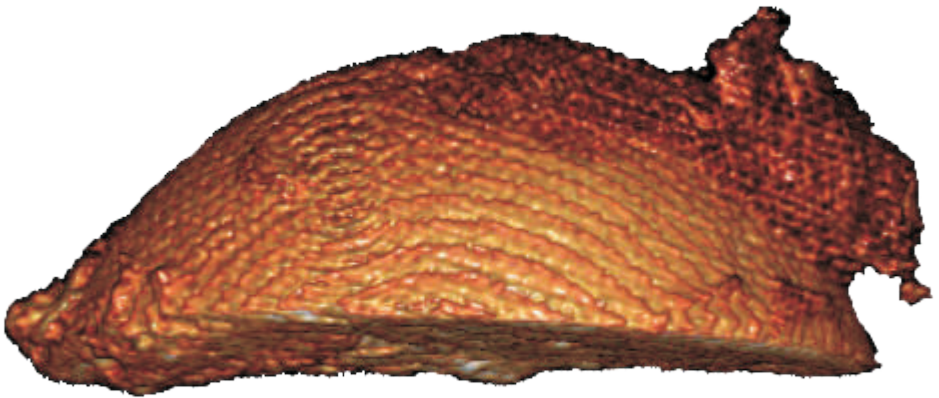


Untersuchungen zum Knochenstoffwechsel und zur
Zytokin-Expression im spongiösen Knochen des
Menschen nach Fragilitätsfraktur des
Schenkelhalses

Julia Palkovich



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2014

© 2014 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**,
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-203-2

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
info@dvf.de
www.dvf.de

Aus der Klinik für Kleintiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. Sabine Wenisch

**Untersuchungen zum Knochenstoffwechsel und zur
Zytokin-Expression im spongiösen Knochen des Menschen
nach Fragilitätsfraktur des Schenkelhalses**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Julia Palkovich

Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen, 2013

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. S. Wenisch

Prof. Dr. J. Roth

Tag der Disputation: 20.02.2014

Meiner Oma

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	5
2.1 Osteoporose.....	5
2.1.1 Formen der Osteoporose.....	5
2.1.2 Risikofaktoren und Klinik der Osteoporose.....	6
2.1.3 Prävalenz der Osteoporose.....	7
2.1.4 Diagnose der Osteoporose.....	9
2.2 Der Knochenstoffwechsel im gesunden Knochen – das Knochenremodeling.....	9
2.3 Das RANK/RANKL/OPG-System.....	12
2.4 Der Knochenstoffwechsel im osteoporotischen Knochen.....	16
2.5 Effekte der Interleukine 1, 4, 6, 10 und 13 auf den gesunden und osteoporotischen Knochen.....	20
2.6 Zytokin-Effekte im frakturierten Knochen.....	27
3 Material und Methoden	31
3.1 Material.....	31
3.1.1 Patienten und Probenmaterial.....	31
3.2 Methoden.....	32
3.2.1 Probengewinnung.....	32
3.2.2 RNA-Extraktion.....	33
3.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	34
3.2.4 DNase-Verdau.....	34
3.2.5 Reverse Transkription – aus mRNA entsteht cDNA.....	35
3.2.6 Qualitative Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion.....	36
3.2.7 Agarosegelelektrophorese – Überprüfung des PCR-Produktes.....	38
3.2.8 Quantitative RT-PCR (RT-qPCR).....	39
3.2.8.1 Überprüfung der Primereffizienz – cDNA-Verdünnungsreihe.....	39
3.2.8.2 Durchführung der RT-qPCR.....	40
3.2.9 Statistische Auswertung.....	42

3.2.10	Computertomographie der Hüftköpfe – Knochendichtemessung (Osteodensitometrie).....	45
4	Ergebnisse	47
4.1	Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte.....	47
4.2	RT-qPCR.....	47
4.2.1	Ergebnisse der cDNA-Verdünnungsreihe zur Kontrolle der Primereffizienz und Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese der RealTime-PCR-Produkte.....	48
4.3	Statistische Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen	49
4.3.1	Ergebnisse der einfaktoriellen nichtparametrischen Analysen	49
4.3.1.1	Interleukin-Expression im Geschlechtervergleich	50
4.3.1.2	Expression der Interleukine bei Schenkelhalsfrakturen und Coxarthrosen .	51
4.3.1.3	Korrelation der Interleukine zu RANKL/OPG	52
4.3.2	Ergebnisse der explorativen mehrfaktoriellen Varianzanalysen.....	54
4.3.2.1	Explorative zweifaktorielle Kovarianzanalyse.....	54
4.3.2.2	Explorative dreifaktorielle Varianzanalyse.....	55
4.4	Ergebnisse der computertomographischen Darstellungen und Osteodensitometrie	56
5	Diskussion	59
5.1	Diskussion der Ergebnisse der einfaktoriellen nichtparametrischen Analysen	59
5.1.1	Interleukin-Expression im Geschlechtervergleich	59
5.1.2	Expression der Interleukine bei Schenkelhalsfrakturen und Coxarthrosen	62
5.1.3	Korrelation der Interleukine zu RANKL/OPG	65
5.2	Diskussion der Ergebnisse der explorativen mehrfaktoriellen Varianzanalysen.....	66
5.2.1	Explorative zweifaktorielle Kovarianzanalyse.....	66
5.2.2	Explorative dreifaktorielle Varianzanalyse.....	67
5.3	Diskussion der Absenz der IL 4 und 13	70
5.4	Diskussion der computertomographischen Darstellungen und Osteodensitometrie	71
6	Zusammenfassung	73
7	Summary	75
8	Literaturverzeichnis	77
9	Anhang	90
9.1	Materialien und Methoden	90
9.1.1	Geräte	90
9.1.2	Verbrauchsmaterialien	91
9.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	91

9.1.4	Puffer und Lösungen	93
9.1.5	Primer	93
9.1.6	Software	94
9.1.7	Metadaten der Computertomographie.....	94
9.2	Statistische Ergebnisse	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Knochenremodeling innerhalb einer BMU 12

Abbildung 2: Mechanismen der Osteoklastengnese und der osteoklastären Knochenresorption..... 14

*Abbildung 3: Überblick der Regulationsmechanismen der Knochenresorption von Östrogen und
verschiedener Knochenmediatoren des Knochenmikromilieus* 17

*Abbildung 4: Darstellung der Effekte der pro-inflammatorischen und die Osteoklastengnese
stimulierenden Interleukine 1 und 6, der anti-inflammatorischen knochenprotektiven
Interleukine 4, 10 und 13 sowie des RANK/RANKL/OPG-Systems im Rahmen des
Knochenstoffwechsels, des Immun- und des Gefäßsystems* 25

*Abbildung 5: Schematische Darstellung des Ablaufs der Entzündungs- und Heilungskaskade einer
Fremdkörperreaktion*..... 27

Abbildung 6: Frakturheilung und zelluläre Beteiligung: 28

*Abbildung 7: Schematische Darstellung der Frakturheilungsphasen und entsprechend beteiligter
Zytokine* 30

Abbildung 8: Zusammensetzung der untersuchten Patientenpopulation 31

Abbildung 9: Probengewinnung mittels einer oszillierenden Säge..... 32

Abbildung 10: Computertomographie einer Hüftkopfkappe 45

Abbildung 11: Schematische Darstellung der drei Ebenen der Knochendichtemessung..... 46

Abbildung 12: Banden der GAPDH-PCR-Produkte 47

Abbildung 13: Banden der IL-RT-qPCR-Produkte 48

*Abbildung 14: Mittlere Expressionen und Standardabweichungen der IL der
Gesamtpatientenpopulation (n = 39)*..... 49

Abbildung 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der IL-Expressionen im Geschlechtervergleich 50

Abbildung 16: p-Werte und Darstellung der mittleren IL-Expressionen samt Standardabweichungen von Patienten mit Coxarthrose und Personen mit einer Schenkelhalsfraktur 51

Abbildung 17: Gegenüberstellung der durchschnittlichen IL-Expressionen, Standardabweichungen und p-Werte von Proben mit einer RANKL/OPG-Ratio ≤ 1 und solchen mit RANKL/OPG > 1 53

Abbildung 18: Normalisierte IL-Expression und Gruppenzuordnung der Patientenpopulation der explorativen dreifaktoriellen Varianzanalyse 55

Abbildung 19: HU-Mittelwerte der gemessenen Knochendichte der Femurkappen von Fraktur- und Coxarthrosepatienten 57

Abbildung 20: Exemplarische Darstellung computertomographischer Schnitte der Hüftkopfkappen ... 57

Abbildung 21: Exemplarische dreidimensionale Darstellung einer Hüftkopfkappe 58

Abbildung 22: Repräsentative Histologien der resezierten Hüftkopfspongiosa 61

Abbildung 23: Differenzierung der Patientenpopulation 68

Abbildung 24: Zusätzliche Darstellung der Standardabweichungen der explorativen dreifaktoriellen Varianzanalyse 97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Alters- und Geschlechtsverteilung der Osteoporose in Deutschland 8

Tabelle 2: Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der IL-Expressionen von Frauen und Männern..... 50

Tabelle 3: Gegenüberstellung der Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der IL-Expressionen von Coxarthrosepatienten und solchen mit einer Schenkelhalsfraktur... 52

Tabelle 4: Standardabweichungen, Mittel- und p-Werte der IL-Expressionen der Knochenproben mit RANKL/OPG ≤ 1 sowie RANKL/OPG > 1 53

Tabelle 5: p-Werte der zweifaktoriellen Kovarianzanalyse..... 54

Tabelle 6: p-Werte der dreifaktoriellen Varianzanalyse 56

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der IL- und RANKL/OPG-Expressionen der explorativen zweifaktoriellen Kovarianzanalyse..... 95

Tabelle 8: Tabellarische Darstellung der IL-Expressions-Mittelwerte und -Standardabweichungen der explorativen dreifaktoriellen Varianzanalyse 96

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
Aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser
BMD	von englisch „bone mineral density“
BMU	von englisch „basic multicellular units“
bzw.	beziehungsweise
c.a.	circa
cDNA	von englisch „copyDNA“
c-fms	von englisch „colony stimulating factor 1 receptor“
cm	Zentimeter
CT	Computertomograph
DEPC	Diethylidicarbonat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure, von englisch „deoxyribonucleic acid“
DPD	Desoxypyridinolin, Urin-Knochenmarker
DVO	Dachverband Osteologie e.V.
DXA	von englisch „dual-energy X-ray absorptiometry“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBGC	Fremdkörperriesenzellen, von englisch „foreign body giant cells“
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	von englisch „granulocyte macrophage-colony stimulating factor“
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HU	von englisch „hounsfield units“, computertomographische Messeinheit (Strahlenabsorption)

IL	Interleukin/e
in vitro	lateinisch „im Glas“, außerhalb eines lebenden Organismus stattfindend
in vivo	lateinisch „im Lebendigen“, im lebendigen Organismus ablaufend
ISCD	International Society for Clinical Densitometry
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
m ²	Quadratmeter
M-CSF	von englisch „macrophage-colony stimulating factor“
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min.	Minuten
ml	Mililiter
mod.	modifiziert
mRNA	von englisch „messengerRNA“
neutr. Granulozyten	neutrophile Granulozyten
NTC	Negativkontrolle, von englisch „no template control“
OPG	Osteoprotegerin
PBS	phosphatgepufferter Salzlösung, von englisch „phosphate buffered saline“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, von englisch „polymerase chain reaction“
PDGF	von englisch „platelet-derived growth factor“
PTH	Parathormon
RANK	von englisch „Receptor Activator of Nuclear Factor κB“
RANKL	von englisch „Receptor Activator of Nuclear Factor κB -ligand“
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure, von englisch „ribonucleic acid“
RT-PCR	von englisch „reverse transcription PCR“
RT-qPCR	von englisch „reverse transcription quantitative PCR“ oder auch „real time quantitative PCR“
u.a.	unter anderem
T-Zellen	T Lymphozyten
Tab.	Tabelle

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGF- β	von englisch „transforming growth factor β “
TNF / TNF α	von englisch „tumor necrosis factor“/ „tumor necrosis factor α “
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung. Auf Grund der gestiegenen Lebenserwartung der Menschen hat sie an klinischer Relevanz gewonnen und zählt mittlerweile zu den häufigsten Erkrankungen älterer Menschen. Gekennzeichnet ist sie durch eine Abnahme von Knochenmasse und -dichte. Die damit einhergehende Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochens und Minderung der Knochenfestigkeit prädestinieren betroffene Patienten zu Fragilitätsfrakturen (WHO Technical Report Series, 1994; Dachverband Osteologie e.V., 2009).

Die klinische Bedeutung der Osteoporose liegt insbesondere im Auftreten von Frakturen und ihren Folgen. So erschweren Heilungsstörungen des systemisch erkrankten Knochens – beispielsweise nach Hüft-Endoprothetik – die strukturelle Wiederherstellung des Knochens sowie die Osseointegration von Implantaten. Insbesondere die Biokompatibilität von zu implantierenden Werkstoffen wird entscheidend von den Material-Gewebe-Interaktionen, die sich zwischen der Materialoberfläche und der Mikroumgebung abspielen, bestimmt (Roach et al., 2007). Daher ist eine differenzierte Kenntnis der lokalen Faktoren des systemisch erkrankten Knochens sowie der Heilungsmediatoren für die Anpassung der Materialeigenschaften an das sie umgebende Mikromilieu essenziell. Die genauen Hintergründe der damit verbundenen molekularen und zellbiologischen Mechanismen sind jedoch bislang noch nicht geklärt.

Verschiedene von unterschiedlichen Zellen gebildete systemische und lokale Mediatoren, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone, regulieren die Differenzierung und Aktivierung der Knochen auf- und abbauenden Zellen und somit die Knochenremodelierung (Manolagas 2000; Pfeilschifter et al., 2002; McNamara, 2010; Zupan et al., 2013). In zahlreichen Studien wurden Östrogen-vermittelte Effekte und bedeutende Einflüsse weiterer Faktoren, insbesondere des *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B* (RANK)/*Receptor Activator of Nuclear Factor κ B-ligand* (RANKL)/*Osteoprotegerin* (OPG)-Systems (RANK/RANKL/OPG-System) (Simonet et al., 1997; Bucay et al., 1998; Nakagawa et al., 1998; Hofbauer et al., 1999a; Kong et al., 1999b; Li et al., 2000; Saika et al., 2001; D'Amelio et al., 2008), sowie der pro-inflammatorischen Interleukine 1 und 6 (Jilka et al., 1992; Poli et al., 1994; Kimble et al., 1994; Kitazawa et al., 1994; Bismar et al., 1995; Zheng et al., 1997) auf den Knochenstoffwechsel und die Pathogenese der Osteoporose belegt. Bislang liegen jedoch nur wenige Untersuchungen humaner Knochenbiopsien, die die lokale Zytokin-

Expression des Mikromilieus im fragilen Hartgewebe nach vorangegangener Fraktur widerspiegeln, vor (Tsangari et al., 2004, Abdallah et al., 2005, Zupan et al., 2102). So entstammen die meisten Daten Zellkulturstudien sowie Tiermodellen. Darüber hinaus belegen Untersuchungen osteoporotisch bedingte Veränderungen der Blut-Zytokin-Konzentrationen betroffener Patienten (Scheidt-Nave et al., 2001; Charatcharoenwitthaya et al., 2007; Cauley et al., 2007; Ding et al., 2008; Barbour et al., 2012). Hierbei stellt sich jedoch die Frage, ob zirkulierende Spiegel adäquat die lokale Expression der Mediatoren des Knochenmikromilieus wiedergeben, insbesondere da die wenigsten von ihnen knochenspezifisch sind und daher von einer Vielzahl nicht-skeletaler Zellen synthetisiert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Bestimmung der mRNA-Expressionen von in den Knochenstoffwechsel involvierter Mediatoren in der Spongiosa von Femurköpfen nach Fragilitätsfraktur des Schenkelhalses. Die Untersuchungen wurden im Rahmen des „Sonderforschungsbereich/Transregio 79 - *Werkstoffe für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen*“, Teilprojekt B2 „*Charakterisierung des Kallus im systemisch erkrankten Knochen*“ am Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Ziel dieses interdisziplinären Forschungsprojektes ist es, neue Knochenersatzmaterialien und Implantatwerkstoffe für den systemisch erkrankten Knochen des Menschen zu generieren, zu untersuchen und zu testen (Sonderforschungsbereich/Transregio 79, 2010-2014).

Als Hauptrisikofaktoren einer (primären) Osteoporose gelten u.a. das weibliche Geschlecht sowie, bei beiden Geschlechtern, ein höheres Lebensalter und eine damit assoziierte Östrogendefizienz. Von osteoporotisch bedingten Fragilitätsfrakturen sind somit insbesondere postmenopausale Frauen (ab ca. 50/55 Jahren) sowie Männer höheren Lebensalters (ab ca. 60 Jahren) betroffen. Um diese klinische Zielgruppe für biokompatible Werkstoffe zu erfassen, wurden daher in die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ausschließlich Patienten mit einem Alter von mindestens 60 Jahren einbezogen.

Für die Ätiologie-adaptierte Generierung neuer Knochenersatzmaterialien und Implantatwerkstoffe für den systemisch erkrankten, porösen Knochen sind genaue Kenntnisse über die Zusammensetzung der knöchernen Mikroumgebung von großer Bedeutung.

Das Erkenntnisinteresse dieser Arbeit lag daher in der Ermittlung von Expressionsprofilen der pro-inflammatorischen und Osteoklasten-stimulierenden Interleukine 1 β und 6, der anti-inflammatorischen Interleukine 4, 10 und 13 sowie der den Knochenstoffwechsel regulierenden Faktoren RANKL und OPG. Untersucht wurde Hüftkopfspongiosa von Frauen und Männern der beschriebenen Altersgruppe, die sich infolge einer Schenkelhalsfraktur der Implantation einer Teilendoprothese unterziehen mussten. Als Kontrollgewebe diente die Spongiosa von Patienten, deren Oberschenkelkopf wegen arthrotischer Veränderungen des Hüftgelenkes (Coxarthrose) reseziert wurde. Die Wahl dieses Untersuchungsdesigns erfolgte – in Übereinstimmung mit Studien ähnlicher Untersuchungsschwerpunkte (Tsangari et al., 2004, Abdallah et al., 2005, D’Amelio et al., 2011; Zupan et al., 2012) – auf Grund der ethischen Schwierigkeit knochengesundes Kontrollgewebe zu rekrutieren.

Das Knochenmaterial wurde

- auf die Expression der genannten pro- und anti-inflammatorischen Interleukine sowie
- auf eine potenzielle osteoporotische Knochenstoffwechselsituation

zur Beantwortung folgender Fragestellungen untersucht:

- Welche molekularen Markerprofile charakterisieren den durch Fragilitätsfrakturen (Schenkelhalsfrakturen) betroffenen Knochen im Unterschied zu nicht frakturiertem Gewebe (Coxarthrosen)?
- Gibt es Unterschiede in der lokalen Interleukin-Expression im Vergleich von Frauen und Männern?
- Wie viele der untersuchten Patienten weisen eine potenzielle osteoporotische Knochenstoffwechselsituation mit entsprechendem RANKL/OPG-Verhältnis (RANKL/OPG > 1) auf?
- Wie stellen sich die Interleukinmuster der Spongiosa mit einem unausgeglichenen Stoffwechsel (RANKL/OPG > 1) im Vergleich zu Knochen mit ausgewogenen (RANKL/OPG \leq 1) Knochenumbauraten dar?

Mittels molekularbiologischer Untersuchungen (RT-qPCR) wurden die Expressionsprofile ausgewählter Mediatoren des Knochenmikromilieus quantifiziert, um im Sinne der formulierten Fragestellungen differenzierte Informationen über die Zytokin- und Stoffwechselsituation des frakturierten und von Knochenverlust gekennzeichneten Knochens zu erhalten.

2 Literaturübersicht

2.1 Osteoporose

Die Osteoporose gehört, u.a. wegen der steigenden Lebenserwartung des Menschen, zu den weltweit am häufigsten auftretenden Erkrankungen (Raisz, 2005; Häussler et al., 2006). Osteoporose ist eine systemische, mit einem Verlust der Knochenmasse und einer damit verbundenen Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochens einhergehende Skeletterkrankung. Charakterisiert ist sie durch eine verringerte Bruchfestigkeit der knöchernen Strukturen und eine daraus resultierende Frakturneigung (WHO Technical Report Series, 1994; Dachverband Osteologie e.V., 2009).

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation [World Health Organization (WHO)] leiden mehr als 75 Millionen Menschen in Europa, Japan und den USA an dieser Erkrankung (WHO Technical Report Series, 1994; WHO Summary Meeting Report, 2007). 8,9 Millionen der betroffenen Personen erleiden eine Fraktur, davon über 4,5 Millionen in Europa und den USA. In den Industriestaaten liegt nach WHO-Angaben das Lebenszeitrisiko für eine osteoporotisch bedingte Fraktur bei 30 % - 40 % (WHO Summary Meeting Report, 2007). Dementsprechend wurde in internationalen Studien bei ca. 30 % der postmenopausalen Frauen sowie älteren Männern mit Knochenbrüchen auch eine reduzierte Knochendichte ermittelt (Dachverband Osteologie e.V., 2009).

2.1.1 Formen der Osteoporose

Ätiologisch wird zwischen der *primären* und der *sekundären* Osteoporose unterschieden (McNamara, 2010).

- Die *primäre* Osteoporose kann sich in Form einer **High-** oder **Low-Turnover-Osteoporose** manifestieren:
 - Eine gesteigerte Knochenumbaurate mit erhöhter Knochenresorption (High-Turnover) führt zu einer **High-Turnover-Osteoporose**. Dieser Osteoporose-Typ I tritt, bedingt durch den Östrogenmangel, insbesondere bei Frauen innerhalb der ersten postmenopausalen Dekade (< 65 Jahre) auf (Riggs et al., 1998, 2002; Eriksen et al., 1999; Adler, 2006).

- Liegt ein reduzierter Knochenaufbau bei normaler oder leicht verminderter Knochenresorption vor, entwickelt sich eine **Low-Turnover-Osteoporose**. Dieser Typ II wird bei Personen beider Geschlechter im höheren Lebensalter (> 65 Jahre) beobachtet und daher auch als altersbedingte oder senile Osteoporose bezeichnet (Riggs et al., 1998, 2002; Adler, 2006; Duque und Troen, 2008).
- Die *sekundäre* Osteoporose kommt sowohl bei alten als auch bei jungen Menschen beider Geschlechter vor. Sie wird durch eine Primärerkrankung (wie Rheumatoide Arthritis, primärer Hyperparathyreoidismus, Hyperthyreose oder Cushing-Syndrom) und gegebenenfalls ein mit der Erkrankung verbundenes hormonelles Ungleichgewicht oder deren medikamentöse Therapie (z.B. Glucocorticoide, Diuretika, Antiepileptika) verursacht (Dachverband Osteologie e.V., 2009; McNamara, 2010).

2.1.2 Risikofaktoren und Klinik der Osteoporose

Risikofaktoren für Osteoporose sind einerseits veränderbare und somit reduzierbare Einflüsse, wie Bewegungsmangel, Fehlernährung, primäre Grunderkrankungen und die Einnahme bestimmter Medikamente (z.B. Antiepileptika, Antidepressiva, Glucocorticoide). Andererseits spielen nicht beeinflussbare Faktoren, wie zunehmendes Alter, das Geschlecht sowie eine genetische Veranlagung eine entscheidende Rolle (Dachverband Osteologie e.V., 2009).

Die Entstehung der Osteoporose verläuft meist langsam. Die Betroffenen weisen in der Regel keine Symptome oder Schmerzen auf (Dachverband Osteologie e.V., 2009).

Der osteoporotische Verlust von Knochenmasse und -dichte (Knochenverlust) und die damit verbundene Verschlechterung der Knochenmikroarchitektur haben eine Reduktion der Knochenfestigkeit zur Folge. Klinisch ist die Osteoporose daher durch eine erhöhte Frakturneigung gekennzeichnet. Bereits Bagateltraumen können zu sogenannten Fragilitätsfrakturen führen. Lokalisiert sind diese insbesondere an den Wirbelkörpern, dem Femurhals, der Trochanter-Region und dem distalen Radius (Robert-Koch-Institut, 2011). Insbesondere die nichtvertebralen Knochenbrüche treten größtenteils sturzbedingt auf. Wirbelkörperfrakturen können mitunter auch während Alltagstätigkeiten durch minimale Traumata verursacht werden. Die klinische Bedeutung der Osteoporose liegt somit v.a. im Auftreten von Frakturen und ihren Folgen. Diese sind insbesondere akute und chronische

Entzündungen, die schließlich zu körperlichen Beeinträchtigungen führen können. Es kommt zu nicht unerheblichen Einschränkungen der Lebensqualität. Sind infolge der Erkrankung bereits eine oder mehrere Frakturen aufgetreten, wird dies als *manifeste* Osteoporose bezeichnet (Dachverband Osteologie e.V., 2009).

Außerdem besteht nach WHO und dem Dachverband Osteologie e.V. (DVO) eine Kausalität zwischen Wirbel- sowie peripheren Frakturen und einer erhöhten Mortalität (WHO Technical Report Series, 1994; Dachverband Osteologie e.V., 2009). Darüber hinaus wird auf eine Verbindung zwischen einer niedrigen Knochendichte und einem erhöhten kardiovaskulären Risiko hingewiesen (Dachverband Osteologie e.V., 2009).

2.1.3 Prävalenz der Osteoporose

Für Deutschland liegen derzeit keine aktuellen, d.h. in dem Zeitraum der letzten zwei Jahre erhobenen Daten über die Prävalenz der Osteoporose vor. Ergebnisse entsprechender Erhebungen (aus dem Zeitraum März 2012 bis Anfang 2013) werden jedoch, laut des Robert-Koch-Institutes (RKI), Anfang 2014 erwartet (telefonische Auskunft des RKI im Mai 2013, Frau Lange). Die letzten diesbezüglich veröffentlichten Zahlen erschienen 2006 (Häussler et al., 2006) und 2011 bzw. 2012 (Robert-Koch-Institut, 2011, 2012), wobei sich letztere auf Datenerhebungen aus den Jahren 2009 und 2010 beziehen.

Eine Analyse der Routinedaten einer gesetzlichen Krankenkasse (Gmünder Ersatzkasse) und Abrechnungsdaten des Zentralinstitutes der Kassenärztlichen Versorgung ergab, dass im Jahr 2003 fast ein Viertel der ≥ 50 Jährigen an Osteoporose erkrankt war. Dies entspricht rund 8 Millionen Menschen von mindestens 50 Jahren, davon 83 % Frauen. 4,3 % der Erkrankten erlitten eine Fraktur. Aus diesen Daten ergibt sich eine Prävalenz von 25,8 % (Häussler et al., 2006).

Eine im Rahmen der Gesundheitsberichterstattung des Bundes von September 2009 bis Juli 2010 durchgeführte telefonische Gesundheitsbefragung des RKI zeigt eine Osteoporose-Gesamtprävalenz dieser Altersgruppe von 11,3 %. Die Lebenszeitprävalenz von Osteoporose in der Altersgruppe der 50- bis 64-jährigen Frauen liegt demnach bei 9,4 % bzw. der Männer bei 3,4 %. Mit zunehmendem Alter (> 65 Jahre) steigt sie auf 23,4 % (Frauen) bzw. 5,6 % (Männer) (Robert-Koch-Institut, 2012).

In beiden Studien wurde eine höhere Prävalenz bei Frauen im Unterschied zu Männern festgestellt. Außerdem steigt sie im Alter deutlich an. Berücksichtigt werden muss jedoch bei beiden Umfragen, dass die ermittelten Prävalenzen sich nur auf ärztlich diagnostizierte Osteoporosen beziehen. So wurden Patienten ohne Osteoporose-Diagnose, d.h. Patienten ohne Arztkontakt oder nicht erkannte Osteoporosekranke, nicht erfasst (Häussler et al., 2006; Robert-Koch-Institut, 2011, 2012).

Ähnliche Zahlen finden sich in den Osteoporose-Leitlinien des DVO (Dachverband Osteologie e.V., 2009). Hiernach liegt die Prävalenz einer Osteoporose-Erkrankung im deutschsprachigen Raum bei postmenopausalen Frauen im Alter von 55 Jahren bei 7 % und steigt im Alter von 80 Jahren auf 19% an. Für Männer, prämenopausale Frauen sowie Personen mit einer sekundären Osteoporose macht der DVO keine Angaben.

Das Auftreten von Frakturen als Folge einer Osteoporose-Erkrankung nimmt mit dem Alter exponentiell zu. Mit jeder Dekade des Lebensalters verdoppelt sich ungefähr das Risiko einer Fraktur. Bei Personen im Alter von 50 bis 79 Jahren liegt die jährliche Inzidenz nach DVO-Angaben in Deutschland für nichtvertebrale Brüche bei 1,9 % (Frauen) bzw. 0,7 % (Männer) sowie für nachweisbare Wirbelkörperfrakturen bei Frauen bei 1 % und 0,6 % bei den Männern. Nach Adler (2006) erleiden Männer im Durchschnitt ungefähr zehn Jahre später als Frauen eine Fraktur.

Die Prävalenzdaten der drei Quellen sind in Tabelle 1 gegenübergestellt.

Tabelle 1: Alters- und Geschlechtsverteilung der Osteoporose in Deutschland (Lebenszeitprävalenz in %)

Geschlecht	Alter	Häussler et al., 2006 (Daten aus 2003)	RKI, 2012 (Datenerhebung 9/2009 - 7/2010)	DVO-Leitlinien, 2009
Frauen	50 – 64	23,3	9,4	55 Jährige: 7
	65 – 74	46,7		
	ab 65		23,4	80 Jährige: 19
	≥ 75	59,2		
Männer	50 – 64	7,1	3,4	
	65 – 74	11,4		
	ab 65		5,6	
	≥ 75	16,1		
Gesamt	≥ 50	25,8	11,3	

(eigene Darstellung)

2.1.4 Diagnose der Osteoporose

Die Diagnose der Osteoporose basiert auf einer differenzierten Anamnese mit Erhebung der Krankengeschichte und möglichen familiären Dispositionen sowie einer umfassenden klinischen Untersuchung. Bei Verdacht auf eine Fraktur, insbesondere der Wirbel, folgt die bildgebende Diagnostik mittels Röntgen. Anhand von Laboruntersuchungen können Grunderkrankungen einer sekundären Osteoporose bzw. Mineralisationsstörungen des Knochens, wie beispielsweise Vitamin D-Mangel, ausgeschlossen werden (Dachverband Osteologie e.V., 2009).

Die Beurteilung der Knochenbrüchigkeit durch Bestimmung des Mineralgehaltes des Knochens basiert bei beiden Geschlechtern auf der Messung der Knochendichte (*bone mineral density* = BMD) (Osteodensitometrie). Diese wird mittels *dual-energy X-ray absorptiometry* (DXA) im Bereich der Lendenwirbelsäule und des proximalen Femur als Flächendichte (SI-Einheit: kg/m²) bestimmt (Dachverband Osteologie e.V., 2009). Eine für Osteoporose charakteristische niedrige Knochendichte liegt vor, wenn hierbei die Standardabweichung der BMD 2,5 oder mehr unter der durchschnittlichen Knochendichte junger erwachsener Frauen liegt, d.h. ein T-Wert von $\leq -2,5$ ermittelt wird (WHO Technical Report Series, 1994; Dachverband Osteologie e.V., 2009). Hierbei gilt: je niedriger die Knochendichte, desto höher ist das Frakturrisiko (Looker et al., 2000). Bei DXA T-Werten zwischen -1 und -2,5 wird von einer erniedrigten Knochendichte und somit von einer Osteopenie gesprochen (WHO Technical Report Series, 1994; Dachverband Osteologie e.V., 2009).

2.2 Der Knochenstoffwechsel im gesunden Knochen

– das Knochenremodeling

Das Knochengewebe unterliegt lebenslang einem Umbauprozess. Während den Lebensjahren des Wachstums kommt es dabei zu einer Veränderung der Knochengeometrie und -größe. Diese Gestaltveränderung des Knochens als Antwort auf physiologische und mechanische Einflüsse wird *modeling* genannt (Frost, 1969; Clarke, 2008; Martin und Seeman, 2008). Auch nach dem Ende der Pubertät und bis zum Ausfall der Gonadenfunktion findet stetig eine Knochenerneuerung statt. Unter physiologischen Umständen besteht dabei ein dynamisches Gleichgewicht zwischen osteoklastären Resorptionsvorgängen und osteoblastärer Knochenbildung (Manolagas, 2000; McNamara, 2010). Dieses Remodeling (*bone remodeling*) ermöglicht im Unterschied zum *modeling*, die annähernde Aufrechterhaltung der

Knochenmasse, ohne dabei bedeutende Veränderungen der Knochenquantität, -geometrie oder -größe zu bewirken (Frost, 1969; Martin und Seeman, 2008). Unter physiologischer mechanischer Belastung entstehen Mikroverletzungen der knöchernen Strukturen. Im Verlaufe des Knochenenerneuerungsprozesses wird dieser alte Knochen ersetzt (Frost, 1997; Clarke, 2008) und die Mineral-Homöostase des Knochens aufrechterhalten (Clarke, 2008). Die dabei aufeinander abgestimmten Resorptions- und Formationsvorgänge der beteiligten Zellen führen am Knochen zur Entstehung von (eigenständigen) temporären anatomischen Strukturen, den sogenannten „Basic Multicellular Units“ (BMU) (Frost, 1969; Parfitt, 1994). Sie umfassen die lokal am Remodeling beteiligten Osteoklasten und Osteoblasten, die versorgenden Blutgefäße, das lokale Bindegewebe (Parfitt, 1994) sowie (im weiteren Sinn) die assoziierten Osteozyten und Immunzellen (Martin und Seeman, 2008). Im gesunden adulten humanen Knochen werden jährlich drei bis vier Millionen dieser BMUs mit einer zeitlichen Aktivitätsspanne von sechs bis neun Monaten zum Zwecke der zyklischen Knochenerneuerung gebildet. Alternde Osteoklasten und Osteoblasten werden dabei durch neue ersetzt (Manolagas, 2000).

