

# **Experimentelle Analyse des Knochenstatus bei Fetternahrung im Maus-Modell**

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

vorgelegt von Hinrich Johann Fehrendt  
aus Hannover

Gießen 2014

---

Aus dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Christian Heiß

des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Frau Prof. Dr. Lips

Gutachter: Herr Prof. Dr. Linn

Tag der Disputation: 12.11.2015

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Theoretische Grundlagen .....	3
2.1	Knochenskelett.....	3
2.2	Anpassung des Knochens an die mechanische Belastungssituation.....	6
2.3	Knochenzellen.....	6
2.4	Wachstum der Röhrenknochen und Wirbelkörper .....	11
3	Fragestellung .....	13
4	Material und Methoden .....	14
4.1	Tiermodell .....	14
4.1.1	Probenentnahme und Studiendesign .....	15
4.2	Dual-X-Ray Absorptiometry.....	17
4.3	Histologische Verfahren .....	17
4.3.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung).....	18
4.4	Enzymnachweis .....	19
4.4.1	Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP).....	19
4.4.2	Alkalische Phosphatase .....	19
4.5	Histomorphometrie.....	20
4.6	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	23
4.6.1	RNA-Extraktion .....	23
4.6.2	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	23
4.6.3	cDNA-Synthese.....	24
4.6.4	Qualitative RT-PCR zur Überprüfung der Elimination der genomischen DNA.....	25
4.6.5	Gelelektrophorese.....	25
4.6.6	Etablierung der real-time RT-PCR.....	26
4.6.7	Auflistung der Primer.....	28
4.6.8	Real-time RT-PCR .....	29
4.7	Immunhistochemie .....	29
4.8	Transmissionselektronenmikroskopie.....	30
4.9	Statistische Auswertung .....	31
5	Ergebnisse.....	33
5.1	Dual-X-Ray Absorptiometry (DXA-Messung).....	33
5.2	Histologie .....	35
5.2.1	HE-Färbung .....	36
5.2.2	TRAP-Enzymhistochemie .....	45

---

5.2.3	Alkalische Phosphatase Enzymhistochemie.....	52
5.3	Histomorphometrie.....	59
5.4	Real-time RT-PCR.....	61
5.5	Kollagen 1 Immunhistochemie.....	64
5.6	Tabellarische Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse.....	72
5.7	Transmissionselektronenmikroskopie.....	73
6	Diskussion.....	80
6.1	Das Tierversuchsmodell als Grundlage der Untersuchung.....	80
6.2	Wirkung von Fetternahrung auf die Knochenmineralisierung und Knochenstruktur.....	82
6.2.1	Bewertung der Auswirkung auf die Knochenmineralisierung.....	82
6.2.2	Histologische Bewertung der Knochenstruktur.....	84
6.3	Bewertung der histomorphometrischen Ergebnisse.....	87
6.4	Auswirkung der Fetternahrung auf die Knochenzellen.....	88
6.5	Wirkung der Fetternahrung auf die Genexpression im Knochenstoffwechsel.....	90
6.6	Ultrastrukturanalyse der Trabekel.....	91
6.7	Erklärungsansätze für die Wirkung der Fetternahrung auf den Knochen.....	94
6.7.1	Auswirkungen in Abhängigkeit von den Bestandteilen der Fetternahrung.....	94
6.7.2	Endokrine Interaktion von Adipozyten und Knochenzellen.....	96
6.7.3	Differenzierung von Osteoblasten.....	97
6.7.4	Inflammation durch das Fettgewebe.....	98
7	Ausblick.....	100
8	Zusammenfassung.....	101
9	Summary.....	103
10	Abkürzungsverzeichnis.....	104
11	Abbildungsverzeichnis.....	106
12	Tabellenverzeichnis.....	108
13	Literaturverzeichnis.....	109
14	Publikationsverzeichnis.....	116
15	Erklärung zur Dissertation.....	117
16	Danksagung.....	118



## 1 Einleitung

Adipositas hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einem global bedeutenden medizinischen Problem entwickelt.

Nach der Definition der Deutschen Adipositas Gesellschaft e.V. wird von Adipositas gesprochen, wenn eine über das Normalmaß hinausgehende Vermehrung des Körperfetts vorliegt. Als einfache Maßeinheit für die Bewertung des Körpergewichts wird der Body Mass Index (BMI) aus dem Verhältnis von Gewicht in Kilogramm und der Größe in Metern zum Quadrat herangezogen. Die Klassifikation der World Health Organization (WHO) für die Bewertung des Körpergewichts für Erwachsene unterscheidet in drei große Kategorien: Untergewicht BMI < 18,5, Normalgewicht BMI von 18,5 – 24,9 und Übergewicht (Präadipös) BMI  $\geq$  25. Ab einem BMI > 30 wird von Adipositas gesprochen, unterteilt in Adipositas Grad I (BMI 30,0 – 34,99), Adipositas Grad II (BMI 35,0 – 39,99) und Adipositas Grad III (BMI  $\geq$  40,0). Den zunehmenden Adipositas Graden werden höhere Komorbiditätsrisiken zugeordnet (Report of a WHO consultation (2000)).

