] mit Visiopharma. Sie beschreiben die Implementierung der Software in HE / Alcianblau gefärbten Mäusefemur-Allografts zur Quantifizierung von neu gebildetem Knochen, Knorpel und Bindegewebe [243]. Bei Visiopharma handelt es sich um einen kommerziellen Analysealgorithmus, der in definierten Färbungen bestimmter Tiere Gewebe und Strukturen automatisch erkennt. Jedoch ist diese Form der Histomorphometrie im Knochen aktuell auf die Frakturheilung bei Mäusen beschränkt. Im Vergleich dazu ist die von uns vorgestellte Methode nicht nur frei zugänglich, sondern auch schon an Schafs-, Ratten-, Mäuse- und Humanenproben getestet. Zusätzlich ist sie durch eigene Modifikation beliebig erweiterbar.

Van't Hof et al. 2017 [222] beschreiben mehrere Open-Source-Plugins für ImageJ namens TrapHisto, OsteoidHisto und CalceinHisto, die eine einfache Benutzeroberfläche bieten und zur semiautomatischen Bestimmung von Knochenparametern wie Knochenresorption, Osteoid und MAR entwickelt wurden [222]. Vorteil dieser Methode ist, dass auch Artefakte einfach beseitigt werden können. Der größte Nachteil gegenüber unserer Etablierung von Trainable Weka Segmentation ist, dass der Benutzer während der gesamten Bearbeitung anwesend sein muss. Bei der von uns beschriebenen Methode ist der Benutzer lediglich bei der anfänglichen Initiierung gefordert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die zuvor beschriebenen Makros, die auf Basis von ImageJ mit den Plug-Ins Trainable Weka Segmentation und BoneJ laufen, auf die Bedürfnisse des jeweiligen Benutzers gut anpassbar sind und aufgrund der Stapelverarbeitung sehr viel Arbeitszeit ersparen können.

6.4 Entnahmeort der Knochenproben

In dieser Studie wurden Knochenproben aus dem Beckenkamm, der Lendenwirbelsäule und dem distalen Femur entnommen. Bei den jeweiligen Regionen ist sowohl der Entnahmeort als auch die Orientierung der Trabekel zu beachten. Im Beckenkamm sind die Trabekel nur geringfügig anisotrop. Das ermöglicht es, von einem zweidimensionalen Bild auf die dreidimensionale Struktur schließen zu können. Jedoch variiert die Tb.Ar/T.Ar in Abhängigkeit der Entnahmestelle. So zeigten Amling et al. 1996 [4], dass beim Menschen eine Entnahme ein Zentimeter dorsal der Spina iliaca anterior superior

signifikant höhere Werte der BMD aufwies, als eine Entnahmestelle sechs oder zehn Zentimeter dorsaler [4, 38, 190].

In den LWK unterscheidet sich die trabekuläre Orientierung zwischen der transversalen und horizontalen Ebene (anisotrop). Insgesamt wird sie als bienenwabenartig orientierte, knöcherne, konzentrische Ringe unterschiedlicher Größe beschrieben, welche an der Hinterkante des Wirbelkörpers beginnen. Interessanterweise ist der altersabhängige Knochenmasseverlust als ein Rückgang der horizontalorientierten Trabekel beschrieben [4, 98].

Knochenproben im Femur weisen die höchste BMD der drei untersuchten Regionen auf. Die Trabekeldicke variiert je nach Region (Epiphyse, Metaphyse und Diaphyse) und ist der physischen Belastung folgend größtenteils vertikal orientiert [4, 181].

Diesen Erkenntnissen folgend wurden transversale Schnitte des Femurs und horizontale Schnitte der LWK-Präparate durchgeführt. Bei der Beckenkammstanzenentnahme wurde auf ein bestmöglich nah beieinanderliegenden Entnahmeort geachtet. Lediglich die Seite der Entnahme wurde variiert, was nach Chappard et al. 2008 keinen Einfluss auf die Ergebnisse zeigt [37].

6.5 Trabekuläre Destruktion durch Steroide

Beim Betrachten der Tb.Th und Tb.Ar/T.Ar im Beckenkamm ergibt die Histomorphometrie in der Kontrollgruppe nach 3M und 8M die höchsten Werte.

Die bilaterale Ovariectomie mit dem Induzieren eines Östrogenmangels wird im Menschen als einer der wichtigsten Faktoren für die Entstehung einer Osteoporose angenommen [115, 165]. Dieser Mechanismus wird hauptsächlich über $ER\alpha$ vermittelt. Ein Ausbleiben der Stimulation führt zu vermehrtem Knochenmetabolismus mit einem Defizit auf Seiten des Knochenaufbaus [173]. Diese östrogenabhängigen Mechanismen betreffen jedoch hauptsächlich den kortikalen Knochen. Der trabekuläre Knochen besitzt weniger $ER\alpha$ und mehr $ER\beta$, die deutlich höhere Wirkspiegel an Östrogen besitzen und somit auch weniger der Regulation von Östrogenen unterliegen [109]. Diese Erkenntnisse sind auf die Ergebnisse dieser Studie sehr gut übertragbar. Die in der OVX-Gruppe nach 3M und 8M gemessenen Trabekelparameter Tb.Th und Tb.Ar/T.Ar sind nur unwesentlich kleiner als die der Kontrollgruppe.

Auch wenn in Nagetieren die bilaterale Ovariectomie ein etabliertes Verfahren zur Reduktion der Knochenmasse ist, so ist bei Schafen die Knochenmasseänderung bzw. die

Änderung der Trabekelparameter sehr umstritten. Einzelne Studien berichten, dass insbesondere nach drei oder sechs Monaten, vergleichbar mit der Phase des high-turnover, die Knochenmasse abgenommen habe. Andere Studien widerlegen diese Annahme und berichten zusätzlich, dass nach längeren Versuchszeiträumen kein signifikanter Unterschied zu einer Kontrolle zu verzeichnen sei [13, 198, 218]. Die in dieser Studie erhobenen Ergebnisse zu den Trabekelparametern decken sich mit den Ergebnissen der letztgenannten Aussage. Eine weitere mögliche Erklärung für das beschriebene Phänomen könnte der lediglich geringe Abfall des Östrogenspiegels nach einer Ovariectomie beim Schaf sein [168]. Dieser lässt sich durch eine extragonadale Produktion von Östrogen im Fettgewebe erklären [168] und bedeutet einen geringen Einfluss der gonadalen Östrogenproduktion auf das Knochenremodeling.

Trotzdem wurde nach 3M ein nicht signifikant geringerer Wert von der OVX- zu der Kontrollgruppe gemessen. Interessant ist, dass im Vergleich zu allen anderen Gruppen einzig die OVX-Gruppe nach 3M und nach 8M eine größere Tb.Sp aufweist, auch wenn diese nicht signifikant ist. Ebenfalls konnten in ovariectomierten Ratten und postmenopausalen Frauen erhöhte Tb.Sp festgestellt werden [43, 197, 237].

Eine Diät mit verminderter Kalzium- und Vitamin D-Einnahme ist ein möglicher Trigger für den Knochenabbau. Er ist nicht nur für die Osteoporose, sondern ebenfalls für die Osteomalazie bzw. Rachitis bei Kindern bekannt. Der Wirkmechanismus dieser Mangelzustände führt zu einem sekundären Hyperparathyreodismus. Das bedeutet eine vermehrte Sekretion von PTH mit der Folge des vermehrten Knochenkatabolismus [73, 111].

Die OVXD-Gruppe zeigte in dieser Studie nur eine geringfügig, nicht signifikante, kleinere Tb.Th und Tb.Ar/T.Ar als die Kontroll- und die OVX-Gruppe nach 8M. Ebenfalls beschrieben Lill et al. 2002 [126] in ihrer Pilot-Studie nur eine geringe Wirkung der Diät in Kombination mit der bilateralen Ovariectomie. Eine deutlich größere Wirkung der kalzium- und Vitamin D-armen Diät stellten sie in Kombination mit der bilateralen Ovariectomie und mit Steroiden fest [126]. Studien über die alleinige kalzium- und Vitamin D-arme Diät in einem Schafmodell sind schwer zu finden, auch wenn der Mangel an Vitamin D, ausgelöst durch eine einseitige Ernährung mit karotinhaltigem Futter, als Auslöser einer Rachitis bekannt ist [56].

Die negative Wirkung von Glukokortikoiden ist multifaktoriell bedingt und wird sowohl über indirekte als auch direkte Effekte vermittelt. Diese führen zum einen zu einer verminderten Differenzierung und Funktion sowie zu einer vermehrten Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten mit der Folge einer verminderten Knochenneubildung. Zum anderen wird die Differenzierung weiterer Osteoklasten angeregt, sodass die Knochenresorption zunimmt [32]. Im Kleintiermodell bei Ratten zeigten sich jedoch bei alleinigen Glukokortikoidinjektionen je nach Alter und Dosis divergente Ergebnisse in Bezug auf Änderungen der Knochenmasse [152]. Bei Schafen konnte histologisch nach dreimonatiger Glukokortikoidapplikation kein signifikanter Unterschied der B.Ar/T.Ar und Tb.Th nachgewiesen werden [40]. Die Kombination von Glukokortikoiden mit einer kalzium- und phosphatarmen Diät zeigte im LWK und distalen Femur (μ CT Messungen) über einen Zeitraum von sieben Monaten eine signifikante Abnahme an Knochenvolumen/Gesamtvolumen (BV/TV) und Tb.Th. Dieser Unterschied sistierte aber bereits drei Monate nach dem Absetzen der Behandlung [55]. Die Kombination der Ovariectomie mit Glukokortikoiden zeigte im Modell von Augat et al. 2003 bei Schafen nach sechs und zwölf Monaten ebenfalls eine signifikante Abnahme des BV/TV, der Tb.Th sowie des BMDs der proximalen Tibia (μ CT Messung) [14]. Lill et al. 2002 [126] beschrieben erstmalig die Kombinationsbehandlung von Ovariectomie, kalzium- und Vitamin D-arter Diät und Glukokortikoidinjektionen als geeignetes Osteoporosemodell im Schaf. In ihrer Studie zeigte diese Dreifachtherapie gegenüber der Kombination von Ovariectomie und Glukokortikoiden nach sechs Monaten eine deutlich größere Trabekeldestruktion im Sinne einer verminderten BV/TV und Tb.Th. Diese Ergebnisse wurden jedoch nur in Versuchsgruppen von je zwei Schafen und unter μ CT Messung erhoben [126]. In den folgenden Jahren wurden sowohl radiologisch als auch histologisch unter leichten Veränderungen des Versuchsprotokolls ähnliche Resultate erzielt [114, 240, 242].

Passend zu den zuvor präsentierten Ergebnissen zeigten sich verglichen mit allen anderen Gruppen in der OVXDS-Gruppe nach 3M und 8M eine signifikant niedrigere BMD in dem LWK und dem Femur. Ebenfalls war in den Beckenkammstanzen der signifikant niedrigste Messwert für Tb.Th und Tb.Ar/T.Ar nach 3M und 8M histologisch nachzuweisen. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Steroidinjektionen ein sehr wichtiger Trigger für die Osteoporoseinduktion darstellen, aber verglichen mit den zuvor präsentierten Studien als alleiniger Auslöser einer Osteoporose nicht ausreichen. Es

scheint erst die Kombination aller drei verwendeter Trigger (Ovarektomie + Diät + Steroide) das deutliche Ausmaß der Veränderungen hervorzurufen.

Die Tb.Sp blieb in allen Versuchsgruppen zu allen Messzeitpunkten auf einem vergleichbaren Niveau. Auch Zarrinkalam et al. 2012 [242] konnten keinen signifikanten Unterschied der Tb.Sp in Beckenkambbiopsien feststellen [242]. Das lässt darauf schließen, dass die Abnahme an Knochenmasse zulasten der Trabekeldicke und nicht zulasten der Trabekelanzahl bzw. des Trabekelabstandes geht. Eine solche Veränderung der Trabekelparameter wurde sowohl im Menschen als auch in der Ratte, durch eine Glukokortikoid-Therapie ausgelöst, beschrieben [39, 150]. Interessanterweise steht diesen Erkenntnissen eine Zunahme an Tb.Sp und eine Abnahme der Trabekelanzahl bzw. -konnektivität in durch Ovarektomie induzierter Osteoporose der Ratten bzw. postmenopausalen Osteoporose des Menschen gegenüber [43, 196, 197]. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass die durch verschiedene Trigger ausgelöste Osteoporose sich in ihrer Pathophysiologie unterscheiden und zu divergenter trabekulärer Mikroarchitektur führen kann.

6.6 Mineralisationsdefekt nach Dreifachtherapie

Osteoporose und Osteomalazie haben gemeinsam, dass ein Vitamin D-Mangel als wichtiger Auslöser der Erkrankung bekannt ist. Es wird angenommen, dass ein Vitamin D-Spiegel < 15 nmol/l zur Osteomalazie führt. Ein weniger stark ausgeprägter Vitamin D-Mangel führt jedoch zu einem geringen Mineralisationsdefekt. Es verbleibt jedoch trotzdem ein sekundärer Hyperparathyreodismus mit der Folge eines hohen Knochenumsatzes und eines vermehrten Knochenabbaus, der letztlich zur Osteoporose führt [129]. Eine zweite Gemeinsamkeit ist, dass in radiologischen Messungen die BMD erniedrigt ist. Jedoch ist es durch Dichtemessungen nicht möglich Details über zelluläre Aktivität, Mineralisation und Knochenremodeling zu erfahren. Um somit die beiden Diagnosen sicher unterscheiden zu können, sind Knochenbiopsien und histomorphometrische Analysen vonnöten [19]. In dieser Studie konnte in den durchgeführten DXA-Untersuchungen in der OVXDS-Gruppe eine signifikant erniedrigte BMD festgestellt werden. Heiss et al. 2017 [87] errechneten mit Hilfe einer unabhängigen Gruppe von 32 gesunden Schafen einen Z-Score und einen T-Score für die in dieser Studie verwendeten Schafe. Der T-Score der OVXDS-Gruppe lag nach 3M bei -2,16 (LWK) und -2,34 (Femur). Nach 8M konnte ein T-Score der OVXDS-Gruppe von -2,88

(LWK) und -3,31 (Femur) bestimmt werden [87]. Wenn nun die Definition einer Osteoporose nach der WHO [235], die sich allein auf die radiologisch bestimmte BMD beruft, auf das Experiment übertragen wird, so wäre die Diagnose einer Osteoporose zu stellen.

Jedoch zeigte sich in der durchgeführten Histomorphometrie in der OVXDS-Gruppe neben einer verminderten Tb.Th und Tb.Ar/T.Ar auch vermehrt Osteoid in Form von gemessener O.Ar/Tb.Ar. Neben dieser statischen Bestimmung der Mineralisation konnte in der dynamischen Messung eine verlangsamte Mineralisation nachgewiesen werden. Diese wurde in Form der MAR durch den Abstand zweier Fluorochrombanden errechnet. Interessanterweise war ebenfalls die Osteoblastenaktivität (ALP-positiven-Fläche) in der OVXDS-Gruppe enorm gesteigert [141]. Diese Ergebnisse weisen auf einen Mineralisationsdefekt hin, wie er bei einer Osteomalazie auftritt [159]. Es besteht Grund zur Annahme, dass die kalzium- und Vitamin D-arme Diät einen sekundären Hyperparathyreodismus ausgelöst hat, der durch die Glukokortikoidapplikationen verstärkt wurde. Dies lässt sich an den verminderten Vitamin D-Serumwerten als auch an der verminderten Kalzium- und vermehrten Phosphatausscheidung im Urin in der OVXDS-Gruppe bestätigen [122]. Denn Glukokortikoide reduzieren die enterale Kalziumaufnahme und verändern die Dynamik der PTH-Ausschüttung aus der Nebenschilddrüse hin zu mehr pulsatiler und weniger tonischer Sekretion, von der ein negativer Einfluss auf die Knochenformation angenommen wird [25, 97].

Die dieser Studie vorangegangenen Tierversuche der gleichen Arbeitsgruppe an Ratten unter bilateraler Ovariectomie und Mangeldiät (Vitamin D-, Kalzium-, Phosphat-, Vitamin K- und Vitamin C-Mangel) wurden ähnliche Effekte beobachtet. Es wurden in den Behandlungsgruppen sowohl erhöhte PTH-Werte, erhöhte Osteoidwerte, erhöhte Osteoblastenaktivität (ALP+-Fläche), verminderter Kalziumgehalt im Knochen (TOF-SIMS) als auch verminderte BMD-Werte in der radiologischen DXA gemessen. Außerdem wurde eine geringere biomechanische Stabilität nachgewiesen [67].

Interessanterweise beschrieben Zarrinkalam et al. 2012 [242] andere Entdeckungen bezüglich der Mineralisation im Schafmodell der Osteoporose. Sie fanden in der Behandlungsgruppe ebenfalls eine verminderte MAR, jedoch war ihr Osteoidmesswert (Osteoid-Oberfläche/Trabekel-Oberfläche) in der Behandlungsgruppe niedriger als in ihrer Kontrolle, was gegensätzlich zu dieser Studie ist [242]. Diese divergente Messung kann unterschiedlich zu erklären versucht werden. Zum einen ist der Osteoidmesswert ein anderer und zum anderen wurde die Messung mit einer von Kossa / HE-Färbung und

nicht wie in dieser Studie anhand einer von Kossa / van Gieson-Färbung durchgeführt. Schon El Khassawna et al. 2017 zeigten große Unterschiede in der Osteoidbestimmung in Abhängigkeit der gewählten Färbung (von Kossa / Sarfanin O zu von Kossa / van Gieson) auf [66]. Jedoch gibt es noch einen dritten möglichen Erklärungsansatz. Die beiden verglichenen Studienmodelle unterscheiden sich insbesondere in der Vitamin D-Mangelernährung, die bei Zarrinkalam et al. 2012 nicht durchgeführt wurde [242]. In weiteren Tiermodellen ohne Vitamin D-Mangel wurden ebenfalls niedrigere Osteoidwerte gemessen (Massons's Trichrom bzw. Paragon) [8, 188]. Interessanterweise zeigte sich verglichen mit der Kontrolle im Beckenkamm und verglichen mit allem anderen Gruppen im LWK auch in dem vorliegenden Tiermodell in der Masson Goldner Trichrom-Färbung in der OVXDS-Gruppe weniger Osteoid [68].