Die beiden für die Knochenregeneration zuständigen Zelltypen (Osteoblasten und Osteoklasten) entstammen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (Manolagas, 2000). Osteoblasten differenzieren sich aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen, aus denen u.a. auch Chondrozyten, Adipozyten und Muskelzellen entstehen (Caplan, 1991; Rickard et al., 1996). Die Progenitorzellen der multinukleären Osteoklasten dagegen sind mononukleäre hämatopoetische Zellen der Monozyten-Makrophagenlinie (Baron et al, 1986; Udagawa et al., 1990).

Die kontinuierlich stattfindenden Remodeling-Zyklen erfolgen als Antwort auf physikalische Reize, wie mechanische Belastungen oder das Auftreten von Mikrofrakturen, und metabolische Einflüsse, insbesondere Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren (Manolagas, 2000).

Ein Zyklus (Abb. 1) beginnt mit einer durch mesenchymale Stammzellen vermittelten Aktivierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen, ihrer Proliferation und Differenzierung zu mononukleären Präosteoklasten und schließlich der Fusion von Präosteoklasten zu multinukleären Osteoklasten (Evans und Fox, et al., 2007; Martin und Seeman, 2008). Nach Retraktion der in der Ruhephase dem Knochen aufliegenden *bone lining cells* und Resorption

der die Knochenoberfläche umgebenden nicht mineralisierten Osteoidschicht (Martin und Seeman, 2008; Sims und Gooi, 2008; McNamara, 2010), lagern sich die reifen Osteoklasten mittels Integrin-vermittelter Adhäsionsmechanismen eng der Knochenoberfläche an (Sims und Gooi, 2008). Es folgt ihre Polarisation mit Ausrichtung ihrer resorptiven Zellseite in Richtung der Knochenoberfläche (Sims und Gooi, 2008). Durch Fusion der zahlreichen intrazellulären Vesikel mit der osteoklastären Plasmamembran faltet sich diese zum sogenannten Bürstensaum (*ruffled border*). Die *ruffled border* stellt das resorptive Organell des Osteoklasten dar und ist somit für den Knochenabbau unerlässlich. Die Verbindungszone zwischen Osteoklast und der Knochenoberfläche wird als *sealing zone* bezeichnet. Diese Aktinfilamentstruktur ist ringartig um die *ruffled border* organisiert (Väänänen und Horton, 1995). Einmal dem Knochen angelagert, erzeugen Osteoklasten ein isoliertes extrazelluläres Mikromilieu zwischen sich und der Knochenoberfläche. Es folgt der Knochenabbau. Für eine leichtere Mobilisierung des Knochenminerals wird der pH-Wert im Bereich des Resorptionskompartiments durch osteoklastäre Wasserstoffionen-Sekretion auf 4,5 gesenkt (Abb. 2) (Teitelbaum, 2004). Mittels verschiedener vesikulär freigesetzter proteolytischer Enzyme (saure Phosphatasen, Proteasen wie Cathepsin K sowie Matrix-Metalloproteinasen) lösen Osteoklasten die Knochenmatrix auf (Nesbitt und Horton, 1997; Teitelbaum, 2004). Die Abbauprodukte werden endozytotisch durch den Osteoklasten aufgenommen und schließlich auf der antiresorptiven Zellseite freigegeben (Nesbitt und Horton, 1997; Wenisch et al., 2003). Die Resorptionsvorgänge werden schließlich durch Apoptose der Osteoklasten (Roodman, 1999) sowie möglicherweise durch parakrine Botenstoffe, die der resorbierten Knochenmatrix oder rekrutierten mesenchymalen Zellen entstammen (Martin und Seeman, 2008; Henriksen et al., 2009), beendet und die osteoblastäre Knochenformation initiiert. Die vermutlich ebenfalls durch diese Signale rekrutierten mesenchymalen Stammzellen (Martin und Seeman, 2008; Sims und Gooi, 2008; Henriksen et al., 2009) differenzieren sich schließlich zu reifen Osteoblasten. Diese synthetisieren die neue organische Knochenmatrix, das Osteoid, welches u.a. aus Kollagen (insbesondere Kollagen I), Proteoglykanen und Glykoproteinen besteht und schließlich mineralisiert. Die darin eingebetteten Osteoblasten werden zu Osteozyten. Die Knochenoberfläche wird wieder von *bone lining cells*, die „inaktive“ Osteoblasten darstellen, bedeckt. (Sims und Gooi, 2008).

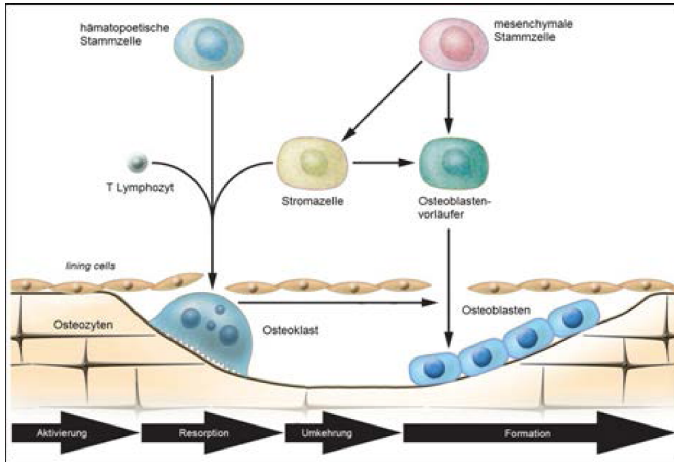


Abbildung 1: modifiziert (mod.) nach Raisz, 2005: Das Knochenremodeling innerhalb einer BMU:

Die Interaktion von hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen initiiert die Aktivierung von knochenresorbierenden Osteoklasten. Nach Beendigung der Resorptionsvorgänge erfolgt die Knochenformation durch sich aus Zellen der Stroma-/Osteoblastenlinie differenzierende reife Osteoblasten. Sie bilden Osteoid, welches schließlich mineralisiert. Am Ende eines Knochenremodeling-Zyklus werden die in die neue Knochenmatrix eingebetteten Osteoblasten zu Osteozyten und die Knochenoberfläche wieder von *lining cells* (inaktive Osteoblasten) bedeckt.

2.3 Das RANK/RANKL/OPG-System

Die Knochenresorption durch Osteoklasten und der osteoblastäre Knochenaufbau sind auf regulatorischer Ebene eng miteinander gekoppelt (Martin und Seeman, 2008). So benötigt die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen der Monozyten-Makrophagenlinie zu knochenresorbierenden Osteoklasten die Präsenz von mesenchymalen Stammzellen oder ihrer osteoblastären Nachfolger (Udagawa et al., 1990; Suda et al., 1999).

Dem sogenannten RANK/RANKL/OPG-System kommt im Rahmen dieser Interaktion zwischen hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen eine entscheidende Rolle zu (Wada et al., 2006; Boyce und Xing, 2007).

Zwei dieser drei genannten Proteine, nämlich der Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (RANK) sowie der RANK -ligand (RANKL), sind membrangebundene Moleküle

(Manolagas, 2000). Von ihnen wird der Rezeptor RANK v.a. auf der Zelloberfläche von Osteoklasten und ihren mononukleären hämatopoetischen Vorläuferzellen sowie dendritischen Zellen exprimiert (Hsu et al., 1999; Boyce und Xing, 2007). Sein Ligand RANKL hingegen wird u.a. in Knochenmarksstromazellen und Osteoblasten (Suda et al., 1999; Boyce und Xing, 2007) sowie T-Lymphozyten gebildet (Kong et al., 1999a; Boyce und Xing, 2007) und kommt, neben der membranständigen Form, auch als sekretorisches Protein vor (Ikeda et al., 2001). RANKL bindet mit hoher Affinität an seinen Rezeptor RANK. Diese Interaktion führt, vermittelt durch intrazelluläre Signalwege, zur Osteoklastendifferenzierung sowie -aktivierung und infolgedessen zur Knochenresorption (Nakagawa et al., 1998; Manolagas, 2000). Osteoprotegerin (OPG), das dritte der drei genannten Proteine, stellt einen gelösten *decoy*-Rezeptor für beide RANKL-Formen (zellständige und gelöste Form) dar (Nakagawa et al., 1998; Sims und Gooi, 2008). Es wird insbesondere von Zellen der Stroma-/Osteoblastenlinie sezerniert (Sims und Gooi, 2008) und bindet im „Wettstreit“ mit RANK dessen Liganden RANKL (Nakagawa et al., 1998; Sims und Gooi, 2008). OPG blockiert dadurch die RANKL/RANK-Interaktion (Manolagas, 2000; Sims und Gooi, 2008) und fungiert so als ein sehr potenter Regulator bzw. Inhibitor der Osteoklastengnese und Knochenresorption (Simonet et al., 1997; Suda et al., 1999).

Ein weiterer von Zellen der Stromalinie produzierter und gemeinsam mit RANKL essenziell die Osteoklastendifferenzierung beeinflussender Faktor ist M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) (Udagawa et al., 1990). Dieses sekretorische Protein induziert mittels Bindung an seinen Rezeptor (c-fms) auf Osteoklastenvorläuferzellen deren Proliferation, die Osteoklastengnese sowie die RANK-Expression dieser Zellen (Arai et al., 1999). Die Zellen der Stroma-/Osteoblastenlinie produzieren demnach zwei Moleküle (M-CSF und RANKL), die für die Reifung von hämatopoetischen Stammzellen zu knochenresorbierenden Osteoklasten nötig sind (Abb. 2). So stellen RANK, RANKL und OPG, wie durch zahlreiche Ratten- und Mausmodellen belegt (Simonet et al., 1997; Bucay et al., 1998; Kong et al., 1999b; Li et al., 2000), drei Schlüsselmoleküle des Knochenremodeling dar (Abb. 2).

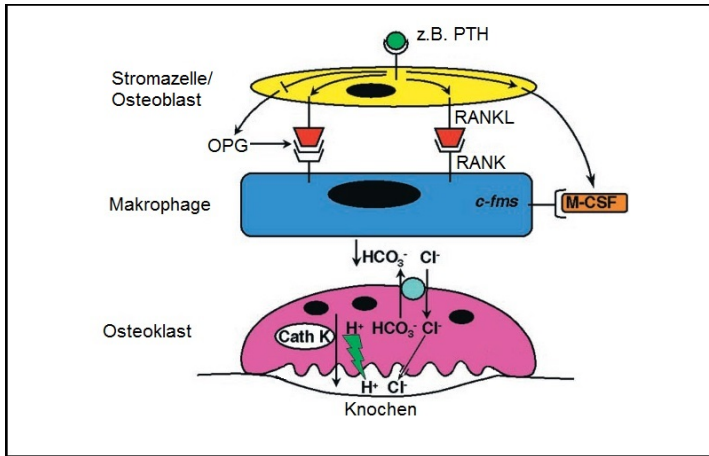


Abbildung 2: mod. nach Teitelbaum, 2000: Mechanismen der Osteoklastengengese und der osteoklastären Knochenresorption:

Stromazellen und Osteoblasten synthetisieren – u.a. induziert durch Parathormon (PTH) – RANKL und M-CSF. Durch Bindung an ihre Rezeptoren (RANK bzw. c-fms) auf Zellen der hämatopoetischen Monozyten-/Makrophagenlinie bewirken diese deren Differenzierung und Fusion zu multinukleären knochenresorbierenden Osteoklasten. Die Osteoklastengengese wird durch Bindung von OPG an RANKL gehemmt. Der Osteoklast bindet an die Knochenoberfläche, polarisiert und erzeugt mittels Protonenpumpe ein isoliertes extrazelluläres Mikromilieu ($\text{pH} = 4,5$). Die Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes wird durch einen $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austauscher auf der antiresorptiven Zelleite gewährleistet. Das saure Milieu in der Resorptionslücke ermöglicht die Knochenresorption, u.a. durch freigesetzte proteolytische Enzyme, insbesondere Cathepsin K.

Gemeinsam mit weiteren den Knochenstoffwechsel beeinflussenden Faktoren (Hormone, Zytokine, Wachstumsfaktoren), bestimmt das RANK/RANKL/OPG-System die Aufrechterhaltung des dynamischen Gleichgewichtes zwischen Knochenabbau und -formation und somit eine gesunde Knochenbilanz. Entscheidend dabei ist das Verhältnis von RANKL zu OPG. Ein Missverhältnis zwischen diesen beiden Molekülen bewirkt eine veränderte Knochenumsatzrate, die schließlich ihren Ausdruck in verschiedenen systemischen Knochenerkrankungen bekommen kann (Boyce und Xing, 2007).

Entsprechend wurden in Stromazellen des Knochenmarks postmenopausaler Frauen erhöhte RANKL-Expressionen gemessen. Zusätzlich wurde hier ein positiver Zusammenhang der RANKL-Level mit Knochenresorptionsmarkern sowie eine negative Korrelation mit Östrogenkonzentrationen im Serum nachgewiesen (Eghbali-Fatourehchi et al., 2003).

Die Daten bezüglich OPG-Konzentrationen im Alter sowie im Rahmen der Osteoporose sind in der Literatur nicht einheitlich (Hofbauer et al., 2004). Nach *in vitro* Studien von Hofbauer et al. (1999a) und Saika et al. (2001) an mesenchymalen Stammzellen und reifen Osteoblasten scheint die OPG-Synthese durch Östrogen stimuliert zu werden. In weiteren vereinzelt Studien wurde eine entsprechende positive Korrelation von OPG- und Östrogenserumkonzentrationen gefunden (Szulc et al., 2001; Rogers et al., 2002). Dementsprechend konnten Makhluף et al. (2000) erniedrigte OPG mRNA-Konzentrationen in *in vitro*-kultivierten Knochenmarkszellen von postmenopausalen Frauen nachweisen. Demgegenüber stehen jedoch zahlreiche Untersuchungen, die im Alter eine eindeutige Steigerung der OPG-Spiegel im Serum von Männern und Frauen mit und ohne Osteoporose und somit einen altersabhängigen OPG-Anstieg belegen. (Yano et al., 1999; Szulc et al., 2001; Khosla et al., 2002a; Kudlacek et al., 2003). Gleichzeitig wurde in einigen dieser Studien eine positive Korrelation der OPG-Konzentrationen mit Knochenresorptionsmarkern sowie ein negativer Zusammenhang der OPG-Werte mit der BMD festgestellt. Somit scheinen OPG-Serumlevel im Alter anzusteigen und zusätzlich bei Personen mit einem gesteigerten Knochenverlust erhöht zu sein (Yano et al., 1999; Khosla et al., 2002a; Ueland et al., 2003). Möglicherweise stellen diese im Alter zunehmenden OPG-Serumwerte einen kompensatorischen Effekt auf die gesteigerte osteoklastäre Knochenresorption dar und dienen so der Prävention eines weiter fortschreitenden Knochenverlustes (Yano et al., 1999; Khosla et al., 2002a; Ueland et al., 2003). Vielleicht sind sie aber auch auf eine erhöhte OPG-Freisetzung aus dem Knochen als Antwort auf vermehrt auftretende Mikrofrakturen zurückzuführen (Hofbauer et al., 2004). Ueland und Kollegen (2003) untersuchten Knochenbiopsien postmenopausaler Frauen und konnten hier ebenfalls altersabhängig erhöhte OPG-Level nachweisen. Diese waren zudem signifikant mit niedrigen BMD-Werten korreliert.

Darüber hinaus besteht ein Zusammenhang zwischen einer reduzierten Knochendichte und einem erhöhten kardiovaskulären Risiko (Hak et al., 2000; Schulz et al., 2004). Diese Korrelation wurde daher auch in die DVO-Leitlinien Osteoporose (Dachverband Osteologie e.V., 2009) aufgenommen. Bei der Entstehung vaskulärer Erkrankungen spielen vermutlich Änderungen des RANK/RANKL/OPG-Systems eine Rolle. Während OPG in Tiermodellen protektiv auf das Gefäßsystem wirkt, scheinen RANKL und OPG beim Menschen im Rahmen von systemischen Knochenkrankungen die Gefäßkalzifizierung zu stimulieren (Hofbauer und Schoppet, 2001; Hofbauer et al., 2004).

2.4 Der Knochenstoffwechsel im osteoporotischen Knochen

Ein Ungleichgewicht des RANKL/OPG-Systems zugunsten des Osteoklastenaktivators RANKL hat eine Dysbalance der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten zur Folge (Hofbauer et al., 2004).

Neben dem RANK/RANKL/OPG-System wird der Knochenstoffwechsel durch zahlreiche im Knochenmarkmikromilieu gebildete Wachstumsfaktoren und Zytokine [wie tumor necrosis factor (TNF) und Interleukine (IL)] sowie durch Adhäsionsmoleküle und Hormone moduliert und kontrolliert (Manolagas, 2000; Raisz, 2005). Die Hormone Calcitonin, Parathormon (PTH) und Vitamin D bestimmen hierbei insbesondere die Kalziumhomöostase des Körpers und somit die Knochenstärke und -qualität (Manolagas, 2000).

Auch den Sexualhormonen Östrogen und Testosteron kommt im Rahmen des Knochenstoffwechsels eine entscheidende Rolle zu. Insbesondere Östrogen besitzt bei beiden Geschlechtern einen elementaren Einfluss auf das Knochenwachstum und die Knochenhomöostase (Riggs et al., 1998; Weitzmann und Pacifici, 2006). Dementsprechend finden sich Östrogenrezeptoren sowohl in Osteozyten (Kousteni et al., 2001), Osteoblasten (Kousteni et al., 2001; Taranta et al., 2002) und Osteoklasten (Taranta et al., 2002), als auch in ihren Vorläuferzellen (Weitzmann und Pacifici, 2006; Lerner, 2006). Östrogen besitzt wichtige antiresorptive Eigenschaften. Es stimuliert die OPG-Sekretion (Hofbauer et al., 1999a; Saika et al., 2001) und hemmt die RANKL-Synthese der Knochenmarkszellen der Stroma-/Osteoblastenlinie (Abb. 3) (Taxel et al., 2008). Durch Inhibition der RANKL-Sensitivität hemmt Östrogen die Osteoklastengese und unterdrückt so die knochenresorptive Aktivität reifer Osteoklasten (Srivastava et al., 2001; García Palacios et al., 2005; Taxel et al. 2008). Des Weiteren stimuliert das Hormon die Apoptose von Osteoklasten (Hughes et al., 1996; Chen et al., 2005), während es den Zelltod von Osteoblasten (Kousteni et al., 2001; Chen et al., 2005) und Osteozyten (Tomkinson et al., 1998, Chen et al., 2005) hemmt. Außerdem kontrolliert Östrogen in bedeutendem Maße die Expression weiterer Osteoklasten-stimulierender Faktoren, wie IL 1, IL 6, TNF α und M-CSF (Abb. 3) (Girasole et al., 1992; Bismar et al., 1995; Weitzmann und Pacifici, 2006).

Entsprechend dieser wichtigen knochenprotektiven Eigenschaften des Östrogens kommt dem Östrogenmangel sowie den aus diesem resultierenden Effekten eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Osteoporose postmenopausaler Frauen sowie dem kontinuierlichen Knochenverlust alternder Männer zu (Weitzmann und Pacifici, 2006; Lerner, 2006).

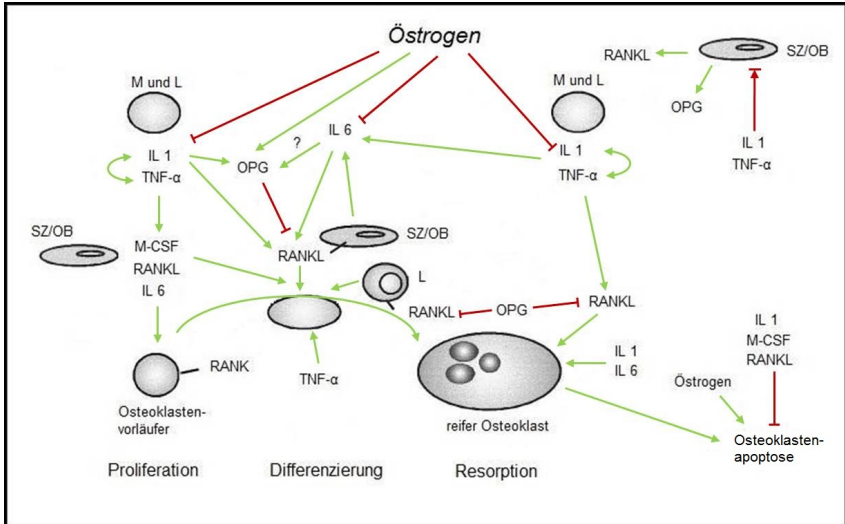


Abbildung 3: mod. nach Pfeilschifter et al., 2002: Überblick der Regulationsmechanismen der Knochenresorption von Östrogen und verschiedenen Knochenmediatoren des Knochenmikromilieus (dargestellt sind IL 1, IL 6, TNF α , RANK, RANKL, OPG und M-CSF):

Die Pfeile stehen für Stimulation (\uparrow) oder Hemmung (\downarrow) eines Zytokin-Effektes. Auf Grund der knochenprotektiven Wirkung des Östrogens hat eine Östrogendefizienz eine vermehrte Zytokinproduktion von Makrophagen (M) (IL 1 und TNF α), Lymphozyten (L) (RANKL und TNF α) und Stromazellen/Osteoblasten (SZ/OB) (u.a. IL 6, RANKL und M-CSF) zur Folge. Neben weiteren Faktoren stimulieren insbesondere IL 1, IL 6, TNF α , RANKL und M-CSF die Osteoklastengese und so die osteoklastäre Knochenresorption. IL 1, RANKL und M-CSF unterdrücken außerdem die Osteoklastenapoptose, während Östrogen diese stimuliert. Für IL 1 und TNF α sind zusätzlich hemmende Effekte auf die Osteoblastenfunktion beschrieben.

Unter Östrogendefizienz entfällt dessen osteoprotektiver Effekt, der unter physiologischen Bedingungen den Knochenabbau vermindern würde. Als Folge kommt es zur Synthese osteolytischer Zytokine wie IL 1, TNF α , RANKL und M-CSF, die auf unterschiedliche Weise eine gesteigerte Knochenresorption induzieren (Bismar et al., 1995; Eghbali-Fatoureechi et al., 2003; Teitelbaum, 2004; D'Amelio et al., 2008). So bewirkt der Mangel an Östrogen unter anderem eine durch antigenpräsentierende Zellen induzierte T-Zell-Aktivierung mit vermehrter IL 1- und TNF α -Produktion. Diese Zytokine stimulieren additiv die RANKL- und M-CSF-Expression der Knochenmarksstromazellen sowie reifer Osteoblasten und bewirken somit eine gesteigerte Osteoklastenreifung und -aktivität (Abb. 3) (Kimble et al., 1996; Hofbauer et al., 1999b; Eghbali-Fatoureechi et al., 2003; Teitelbaum,

2004; D'Amelio et al., 2008). Die Folge ist ein Ungleichgewicht des RANK/RANKL/OPG-Systems mit vermehrter Bildung des RANK/RANKL-Komplexes. Als Resultat findet sich eine pathologische Knochenstoffwechselsituation, die in einem erheblichen Knochenverlust und somit in einer Osteoporose gipfeln kann (Hofbauer et al., 2004).

Sowohl bei Männern als auch bei Frauen fällt der Östrogenspiegel im Alter langsam aber kontinuierlich ab und führt zu einem Verlust der Knochenmasse. Durch den Ausfall der hormonellen Ovarialfunktion während des Klimakteriums der Frau und die damit verbundene sehr rasch einsetzende Östrogendefizienz wird dieser Prozess erheblich verschärft (Riggs et al., 1998; Weitzmann und Pacifici, 2006). So wird bei Frauen in der ersten postmenopausalen Dekade (< 65 Jahre) häufig eine akzelerierte Abnahme (**High-Turnover**) der Knochenmasse (Riggs et al., 1998, 2002), bedingt durch eine gesteigerte Knochenumbaurate mit einer entsprechend erhöhten Anzahl an BMUs (Eriksen et al., 1999), beobachtet. In einer solchen High-Turnover-Knochenstoffwechselsituation dominieren die Knochenresorptionsvorgänge gegenüber denen der Knochenformation. Dieses Remodeling-Ungleichgewicht manifestiert sich schließlich in einem erhöhten (überproportionalen) Knochenabbau (Eriksen et al., 1999; Riggs 1998, 2002). Diese Form der Osteoporose (Typ I) betrifft hauptsächlich die trabekuläre Knochenstruktur und geht überwiegend mit Wirbelkörper- oder Handgelenksbrüchen (distaler Radius) einher (Duque und Troen, 2008; Adler, 2006).

Der Knochenstoffwechsel in den nachfolgenden höheren Lebensjahren (> 65 Jahre) ist dagegen durch einen langsamen aber kontinuierlichen Knochenschwund (**Low-Turnover**) charakterisiert. Dieser trägt dem physiologischen Alterungsprozess Rechnung und basiert auf einer verminderten Knochenumbaurate (Riggs et al., 2002). Wie durch mehrere Studien belegt, resultiert die reduzierte Anzahl aktiver Osteoblasten aus einem altersbedingten Anstieg der osteoblastären Apoptoserate (Jilka et al., 1999; Chan und Duque, 2002). Es kommt zu einem Knochenformationsdefizit bei normaler oder im Verhältnis nur leicht reduzierter Resorption im Alter (Chan und Duque, 2002). Dieser Low-Turnover hält das restliche Leben an und wird daher (im Falle einer Diagnose) auch als altersbedingte oder senile Osteoporose bezeichnet. Patienten mit diesem Osteoporose-Typ (Typ II) erleiden insbesondere Oberschenkelhals- und Wirbelkörperfrakturen, die auf eine Veränderung sowohl der trabekulären als auch der kortikalen Knochenstrukturen zurückzuführen sind (Chan und Duque, 2002; Adler, 2006).

Da Männer kein Äquivalent einer Menopause durchlaufen, weisen sie keinen beschleunigten Verlust ihrer Knochenmasse, d.h. keine High-Turnover-Osteoporose auf (eine Ausnahme hierbei wäre die Verminderung oder der Ausfall der Hodenfunktion, z.B. durch Hypogonadismus oder chemische bzw. operative Kastration ohne Sexualhormonsubstitution). Dennoch gilt eine im Alter auftretende Östrogendefizienz als mitverantwortlich für den kontinuierlichen Knochenverlust bei alternden Männern. Eine Erklärung hierfür ist die altersbedingte Abnahme der Testosteronproduktion der Hoden. Dieses Sexualhormon wirkt anabol auf den Knochenstoffwechsel und dient zusätzlich als essenzielles Ausgangsprodukt für die männliche Östrogensynthese durch Aromatisierung (Khosla et al., 1998, 2002b; Riggs et al., 2002; Adler, 2006; Khosla et al., 2008). Die daraus resultierende altersbedingte Absenkung des Östrogenspiegels bei Männern führt zu einer langsamen aber kontinuierlichen Änderung der Knochenmasse und damit zu einer Low-Turnover-Knochenstoffwechselsituation (Riggs et al., 1998, 2002). Daneben werden weitere biochemische Abweichungen beschrieben, die zu einer primären Osteoporose bei Männern führen können (Adler, 2006; Khosla et al., 2008).

Die Unterscheidung einer High- oder Low-Turnover-Knochenstoffwechselsituation ist diagnostisch schwierig und wird deshalb in der Praxis nur bedingt durchgeführt. Dennoch ist sie, gerade im Hinblick auf die Wahl der richtigen Therapie, von Nöten. In einer Studie von Mehl et al. (2002) wurde daher der potenzielle Zusammenhang zwischen dem histologischen Befund von Knochenbiopsien und den Knochenmarker-Konzentrationen im Serum (Osteocalcin und Gesamt-AP, Vitamin D3, Parathormon) und Urin (DPD-Crosslinks) von Osteoporosepatienten untersucht. Daraus ergab sich jedoch, dass die histologische Klassifizierung einer High- oder Low-Turnover-Osteoporose *nicht* mit charakteristischen Knochenmarker-Spiegeln assoziiert ist. Eine diagnostische Einteilung in eine der beiden Knochenstoffwechselsituationen (High- oder Low-Turnover) und eine damit mögliche optimale therapeutische Behandlung von Patienten mit einer primären Osteoporose, ist somit alleine mittels histologischer Untersuchungen von Knochenbiopsien möglich (Mehl et al., 2002).

Insbesondere im Rahmen einer Typ II Osteoporose wird bei beiden Geschlechtern häufig ein kompensatorischer sekundärer Hyperparathyreoidismus beobachtet. Dieser gilt als mitverantwortlich für den altersbedingten Knochenverlust aufgrund erhöhter Knochenresorptionsvorgänge und die daraus resultierende senile Osteoporose (Ledger et al.,

1995; Riggs et al., 2002). Alte Menschen weisen oftmals eine ungenügende Kalziumresorption aus dem Darm auf. Dies hängt zum einen mit einer im Alter auftretenden Beeinträchtigung der Kalziumresorptionsvorgänge sowie einer häufig verminderten Kalziumzufuhr über die Nahrung zusammen (Gallagher et al., 1979). Zum anderen kommt der altersbedingten Reduktion der Vitamin D₃-Bildung der Haut, auch bedingt durch eine reduzierte UV-Strahlenexposition, eine entscheidende Rolle zu. Gleichzeitig besteht im Alter eine verringerte Fähigkeit der Niere Vitamin D₃ in die hormonell aktive Form (Calcitriol) umzuwandeln (Gallagher et al., 1979) sowie die Kalziumhomöostase mittels adaptierter Sekretion zu steuern (Gallagher et al., 1979; Ledger et al., 1995). Der daraus resultierende Mangel an Kalzium und Vitamin D hat eine kompensatorisch gesteigerte PTH-Ausschüttung der Nebenschilddrüse zur Folge (Riggs et al., 2002). Außerdem führt die Östrogendefizienz zu einer Erhöhung der PTH-Sensitivität des Knochens (Cosman et al., 1993). Zum Zwecke der Kalziummobilisierung unterdrückt PTH zum einen die OPG-Produktion und stimuliert zum anderen die RANKL-Expression der Zellen der Stroma-/Osteoblastenreihe. PTH induziert somit indirekt die Osteoklastengnese und die Aktivierung reifer Osteoklasten (Ma et al., 2001; Huang et al., 2004). Die so gesteigerte Knochenresorption bewirkt schließlich eine erhöhte Kalziumfreisetzung aus dem Knochen (Ledger et al., 1995).

Osteoporotische Knochenverluste basieren somit individuell auf multifaktoriellen endogenen (vgl. Kap. 2.3, 2.5) sowie exogenen (vgl. Kap. 2.1.2) Einflussfaktoren und unterschiedlichen pathologischen Mechanismen (Raisz, 2005).

2.5 Effekte der Interleukine 1, 4, 6, 10 und 13 auf den gesunden und osteoporotischen Knochen

Neben einem Ungleichgewicht des RANK/RANKL/OPG-Systems kommt im Rahmen des Osteoporose-assoziierten Knochenverlustes zahlreichen Zytokinen, insbesondere IL1, IL 6, TNF α , M-CSF und GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor), eine entscheidende Bedeutung zu (Abb. 4) (Pacifci, 1996; Manolagas, 2000; Lorenzo et al., 2008; D'Amelio und Isaia, 2009). Während die eben genannten Mediatoren die Osteoklastengnese stimulieren, unterdrücken wiederum andere Zytokine, wie die Interleukine 4, 10 und 13, die Osteoklastenentwicklung (Manolagas, 2000). Im gesunden Knochen wirken, wie bereits erwähnt, die Sexualhormone Östrogen und Androgene regulatorisch auf die Zytokin-

Sekretion der am Knochenab- und -aufbau beteiligten Zellen (Horowitz, 1993; Pacifici, 1996; Pfeilschifter et al., 2002).

Aus diesem insgesamt sehr umfangreichen und komplexen Zytokin-Netzwerk sind als Osteoklasten-stimulierende Faktoren insbesondere die pro-inflammatorischen Interleukine 1 (IL 1) und 6 (IL 6) zu nennen. Beide stellen multifunktionale Zytokine dar, die in besonderem Maße an der Regulation des Knochenstoffwechsels beteiligt sind (Jilka, 1998; Lorenzo et al., 2008).

Gemeinsam mit TNF α gilt insbesondere IL 1 als einer der potentesten Knochenresorptionsstimulatoren (Pacifici, 1996; Romas und Martin, 1997; Jilka, 1998) sowie als einer der wichtigsten Vermittler des Knochenverlustes unter Östrogendefizienz (Charatcharoenwitthaya et al., 2007). Seine Hauptsynthesequellen, mit Einfluss auf das Knochenmikromilieu, sind Monozyten und Gewebemakrophagen (Horowitz, 1993; Jilka, 1998; Dinarello, 2009) sowie T- Lymphozyten (Teitelbaum, 2004).