Weltweit sind mehr als 1,1 Milliarden Menschen übergewichtig und über 300 Millionen Erwachsene adipös (James et al. 2004). Laut einer Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS) des Robert-Koch Institutes aus dem Jahr 2012 sind allein in Deutschland rund 67% der Männer und 53% der Frauen übergewichtig oder adipös. Auffallend ist, dass die Prävalenz von Adipositas besonders bei Männern und im jungen Erwachsenenalter weiter zunimmt (Scheidt-Nave et al. 2012). Auch Daten von Kindern und Jugendlichen aus Deutschland zeigen nach dem Kinder- und Jugend-Gesundheitssurvey (KiGGS) (2007) des Robert Koch-Instituts einen Anstieg der Adipositasprävalenz. In Deutschland sind ungefähr 1,9 Millionen Kinder und Jugendliche übergewichtig, von denen 800.000 adipös sind (Kurth et al. 2007).

Unstrittig ist, dass Adipositas häufig mit anderen Erkrankungen wie Diabetes, kardiovaskulären Erkrankungen und bestimmten Tumorerkrankungen assoziiert ist (Kopelman 2000). Der Einfluss von Adipositas auf die Knochenstruktur und den Knochenstoffwechsel wird hingegen kontrovers diskutiert. Zusätzlichem Körpergewicht wird teilweise ein protektiver und begünstigender Einfluss auf den Knochenstatus, insbesondere für postmenopausale Frauen mit der Gefahr der Entwicklung einer Osteoporose, eingeräumt (Edelstein et al. 1993; Albala et al. 1996; Kirchengast et al. 2002; Nguyen et al. 2005; Reid 2008; Reid 2010). Vermutet wird, dass durch die zusätzliche biomechanische Stimulation des Knochens eine verbesserte

Knochenstruktur erzielt und die Stabilität des Knochens gesteigert wird (Ehrlich et al. 2002).

Im Widerspruch zu der These, dass sich ein erhöhtes Körpergewicht positiv auf den Knochenstatus auswirkt, stehen Studien mit erhöhter Frakturinzidenz bei übergewichtigen Jugendlichen im Vergleich zu ihren normalgewichtigen Altersgenossen (Manias et al. 2006; Taylor et al. 2006; Rana et al. 2009). Unabhängig von der Knochenstruktur ist festzustellen, dass übergewichtige Jugendliche im Vergleich zu normalgewichtigen Jugendlichen schlechtere Koordinationsfähigkeiten und ein eingeschränktes Körpergefühl haben (Hills et al. 1992; Colne et al. 2008). Beides trägt zu einem erhöhtem Frakturrisiko bei. Bei Messungen der Knochenmineraldichte bei übergewichtigen Jugendlichen wurde auch ein niedrigerer Knochenmineralgehalt bezogen auf das Gewicht gemessen (Goulding et al. 2000). Eine neuere prospektive klinische Studie mit übergewichtigen postmenopausalen Frauen zeigt eine erhöhte Frakturinzidenz (Compston et al. 2011) und steht somit im Kontrast zu den oben zitierten positiven Effekten des Übergewichts für den Knochenstatus.

Im Tiermodell bei Untersuchungen an Ratten, die eine fettreiche Ernährung erhielten, wurde eine erhöhte Brüchigkeit der Knochen und eine Reduktion des Knochenmineralgehaltes nachgewiesen (Ward et al. 2007).

Die kontrovers diskutierten Ansichten über den Einfluss der Fetternährung auf die Knochenstruktur und den Knochenstoffwechsel gilt es grundlegend zu untersuchen.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Knochenskelett

Das Knochenskelett hat Stütz- und Schutzfunktionen für den menschlichen Körper, besitzt Aufgaben in der Blutzellproduktion und in der Regulation des Kalzium- und Phosphathaushaltes. Die Knochen des Skelettes lassen sich nach Funktion und Aussehen bestimmten Kategorien zuordnen. In dieser Arbeit werden im Maus-Modell die langen Röhrenknochen (*Ossa longa*) und die zu den unregelmäßigen Knochen (*Ossa irregularia*) zählenden Wirbelkörper betrachtet. Sie sollen im nächsten Abschnitt genauer erklärt werden.

Die an den Extremitäten vorherrschende Knochenart sind lange, stabförmige Röhrenknochen. Sie lassen sich in verschiedene Abschnitte unterteilen. Die Enden der Röhrenknochen werden als Epiphysen bezeichnet und bilden die Gelenkflächen. Die Diaphyse bildet den in der Mitte liegenden röhrenförmigen Schaft. Als Metaphyse, die auch die Wachstumsplatte (Epiphysenfuge) enthält, wird ein Bereich zwischen Epiphyse und Diaphyse bezeichnet (Abb. 1).

Das Längenwachstum des Knochens wird maßgeblich durch die Epiphysenfuge beeinflusst. Durch die Umwandlung von Knorpelgewebe zu Knochengewebe wird ein interstitielles Wachstum der Röhrenknochen erzeugt. Nach Beendigung des Wachstums zum Ende der Pubertät verknöchert die Epiphysenfuge zur *Linea epiphysialis*.