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass durch die Diät ein sekundärer Hyperparathyreodismus, der in seiner Wirkungsweise durch Glukokortikoide verstärkt wird, aufgetreten ist, der zu einer gestörten Mineralisation mit vermehrter Osteoidablagerung geführt hat. Andererseits ist jedoch auch die Abnahme der Trabekeldicke und -fläche zu betrachten, die auf einen vermehrten Knochenabbau im Sinne einer Osteoporose zu bewerten ist. Somit lassen sich die zuvor beschriebenen Veränderungen weder rein der Osteoporose noch einer reinen Osteomalazie zuordnen. Passenderweise wurde bei Untersuchungen von osteoporotischen Schenkelhalsfrakturen in der Histologie auch osteomalatische Veränderungen gefunden [195].

Jedoch schmälern diese Beobachtungen nicht die Anwendbarkeit dieses Studienmodells, da ein biomechanisch geschwächter Knochen [68] mit verminderten BMD nachgewiesen wurde, der durch die beim Menschen üblichen Trigger hervorgerufen wurde.

6.7 Einfluss der mechanischen Belastung auf die Trabekelarchitektur

In der vorgestellten Studie am Schaf wurden zum Zeitpunkt 8M Knochenproben verschiedener Regionen entnommen. Zum einen wurden aus dem unbelasteten Beckenkamm, zum anderen aus dem unter großer axialer Belastung stehenden Femur Proben gewonnen. Die dritte zu vergleichende Region war die Lendenwirbelsäule, die sowohl beim aufrechtlaufenden Menschen als auch beim auf allen Vieren laufenden Schaf unter axialer Last steht [204]. Dem Wolff'schen Gesetz folgend passt sich der Knochen an die mechanischen Belastungen an [72]. Diese Theorie bekräftigend konnte in Experimenten aus dem Weltall unter Schwerelosigkeit als auch durch Immobilisation von

Tieren oder Skelettregionen gezeigt werden, dass die Abwesenheit von Belastung zu einer Abnahme der BMD mit Abnahme der Tb.Th führt [123, 143, 212]. Interessanterweise wurde nach der Immobilisation des Sprunggelenks eines Schafes mit Fixateur externe ein lokaler Knochenmasseverlust festgestellt, ohne dass Auswirkungen auf die contra laterale Seite und den Beckenkamm entstanden sind [212]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die ausgewerteten Beckenkammstanzen unabhängig von Belastung oder Entlastung und somit auch unabhängig von äußeren Einflussfaktoren wie eingeschränkte Mobilität zu sehen sind. Wenn auch im Versuchsaufbau keine Experimentalgruppe gewählt wurde, in der Schafe eine Entlastung als einzig geänderte Variable erfuhren, so ist trotzdem zwischen Weide- und Stallhaltung zu unterscheiden. Auf der Weide wurden die Kontroll- und die OVX-Gruppe und im Stall bzw. in offenen Außenboxen wurden die OVXD- und die OVXDS-Gruppe gehalten. Wenn auch die Diät keinen signifikanten Unterschied der Tb.Th und der Tb.Ar/T.Ar. zwischen der OVX- und der OVXD-Gruppe nach 8M in den Beckenkammschnitten auszulösen vermochte, so ist ebenfalls festzustellen, dass wie zuvor angenommen auch kein signifikanter Unterschied in den Beckenkammstanzen durch ein vermutlich geringeres Bewegungsausmaß in den Außenboxen verursacht wurde. Die angenommene Immobilität konnte jedoch auch in den belasteten Regionen der Lendenwirbelsäule und des Femurs keine signifikanten Unterschiede der Tb.Th und der Tb.Ar/T.Ar hervorbringen. Dies kann zum einen an einer vergleichbaren Mobilität aller Gruppen unabhängig der Unterbringung liegen. Zum anderen kann jedoch auch die geringe Probenanzahl der LWK und des Femurs mit $n = 3$ pro Versuchsgruppe der Auslöser sein.

Beim Vergleichen der belasteten und unbelasteten Regionen innerhalb der jeweiligen Gruppe fällt auf, dass die Tb.Th in den belasteten Regionen signifikant größer als im unbelasteten Beckenkamm gemessen wurde. Dagegen konnte im Vergleich der Tb.Ar/T.Ar nur in der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied erhoben werden.

Die in unserer Studie histologisch bestimmte geringere Tb.Th im Beckenkamm verglichen mit dem LWK konnten Oheim et al. 2017 [156] in ihrer Studie ebenfalls in der μ CT nachweisen. Jedoch konnten sie im distalen Femur deutlich geringer Tb.Th-Werte als die hier Vorgestellten erheben [156]. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine unterschiedlich gewählte ROI für diese Messung sein, die je nach Lokalisation (epiphysär, metaphysär oder diaphysär) die anisotrope trabekuläre Mikroarchitektur miteinschließt. Jedoch bleibt aufgrund der noch unveröffentlichten Daten der biomechanischen Testung abzuwarten, welche regionalen Unterschiede in Bezug auf die

maximale Belastung und die Steifigkeit zu erheben sind. Ebenso wäre die Korrelation zwischen biomechanischen Messgrößen und der Tb.Th bzw. Tb.Ar/T.Ar interessant.

Beim Betrachten des Osteoidanteils in den unbelasteten und belasteten Regionen, fällt ein signifikanter Unterschied in allen vier Versuchsgruppen auf. Die in den belasteten Regionen geringere O.Ar/Tb.Ar ist zum einen durch die erhöhte Tb.Th bzw. Tb.Ar/T.Ar in den belasteten Regionen erklärbar, da diese Messwerte in der Normalisierung auftauchen. Zum anderen könnten weitere Faktoren auch die anabole Wirkung der Belastung auf den Knochen und der positive Einfluss auf die Mineralisation sein, die über eine geringere SCL-Ausschüttung vermittelt werden [171, 223]. Interessanterweise machten Zarrinkalam et al. 2012 [242] ebenfalls die Beobachtung, dass in einer belasteten Skelettregion (Lendenwirbelsäule) weniger Osteoid zu finden war, verglichen mit einer unbelasteten Region (Beckenkamm). Ihre Ergebnisse stützen sich ebenfalls auf histomorphometrische Analysen, jedoch wurde der Parameter Osteoidoberfläche pro gesamtter Knochenoberfläche verwendet. Passend dazu waren in der belasteten Region mehr Osteozyten pro Knochenfläche zu finden, die eine Schlüsselrolle in der Regulation des Knochenmetabolismus einzunehmen scheinen [242].

7 Zusammenfassung

Jede vierte Frau über dem 50. Lebensjahr in Deutschland ist an Osteoporose erkrankt. Charakteristisch dafür ist eine verminderte Knochenqualität mit der Anfälligkeit bereits bei niederenergetischen Traumen zu brechen. Aufgrund des demographischen Wandels ist ein Anstieg von 115.248 osteoporotischer Frakturen im Jahr 2010 auf 273.794 im Jahr 2050 in Deutschland zu erwarten. Zur Gewinnung neuer Erkenntnisse sowie Entwicklung neuer Knochenersatzmaterialien und Implantate sind geeignete und gut beschriebene Tiermodelle vonnöten.

Im Folgenden wird ein osteoporotisches Großtiermodell an 31 Merinolandschafen beschrieben. Die Versuchstiere wurden dabei in vier Gruppen unterteilt und über 8 Monate (M) behandelt. Es erfolgte eine Stufentherapie mit Unterteilung in eine Kontrollgruppe, eine Östrogenmangelgruppe induziert durch eine bilaterale Ovariectomie (OVX), eine Gruppe mit kalzium- und Vitamin D-armer Diät zusätzlich zur bilateralen Ovariectomie (OVXD) und einer Dreifachtherapiegruppe aus OVXD plus regelmäßigen Glukokortikoidinjektionen. Die Auswertung erfolgte anhand histologischer Schnitte aus dem Beckenkamm, dem Femur und den LWK sowie anhand von DXA-Messungen.

Verglichen mit allen anderen Behandlungsgruppen zeigte sich im Beckenkamm der OVXDS-Gruppe nach 3M und 8M eine signifikant geringere Trabekeldicke und -fläche sowie ein signifikant höherer Osteoidgehalt. Zwischen der Kontroll-, der OVX- und der OVXD-Gruppe konnten innerhalb der einzelnen Zeitpunkte keine signifikanten Unterschiede erhoben werden. Die gemessene Mineralisationsgeschwindigkeit im Femur nach 8M zeigte in OVXDS signifikant geringere Werte verglichen mit allen anderen Gruppen.

Es lässt sich festhalten, dass in diesem Schafmodell mittels OVXDS erfolgreich ein osteoporotischer Knochenstatus induziert wurde. Interessanterweise ist dieser von einer trabekulären Destruktion mit Knochenmasseverlust in Form von dünneren Trabekeln sowie einer Zunahme an nichtmineralisierter Matrix gezeichnet. Diese Erkenntnisse lassen die Frage offen, inwieweit ein osteoporotischer mit einem osteomalatischen Knochenstatus kombiniert ist, insbesondere da die Diagnose beim Menschen auf radiologischen Verfahren wie der DXA Messung beruht und der Anteil an nichtmineralisierter Matrix nicht erfasst wird. Es bedarf weiterer Analysen der Mineralisation im osteoporotischen Knochen, um einen Transfer der Erkenntnisse auf die Frakturprophylaxe und -behandlung zu erreichen und umsetzen zu können.

8 Summary

Every fourth woman above the age of 50 years in Germany has osteoporosis. Distinguishing is a reduced bone quality with the vulnerability to fracture even by low-energy traumas. Due to the demographic change, an increase from 115,248 osteoporotic fractures in 2010 to 273,794 in 2050 is expected in Germany. Suitable and well-described animal models are required to gain new knowledge and develop new bone substitutes.

In the following, an osteoporotic large animal model on 31 Merino sheep is described. The animals were divided into 4 groups: a control group, an estrogen deficiency group induced by a bilateral ovariectomy (OVX), a group with a low calcium and vitamin D intake combined with bilateral ovariectomy (OVXD) and a triple therapy group of OVXD plus regular glucocorticoid injections. The experiment last for 8 months (M). The evaluation was based on histological sections from the iliac crest, femur and lumbar spine, as well as DXA measurements.

After 3M and 8M, the iliac crest of OVXDS showed a significantly lower trabecular thickness and trabecular area as well as a significantly higher osteoid content compared to all other treatment groups. No significant differences could be determined between the control, OVX and OVXD within each point in time. The mineralization rate after 8M showed significantly lower values in OVXDS compared to all other groups measured in the femur.

In summary this study induced successfully an osteoporotic bone status in sheep using OVXDS. Interestingly, this is characterized by trabecular destruction with loss of bone mass in the form of thinner trabeculae and an increase in non-mineralized matrix. These results lead us to the question how the osteoporotic and the osteomalatic bone status are combined with each other. Especially because the diagnosis of osteoporosis in humans is only based on radiological methods such as the DXA, without measuring the proportion of non-mineralized matrix. The author also can conclude that histologically OVX and OVXD did not cause a significant bone loss in this sheep model.

Further analysis of the mineralization in the osteoporotic bone is required in order to transfer the findings to fracture prophylaxis and to improve the treatment of osteoporosis.

9 Abkürzungsverzeichnis

μCT	Mikro-Computertomographie
Abb	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
ALP	Alkalische Phosphatase
ANK	Ankylosis Protein-Transporter
APC	Adenomatous polyposis coli
Ar	Fläche, area; (Nomenklatur ASBMR)
ARRIVE	Animal Research Reporting of In Vivo Experiments
ASBMR	American Society of Bone and Mineral Research
ATP	Adenosintriphosphat
B	Knochen (mineralisierter Knochen und Osteoid), Bone; (Nomenklatur ASBMR)
BMC	Knochenmineralgehalt, Bone minerale content
BMD	Knochendichte / Knochenmineraldichte, Bone mineral density
BMU	Basic multicellular unit
BSP	Bone sialoprotein
Ca ²⁺	Kalziumionen
CRH	Corticotropin-releasing hormone
d	Tag
DKK1	Dickkopf-related protein 1
DMP1	Dentin matrix protein 1
DSPP	Dentin sialophosphoprotein
DXA	Dual Energy X-ray Absorptiometry
ER	Östrogenrezeptor
FGF23	Fibroblast growth factor 23
FRAX	fracture risk assesement tool
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
Fz	Frizzled
GSK3β	Glykogen synthetase kinase 3β
HA	Hydroxylapatit

HE	Hämatoxylin-Eosin
LH	Luteinisierendes Hormon
LRP	Low-density lipoprotein receptor related protein
LWK	Lendenwirbelkörper
M	Monat
MAR	Mineralisationsrate, mineral apposition rate
MB	Megabyte
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
Md	Mineralisierter Knochen, mineralized bone; (Nomenklatur ASBMR)
Md.Ar	Fläches des mineralisierten Knochens; (Nomenklatur ASBMR)
MEPE	Matrix extracellular phosphoglycoprotein
MV	Matrixvesikel
NPP1	Enucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
O	Osteoid; (Nomenklatur ASBMR)
O.Ar	Osteoidfläche; (Nomenklatur ASBMR)
O.Ar/Tb.Ar	Anteil der Osteoidfläche an der Trabekelfläche; (Nomenklatur ASBMR)
OPG	Osteoprotegerin
OVX	Ovarektomie
OVXD	Ovarektomie + spezielle Mangeldiät
OVXDS	Ovarektomie + spezielle Mangeldiät + Steroidinjektionen
PChol	Phosphocholin
PEA	Phosphoethanolamin
PHOSPHO1	Phosphatase orphan 1
Pi	Anorganisches Phosphat
PiT1/2	Sodium-dependent Pi symporters 1/2
PMMA	Polymethylmethacrylat
PPi	Anorganisches Pyrophosphat
PTH	Parathormon
RANK	Receptor activator of nuclear factor- κ B

RANKL	Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand
ROI	Region of Interest
SCL	Sclerostin
sFrps	Secreted Frizzled-related proteins
SIBLING	Small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein
Sp	Abstand, separation; (Nomenklatur ASBMR)
T	Gesamt, total; (Nomenklatur ASBMR)
T.Ar	Gesamtfläche; (Nomenklatur ASBMR)
Tab	Tabelle
Tb	Trabekel, trabecular; (Nomenklatur ASBMR)
Tb.Ar	Trabekelfläche; (Nomenklatur ASBMR)
Tb.Ar/T.Ar	Anteil der Trabekelfläche an der Gesamtfläche; (Nomenklatur ASBMR)
Tb.Sp	Trabekelabstand; (Nomenklatur ASBMR)
Tb.Th	Trabekeldicke; (Nomenklatur ASBMR)
Th	Dicke, thickness; (Nomenklatur ASBMR)
TNF	Tumor necrosis factor
TNSALP	Tissue-nonspecific alkaline phosphatase
TOF-SIMS	Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie, Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry
V	Volumen; (Nomenklatur ASBMR)
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
WHO	World Health Organization
WNT	Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Makroskopischer Aufbau eines langen Knochens.	3
Abb. 2: Mikroskopischer Aufbau der Knochenlamellen.	4
Abb. 3: Schematische Darstellung der BMU.	7
Abb. 4: Knochenauf- und -abbau im Verlauf des Lebens einer Frau.	8
Abb. 5: Regulation der Hydrroxylapatitbildung.	9
Abb. 6: Der aktive und der gehemmte Canonical WNT/ β -catenin-Signalweg.	13
Abb. 7: Wirkung von Kalzitriol unter ausreichender Kalziumaufnahme.	15
Abb. 8: Kalzitriol-Wirkung bei Kalziummangel.	16
Abb. 9: Gegenüberstellung des T- und Z-Score.	19
Abb. 10: Altersabhängiger Knochenverlust bei Männern und Frauen.	21
Abb. 11: Studiendesign zur Osteoporoseinduktion bei Schafen.	26
Abb. 12: DXA-Scan eines Schafs.	31
Abb. 13: Ovariectomie und Beckenkammbiopsie.	33
Abb. 14: Erstellen eines Classifiers.	40
Abb. 15: Classified image.	41
Abb. 16: Probability maps.	41
Abb. 17: Bestimmung der Trabekelparameter.	42
Abb. 18: Berechnung der Mineralisationsrate (MAR).	45
Abb. 19: Gewichtsverlauf.	47
Abb. 20: Altersunterschiede zum Zeitpunkt 0M.	47
Abb. 21: Knochendichtemessungen (BMD) von Femur und LWK.	49
Abb. 22: Übersicht der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Beckenkammstanzen.	50
Abb. 23: Bildausschnitte der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Beckenkammstanzen.	51
Abb. 24: Übersichtsbilder der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Femurkondylen.	53
Abb. 25: Übersichtsbilder der Hämatoxylin-Eosin gefärbten LWK.	54
Abb. 26: Übersicht der von Kossa / van Gieson gefärbte Beckenkammstanzen.	56
Abb. 27: Bildausschnitte der von Kossa /van Gieson gefärbten Beckenkammstanzen.	57
Abb. 28: Übersichtsbilder der von Kossa / van Gieson gefärbten Femurkondylen.	58
Abb. 29: Übersichtsbilder der von Kossa / van Gieson gefärbten LWK.	59
Abb. 30: Trabekelparameter Beckenkamm.	61
Abb. 31: O.Ar/Tb.Ar im Beckenkamm.	63
Abb. 32: Mineralisationsrate (MAR) im Beckenkamm.	64

Abb. 33: Trabekelparameter Femur.....	65
Abb. 34: O.Ar/Tb.Ar im Femur.....	65
Abb. 35: Mineralisierungsrate (MAR) im Femur.....	66
Abb. 36: Bestimmung der Mineralisierungsrate (MAR) in der Fluoreszenzmikroskopie.....	67
Abb. 37: Trabekelparameter LWK.....	68
Abb. 38: O.Ar/Tb.Ar im LWK.....	69
Abb. 39: Vergleich der anatomischen Regionen: Beckenkamm, LWK und Femur.....	71
Abb. 40: Unbelastete vs. Belastete Regionen.....	72