Die Stromazellen des Knochenmarks sowie Osteoblasten hingegen gelten als wichtigste IL 6-produzierende Zellen im Knochen (Horowitz, 1993; Manolagas und Jilka, 1995; Jilka, 1998). Ihre IL 6 Synthese wird insbesondere durch IL 1 und TNF α induziert (Girasole et al., 1992; Jilka, 1998).

Im gesunden Knochen werden nur begrenzte Mengen „osteolytischer“ Zytokine, wie IL 1, TNF α und IL 6, freigesetzt. Dieser Östrogen-vermittelte Effekt ist für den physiologischen Ablauf der Knochenremodeling-Zyklen essenziell (Horowitz, 1993). Folglich führt Östrogendefizienz zu einer veränderten Zytokin-Produktion der Zellen des Knochenmikromilieus (Horowitz, 1993; Bismar et al., 1995; Pfeilschifter et al., 2002). Des Weiteren wird eine verstärkte IL-Sensitivität der Zielzellen im Knochen durch Hochregulation der Zytokinrezeptor-Expression beschrieben (Lin et al., 1997; Girasole et al., 1999; Pfeilschifter et al., 2002).

Dementsprechend wurden in verschiedenen (*in vitro* und *in vivo*) Untersuchungen an Nagern und Menschen erhöhte Konzentrationen der pro-inflammatorischen Interleukine 1 und 6 unter Östrogenmangel gefunden (Jilka et al., 1992; Bismar et al., 1995; Zheng et al., 1997) und ein Zusammenhang dieser IL-Levelveränderungen mit einer gesteigerten Knochenresorptionsrate belegt (Jilka et al., 1992; Poli et al., 1994; Kimble et al., 1994; Kitazawa et al., 1994; Zheng et al., 1997; Charatcharoenwitthaya et al., 2007; Ding et al., 2008).

Im Rahmen des Zytokin-vermittelten postmenopausalen Knochenverlustes kommt insbesondere den T-Lymphozyten eine Schlüsselrolle zu. So bewirkt Östrogenmangel eine durch antigenpräsentierende Zellen induzierte Aktivierung von T-Zellen. Der Mangel an Östrogen hat somit eine gesteigerte IL 1- und TNF α -Produktion stimulierter T-Lymphozyten sowie von Monozyten zur Folge (Abb. 3) (Pacifci et al., 1991; Horowitz, 1993; Teitelbaum, 2004; D'Amelio et al., 2008). TNF α stimuliert zusätzlich die Stromazellen zur Freisetzung von IL 1, welches nach Wei et al. (2005) im Weiteren die Osteoklastengnese vermittelt. So induziert IL 1 in Verbindung mit TNF α (wie bereits in Kap. 2.4 beschrieben) über eine Steigerung der RANKL- und M-CSF-Expression der Zellen der Stroma-/Osteoblastenlinie *indirekt* die Osteoklastengnese (Kimble et al., 1996; Hofbauer et al., 1999b; Eghbali-Fatourechi et al., 2003; Teitelbaum, 2004; Wei et al., 2005; D'Amelio et al., 2008). Kimble et al. (1995) sowie Charatcharoenwitthaya et al. (2007) bestätigen dieses „Zusammenspiel“ von IL 1 und TNF α mit der Feststellung, dass die alleinige Blockade von IL 1 oder TNF α nicht zur vollständigen Prävention der Knochenresorption unter Östrogenmangel ausreichend sei. Zusätzlich wird für IL 1 unter entsprechenden RANKL-Konzentrationen ein *direkter* Effekt auf hämatopoetische Stammzellen der Monozyten-/Makrophagenlinie sowie Osteoklasten und somit auf die Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung beschrieben (Jimi et al., 1999; Wei et al., 2005).

Wie bereits erwähnt, synthetisieren Knochenmarksstromazellen und Osteoblasten nach Stimulation durch IL 1, TNF α sowie andere Zytokine und Wachstumsfaktoren hohe Konzentrationen an IL 6 (Girasole et al., 1992; Jilka, 1998). Die Fähigkeit, sowohl ihre eigene als auch die Synthese anderer – meist synergistisch wirkender – Zytokine zu stimulieren, ist ein charakteristischer Zytokin-Effekt und trifft insbesondere auf die Interleukine 1 und 6 (in Verbindung mit TNF α) zu (Jilka, 1998). Auf Grund dieses interagierenden Netzwerkes hat eine Level-Änderung eines dieser Zytokine dramatische Konzentrationsänderungen der anderen sowie der Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung zur Folge (Pacifci, 1996; Jilka, 1998).

Obwohl diverse *in vitro*- sowie *in vivo*-Versuche kontroverse Ergebnisse in Bezug auf die Fähigkeit des IL 6 die Knochenresorption zu stimulieren erbrachten (Pacifci, 1996; Franchimont et al., 2005; Lorenzo et al., 2008), gilt dieses Interleukin als ein sehr potenter Stimulator der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu Osteoklasten (Pacifci, 1996; Lorenzo et al., 2008). Dementsprechend ist insbesondere IL 6 an der Pathogenese

weiterer systemischer Knochenerkrankungen mit vermehrtem Knochenabbau, wie Morbus Paget, Multiples Myelom und Rheumatoide Arthritis, beteiligt (Manolagas, 2000). Außerdem konnten Ding et al. (2008) in einer Längsschnittstudie den Zusammenhang hoher IL 6-Serumkonzentrationen mit einer verminderten Knochenmasse bei älteren Männern und Frauen belegen. In einer Studie von Girasole et al. (1999) an ovariectomierten Frauen wurden des Weiteren signifikant erhöhte IL 6-Rezeptor-(IL 6R)-Serumkonzentrationen gemessen. Dies entspricht von Lin et al. (1997) veröffentlichten *in vitro*-Ergebnissen an Mausknochenmarkszellen, die ebenfalls erhöhte IL 6R-Expressionen unter Östrogenmangel zeigen. Demnach kommt es unter Östrogendefizienz, neben veränderten Interleukin-Konzentrationen, auch zu einer gesteigerten Interleukin-Sensitivität der Zielzellen und dadurch zu einer erhöhten biologischen Aktivität der Interleukine, insbesondere des IL 6 (Lin et al., 1997; Girasole et al., 1999; Pfeilschifter et al., 2002). Diese Beobachtungen decken sich mit den von Palmqvist et al. (2002) publizierten Daten. Während zwar Hofbauer et al. (1999b) keinen RANKL-stimulierenden Effekt des IL 6 (im Unterschied zu IL 1) an humanen Osteoblasten nachweisen konnten, beschreiben Palmqvist und Kollegen (2002) eine Regulation des RANK/RANKL/OPG-Systems durch IL 6 in Kombination mit seinem löslichen Rezeptor (sIL 6R). Demnach stimuliert IL 6 in Anwesenheit seines gelösten Rezeptors die OPG-Synthese sowie in hohem Maße die RANKL-Expression und hemmt zusätzlich die RANK-Produktion in der Calvaria (Schädelkalotte) von Mäusen. Dieses *in vitro*-Mausmodell demonstriert die durch IL 6 und sIL 6R regulierte Expression von RANK, RANKL und OPG zu Gunsten des Osteoklasten-Aktivators RANKL und die daraus resultierende Stimulation der Knochenresorptionsvorgänge (Palmqvist et al., 2002). Der RANKL-vermittelte Mechanismus des IL 6 ist in weiteren Veröffentlichungen publiziert, obwohl die Daten hierzu teilweise widersprüchlich sind (O'Brien et al., 1999; Pfeilschifter et al., 2002). Des Weiteren wird IL 6 (u.a. gemeinsam mit Interleukin 11 und in Anwesenheit von M-CSF) ein RANKL-unabhängiger Wirkungsmechanismus mit potenter Steigerung der Osteoklastenformation aus hämatopoetischen Vorläufern zugesprochen (Hofbauer et al., 1999b; Kudo et al., 2003).

Die unter Östrogendefizienz auftretenden Konzentrationsänderungen sowie osteoklastogenen Effekte der hier beschriebenen Interleukine 1 und 6 können, wie in zahlreichen Studien belegt, sowohl mittels Östrogen-Supplementierung als auch durch entsprechende neutralisierende Antikörper unterdrückt werden. Dies bestätigt und verdeutlicht ihre Bedeutung im Rahmen des postmenopausalen Knochenverlustes sowie den osteoprotektiven

Effekt des Östrogens (Pacifici et al., 1991; Girasole et al., 1992; Jilka et al., 1992; Kimble et al., 1994).

Im Gegensatz zu den pro-inflammatorischen und die Knochenresorption stimulierenden Interleukinen 1 und 6, hemmt Interleukin 10 (IL 10) die Osteoklastengenese (Abb. 4). Hierbei unterdrückt es potent die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu mononukleären Präosteoklasten (Xu et al., 1995). Das anti-inflammatorische IL 10 wird v.a. von T-Lymphozyten (Th2-Zellen) (Fiorentino et al., 1989; Evans und Fox, 2007), Monozyten (Waal Malefyt et al., 1991) und aktivierten Makrophagen (Panuska et al., 1995; Evans und Fox, 2007) gebildet. Seine anti-inflammatorische Fähigkeit basiert insbesondere auf seiner die Makrophagenfunktion blockierenden Wirkung. IL 10 deaktiviert dabei die Ausschüttung von entzündungsfördernden Zytokinen, wie IL 1, IL 6, TNF α und M-CSF, durch Makrophagen (Fiorentino et al., 1991b; Clarke et al., 1998). Ergänzend zeigt IL 10 diesen Effekt u.a. auch auf Monozyten (Waal Malefyt et al., 1991) und T-Lymphozyten (insbesonder Th1-Zellen) (Fiorentino et al., 1991a) und reduziert so die (akute) Entzündungsreaktion (Evens und Fox, 2007). Von besonderer Bedeutung ist dabei die verminderte Freisetzung von IL 1 und TNF α . Diese beiden Zytokine weisen u.a. im Rahmen des pathologischen Knochenstoffwechsels synergistische inflammatorische Wirkungen, wie die Induktion der IL 6-Freisetzung durch osteoblastäre Zellen auf. Daher ist ihre Unterdrückung durch IL 10 für dessen anti-inflammatorischen Effekt entscheidend (Moore et al., 2001). Wie bereits angesprochen, besitzt IL 10 einen potenten Osteoklasten-inhibierenden Effekt und hemmt *direkt* die Differenzierung mononukleärer Osteoklastenvorläuferzellen (Xu et al., 1995; Hong et al., 2000; Lovibond et al., 2003; Mohamed et al., 2007). *In vitro* unterdrückt es außerdem *indirekt* die Knochenresorption durch Hochregulation der OPG-Synthese bei gleichzeitiger Unterdrückung der RANKL-Expression (Liu et al., 2006). Die Bedeutung des IL 10 für die Regulation der Knochenauf- und -abbauvorgänge wurde durch verschiedene Studien an IL 10-knockout Mäusen bestätigt. Diese Tiere wiesen erhöhte Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL 1, TNF α und IL 6 auf (Cohen et al., 2004) und zeigten einen deutlich gesteigerten Knochenverlust (Al-Rasheed et al., 2003; Cohen et al., 2004; Dresner-Pollak et al., 2004). Sowohl in einer Studie von Park et al. (2004) als auch von Chen et al. (2005) an asiatischen postmenopausalen Frauen wurde gezeigt, dass ein genetischer Polymorphismus des IL 10, auf Grund seiner potenten anti-inflammatorischen Effekte, einen entscheidenden regulatorischen Einfluss auf die postmenopausale Entwicklung der Knochendichte und somit auf die Umbaurate der knöchernen Strukturen hat.

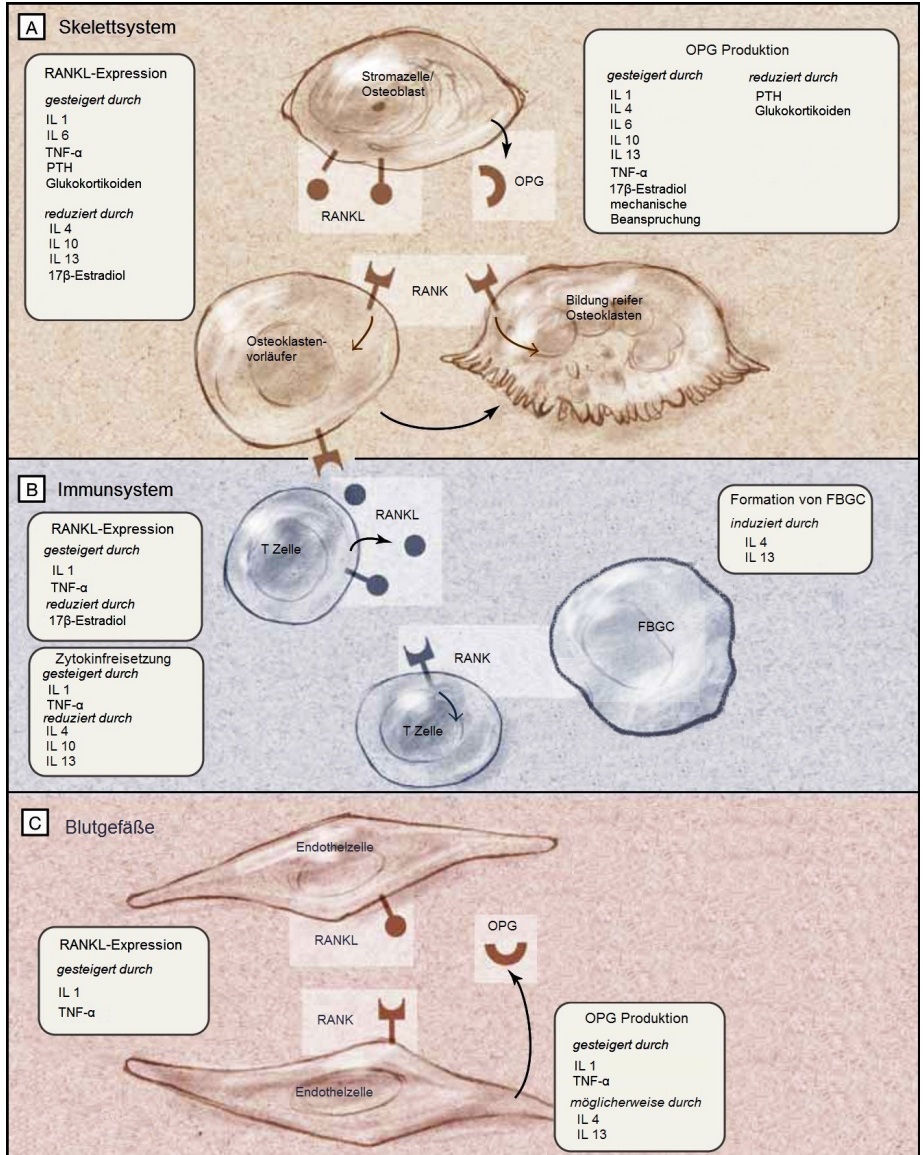


Abbildung 4: mod. nach Hofbauer und Schoppet, 2004: Darstellung der Effekte der pro-inflammatorischen und die Osteoklastengnese stimulierenden Interleukine 1 und 6, der anti-inflammatorischen knochenprotektiven Interleukine 4, 10 und 13 sowie des RANK/RANKL/OPG-Systems im Rahmen des Knochenstoffwechsels, des Immun- und des Gefäßsystems.

Die Interleukine 4 (IL 4) und 13 (IL 13) werden insbesondere von aktivierten T-Lymphozyten (Th2-Zellen) (Seder und Paul, 1994; Mannon und Reinisch, 2012) und Mastzellen (Seder und Paul, 1994; Toru et al., 1998) produziert. Sie weisen auf Grund eines gemeinsamen Zellrezeptors sowie struktureller Homologien, zahlreiche überlappende biologische und immunregulatorische Effekte auf (Chomarat und Banchereau, 1998). So sind IL 4 und IL 13 als anti-inflammatorische Zytokine für die Regulation der Immunantwort und von Entzündungen bedeutend. Hierbei hemmen sie, ebenso wie IL 10, die Freisetzung inflammatorischer Zytokine, insbesondere von IL 1, IL 6 und TNF α , durch Monozyten und Makrophagen (te Velde et al., 1990; Gautam et al., 1992; Waal Malefyt et al., 1993; Clarke et al., 1998).

Zahlreiche Studien belegen, dass IL 4 und IL 13 die Osteoklastengnese und damit die osteoklastäre Knochenresorption unterdrücken (Onoe et al., 1996; Wei et al., 2002; Moreno et al., 2003; Palmqvist et al., 2006; Yamada et al., 2007). IL 4 inhibiert außerdem die Aktivität reifer Osteoklasten (Mangashetti et al., 2005). Zusätzlich steigern IL 4 und IL 13 die OPG-Produktion und hemmen die – u.a. durch TNF α und IL 1 stimulierte – RANKL-Expression der Knochenmarkstromazellen und Osteoblasten (Abb. 4) (Moreno et al., 2003; Wei et al., 2005; Palmqvist et al., 2006; Yamada et al., 2007). Möglicherweise beeinflussen sie die Knochenresorption zusätzlich auch durch Induktion der OPG-Synthese humaner Endothelial- und Gefäßmuskelzellen (Stein et al., 2008).

Beide Interleukine sind darüber hinaus am Verlauf von Fremdkörperreaktionen und der damit verbundenen Formation von Fremdkörperriesenzellen (*foreign body giant cells*, FBGC) als Antwort auf implantierte Biomaterialien beteiligt. Dies ist beispielsweise nach Implantation eines künstlichen Hüftgelenkes oder anderer Knochenersatzmaterialien von Bedeutung. So werden IL 4 und 13 zunächst in der akuten Entzündungsphase nach einer Implantation mittels Mastzell-Degranulation freigesetzt. Beide Interleukine induzieren hier eine alternative Aktivierung von Makrophagen, die für deren spätere Fusion entscheidend ist. Während der sich anschließenden chronischen Entzündung sind es aktivierte Lymphozyten, die die anti-inflammatorischen Zytokine IL 4 und IL 13 freisetzen. Diese induzieren schließlich die Fusion einkerniger Makrophagen zu mehrkernigen FBGC, die entlang der Materialoberfläche lokalisiert sind (Abb. 5) (Anderson et al., 2008).

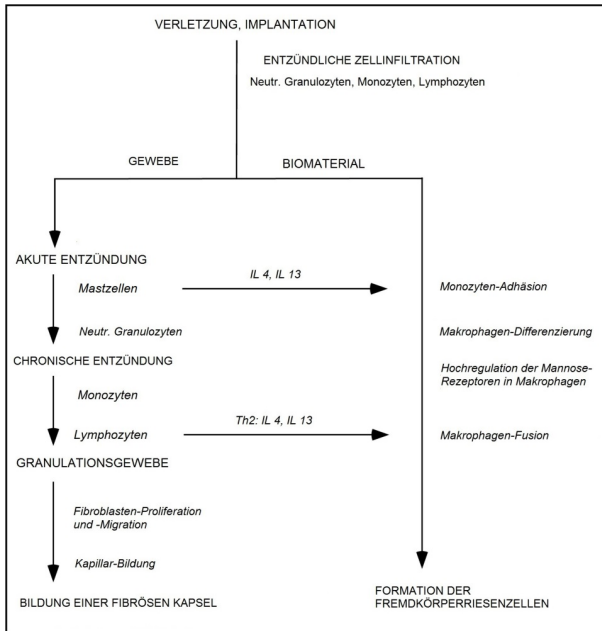


Abbildung 5: mod. nach Anderson et al., 2008: Schematische Darstellung des Ablaufs der Entzündungs- und Heilungskaskade einer Fremdkörperreaktion.

Die Formation von Fremdkörperriesenzellen wird durch IL 4 und 13 initiiert. (neutr. = neutrophile)

2.6 Zytokin-Effekte im frakturierten Knochen

Die für Osteoporose charakteristischen Fragilitätsfrakturen sind auf den osteoporotisch bedingten Verlust von Knochenmasse und -dichte und die damit verbundene Verschlechterung der Knochenmikroarchitektur zurückzuführen (Robert-Koch-Institut, 2011). Im Verlaufe des nach einer Fraktur einsetzenden Heilungsprozesses kommt es zur Geweberegeneration und Wiederherstellung der betroffenen Strukturen (Kolar et al., 2011). Die Frakturheilung wird in vier sich teils überlappende Phasen eingeteilt: die initiale Entzündungsphase, das Stadium der weichen Kallusbildung, die Formation des harten Kallus und die Phase des Remodeling (Abb. 6) (Schindeler et al., 2008). Unterschiedlichste Zelltypen und endogene Mediatoren unterliegen dabei einem komplexen Zusammenspiel (Pape et al., 2010). So sind u.a. Entzündungs- und osteochondrale Vorläuferzellen sowie Chondrozyten, Osteoblasten und -klasten in den Heilungsprozess involviert. Auf molekularer

Ebene kommt verschiedenen pro-inflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren sowie osteogenen und angiogenen Faktoren große Bedeutung zu (Schindeler et al., 2008).

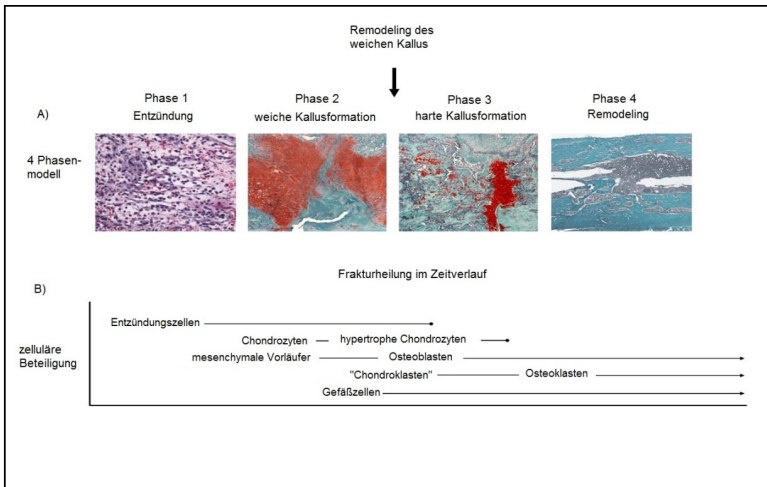


Abbildung 6: mod. nach Schindeler et al., 2008: Frakturheilung und zelluläre Beteiligung:

A) Repräsentative histologische Bilder der vier Phasen der Frakturheilung.

B) Schematische Darstellung der am Prozess der Frakturheilung beteiligten Zelltypen. Die initiale Entzündungsphase ist durch Infiltration von Entzündungszellen gekennzeichnet.

Eine Fraktur geht immer mit der Zerstörung des Periosts, des kortikalen sowie ggf. des trabekulären Knochens und des umliegenden Gewebes einher. Dabei kommt es zu einer Destruktion der örtlichen Blutgefäße und somit zu einer Blutung an der Frakturstelle. Die lokal vorkommenden Zellen (Blut- und Knochenmarkszellen) unterliegen der unzureichenden Sauerstoff- und Nährstoffversorgung am Ort der Verletzung (niedrige Sauerstoff-, hohe Laktatkonzentration, niedriger pH-Wert). Als Folge wird eine (Fraktur-)Hämatombildung mit lokaler Gewebehypoxie beobachtet (Schindeler et al., 2008; Kolar et al., 2011). Lokale Gewebeverletzungen, Nekrosen und Hypoxie (sowie eine ggf. vorliegende bakterielle Infektion) führen innerhalb weniger Stunden zu einer Entzündungsreaktion. Diese Entzündungsantwort des Körpers ist bedeutend für den weiteren Verlauf der Frakturheilung und initiiert die Heilungskaskade (Pape et al., 2010). Der entzündliche Prozess, ohne den das Knochengewebe nicht heilen würde, resultiert aus der Migration von Thrombozyten und Entzündungszellen (initial Makrophagen, neutrophile Granulozyten, im weiteren Verlauf zusätzlich Lymphozyten) in das Frakturhämatom. Hier bekämpfen sie Infektionen, phagozytieren Zelldetritus und sekretieren inflammatorische Zytokine und

Wachstumsfaktoren (wie platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor β (TGF- β) und M-CSF). Diese Faktoren haben die Rekrutierung (Chemotaxis) weiterer Entzündungszellen sowie von multipotenten mesenchymalen Stammzellen, Fibroblasten und Endothelzellen zur Folge. Mit der Zeit kommt es zur Bildung erster Kapillaren innerhalb des Hämatoms und dessen Reorganisation zu Granulationsgewebe. Im Weiteren wird das zerstörte Bindegewebe erneuert und der Frakturspalt zunächst durch weichen Kallus (Knorpelgewebe; am Ende dieser Phase mit Beginn der Verkalkung) und später harten Kallus (festes kalzifiziertes Knochengewebe) überbrückt und stabilisiert. Mittels abschließendem Remodeling wird die ursprüngliche Geometrie sowie Funktion des Knochens wieder hergestellt (Schindeler et al., 2008; Pape et al., 2010; Kolar et al., 2011).

Am Ort der Fraktur kommt es somit innerhalb kürzester Zeit zu einer Infiltration von Entzündungszellen mit entsprechender Zytokin-Sekretion und schließlich zu einer Entzündungsreaktion (Kon et al., 2001). Folglich sind im frakturierten Knochen veränderte Expressionsmuster von u.a. Interleukinen, insbesondere IL 1 und 6, sowie RANK, RANKL und OPG nachweisbar (Abb. 7) (Einhorn et al., 1995; Kon et al., 2001; Cho et al., 2002; Tsangari et al., 2004; Abdallah et al., 2005; D'Amelio et al., 2011). Dementsprechend wurden zu Beginn der initialen Entzündungsphase *post fracturam* (1-3 Tag) deutlich erhöhte IL 1- und IL 6-Expressionen im Kallus der Tibia von Mäusen gemessen. Diese scheinen im weiteren Heilungsverlauf zunächst abzusinken, um im Falle des IL 1 (ab Tag 21) während des Remodelings einen erneuten Peak zu erreichen (Kon et al., 2001; Cho et al., 2002). In einer Ratten-*in vitro*-Studie wurden im Gegensatz dazu niedrige IL 1-Level gefunden, die jedoch mittels Lipopolysaccharid-Behandlung (antigen wirkend) während des frühen Heilungsstadiums stark anstiegen. Ebenfalls in dieser frühen Phase konnten hohe IL 6-Konzentrationen belegt werden (Einhorn et al., 1995). So wurden auch in Knochenproben von > 76 jährigen Männern und Frauen mit Schenkelhalsfrakturen signifikant erhöhte IL 6-Expressionen im Vergleich zu einer adäquaten Kontrollgruppe gemessen (Tsangari et al., 2004).

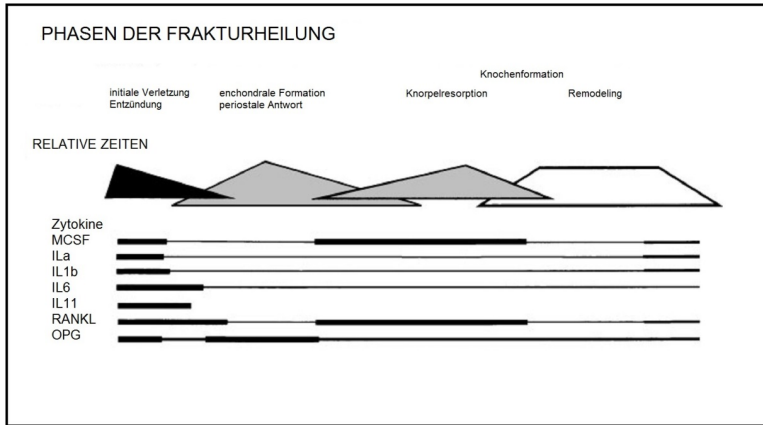


Abbildung 7: mod. nach Gerstenfeld et al., 2003: Schematische Darstellung der Frakturheilungsphasen und entsprechend beteiligter Zytokine.

Kon et al. (2001) analysierten des Weiteren die Expressionen von RANKL, OPG und M-CSF und konstatierten eine deutliche Steigerung innerhalb der ersten Tage *post fracturam*. Sowohl Abdallah et al. (2005) als auch D'Amelio et al. (2011) untersuchten Knochenmaterial von älteren (> 70 jährigen) Frauen mit Fragilitätsbrüchen und verglichen dieses mit Knochenproben von Osteoarthrosepatientinnen. Beide Arbeitsgruppen konnten ein erhöhtes RANKL/OPG-Verhältnis in den Frakturgruppen feststellen. Dieses wurde jedoch bei D'Amelio et al. (2011) im Knochenmark und nicht im Knochen selbst manifestiert. Anzuführen ist auch, dass in der Studie von Abdallah und Kollegen (2005) limitierende Faktoren die Ergebnisse schmälern. So fanden hier Knochenbiopsien Verwendung, die nicht der Frakturstelle, sondern dem Darmbein entnommen wurden und somit keinen Einblick in das lokale Heilungsmikromilieu erlauben. Damit wird die Aussagekraft der in der genannten Untersuchung festgestellten fehlenden Signifikanz der IL 1-Expression sowie die signifikant erniedrigten IL 6-Level der Frakturgruppe relativiert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patienten und Probenmaterial

Zur Untersuchung der Expressionsprofile mittels RT-qPCR wurde *Spongiosa* aus resezierten Femurköpfen von Patienten der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des *Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH* - Standort Gießen sowie der *Asklepios Klinik Lich GmbH* entnommen und molekularbiologisch untersucht. Die in die vorliegende Arbeit einbezogene Gesamtpatientenpopulation ($n = 39$) setzte sich aus 21 Frauen und 18 Männern im Alter von über 60 Jahren zusammen, bei denen im Zeitraum von 2010 bis 2012 auf Grund einer Schenkelhalsfraktur ($n = 17$) oder einer Coxarthrose ($n = 22$) ein Hüftkopf operativ entfernt wurde (Abb. 8). Darüber hinaus lagen nur begrenzte Informationen zu genetischen Osteoporose-Prädispositionen, osteoporotischen Erkrankungen oder Behandlungen, möglichen Primärerkrankungen oder Medikamenteneinnahmen vor. Auch wurden bei den Patienten keine Knochendichtemessungen in den Kliniken durchgeführt.

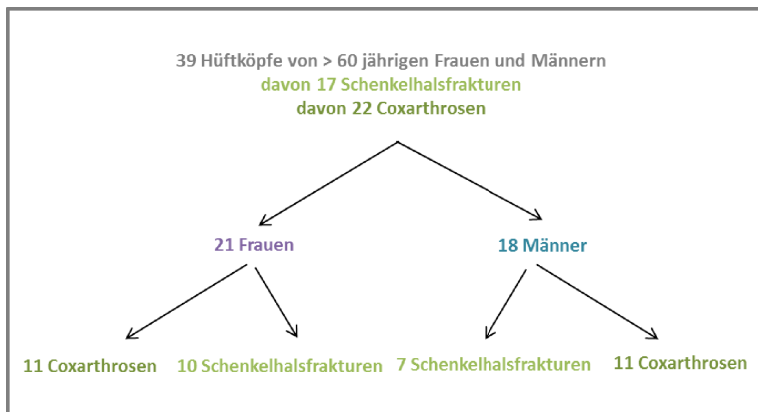


Abbildung 8: Zusammensetzung der untersuchten Patientenpopulation

Das mittlere Alter der Gesamtpatientenpopulation betrug 73,5 ($\pm 9,6$) Jahre. Frauen waren durchschnittlich 76,1 (± 10) und Männer 70,6 ($\pm 8,4$) Jahre alt. Auf Grund der ethisch bedingten Schwierigkeit Knochenproben von gesunden möglichst jungen Personen mit

physiologischem Knochenstoffwechsel zu erhalten, konnte keine entsprechende Kontrollgruppe in die Studie einbezogen werden. In Anlehnung an ähnliche vorangegangene Studien (Abdallah et al., 2005; D'Amelio et al., 2011; Zupan et al., 2012) wurden stattdessen Patienten, denen auf Grund einer Coxarthrose ein Femurkopf reseziert wurde – trotz dieser eigenständigen Erkrankung – als Kontrollgruppe gewählt.

Die Untersuchungen wurden von der Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt.

3.2 Methoden

3.2.1 Probengewinnung

Die aus den Kliniken erhaltenen und in steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelagerten humanen Femurköpfe wurden schnellstmöglich unter sterilen Bedingungen der Probenentnahme unterzogen. Hierzu wurde zunächst mittels einer oszillierenden Säge (Hebu medical) ein Drittel bis die Hälfte – je nach Knochengröße – des Femurkopfes abgesetzt (Abb. 9). Die abgesägten Kappen wurden in Alufolie eingewickelt und bei -20 °C konserviert, um zu einem späteren Zeitpunkt für weitere Untersuchungen zur Verfügung zu stehen. Von dem restlichen Knochen wurden feine Scheiben heruntergesägt, von der Kortikales befreit und mehrere 0,5 x 0,5 cm bis 1 x 1 cm große Knochenstücke in 15 ml Falcons zum Zwecke der späteren RNA-Extraktion bei -80 °C tiefgefroren.

