Induktion von Osteoporose beim Schaf

Tierexperimentelles Modell zur Untersuchung der Frakturbehandlung beim osteoporotischen Knochen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

Ulrike Verena Gerlach

aus Bonn

Giessen 2002

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anaesthesiologie und Urologie
Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Reinhard Schnettler
des Universitätsklinikums Giessen

und

aus dem
AO-Forschungsinstitut
Davos, Schweiz
Direktor: Prof. Dr. Erich Schneider

Gutachter: Prof. Dr. Dr. R. Schnettler
Gutachter: Prof. Dr. Ch. Melzer

Tag der Disputation: 21. Oktober 2002

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Seite

1 Einleitung 6

2 Osteoporose 9

3 Material und Methoden 20

3.1 Versuchstiere 20
3.2 Operationen 22
3.2.1 Anästhesie 22
3.2.2 Ovarektomie 23
3.2.3 Beckenkammbiopsieentnahme 24
3.3 Diät und Glukokortikoidgabe 26
3.4 Labor 27
3.4.1 Biochemische Marker im Serum 28
3.4.2 Biochemische Marker im Urin 28
3.4.3 Methylprednisolonbestimmung 29
3.5 Quantitative Computertomographie 30
3.6 Euthanasie, Präparation und Entnahme von Knochenbiopsien 36
3.7 Mikro-Computertomographie 39
3.8 Mechanische Testung 40
3.8.1 Kompressionstest 40
3.8.2 Torsionstest 41
3.8.3 Vier- Punkt- Biegung 43
3.9 Statistik 44
3.10 Studienprotokoll 45

4 Ergebnisse 48

4.1 Knochendichte (Quantitative Computertomographie) 48
4.1.1 Knochendichte im Verlauf 48
4.1.2 Knochendichte nach sieben Monaten 57
4.2 Knochenstrukturanalyse mit der Mikro-Computertomographie 61
4.2.1 Knochenstrukturanalyse der Beckenkammbiopsien zu Beginn und nach sieben Monaten 61
4.2.2 Knochenstrukturanalyse der Wirbelkörperbiopsien nach sieben Monaten 64
4.2.3 Knochenstrukturanalyse der Femurkopfbiopsien nach sieben Monaten 66
4.3 Mechanische Testung 68
4.3.1 Kompressionstest von Wirbelkörper- und Femurkopfbiopsien 68
4.3.2 Torsionstest der Tibia 70
4.3.3 Vier- Punkt- Biegung von Kortikalispräparaten der Tibia 71
4.4 Knochenstoffwechselparameter 73
4.5 Korrelationen 77

5 Diskussion 78

5.1 Probleme bei der Versuchsdurchführung 79
5.2 Knochendichtebestimmung 80
5.3 Knochenstrukturanalyse mit der Mikro-Computertomographie 90
5.4 Mechanische Testung 96

5.5 Laborparameter 102
5.6 Tiermodell 111
5.7 Studienvergleich 119
6 Zusammenfassung 125
7 Literaturverzeichnis 127
8 Anhang: Abb./ Tab.- Verzeichnis 138
9 Danksagung 143
10 Lebenslauf 144

1 Einleitung

“Osteoporosis is a systemic skeletal disease characterized by low bone mass and micro architectural deterioration of bone tissue, with a consequent increase in bone fragility and susceptibility to fracture” (Consensus statement on osteoporosis, 1993).
Die offizielle Übersetzung lautet:
„Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine Störung der Mikroarchitektur des Knochengewebes mit konsekutiv erhöhter Knochenbrüchigkeit und erhöhtem Frakturrisiko charakterisiert ist“ (Consensus Development Conference, 1993).

Das Krankheitsbild der Osteoporose beschränkt sich auf Menschen und Affen.
Bis heute existiert kein geeignetes Tiermodell, das sowohl in den anatomischen Verhältnissen, als auch hormonellen Gegebenheiten mit denen des Menschen vergleichbar ist. Daraus ergibt sich eine gewisse Problematik hinsichtlich der Untersuchung der Pathogenese, der Pathophysiologie von Osteoporose und der therapeutischen und diagnostischen Möglichkeiten. Es muss ein auf den Menschen übertragbares Tiermodell gefunden werden, um die Behandlungsmöglichkeiten von Frakturen beim osteoporotischen Knochen erforschen zu können.
Eine Vielzahl von Tiermodellen wurden zur Osteoporoseforschung verwendet. Dazu gehören Hunde, Katzen, Kaninchen, Nagetiere, Schweine und Primaten (Newman et al., 1995). Es wurde versucht, den postmenopausalen Knochenverlust der Frau durch Ovarektomie oder Ovariohysterektomie zu induzieren. In mehreren Studien wurde das Schaf als Modell untersucht (Chavassieux, 1990; Chavassieux et al., 1991; Chavassieux et al., 1993; Geusens et al., 1996; Hornby et al., 1995; Newman et al., 1995;Pastoureau et al., 1989; Turner et al., 1995a; Turner et al., 1995b; Turner et al., 1995c; Turner and Villanueva, 1993). Der Einfluss auf die Knochendichte durch hohes Alter und Östrogenentzug durch Ovarektomie wurde im Verlust von etwa 10 % Knochenmasse beschrieben.

Im Vergleich dazu sinkt die Knochendichte beim Menschen bei Osteoporose um 20 – 40 %.

Möglichkeiten der Osteoporoseinduktion:
• Ovarektomie (postmenopausale Osteoporose) • Immobilisation (lokale Osteopenie) • Medikamente (Glukokortikoide) • Mangelernährung (Ca/ Vit D)

Um in Zukunft Untersuchungen der Frakturheilung und Frakturbehandlung am osteoporotischen Knochen durchführen zu können, muss ein standardisiertes Tiermodell existieren. Osteosynthesematerialien und –verfahren und die endoprothetische Versorgung beim osteoporotischen Knochen müssen in vivo untersucht werden können. Grundlage des Modells ist eine Vergleichbarkeit mit dem des Menschen sowohl im Knochenstoffwechsel als auch in Grösse und Aufbau des Skeletts.

In einer Pilotstudie (Lill et al., 2000) wurden acht Schafe in vier Behandlungsgruppen unterteilt. Die erste Gruppe erhielt nach Ovarektomie zusätzlich eine Kalzium- und Vitamin D-reduzierte Diät. Die zweite Gruppe wurde nach der Ovarektomie täglich mit Methylprednisoloninjektionen (25 mg) behandelt. Die dritte Gruppe erhielt eine Kombination aus einer Kalzium- und Vitamin D-reduzierten Diät, tägliche Methylprednisoloninjektionen (25 mg) und Ovarektomie. Zwei Schafe blieben als Kontrollgruppe unbehandelt. Die stärkste Abnahme der Knochendichte zeigte nach einer Behandlungszeit von sechs Monaten die Gruppe 3. Im spongiösen Knochen sank die Knochendichte um 58 % und im kortikalen Knochen um 22 %. In Beckenkammbiopsien zeigte sich nach Osteoporoseinduktion eine Abnahme der Trabekelanzahl von 19 %, die Trabekeldicke sank um 22 %.
Ziel dieser Studie ist, ein mit dem Menschen vergleichbares Tiermodell für Osteoporose zu entwickeln.

Die Ergebnisse der Pilotstudie sollen nun an einer grösseren Anzahl von Tieren geprüft werden. Der Effekt verschiedener Steroidapplikationsformen auf die Osteoporoseinduktion soll untersucht werden.

2 Osteoporose

Die maximale Knochenmasse wird bereits im Alter von 20 - 25 Jahren erreicht. Durch genetische, hormonelle, diätetische und mechanische Störungen kann es zu einer erniedrigten maximalen Knochenmasse kommen. Eine hohe maximale Ausgangsknochendichte ist vorteilhaft, da eine niedrige Ausgangsmasse eine frühe Osteoporosemanifestation bedeuten kann.
Nach dem Aufbau des Skeletts bis zur Skelettreife (Modeling) erfolgt eine regelmässige Materialerneuerung des Knochengewebes. Bei diesem als Umbau (Remodeling) bezeichneten Vorgang wird von einer lokalen Gruppe von kooperierenden Zellen zunächst eine Lakune ausgehöhlt. Dieser Abbauvorgang stimuliert Vorläuferzellen zu reifen Osteoblasten, welche den Defekt mit Osteoid auffüllen. Nach Mineralisation ist ein neues Stück Knochen entstanden, das als Knochenstruktureinheit bezeichnet wird.
Für die Genese der Osteoporose ist bedeutsam, dass beim Knochenremodeling in der zweiten Lebenshälfte stets eine mehr oder weniger ausgeprägte negative Knochenbilanz zu verzeichnen ist. Nach und nach werden die Knochenbälkchen der Spongiosa dünner oder perforieren irreversibel (Ringe, 1995).
Etwa mit Beginn des 25. Lebensjahres beginnt ein physiologischer Knochenabbau, der 0,5 - 1 % pro Jahr beträgt. Die Verluste während des gesamten Lebens können bei Frauen 30 – 40 % der maximalen Knochenmasse und bei Männern 20 – 30 % betragen (Wehr, 1998).

Neben der Knochenmasse ist ebenso die Struktur des Knochens als Risikodeterminante für Frakturen von entscheidender Bedeutung. Zu den prädisponierenden Faktoren für osteoporoseassoziierte Veränderungen zählen die Akkumulation von Materialermüdungserscheinungen, die Ausbildung von mangelhaften trabekulären Verbindungen und der Anstieg der Absterberate der Osteozyten im Alter (Heaney, 1992; Mullender et al., 1996).

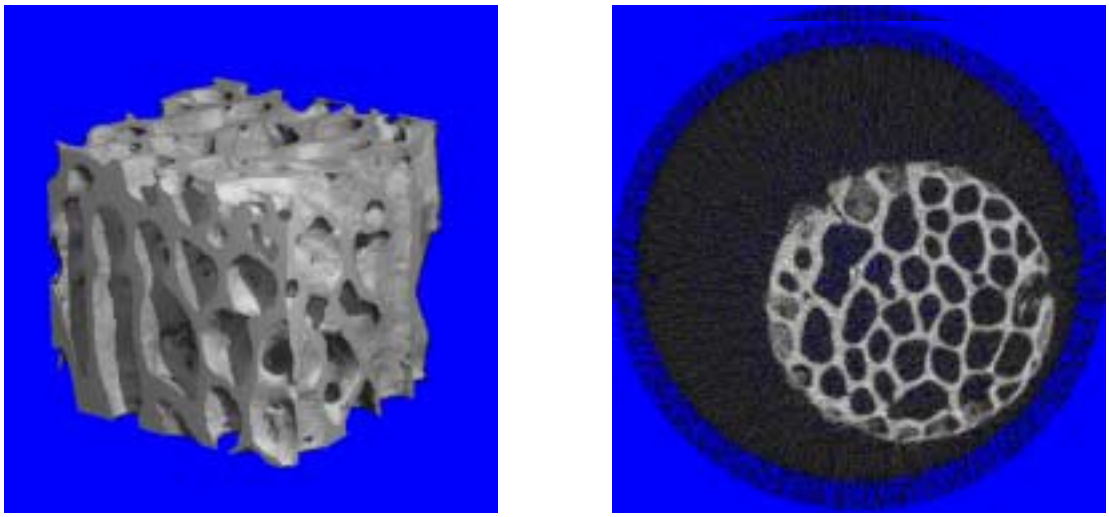


Abb. 2.1 Mikro-Computertomographisch dargestellte Wirbelkörperbiopsie von einem gesunden Schaf; links dreidimensionale, rechts zweidimensionale Darstellung (Knochenproben stammen von Tieren aus dieser experimentellen Arbeit)

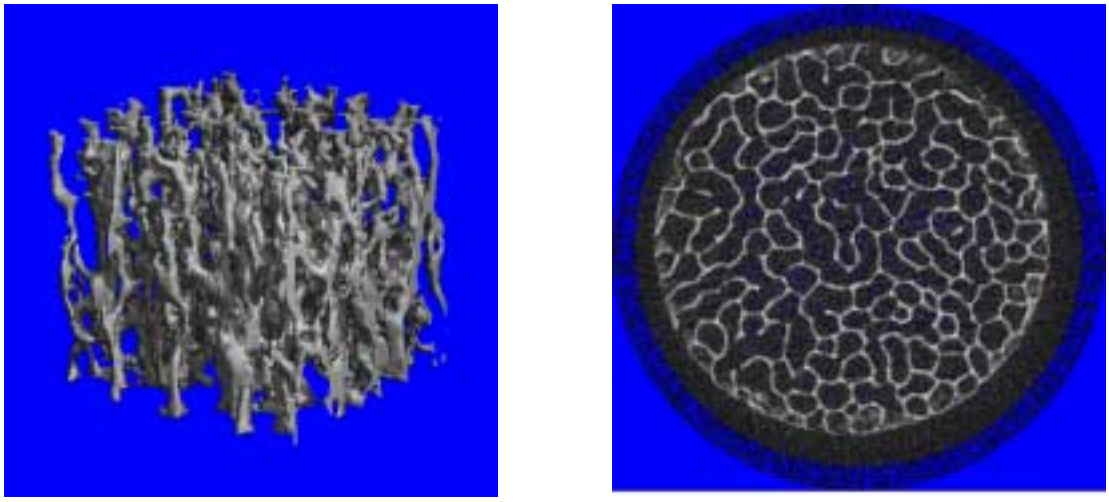


Abb. 2.2 Mikro-Computertomographisch dargestellte Wirbelkörperbiopsie von einem osteoporotischen Schaf; links dreidimensionale, rechts zweidimensionale Darstellung (Knochenproben stammen von Tieren aus dieser experimentellen Arbeit)

Statische Veränderungen der Wirbelsäule und vor allem Frakturen, welche bei Osteoporose hauptsächlich an der Wirbelsäule, am Schenkelhals und am Radius auftreten, sind die Folge und als Komplikation zu betrachten.
Bei Osteoporose ist die chemische Zusammensetzung des Knochens im Vergleich zum gesunden Knochen unverändert, das trabekuläre Netzwerk

dagegen pathologisch verändert. Dieses Krankheitsbild muss von der Osteomalazie abgegrenzt werden, bei welcher nicht die Knochenmasse, sondern die chemische Zusammensetzung des Knochens im Sinne einer verminderten Mineralisierung der organischen Matrix verändert ist (Wasnich, 1997).

Der Knochenschwund zeigt sich wegen eines erhöhten Knochenabbaus besonders markant nach der Menopause. Dieser postmenopausale Verlust betrifft hauptsächlich den trabekulären Knochen und ist durch Mangel an Östrogenen bedingt (Fleisch, 1989). Der trabekuläre Knochen spricht schneller auf metabolische Veränderungen an als der kortikale Knochen (WHO, 1994; Jergas und Schmid, 1999).
Warum es nach der Menopause bei der Frau zur Beschleunigung des Knochenstoffwechsels und des Knochenverlustes kommt, ist noch nicht vollständig geklärt. Die Skelettmasse der Frau korreliert mit der Gesamtzeit der Östrogenexposition. Sowohl eine späte Menarche als auch eine frühe Menopause erhöhen das Osteoporoserisiko. Eriksen et al. (1988) fanden zahlreiche Sexualhormonrezeptoren, die auf Osteoblasten angesiedelt sind. Es ist wahrscheinlich, dass Östrogene einen direkten Effekt auf den Knochen besitzen (Wehr, 1998). Der Knochenverlust ist unter Östrogenmangel in der Frühphase durch einen stark gesteigerten Knochenumsatz (high turnover) gekennzeichnet. Infolge verminderter oder fehlender Apoptosis der Osteoklasten kommt es zu erhöhter Abbauaktivität. Der Abbau überwiegt den Anbau (Eriksen et al., 1986; Eriksen et al., 1990).
Der Verlust von Knochenmasse im höheren Alter beruht hauptsächlich auf einer verminderten Aktivität der Osteoblasten und damit der Knochenneubildung und betrifft sowohl den trabekulären als auch den kortikalen Knochen (Fleisch, 1989). Der Umbau des kortikalen Knochens geschieht an der inneren Oberfläche. Ein Ungleichgewicht zwischen Knochenformation und Knochenresorption führt mit zunehmendem Alter zu einer gesteigerten Trabekularisierung der inneren Oberfläche des kortikalen Knochens und einer Aufweitung des Markraumes.

Für die Entstehung der Osteoporose werden von Wasnich (1997) fünf Risikofaktoren verantwortlich gemacht. Dazu gehören das Alter, die genetische Veranlagung, Umwelteinflüsse, hormonelle (Östrogen- und Androgenmangel) und chronische Krankheiten (Hyperparathyreoidismus, Hyperkortisolismus, Malabsorptionssyndrom und Gastrektomie) sowie physikalischen Eigenschaften des Knochens. Riggs und Melton (1986) machen auch den Lebensstil (Rauchen, Alkoholkonsum), Bewegungsmangel und Kalziummangelernährung für das Auftreten von Osteoporose verantwortlich. Nach Battmann et al. (2001) werden drei Hypothesen für die Entwicklung von osteoporotischen Knochen geprüft. Danach ist die generalisierte Zellalterung, die zunehmende Abnahme der hormonellen Stimulierung der Knochenformation im Alter und das geringe Ansprechen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren als Grund für die Entwicklung des osteoporotischen Knochens zu sehen.

Die physikalischen Eigenschaften des Knochens werden durch die Knochendichte, Grösse und Geometrie, die Mikroarchitektur und die chemische Zusammensetzung beeinflusst.

Ein Vitamin D-Mangel kann das Frakturrisiko bei älteren Frauen erhöhen. Ausgelöst wird der Mangel durch eine reduzierte Vitamin D-Aufnahme über die Nahrung und eine verminderte Vitamin D-Aktivierung in der Haut. Die verringerte Eigensynthese von Vitamin D in der Haut (primärer Vitamin D-Mangel) beruht zum einen auf einer geringeren Sonnenexposition im Alter (Mc Kenna, 1992; Brock et al., 1997) und zum anderen darauf, dass die Haut älterer Menschen weniger Cholecalciferol produzieren kann (Bell, 1995). Andere Risiken liegen in einer hohen Phosphat- und Proteinzufuhr. So kann eine hohe Phosphatzufuhr zu einer Hemmung der 1,25 Dihydroxy-Vitamin D_3-Synthese in der Niere führen und die Knochenresorption verstärken (Keck und Kruse, 1994).

Eine frühe Menopause, operativ (Ovarektomie) oder nicht-operativ (Klimax praecox) bedingt, beschleunigt das Entstehen von Osteoporose. Östrogenmangelzustände bei prämenopausalen Frauen, ausgelöst z.B. durch Anorexia nervosa oder durch übermässigen Sport, induzieren Knochenabbau und können zu einer Verminderung der maximalen Knochenmasse führen (Riggs und Melton, 1986).

Tab. 2.1 Gesamtübersicht über die wichtigsten Risikofaktoren, die bei Männern und Frauen eine Osteoporose verursachen oder zu Osteoporose beitragen können (Ringe, 1995)

Bewegung:	geringe körperliche Aktivität, langfristige Bettruhe, Paraplegie, Hemiplegie, Raumfahrt
Ernährung:	lebenslange geringe Kalziumzufuhr, phosphat-, protein- und faserreiche Kost
Genussmittel:	chronisch hoher Alkoholkonsum, Zigarettenrauchen, Koffein
Genetik:	weisse oder asiatische Rasse, familiäre Osteoporosehäufung, grazile Skelettanlage
Endokrine Erkrankungen:	Hypogonadismus, Cushing-Syndrom, Hyperthyreose, primärer Hyperparathyreoidismus, Hyperprolaktinämie, Akromegalie, idiopathische Hyperkalzurie, Diabetes mellitus
Maligne Erkrankungen:	Plasmozytom, myelo- und lymphoproliferative Erkrankungen, diffuse skelettale Metastasierung
Medikamente:	Kortikoide, Heparin, Thyroxinüberdosierung, Laxantien, Antikonvulsiva, Lithium, GnRH-Analoga
Gastroenterologische Erkrankungen:	Magenresektion, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Pankreasinsuffizienz, Leberzirrhosen
Kollagenstoffwechselerkrankungen:	Osteogenesis imperfecta, Marfan-Syndrom, Ehlers-Danlos-Syndrom
Sonstige Erkrankungen:	Niereninsuffizienz, Asthma bronchiale, chronische Polyarthritis und andere entzündlich-immunologischen Systemerkrankungen

Ringe (1993) stellte fest, dass es bezüglich der Inzidenz von Osteoporose geographische und ethnische Unterschiede gibt. Dünne, zierliche, kaukasische und asiatische Frauen tragen das grösste Osteoporoserisiko, wenn in deren Familienanamnese diese Erkrankung bereits bekannt ist. Es liegen Hinweise vor, dass genetische Faktoren wichtige Determinanten der maximalen Knochenmasse sind.

Bezüglich der Knochenbruchinzidenz bestehen zwischen verschiedenen Populationen und Volksgruppen Unterschiede. Die Inzidenz ist unter Weissen

und Asiaten am höchsten und in der schwarzen Bevölkerung am niedrigsten (Ringe, 1993).
Die Inzidenz der hüftnahen Frakturen hat sich in den letzten 20 Jahren verdoppelt. Es wurde aufgrund von statistischen Erhebungen errechnet, dass in der Europäischen Gemeinschaft 30 - 40 % der 50- jährigen Frauen im Verlauf ihres restlichen Lebens eine mit Osteoporose assoziierte Fraktur erleiden werden (Bonjour et al., 1997; International Osteoporosis Foundation, 2000). Eine von drei Frauen wird nach der Menopause eine Wirbelkörperkompressionsfraktur erleiden, eine von sechs Frauen bis 65 Jahre eine Hüftfraktur (Melton 1995). Bei 13 % der Männer besteht im Verlauf des Lebens das Risiko, eine osteoporoseassoziierte Fraktur zu erleiden (Ross, 1996; WHO, 2000; International Osteoporosis Foundation, 2000). Lindsay et al. (2001) bestätigen, dass das Risiko, eine weitere Fraktur in Folgejahren zu erleiden, ebenfalls gesichert ist.
In vielen Ländern wurde in den letzten 40 - 50 Jahren ein signifikanter Anstieg in der alterskorrigierten Inzidenz osteoporosebedingter Frakturen beobachtet. In einigen Ländern hat der Anstieg ein Plateau erreicht, in anderen hält er weiterhin an. Es liegen Hinweise vor, dass die Frakturinzidenz in der städtischen Bevölkerung wesentlich höher ist als in der ländlichen Bevölkerung. Dieses kann in geringerer körperlicher Betätigung und einer unterschiedlichen Ernährung begründet sein (Osteoporose in der Europäischen Gemeinschaft, 2000).

Die Osteoporose wird in zwei Gruppen, die primäre und sekundäre Form unterteilt.
Die primäre Form bezeichnet die Osteoporose mit unbekannter Ätiologie und wird weiter in Typ I und Typ II differenziert.
Der Typ I, auch postmenopausale Osteoporose genannt, findet sich insbesondere bei Frauen und tritt im Verhältnis zur Osteoporose beim Mann mit einer Häufigkeit von 6:1 auf. Von den Osteoporosepatienten im Alter zwischen 50 und 70 Jahren sind 5 – 10 % betroffen. Durch den primär trabekulären Knochenverlust treten Frakturen vorwiegend an den Stellen auf, wo dieser biomechanisch relevant ist (WHO, 1994). Frakturgefährdet ist vor

allem der untere Brustwirbel- bzw. der obere Lendenwirbelbereich sowie der distale Radius.

Der Typ II der primären Osteoporose wird auch senile Osteoporose genannt. Frauen sind doppelt so häufig wie Männer betroffen. Nach dem 70. Lebensjahr leiden 90 – 95 % der Osteoporosepatienten an dieser Form der Krankheit. Im Gegensatz zur postmenopausalen Osteoporose ist bei der senilen nicht nur der trabekuläre Knochen betroffen sondern zusätzlich auch der kortikale Knochen. Schenkelhals, Wirbelkörper und der Radius sind für Frakturen prädestiniert (Riggs und Melton, 1986; Fleisch, 1989). Häufig liegt ein Vitamin D_3-Mangel zugrunde. Diesem Mangel folgt eine Resistenz der α-Hydroxylase, welche die Umwandlung in das aktive Vitamin D_3 erschwert. Es kommt zur Ausbildung eines sekundären Hyperparathyreoidismus mit Erhöhung des Kalziumspiegels im Blut. Der Knochen wird dabei entmineralisiert.

Die sekundäre Osteoporose tritt im Verlauf verschiedener Erkrankungen auf. Hierbei kann es sich unter anderem um Morbus Cushing, Hyperthyreose, Hypogonadismus, Malabsorptionssyndrom, Osteogenesis imperfecta und um die Folge einer Therapie mit Heparin und Kortikoiden handeln (Hawker, 1996).

Primäre Osteoporose	Sekundäre Osteoporose
• idiopathisch • postmenopausal (Typ I) • senil (Typ II)	• Immobilisation • Medikamente (Glukokortikoide) • Mangelernährung (Ca/ Vit D) • endogen/ metabolisch

Harvey Cushing beobachtete bereits 1932 das gemeinsame Auftreten von Hypercortisolismus und Knochenmasseverlust. Dieser Zusammenhang ist inzwischen durch mehrere Studien belegt worden (Bressot et al., 1979; Adinoff und Hollister, 1983).

Der Pathomechanismus beruht auf der Steigerung der Knochenresorption und der gleichzeitigen Reduzierung der Formationsrate. Die Hemmung der

Knochenformation basiert auf einer direkten negativen Wirkung der Glukokortikoide auf die Osteoblasten. Die Glukokortikoide behindern die Reifung der Osteoblasten durch eine Hemmung der Umwandlung von Vorläuferzellen in Osteoblasten und reduzieren die osteoblastäre Synthese von Typ I- Kollagen (Dietrich et al., 1979; Canalis, 1984; Delany et al., 1995).
Das klinische Bild der Osteoporose unter Kortisontherapie unterscheidet sich nicht von dem der Osteoporose anderer Genese. Es wird ebenso geprägt von Wirbelfrakturen, die zu Schmerzen, Grössenverlust und Änderungen des äusseren Habitus führen.
Histologisch und radiologisch lassen sich dagegen Unterschiede nachweisen. Ähnlich wie bei der postmenopausalen Osteoporose ist beim Knochensubstanzverlust unter Kortisontherapie zunächst das axiale Skelett betroffen. Der Abbau des trabekulären Knochens prädestiniert zu Wirbelfrakturen, die frühzeitig im klinischen Verlauf auftreten. Anders als bei der postmenopausalen Osteoporose ist jedoch die Knochenarchitektur oft besser erhalten. Beim Fehlen der weiblichen Sexualhormone kommt es primär zu einem Verlust der horizontalen Trabekel. Die vertikalen Trabekel können sich verstärken, was radiologisch zu dem Eindruck einer vertikalen Streifung des Knochens führt. Bei der kortisoninduzierten Osteoporose ergibt die generelle „Ausdünnung“ der Trabekel radiologisch ein verschwommenes Bild. Der Knochen lässt keine Trabekelstruktur erkennen. Die Trabekelarchitektur ist jedoch in filigraner Form erhalten.
Bei der postmenopausalen Osteoporose sind die Resorptionsdefekte stärker ausgeprägt als bei der kortisoninduzierten Osteoporose. Die Kontinuität der Trabekel ist häufiger durchbrochen (Kaiser und Ringe,1996).

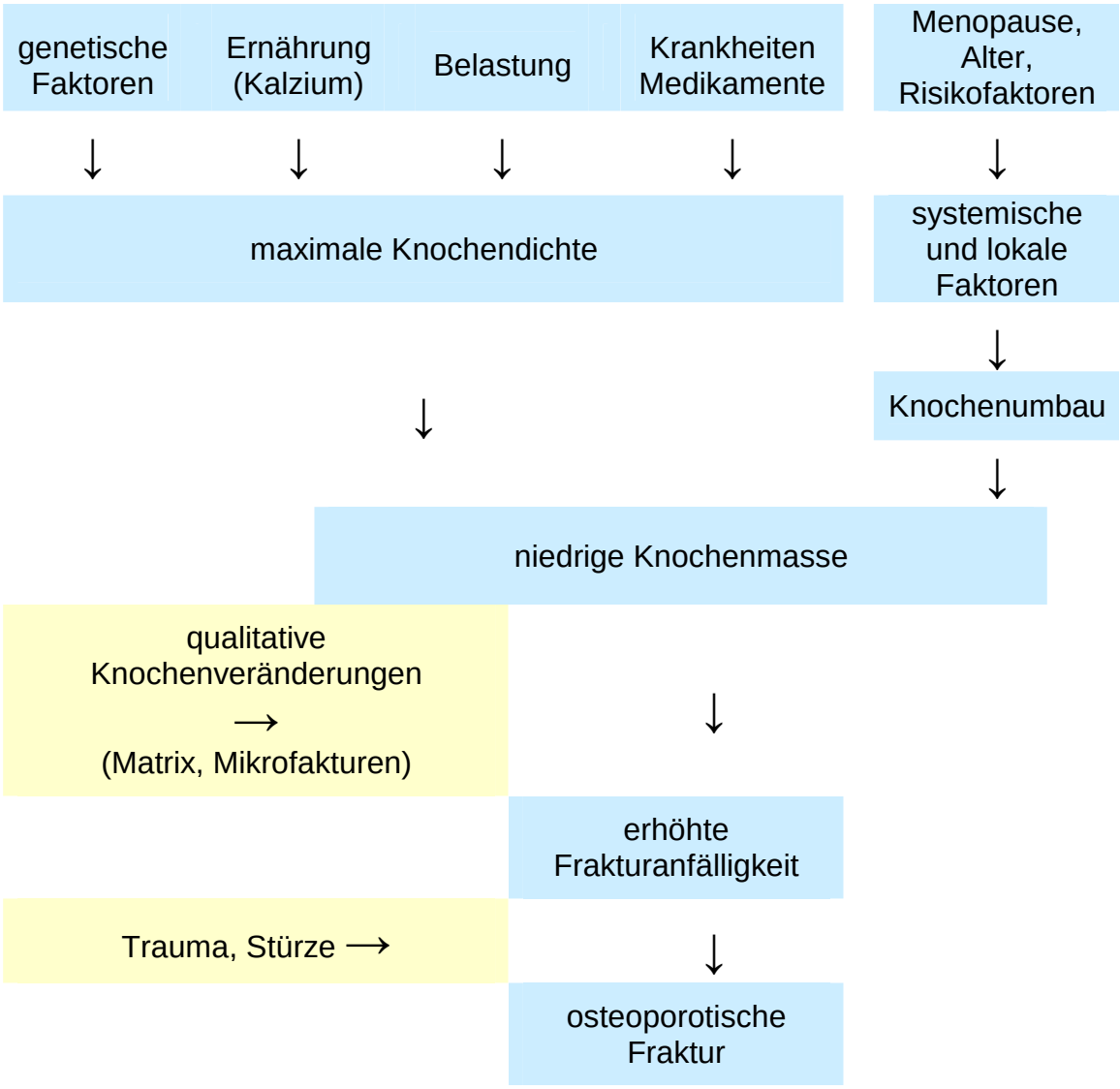


Abb. 2.3 Pathogenese: vom Risikofaktor zum Knochenbruch (nach Ringe, 1995)

Der mit Osteoporose einhergehende Knochenverlust verursacht zunächst keine Symptome. Das Frakturrisiko steigt mit abnehmender Knochenmasse und Zerstörung der Knochenmikroarchitektur.

Die Osteoporose wird heute zu den bedeutenden Volkskrankheiten gerechnet. Die WHO hat die Osteoporose in die Liste der wichtigsten Krankheiten der Menschheit aufgenommen und damit einen bevorzugten Forschungsbedarf auf dem Gebiet der metabolischen Osteopathien herausgestellt. Die grosse sozioökonomische Bedeutung der Erkrankung ist heute unumstritten. Sie beruht hauptsächlich auf drei Aspekten: der hohen

Prävalenz, den erheblichen Kosten für das Gesundheitssystem und auf der meist starken Beeinträchtigung der Lebensqualität der Betroffenen. (Ringe, 1995).

Die Diagnose und Einschätzung der Osteoporose im Verlauf basiert in der Regel auf bildgebenden Verfahren. In den vergangenen Jahren wurden mit Hilfe der Computertechnik vielversprechende Entwicklungen eingeleitet, wodurch die Diagnostik auch geringer Knochenmassenveränderungen ermöglicht wird. Dazu werden an Knochen der Extremitäten und Wirbelsäule Knochendichtemessungen vorgenommen. Zu den etablierten Techniken gehören die volumenbezogene quantitative Computertomographie (QCT) und die flächenbezogene duale Röntgenabsorptiometrie (DXA). Um die Anpassungsvorgänge im osteoporotischen Knochen besser untersuchen zu können, müssen die strukturellen Veränderungen berücksichtigt werden (Ringe 1995).
Die dreidimensionale Struktur von Knochen kann mit Hilfe des Mikro-Computertomographen mit einer hohen Auflösung erfasst werden (Parfitt, 1992). Der Verlust an Spongiosa stellt sich durch eine Abnahme in der Anzahl und Dicke der Trabekel dar. Zusätzlich wird eine Abnahme der Verbindungen der Trabekel untereinander beobachtet (Melton et al., 1988).
Neben den bildgebenden Techniken hat auch die Laborchemie als Möglichkeit der Beurteilung des Knochenstoffwechsels an Bedeutung gewonnen. Eine Vielzahl biochemischer Parameter werden beschrieben, die in direktem Zusammenhang mit den Umbauaktivitäten der Knochenmatrix stehen. Sie werden als Marker für die Aktivität des Knochenstoffwechsels bezeichnet. Es handelt sich dabei um Parameter der Knochenformation und der Knochenresorption (Ringe 1995).

Osteoporosebedingte Frakturen zeichnen sich durch zum Teil multifrakturierte und/ oder eingestauchte Frakturmuster bei reduzierter Qualtiät der Knochen aus. Es wird eine möglichst schnelle Wiederherstellung der Mobilität und Funktion der meist komplizierten Frakturen erwartet. Infolge der Immobilisierung treten bei den meist alten Patienten Folgekrankheiten auf.

Dazu gehört die pulmonale Dekompensation, die Thromboembolie, die Ausbildung von Decubiti und weitere skelettale Störungen.
Bei der Behandlung von osteoporotischen Frakturen muss mit Komplikationen gerechnet werden. Dazu gehören z.B. bei der Schenkelhalsfraktur ein Aufbrechen der Kortikalis beim Aufbohren des Femurs und/ oder beim Einbringen von Zement in den Kanal. Auch mangelhafte Fixierungsmöglichkeiten von Implantaten kommen vor und führen z.B. zum Auslockern von Schenkelhalsschrauben im Hüftkopf (Cut out Phänomen) oder zum Materialbruch.

3 Material und Methoden

Die hier vorliegende tierexperimentelle Untersuchung wurde aufgrund von Ergebnissen aus der Pilotstudie an einer statistisch relevanten Anzahl von Schafen durchgeführt.

In der 30 Wochen dauernden Studie blieb eine Kontrollgruppe (n=16) unbehandelt, bei der anderen Gruppe (n=16) wurde die Osteoporose mit der Dreifachkombination aus der Pilotstudie, bestehend aus Ovarektomie, Kalzium- und Vitamin D-reduzierten Diät und einer Steroidgabe untersucht.

Zur Darstellung einer Veränderung der Knochendichte erfolgten Messungen mit Hilfe der quantitativen Computertomographie. Veränderungen der Knochenstruktur von Beckenkamm-, Wirbelkörper- und Femurkopfbiopsien wurden mittels Mikro-Computertomographen untersucht. Mechanische Tests lieferten Daten über die biomechanische Kompetenz der Knochen. Dazu wurden Kompressions- und Torsionstests sowie die Vier- Punkt- Biegung von sowohl trabekulären als auch kortikalen Knochenproben durchgeführt. Der Knochenstoffwechsel wurde mit verschiedenen biochemischen Markern aus Blut und Urin untersucht.

3.1 Versuchstiere

In die Studie wurden 32 Schafe einbezogen. Die Schafe stammten alle aus einheitlicher Zucht (Herkunft: W. Zahner). Es handelte sich um weibliche Tiere der Rasse `Weisses Alpenschaf`. Zwei Gruppen wurden gebildet.

Gruppe 1	Kontrollgruppe	n=16
Gruppe 2	Behandelte Gruppe	n=16

Die Tiere der Gruppe 1 (n=16) waren als Kontrollgruppe vorgesehen und zwischen drei und fünf Jahre alt. Sie wurden in den Sommermonaten (von Beginn der Studie im Juli bis Mitte Oktober) artgerecht auf einer Weide gehalten. Im Winter standen sie in Gruppenhaltung im Stall und hatten auch von dort aus Zugang zu einer Weide. Damit bestand ausreichend Bewegungsmöglichkeit.

Gruppe 2 (n=16) bestand aus behandelten Tieren, die ein Alter zwischen sieben und neun Jahren hatten. Über 28 Wochen wurde in dieser Gruppe, beginnend zwei Wochen nach Ovarektomie, eine Ca/ Vit D-reduzierte Diät gefüttert und Glukokortikoide verabreicht. Diese Schafe wurden für 22 Wochen in Gruppenhaltung im Stall untergebracht. Es bestand die Möglichkeit des Auslaufes. In den letzten sechs Wochen wurden sie in Einzelboxen untergebracht, um die Mobilität einzuschränken.

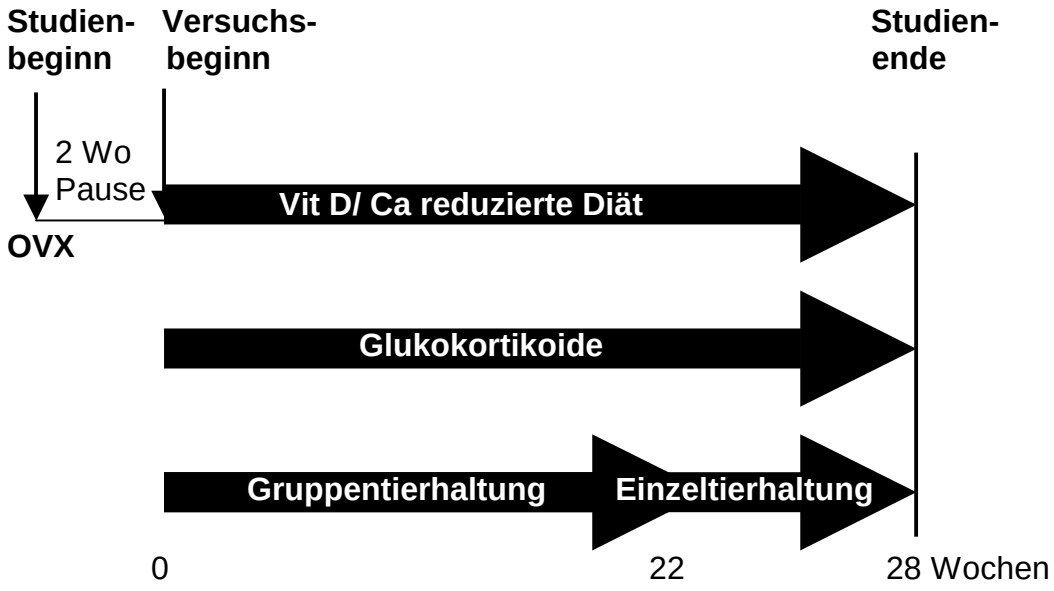


Abb. 3.1 Darstellung der zeitlichen Abläufe innerhalb der tierexperimentellen Arbeit

Bei allen Schafen wurden monatliche Gewichtskontrollen, vierteljährliche Entwurmungskuren und regelmässige veterinärmedizinische Kontrollen durchgeführt.

Das Gewicht der Schafe in Gruppe 1 lag zu Beginn der Studie bei 61,5 kg ± 7,5 kg. Schafe der Gruppe 2 waren 60,3 kg ± 6,0 kg schwer. Im Verlauf der Studie nahmen die behandelten Schafe (Gruppe 2) durchschnittlich um zwei Kilogramm zu.

Die Entwurmungskuren fanden mit Ovitelmin®, einem Breitband-Anthelminthikum für Schafe der Firma Janssen Pharmaceutica Zürich, statt.

Die Vorschriften im Hinblick auf Tierversuche sind nach dem Schweizer Tierschutzgesetz und den europäischen Konventionen zum Tierschutz (Art. 15 TSchG und Art. 58a, 59 TSchV) eingehalten worden. Der Tierversuch wurde unter dem Titel: „Das ovarektomierte Schaf als Osteoporosemodell“ Nr. 11/97 mit dem Fortsetzungsgesuch Nr. 1/98 genehmigt.