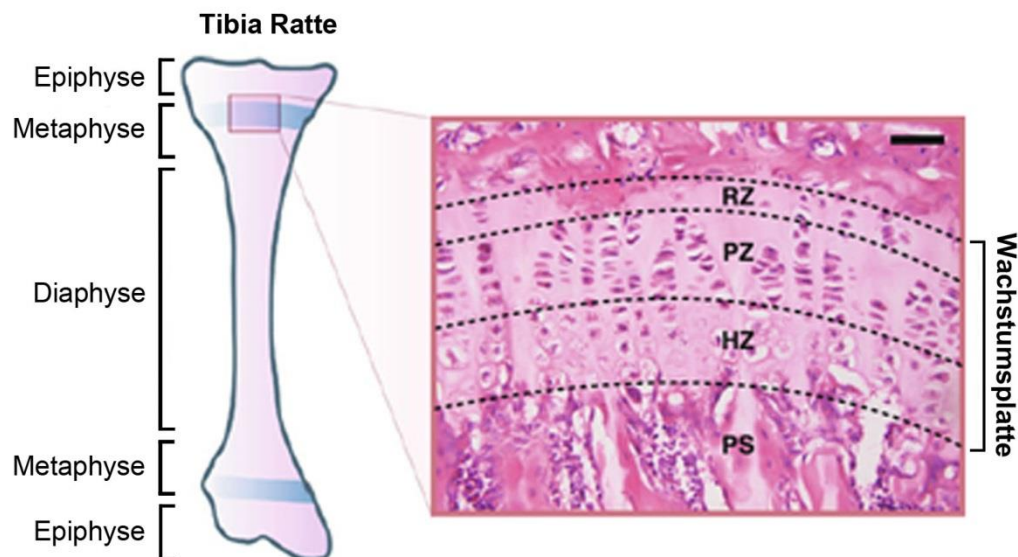
Der Innenraum von Epiphyse und Metaphyse in den Röhrenknochen, sowie der Innenraum anderer Knochenarten wird aus einem schwammartigen Netzwerk von Knochenbälkchen (*Substantia spongiosa*) gebildet (Abb. 2 b), das sich in Abhängigkeit von der auf den Knochen einwirkenden Druck- und Zugspannung ausbildet. Diese Knochenbälkchen weisen beim Erwachsenen eine Lamellenstruktur auf. Einzelne Lamellen können im histologischen Präparat durch eine kollagenfreie Zementlinie voneinander abgegrenzt werden. Umgeben ist dieses Netzwerk von Knochenbälkchen durch eine Wand aus kompaktem Knochengewebe, der *Substantia corticalis*. In den Zwischenräumen der *Spongiosa* befinden sich die Zellen des blutbildenden Knochenmarks.

Die *Substantia corticalis* bildet als äußere Hüllstruktur den kompakten Knochen. Auch hier weist der Knochen eine Lamellenstruktur auf. Diese besteht aus konzentrisch verlaufenden Lamellen, die um ein zentral liegendes Gefäß (Haversscher Kanal) angeordnet sind und zusammen das Osteon bilden. Osteone liegen nur im kompakten

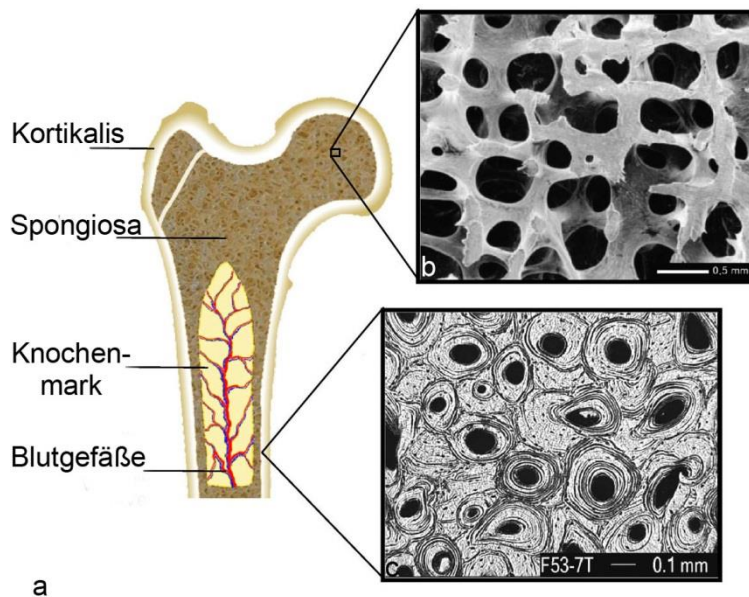
Knochen vor (Abb. 2 c) und sind im Röhrenknochen in Längsrichtung des Schaftes ausgerichtet.

Die Substantia corticalis der Diaphyse umschließt eine Markhöhle (Cavitas medullaris), die beim Erwachsenen mit Fettgewebe und gelbem Knochenmark gefüllt ist.

Die äußere Oberfläche des Knochens bildet das Periost. Es besteht aus zwei Schichten, einer inneren mit osteogenen und chondrogenen Vorläuferzellen (Stratum osteogenicum) und einer äußeren Schicht aus straffem kollagenen Bindegewebe (Stratum fibrosum). Innere Oberflächen im Markraum, den Gefäßkanälen und der Trabekel in der Spongiosa werden durch eine Zellschicht, dem Endost, bedeckt (Drenckhahn 2008).