11 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Therapieentscheidung in Abhängigkeit der DXA-Werte.....	24
Tab. 2: Entwässerungsprotokoll der Paraffin-Einbettung.....	113
Tab. 3: Entwässerungs- und Infiltrationsschema der Technovit-Einbettung.....	114
Tab. 4: Färbeprotokoll H.E.....	115
Tab. 5: Färbeprotokoll für Schnittpräparate von Kossa / van Gieson.....	116
Tab. 6: Färbeprotokoll für Schliffpräparate von Kossa / van Gieson.....	117
Tab. 7: Anzahl der in die Auswertung eingegangenen Proben.....	119
Tab. 8: Mittleres Körpergewicht [kg] im Verlauf der Studie.....	120
Tab. 9: Mittlere Tb.Th [μm] im Verlauf der Studie aller erfassten Skelettregionen.....	120
Tab. 10: Signifikante Differenzen bei Bestimmung der Tb.Th aller erfassten Skelettregionen.....	121
Tab. 11: Mittlere Tb.Sp [μm] im Verlauf der Studie aller erfassten Skelettregionen.....	121
Tab. 12: Signifikante Differenzen bei Bestimmung der Tb.Sp aller erfassten Skelettregionen.....	121
Tab. 13: Mittlere Tb.Ar/T.Ar [%] im Verlauf der Studie aller erfassten Skelettregionen.....	122
Tab. 14: Signifikante Differenzen bei Bestimmung der Tb.Ar/T.Ar aller erfassten Skelettregionen.....	122
Tab. 15: Mittlere O.Ar/Tb.Ar [%] im Verlauf der Studie aller erfassten Skelettregionen.....	123
Tab. 16: Signifikante Differenzen bei Bestimmung der O.Ar/Tb.Ar aller erfassten Skelettregionen.....	123

Tab. 17: Mittlere Mineralisationsrate (MAR) [$\mu\text{m}/\text{d}$] im Verlauf der Studie aller erfassten Skelettregionen.	124
Tab. 18: Signifikante Differenzen bei Bestimmung der MAR aller erfassten Skelettregionen.	124
Tab. 19: Mittlere Tb.Th [μm] beim Vergleich der Regionen nach 8M.	124
Tab. 20: Signifikante Differenzen der Tb.Th im Vergleich der Regionen nach 8M.	124
Tab. 21: Mittlere Tb.Ar/T.Ar [%] beim Vergleich der Regionen nach 8M.	125
Tab. 22: Signifikante Differenzen der Tb.Ar/T.Ar im Vergleich der Regionen nach 8M.	125
Tab. 23: Mittlere O.Ar/Tb.Ar [%] beim Vergleich der Regionen nach 8M.	125
Tab. 24: Signifikante Differenzen der O.Ar/Tb.Ar im Vergleich der Regionen nach 8M.	125
Tab. 25: Mittlere Tb.Th [μm] beim Vergleich der unbelasteten und belasteten Regionen nach 8M.	125
Tab. 26: Signifikante Differenzen der Tb.Th im Vergleich der unbelasteten und belasteten Regionen nach 8M.	126
Tab. 27: Mittlere Tb.Ar/T.Ar [%] beim Vergleich der unbelasteten und belasteten Regionen nach 8M.	126
Tab. 28: Signifikante Differenzen der Tb.Ar/T.Ar im Vergleich der unbelasteten und belasteten Regionen nach 8M.	126
Tab. 29: Mittlere O.Ar/Tb.Ar [%] beim Vergleich der unbelasteten und belasteten Regionen nach 8M.	126
Tab. 30: Signifikante Differenzen der O.Ar/Tb.Ar im Vergleich der unbelasteten und belasteten Regionen nach 8M.	126
Tab. 31: Mittlere BMD [g/cm^2] im Verlauf der Studie aller erfassten Skelettregionen. .	127
Tab. 32: Signifikante Differenzen bei Bestimmung der BMD aller erfassten Skelettregionen.	127

12 Literaturverzeichnis

1. Aguirre, J.I., Plotkin, L.I., Gortazar, A.R., Millan, M.M., O'Brien, C.A., Manolagas, S.C., Bellido, T., *A novel ligand-independent function of the estrogen receptor is essential for osteocyte and osteoblast mechanotransduction.* J Biol Chem, 2007. **282**(35): p. 25501-8.
2. Aguirre, J.I., Plotkin, L.I., Stewart, S.A., Weinstein, R.S., Parfitt, A.M., Manolagas, S.C., Bellido, T., *Osteocyte Apoptosis Is Induced by Weightlessness in Mice and Precedes Osteoclast Recruitment and Bone Loss.* Journal of Bone and Mineral Research, 2006. **21**(4): p. 605-615.
3. Almeida, M., Iyer, S., Martin-Millan, M., Bartell, S.M., Han, L., Ambrogini, E., Onal, M., Xiong, J., Weinstein, R.S., Jilka, R.L., O'Brien, C.A., Manolagas, S.C., *Estrogen receptor- α signaling in osteoblast progenitors stimulates cortical bone accrual.* J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 394-404.
4. Amling, M., Herden, S., Posl, M., Hahn, M., Ritzel, H., Delling, G., *Heterogeneity of the skeleton: comparison of the trabecular microarchitecture of the spine, the iliac crest, the femur, and the calcaneus.* J Bone Miner Res, 1996. **11**(1): p. 36-45.
5. Anastasilakis, A.D., Polyzos, S.A., Avramidis, A., Toulis, K.A., Papatheodorou, A., Terpos, E., *The effect of teriparatide on serum Dickkopf-1 levels in postmenopausal women with established osteoporosis.* Clin Endocrinol (Oxf), 2010. **72**(6): p. 752-7.
6. Anderson, H.C., *Molecular biology of matrix vesicles.* Clin Orthop Relat Res, 1995(314): p. 266-80.
7. Anderson, H.C., Garimella, R., Tague, S.E., *The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization.* Front Biosci, 2005. **10**: p. 822-37.
8. Andreasen, C.M., Ding, M., Overgaard, S., Bollen, P., Andersen, T.L., *A reversal phase arrest uncoupling the bone formation and resorption contributes to the bone loss in glucocorticoid treated ovariectomised aged sheep.* Bone, 2015. **75**: p. 32-9.
9. Angeli, A., Guglielmi, G., Dovio, A., Capelli, G., de Feo, D., Giannini, S., Giorgino, R., Moro, L., Giustina, A., *High prevalence of asymptomatic vertebral fractures in post-menopausal women receiving chronic glucocorticoid therapy: a cross-sectional outpatient study.* Bone, 2006. **39**(2): p. 253-9.
10. Arens, D., Sigrist, I., Alini, M., Schawalder, P., Schneider, E., Egermann, M., *Seasonal changes in bone metabolism in sheep.* Vet J, 2007. **174**(3): p. 585-91.
11. Arganda-Carreras, I., Kaynig, V., Rueden, C., Eliceiri, K.W., Schindelin, J., Cardona, A., Sebastian Seung, H., *Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification.* Bioinformatics, 2017. **33**(15): p. 2424-2426.
12. Armstrong, V.J., Muzylak, M., Sunters, A., Zaman, G., Saxon, L.K., Price, J.S., Lanyon, L.E., *Wnt/beta-catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor alpha.* J Biol Chem, 2007. **282**(28): p. 20715-27.
13. Augat, P., Schorlemmer, S., Gohl, C., Iwabu, S., Ignatius, A., Claes, L., *Glucocorticoid-treated sheep as a model for osteopenic trabecular bone in biomaterials research.* Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2003. **66A**(3): p. 457-462.
14. Augat, P., Schorlemmer, S., Gohl, C., Iwabu, S., Ignatius, A., Claes, L., *Glucocorticoid-treated sheep as a model for osteopenic trabecular bone in biomaterials research.* J Biomed Mater Res A, 2003. **66**(3): p. 457-62.

15. Baron, R., Kneissel, M., *WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments*. Nat Med, 2013. **19**(2): p. 179-92.
16. Bauer, N.B., Khassawna, T.E., Goldmann, F., Stirn, M., Ledieu, D., Schlewitz, G., Govindarajan, P., Zahner, D., Weisweiler, D., Schliefer, N., Bocker, W., Schnettler, R., Heiss, C., Moritz, A., *Characterization of bone turnover and energy metabolism in a rat model of primary and secondary osteoporosis*. Exp Toxicol Pathol, 2015. **67**(4): p. 287-96.
17. Beil, F.T., Oheim, R., Barvencik, F., Hissnauer, T.N., Pestka, J.M., Ignatius, A., Rueger, J.M., Schinke, T., Clarke, I.J., Amling, M., Pogoda, P., *Low turnover osteoporosis in sheep induced by hypothalamic-pituitary disconnection*. J Orthop Res, 2012. **30**(8): p. 1254-62.
18. Bergstrahl, E.J., Sinaki, M., Offord, K.P., Wahner, H.W., Melton, L.J., 3rd, *Effect of season on physical activity score, back extensor muscle strength, and lumbar bone mineral density*. J Bone Miner Res, 1990. **5**(4): p. 371-7.
19. Bhan, A., Qiu, S., Rao, S.D., *Bone histomorphometry in the evaluation of osteomalacia*. Bone Rep, 2018. **8**: p. 125-134.
20. Bijelić, N., Belovari, T., Stolnik, D., Lovrić, I., Baus Lončar, M., *Histomorphometric Parameters of the Growth Plate and Trabecular Bone in Wild-Type and Trefoil Factor Family 3 (Tff3)-Deficient Mice Analyzed by Free and Open-Source Image Processing Software*. Microscopy and Microanalysis, 2017. **23**(4): p. 818-825.
21. Bindl, R., Oheim, R., Pogoda, P., Beil, F.T., Gruchenberg, K., Reitmaier, S., Wehner, T., Calcia, E., Radermacher, P., Claes, L., Amling, M., Ignatius, A., *Metaphyseal fracture healing in a sheep model of low turnover osteoporosis induced by hypothalamic-pituitary disconnection (HPD)*. J Orthop Res, 2013. **31**(11): p. 1851-7.
22. Blair, H.C., Teitelbaum, S.L., Ghiselli, R., Gluck, S., *Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump*. Science, 1989. **245**(4920): p. 855-7.
23. Bleibler, F., Benzinger, P., Lehnert, T., Becker, C., König, H.H., *Frakturkosten im deutschen Krankenhaussektor – Welche Rolle spielt die Osteoporose?* Gesundheitswesen, 2014. **76**(03): p. 163-168.
24. Bleibler, F., Konnopka, A., Benzinger, P., Rapp, K., König, H.H., *The health burden and costs of incident fractures attributable to osteoporosis from 2010 to 2050 in Germany--a demographic simulation model*. Osteoporos Int, 2013. **24**(3): p. 835-47.
25. Bonadonna, S., Burattin, A., Nuzzo, M., Bugari, G., Rosei, E.A., Valle, D., Iori, N., Bilezikian, J.P., Veldhuis, J.D., Giustina, A., *Chronic glucocorticoid treatment alters spontaneous pulsatile parathyroid hormone secretory dynamics in human subjects*. Eur J Endocrinol, 2005. **152**(2): p. 199-205.
26. Bonewald, L.F., *The Amazing Osteocyte*. Journal of Bone and Mineral Research, 2011. **26**(2): p. 229-238.
27. Bono, C.M., Einhorn, T.A., *Overview of osteoporosis: pathophysiology and determinants of bone strength*. Eur Spine J, 2003. **12 Suppl 2**: p. S90-6.
28. Boskey, A.L., *Mineral-matrix interactions in bone and cartilage*. Clin Orthop Relat Res, 1992(281): p. 244-74.
29. Boyce, B.F., *Advances in the Regulation of Osteoclasts and Osteoclast Functions*. Journal of Dental Research, 2013. **92**(10): p. 860-867.
30. Browner, W.S., Seeley, D.G., Cummings, S.R., Vogt, T.M., For The Study Of Osteoporotic Fractures Research, G., *Non-trauma mortality in elderly women with low bone mineral density*. The Lancet. **338**(8763): p. 355-358.

31. Campbell, E.J., Campbell, G.M., Hanley, D.A., *The effect of parathyroid hormone and teriparatide on fracture healing*. Expert Opin Biol Ther, 2015. **15**(1): p. 119-29.
32. Canalis, E., Mazziotti, G., Giustina, A., Bilezikian, J.P., *Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy*. Osteoporos Int, 2007. **18**(10): p. 1319-28.
33. Caniggia, A., Lore, F., di Cairano, G., Nuti, R., *Main endocrine modulators of vitamin D hydroxylases in human pathophysiology*. J Steroid Biochem, 1987. **27**(4-6): p. 815-24.
34. Carmeliet, G., Dermauw, V., Bouillon, R., *Vitamin D signaling in calcium and bone homeostasis: A delicate balance*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2015. **29**(4): p. 621-631.
35. Chambers, T.J., Moore, A., *The sensitivity of isolated osteoclasts to morphological transformation by calcitonin*. J Clin Endocrinol Metab, 1983. **57**(4): p. 819-24.
36. Chan, H.L., Lau, E.M.C., Woo, J., Lin, F., Sham, A., Leung, P.C., *Dietary calcium intake, physical activity and the risk of vertebral fracture in Chinese*. Osteoporosis International, 1996. **6**(3): p. 228-232.
37. Chappard, C., Marchadier, A., Benhamou, C.L., *Side-to-side and within-side variability of 3D bone microarchitecture by conventional micro-computed tomography of paired iliac crest biopsies*. Bone, 2008. **43**(1): p. 203-208.
38. Chappard, C., Marchadier, A., Benhamou, L., *Interindividual and intraspecimen variability of 3-D bone microarchitectural parameters in iliac crest biopsies imaged by conventional micro-computed tomography*. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 2008. **26**(5): p. 506-513.
39. Chappard, D., Legrand, E., Basle, M.F., Fromont, P., Racineux, J.L., Rebel, A., Audran, M., *Altered trabecular architecture induced by corticosteroids: a bone histomorphometric study*. J Bone Miner Res, 1996. **11**(5): p. 676-85.
40. Chavassieux, P., Buffet, A., Vergnaud, P., Garnero, P., Meunier, P.J., *Short-term effects of corticosteroids on trabecular bone remodeling in old ewes*. Bone, 1997. **20**(5): p. 451-5.
41. Chen, H., Senda, T., Kubo, K.-y., *The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis*. Medical Molecular Morphology, 2015. **48**(2): p. 61-68.
42. Chiang, C., Chiu, M., Moore, A.J., Anderson, P.H., Ghasem-Zadeh, A., McManus, J.F., Ma, C., Seeman, E., Clemens, T.L., Morris, H.A., Zajac, J.D., Davey, R.A., *Mineralization and bone resorption are regulated by the androgen receptor in male mice*. J Bone Miner Res, 2009. **24**(4): p. 621-31.
43. Cinar, Y., Atamaz, F.C., Kirazli, Y., Doganavsargil, B., Sezak, M., Ozkayin, N., Aktuglu, K., Aydogdu, S., *A comparison of the femur heads histomorphometrically regarding trabecular bone properties in the patients with osteoporosis and osteoarthritis*. Aging Clin Exp Res, 2016. **28**(5): p. 997-1001.
44. Compston, J., *Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update*. Endocrine, 2018. **61**(1): p. 7-16.
45. *Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis*. Am J Med, 1993. **94**(6): p. 646-50.
46. Dachverband_Osteologie_e.V. *Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der OSTEOPOROSE bei postmenopausalen Frauen und bei Männern*. 2017; URL: http://www.dv-osteologie.org/dvo_leitlinien/dvo-leitlinie-2017 [abgerufen am: 15.01.2020].

47. Dallas, S.L., Prideaux, M., Bonewald, L.F., *The Osteocyte: An Endocrine Cell ... and More*. Endocrine Reviews, 2013. **34**(5): p. 658-690.
48. Daoussis, D., Andonopoulos, A.P., *The Emerging Role of Dickkopf-1 in Bone Biology: Is It the Main Switch Controlling Bone and Joint Remodeling?* Seminars in Arthritis and Rheumatism, 2011. **41**(2): p. 170-177.
49. Delahunty, K.M., Horton, L.G., Coombs, H.F., 3rd, Shultz, K.L., Svenson, K.L., Marion, M.A., Holick, M.F., Beamer, W.G., Rosen, C.J., *Gender- and compartment-specific bone loss in C57BL/6J mice: correlation to season?* J Clin Densitom, 2009. **12**(1): p. 89-94.
50. Delgado-Calle, J., Sanudo, C., Bolado, A., Fernandez, A.F., Arozamena, J., Pascual-Carra, M.A., Rodriguez-Rey, J.C., Fraga, M.F., Bonewald, L., Riancho, J.A., *DNA methylation contributes to the regulation of sclerostin expression in human osteocytes*. J Bone Miner Res, 2012. **27**(4): p. 926-37.
51. Dempster, D.W., Arlot, M.A., Meunier, P.J., *Mean wall thickness and formation periods of trabecular bone packets in corticosteroid-induced osteoporosis*. Calcif Tissue Int, 1983. **35**(4-5): p. 410-7.
52. Dempster, D.W., Compston, J.E., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., Recker, R.R., Parfitt, A.M., *Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee*. Journal of Bone and Mineral Research, 2013. **28**(1): p. 2-17.
53. Densitometry, T.I.S.F.C. *2019 ISCD Official Position -Adult*. URL: <https://www.iscd.org/official-positions/2019-iscd-official-positions-adult/> [abgerufen am: 15.01.2020].
54. Dick, I.M., St John, A., Heal, S., Prince, R.L., *The effect of estrogen deficiency on bone mineral density, renal calcium and phosphorus handling and calcitropic hormones in the rat*. Calcif Tissue Int, 1996. **59**(3): p. 174-8.
55. Ding, M., Cheng, L., Bollen, P., Schwarz, P., Overgaard, S., *Glucocorticoid induced osteopenia in cancellous bone of sheep: validation of large animal model for spine fusion and biomaterial research*. Spine (Phila Pa 1976), 2010. **35**(4): p. 363-70.
56. Dittmer, K.E., Thompson, K.G., *Vitamin D metabolism and rickets in domestic animals: a review*. Vet Pathol, 2011. **48**(2): p. 389-407.
57. Doube, M., Kłosowski, M.M., Arganda-Carreras, I., Cordelières, F.P., Dougherty, R.P., Jackson, J.S., Schmid, B., Hutchinson, J.R., Shefelbine, S.J., *BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ*. Bone, 2010. **47**(6): p. 1076-1079.
58. Drake, M.T., Clarke, B.L., Khosla, S., *Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice*. Mayo Clinic Proceedings, 2008. **83**(9): p. 1032-1045.
59. Drake, M.T., Khosla, S., *Hormonal and Systemic Regulation of Sclerostin*. Bone, 2017. **96**: p. 8-17.
60. Drake, M.T.a.K., S., *The Role of Sex Steroids in the Pathogenesis of Osteoporosis*, in *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, C.J. Rosen, Editor. 2013.
61. Drenckhahn, D., *Allgemeine Gelenk- und Knochenlehre*, in *Anatomie : Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie.*, D. Drenckhahn, Editor. 2008, Elsevier, Urban & Fischer: München. p. 254-277.
62. Drenckhahn, D., *Allgemeine Gewebelehre*, in *Anatomie : Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie.*, D. Drenckhahn, Editor. 2008, Elsevier, Urban & Fischer: München. p. 94-207.

63. Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A.F., Beil, F.T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J.M., Karsenty, G., *Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass*. Cell, 2000. **100**(2): p. 197-207.
64. Eastell, R., Lambert, H., *Strategies for skeletal health in the elderly*. Proc Nutr Soc, 2002. **61**(2): p. 173-80.
65. Egan, K.P., Brennan, T.A., Pignolo, R.J., *Bone histomorphometry using free and commonly available software*. Histopathology, 2012. **61**(6): p. 1168-1173.
66. El Khassawna, T., *Cellular and molecular analysis of fracture healing in a neurofibromatosis type 1 conditional knockout mice model*. 2013, Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I.
67. El Khassawna, T., Böcker, W., Brodsky, K., Weisweiler, D., Govindarajan, P., Kampschulte, M., Thormann, U., Henss, A., Rohnke, M., Bauer, N., Müller, R., Deutsch, A., Ignatius, A., Dürselen, L., Langheinrich, A., Lips, K.S., Schnettler, R., Heiss, C., *Impaired extracellular matrix structure resulting from malnutrition in ovariectomized mature rats*. Histochemistry and Cell Biology, 2015. **144**(5): p. 491-507.
68. El Khassawna, T., Merboth, F., Malhan, D., Böcker, W., Daghma, D.E.S., Stoetzel, S., Kern, S., Hassan, F., Rosenbaum, D., Langenstein, J., Bauer, N., Schlagenhauf, A., Rösen-Wolff, A., Schulze, F., Rupp, M., Hose, D., Secklinger, A., Ignatius, A., Wilke, H.-J., Lips, K.S., Heiss, C., *Osteocyte Regulation of Receptor Activator of NF- κ B Ligand/Osteoprotegerin in a Sheep Model of Osteoporosis*. The American Journal of Pathology, 2017. **187**(8): p. 1686-1699.
69. Emkey, G.R., Epstein, S., *Secondary osteoporosis: Pathophysiology & diagnosis*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2014. **28**(6): p. 911-935.
70. Falahati-Nini, A., Riggs, B.L., Atkinson, E.J., O'Fallon, W.M., Eastell, R., Khosla, S., *Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men*. J Clin Invest, 2000. **106**(12): p. 1553-60.
71. Fisher, L.W., Fedarko, N.S., *Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins*. Connect Tissue Res, 2003. **44** Suppl 1: p. 33-40.
72. Frost, H.M., *A 2003 update of bone physiology and Wolff's Law for clinicians*. Angle Orthod, 2004. **74**(1): p. 3-15.
73. Fukumoto, S., Ozono, K., Michigami, T., Minagawa, M., Okazaki, R., Sugimoto, T., Takeuchi, Y., Matsumoto, T., *Pathogenesis and diagnostic criteria for rickets and osteomalacia—proposal by an expert panel supported by the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, the Japanese Society for Bone and Mineral Research, and the Japan Endocrine Society*. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 2015. **33**(5): p. 467-473.
74. Gardsell, P., Johnell, O., *Bone mass--a marker of biologic age?* Clin Orthop Relat Res, 1993(287): p. 90-3.
75. Garnero, P., Sornay-Rendu, E., Chapuy, M.C., Delmas, P.D., *Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis*. J Bone Miner Res, 1996. **11**(3): p. 337-49.
76. Gennari, C., Agnusdei, D., Nardi, P., Civitelli, R., *Estrogen preserves a normal intestinal responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in oophorectomized women*. J Clin Endocrinol Metab, 1990. **71**(5): p. 1288-93.

77. Gerd, H., *DIABETES MELLITUS (DM)-NEBENNIERENRINDE (NNR)*, in *Innere Medizin 2020*, H. Gerd, Editor. 2020, De Gruyter: Berlin, Boston. p. 1445-1505.
78. Gerstenfeld, L.C., Wronski, T.J., Hollinger, J.O., Einhorn, T.A., *Application of histomorphometric methods to the study of bone repair*. *J Bone Miner Res*, 2005. **20**(10): p. 1715-22.
79. Gertz, B.J., Holland, S.D., Kline, W.F., Matuszewski, B.K., Porras, A.G., *Clinical pharmacology of alendronate sodium*. *Osteoporos Int*, 1993. **3 Suppl 3**: p. S13-6.
80. Glaser, D.L., Kaplan, F.S., *Osteoporosis. Definition and clinical presentation*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1997. **22**(24 Suppl): p. 12s-16s.
81. Guañabens, N., Gifre, L., Peris, P., *The Role of Wnt Signaling and Sclerostin in the Pathogenesis of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis*. *Current Osteoporosis Reports*, 2014. **12**(1): p. 90-97.
82. Hadji, P., Klein, S., Gothe, H., Haussler, B., Kless, T., Schmidt, T., Steinle, T., Verheyen, F., Linder, R., *The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data*. *Dtsch Arztebl Int*, 2013. **110**(4): p. 52-7.
83. Hakeda, Y., Kobayashi, Y., Yamaguchi, K., Yasuda, H., Tsuda, E., Higashio, K., Miyata, T., Kumegawa, M., *Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **251**(3): p. 796-801.
84. Hall, T.J., Chambers, T.J., *Optimal bone resorption by isolated rat osteoclasts requires chloride/bicarbonate exchange*. *Calcif Tissue Int*, 1989. **45**(6): p. 378-80.
85. Hammes, S.R., Levin, E.R., *Extranuclear steroid receptors: nature and actions*. *Endocr Rev*, 2007. **28**(7): p. 726-41.
86. Harris, H.A., *Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies*. *Mol Endocrinol*, 2007. **21**(1): p. 1-13.
87. Heiss, C., Kern, S., Malhan, D., Böcker, W., Engelhardt, M., Daghma, D.E.S., Stoetzel, S., Schmitt, J., Ivo, M., Kauschke, V., Lips, K.S., Tushtev, K., Rezwani, K., El Khassawna, T., *A New clinically relevant T-Score standard to interpret bone Status in a sheep Model*. *Medical science monitor basic research*, 2017. **23**: p. 326-335.
88. Hernlund, E., Svedbom, A., Ivergard, M., Compston, J., Cooper, C., Stenmark, J., McCloskey, E.V., Jonsson, B., Kanis, J.A., *Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA)*. *Arch Osteoporos*, 2013. **8**: p. 136.
89. Hesse, L., Johnson, K.A., Anderson, H.C., Narisawa, S., Sali, A., Goding, J.W., Terkeltaub, R., Millán, J.L., *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002. **99**(14): p. 9445-9449.
90. Hidiroglou, M., Karpinski, K., *Providing vitamin D to confined sheep by oral supplementation vs ultraviolet irradiation*. *J Anim Sci*, 1989. **67**(3): p. 794-802.
91. Hiligsmann, M., Ethgen, O., Richy, F., Reginster, J.-Y., *Utility Values Associated with Osteoporotic Fracture: A Systematic Review of the Literature*. *Calcified Tissue International*, 2008. **82**(4): p. 288-292.
92. Hock, J.M., Gera, I., *Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone*. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1992. **7**(1): p. 65-72.

93. Holick, M.F., *Ultraviolet B Radiation: The Vitamin D Connection*. Adv Exp Med Biol, 2017. **996**: p. 137-154.
94. Hu, M.C., Shiizaki, K., Kuro-o, M., Moe, O.W., *Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism*. Annual review of physiology, 2013. **75**: p. 503-533.
95. Hudec, S.M., Camacho, P.M., *Secondary causes of osteoporosis*. Endocr Pract, 2013. **19**(1): p. 120-8.
96. Hughes, D.E., Dai, A., Tiffée, J.C., Li, H.H., Mundy, G.R., Boyce, B.F., *Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta*. Nat Med, 1996. **2**(10): p. 1132-6.
97. Huybers, S., Naber, T.H., Bindels, R.J., Hoenderop, J.G., *Prednisolone-induced Ca²⁺ malabsorption is caused by diminished expression of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV6*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(1): p. G92-7.
98. Jayasinghe, J.A., Jones, S.J., Boyde, A., *Three-dimensional photographic study of cancellous bone in human fourth lumbar vertebral bodies*. Anat Embryol (Berl), 1994. **189**(3): p. 259-74.
99. Jia, D., O'Brien, C.A., Stewart, S.A., Manolagas, S.C., Weinstein, R.S., *Glucocorticoids act directly on osteoclasts to increase their life span and reduce bone density*. Endocrinology, 2006. **147**(12): p. 5592-9.
100. Johansson, C., Black, D., Johnell, O., Oden, A., Mellstrom, D., *Bone mineral density is a predictor of survival*. Calcif Tissue Int, 1998. **63**(3): p. 190-6.
101. Johnell, O., Kanis, J., *Epidemiology of osteoporotic fractures*. Osteoporosis International, 2005. **16**(2): p. S3-S7.
102. Johnell, O., Kanis, J.A., *An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures*. Osteoporosis International, 2006. **17**(12): p. 1726-1733.
103. Kalu, D.N., *The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss*. Bone and Mineral, 1991. **15**(3): p. 175-191.
104. Kamioka, H., Honjo, T., Takano-Yamamoto, T., *A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy*. Bone, 2001. **28**(2): p. 145-149.
105. Kanis, J.A., Johnell, O., Oden, A., Johansson, H., McCloskey, E., *FRAX and the assessment of fracture probability in men and women from the UK*. Osteoporos Int, 2008. **19**(4): p. 385-97.
106. Keller, J., Catala-Lehnen, P., Huebner, A.K., Jeschke, A., Heckt, T., Lueth, A., Krause, M., Koehne, T., Albers, J., Schulze, J., Schilling, S., Haberland, M., Denninger, H., Neven, M., Hermans-Borgmeyer, I., Streichert, T., Breer, S., Barvencik, F., Levkau, B., Rathkolb, B., Wolf, E., Calzada-Wack, J., Neff, F., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., de Angelis, M.H., Klutmann, S., Tsourdi, E., Hofbauer, L.C., Kleuser, B., Chun, J., Schinke, T., Amling, M., *Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts*. Nature Communications, 2014. **5**: p. 5215.
107. Khalid, A.B., Krum, S.A., *Estrogen receptors alpha and beta in bone*. Bone, 2016. **87**: p. 130-5.
108. Khosla, S., Atkinson, E.J., Melton, L.J., 3rd, Riggs, B.L., *Effects of age and estrogen status on serum parathyroid hormone levels and biochemical markers of bone turnover in women: a population-based study*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(5): p. 1522-7.

109. Khosla, S., Melton, L.J., 3rd, Riggs, B.L., *The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed?* J Bone Miner Res, 2011. **26**(3): p. 441-51.
110. Khosla, S., Riggs, B.L., *Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2005. **34**(4): p. 1015-30, xi.
111. Khundmiri, S.J., Murray, R.D., Lederer, E., *PTH and Vitamin D*. Compr Physiol, 2016. **6**(2): p. 561-601.
112. Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M., Altman, D.G., *Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research*. PLoS Biol, 2010. **8**(6): p. e1000412.
113. Kleerekoper, M., *Osteoporosis Overview*, in *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, C.J. Rosen, Editor. 2013.
114. Klopfenstein Bregger, M.D., Schawalder, P., Rahn, B., Eckhardt, C., Schneider, E., Lill, C., *Optimization of corticosteroid induced osteoporosis in ovariectomized sheep. A bone histomorphometric study*. Vet Comp Orthop Traumatol, 2007. **20**(1): p. 18-23.
115. Komori, T., *Animal models for osteoporosis*. European Journal of Pharmacology, 2015. **759**: p. 287-294.
116. Komori, T., *Glucocorticoid Signaling and Bone Biology*. Horm Metab Res, 2016. **48**(11): p. 755-763.
117. Kovacs, S., Wilkens, M.R., Liesegang, A., *Influence of UVB exposure on the vitamin D status and calcium homeostasis of growing sheep and goats*. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl), 2015. **99 Suppl S1**: p. 1-12.
118. Landis, W.J., Hodgens, K.J., Song, M.J., Arena, J., Kiyonaga, S., Marko, M., Owen, C., McEwen, B.F., *Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging*. J Struct Biol, 1996. **117**(1): p. 24-35.
119. Lang, F., *Kalzium-, Magnesium- und Phosphathaushalt*, in *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*, R. Brandes, F. Lang, R.F. Schmidt, Editors. 2019, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 445-456.
120. Lang, F., Föllner, M., *Nebennierenrindenhormone*, in *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*, R. Brandes, F. Lang, R.F. Schmidt, Editors. 2019, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 943-950.
121. Lang, G., *Histotechnik : Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2013.
122. Langenstein, J.E., *Untersuchungen zu biochemischen Markern des Knochen- und Energiestoffwechsels am Osteoporose-induzierten Schafmodell*. 2016, Universitätsbibliothek: Gießen.
123. LeBlanc, A.D., Spector, E.R., Evans, H.J., Sibonga, J.D., *Skeletal responses to space flight and the bed rest analog: a review*. Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions, 2007. **7**(1): p. 33.
124. Leidig-Bruckner, G., Minne, H.W., Schlaich, C., Wagner, G., Scheidt-Nave, C., Bruckner, T., Gebest, H.J., Ziegler, R., *Clinical grading of spinal osteoporosis: quality of life components and spinal deformity in women with chronic low back pain and women with vertebral osteoporosis*. J Bone Miner Res, 1997. **12**(4): p. 663-75.
125. Li, X., Ominsky, M.S., Niu, Q.T., Sun, N., Daugherty, B., D'Agostin, D., Kurahara, C., Gao, Y., Cao, J., Gong, J., Asuncion, F., Barrero, M., Warmington, K., Dwyer, D., Stolina, M., Morony, S., Sarosi, I., Kostenuik, P.J., Lacey, D.L., Simonet, W.S., Ke, H.Z., Paszty, C., *Targeted deletion of the sclerostin gene in*

- mice results in increased bone formation and bone strength.* J Bone Miner Res, 2008. **23**(6): p. 860-9.
126. Lill, C.A., Fluegel, A.K., Schneider, E., *Effect of ovariectomy, malnutrition and glucocorticoid application on bone properties in sheep: a pilot study.* Osteoporos Int, 2002. **13**(6): p. 480-6.
127. Lill, C.A., Winterstein, E., Eckhardt, C., Rahn, B., Goldhahn, J., Schneider, E., *Quantification of histomorphometric and structural bone changes in a sheep model for fracture treatment in osteoporotic bone.* Vet Comp Orthop Traumatol, 2003. **16**(04): p. 243-249.
128. Lin, C., Jiang, X., Dai, Z., Guo, X., Weng, T., Wang, J., Li, Y., Feng, G., Gao, X., He, L., *Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling.* J Bone Miner Res, 2009. **24**(10): p. 1651-61.
129. Lips, P., van Schoor, N.M., *The effect of vitamin D on bone and osteoporosis.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2011. **25**(4): p. 585-91.
130. LoCascio, V., Bonucci, E., Imbimbo, B., Ballanti, P., Adami, S., Milani, S., Tartarotti, D., DellaRocca, C., *Bone loss in response to long-term glucocorticoid therapy.* Bone Miner, 1990. **8**(1): p. 39-51.
131. Lüllmann-Rauch, R., Asan, E., *Binde- und Stützgewebe*, in *Taschenlehrbuch Histologie*, R. Lüllmann-Rauch, E. Asan, Editors. 2019, Georg Thieme Verlag: Stuttgart ; New York. p. 147-210.
132. Malavolta, N., Rossi, E., Buffa, A., Falchetti, A., *Fragility fractures: clinical and therapeutic aspects.* J Biol Regul Homeost Agents, 2015. **29**(4): p. 761-9.
133. Malhan, D., Muelke, M., Rosch, S., Schaefer, A.B., Merboth, F., Weisweiler, D., Heiss, C., Arganda-Carreras, I., El Khassawna, T., *An optimized approach to perform bone histomorphometry.* Frontiers in Endocrinology, 2018. **9**(666).
134. Mankin, H.J., *Nontraumatic necrosis of bone (osteonecrosis).* N Engl J Med, 1992. **326**(22): p. 1473-9.
135. Manolagas, S.C., *Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis.* Endocr Rev, 2000. **21**(2): p. 115-37.
136. Manolagas, S.C., O'Brien, C.A., Almeida, M., *The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease.* Nature reviews. Endocrinology, 2013. **9**(12): p. 699-712.
137. Marcus, R., Feldman, D., Nelson, D., Rosen, C.J., *Fundamentals of Osteoporosis.* 2009: Elsevier Science.
138. Marrinan, S., Pearce, M.S., Jiang, X.Y., Waters, S., Shanshal, Y., *Admission for osteoporotic pelvic fractures and predictors of length of hospital stay, mortality and loss of independence.* Age Ageing, 2015. **44**(2): p. 258-61.
139. Martin-Millan, M., Almeida, M., Ambrogini, E., Han, L., Zhao, H., Weinstein, R.S., Jilka, R.L., O'Brien, C.A., Manolagas, S.C., *The estrogen receptor-alpha in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone.* Mol Endocrinol, 2010. **24**(2): p. 323-34.
140. Martin, R.B., *Fatigue microdamage as an essential element of bone mechanics and biology.* Calcified Tissue International, 2003. **73**(2): p. 101-107.
141. Merboth, F., *Enzym- und immunhistochemische Analyse des zellulären Knochenmetabolismus eines osteoporotischen Schafmodells.* 2020, JLU Gießen: unveröffentlichte Dissertation.
142. Moreira, L.D., Oliveira, M.L., Lirani-Galvao, A.P., Marin-Mio, R.V., Santos, R.N., Lazaretti-Castro, M., *Physical exercise and osteoporosis: effects of different*