3.2 Operationen

3.2.1 Anästhesie

Präoperativ wurden die Schafe bei freiem Wasserzugang 24 Stunden nüchtern gehalten.

Die Prämedikation erfolgte intramuskulär in die Hinterlauf- oder Nackenmuskulatur mit 0,3 ml Detomidin (Domosedan®, 10 mg/ml, FARMOS, Finnland, Vertrieb Pfitzer AG 8048 Zürich). Nach ca. 10 min. setzte die sedierende Wirkung ein, so dass das Tier anschliessend gewogen und mittels Transportwagen zum Op-Vorbereitungsraum gebracht werden konnte. Das Schaf wurde in Rechtsseitenlage auf dem Operationstisch gelagert. Dort wurde das Pulsoxymeter am Ohr befestigt, die Halsstelle über der V. jugularis rasiert und desinfiziert. Der Venenkatheter wurde in die Vene gesetzt und mit Hautstichen fixiert.

Zur Einleitung der Narkose sind 6 – 8 ml einer 5 %igen Pentothallösung (Thiopental 50 mg/ml, Abbott AG, CH-6330 Cham) intravenös gespritzt worden. Nach erfolgter Muskelrelaxation erfolgte die Intubation. Die Narkose wurde mit Sauerstoff, Isofluran® (Halocarbon Laboratories, P.O. Box 661, River Edge, New Jersey 07661), in Ausnahmefällen mit Halothan® und N_2O (Lachgas) vertieft und aufrecht erhalten. Das Narkosegerät war mit einem Überwachungsmonitor und einem Beatmungsgerät verbunden. Die Blutdruckmanschette wurde um einen Vorderlauf gelegt. Falls notwendig wurde ein Pansenschlauch in den Pansen eingeführt.

Zur intraoperativen Analgesie wurde kurz nach der Einleitung 1 ml Temgesic® i.v. (Buprenorphin HCl 0,3 mg/ml, Reckitt & Colman Pharm., Hull, England) verabreicht.

3.2.2 Ovarektomie

Die Ovarektomie wurde in Gruppe 2 (n=16) in oben beschriebener Intubationsnarkose durchgeführt.

Nach Rasur im Bereich des Beckenkammes ist die Haut grossflächig mit Betadineseife® (Polyvinylpyrrolidon- Jod, Mundipharma) gereinigt und mit Jodobac® (Fa. Bode, BDF) desinfiziert worden. In Rückenlage erfolgte die Rasur im Bereich der gesamten Bauchdecke mit anschliessender oben erwähnter Reinigung und Desinfektion. Danach erfolgte die sterile Abdeckung.

Für die Durchführung der Ovarektomie wurde ventral ein paramedianer Zugang kranial des Euters gewählt. Ein ca. 15 cm langer Hautschnitt wurde gesetzt und zur Darstellung der Linea Alba teils scharf, teils stumpf durch das Subkutangewebe präpariert. Die Linea Alba ist mit dem Skalpell inzidiert worden, der Schnitt mit dem Elektrokauter erweitert und im Anschluss das Peritoneum eröffnet worden. Der Uterus wurde intraabdominell lokalisiert und vor die Bauchdecke luxiert.

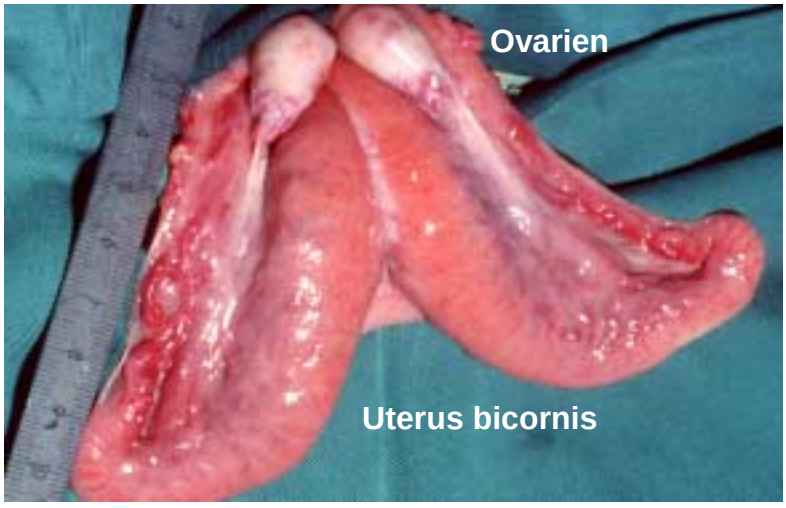


Abb. 3.2 Uterus in situ

Nach der Darstellung eines Ovars wurde die Ovarialarterie über Overholdtklemmen mit einer Durchstechungsligatur (Vicryl 2/0) ligiert.

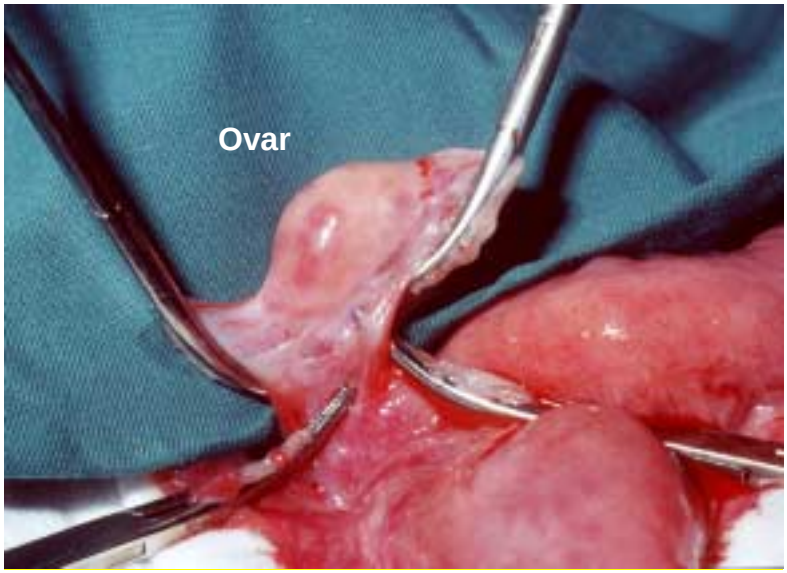


Abb. 3.3 Ovar

Anschliessend erfolgte die Absetzung des Ovars. Entsprechend wurde mit dem zweiten Ovar verfahren.

Im Anschluss daran wurde auf Blutungen innerhalb des Operationsgebietes kontrolliert und der Uterus in situ reponiert. Der Verschluss der Linea alba erfolgte zusammen mit dem Peritoneum mit fortlaufender Schlingennaht (PDS 1). Daraufhin wurde der Subkutanverschluss mit einer einfach fortlaufenden Naht (Vicryl 2/0) und der Hautverschluss mit ca. 8 Klammern durchgeführt. Die Wunde wurde mit einem sterilen Verband versorgt.

Die Klammern konnten 12 Tage postoperativ entfernt werden.

3.2.3 Beckenkammbiopsieentnahme

Die Schafe der Gruppe 1 (Kontrollgruppe, n=16) wurden in oben beschriebener Intubationsnarkose für die Beckenkammbiopsie vorbereitet.

Nach Abschluss der Ovarektomie ist auch bei den Schafen der Gruppe 2 (OVX-Gruppe, n=16) eine Beckenkammbiopsie entnommen worden.

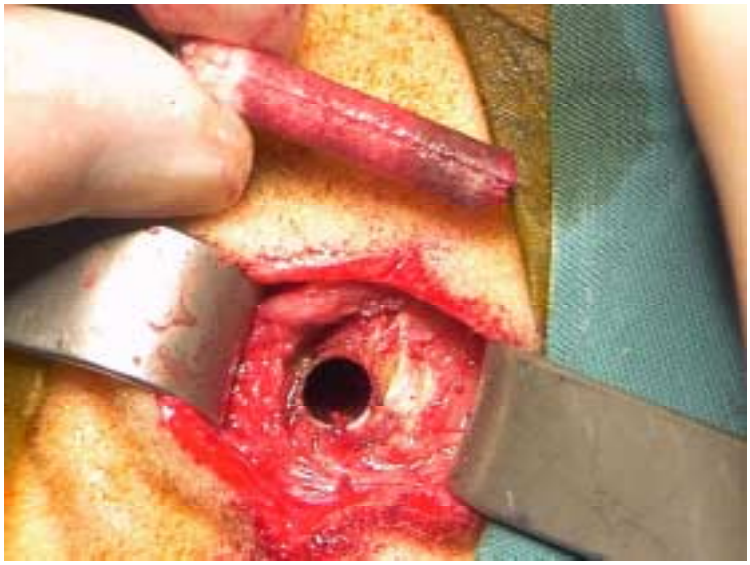
In Rechtsseitenlage konnte bei allen Schafen der linke Beckenkammbereich mit Jodobac® (Fa. Bode, BDF) desinfiziert werden, bevor die sterile Abdeckung erfolgte.

Durch eine Hautinzision von 5 cm Länge wurde etwa 3 cm medial der Spina iliaca ant. sup. scharf auf den Beckenkamm präpariert. Mit dem 'diamond bone cutting system' (TL 05 Trepanfräse 2,0, Aussendurchmesser 7,30 mm, Innendurchmesser 6,40 mm, Zentrum für Orthopädische Wissenschaften,

München- Bern ZOW) konnte 3 cm dorsal der Spina iliaca ant. sup. das Os ilium längs 3 cm tief aufgefräst werden.

Abb. 3.4 Biopsieentnahme

Anschliessend wurde der Extraktor eingebracht und das Biopsiematerial entnommen (siehe Abb. 3.13 und Text 3.6).



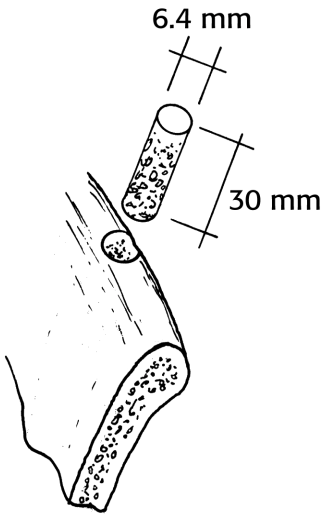


Abb. 3.5 Biopsieloch mit entnommener Biopsie

Die Biopsie ist direkt im Anschluss an die Entnahme in gepuffertem Formalin (4 %) fixiert worden. Die Subkutannaht erfolgte mit Dexon 2/0, der Hautverschluss mit ca. 5 Klammern und die Wundversorgung mit einem sterilen Verband. Die Klammerentfernung war 12 Tage postoperativ.

Nach Beendigung der Narkose und Extubation wurde das wache Schaf liegend zurück in den Stall transportiert. Dort lag es für etwa sechs Stunden unter einer Wärmelampe. Anschliessend begann die Fütterung.
Zur weiteren Analgesie wurde postoperativ nach Bedarf Temgesic® i.m. (bis 2 mal täglich 0,3 mg) gegeben.
Alle Tiere standen unter engmaschiger postoperativer Kontrolle. Die Wundheilung und der Allgemeinzustand wurden regelmäßig überprüft und dokumentiert.

3.3 Diät und Glukokortikoidgabe

Von der Firma EBERLE NAFAG AG, 9201 Gossau, wurde eine Spezialdiät für Tiere der Gruppe 2 (n=16) zubereitet. Die Diät war im Kalzium- und Vitamin D_3-Gehalt reduziert. Die Nahrung für die behandelten Schafe bestand aus 80 % NAFAG 8277 und 20 % Stroh. Es wurden 800 g Trockensubstanz in zwei Portionen gefüttert. 1 kg Futter enthielt 1,7 g Kalzium, <100 IE Vitamin D_3 und 6,8 g Phosphor.
Die Fütterung erfolgte während der Gruppenhaltung 22 Wochen lang über eine Futtermaschine. Jedes Schaf hatte eine Ohrmarke, die den Futterauswurf aus der Maschine regelte. Damit konnte sichergestellt werden, dass jedes Schaf nicht mehr als die vorgesehene Tagesration von dem NAFAG- Erhaltungsfutter bekam. In den letzten sechs Wochen der Studie wurden die Tiere in Einzelhaltung getrennt mit der gleichen Menge und Zusammensetzung wie zuvor versorgt.
Die unbehandelten Schafe (n=16) standen in den Sommermonaten auf der Weide. Im Winter bestand das Futter aus 750 g Heu, 100 g Kraftfutter, 1 kg Grassilo und Stroh. Das Kraftfutter beinhaltete die physiologische Menge an benötigtem Kalzium (5 g), Phosphor (4 g) und Vitamin D_3 (1000 IE).

In Gruppe 2 (n=16) wurden ab zwei Wochen postoperativ 28 Wochen lang Methylprednisoloninjektionen (1 %ig 2 ml, Strenzli & Co. AG Pharmazeutika, 8730 Uznach) vorgenommen. Die Injektionen erfolgten intramuskulär im Wechsel in Muskelgruppen der Schulter, des Nackens oder die Hinterläufe.
In den ersten 22 Wochen wurde das Steroid in Form einer Lösung injiziert. Über die ersten 14 Wochen (Mitte August bis Anfang Dezember) bekamen die

Tiere wöchentlich je 120 mg des Steroids verabreicht. Die 40 mg Dosen wurden dreimal pro Woche intramuskulär gespritzt. In den folgenden acht Wochen (Anfang Dezember bis Ende Januar) wurde die wöchentliche Steroiddosis auf 200 mg erhöht. Fünfmal pro Woche wurden den Tieren je 40 mg verabreicht.

In den letzten sechs Wochen (Ende Januar bis Mitte März) fand eine Umstellung auf Methylprednisolon in Form einer Kristallsuspension statt. Das Präparat wurde ebenfalls in 40 mg Dosen fünfmal pro Woche verabreicht (Wochendosis 200 mg).

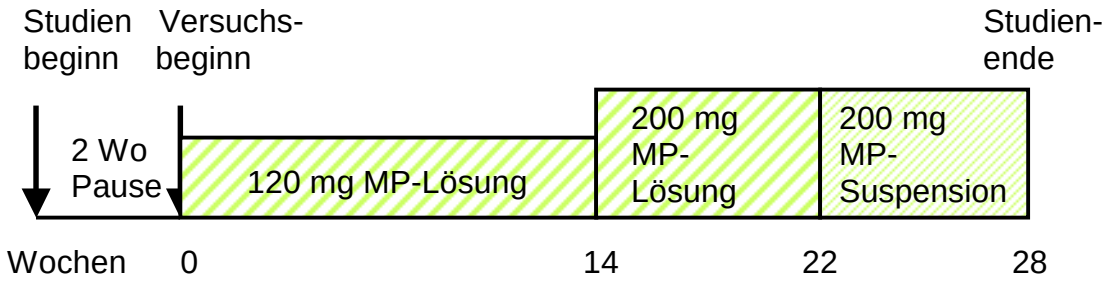


Abb. 3.6 Veränderung der Steroidemenge bzw. Steroideformulierung

3.4 Laboruntersuchungen

Es wurde monatlich, zeitgleich morgens, Blut und Urin abgenommen.

Die Blutentnahme erfolgte steril mit Hilfe des Monovette® Systems (Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht). Aus der V. jugularis externa wurden 10 ml Blut entnommen und unmittelbar im Anschluss 10 min. bei 4 °C und mit 2200 G zentrifugiert (Universal Zentrifuge/ K2S, Hettich Zentrifugen Tuttlingen). Das Serum wurde abpipettiert und bei –20 °C tiefgefroren.

Der, mit Hilfe eines speziell entwickelten Auffangbehälters gewonnene Morgenurin, wurde ebenfalls bei –20 °C tiefgefroren.

Das diagnostische Programm enthielt die Untersuchung von verschiedenen biochemischen Markern des Knochenstoffwechsels.

Im Serum wurde die alkalische Phosphatase (ALP) bestimmt. Das C-terminale Prokollagen-Typ I-Propeptid (PICP) wurde exemplarisch bei zwei Schafen der Gruppe 1 (Schafe mit der ID- Nr. 744 und 758) und bei drei Schafen der Gruppe 2 (Schafe mit der ID- Nr. 556, 842 und 852) gemessen.

Im Urin wurden Kollagen-Crosslinks, Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) bestimmt. Die Bestimmung der Laborparameter wurde vom Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der LMU München (Prof. Dr. Rambeck) durchgeführt.

3.4.1 Biochemische Marker im Serum

Die alkalische Phosphatase wurde im Serum photometrisch bestimmt.
P- Nitrophenyl- Phosphat und H_2O wurden von der alkalischen Phosphatase enzymatisch zu Phosphat und p- Nitrophenol umgesetzt. Die Messung des Produktes erfolgte spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm (Referenz 660 nm). Die Aktivität der Phosphatase war direkt proportional zu der in der Probe enthaltenen Menge des Enzyms.

Die Messungen des Serumgehaltes an C-terminalen Prokollagen-Typ I-Propeptid (PICP) wurden mit dem PICP RIA Assay (Orion Diagnostica, Finnland) durchgeführt. Prinzip der Messung war die Kompetition zwischen dem PICP der Probe und dem ^{125}Jod- markiertem PICP (Tracer) um limitierte Bindungsstellen an einem Antikörper. Nach Reaktionsende wurde der Antigen- Antikörperkomplex von dem nicht gebundenen Traceranteil abgetrennt. Dies geschah durch Fällung des Komplexes mittels einer präzipitierenden Lösung, die einen gegen den ersten Antikörper gerichteten zweiten Antikörper enthielt. Nach 30 min Inkubation wurde der Überstand abzentrifugiert und die Radioaktivität des Niederschlags in einem Gamma-Counter (Auto-Gamma 500, United Technologies Packard) gemessen. Die bestimmte Prozentbindung war der PICP-Serumkonzentration direkt proportional.

3.4.2 Biochemische Marker im Urin

Die Detektion von Pyridinolin und Desoxypyridinolin im Urin erfolgte nach saurer Hydrolyse und Vorreinigung über Zellulose-Chromatographie-Säulen mittels Eigenfluoreszenz. Dazu wurde eine Ionenpaar-Reversed-Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Anlage benutzt (HPLC; Integrator, Shimadzu C-R4AX Chromatopac; Fluoreszenzdetektor, Shimadzu RF-551 S Spectrofluometric Detektor).

Das Bestimmungsverfahren der Einzelkonzentrationen von Pyridinolin und Desoxypyridinolin beruhte auf einem modifizierten isokratischen Verfahren nach Collwell et al. (1993) und Black et al. (1988).

3.4.3 Methylprednisolonbestimmung

Sowohl während der Applikation von Methylprednisolon-Lösung als auch Methylprednisolon-Suspension wurden Methylprednisolonspiegel bestimmt.

Die Bestimmung der Methylprednisolonkonzentration im Blut wurde von der Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin (Dr. Eberhard & Partner, Dortmund, Deutschland) vorgenommen.

Die erste Methylprednisolonkonzentrationsbestimmung erfolgte zu der Zeit, in der die Schafe wöchentlich 3 Injektionen à 40 mg Methylprednisolon-Lösung bekamen. Zwischen der letzten Injektion und der Blutabnahme lagen 24 Stunden.

Die zweite Methylprednisolonkonzentrationsbestimmung erfolgte während der wöchentlichen Gabe von 5 mal à 40 mg Methylprednisolon-Lösung. Hier lagen zwischen der letzten Injektion und Blutentnahme 4 Stunden.

Zuletzt wurde der Methylprednisolonspiegel untersucht, als die Schafe wöchentlich 5 mal à 40 mg Methylprednisolon-Kristallsuspension-Injektionen erhielten. Nach der Injektion wurden im Abstand von 4, 12 und 24 Stunden Blutproben gewonnen.

wöchentliche Gabe von 3 x 40 mg Methylprednisolon-Lösung	wöchentliche Gabe von 5 x 40 mg Methylprednisolon-Lösung	wöchentliche Gabe von 5 x 40 mg Methylprednisolon-Kristallsuspension
Blutentnahme 24 Std. nach Injektion	Blutentnahme 4 Std. nach Injektion	Blutentnahme 4, 12, 24 Std. nach Injektion

Abb. 3.7 Blutentnahmen im zeitlichen Zusammenhang mit zuvor gegebenen Steroideinjektionen

3.5 Quantitative Computertomographie

Zur Verlaufskontrolle der Knochendichte wurden in regelmässigem Abstand fünf Messungen der Knochendichte mit Hilfe der peripheren quantitativen Computertomographie (pQCT) durchgeführt. Die behandelten Tiere (n=16) wurden zu Beginn, nach sechs Wochen, dann zweimal im Abstand von acht Wochen und zuletzt noch einmal nach sechs Wochen gemessen. In der Kontrollgruppe (n=16) konnte auf die vierte Messung nach 22 Wochen verzichtet werden.

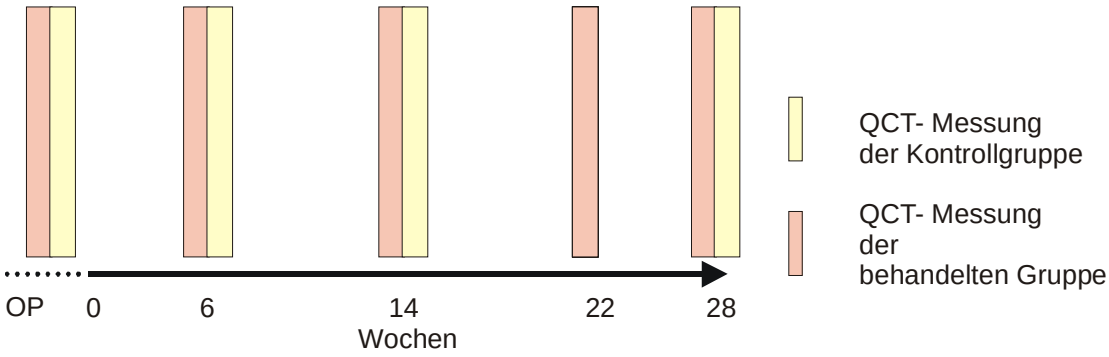


Abb. 3.8 Zeitpunkte der QCT- Messungen

Das verwendetet Gerät ist ein Dünnschicht-Computertomograph der Marke Densiscan 1000® der Firma Scanco Medical AG, Bassersdorf.

Die Messung der Knochendichte beider Gruppen erfolgte in Intubationsanästhesie, um Bewegungsartefakte auszuschliessen. In Rechtsseitenlage wurden nacheinander distaler Radius, distale Tibia und Calcaneus beidseits gemessen.

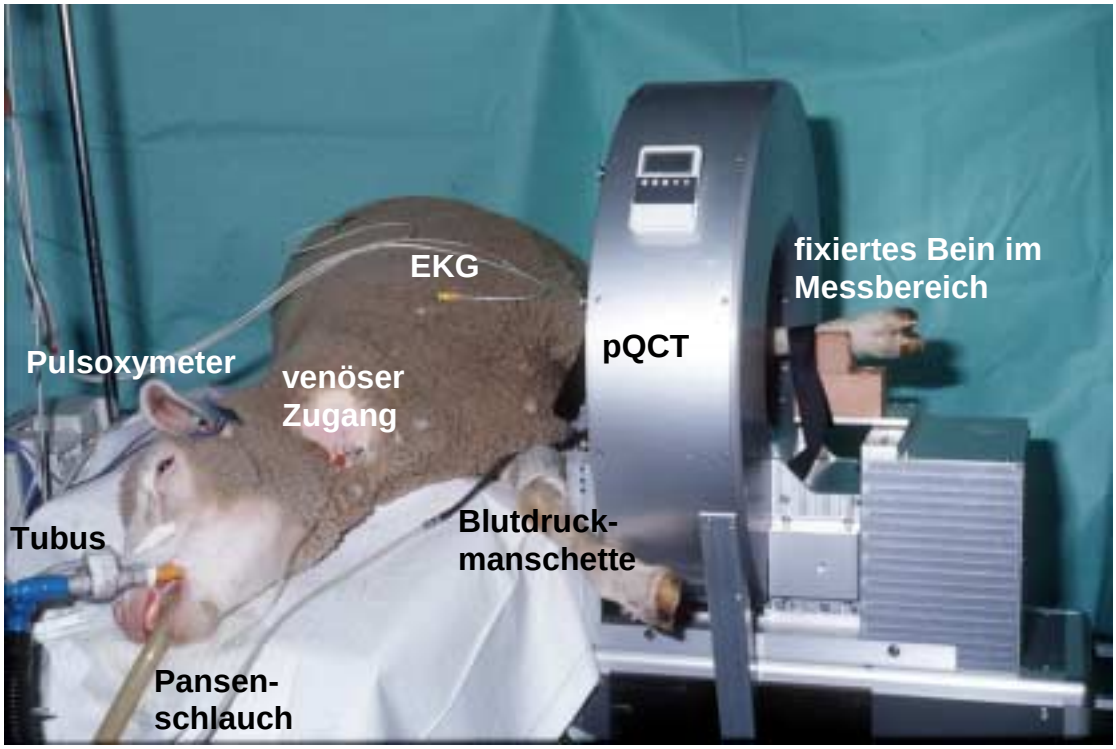


Abb. 3.9 Schaf während der Messung in einem pQCT

Abb. 3.10 Blick auf den eingespannten Hinterlauf während einer Messung im pQCT

Zur Festlegung des Messbereiches wurde ein Scout-View angefertigt. Vergleichbar mit einer Röntgenaufnahme kann so zuverlässig die Referenzlinie festgelegt werden, von wo aus mit der Messung begonnen werden soll. Diese Linie wird gespeichert und kann bei Wiederholungsmessungen abgerufen werden, um an derselben Stelle des Knochens mit der Messung zu beginnen.

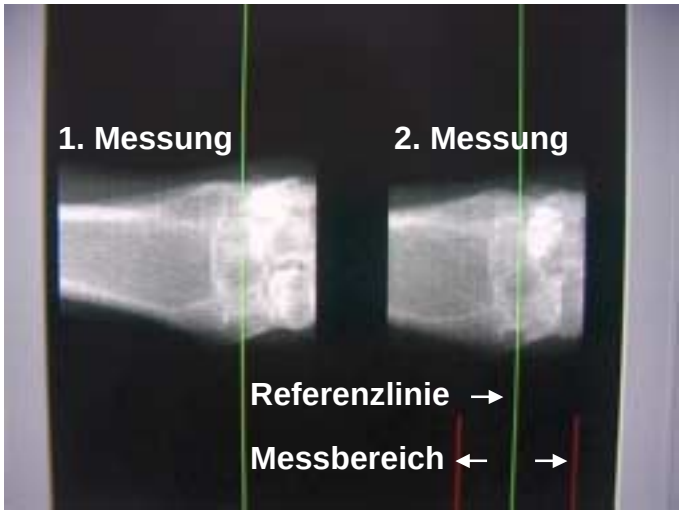


Abb. 3.11 Scout-View, Bildschirmdarstellung einer Wiederholungsmessung des Radius

In dieser Studie setzten wir diese Linie sowohl am Radius als auch an der Tibia 2 mm proximal des distalen Gelenkspaltes fest. Von der Referenzlinie aus wurden 11 Schnitte in proximale Richtung gemacht. Die Schnittdicke betrug 1 mm und der Meßabstand 1,5 mm.

Eine wöchentlich durchgeführte Kalibriermessung zur Herstellung einer Eichkurve wird zur Qualitätssicherung gefordert. Zur Kontrolle der Gerätekonstanz und anderer kV-abhängiger Fehler wurden Referenzkörper bzw. Kalibrierphantome eingesetzt.

Aufgrund der technischen Gegebenheiten waren in vivo Messungen der Lendenwirbelkörper, des Humerus und des Femurs nicht möglich.

Messungen der Knochendichte erfolgten deshalb ex vivo an der präparierten Lendenwirbelsäule (L3 - L5), dem Radius und Humerus, der Tibia und dem Femur. An den Röhrenknochen wurde über die gesamte Knochenlänge mit einer Schichtdicke von 1 mm und einem Messabstand von 3 mm gemessen. Bei den Wirbelkörpern war die Schichtdicke ebenfalls 1 mm, der Messabstand betrug 2 mm. An einem Wirbelkörper sind vier Aufnahmen parallel zur Deckplatte gemacht worden.

Die Knochendichten der unbehandelten Schafe wurden mit der Knochendichte der behandelten Schafe verglichen. Für die Auswertung der Tomogramme konnten aufgrund eines computerkontrollierten Positionierungssystems identische Knochenabschnitte analysiert werden.

Dadurch sind die Ergebnisse subjektiven Einflüssen entzogen. Es wird eine Kontur um den Knochen gelegt, eine zweite an die Grenze zwischen Kortikalis und Spongiosa. Eine spezielle Software, entwickelt von der Firma Scanco Medical AG, Bassersdorf, findet dann die innere und äussere Kontur um die Kortikalis. Die Auswertung wurde immer von derselben Person durchgeführt.

Am Radius wurde um die Kortikalis eine Kontur gesetzt. Der Computer berechnete automatisch die Knochendichte der inneren 50 % der eingezeichneten Fläche. Dadurch wurde nur Spongiosa zur Knochendichtemessung erfasst.

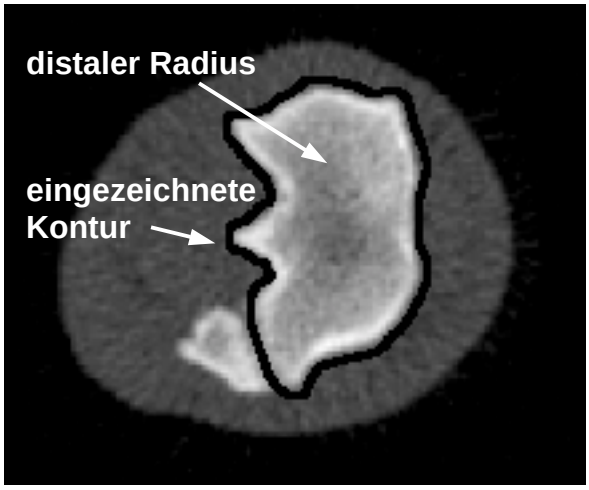


Abb. 3.12a Radius, Spongiosa

An der Tibia wurden Spongiosa und Kortikalis getrennt ausgewertet. Um eine exakte Auswertung der Spongiosadichte zu gewährleisten, wurde im distalen Bereich des Knochens nach demselben Prinzip der Radiusspongiosaauswertung verfahren. Die Konturen für die Kortikalismessung wurden im proximalen Messbereich gezogen, da hier eine genaue Abgrenzung zwischen Spongiosa und Kortikalis erfolgen konnte.

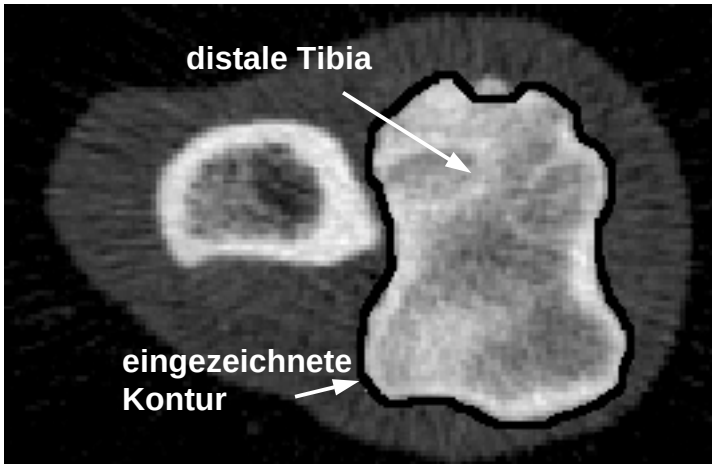


Abb. 3.12b Tibia, Spongiosa

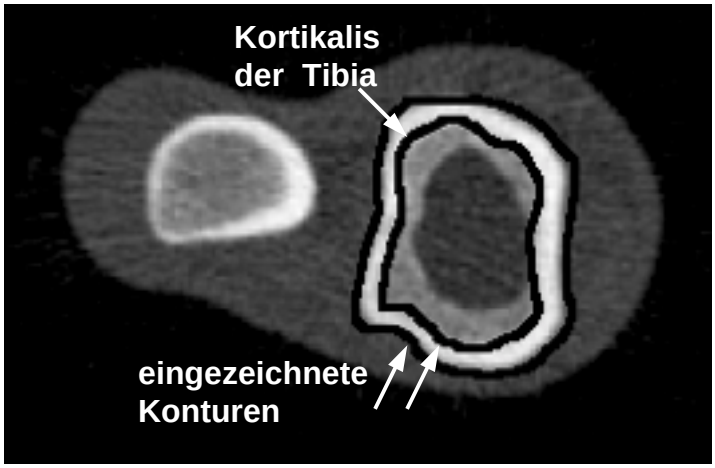


Abb. 3.12c Tibia, Kortikalis

Am Calcaneus wurde die Knochendichte von Kortikalis und Spongiosa zusammen ausgewertet, indem die Knochendichte der gesamten eingezeichneten Fläche errechnet wurde.

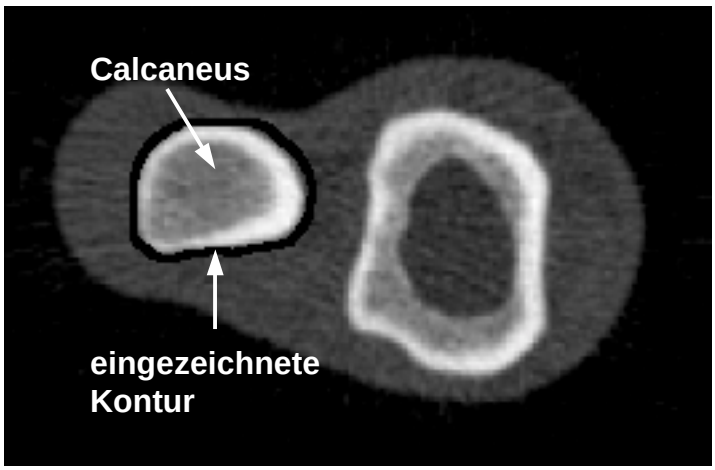


Abb. 3.12d Calcaneus, Spongiosa und Kortikalis

Mit Hilfe der Gesamtknochenfläche eines Schnittes konnten korrespondierende Schnitte (gemessen zu verschiedenen Zeitpunkten) gefunden werden. Der Mittelwert der Knochendichte wurde aus drei bis fünf Schnitten im festgelegten Auswertebereich (ROI Region of Interest) gemittelt. So konnten die Knochendichtewerte über den Studienverlauf miteinander verglichen werden.

Bei der Auswertung der Knochendichte der Wirbelkörper wurde die Kontur so in einem Schnitt eines Wirbelkörpers platziert, dass keine Kortikalis mit angeschnitten wurde. Auch hier kamen pro Wirbelkörper drei Messungen zur Auswertung.

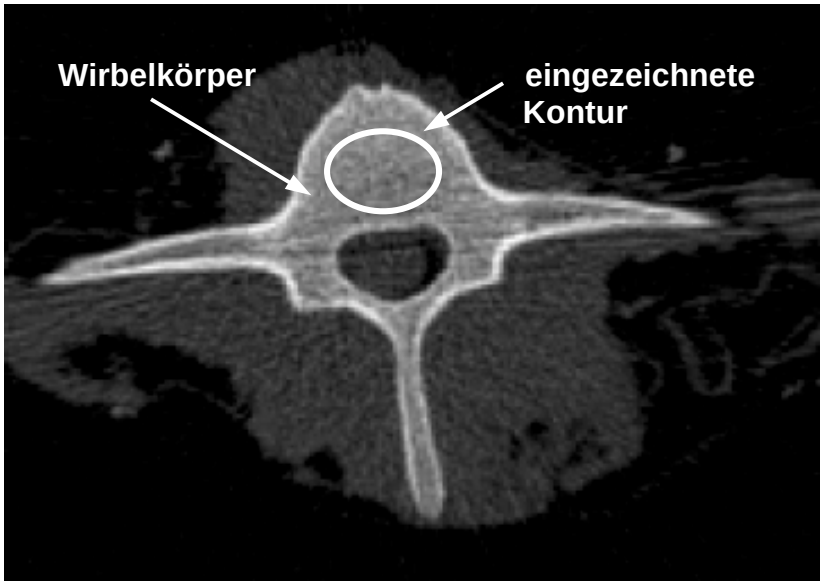


Abb. 3.12e Wirbelkörper mit Kontur

Die Angabe des Knochenmineralgehaltes erfolgte in g/cm^3.

Die Analyse mit der integrierten Scanco-Software lieferte uns im Einzelnen folgende Parameter:

Parameter	Gemessen in:	Gemessen wird:
μ 100	1/cm	Mittlere Knochendichte über die gesamte evaluierte Knochenquerschnittsfäche
μ 50	1/cm	Mittlere Knochendichte über die inneren 50 Prozenten der Knochenquerschnittsfläche
DensC	g/cm^3	Knochenmineralgehalt des kortikalen Anteils des Knochenvolumens eines Schnittes
DensT	g/cm^3	Knochenmineralgehalt des trabekulären Anteils des Knochenvolumens eines Schnittes
Area B	mm^2	Gesamtknochenfläche eines Schnittes
Area C	mm^2	Fläche des kortikalen Anteils eines Schnittes
Area T	mm^2	Fläche des trabekulären Anteils eines Schnittes

3.6 Euthanasie, Präparation und Entnahme von Knochenbiopsien

Zur Euthanasie der Schafe wurden 20 ml Vetanarcol® (Pentobarbital 162 mg/ml) intravenös verabreicht.

Aus der Kontrollgruppe wurden 7 Schafe geopfert. Ein weiteres Schaf verstarb einen Monat vor Studienende (Grund: Mesenterialstildrehung) und wurde ebenfalls in die Auswertung mit einbezogen. Somit wurden in bezug auf die mechanischen Tests (n=8) Tiere aus der Gruppe 1 ausgewertet.

Aus der Gruppe 2 wurden (n=7) Schafe zur Auswertung der mechanischen Eigenschaften genommen. Acht Tiere wurden geopfert. Auch in dieser Gruppe verstarb ein Schaf vorzeitig. Dieses wurde bei der Auswertung der Daten, die bei mechanischen Tests erhoben wurden, nicht berücksichtigt. Das ausgelassene Schaf wurde bereits aufgrund von Nebenwirkungen, die man

im Zusammenhang mit der Gabe von Steroiden sehen muss, vorzeitig aus der Studie ausgeschlossen.

Zur Dokumentation der erfolgreich durchgeführten Ovarektomie bei Schafen der Gruppe 2 wurden diese nach Euthanasie auf eine Uterusatrophie hin untersucht.
Den Tieren wurden Lendenwirbelsäule, Becken, Vorder- und Hinterbeine entnommen.
Beim Schaf kommen physiologischerweise sechs oder sieben Lendenwirbel vor. Für unsere Studie wurde jeweils der dritte, vierte und fünfte Lendenwirbel für mechanische Tests verwendet, um die Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu gewährleisten. Lendenwirbelkörper sind häufig verwendete Knochen, um sie mechanischen Tests zu unterziehen und Veränderungen hinsichtlich der Knochendichte zu erkennen (siehe Text 5.7).

Unmittelbar im Anschluss an die Exartikulation der Extremitäten im Hüft- bzw. Schultergelenk wurden die Knochendichten der Humeri, Radii, Femura und Tibiae im QCT gemessen. Darauf folgte die Präparation, in denen sämtliche Weichteile unter Schonung des Periostes abpräpariert wurden. Die Knochen wurden einzeln in mit NaCl durchfeuchtetem Zellstoff in Plastikbeuteln verpackt und bei –20 °C gelagert.
Aus dem Beckenkamm wurde auf der rechten Seite eine Knochenbiopsie entnommen.
Nach dem gleichen Verfahren, das bei der in vivo-Entnahme der Beckenkammbiopsie zu Beginn der Studie angewendet wurde, wurde mit dem 'diamond bone cutting system' (TL 05 Trepanbohrer 2,0, Aussendurchmesser 7,30 mm, Innendurchmesser 6,40 mm, Zentrum für Orthopädische Wissenschaften, München- Bern ZOW) 3 cm dorsal der Spina iliaca ant. sup. das Os ilium 3 cm tief aufgefräst. Anschliessend wurde der Extraktor eingebracht und das Biopsiematerial entnommen.
Das von uns verwendete 'diamond bone cutting system' war eine innengekühlte Diamantzylinderhohlschleife. Durch die Innenkühlung konnten Hitzenekrosen und Mikrofrakturierungen minimiert werden.

Abb. 3.13
DBCS-System (Diamond bone cutting system) + Extraktor

Zur Entnahme des Knochenzylinders ist ein Extraktor mit Innenprofil benutzt worden. Damit konnte eine Rotation des Zylinders beim Abdrehen des Knochen-Zylinders von der Basis verhindert werden. Das Transplantat wurde mit einem entsprechenden Stössel ausgestossen.