**Abb. 1** Schematische Darstellung der Einteilung eines langen Röhrenknochens (Tibia einer Ratte) in die verschiedenen Abschnitte. Ausschnittsvergrößerung mit Einteilung der Epiphysenfuge der Ratte in die einzelnen histologischen Abschnitte: Reservezone (RZ), Proliferationszone (PZ), Hypertrophiezone (HZ) und den primären Trabekeln (PS). Modifiziert nach Wongdee et al. (2012).



**Abb. 2** Schematische Darstellung eines Längsschnittes durch einen Femur. Modifiziert nach Arola et al. (2010)

- Grobe Strukturierung des Aufbaus mit Kortikalis, dem spongiosen Anteil gebildet durch die Trabekel und dem in der Diaphyse befindlichen Knochenmark.
- Dreidimensionale Darstellung des porös aussehenden spongiosen Knochenanteils mit dem Trabekelnetzwerk.
- Darstellung des kompakten Knochens mit Osteonen und ihren konzentrisch um ein Blutgefäß angeordneten Lamellen.

Die zu den unregelmäßigen Knochen zählenden Wirbelkörper besitzen eine gemeinsame Grundform, die in den verschiedenen Regionen der Wirbelsäule unterschiedlich ausgeprägt ist. Der Wirbelkörper wird in Corpus vertebrae, den Wirbelbogen (Arcus vertebrae) mit seinen Fortsätzen (Processus) unterteilt. Wirbelkörper und Wirbelbogen bilden das Wirbelloch (Foramen vertebrae), in dem das Rückenmark mit Nerven und Blutgefäßen liegt.

Der Wirbelkörper besteht aus Spongiosa, dichten Knochenbälkchen, die meist senkrecht und parallel zu den Endflächen ausgerichtet sind und nach außen hin durch die Substantia corticalis umhüllt werden. Die Endflächen, Facies intervertebralis, stellen die Grund- und Deckplatten der Wirbelkörper dar und sind mit Ausnahme der Randleiste (Epiphysis anularis) von einer hyalinen Knorpelplatte bedeckt. Diese Fläche bildet eine Verbindung mit den Zwischenwirbelscheiben.

## 2.2 Anpassung des Knochens an die mechanische Belastungssituation

Die Knochenmatrix besteht zu 50-70% aus anorganischen Mineralien, meist Hydroxylapatit [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ], zu 20-40% aus organischer Matrix, aus 5-10% Wasser und aus <3% Fetten sowie zellulären Bestandteilen (Clarke 2008). Die organischen Anteile bestehen zu 85-90% aus Kollagen 1 (Brodsky et al. 2005) und der Rest sind weitere Kollagentypen und nichtkollagene Proteine.

Das Zusammenspiel aus organischen und anorganischen Bestandteilen ermöglicht der Knochenstruktur, auf die im Knochen wirkende Druck- und Zugspannung zu reagieren. Das Knochenskelett befindet sich in einem kontinuierlichen Umbauprozess zur Adaption auf physiologische oder mechanische Einflüsse und dem Ersatz mikrofrakturierter Bestandteile der Knochenstruktur. Knochen und Skelett werden so optimal an die einwirkenden Kräfte angepasst. Regionen im Knochen, die stark belastet sind, werden verstärkt. An Stellen mit geringerer Krafteinwirkung wird Knochen resorbiert. Diese Kombination aus gleichzeitigem Auf- und Abbau von Knochen wird als *Remodeling* bezeichnet (Ralston 1997).

Dieses direkte Ineinandergreifen des Knochenabbauprozesses durch resorbierende Zellen, sogenannte Osteoklasten, und dem Prozess des Knochenaufbaus durch Osteoblasten als eine funktionelle Einheit wird als „*Basic multicellular Unit*“ (BMU) bezeichnet (Jilka 2003; Eriksen 2010).

## 2.3 Knochenzellen

Die knochenaufbauenden Zellen, Osteoblasten, gehen aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen hervor (Owen 1988; Pittenger et al. 1999). Unter dem Zusammenspiel vieler Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel Runx-2 (Stein et al. 2004) oder Osterix, differenzieren sich die multipotenten mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten. Natürlich spielen auch Östrogene, Glucocorticoide, Vitamin D und das Parathormon hier eine wichtige Rolle. Für die Osteoblastenaktivierung und Rekrutierung neuer Zellen ist das *bone-morphogenetic protein-2 (BMP2)* wichtig (Khosla et al. 2008).

Die Aufgabe der einkernigen, annähernd kubischen Osteoblasten im Knochen besteht vor allem in der Synthese der Knochenmatrix und einer Kontrollfunktion für den Prozess des *Bone-remodelings* (Neve et al. 2011). Beim Knochenaufbau wird von den Osteoblasten Kollagen 1 synthetisiert und sezerniert sowie weitere Proteine, wie die alkalische Phosphatase und nichtkollagene Proteine (wie Osteocalcin (Bglap),

Osteopontin und Sialoproteine) exprimiert. Die alkalische Phosphatase ist ein in der Zellmembran der Osteoblasten verankertes Enzym, das für die Knochenmineralisation entscheidend ist. Osteocalcin ist ein Vitamin K abhängiger Osteoblasten spezifischer Marker, der an Hydroxylapatite für die Knochenmineralisation bindet (Cantatore et al. 2005). Das nicht gebundene Osteocalcin kann im Blut als Marker für den Knochenaufbau gemessen werden.