- types of exercises on bone and physical function of postmenopausal women.* Arq Bras Endocrinol Metabol, 2014. **58**(5): p. 514-22.
143. Morey, E.R., Baylink, D.J., *Inhibition of bone formation during space flight.* Science, 1978. **201**(4361): p. 1138-1141.
144. Moriishi, T., Fukuyama, R., Ito, M., Miyazaki, T., Maeno, T., Kawai, Y., Komori, H., Komori, T., *Osteocyte Network; a Negative Regulatory System for Bone Mass Augmented by the Induction of Rankl in Osteoblasts and Sost in Osteocytes at Unloading.* PLoS ONE, 2012. **7**(6): p. e40143.
145. Moustafa, A., Sugiyama, T., Prasad, J., Zaman, G., Gross, T.S., Lanyon, L.E., Price, J.S., *Mechanical loading-related changes in osteocyte sclerostin expression in mice are more closely associated with the subsequent osteogenic response than the peak strains engendered.* Osteoporosis International, 2012. **23**(4): p. 1225-1234.
146. Muller, R., Van Campenhout, H., Van Damme, B., Van Der Perre, G., Dequeker, J., Hildebrand, T., Ruegsegger, P., *Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography.* Bone, 1998. **23**(1): p. 59-66.
147. Nabble. *Distance Between Polylines.* 2006; URL: <http://imagej.1557.x6.nabble.com/Distance-Between-Lines-a-plugin-for-ImageJ-td3701802.html> [abgerufen am: 15.01.2020].
148. Nabble. *Weka Stats.* 2013; URL: <http://imagej.1557.x6.nabble.com/Getting-stats-from-Trainable-Weka-Segmentation-plugin-td5004723.html> [abgerufen am: 15.01.2020].
149. Nabble. *Weka stats (Update).* 2014; URL: <http://imagej.1557.x6.nabble.com/Problem-with-getting-stats-from-trainable-weka-segmentation-plugin-td5007531.html> [abgerufen am: 15.01.2020].
150. Nakamuta, H., Nitta, T., Hoshino, T., Koida, M., *Glucocorticoid-induced osteopenia in rats: histomorphometrical and microarchitectural characterization and calcitonin effect.* Biol Pharm Bull, 1996. **19**(2): p. 217-9.
151. National Institutes of Health, U. *Built-in Macro Functions.* URL: <https://imagej.nih.gov/ij/developer/macro/functions.html> [abgerufen am: 15.01.2020].
152. Ogoshi, T., Hagino, H., Fukata, S., Tanishima, S., Okano, T., Teshima, R., *Influence of glucocorticoid on bone in 3-, 6-, and 12-month-old rats as determined by bone mass and histomorphometry.* Modern Rheumatology, 2008. **18**(6): p. 552-561.
153. Oheim, R., Beil, F.T., Kohne, T., Wehner, T., Barvencik, F., Ignatius, A., Amling, M., Clarke, I.J., Pogoda, P., *Sheep model for osteoporosis: sustainability and biomechanical relevance of low turnover osteoporosis induced by hypothalamic-pituitary disconnection.* J Orthop Res, 2013. **31**(7): p. 1067-74.
154. Oheim, R., Beil, F.T., Krause, M., Bindl, R., Ignatius, A., Pogoda, P., *Mandibular bone loss in ewe induced by hypothalamic-pituitary disconnection.* Clin Oral Implants Res, 2014. **25**(11): p. 1239-1244.
155. Oheim, R., Schinke, T., Amling, M., Pogoda, P., *Can we induce osteoporosis in animals comparable to the human situation?* Injury, 2016. **47**: p. S3-S9.
156. Oheim, R., Simon, M.J.K., Steiner, M., Vettorazzi, E., Barvencik, F., Ignatius, A., Amling, M., Clarke, I.J., Pogoda, P., Beil, F.T., *Sheep model for osteoporosis: The effects of peripheral hormone therapy on centrally induced systemic bone loss in an osteoporotic sheep model.* Injury, 2017. **48**(4): p. 841-848.

157. Ooms, M.E., Lips, P., Roos, J.C., van der Vijgh, W.J., Popp-Snijders, C., Bezemer, P.D., Bouter, L.M., *Vitamin D status and sex hormone binding globulin: determinants of bone turnover and bone mineral density in elderly women*. J Bone Miner Res, 1995. **10**(8): p. 1177-84.
158. Parfitt, A.M., *Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone*. Journal of Cellular Biochemistry, 1994. **55**(3): p. 273-286.
159. Parfitt, A.M., *Chapter 11 - Osteomalacia and Related Disorders*, in *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders (Third Edition)*, L.V. Avioli, S.M. Krane, Editors. 1998, Academic Press: San Diego. p. 327-386.
160. Pinkerton, J.V., Thomas, S., *Use of SERMs for treatment in postmenopausal women*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2014. **142**: p. 142-54.
161. Plotkin, L.I., Weinstein, R.S., Parfitt, A.M., Roberson, P.K., Manolagas, S.C., Bellido, T., *Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin*. J Clin Invest, 1999. **104**(10): p. 1363-74.
162. Portillo, M.R., Rodríguez-Ortiz, M.E., *Secondary Hyperparathyroidism: Pathogenesis, Diagnosis, Preventive and Therapeutic Strategies*. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 2017. **18**(1): p. 79-95.
163. Prockop, D.J., *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. Science, 1997. **276**(5309): p. 71-4.
164. Rachner, T.D., Khosla, S., Hofbauer, L.C., *New horizons in osteoporosis*. Lancet, 2011. **377**(9773): p. 1276-1287.
165. Raisz, L.G., *Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects*. The Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(12): p. 3318-3325.
166. Rapuri, P.B., Kinyamu, H.K., Gallagher, J.C., Haynatzka, V., *Seasonal changes in calciotropic hormones, bone markers, and bone mineral density in elderly women*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(5): p. 2024-32.
167. Recker, R., Lappe, J., Davies, K., Heaney, R., *Characterization of perimenopausal bone loss: a prospective study*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(10): p. 1965-73.
168. Reinwald, S., Burr, D., *Review of nonprimate, large animal models for osteoporosis research*. Journal of Bone and Mineral Research, 2008. **23**(9): p. 1353-1368.
169. Riggs, B.L., Khosla, S., Melton, L.J., 3rd, *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, 1998. **13**(5): p. 763-73.
170. Riggs, B.L., Khosla, S., Melton, L.J., 3rd, *Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton*. Endocr Rev, 2002. **23**(3): p. 279-302.
171. Robling, A.G., Niziolek, P.J., Baldrige, L.A., Condon, K.W., Allen, M.R., Alam, I., Mantila, S.M., Gluhak-Heinrich, J., Bellido, T.M., Harris, S.E., *Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(9): p. 5866-5875.
172. Roodman, G.D., *Cell biology of the osteoclast*. Experimental Hematology, 1999. **27**(8): p. 1229-1241.
173. Rooney, A.M., van der Meulen, M.C.H., *Mouse models to evaluate the role of estrogen receptor alpha in skeletal maintenance and adaptation*. Ann N Y Acad Sci, 2017. **1410**(1): p. 85-92.
174. Rosen, C.J., *The Epidemiology and Pathogenesis of Osteoporosis*, in *Endotext*, K.R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W.W. de Herder, K. Dungan,

- A. Grossman, J.M. Hershman, H.J. Hofland, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, R. McLachlan, J.E. Morley, M. New, J. Purnell, F. Singer, C.A. Stratakis, D.L. Trencce, D.P. Wilson, Editors. 2020, MDText.com: South Dartmouth (MA).
175. Rosini, S., Rosini, S., Bertoldi, I., Frediani, B., *Understanding bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: uses and risks*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015. **19**(17): p. 3309-17.
176. Rössler, H., Rütter, W., *Erworbene Osteopathien*, in *Orthopädie und Unfallchirurgie*. 2005: München u.a. p. 71-82.
177. Rueden, C.T., Schindelin, J., Hiner, M.C., DeZonia, B.E., Walter, A.E., Arena, E.T., Eliceiri, K.W., *ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data*. BMC Bioinformatics, 2017. **18**(1): p. 529.
178. Salerno, A., Hermann, R., *Efficacy and safety of steroid use for postoperative pain relief. Update and review of the medical literature*. J Bone Joint Surg Am, 2006. **88**(6): p. 1361-72.
179. Salo, J., Lehenkari, P., Mulari, M., Metsikko, K., Vaananen, H.K., *Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis*. Science, 1997. **276**(5310): p. 270-3.
180. Samefors, M., Ostgren, C.J., Molstad, S., Lannering, C., Midlov, P., Tengblad, A., *Vitamin D deficiency in elderly people in Swedish nursing homes is associated with increased mortality*. Eur J Endocrinol, 2014. **170**(5): p. 667-75.
181. Sampath, S.A., Lewis, S., Fosco, M., Tigani, D., *Trabecular orientation in the human femur and tibia and the relationship with lower-limb alignment for patients with osteoarthritis of the knee*. J Biomech, 2015. **48**(6): p. 1214-8.
182. Sapir-Koren, R., Livshits, G., *Bone mineralization is regulated by signaling cross talk between molecular factors of local and systemic origin: The role of fibroblast growth factor 23*. BioFactors, 2014. **40**(6): p. 555-568.
183. Scheidt-Nave, C., Banzer, D., Abendroth, K., *Schlussbericht multizentrische Studie zu Verteilung, Determination und prädiktivem Wert der Knochendichte in der deutschen Bevölkerung*. Förderprojekt des Bundesministeriums für Forschung und Technologie, Förderkennzeichen 01KM, 1997. **9304**(0): p. 1-45.
184. Schiebler, T.H., *Bewegungsapparat*, in *Anatomie : Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*, T.H. Schiebler, Editor. 2005, Springer Berlin Heidelberg New York: Berlin, Heidelberg, New York. p. 167-374.
185. Schiebler, T.H., *Histologie, Gewebelehre*, in *Anatomie : Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*, T.H. Schiebler, Editor. 2005, Springer Berlin Heidelberg New York: Berlin, Heidelberg, New York. p. 5-90.
186. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nature Methods, 2012. **9**: p. 676.
187. Schlesinger, P.H., Blair, H.C., Teitelbaum, S.L., Edwards, J.C., *Characterization of the osteoclast ruffled border chloride channel and its role in bone resorption*. J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18636-43.
188. Schorlemmer, S., Gohl, C., Iwabu, S., Ignatius, A., Claes, L., Augat, P., *Glucocorticoid treatment of ovariectomized sheep affects mineral density, structure, and mechanical properties of cancellous bone*. J Bone Miner Res, 2003. **18**(11): p. 2010-5.

189. Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., *Knochen und Knochenverbindungen*, in *Prometheus - LernAtlas der Anatomie: Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*, M. Schünke, E. Schulte, U. Schumacher, M. Voll, Editors. 2014, Thieme: Stuttgart, New York. p. 40-55.
190. Schwartz, M.P., Recker, R.R., *Comparison of surface density and volume of human iliac trabecular bone measured directly and by applied stereology*. *Calcif Tissue Int*, 1981. **33**(6): p. 561-5.
191. Scott, L.J., *Denosumab: A Review of its Use in Postmenopausal Women with Osteoporosis*. *Drugs & Aging*, 2014. **31**(7): p. 555-576.
192. Searing, D.A., Zhang, Y., Murphy, J.R., Hauk, P.J., Goleva, E., Leung, D.Y., *Decreased serum vitamin D levels in children with asthma are associated with increased corticosteroid use*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **125**(5): p. 995-1000.
193. Seeman, E., *Bone quality: the material and structural basis of bone strength*. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2008. **26**(1): p. 1-8.
194. Seeman, E., *Bone Modeling and Remodeling*. 2009. **19**(3): p. 219-233.
195. Seitz, S., Koehne, T., Ries, C., De Novo Oliveira, A., Barvencik, F., Busse, B., Eulenburg, C., Schinke, T., Puschel, K., Rueger, J.M., Amling, M., Pogoda, P., *Impaired bone mineralization accompanied by low vitamin D and secondary hyperparathyroidism in patients with femoral neck fracture*. *Osteoporos Int*, 2013. **24**(2): p. 641-9.
196. Shen, V., Dempster, D.W., Birchman, R., Xu, R., Lindsay, R., *Loss of cancellous bone mass and connectivity in ovariectomized rats can be restored by combined treatment with parathyroid hormone and estradiol*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(6): p. 2479-87.
197. Shen, Y., Zhang, Y.H., Shen, L., *Postmenopausal women with osteoporosis and osteoarthritis show different microstructural characteristics of trabecular bone in proximal tibia using high-resolution magnetic resonance imaging at 3 tesla*. *BMC Musculoskelet Disord*, 2013. **14**: p. 136.
198. Sigrist, I.M., Gerhardt, C., Alini, M., Schneider, E., Egermann, M., *The long-term effects of ovariectomy on bone metabolism in sheep*. *J Bone Miner Metab*, 2007. **25**(1): p. 28-35.
199. Silva, B.C., Bilezikian, J.P., *Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton*. *Current opinion in pharmacology*, 2015. **22**: p. 41-50.
200. Silva, I., Branco, J.C., *Rank/Rankl/opg: literature review*. *Acta Reumatol Port*, 2011. **36**(3): p. 209-18.
201. Simon, M.J.K., Beil, F.T., Pogoda, P., Vettorazzi, E., Clarke, I., Amling, M., Oheim, R., *Is centrally induced alveolar bone loss in a large animal model preventable by peripheral hormone substitution?* *Clin Oral Investig*, 2018. **22**(1): p. 495-503.
202. Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., Boyle, W.J., *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. *Cell*, 1997. **89**(2): p. 309-19.
203. Sims, N.A., Martin, T.J., *Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit*. *BoneKEY reports*, 2014. **3**: p. 481-481.

204. Smit, T.H., *The use of a quadruped as an in vivo model for the study of the spine - biomechanical considerations*. Eur Spine J, 2002. **11**(2): p. 137-44.
205. Soysa, N.S., Alles, N., *Osteoclast function and bone-resorbing activity: An overview*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016. **476**(3): p. 115-120.
206. Staines, K.A., MacRae, V.E., Farquharson, C., *The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling*. J Endocrinol, 2012. **214**(3): p. 241-55.
207. Staples, L.D., McPhee, S., Kennaway, D.J., Williams, A.H., *The influence of exogenous melatonin on the seasonal patterns of ovulation and oestrus in sheep*. Animal Reproduction Science, 1992. **30**(1): p. 185-223.
208. Steinbuch, M., Youket, T.E., Cohen, S., *Oral glucocorticoid use is associated with an increased risk of fracture*. Osteoporos Int, 2004. **15**(4): p. 323-8.
209. Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T., Martin, T.J., *Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families*. Endocr Rev, 1999. **20**(3): p. 345-57.
210. Teitelbaum, S.L., *Bone resorption by osteoclasts*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1504-8.
211. Tejwani, V., Qian, Q., *Calcium Regulation and Bone Mineral Metabolism in Elderly Patients with Chronic Kidney Disease*. Nutrients, 2013. **5**(6): p. 1913-1936.
212. Thomas, T., Vico, L., Skerry, T.M., Caulin, F., Lanyon, L.E., Alexandre, C., Lafage, M.H., *Architectural modifications and cellular response during disuse-related bone loss in calcaneus of the sheep*. J Appl Physiol (1985), 1996. **80**(1): p. 198-202.
213. Thompson, D.D., Simmons, H.A., Pirie, C.M., Ke, H.Z., *FDA Guidelines and animal models for osteoporosis*. Bone, 1995. **17**(4 Suppl): p. 125s-133s.
214. Thouverey, C., Malinowska, A., Balcerzak, M., Strzelecka-Kiliszek, A., Buchet, R., Dadlez, M., Pikula, S., *Proteomic characterization of biogenesis and functions of matrix vesicles released from mineralizing human osteoblast-like cells*. Journal of Proteomics, 2011. **74**(7): p. 1123-1134.
215. Tong, W., Glimcher, M.J., Katz, J.L., Kuhn, L., Eppell, S.J., *Size and shape of mineralites in young bovine bone measured by atomic force microscopy*. Calcif Tissue Int, 2003. **72**(5): p. 592-8.
216. Tsai, M.J., O'Malley, B.W., *Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 451-86.
217. Turner, A.S., *The sheep as a model for osteoporosis in humans*. Vet J, 2002. **163**(3): p. 232-9.
218. Turner, A.S., Alvis, M., Myers, W., Stevens, M.L., Lundy, M.W., *Changes in bone mineral density and bone-specific alkaline phosphatase in ovariectomized ewes*. Bone, 1995. **17**(4, Supplement): p. S395-S402.
219. Turner, R.T., *Mice, Estrogen, and Postmenopausal Osteoporosis*. Journal of Bone and Mineral Research, 1999. **14**(2): p. 187-191.
220. Vaananen, H.K., Karhukorpi, E.K., Sundquist, K., Wallmark, B., Roininen, I., Hentunen, T., Tuukkanen, J., Lakkakorpi, P., *Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H(+)-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts*. J Cell Biol, 1990. **111**(3): p. 1305-11.
221. Vaananen, H.K., Zhao, H., Mulari, M., Halleen, J.M., *The cell biology of osteoclast function*. Journal of Cell Science, 2000. **113**(3): p. 377-381.