Die Knochendichte der Lendenwirbelkörper L3 - L5 wurde nach der Präparation im QCT gemessen (siehe Text 3.5). Die Entnahme einer Biopsie aus dem Wirbelkörper (L3 - L5) in axialer Richtung erfolgte zentral mit der Diamantbiopsiefräse (TN 09 Diamond Trepline, Länge 80 mm, Aussendurchmesser 11,50 mm, Innendurchmesser 10,60 mm, Stratec Medical AG, 4436 Oberdorf).

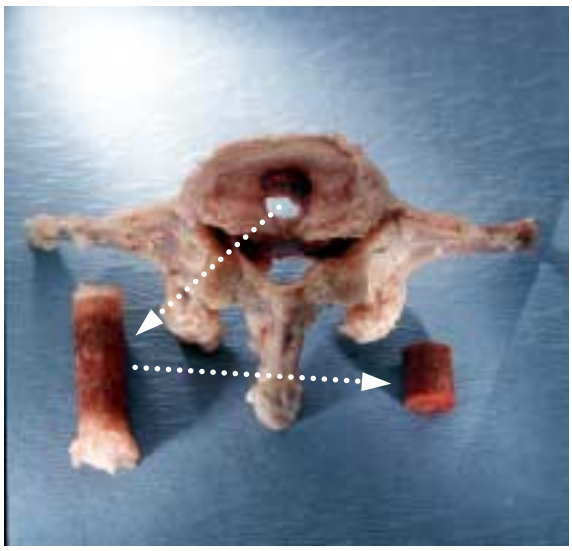


Abb. 3.14
Lendenwirbelkörper mit entnommener Biopsie links und zurechtgesägter Biopsie rechts

Aus dem Femurkopf wurde zentral eine zylindrische Probe ebenfalls mit Hilfe des oben genannten Diamantbiopsiefräse (TN 09) entnommen.
Alle Biopsien wurden direkt im Anschluss an die Entnahme in gepuffertem Formalin (4 %) fixiert.

3.7 Mikro-Computertomographie

Die Mikro-Computertomographie (µ-CT) ermöglicht simultan eine zwei- und dreidimensionale, qualitative und quantitative Strukturanalyse von Knochenproben. Neben Anzahl, Dicke und Abstand der Trabekel wurde der Grad der Anisotropie ermittelt. Ausserdem wurden die Oberflächendichte des Knochens und das Verhältnis des trabekulären Knochenvolumens zum Gesamtvolumen des “Volume of Interest” (VOI) als Quotient errechnet.
Verwendet wurde der Mikro-Comutertomograph 20 der Firma Scanco Medical AG, Bassersdorf.
Das Gerät ermittelt die Struktur der Knochen zerstörungsfrei und ohne Schnittartefakte. Es wurden Spongiosaproben aus dem Beckenkamm (entnommen zu Beginn der Studie und nach Euthanasie), Femurkopf und Lendenwirbelkörper (entnommen nach Euthanasie) untersucht. Die Messungen der Spongiosaproben erfolgten in formalinfixiertem, nicht eingebettetem Zustand.
Der Messvorgang wurde mit einem Scout-View begonnen, um so das zu untersuchende Volumen auszusuchen. Das Objekt konnte automatisch für die eigentliche Messung positioniert werden. Die Biopsien wurden auf einem beweglichen Tisch befestigt und rotierend in axialer Richtung durch den Röntgenstrahl bewegt. Ein Detektor mit einem Szintillator wandelte die Röntgenstrahlen, die zuvor nicht vom Objekt absorbiert worden waren, in Licht um. Anschliessend fand über eine Workstation die zwei- und dreidimensionale Rekonstruktion der CT-Bilder statt.
Die Biopsien wurden längs in einen vorgegebenen Zylinder gestellt. Aus dem nur aus Spongiosa bestehenden mittleren Teil wurde ein Würfel von 4 x 4 x 4 mm gemessen.
Bei der Beckenkammbiopsie wurden über 4 mm in einem Abstand von 22 µm 183 Schnitte gemessen. Bei den Femurkopf- und Lendenwirbelkörperbiopsien

wurden über 4 mm 155 Schnitte gemessen. Das entspricht einem Abstand der einzelnen Schnitte von 26 µm.

Es wurde eine mittelhohe Auflösung gewählt. Das bedeutet bei der Rekonstruktion der Bilder 512 x 512 Pixel.

Das µ-CT lieferte Daten über:

Parameter	Gemessen in:	Gemessen wird:
TV	mm^3	Tissue Volume, Gesamtvolumen
BV	mm^3	Bone Volume, Knochenvolumen
BV/TV	%	Knochenvolumen/ Gesamtvolumen
BS	mm^2	Bone Surface, Knochenoberfäche
BS/BV	1/mm	Oberfächendichte
Tb.N	1/mm	Trabecular Number, Trabekelanzahl
Tb.Th	mm	Trabecular Thickness, Trabekeldicke
Tb.Sp	mm	Trabecular Spacing, Trabekelabstand
DA	dimensionslos	Degree of Anisotropy, Grad der Anisotropie

3.8 Mechanische Testung

3.8.1 Kompressionstest

An Femurkopf- und Lendenwirbelkörperbiopsien (L3/L4) wurde ein Kompressionstest durchgeführt.

Die 30 mm langen Femurkopfbiopsien sind dazu mit dem Sägemikrotom (Sägemikrotom 1600, Ernst Leitz Wetzlar GmbH) zu 10 mm langen Proben zugeschnitten worden. Um vergleichbare Spongiosaproben zu gewährleisten, wurde ein Abstand von 5 mm zur Kortikalis eingehalten. Die Zylinder aus Spongiosa hatten einen Durchmesser von 10,60 mm.

Aus den Lendenwirbelkörpern (L3/L4) wurden die zentral gewonnenen Knochenbiopsien verwendet. Im Gegensatz zu den Femurkopfproben ist bei Lendenwirbelkörpern die Spongiosaschicht auf beiden Seiten von Kortikalis begrenzt. Zur Kortikalis wurde auf beiden Seiten ein gleich grosser Abstand

eingehalten und ein 10 × 10,60 mm grosser Spongiosazylinder mit Hilfe des Sägemikrotoms gewonnen.

Mit der Materialprüfmaschine Instron 4302 (Instron series IX automated materials testing system, Instron Ltd., High Wycombe, England) wurden die formalinfixierten Knochenproben in kranio- kaudaler Richtung mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/min komprimiert. Die Kraft- Weg- Kurve wurde digital aufgezeichnet und die Versagenslast (kN) sowie die Steifigkeit (N/mm) ermittelt.

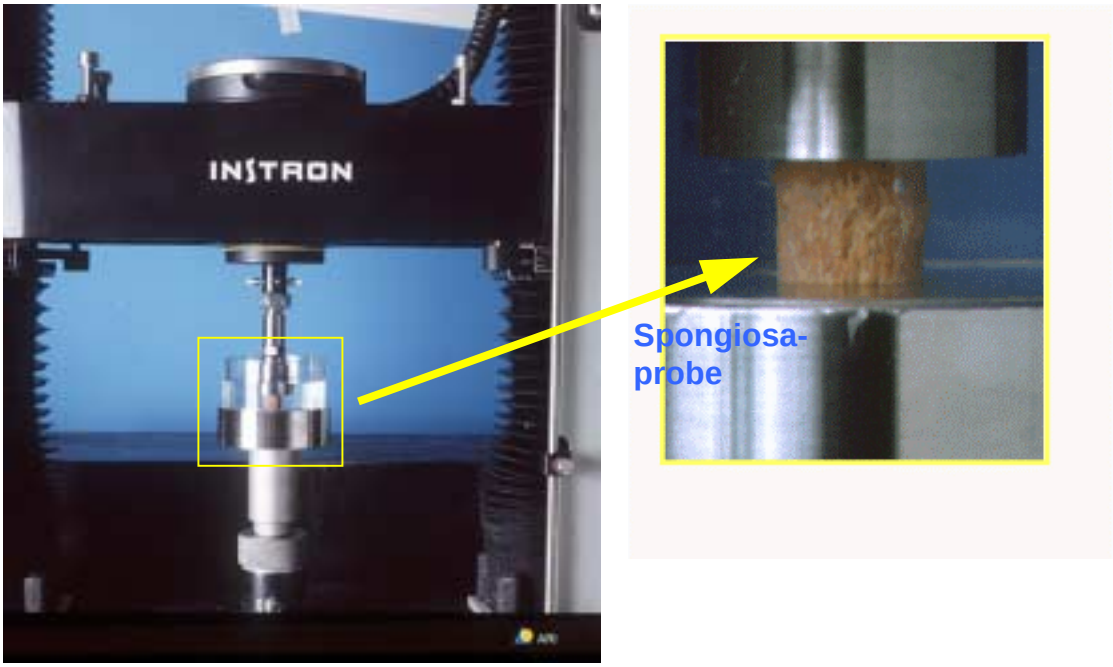


Abb. 3.15 Kompression einer Spongiosabiopsie

3.8.2 Torsionstest

Der Torsionstest diente zur Festigkeitsprüfung der präparierten intakten Tibia. Bei der Präparation wurde darauf geachtet, dass das Periost unbeschädigt blieb. Die Tibiae wurden vom proximalen Ende aus einheitlich auf 20 cm gekürzt. Eine Schraube wurde quer durch das proximale Ende eingebracht. Sowohl das proximale als auch distale Ende der Tibia wurde in Beracryl®, einem Zweikomponenten-Polymersystem (W.Troller AG, 4854 Fulenbach/ Schweiz) eingebettet, so dass 5 cm der Diaphyse frei blieben. Die eingebrachte Schraube erbrachte zusätzliche Rotationsstabilität. Die Maschine zur Durchführung des Torsionstests wurde im AO-

Forschungsinstitut im Rahmen einer früheren Studie entwickelt (Grütter et al., 1996). Die Belastung fand bis zum Bruch des Knochens statt.

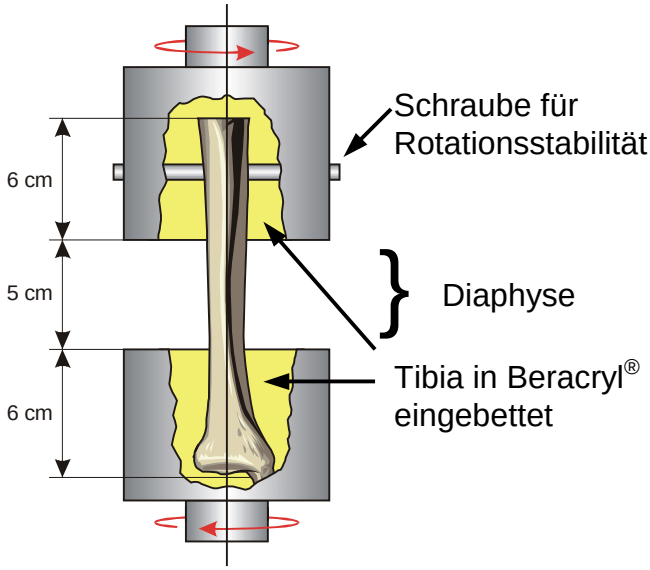


Abb. 3.16 Graphik zur Darstellung der Torsionsapparatur

Mit einer Messvorrichtung waren über einen hydraulischen Antrieb konstante Drehgeschwindigkeiten möglich. Zur Anlage des Drehmoments wurde eine Torsionsmesszelle für 100 Nm (MESSRING, München) benutzt. Die Winkelgeschwindigkeit betrug 3,6 ° pro Sekunde. Der Meßbereich wurde auf 90 ° limitiert und mit einer Genauigkeit von 0,5 ° festgelegt. Die Winkelmessung erfolgte über einen digitalen Winkelencoder von IHI, Japan, die Datenerfassung über eine AD- Karte DASH- 16. Zur Auswertung wurde eine speziell entwickelte Software (Remy Grütter, AO- Forschungsinstitut, 1996) verwendet.

Die Reaktion des Knochens unter Torsionsbelastung wurde kontinuierlich digital aufgezeichnet. Es wurden das maximale Drehmoment (Nm), sowie die maximale Winkeldeformation in Grad (°) bestimmt.

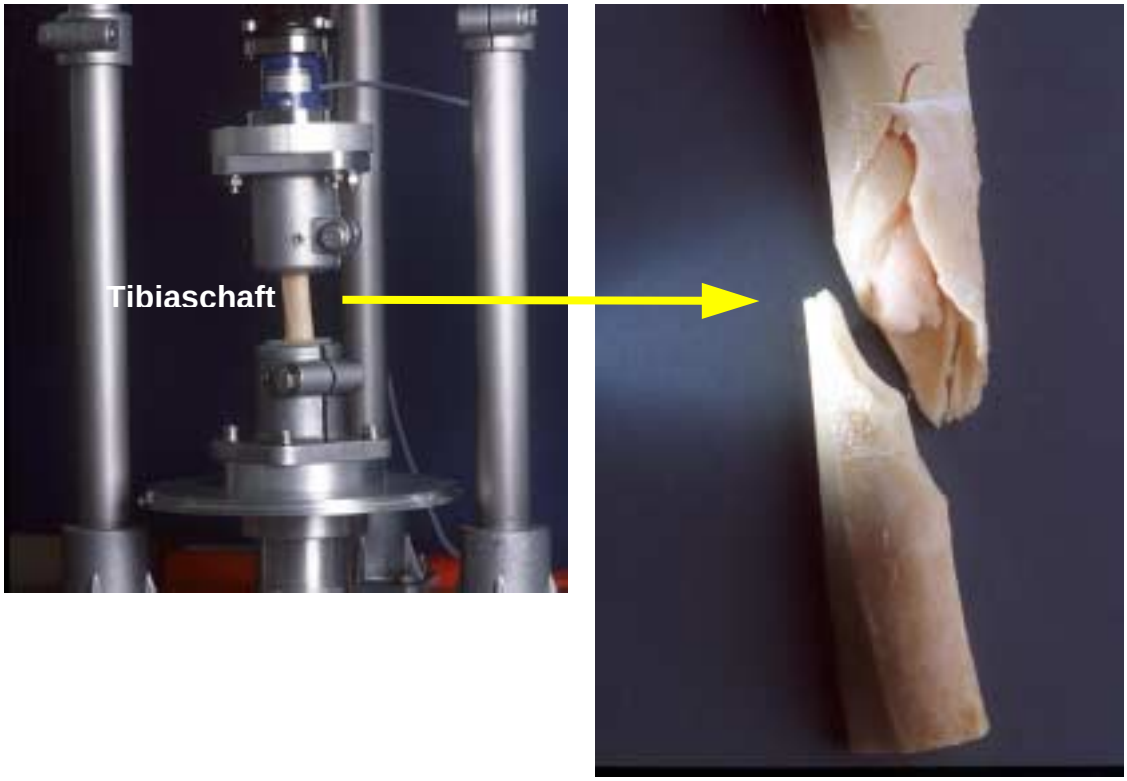


Abb. 3.17 Torsion, intakte Tibia in der Apparatur + gebrochene Tibia nach der Torsion

3.8.3 Vier- Punkt- Biegung

Für die Vier- Punkt- Biegung wurden Kortikalisproben verwendet. Dazu sind im Anschluss an den Torsionstest Proben der Tibia von anatomisch identischen Stellen entnommen worden.

Die Kortikalisstücke wurden mit der oszillierenden Säge (The Aero Corporation, Bryan Ohio, USA) unter ständiger Kühlung mittels NaCl- Nebel herauspräpariert. Die Stücke hatten eine Breite von 5 mm und eine Länge von 40 mm. Mit einer CNC- Fräse (EMCO F-1-CNC) konnten die Kortikalisproben auf die endgültige Größe von $2 \times 2 \times 32$ mm gebracht werden.

Zu Beginn wurde die äussere Seite der Kortikalis markiert, um im Biegetest eine immer gleichgerichtete Krafteinwirkung zu gewährleisten.

Die Stabilität der Kortikalisstücke wurden mit der Materialprüfmaschine Instron 4302 (Instron series IX automated materials testing system, Instron Ltd., High Wycombe, England) getestet. Mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/min wurde die Kraft auf die markierte Kortikalisseite ausgeübt.

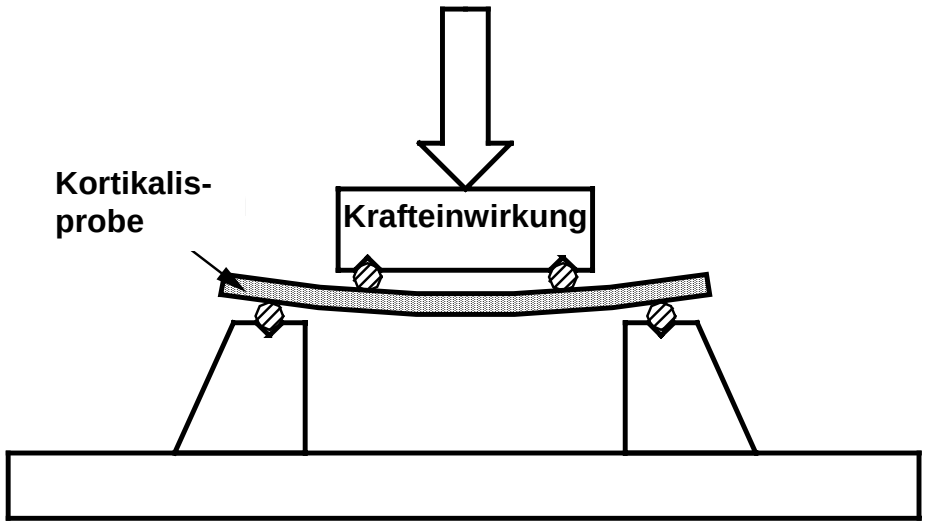


Abb. 3.18 Vier- Punkt- Biegung

Bis zum Bruch des Prüfstückes wurde die Kraft- Weg- Kurve aufgezeichnet und die maximale Kraft (MPa) und Steifigkeit (N/mm) bestimmt.

3.9 Statistik

Die Knochendichteverläufe wurden zwischen der behandelten und nicht behandelten Gruppe mit der Methode der ‘Repeated Measures Analysen’ (wiederholte Beobachtungen) verglichen (Morrison, 1976). Diese Methode trägt dem Umstand Rechnung, dass für den eigentlichen Gruppenvergleich das Tier und nicht der Zeitpunkt die statistische Einheit bildet.

Um zwischen den Gruppen Unterschiede zu erkennen, wurde der ‘between subjects error’, d.h. die Streuung zwischen den Gruppen untersucht.

Für Vergleiche zwischen den Untersuchungszeitpunkten und die Interaktion Zeit*Gruppe wurde die Streuung innerhalb der Tiere untersucht (=Within subjects error).

Falls eine signifikante Interaktion Zeit*Gruppe vorlag, konnten die weiteren Analysen getrennt nach Gruppen durchgeführt werden (Conover,1980): Mit dem Hotelling T2-Test (MANOVA) wurde dann geprüft, ob sich die Mittelwerte über die Zeit unterschieden.

Tests auf Unterschiede sowohl in der Knochendichte als auch in den mechanischen Tests, Mikro-Computertomographieergebnissen und den Knochenstoffwechselparametern wurden mit dem Wilcoxon-Test und T-Test

überprüft. Die Korrelationen wurden mit Hilfe des Pearson Korrelations Koeffizienten und dem Spearman Korrelations Koeffizienten errechnet.
Alle Analysen wurden mit der Software SAS (Version 6.12, 1999 ,SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt.

3.10 Studienprotokoll

Studienbeginnbeginn:

- Blutentnahme
- Urinprobengewinnung
- QCT
- Ovarektomie (OVX) bei Schafen der Gruppe 2
- Beckenkammbiopsie bei Schafen beider Gruppen
- zwischen Studienbeginn mit Operation und Versuchsbeginn vergingen zwei Wochen

Versuchsbeginn:

- Beginn der Glukokortikoidgabe (Methylprednisolon 120 mg i.m. wöchentlich in einer Lösung) und Diät bei Schafen der Gruppe 2
- Gruppenhaltung

4 Wochen nach Versuchsbeginn:

- Blutentnahme
- Urinprobengewinnung

6 Wochen nach Versuchsbeginn:

- QCT bei Schafen beider Gruppen

8 Wochen nach Versuchsbeginn:

- Blutentnahme
- Urinprobengewinnung

12 Wochen nach Versuchsbeginn:

- Blutentnahme

- Urinprobengewinnung

14 Wochen nach Versuchsbeginn:

- QCT bei Schafen beider Gruppen
- Erhöhung der Methylprednisolongabe auf 200 mg wöchentlich
- Schaf Nr. 844 wird aus der Studie ausgeschlossen, die Steroidegabe wird abgesetzt

16 Wochen nach Versuchsbeginn:

- Blutentnahme
- Urinprobengewinnung

20 Wochen nach Versuchsbeginn:

- Blutentnahme
- Urinprobengewinnung

22 Wochen nach Versuchsbeginn:

- QCT bei den behandelten Schafen (Gruppe 2)
- Änderung der Steroideapplikation: Gabe von 200 mg Methylprednisolon pro Woche in Form einer Kristallsuspension
- Schaf ID- Nr. 645 (Gruppe 2) stirbt im Anschluss an die Narkose an Herz-Kreislaufversagen
- Schaf ID- Nr. 770 (Gruppe 1) stirbt infolge einer Mesenterialstildrehung
- behandelte Schafe werden nicht mehr in der Gruppe, sondern in Einzelboxen gehalten

24 Wochen nach Versuchsbeginn:

- Blutentnahme
- Urinprobengewinnung

28 Wochen nach Versuchsbeginn:

- Blutentnahme
- Urinprobengewinnung

- Tötung der unbehandelten Schafe (ID- Nr.: 790, 803, 774, 712, 721, 767, 781)
- Tötung der behandelten Schafe (ID- Nr.: 852, 846, 732, 854, 556, 818, 817, (844))
- Die übrigen Schafe gehen in eine Folgestudie ein (ID- Nr.: 845, 711, 838, 786, 842, 599, 758, 744, 813, 743, 719, 772, 807, 819, 839)

Nach Tötung der Tiere:

- Präparation der Knochen
- QCT- Messung
- Entnahme von Biopsien aus Beckenkamm, Lendenwirbelkörper (L3 – L5), Femurkopf beidseits
- Mikro-CT-Messung
- Mechanische Testung (Kompression, Torsion, Vier- Punkt- Biegung)

4 Ergebnisse

4.1 Knochendichte mit der quantitativen Computertomographie

4.1.1 Knochendichte im Verlauf

Die Knochendichte wurde über einen Zeitraum von 28 Wochen bei Schafen der behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe bestimmt (siehe Text 3.5). Der Beginn der Messung war für alle Tiere im August und endete im März des folgenden Jahres. Die Knochendichte der behandelten Gruppe wurde fünfmal gemessen, die der Kontrollgruppe viermal.

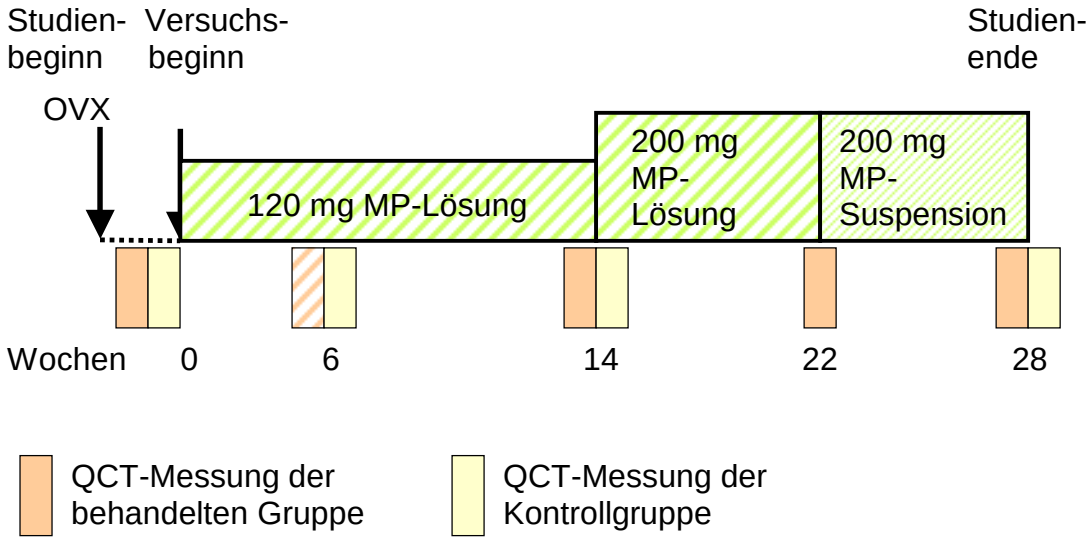


Abb. 4.1 Steroideapplikations- und QCT-Messungszeitpunkte

Messorte waren distaler Radius, distale Tibia und der Calcaneus auf beiden Seiten.

Bei den behandelten Tieren war der erste Messzeitpunkt nach Ovarektomie. Dann folgten die Verlaufsmessungen nach sechs, 14, 22 und 28 Wochen. Im folgenden Text wird die Knochendichte zum Zeitpunkt der Sechswochenmessung nicht angegeben. Der Grund dafür ist, dass das Behandlungsschema nach 14 und 22 Wochen umgestellt wurde und Veränderungen in dem Zusammenhang klar dargestellt werden sollen.

Die Knochendichten der Kontrolltiere wurden nach Beckenkammbiopsie-entnahme, nach weiteren sechs und 14 Wochen und zuletzt nach 28 Wochen bestimmt.
Am Radius ist ausschliesslich die Dichte der Spongiosa ermittelt worden. An der Tibia wurden getrennt die Spongiosa- und Kortikalisdichten ermittelt und am Calcaneus wurde die Knochendichte von Spongiosa und Kortikalis zusammen gemessen.
Am distalen Radius ist die Kortikalis so dünn, dass eine exakte Abgrenzung zwischen Kortikalis und Spongiosa nicht immer möglich ist. Somit wurde die Erfassung der Knochendichte auf die Messung der Spongiosa beschränkt. Es wurden die inneren 50 % der Fläche eines Knochenschnittes ermittelt.
An der distalen Tibia können beide Knochengewebe exakt abgegrenzt werden. Bei gewährleisteter Reproduzierbarkeit erfolgte eine getrennte Auswertung.
Am Calcaneus wurden die Spongiosa- und Kortikalisdichten miteinander erfasst. Der Grund bestand ebenfalls in der fehlenden Reproduzierbarkeit, hätte man die Knochengewebe zur Auswertung trennen wollen.
Die Ergebnisse der Knochendichten der rechten und linken Extremitäten sind nach den Messungen gemittelt worden.

1. Radius:

Die Knochendichte am Radius nahm bei den Tieren der behandelten Gruppe nach einer Induktion mit 120 mg Methylprednisolonlösung pro Woche im Zeitraum von 14 Wochen um 9,7 ± 3,5 % ab. In den folgenden acht Wochen wurden wöchentlich 200 mg der Methylprednisolonlösung gegeben. Dabei sank die Knochendichte um weitere 7,2 % auf –16,9 ± 4,6 %. In den letzten sechs Wochen reduzierte sich die Knochendichte nach Umstellung des Steroids auf eine Kristallsuspension bei einer Gabe von 200 mg pro Woche um weitere 19 % auf -35,9 ± 3,2 %. Die Unterschiede zwischen der Knochendichte am Radius zu Beginn der Studie und am Ende waren hoch signifikant ($p<0,0001$).

Tab. 4.1 BMD (g/cm^3) Radius, Spongiosa, behandelte Gruppe

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Beginn	0.596	0.052	0.415	0.784
Nach 14 Wochen	0.538	0.055	0.326	0.737
Nach 22 Wochen	0.495	0.053	0.326	0.687
Nach 28 Wochen	0.382	0.054	0.229	0.609

In der Gruppe der Kontrolltiere änderten sich die Knochendichten innerhalb der ersten sechs Wochen um -0,8 ± 2 %. Bei der folgenden Messung wurden um 1,0 % niedrigere Werte gemessen. Zu diesem Zeitpunkt war die Knochendichte um 1,8 ± 1,5 % reduziert. Am Ende der Studie war die Knochendichte im Vergleich zum Beginn der Studie um 1,8 ± 1,3 % niedriger. Die Änderungen waren nicht signifikant.

Tab. 4.2 BMD (g/cm^3) Radius, Spongiosa, Kontrollgruppe

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Beginn	0.625	0.031	0.523	0.746
Nach 6 Wochen	0.620	0.033	0.538	0.742
Nach 14 Wochen	0.614	0.029	0.543	0.730
Nach 28 Wochen	0.614	0.032	0.529	0.741

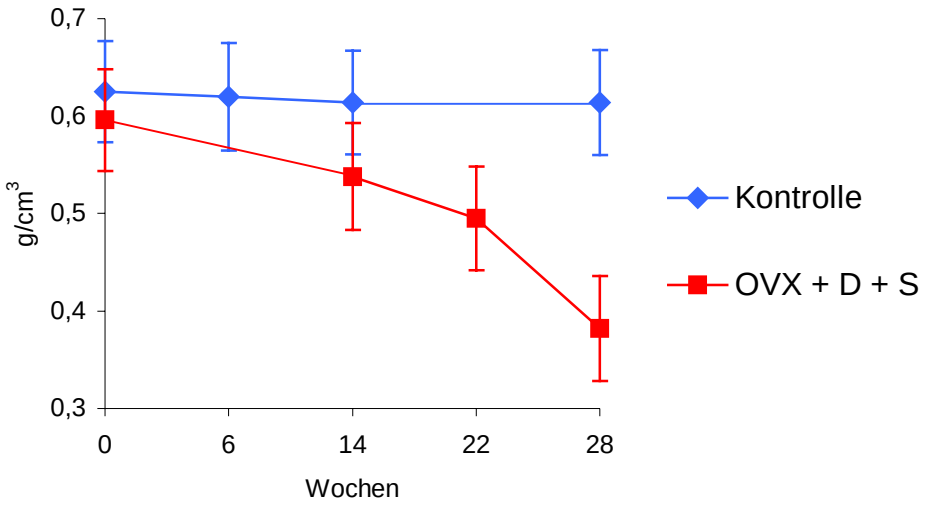


Abb. 4.2 Knochendichteverlauf Radius: Spongiosa

2. Tibia:

Der trabekuläre Anteil der Tibia reduzierte sich bei den behandelten Schafen in den ersten 14 Wochen um 13,6 ± 4,3 %. Die nächsten acht Wochen der Behandlung liessen die Knochendichte um weitere 4,2 % auf -17,8 ± 4,8 % sinken. Unter der Behandlung mit 200 mg Methylprednisolon als Suspension reduzierte sich die gemessene Knochendichte weiter um 20,7 % auf letztlich -38,5 ± 3,7 %. Die Unterschiede im Verlauf der Messungen waren signifikant ($p<0,0001$).

Tab. 4.3 BMD (g/cm^3) Tibia, Spongiosa, behandelte Gruppe

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Beginn	0.478	0.078	0.266	0.834
Nach 14 Wochen	0.413	0.081	0.212	0.767
Nach 22 Wochen	0.393	0.077	0.207	0.728
Nach 28 Wochen	0.294	0.061	0.128	0.523

An der Kortikalis waren die Knochendichteveränderungen nicht signifikant. Nach 14 Wochen wurde eine Zunahme der Knochendichte um 0,4 ± 1,1 % ermittelt. In den weiteren acht Wochen reduzierte sich die Knochendichte um 0,5 % auf -0,1 ± 0,9 %. Letztlich sank die Dichte nach 28 Wochen auf -2,0 ± 1,6 %.

Tab. 4.4 BMD (g/cm^3) Tibia, Kortikalis, behandelte Gruppe

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Beginn	1.648	0.028	1.590	1.698
Nach 14 Wochen	1.657	0.024	1.597	1.695
Nach 22 Wochen	1.647	0.024	1.600	1.679
Nach 28 Wochen	1.614	0.036	1.543	1.658

An der Tibia der Kontrolltiere änderte sich die Knochendichte des spongiösen Knochens nicht signifikant. Zunächst sank die Dichte um 1,7 ± 1,8 %. Bis zur nächsten Messung fiel sie weiter auf –2,6 ± 1,6 %. Bis zur letzten Messung stieg die Dichte wieder auf +3,5 ± 2,2 % an.

Tab. 4.5 BMD (g/cm^3) Tibia, Spongiosa, Kontrollgruppe

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Beginn	0.462	0.125	0.134	0.988
Nach 6 Wochen	0.454	0.124	0.114	0.938
Nach 14 Wochen	0.450	0.125	0.117	0.945
Nach 28 Wochen	0.478	0.129	0.266	1,007

Am kortikalen Anteil der Tibia wurde eine kontinuierliche Zunahme der Knochendichte gesehen. Sie nahm zunächst um 0,2 ± 0,9 % zu. Bis zur nächsten Messung war die Knochendichte im Vergleich zum Ausgangswert um 0,4 ± 0,9 % angestiegen. Zuletzt lag sie um 1,1 ± 1,8 % über der Knochendichte zu Beginn der Untersuchung. Die Änderungen waren nicht signifikant.

Tab. 4.6 BMD (g/cm^3) Tibia, Kortikalis, Kontrollgruppe

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Beginn	1.615	0.059	1.494	1.691
Nach 6 Wochen	1.618	0.052	1.524	1.699
Nach 14 Wochen	1.621	0.051	1.529	1.694
Nach 28 Wochen	1.632	0.042	1.567	1.706

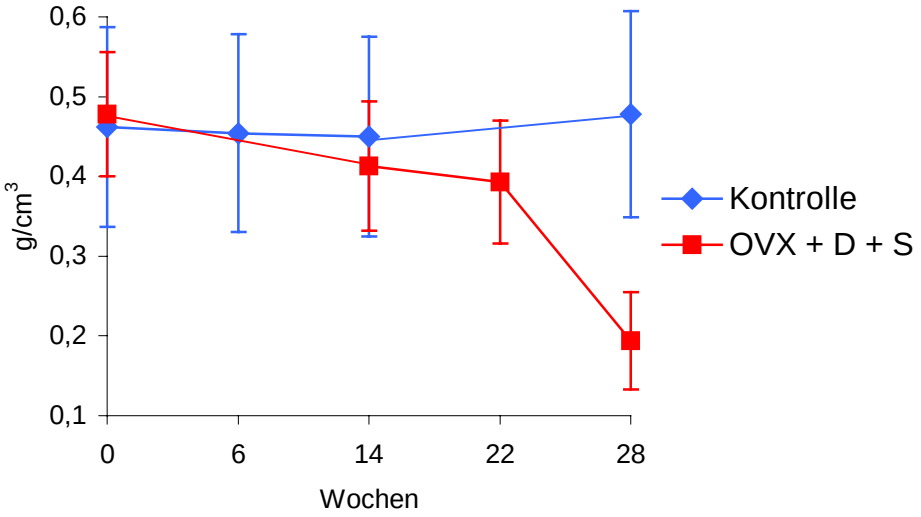


Abb. 4.3a Knochendichteverlauf Tibia: Spongiosa

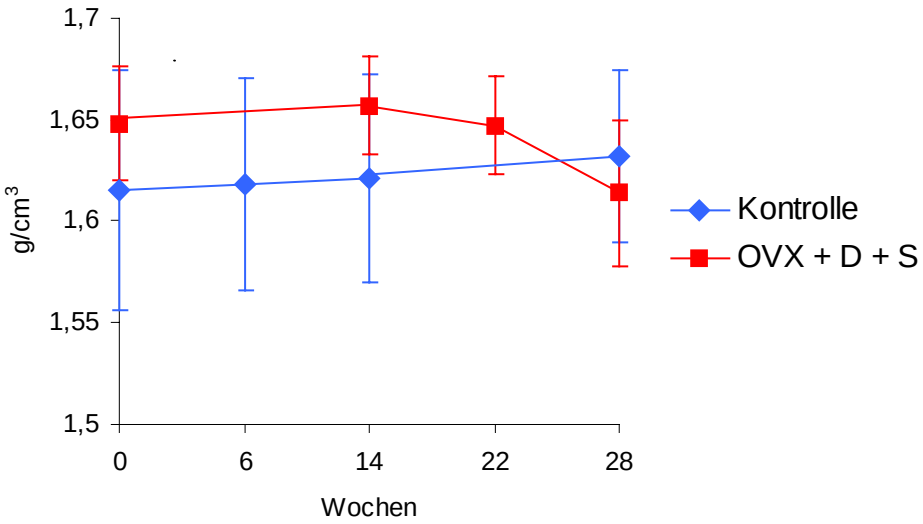


Abb. 4.3b Knochendichteverlauf Tibia: Kortikalis

3. Calcaneus:

Die Knochendichteveränderungen waren bei den Tieren der behandelten Gruppe signifikant ($p<0,0001$). In den ersten 14 Wochen sank die Dichte um 4,2 ± 2,4 %. In den folgenden zwei Monaten reduzierten sich die Werte um weitere 2 % auf -6,2 ± 3,6 %. Am Ende der Studie wurde eine Reduzierung der Knochendichte von 16,1 ± 3,2 % ermittelt.

Tab. 4.7 BMD (g/cm^3) Calcaneus, Spongiosa und Kortikalis, behandelte Gruppe

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Beginn	1.080	0.106	0.796	1.270
Nach 14 Wochen	1.035	0.099	0.771	1.153
Nach 22 Wochen	1.016	0.105	0.753	1.141
Nach 28 Wochen	0.916	0.103	0.646	1.132

Bei den Kontrolltieren sank die Knochendichte am Calcaneus zunächst auf -0,6 ± 1,8 % und weiter nach 14 Wochen auf -0,9 ± 1,8 %. Am Ende lag die Knochendichte -0,1 ± 1,6 % unter dem Ausgangswert. Diese Änderungen waren nicht signifikant.

Tab. 4.8 BMD (g/cm^3) Calcaneus, Spongiosa und Kortikalis, Kontrollgruppe

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Beginn	1.078	0.050	0.978	1.161
Nach 6 Wochen	1.068	0.053	0.978	1.147
Nach 14 Wochen	1.067	0.051	0.969	1.147
Nach 28 Wochen	1.073	0.051	0.977	1.137

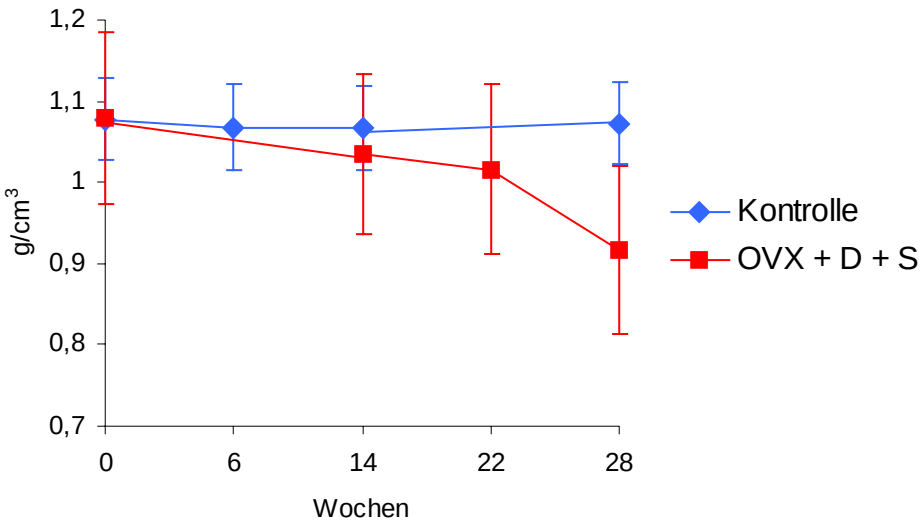


Abb. 4.4 Knochendichteverlauf Calcaneus: Spongiosa und Kortikalis

Zusammenfassend kann man in Bezug auf Veränderungen der Knochendichte nach Osteoporoseinduktion über sieben Monate folgende Aussagen machen:
Es existierten zwischen den osteoporotischen und nicht osteoporotischen Gruppen hoch signifikante Unterschiede am Radius ($p<0,00001$) und Calcaneus ($p<0,00001$), signifikante Unterschiede an der spongiösen Tibia ($p<0,02$) und keine signifikanten Unterschiede am kortikalen Anteil der Tibia ($p<0,21$).