Neuere Studien zeigen, dass Osteocalcin an der Regulation des Blutglukosespiegels beteiligt zu sein scheint (Ducy 2011). Die Osteoblasten nehmen eine aktive Rolle im Zusammenspiel mit den für die Knochenresorption zuständigen Osteoklasten in der Beeinflussung der Regulation der Blutglukose ein (Clemens et al. 2011).

Osteopontin wird unter anderem von Osteoblasten in Abhängigkeit von mechanischem Stress auf den Knochen synthetisiert und beeinflusst die Knochenhomöostase durch Inhibition der Knochenmineralisation (Ishijima et al. 2007).

Knochensialoproteine fördern die Bildung von Hydroxylapatitkristallen zur Mineralisierung der Knochenmatrix und stimulieren die Osteoblastendifferenzierung (Gordon et al. 2007).

Die aktive Synthese der Knochenmatrix besteht zu Beginn hauptsächlich aus der Synthese von Kollagenfasern, die noch nicht mineralisiert sind. Diese nicht mineralisierte Proteinmatrix wird als Osteoid bezeichnet. Die Knochenmineralisierung durch die Einlagerung von Kalziumphosphat schließt sich dem Prozess der Kollagensynthese an (Neve et al. 2011).

Nach Beendigung der Synthese von Knochenmatrix können Osteoblasten sich auf drei Wegen weiter differenzieren: 1) Sie nehmen einen inaktiven Zustand ein und bilden an der endostalen Oberfläche endostale Saumzellen, sog. *bone lining cells*, die sich auch wieder zu aktiven Osteoblasten umwandeln können. 2) Sie werden als Osteozyten in den Knochen eingebaut. 3) Sie gehen in Apoptose (Rocheffort et al. 2010).

Die endostalen Saumzellen oder *bone lining cells* sind sehr flache Zellen und bedecken die Oberfläche der Trabekel und die Innenfläche der Kortikalis des Knochens. Sie bilden das Endost und regeln den Austausch von Mineralionen, können aber jederzeit wieder zu aktiven Osteoblasten rekrutiert werden. Der zusammenhängende Zellverband der endostalen Saumzellen mit den Nachbarzellen wird über adhärente Zellkontakte, die Cadherine beinhalten, *tight junctions* und Desmosomen hergestellt. Außerdem sind sie über *gap-junctions*, bestehend aus Connexin 43, metabolisch und elektrisch mit den Osteozyten verbunden (Clarke 2008). Beim Einbau von Osteoblasten in den mineralisierten Knochen entstehen in Lakunen liegende Osteozyten. Sie stellen 95% aller Knochenzellen. Während des Prozesses des Einmauerns der Osteoblasten in die Knochenmatrix verändert sich die

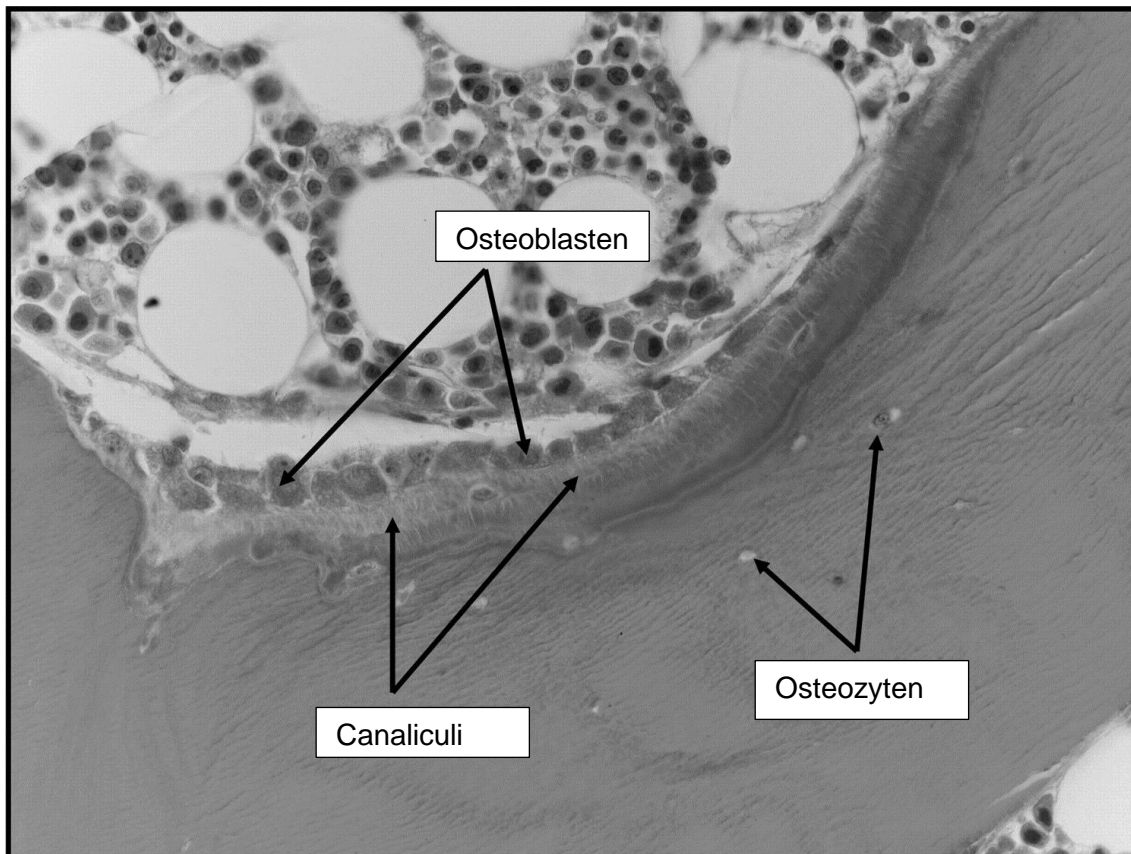
Zytoplasmastruktur. Eine Reduktion von endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat im Zytoplasma tritt ein. Die Proteinsynthese und -sekretion verringern sich. Die alkalische Phosphatase ist ein wichtiges Enzym der Osteoblasten, das von ausgereiften Osteozyten nicht mehr synthetisiert wird (Rochefort et al. 2010).