222. van 't Hof, R.J., Rose, L., Bassonga, E., Daroszewska, A., *Open source software for semi-automated histomorphometry of bone resorption and formation parameters*. Bone, 2017. **99**: p. 69-79.
223. van Bezooijen, R.L., Roelen, B.A., Visser, A., van der Wee-Pals, L., de Wilt, E., Karperien, M., Hamersma, H., Papapoulos, S.E., ten Dijke, P., Lowik, C.W., *Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist*. J Exp Med, 2004. **199**(6): p. 805-14.
224. van der Eerden, B.C., Hoenderop, J.G., de Vries, T.J., Schoenmaker, T., Buurman, C.J., Uitterlinden, A.G., Pols, H.A., Bindels, R.J., van Leeuwen, J.P., *The epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 is essential for proper osteoclastic bone resorption*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(48): p. 17507-12.
225. van Staa, T.P., Leufkens, H.G., Cooper, C., *The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis*. Osteoporos Int, 2002. **13**(10): p. 777-87.
226. Walsh, M.C., Choi, Y., *Biology of the RANKL–RANK–OPG System in Immunity, Bone, and Beyond*. Frontiers in Immunology, 2014. **5**(511).
227. Wang, F.-S., Ko, J.-Y., Yeh, D.-W., Ke, H.-C., Wu, H.-L., *Modulation of Dickkopf-1 Attenuates Glucocorticoid Induction of Osteoblast Apoptosis, Adipocytic Differentiation, and Bone Mass Loss*. Endocrinology, 2008. **149**(4): p. 1793-1801.
228. Wang, L., *Solute transport in the bone lacunar-canalicular system (LCS)*. Current Osteoporosis Reports, 2018. **16**(1): p. 32-41.
229. Weinstein, R.S., *True strength*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(4): p. 621-5.
230. Weinstein, R.S., *Clinical practice. Glucocorticoid-induced bone disease*. N Engl J Med, 2011. **365**(1): p. 62-70.
231. Weinstein, R.S., Jilka, R.L., Parfitt, A.M., Manolagas, S.C., *Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone*. J Clin Invest, 1998. **102**(2): p. 274-82.
232. Welsch, U., Kummer, W., *Bindegewebe*, in *Histologie: Das Lehrbuch*, U. Welsch, W. Kummer, Editors. 2018, Elsevier, Urban & Fischer: München. p. 115-151.
233. Werny, F., Schlatt, S., *Reproduktive Funktion der Frau*, in *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*, R. Brandes, F. Lang, R.F. Schmidt, Editors. 2019, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 964-969.
234. Weyerstahl, T., Stauber, M., Andergassen, U., *Gynäkologie und Geburtshilfe*, in *Duale Reihe*. 2013: Stuttgart.
235. World Health, O., *Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis : report of a WHO study group [meeting held in Rome from 22 to 25 June 1992]*. 1994, World Health Organization: Geneva.
236. Wuthier, R.E., *Mechanism of de novo mineral formation by matrix vesicles*. Connect Tissue Res, 1989. **22**(1-4): p. 27-33; discussion 53-61.
237. Yang, J., Pham, S.M., Crabbe, D.L., *Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture*. Dentomaxillofac Radiol, 2003. **32**(4): p. 247-51.
238. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Suda, T., *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3597-602.

239. Yun, T.J., Chaudhary, P.M., Shu, G.L., Frazer, J.K., Ewings, M.K., Schwartz, S.M., Pascual, V., Hood, L.E., Clark, E.A., *OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 6113-21.
240. Zarrinkalam, M.-R., Schultz, C.G., Parkinson, I.H., Moore, R.J., *Osteoporotic characteristics persist in the spine of ovariectomized sheep after withdrawal of corticosteroid administration*. Journal of osteoporosis, 2012. **2012**.
241. Zarrinkalam, M.R., Beard, H., Schultz, C.G., Moore, R.J., *Validation of the sheep as a large animal model for the study of vertebral osteoporosis*. European Spine Journal, 2009. **18**(2): p. 244-253.
242. Zarrinkalam, M.R., Mulaibrahimovic, A., Atkins, G.J., Moore, R.J., *Changes in osteocyte density correspond with changes in osteoblast and osteoclast activity in an osteoporotic sheep model*. Osteoporos Int, 2012. **23**(4): p. 1329-36.
243. Zhang, L., Chang, M., Beck, C.A., Schwarz, E.M., Boyce, B.F., *Analysis of new bone, cartilage, and fibrosis tissue in healing murine allografts using whole slide imaging and a new automated histomorphometric algorithm*. Bone research, 2016. **4**: p. 15037-15037.
244. Zhou, X., Cui, Y., Zhou, X., Han, J., *Phosphate/Pyrophosphate and MV-related Proteins in Mineralisation: Discoveries from Mouse Models*. International Journal of Biological Sciences, 2012. **8**(6): p. 778-790.

13 Anhang

13.1 Paraffin-Einbettung

Lösung	Temperatur	Dauer
70 % Ethanol	Raumtemperatur	2 h
80 % Ethanol	-"-	2,5 h
96 % Ethanol	-"-	2 h
100 % Ethanol	-"-	3 x 3 h
Xylol	-"-	1 h, danach 2 x 45 min
Paraffin	58 °C	3 x 45 min

Tab. 2: Entwässerungsprotokoll der Paraffin-Einbettung.

Material:

Alkohol: Ethanol 522 vergällt mit 1 % Petroläther (1001043227002, Stockmeier Chemie, Bielefeld, Deutschland)

Xylol: (28.975.325, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)

Paraffin: (6642.6, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

13.2 Polymethylmethacrylat Einbettung

Phase	Lösung	Temperatur	Applikation	Dauer
Entwässerung	70 % Ethanol	Raumtemperatur	Niederfrequente Vibrationen	2 d
	70 % Ethanol	-"-	-"-	2 d
	80 % Ethanol	-"-	-"-	3 d
	96 % Ethanol	-"-	-"-	3 d
	100 % Ethanol	-"-	-"-	4 d
	100 % Ethanol	-"-	-"-	3 d
	100 % Ethanol	-"-	-"-	4 d
	100 % Ethanol	-"-	-"-	3 d
	100 % Ethanol	-"-	-"-	4 d
Intermedium	Xylol	-"-	-"-	12 h
	Xylol	-"-	-"-	12 h
Präinfiltration	Präinfiltrationslösung 1	-"-	-"-	5 d
	Präinfiltrationslösung 2	-"-	-"-	5 d
	Präinfiltrationslösung 3	4 °C		4 d
Infiltration	Infiltrationslösung	4 °C		11 d

Tab. 3: Entwässerungs- und Infiltrationsschema der Technovit-Einbettung.

Herstellung der Gebrauchslösungen

Präinfiltrationslösungen:

- 1) 125 ml Basislösung (stabilisiert) + 125 ml Xylol
- 2) 250 ml Basislösung (stabilisiert) + 1,25 g Härter 1
- 3) 250 ml Basislösung (entstabilisiert) + 1,25 g Härter 1

Infiltrationslösung:

- 250 ml Basislösung (entstabilisiert) + 20 g PMMA-Pulver + 1 g Härter 1

Stammlösungen:

- A) 500 ml Basislösung (entstabilisiert) + 80 g PMMA-Pulver + 3 g Härter 1
- B) 44 ml Basislösung (entstabilisiert) + 4 ml Härter 2 + 2 ml

Polymerisationsregler

Polymerisationsgemisch:

- Stammlösung A und B in einem Verhältnis von 9 : 1

Entstabilisierung der Basislösung

Beim Durchlaufen von stabilisierter Basislösung durch eine mit 50 g Aluminiumoxid gefüllte Chromatographiesäule entsteht entstabilisierte Basislösung.

Material:

Alkohol: Ethanol 522 vergällt mit 1 % Petroläther (1001043227002, Stockmeier Chemie, Bielefeld, Deutschland)

Xylol: (28.975.325, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)

Basislösung (stabilisiert): Technovit[®] 9100 Basislösung stabilisiert

Härter 1: Technovit[®] 9100 Härter 1

Härter 2: Technovit[®] 9100 Härter 2

PMMA-Pulver: Technovit[®] 9100 PMMA-Pulver

Polymerisationsregler: Technovit[®] 9100 Regler

Komponenten (64715444, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland)

13.3 Färbeprotokoll Hämatoxylin-Eosin

Arbeitsanweisung	Wiederholungszahl	Dauer [min]
Entparaffinieren mit Xylol	2	5
Absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 %)	1	Je 2 - 5
Aqua dest.	1	2-5
Kernfärbung mit Mayers Hämalaun (vor Gebrauch filtrieren)	1	3-6
Mit Aqua dest. abspülen	1	
Bläuen mit fließendem Leitungswasser	1	10
Mit Aqua dest. abspülen	1	
Bindegewebsfärbung mit 1 % Eosinlösung	1	0,5 - 2
Aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %)	1	2-5
Xylol	2	5
Eindeckeln mit DePex		

Tab. 4: Färbeprotokoll H.E.

Material:

Xylol: (28.975.325, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)

Alkohol: Ethanol 522 vergällt mit 1 % Petroläther (1001043227002, Stockmeier Chemie, Bielefeld, Deutschland)

Mayers Hämalan: (T865.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Eosinlösung: 1 % wässrige Gebrauchslösung: 10 g Eosin G (7089.2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) ad 1000 ml Aqua dest + 10 Tropfen Eisessig (3738.4, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

DePex: (18243.02, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)

13.4 Färbeprotokoll von Kossa / van Gieson:

Schnitte:

Arbeitsanweisung	Wiederholungszahl	Dauer [min]
Entplasten in MEA	3	5
Absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 %)	je	2
Rehydrieren mit Aqua bidest.	1	2
3 % Silbernitratlösung	1	10
Spülen mit Aqua bidest	3	2
10 % Natriumcarbonatlösung	1	2
Spülen mit Leitungswasser	1	8
5 % Natriumthiosulfatlösung	1	5
In Aqua dest. tauchen um Reaktion zu stoppen	2	2
Gegenfärbung mit Methylgrün	1	8
Spülen mit Leitungswasser	1	8
Spülen mit Aqua dest.	3	2
Färben mit Weigert's Eisenhämatoxylin	1	6
Spülen mit Leitungswasser	1	8
Färben mit van Gieson Mixtur	1	5
Kurz in 96 % Alkohol eintauchen		
In 100 % Alkohol	2	1
Xylol	2	5
Eindeckeln mit DePex		

Tab. 5: Färbeprotokoll für Schnittpräparate von Kossa / van Gieson.

Schliffe:

Arbeitsanweisung	Wiederholungszahl	Dauer [min]
Entplasten in MEA	2	30
Absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 %)	je	5
Rehydrieren mit Aqua bidest.	1	5
3 % Silbernitratlösung	1	10
Spülen mit Aqua bidest	3	2
10 % Natriumcarbonatlösung	1	2
Spülen mit Leitungswasser	1	10
5 % Natriumthiosulfatlösung	1	5
In Aqua dest. tauchen um Reaktion zu stoppen	2	2
Gegenfärbung mit Methylgrün	1	5
Kurz in dest. Wasser tauchen		
Spülen mit Leitungswasser	1	10
Spülen mit Aqua dest.	3	2
Färben mit Weigert's Eisenhämatoxylin	1	6
Spülen mit Leitungswasser	1	10
Färben mit van Gieson Mixtur	1	5
Kurz in 96 % Alkohol eintauchen	2 - 3	
In 100 % Alkohol	1	< 1
Xylol	2	5
Eindeckeln mit DePex		

Tab. 6: Färbeprotokoll für Schliffpräparate von Kossa / van Gieson.**Material:**

MEA: (2-Methoxyethyl) -acetat (806.061, Merck Chemical GmbH, Schwalbach, Deutschland)

Alkohol: Ethanol 522 vergällt mit 1 % Petroläther (1001043227002, Stockmeier Chemie, Bielefeld, Deutschland)

3 % Silbernitrat: 3 g Silbernitrat (31630-100G-R, Sigma Aldrich, St. Louis MO) in 100 ml Aqua bidest.

10 % Natriumcarbonat-Formaldehyd: 10 g Natriumcarbonat (CNa₂O₃, 105,99 g/mol, 106392, Merck Chemical GmbH, Schwalbach, Deutschland)
+ 25 ml Formaldehyd 37 % (104002, Merck Chemical GmbH, Schwalbach, Deutschland) ad 100 ml Aqua bidest.

5 % Natriumthiosulfat: 5 g Natriumthiosulfat (Na₂O₃S₂, 248,21 g/mol, 106509, Merck Chemical GmbH, Schwalbach, Deutschland) ad 100 ml Aqua bidest.

Methylgrün: 1 g Methylgrün (5159.2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
ad 100 ml Aqua bidest. + 25 ml 100 % Alkohol

Weigert's Hämatoxylin: 1 Teil A + 1 Teil B (X906.1 & X907.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Van Gieson: (2E050, Chroma, Münster, Deutschland)

Xylol: (28.975.325, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)

DePex: (18243.02, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)

13.5 Herstellung der Injektionslösungen für die Fluoreszenz-Marker

Injektionslösungen

Alizarin: 3 % Alizarin Complexone und 2 % NaHCO₃ in Aqua ad iniectabilia mischen (pH 7,4)
mit Faltenfilter und 0,22 µm Filter steril filtern

Calcein: 3 % Calcein und 2 % NaHCO₃ in Aqua ad iniectabilia mischen (pH 7,4)
mit 0,45 µm Filter und 0,22 µm Filter steril filtern

Material:

Alizarin Complexone (A3882, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO):

Calcein (C0875, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

NaHCO₃ (Cellpure HN01.1, Carl, Karlsruhe, Deutschland)

13.6 Probenzahl

Anzahl der pro Gruppe, Zeitpunkt und Region in die Auswertung eingegangenen Proben.

	Kontrolle	OVX	OVXD	OVXDS
H.E.:				
Beckenkamm 0M	8	5	6	7
Beckenkamm 3M	6	6	8	7
Beckenkamm 8M	8	7	7	7
Femur 8M	8	7	8	7
LWK 8M	8	7	8	7
Von Kossa / van Gieson				
Beckenkamm 0M	8	6	8	8
Beckenkamm 3M	5	6	5	6
Beckenkamm 8M	5	6	7	7
Femur 8M	3	3	3	3
LWK 8M	3	3	3	3
Fluoreszenz:				
Beckenkamm 8M	3	3	3	2
Femur 8M	3	3	3	2

Tab. 7: Anzahl der in die Auswertung eingegangenen Proben.

13.7 Ergebnistabellen

13.7.1 Gewichtsentwicklung

Zeitpunkt	Kontrolle	OVX	OVXD	OVXDS
0M	63,3	62,6	62,6	58,5
3M	69,3	66,4	68,6	60,3
8M	69,7	62,8	67,3	60,1

Tab. 8: Mittleres Körpergewicht [kg] im Verlauf der Studie.

13.7.2 Quantitative Analyse der Trabekelparameter

13.7.2.1 Tb.Th

Zeitpunkt	Kontrolle	OVX	OVXD	OVXDS
Beckenkamm				
0M	122	134	150	142
3M	144	142	135	104
8M	174	174	162	100
Femur				
8M	300	379	326	170
LWK				
8M	214	211	193	125

Tab. 9: Mittlere Tb.Th [μm] im Verlauf der Studie aller erfassten Skelettregionen.

Skelettregion	Zeitpunkt	Gruppe	p-Wert
Beckenkamm	0M	K_OVXD	0,029
Beckenkamm	3M	K_OVXDS	0,017
Beckenkamm	3M	OVX_OVXDS	0,002
Beckenkamm	3M	OVXD_OVXDS	0,030
Beckenkamm	8M	K_OVXDS	0,003
Beckenkamm	8M	OVX_OVXDS	0,001
Beckenkamm	8M	OVXD_OVXDS	0,001
Beckenkamm	0M_8M	K	0,019
Beckenkamm	0M_8M	OVX	0,009
Beckenkamm	3M_8M	OVX	0,002
Beckenkamm	3M_8M	OVXD	0,020
Beckenkamm	0M_3M	OVXDS	0,003
Beckenkamm	0M_8M	OVXDS	0,001

Tab. 10: Signifikante Differenzen bei Bestimmung der Tb.Th aller erfassten Skelettregionen.

13.7.2.2 Tb.Sp

Zeitpunkt	Kontrolle	OVX	OVXD	OVXDS
Beckenkamm				
0M	501	546	539	516
3M	545	620	592	534
8M	553	665	584	578
Femur				
8M	629	865	909	809
LWK				
8M	519	541	575	539

Tab. 11: Mittlere Tb.Sp [μm] im Verlauf der Studie aller erfassten Skelettregionen.

Skelettregion	Zeitpunkt	Gruppe	p-Wert
Keine	Signifikanten	Unterschiede	!!!

Tab. 12: Signifikante Differenzen bei Bestimmung der Tb.Sp aller erfassten Skelettregionen.

13.7.2.3 Tb.Ar/T.Ar

Zeitpunkt	Kontrolle	OVX	OVXD	OVXDS
Beckenkamm				
0M	23,8	24,6	23,6	22,8
3M	24,8	20,7	24,0	15,1
8M	28,1	26,2	24,9	15,4
Femur				
8M	34,2	29,7	25,3	15,7
LWK				
8M	33,7	31,6	28,6	20,7

Tab. 13: Mittlere Tb.Ar/T.Ar [%] im Verlauf der Studie aller erfassten Skelettregionen.

Skelettregion	Zeitpunkt	Gruppe	p-Wert
Beckenkamm	3M	K_OVXDS	0,004
Beckenkamm	3M	OVX_OVXDS	0,041
Beckenkamm	3M	OVXD_OVXDS	0,004
Beckenkamm	8M	K_OVXDS	0,003
Beckenkamm	8M	OVX_OVXDS	0,005
Beckenkamm	8M	OVXD_OVXDS	0,004
Beckenkamm	0M_3M	OVXDS	0,001
Beckenkamm	0M_8M	OVXDS	0,004

Tab. 14: Signifikante Differenzen bei Bestimmung der Tb.Ar/T.Ar aller erfassten Skelettregionen.

13.7.3 O.Ar/Tb.Ar

Zeitpunkt	Kontrolle	OVX	OVXD	OVXDS
Beckenkamm				
0M	15,08	15,29	13	13,13
3M	11,93	13,18	12,85	16,37
8M	10,44	10,16	12,22	20,08
Femur				
8M	5,7	5,9	8,6	15,6
LWK				
8M	6,0	5,2	5,2	14,6

Tab. 15: Mittlere O.Ar/Tb.Ar [%] im Verlauf der Studie aller erfassten Skelettregionen.