Knochendichteverlauf über die Zeit von sieben Monaten in der Kontrollgruppe (Gruppe 1) und der behandelten Gruppe (Gruppe 2):

Tab. 4.9 BMD Radius, Spongiosa

Gruppe1	Mittelwert (%)	Standard-abweichung	Gruppe2	Mittelwert (%)	Standard-abweichung
Beginn	0	0	Beginn	0	0
Nach 6 Wochen	-0.8	2.0	Nach 6 Wochen	-7.5	2.2
Nach 14 Wochen	-1.8	1.5	Nach 14 Wochen	-9.7	3.5
			Nach 22 Wochen	-16.9	4.6
Nach 28 Wochen	-1.8	1.3	Nach 28 Wochen	-35.9	3.2

Tab. 4.10 BMD Tibia, Spongiosa

Gruppe1	Mittelwert (%)	Standard-abweichung	Gruppe2	Mittelwert (%)	Standard-abweichung
Beginn	0	0	Beginn	0	0
Nach 6 Wochen	-1.7	1.8	Nach 6 Wochen	-8.0	3.4
Nach 14 Wochen	-2.6	1.6	Nach 14 Wochen	-13.6	4.3
			Nach 22 Wochen	-17.8	4.8
Nach 28 Wochen	+3.5	2.2	Nach 28 Wochen	-38.5	3.7

Tab. 4.11 BMD Tibia, Kortikalis

Gruppe1	Mittelwert (%)	Standard-abweichung	Gruppe2	Mittelwert (%)	Standard-abweichung
Beginn	0	0	Beginn	0	0
Nach 6 Wochen	+0.2	0.9	Nach 6 Wochen	+0.4	1.5
Nach 14 Wochen	+0.4	0.9	Nach 14 Wochen	+0.4	1.1
			Nach 22 Wochen	-0.1	0.9
Nach 28 Wochen	+1.1	1.8	Nach 28 Wochen	-2.0	1.6

Tab. 4.12 BMD Calcaneus, Spongiosa und Kortikalis

Gruppe1	Mittelwert (%)	Standard-abweichung	Gruppe2	Mittelwert (%)	Standard-abweichung
Beginn	0	0	Beginn	0	0
Nach 6 Wochen	-0.6	1.8	Nach 6 Wochen	-3.8	2.7
Nach 14 Wochen	-0.9	1.8	Nach 14 Wochen	-4.2	2.4
			Nach 22 Wochen	-6.2	3.6
Nach 28 Wochen	-0.1	1.6	Nach 28 Wochen	-16.1	3.2

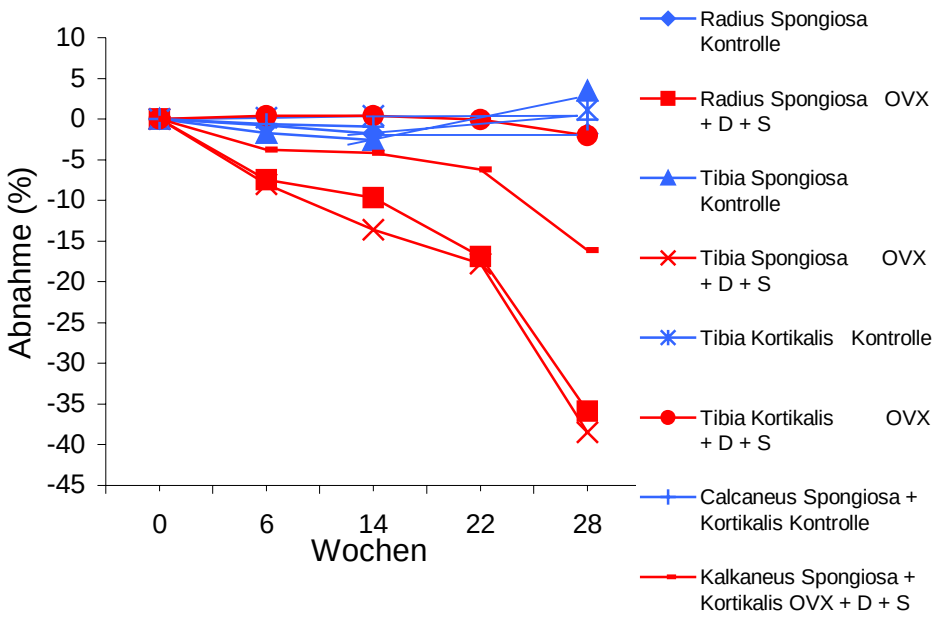


Abb. 4.5 Knochendichteverlauf über 28 Wochen

4.1.2 Knochendichte nach sieben Monaten

Nach 28 Wochen Osteoporoseinduktion wurden die Knochendichten der osteoporotischen Gruppe und der Kontrollgruppe verglichen. Dazu wurde nach Euthanasie die Knochendichtemessung der kompletten Radii, Humeri, Tibiae, Femura und Lendenwirbelkörper L3 - L5 durchgeführt (siehe Text 3.5). Es wurden Mittelwerte der Knochendichten der rechten und linken Seite gebildet.

Signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen den behandelten Tieren und der Kontrollgruppe im kortikalen Anteil des Radius und Humerus, sowie im spongiösen Anteil der Lendenwirbelkörper.

Die kortikale Knochendichte des Radius lag am Ende der Studie in der behandelten Gruppe bei 1,81 ± 0,04 g/cm^3, in der Kontrollgruppe im Mittel bei 1,85 ± 0,02 g/cm^3. Damit lag die Knochendichte bei den behandelten Tieren signifikant um 2,3 % niedriger als in der Kontrollgruppe ($p<0,01$).

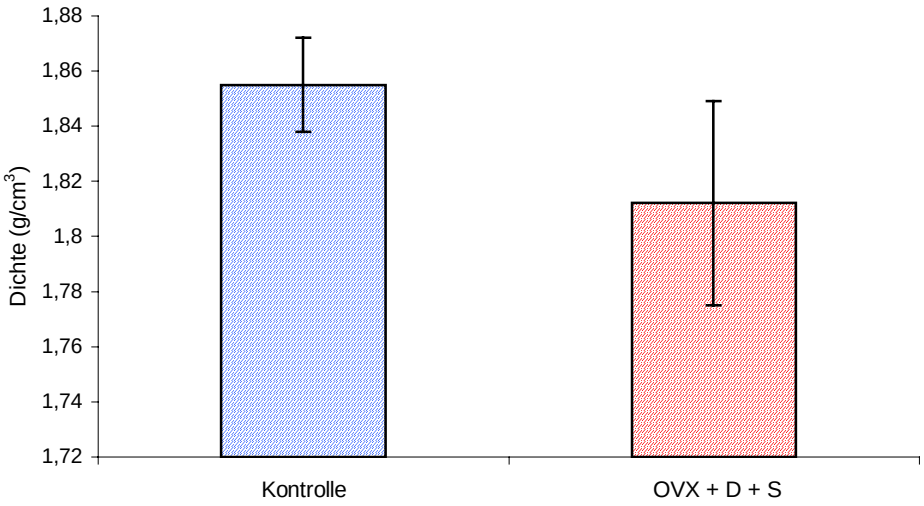


Abb. 4.6 BMD Radius nach 28 Wochen: Kortikaler Knochen

Die Kortikalisdichte des Humerus in der behandelten Gruppe lag bei 1,86 ± 0,04 g/cm^3. In der unbehandelten Gruppe lag die Dichte bei 1,90 ± 0,03 g/cm^3. Die Knochendichte in der behandelten Gruppe war signifikant um 2,8 % niedriger als in der Kontrollgruppe ($p<0,005$).

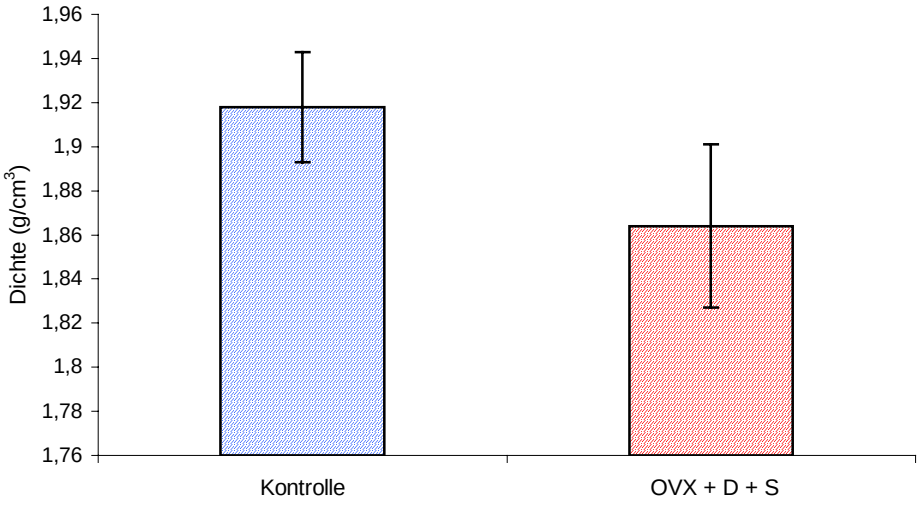


Abb. 4.7 BMD Humerus nach 28 Wochen: Kortikaler Knochen

Die Dichten der Spongiosa lagen in der Gruppe der behandelten Tiere am Lendenwirbelkörper L3 bei 0,56 ± 0,05 g/cm^3, am Wirbelkörper L4 bei 0,55 ± 0,06 g/cm^3 und am Wirbelkörper L5 bei 0,54 ± 0,05 g/cm^3. Bei den Kontrolltieren wurde am Wirbelkörper L3 eine Knochendichte von 0,62 ±

0,07 g/cm^3, am Wirbelkörper L4 von 0,63 ± 0,06 g/cm^3 und am Wirbelkörper L5 von 0,62 ± 0,06 g/cm^3 gemessen. Im Mittel lag die Knochendichte der Spongiosa von L3, L4 und L5 der behandelten Tiere um 10,3 %, 12,8 % und 12,1 % unter der Kontrollgruppe. Die Unterschiede waren signifikant (L3: p<0,04; L4: p<0,01; L5: p<0,02).

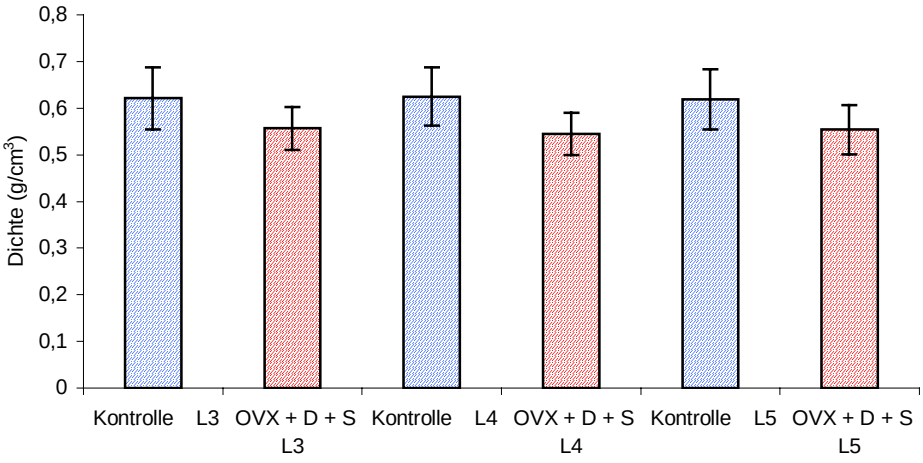


Abb. 4.8 BMD L3, L4, L5 nach 28 Wochen: Trabekulärer Knochen

Die trabekuläre Knochendichte von Radius (p<0,46), Humerus (p<0,92), Tibia (p<0,41) und Femur (p<0,06), sowie die kortikalen Knochendichten von Tibia (p<0,62) und Femur (p<0,05) ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen der behandelten und unbehandelten Gruppe.

Tab. 4.13 BMD (g/cm^3) nach 28 Wochen

Radius Spongiosa	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	0.048	0.016	0.033	0.082
OVX + D + S	0.055	0.021	0.033	0.091
Radius Kortikalis	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	1.854	0.017	1.833	1.878
OVX + D + S	1.812	0.037	1.748	1.748
Humerus Spongiosa	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	0.069	0.027	0.030	0.117
OVX + D + S	0.068	0.024	0.043	0.113
Humerus Kortikalis	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	1.918	0.025	1.889	1.966
OVX + D + S	1.864	0.037	1.814	1.912

Tab. 4.13 BMD (g/cm^3) nach 28 Wochen

Tibia Spongiosa	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	0.022	0.010	0.012	0.041
OVX + D + S	0.031	0.027	0.011	0.096
Tibia Kortikalis	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	1.896	0.024	1.860	1.937
OVX + D + S	1.885	0.057	1.818	1.978
Femur Spongiosa	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	0.022	0.012	0.004	0.039
OVX + D + S	0.047	0.034	0.018	0.118
Femur Kortikalis	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	1.952	0.036	1.896	2.018
OVX + D + S	1.917	0.030	1.865	1.956
L3	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	0.621	0.066	0.538	0.755
OVX + D + S	0.557	0.046	0.493	0.627
L4	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	0.625	0.063	0.552	0.750
OVX + D + S	0.545	0.045	0.481	0.617
L5	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	0.619	0.064	0.535	0.727
OVX + D + S	0.544	0.053	0.461	0.632

4.2 Strukturanalyse mit der Mikro-Computertomographie

4.2.1 Knochenstrukturanalyse der Beckenkammbiopsien zu Beginn der Studie und nach sieben Monaten

Verschiedene Strukturparameter wurden mit Hilfe der Mikro-Computertomographie ermittelt. Zu Beginn der Studie und am Ende wurde eine Beckenkammbiopsie entnommen. Zwischen den behandelten und unbehandelten Tieren gab es zum Ausgangszeitpunkt keine signifikanten Unterschiede ($p<0,05$).

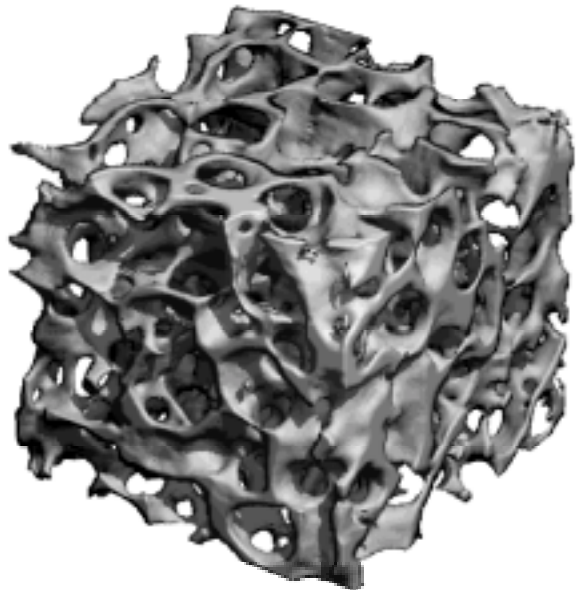


Abb. 4.9 Mikro-CT
Beckenkamm Kontrollgruppe
(Schaf ID- Nr.: 711)

Tb.N 1.76 /mm
Tb.Th 0.11 mm
Tb.Sp 0.46 mm
BV/TV 0.19

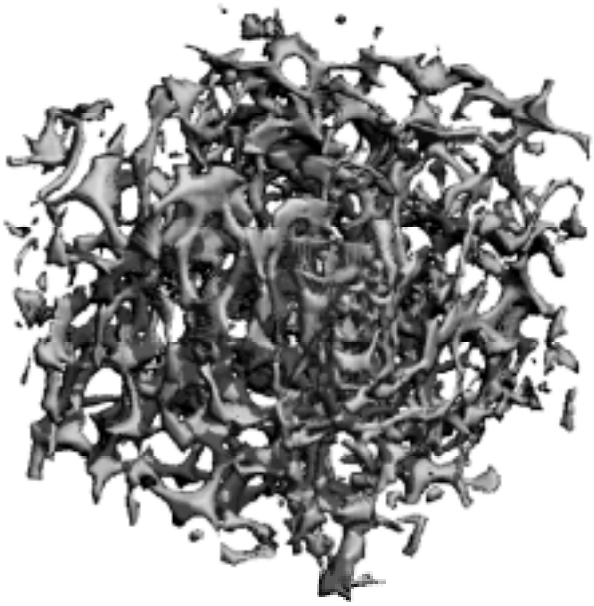


Abb. 4.10 Mikro-CT
Beckenkamm OVX + D + S
(Schaf ID- Nr.: 846)

Tb.N 0.91 /mm
Tb.Th 0.05 mm
Tb.Sp 1.04 mm
BV/TV 0.05

Bei den unbehandelten Tieren nahm das Verhältnis von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen innerhalb der sieben Monate um 5,5 ± 27,8 % zu. Das Verhältnis von Knochenoberfläche zu Knochenvolumen nahm im Verlauf um 7,5 ± 25,6 % ab. Die Trabekelanzahl nahm um 7,4 ± 14.6 % ab. Die Trabekeldicke nahm um 15,9 ± 33,0 % zu und der Abstand der Trabekel zueinander nahm um 8,9 ± 17.5 % zu. Die Anisotropie nahm um 13,1 ± 29,8 % zu.
Die Unterschiede waren nicht signifikant ($p<0,05$).

Zwischen den behandelten Tieren und der Kontrollgruppe bestanden am Ende der Studie bei allen Strukturparametern mit Ausnahme der Anisotropie signifikante Unterschiede (BV/TV: $p<0,002$;. BS/BV: $p<0,0006$; Tb.N: $p<0,003$; Tb.Th: $p<0,001$; Tb.Sp: 0,0007).
Innerhalb der Gruppe der behandelten Tiere nahm im Verlauf der Studie das Verhältnis von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen signifikant ($p<0,0008$) um 42,2 ± 15,7 % ab. Das Verhältnis von Knochenoberfläche zu Knochenvolumen nahm signifikant ($p<0,002$) um 50,6 ± 37,7 % zu. Die Trabekelanzahl reduzierte sich nicht signifikant ($p<0,18$) um 17,0 ± 13,1 %. Signifikant ($p<0,002$) nahm die Trabekeldicke um 30,4 ± 15,1 % ab. Der Abstand der einzelnen Trabekel untereinander nahm signifikant ($p<0,03$) um 34,6 ± 25,7 % zu.

Tab. 4.14 Deskriptive Statistik Mikro-CT vom Beckenkamm

	Kontrolle	Mittelwert	Standard-abweichung	Minimum	Maximum
Beginn	BV/TV (%)	0.19	0.06	0.10	0.39
	BS/BV (1/mm)	18.6	3.94	10.7	28.9
	Tb.N (/mm)	1.60	0.27	1.06	2.09
	Tb.Th (mm)	0.11	0.03	0.07	0.19
	Tb.Sp (mm)	0.51	0.11	0.29	0.78
	DA	1.70	0.31	1.30	2.61
Nach 28 Wochen	BV/TV (%)	0.21	0.09	0.11	0.40
	BS/BV (1/mm)	17.0	5.95	7.55	23.3
	Tb.N (/mm)	1.56	0.22	1.32	1.91
	Tb.Th (mm)	0.14	0.06	0.09	0.26
	Tb.Sp (mm)	0.52	0.10	0.39	0.67
	DA	1.90	0.58	1.22	3.07

Tab. 4.14 Deskriptive Statistik Mikro-CT vom Beckenkamm

	OVX + D + S	Mittelwert	Standard-abweichung	Minimum	Maximum
Beginn	BV/TV (%)	0.16	0.06	0.11	0.28
	BS/BV (1/mm)	19.9	5.15	10.4	26.9
	Tb.N (/mm)	1.49	0.15	1.24	1.76
	Tb.Th (mm)	0.11	0.04	0.07	0.19
	Tb.Sp (mm)	0.57	0.08	0.45	0.69
	DA	1.54	0.40	1.19	2.81
Nach 28 Wochen	BV/TV (%)	0.09	0.02	0.05	0.12
	BS/BV (1/mm)	29.2	5.17	22.2	36.4
	Tb.N (/mm)	1.21	0.17	0.91	1.46
	Tb.Th (mm)	0.07	0.01	0.05	0.09
	Tb.Sp (mm)	0.77	0.13	0.61	1.04
	DA	1.45	0.21	1.21	1.86

Tab. 4.15 Deskriptive Statistik Mikro-CT vom Beckenkamm: relative Unterschiede zwischen dem Beginn und dem Ende der Studie

Kontrolle	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	Minimum	Maximum
BV/TV (%)	+5.47	27.81	-22.52	48.65
BS/BV(1/mm)	-7.50	25.61	-41.03	33.91
Tb.N (/mm)	-7.38	14.60	-27.12	21.84
Tb.Th (mm)	+15.92	33.04	-25.31	69.70
Tb.Sp (mm)	+8.88	17.46	-16.17	34.42
DA	+13.14	29.75	-38.41	62.87
OVX + D + S	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	Minimum	Maximum
BV/TV (%)	-42.18	15.69	-63.52	-17.75
BS/BV(1/mm)	+50.56	37.70	7.65	122.56
Tb.N (/mm)	-16.98	13.10	-38.57	-0.96
Tb.Th (mm)	-30.38	15.09	-55.08	-7.20
Tb.Sp (mm)	+34.55	25.71	10.45	75.71
DA	-4.27	27.37	-51.16	32.21

4.2.2 Knochenstrukturanalyse der Wirbelkörperbiopsien nach sieben Monaten

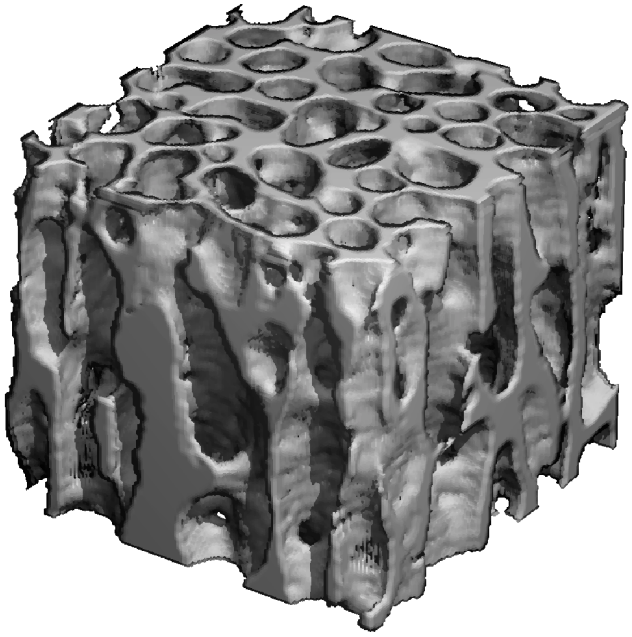


Abb. 4.11 Mikro-CT
L5 Kontrollgruppe
(Schaf ID- Nr.: 803)

Tb.N 2.06 /mm
Tb.Th 0.22 mm
Tb.Sp 0.27 mm
BV/TV 0.45

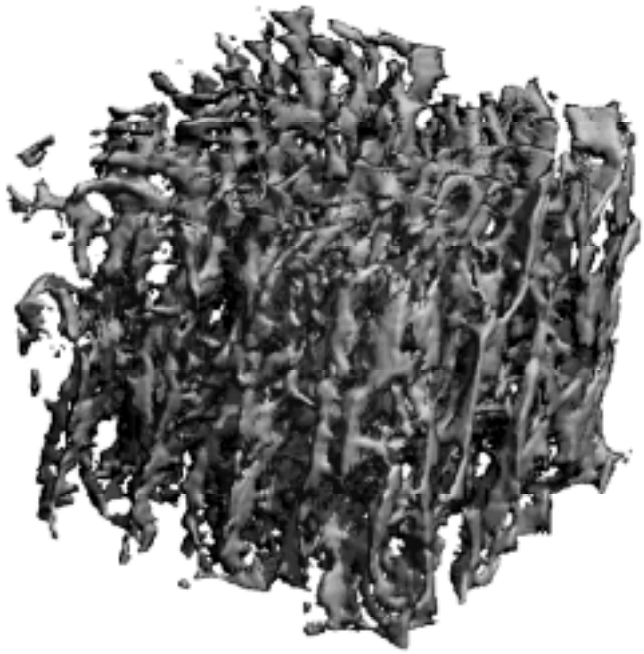


Abb. 4.12 Mikro-CT
L5 OVX + D + S
(Schaf ID- Nr.: 846)

Tb.N 1.48 /mm
Tb.Th 0.05 mm
Tb.Sp 0.62 mm
BV/TV 0.08

Um mögliche Unterschiede der Strukturparameter an den Lendenwirbelkörpern festzustellen, wurden die Parameter der unbehandelten Schafe mit denen der behandelten Schafe nach Euthanasie verglichen. Die Ergebnisse wiesen zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf (BV/TV: $p<0,08$;. BS/BV: $p<0,06$; Tb.N: $p<0,6$; Tb.Th: $p<0,1$; Tb.Sp: 0,2).

Tab. 4.16 Deskriptive Statistik Mikro-CT von L5

Kontrolle	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
BV/TV (%)	0.27	0.09	0.19	0.46
BS/BV(1/mm)	14.90	6.63	0.92	21.79
Tb.N (/mm)	2.00	0.11	1.81	2.12
Tb.Th (mm)	0.13	0.04	0.09	0.22
Tb.Sp (mm)	0.37	0.06	0.26	0.43
DA	2.59	0.30	1.98	2.83
OVX + D + S	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
BV/TV (%)	0.19	0.07	0.08	0.27
BS/BV(1/mm)	22.54	7.69	11.82	37.06
Tb.N (/mm)	1.94	0.31	1.48	2.27
Tb.Th (mm)	0.10	0.04	0.05	0.17
Tb.Sp (mm)	0.43	0.10	0.32	0.62
DA	2.34	0.41	1.62	2.85

4.2.3 Knochenstrukturanalyse der Femurkopfbiopsien nach sieben Monaten

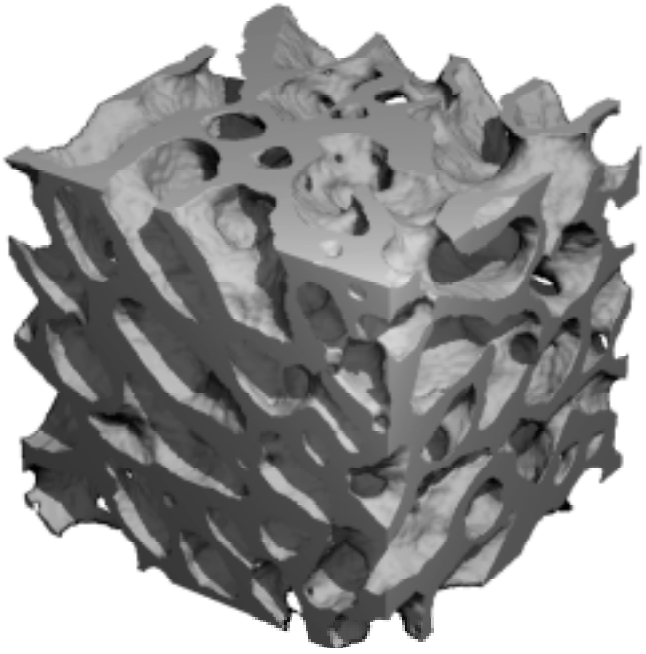


Abb. 4.13 Mikro-CT
Femurkopf Kontrollgruppe
(Schaf ID- Nr.: 803)

Tb.N 1.82 /mm
Tb.Th 0.17 mm
Tb.Sp 0.38 mm
BV/TV 0.31

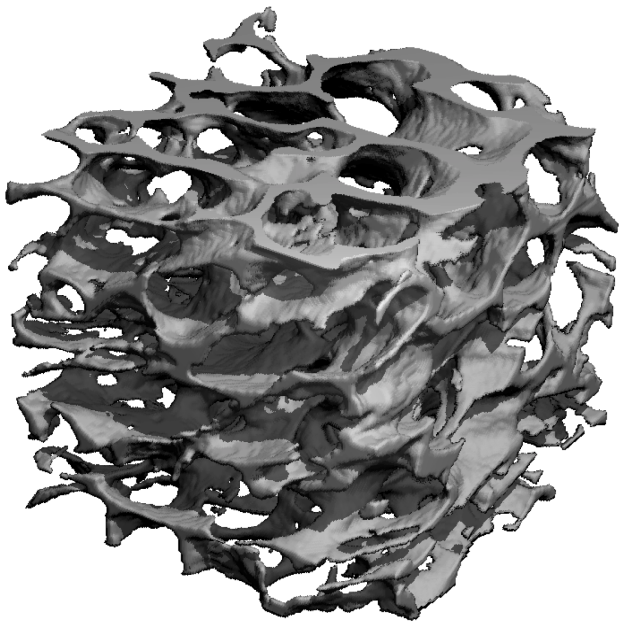


Abb. 4.14 Mikro-CT
Femurkopf OVX + D + S
(Schaf ID- Nr.: 846)

Tb.N 1.81 /mm
Tb.Th 0.13 mm
Tb.Sp 0.43 mm
BV/TV 0.23

Der Vergleich von Strukturparametern an Femurkopfbiopsien am Ende der Studie zwischen der unbehandelten und behandelten Gruppe zeigten signifikante Unterschiede für das Verhältnis Knochenvolumen zu Gesamtvolumen ($p<0,004$), sowie für das Verhältnis Knochenoberfäche zum Knochenvolumen ($p<0,0006$) und für die Trabekeldicke ($p<0,0005$). Im Vergleich zwischen den unbehandelten Schafen und den behandelten

Schafen nahm das Verhältnis Knochenvolumen zu Gesamtvolumen um 25,8 ± 0,7 % ab, die Knochenoberfläche zum Knochenvolumen nahm um 35,2 ± 5,8 % zu und die Trabekeldicke nahm um 23,5 ± 0,3 % ab.

Nicht signifikant änderten sich Tb.N ($p<0,9$), Th.Sp ($p<0,2$) und die Anisotropie ($p<0,8$).

Tab. 4.17 Deskriptive Statistik Mikro-CT vom Femurkopf

Kontrolle	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
BV/TV (%)	0.31	0.03	0.25	0.34
BS/BV(1/mm)	11.89	0.89	10.35	13.01
Tb.N (/mm)	1.82	0.19	1.59	2.09
Tb.Th (mm)	0.17	0.01	0.15	0.19
Tb.Sp (mm)	0.38	0.06	0.32	0.47
DA	1.64	0.25	1.40	1.99
OVX + D + S	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
BV/TV (%)	0.23	0.06	0.17	0.35
BS/BV(1/mm)	16.07	2.55	11.58	19.54
Tb.N (/mm)	1.81	0.19	1.45	2.03
Tb.Th (mm)	0.13	0.02	0.10	0.17
Tb.Sp (mm)	0.43	0.07	0.32	0.55
DA	1.61	0.23	1.34	2.10

4.3 Mechanische Testung

4.3.1 Kompressionstest von Wirbelkörper- und Femurkopfbiopsien

Am Ende der Studie wurden an den Wirbelkörperbiopsien L3 und L4 Kompressionstests durchgeführt, um mögliche Unterschiede zwischen den unbehandelten und behandelten Tieren untersuchen zu können (siehe Text 3.8.1). Die Versagenslast wurde bis zum Bruch des Knochens aufgezeigt. Daneben wurde die Steifigkeit bestimmt.

Zwischen den beiden Gruppen waren signifikante Unterschiede zu erkennen (L3 Versagenslast: $p<0,002$; L3 Steifigkeit: $p<0,002$; L4 Versagenslast: $p<0,003$; L4 Steifigkeit: $p<0,007$). In der behandelten Gruppe war die Versagenslast am Lendenwirbelkörper L3 um 41,3 % und am Lendenwirbelkörper L4 um 39,4 % niedriger als in der Gruppe der unbehandelten Schafe. Die Steifigkeit war in der Gruppe der behandelten Tiere am Lendenwirbelkörper L3 um 25,8 % und am Lendenwirbelkörper L4 um 20,6 % niedriger, als in der Kontrollgruppe.

Tab. 4.18 Kompressionstest L3, L4

L3 Versagenslast (kN)	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	3.17	0.84	2.45	5.10
OVX + D + S	1.86	0.60	0.99	2.65
L3 Steifigkeit (N/mm)	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	8104.8	913.1	6758.9	9863.5
OVX + D + S	6010.4	1322.5	3842.4	8099.3
L4 Versagenslast (kN)	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	2.97	0.82	1.96	4.21
OVX + D + S	1.80	0.49	1.10	2.41
L4 Steifigkeit (N/mm)	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	7760.6	984.5	5611.8	8714.8
OVX + D + S	6162.5	1060.4	5059.1	8437.3

Die Kompressionstests der Spongiosa der Femurkopfbiopsien wiesen nur im Verhalten der Steifigkeit ($p<0,03$) signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf. Sie war bei den behandelten Tieren um 35,0 % geringer als in der behandelten Gruppe.

Die Ergebnisse der Versagenslast unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p<0,07$).

Tab. 4.19 Kompressionstest Femurkopf

Fk Versagenslast (kN)	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	1.68	0.95	1.04	3.92
OVX + D + S	0.99	0.38	0.37	1.53
Fk Steifigkeit (N/mm)	**Mittelwert**	**Standardabweichung**	**Minimum**	**Maximum**
Kontrolle	5556.4	1855.6	3500.1	9790.0
OVX + D + S	3611.0	1350.7	1709.2	5927.7

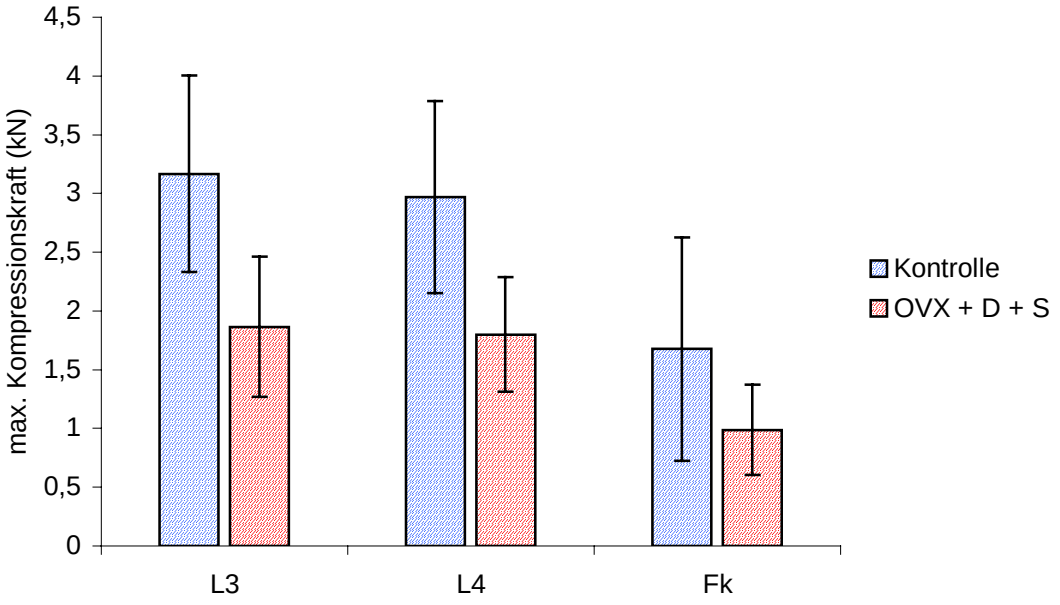


Abb. 4.15a Kompressionstest L3, L4, Fk: max. Kompressionskraft

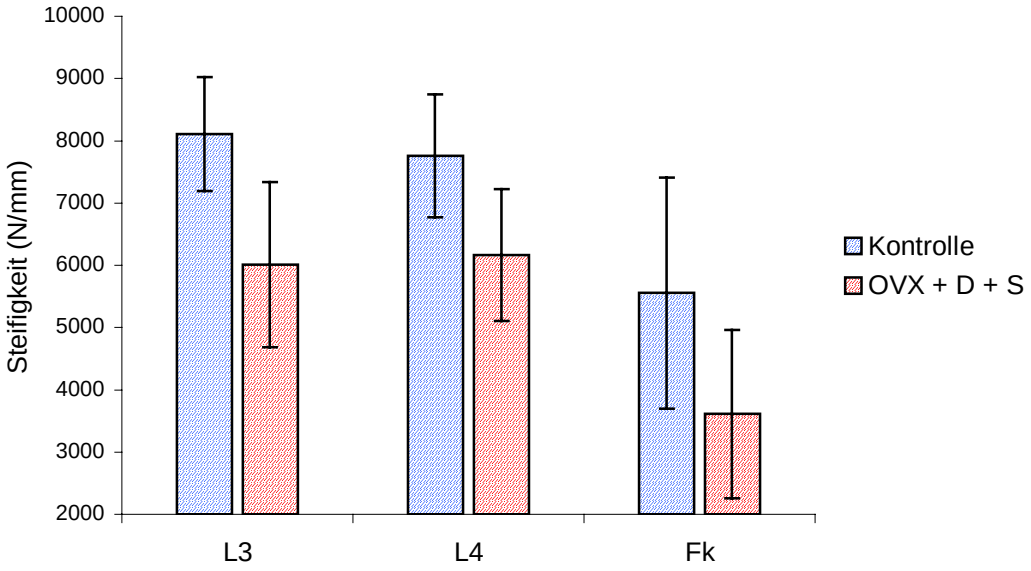


Abb. 4.15b Kompressionstest L3, L4, Fk: Steifigkeit

4.3.2 Torsionstest der Tibia

Der Torsionstest wurde jeweils an der rechten und linken Tibia durchgeführt. Die Auswertung basierte auf gemittelten Werten innerhalb der jeweiligen Gruppen.

Das Drehmoment, das bis zum Bruch der Tibia benötigt wurde, lag bei den osteoporotischen Knochen um 10,7 % niedriger als in der Kontrollgruppe. Der Winkel, der bis zum Bruch des Knochens überwunden wurde, lag in der behandelten Gruppe 8 % unter dem der Kontrollgruppe. Die Unterschiede im mechanischen Verhalten der Tibiae waren nicht signifikant.

Tab. 4.20 Torsionstest L3, L4

Drehmoment (kN)	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	86.8	3.3	69.7	97.9
OVX + D + S	77.5	5.2	55.3	98.2
Bruchwinkel (°)	**Mittelwert**	**Standardabweichung**	**Minimum**	**Maximum**
Kontrolle	14.9	0.7	11.4	17.5
OVX + D + S	13.7	1.7	9.1	25.0

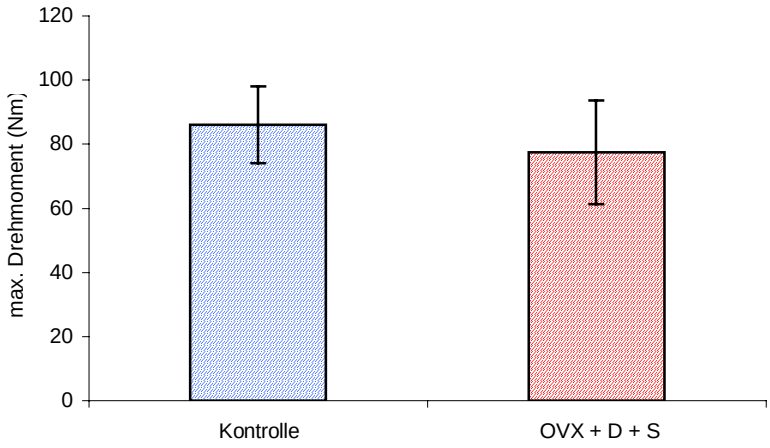


Abb. 4.16a Torsionstest Tibia: max. Drehmoment

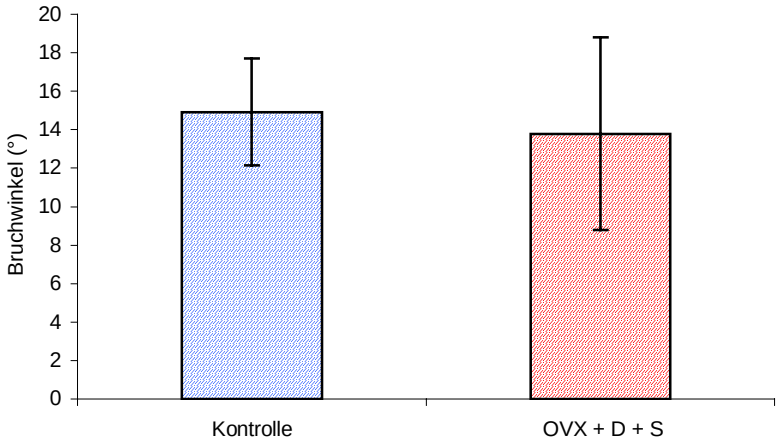


Abb. 4.16b Torsionstest Tibia: Bruchwinkel

4.3.3 Vier- Punkt- Biegung von Kortikalispräparaten der Tibia

Bei der Vier- Punkt- Biegung wurden die Ergebnisse der Versagenslast und Steifigkeit zwischen der behandelten und unbehandelten Gruppe verglichen. Die Versagenslast war an den Kortikalispräparaten der behandelten Gruppe um 9 % geringer als bei der behandelten Gruppe. Auch die Steifigkeit wurde bei den Knochenproben der behandelten Gruppe um 15,7 % niedriger gemessen.