Trotzdem behält der entstehende Osteozyt über Zytoplasmafortsätze eine Verbindung zu den an der Oberfläche liegenden Osteoblasten und endostalen Saumzellen. In kleinen Knochenkanälen, den Canaliculi, liegen die Zytoplasmafortsätze der Osteozyten, die über *gap-junctions* mit den Zellen an der Knochenoberfläche sowie mit benachbarten Osteozyten verbunden sind (Abb. 3). Es entsteht ein Zellsynzytium, das eine metabolische und elektrische Einheit darstellt. Dieser Kontakt der Osteozyten untereinander ist entscheidend für die Reifung, Aktivität und das Überleben der Zelle (Clarke 2008; Rochefort et al. 2010).

Die Hauptaufgabe der Osteozyten besteht in der Mechanorezeption von auf den Knochen einwirkenden Kräften und deren Transduktion in biologische Signale. Es wird vermutet, dass Flüssigkeitsverschiebungen innerhalb des Canaliculissystems von den Osteozyten registriert werden und über Moleküldiffusion sowie über *gap-junctions* eine Signalweiterleitung an benachbarte Zellen erreicht wird. Diese Mechanorezeption und Signaltransduktion ermöglicht eine optimale Anpassung des Knochens auf mechanische Kräfte (Bonewald 2006; Taylor et al. 2007; Buo et al. 2014).

Auch die Apoptose eines Osteozyten induziert einen Knochenumbau an dieser Stelle und sichert so den Erhalt einer intakten Knochenstruktur (Cardoso et al. 2009; Rochefort et al. 2010).

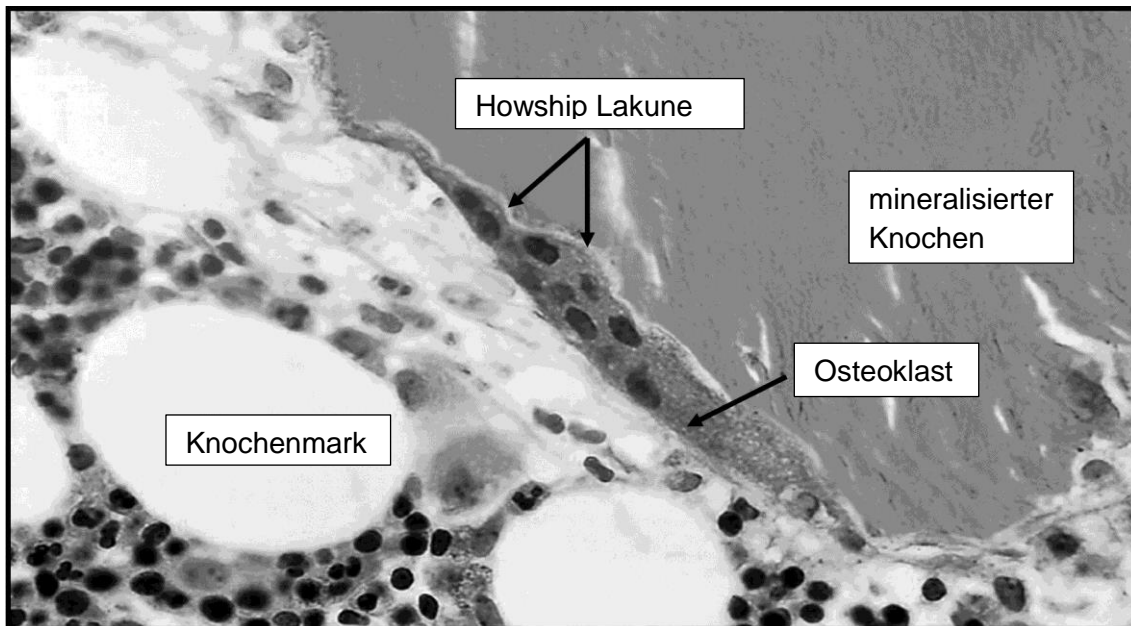




**Abb. 3** Darstellung von Osteoblasten an der Trabekeloberfläche. Osteoblasten synthetisieren die vor allem aus Kollagen 1 bestehende proteinreiche Matrix mit anschließender Mineralisierung zur Ausbildung des neuen Knochens. Modifiziert nach Clarke (2008).