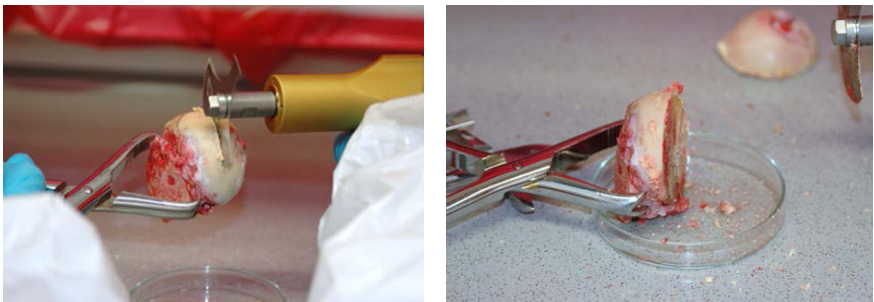


Abbildung 9: Probengewinnung mittels einer oszillierenden Säge

3.2.2 RNA-Extraktion

Im Jahre 1987 veröffentlichten Piotr Chomczynski und Nicoletta Sacchi erstmals eine neue Methode der Einzel-RNA-Extraktion mit dem Ziel, möglichst reine RNA zu erhalten (Chomczynski und Sacchi, 1987).

Diese Methode ist bis heute in teilweise modifizierter Form in der Molekularbiologie gängige Praxis. Sie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemäß dem leicht abgeänderten peqGOLD TriFast™ Protokoll von Peqlab mit nachfolgenden Schritten durchgeführt:

- *Mörsern des Knochens zu Knochenpulver und Homogenisierung*

Der erste Schritt auf dem Weg zur RNA-Isolierung bestand darin, ca. 100 mg der jeweiligen Knochenprobe unter Stickstoffzugabe zu einem Pulver zu mörsern. Das entstandene Knochenpulver wurde mit Hilfe eines sterilen Spatels in ein 1,7 ml Cryo-Röhrchen verbracht, mit 1000 µl peqGOLD TriFast™ (Peqlab) versetzt und anschließend für fünf Minuten bei Raumtemperatur homogenisiert. Dieser erste Schritt der RNA-Extraktion führte zu einer Dissoziation der Nukleotidkomplexe.

- *Phasentrennung*

Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben für ca. 15 Sekunden kräftig geschüttelt und über 10 Minuten, wiederum bei Raumtemperatur, inkubiert. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation (12000 x g, bei 4 °C). Hierdurch wurde eine Auftrennung in drei Phasen herbeigeführt. Die Proteine reichern sich dabei in der unteren Phenol- und die DNA in der mittleren Interphase an. Die obere wässrige Phase, in welcher die RNA zu finden ist, wurde in ein neues Cryo-Röhrchen pipettiert.

- *Präzipitation der RNA*

Zum Zwecke der RNA-Präzipitation (Fällung) wurde die Probe anschließend mit 500 µl Isopropanol versetzt, gut gemischt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Es folgte eine 4 °C-Kühlzentrifugation bei 12000 x g über 10 Minuten.

- *Waschen der RNA, Trocknung des Pellets und Lösen der RNA*

Im Anschluss wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet zweimalig, durch Zugabe von je 1000 µl 70 % Ethanol, unter zehnminütiger Zentrifugation (12000 x g, bei 4 °C) gewaschen. Nach Entfernung des Ethanolüberstandes bestand der nächste Schritt in einer

kurzen Trocknung (5 - 10 Minuten) des Pellets an der Luft. Nachfolgend wurde das Pellet in RNase-freiem Wasser durch Mischen gelöst. Die hierbei eingesetzte Wassermenge richtete sich nach der makroskopischen Größe des Pellets. Bei kleinen, schlecht sichtbaren Pellets wurden 20-30 µl, bei großen 50 µl eingesetzt. Schwer lösliche Pellets wurden zusätzlich im Wasserbad auf 60 °C erhitzt.

3.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Mittels biophotometrischer Messung (Eppendorf) konnten anschließend die RNA-Konzentration sowie die Reinheit der Probe bestimmt werden. Hierzu wurde vor jeder Messung in eine lichtdurchlässige Photometerküvette 69 µl Tris-HCl pipettiert und ohne Zugabe von RNA als Reverenz-Nullwert bestimmt. Anschließend wurde 1 µl der zumessenden RNA-Lösung hinzugegeben, gründlich gemischt und die RNA-Konzentration in µg/ml mittels der Extinktion bei 260 nm (\cong dem Lichtabsorptionsmaximum von RNA) gemessen. Anhand des Extinktionsverhältnisses von 260 nm zu 280 nm (E_{260}/E_{280}) konnte im selben Schritt die Reinheit der Probe bestimmt werden.

Im weiteren Verlauf dieser Studie wurden ausschließlich Proben verwendet, die einen E_{260}/E_{280} -„Reinheits“-Quotienten von 1,6 - 2,2 aufwiesen. Diese wurden vor der Weiterverarbeitung durch Verdünnung mit RNase-freiem Wasser auf eine cDNA-Konzentration von 200 ng/µl eingestellt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -20 °C.

Die im Folgenden angegebenen µl-Angaben beziehen sich jeweils auf die eingesetzte Menge *je untersuchter Probe (Einfachansatz)*. Zusätzlich wurde zur Mastermix-Pipettierung ein Verlust von 0,5 µl je Ansatz hinzugerechnet.

3.2.4 DNase-Verdau

Um potenzielle genomische DNA(gDNA)-Verunreinigungen der RNA-Isolate zu beseitigen, wurde als nächster Schritt ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurden **8,1 µl** der auf 200 ng/µl eingestellten **RNA-Lösung** mit **3,9 µl DNase-Mix** inkubiert.

Um den gleichzeitigen Verdau der empfindlichen mRNA zu vermeiden, wurden dem hierbei eingesetzten DNase-Mix je Probe 0,3 µl eines 40 U/µl RNase-Inhibitors zugesetzt. Außerdem enthielt er je Einfachansatz folgende Komponenten:

<i>1 x Ansatz</i>	<i>Reagenz</i>
1,2 µl	25 mM MgCl ₂ -Lösung
1,2 µl	10 x DNase Puffer I
1,2 µl	10 U/µl RNase freie DNase I

Zu Kühlungs Zwecken wurde auf Eis gearbeitet. Die anschließende DNase-Behandlung erfolgte mit folgendem Programm in einem Thermocycler (Bio-Rad):

<i>Schritt</i>	<i>Zeitdauer</i>	<i>Temperatur</i>	
1.	25 Min.	37 °C	Verdau der gDNA durch die DNase I
2.	5 Min.	75 °C	DNase I-Deaktivierung
Ende	<i>for ever</i>	4 °C	Ab-/Kühlung

3.2.5 Reverse Transkription – aus mRNA entsteht cDNA

1970 konnten Howard Temin und David Baltimore unabhängig voneinander belegen, dass bestimmte Retroviren über ein Enzym verfügen, welches es ihnen ermöglicht ihr RNA-Genom in DNA umzuschreiben (Baltimore, 1970; Temin und Mizutani, 1970).

Seinen Namen *Reverse Transkriptase* verdankt dieses Enzym daher seiner speziellen Funktion, den Weg der Genomumschreibung (DNA → RNA) umzukehren und somit eine reverse Transkription (RNA → DNA) durchzuführen. Heute wird diese Entdeckung im Rahmen der Genforschung und Mikrobiologie genutzt.

Auch für die vorliegende Studie wurde die mit DNase behandelte und dadurch von gDNA befreite RNA umgeschrieben und somit mittels reverser Transkriptase in Form von *copy*DNA(cDNA)-Strängen dupliziert.

Für diesen Schritt erfolgte unter Kühlung auf Eis die Pipettierung *zweier* Ansätze:

Je Probe wurde ein +RT-Ansatz mit 25 Units der reversen Transkriptase sowie ein -RT-Ansatz statt dem Enzym mit 0,5 µl sterilem Aqua bidest. versetzt. Letzterer diente als

Negativkontrolle um mögliche DNA-Verunreinigungen auszuschließen. Je Einfachansatz enthielten die Ansätze (+RT sowie -RT) außerdem:

<i>I x Ansatz</i>	<i>Reagenz</i>
2 µl	25 mM MgCl ₂ solution
1 µl	10 x PCR Gold Puffer
4 µl	Nukleotide Mix (dNTPs)
0,5 µl	50 µM Random Hexamers
0,5 µl	20 U/µl RNase-Inhibitor

Für die reverse Transkription wurden schließlich folgende Volumina eingesetzt:

Ansatz	+RT bzw. -RT-Mix	DNase behandelte RNA
+RT	51 µl	9 µl
-RT	8,5 µl	1,5 µl

Die Probeninkubation erfolgte wiederum in einem Standard-PCR-Cycler mit nachstehendem Programm:

<i>Schritt</i>	<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>	
1.	8 Min.	21 °C	Anlagerung der Random Hexamers
2.	15 Min.	42 °C	Umschreiben der mRNA in cDNA
3	5 Min.	99 °C	Inaktivierung der Reversen Transkriptase
4.	5 Min.	5 °C	Abkühlung
Ende	<i>for ever</i>	4 °C	Ab-/Kühlung

3.2.6 Qualitative Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion

Kleppe et al. beschrieben erstmals 1971 die Möglichkeit der mittels DNA-Polymerase katalysierten DNA-Vervielfältigung (Kleppe et al., 1971). Diese Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht geringste Mengen spezifischer DNA-Sequenzen durch Vervielfältigung einer Analyse zugänglich zu machen. Die damals verwendete Polymerase war jedoch nicht hitzestabil und musste somit nach jeder Denaturierung dem Reaktionsansatz erneut zugegeben

werden. Schließlich wurde von Kary Millus eine hitzestabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert und als hitzestabile „Taq-Polymerase“ zu PCR-Zwecken genutzt (Saiki et al., 1988).

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde bei der PCR durch reverse Transkription aus mRNA synthetisierte *copy*DNA (cDNA) anstatt DNA eingesetzt. Diese Form der PCR wird als Qualitative Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) bezeichnet.

Die RT-PCR wurde hier zur Amplifikation und Detektion von GAPDH-cDNA-Sequenzen mit Hilfe eines PCR-GAPDH-Primers (Eurofins) genutzt. Ziel dabei war es, die Reinheit der cDNA und somit den Erfolg der DNase-Behandlung mittels des *housekeeping gens* GAPDH (= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; ein nicht-reguliertes Referenzgen) zu kontrollieren. Die Sequenzen der eingesetzten Primer lauten:

<i>Primer (Gen)</i>	<i>Primersequenz</i>	<i>Produktgröße</i>
GAPDH	for 5' - CCAGGTGGTCTCCTCTGACTTC - 3' rev 5' - GTGGTCGTTGAGGGCAATG - 3'	81 bp

Auf Eis wurden je Einfachansatz 0,25 µl des vorwärts sowie des rückwärts GAPDH-Primers dem folgenden Mastermix beigefügt:

<i>1 x Ansatz</i>	<i>Reagenz</i>
0,5 µl	25 mM MgCl ₂ solution
1 µl	10 x PCR Puffer (1 µl)
0,0625 µl	Amplitag Polymerase
7,93 µl	Aqua bidest.

Jeweils **10 µl** dieses Gesamt-PCR-Ansatzes wurden anschließend mit **2,5 µl** der + bzw. -RT-Ansätze des vorherigen Schrittes versetzt. Der Mastermixansatz wurde auf seine Reinheit hin überprüft. Diese Negativkontrolle [no template control, (NTC)] erfolgte, indem in einem Reaktions-Cup statt cDNA steriles Aqua bidest. hinzugefügt wurde. Die restliche cDNA wurde wieder bei -20 °C gelagert. Die Reaktionsdurchführung erfolgte in einem PCR-Thermocycler mit nachstehendem Programmprotokoll:

<i>Schritt</i>	<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>	
1.	10 Min.	95 °C	Polymeraseaktivierung
2.	1 Min.	94 °C	Auftrennung der DNA-Doppelhelix
3.	1 Min.	60 °C	Primeranlagerung
4.	1,3 Min.	72 °C	DNA-Strangamplifikation
→	Wiederholung der Schritte 2 bis 4 für 34 Zyklen		
6.	<i>for ever</i>	4 °C	Ab-/Kühlen

3.2.7 Agarosegelelektrophorese – Überprüfung des PCR-Produktes

Mittels Elelektrophorese ist es möglich Nukleinsäuren entsprechend ihrer Basenpaarlänge aufzutrennen. Zur Visualisierung des PCR-Produktes wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde zunächst 1 g Agarose (Roth) in 50 ml TAE-Puffer unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, anschließend zum Einfärben mit 5 µl des Farbstoffes GelGreen™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) versetzt und in einen Elektrophoreseschlitten mit Gelkamm zum Abkühlen und Aushärten gegeben. Das polymerisierte Gel konnte dann in die mit TAE-Puffer befüllte Gelelektrophoresekammer (Biometra) überführt werden.

Die Proben aus der zuvor durchgeführten PCR wurden jeweils mit 2 µl Ladepuffer versetzt und in die mittels der Gelkämme entstandenen Slots pipettiert. Als Marker diente ein gebrauchsfertiger DNA Marker (Quantitas DNA Marker von Biozym), der DNA-Fragmente in den Größen 50 bp bis 2 kp enthält. 3 µl Marker wurden mit 2 µl 5 x DNA Ladepuffer (Biozym) sowie 10 µl Aqua bidest. versetzt und als Referenz ebenfalls in eine Geltasche geladen.

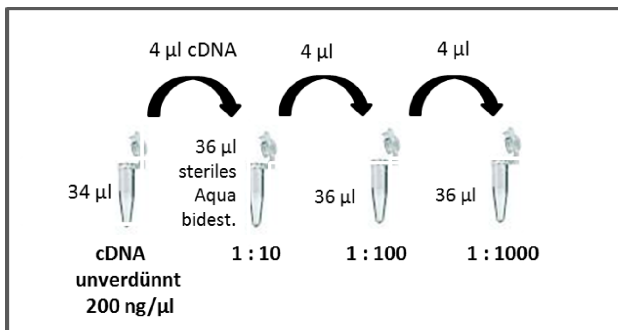
Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung von 125 V mittels PowerPac™ Basic (Bio-Rad) kam es über eine Zeitdauer von 45 Minuten zu einer Wanderung der negativ geladenen DNA-Sequenzen zur positiven Anode. Mittels UV-Licht konnten die dadurch entstandenen Banden in einem UV-Transilluminator (Biometra) sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe der Referenzbanden des Markers war nun eine Bestimmung der cDNA-Fragmentlänge (Größenbestimmung) sowie der Bandenstärke möglich. Außerdem dienten die negativen (nichtvorhandenen) Banden der -RT-Ansätze der Reinheitskontrolle.

Im weiteren Studienverlauf wurde nur cDNA verwendet, deren Bandenmuster dem des getesteten Referenzgens GAPDH entsprach sowie deren -RT-Ansatz keine Bande zeigte und somit frei von gDNA sowie Verunreinigungen war.

3.2.8 Quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

3.2.8.1 Überprüfung der Primereffizienz – cDNA-Verdünnungsreihe

Für die quantitative RealTime-PCR wurden vom Hersteller (Qiagen) designte und getestete Primer genutzt. Daher wären im Normalfall keine Überprüfungen der Primereffizienz nötig gewesen. Da im Laufe der Versuchsdurchführungen jedoch in keiner einzigen Knochenprobe messbare mRNA-Konzentrationen der IL 4 und 13 im *triplet* detektierbar waren, erfolgte eine Effektivitätsprüfung der verwendeten IL-Primer. Zu diesem Zweck wurde eine Verdünnungsreihe einer Positivkontrolle durchgeführt und die Primer mit Hilfe von dieser in einem RT-qPCR-Lauf getestet. Ziel dabei war es, die Primer-Effizienz und die Spezifität der Amplifikationsprodukte anhand der Schmelzkurvenanalyse zu kontrollieren und nachzuweisen. Als Positivkontrolle wurde aus humanem Blut stammende mRNA verwendet. Hierzu wurde aus einer mittels Dichtegradientenzentrifugation aus humanem *buffy coat* isolierter mononukleärer Zellfraktion RNA extrahiert. Die Probe entstammte der Blutbank des Zentrums für Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg. Entsprechend dem oben beschriebenen Vorgehen wurde die gewonnene mRNA zunächst auf 200 ng/μl eingestellt, mit DNase I behandelt, zu cDNA transkribiert und diese mittels RT-PCR der Reinheitskontrolle unterzogen. Die cDNA wurde anschließend in der Verdünnungsreihe eingesetzt und dazu schrittweise nach folgendem Pipettierschema verdünnt:



In der RT-qPCR der Verdünnungsreihe fanden somit folgende Template-Lösungen Verwendung:

<i>unverdünnt</i>	<i>Verdünnung</i>		
Konzentration 200ng/µl	1:10	1:100	1:1000

Der in der RT-qPCR der Verdünnungsreihe eingesetzte Mastermix setzte sich je Primeransatz wie folgt zusammen:

Volumen pro Reaktion (± well)	Mastermixkomponenten
12,5 µl	2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix
2 µl	Primer (QuantiTect Primer Assay)
8 µl	RNase-freies Wasser

Die getesteten Primer sind nachfolgendem Kapitel (Kap. 3.2.8.2) zu entnehmen. In jedes belegte Well der 96-well-RT-qPCR-Platte wurden anschließend **23 µl** des entsprechenden **Primermixes** pipettiert und mit **2 µl cDNA** aus einer der vier Verdünnungsstufen versetzt. Hierbei wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, d.h. jeder IL-Primer wurde mit jeder Verdünnungsstufe dreimal, also in drei Wells (*triplet*), getestet. Zusätzlich wurde zur Kontrolle der Mastermixreinheit je Primermix eine NTC mitgetestet.

3.2.8.2 Durchführung der RT-qPCR

Zur Quantifizierung der im Rahmen dieser Studie untersuchten Genexpressionen wurde die Standardnachweismethode quantitative RT-PCR (RT-qPCR) – auch als RealTime-PCR bezeichnet – eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine Nukleinsäuren-Vervielfältigungsmethode, die auf dem Prinzip der PCR beruht. Die Bezeichnung „Real-Time-PCR“, also Echtzeit-PCR, basiert auf der Tatsache, dass es hierbei zu einer Quantifizierung *während* der einzelnen PCR-Zyklen kommt und nicht, wie bei anderen quantitativen PCR-Methoden, am Ende der Gesamtreaktion. Die eigentliche Quantifizierung basiert auf der Messung von Fluoreszenzsignalen. Dazu wurde dem PCR-Ansatz der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I beigefügt. Dieser weist in Lösung wenig Fluoreszenz auf, lagert sich in die sich vervielfältigenden DNA-Doppelstränge ein und kann so, durch Licht angeregt, ein deutliches Fluoreszenzsignal erzeugen. Im Verlauf der PCR-Zyklen und der

damit verbundenen Zunahme an DNA-Doppelsträngen kann immer mehr Farbstoff interkalieren. Es kommt zu einer Verstärkung des Fluoreszenzsignals. Dieses wird (wie oben beschrieben) in Echtzeit während den RealTime-Zyklen gemessen, in der exponentiellen Phase der PCR quantifiziert und nimmt proportional zur PCR-Produktmenge zu.

Für die RT-qPCR-Analyse wurde das Qiagen Quanti Fast SYBR Green PCR Kit (Qiagen) verwendet. Dazu wurde der QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix, der bereits dNTPs und Polymerase enthält, mit den entsprechenden QuantiTect Primer Assays von Qiagen sowie RNase-freiem Wasser versetzt. Bei der Pipettierung wurde auf Eis gearbeitet und zunächst die Primer-Mastermixansätze hergestellt:

Volumen pro Reaktion (\triangleq well)	Mastermixkomponenten
10 μ l	2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix
2 μ l	Primer (QuantiTect Primer Assay)
6,4 μ l	RNase-freies Wasser

In jedes belegte Well der 96-well-PCR-Platten wurden anschließend **18,4 μ l** des entsprechenden **Mastermixes** pipettiert und mit **1,6 μ l** der auf 200 ng/ μ l eingestellten **cdNA** versetzt. Um Pipettierfehler zu vermeiden, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine Dreifachbestimmung (*triplet*) der Genexpressionen, d.h. jede Patienten-cDNA wurde mittels RT-qPCR in einem Lauf *auf jedes Gen dreimalig* (\triangleq drei wells) getestet. Bei allen RealTime-Läufen wurde außerdem als interne Referenz die GAPDH-Expression aller Template-cDNAs (ebenfalls als *triplet*) mitgemessen. Dies ist nötig, um im Rahmen einer relativen Quantifizierung die Zielgen-Expressionen mit denen des nichtregulierten Referenzgens zu verrechnen und so einen relativen Mengenvergleich zu erhalten.

Folgende Quanti Tect Primer Assays der Firma Qiagen wurden verwendet:

Primer	Quanti Tect Primer Assay	Qiagen-Nr.	Produktgröße
GAPDH	Hs_GAPDH_1_SG	QT00079247	95 bp
RANKL	Hs_TNFSF11_1_SG	QT00215614	91 bp
OPG	Hs_TNFRSF11B_1_SG	QT00014294	107 bp
Interleukin 1 β	Hs_IL1B_1_SG (IL1 β)	QT00021385	117 bp
Interleukin 4	Hs_IL4_1_SG (IL 4)	QT00012565	89 bp
Interleukin 6	Hs_IL6_1_SG (IL 6)	QT00083720	107 bp
Interleukin 10	Hs_IL10_1_SG (IL 10)	QT00041685	113 bp
Interleukin 13	Hs_IL13_1_SG (IL 13)	QT00000511	185 bp

Zur Abklärung der Mastermixreinheit wurden zusätzlich je Primer drei NTCs statt mit cDNA mit Wasser versetzt. Die Inkubation der 96-Well-Platten erfolgte im BioRad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) bei folgendem Programm:

Schritt	Zeitdauer	Temperatur	
1.	5 Min.	95 °C	Polymeraseaktivierung
2.	10 Sek.	95 °C	Auftrennung der DNA-Doppelhelix
3.	30 Sek.	60 °C	Primeranlagerung und DNA-Strangamplifikation
→	Wiederholung der Schritte 2 und 3 für 39 weitere Zyklen		
4.	je 5 Sek.	schrittweise Erhöhung in 0,5 °C-Schritten von 60 auf 95 °C	Schmelzkurve
Ende		4 °C	Ab-/Kühlen

Um sicher zu stellen, dass die amplifizierten DNA-Sequenzen den Zielgenen entsprechen, wurde stichprobenartig eine Agarosegelelektrophorese der IL-RealTime-PCR-Produkte durchgeführt.

3.2.9 Statistische Auswertung

Die RT-qPCR-Daten wurden mittels der CFX Manager Software 2.1 von Bio-Rad ausgewertet und die C_q-Werte anschließend in Excel (Microsoft 2010) importiert. Hier

erfolgte die Berechnung der normalisierten Expression gegen GAPDH unter Anwendung der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode. Die statistischen Datenauswertungen wurden schließlich durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

In die gesamte statistische Auswertung wurden nur die Zytokine einbezogen, die in ihrer mittels RT-qPCR gemessenen Expression *nicht komplett null* waren. Dies waren RANKL, OPG sowie die IL 1 β , 6 und 10. Sowohl IL 4 als auch IL 13 zeigten in den gesamten Real-Time-Läufen keine detektierbaren Expressionen. Ihre normalisierte Expression lag somit bei allen Studienpatienten bei null. Daher wurden sie in den statistischen Berechnungen nicht berücksichtigt. Zur Verdeutlichung der Unterschiede sind sie jedoch im Rahmen der Ergebnisse aufgeführt (Kap. 4).

Die in der RT-qPCR gemessenen mRNA-Konzentrationen zeigten nach Berechnung der normalisierten Expression in Excel *keine* Normalverteilung. Auf Grund dessen wurden die Expressionen der untersuchten IL (1 β , 4, 6, 10 und 13) untereinander sowie von Frauen und Männern, Frakturen und Coxarthrosen sowie ihre Beziehung zu dem errechneten RANKL/OPG-Quotienten mittels einfaktorieller *nichtparametrischer* Analysen verglichen. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den IL erfolgte hierbei durch den exakten Friedman-Test unter Verwendung des Programmes „StatXact“ (Cytel, 2010). Die Zusammenhänge der IL-Expressionen zwischen den Geschlechtern sowie den Erkrankungen (Fraktur, Coxarthrose) wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ermittelt. Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman wurde zur Untersuchung der Korrelation der IL-Expressionen und dem quantitativen Merkmal des RANKL/OPG-Quotienten verwendet. Im Rahmen der beiden letztgenannten statistischen Verfahren fand das Statistikprogramm BMDP/Dynamic, Release 8.1 (Dixon, 1993) Anwendung.

RANKL/OPG wurde als das Verhältnis der mittels RT-qPCR gemessenen und mit Excel errechneten normalisierten Expressionen von RANKL und OPG bestimmt und dementsprechend als Quotient dieser Werte errechnet (Rechnung \rightarrow RANKL-mRNA-Konzentration : OPG-mRNA-Level). Dadurch konnten folgende potenziellen Knochenstoffwechselsituationen unterschieden werden:

- $\text{RANKL/OPG} \leq 1$ \rightarrow resultierte aus einer ausgeglichenen oder höheren Expression des Knochenprotektors OPG im Verhältnis zu RANKL. Daher wurde in diesen Fällen von

einem ausgewogenen (Präventions-)Stadium des Knochenstoffwechsels ausgegangen (Knochen-Erhaltung).

- RANKL/OPG > 1 → ergab sich, wenn die Konzentration des Osteoklasten-Aktivators RANKL über der von OPG lag. Bei diesen Patienten wurde somit ein bestehendes Ungleichgewicht des Knochenstoffwechsels zu Gunsten des Knochenverlustes angenommen (Knochen-Abbau).

Bei der Berechnung des RANKL/OPG-Quotienten erfolgte folgende Anpassung:

- Im Falle von RANKL/OPG = 0/0 wurde dieser Quotient = 1 gesetzt und ein ausgeglichener Knochenstoffwechsel unterstellt.
- Zum Abfangen von Nullen im Nenner (OPG = 0) bei gleichzeitiger Expression von RANKL (=> RANKL/0) wurde der OPG-Wert = 0,5 gesetzt. Dies entsprach der *niedrigsten* normalisierten OPG-Expression des untersuchten Genpools und gewährleistete somit einen möglichst *hohen* Quotienten.

Wie bereits erwähnt, wiesen die erhobenen Daten keine Normalverteilung auf. Um dennoch weitere mögliche und bisher unbekanntes Zusammenhänge erkennbar werden zu lassen, wurden im Weiteren mehrfaktorielle Varianzanalysen als *explorative* Untersuchungen durchgeführt. Anwendung fand hierbei wiederum das Statistikprogrammpaket BMDP/Dynamic, Release 8.1 (Dixon, 1993). Zunächst wurden dabei für die explorative zweifaktorielle Kovarianzanalyse die Gruppierungsfaktoren Geschlecht (männlich, weiblich) und Erkrankung (Fraktur, Coxarthrose) bestimmt und die quantitative Einflussgröße RANKL/OPG als Kovariable in die Berechnung einbezogen. Im Rahmen der explorativen dreifaktoriellen Varianzanalyse wurde der RANKL/OPG-Quotient als dritter Gruppierungsfaktor gewertet und ein Cutpoint entsprechend der einfaktoriellen Analyse bei RANKL/OPG = 1 gesetzt. Somit konnte bei dieser explorativen Analyse zusätzlich zwischen folgenden RANKL/OPG-Gruppierungsfaktoren unterschieden werden:

- RANKL/OPG ≤ 1: Knochen-Erhaltung
- RANKL/OPG > 1: Knochen-Abbau

Bei der statistischen Auswertung der gesamten Daten galt ein p-Wert von ≤ 0,05 als statistisch signifikant. Zur Beschreibung der Daten wurden die Mittelwerte, positive (+) und negative (-) Standardabweichungen sowie p-Werte berechnet.

3.2.10 Computertomographie der Hüftköpfe – Knochendichtemessung (Osteodensitometrie)

Um eine Einschätzung der Knochenmaterial- und geometrischen Eigenschaften sowie der Knochendichte der untersuchten Femurköpfe zu erhalten, wurden 25 (13 Frakturen, 12 Coxarthrosen) der bei der Probenentnahme abgesetzten Knochenkappen mittels Computertomographie (CT) gescannt. Hierbei fand der Computertomograph Brilliance CT 16-slice (Philips) der chirurgischen Abteilung der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig Universität Gießen Verwendung. Es wurden helicale und axiale Scans mit einer Schichtdicke von 0,7 mm sowie 1 mm angefertigt (Metadaten siehe Anhang).

Als Kontrollstandard wurde neben den Knochenproben in jedem Lauf ein mit wassergefülltes Referenzphantom mitgescannt [Wasser weist definitionsgemäß *null* (0) Hounsfield units (HU) auf]. Dieses wurde auf dem Schlitten unterhalb der Knochenkappen platziert (Abb. 10). Die Kalibrierung des Apparates erfolgte vor dem ersten Lauf und wurde ungefähr nach einem Drittel sowie zwei Drittel der Läufe wiederholt. Nach Erfassung der Daten wurden die Bilder zweidimensional errechnet und anschließend dreidimensional rekonstruiert (Systemsoftware V 1.2.5).

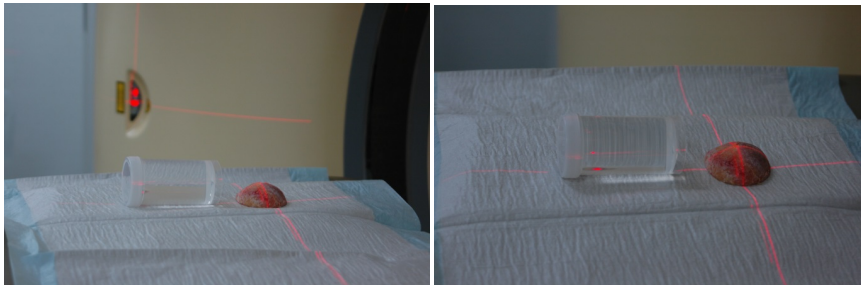


Abbildung 10: Computertomographie einer Hüftkopfkappe.

Zur Messung der Knochendichte fand das Programm Synedra View Personal 3.2.0.3 Anwendung. Es wurde zunächst die Knochendichte des midsagitalen Schnittes der *nativen* computertomographischen Knochenscans mittels Polygone gemessen. Anschließend erfolgte die Messung an zwei weiteren Schnitten. Diese wurden für alle Femurkopfkappen als die, in der Mitte zwischen der midsagitalen Ebene und den äußeren Kappenrändern liegenden Schnitte, definiert (Abb. 11). Bei den Messungen wurde die Kortikalis ausgelassen und

ausschließlich die Knochendichte (in HU) des spongiösen Knochens gemessen. Bei jedem Patienten erfolgte eine Kontrolldichtemessung des Referenzphantoms (HU von Wasser = 0).

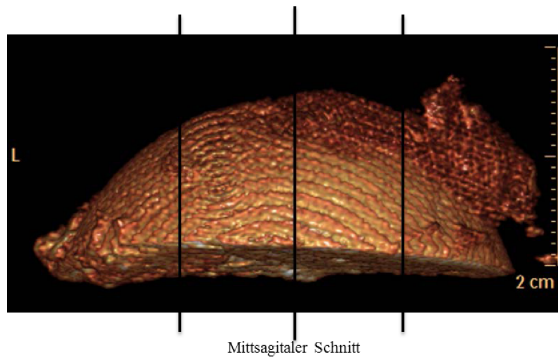


Abbildung 11: Schematische Darstellung der drei Ebenen der Knochendichtemessung.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte

Um die Reinheit der cDNA und somit den Erfolg der DNase-Behandlung zu gewährleisten, wurden die Proben mit Hilfe des Referenzgens GAPDH in einer RT-PCR getestet und das PCR-Produkt anschließend mittels Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. Im Weiteren wurde ausschließlich cDNA verwendet, die eine einzelne für GAPDH-spezifische Bande aufwies und deren -RT-Ansatz *keine* Bande zeigte (Abb. 12).

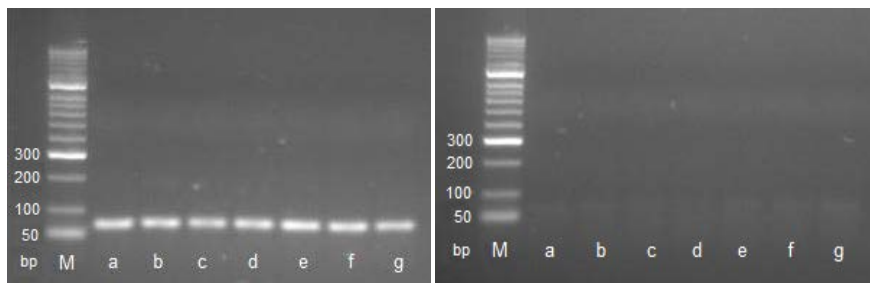


Abbildung 12: Banden der GAPDH-PCR-Produkte;
 links: Banden der GAPDH-PCR-Produkte von sieben verschiedenen Patienten (+RT),
 rechts: ihre negativen -RT-Proben,
 Produktgröße GAPDH 81 bp,
 M = Marker

4.2 RT-qPCR

Bevor auf die Einzelergebnisse eingegangen wird, ist darauf hinzuweisen, dass im Rahmen der gesamten Studiendurchführung keine Expressionsmuster der IL 4 und 13 in den Proben nachgewiesen werden konnten, die entsprechend gängiger RealTime-Auswertungen verwendbar und auswertbar waren. Die normalisierten Expressionen der detektierbaren IL (1, 6 und 10) stellten sich im Verhältnis zu dem internen Kontrollgen GAPDH generell niedrig dar.