Aufgrund der grossen Streuung waren die Unterschiede nicht signifikant.

Tab. 4.21 Vier- Punkt- Biegung

Versagenslast (kN)	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	0.011	0.001	0.005	0.014
OVX + D + S	0.010	0.001	0.006	0.013
Steifigkeit (MPa)	**Mittelwert**	**Standardabweichung**	**Minimum**	**Maximum**
Kontrolle	253.5	29.7	87.1	331.1
OVX + D + S	213.7	14.7	141.9	268.1

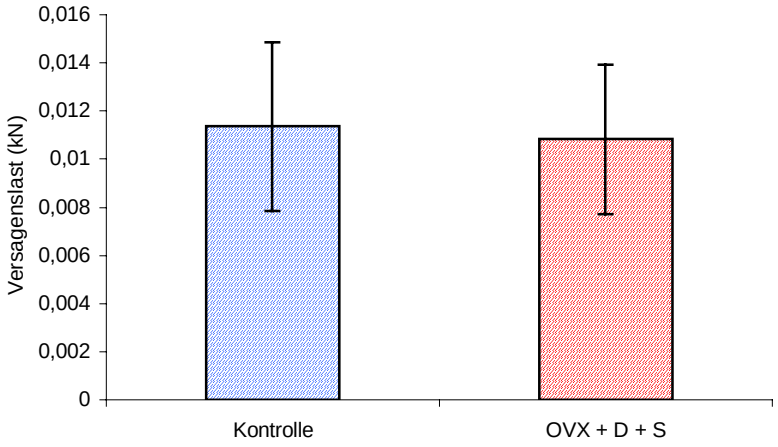


Abb. 4.17a Vier- Punkt- Biegung der Tibiakortikalis: Versagenslast

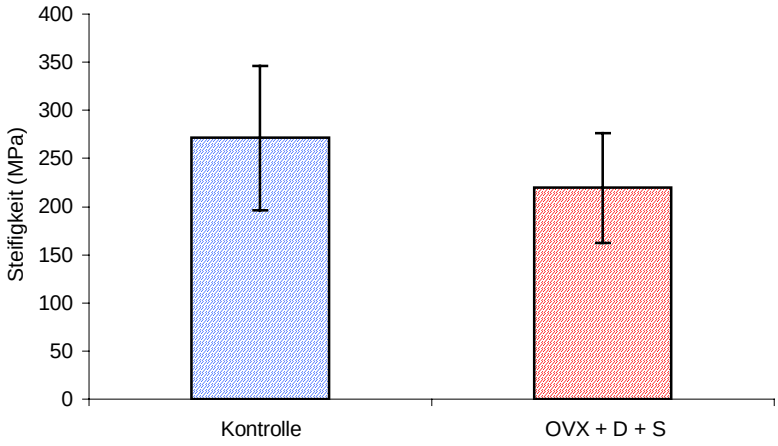


Abb. 4.17b Vier- Punkt- Biegung der Tibiakortikalis: Steifigkeit

4.4 Knochenstoffwechselparameter

Verschiedene Knochenstoffwechselparameter wurden monatlich in Urin und Serum bestimmt (siehe Text 3.4)

Die alkalische Phosphatase zeigte zwischen den beiden Gruppen zum Beginn der Studie keine Unterschiede. Während der weiteren Beobachtung waren die Ergebnisse starken Schwankungen unterworfen. Dieses traf sowohl für die behandelten Tiere als auch für die Kontrollgruppe zu. Es gab zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 4.22 Alkalische Phosphatase (U/l)

Kontrolle	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Beginn	167.9	53.15	63.00	273.0
September	187.6	91.52	77.00	475.0
Oktober	111.6	41.32	56.00	202.0
November	131.2	46.93	53.00	233.0
Dezember	112.6	39.92	49.00	179.0
Januar	128.9	54.05	49.00	241.0
Februar	137.8	54.77	59.00	228.0
März	174.4	59.51	88.00	253.0
OVX + D + S	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Beginn	152.0	70.84	79.00	308.0
September	132.4	53.61	41.00	223.0
Oktober	107.3	58.90	24.00	235.0
November	140.8	59.13	33.00	268.0
Dezember	141.7	90.81	52.00	382.0
Januar	142.1	67.55	50.00	265.0
Februar	116.6	58.41	58.00	214.0
März	138.1	55.76	52.00	248.0

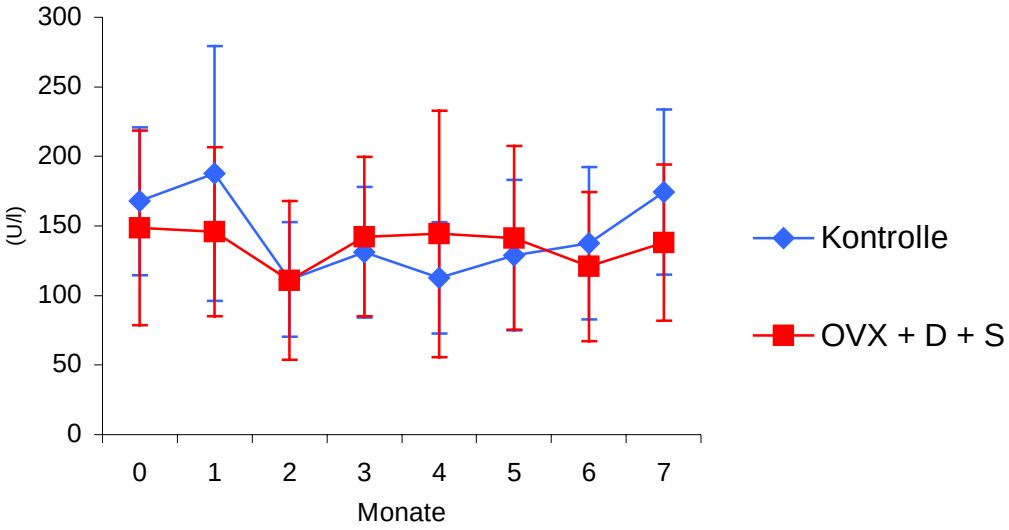


Abb. 4.18 Alkalische Phosphatase Konzentration im Blut über den Verlauf von 7 Monaten

Bei der Bestimmung des Pyridinolin und Desoxypyridinolin waren die Gruppenmittelwerte zu allen Zeitpunkten signifikant verschieden. Das heisst, dass sich die Zeitprofile der beiden Gruppen unterschiedlich verhielten. Zu beobachten war, dass einen Monat nach Ovarektomie der Wert des Desoxypyridinolin signifikant von 10,0 ± 2,0 nmol/mmol Kreatinin auf 17,9 ± 4,3 nmol/mmol Kreatinin anstieg. Eine weitere Zunahme erfolgte nach Umstellung von 120 mg auf 200 mg Methylprednisolon pro Woche. Werte von 18,0 ± 4,8 nmol/mmol Kreatinin wurden erreicht. Die Umstellung auf das Steroid in Form der Kristallsuspension nach 22 Wochen brachte keine weitere Zunahme der Werte.

Tab. 4.23 Pyridinolin (nmol/mmol Kreatinin)

Kontrolle	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Beginn	48.57	15.81	22.90	72.4
September	44.05	15.52	7.90	65.1
Oktober	42.88	11.68	25.20	63.6
November	48.78	14.71	32.40	75.6
Dezember	35.93	12.35	17.90	57.6
Januar	36.40	10.69	16.40	56.4
Februar	35.73	9.59	21.10	48.0
März	45.31	6.36	36.90	54.6

Tab. 4.23 Pyridinolin (nmol/mmol Kreatinin)

OVX + D + S	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Beginn	81.1	18.24	56.40	112.6
September	147.6	36.90	99.30	202.5
Oktober	101.9	29.36	62.30	156.1
November	113.7	35.48	64.30	201.0
Dezember	162.6	44.86	75.80	249.7
Januar	144.7	36.06	71.20	202.3
Februar	128.5	34.00	73.20	185.6
März	120.0	31.92	65.40	187.0

Tab. 4.24 Desoxypyridinolin (nmol/mmol Kreatinin)

Kontrolle	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Beginn	6.113	1.692	3.5	9.1
September	6.207	1.358	3.8	8.3
Oktober	5.738	1.246	4.0	8.0
November	6.271	1.309	4.8	9.0
Dezember	4.994	1.524	3.4	7.8
Januar	4.863	1.263	2.8	7.2
Februar	4.917	1.138	3.4	6.4
März	6.100	0.804	5.1	7.2
OVX + D + S	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Beginn	9.98	1.997	7.3	13.2
September	17.86	4.328	10.2	24.5
Oktober	11.79	3.327	7.9	18.1
November	13.35	3.620	7.8	21.5
Dezember	17.96	4.831	8.2	26.5
Januar	16.27	4.255	6.5	22.1
Februar	14.86	3.339	9.2	21.1
März	13.20	3.582	8.4	21.0

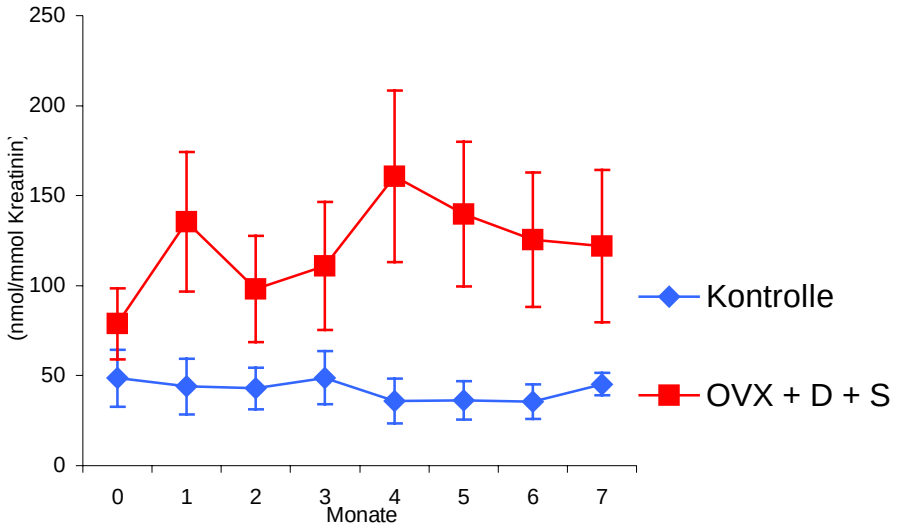


Abb. 4.19 Pyridinolinkonzentrationen im Urin über den Verlauf von 7 Monaten

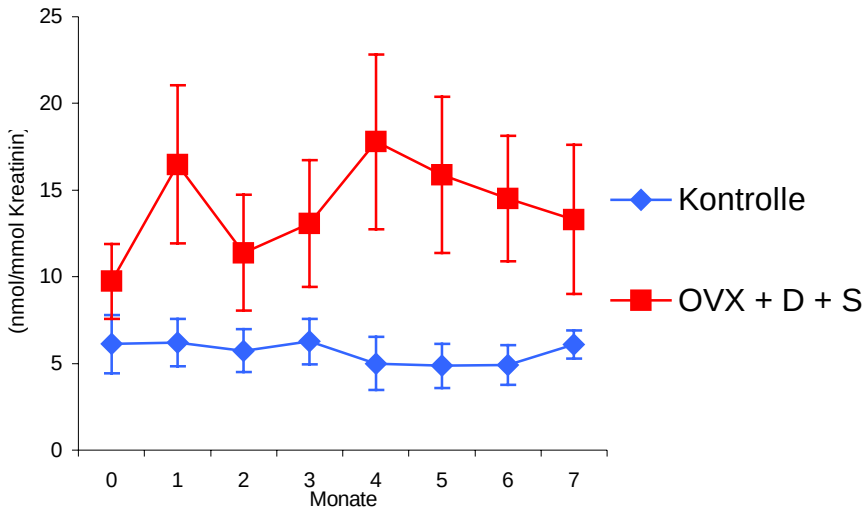


Abb. 4.20 Desoxypyridinolinkonzentrationen im Urin über den Verlauf von 7 Monaten

Die Pyridinolinkonzentrationen korrelierten eng mit den Desoxypyridinolin-konzentrationen.

Die Werte der Methylprednisolonkonzentrationen wurden im Serum bestimmt. Nach den im Blut nachgewiesenen Steroidekonzentrationen und in Kombination mit Zwischenauswertungen der Abnahme der Knochendichte, wurden die Steroidegaben erhöht bzw. in der Darreichungsform verändert.

Tab. 4.25 Bestimmung der Methylprednisolonwerte im Blut

	wöchentliche Gabe von 120 mg Methylprednisolon Lösung
Blutentnahme 24 Std. nach der Injektion	unter 10 ng/ml
	wöchentliche Gabe von 200 mg Methylprednisolon Lösung
Blutentnahme 4 Std. nach der Injektion	14 ± 6 ng/ml
	wöchentliche Gabe von 200 mg Methylprednisolon Kristallsuspension
Blutentnahme 4 Std. nach der Injektion	28 ± 18 ng/ml
Blutentnahme 12 Std. nach der Injektion	16 ± 4 ng/ml
Blutentnahme 24 Std. nach der Injektion	12 ± 6 ng/ml

4.5 Korrelationen

Ausgeprägte Korrelationen zeigten die Ergebnisse des Kompressionstests von L3-, L4- und den Femurkopfbiopsien mit den im Mikro-CT gemessenen Strukturparametern der Knochen. Die Ergebnisse waren stark signifikant und spiegelten den Zusammenhang zwischen der Kompressionsfestigkeit eines Knochens und der Trabekeldicke wider.

Tab. 4.25 Korrelation mit dem Pearson Korrelations Koeffizienten von mechanischen Tests und Strukturparametern aus dem Mikro-Computertomographen

	BV/TV	BS/BV	Tb.N	Tb.Th	Tb.Sp
L3 Versagenslast (kN)	0.005	0.002	0.03	0.007	0.002
L3 Steifigkeit (N/mm)	0.003	0.002	0.01	0.007	0.0004
L4 Versagenslast (kN)	0.05	0.02	0.009	0.1	0.004
L4 Steifigkeit (N/mm)	0.003	0.02	0.01	0.07	0.005
Fk Versagenslast (kN)	0.03	0.02	0.2	0.02	0.05
Fk Steifigkeit (N/mm)	0.03	0.01	0.2	0.02	0.04

5 Diskussion

Das Fehlen eines adäquaten Tiermodells erschwert systematische experimentelle Studien zur Frakturbehandlung und Frakturheilung am osteoporotischen Knochen.

An Tiermodellen können in vivo kontrollierte und standardisierte Untersuchungen durchgeführt werden. Einflüsse von Einwirkungen auf den Knochenstoffwechsel können nachvollzogen werden. Bei Studien zur Untersuchung von Osteosynthesematerialien ist ein Tiermodell notwendig, das bezüglich der Anatomie und des Knochenstoffwechsels mit dem Menschen vergleichbar ist.

Viele Erkenntnisse über Entstehung und Verlauf von Krankheiten, Operationstechniken, medizinische Geräte und Instrumente, Diagnosemethoden, Hygiene sowie Arzneimittel resultieren aus Tierversuchen.

Als Komplement zum persönlichen Nutzen des medizinischen Fortschritts besteht auch ein volkswirtschaftlicher Nutzen: verbesserte Therapiekonzepte senken die Behandlungs-, Pflege- und Rehabilitationskosten, vermeiden oder verkürzen Arbeitsausfälle und Krankenhausaufenthalte, erhöhen die Leistungsfähigkeit und Lebensqualität der Erkrankten und reduzieren die Zahl der Neuerkrankungen.

Es stellt sich die Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse von Tierversuchen auf den Menschen. Hier ist zu beachten, dass relevante Unterschiede zwischen gewissen Tierarten und Homo sapiens bekannt sind und natürlich bei der Auswahl der verwendeten Versuchstiere berücksichtigt werden. Umgekehrt lassen sich etwa 70 - 80% der Wirkungen von Arzneimitteln auf Menschen aufgrund von Tierversuchen korrekt vorhersagen, ca. 80 % der in der Veterinärmedizin verwendeten Arzneimittel wurden aus der Humanmedizin übernommen (Küsters et al., 1993).

Untersuchungen am Tier können von Nutzen sein, wenn sie anschliessend neue Behandlungsmöglichkeiten am Menschen zulassen.

Bis heute wird zur Diagnosesicherung der Osteoporose die Messung der Knochendichte durchgeführt. Dazu gibt es verschiedene Verfahren.
Neben der Knochendichtemessung erlaubt die Untersuchung von Knochenproben mittels der Mikro-Computertomographie zusätzlich, Strukturveränderungen am osteoporotisch veränderten Knochen zu erkennen.
Die Methoden zur Diagnostik und Verlaufskontrolle der Osteoporose können durch Laboruntersuchungen von Stoffwechselprodukten des Knochenumbaus im Blut und Urin unterstützt werden. Mit Knochenstoffwechselmarkern kann zwischen der Knochenaufbauphase und -abbauphase differenziert werden.
Im Rahmen der Osteoporose kommt es zur Reduktion der mechanischen Kompetenz der Knochen. Zur differenzierten Untersuchung von spongiösem und kortikalem Knochen eignen sich Kompressions- und Torsionstests sowie die Drei- bzw. Vier- Punkt- Biegung (Bouxsein et al., 1996).
Auf dem Gebiet der in vitro Diagnostik ist die Histomorphometrie von Dünnschnitten eine etablierte Methode zur Bestimmung von Strukturparametern wie Trabekeldicke und Trabekelabstand. Die Darstellung ist zweidimensional (Engelke et al., 1999).
Von einigen Autoren sind verschiedene Tiere, im Hinblick auf die Eignung als Modell für Osteoporose untersucht worden (Chavassieux, 1990; Chavassieux et al., 1991; Chavassieux et al., 1993; Geusens et al., 1996; Hornby et al., 1995; Newman et al., 1995; Pastoureau et al., 1989 Turner et al., 1995a; Turner et al., 1995b; Turner et al., 1995c; Turner and Villanueva, 1993).

5.1 Probleme bei der Versuchsdurchführung

Nach sechs Wochen wurden an allen Schafen CT-Messungen durchgeführt, um etwaige erste Veränderungen seitens der Knochendichte erfassen zu können. Auch nach 14 Wochen wurden in einer weiteren Zwischenauswertung des Knochendichteverlaufes nur geringfügige Änderungen aufgezeigt. Dies veranlasste uns, die Steroiddosis zu erhöhen. Da auch nach weiteren zwei Monaten der von uns erwartete Effekt ausblieb, wurde auf dieselbe Substanz des Steroids in veränderter Darreichungsform umgestellt, von der Lösung zur Kristallsuspension.

Die Steroide hatten ihre Nebenwirkungen. Im Verlauf der Studie mussten zwei Tiere ausgeschlossen werden. Beobachtet wurde in der behandelten Gruppe eine Muskelatrophie und Stammfettsucht sowie eine Alopezie.
Von diesen Tieren erwachte nach einer QCT- Kontrollmessung das Schaf mit der ID- Nr. 645 nicht mehr aus der Intubationsnarkose. In der Autopsie wurden zahlreiche Abszesse in Lunge, Herz und Niere erkannt. Als Erreger dieser Infektion wurde das Mykobakterium pseudotuberkulosis gefunden. Als Folge wurden weitere Schafe auf M. pseudotuberkulosis untersucht. Das Ergebnis war bei drei weiteren Schafen aus der OVX + D + S- Gruppe positiv. Es fanden sich an Stellen, an denen intramuskuläre Injektionen erfolgten, Abszesse mit M. pseudotuberkulosis. Diese führten jedoch nicht zu generalisierten Infektionen. Alle Schafe wurden im weiteren Verlauf engmaschig durch einen Veterinärmediziner überwacht.
Das Schaf aus der Kontrollgruppe (ID- Nr. 770) verstarb unabhängig vom Versuch infolge einer Mesenterialstildrehung an einem paralytischen Ileus.
In den ersten 22 Wochen wurden die behandelten Tiere in einem Laufstall gehalten, um den Auslauf und damit die mechanische Belastung der Knochen einzuschränken. Die Fütterung erfolgte automatisiert über eine Maschine. Da es vor dieser Maschine häufig zu Drängeleien zwischen den Tieren kam, vermuteten wir, dass auch dadurch die Knochen besonderen Belastungen ausgesetzt waren. Somit wurde nach 22 Wochen die Gruppenhaltung der behandelten Tiere durch Einzelhaltung ersetzt.

5.2 Knochendichtebestimmung

Mit Hilfe der Osteodensitometrie sind grosse Fortschritte auf dem Gebiet der in vivo Diagnostik der Osteoporose erzielt worden. Insbesondere zur Überwachung von Verlaufskontrollstudien sind die Standardverfahren der quantitativen Computertomographie besonders geeignet. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Knochendichte zu ermitteln. Dazu gehören:

- Quantitative Computertomographie (QCT)
- Periphere Quantitative Computertomographie (pQCT)
  - Zwei- Energie- QCT (DEQCT)
  - Ein- Energie- QCT (SEQCT)
- Ein- Energie- Röntgenabsorptiometrie (SPA)
- Zwei- Energie- Röntgenabsorptiometrie (DPA)
- Duale Röntgenabsorptiometrie (DXA)
- Quantitativer Ultraschall (QUS)

Die Relevanz eines densitometrischen Verfahrens kann durch seine Genauigkeit, Präzision und Empfindlichkeit charakterisiert werden. Diese Grössen werden ihrerseits von der Reproduzierbarkeit und dem Einfluss der Patientenpositionierung, der Dicke und Homogenität des umgebenden Gewebes, der Zusammensetzung des Knochenmarks sowie arthrotischer Veränderungen bestimmt.

Die Genauigkeit eines Verfahrens gibt die Abweichung des Messergebnisses vom wahren Wert an. DEQCT bietet eine höhere Genauigkeit als DXA, während SEQCT mit DXA vergleichbar ist (Jergas et al., 1992).

Während hohe Genauigkeit die wichtigste Voraussetzung für einen aussagekräftigen Vergleich zwischen Messwerten unterschiedlicher Individuen ist, nimmt bei wiederholten Messungen am selben Objekt die Präzision eine zentrale Kenngrösse eines Knochendichtemessverfahrens ein. Sie beschreibt, wie gut ein Messwert reproduziert werden kann und bildet damit die Basis für die Berechnung des kleinsten Knochendichteunterschiedes, der mit hinreichender statistischer Wahrscheinlichkeit entdeckt werden kann.

Die Quantifizierung des Knochenmineralgehaltes wird durch verschiedene Methoden ermöglicht.

Das wohl einfachste densitometrische Verfahren stellt die native Röntgenaufnahme dar.

Die Absorption von Röntgenstrahlen in einem Gewebe hängt von der Qualität des Röntgenstrahls, der Zusammensetzung des untersuchten Gewebes und damit von der Dichte und Dicke des durchstrahlten Gewebes ab. Die Menge der Absorption bestimmt die Abbildung auf einem Röntgenfilm.

Der Kalziumphosphatgehalt des Knochens ist für das Ausmass der Absorption von Röntgenstrahlen verantwortlich. Der relative Anteil des Kalziums am mineralisierten Knochen bleibt bei der Osteoporose relativ konstant bei 35 %. Die Verringerung des mineralisierten Knochenvolumens führt dagegen zu einer Verringerung des Kalziums und zu einer herabgesetzten Absorption der Röntgenstrahlen durch den Knochen.

Mit Verminderung der Knochenmasse kommt es zu einer Veränderung der Knochenstruktur. Radiologisch sind bei Osteoporose besonders Veränderungen des trabekulären Knochens im Stammskelett und an den Epiphysen der Röhrenknochen auffällig.

Abb. 5.1 Röntgenbilder
links: Schafsfemur gesund
rechts: Schafsfemur nach 7 Monaten Osteoporoseinduktion

Die Diagnose der Osteopenie anhand konventioneller Röntgenaufnahmen ist oft unzuverlässig, weil die Abbildung des Kalksalzgehaltes durch eine Reihe technischer Faktoren z.B. Aufnahmeparameter, Filmentwicklung,

Weichteildicke beeinflusst wird. Zusätzlich besteht eine Unsicherheit durch subjektive Entscheidungen in der Beurteilung der Osteopenie. Schätzungen gehen davon aus, dass 30 - 40 % der Knochenmasse verloren sein muss, um eine Verminderung des Mineralgehaltes auf Röntgenaufnahmen erkennen zu können. Damit ist diese Technik zur Verlaufskontrolle bei der Knochendichtebestimmung wenig geeignet (Jergas und Schmid, 1999).

Ein- Energie- Röntgenabsorptiometrie (SPA):

Bereits 1963 wurde von Cameron und Sørenson die Single Photon Absorptiometry (SPA) beschrieben.

Gemessen wird dabei die Photonenschwächung durch den Knochen. Bei der Strahlenquelle handelt es sich in der Regel um eine ^{125}Jod-Quelle. Die Messung wird nachteilig durch Weichteilgewebe beeinflusst. Zur Kompensation der vorhandenen Weichteilüberlagerung muss die Untersuchung durch Lagerung des betreffenden Knochens in einem gewebeäquivalenten Material (Wasserbad) ausgeglichen werden. Ebenso muss die Weichteildicke annähernd konstant sein.

Da Wasser die Photonen in etwa gleichem Masse schwächt wie das Weichteilgewebe, kann bei vorgegebener Weichteildicke die Absorption durch den Knochen berechnet werden.

Der Knochenmineralgehalt (Bone Mineral Content=BMC) wird in g/cm Radiuslänge oder gerätespezifisch als Flächenwert in g/cm^2 angegeben.

Gemessen werden kann nur das periphere Skelett, da eine Wasserbadlagerung notwendig ist.

Ein weiterer Nachteil liegt in der kurzen Halbwertszeit des Radionuklids ^{125}Iod, so dass die Strahlenquelle relativ rasch ersetzt werden muss.

Zwischen Radius und Wirbelsäule besteht ein Unterschied, der das Verhältnis von kortikalem zu trabekulärem Knochen betrifft. Mit der SPA- Methode werden etwa 30 % falsch negative Ergebnisse gemessen. Das heisst, dass in der Peripherie Normalwerte gemessen werden, während in der Wirbelsäule eine Osteopenie vorliegen kann.

Weiterhin ist als Nachteil zu betrachten, dass zwischen kortikalem und trabekulärem Knochen nicht differenziert werden kann (Jergas et al., 1992).

Zwei- Energie- Röntgenabsorptiometrie (DPA):

Bei der DPA (Dual Photon Absorptiometry) wird eine natürliche Strahlenquelle verwendet. Es handelt sich um eine ^{153}Gadolinium-Quelle. Die Emission beträgt 44 keV und 100 keV. Grundsätzlich werden bei allen Zwei- Energie-Verfahren von jedem Punkt die Datensätze bei einer niedrigen und einer hohen Energie gewonnen. So kann aus der Höhe und der Differenz der Messwert errechnet werden und gleichzeitig der Einfluss des umgebenden Weichteilgewebes eliminiert werden.

Der Nachteil der DPA-Methode liegt in einer geringen Reproduzierbarkeit von 2 bis 4 %. Es liegt eine starke Gerätespezifität vor. Fischer konnte 1990 bei einer vergleichenden Untersuchung an zehn DPA und DXA-Geräten unterschiedlicher Hersteller Messwertdifferenzen von mehr als 20 % feststellen (Fischer et al., 1990; Frahm et al., 1994).

Duale Röntgenabsorptiometrie (DXA):

Das am häufigsten verwendete Verfahren zur Knochendichtemessung ist die duale Röntgenabsorptiometrie (Synonyme: DXA=Dual X-ray Absorptiometry, DEXA=Dual Energy X-ray Absorptiometry).

Die DXA-Technik stellt ein zweidimensionales Verfahren dar. Quantifiziert werden selektiv anorganische Materialien (Knochenmineralien) innerhalb eines organischen Körpers.

Bei dieser Messmethode werden zwei Strahlen unterschiedlicher Energie genutzt. Das Messprinzip beruht auf der unterschiedlichen Schwächung dieser hochenergetischen Photonenstrahlung beim Durchtritt durch das Gewebe.

Im Knochen und im Weichteilgewebe werden Strahlen niedriger Energie stärker geschwächt als Strahlen höherer Energie. Dies geschieht im Knochen in deutlich grösserem Ausmass als im Weichteilgewebe.

Da die Abbildung des Knochens nur in zwei Dimensionen geschieht, also einer Fläche entspricht, erfolgt die Angabe des Knochenmineralgehaltes in g/cm^2.

Die DXA erlaubt Messungen an Orten mit inkonstanter Weichteildicke und Weichteilzusammensetzung wie LWS und Hüfte. Ganzkörpermessungen sind ebenso möglich wie Messungen an Radius und Calcaneus.

Bei der DXA werden kortikaler und trabekulärer Knochen gemeinsam gemessen.
Systematische Verfälschungen der Werte können durch Überlagerungen durch Aortenkalk, Wirbelsinterungen, eine ausgeprägte Spondylarthrose oder Spondylose entstehen.
Um Messwerteverfälschung zu vermindern, wurde die laterale DXA-Messtechnik eingeführt. Hierzu wird die Strahlenquelle samt Detektorsystem seitlich geschwenkt. Als sicher überlagerungsfreier Messbereich kann häufig nur der 3. LWK erfasst werden (Jergas et al., 1992).
Während die Knochenmineralienzusammensetzung - auch bei Vorliegen einer Osteoporose - als weitgehend konstant angenommen werden kann, trifft das für das Weichteilgewebe nicht zu. Die unterschiedliche Zusammensetzung aus Muskel- und Fettgewebe führt zu einem weiteren systematischen Fehler der DXA- Messung.

Quantitativer Ultraschall (QUS):
Als weiteres Verfahren zur Knochendichtebestimmung wird die quantitative Ultraschallmessung (QUS) genutzt. Grundsätzlich können zur Messung der Knochendichte die Schallgeschwindigkeit (Speed of Sound = SOS) und die Schallschwächung (Broadband Ultrasound Attenuation = BUA) herangezogen werden.
Der grosse Vorteil dieser Methode ist in der fehlenden Strahlenbelastung zu sehen.
Ultraschallwellen durchdringen bei einer Frequenz von unter 1 MHz den Knochen. Die Geschwindigkeit des Ultraschalls wird aus der Transitzeit bei der Durchquerung des Knochens und der Dicke des Knochens bestimmt. Die Geschwindigkeit ist von der Knochenqualität und Knochenmasse abhängig. Für spongiösen Knochen liegt sie zwischen 1600 und 2300 m/s. Für Kortikalis beträgt sie zwischen 3000 und 3600 m/s. Da also die knochenspezifische Schallgeschwindigkeit bekannt ist, kann durch eine Zeitmessung auf die Knochendichte zurückgeschlossen werden.
Eine Reduktion der Knochendichte führt zu einer messbaren Herabsetzung der Geschwindigkeit (Evans, 1990).

Das Verfahren der Ultraschallmessung wird ausschliesslich an peripheren Skelettstrukturen wie dem Calcaneus, der Patella oder an einzelnen Fingerknochen durchgeführt. Der Grund dafür liegt in der freien Zugänglichkeit und direktem Kontakt durch die Haut. Dieses Verfahren der Messtechnik ist an Wirbelsäule und Schenkelhals derart nicht möglich.
Nachteil der QUS- Methode ist, dass die bei den Messungen herangezogenen Messareale nicht für osteoporotische Veränderungen prädisponiert sind.

Zur Ermittlung der Knochendichte wurde in dieser Studie das etablierte Verfahren der quantitativen Computertomographie (QCT) durchgeführt.

Periphere Quantitative Computertomographie (pQCT):
Auch bei dieser Messtechnik unterscheidet man zwischen den Verfahren der DEQCT und der SEQCT.
Das Prinzip der DEQCT (Dual-Energy QCT) beruht auf der Schwächung von Röntgenstrahlung. Materialien niedriger Ordnungszahl schwächen die Röntgenstrahlung vorwiegend durch Streuung, Materialien höherer Ordnungszahl vorrangig durch Absorption. In beiden Fällen besteht eine ausgeprägte Abhängigkeit von der Energie. Das Schwächungsprofil von Weichteilgewebe weist bei unterschiedlicher Strahlungsenergie nur einen geringen Unterschied auf. Im Knochen resultiert hingegen ein deutlich grösserer Unterschied im Schwächungsprofil unterschiedlicher Strahlungsenergien. Aus der Differenz der Schwächungswerte bei unterschiedlicher Strahlungsenergie wird auf die Materialzusammensetzung des Objektes im Strahlengang geschlossen. Eine selektive Kalziummessung ist möglich (Kalender, 1988).
Vorteil der Anwendung der Zwei- Energie- Methode besteht darin, dass der “Fettfehler” um den Faktor vier im Vergleich zur SEQCT reduziert werden kann. Der “Fettfehler” wird in der Literatur in einer Höhe von bis zu 30 % angegeben (Felsenberg und Gowin, 1999). Er beruht darauf, dass die Röntgenschwächung integral über allen Gewebeanteilen gemessen wird, also als Summe der Schwächung durch die mineralisierten Trabekel, das blutbildende Mark und dem individuell stark variablen Fettanteil in der

Spongiosa. Dadurch wird die integrale Dichte des Gewebes abgesenkt, da Fett im Vergleich zum roten Knochenmark eine um 10 % niedrigere Dichte besitzt.
Um die Genauigkeit zu erhöhen, kann der Fehler durch Messung mit zwei Härten der Röntgenstrahlung reduziert werden (40 kV, 70 kV). Die Unterschätzung des Knochenmineralgehaltes wird so vermieden und die systematische Abweichung wird durch alters- und geschlechtsbezogene Korrekturwerte reduziert (Mark et al., 1993).
Nachteil der DEQCT besteht in einer hohen Strahlenbelastung (3 - 10 fach höhere effektive Dosis gegenüber des SEQCT) und einer schlechten Reproduzierbarkeit, die durch das stärkere Bildpunktrauschen im materialselektiven Bild bedingt ist. Der Grund liegt an der Notwendigkeit, zwei Scanvorgänge vorzunehmen (Felsenberg, 1988).

Bei der in dieser Studie genutzten Ein- Energie- Methode SEQCT (Single-Energy QCT) findet die Untersuchung mit einem festgelegten kV-Wert statt. Die Schwächung des Röntgenstrahls wird nicht nur durch den Knochen, sondern auch durch die Weichteilzusammensetzung in der “Region of interest” (ROI)”, d.h. vom individuell variablen Fettanteil in der Spongiosa beeinflusst. Der Fettgehalt des Knochenmarks führt zu einer systematischen Unterschätzung des Knochenmineralgehaltes. Sie ist vom gewählten kV-Wert abhängig (Glüer et al., 1988). Werden die Daten mit Normaldaten desselben CT-Typs verglichen, reduziert sich dieser Fehler erheblich (Glüer et al., 1989).

Im Gegensatz zur planaren Densitometrie wird bei der von uns gewählten SEQCT Methode zwischen kortikalem und trabekulärem Knochen unterschieden. Es handelt sich um eine überlagerungsfreie, dreidimensionale Darstellung. Mit Hilfe von mehreren Schnittbildern in Folge ist eine räumliche Illustration möglich.
Die Angabe des Knochenmineralgehaltes der QCT- Messung erfolgt in g/cm^3.
Die gemessenen Schwächungswerte sind stark von der gewählten Röhrenspannung abhängig.
Zur Messung des Knochenmineralgehaltes am peripheren Skelett eignet sich der periphere Computertomograph mit hochauflösenden Spezialscannern.

Der Messort liegt bevorzugt im Bereich des distalen Radius und der distalen Tibia.

Für die Anwendung des SEQCT sprechen bei unserem Gerät kurze Untersuchungszeiten und eine gute Reproduzierbarkeit mit einem Reproduzierbarkeitsfehler von ± 0.3 %. Es besteht eine im Vergleich zur QCT am Stammskelett ähnlich gute Differenzierung zwischen osteoporotischen und nicht- osteoporotischen Kollektiven. Für diese Messmethode spricht ebenso eine geringe Strahlenbelastung (ca. 200 mrem Hautdosis bei der SEQCT- Methode im Gegensatz zu einer Strahlenbelastung von ca. 600 mrem bei der Verwendung der DEQCT). Ein hohes Auflösungsvermögen ist für die Messortwiederholung bei Folgemessungen von Vorteil. Ausserdem ist die hohe Auflösung für eine selektive Auswertung der dünnwandigen Kortikalis wichtig (Jergas et al., 1992).

Aufgrund der geschilderten Vorteile der peripheren quantitativen Computertomographie ist der Einsatz dieses Gerätes zur Darstellung der Knochendichte beim Schaf von besonderem Vorteil. Der zeitliche Verlauf einer Knochendichteveränderung kann gut gezeigt werden.

Tab. 5.1 Übersicht über die nichtinvasiven Methoden zur Knochendichtemessung (Reiners, 1991)

Methode	SPA	DPA	DXA	SEQCT	pQCT
Messort	Radius	LWS/Femur Ganzkörper	LWS/Femur Ganzkörper	LWS (Femur)	Radius Tibia
Spongiosa-anteil	5 - 80 %	50 - 60 %	50 - 60 %	100 %	100 %
Dichte-äquivalent/ Dimension	Längen-wert (g/cm)	Flächen-wert (g/cm^2)	Flächenwert (g/cm^2)	Volumen-wert (mg/cm^3)	Volumen-wert (mg/cm^3)
Strahlenquelle/ Energie (keV)	I-125 (28)	Gd-153 (44/100)	Rö-Röhre (40/70)	Rö-Röhre (40/70)	I-125/ Rö-Röhre (28/40)
Strahlen-exposition (Knochenmark mGy)	≤ 0,1	≤ 0,15	≤ 0,05	1-10	≤ 0,1
Reproduzierbar-keit (Variations-koeffizient)	1 - 3 %	2 – 5 %	1 - 2 %	SE: 1 - 3 % DE: 3 - 10 %	0,5 - 1 %
Untersuchungs-dauer (min)	5 - 10	20 - 60	5 - 10	10 - 20	5 - 10

Beim Menschen stellt man die Diagnose einer Osteoporose, wenn sich der Knochenmineraldichtewert um mehr als 2,5 SD unter dem T-Score befindet. Beim T-Score handelt es sich als Bezugsgrösse um die Knochendichte in Prozent der mittleren Knochendichte von 25 - 40jährigen, differenziert nach Geschlecht.

Die Abnahme der Knochenmineraldichte zwischen 3 % und in extremen Fällen von 25 % wird innerhalb des ersten Jahres nach Beginn der Menopause festgestellt (Dambacher et al., 1991).

In der hier vorliegenden Studie wird bei den behandelten Schafen im Durchschnitt eine Knochendichteabnahme am Radius von 37 % erzielt. 1 SD entspricht beim Menschen laut Marshall et al. einer Knochendichteabnahme von 12 % (Marshall et al., 1996).

Tab. 5.2 Klinische Osteoporosestadien definiert aus Densitometriebefund und Wirbelfrakturen (Ringe, 1996)

Osteoporose-Stadium	Knochendichte (T-Score)
Normalbefund	bis -1,0
Osteopenie, präklinische Osteoporose	-1,0 bis -2.5
Osteoporose ohne/mit Fraktur	>-2.5

5.3 Strukturanalyse mit der Mikro-Computertomographie

Mit Hilfe der Technologie der Mikro-Computertomographie ist sowohl eine zwei- als auch dreidimensionale Knochenstrukturdarstellung von kleinen Proben ohne Zerstörung oder aufwendige Probenpräparation möglich.

Bei der Mikro-CT-Technik werden nur mineralisierte Anteile des Knochengewebes dargestellt. Mineralisationsstörungen, also unverkalkte Interzellularsubstanz des Knochengewebes bestehend aus kollagenen Fasern und glykoproteinhaltiger Kittsubstanz können nicht abgebildet werden. Veränderungen innerhalb der Markräume werden nicht erfasst.

Im Vergleich zu zweidimensionalen Präparaten ergibt sich nach der dreidimensionalen Rekonstruktion der Schichtbilder ein Eindruck der tatsächlichen räumlichen Knochenstruktur. Aufgrund der hohen Auflösung der Tomogramme von 20 μm können krankheitsbedingte Veränderungen erkannt werden. Auch wenn in zweidimensionalen Schnittpräparaten schon die Reduktion der Vernetzung der Trabekel im Vordergrund steht, so wird erst am dreidimensionalen Bild das ganze Ausmass der Strukturveränderungen bei Osteoporose klar.