Die ständigen Umbauprozesse des Knochens machen einen Abbau von überschüssiger Knochenmatrix erforderlich. Der Abbau der Knochenmatrix wird von multinukleären Riesenzellen, den Osteoklasten, vorgenommen. Osteoklasten differenzieren sich aus hämatopoetischen Stammzellen. Über die Fusion mehrerer einkerniger Vorläuferzellen bilden sich große multinukleäre Zellen, die meist in einer Resorptionslakune (Howship-Lakune) an der Trabekel- oder endostalen Oberfläche liegen (Edwards et al. 2011) (Abb. 4).

Für den Knochenresorptionsprozess spielt das Trabekelnetzwerk aufgrund seiner großen Oberfläche im Vergleich zum kompakten Knochengewebe eine entscheidende Rolle. Im kompakten Knochen liegen die Osteoklasten in Erosionstunneln vor (Drenckhahn 2008).



**Abb. 4** Multinukleäre Osteoklasten resorbieren die Knochenmatrix und formen die Resorptionslakune (Howship Lakune). Modifiziert nach Clarke (2008).

Die Differenzierung der Osteoklasten erfolgt unter dem Einfluss vieler Faktoren, wobei die beiden Zytokine *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand* (RANKL) und *macrophage-colony-stimulating-factor* (M-CSF) entscheidende Bedeutung besitzen.

RANKL ist ein membrangebundenes Protein, welches auf der Oberfläche von Osteoblasten und deren Vorläuferzellen exprimiert wird. Es bindet an den RANK-Rezeptor der zuvor durch M-CSF stimulierten Vorläuferzellen. Diese Interaktion ist ein entscheidender Schritt für die Differenzierung der Osteoklasten aus den Osteoklastenvorläuferzellen.

Osteoprotegerin ist ein Glycoprotein und wird von Osteoblasten sezerniert. Als sogenannter „*decoy-receptor*“ für RANKL hemmt es die Osteoklastogenese, indem es eine Bindung mit RANKL eingeht und dieser Ligand dann nicht mehr an den RANK-Rezeptor binden kann (Boyle et al. 2003; Teitelbaum 2007).

Die reifen Osteoklasten sind durch Expression des Markerproteins Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) gekennzeichnet und in der Lage, Knochen zu resorbieren. TRAP ist wahrscheinlich innerhalb Transzytose-Vesikel lokalisiert und für die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen und den Abbau der resorbierten Knochenmatrix verantwortlich (Vaananen et al. 2000).

Die Anhaftung der Osteoklasten an die Knochenoberfläche erfolgt mittels Integrinen (Ross et al. 2005). Gleichzeitig findet eine Polarisation durch Umorganisation des Zytoskelettes der Osteoklasten statt. An der Knochenoberfläche, dem apikalen Pol der

Zelle, entsteht der sogenannte Faltensaum oder „*ruffled border*“ (stark gefaltete Zellmembran). Veränderungen des Zytoskelettes vor allem durch die Umorganisation von Aktinfilamenten sorgen für die Entstehung einer Versiegelungszone, der sogenannten „*sealing zone*“. In der Peripherie mit engstem Kontakt zwischen Osteoklast und Knochenmatrix entsteht so ein abgeschlossenes Kompartiment. Über die in der Mitte des apikalen Pols stark gefaltete Zellmembran („*ruffled border*“) werden aktiv Wasserstoff-Ionen mithilfe von Protonenpumpen ( $H^+$ -ATPasen) sezerniert. Die Protonen werden im Zytoplasma unter Mitwirkung des Enzyms der Carboanhydrase gebildet. Das in der Howship-Lakune entstehende saure Milieu (pH ca. 4,5) sorgt für die Auflösung der anorganischen Bestandteile der Knochenmatrix. Weiterhin werden von den Osteoklasten proteolytische Enzyme (z.B. Cathepsin K (CtsK)) sezerniert, die für den Proteinverdau, vorrangig von Kollagen 1, verantwortlich sind (Teitelbaum 2007). Cathepsin K ist nicht nur verantwortlich für den Abbau von Kollagen 1, sondern es wird auch eine autokrine Funktion diskutiert, die zur Termination des Resorptionsvorganges des Osteoklasten beiträgt (Wilson et al. 2009).

Durch den aktiven Abbau der Knochenmatrix durch Osteoklasten können Defekte in der Knochenstruktur entfernt und durch Interaktion mit den Osteoblasten durch neuen mechanisch belastbareren Knochen ersetzt werden. Osteoklasten sind damit unerlässlich für den Erhalt eines stabilen und belastbaren Knochens.

## **2.4 Wachstum der Röhrenknochen und Wirbelkörper**

Bei der Knochenentwicklung unterscheidet man zwei Prozesse, in denen aus osteogenen und chondrogenen Mesenchymverdichtungen Knochengewebe entsteht. Die direkte Umwandlung des mesenchymalen Bindegewebes in Knochengewebe wird als desmale Ossifikation bezeichnet. Die Knochen des Schädeldachs, der Gesichtsschädel und das Schlüsselbein entstehen durch desmale Ossifikation.