4.2.1 Ergebnisse der cDNA-Verdünnungsreihe zur Kontrolle der Primereffizienz und Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese der RealTime-PCR-Produkte

Anhand der durchgeführten Verdünnungsreihe der Positivkontrolle (*buffy coat*) wurde die Effektivität und Funktion der IL-Primer kontrolliert. Da hierbei sowohl IL 4- als auch IL13-mRNA detektiert wurde, konnte sichergestellt werden, dass der Mangel an IL 4 und 13 in den beprobten Knochen nicht auf einen Fehler der Versuchsdurchführung oder der verwendeten Primer zurückführbar ist. Die in der RT-qPCR zur Untersuchung der Genexpressionen verwendeten IL-Primer zeigten in der cDNA-Verdünnungsreihe der Positivkontrolle *alle* eine Effizienz zwischen 98,7 % und 108,7 %. Des Weiteren wurde ihre Spezifität anhand der Schmelzkurvenanalyse, die bei allen ein *einzelnes spezifisches* Amplifikationsprodukt zeigte, bestätigt. Um sicher zu stellen, dass die amplifizierten DNA-Sequenzen den Zielgenen entsprechen, wurde zusätzlich stichprobenartig eine Agarosegelelektrophorese der IL-RealTime-PCR-Produkte durchgeführt. Für die IL 4 und 13 wurde hierzu exemplarisch ein Produkt aus der Verdünnungsreihe eingesetzt (Abb. 13).

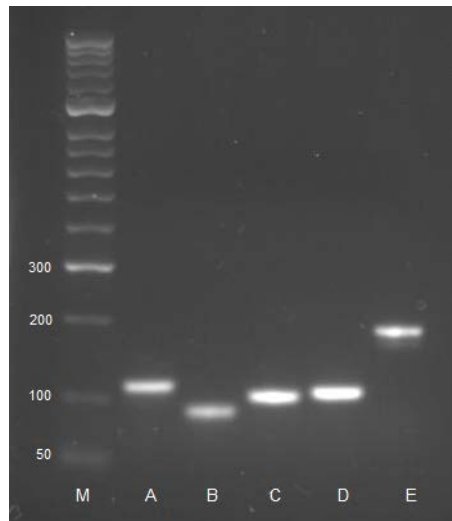


Abbildung 13: Banden der IL-RT-qPCR-Produkte;

A: IL 1β, Produktgröße 117 bp; B: IL 4 (Positivkontrolle), Produktgröße 89 bp;
C: IL 6, Produktgröße 107 bp; D: IL 10, Produktgröße 113;
E: IL 13 (Positivkontrolle), Produktgröße 185 bp; M = Marker

4.3 Statistische Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

4.3.1 Ergebnisse der einfaktoriellen nichtparametrischen Analysen

Die Expressionen der untersuchten IL sowie von RANKL und OPG wurden auf Grund fehlender Normalverteilung mittels einfaktorieller nichtparametrischer Statistikverfahren analysiert. Hierbei wurden zwischen den drei detektierbaren IL 1, 6 und 10 keine signifikanten Differenzen ihrer mRNA-Konzentrationen in den beprobten Knochen gefunden. Der p-Wert lag bei 0,3344. Dennoch konnten, wenn auch nicht signifikant, Unterschiede in der durchschnittlichen Expression beobachtet werden. Abbildung 14 gibt die hierbei ermittelten mittleren IL-mRNA-Level sowie die Standardabweichungen der einzelnen Interleukine wieder.

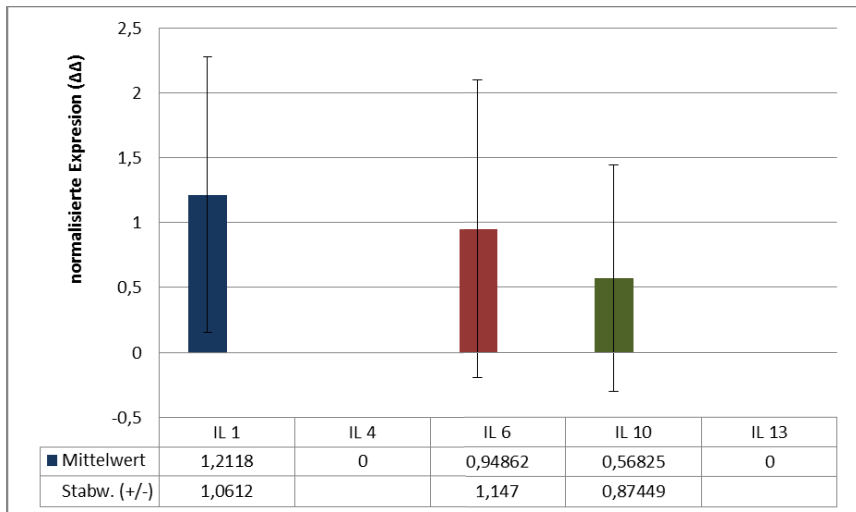


Abbildung 14: Mittlere Expressionen (\bar{x}) und Standardabweichungen (s) der IL der Gesamtpatientenpopulation ($n = 39$);
 $p = 0,3344$

Im Durchschnitt der untersuchten Gesamtpopulation wurden für IL 1 die höchsten Expressionen gemessen. IL 6 zeigte etwas niedrigere Werte, wo hingegen IL 10 das am niedrigsten exprimierte detektierbare Interleukin darstellte. Wie oben erwähnt, wurden in den gesamten RT-qPCR-Läufen keine mRNA-Konzentrationen der IL 4 und 13 detektiert.

4.3.1.1 Interleukin-Expression im Geschlechtervergleich

Zwischen den Geschlechtern konnten keine signifikanten Unterschiede der IL-Expressionen festgestellt werden. Jedoch waren die gemessenen IL 1- und 6-Level der Frauen im Durchschnitt gegenüber denen der Männer erhöht. IL 10 hingegen zeigte, wenn auch nur leicht, höhere mRNA-Konzentrationen bei den männlichen Patienten (Abb. 15).

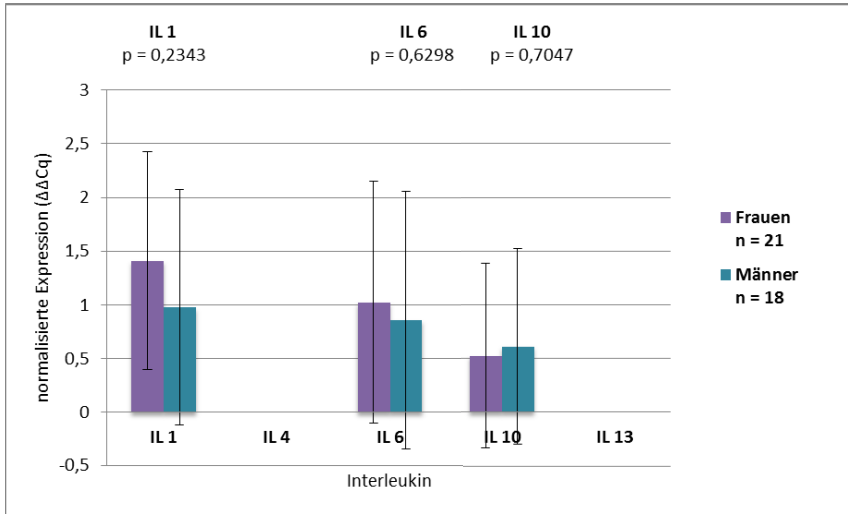


Abbildung 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der IL-Expressionen im Geschlechtervergleich, Gesamtpatientenpopulation (n = 39); n = Anzahl der Frauen bzw. Männer

Nachfolgend sind die entsprechenden Mittelwerte, Standardabweichungen sowie p-Werte von Frauen und Männern tabellarisch dargestellt:

Tabelle 2: Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der IL-Expressionen von Frauen und Männern, Gesamtpatientenpopulation (n = 39)

Interleukin	Mittelwert		+/- Standardabweichung		p-Wert
	Frauen	Männer	Frauen	Männer	
IL 1	1,4132	0,9767	1,0142	1,0948	0,2343
IL 4	/	/	/	/	/
IL 6	1,0249	0,8597	1,1266	1,1967	0,6298
IL 10	0,5276	0,6157	0,8610	0,9127	0,7047
IL 13	/	/	/	/	/

4.3.1.2 Expression der Interleukine bei Schenkelhalsfrakturen und Coxarthrosen

Die gemessenen mRNA-Mengen der IL 1, 6 und 10 wiesen deutliche Unterschiede zwischen Coxarthrosepatienten und Personen mit einer Schenkelhalsfraktur auf (Abb. 16).

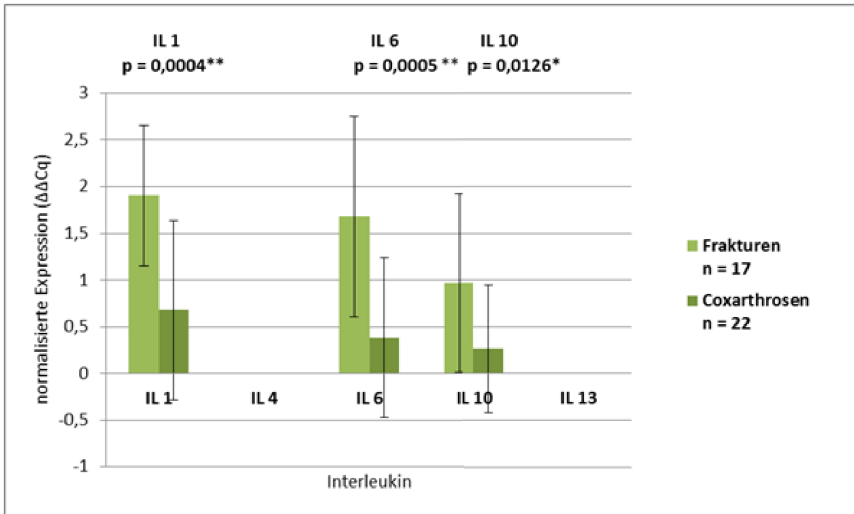


Abbildung 16: *p*-Werte und Darstellung der mittleren IL-Expressionen samt Standardabweichungen von Patienten mit Coxarthrose und Personen mit einer Schenkelhalsfraktur, Gesamtpatientenpopulation ($n = 39$); n = Anzahl der Patienten der entsprechenden Gruppe
* = signifikant, ** = hoch-signifikant, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % = $p \leq 0,05$

Alle drei detektierbaren IL (IL 1, 6 und 10) waren in Knochen von Frakturpatienten deutlich höher exprimiert, als in Proben von Personen mit einer Coxarthrose. Es zeigte sich für IL 1 und 6 ein hoch-signifikanter (IL 1 $p = 0,0004$; IL 6 $p = 0,0005$), für IL 10 ein signifikanter ($p = 0,0126$) Unterschied zwischen den Coxarthrosepatienten und der Frakturgruppe (Tab. 3).

Tabelle 3: Gegenüberstellung der Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der IL-Expressionen von Coxarthrosepatienten und solchen mit einer Schenkelhalsfraktur, Gesamtpatientenpopulation (n = 39)

<i>Interleukin</i>	<i>Mittelwert</i>		<i>+/- Standardabweichung</i>		<i>p-Wert</i>
	<i>Frakturen</i>	<i>Coxarthrosen</i>	<i>Frakturen</i>	<i>Coxarthrosen</i>	
IL 1	1,9044	0,6765	0,7522	0,9583	0,0004**
IL 4	/	/	/	/	/
IL 6	1,6818	0,382	1,0735	0,855	0,0005**
IL 10	0,9652	0,2615	0,9543	0,681	0,0126*
IL 13	/	/	/	/	/

Tab. 3: * = signifikant
** = hoch-signifikant

4.3.1.3 Korrelation der Interleukine zu RANKL/OPG

Um einen Hinweis auf die Knochenstoffwechselsituation der Patienten zu erhalten, wurde aus den Expressionswerten der Knochenmediatoren RANKL und OPG ihr Quotient (RANKL/OPG) ermittelt. Im Rahmen der einfaktoriellen nichtparametrischen Analyse wurde die Korrelation der IL-Expressionen mit der errechneten Ratio untersucht. Dabei konnte eine Signifikanz der IL 10-mRNA-Konzentration mit RANKL/OPG ($p = 0,0436$) festgestellt werden. Folglich war bei Patienten mit einem höheren RANKL/OPG-Verhältnis die IL 10-Expression deutlich gesteigert.

Die Korrelation von IL 6 zu RANKL/OPG gilt als statistisch auffällig und war knapp nicht signifikant ($p = 0,0678$). Es konnte somit eine Tendenz der Hochregulation des IL 6 bei erhöhter RANKL/OPG-Ratio festgestellt werden.

Nachfolgende Tabelle (Tab. 4) zeigt die ermittelten Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der IL-Expressionen in Korrelation zu RANKL/OPG (≤ 1 oder > 1).

Tabelle 4: Standardabweichungen, Mittel- und p-Werte der IL-Expressionen der Knochenproben mit $RANKL/OPG \leq 1$ sowie $RANKL/OPG > 1$, Gesamtpatientenpopulation ($n = 39$)

Interleukin	Mittelwert		+/- Standardabweichung		p-Wert
	RANKL/OPG	RANKL/OPG	RANKL/OPG	RANKL/OPG	
	≤ 1	> 1	≤ 1	> 1	
IL 1	1,2523	1,1805	1,1521	1,0120	0,7789
IL 4	/	/	/	/	/
IL 6	0,7012	1,1398	1,1307	1,1484	<u>0,0678</u>
IL 10	0,1949	0,8567	0,5525	0,9753	0,0436*
IL 13	/	/	/	/	/

Tab. 4: * = signifikant
p unterstrichen = knapp nicht signifikant = statistisch auffällig

Anhand des Verhältnisses von RANKL zu OPG konnte, wie bereits erwähnt, auf die Knochenstoffwechselsituation der 39 untersuchten Patienten geschlossen werden. Daraus ergaben sich *15 Personen* mit einer RANKL/OPG-Ratio ≤ 1 (ausgeglichene Knochenumbaurate, Prävention des Knochenverlustes) und *24 Patienten* mit RANKL/OPG > 1 (potenzieller Knochenverlust) (Abb. 17).

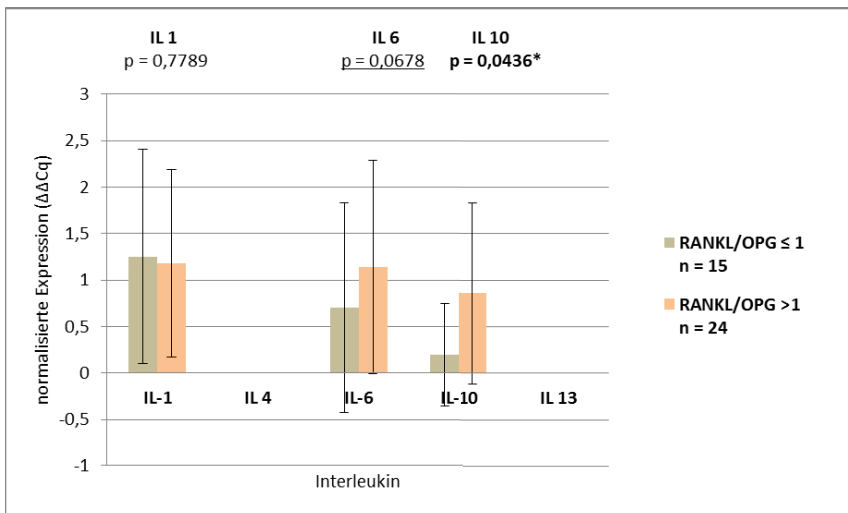


Abbildung 17: Gegenüberstellung der durchschnittlichen IL-Expressionen, Standardabweichungen und p-Werte von Proben mit einer RANKL/OPG-Ratio ≤ 1 und solchen mit RANKL/OPG > 1 , Gesamtpatientenpopulation ($n = 39$);

n = Anzahl der Patienten mit entsprechender RANKL/OPG-Ratio
 * = signifikant, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % = $p \leq 0,05$
p unterstrichen = knapp nicht signifikant = statistisch auffällig

4.3.2 Ergebnisse der explorativen mehrfaktoriellen Varianzanalysen

Die mehrfaktoriellen Varianzanalysen wurden auf Grund der fehlenden Normalverteilung der erhobenen Daten als *explorative* Untersuchungen durchgeführt. Ziel dabei war es, in den vorangegangenen Analysen möglicherweise nicht erfasste Korrelationen zu erkennen.

4.3.2.1 Explorative zweifaktorielle Kovarianzanalyse

Tabelle 5: *p*-Werte der zweifaktoriellen Kovarianzanalyse, Gesamtpatientenpopulation (*n* = 39)

	IL 1	IL 6	IL 10
Geschlecht (G)	0,3081	0,8379	0,5985
Arthrose/Fraktur (E)	< 0,0001	0,0005	0,0168
RANKL/OPG (Kovariablen)	0,0141	0,7485	0,8874
Wechselwirkung GE	0,2672	0,7119	0,8812

Arthrose/Fraktur = Erkrankung (E)

Kovariablen = abhängige Variable

Wechselwirkung GE = Wechselwirkung zwischen G und E

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, wurden bei der explorativen zweifaktoriellen Kovarianzanalyse die Ergebnisse der einfaktoriellen nichtparametrischen Analyse aus Abschnitt 4.3.1.2 bestätigt. Es konnten hier ebenfalls für IL 1 und 6 hoch-signifikante (IL 1 $p < 0,0001$; IL 6 $p = 0,0005$) und für IL 10 ($p = 0,0168$) signifikante Unterschiede der IL-mRNA-Konzentrationen in arthrotischen bzw. frakturierten Knochenproben belegt werden.

Des Weiteren zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang von IL 1 mit RANKL/OPG ($p = 0,0141$). Eine Wechselwirkung zwischen Geschlecht und Art der Erkrankung (Fraktur, Coxarthrose) wurde nicht gefunden. Mittelwerte und Standardabweichungen sind im Anhang aufgeführt (Tab. 7).

4.3.2.2 Explorative dreifaktorielle Varianzanalyse

Unter Einbeziehung der RANKL/OPG-Ratio in die Varianzberechnung als weiterer Gruppierungsfaktor, ergab sich eine Zuordnung der untersuchten Frauen und Männer mit einer Coxarthrose oder einer Schenkelhalsfraktur in Gruppen mit einem ausgeglichenen (RANKL/OPG ≤ 1) oder sich im Stadium des Knochenverlustes (RANKL/OPG > 1) befindlichen Knochenstoffwechsel (Abb. 18).

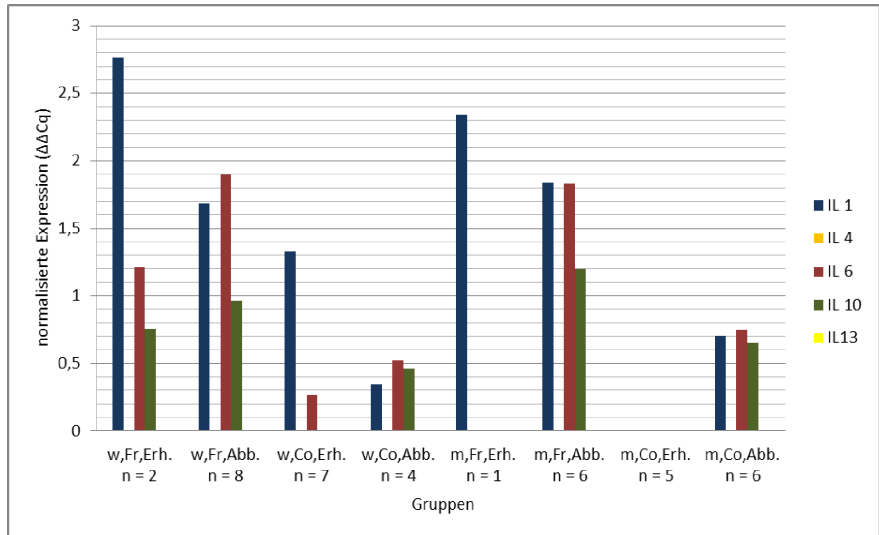


Abbildung 18: Normalisierte IL-Expression und Gruppenzuordnung der Patientenpopulation der explorativen dreifaktoriellen Varianzanalyse, Gesamtpatientenpopulation (n = 39);
w = weiblich, m = männlich
Fr = Fraktur, Co = Coxarthrose,
Erh. = Knochen-Erhalt (RANKL/OPG ≤ 1)
Abb. = Knochen-Abbau (RANKL/OPG > 1)
n = Anzahl der Patienten in der entsprechenden Gruppe

Die p-Werte der explorativen dreifaktoriellen Varianzanalyse sind in nachfolgender Tabelle, die Mittelwerte und Standardabweichungen im Anhang (Tab. 8, Abb. 24) dargestellt.

Tabelle 6: *p*-Werte der dreifaktoriellen Varianzanalyse, Gesamtpatientenpopulation (n = 39)

Faktor	IL 1	IL 6	IL 10
Geschlecht (G)	0,346	0,3967	0,7988
Arthrose/Fraktur (E)	< 0,0001	0,0328	0,1802
RANKL/OPG (R)	0,1601	0,028	<u>0,0654</u>
Wechselwirkung GE	0,5939	0,4228	0,5933
Wechselwirkung GR	0,0903	0,291	0,3779
Wechselwirkung ER	0,3254	0,3279	0,8278
Wechselwirkung GER	0,4026	0,6715	0,545

Arthrose/Fraktur = Erkrankung (E)

Wechselwirkung GE/GR/ER/GER = Wechselwirkung zwischen den entsprechenden Gruppierungsfaktoren

p unterstrichen = knapp nicht signifikant = statistisch auffällig

Auch bei der dreifaktoriellen Varianzanalyse ergaben sich bei IL 1 ($p < 0,0001$) bzw. 6 ($p = 0,0328$) hoch- bzw. signifikante Korrelationen mit der „Primär“-Erkrankung.

IL 6 wies außerdem eine Signifikanz von $p = 0,028$ zu RANKL/OPG auf. D.h., bei einer höheren Ratio von RANKL zu OPG wurden höhere mRNA-Konzentrationen des IL 6 gemessen. Ebenfalls in Verbindung mit einem hohen RANKL/OPG-Verhältnis wurde eine statistische Auffälligkeit des IL 10 gefunden, die mit einem p-Wert von 0,0654 statistisch knapp nicht signifikant war.

4.4 Ergebnisse der computertomographischen Darstellungen und Osteodensitometrie

Die Knochendichtemessungen der Femurkappen-CT-Scans ergaben – unter Einbeziehung der minimalen und maximalen HU-Werte jedes gemessenen Schnittes – in der Frakturgruppe einen mittleren HU-Wert von 287,4 und bei den Patienten mit einer Coxarthrose einen Mittelwert von 489,71 HU (Abb. 19).

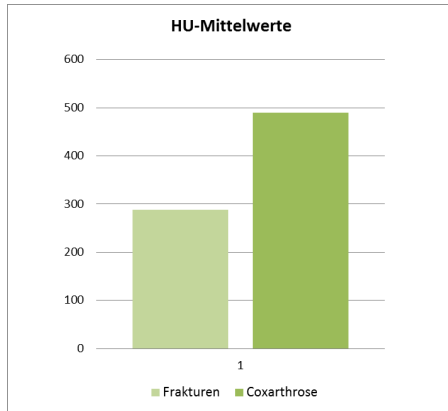


Abbildung 19: HU-Mittelwerte der gemessenen Knochendichte der Femurkappen von Fraktur- und Coxarthrosepatienten.

Im Folgenden sind exemplarisch zwei- und dreidimensionale Rekonstruktionen der CT-Scans dargestellt (Abb. 20, Abb. 21).

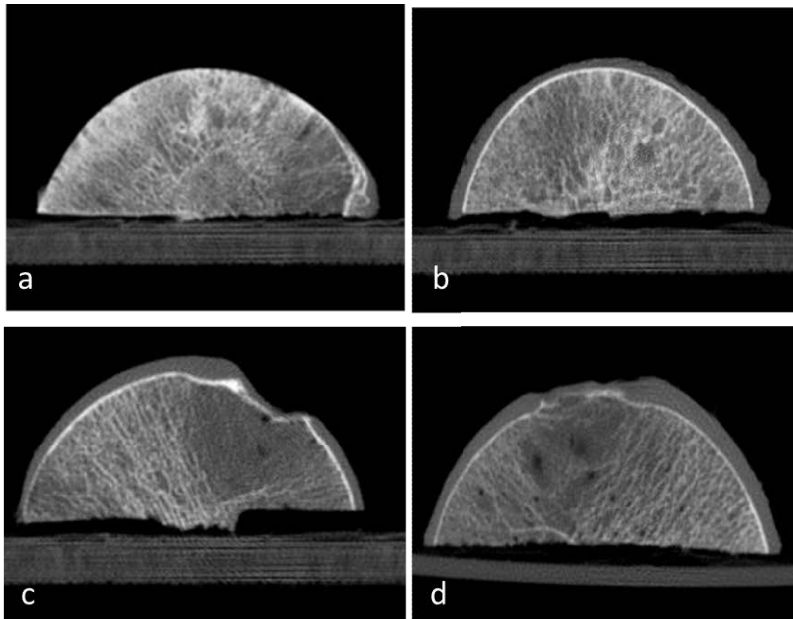


Abbildung 20: Exemplarische Darstellung computertomographischer Schnitte der Hüftkopfkappen (a, b);

a) Coxarthrose, weiblich, 77 Jahre (J.); b) Coxarthrose, weiblich, 75 J.

c) Schenkelhalsfraktur, weiblich, 86 J.; d) Schenkelhalsfraktur, männlich, 75 J.

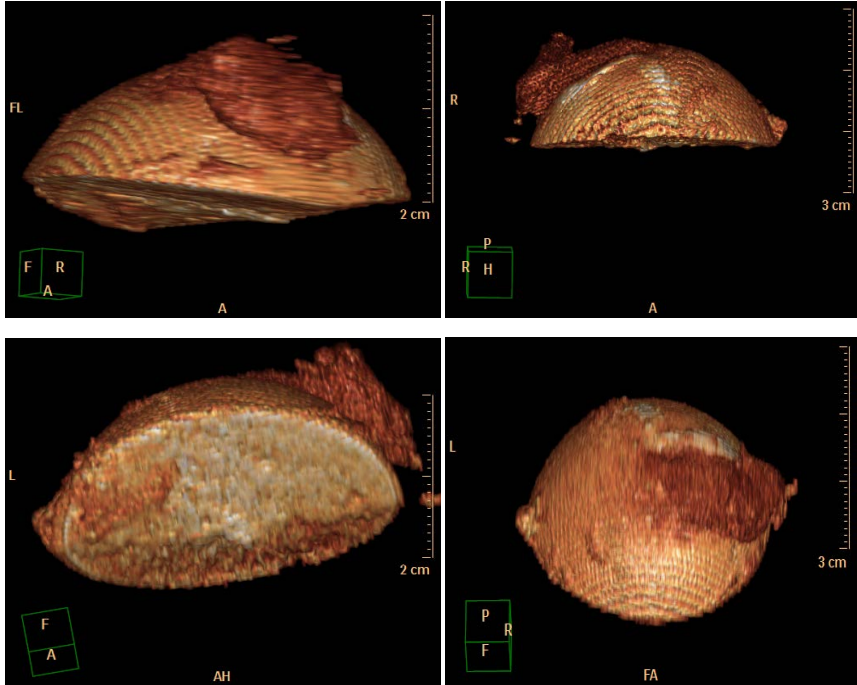


Abbildung 21: Exemplarische dreidimensionale Darstellung einer Hüftkopfkappe;
(Schenkelhalsfraktur, weiblich, 98 Jahre)

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Ergebnisse der einfaktoriellen nichtparametrischen Analysen

Ungeachtet der Probenherkunft (Coxarthrose-/Schenkelhalsfrakturpatient) zeigte der Vergleich der Expressionen der detektierten IL 1, 6 und 10 annähernd gleiche Expressionshöhen aller drei Zytokine. IL 1 wies insgesamt die höchsten mRNA-Werte auf, während IL 6 etwas niedriger und IL 10 am niedrigsten exprimiert waren. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede ihrer mRNA-Konzentrationen. Die Diskussion der Expressionen der IL 1, 6, und 10 erfolgt nachstehend im Kontext der Erörterung der weiteren Ergebnisse der einfaktoriellen nichtparametrischen Analysen (vgl. Kap. 5.1.1 - 5.2.2). In *keiner* untersuchten Probe waren messbare mRNA-Mengen der IL 4 und 13 nachweisbar. Dieses Ergebnis wird an späterer Stelle ausführlich diskutiert (vgl. Kap. 5.3).

5.1.1 Interleukin-Expression im Geschlechtervergleich

Die IL 1, 6 und 10 zeigten keinen bedeutenden Unterschied ihrer mRNA-Expression zwischen Frauen und Männern. Dies kann auf den ersten Blick verwundern, galt doch die Osteoporose auf Grund des postmenopausalen Wegfalls des knochenprotektiven Östrogeneffektes lange Zeit als eine typische Frauenerkrankung (WHO Technical Report Series, 1994; Häussler et al., 2006). Bei der Interpretation des Ergebnisses ist jedoch zu berücksichtigen, dass ausschließlich Knochen von Frauen und Männern mit einem Lebensalter von mindestens 60 Jahren (mittleres Alter = $73,5 \pm 9,6$) untersucht wurden. Das ist von bedeutender Relevanz, da sich mit höherem Lebensalter bei *beiden* Geschlechtern die gleiche Form der Osteoporose – die senile Osteoporose – manifestiert (Riggs et al., 1998, 2002; Adler, 2006) und somit Männer und Frauen dieser Altersklasse ähnliche Zytokinprofile aufweisen. Diese Low-Turnover-Osteoporose ist durch einen langsamen, kontinuierlich fortschreitenden Knochenverlust charakterisiert (Riggs et al., 1998, 2002; Adler, 2006; Duque und Troen, 2008). Bei Frauen geht diesem Low-Turnover, bedingt durch den postmenopausalen Östrogenmangel, ein beschleunigter Knochenschwund (High-Turnover; über ca. 10 Jahre postmenopausal) voran (Riggs et al., 1998, 2002; Eriksen et al., 1999; Adler, 2006). Es gibt Hinweise darauf, dass in der zweiten postmenopausalen Dekade der Frau und der entsprechenden Low-Turnover-Osteoporose des Mannes die Zytokin-Synthese im

Unterschied zum frühen beschleunigten Knochenverlust des High-Turnovers verändert ist. So konnten Scheidt-Nave et al. (2001) lediglich in der frühen postmenopausalen Phase eine Korrelation erhöhter Serum-IL 6-Level mit osteoporotisch bedingtem Knochenschwund finden. Bei Patientinnen jenseits der ersten postmenopausalen Dekade waren die IL-Konzentrationen jedoch – analog der im Rahmen der vorliegenden Arbeit lokal gemessenen niedrigen IL-Knochenexpressionsmuster – deutlich niedriger und nicht signifikant. Entsprechende Ergebnisse lieferten auch vorangegangene Zellkulturstudien. Hier wurde eine erhöhte Zytokin-Produktion in humanen mononukleären Zellen (Pacifiçi et al., 1993) und Knochenmarkszellen (Bismar et al., 1995) bei früh-, jedoch nicht spät-postmenopausalen Frauen gemessen. Als Kontrollgruppen dienten dabei jeweils Zellen prämenopausaler Frauen.

Die gemessenen IL-Expressionen des untersuchten Patientenkollektivs waren in Relation zu dem internen Referenzgen GAPDH generell niedrig. Außerdem waren keine bedeutenden Konzentrationsunterschiede der untersuchten IL zwischen den Geschlechtern festzustellen. Diese niedrigen geschlechtsunspezifischen Konzentrationen sind durch das hohe mittlere Alter der Patientenpopulation (gesamt = $73,5 \pm 9,6$; Männer = $70,6 \pm 8,4$; Frauen = $76,1 \pm 10$) begründet. Im Einklang mit den Erkenntnissen der oben genannten Forschungsgruppen sowie weiteren Veröffentlichungen (Riggs et al., 1998, 2002; Adler, 2006; Duque und Troen, 2008) lassen diese Ergebnisse auf eine Low-Turnover-Osteoporose der in diese Arbeit einbezogenen spät-postmenopausalen Frauen sowie älteren Männer schließen. Die demnach bei beiden Geschlechtern vorliegende Knochenstoffwechselsituation der senilen Osteoporose oder zumindest des altersabhängigen Knochenverlustes, stellt somit eine Erklärung für die nicht vorhandenen Unterschiede der IL-mRNA-Expressionen der Knochenproben von Frauen und Männern dar. In Übereinstimmung mit den erhobenen Daten stehen die Ergebnisse von Zupan und Kollegen (2012), die in einem ähnlichen Studiendesign ebenfalls keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede der Zytokine-Expressionen in Knochenproben von Patienten mit einem Mindestalter von 65 Jahren fanden.