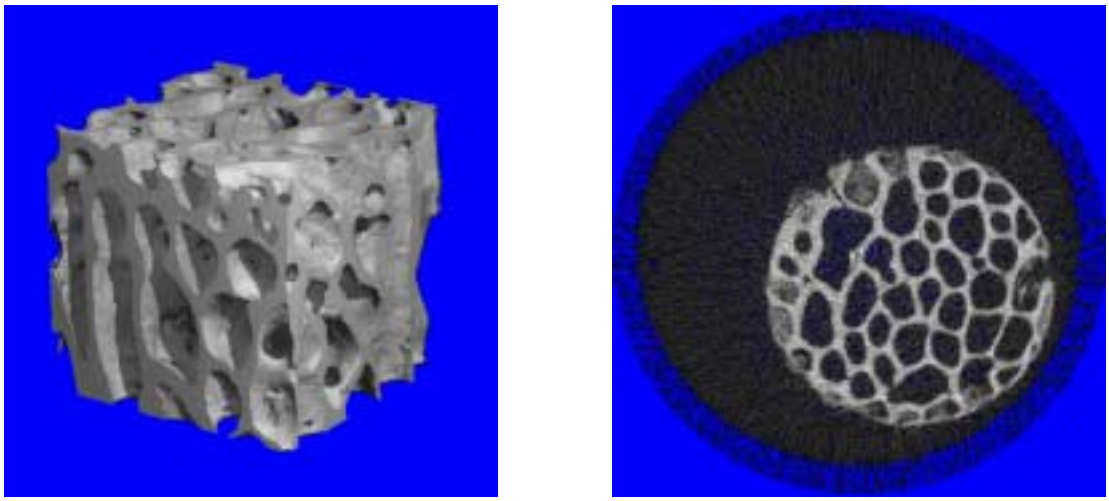


Abb. 5.2a Mikro-Computertomographisch dargestellte Beckenkammbiopsie von einem gesunden Schaf; links dreidimensionale, rechts zweidimensionale Darstellung (Knochenproben stammen von Tieren aus dieser experimentellen Arbeit)

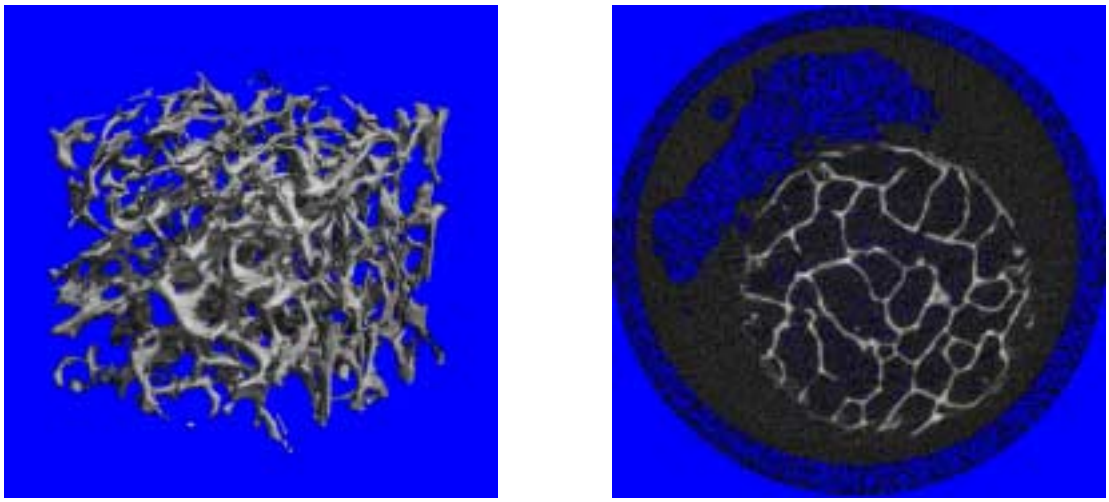


Abb. 5.2b Mikro-Computertomographisch dargestellte Beckenkammbiopsie von einem osteoporotischen Schaf; links dreidimensionale, rechts zweidimensionale Darstellung (Knochenproben stammen von Tieren aus dieser experimentellen Arbeit)

Neben der stabartigen Struktur der Trabekel kann gezeigt werden, dass bei Osteoporose auch zahlreiche freie Enden ohne biomechanische Funktion entstehen.

Darin besteht auch das Kernproblem der Osteoporose. Die Bruchfestigkeit hängt nicht nur von der Masse des Knochenmaterials ab, sondern vor allem

von seiner Verteilung in feinen Verstrebungen, dem Trabekelnetzwerk. Das Frakturrisiko ist primär eine Funktion der Knochenarchitektur (Parfitt, 1992).

Ito et al. zeigten (1998), dass sich in den histomorphometrischen Parametern einer humanen Gruppe mit osteoporotischen Wirbelkörperfrakturen (n=14) und einer gesunden Kontrollgruppe gleichen Alters (n=36) durch die Strukturanalyse mit Hilfe des Mikro-Computertomographen signifikante Unterschiede finden liessen. Die trabekuläre Struktur der osteoporotischen Knochen wies charakteristische Unterschiede zur Kontrollgruppe auf. Zusätzlich zur reduzierten Knochendichte war die Anzahl der Trabekel vermindert und der Abstand zwischen den Trabekeln vergrössert. Es fand sich keine signifikante Änderung der Trabekeldicke.

Vergleicht man die humanen Strukturparameter mit denen der Schafe und unterscheidet zwischen den gesunden und osteoporotischen Individuen, dann ergeben sich folgende Zusammenhänge:
Die Anzahl der Trabekel (Tb.N) in den Beckenkammbiopsien der humanen Kontrollgruppe betrug $1,9 \pm 0,2$ /mm. In der osteoporotischen Patientengruppe wurden Werte von $1,7 \pm 0,15$ /mm gemessen. Bei den zu Studienbeginn noch unbehandelten Schafen lag die Trabekelanzahl bei $1,49 \pm 0,15$ /mm. Nach einer Behandlungszeit von sieben Monaten änderten sich diese Werte auf $1,21 \pm 0,17$ /mm.
Die Trabekelanzahl nahm beim Menschen um 12 % ab, beim Schaf nahm sie um 19 % ab.
Die Dicke der Trabekel (Tb.Th) in den Beckenkammbiopsien wurde bei der humanen Kontrollgruppe mit $0,16 \pm 0,04$ mm angegeben. Bei den osteoporotischen Menschen hatten die Trabekel eine Dicke von $0,15 \pm 0,04$ mm. Die unbehandelten Schafe hatten bei der Untersuchung der Dicke der Trabekel Werte von $0,11 \pm 0,04$ mm und nach der Behandlungszeit von $0,07 \pm 0,01$ mm.
Die Trabekeldicke reduzierte sich beim Menschen um 6 %, beim Schaf um 36 %.

Der Abstand der Trabekel (TB.Sp) betrug in der humanen Kontrollgruppe 0,36 ± 0,08 mm. Die osteoporotischen Beckenkammbiopsien hatten im Vergleich dazu Werte von 0,45 ± 0,08 mm. Bei den unbehandelten Schafen wurde der Abstand der Trabekel mit 0,57 ± 0,08 mm und bei den behandelten Schafen mit 0,77 ± 0,13 mm ermittelt.
Die Zunahme des Abstandes zwischen den Trabekeln machten beim Menschen 20 % aus, beim Schaf nahm er um 35 % zu.
Das Verhältnis von Knochenoberfläche zu Knochenvolumen (BS/BV) betrug bei den gesunden Menschen 12,73 %, bei der osteoporotischen Patientengruppe 15,21 ± 3,37 %. Die unbehandelten Schafe hatten ein Knochenoberflächen- zu Knochenvolumenverhältnis von 19,9 ± 5,15 %. Nach acht Monaten wurden Werte von 29,2 ± 5,17 % gemessen.
Das Verhältnis von Knochenoberfläche zu Knochenvolumen nahm beim Menschen um 20 % zu, das der Schafe nahm um 47 % zu.
Das Verhältnis von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen der Probe (BV/TV) betrug in der humanen Kontrollgruppe 0,32 ± 0,09 %, in der osteoporotischen Gruppe 0,25 ± 0,08 %. Bei der Untersuchung der Beckenkammbiopsien der unbehandelten Schafe wurden diese Werte mit 0,16 ± 0,06 % und bei den behandelten Schafen mit 0,09 ± 0,02 % angegeben.
Eine Abnahme im Verhältnis von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen war sowohl bei den Menschen mit 22 % als auch bei den Schafen mit 44 % zu erkennen.
Vergleicht man die prozentuale Änderung zwischen den nicht-osteoporotischen und den osteoporotischen Kollektiven, so wird deutlich, dass sich die Werte tendenziell gleich verhalten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die absoluten Werte der Schafe in unterschiedlichem Ausmass von denen der Menschen unterscheiden. Tendenziell verhielten sich die Änderungen aber vergleichbar.
Der trabekuläre Knochen des gesunden Schafes hatte verglichen mit dem gesunden Menschen eine um 27 % geringere Trabekelanzahl, die Trabekeldicke war beim Schaf um 45 % geringer und der intertrabekuläre Abstand war beim Schaf um 37 % grösser. Das Verhältnis

Knochenoberfläche zu Knochenvolumen war beim Schaf um 36 % grösser als beim gesunden Menschen und hatte im Verhältnis von Knochenvolumen zum Gesamtvolumen einen 100 % niedrigeren Ausgangswert als beim gesunden Menschen.

Das von uns verwendete Schweizer Bergschaf hat neben einer geringeren Knochendichte auch bezüglich der Knochenstrukturparameter Werte, die im Vergleich zum Menschen osteopenisch sind. Um einen, mit dem Menschen vergleichbar osteoporotischen Knochen zu erhalten, muss nicht das gleiche Ausmass an Knochenmasseverlust erzielt werden.

Bei einem Vergleich der Werte innerhalb der osteoporotischen Gruppen erkennt man, dass die Trabekelanzahl bei den osteoporotischen Schafen um 40 % geringer war als in der humanen osteoporotischen Gruppe. Die Trabekeldicke war beim Schaf um 114 % geringer als beim Menschen und der trabekuläre Abstand war beim Schaf um 58 % grösser. Das Verhältnis Knochenoberfläche zu Knochenvolumen war beim osteoporotischen Schaf um 52 % grösser und das Verhältnis von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen zeigte bei den osteoporotischen Schafen 177 % geringere Werte auf als in der humanen Vergleichsgruppe.

Tab. 5.3 Vergleich zwischen den Strukturparameterdifferenzen von Mensch und Schaf

Vergleich	Schaf	Mensch	Schaf	Mensch
	gesund		osteoporotisch	
Tb.N	-27 %	0 %	- 40 %	0 %
Tb.Th	- 45 %	0 %	- 114 %	0 %
Tb.Sp	+ 37 %	0 %	+ 58 %	0 %
BS/BV	+ 36 %	0 %	+ 52 %	0 %
BV/TV	- 100 %	0 %	- 177 %	0 %

Im Rahmen der Osteoporoseinduktion kam es bei den Schafen zu einer deutlicheren Veränderung der Knochenstrukturparametern im Sinne von

Osteoporose, als bei dem von Ito et al. (1998) beschriebenem humanen Kollektiv.

E. Legrand et al. (2000) untersuchten spongiösen Knochen bei Männern (n=108; mittleres Alter von 52,1 Jahren) mit lumbaler Osteopenie (T-score< -2,5). Dabei kamen konventionelle Histologie am Beckenkamm und DXA an der Lendenwirbelsäule zum Einsatz. Sie interessierte der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Wirbelfrakturen und den damit einhergehenden Veränderungen bei Knochendichte und Mikroarchitektur. Histomorphometrisch fanden sich tendenziell die gleichen Veränderungen wie bei Ito et al. (1998). Zusätzlich wurde festgestellt, dass die trabekuläre Mikroarchitektur ein maßgeblicher, unabhängiger Faktor für das Auftreten von Wirbelfrakturen bei osteoporotischen Männern mittleren Alters ist. Die Trabekelzahl (Tb.N) ist dabei ein signifikanter Prädiktor für das Auftreten von Wirbelkörperfrakturen. Ob dies so auch für die Wirbelkörper des Schafs gilt, ist nicht geklärt. Bei den Tieren dieser Studie konnte aber nach Osteoporoseinduktion eine reduzierte mechanische Kompetenz des spongiösen Knochens nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Strukturparameter bei Mensch und Schaf in ihrem Muster der Veränderungen (prozentuale Abnahmen bei Tb.N und Zunahmen bei Tb.Sp) durchaus ähnlich sind, in ihren absoluten Werten aber Unterschiede aufweisen. Die Ursache dafür kann in physiognomischen Unterschieden zwischen Mensch und Schaf sowie den daraus resultierenden verschiedenen biomechanischen Belastungen des untersuchten Knochenmaterials liegen. So werden an die menschliche Wirbelsäule ganz andere statische Anforderungen (vertikale Belastung) gestellt als an die eines Schafs (horizontale Belastung). Skelett und Muskulatur sind an sehr verschiedenartige Bewegungsabläufe angepasst (zweibeiniger Gang beim Mensch und vierbeiniger Gang beim Schaf). Darüber hinaus ist bei einem Vergleich mit anderen Studien immer zu bedenken, dass sich ein anderes Auswahlkriterium für die Kollektivzusammenstellung oder eine andere Untersuchungsmethode ebenfalls auf die Messergebnisse auswirken kann.

5.4 Mechanische Testung

Für die mechanische Prüfung osteoporotischer Knochen werden in einem Entwurf der Food and Drug Administration (Food and Drug Administration, 1994) verschiedene Verfahren aufgeführt und empfohlen. Zur Testung des trabekulären Knochens stehen Kompressionsverfahren im Vordergrund. Für die Überprüfung der mechanischen Eigenschaften des kortikalen Knochens bedient man sich verschiedener Zug-, Biegungs- und Torsionstests.

Des weiteren werden Informationen über die Knochenqualität gefordert. Diese beinhalten die Knochenarchitektur, -masse und -festigkeit.

In Fällen, bei denen die Knochendichte nicht positiv mit der Architektur und Festigkeit korreliert, sollen alle drei Teilqualitäten geprüft werden. Da auf eine fehlende Korrelation mit Sicherheit erst nach Testung der geforderten Teilqualitäten geschlossen werden kann, erscheint es unumgänglich, am gleichen Material sämtliche Tests durchzuführen (Food and Drug Administration 1994).

Für die mechanische Testung von Materialien gibt es akzeptierte Normen (ISO, CEN, DIN, ASTM, usw.). Diese normierten Tests setzen alle eindeutig definierte Probengeometrien und eine homogene Materialzusammensetzung voraus. Normen zur mechanischen Testung von Knochen existieren nicht. Bei der Materialprüfung von Knochen müssen bezüglich der Homogenität des Materials weitreichende Kompromisse akzeptiert werden.

Als Testknochen werden Röhrenknochen und lumbale Wirbelkörper vorgeschlagen (Food and Drug Administration 1994).

Die biomechanischen Eigenschaften des Knochens unterscheiden sich von anderen Materialien.

Da der Knochen ein heterogenes, anisotropes Material ist, hängen experimentelle Ergebnisse unter anderem von der anatomischen Herkunft des Testobjektes ab.

Intakte Knochen bestehen aus zwei verschieden organisierten Strukturen, dem kortikalen und spongiösen Anteil. Die Spongiosa grenzt an der Innenfläche mit ihrem dreidimensionalen Gerüst aus Knochenlamellen und

Bälkchen an die sie umgebene äussere, feste Struktur, die Kortikalis (Bouxsein et al., 1996).

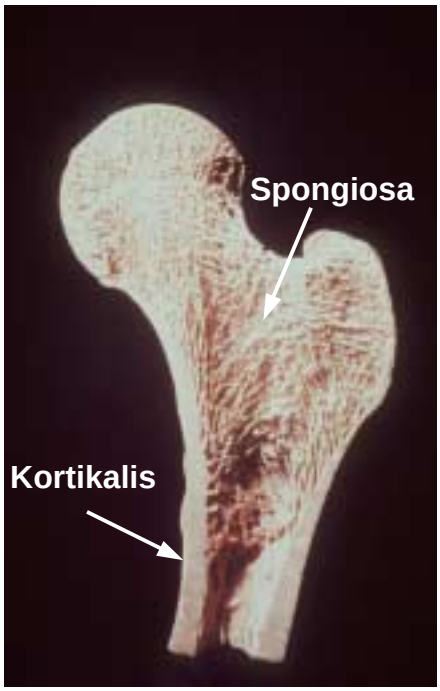


Abb. 5.3 Makroskopische Darstellung eines humanen proximalen Femurs im Längsschnitt

Für die mechanische Testung des Knochens kann man entweder kortikalen oder spongiösen Knochen verwenden (Natali und Meroi, 1989). Im Gegensatz zur Kompakta sind im Bereich der Spongiosa raschere Mineralverluste zu erwarten. Der Grund besteht in einer grösseren Knochenoberfläche, die für einen Umbau zugänglich ist. Bei Osteoporose wird die Mikroarchitektur des Gewebes nach und nach zerstört. Der Knochen verliert an Substanz, wird porös und verliert an Stabilität. So kommt es durch axiale Druckkraft vor allem an spongiösen Knochen zu Kompressionsfrakturen (Bouxsein, 1996).
Die mechanischen Eigenschaften von Knochen werden beeinflusst von Veränderungen der Qualität des Knochenmaterials, Veränderungen der Knochenvolumendichte und Veränderungen der geometrischen Verteilung. Zusätzlich spielt die Anordnung der Trabekel eine wesentliche Rolle.

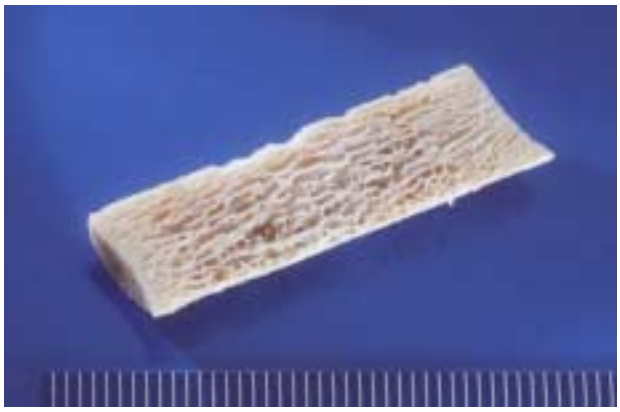


Abb. 5.4a
Makroskopische Darstellung einer mazerierten Schafswirbelkörperbiopsie im Längsschnitt

Abb. 5.4b
Makroskopische Darstellung einer mazerierten Schafsfemurkopfbiopsie im Längsschnitt

Bei anisotropen Strukturen können die mechanischen Eigenschaften je nach Belastungsrichtung stark variieren.
Versuchsbedingte Parameter wie Grösse des Prüfstückes, Vorbehandlung, Temperatur, Feuchtigkeitsgrad und technische Grössen wie Frequenz und Dauer der Belastung haben ebenso Einfluss auf die Resultate wie biologische Variablen, Alter, Geschlecht, Rasse und Grad der Aktivität (Bouxsein, 1996).
Laut Borchers et al (1995) sind keine wesentlichen Einflüsse durch mehrfaches Gefrieren und Auftauen der Knochenproben im Bezug auf die Eigenschaften bei der mechanischen Testung zu erwarten.
In dieser Studie ist ein Quervergleich zwischen den Gruppen zulässig, da alle getesteten Knochen ähnliche Abweichungen vom Ideal der Geometrie und der Materialeigenschaften aufwiesen.

Zur Erfassung von geringfügigen Unterschieden im Bezug auf unterschiedliche Knochenstrukturen müssen verschiedene Testmethoden in Betracht gezogen werden.

Kompressionstest:

Zur Testung von trabekulärem Knochen wird in erster Linie das statische Prüfverfahren genutzt. Beim statischen Druckversuch verwendet man Knochenzylinder. Kraft- Weg- Diagramme werden aufgezeichnet. Als Bruchkriterium dient die erste Zacke im Diagramm.

Die maximale Grösse der Prüfkörper ist durch den Homogenitätsanspruch vorgegeben. Zur Nutzung von Knochenzylindern eignen sich nach Keaveny Prüfkörper mit einem Länge/Durchmesser- Quotienten von 2:1 bzw. 1:1 (Keaveny et al., 1993). Die minimale Grösse eines Knochenprüfstückes sollte im allgemeinen 1.5 - 2 mm (Knets, 1987) mit einem Querschnitt von 4 - 20 mm (Reilly und Burstein, 1974) betragen. Damit ist gesichert, dass ausreichend verschiedene Haverssche Systeme vorhanden sind, um eine aussagekräftige Testung zu ermöglichen.

In dieser Studie wurden $2 \times 2 \times 32$ mm grosse Proben verwendet.

Für den Druckversuch müssen bei den Probekörpern zwei planparallele Flächen geschaffen werden. Der Druck muss axial ausgerichtet sein.

Ein Bruchlastdiagramm weist folgende Abschnitte auf:

Das Diagramm beginnt mit der “unproportionalen Kontaktphase”. In diesem Bereich steigt die Belastung stärker als die Kompression. Während der “Proportionalitätsphase” kommt es zu einem linearen = elastischem Kurvenverlauf. Bei Entlastung nimmt der Knochen seine Ausgangslänge wieder ein. Die “plastische Verformung” des Segmentes wird dadurch bedingt, dass die Kompression stärker zunimmt als die Kraft. Beendet wird die plastische Verformung durch den “Bruch”. Es kommt zu einer Zersplitterung des Segmentes.

Affentranger (1995) hat die Spongiosa von Hundewirbelkörpern ohne Verfälschung durch Kortikalisanteile mittels Eindrucktests komprimiert. Es resultierte eine hohe Korrelation zwischen mechanischer Festigkeit und Dichte. Auch Lotz et al. (1990). konnten eine positive Korrelation zwischen Knochendichte (QCT) und Kompressionsfestigkeit bei Hundefemura feststellen.

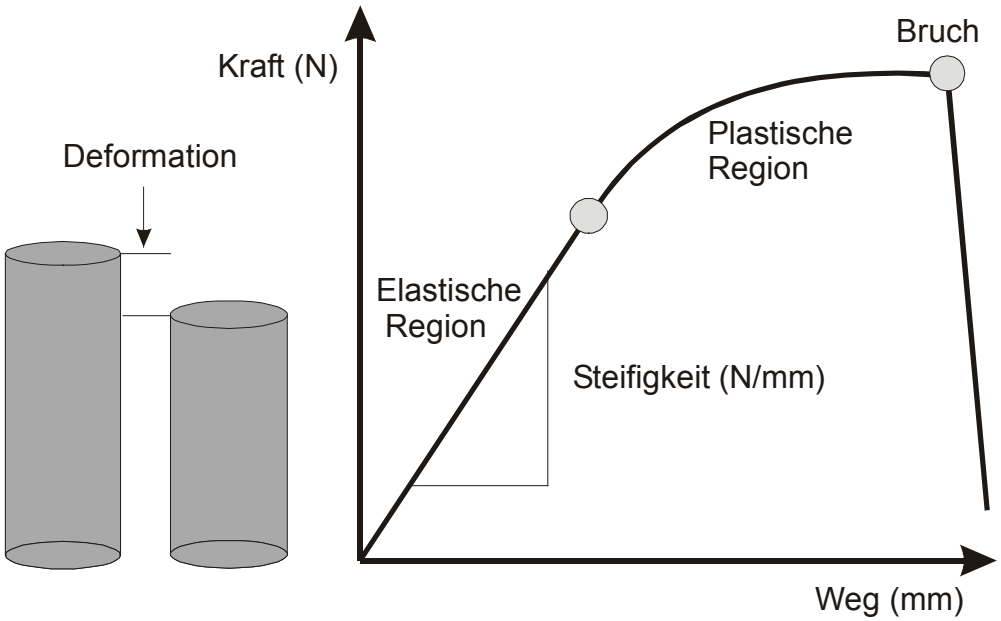


Abb. 5.5 Bruchlastdiagramm (nach Bouxsein et al., 1996)

Beim Hund wurden von Yamaura et al. (1993) ganze Wirbelkörper mittels Kompression getestet. Die Ovarektomie reduzierte die Wirbelsteifigkeit signifikant.

Bei den in dieser Studie durchgeführten Kompressionstests wurden Knochenbiopsien des Femurkopfes und Knochenproben von Lendenwirbelkörpern eingesetzt. Als Parameter wurden die Versagenslast in (kN) und die Steifigkeit in (N/mm) bestimmt. Dabei zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Torsionstest:

Torsionsversuche sind Tests, mit denen auch der mechanische Widerstand untersucht wird.

Yamaura et al. (1993) haben beim Hund Femura mittels Torsion getestet. Die Ovarektomie hatte aber keinen Einfluss auf die Torsionssteifigkeit der Femura.

In dem in dieser Studie durchgeführten Torsionstest wurde die Stabilität beider Tibiae geprüft. Es wurden das maximale Drehmoment in (Nm) und der Bruchwinkel in (°) bestimmt. Die Ergebnisse zeigten auch in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die Torsionsbelastung der Knochen fand bis zur Fraktur statt.

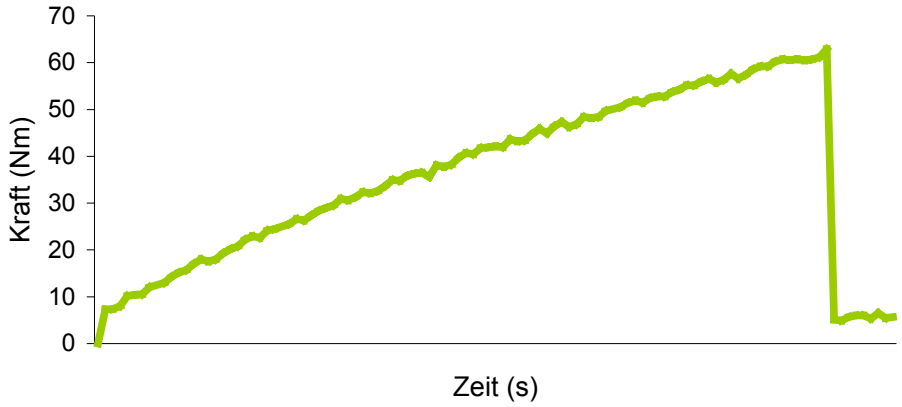


Abb. 5.6 Torsionsdiagramm

Bei der Torsion der Tibiae waren versuchstechnisch bedingt das proximale Knochenende incl. Schraube bzw. distale Ende der Knochen in Kunststoff fixiert. Der Bruch der Knochen erfolgte somit an den Stellen, an denen sich physiologischerweise nur Kortikalis befindet. Die nicht signifikanten Ergebnisse im Torsionstest korrelierten mit den ebenfalls nicht signifikanten Ergebnissen in der Veränderung der Knochendichte des kortikalen Knochens.

Biegetest:
Drei- Punkt- und Vier- Punkt- Biegetests sind häufig angewendete Techniken zur Bestimmung der mechanischen Knocheneigenschaften.
Für einen Biegetest sollen bestimmte Kriterien beachtet werden. Dazu gehört das Spannweiten- Knochendicken- Verhältnis. Die Spannweite einer Knochenprobe soll das 16- fache der Knochendicke betragen.
Bei uns wurden $2 \times 2 \times 32$ mm grosse Proben eingesetzt.
Turner und Burr (1993) fordern eine Mindestlänge von 20 mm. Ausserdem soll die Probe zur Prüfung linear elastisch, isotrop, homogen und gerade sein. Keine dieser Anforderungen trifft auf den Knochen zu. Da jedoch alle von uns getesteten Proben ähnliche Abweichungen vom Ideal der Materialeigenschaften aufwiesen, erscheint ein Quervergleich zwischen verschiedenen Gruppen als zulässig. Vorteil der Drei- Punkt- Biegung liegt in der Einfachheit, der Nachteil in hohen Scherkräften unter dem belastenden Pol.

Bei der in dieser Studie genutzten Vier- Punkt- Biegung konnte zwischen den inneren Auflagepunkten eine reine Biegung erzeugt werden. Bei den Biegetests wurden die Parameter Kraft und Deformation digital aufgezeichnet und daraus die Versagenslast in (N) und Steifigkeit in (MPa) berechnet.
Bei der Vier- Punkt- Biegung wurden zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede erkannt. Dieses passt zu der Aussage, dass sich auch die kortikale Knochendichte im Verlauf der Studie nicht signifikant unterschied. Die Knochendichteverluste am kortikalen Knochen der behandelten Schafe betrugen –2 %. Unterschiede der Brüchigkeit der kortikalen Proben von 2 % sind in der Vier– Punkt– Biegung nicht zu differenzieren.

5.5 Laborparameter

Häufig ist die Fraktur der erste Hinweis einer bestehenden Osteoporose. Der Knochen wird infolge einer reduzierten Knochenmasse brüchig.
Einen Überblick über Knochenstoffwechselveränderungen erhält man durch Messung der Enzymaktivität von knochenaktiven Zellen oder durch Messung von Bestandteilen der Knochenmatrix, die in den Kreislauf gelangen (Delmas, 1988).
Der Vorteil in der Erfassung von spezifischen Serum- und Urinmarkern liegt darin, dass das dynamische und rasch wechselnde Knochenstoffwechselgeschehen dargestellt wird. Im Gegensatz dazu entspricht die osteodensitometrisch messbare Knochenmasse dem langfristigen Nettoeffekt aus Knochenneubildung und Knochenresorption. Es handelt sich um eine statische, sich langsam verändernde Grösse.
Die Diagnostik des Knochenstoffwechsels durch quantitative Knochendichtemessungen kann durch die Bestimmung von biochemischen Markern ergänzt werden.
Zusammen mit klinischen und bildgebenden Verfahren erlauben die biochemischen Knochenstoffwechselparameter die nicht- invasive Evaluation des skelettalen Status des Patienten. Sie werden bei Fragestellungen verwendet, welche die Vorhersage des zukünftigen Knochenmasseverlustes bzw. die Abschätzung des aktuellen Knochenumsatzes betrifft.

Keine der derzeit verfügbaren biochemischen Marker des Knochenstoffwechsels können im Sinne einer Einzelmessung zur Diagnose der Osteoporose herangezogen werden. Ist die Osteopenie oder Osteoporose aber gesichert, liefern die Biomarker Orientierungshilfen bei der weiteren Evaluation (Seibel, 1999).
Mit der Bestimmung der Knochenmasse und des Knochenumsatzes stehen zwei komplementäre diagnostische Verfahren zur Verfügung, die jeweils unterschiedliche Aspekte der skeletalen Homöostase beleuchten. Sie ergänzen sich bei der Diagnostik und Verlaufskontrolle (Seibel, 1999).

Das Knochenvolumen wird durch die Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten bestimmt. Die Mechanismen der Formation und Resorption sind zeitlich und räumlich eng miteinander verbunden, so dass sie Umbaueinheiten bilden. Die Knochenmasse hängt von diesen ab. Weiterhin wird sie durch die Anzahl von Umbaueinheiten in einer bestimmten Zeit und in einer bestimmten Knochengegend bestimmt (Delmas, 1988).
Durch unterschiedliche Einflussfaktoren kann ein Ungleichgewicht im Formations- und Resorptionsverhältnis entstehen. Dazu zählen kalziotrope Hormone (Parathormon, 25 OH- Vitamin D), Steroide (Glukokortikoide) und Zytokine (IGF = insulinähnliche Wachstumsfaktoren; PDGF = Plättchen-wachstumsfaktoren; TGF = Gewebewachstumsfaktoren) (Seibel, 1999).
Der Mechanismus der steroidinduzierten Osteoporose ist nicht endgültig geklärt. Es gibt bei der steroidinduzierten Osteoporose eine Abnahme in der Osteoblastenaktivität. Das Ergebnis zeigt sich in einer verminderten Knochenmatrixsynthese und in einer verminderten Lebensdauer der Osteoblasten (Eastell et al., 1998).
Glukokortikoide negativieren die Bilanz von Kalzium- und Knochenstoffwechsel über verschiedene Mechanismen. Sie hemmen die Proliferation und Knochenmatrixsynthese der Osteoblasten und fördern die Knochenresorption durch Osteoklasten. Ursache der reduzierten Osteoblastenaktivität ist eine direkte, kortisoninduzierte Erniedrigung von IGF I und II und TGF-ß sowie der Bindungsproteine und IGFBP, die als Hauptstimulatoren der Osteoblasten gelten. Die ebenfalls direkt durch Cortison inhibierte Wachstumshormon- und Testosteronsekretion verstärkt die

Hemmung der Osteoblasten. Osteocalcin im Serum, ein Stoffwechselprodukt der Osteoblasten und ein Marker ihrer Aktivität, nimmt ab.
Die Osteoklasten werden überwiegend indirekt stimuliert. Glukokortikoide hemmen die aktive Resorption von Kalziumionen im Darm und fördern die Kalziumausscheidung durch die Niere. Es kommt zu einem leichten Abfall des Serum-Kalziumspiegels. Dieser ist nicht so gross, dass der Normwert unterschritten wird, reicht aber aus, um Parathormon zu aktivieren. Gleichzeitig inhibiert Cortison die endogene Calcitoninsekretion der Schilddrüse. Beide Faktoren, erhöhtes Parathormon und vermindertes Calcitonin, verstärken die Aktivität der Osteoklasten. Der erhöhte Knochenabbau lässt sich anhand erhöhter Desoxypyridinolinwerte im Urin nachweisen (Kaiser und Ringe, 1996).

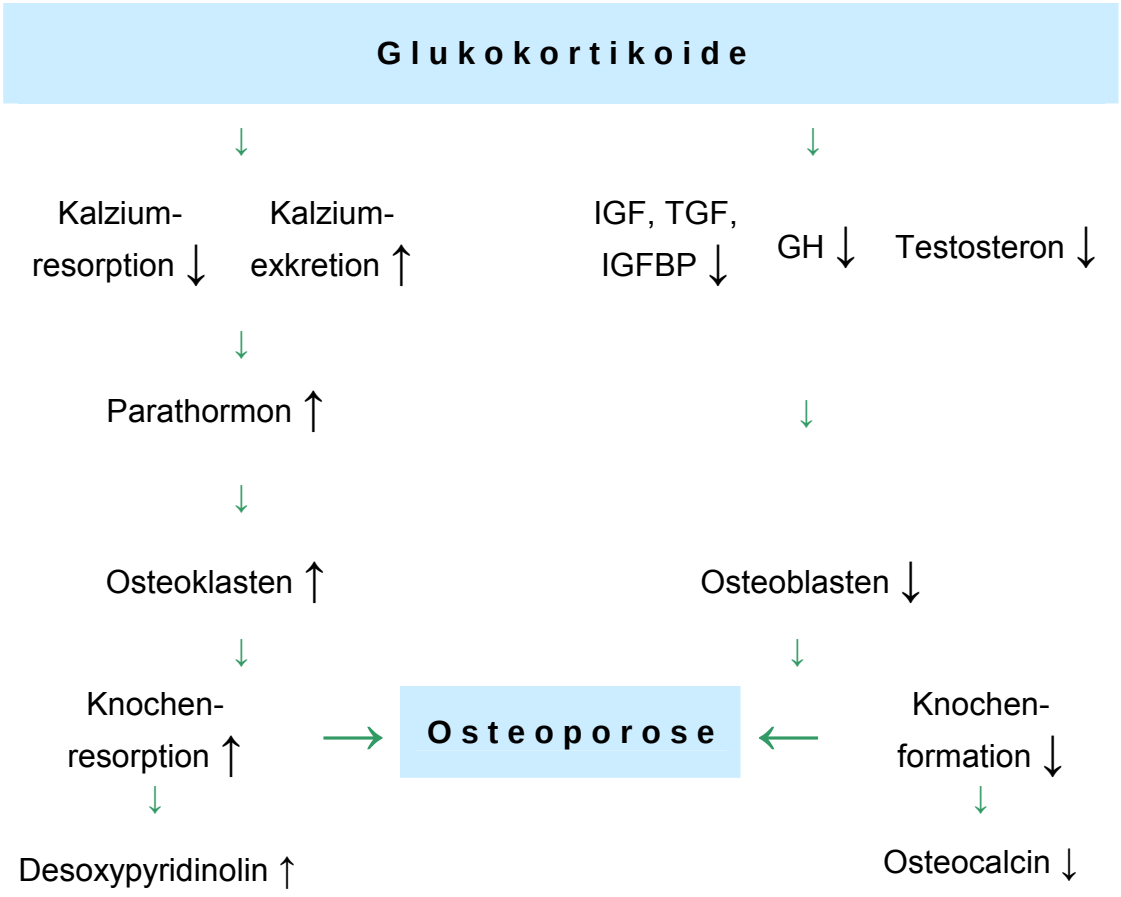


Abb. 5.7 Einfluss von Glukokortikoiden auf den Knochenstoffwechsel

Eine weitere Ursache für die Entstehung einer Osteoporose besteht in einem Mangel an Östrogenen. Physiologischerweise wird durch Östrogen die

Knochenformation stimuliert, so dass es bei einem Mangel zu einer verminderten Neubildung an Knochensubstanz kommt (Price und Thompson, 1995).
Die erste Konsequenz nach Abfall der Östrogenspiegel ist nicht völlig geklärt. Es handelt sich um eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Parathormon. Nach verschiedenen Untersuchungen sind ein mit dem Östrogenentzug parallel auftretender Abfall der endogenen Calcitoninsekretion und ein Anstieg von Interleukin 1 beteiligt. Interleukin 1 ist ein sehr potenter Osteoklastenstimulator. Der sich anschliessende leichte Anstieg des Serumkalziumspiegels drosselt die Parathormonsekretion mit dem Ergebnis einer reduzierten Hydroxylierung von 25-Hydroxycholecalciferol in den Nieren zum aktiven 1,25-Dihydroxycholecalciferol. Die Folge ist eine verminderte enterale Kalziumresorption und ein relativer Abfall des Serumkalziumspiegels, so dass ein Circulus vitiosus in Gang gesetzt wird (Ringe, 1995).

Zu den biochemischen Markern, die den Knochenanbau widerspiegeln, gehören die alkalische Serumphosphatase, die knochenspezifische alkalische Phosphatase, das Osteocalcin und das carboxyterminale Prokollagen Typ I Propeptid (PICP).
Biochemische Marker, welche die Knochenresorption darstellen, sind das Kollagen- Crosslinks- Pyridinolin und Desoxypyridinolin, die tartratresistente saure Phosphatase und die Kalziumausscheidung im Urin.
Die Formationsmarker werden im Blut, die Resorptionmarker im Urin bestimmt. Unterschiede gibt es dadurch hinsichtlich der Konzentration. Parameter, die im Blut bestimmt werden, zeigen Momentaufnahmen einer bestimmten Konzentration. Im Urin findet im Gegensatz dazu eine Aufkonzentrierung der Stoffwechselprodukte über mehrere Stunden statt. Diese Unterschiede können zu erheblichen Problemen bei der Interpretation des Knochenstoffwechsels führen.

Biochemische Marker des Knochenanbaus:
Die alkalische Phosphatase (ALP) ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym mit hoher Anreicherung in Osteoblasten. Die grösste Aktivität wird in der Phase der Matrixreifung gemessen. Die Serumgesamtaktivität der ALP stammt beim

gesunden Erwachsenen hauptsächlich zu etwa gleichen Teilen aus der Leber und dem Knochen (Kyd et al., 1998). Geringfügig wird sie auch im Intestinum, der Niere und der Plazenta gebildet. Nach Delmas und Garnero (1996) wird die ALP trotz geringer Spezifität und Sensitivität wegen der einfachen Bestimmungsmethode am häufigsten zur Darstellung der Knochenstoffwechselaktivität gebraucht.
In mehreren Studien nimmt die Aktivität der ALP bei älteren Menschen, speziell bei Frauen nach der Menopause, zu. Bei Patienten mit vertebraler Osteoporose sind die Werte normal oder leicht erhöht.
Um die Spezifität zu erhöhen, kann von der ALP ein Isoenzym abgespaltet werden, welches die knochenspezifische alkalische Phosphatase darstellt. Damit entfallen Einflüsse auf die ALP, die durch Lebererkrankungen entstehen können.
Für Schafe liegt der Referenzbereich der alkalischen Phosphatase zwischen 44-355 U/l. Bei jungen Tieren liegen die Aktivitäten vermutlich durch gesteigerten Knochenstoffwechsel höher. Jahreszeitliche Schwankungen zeigen im Winter eine verminderte Phosphataseaktivität (Pernthaner et al., 1993).
Unsere Ergebnisse der alkalischen Phosphatase zeigen sowohl innerhalb einer Gruppe, als auch zwischen den beiden Gruppen starke Schwankungen.
Eine Beeinflussung der Konzentration durch die Ovarektomie und Glukokortikoidbehandlung war nicht erkennbar. Dies kann damit erklärt werden, dass die gesamtalkalische Phosphatase sehr unspezifisch ist und von vielen Faktoren beeinflusst wird.