Skelettregion	Zeitpunkt	Gruppe	p-Wert
Beckenkamm	3M	K_OVXDS	0,009
Beckenkamm	3M	OVX_OVXDS	0,041
Beckenkamm	3M	OVXD_OVXDS	0,030
Beckenkamm	8M	K_OVXDS	0,003
Beckenkamm	8M	OVX_OVXDS	0,001
Beckenkamm	8M	OVXD_OVXDS	0,001
Beckenkamm	0_8M	OVX	0,026
Beckenkamm	3_8M	OVX	0,026
Beckenkamm	0_3M	OVXDS	0,008
Beckenkamm	0_8M	OVXDS	0,000
Beckenkamm	3_8M	OVXDS	0,014

Tab. 16: Signifikante Differenzen bei Bestimmung der O.Ar/Tb.Ar aller erfassten Skelettregionen.

13.7.4 Mineralisationsrate (MAR)

Zeitpunkt	Kontrolle	OVX	OVXD	OVXDS
Beckenkamm				
8M	1,88	1,98	1,92	1,48
Femur				
8M	1,53	1,95	1,90	1,02

Tab. 17: Mittlere Mineralisationsrate (MAR) [$\mu\text{m}/\text{d}$] im Verlauf der Studie aller erfassten Skelettregionen.

Skelettregion	Zeitpunkt	Gruppe	p-Wert
Femur	8M	K_OVXDS	0,016
Femur	8M	OVX_OVXDS	0,000
Femur	8M	OVXD_OVXDS	0,016

Tab. 18: Signifikante Differenzen bei Bestimmung der MAR aller erfassten Skelettregionen.

13.7.5 Vergleich der Regionen

13.7.5.1 Beckenkamm vs. Femur vs. LWK, Tb.Th

Skelettregion	Kontrolle	OVX	OVXD	OVXDS
Beckenkamm	174	174	162	100
Femur	300	379	326	170
LWK	214	211	193	125

Tab. 19: Mittlere Tb.Th [μm] beim Vergleich der Regionen nach 8M.

Skelettregion	Gruppe	p-Wert
Beckenkamm_Femur	K	0,036
Beckenkamm_LWK	K	0,036
Beckenkamm_Femur	OVX	0,024
Beckenkamm_LWK	OVX	0,048
Beckenkamm_Femur Beckenkamm	OVXD	0,017
Beckenkamm_Femur Beckenkamm	OVXDS	0,017

Tab. 20: Signifikante Differenzen der Tb.Th im Vergleich der Regionen nach 8M.

13.7.5.2 Beckenkamm vs. Femur vs. LWK, Tb.Ar/T.Ar

Skelettregion	Kontrolle	OVX	OVXD	OVXDS
Beckenkamm	28,1	26,2	24,9	15,4
Femur	34,2	29,7	25,3	15,7
LWK	33,7	31,6	28,6	20,7

Tab. 21: Mittlere Tb.Ar/T.Ar [%] beim Vergleich der Regionen nach 8M.

Skelettregion	Gruppe	p-Wert
Keine	Signifikanten	Unterschiede!!!

Tab. 22: Signifikante Differenzen der Tb.Ar/T.Ar im Vergleich der Regionen nach 8M.

13.7.5.3 Beckenkamm vs. Femur vs. LWK, O.Ar/Tb.Ar

Skelettregion	Kontrolle	OVX	OVXD	OVXDS
Beckenkamm	10,44	10,16	12,22	20,08
Femur	5,7	5,9	8,6	15,6
LWK	6,0	5,2	5,2	14,6

Tab. 23: Mittlere O.Ar/Tb.Ar [%] beim Vergleich der Regionen nach 8M.

Skelettregion	Gruppe	p-Wert
Beckenkamm_Femur	OVX	0,048
Beckenkamm_LWK	OVX	0,024
Beckenkamm_LWK	OVXD	0,017
Beckenkamm_LWK	OVXDS	0,017

Tab. 24: Signifikante Differenzen der O.Ar/Tb.Ar im Vergleich der Regionen nach 8M.

13.7.5.4 Unbelastet vs. belastet, Tb.Th

Skelettregion	Kontrolle	OVX	OVXD	OVXDS
unbelastet	174	174	162	100
belastet	257	295	260	148

Tab. 25: Mittlere Tb.Th [μm] beim Vergleich der unbelasteten und belasteten Regionen nach 8M.

Skelettregion	Gruppe	p-Wert
unbelastet_belastet	K	0,004
unbelastet_belastet	OVX	0,004
unbelastet_belastet	OVXD	0,005
unbelastet_belastet	OVXDS	0,002

Tab. 26: Signifikante Differenzen der Tb.Th im Vergleich der unbelasteten und belasteten Regionen nach 8M.

13.7.5.5 Unbelastet vs. belastet, Tb.Ar/T.Ar

Skelettregion	Kontrolle	OVX	OVXD	OVXDS
unbelastet	28,1	26,2	24,9	15,4
belastet	33,9	30,7	27,0	18,2

Tab. 27: Mittlere Tb.Ar/T.Ar [%] beim Vergleich der unbelasteten und belasteten Regionen nach 8M.

Skelettregion	Gruppe	p-Wert
unbelastet_belastet	K	0,030

Tab. 28: Signifikante Differenzen der Tb.Ar/T.Ar im Vergleich der unbelasteten und belasteten Regionen nach 8M.

13.7.5.6 Unbelastet vs. belastet, O.Ar/Tb.Ar

Skelettregion	Kontrolle	OVX	OVXD	OVXDS
unbelastet	10,44	10,16	12,22	20,08
belastet	5,9	5,5	6,92	15,11

Tab. 29: Mittlere O.Ar/Tb.Ar [%] beim Vergleich der unbelasteten und belasteten Regionen nach 8M.

Skelettregion	Gruppe	p-Wert
unbelastet_belastet	K	0,030
unbelastet_belastet	OVX	0,004
unbelastet_belastet	OVXD	0,005
unbelastet_belastet	OVXDS	0,008

Tab. 30: Signifikante Differenzen der O.Ar/Tb.Ar im Vergleich der unbelasteten und belasteten Regionen nach 8M.

13.7.6 DXA-Messungen; BMD

Zeitpunkt	Kontrolle	OVX	OVXD	OVXDS
Femur				
0M	1,15	1,16	1,20	1,19
3M	1,15	1,18	1,13	0,91
8M	1,19	1,24	1,18	0,81
LWK				
0M	1,11	1,14	1,14	1,15
3M	1,10	1,08	1,04	0,81
8M	1,15	1,11	1,01	0,75

Tab. 31: Mittlere BMD [g/cm²] im Verlauf der Studie aller erfassten Skelettregionen.

Skelettregion	Zeitpunkt	Gruppe	p-Wert
Femur	3M	K_OVXDS	0,003
Femur	3M	OVX_OVXDS	0,004
Femur	3M	OVXD_OVXDS	0,010
Femur	8M	K_OVXDS	0,000
Femur	8M	OVX_OVXDS	0,000
Femur	8M	OVXD_OVXDS	0,000
Femur	0M_3M	OVXDS	0,005
Femur	0M_8M	OVXDS	0,000
LWK	3M	K_OVXDS	0,001
LWK	3M	OVX_OVXDS	0,000
LWK	3M	OVXD_OVXDS	0,001
LWK	8M	K_OVXDS	0,000
LWK	8M	OVX_OVXDS	0,001
LWK	8M	OVXD_OVXDS	0,001
LWK	0M_3M	OVXDS	0,000
LWK	0M_8M	OVXDS	0,000

Tab. 32: Signifikante Differenzen bei Bestimmung der BMD aller erfassten Skelettregionen.

13.8 Makros

13.8.1 Quellcode "auto_Trainable_Weka_Segmentaion"

```
macro "auto Trainable Weka Segmentation" {

setBatchMode(true);
empty="";
dir1=getDirectory("Input");
if (dir1==empty) {
beep();
exit("aborted");
}
dir0=getDirectory("working folder");

if (dir0==empty) {
beep();
exit("aborted");
}
if (dir0==dir1) {
beep();
exit("aborted! Input folder couldn't be the working folder");
}

if(File.exists(dir0+"Stacks")) {
    print("folder already exists");
}else{
    myDir2=dir0+"Stacks"+File.separator;
    File.makeDirectory(myDir2);
    print("new folder created");
}
dir2=dir0+"Stacks//";

if(File.exists(dir0+"Classified_images")) {
    print("folder already exists");
}else{
    myDir3=dir0+"Classified_images"+File.separator;
    File.makeDirectory(myDir3);
    print("new folder created");
}
dir3=dir0+"Classified_images//";

if(File.exists(dir0+"Probability_maps")) {
    print("folder already exists");
}else{
    myDir4=dir0+"Probability_maps"+File.separator;
    File.makeDirectory(myDir4);
    print("new folder created");
}
}
```

```
dir4=dir0+"Probability_maps//";

if(File.exists(dir0+"Cache")) {
    print("folder already exists");
}else{
    myDir5=dir0+"Cache"+File.separator;
    File.makeDirectory(myDir5);
    print("new folder created");
}
dir5=dir0+"Cache//";

if(File.exists(dir0+"Classified_Overview")) {
    print("folder already exists");
}else{
    myDir6=dir0+"Classified_Overview"+File.separator;
    File.makeDirectory(myDir6);
    print("new folder created");
}
dir6=dir0+"Classified_Overview//";

if(File.exists(dir0+"Probability_maps_Overview")) {
    print("folder already exists");
}else{
    myDir7=dir0+"Probability_maps_Overview"+File.separator;
    File.makeDirectory(myDir7);
    print("new folder created");
}
dir7=dir0+"Probability_maps_Overview//";

classifier=File.openDialog ("Please select the classifier file:");
if (classifier==empty) {
    beep();
    exit("aborted");
}

data=File.openDialog ("Please select the data file:");
if (data==empty) {
    beep();
    exit("aborted");
}

Cache1="format=TIFF save=["+dir5+"//Stack0000.tif]";
Cache2="format=TIFF save=["+dir5+"//Probability maps_c001.tif]";

column_number=getNumber("images per columns?  If the size of each image is big, it could make sense to cut them in many small
images", 4);
row_number=getNumber("images per rows?  If the size of each image is big, it could make sense to cut them in many small
images", 4);
```

```
a=column_number*row_number;
```

```
Enhance_Contrast=getBoolean("Do you want to enhance Contrast?");  
if (Enhance_Contrast==1) {  
  saturaion=getString("How much saturaion?", "0.3");  
}
```

```
Probability_maps=getBoolean("Do you want to creat Probability maps?");
```

```
list = getFileList(dir1);  
for (j=0; j<list.length; j++) {
```

```
  input1=list[j];  
  inputtif=input1;  
  file1=dir1+inputtif;
```

```
  print("open" + input1);  
  open(file1);  
  if (Enhance_Contrast==1) {  
    run("Enhance Contrast...", "saturated=saturaion");  
  }  
  run("Montage to Stack...", "images_per_row=row_number images_per_column=column_number border=0");  
  run("Image Sequence... ", Cache1);  
  wait(1000);  
  run("Close");  
  close();  
  wait(100);
```

```
  if (a>10) {  
    for (i=0; i<10; i++) {  
      open(dir5+"Stack000"+i+".tif");  
      saveAs(dir2+input1+"0"+i+".tif");  
      close();
```

```
      open(dir2+input1+"0"+i+".tif");  
      run("Trainable Weka Segmentation");  
      wait(3000);  
      selectWindow("Trainable Weka Segmentation v2.1.5");  
      call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.loadClassifier", classifier);  
      call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.loadData", data);  
      wait(1000);  
      if (Probability_maps==1) {  
        call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.getProbability");  
        selectWindow("Probability maps");  
        run("Image Sequence... ", Cache2);
```

```
close();
}
selectWindow("Trainable Weka Segmentation v2.1.5");
call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.trainClassifier");
call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.getResult");
selectWindow("Classified image");
saveAs("Tiff", dir3+input1+"0"+i+".tif.tif");
close();
selectWindow("Trainable Weka Segmentation v2.1.5");
close();
selectWindow(input1+"0"+i+".tif");
close();

if (Probability_maps==1) {
if (File.exists(dir5+"Probability maps0000.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0000.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.0.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0001.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0001.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.1.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0002.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0002.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.2.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0003.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0003.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.3.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0004.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0004.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.4.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0005.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0005.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.5.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0006.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0006.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.6.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0007.tif")) {
```

```
open(dir5+"Probability maps0007.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.7.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0008.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0008.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.8.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0009.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0009.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.9.tif");
close();
}
}
}
if (a<=10) {
    for (i=0; i<a; i++) {
open(dir5+"Stack000"+i+".tif");
saveAs(dir2+input1+"0"+i+".tif");
close();

open(dir2+input1+"0"+i+".tif");
run("Trainable Weka Segmentation");
wait(3000);
selectWindow("Trainable Weka Segmentation v2.1.5");
call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.loadClassifier", classifier);
call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.loadData", data);
wait(1000);
if (Probability_maps==1) {
call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.getProbability");
selectWindow("Probability maps");
run("Image Sequence... ", Cache2);
close();
}
selectWindow("Trainable Weka Segmentation v2.1.5");
call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.trainClassifier");
call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.getResult");
selectWindow("Classified image");
saveAs("Tiff", dir3+input1+"0"+i+".tif.tif");
close();
selectWindow("Trainable Weka Segmentation v2.1.5");
close();
selectWindow(input1+"0"+i+".tif");
close();

if (Probability_maps==1) {
```

```
if (File.exists(dir5+"Probability maps0000.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0000.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.0.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0001.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0001.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.1.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0002.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0002.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.2.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0003.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0003.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.3.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0004.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0004.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.4.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0005.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0005.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.5.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0006.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0006.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.6.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0007.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0007.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.7.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0008.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0008.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.8.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0009.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0009.tif");
saveAs(dir4+input1+"0"+i+".tif.9.tif");
close();
}
```

```
}  
    }  
}  
  
for (i=10; i<a; i++) {  
    open(dir5+"Stack00"+i+".tif");  
    saveAs(dir2+input1+i+".tif");  
    close();  
  
    open(dir2+input1+i+".tif");  
    run("Trainable Weka Segmentation");  
    wait(3000);  
    selectWindow("Trainable Weka Segmentation v2.1.5");  
    call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.loadClassifier", classifier);  
    call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.loadData", data);  
    wait(1000);  
    if (Probability_maps==1) {  
        call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.getProbability");  
        selectWindow("Probability maps");  
        run("Image Sequence... ", Cache2);  
        close();  
    }  
    selectWindow("Trainable Weka Segmentation v2.1.5");  
    call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.trainClassifier");  
    call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.getResult");  
    selectWindow("Classified image");  
    saveAs("Tiff", dir3+input1+i+".tif.tif");  
    close();  
    selectWindow("Trainable Weka Segmentation v2.1.5");  
    close();  
    selectWindow(input1+i+".tif");  
    close();  
  
    if (Probability_maps==1) {  
        if (File.exists(dir5+"Probability maps0000.tif")) {  
            open(dir5+"Probability maps0000.tif");  
            saveAs(dir4+input1+i+".tif.0.tif");  
            close();  
        }  
        if (File.exists(dir5+"Probability maps0001.tif")) {  
            open(dir5+"Probability maps0001.tif");  
            saveAs(dir4+input1+i+".tif.1.tif");  
            close();  
        }  
        if (File.exists(dir5+"Probability maps0002.tif")) {  
            open(dir5+"Probability maps0002.tif");  
            saveAs(dir4+input1+i+".tif.2.tif");  
            close();  
        }  
    }
```

```
if (File.exists(dir5+"Probability maps0003.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0003.tif");
saveAs(dir4+input1+i+".tif.3.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0004.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0004.tif");
saveAs(dir4+input1+i+".tif.4.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0005.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0005.tif");
saveAs(dir4+input1+i+".tif.5.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0006.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0006.tif");
saveAs(dir4+input1+i+".tif.6.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0007.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0007.tif");
saveAs(dir4+input1+i+".tif.7.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0008.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0008.tif");
saveAs(dir4+input1+i+".tif.8.tif");
close();
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0009.tif")) {
open(dir5+"Probability maps0009.tif");
saveAs(dir4+input1+i+".tif.9.tif");
close();
}
}
}
}
if (a>1) {
    setBatchMode(false);
    while (nImages>0) {
        selectImage(nImages);
        close();
    }
}
if (a>10) {
    for (i=0; i<10; i++) {
        open(dir3+input1+"0"+i+".tif.tif");
    }
    for (i=10; i<a; i++) {
        open(dir3+input1+i+".tif.tif");
    }
}
```

```
}
if (a<=10) {
    for (i=0; i<a; i++) {
        open(dir3+input1+"0"+i+".tif.tif");
    }
}
run("Images to Stack", "name=stack title=[] use");
run("Make Montage...", "columns=row_number rows=column_number scale=1 first=1 last=a increment=1 border=0 font=a");
run("8-bit Color", "number=256");
saveAs("Tiff", dir6+input1+".tif");
close();
close();
setBatchMode(true);
}
if (Probability_maps==1) {
if (File.exists(dir5+"Probability maps0000.tif")) {
    if (a>1) {
        setBatchMode(false);
    }
if (a>10) {
    for (i=0; i<10; i++) {
        open(dir4+input1+"0"+i+".tif.0.tif");
    }
    for (i=10; i<a; i++) {
        open(dir4+input1+i+".tif.0.tif");
    }
}
}
if (a<=10) {
    for (i=0; i<a; i++) {
        open(dir4+input1+"0"+i+".tif.0.tif");
    }
}
run("Images to Stack", "name=stack title=[] use");
run("Make Montage...", "columns=row_number rows=column_number scale=1 first=1 last=a increment=1 border=0 font=a");
saveAs("Tiff", dir7+input1+"0.tif");
close();
close();
setBatchMode(true);
}
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0001.tif")) {
    if (a>1) {
        setBatchMode(false);
    }
if (a>10) {
    for (i=0; i<10; i++) {
        open(dir4+input1+"0"+i+".tif.1.tif");
    }
    for (i=10; i<a; i++) {
        open(dir4+input1+i+".tif.1.tif");
    }
}
}
}
```

```
if (a<=10) {
    for (i=0; i<a; i++) {
        open(dir4+input1+"0"+i+".tif.1.tif");
    }
}
run("Images to Stack", "name=stack title=[] use");
run("Make Montage...", "columns=row_number rows=column_number scale=1 first=1 last=a increment=1 border=0 font=a");
saveAs("Tiff", dir7+input1+"1.tif");
close();
close();
setBatchMode(true);
}
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0002.tif")) {
    if (a>1) {
        setBatchMode(false);
    }
    if (a>10) {
        for (i=0; i<10; i++) {
            open(dir4+input1+"0"+i+".tif.2.tif");
        }
        for (i=10; i<a; i++) {
            open(dir4+input1+i+".tif.2.tif");
        }
    }
}
if (a<=10) {
    for (i=0; i<a; i++) {
        open(dir4+input1+"0"+i+".tif.2.tif");
    }
}
run("Images to Stack", "name=stack title=[] use");
run("Make Montage...", "columns=row_number rows=column_number scale=1 first=1 last=a increment=1 border=0 font=a");
saveAs("Tiff", dir7+input1+"2.tif");
close();
close();
setBatchMode(true);
}
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0003.tif")) {
    if (a>1) {
        setBatchMode(false);
    }
    if (a>10) {
        for (i=0; i<10; i++) {
            open(dir4+input1+"0"+i+".tif.3.tif");
        }
        for (i=10; i<a; i++) {
            open(dir4+input1+i+".tif.3.tif");
        }
    }
}
if (a<=10) {
    for (i=0; i<a; i++) {
```

```
        open(dir4+input1+"0"+i+".tif.3.tif");
    }
}
run("Images to Stack", "name=stack title=[] use");
run("Make Montage...", "columns=row_number rows=column_number scale=1 first=1 last=a increment=1 border=0 font=a");
saveAs("Tiff", dir7+input1+"3.tif");
close();
close();
setBatchMode(true);
}
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0004.tif")) {
    if (a>1) {
        setBatchMode(false);
    }
    if (a>10) {
        for (i=0; i<10; i++) {
            open(dir4+input1+"0"+i+".tif.4.tif");
        }
        for (i=10; i<a; i++) {
            open(dir4+input1+i+".tif.4.tif");
        }
    }
}
if (a<=10) {
    for (i=0; i<a; i++) {
        open(dir4+input1+"0"+i+".tif.4.tif");
    }
}
run("Images to Stack", "name=stack title=[] use");
run("Make Montage...", "columns=row_number rows=column_number scale=1 first=1 last=a increment=1 border=0 font=a");
saveAs("Tiff", dir7+input1+"4.tif");
close();
close();
setBatchMode(true);
}
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0005.tif")) {
    if (a>1) {
        setBatchMode(false);
    }
    if (a>10) {
        for (i=0; i<10; i++) {
            open(dir4+input1+"0"+i+".tif.5.tif");
        }
        for (i=10; i<a; i++) {
            open(dir4+input1+i+".tif.5.tif");
        }
    }
}
if (a<=10) {
    for (i=0; i<a; i++) {
        open(dir4+input1+"0"+i+".tif.5.tif");
    }
}
```

```
}
run("Images to Stack", "name=stack title=[] use");
run("Make Montage...", "columns=row_number rows=column_number scale=1 first=1 last=a increment=1 border=0 font=a");
saveAs("Tiff", dir7+input1+"5.tif");
close();
close();
setBatchMode(true);
}
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0006.tif")) {
    if (a>1) {
        setBatchMode(false);
    }
    if (a>10) {
        for (i=0; i<10; i++) {
            open(dir4+input1+"0"+i+".tif.6.tif");
        }
        for (i=10; i<a; i++) {
            open(dir4+input1+i+".tif.6.tif");
        }
    }
    if (a<=10) {
        for (i=0; i<a; i++) {
            open(dir4+input1+"0"+i+".tif.6.tif");
        }
    }
    run("Images to Stack", "name=stack title=[] use");
    run("Make Montage...", "columns=row_number rows=column_number scale=1 first=1 last=a increment=1 border=0 font=a");
    saveAs("Tiff", dir7+input1+"6.tif");
    close();
    close();
    setBatchMode(true);
}
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0007.tif")) {
    if (a>1) {
        setBatchMode(false);
    }
    if (a>10) {
        for (i=0; i<10; i++) {
            open(dir4+input1+"0"+i+".tif.7.tif");
        }
        for (i=10; i<a; i++) {
            open(dir4+input1+i+".tif.7.tif");
        }
    }
    if (a<=10) {
        for (i=0; i<a; i++) {
            open(dir4+input1+"0"+i+".tif.7.tif");
        }
    }
    run("Images to Stack", "name=stack title=[] use");
```

```
run("Make Montage...", "columns=row_number rows=column_number scale=1 first=1 last=a increment=1 border=0 font=a");
saveAs("Tiff", dir7+input1+"7.tif");
close();
close();
setBatchMode(true);
}
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0008.tif")) {
    if (a>1) {
        setBatchMode(false);
    }
    if (a>10) {
        for (i=0; i<10; i++) {
            open(dir4+input1+"0"+i+".tif.8.tif");
        }
        for (i=10; i<a; i++) {
            open(dir4+input1+i+".tif.8.tif");
        }
    }
}
if (a<=10) {
    for (i=0; i<a; i++) {
        open(dir4+input1+"0"+i+".tif.8.tif");
    }
}
run("Images to Stack", "name=stack title=[] use");
run("Make Montage...", "columns=row_number rows=column_number scale=1 first=1 last=a increment=1 border=0 font=a");
saveAs("Tiff", dir7+input1+"8.tif");
close();
close();
setBatchMode(true);
}
}
if (File.exists(dir5+"Probability maps0009.tif")) {
    if (a>1) {
        setBatchMode(false);
    }
    if (a>10) {
        for (i=0; i<10; i++) {
            open(dir4+input1+"0"+i+".tif.9.tif");
        }
        for (i=10; i<a; i++) {
            open(dir4+input1+i+".tif.9.tif");
        }
    }
}
if (a<=10) {
    for (i=0; i<a; i++) {
        open(dir4+input1+"0"+i+".tif.9.tif");
    }
}
run("Images to Stack", "name=stack title=[] use");
run("Make Montage...", "columns=row_number rows=column_number scale=1 first=1 last=a increment=1 border=0 font=a");
saveAs("Tiff", dir7+input1+"9.tif");
```

```
close();
close();
setBatchMode(true);
}
}
}
}
list = getFileList(dir5);
for (j=0; j<list.length; j++) {

File.delete(dir5+list[j])
}
print("processing all pictures is finished");

if (a>1) {
list = getFileList(dir6);
for (j=0; j<list.length; j++) {

open(dir6+list[j]);

// id values of each class in the classified image
classLabels = newArray( 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 );

run("Set Measurements...", "area_fraction redirect=None decimal=3");

for( i=0; i<classLabels.length; i ++ )
{
minTh = classLabels[ i ];
maxTh = classLabels[ i ];
if( i < classLabels.length - 1 )
maxTh = classLabels[ i+1 ] -1;
else // last value is assumed to be 255
{
minTh = classLabels[ i-1 ] +1;
maxTh = classLabels[ i ];
}
selectWindow(list[j]);
run("Duplicate...", "title=[to-be-thresholded]"); selectWindow("to-be-thresholded");
setThreshold( minTh, maxTh );
run("Convert to Mask");
run("Measure");
close();
}
close();
}
}
if (a==1) {
list = getFileList(dir3);
```

```
for (j=0; j<list.length; j++) {

open(dir3+list[j]);

// id values of each class in the classified image
classLabels = newArray( 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 );

run("Set Measurements...", "area_fraction redirect=None decimal=3");

for( i=0; i<classLabels.length; i ++ )
{
minTh = classLabels[ i ];
maxTh = classLabels[ i ];
if( i < classLabels.length - 1 )
maxTh = classLabels[ i+1 ] -1;
else // last value is assumed to be 255
{
minTh = classLabels[ i-1 ] +1;
maxTh = classLabels[ i ];
}
selectWindow(list[j]);
run("Duplicate...", "title=[to-be-thresholded]"); selectWindow("to-be-thresholded");
setThreshold( minTh, maxTh );
run("Convert to Mask");
run("Measure");
close();
}
close();
}

MonthNames = newArray("Jan","Feb","Mar","Apr","May","Jun","Jul","Aug","Sep","Oct","Nov","Dec");
DayNames = newArray("Sun", "Mon","Tue","Wed","Thu","Fri","Sat");
getDateAndTime(year, month, dayOfWeek, dayOfMonth, hour, minute, second, msec);
TimeString =DayNames[dayOfWeek]+"_";
if (dayOfMonth<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+dayOfMonth+"-"+MonthNames[month]+"-"+year+"_";
if (hour<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+hour+"-";
if (minute<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+minute+"-";
if (second<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+second;

saveAs("Results", dir0+"Results_"+TimeString+".xls");

beep();
}
```