Die Diagnose einer High- bzw. einer Low-Turnover-Osteoporose ist in der Praxis insbesondere für die Wahl der richtigen Therapie essenziell. Eine Unterscheidung und anerkannte Diagnostik dieser beiden Osteoporose-Typen ist bisher jedoch nur mittels histologischer Untersuchungen von Knochenbiopsien möglich (Mehl et al., 2002; Malluche et al., 2007). Parallel zu den molekularbiologischen Studien der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen desselben Teilprojektes morphologische Untersuchungen histologischer Schnitte der

beprobten Hüftköpfe durchgeführt. Die Befunde spiegeln, in Anlehnung an die von Mehl et al. (2002) aufgestellten Kriterien zur Beurteilung der Knochenqualität, die Rarefizierung der Trabekel eines insgesamt zellarmen Hartgewebes – und somit einer Low-Turnover-Knochenstoffwechselsituation – wider (Abb. 22).

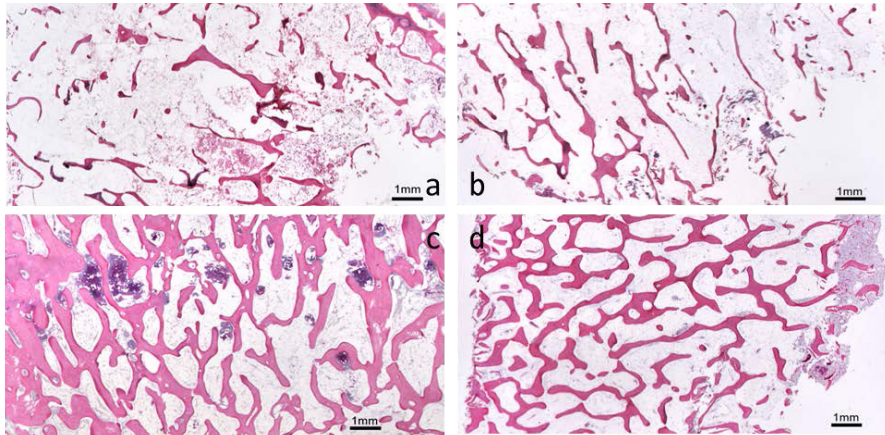


Abbildung 22: Repräsentative Histologien der resezierten Hüftkopfspongiosa (a - d);
 (a, b) Rarefizierung der Knochenbälkchen nach Fragilitätsfrakturen des Schenkelhalses (Frakturgruppe).
 (c, d) Repräsentative Spongiosa-Verhältnisse nach Resektion des Hüftkopfes im Zuge von Coxarthrosen (Coxarthrosegruppe).
 (a - d) Hämatoxylin-Eosin-Färbung Paraffin-eingebetteter Proben.

Bei Betrachtung der mittleren Expressionswerte wiesen die weiblichen Patienten trotz fehlender Geschlechtssignifikanz leicht höhere Konzentrationen der IL 1 und 6 im Vergleich zu den Männern auf. Diese beiden pro-inflammatorischen IL induzieren unter Östrogendefizienz, sowohl direkt, als auch über die Stimulation weiterer lokaler Mediatoren indirekt, sehr potent die Knochenresorption. Entsprechend erhöhte Expressionsprofile sowie ein damit korrelierter Knochenverlust wurden unter Östrogenmangel in der Vergangenheit umfassend durch zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Tiermodelle (Jilka et al., 1992; Poli et al., 1994; Kimble et al., 1994; Kitazawa et al., 1994; Kon et al., 2001) sowie humane Zellkulturstudien (Bismar et al., 1995; Zheng et al., 1997) und diverse Serumkonzentrationsmessungen (Scheidt-Nave et al., 2001; Charatcharoenwitthaya et al., 2007) belegt. Untersuchungen der lokalen Expressionsmuster dieser potenten Knochenresorptionsstimulatoren wurden zwar durch einige wenige Arbeitsgruppen an Knochenmaterial beider Geschlechter (Tsangari et al., 2004; Abdallah et al., 2005) sowie von

Pino et al. (2010) an Flüssigkeitsüberständen von Knochenmarksaspiraten durchgeführt, doch geschlechtsvergleichende Ergebnisse sind rar.

Die in der vorliegenden Untersuchung festgestellten leicht erhöhten IL-Expressionen der weiblichen Probanden, lassen sich möglicherweise durch die individuell unterschiedlichen Expressionsmuster der Patienten erklären. Entsprechend sind diskontinuierliche sowie altersabhängige Zytokin-Veränderungen beschrieben (Pacifici et al., 1993; Bismar et al., 1995; Scheidt-Nave et al., 2001; Pfeilschifter et al., 2002).

IL 10 hingegen zeigte in der Spongiosa männlicher Patienten geringgradig höhere mRNA-Level im Verhältnis zu dem Niveau der IL 10 mRNA der Spongiosa von Frauen. Diese können als kompensatorische Antwort auf die aus dem Gleichgewicht laufenden Knochenstoffwechselfvorgänge der sich teilweise zum Entnahmezeitpunkt noch in einer jüngeren Phase des Knochenverlustes befindlichen männlichen Patienten angesehen werden. Diesbezüglich ist anzumerken, dass der Altersdurchschnitt der männlichen Probanden bei 70,6 (\pm 8,4) Jahren lag. Männer erleiden im Durchschnitt *zehn* Jahre später als Frauen eine osteoporotisch bedingte Fraktur, was eine langsamere und somit später auftretende Manifestation der Erkrankung verdeutlicht. Dementsprechend empfiehlt die *International Society for Clinical Densitometry* (ISCD) eine Knochendichtmessung bei Männern, die keine zusätzlichen Risikofaktoren aufweisen, erst ab dem 70ten Lebensjahr, während die Messungen bei Frauen bereits ab einem Alter von 65 Jahren durchgeführt werden sollten (Adler, 2006). Als anti-inflammatorisches IL unterdrückt IL 10 die Sekretion entzündungsfördernder Zytokine, wie IL 1, 6, TNF α und M-CSF durch verschiedene Entzündungszellen (Fiorentino et al., 1991a und b; Waal Malefyt et al., 1991; Clarke et al., 1998). Außerdem weist es durch Hemmung der Osteoklastendifferenzierung direkte (Xu et al., 1995; Hong et al., 2000; Lovibond et al., 2003; Mohamed et al., 2007) sowie, vermittelt durch Hochregulation der OPG- und Unterdrückung der RANKL-Synthese, indirekte (Liu et al., 2006) Osteoklasten-inhibierende Effekte auf.

5.1.2 Expression der Interleukine bei Schenkelhalsfrakturen und Coxarthrosen

Die ermittelten Daten belegen deutlich höhere Konzentrationen der IL 1, 6 und 10 bei Patienten mit einer Fraktur und stimmen mit Ergebnissen überein, die entsprechende Zytokin-Expressionsprofile in frakturierten Knochen dokumentieren (Einhorn et al., 1995; Hauser et al., 1996; Kon et al., 2001; Cho et al., 2002; Abdallah et al., 2005; Lange et al., 2010;

D'Amelio et al., 2011). Tsangari und Kollegen (2004) fanden ebenfalls erhöhte IL 6-Konzentrationen in Knochenmaterial humaner Fragilitätsfrakturen (Patientenalter > 73 Jahre), verglichen mit Knochenbiopsien von Personen ohne bekannte skelletale Beschwerden (Patientenalter > 70 Jahre). Anzumerken ist hier lediglich, dass die untersuchte Patientenpopulation relativ klein war (n = 13 je Gruppe). Analog der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verglichen Zupan et al. (2012) Zytokin-Expressionen frakturierter Knochen mit Knochenproben osteoarthrotischer Frauen und Männer mit einem Mindestalter von 66 Jahren. Auch sie zeigten deutlich erhöhte IL 1- und 6-Expressionen in der Frakturgruppe. Allerdings galt in ihrem Studiendesign eine radiologisch bestätigte Fragilitätsfraktur als klinische Diagnose einer Osteoporose, sodass die Autoren in ihren Ergebnissen eine osteoporotisch bedingte Steigerung der IL-Synthese sahen, jedoch keinen frakturbedingten Zusammenhang in Erwägung zogen. Zu erklären sind die erhöhten IL-Expressionen *post fracturam* jedoch vor allem durch die initial nach einer Fraktur initiierte Entzündungsreaktion. Diese ist durch die Infiltration zahlreicher Entzündungszellen (Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten) mit entsprechender Freisetzung ihrer pro- sowie anti-inflammatorischen Zytokine gekennzeichnet und stellt die erste Phase der Frakturheilung dar (Schindeler et al., 2008; Pape et al., 2010; Kolar et al., 2011). Hiermit übereinstimmend konnten Hauser et al. (1996) deutlich höhere Konzentrationen des IL 10 in humanen Frakturhämatomen finden. In derselben Studie wurde gezeigt, dass gemessene Serumtitere nicht die lokalen Verhältnisse widerspiegeln und diskontinuierlich zu sein scheinen. Auch in verschiedenen Mausmodellen wurden erhöhte IL-Level (IL 1 und 6) in durch eine Fraktur gekennzeichneten Knochen nachgewiesen (Kon et al., 2001; Cho et al., 2002; Lange et al., 2010).

Sicherlich ist eine osteoporotisch bedingte Steigerung der lokalen IL-Produktion nicht eindeutig auszuschließen. Gilt doch ein Anstieg, insbesondere pro- (aber auch anti-) inflammatorischer Zytokine, als charakteristisch für das molekulare Bild der Osteoporose unter Östrogendefizienz (Horowitz, 1993; Manolagas, 2000; Pfeilschifter et al., 2002; Zupan et al., 2013). In mehreren Untersuchungen der Zytokin-Serum-Konzentrationen älterer Menschen wurde dementsprechend der Zusammenhang erhöhter inflammatorischer Knochenmarker mit der Inzidenz des Frakturrisikos untersucht. Die meisten veröffentlichten Daten stimmen überein und beschreiben erhöhte Blutspiegel von inflammatorischen Markern als prognostizierend für einen Knochenverlust sowie ein erhöhtes Frakturrisiko (Scheidt-Nave et al., 2001; Cauley et al., 2007; Ding et al., 2008; Barnour et al., 2012). Diese Resultate

belegen den Zusammenhang bereits *prae fractura* veränderter Konzentrationen von in die Pathogenese der Osteoporose involvierten Zytokinen und einem osteoporotischen Knochenverlust sowie einem erhöhten Frakturrisiko. Daher sind die vielfach beschriebenen im Alter unter Östrogendefizienz auftretenden Veränderungen des Knochenstoffwechsels und die damit einhergehenden Abweichungen der Zytokin-Expressionen auch bei den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht zu unterschätzen. Insbesondere, da sie für die Destruktion der Knochenstruktur und somit für den Verlust von Knochenmasse und -dichte verantwortlich sind (Pfeilschifter et al., 2002; Zupan et al., 2013). Jedoch ist auch hier auf die Differenzierung der unterschiedlichen Formen des Knochenverlustes (High- bzw. Low-Turnovers) hinzuweisen. So werden Unterschiede der Mechanismen und molekularen Mediatoren der Östrogen-vermittelten Effekte auf die Zytokin-Expression sowie des früh-postmenopausalen beschleunigten und des späten langsamen Knochenverlustes der Frau sowie dem entsprechenden kontinuierlichen Knochenschwund des Mannes angenommen (vgl. Kap. 5.1.1). Demnach scheinen sich die Expressionsprofile der involvierten knochenmodulierenden Zytokine, so auch der IL 1 und 6, zum einen individuell diskontinuierlich (zyklisch bzw. biphasisch) und zum anderen mit fortschreitendem Alter zu verändern (Pacifci et al., 1993; Bismar et al., 1995; Scheidt-Nave et al., 2001; Pfeilschifter et al., 2002). Entsprechend der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheint somit der von einem Low-Turnover-Knochenverlust gekennzeichnete Knochen eher unauffällige Expressionsmuster aufzuweisen, während ein Frakturgeschehen einen signifikanten Anstieg bestimmter Zytokine (wie der hier nachgewiesenen IL 1, 6 und 10) initiiert.

Zur Beurteilung der gewonnenen Daten ist darüber hinaus zu berücksichtigen, dass im Rahmen der vorliegenden Untersuchung die pro-inflammatorischen IL 1 und 6 hochsignifikant mit Frakturen, jedoch *nicht* mit hohen RANKL/OPG-Quotienten korrelierten (vgl. Kap. 5.1.3). Letztere gelten als Hinweis auf eine gesteigerte Osteoklastengengese mit vermehrter Knochenresorption. Zusätzlich war auch IL 10, entsprechend seiner bekannten anti-inflammatorischen Funktion *post fracturam* (Hauser et al., 1996) signifikant in Proben der Frakturgruppe hochreguliert. Somit scheint ein ausschließlich osteoporotisch bedingter Anstieg der gemessenen lokalen IL-Expressionen weniger wahrscheinlich als eine direkte Kausalität des Frakturgeschehens. Um die Expressionsprofile kausal beurteilen zu können, hätte osteoporotisches, nicht durch Frakturen betroffenes Gewebe in die Untersuchungen implementiert werden müssen. Dieses stand jedoch aus ethischen Gründen nicht zur Verfügung (vgl. Kap. 3.1.1). Dennoch geben die ermittelten Ergebnisse im Sinne der

eingangs formulierten Zielsetzung der Arbeit einen wertvollen Einblick in das Knochenmikromilieu des frakturierten und von Knochenverlust gekennzeichneten Knochens älterer Menschen.

5.1.3 Korrelation der Interleukine zu RANKL/OPG

Die Interaktionen der drei Proteine des RANK/RANKL/OPG-Systems sind essenzielle Regulationsmechanismen der Osteoklastengnese und Knochenresorption. Das Verhältnis des Osteoklasten-Aktivators RANKL zu seinem löslichen *decoy* Rezeptor OPG gilt als Indikator für das Ausmaß des systemischen Knochenverlustes. Daher gilt ein Ungleichgewicht des RANKL/OPG-Verhältnisses zu Gunsten von RANKL, als ein Hinweis auf eine gesteigerte Osteoklastengnese und somit auf eine vermehrte Knochenresorption (Wei et al., 2005; Boyce und Xing, 2007; Weitzmann, 2013).

Bei 15 der untersuchten 39 Patienten resultierten niedrige RANKL/OPG-Werte (≤ 1) aus ausgeglichenen oder erhöhten OPG-Expressionen im Verhältnis zu RANKL. Daher wurde in diesen Fällen auf einen ausgewogenen Knochenstoffwechsel geschlossen. Die restlichen 24 Probanden zeigten, auf Grund des vermehrten Vorhandenseins von RANKL bei niedriger OPG-Konzentration, RANKL/OPG-Werte von > 1 . Es wurde daher von einer potenziell veränderten Knochenumbaurate mit erhöhter Knochenresorption ausgegangen. Auf Grund geschlechtsunspezifischer, niedriger IL-Expressionen sowie des Alters der Patientenpopulation konnte auf eine Low-Turnover-Osteoporose dieser Patienten geschlossen werden. Diese Annahme fand durch morphologische Untersuchungen histologischer Schnitte der beprobten Hüftköpfe ihre Bestätigung (Abb. 22).

IL 10 war mit RANKL/OPG positiv korreliert, d.h. Patienten mit einer höheren RANKL/OPG-Ratio wiesen höhere IL 10-Werte im Vergleich zu Personen mit niedrigerem RANKL/OPG auf. Im Rahmen dieses verschobenen RANKL/OPG-Gleichgewichtes erscheint die positiv korrelierte Synthese des anti-inflammatorischen IL 10 als ein kompensatorischer Effekt, um die Osteoklasten-stimulierenden RANKL-Effekte abzufangen bzw. durch Reduktion der RANKL-Synthese abzumildern (Xu et al., 1995; Hong et al., 2000; Lovibond et al., 2003; Liu et al., 2006; Mohamed et al., 2007). Die statistisch auffällige, jedoch nicht signifikante Expression des inflammatorischen IL 6 im Zusammenhang mit einem hohen RANKL/OPG-Quotienten, könnte ein weiteres Indiz für die gesteigerten Knochenumbauraten

der betroffenen Patienten sein. So gilt IL 6 als ein direkter Aktivator der Osteoklastengnese (Pacifci et al., 1996; Lorenzo et al., 2008) und wurde u.a. von Palmqvist et al. (2002) als ein potenter Stimulator der RANKL-Synthese beschrieben.

Darauf hinzuweisen ist, dass erhöhte RANKL/OPG-Quotienten auch in Untersuchungen gefunden wurden, die einen Zusammenhang der erhöhten Ratio mit einem Frakturgeschehen begründen (Kon et al., 2001; Tsangari et al., 2004; Abdallah et al., 2005). Entsprechend beschreiben D'Amelio et al. in einer jüngeren Studie (2011) einen erhöhten RANKL/OPG-Quotient sowie erhöhte Level Osteoklasten-stimulierender Zytokine (u.a. M-CSF, RANKL) bei Fragilitätsfrakturen. Da der „Knochenresorptions-Indikator“ (RANKL/OPG > 1) in den vorliegenden Ergebnissen der einfaktoriellen nichtparametrischen Analysen weder eine signifikante Korrelation zum Frakturgeschehen noch zu den pro-inflammatorischen IL 1 und 6 aufwies, diese jedoch hochsignifikant mit dem Frakturgeschehen korreliert waren, ist ein frakturbedingter RANKL/OPG-Anstieg allerdings eher auszuschließen.

5.2 Diskussion der Ergebnisse der explorativen mehrfaktoriellen Varianzanalysen

Die mehrfaktoriellen Varianzanalysen wurden, wie bereits dargelegt, auf Grund fehlender Normalverteilung als *explorative* Datenerhebungen durchgeführt. Ziel dabei war es, in vorangegangenen Analysen möglicherweise nicht erfasste Zusammenhänge der erhobenen Daten zu erkennen. Auch wenn sich hierdurch keine repräsentativen Ergebnisse generieren ließen, untermauern die explorativen Daten die Ergebnisse der einfaktoriellen nichtparametrischen Analysen. Darüber hinaus konnten weitere Korrelationen der beobachteten Daten gefunden werden.

5.2.1 Explorative zweifaktorielle Kovarianzanalyse

Bei der explorativen zweifaktoriellen Kovarianzanalyse wurden die Ergebnisse der einfaktoriellen nichtparametrischen Analysen bestätigt. Auch hier fanden sich in den Proben der Frakturgruppe für IL 1 sowie IL 6 hoch-signifikant und für IL 10 signifikant höhere Expressionen im Vergleich zu Patienten mit einer Coxarthrose (vgl. Kap. 5.1.2). Zusätzlich zeigte IL 1 eine positive Signifikanz mit dem Quotienten aus RANKL/OPG. Dementsprechend waren bei höheren RANKL/OPG-Werten ebenfalls höhere IL 1-

Konzentrationen nachweisbar. Zu erklären ist dieser Zusammenhang durch die bedeutende Rolle des IL 1 im Rahmen des altersbedingten Knochenverlustes. Dieses inflammatorische IL gilt als einer der potentesten Stimulatoren der Knochenresorption (Pacifici, 1996; Romas und Martin, 1997; Jilka, 1998) sowie als einer der wichtigsten Vermittler des Knochenverlustes unter Östrogenmangel (Charatcharoenwitthaya et al., 2007). Entsprechend sind hohe IL 1-mRNA-Level bei gleichzeitig hohem RANKL/OPG im Rahmen des osteoporotischen Knochenverlustes nachvollziehbar. So induziert IL 1 in Verbindung mit TNF α über eine Steigerung der RANKL- und M-CSF-Expression von Stromazellen und Osteoblasten die Osteoklastengnese (Kimble et al., 1996; Hofbauer et al., 1999b; Eghbali-Fatourehchi et al., 2003; Teitelbaum, 2004; Wei et al., 2005; D'Amelio et al., 2008). Zusätzlich sind direkte Effekte des IL 1 auf die Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung beschrieben (Jimi et al., 1999; Wei et al., 2005). Dadurch sind hohe IL 1-Werte bei einer Verschiebung der Knochenremodelierung in Richtung des vermehrten Knochenabbaus (RANKL/OPG > 1) erklärbar. Allerdings wirft dieser Zusammenhang erneut die Frage der tatsächlichen – osteoporotischen oder frakturbedingten – Kausalität auf, was im Anschluss weiter diskutiert wird.

5.2.2 Explorative dreifaktorielle Varianzanalyse

In Ergänzung zu der mittels explorativer zweifaktorieller Kovarianzanalyse dargelegten positiven Korrelation des IL 1 zu RANKL/OPG, wurde durch die explorative dreifaktorielle Varianzanalyse eine positive Signifikanz des IL 6 mit RANKL/OPG gefunden. Dieser Zusammenhang untermauert die statistisch auffällige Korrelation von IL 6 mit RANKL/OPG der einfaktoriellen Analyse. Entsprechend seiner bedeutenden Osteoklasten-stimulierenden (Pacifici et al., 1996; Lorenzo et al., 2008) und die RANKL-Synthese induzierenden (Palmqvist et al., 2002) Wirkung ist eine IL 6-Hochregulation – analog IL 1 – im Rahmen eines veränderten Knochenstoffwechsels mit vermehrter Knochenresorption (RANKL/OPG > 1) erklärbar. Allerdings werfen diese Zusammenhänge erneut die Frage der tatsächlichen – osteoporotischen oder frakturbedingten – Kausalität auf. Die zu IL 1 und 6 korrelierten höheren RANKL/OPG-Werte lassen sich zum einen durch die Pathogenese der (senilen) Osteoporose erklären oder zum anderen als Antwort auf die erhöhten IL 1- und IL 6-Werte *post fracturam* werten. Beide IL waren bei der Datenanalyse jedoch entsprechend der einfaktoriellen nichtparametrischen Analysen (hoch-)signifikant mit der Frakturgruppe korreliert. Daher gilt auch hier ein frakturbedingter Anstieg dieser pro-inflammatorischen IL

als wahrscheinlicher. Es kann demnach eher davon ausgegangen werden, dass der gefundene Zusammenhang ein erhöhtes Frakturrisiko bei verändertem Knochenstoffwechsel mit gesteigerter Knochenresorption bestätigt (DVO-Leitlinie Osteoporose, 2009). Somit begünstigt ein Ungleichgewicht von RANKL und OPG zu Gunsten des vermehrten Knochenabbaus ein Frakturgeschehen (Wei et al., 2005; Boyce und Xing, 2007; Weitzmann, 2013). Entsprechend wurde im Rahmen der explorativen dreifaktoriellen Varianzanalyse in der Frakturgruppe eine größere Personenanzahl mit hoher RANKL/OPG-Ratio (> 1) als in der Coxarthrosegruppe gefunden (Abb. 23). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit ähnlichen Studien, die ebenfalls erhöhte RANKL/OPG-Verhältnisse in von Knochenverlust gekennzeichneten fragilen Knochen fanden (Abdallah et al., 2005; D'Amelio et al., 2011). Das Frakturgeschehen wiederum hat auf Grund entzündlicher Zellinfiltrationen die Hochregulation der IL 1 und 6 zur Folge (Schindeler et al., 2008; Pape et al., 2010; Kolar et al., 2011).

Unter Einbeziehung aller Gruppierungsfaktoren [Geschlecht, Erkrankung (Fraktur oder Coxarthrose) und RANKL/OPG (≤ 1 bzw. > 1)] erfolgte mittels dreifaktorieller Varianzanalyse eine explorative Differenzierung der Patientengruppe (Abb. 23; IL-Expressionen: Abb. 24).

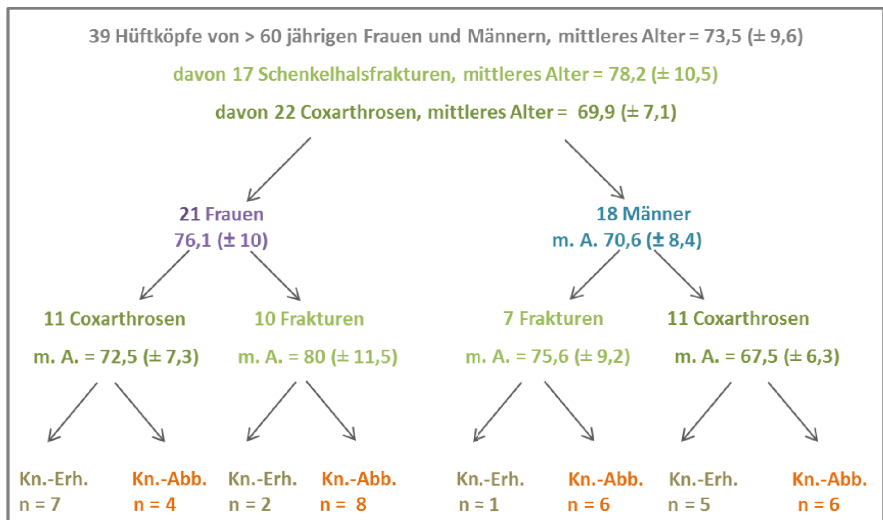


Abbildung 23: Differenzierung der Patientengruppe, Gesamtpatientengruppe (n = 39);

Kn.-Erh. = Knochen-Erhalt (RANKL/OPG ≤ 1)

Kn.-Abb. = Knochen-Abbau (RANKL/OPG > 1)

m. A. = mittleres Alter in Jahren

n = Anzahl der Patienten in der entsprechenden Gruppe

Die explorative dreifaktorielle Varianzanalyse verdeutlicht, dass lediglich drei Probanden (2 Frauen, 1 Mann) der insgesamt 17 Patienten der Frakturgruppe (10 Frauen, 7 Männer) einen präventiven bzw. ausgeglichenen Knochenstoffwechsel aufwiesen ($RANKL/OPG \leq 1$). Die Mehrzahl der von einer Fraktur betroffenen Personen (14 aus 17) zeigte auf Grund ihrer hohen $RANKL/OPG$ -Ratio von > 1 den Hinweis auf einen sich im Stadium des Knochenverlustes befindlichen skeletalen Stoffwechsel. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Kenntnissen der Osteoporose-Forschung, gilt doch ein Ungleichgewicht des $RANK/RANKL/OPG$ -Systems als Indikator des osteoporotischen Knochenverlustes und somit des fragilen Knochens (Wei et al., 2005; Boyce und Xing, 2007; Weitzmann, 2013). Entsprechend sehen einige Autoren durch Bagatelltraumen verursachte Frakturen älterer Personen als *alleiniges* Indiz einer gesicherten Osteoporose (Tsangari et al., 2004; Zupan et al., 2012). Wie bereits diskutiert, ist ein frakturbedingter Anstieg der $RANKL/OPG$ -Ratio jedoch nicht sicher auszuschließen (vgl. Kap. 5.1.3). Auf Grund der fehlenden Wechselwirkung von $RANKL/OPG$ mit dem Gruppierungsfaktor „Erkrankung“ scheint allerdings in Bezug auf diese Knochenmediatoren und im Unterschied zu den gemessenen IL, ein osteoporotisch bedingter Zusammenhang wahrscheinlicher (vgl. Kap. 5.1.3). Die Beurteilung der Daten der dreifaktoriellen Varianzanalyse bekräftigen somit die Ergebnisse der einfaktoriellen Analysen.

Bei den Coxarthrosen wiesen lediglich 6 von 11 männlichen Knochenproben einen entsprechenden $RANKL/OPG$ -Quotienten von > 1 auf, während es bei den Frauen weniger als die Hälfte (4 von 11) waren. In verschiedenen Publikationen werden altersabhängige (Yano et al., 1999; Khosla et al., 2002a; Ueland et al., 2003) sowie kompensatorisch erhöhte OPG -Level bei osteoporotischen Patienten beschrieben (Yano et al., 1999; Khosla et al., 2002a; Ueland et al., 2003; Eghbali-Fatoureechi et al., 2003; D'Amelio et al., 2011). Diese Effekte sollten bei der Beurteilung der Daten, insbesondere der Coxarthrosepatienten, in Erwägung gezogen werden. Außerdem ist an dieser Stelle auf das mittlere Alter der einzelnen „Untergruppen“ zu verweisen (Abb. 23). Sowohl bei den Frauen als auch den Männern liegt das mittlere Alter der Coxarthrosegruppe deutlich unter dem der Frakturpatienten. Dieses jüngere Durchschnittsalter der Probanden mit einer Coxarthrose erklärt möglicherweise die größere Patientenzahl der Personen mit höheren OPG -Konzentrationen im Verhältnis zu $RANKL$. So scheinen diese „kompensatorischen“ Expressionsprofile des Knochenstoffwechsels mit zunehmendem Alter nicht mehr adäquat zu funktionieren. Entsprechend sind erhöhte Apoptose-Raten der OPG -produzierenden Osteblasten, die mit fortschreitendem Alter zunehmen, beschrieben (Jilka et al., 1999; Chan und Duque, 2002).

Die altersabhängige Beobachtung der geringeren Frakturzahlen in „jüngeren“ Jahren auf Grund eines potenziell präventiven Knochenstoffwechsels ($RANKL/OPG \leq 1$) stimmen auch mit DVO-Angaben überein. Demnach nimmt das Frakturrisiko im Alter exponentiell zu und verdoppelt sich mit jeder Dekade des Lebensalters (Dachverband Osteologie e.V., 2009).

5.3 Diskussion der Absenz der IL 4 und 13

In dem gesamten untersuchten Probenmaterial waren keine detektierbaren mRNA-Mengen der IL 4 und 13 messbar. In die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden diese anti-inflammatorischen Zytokine auf Grund ihres fusionsfördernden Effektes auf Makrophagen einbezogen. Ihrer Beteiligung an Fremdkörperreaktionen und der damit verbundenen Formation von *foreign body giant cells* (FBGC) kommt im Rahmen der Implantation von Biomaterialien eine große Bedeutung zu (Anderson et al., 2008). Dennoch zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass eine potenziell osteoporotisch- bzw. frakturbedingte Veränderung der lokalen Zytokinmuster zwar auf die IL 1, 6 und 10, jedoch nicht auf die IL 4 und 13 zutrifft.

IL 4 und 13 werden v.a. von Th2-Lymphozyten und Mastzellen produziert. Ihre hemmende Wirkung auf Osteoklasten wird u.a. durch eine gesteigerte OPG-Produktion sowie eine Reduktion der RANKL- und RANK-Synthese hervorgerufen (Palmqvist et al., 2006). Wie beschrieben (vgl. Kap. 2.5), induzieren IL 4 und 13 darüber hinaus im Rahmen von Fremdkörperreaktionen die Fusion einkerniger Makrophagen zu Biomaterialoberflächen-assoziierten mehrkernigen FBGC. Dabei werden sie in der akuten Entzündungsphase von Mastzellen und im späteren chronischen Verlauf von aktivierten Lymphozyten freigesetzt (Anderson et al., 2008).

Entsprechend ihrer Synthese-Zellen liegen in der zellulären Komposition des untersuchten Hartgewebes die mittels RT-qPCR nicht messbaren IL 4- und 13-Konzentrationen begründet. So sind unter (spät-)arthrotischen Bedingungen, die dem Stadium der untersuchten Coxarthrosepatienten entsprechen, lokal nur wenige Entzündungszellen zu finden (Melchiorri et al., 1999; Benito et al., 1999). Außerdem gelten *post fracturam* insbesondere Makrophagen und neutrophile Granulozyten (jedoch keine Mastzellen) und erst im weiteren Verlauf Lymphozyten als charakteristische Zellen (Schindeler et al., 2008; Pape et al., 2010; Kolar et al., 2011). Vor diesem Hintergrund kann die Absenz der IL 4 und 13 in Coxarthrose- und

Frakturgruppe durch das lokale Zellmilieu begründet werden. Dass sowohl IL 4 als auch IL 13 keinen essenziellen Einfluss auf die Frakturheilung besitzen, wurde auch in einer Untersuchung an IL 4/IL 13-knockout Mäusen belegt. Entsprechend zeigten die Tiere keine Veränderungen des Heilungsprozesses ihrer Frakturen im Vergleich zu Mäusen des Wildtyps (Silfverswärd et al., 2008). Eine ebenfalls die Absenz des IL 4 belegende Veröffentlichung untersuchte Weichteilgewebe von humanen Frakturhämatomen u.a. auf dieses anti-inflammatorische IL. IL 4 war hier in den ersten Tagen *post fracturam* ebenfalls nicht exprimiert und wurde erst ab dem fünften Tag nach dem Frakturgeschehen in drei von 22 Patienten gemessen (Hauser et al., 1996). Diese Ergebnisse untermauern die Feststellung der nicht detektierbaren IL 4- und 13-mRNA-Konzentrationen in den untersuchten Knochenproben.

5.4 Diskussion der computertomographischen Darstellungen und Osteodensitometrie

Eine reduzierte Knochendichte gilt als Indikator für ein erhöhtes osteoporotisches Frakturrisiko. Um zusätzlich Informationen über die Knochenmaterial- und geometrischen Eigenschaften des Knochens zu erhalten, haben computertomographische Darstellungen mittels CT an Bedeutung gewonnen (Bousson et al., 2000; Schreiber et al., 2011). So wurde auch bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten CT-Scans ersichtlich, wie fokale porotischen, durch eine deutlich verringerte Mikroarchitektur charakterisierten Stellen innerhalb betroffener Femurköpfe lokalisiert sind (Abb. 20). Diese Erkenntnis ist in Bezug auf weitere molekularbiologische Untersuchungen zu berücksichtigen, da innerhalb desselben Knochens lokal unterschiedliche Expressionsprofile möglich erscheinen.