Osteocalcin (OC), auch bone gla- protein genannt, ist ein spezieller Marker für Knochen und Dentin. Es ist ein Produkt aktiver Osteoblasten. Osteocalcin ist ein hochspezifischer Marker der Knochenneubildung (Stracke et al., 1987). Das Vitamin- K- abhängig produzierte Protein wird zum grössten Teil sofort in die Knochenmatrix integriert. Ein geringer Teil gelangt in die Zirkulation, wo es einer schnellen Biodegradation durch proteolytischen Abbau unterliegt (Delmas und Garnero, 1996). Damit findet die Expression von Osteocalcin in der Phase der Mineralisation statt.

Osteocalcin im Serum ist nach der Menopause oft signifikant erhöht. Damit reflektiert es den unter Östrogenentzug gesteigerten Knochenumsatz.
Unter glucokortikoidinduzierter Osteoporose finden sich regelmässig erniedrigte OC- Werte, da es hier zur Depression der Osteoblastenfunktion kommt.
Vergleiche zwischen dem Serum Osteocalcinspiegel mit Kalziumstoffwechseldaten und histomorphometrischen Daten einer Beckenkammbiopsie zeigen, dass Osteocalcin ein gültiger Marker für den Knochenstoffwechsel ist, wenn die Knochenresorption und Knochenformation gleichzeitig auftreten. Das OC kann als spezifischer Marker gesehen werden, wenn die Formations- und Resorptionsrate nicht gleichzeitig verändert ist (Delmas und Garnero, 1996).
Infolge von unzuverlässigen Werten in der Pilotstudie, wurden die OC-Spiegel in dieser Studie nicht mehr bestimmt.

Die von den Osteoblasten gebildete Knochenmatrix besteht aus Typ I Kollagen, das als Prokollagen sezerniert wird. Extrazellulär erfolgt die enzymatische Abspaltung der terminalen Extensionspeptide (carboxyterminales Propeptid- PICP, aminoterminales Propeptid- PINP) (Tohmé et al., 1991). Das so bei der Matrixbildung abgespaltene PICP ist im Serum messbar und reflektiert die osteoblastäre Aktivität.
Garnero und Delmas sowie Simon und Krane beschreiben, dass die PICP-Konzentration im Blut durch Prednisolon absinkt (Garnero und Delmas, 1996; Simon und Krane, 1983). Es besteht eine Korrelation zwischen Serum PICP und histomorphometrischen Anbauparametern sowie mit anderen biochemischen Markern des Knochenanbaus (gesamt- alkalische Phosphatase, knochenspezifische alkalische Phosphatase, Osteocalcin).
In dieser Studie wurden die PICP- Spiegel nur exemplarisch an fünf Tieren vorgenommen. Ergebnisse aus der Pilotstudie zeigten keine zufriedenstellenden Ergebnisse, welche diesen Entschluss rechtfertigten.

Biochemische Marker des Knochenabbaus:
Die Kollagen- Crosslinks Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) haben sich im Vergleich zu Hydroxyprolin oder tartratresistenter saurer

Phosphatase als die zuverlässigste und aussagekräftigste Bestimmung zur Abschätzung der Knochenresorptionsrate erwiesen (Seibel et al., 1994).

Die Pyridiniumkomponenten Pyridinolin und Desoxypyridinolin werden durch Spaltung der Matrixkollagene während der Kollagenreifung gebildet und bei der Knochenresorption freigesetzt. PYD und DPD gelangen zum einen Teil frei und zum anderen Teil peptidgebunden über die Niere in den Urin (Seibel, 1996). Der Anteil der freien Moleküle beträgt dabei 40 %, der der peptidgebundenen 60 % (Delmas, 1993). Infolge einer fehlerhaften Nierenfunktion kann die Ausscheidung der Pyridiniumkomponenten negativ beeinflusst werden (Robins, 1983). Um diesen Nachteil auszugleichen, werden in dieser Studie die Pyridinolin und Desoxypyridinolinwerte auf die Bezugsgrösse (Kreatinin) korrigiert.

Pyridinolin und Desoxypyridinolin zeichnen sich durch eine hohe Spezifität für skelettale Gewebe aus. Pyridinolin ist auch im Knorpel nachweisbar, so dass bei entzündlichen und degenerativen Gelenkerkrankungen gelegentlich erhöhte Werte dieser Crosslinks- Komponente (bei normalem Desoxypyridinolin) zu beobachten sind (Seibel et al., 1993).

Das Verhältnis von PYD zu DPD beträgt im menschlichen Knochen ungefähr 1: 1 (Delmas,1993).

Die Ausscheidung der Collagen- Crosslinks steigt beim älteren Menschen an (Delmas et al., 1993).

Bei der Frau zeigen die Crosslinks- Werte zu Beginn der Menopause im Gegensatz zu den prämenopausalen Werten einen Anstieg um 80 - 100 %. Unter Östrogentherapie sinken diese Spiegel wieder (Uebelhart et al., 1991).

Bei der postmenopausalen Osteoporose fällt besonders die abnorm gesteigerte Ausscheidung der knochenspezifischen Crosslinks- Komponente auf.

In der Studie konnten wir ähnliches beim Schaf erkennen. Die Werte des Pyridinolin und Desoxypyridinolin lagen zu Versuchsbeginn bei den Tieren der Kontrollgruppe mit einem Alter zwischen drei und fünf Jahren wesentlich niedriger als bei den behandelten Tieren mit einem Alter zwischen sieben und neun Jahren. Es war zu beobachten, dass die Werte des Pyridinolin und Desoxypyridinolin einen Monat nach Ovarektomie signifikant anstiegen und anschliessend wieder leicht abfielen. Dieses ist auf den erhöhten

Knochenstoffwechsel infolge des Östrogenmangels zurückzuführen. Der ovarektomiebedingte Konzentrationsanstieg stimmt mit Ergebnissen aus einer anderen Studie überein. Wirner (1997) beschreibt ebenfalls einen Anstieg der Konzentration der Crosslinks bei Minischweinen einen Monat nach Ovarektomie.
Auch die Gabe der Glukokortikoide zeigte eine Auswirkung auf die Knochenstoffwechselsituation. Die Werte des Pyridinolin und Desoxypyridinolin stiegen nach der Umstellung der Steroidgabe von 120 mg auf 200 mg pro Woche an. Der Pathomechanismus der sekundären, glukokortikoidinduzierten Osteoporose beruht auf der Reduzierung der Knochenformation bei gleichzeitiger Steigerung der Knochenresorption.

Hydroxyprolin ist ein häufig genutzter Marker der Knochenresorption, obwohl er eine Reihe von Grenzen aufweist. Hydroxyprolin wird bei Knochenerkrankungen mit hohem Gewebeumsatz vermehrt ausgeschieden.
Es wird von der Leber schnell verstoffwechselt, so dass nur 10 % im Urin ausgeschieden werden. Hydroxyprolin entstammt nur zum Teil dem Knochen, da das Kollagen anderer mesenchymaler Gewebe hydroxyprolinhaltig ist.
Aufgrund dieser Tatsache haben wir uns gegen die Verwendung von Hydroxyprolin als Marker der Knochenresorption entschieden.

Die saure Phosphatase wird in der Prostata, Knochen, Erythrozyten, Thrombozyten, Milz und Niere gebildet.
Die Osteoklasten bilden ein tartratresistentes Isoenzym der sauren Phosphatase, das somit als Parameter der Knochenresorption bestimmt werden kann. Dieses Enzym wird selten bestimmt, weil es sich im Serum sehr instabil verhält (Seibel, 1996). Auch in dieser Studie wurde es nicht verwendet.

Die Kalziumausscheidung im Urin wird im wesentlichen durch die diätische Kalziumzufuhr beeinflusst. Sie ist im eigentlichen Sinne kein Knochenresorptionsmarker, sondern eine von vielen Einflüssen bestimmte Bilanzgrösse des Knochenstoffwechsels (Seibel, 1999) und wurde deshalb nicht von uns bestimmt.

Tab. 5.4 Knochenstoffwechselparameter

Marker (Abkürzung)	Ursprungsgewebe	Proben-material	Spezifität und andere Charakteristika
Alkalische Phosphatase (ALP)	Knochen Leber Intestinum Niere Plazenta Tumoren	Serum	Mittlere Spezifität
Osteocalcin (OC)	Knochen (Osteoblasten)	Serum	Hohe Spezifität
Carboxyterminales Propeptid des Typ I Prokollagen (PICP)	Knochen (Osteoblasten)	Serum	Mittlere Spezifität und Sensitivität. Marker der frühen Osteoblasten-aktivierung
Pyridinolin und Desoxypyridinolin Crosslinks (PYD), (DPD)	PYD: Knochen, Knorpel, Sehnen, Gefässe DPD: Knochen, Dentin	Urin	Hohe Spezifität und Sensitivität, insbesondere für DPD

Die Ergebnisse zeigen, dass die Ovarektomie und zusätzliche Glukokortikoidbehandlung zur Erhöhung der Knochenresorption geführt haben. Die Auswertung der Knochendichte bestätigt mit dem Ergebnis der Knochendichtereduzierung bei den behandelten Tieren das Vorliegen von Osteoporose.

Nach Ergebnissen, die von Eastell et al. (1998) beschrieben wurden, zeigen sich bei der Behandlung mit Glukokortikoiden spezifische Veränderungen. Pyridinolin zeigt eine signifikante Zunahme bei der Behandlung mit Prednisolon. Desoxypyridinolin weist dagegen keine signifikanten Unterschiede im Verlauf auf, so dass die Vermutung geäussert wird, dass die Glukokortikoide keinen Einfluss auf diese Knochenmarker haben.
Bei unseren Untersuchungen konnten keine Aussagen über einen Unterschied zwischen den Gruppen gemacht werden. Die Mittelwerte zwischen der behandelten und unbehandelten Gruppe sind sowohl bei der Untersuchung von Pyridinolin als auch beim Desoxypyridinolin zu allen Zeitpunkten verschieden. Die Zeitprofile der behandelten und unbehandelten

Gruppen sind auf Grund von völlig unterschiedlichen Verläufen nicht zu vergleichen. Auffallend ähnliche Zeitverläufe sind zwischen dem Pyridinolin und dem Desoxypyridinolin zu erkennen, wenn man die Ergebnisse der Tiere aus der behandelten Gruppe untereinander vergleicht.
Über einen Zusammenhang zwischen dem Knochenumbau im Verlauf der Osteoporoseinduktion und der Zu- bzw. Abnahme der Knochenmarker lassen sich keine schlüssigen Aussagen machen.

5.6 Tiermodell

Die postmenopausale Osteoporose ist ein weitverbreitetes gesundheitliches Problem von grosser Tragweite, deren Pathogenese heute noch nicht vollständig verstanden ist. Diese Art der Erkrankung ist ausschliesslich auf den Menschen beschränkt. Zur Klärung und weiterer Forschung über daraus resultierende Folgekrankheiten müssen Tiermodelle zur Verfügung stehen.

Im Tiermodell können interindividuelle Variablen deutlich reduziert werden, indem eine gewissenhafte Auswahl der Tiere vorgenommen wird. In einer Studie mit Tieren soll stets auf gleiche Rasse, gleiches Alter, selbe Herkunft, vergleichbare Grösse und Gewicht geachtet werden.
Die Anforderungen an Tiermodelle sind vielfältig und abhängig von der jeweiligen Fragestellung. Von der US FDA (Food and Drug Administration, 1994) wurden Richtlinien für Osteoporosestudien zusammengestellt. Sie beinhalten die Forderung, dass präklinische Studien zunächst an ovarektomierten Ratten und nachfolgend an einem grossen Tiermodell durchgeführt werden soll. 1994 wurden der Primat, das Schwein und das Schaf als grosses Tiermodell zugelassen.

Allgemein gilt, dass die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen gewährleistet sein muss. Genetische, organische und hormonelle Übereinstimmungen müssen als Auswahlkriterium für ein Tier überprüft werden. Es sollte ausreichendes Hintergrundwissen über biologische Eigenschaften des Tieres vorhanden sein, und die tierexperimentellen Studien müssen zu verallgemeinern sein. Daneben sollten ökologische und

ethische Überlegungen in der Studienplanung berücksichtigt werden (Davidson et al., 1987).

Kalu (1991) definiert ein Tiermodell für Osteoporose als ein lebendes Tier, bei dem ein spontaner oder induzierter Knochenverlust aufgrund eines ovariellen Hormonmangels studiert werden kann. Das Tiermodell muss folgenden Ansprüchen genügen. Das Tier sollte in der Haltung, Pflege und veterinärmedizinischer Betreuung leicht zu handhaben sein. Wichtig ist die Vergleichbarkeit zwischen physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen des Tiermodells mit denen des Menschen. Als letzten Anspruch fordert er die Vergleichbarkeit anderer Phänomene, die mit der zu untersuchenden Krankheit zusammenhängen (Wirkung von Arzneimitteln, Nebeneffekte des Östrogenmangels).

In der Vergangenheit wurden vor allem nichthumane Primaten, Hunde, Katzen, Nagetiere, Kaninchen, Meerschweinchen, Schweine und Schafe untersucht.

Die meisten der nachfolgend besprochenen Tierarten sind im Gegensatz zum Menschen Quadrupeden. Da biomechanische Kräfte neben den Geschlechtshormonen einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation der Knochenmasse ausüben, kann der Östrogenverlust bei Quadrupeden einen anderen Stellenwert haben als bei Bipeden (Turner C.H., 1991).

Tiermodelle:
• Nichthumane Primaten • Hunde • Katzen • Mäuse, Ratten • Kaninchen • Schwein • Schaf

Nichthumane Primaten:

Eine Vielzahl von Artikeln beschreibt die Effekte einer Ovarektomie auf das Skelett von Affen wie Paviane und Makaken. Diese Modelle haben einige Vorteile gegenüber anderen Tiermodellen.

Ein wichtiger Vorteil ist in der Ähnlichkeit des Organsystems mit dem des Menschen zu sehen (Gastrointestinaltrakt, Hormonsystem und Knochenmetabolismus). Der monatliche Zyklus und das Hormonmuster der weiblichen Makaken ähneln dem des Menschen (Hodgen et al., 1977). Mit Ausnahme weniger Primaten existiert keine Tierart, bei der die physiologische Menopause abläuft.

Nach Ovarektomie fanden Miller et al. (1986) eine signifikante Reduktion des Knochenvolumens und eine Verminderung des spongiösen Knochens in Wirbelkörpern.

Weibliche Rhesusaffen, die mit einem Gonadotropin- Releasing- Hormon-Agonisten behandelt wurden, zeigten eine verminderte Knochendichte, die in ihrem Ausmass vergleichbar mit der Abnahme bei postmenopausalen Frauen ist (Mann et al., 1990).

Um als vergleichbares Modell für postmenopausale Frauen zu fungieren, müssen die Primaten ein Mindestalter von vier bis sieben Jahren haben. Der Grund besteht darin, dass sie die höchstmögliche Knochenmasse (peak bone mass) erst dann erreichen, was für die Wirksamkeit der Ovarektomie in Bezug auf die Knochendichteveränderung von Bedeutung ist (Jerome et al., 1993).

Mit höherem Alter der Tiere wirkt sich deren zunehmende Aggressivität nachteilig aus. Sie sind in der Beschaffung teurer und an die Unterbringung werden hohe Anforderungen gestellt. Als weiteres Problem ist das Zoonoserisiko für das Personal zu sehen.

Die geringe verfügbare Tierzahl und die negative Einstellung der Öffentlichkeit sprechen gegen die Verwendung des Primaten als Versuchstier für unsere Fragestellung.

Hunde:

Der Hund bietet als Tiermodell Vorteile. Östrogenmangel bedingt einen Knochenschwund und die Tatsache, dass Hunde ein Haverssches System des kortikalen Knochens besitzen, spricht für die Verwendung in Studien der

Osteoporoseforschung. Die Knochenumbauprozesse im kortikalen und spongiösen Knochen entsprechen dem des Menschen (Boyce et al., 1990).
Im Umgang sind Hunde im Vergleich zum Primaten einfacher zu handhaben, ebenso sind sie kostengünstiger.
Boyce konnte im Gegensatz zu anderen Untersuchern (Martin et al., 1987; Malluche et al., 1986; Faugere et al., 1990; Monier-Faugere et al., 1993) keine signifikante Abnahme der Knochenmasse nach Ovarektomie feststellen.
Ovulation kommt bei einer Hündin zweimal pro Jahr vor, während Menschen und Affen polyovulatorisch sind. Das bedeutet, dass der Östrogenspiegel beim Hund über einen langen Zeitraum im Jahr sehr niedrig ist. Auch nach Ovariohysterektomie werden in der Veterinärmedizin keine Spontanfrakturen beschrieben. Dies lässt den Schluss zu, dass der Östrogenspiegel des Hundes eine untergeordnete Rolle im Bezug auf den Knochenstoffwechsel hat.
Ein zusätzlicher Nachteil, der gegen die Verwendung des Hundes als Versuchstier spricht, ist die ethische Einstellung zu dem Versuchstier (“des Menschen bester Freund”).

Katzen:
Die Katze wurde bis zum heutigen Tag selten in der Osteoporoseforschung eingesetzt.
Eine Osteopenie kann bei wachsenden Katzen durch Immobilisation und Fütterung einer kalziumarmen und phosphatreichen Diät erreicht werden.
Ein Vorteil in der Nutzung dieser Tiere ergibt sich aus der einfachen Handhabung, in der einfachen Pflege und Unterbringung.
Wie beim Hund werden auch bei Katzen in der Veterinärmedizin keine Spontanfrakturen beschrieben, obwohl die meisten dieser Tiere ovar- bzw. ovariohysterektomiert sind. Ebenso gestaltet sich die Akzeptanz der Katzen als Versuchstiere in der Bevölkerung schwierig. Der Grund dafür ist in der Stellung als Haustier zu sehen.

Ratten:

Die ovarektomierte Ratte ist das am häufigsten verwendete Tiermodell, das in der Osteoporoseforschung zu Studienzwecken eingesetzt wird (Jeroen et al., 1996).

Ihre Vorteile sind zahlreich. Ratten sind kostengünstig, einfach zu handhaben und sind als Versuchstiere allgemein akzeptiert.

Es gibt ausreichend Literatur über die ovarektomierte Ratte im Bezug auf histomorphologische Veränderungen, biochemische Marker, Methoden zur Knochendichtemessung und Evaluation der Brüchigkeit von Knochen. Es liegt ausreichendes Wissen über Stoffwechseleffekte und Diäteffekte vor. Die Abnahme des kortikalen Durchmessers bei der alternden Ratte ist dokumentiert (Mosekilde et al., 1993a; Kalu, 1991)

Nagetiere haben keine natürliche Menopause. Die Ovarektomie bewirkt eine artefizielle Menopause (Wronski und Yen, 1991).

Es existieren zwei verschiedene Modelle. Zum einen die drei Monate alte geschlechsreife Ratte und zum anderen die zwölf Monate alte Ratte, die ein abgeschlossenes Knochenwachstum aufweist.

Die Osteoporose stellt eine Erkrankung des adulten Menschen dar und erfordert deshalb auch im Tiermodell ein entsprechend abgeschlossenes Knochenwachstum. Andererseits sollte die Ovarektomie nicht so spät erfolgen, dass der Östrogenmangel von alters- und krankheitsbedingten Knochenverlusten überlagert werden könnte (Birner, 1995).

Der Nachteil der älteren ausgewachsenen Ratten besteht in den höheren Anschaffungskosten und sie sind oft nicht in ausreichender Anzahl erhältlich. Ausserdem ist es zeitintensiv, einen Knochenverlust biochemisch oder histologisch nachzuweisen. Diese Nachteile sind bei den jüngeren, drei Monate alten Ratten nicht vorhanden. Effekte einer Ovarektomie zeigen sich bereits nach etwa einem Monat.

Nagetiere sind für unsere Fragestellung nicht geeignet, da bei diesen kleinen Tieren eine Langzeitstudie mit mehreren Blutentnahmen und Biopsien nicht möglich ist. Die geringe Grösse von Ratten bringt schwerwiegende Nachteile für die Implantation von Osteosynthesematerialien oder prothetische Versorgungen.

Kaninchen:

Über das ovarektomierte Kaninchen existieren wenig Arbeiten im Bezug auf die Osteoporose. Das Tier wird häufig für Studien über Knochenimplantate verwendet (Newman et al., 1995).

Kaninchen sind einfach in der Pflege und Haltung. Ausserdem sind sie in grösserer Anzahl verfügbar. Sie besitzen einen schnelleren Knochenumbau als Primaten. Ihr Verwendungszweck wird durch ihre schlecht regulierte Kalziumhomöostase eingeschränkt.

Im Gegensatz zur Ratte, Maus und Meerschweinchen schliessen die Epiphysenfugen beim Kaninchen schon nach sechs Monaten (Gilsanz et al., 1988).

Wie auch Ratten sind Kaninchen für unsere Fragestellung auf Grund der geringen Grösse nicht geeignet.

Meerschweinchen:

Das Meerschweinchen ist ein beliebtes Forschungsobjekt, weil die Zykluslänge mit der des Menschen vergleichbar ist. Die Ovulation findet spontan statt.

In einer Studie von Vanderschueren et al. (1992) wurden die Effekte von Androgen- und Östrogenmangel auf die Knochenstruktur untersucht. Beim ovarektomierten erwachsenen Meerschweinchen zeigte sich kein Effekt auf das Knochenvolumen. Somit stimmen diese Erkenntnisse nicht mit denen des Menschen überein, was zum Ausschluss des Meerschweinchen als Osteoporosemodell führte.

Schwein:

Das Minischwein weist im Gegensatz zu anderen Tiermodellen einige spezifische Vorteile auf. So hat das Schwein, ähnlich der Frau, einen polyöstrischen, polysaisonalen Zyklus. Die Zykluslänge dauert zwischen 18 und 21 Tagen. Des weiteren ist das gastrointestinale System dieser Omnivoren dem des Menschen ähnlich.

Minipigs wiegen etwa 60 kg, was im Gegensatz zu ausgewachsenen Schweinen mit einem Gewicht von bis zu 150 kg für die Haltung von Vorteil ist. Minipigs sind gross genug und eignen sich für Untersuchungen mit

Osteosynthesematerialien und prothetischen Versorgungen. Mehrfache Blut- und Knochenbiopsieentnahmen werden gut toleriert.
Der Knochenstoffwechsel (incl. trabekulärer und kortikaler Umbauprozesse) und auch die Knochenstruktur ist dem des Menschen sehr ähnlich.
Mosekilde et al. (1993b) fanden einen deutlichen Verlust der Knochendichte an der Wirbelsäule bei ovarektomierten Schweinen. Der Verlust gleicht dem einer Frau in der Postmenopause. In einem Zeitraum von sechs Monaten zwischen Ovarektomie und der Knochendichtebestimmung wurden Sinclair S-1 Minipigs mit einer kalziumreduzierten Diät gefüttert. Bei dem Versuch mit diesen Schweinen zeigten sich signifikante Änderungen in den Knochenumbauparametern (Zunahme der resorptiven Vorgänge), die zu signifikanten Veränderungen der Knochenstrukur führten (Perforation der Trabekelplatten). Es kam zu einem signifikanten Abfall der Knochenmasse und biomechanischen Stabilität des spongiösen Knochens der Wirbelkörper (Mosekilde et al., 1993a; Mosekilde et al., 1993b).
Diese Ergebnisse lassen Minipigs als gutes Modell auch im Hinblick auf operative Verfahren erscheinen.
Die Nachteile im Gebrauch des Schweins als Tiermodell für die Osteoporoseforschung sind in der höheren Knochenmasse und dichteren Trabekelstruktur im Gegensatz zum Menschen zu sehen. Auch die hohen Haltungskosten, die Lärmbelästigung, die mögliche Aggressivität und problematische Logistik sprechen gegen die Verwendung dieser Tiere.

Schaf:
Das Schaf ist in einigen Studien zur Osteopenie untersucht worden. Günstig wirkt sich bei dem Umgang mit den Tieren aus, dass sie in der Herde gehalten werden können, zahm sind und der emotionale Bezug der Bevölkerung, ähnlich wie beim Schwein, nicht derselbe wie bei Haustieren ist.
Das Schaf ist ein saisonal polyöstrisches Tier mit unterschiedlichem Zyklus je nach Rasse, Tageslänge oder Lichtbedingungen im Stall. Die Zykluslänge variiert zwischen 14 und 21 Tagen. Dem Menschen sind sie in quantitativen Schwankungen der Hormonprofile im Zeitvergleich ähnlich. Ein ovarektomiertes Tier mit häufigeren Zyklen reagiert im Gegensatz zum Hund empfindlicher auf Östrogenmangel. Schafe haben wie Ratten und einige

andere Tiermodelle keine klar abgrenzbare Menopause, die sich durch den Abbau von Knochenmasse auszeichnet (Kalu, 1991).

Aufgrund der ausreichenden Grösse des Schafes können chirurgische Interventionen stattfinden. Neue orthopädische Implantate können an einer grossen Anzahl von vergleichbaren Tieren kontrolliert eingebracht werden. Problemlos können mehrfache Blutentnahmen und Urinkontrollen sowie Knochenbiopsien gewonnen werden. Diese Möglichkeiten erleichtern Untersuchungen auf klinischer, histologischer, zellulärer und biochemischer Ebene.

Es besteht eine Ähnlichkeit zwischen dem Beckenkamm des Schafes und dem des Menschen (Pastoureau et al., 1991; Turner und Villanueva, 1993). Diese konnten hier anhand der Auswertung der Beckenkammbiopsien bestätigen werden (siehe 4.2: Vergleich der Ergebnisse von Ito et al. (1998) mit den in dieser Studie ermittelten Werten).

Eine Verminderung des Knochenumsatzes wurde sowohl bei ovarektomierten als auch bei scheinoperierten Schafen festgestellt. Dieses Phänomen lässt sich durch saisonale Veränderungen begründen (Tageslänge und saisonale Veränderungen) (Hornby et al., 1995).

Chavassieux (1990) zeigte, dass durch Ovarektomie eine kontinuierliche Abnahme der Knochenneubildung während 10 Wochen bis sechs Monate nach dem Eingriff zu verzeichnen war. Auch in unserer Studie kam es über sieben Monate zu einer Abnahme der Knochendichte.

Die Abnahme des Knochenvolumens mit zunehmendem Alter sowie eine signifikante Reduktion der Knochenmasse nach Ovarektomie lässt das Schaf als gutes Modell für Studien der Altersosteoporose sowie Östrogenmangelosteoporose erscheinen (Turner et al., 1993).

Da eine Knochendichteabnahme durch Ovarektomie als gesichert angenommen werden konnte und das Schaf aufgrund der Grösse und Struktur seines Skeletts mit dem Menschen vergleichbar ist, haben wir uns für das Schaf als Modell für die Induktion einer Osteoporose entschieden.

Im Studiendesign haben wir uns an die von der Food and Drug Administration 1994 verabschiedeten Richtlinien zur Verwendung von Tiermodellen in der Osteoporoseforschung orientiert. Diese Richtlinien empfehlen für die Etablierung eines Tiermodells neben

Knochendichemessungen die Bestimmung von biochemischen Knochenmarkern und die biomechanische Testung der Knochen.

5.7 Studienvergleich

Solange Diskrepanzen bezüglich der Physiologie und den anatomischen Verhältnissen zwischen einem Tiermodell und dem Menschen existieren, wird die Suche nach einem geeigneten Tier andauern. Es scheint, dass das Schaf trotz der oben angeführten Nachteile für unsere Fragestellung geeignet ist.
Verschiedene Autoren beschreiben in Studien das Verhalten der Knochendichte nach Ovarektomie beim Schaf.

Turner et al. (1995b) haben den Knochendichteverlauf bestimmt. Es wurden 45 Schafe in die Studie aufgenommen. 12 Schafe wurden scheinoperiert, 15 Schafe wurden ovarektomiert und 18 Schafe wurden mit Östrogenen nach Ovarektomie behandelt.
Die Knochendichte der Schafe wurde zu Beginn der Studie mit Hilfe des DXA-Messverfahrens ermittelt. Messorte waren in Abhängigkeit von der Anatomie die letzten drei Lendenwirbelkörper L4 - L6 bzw. L5 - L7 sowie der Calcaneus und distale Radius. Die Messungen erfolgten für den Ausgangswert vor der Operation und nach weiteren sechs und zwölf Monaten. In der Gruppe der scheinoperierten Schafe zeigten sich im Verlauf keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich einer Knochendichteveränderung. In der Gruppe der ovarektomierten Schafe war die signifikante Veränderung nicht einheitlich. Nach sechs Monaten war die Knochendichte am fünften Lendenwirbel und distalen Radius, nach 12 Monaten am vierten Lendenwirbelkörper signifikant erniedrigt. Keine signifikanten Veränderungen wurden am Calcaneus festgestellt. Nach 12 Monaten wurden die Tiere getötet und die Knochendichten des proximalen und distalen Femurs, sowie der proximalen Tibia und des proximalen Humerus gemessen. Im Vergleich zwischen den scheinoperierten und ovarektomierten Schafen gab es an den verschiedenen Lokalisationen hinsichtlich der Knochendichte keine signifikanten Unterschiede.
Im Verlauf unserer Studie zeigten sich im Hinblick auf die Knochendichte bei Schafen der Kontrollgruppe ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. In der

behandelten Gruppe sank die Knochendichte am Radius hoch signifikant und die Spongiosa der Lendenwirbelkörper hatten im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erniedrigte Knochendichten. Keine Übereinstimmung findet sich zu der von Turner et al gemachten Aussage, dass sich die Knochendichte von Calcaneus nicht signifikant reduzierte. In unserer Studie waren die Veränderungen im Verlauf der Induktion signifikant.

In einer weiteren Studie haben Turner et al. (1995a) Schafe verwendet, um den Knochendichteverlauf nach Ovarektomie, nach Ovarektomie mit anschliessender Östrogenimplantatbehandlung und bei scheinoperierten Schafen zu betrachten.
Wir haben die Ergebnisse der 12 ovarektomierten Schafe und die der neun scheinoperierten Schafe verglichen. Es wurden sieben bis neun Jahre alte Tiere verwendet. Die Messungen der Knochendichte wurden mittels DXA zum Zeitpunkt null (ein Monat vor dem operativen Eingriff) und nach weiteren drei und sechs Monaten durchgeführt. Messorte waren die letzten drei Lendenwirbel, je nach Anatomie L4 - L6 bzw. L5 - L7, sowie der Calcaneus und distale Radius. Das Ergebnis ergab nach sechs Monaten nach Ovarektomie eine nicht signifikante Abnahme der Knochendichte in Calcaneus und distalem Radius. Die Unterschiede der Knochendichte an den Lendenwirbelkörpern waren dagegen signifikant erniedrigt.
Neben der Knochendichtemessung wurden Veränderungen der Struktur des Knochens mittels der Histomorphometrie überprüft. Dazu wurden den Schafen zu Beginn der Studie und am Ende Beckenkammbiopsien entnommen und untersucht. Das Ergebnis zeigte eine nicht signifikante Änderung der Trabekelanzahl, der Trabekeldicke und dem Abstand zwischen den einzelnen Trabekeln.
Turner et al. sehen als Grund für die fehlende Übereinstimmung in der signifikanten Knochendichteabnahme und der nicht signifikanten Änderung der Knochenstruktur folgende Erklärungen. Die Knochenumbauprozesse setzen im Beckenkamm nicht so rasch ein wie in der trabekulären Struktur der Lendenwirbelkörper. Als weitere Möglichkeit wird in Betracht gezogen, dass die Entnahme der Beckenkammbiopsien zu Beginn der Studie und am Ende an nicht identischen Stellen der rechen bzw. linken Seite stattfanden.

Bei einem Vergleich mit unserer Studie fällt auf, dass es Unterschiede im Verhalten der Knochendichte am distalen Radius und Calcaneus gibt. Wir registrieren signifikante Unterschiede über die Zeit der Induktion. In beiden Studien reduzierte sich die Dichte des spongiösen Knochens an den Lendenwirbelkörpern signifikant.
Auch die histomorphologischen Daten der Beckenkammbiopsie zeigen bei uns signifikante Unterschiede zwischen Beginn und Ende der Studie.

Hornby et al. (1995) haben am Schaf Untersuchungen zum Knochendichteverlauf vorgenommen. Die Schafe hatten ein Alter von sieben Jahren. Sechs wurden scheinbehandelt, 15 wurden ovarektomiert und nach 75 Wochen mit Östrogenen behandelt. Die Nahrung enthielt eine Mischung aus Heu und einem Spezialkonzentrat, welches aus einer kalzium- und phosphatarmen und einer Vitamin D-reichen Diät (1,2 % Kalzium, 0.65 % Phosphor, 2000 IE Vitamin D_3/kg) bestand. Zu Beginn wurde die Knochendichte mittels Ganzkörper- DXA- Messung bestimmt. Verlaufsmessungen fanden nach 15, 23, 32, 45, 59, 75, 95 und 113 Wochen statt. Innerhalb der ersten 45 Wochen wurde zwischen den operierten und scheinoperierten Schafen eine signifikante Abnahme der Knochendichte ermittelt. Die Knochendichteabnahme bei den ovarektomierten Schafen war nach 45 Wochen signifikant.
In unserer Studie wurden einzelne Knochen im Hinblick auf Dichteveränderungen untersucht. Zusätzlich fand eine Differenzierung zwischen spongiösem und kortikalem Knochen statt. Dadurch ist es bei uns nicht zulässig, einheitlich von einer signifikanten Knochendichtereduzierung zu sprechen.

In der Studie von Turner et al. (1993) wurde ein signifikanter Unterschied zwischen ovarektomierten und nicht behandelten Schafen festgestellt. Bei den unbehandelten Tieren wurde nochmals zwischen jungen (drei und vier Jahre alt) und alten Schafen (acht bis neun Jahre alt) unterschieden. Am proximalen Femur wurden Röntgenbilder als Indikator für eine Veränderung der Knochenstruktur gemacht. Nach dem Singh Index wurde das trabekuläre Muster zwischen den unterschiedlichen Gruppen im Blindversuch eingeteilt.

Das Ergebnis zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den jungen und alten Schafen, eine signifikante Änderung war im Vergleich dazu bei den behandelten Schafen zu beobachten. In der histomorphologischen Analyse ergaben sich signifikante Änderungen der ovarektomierten Schafe im Vergleich vor Ovarektomie und nach sechs Monaten. Die trabekuläre Dicke nahm signifikant ab, der trabekuläre Abstand zueinander nahm signifikant zu.
Die histomorphologischen Aussagen können durch unsere Studie bestätigt werden. Auch bei uns fand im Vergleich vor zu nach Induktion von Osteoporose eine signifikante Unterscheidung bei den Werten der Trabekelanzahl, -Dicke und des –Abstandes statt.

Deloffre et al. (1995) induzierten beim Schaf eine Osteoporose mit Hilfe der Gabe von Methylprednisolon. Über einen Zeitraum von vier Monaten wurden bei 16 sechs bis neun Jahre alten Schafen Methylprednisoloninjektionen verabreicht. Die tägliche Dosis betrug 15mg. Die Behandlung der Tiere wurde gut toleriert, klinische Symptome traten nicht auf. Im Vergleich dazu blieben 11 Schafe unbehandelt. Sie erhielten als Placebo Kochsalzinjektionen. Der Knochendichteverlauf wurde mittels DXA-Messungen ermittelt. Messorte waren der linke Femur und die Lendenwirbelkörper L2 - L6. Das Ergebnis zeigte zwischen den behandelten und unbehandelten Schafen nach einem Zeitraum von vier Monaten keine signifikanten Unterschiede.
In den ex vivo durchgeführten mechanischen Tests fanden sich zwischen den Gruppen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Die Drei- Punkt- Biegung wurde am kompletten Femur durchgeführt. Spongiosazylinder, die aus den Lendenwirbelkörpern L4 - L6 ausgebohrt wurden, wurden im Kompressionstest eingesetzt. Die Ergebnisse der mechanischen Tests zeigten ebenfalls zwischen der behandelten und unbehandelten Gruppe keine signifikanten Unterschiede.
Deloffre et al. (1995) erklären die fehlende Knochendichteabnahme trotz einer Behandlung mit Steroiden damit, dass die Induktionszeit zu kurz gewählt wurde.
Wenn man sich den Knochendichteverlauf in unserer Studie vergegenwärtigt fällt auf, dass in den ersten 14 Wochen selbst mit Kombination aus OVX und

Diät eine Steroideinjektion von 120 mg pro Woche zu wenig erschien, um deutliche Einflüsse auf das Knochendichteverhalten zu erzielen.

Die hier vorliegende Studie wurde im Anschluss an eine Pilotstudie (Lill et al., 2000) durchgeführt. In der Pilotstudie wurde an acht Mutterschafen im Alter von sieben bis neun Jahren ein Knochendichteverlust nach unterschiedlichem Induktionsverfahren induziert. Es wurden vier Gruppen zu je zwei Tieren gebildet. Eine Gruppe blieb unbehandelt, in der zweiten bekamen ovarektomierte Schafe zusätzlich eine Kalzium- und Vitamin D-arme Diät. In der dritten Gruppe wurden ovarektomierte Schafe täglich mit 25 mg Methylprednisolon i.m. behandelt, und in der vierten Gruppe wurden ovarektomierte Schafe sowohl mit der Kalzium- und Vitamin D-armen Diät, als auch mit täglichen 25 mg Methylprednisoloninjektionen behandelt. Der Verlauf der Knochendichteveränderungen wurde mittels quantitativer Computertomographie dokumentiert. Messorte waren der distale Radius, die distale Tibia und der Calcaneus. Die Ausgangsmessung war vor Beginn der Behandlung. Verlaufsmessungen wurden alle zwei Monate durchgeführt. Die Studie endete nach sechs Monaten Behandlung. Die Ergebnisse zeigten bei den Tieren, die mit der Kombination aus Ovarektomie, Steroiden und Diät behandelt wurden, die grösste Knochendichteabnahme am distalen Radius. Hier nahm die Dichte der Spongiosa im Verlauf der Behandlung um 60 % ab, die Dichte der Kortikalis sank um 25 %. Bei den zweifach behandelten Schafen war die Kombination aus Ovarektomie und Steroiden in Bezug auf den Knochendichteverlust wirksamer als die Kombination aus Ovarektomie- und Diät. Die Dichte der Spongiosa nahm um 25 %, die Dichte der Kortikalis um 17 % ab, im Vergleich dazu sank die Dichte der Spongiosa bei Ovarektomie und Diätbehandlung um 10 % und die der Kortikalis um 5 %. In der unbehandelten Kontrollgruppe wurden keine Unterschiede festgestellt.
Nach der sechsmonatigen Behandlungszeit wurden zur Beurteilung der Knochenstruktur mechanische Tests und Mikro-Computertomographie-aufnahmen durchgeführt. Signifikante Änderungen ergaben sich im Vergleich vor Behandlungsbeginn und dem Ende bei der Gruppe, die ovarektomiert wurde und zusätzlich Steroide erhielten, sowie in der Gruppe, die mit der Dreifachkombination behandelt wurde.

Mit der hier vorliegenden Studie können alle Parameter der Pilotstudie im Hinblick auf Knochenveränderungen bestätigen werden.

Nach Hornby et al. (1995) ist das Mass des Verlustes der Knochendichte nach Ovarektomie vom Alter der Tiere abhängig. Schafe verlieren nach dem achten Lebensjahr mehr Knochendichte als in jüngeren Jahren.
Durch unsere Studie kann diese Aussage nicht bestätigt werden. Die Tiere unterschieden sich nur zwischen den Gruppen, nicht aber innerhalb der Gruppen im Alter.
Weitere Einflussfaktoren auf die Knochendichte haben nach Hornby et al. (1995) saisonale Effekte. Im Winter ist die Knochenformation erniedrigt. Dies wird von Turner et al. (1995c). bestätigt.
Auch diese Aussage kann von uns letztlich nicht bestätigt werden, da wir im Verlauf der Studie das Schema der Induktion änderten. Somit sind zu viele Einflussgrössen auf das Knochendichteverhalten zu betrachten.
Zudem wird das Verhalten der Knochendichte von dem zeitlichen Abstand zwischen Trächtigkeit und Laktation zur Ovarektomie bestimmt. Die gastrointestinale Absorption von Kalzium ist während dieser Zeit gesteigert. Ein Mindestabstand von 12 Monaten wird für den Einsatz dieser Tiere vorgeschlagen (Turner et al., 1995c).
Bei uns bestand ein Abstand zwischen Laktation und Studienbeginn von mindestens 15 Monaten.