13.8.2 Quellcode "ROI_zeichen"

```
roiManager("Add");
imageTitle=getTitle();
saveAs("Tiff", "C:\\Dr Arbeit\\Auswertung\\Results_Beckenkamm\\+ROI\\"+imageTitle);
close();
close();

run("Set Scale...", "distance=5 known=1 unit=um global");
run("Scale...", "x=0.25 y=0.25 width=692 height=2154 interpolation=Bilinear average create");
run("ROI Manager...");
```

13.8.3 Quellcode "Trabekel_Dicke_Abstand_Fläche"

// author: Matthias Muelke; Institut für Experimentelle Unfallchirurgie Gießen

```
dir1=getDirectory("Input");
dir2=getDirectory("Working directory");

Dialog.create("settings");
Dialog.addNumber("scale [pixels/µm] (microscope)", 1.55);
Dialog.addNumber("downsizing", 0.25);
Dialog.addMessage("");
Dialog.addCheckbox("Thickness", true);
Dialog.addCheckbox("Separation", true);
Dialog.addCheckbox("Area", true);
    Dialog.show();
scale = Dialog.getNumber();
downsizing = Dialog.getNumber();
mode_Th = Dialog.getCheckbox();
mode_Sep = Dialog.getCheckbox();
mode_Area = Dialog.getCheckbox();

s=scale*downsizing ;

if(File.exists(dir2+"Thickness")) {
    print("folder already exists");
}else{
    myDir3=dir2+"Thickness"+File.separator;
    File.makeDirectory(myDir3);
    print("new folder created");
}

dir3=dir2+"Thickness\\";

if(File.exists(dir2+"Separation")) {
    print("folder already exists");
}else{
    myDir4=dir2+"Separation"+File.separator;
    File.makeDirectory(myDir4);
```

```
        print("new folder created");
    }
    dir4=dir2+"Separation\\";

    setBatchMode(false);

    list = getFileList(dir1);
    for (j=0; j<list.length; j++) {
        file1=dir1+list[j];

        if (mode_Th==1) {
            open(file1);

            run("Set Scale...", "distance=s known=1 pixel=1 unit=µm");
            run("Clear Outside");
            setOption("BlackBackground", true);
            run("Make Binary");
            run("Thickness", "thickness graphic");

            saveAs("Tiff", dir3+list[j]+"1.tif");
            close();
            close();
            setResult("measurement", j, "Thickness");
        }
        if (mode_Sep==1 && mode_Th==1) {
            setResult(" ", j, " ");
        }

        if (mode_Sep==1) {
            open(file1);

            run("ROI Manager...");
            roiManager("Add");
            setBackgroundColor(0, 0, 0);
            run("Clear Outside");
            run("Invert");

            run("Set Scale...", "distance=s known=1 pixel=1 unit=µm");

            run("Make Binary");
            run("Invert");
            run("Thickness", "spacing graphic");

            saveAs("Tiff", dir4+list[j]+"2.tif");
            close();
            close();
```

```

setResult("measurement ", j, "Separation");
}

while (nImages>0) {
    selectImage(nImages);
    close();
}
}

MonthNames = newArray("Jan", "Feb", "Mar", "Apr", "May", "Jun", "Jul", "Aug", "Sep", "Oct", "Nov", "Dec");
DayNames = newArray("Sun", "Mon", "Tue", "Wed", "Thu", "Fri", "Sat");
getDateAndTime(year, month, dayOfWeek, dayOfMonth, hour, minute, second, msec);
TimeString = DayNames[dayOfWeek] + "_";
if (dayOfMonth<10) { TimeString = TimeString + "0"; }
TimeString = TimeString + dayOfMonth + "-" + MonthNames[month] + "-" + year + "_";
if (hour<10) { TimeString = TimeString + "0"; }
TimeString = TimeString + hour + "-";
if (minute<10) { TimeString = TimeString + "0"; }
TimeString = TimeString + minute + "-";
if (second<10) { TimeString = TimeString + "0"; }
TimeString = TimeString + second;

if (mode_Sep==0 && mode_Th==0) {
    }else{
        if (mode_Sep==1 && mode_Th==1) {
saveAs("Results", dir2+"Results_Thickness+Separation_"+TimeString+".xls");
        }else{
            if (mode_Th==1) {
saveAs("Results", dir2+"Results_Thickness_"+TimeString+".xls");
            }
            if (mode_Sep==1) {
saveAs("Results", dir2+"Results_Separation_"+TimeString+".xls");
            }
        }
    }

selectWindow("Results");
run("Close");
if (mode_Sep==1) {
selectWindow("ROI Manager");
run("Close");
}
}

if (mode_Area==1) {

list = getFileList(dir1);
setBatchMode( true );
run("Set Measurements...", "area area_fraction redirect=None decimal=3");
for (j=0; j<list.length; j++) {

```

```
open(dir1+list[j]);
l=3*j;

run("Set Scale...", "distance=s known=1 pixel=1 unit=µm");
run("Measure");
run("Clear Outside");
run("Make Binary");
run("Invert");

// id values of each class in the classified image
classLabels = newArray( 0, 1 );

run("Set Measurements...", "area area_fraction redirect=None decimal=3");

for( i=0; i<classLabels.length; i ++ )
{
minTh = classLabels[ i ];
maxTh = classLabels[ i ];
if( i < classLabels.length - 1 )
maxTh = classLabels[ i+1 ] -1;
else // last value is assumed to be 255
{
minTh = classLabels[ i-1 ] +1;
maxTh = classLabels[ i ];
}
selectWindow(list[j]);
run("Duplicate...", "title=[to-be-thresholded]"); selectWindow("to-be-thresholded");
setThreshold( minTh, maxTh );
run("Convert to Mask");
run("Measure");
close();
}
close();
new=getResult("Area",l);
new2=getResult("Area",l+1);
new3=getResult("%Area",l+1);
setResult("Tb.Ar/T.Ar", l, new3/(new/new2));
setResult("name", l, list[j]);
}

saveAs("Results", dir2+"Results_Area_"+TimeString+".xls");
selectWindow("Results");
run("Close");
}
```

Präsentationen, Publikationen, Preise

Posterpräsentationen:

Von-Behring-Röntgen Symposium (Gießen 2015):

"Histological analysis of non-mineralized portion at fracture risk regions in an osteoporotic sheep model"

ARRP Jahrestagung (Bad Kreuznach 2016):

"Histologische Analyse des Knochenmetabolismus in einem osteoporotischen Schafmodell"

DGRh Kongress (Frankfurt 2016):

"Erhöhte Osteoidanteile als Zeichen einer defizienten Mineralisation im Schafmodell der Osteoporose"

ARRP Jahrestagung (Bad Kreuznach 2017):

"Untersuchung der defizienten Knochen-Mineralisation im Schafmodell der Osteoporose"

ARRP Jahrestagung (Bad Kreuznach 2018):

"Beschreibung der Trabekelparameter im Schafmodell der Osteoporose"

DKOU (Berlin 2019):

"Beschreibung der Trabekelparameter im Schafmodell der Osteoporose"

Preise:

Posterpreis ARRP Jahrestagung (Bad Kreuznach 2016):

"Histologische Analyse des Knochenmetabolismus in einem osteoporotischen Schafmodell"

Posterpreis ARRP Jahrestagung (Bad Kreuznach 2017):

"Untersuchung der defizienten Knochen-Mineralisation im Schafmodell der Osteoporose"

Publikationen:

Frontiers in Endocrinology, 2018. **9** (666)

"An Optimized Approach to Perform Bone Histomorphometry"

Deeksha Malhan, Matthias Muelke, Sebastian Rosch, Annemarie B. Schaefer, Felix Merboth, David Weisweiler, Christian Heiss, Ignacio Arganda-Carreras and Thaqif El Khassawna. (geteilte Erstautorenschaft)

Ehrenwörtliche Erklärung

Erklärung zur Dissertation

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

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen einen großen Dank aussprechen, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation so tatkräftig unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Heiß und Prof. El Khassawna, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit durchzuführen und mich mit zahlreichen Ideen und ihrer Expertise unterstützt haben. Dadurch haben Sie zu meiner fachlichen und persönlichen Entwicklung, während und durch die Arbeit, Großes beigetragen.

Ebenfalls möchte ich Prof. Lips und dem gesamten Team der Experimentellen Unfallchirurgie danken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Hervorheben möchte ich Annette Stengel, die mir die Arbeit im Labor näher gebracht und mir unter anderem das Färben beigebracht hat. Ebenso wichtig war Deeksha Malhan, die mir neben dem regen wissenschaftlichen Austausch beim Lösen verschiedenster Probleme eine große Hilfe war. Berücksichtigen möchte ich auch Felix Merboth und Sebastian Rosch, mit denen ich die gemeinsame Zeit an unseren Dissertationen mit all den Diskussionen und dem gegenseitigen Austausch an Erfahrungen sehr genossen habe.

Ein weiterer Dank geht an unser Team aus der Klinik, insbesondere an Christoph Biehl, Markus Rupp, Gero Knapp und David Weisweiler, die neben Prof. Heiß den Austausch an Erfahrungen zwischen der Klinik und dem Labor bereichert haben und mir mit unterschiedlichsten Hilfen zur Seite standen.

Außerdem möchte ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken, die mit ihrer achtjährigen Förderung des Sonderforschungsbereichs 79 für die Entwicklung von Werkstoffen für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen die Arbeit am Schafmodell und damit die Erstellung dieser Dissertation erst ermöglicht hat.

Meinen Eltern danke ich dafür, alle Voraussetzungen geschaffen zu haben, um meine Dissertation in diesem Umfang durchführen zu können, sowie für die Unterstützung bei der schriftlichen Umsetzung dieses Projektes.

Schließlich danke ich meiner Frau Theresa Mülke, die neben ihrer Hilfe an dieser Arbeit insbesondere viel Unterstützung und Geduld gezeigt hat, die ich bei der Durchführung dieser Dissertation benötigt habe.