Die Ergebnisswerte der Osteodensitometrie von Fraktur- und Coxarthrosepatienten ergaben niedrigere mittlere HU-Werte in der Frakturgruppe [287,4 HU (+/- 148,15)] im Vergleich zu den Coxarthrosepatienten [489,71 HU (+/-118,26)]. Gesunder Knochen weist typischerweise Werte von mindestens + 400 HU auf. Ein Wert unter 400 HU gilt daher als porotisch und bestätigt somit eine Abnahme der Knochendichte des untersuchten frakturierten Hartgewebes (Celenk und Celenk, 2012). Diese Daten stehen somit im Einklang mit den molekularbiologischen und histologischen Ergebnissen und bestätigen einen osteoporotisch bedingten Knochenverlust des von Fragilitätsfrakturen betroffenen untersuchten Knochens.

Abschließend ist zu konstatieren, dass zwar keine klinischen Daten über den Knochenstatus des untersuchten Patientenklientels vorlagen, dennoch die Fragilität des durch Fraktur gekennzeichneten Knochens auf histologischer Ebene und mittels CT dokumentiert werden konnte. So zeigen die ermittelten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die pro-inflammatorischen IL 1 und 6 sowie das anti-inflammatorische IL 10 im Mikromilieu des frakturierten und von Knochenverlust gekennzeichneten Knochens vermehrt exprimiert sind. Den anti-inflammatorischen IL 4 und 13 hingegen konnte in entsprechendem Knochen keine Relevanz nachgewiesen werden.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Expressionen verschiedener lokaler Faktoren des Knochenmikromilieus zu evaluieren, um differenzierte Informationen über die Zytokin- und Stoffwechselsituation des durch Fragilitätsfrakturen charakterisierten Knochens zu erhalten. Hierzu wurde humane Hüftkopfspongiosa mittels RealTime-PCR auf die Expressionsprofile ausgewählter Zytokine und Mediatoren des Knochenstoffwechsels untersucht. Die insgesamt 39 Spongiosaproben entstammten Frauen (n = 21) und Männern (n = 18) mit einem Lebensalter von mindestens 60 Jahren, die sich auf Grund einer Schenkelhalsfraktur oder einer Coxarthrose einer Resektion des Oberschenkelkopfes unterziehen mussten. Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen des Sonderforschungsbereich/Transregio 79 „*Werkstoffe für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen*“, Teilprojekt B2 „*Charakterisierung des Kallus im systemisch erkrankten Knochen*“ am Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Ziel dieses interdisziplinären Forschungsprojektes ist es, neue Ätiologie-adaptierte Knochenersatzmaterialien und Implantatwerkstoffe für den systemisch erkrankten Knochen des Menschen zu generieren (Sonderforschungsbereich/Transregio 79, 2010-2014).

Das Erkenntnisinteresse der vorliegenden Arbeit lag in der Ermittlung von Expressionsprofilen der pro-inflammatorischen und die Osteoklastengnese stimulierenden Interleukine 1 und 6, der anti-inflammatorischen knochenprotektiven Interleukine 4, 10 und 13 sowie der den Knochenstoffwechsel regulierenden Faktoren RANKL und OPG. Die aus den Proben extrahierte mRNA wurde mittels RT-qPCR quantifiziert, um die Expressionen der genannten Zytokine und Mediatoren zu bestimmen.

Die Ergebnisse legen auf Grund geschlechtsunspezifischer, niedriger Expressionsprofile und dem Durchschnittsalter der Patientenpopulation eine Low-Turnover-Osteoporose bei den untersuchten Patienten nahe. Diese Annahme fand durch morphologische Untersuchungen histologischer Schnitte der beprobten Hüftköpfe ihre Bestätigung. Des Weiteren weisen die signifikant höheren IL-Expressionen (IL 1, 6 und 10) in der Frakturgruppe, entsprechend dem Ablauf einer Frakturheilung, auf einen bedeutenden Einfluss des Frakturgeschehens im Rahmen der Hochregulation dieser Zytokine hin. Im Gegensatz dazu scheint die Bedeutung der IL 4 und 13 im skeletalen Mikromilieu eine untergeordnete Rolle zu spielen. So waren diese anti-inflammatorischen IL, die in das Studiendesign auf Grund ihrer Beteiligung an

Fremdkörperreaktionen und der damit verbundenen Fusion einkerniger Makrophagen zu mehrkernigen Biomaterial-adhären *foreign body giant cells* aufgenommen wurden, in keiner der untersuchten Knochenproben in detektierbaren mRNA-Mengen exprimiert. Um einen Hinweis auf die Knochenstoffwechselsituation der Patienten zu erhalten, wurde aus den Expressionswerten von RANKL und OPG ihre Ratio (RANKL/OPG) ermittelt und dadurch zwischen ausgewogenen ($RANKL/OPG \leq 1$, $n = 15$) und unausgeglichenen ($RANKL/OPG > 1$, $n = 24$) Knochenumbauraten unterschieden. Auffällig hierbei war insbesondere, dass lediglich 3 der 17 Patienten mit einer Fraktur einen ausgeglichenen Knochenstatus und somit die Mehrzahl der Frakturpatienten einen potenziellen Status des Knochenverlustes aufwiesen. Da RANKL/OPG im Rahmen der einfaktoriellen nichtparametrischen Datenanalyse keine Korrelation zu den – hoch-signifikant mit einem Frakturgeschehen korrelierten – pro-inflammatorischen IL 1 und 6 zeigte, konnte eine rein frakturbedingte Kausalität hoher RANKL/OPG-Quotienten (> 1) ausgeschlossen werden. Dementsprechend ergab die explorative dreifaktorielle Varianzanalyse keine Wechselwirkung von RANKL/OPG mit der Frakturgruppe. Entsprechend bekannter Mechanismen der Knochenheilung des fragilen Knochens, waren die pro-inflammatorischen IL 1 und 6 dennoch im Rahmen explorativer mehrfaktorieller Varianzanalysen positiv signifikant und IL 6 zusätzlich in der einfaktoriellen nichtparametrischen Analyse statistisch auffällig mit RANKL/OPG korreliert. Auch zeigte das anti-inflammatorische IL 10 bei der einfaktoriellen nichtparametrischen Analyse, im Sinne eines möglichen kompensatorischen Effektes, eine positive Signifikanz mit RANKL/OPG.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass die pro-inflammatorischen IL 1 und 6 sowie das anti-inflammatorische IL 10 im Mikromilieu des frakturierten und von Knochenverlust gekennzeichneten Knochens älterer Menschen vermehrt exprimiert sind, während IL 4 und 13 *prae implantationem* keine relevante Rolle spielen. Da die ermittelten Expressionsprofile der Interleukine 1, 6 und 10 prinzipiell mit den während der Heilung im gesunden Knochen dokumentierten mRNA-Mustern übereinstimmen, ist von einer konservierten Heilungskaskade im fragilen spongiösen Knochen auszugehen. Für die Entwicklung neuer Knochenersatzmaterialien und Implantatwerkstoffe für den systemisch erkrankten und von Fragilitätsfrakturen betroffenen Knochen sind genaue Kenntnisse über die lokale Zytokin- und Stoffwechselsituation des Zielgewebes von großer Bedeutung. Hierzu leisten die Ergebnisse dieser Arbeit einen wichtigen Beitrag.

7 Summary

In the present study the expression of specific cytokines and important regulatory molecules of trabecular bone of patients with a fracture of the femoral neck and with osteoarthritis (used as a control) has been investigated by means of quantitative real time PCR. 39 bone samples were taken from femoral heads from men (n = 18) and women (n = 21) with a minimum age of sixty years subjected to hip-joint replacement surgery for femoral neck replacement (n = 17) or because of osteoarthritis (n = 22). mRNA was extracted from the bone samples and the expression of the pro-inflammatory interleukins 1 and 6, the anti-inflammatory interleukins 4, 10 and 13, and of RANKL and OPG, both of which are important molecules associated with bone remodeling was evaluated. The investigations were performed in the course of the Collaborative Research Center TRR 79 funded by DFG „Materials for tissue regeneration of systemically altered bone”, Project B2 „Characterization of callus tissue within systemically altered bone “ at the Institute of Veterinary-Anatomy, -Histology und -Embryology of the Justus-Liebig-University, Giessen. The aim of the research project is the generation of etiology-adapted bone substitutes and implants for systemically altered human bone.

The results of the present study suggest due to low, gender-unrelated expression-profiles as well as to the mean age of the study group, a low-turnover osteoporosis of the patients suffering a femoral fracture. This was confirmed by histological analyses of bone samples and by CT. The expression of IL 1, 6 and 10 was significantly increased in the fracture group compared to osteoarthritis-patients documenting a cytokine pattern within fractured bone that refer to conserved bone healing following fragility fracture. In contrast IL 4 and 13 appear to play a minor role in the fractured bone, because the mRNA of both anti-inflammatory interleukins was not detectable. These interleukins were included in this study due to their capacity to stimulate formation of biomaterial-adherent foreign body giant cells after implantation. In order to get information about the patients' bone metabolism we calculated the ratio of RANKL and OPG (RANKL/OPG). Based upon this calculation it was possible to differentiate between balanced (RANKL/OPG ≤ 1 , n = 15) and imbalanced (RANKL/OPG > 1 , n = 24) bone status. Only 3 fracture-patients revealed a balanced ratio of RANKL and OPG (3 out of 17), whereas the majority showed a ratio greater than 1 referring to a stage of bone loss. The non-parametrical single factor data analysis showed no significant correlation of the RANKL/OPG ratio with the pro- inflammatory IL 1 and 6 which were significantly elevated in fractured bone samples. Therefore, it can be assumed that a high RANKL/OPG ratio (> 1)

was not exclusively caused by the fracture event. Accordingly, the exploratory three-factor analysis of variance showed no correlation between the RANKL/OPG ratio and the fractured bone. It could be further shown that increasing levels of IL 1 and 6 were significantly correlated with the RANKL/OPG ratio according to the exploratory multivariate analysis of variance. In addition, IL 6 was markedly, but not significantly correlated with the RANKL/OPG ratio according to the non-parametric single factor analysis. The non-parametric single factor analysis revealed also a significant correlation of IL 10 expression with the RANKL/OPG ratio which can be regarded as a compensatory effect.

In sum, the present study demonstrates increased expression of the pro-inflammatory interleukins 1 and 6 and of the anti-inflammatory IL 10 within fractured bone referring to a well conserved bone healing cascade following fragility fracture. However, IL 4 and 13 were not detectable. An important prerequisite for the generation of materials with a high degree of biocompatibility is the knowledge about cells and soluble factors predominating within the microenvironment of the tissue. Therefore, the present results provide the basis for generating these materials especially of those designated for the systemically altered bone.

8 Literaturverzeichnis

- Abdallah, B. M.; Stilgren, L. S.; Nissen, N.; Kassem, M.; Jørgensen, H. R. I.; Abrahamsen, B. (2005):** Increased RANKL/OPG mRNA ratio in iliac bone biopsies from women with hip fractures. In: *Calcif. Tissue Int.* 76 (2), S. 90–97.
- Adler, R. A. (2006):** Epidemiology and pathophysiology of osteoporosis in men. In: *Curr Osteoporos Rep* 4 (3), S.110–115.
- Al-Rasheed, A.; Scheerens, H.; Rennick, D. M.; Fletcher, H. M.; Tatakis, D. N. (2003):** Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10. In: *J. Dent. Res.* 82 (8), S. 632–635.
- Anderson, J. M.; Rodriguez, A.; Chang, D. T. (2008):** Foreign body reaction to biomaterials. In: *Semin. Immunol.* 20 (2), S. 86–100.
- Arai, F.; Miyamoto, T.; Ohneda, O.; Inada, T.; Sudo, T.; Brasel, K. et al. (1999):** Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. In: *J. Exp. Med.* 190 (12), S. 1741–1754.
- Baltimore, D. (1970):** RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. In: *Nature* (226), S. 1209–1211.
- Barbour, K. E.; Boudreau, R.; Danielson, M. E.; Youk, A. O.; Wactawski-Wende, J.; Greep, N. C. et al. (2012):** Inflammatory markers and the risk of hip fracture: the Women's Health Initiative. In: *J. Bone Miner. Res.* 27 (5), S. 1167–1176.
- Baron R., Neff L. Tran Van P.; Nefussi, J.-R and Vignery A. (1986):** Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. In: *Am. J. Pathol.* (122), S. 363–378.
- Benito, M. J.; Veale, D. J.; FitzGerald, O.; van den Berg, W. B.; Bresnihan, B. (2005):** Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. In: *Ann. Rheum. Dis.* 64 (9), S. 1263–1267.
- Bismar, H.; Diel, I.; Ziegler, R.; Pfeilschifter, J. (1995):** Increased cytokine secretion by human bone marrow cells after menopause or discontinuation of estrogen replacement. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80 (11), S. 3351–3355.
- Bousson, V.; Bergot, C.; Meunier, A.; Barbot, F.; Parlier-Cuau, C.; Laval-Jeantet, A. M.; Laredo, J. D. (2000):** CT of the middiaphyseal femur: cortical bone mineral density and relation to porosity. In: *Radiology* 217 (1), S. 179–187.
- Boyce, B. F.; Xing, L. (2007):** Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. In: *Arthritis Res. Ther.* 9 (Suppl. 1): S 1, S. 1–7
- Bucay, N.; Sarosi, I.; Dunstan, C. R.; Morony, S.; Tarpley, J.; Capparelli, C. et al. (1998):** Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. In: *Genes Dev.* 12 (9), S. 1260–1268.
- Caplan, A. I. (1991):** Mesenchymal stem cells. In: *J. Orthop. Res.* 9 (5), S. 641–650.

- Cauley, J. A.; Danielson, M. E.; Boudreau, R. M.; Forrest, K. Y.; Zmuda, J. M.; Pahor, M. et al. (2007):** Inflammatory markers and incident fracture risk in older men and women: the Health Aging and Body Composition Study. In: *J. Bone Miner. Res.* 22 (7), S. 1088–1095.
- Celenk, C.; Celenk, P. (2012):** Bone density measurement using computed tomography. In: *Computed Tomography – Clinical applications*. Saba, L. (Ed.), *InTech*, S. 123–135.
- Chan, G. K.; Duque, G. (2002):** Age-related bone loss: old bone, new facts. In: *Gerontology* 48 (2), S. 62–71.
- Charatcharoenwithaya, N.; Khosla, S.; Atkinson, E. J.; McCready, L. K.; Riggs, B. L. (2007):** Effect of blockade of TNF-alpha and interleukin-1 action on bone resorption in early postmenopausal women. In: *J. Bone Miner. Res.* 22 (5), S. 724–729.
- Chen, H.-Y.; Chen, W.-Ch.; Hsu, Ch.-M.; Tsai, F.-J.; Tsai, Ch.-H. (2005):** Tumor necrosis factor alpha, CYP 17, urokinase, and interleukin 10 gene polymorphisms in postmenopausal women: correlation to bone mineral density and susceptibility to osteoporosis. In: *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 122 (1), S. 73–78.
- Chen, J.-R.; Plotkin, L. I.; Aguirre, J. I.; Han, L.; Jilka, R. L.; Kousteni, St. et al. (2005):** Transient versus sustained phosphorylation and nuclear accumulation of ERKs underlie anti-versus pro-apoptotic effects of estrogens. In: *J. Biol. Chem.* 280 (6), S. 4632–4638.
- Cho, T.-J. Gerstenfeld, L. C.; Einhorn, T. A. (2002):** Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. In: *J. Bone Miner. Res.* 17 (3), S. 513–520.
- Chomarat, P.; Banchereau, J. (1998):** Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. In: *Int. Rev. Immunol.* 17 (1-4), S. 1–52.
- Chomczynski, Piotr; Sacchi, Nicoletta (1987):** Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Analytic Biochemistry* (162), S. 156–159.
- Clarke, B. (2008):** Normal bone anatomy and physiology. In: *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 3, S. 131–139.
- Clarke, C. J.; Hales, A.; Hunt, A.; Foxwell, B. M. (1998):** IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity. In: *Eur. J. Immunol.* 28 (5), S. 1719–1726.
- Cohen, St. L.; Moore, A. M.; Ward, W. E. (2004):** Interleukin-10 knockout mouse: a model for studying bone metabolism during intestinal inflammation. In: *Inflamm. Bowel Dis.* 10 (5), S. 557–563.
- Cosman, F.; Shen, V.; Xie, F.; Seibel, M.; Ratcliffe, A.; Lindsay, R. (1993):** Estrogen protection against bone resorbing effects of parathyroid hormone infusion. Assessment by use of biochemical markers. In: *Ann. Intern. Med.* 118 (5), S. 337–343.
- Cytel Studio StatXact Vers. 9.0.0 (2010).** Statistical Software for Exact Non-parametric Inference, User Manuel. CYTEL Inc., Cambridge, MA 02139, U.S.A
- D'Amelio, P.; Isaia, G. C. (2009):** Immune System and Postmenopausal Bone Loss. In: *Clinic Rev Bone Miner Metab* 7 (4), S. 262–268.

- Dachverband Osteologie e.V. (2009):** DVO-Leitlinie 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen. Langfassung. In: *Osteologie, Schattauer* (4), S. 304–324.
- D'Amelio, P.; Roato, I.; D'Amico, L.; Veneziano, L.; Suman, E.; Sassi, F. et al. (2011):** Bone and bone marrow pro-osteoclastogenic cytokines are up-regulated in osteoporosis fragility fractures. In: *Osteoporos Int* 22 (11), S. 2869–2877.
- D'Amelio, P.; Grimaldi, A.; Di Bella, St.; Brianza, St. Z. M.; Cristofaro, M. A.; Tamone, C. et al. (2008):** Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis. In: *Bone* 43 (1), S. 92–100.
- Dinarello, Ch. A. (2009):** Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. In: *Annu. Rev. Immunol.* 27, S. 519–550.
- Ding, C.; Parameswaran, V.; Udayan, R.; Burgess, J.; Jones, G. (2008):** Circulating levels of inflammatory markers predict change in bone mineral density and resorption in older adults: a longitudinal study. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (5), S. 1952–1958.
- Dixon, W. J. (chief editor), 1993.** BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London
- Dresner-Pollak, R.; Gelb, N.; Rachmilewitz, D.; Karmeli, F.; Weinreb, M. (2004):** Interleukin 10-deficient mice develop osteopenia, decreased bone formation, and mechanical fragility of long bones. In: *Gastroenterology* 127 (3), S. 792–801.
- Duque, G.; Troen, B. R. (2008):** Understanding the mechanisms of senile osteoporosis: new facts for a major geriatric syndrome. In: *J Am Geriatr Soc* 56 (5), S. 935–941.
- Eghbali-Fatoureechi, G.; Khosla, S.; Sanyal, A.; Boyle, W. J.; Lacey, D. L.; Riggs, B. L. (2003):** Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. In: *J. Clin. Invest.* 111 (8), S. 1221–1230.
- Einhorn, T. A.; Majeska, R. J.; Rush, E. B.; Levine, P. M.; Horowitz, M. C. (1995):** The expression of cytokine activity by fracture callus. In: *J. Bone Miner. Res.* 10 (8), S. 1272–1281.
- Eriksen, E. F.; Langdahl, B.; Vesterby, A.; Rungby, J.; Kassem, M. (1999):** Hormone replacement therapy prevents osteoclastic hyperactivity: A histomorphometric study in early postmenopausal women. In: *J. Bone Miner. Res.* 14 (7), S. 1217–1221.
- Evans, K. E.; Fox, S. W. (2007):** Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus. In: *BMC Cell Biol* 8 (1), S. 4.
- Fiorentino, D. F.; Bond, M. W.; Mosmann, T. R. (1989):** Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. In: *J. Exp. Med.* 170 (6), S. 2081–2095.
- Fiorentino, D. F.; Zlotnik, A.; Mosmann, T. R.; Howard, M.; O'Garra, A. (1991b):** IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. In: *J. Immunol.* 147 (11), S. 3815–3822.
- Fiorentino, D. F.; Zlotnik, A.; Vieira, P.; Mosmann, T. R.; Howard, M.; Moore, K. W.; O'Garra, A. (1991a):** IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. In: *J. Immunol.* 146 (10), S. 3444–3451.
- Franchimont, N.; Wertz, S.; Malaise, M. (2005):** Interleukin-6: An osteotropic factor influencing bone formation? In: *Bone* 37 (5), S. 601–606.

- Frost, H. M. (1969):** Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. In: *Calcif Tissue Res* 3 (3), S. 211–237.
- Frost, H. M. (1997):** Defining osteopenias and osteoporoses: another view (with insights from a new paradigm). In: *Bone* 20 (5), S. 385–391.
- Gallagher, J. C.; Riggs, B. Lawrence; Eisman, John; Hamstra, Alan; Arnaud, Sara B.; Deluca, Hector F. (1979):** Intestinal Calcium Absorption and Serum Vitamin D Metabolites in Normal Subjects and Osteoporotic Patients. In: *J. Clin. Invest.* 64 (3), S. 729–736.
- García Palacios, V.; Robinson, L. J.; Borysenko, Ch. W.; Lehmann, T.; Kalla, S. E.; Blair, H. C. (2005):** Negative regulation of RANKL-induced osteoclastic differentiation in RAW264.7 Cells by estrogen and phytoestrogens. In: *J. Biol. Chem.* 280 (14), S. 13720–13727.
- Gautam, S.; Tebo, J. M.; Hamilton, T. A. (1992):** IL-4 suppresses cytokine gene expression induced by IFN-gamma and/or IL-2 in murine peritoneal macrophages. In: *J. Immunol.* 148 (6), S. 1725–1730.
- Gerstenfeld, L. C.; Cullinane, D. M.; Barnes, G. L.; Graves, D. T.; Einhorn, T. A. (2003):** Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. In: *J. Cell. Biochem.* 88 (5), S. 873–884.
- Girasole, G.; Giuliani, N.; Modena, A. B.; Passeri, G.; Pedrazzoni, M. (1999):** Oestrogens prevent the increase of human serum soluble interleukin-6 receptor induced by ovariectomy in vivo and decrease its release in human osteoblastic cells in vitro. In: *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 51 (6), S. 801–807.
- Girasole, G.; Jilka, R. L.; Passeri, G.; Boswell, S.; Boder, G.; Williams, D. C.; Manolagas, S. C. (1992):** 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. In: *J. Clin. Invest.* 89 (3), S. 883–891.
- Hak, A. E.; Pols, H. A.; van Hemert, A. M.; Hofman, A.; Witteman, J. C. (2000):** Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause: a population-based longitudinal study. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (8), S. 1926–1931.
- Hauser, C. J.; Joshi, P.; Zhou, X.; Kregor, P.; Hardy, K. J.; Devidas, M. et al. (1996):** Production of interleukin-10 in human fracture soft-tissue hematomas. In: *Shock* 6 (1), S. 3–6.
- Häussler, B.; Gothe, H.; Mangiapane, S.; Glaeske, G.; Pientka, L.; Felsenberg, D. (2006):** Versorgung von Osteoporose-Patienten in Deutschland. Ergebnisse der BoneEVA-Studie. In: *Deutsches Ärzteblatt* 103 (39), S. 2542–2548.
- Henriksen, K.; Neutzsky-Wulff, A. V.; Bonewald, L. F.; Karsdal, M. A. (2009):** Local communication on and within bone controls bone remodeling. In: *Bone* 44 (6), S. 1026–1033.
- Hofbauer, L. C.; Khosla, S.; Dunstan, C. R.; Lacey, D. L.; Spelsberg, T. C.; Riggs, B. L. (1999a):** Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. In: *Endocrinology* 140 (9), S. 4367–4370.
- Hofbauer, L. C.; Kühne, C. A.; Viereck, V. (2004):** The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. In: *J. Musculoskelet Neuronal Interact* 4 (3), S. 268–275.

- Hofbauer, L. C.; Lacey, D. L.; Dunstan, C. R.; Spelsberg, T. C.; Riggs, B. L.; Khosla, S. (1999b):** Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. In: *Bone* 25 (3), S. 255–259.
- Hofbauer, L. C.; Schoppet, M. (2001):** Osteoprotegerin: a link between osteoporosis and arterial calcification? In: *Lancet* 358 (9278), S. 257–259.
- Hofbauer, L. C.; Schoppet, M. (2004):** Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. In: *JAMA* 292 (4), S. 490–495.
- Hong, M. H.; Williams, H.; Jin, C. H.; Pike, J. W. (2000):** The inhibitory effect of interleukin-10 on mouse osteoclast formation involves novel tyrosine-phosphorylated proteins. In: *J. Bone Miner. Res.* 15 (5), S. 911–918.
- Horowitz, M. C. (1993):** Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. In: *Science* 260 (5108), S. 626–627.
- Hsu, H.; Lacey, D. L.; Dunstan, C. R.; Solovyev, I.; Colombero, A.; Timms, E. et al. (1999):** Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (7), S. 3540–3545.
- Huang, J. C.; Sakata, T.; Pflieger, L. L.; Bencsik, M.; Halloran, B. P.; Bikle, D. D.; Nissenson, R. A. (2004):** PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. In: *J. Bone Miner. Res.* 19 (2), S. 235–244.
- Hughes, D. E.; Dai, A.; Tiffiee, J. C.; Li, H. H.; Mundy, G. R.; Boyce, B. F. (1996):** Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. In: *Nat. Med.* 2 (10), S. 1132–1136.
- Ikeda, T.; Kasai, M.; Utsuyama, M.; Hirokawa, K. (2001):** Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. In: *Endocrinology* 142 (4), S. 1419–1426.
- Jilka, R. L. (1998):** Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. In: *Bone* 23 (2), S. 75–81.
- Jilka, R. L.; Hangoc, G.; Girasole, G.; Passeri, G.; Williams, D. C.; Abrams, J. S. et al. (1992):** Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. In: *Science* 257 (5066), S. 88–91.
- Jilka, R. L.; Weinstein, R. S.; Bellido, T.; Roberson, P.; Parfitt, A. M.; Manolagas, St. C. (1999):** Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. In: *J. Clin. Invest.* 104 (4), S. 439–446.
- Jimi, E.; Nakamura, I.; Duong, L. T.; Ikebe, T.; Takahashi, N.; Rodan, G. A.; Suda, T. (1999):** Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. In: *Exp. Cell Res.* 247 (1), S. 84–93.
- Khosla, S.; Arrighi, H. M.; Melton, L. J.; Atkinson, E. J.; O'Fallon, W. M.; Dunstan, C.; Riggs, B. L. (2002a):** Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. In: *Osteoporos Int* 13 (5), S. 394–399.

- Khosla, S.; Melton, L. J.; Atkinson, E. J.; O'Fallon, W. M.; Klee, G. G.; Riggs, B. L. (1998):** Relationship of serum sex steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men and women: a key role for bioavailable estrogen. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (7), S. 2266–2274.
- Khosla, S.; Melton, L. J.; Riggs, B. L. (2002b):** Clinical review 144: Estrogen and the male skeleton. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (4), S. 1443–1450.
- Kimble, R. B.; Matayoshi, A. B.; Vannice, J. L.; Kung, V. T.; Williams, C.; Pacifici, R. (1995):** Simultaneous block of interleukin-1 and tumor necrosis factor is required to completely prevent bone loss in the early postovariectomy period. In: *Endocrinology* 136 (7), S. 3054–3061.
- Kimble, R. B.; Srivastava, S.; Ross, F. P.; Matayoshi, A.; Pacifici, R. (1996):** Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production. In: *J. Biol. Chem.* 271 (46), S. 28890–28897.
- Kimble, R. B.; Vannice, J. L.; Bloedow, D. C.; Thompson, R. C.; Hopfer, W.; Kung, V. T. et al. (1994):** Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats. In: *J. Clin. Invest.* 93 (5), S. 1959–1967.
- Kitazawa, R.; Kimble, R. B.; Vannice, J. L.; Kung, V. T.; Pacifici, R. (1994):** Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice. In: *J. Clin. Invest.* 94 (6), S. 2397–2406.
- Kleppe, K.; Ohtsuka, E.; Kleppe, R.; Molineux, I.; Khorana, H. G. (1971):** Studies on polynucleotides. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. In: *J. Mol. Biol.* (56), S. 341–361.
- Kolar, P.; Gaber, T.; Perka, C.; Duda, G. N.; Buttgerit, F. (2011):** Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. In: *Clin. Orthop. Relat. Res.* 469 (11), S. 3118–3126.
- Kon, T.; Cho, T. J.; Aizawa, T.; Yamazaki, M.; Nooh, N.; Graves, D. et al. (2001):** Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. In: *J. Bone Miner. Res.* 16 (6), S. 1004–1014.
- Kong, Y. Y.; Feige, U.; Sarosi, I.; Bolon, B.; Tafuri, A.; Morony, S. et al. (1999a):** Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. In: *Nature* 402 (6759), S. 304–309.
- Kong, Y. Y.; Yoshida, H.; Sarosi, I.; Tan, H. L.; Timms, E.; Capparelli, C. et al. (1999b):** OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. In: *Nature* 397 (6717), S. 315–323.
- Kousteni, S.; Bellido, T.; Plotkin, L. I.; O'Brien, C. A.; Bodenner, D. L.; Han, L. et al. (2001):** Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. In: *Cell* 104 (5), S. 719–730.
- Kudlacek, S.; Schneider, B.; Woloszczuk, W.; Pietschmann, P.; Willvonseder, R. (2003):** Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. In: *Bone* 32 (6), S. 681–686.

- Kudo, O.; Sabokbar, A.; Pocock, A.; Itonaga, I.; Fujikawa, Y.; Athanasou, N. A. (2003):** Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. In: *Bone* 32 (1), S. 1–7.
- Lange, J.; Sapozhnikova, A.; Lu, Ch; Hu, D.; Li, X.; Miclau, Th; Marcucio, R. S. (2010):** Action of IL-1beta during fracture healing. In: *J. Orthop. Res.* 28 (6), S. 778–784.
- Ledger, G. A.; Burritt, M. F.; Kao, P. C.; O'Fallon, W. M.; Riggs, B. L.; Khosla, S. (1995):** Role of parathyroid hormone in mediating nocturnal and age-related increases in bone resorption. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80 (11), S. 3304–3310.
- Lerner, U. H. (2006):** Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. In: *J. Dent. Res.* 85 (7), S. 584–595.
- Li, J.; Sarosi, I.; Yan, X. Q.; Morony, S.; Capparelli, C.; Tan, H. L. et al. (2000):** RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (4), S. 1566–1571.
- Lin, S. C.; Yamate, T.; Taguchi, Y.; Borba, V. Z.; Girasole, G.; O'Brien, C. A. et al. (1997):** Regulation of the gp80 and gp130 subunits of the IL-6 receptor by sex steroids in the murine bone marrow. In: *J. Clin. Invest.* 100 (8), S. 1980–1990.
- Liu, D.; Yao, Sh.; Wise, G. E. (2006):** Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. In: *Eur. J. Oral Sci.* 114 (1), S. 42–49.
- Looker, A. C.; Bauer, D. C.; Chesnut, C. H.; Gundberg, C. M.; Hochberg, M. C.; Klee, G. et al. (2000):** Clinical use of biochemical markers of bone remodeling: current status and future directions. In: *Osteoporos Int* 11 (6), S. 467–480.
- Lorenzo, J.; Horowitz, M.; Choi, Y. (2008):** Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. In: *Endocr. Rev.* 29 (4), S. 403–440.
- Lovibond, A. C.; Haque, S. J.; Chambers, T. J.; Fox, S. W. (2003):** TGF-beta-induced SOCS3 expression augments TNF-alpha-induced osteoclast formation. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309 (4), S. 762–767.
- Ma, Y. L.; Cain, R. L.; Halladay, D. L.; Yang, X.; Zeng, Q.; Miles, R. R. et al. (2001):** Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. In: *Endocrinology* 142 (9), S. 4047–4054.
- Makhluf, H. A.; Mueller, S. M.; Mizuno, S.; Glowacki, J. (2000):** Age-related decline in osteoprotegerin expression by human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268 (3), S. 669–672.
- Malluche, H. H.; Mawad, H.; Monier-Faugere, M.-C. (2007):** Bone biopsy in patients with osteoporosis. In: *Curr Osteoporos Rep* 5 (4), S. 146–152.
- Mangashetti, L. S.; Khapli, Sh. M.; Wani, M. R. (2005):** IL-4 inhibits bone-resorbing activity of mature osteoclasts by affecting NF-kappa B and Ca²⁺ signaling. In: *J. Immunol.* 175 (2), S. 917–925.
- Mannon, P.; Reinisch, W. (2012):** Interleukin 13 and its role in gut defence and inflammation. In: *Gut* 61 (12), S. 1765–1773.