In allen genannten Studien wurde das Knochendichteverhalten auf Grund von unterschiedlichen Einflussfaktoren untersucht.
In der hier vorgelegten Studie konnte im Sinne der Erwartung eine Osteoporose zu induzieren, der Effekt von Ovarektomie, Diät und Steroiden auf die Knochendichte, mechanische Eigenschaften des Knochens und Knochenstruktur gezeigt werden.

6 Zusammenfassung

Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die häufig erst aufgrund von Frakturen ohne adäquates Trauma diagnostiziert wird. Aufgrund der epidemiologischen Entwicklung, ist mit einer deutlichen Zunahme der Inzidenz zu rechnen.
Eine zufriedenstellende Stabilisierung von osteoporoseassoziierten Frakturen ist mit derzeit verwendeten Osteosyntheseverfahren nicht immer möglich.

Ziel dieser Studie war die Entwicklung eines Tiermodells für Osteoporose, welches in Anatomie und Knochenstoffwechsel dem Menschen ähnlich ist. Am Schaf wurde Osteoporose mit einer Behandlung aus Ovarektomie, Kalzium- und Vitamin D-reduzierten Diät und verschiedenene Steroideapplikationensformen induziert. Über eine Induktionszeit von 7 Monaten sollte der Effekt verschiedener Steroidedosierungen und Steroidedarreichungsformen auf die Ausprägung der Osteoporose untersucht werden.
Es wurden zwei Gruppen gebildet. Gruppe 1 (n=16) diente als unbehandelte Kontrollgruppe. Gruppe 2 (n=16) wurde ovarektomiert und mit einer Kalzium- und Vitamin D-reduzierten Diät gefüttert und erhielt über 14 Wochen 3 x 40 mg Methylprednisolon (MP)-Lösung pro Woche i.m. appliziert. Über weitere 8 Wochen erhielt diese Gruppe 5 x 40 mg (MP)-Lösung pro Woche. Die letzten sechs Wochen wurden 5 x 40 mg (MP)-Kristallsuspension verabreicht.
Mittels peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT) wurden die Knochendichteverläufe über 7 Monate an distaler Tibia, distalem Radius und Calcaneus beidseits dokumentiert.
Es wurden Biopsien aus den Beckenkämmen, aus Wirbelkörpern und Femurköpfen entnommen. Von diesen Proben wurden verschiedene Knochenstrukturparameter (BV/TV in %, BS/BV in 1/mm, Tb.N in 1/mm, Tb.Th in mm, Tb.Sp in mm und DA) im Mikro-Computertomographen (mittelhohe Auflösung, die Rekonstruktion der Bilder erfolgte mit 512 x 512 Pixel) ermittelt.

Im Verlauf der Studie wurden verschiedene Knochenstoffwechselparameter (ALP, PICP, PYD, DPD) bestimmt, um Veränderungen des Knochenstoffwechsels im Rahmen der Osteoporoseinduktion darzustellen.

In dieser tierexperimentellen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass im Schafsmodell mit einer Dreifachbehandlung aus Ovarektomie, Kalzium- und Vitamin D-reduzierter Diät und Steroideapplikation die Induktion von Osteoporose möglich ist. Die Abnahme im spongiösen Knochen betrug im Mittel 37 %, im kortikalen Knochen 2 %.
Es konnte aufgezeigt werden, dass Methylprednisolon-Suspension im Bezug auf die Osteoporoseinduktion im Vergleich zur Methylprednisolon-Lösung eine höhere Wirksamkeit aufwies.
Die Veränderungen der Knochenstrukturparameter im Rahmen der Osteoporoseinduktion beim Schaf sind mit der Situation beim Menschen vergleichbar.
Die Knochenstoffwechselparameter wiesen in dieser Untersuchung nur eine geringe Aussagekraft in Bezug auf die Dokumentation von Osteoporose auf.
Mit Abnahme der Knochendichte kam es zu einer Reduktion der mechanischen Eigenschaften des Knochens.

Das Schaf scheint somit ein geeignetes Tiermodell zu sein, um an einer grösseren Anzahl vergleichbarer Individuen Untersuchungen und Entwicklungen neuer Osteosyntheseverfahren bei Osteoporose durchführen zu können.
In weiteren wissenschaftlichen Untersuchungen müssen histologische Aufarbeitungen und Auswertungen die Vergleichbarkeit des Osteoporosetyps Schaf/ Mensch belegen.

7 Literaturverzeichnis

1. Adinoff A.D. and Hollister J.R. (1983):Steroid-induced fractures and bone loss in patients with with asthma. N Engl J Med 309: 265-268

2. Affentranger U. (1995): Entwicklung einer Testmethode zur Prüfung der Spongiosaqualität und Anwendung nach Langzeitapplikation des Bisphosphonats BM 21.0955. Dissertation, Bern

3. Baylink D.J. and Libanati C.R. (1994): The actions and therapeutic applications of 1 alpha hydroxylated derivatives of Vitamin D. Akt Rheumatol 19: 10-18

4. Battmann A., Schulz A. and Stahl U. (2001): Cellular senescence: a mechanism of the development of osteoporosis? Orthopäde 30(7): 405-411

5. Bell N.H. (1995): Vitamin D metabolism, aging and bone loss. J Clin Endocrinol Metab 80:1051

6. Birner H. (1995): Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels bei der Ratte und beim Menschen, Vitamine als Prophylaxe im Osteoporosemodell Ratte. Vet Med Diss, München

7. Black D., Duncan A. and Robins S.P. (1988): Quantitative analysis of the pyridium crosslinks of collagen in urine using ion- paired- phase high- performance liquid chromatography.

8. Bonjour J.P., Burckhardt P., Dambacher M., Kraenzlin M.E. and Wimpfheimer C. (1997): Schweiz Med Wochenschr. 19; 127: 659-667

9. Borchers R.E., Gibson J.L., Burchardt H. and Hayes W.C. (1995): Effects of selected thermal variables on the mechanical properties of trabecular bone. Biomaterials16: 545-551

10. Bouxsein M.L., Myers E.R. and Hayes W.C. (1996): Biomechanics of Age-Related Fractures. Osteoporosis, Academic Press. Inc., 373-393

11. Boyce R.W., Franks A.F., Jankowsky M.L., Orcutt C.M. Piacquadio A.M., White J.M. and Bevan J.A. (1990): Sequential histomorphometric changes in cancellous bone of ovariohysterectomized dogs. J Bone Min Res 5, 947-95

12. Bressot C., Meunier P.J., Chapuy M.C., Lejeune E. and Edourd C. (1979): Histomorphometric profile, pathophysiology and reversibility of corticoid-induced osteoporosis. Metab Bone Dis Rel Res 5: 609-618

13. Brock K., Reid J. and Fraser D. (1997): Effect of type of accommodation on the vitamin D status of the elderly in Sydney, Australia, in vitamin D: chemistry, biology and clinical applications of the steroid hormone – proceedings of the Tenth Workshop on Vitamin D, Strasbourg, France (ed: Norman A.W., Bouillon R. and Thomasset M.) University of California, Riverside: 885-886

14. Canalis, E. (1984): Effect of cortisol on periosteal and nonperiosteal collagen and DNA synthesis in cultured rat calvariae. Calcif Tissue Int 36: 158-166

15. Carter D.R. and Hayes W.C. (1976): Bone compressive strength: The influence of density and strain rate. Science 194: 1174

16. Chavassieux, P. (1990): Bone effects of fluoride in animal models in vivo. A review and a recent study (abstract). J Bone Min Res (suppl 1): 95-99

17. Chavassieux P., Pastoureau P., Boivin G., Chapuy C., Delmas P.D. and Meunier P.J. (1991): The effects on ewe bone remodeling of short-term sodium flupride administration. A histomorphometric and biochemical study. Bone 12: 421-427

18. Chavassieux P., Pastereau P., Chapuy C., Delmas P.D. and Meunier P.J. (1993): Glucocorticoid- induced inhibition of osteoblastic bone formation in ewes. A biochemical and histomorphometric study. Osteoporosis Int 3: 97-102

19. Chavassieux P., Buffet A., Vergnaud P., Garnero P. and Meunier P.J. (1997): Short- term effects on ewe bone remodeling of short- term sodium fluoride administration. A histomorphpometric and biocemical study. Bone 12: 421-427

20. Collwell A., Russell R.G. and Eastell R. (1993): Factors affecting the assay of urinary 3- hydroxy pyridium crosslinks of collagen as markers of bone resorption. Eur J Clin Invest 23: 341-349

21. Conover W.J. (1980): Practical nonparametric statistics, Second Edition, New York: John Wiley & Sons, Inc.

22. Consensus Development Conference (1993): Consensus Development Conference: Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. Am J Med 1994: 646-650

23. Dambacher M.A., Haas H.G. und Rüegsegger P. (1991): Pathophysiologie der Osteoporose und Knochendichtebestimmung. Der Internist 32: 63-69.

24. Davidson M.K., Lindsey J.R and Davis J.K. (1987): Requirements and selections of an animal model. Isr J Med Sci 23: 551-555

25. Delany A.M., Gabbitas B.Y. and Canalis E. (1995): Cortisol downregulates osteoblast alpha 1 (I) procollagen mRNA by transcriptional and posttranscriptional mmechanisms. J Cell Biochem 57: 488-494

26. Delmas P.D. (1988): Biochemical Markers of Bone Turnover in Osteoporosis. Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management, edited by Riggs, L. And Melton, L.J., III Raven Press, New York

27. Delmas P.D., Gineyts E., Bertholin A., Garnero P. and Marchand F. (1993): Immunoassay of pyridinoline crosslink excretion in normal adults and in Paget`s disease. J Bone Miner Res 8: 643-648

28. Delmas P.D. and Garnero P. (1996): Utility of Biochemical Markers of Bone Turnover in Osteoporosis. Academic Press, Inc: 234-237

29. Deloffre P., Hans D., Rumelhart C., Mitton D., Tsouderos Y. and Meunier P.J. (1995): Comparison between bone density and bone strength in glucocorticoid- treated aged ewes. Bone Vol.17 (suppl 4): 409-414

30. Dietrich J.W., Canalis E.M., Maina D.M. and Raisz L.G. (1979): Effects of glucocorticoids on fetal rat bone collagen synthesis in vitro. Endocrinology 104: 715-721

31. Eastell R., Yergey A.L., Vieira N.E., Cedel S.L., Kumar R. and Riggs B.L. (1991): Interrelationship among vitamin D metabolism, true calcium absorption, parathyroid function, and age in women: evidence of an age- related intestinal residence to 1,25- dihydroxyvitamin D action. J Bone Miner Res 6:125-132

32. Eastell R., Reid D.M., Compston J., Cooper C., Fogelman I., Francis R.M., Hoskin D.J., Purdie D.W., Ralston S.H., Reeve J., Russell R.G., Stevenson J.C. and Torgerson D.J. (1998): A UK Consensus Group on management of glucocorticoid- induced osteoporosis: an update. Journal of Internal Medicine 244: 271-292

33. Einhorn T.A. (1981): Orthopedic Complications of Osteoporosis in Primer on Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, Third edition, Lippincott- Ravenpress 479-481

34. Engelke K., Karolczak M., Lutz A., Seibert U., Schaller S. und Kalender W. (1999): Mikro-CT: Technologie und Applikationen zur Erfassung von Knochenarchitektur. Radiologe 39: 203-212

35. Eriksen E.F., Mosekilde L. and Melsen F. (1986): Trabecular bone remodeling and balance in primary hyperparathyroidism. Bone 7: 213-221

36. Eriksen E.F., Colvard D.S., Berg, N.J., Graham M.L., Spelsberg T.C. and Riggs B.L. (1988): Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast- like cells. Science 241: 84-86

37. Eriksen E.F., Hodgson S.F., Eastell R., Cedel S.L., O`Fallon W.M. and Riggs B.L. (1990): Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels. J Bone Miner Res 5: 311- 319

38. Evans J.A. (1990): Ultrasonic attenuation and velocity in bone. Phys Mod Biol 35: 1387-1396

39. Faugere M.C., Friedler R.M. Fanti P. and Malluche H.H. (1990): Bone changes occuring early after cessation of ovarian function in beagle dogs. A histomorphometric study employing sequential biopsies. J Bone min Res 5: 263-271

40. Felsenberg D. (1988): Quantitative Knochenmineralbestimmung mit der Zwei-Spektren-Computertomographie. Radiologe 28: 166-172

41. Felsenberg D. und Gowin W. (1999): Knochendichtemessung mit Zwei-Spektren- Methoden. Radiologe 39: 186-219

42. Fischer M., Kempers B. und Spitz J. (1990): Knochendensitometrie: Wertigkeit und Grenzen der Methode. Der Nuklearmediziner 13: 77-82

43. Fleisch H.(1989): Osteoporose. Arch Gynecol Obstet 246: 73-75

44. Food and Drug Administration (1994): Draft- Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. Division of metabolism and endocrine drug product

45. Frahm C., Link J., Hakelberg K., Weiss H.D. und Rademaker J. (1994): Densitometrie bei Verdacht auf präklinische Osteoporose: Quantitative Computertomographie versus Zweispektren-Röntgenabsorptiometrie. Bildgebung 61: 256-262

46. Garnero P. and Delmas P. (1996): Measurements of biochemical markers: Methods and limitations. Principles of Bone Biology. 1277-1291

47. Geusens P., Boonen S., Nijs J., Jiang Y., Lowet G., Van Audekercke R., Huyghe C., Caulin F., Very J.M., Dequerker J. and Van der Perre G. (1996): Effect of salmon calcitonin on femoral bone quality in adult ovariectomized ewes. Calcif Tissue Int 59: 315-320

48. Gilsanz V., Roe T.F., Gibbens D.T., Schulz E.E., Carlson M.E., Gonzales O. and Boechat M.I. (1988): Effect of sex steroids on peak

bone density of growing rabbits. Am J Physiol 255 (Endocrinol Metabol 18): 416-442

49. Glüer C.C., Reiser U.J., Davis C.A., Rutt B.K. and Genant H.K. (1988): Vertebral mineral determination by quantitative computed tomography QCT; accuracy of single and dual energy measurements. J.Comp Assist Tomogr 12: 242-258

50. Glüer C.C., Genant H.K. (1989): Impact of marrow fat on accuracy of quantitative CT. J Comp. Assist. Tomogr. 13: 1023-1035

51. Grütter R., Cordey J., Koller B., Wahl D. (1996): Torsional strength of human cadaver tibiae: The size is more important than the degree of osteoporosis, Book of abstracts- 10th Conference of the European Society of Biomechanics, Leuven, August: 28-31

52. Hauser W. und Asang E. (1979): Stoss- und Schlagbelastung des menschlichen Schienbeins im Drehversuch. Archives of Orthopadic and Traumatic Surgery.Volume 93 (2): 124- 131

53. Hawker G.A. (1996): The epidemiology of Osteoporosis. J Rheumatol 23: 2-5

54. Heaney R.P. (1992): The natural history of vertebral osteoporosis. Is low bone mass an epiphenomenon? Bone 13: 23-26

55. Hodgen G.D., Goodman A.L., O`Conner A. and Johnson D.K. (1977): Menopause in rhesus monkeys: Model for study of disorders in the human climacteric. Am J Obstet Gynecol 127: 581-584

56. Hornby S.B., Ford S.L., Mase C.A. and Evans G.P. (1995): Skeletal changes in the ovariectomised ewe and subsequent response to treatment with 17β Oestradiol. Bone Vol.17 (suppl 4): 389-394

57. Hornby S.B., Ford S.L., Timpson N.J., Ancill A.K. and Evans G.P. (1994): Skeletal changes in the ewe after ovariectomy. J.Bone Miner Res 9 (suppl 1): 258

58. Hoyer H.E., Kokemohr M. und Lippert H. (1980): Druckfestigkeit menschlicher Radien. Z. Orthop.118: 816- 821

59. International Osteoporosis Foundation (2000): Aktuelle Internetseite: www.Osteofound.org

60. Ito M., Nakamura T., Matsumoto T., Tsurusaki K. and Hayashi K. (1998): Analysis of trabecular microarchitekture of human iliac bone using microcomputed tomography in patients with hip arthrosis with or without vertebral fracture. Bone 23, 2: 163-169

61. Jergas M., Glüer C., Grampp S. und Köster O. (1992): Radiologische Diagnostik der Osteoporose. Aktuelle Methoden und Perspektiven. Akt Radiol 2: 220-229

62. Jergas M. und Schmid G. (1999): Konventionelle Radiologie der Osteoporose und Röntgenabsorptiometrie. Radiologe 39:174-185

63. Jeroen A., Van Audekercke R., Talalaj M., Geusens P., Bramm E., Dequeker J. (1996): Effects of 1α-vitamin D_3 and estrogen therapy on cortical bone mechanical properties in the ovariectomized rat model. Endocrinology 137: 1358-1364

64. Jerome C.P., Carlson C.S., Register T.C., Bain F.T., Jayo M.J., Weaver D.S. and Adams M.R. (1993): Bone functional changes in intact, ovariectomized and hormon-supplemented adult cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis) evaluated by serum markers and dynamic histomorphometry. J Bone Min Res 9: 527-540

65. Kaiser H. and Ringe J.D. (1996): Cortison und Osteoporose. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York

66. Kalender W.A. (1988): Neue Entwicklungen in der Knochendichtemessung mit quantitativer Computertomographie QCT. Radiologe 28: 173-178

67. Kalu D.N. (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Min 15: 175-192

68. Kasra M. and Grynpas M.D. (1994): Effect of long- term ovariectomy on bone mechanical properties in young female cynomolgus monkeys. Bone15: 557-561

69. Keck E. and Kruse H.P. (1994): Osteoporose: Klinik – Diagnostik – Therapie. Fischer Verlag, Stuttgart

70. Keaveny T.M., Borchers R.E., Gibson L.J. and Hayes W.C. (1993): Trabecular bone modulus and strength can depend on specimen geometry. J Biomech 26, 8: 991-1000

71. Knets I. (1987): Preparation and preservation of bone tissue for testing. Lecture at the CISM Course on bone mechanics, Udine

72. Küsters, G., Geursen, R. (1993): Gesundheit für Mensch und Tier - warum Tierversuche doch nötig sind. Piper Verlag

73. Kyd P.A., De Vooght K., Kerkhoff F., Thomas E. and Fairney, A. (1998): Clinical usefulness of bone alkaline phosphatase in osteoporosis. Ann Clin Biochem 35: 717- 72

74. Legrand E., Chappard D., Pascaretti C., Duquenne M., Krebs S., Rohmer V., Basle M.F., and Audran M. (2000): Trabecular bone microarchitecture, bone mineral density, and vertebral fractures in male osteoporosis. J Bone Miner Res 15: 13-19

75. Lill C.A., Flügel A.G. und Schneider E. (1998): Eignung des Schafes als Modell für die Frakturbehandlung am osteoporotischen Knochen. AO- Forschungsinstitut, Davos, Schweiz

76. Lill C.A., Flügel A.K. and Schneider E. (2000): Sheep model for fracture treatment in osteoporotic bone: A pilot study about different induction regimes. J Orthop Trauma 14: 559- 566

77. Linde F., Nørgaard P., Odgaard A. and Søballe K. (1991): Mechanical properties of trabecular bone. Dependency on strain rate. J Biomech 24, 9: 803-809

78. Lindsay R., Silverman S.L., Cooper C., Hanley D.A., Barton I., Broy S.B., Licata A., Benhamou L., Geusens P., Flowers K., Stracke H. and Seeman E. (2001): Risk of new vertebral fractures in the year following a fracture. JAMA 17;285(3): 320-323

79. Lotz J., Gerhard T., Hayes W. (1990): Mechanical properties of trabecular bone from the proximal femur. A quantitative CT- study. J Comput Assist Tomtgr 14 (1): 107-114

80. Malluche H.H., Faugere M.C., Rush M. and Friedler R. (1986): Osteoblastic insufficiency is responsible for maintenance of osteopenia after loss of ovarian function in experimental beagle dogs. Endocrinology 119: 2649-54

81. Mann D.R., Gould K.G. and Collins D.C. (1990): Potential primate model for bone loss resulting from medical oophorectomy or menopause. J Clin Enocrinol Metabol 71: 105-110

82. Mark D., Markel D.V., Edmund Y.S., Chao (1993): Noninvasive Monitoring Techniques for Quantitative Description of Callus Mineral Content and Mechanical Properties. Clinical Orthopaedics And Related Research 293: 37-45

83. Marshall D., Johnell O. and Wedel H. (1996): Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurence of osteoporotic fractures. Br Med J 312: 1254-1259

84. Martens M., Van Audekercke R., De Meester P. and Mulier J.C. (1980): The mechanical characteristics of the long bones of the lower extremity in tosional loading. J.Biomech 13 (8): 667-76

85. Martin R.B., Butcher R.L., Sherwood L.L., Buckendhal P., Boyd R.D., Farris D., Sharkey N. and Dannicci G. (1987): Effects of ovariectomy in beagle dogs. Bone 8: 23-31

86. Mc Kenna M.J. (1992): Differences in vitamin D status between countries in young adults and the elderly. Am J Med 93: 69-77

87. Melton L.J., Chao E.Y. and Lane J. (1988): Biomechanical aspects of fractures. In: Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management, ed by Riggs B.L. and Melton L.J. New York, Raven Press: 111-113

88. Melton L.J. (1995): How many women have osteoporosis now? J Bone Miner Res.10(2):175-177

89. Miller L.C., Weaver D.S., McAlister J.A. and Koritnik D.R. (1986): Effects of ovariectomy on vertebral bone in the cynomolgus monkey. Calcif Tissue Int 38: 62-65

90. Monier-Faugere M.C., Friedler R.M., Bauss F. and Malluche H.H. (1993): A new bisphosphonate, BM 21.0955, prevents bone loss associated with cessation of ovarian function in experimental dogs. J Bone Min Res 8: 1345-1355

91. Morrison D.F. (1976): Multivariate statistical methods, Second Edition, New York, McGraw-Hill Book Co.

92. Mosekilde L., Danielsen C. and Knudsen U. (1993a): The effect of aging and ovariektomy on the vertebral bone mass and biomechanical properties of mature rats. Bone 14: 1-6

93. Mosekilde L., Weisbrode S.E., Safron J.A., Stills H.F., Jankowsky M. L., Ebert D.L., Danielsen C.C., Sogaard C.H., Franks A.F., Stevens M.L., Paddock C. L. and Boyce R.W. (1993b): Calcium- restricted ovariectomized Sinclair S-1 minipigs: An animal model of osteopenia and trabecular plate perforation. Bone 14: 379-382

94. Mullender M.G., van der Meer D.D., Huiskes R. and Lips P. (1996): Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. Bone 18: 109-113

95. Natali A.N. and Meroi E.A. (1989): A review of the biomechanical properties of bone as a material. J Biomed Eng 11: 266-276

96. Newman E., Turner A.S. and Wark J.D. (1995): The potential of sheep for the study of osteopenia: Current status and comparison with other animal models. Bone 16 (suppl 4): 277-284

97. Osteoporose in der Europäischen Gemeinschaft (2000): Aktuelle Internetseite: www.kilian.de

98. Parfitt A.M. (1992): Implications of architecture in the pathogenesis and prevention of vertebral fracture. Bone 13: 41-47

99. Pastoureau P., Arlot M.E., Caulin F., Barier J.P., Meunier P.J. and Delmas D.P. (1991): Effects of oophorectomy on biomechanical and histological indices of bone turnover in ewes. J Bone Miner Res 4 (suppl 1, abstract 447)

100. Pernthaner A., Baumgartner W., Jahn J., Plautz W. and Angel T. (1993): The hematologic parameters, concentration of minerals and metabolic products and activities of enzymes in sheep. Berl Munch Tierarztl Wochenzeitschr 106: 73-79

101. Price C.P. and Thompson P.W. (1995): The role of biochemical tests in the screening and monitoring of osteoporosis. Ann Clin Biochem 32: 244-260

102. Reiner C.H. (1991): Nicht-invasive quantitative Knochendichte-bestimmung. Osteoporose: Pathogenese, Diagnostik und Therapiemöglichkeiten Hrsg.: J.D. Ringe, Walter de Gruyter, Berlin

103. Riggs B.L and Melton LJ. (1986): Involutional osteoporosis. N Engl J Med 314,26: 1676-1686

104. Reilly D.T. and Burstein A.H. (1974): The mechanical properties of cortical bone. J Bone Joint Surg 56A: 1001-1022

105. Ringe J.D. (1993): Diagnose, Prophylaxe und Therapie. Arzneimitteltherapie 9: 302-308

106. Ringe J.D. (1995): Osteoporose: Postmenopausale Osteoporose, senile Osteoporose, sekundäre Osteoporose, Osteoporose des Mannes. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York

107. Robins S.P. (1983): Cross-linking of collagen. Isolation, structural charakterization and glycosylation of pyridinoline. J Biochem 215: 167-173

108. Rosen C.J., Morrison A., Zhou H., Storm D., Hunter S.J., Musgrave K., Chen T., Wen-Wei and Holick M.F. (1994): Elderly women in nothern New England exhibit seasonal changes in bone mineral density and calciotropic hormones. Bone Min 25: 83-92

109. Ross P.D. (1996): Osteoporosis. Arch Intern Med, 156:1399-1411

110. Seibel M.J., Cosman F., Shen V., Gordon S., Dempster D.W., Ratcliffe A. and Lindsay R. (1993): Urinary hydroxypyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption and estrogen efficacy in postmenopausal osteoporosis. J Bone Miner Res (8), 7: 881-889

111. Seibel M.J., Zipf A. und Ziegler R. (1994): Pyridinium cross-links in urine. Dtsch-Med-Wochenschr 119: 923-929

112. Seibel M.J. (1999): Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels, Methodische Aspekte, Aussagekraft, Indikation und klinische Relevanz. Der Kassenarzt 3/ 4

113. Simon L.S. and Krane S.M. (1983): Procollagen extension peptides as marker of collagen synthesis. In: Frame B. and Potts jr J.T.: Clinical Disorders of Bone and Mineral Metabolism, Excerpta Medica, Amsterdam: 108-111

114. Stracke H., Schulz A., Weber U., Ullmann J. and Schatz H. (1987): Osteocalcin and bone histology in osteoporosis. Klin Wochenschrift 16: 65(22): 1095-1100

115. Tohmé J.F., Seibel M.J., Silverberg S.J., Robins S.P. and Bilezikian J.P. (1991): Biochemical markers of bone metabolism. Z Rheumatol 50: 133-141

116. Turner C. and Burr D. (1993): Basic biomechanical measurements of bone. A tutorial. Bone 14: 595-608

117. Turner A.S., Park R.D., Aberman H.M., Villanueva A.R., Nett T.M., Trotter G.W. and Eckhoff D.G. (1993): Effects of age and ovariectomy on trabecular bone of the proximal femur and iliac crest in sheep. Trans Orthop Res Soc 18: 548

118. Turner A.S. and Villanueva A.R. (1993): Histomorphometry of the iliac crest: 9-11 year old ewes [abstract]. Proc Vet Surg 22: 413

119. Turner A.S., Alvis M., Myers W., Stevens M.L. and Lundy M.W. (1995a): Changes in bone mineral density and bone-specific alkaline phosphatase in ovariectomized ewes. Bone 17 suppl: 396-402

120. Turner A.S., Mallinckrodt C.H., Alvis M.R. and Bryant H.U. (1995b): Dose- response effects of estradiol implants on bone mineral density in ovariectomized ewes. Bone Vol.17 (suppl 4): 421-427

121. Turner A.S., Villanueva A.R., Alvis M. and Aberman H.M. (1995c): Unusual histomorphometric changes in the iliac crest from ovariectomised ewes. Bone16: 155

122. Turner C.H. (1991): Homeostatic control of bone structure: An application of feedback theory. Bone 12: 203-217

123. Uebelhart D., Schlemmer A., Johansen J., Gineyts E., Christiansen C. and Delmas P.D. (1991): Effect of menopause and hormone replacement therapie on the urinary excretion of pyridinium crosslinks. J Clin Endocrinol Metab 72: 367-373

124. Vanderschueren D., Van Herck E., Suiker A.M., Allewaert K., Visser W.J., Geusens P. and Bouillon R. (1992): Bone mineral metabolism in the adult guinea pig: Long term effects of estrogen and androgen defiency. J Bone Min Res: 1407-1415

125. Wasnich R.D. (1997): Epidemiology of Osteoporosis in the United States of America. Osteoporos Int. 7 (suppl 3): 68-72

126. Wehr U. (1998): Diagnose, Prävention und Therapie von Knochenstoffwechselerkrankungen in der Humanmedizin. Möglichkeiten und Grenzen von biochemischen Knochenmarkern. Diss., Ludwig- Maximilians- Universität, München

127. Wirner M. (1997): Knochenresorptionsmarker bei Herztransplantation, Osteoporose-prävention mit 1,25 Dihydroxyvitamin D3. Vet Med Diss, München

128. Wronski T.J. and Yen C.F. (1991): The ovariectomized rat as an animal model for postmenopausal bone loss. Bone Min Res 18: 227-236

129. WHO (1994): Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser 843: 1-129

130. WHO (2000): Aktuelle Internetseite: www.who.int

131. Yamaura M., Nakamura T., Nagai Y., Yoshihara A. and Suzuki K. (1993): Reduced mechanical competence of bone by ovariectomy and its preservation with 24r, 25-Dihydroxyvitamin D3. Administration in Beagles. Calcif Tissue Int 52: 49-52

132. Yeni Y.N., Brown C.U. and Norman T.L. (1998): Influence of bone composition and apparent density on fracture toughness of the human femur and tibia. Bone 22: 79-84

8 Anhang: Abb./ Tab.- Verzeichnis

Seite

Abb. 2.1 Mikro-Computertomographisch dargestellte Wirbelkörperbiopsie von einem gesunden Schaf in dreidimensionaler, zweidimensionaler Darstellung 10

Abb. 2.2 Mikro-Computertomographisch dargestellte Wirbelkörperbiopsie von einem osteoporotischen Schaf in dreidimensionaler, zweidimensionaler Darstellung 10

Tab. 2.1 Gesamtübersicht über die wichtigsten Risikofaktoren, die bei Männern und Frauen eine Osteoporose verursachen oder zu Osteoporose beitragen können 13

Abb. 2.3 Pathogenese: vom Risikofaktor zum Knochenbruch (nach Ringe, 1995) 17

Abb. 3.1 Darstellung der zeitlichen Abläufe innerhalb der tierexperimentellen Arbeit 21

Abb. 3.2 Uterus in situ 23

Abb. 3.3 Ovar 24

Abb. 3.4 Biopsieentnahme 25

Abb. 3.5 Biopsieloch mit entnommener Biopsie 25

Abb. 3.6 Veränderung der Steroidemenge bzw. Steroideformulierung 27

Abb. 3.7 Blutentnahmen im zeitlichen Zusammenhang mit zuvor gegebenen Steroideinjektionen 29

Abb. 3.8 Zeitpunkte der QCT- Messungen 30

Abb. 3.9 Schaf während der Messung in einem pQCT 31

Abb. 3.10 Blick auf den eingespannten Hinterlauf während einer Messung im pQCT 31

Abb. 3.11 Scout-View, Bildschirmdarstellung einer Wiederholungsmessung des Radius 32

Abb. 3.12a Radius, Spongiosa 33

Abb. 3.12b Tibia, Spongiosa 34

Abb. 3.12c Tibia, Kortikalis 34

Abb. 3.12d Calcaneus, Spongiosa und Kortikalis 34

Abb. 3.12e Wirbelkörper mit Kontur 35

Abb. 3.13 DBCS-System (Diamond bone cutting system) + Extraktor 38

Abb. 3.14 Lendenwirbelkörper mit entnommener Biopsie und zurechtgesägter Biopsie 38

Abb. 3.15 Kompression einer Spongiosabiopsie 41

Abb. 3.16 Graphik zur Darstellung der Torsionsapparatur 42

Abb. 3.17 Torsion, intakte Tibia in der Apparatur + gebrochene Tibia nach der Torsion 43

Abb. 3.18 Vier- Punkt- Biegung 44

Abb. 4.1 Steroideapplikations- und QCT-Messungszeitpunkte 48

Tab. 4.1 BMD (g/cm^3) Radius, Spongiosa, behandelte Gruppe 50

Tab. 4.2 BMD (g/cm^3) Radius, Spongiosa, Kontrollgruppe 50

Abb. 4.2 Knochendichteverlauf Radius: Spongiosa 51

Tab. 4.3 BMD (g/cm^3) Tibia, Spongiosa, behandelte Gruppe 51

Tab. 4.4 BMD (g/cm^3) Tibia, Kortikalis, behandelte Gruppe 52

Tab. 4.5 BMD (g/cm^3) Tibia, Spongiosa, Kontrollgruppe 52

Tab. 4.6 BMD (g/cm^3) Tibia, Kortikalis, Kontrollgruppe 53

Abb. 4.3a Knochendichteverlauf Tibia: Spongiosa 53

Abb. 4.3b Knochendichteverlauf Tibia: Kortikalis 53

Tab. 4.7 BMD (g/cm^3) Calcaneus, Spongiosa und Kortikalis, behandelte Gruppe 54

Tab. 4.8 BMD (g/cm^3) Calcaneus, Spongiosa und Kortikalis, Kontrollgruppe 54

Abb. 4.4 Knochendichteverlauf Calcaneus: Spongiosa und Kortikalis 55

Tab. 4.9 BMD Radius, Spongiosa 55

Tab. 4.10 BMD Tibia, Spongiosa 56

Tab. 4.11 BMD Tibia, Kortikalis 56

Tab. 4.12 BMD Calcaneus, Spongiosa und Kortikalis 56

Abb. 4.5 Knochendichteverlauf über 28 Wochen 57

Abb. 4.6 BMD Radius nach 28 Wochen: Kortikaler Knochen 58

Abb. 4.7 BMD Humerus nach 28 Wochen: Kortikaler Knochen 58

Abb. 4.8 BMD L3, L4, L5 nach 28 Wochen: Trabekulärer Knochen 59

Tab. 4.13 BMD (g/cm^3) nach 28 Wochen 59

Abb. 4.9 Mikro-CT Beckenkamm Kontrollgruppe 61

Abb. 4.10 Mikro-CT Beckenkamm OVX + D + S 61

Tab. 4.14 Deskriptive Statistik Mikro-CT vom Beckenkamm 62

Tab. 4.15 Deskriptive Statistik Mikro-CT vom Beckenkamm: relative Unterschiede zwischen dem Beginn und dem Ende der Studie 63

Abb. 4.11 Mikro-CT L5 Kontrollgruppe 64

Abb. 4.12 Mikro-CT L5 OVX + D + S 64

Tab. 4.16 Deskriptive Statistik Mikro-CT von L5 65

Abb. 4.13 Mikro-CT Femurkopf Kontrollgruppe 66

Abb. 4.14 Mikro-CT Femurkopf OVX + D + S 66

Tab. 4.17 Deskriptive Statistik Mikro-CT vom Femurkopf 67

Tab. 4.18 Kompressionstest L3, L4 68

Tab. 4.19 Kompressionstest Femurkopf 69

Abb. 4.15a Kompressionstest L3, L4, Fk: max. Kompressionskraft 69

Abb. 4.15b Kompressionstest L3, L4, Fk: Steifigkeit 70

Tab. 4.20 Torsionstest L3, L4 70

Abb. 4.16a Torsionstest Tibia: max. Drehmoment 71

Abb. 4.16b Torsionstest Tibia: Bruchwinkel 71

Tab. 4.21 Vier- Punkt- Biegung 72

Abb. 4.17a Vier- Punkt- Biegung der Tibiakortikalis: Versagenslast 72

Abb. 4.17b Vier- Punkt- Biegung der Tibiakortikalis: Steifigkeit 72

Tab. 4.22 Alkalische Phosphatase (U/l) 73

Abb. 4.18 Alkalische Phosphatase Konzentration im Blut über den Verlauf von 7 Monaten 74

Tab. 4.23 Pyridinolin (nmol/mmol Kreatinin) 74

Tab. 4.24 Desoxypyridinolin (nmol/mmol Kreatinin) 75

Abb. 4.19 Pyridinolinkonzentrationen im Urin über den Verlauf von 7 Monaten 75

Abb. 4.20 Desoxypyridinolinkonzentrationen im Urin über den Verlauf von 7 Monaten 76

Tab. 4.25 Bestimmung der Methylprednisolonwerte im Blut 76

Tab. 4.26 Korrelation mit dem Pearson Korrelations Koeffizienten von mechanischen Tests und Strukturparametern aus dem Mikro-Computertomographen 77

Abb 5.1 Röntgenbilder Schafsfemur gesund und Schafsfemur nach 7 Monaten Osteoporoseinduktion 82

Tab. 5.1 Übersicht über die nichtinvasiven Methoden zur Knochendichtemessung 89

Tab. 5.2 Klinische Osteoporosestadien definiert aus Densitometriebefund und Wirbelfrakturen 90

Abb. 5.2a Mikro-Computertomographisch dargestellte Beckenkammbiopsie von einem gesunden Schaf in dreidimensionaler und zweidimensionaler Darstellung 91

Abb. 5.2b Mikro-Computertomographisch dargestellte Beckenkammbiopsie von einem osteoporotischen Schaf in dreidimensionaler und zweidimensionaler Darstellung 91

Tab. 5.3 Vergleich zwischen Strukturparameterdifferenzen von Mensch und Schaf 94

Abb. 5.3 Makroskopische Darstellung eines humanen proximalen Femurs im Längsschnitt 97

Abb. 5.4a Makroskopische Darstellung einer Schafswirbelkörperbiopsie im Längsschnitt 98

Abb. 5.4b Makroskopische Darstellung einer Schafsfemurkopfbiopsie im Längsschnitt 98

Abb. 5.5 Bruchlastdiagramm 100

Abb. 5.6 Torsionsdiagramm 101

Abb. 5.7 Einfluss von Glukokortikoiden auf den Knochenstoffwechsel 104

Tab. 5.4 Knochenstoffwechselparameter 110

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Dr. R. Schnettler für die Überlassung des Themas bedanken. Sie erst machte mir die Arbeit am AO- Forschungsinstitut möglich.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. C. Lill, der mich in der Zeit in Davos sehr gut betreute. Ihm habe ich zu verdanken, dass ich auch bei weiteren Aufgaben, die nicht im unmittelbaren Zusammenhang mit meiner Dissertation standen, mitwirken und dabei lernen konnte.

Besonders möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. E. Schneider bedanken. Er konnte mir mit wertvollen Ratschlägen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben, helfen.

Ebenso gilt den vielen Mitarbeitern im AO-Forschungsinstitut ein besonderer Dank: Otto Maissen für die Anästhesie, Urban Lanker, Peter Erb und Dominic Perren für die Tierhaltung, Dipl. Ing. Christina Eckhardt für die Arbeit mit dem Computertomographen und dem Mikro-Computertomographen, Ronald Wieling für die Zusammenarbeit während der Operationen und die moralische Unterstützung während meines 20 monatigen Aufenthaltes in Davos, René Senn für die Bedienung des Computertomographen, Dieter Wahl für die Unterstützung bei den mechanischen Tests, Hans-Jörg Hoch für die Sterilisation und die Laborarbeiten, Iris Keller für Laborarbeiten, Elsbeth Wenzinger und Helga Klebl für die Literaturbeschaffung, sowie Dr. PhD Dominik Pfluger für die statistischen Arbeiten.

Meinen Eltern bin ich ausserordentlich dankbar, dass sie es mir durch Ihre Unterstützung ermöglichten, diese Arbeit anzufertigen.

10 Lebenslauf

Name: Ulrike Verena Gerlach

Geb.: 14.04.1971 in Bonn

Eltern: Dr. Diethild Gerlach, geb. Heuwes
Dr. Fritz Gerlach

Schwester: Dr. Renate Gerlach

Schulische Ausbildung:

- 1977- 1978 Katholische Grundschule in Bonn
- 1978- 1981 Grundschule in Witten
- 1981- 1990 Schiller- Gymnasium in Witten
  Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

- WS 1990 - SS 1992 Geographiestudium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn
- Okt. 1993 Immatrikulation an der humanmedizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität in Giessen
- März 1996 Ärztliche Vorprüfung
- Sep. 1997 1. Staatsexamen
- Juli 1998 Beginn der Arbeit an der vorliegenden Dissertation am AO-Forschungsinstitut in Davos/ Schweiz
- Juni 2000 Ende des Aufenthaltes im AO-Forschungsinstitut in Davos/ Schweiz
- Sep. 2000 2. Staatsexamen
- Okt. 2000 Immatrikulation an der humanmedizinischen Fakultät der Technischen Universität in München
- Nov. 2001 3. Staatsexamen