- Manolagas, S. C. (2000):** Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. In: *Endocr. Rev.* 21 (2), S. 115–137.
- Manolagas, S. C.; Jilka, R. L. (1995):** Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. In: *N. Engl. J. Med.* 332 (5), S. 305–311.
- Martin, T. J.; Seeman, E. (2008):** Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. In: *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 22 (5), S. 701–722.
- McNamara, L. M. (2010):** Perspective on post-menopausal osteoporosis: establishing an interdisciplinary understanding of the sequence of events from the molecular level to whole bone fractures. In: *J. R. Soc. Interface* 7 (44), S. 353–372.
- Mehl, B.; Delling, G.; Schlindwein, I.; Heilmann, P.; Voia, Ch. et al. (2002):** Korrelieren biochemische Knochenstoffwechselfmarker mit einer histologisch gesicherten High- bzw. Low-Turnover-Osteoporose? In: *Medizinische Klinik* 97 (10), S. 588–594.
- Melchiorri, C.; Meliconi, R.; Frizziero, L.; Silvestri, T.; Pulsatelli, L.; Mazzetti, I. et al. (1998):** Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. In: *Arthritis Rheum.* 41 (12), S. 2165–2174.
- Mohamed, S. G.-K.; Sugiyama, E.; Shinoda, K.; Taki, H.; Hounoki, H.; Abdel-Aziz, H. O. et al. (2007):** Interleukin-10 inhibits RANKL-mediated expression of NFATc1 in part via suppression of c-Fos and c-Jun in RAW264.7 cells and mouse bone marrow cells. In: *Bone* 41 (4), S. 592–602.
- Moore, K. W.; Waal Malefyt, R. de; Coffman, R. L.; O'Garra, A. (2001):** Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. In: *Annu. Rev. Immunol.* 19, S. 683–765.
- Moreno, J. L.; Kaczmarek, M.; Keegan, A. D.; Tondravi, M. (2003):** IL-4 suppresses osteoclast development and mature osteoclast function by a STAT6-dependent mechanism: irreversible inhibition of the differentiation program activated by RANKL. In: *Blood* 102 (3), S. 1078–1086.
- Nakagawa, N.; Kinosaki, M.; Yamaguchi, K.; Shima, N.; Yasuda, H.; Yano, K. et al. (1998):** RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253 (2), S. 395–400.
- Nesbitt, S. A.; Horton M. A. (1997):** Trafficking of Matrix Collagens Through Bone-Resorbing Osteoclasts. In: *Science* 276 (5310), S. 266–269.
- O'Brien, C. A.; Gubrij, I.; Lin, S. C.; Saylor, R. L.; Manolagas, S. C. (1999):** STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF-kappaB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone. In: *J. Biol. Chem.* 274 (27), S. 19301–19308.
- Onoe, Y.; Miyaura, C.; Kaminakayashiki, T.; Nagai, Y.; Noguchi, K.; Chen, Q. R. et al. (1996):** IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. In: *J. Immunol.* 156 (2), S. 758–764.
- Pacifici, R. (1996):** Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. In: *J. Bone Miner. Res.* 11 (8), S. 1043–1051.

- Pacifici, R.; Brown, C.; Puscheck, E.; Friedrich, E.; Slatopolsky, E.; Maggio, D. et al. (1991):** Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (12), S. 5134–5138.
- Pacifici, R.; Vannice, J. L.; Rifas, L.; Kimble, R. B. (1993):** Monocytic secretion of interleukin-1 receptor antagonist in normal and osteoporotic women: effects of menopause and estrogen/progesterone therapy. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77 (5), S. 1135–1141.
- Palmqvist, P.; Lundberg, P.; Persson, E.; Johansson, A.; Lundgren, I.; Lie, A. et al. (2006):** Inhibition of hormone and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent pathway. In: *J. Biol. Chem.* 281 (5), S. 2414–2429.
- Palmqvist, P.; Persson, E.; Conaway, H. H.; Lerner, U. H. (2002):** IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. In: *J. Immunol.* 169 (6), S. 3353–3362.
- Panuska, J. R.; Merolla, R.; Rebert, N. A.; Hoffmann, S. P.; Tsvitsee, P.; Cirino, N. M. et al. (1995):** Respiratory syncytial virus induces interleukin-10 by human alveolar macrophages. Suppression of early cytokine production and implications for incomplete immunity. In: *J. Clin. Invest.* 96 (5), S. 2445–2453.
- Pape, H.-Ch.; Marcucio, R.; Humphrey, C.; Colnot, C.; Knobe, M.; Harvey, E. J. (2010):** Trauma-induced inflammation and fracture healing. In: *J. Orthop. Trauma* 24 (9), S. 522–525.
- Parfitt, A. M. (1994):** Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. In: *J. Cell. Biochem.* 55 (3), S. 273–286.
- Park, B. L.; Han, K. in; Lee, H. S.; Kim, L. H.; Kim, S. J.; Shin, J.-Sh. et al. (2004):** Association of interleukin 10 haplotype with low bone mineral density in Korean postmenopausal women. In: *J. Biochem. Mol. Biol.* 37 (6), S. 691–699.
- Pfeilschifter, J.; Köditz, R.; Pfohl, M.; Schatz, H. (2002):** Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. In: *Endocr. Rev.* 23 (1), S. 90–119.
- Pino, A. M.; Ríos, S.; Astudillo, P.; Fernández, M.; Figueroa, P.; Seitz, G.; Rodríguez, J. P. (2010):** Concentration of adipogenic and proinflammatory cytokines in the bone marrow supernatant fluid of osteoporotic women. In: *J. Bone Miner. Res.* 25 (3), S. 492–498.
- Poli, V.; Balena, R.; Fattori, E.; Markatos, A.; Yamamoto, M.; Tanaka, H. et al. (1994):** Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. In: *EMBO J.* 13 (5), S. 1189–1196.
- Raisz, L. G. (2005):** Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. In: *Journal of Clinical Investigation* 115 (12), S. 3318–3325.
- Rickard, D. J.; Kassem, M.; Hefferan, T. E.; Sarkar, G.; Spelsberg, T. C.; Riggs, B. L. (1996):** Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. In: *J. Bone Miner. Res.* 11 (3), S. 312–324.
- Riggs, B. L.; Khosla, S.; Melton, L. J. (1998):** A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. In: *J. Bone Miner. Res.* 13 (5), S. 763–773.

- Riggs, B. L.; Khosla, S.; Melton, L. J. (2002):** Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. In: *Endocr. Rev.* 23 (3), S. 279–302.
- Roach, P.; Eglin, D.; Rohde, K.; Perry, C. C. (2007):** Modern biomaterials: a review - bulk properties and implications of surface modifications. In: *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18 (7), S. 1263–1277.
- Robert-Koch-Institut (2011):** Ergebnisse der Studie "Gesundheit in Deutschland aktuell 2009". Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Osteoporose. In: *Faktenblätter des RKI*, S. 97–99.
- Robert-Koch-Institut (2012):** Ergebnisse der Studie "Gesundheit in Deutschland aktuell 2010". Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Osteoporose. In: *Faktenblätter des RKI*, S. 113–115.
- Rogers, A.; Saleh, G.; Hannon, R. A.; Greenfield, D.; Eastell, R. (2002):** Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (10), S. 4470–4475.
- Romas, E.; Martin, T. J. (1997):** Cytokines in the pathogenesis of osteoporosis. In: *Osteoporos. Int.* 7 Suppl 3, S. S47-53.
- Roodman, G. D. (1999):** Cell biology of the osteoclast. In: *Exp. Hematol.* 27 (8), S. 1229–1241.
- Saika, M.; Inoue, D.; Kido, S.; Matsumoto, T. (2001):** 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. In: *Endocrinology* 142 (6), S. 2205–2212.
- Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T. et al. (1988):** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. In: *Science* (239), S. 487–491.
- Scheidt-Nave, C.; Bismar, H.; Leidig-Bruckner, G.; Woitge, H.; Seibel, M. J.; Ziegler, R.; Pfeilschifter, J. (2001):** Serum interleukin 6 is a major predictor of bone loss in women specific to the first decade past menopause. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (5), S. 2032–2042.
- Schindeler, A.; McDonald, M. M.; Bokko, P.; Little, D. G. (2008):** Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. In: *Semin. Cell Dev. Biol.* 19 (5), S. 459–466.
- Schreiber, J. J.; Anderson, P. A.; Rosas, H. G.; Buchholz, A. L.; Au, A. G. (2011):** Hounsfield units for assessing bone mineral density and strength: a tool for osteoporosis management. In: *J. Bone Joint. Surg. Am.* 93 (11), S. 1057–1063.
- Schulz, E.; Arfai, K.; Liu, X.; Sayre, J.; Gilsanz, V. (2004):** Aortic calcification and the risk of osteoporosis and fractures. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (9), S. 4246–4253.
- Seder, R. A.; Paul, W. E. (1994):** Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. In: *Annu. Rev. Immunol.* 12, S. 635–673.
- Silfverswärd, C.-J.; Sisask, G.; Larsson, S.; Ohlsson, C.; Frost, A.; Ljunggren, O.; Nilsson, O. (2008):** Bone formation in interleukin-4 and interleukin-13 depleted mice. In: *Acta Orthop.* 79 (3), S. 410–420.

- Simonet, W. S.; Lacey, D. L.; Dunstan, C. R.; Kelley, M.; Chang, M. S.; Lüthy, R. et al. (1997):** Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. In: *Cell* 89 (2), S. 309–319.
- Sims, N. A.; Gooi, J. H. (2008):** Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. In: *Semin. Cell Dev. Biol.* 19 (5), S. 444–451.
- Sonderforschungsbereich/Transregio 79 (2010–2014):** Werkstoffe für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen. Online unter <http://www.uni-giessen.de/cms/fbz/fb11/forschung/schwerpunkte/sfb/trr79>, Stand 01.07.2013
- Srivastava, S.; Toraldo, G.; Weitzmann, M. N.; Cenci, S.; Ross, F. P.; Pacifici, R. (2001):** Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. In: *J. Biol. Chem.* 276 (12), S. 8836–8840.
- Stein, N. C.; Kreutzmann, C.; Zimmermann, S.-P.; Niebergall, U.; Hellmeyer, L.; Goettsch, C. et al. (2008):** Interleukin-4 and interleukin-13 stimulate the osteoclast inhibitor osteoprotegerin by human endothelial cells through the STAT6 pathway. In: *J. Bone Miner. Res.* 23 (5), S. 750–758.
- Suda, T.; Takahashi, N.; Udagawa, N.; Jimi, E.; Gillespie, M. T.; Martin, T. J. (1999):** Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. In: *Endocr. Rev.* 20 (3), S. 345–357.
- Szulec, P.; Hofbauer, L. C.; Heufelder, A. E.; Roth, S.; Delmas, P. D. (2001):** Osteoprotegerin serum levels in men: correlation with age, estrogen, and testosterone status. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (7), S. 3162–3165.
- Taranta, A.; Brama, M.; Teti, A.; Luca, V. de; Scandurra, R.; Spera, G. et al. (2002):** The selective estrogen receptor modulator raloxifene regulates osteoclast and osteoblast activity in vitro. In: *Bone* 30 (2), S. 368–376.
- Taxel, P.; Kaneko, H.; Lee, S.-K.; Aguila, H. L.; Raisz, L. G.; Lorenzo, J. A. (2008):** Estradiol rapidly inhibits osteoclastogenesis and RANKL expression in bone marrow cultures in postmenopausal women: a pilot study. In: *Osteoporos Int.* 19 (2), S. 193–199.
- te Velde, A. A.; Huijbens, R. J.; Heije, K.; Vries, J. E. de; Figdor, C. G. (1990):** Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. In: *Blood* 76 (7), S. 1392–1397.
- Teitelbaum, S. L. (2000):** Bone resorption by osteoclasts. In: *Science* 289 (5484), S. 1504–1508.
- Teitelbaum, S. L. (2004):** Postmenopausal osteoporosis, T cells, and immune dysfunction. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (48), S. 16711–16712.
- Temin, H. M.; Mizutani, S. (1970):** RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus. In: *Nature* (226), S. 1211–1213.
- Tomkinson, A.; Gevers, E. F.; Wit, J. M.; Reeve, J.; Noble, B. S. (1998):** The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. In: *J. Bone Miner. Res.* 13 (8), S. 1243–1250.
- Toru, H.; Pawankar, R.; Ra, C.; Yata, J.; Nakahata, T. (1998):** Human mast cells produce IL-13 by high-affinity IgE receptor cross-linking: enhanced IL-13 production by IL-4-primed human mast cells. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 102 (3), S. 491–502.

- Tsangari, H.; Findlay, D. M.; Kuliwaba, J. S.; Atkins, G. J.; Fazzalari, N. L. (2004):** Increased expression of IL-6 and RANK mRNA in human trabecular bone from fragility fracture of the femoral neck. In: *Bone* 35 (1), S. 334–342.
- Udagawa, N.; Takahashi, N.; Akatsu, T.; Tanaka, H.; Sasaki, T.; Nishihara, T. et al. (1990):** Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (87), S. 7260–7264.
- Ueland, T.; Brixen, K.; Mosekilde, L.; Mosekilde, L.; Flyvbjerg, A.; Bollerslev, J. (2003):** Age-related changes in cortical bone content of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3, IGFBP-5, osteoprotegerin, and calcium in postmenopausal osteoporosis: a cross-sectional study. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (3), S. 1014–1018.
- Väänänen, H. K.; Horton, M. (1995):** The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. In: *J. Cell. Sci.* 108 (Pt 8), S. 2729–2732.
- Waal Malefyt, R. de; Abrams, J.; Bennett, B.; Figdor, C. G.; Vries, J. E. de (1991):** Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. In: *J. Exp. Med.* 174 (5), S. 1209–1220.
- Waal Malefyt, R. de; Figdor, C. G.; Huijbens, R.; Mohan-Peterson, S.; Bennett, B.; Culpepper, J. et al. (1993):** Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. In: *J. Immunol.* 151 (11), S. 6370–6381.
- Wada, T.; Nakashima, T.; Hiroshi, N.; Penninger, J. M. (2006):** RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. In: *Trends Mol Med* 12 (1), S. 17–25.
- Wei, S.; Kitaura, H.; Zhou, P.; Ross, F. P.; Teitelbaum, S. L. (2005):** IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. In: *J. Clin. Invest.* 115 (2), S. 282–290.
- Wei, S.; Wang, M. W-H; Teitelbaum, S. L.; Ross, F. P. (2002):** Interleukin-4 reversibly inhibits osteoclastogenesis via inhibition of NF-kappa B and mitogen-activated protein kinase signaling. In: *J. Biol. Chem.* 277 (8), S. 6622–6630.
- Weitzmann, M. N. (2013):** The Role of Inflammatory Cytokines, the RANKL/OPG Axis, and the Immunoskeletal Interface in Physiological Bone Turnover and Osteoporosis. In: *Scientifica* 2013 (3), S. 1–29.
- Weitzmann, M. N.; Pacifici, R. (2006):** Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. In: *J. Clin. Invest.* 116 (5), S. 1186–1194.
- Wenisch, S.; Stahl, J-P; Horas, U.; Heiss, C.; Kilian, O.; Trinkaus, K. et al. (2003):** In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts: fine structural microscopy. In: *J. Biomed. Mater. Res. A* 67 (3), S. 713–718.
- WHO Summary Meeting Report (2007):** WHO scientific group on the assessment of osteoporosis at primary health care level. Summary meeting report Brussels, Belgium, 5-7 May 2004. Online verfügbar unter <http://www.who.int/chp/topics/Osteoporosis.pdf>.
- WHO Technical Report Series (1994):** Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. In: *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 843, S. 1–129.

- Xu, L. X.; Kukita, T.; Kukita, A.; Otsuka, T.; Niho, Y.; Iijima, T. (1995):** Interleukin-10 selectively inhibits osteoclastogenesis by inhibiting differentiation of osteoclast progenitors into preosteoclast-like cells in rat bone marrow culture system. In: *J. Cell. Physiol.* 165 (3), S. 624–629.
- Yamada, A.; Takami, M.; Kawawa, T.; Yasuhara, R.; Zhao, B.; Mochizuki, A. et al. (2007):** Interleukin-4 inhibition of osteoclast differentiation is stronger than that of interleukin-13 and they are equivalent for induction of osteoprotegerin production from osteoblasts. In: *Immunology* 120 (4), S. 573–579.
- Yano, K.; Tsuda, E.; Washida, N.; Kobayashi, F.; Goto, M.; Harada, A. et al. (1999):** Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. In: *J. Bone Miner. Res.* 14 (4), S. 518–527.
- Zheng, S. X.; Vrindts, Y.; Lopez, M.; Groote, D. de; Zangerle, P. F.; Collette, J. et al. (1997):** Increase in cytokine production (IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha but not IFN-gamma, GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells in postmenopausal osteoporosis. In: *Maturitas* 26 (1), S. 63–71.
- Zupan, J.; Jeras, M.; Marc, J. (2013):** Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. In: *Biochem Med (Zagreb)* 23 (1), S. 43–63.
- Zupan, J.; Komadina, R.; Marc, J. (2012):** The relationship between osteoclastogenic and anti-osteoclastogenic pro-inflammatory cytokines differs in human osteoporotic and osteoarthritic bone tissues. In: *J. Biomed. Sci.* 19, S. 28.

9 Anhang

9.1 Materialien und Methoden

9.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
“Autoclav Systec DE65“ Sterilisator “Heraeus Function line“	<i>Systec GmbH, Wetztenberg, D</i> <i>Kendro Laboratory Products,</i> <i>Hanau, D</i>
Eismaschine SPR 80 L	<i>NordCap GmbH & Co. KG,</i> <i>Bremen, D</i>
“Hebu Oszillosäge GOLD Plus Autopsie“ Gefrierschrank -80 °C Heraeus Herafrees	<i>Hebu medical, Tuttlingen, D</i> <i>Thermo Fisher Scientific, D</i>
“Finnpipette F2“ 2-20µl, 20-200µl, 100-1000µl Pipetten “Research“ 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl Zentrifuge “Mikro 220R“ Wasserbad	<i>Thermo Fisher Scientific, D</i> <i>Eppendorf AG, Hamburg, D</i> <i>Hettich Laborapparate, Bäch, CH</i> <i>Memmert GmbH + Co.KG,</i> <i>Schwabach, D</i>
BioPhotometer Kühl-Gefriergerät -20 °C Zentrifuge “Mirko 20“	<i>Eppendorf AG, Hamburg, D</i> <i>Privileg, Stuttgart, D</i> <i>Hettich Laborapparate, Bäch, CH</i>
“DNA Engine Peltier Thermal Cycler“ Waage “PB3002-S Delta Range” Mikrowelle “Privileg 8520“ Gelelektrophorese-Kammer PowerPac™ Basic Transiluminator UVsolo	<i>Bio-Rad, München, D</i> <i>Mettler-Toledo GmbH, Gießen, D</i> <i>Privileg, Stuttgart, D</i> <i>Biometra, Göttingen, D</i> <i>Bio-Rad, München, D</i> <i>Biometra, Göttingen, D</i>
Real Time Cycler: “Real Time System CFX 96” mit “C1000 Touch Thermal Cycler” Computertomograph “Brilliance CT 16-slice”	<i>Bio-Rad, München, D</i> <i>Philips Healthcare, NL</i>

9.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
15 ml Falcons	<i>Sarstedt AG & Co.</i> , Nümbrecht, D
1,7 ml Cryo tubes	<i>Sorenson BioScience</i> , Salt Lake City, Utah, USA
Pipettenspitzen: 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	<i>nerbe plus GmbH</i> , Winsen/Luhe D
Pipettenspitzen: 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	<i>Ratiolab</i> , Dreieich, D
Photometer-Küvetten	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, D
650 µl Microtubes	<i>Carl Roth GmbH</i> , Karlsruhe, D
1,5 ml Cups	<i>Sarstedt AG & Co.</i> , Nümbrecht, D
2 ml Cups	<i>Sarstedt AG & Co.</i> , Nümbrecht, D
500 µl PCR-Tubes	<i>Sarstedt AG & Co.</i> , Nümbrecht, D
„Hard-Shell PCR Plates 96-Well“	<i>Bio-Rad</i> , München, D

9.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	siehe 8.1.4 Puffer und Lösungen
RNase-freies Wasser	<i>Qiagen GmbH</i> , Hilden, D
Aqua bidest./ Aqua ad injectabilia	<i>B. Braun Melsungen AG</i> , Melsungen, D

Zur RNA- Extraktion & -Konzentrationsbestimmung verwendete Chemikalien & Reagenzien

peqGOLD TriFast™	<i>Peqlab</i> , Erlangen, D
Chloroform	<i>Carl Roth GmbH</i> , Karlsruhe, D
Isopropanol	<i>Carl Roth GmbH</i> , Karlsruhe, D
Ethanol, unvergällt, 100%	<i>Carl Roth GmbH</i> , Karlsruhe, D
Tris-HCl (pH 7,3)	siehe 8.1.4 Puffer und Lösungen

Reagenzien des DNase-Verdaus

25 mM MgCl ₂ solution	<i>Life Technologies - Invitrogen,</i> Darmstadt, D
10 x DNase I incubation buffer	<i>Roche, Mannheim, D</i>
10 U/μl DNase I, RNase frei	<i>Roche, Mannheim, D</i>
40 U/μl RNase-Inhibitor	<i>Roche, Mannheim, D</i>

Reagenzien der DNA-Generierung

25 mM MgCl ₂ solution	}	<i>Life Technologies - Invitrogen,</i> Darmstadt, D
10 x PCR Gold Puffer		
Nukleotide Mix (dNTPs)		
50 μM Random Hexamers		
20 U/μl RNase-Inhibitor		
50 U/μl Reverse Transkriptase		

RT-PCR- und Agarosegelreagenzien

25 mM MgCl ₂ solution	<i>Life Technologies - Invitrogen,</i> Darmstadt, D
10 x PCR Gold Puffer	<i>Life Technologies - Invitrogen,</i> Darmstadt, D
GOLD Amplitag Polymerase	<i>Roche, Mannheim, D</i>
Agarose "High Resolution"	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D</i>
TAE-Puffer	siehe 8.1.4 Puffer und Lösungen
Gel Green™ Nucleic Acid Gel Stain	<i>Biotium, Hayward, California USA</i>
5 x DNA Loading Buffer (blue)	<i>Biozym Scientific GmbH,</i> Hessisch Oldendorf, D
Quantitas DNA Marker 50 bp – 2 kb	<i>Biozym Scientific GmbH,</i> Hessisch Oldendorf, D

RT-qPCR-Reagenzien

QuantiTect SYBR Green PCR Kit	<i>Qiagen GmbH, Hilden, D</i>
-------------------------------	-------------------------------

9.1.4 Puffer und Lösungen

a) Für den Transport und bis zu ihrer Weiterverarbeitung wurden die chirurgisch entnommenen Femurköpfe direkt nach der Operation in steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) eingelegt.

b) 1 mM Tris-HCl, pH 7,3

MENGE	REAGENZ	HERSTELLER
1,21 g	Tris (Pufferan, $\geq 99,9\%$ p.a.)	<i>Sigma Aldrich</i> , St. Louis, MO, USA
ca. 5 ml	konzentrierte HCl (25 %)	<i>Carl Roth GmbH</i> , Karlsruhe, D
ad 100 ml	DEPC-H ₂ O	siehe unten

→ alles gut mischen, mit HCl Einstellung des pH-Wertes auf 7,3; Lagerung bei -20°C

c) DEPC-H₂O

MENGE	REAGENZ	HERSTELLER
2 ml	Diethylpyrocarbonat (DEPC)	<i>Sigma Aldrich</i> , St. Louis, MO, USA
2 l	steriles Aqua bidest	

→ beides mischen, über 24 Stunden bei 37 °C inkubieren und anschließend autoklavieren

d) 10 x TAE-Puffer

MENGE	REAGENZ	HERSTELLER
145,2 g	Tris	<i>Carl Roth GmbH</i> , Karlsruhe, D
11,1 g	EDTA	<i>Carl Roth GmbH</i> , Karlsruhe, D
3 l	Aqua bidest	

→ mischen und mit Essigsäure (*Carl Roth GmbH*, Karlsruhe, D) auf pH 8 einstellen

9.1.5 Primer

Bei der RT-PCR eingesetzte Primer

Primer (Gen)	Primersequenz	Hersteller
GAPDH	for 5' - CCAGGTGGTCTCCTCTGACTTC - 3'	<i>Eurofins MWG</i>
	rev 5' - GTGGTCGTTGAGGGCAATG - 3'	<i>Operon</i> , Ebersberg, D

RT-qPCR-Primer: Quanti Tect Primer Assays

Gen	Quanti Tect Primer Assay	Qiagen-Nr.	Größe bp	Hersteller
GAPDH, human	Hs_GAPDH_1_SG	QT00079247	95	<i>Qiagen GmbH, Hilden, D</i>
RANKL, human	Hs_TNFSF11_1_SG	QT00215614	91	
OPG, human	Hs_TNFRSF11B_1_SG	QT00014294	107	
IL 1 β , human	Hs_IL1B_1_SG (IL 1 β)	QT00021385	117	
IL 4, human	Hs_IL4_1_SG (IL 4)	QT00012565	89	
IL 6, human	Hs_IL6_1_SG (IL 6)	QT00083720	107	
IL 10, human	Hs_IL10_1_SG (IL 10)	QT00041685	113	
IL 13, human	Hs_IL13_1_SG (IL 13)	QT00000511	185	

9.1.6 Software

Verwendete Software

Hersteller

Bio-Rad CFX Manager Software 2.1	<i>Bio-Rad, München, D</i>
Microsoft Word, Excel, PowerPoint 2010, Paint	<i>Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA</i>
Systemsoftware V 1.2.5	<i>Philips Healthcare, NL</i>
Synedra View Personal 3.2.0.3	<i>Synedra Deutschland GmbH, Aachen, D</i>

9.1.7 Metadaten der Computertomographie

- Helicale und axiale Scans, Schichtdicke 0,7 mm bzw. 1 mm, Scandauer ca. 10 Min.
- 140 kVp, 196 mAs
- Convolution Kernel D, Matrix 1024

9.2 Statistische Ergebnisse

a) Explorative zweifaktorielle Kovarianzanalyse

Tabelle 7: Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (n) der IL- und RANKL/OPG-Expressionen der explorativen zweifaktoriellen Kovarianzanalyse, Gesamtpatientenpopulation ($n = 39$)

G		weiblich	weiblich	männlich	männlich
E		Fraktur	Coxarthrose	Fraktur	Coxarthrose
n		10	11	7	11
IL 1	x	1,8999	0,9783	1,91091	0,38225
	n	0,88067	0,95231	0,58766	0,91155
IL 4		0	0	0	0
IL 6	x	1,75978	0,35676	1,5705	0,40733
	n	0,98601	0,79528	1,26109	0,94942
IL 10	x	0,92254	0,16859	1,02622	0,35441
	n	0,98438	0,55915	0,98379	0,80139
IL 13		0	0	0	0
R/O	x	2,67599	1,5978	2,73918	1,69524
	n	1,68613	1,9283	1,49164	1,43943

G = Geschlecht; E = Erkrankung; n = Anzahl der Patienten in der entsprechenden Gruppe; R/O = RANKL/OPG

b) Explorative dreifaktorielle Varianzanalyse

Tabelle 8: *Tabellarische Darstellung der IL-Expressions-Mittelwerte (x) und – Standardabweichungen (n) der explorativen dreifaktoriellen Varianzanalyse (vgl. 4.4.2.2), Gesamtpatientenpopulation (n = 39). Die Werte in der jeweiligen oberen Zeile geben die Mittelwerte, die in der unteren die Standardabweichungen (kursiv) an.*

G	weibl.	weibl.	weibl.	weibl.	männl.	männl.	männl.	männl.	
		F.	F.	Co.	Co.	F.	F.	Co.	Co.
R/O	Erh.	Abb.	Erh.	Abb.	Erh.	Abb.	Erh.	Abb.	
n	n = 2	n = 8	n = 7	n = 4	n = 1	n = 6	n = 5	n = 6	
1	x	2,76749	1,683	1,32956	0,34303	2,3393	1,8392	0	0,7008
	n	1,02528	0,76038	0,92911	0,68606	/	0,60958	0	1,18066
4	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	x	1,21133	1,89689	0,2645	0,51821	0	1,83225	0	0,74678
	n	1,71309	0,85049	0,6998	1,03641	/	1,15452	0	1,22418
10	x	0,75848	0,96355	0	0,46362	0	1,19726	0	0,64974
	n	1,07266	1,03531	0	0,92724	/	0,95691	0	1,02673
13	0	0	0	0	0	0	0	0	

G = Geschlecht, weibl. = weiblich, männl. = männlich
 E = Erkrankung, F. = Fraktur, Co. = Coxarthrose
 R/O = RANKL/OPG → Unterscheidung in:
 - Erh. = Knochen-Erhalt, Abb. = Knochen-Abbau
 n = Anzahl der Patienten in der entsprechenden Gruppe

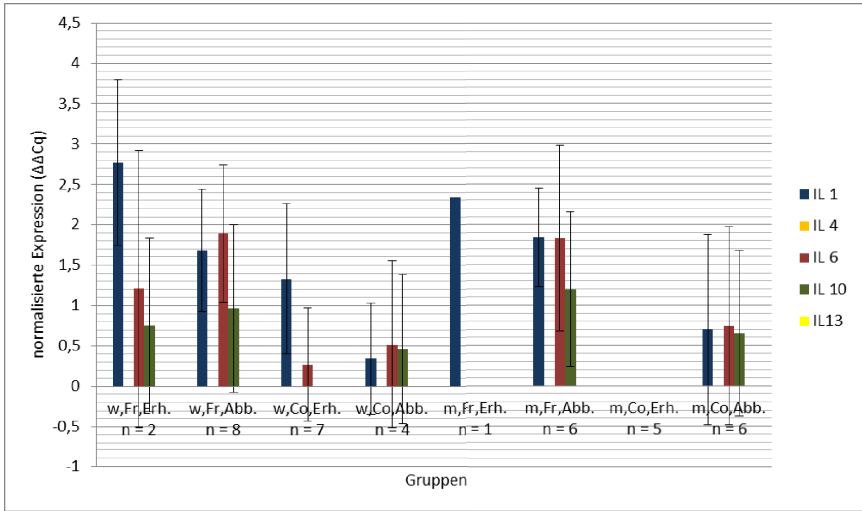


Abbildung 24: Zusätzliche Darstellung der Standardabweichungen der explorativen dreifaktoriellen Varianzanalyse (vgl. 4.4.2.2), Gesamtpatientenpopulation (n = 39);
 w = weiblich, m = männlich
 Fr = Fraktur, Co = Coxarthrose
 Erh. = Knochen-Erhalt, Abb. = Knochen-Abbau
 n = Anzahl der Patienten in der entsprechenden Gruppe

Danksagung

Zu allererst möchte ich Frau Prof. Dr. Wenisch für die Überlassung des Promotionsthemas sowie ihre gute Betreuung und Unterstützung danken! Insbesondere der mir gelassene zeitliche und örtliche Freiraum bei der Studiendurchführung und schriftlichen Anfertigung haben mir das Erstellen dieser Arbeit sehr erleichtert.

Danke sage ich auch Bastian Krähling – ohne dessen saubere -RT-Proben ich wohl heute noch umschreiben würde ☺ – für die Einarbeitung, die Zusammenarbeit und das Beantworten meiner Fragen.

Ein Dank geht an dieser Stelle außerdem an die DFG (SFB/Transregio 79) für die Bereitstellung der Sachmittel.

Ein weiterer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Failing und seinem Team der AG Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der JLU Gießen für die statistische Auswertung.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Kerstin Amort und Ella Wenz für ihre Hilfe bei den CT-Scans sowie bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Kramer, für die Möglichkeit der Durchführung dieser Aufnahmen in der chirurgischen Abteilung der Klinik für Kleintiere der JLU Gießen.

Mein besonders herzlicher Dank gilt den Doktoranden-Mädels der vet-Anatomie, insbesondere Nadine und Julia, mit denen die Zeit am Institut immer wie im Flug vergangen ist. Aber auch Anika G., Kristina & Lena die immer ein offenes Ohr hatten. Danke auch Eva T., dass du während meiner Praxiszeit immer wieder bei mir angeklopft und mir schließlich dieses Dissertationsthema schmackhaft gemacht hast – ohne dich wäre diese Arbeit somit wohl nicht entstanden ☺.

Ein besonderer Dank gebührt an dieser Stelle meinem Opa, zum einen für die zahlreichen Korrekturen ☺, zum anderen für seine Unterstützung in jeglicher Hinsicht!

Tausend Dank möchte ich außerdem meiner Ma sagen: Danke, für das mehrfache Korrekturlesen dieser Arbeit. Danke, dass du immer für mich da bist, mir sooo vieles ermöglicht hast und natürlich ganz besonders für die Erfüllung meines Traumes!!!

Ich danke auch meinem Dad, der uns insbesondere bei den parallel zur Entstehung dieser Arbeit stattfindenden Umbaumaßnahmen tatkräftig unterstützt hat und auf den ich immer zählen kann!

Abschließend möchte ich dir Markus danken. Du hast es ohne Murren hingenommen, dass ich nach einem Jahr Beziehung wieder in alte Gefilde zurückgekehrt bin, wir uns nur an manchen Wochenenden sehen konnten und nebenbei eine Großbaustelle eröffnet und schließlich vollendet haben. Du hast immer voll und ganz hinter mir und meiner Entscheidung gestanden – dafür danke ich dir von ganzem Herzen! Du bist wunderbar.

Gewidmet habe ich diese Arbeit meiner Oma – sie wäre unendlich stolz. „Omi, du fehlst mir so sehr!“

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Arbeit angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der *Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis* niedergelegt sind, eingehalten.“

Julia Palkovich

ISBN 978-3-86345-203-2



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvg.de · Internet: www.dvg.de**