Die zweite Art der Knochenbildung für das restliche Skelett findet über ein sich aus den Mesenchymverdichtungen entwickelndes Knorpelmodell als Zwischenschritt statt. Diese indirekte Knochenbildung wird als chondrale (kartilaginäre) Ossifikation bezeichnet (Drenckhahn 2008). Sie erfolgt entweder als Umwandlung des Knorpelgewebes in Knochengewebe (enchondrale Ossifikation) oder durch Anlagerung von Knochengewebe auf die Knorpeloberfläche im perichondralen Bindegewebe (perichondrale Ossifikation). Die enchondrale Ossifikation ist für das Längenwachstum

entscheidend. Das Dickenwachstum von Knochen wird durch die perichondrale Ossifikation erreicht (Drenckhahn 2008).

Für das Längenwachstum des Röhrenknochens ist die Epiphysenfuge entscheidend. Im Bereich der Epiphysenfuge findet eine Proliferation von Knorpelgewebe statt. Dieses entstehende Knorpelgewebe wird in der gleichen Geschwindigkeit, in der es im Bereich der Epiphysenfuge proliferiert, von der Markhöhle aus in Knochen umgewandelt. Dieser Prozess hat zur Folge, dass eine auf die Diaphyse bezogene Verlagerung der Epiphysenfuge zu den Knochenenden hin stattfindet. Die Proliferation von Knorpelgewebe in der Epiphysenfuge und die Entstehung von Knochengewebe erfolgen in gleicher Geschwindigkeit, was ein entscheidendes Merkmal für den kontinuierlichen Wachstumsprozess ist. Erst beim Verschluss der Epiphysenfuge wird dieses Gleichgewicht zwischen der Proliferation von Knorpelgewebe und der Ossifikation aufgehoben. Die Proliferationsrate der Knorpelzellen wird verringert und es kommt zur Ossifikation des restlichen Knorpelgewebes. Die Epiphysenfuge schließt sich und das Längenwachstum ist abgeschlossen.

Die Epiphysenfuge kann in Zonen eingeteilt werden (Abb. 1). An der Grenze der Epiphyse zur Epiphysenfuge liegt die Reservezone aus hyalinem Knorpel mit einem Vorrat an Knorpelzellen (Chondrozyten). In Richtung der Diaphyse folgt die Proliferationszone, in der mitotisch aktive Chondrozyten vorliegen und sich säulenförmig anordnen (Säulenknorpel). Dieser interstitielle Wachstumsdruck sorgt für die Verschiebung der Epiphyse von der Diaphyse. In der Hypertrophiezone findet eine Volumenvergrößerung der Zellen statt, die wesentlich für das Längenwachstum ist. Im Übergang zwischen der Hypertrophiezone und der Eröffnungszone/Resorptionszone verkalken die longitudinalen Septen. Diese Longitudinalsepten befinden sich zwischen den säulenförmig angeordneten Knorpelzellen. Am Ende liegen die Knorpelzellen zwischen den verkalkten Säulen vor. Sie gehen durch Apoptose zugrunde. Blutgefäße sprießen ein und Osteoblasten belegen die nun freiliegende, mineralisierte longitudinale Knorpelmatrix mit Osteoid. Diese Osteoidbildung findet in der Ossifikationszone statt. Nur jedes dritte Longitudinalseptum wird zu einem primären Knochenbälkchen (Trabekel) ausgebaut. Die anderen Longitudinalsepten werden durch Chondroklasten abgebaut. Später werden diese Primärtrabekel mit ihrem Kern aus Knorpelmatrix und der Geflechtknochenstruktur durch Sekundärtrabekel aus Lamellenknochen ersetzt (Drenckhahn 2008; Lüllmann-Rauch et al. 2012; Wongdee et al. 2012).

### 3 Fragestellung

Übergewicht aufgrund falscher Ernährungs- und Verhaltensweisen ist nachgewiesenermaßen ein Risikofaktor für einige sog. „Zivilisationskrankheiten“ (z.B. Diabetes, kardivaskuläre Erkrankungen und Tumorerkrankungen). Nicht eindeutig geklärt sind die Auswirkungen einer fettreichen Ernährung auf das Knochenskelett. Diese werden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Das Ziel dieser Studie ist, die Einwirkung der Fetternährung auf die Knochenstruktur, insbesondere die Ultrastruktur der Trabekel, im Mausmodell darzustellen und zu überprüfen, ob der Knochenstoffwechsel durch die Fetternährung und die daraus folgende Gewichtszunahme beeinflusst wird.

Folgende Fragen stehen im Vordergrund:

- 1) Hat eine fettreiche Ernährung im Mausmodell einen Einfluss auf die Ausprägung der Knochenstruktur von Mäusen?
- 2) Beeinflusst die Fetternährung die Genexpression von Zellen für den Knochenumbau?
- 3) Treten ultrastrukturelle Veränderungen innerhalb des Trabekelgerüsts durch die Fetternährung auf?
- 4) Werden die Zellmorphologie und Zellinteraktion von Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten verändert?

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten mittelfristig im Bereich der Orthopädie und Unfallchirurgie zu einer Veränderung von Therapiestrategien, z.B. bei der Verankerung von Endoprothesen führen. Gesundheitspolitische Zielsetzungen könnten entsprechend angepasst werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Tiermodell

Im untersuchten Tiermodell wurden Mäuse mit fettreicher Ernährung im Vergleich zu Tieren mit normalem Fettgehalt im Futter bezüglich ihres Knochenstatus analysiert. Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche C57BL/6J Mäuse (Janvier, Saint Berthevin, Frankreich) mit einem Alter von 4 Wochen bei Versuchsbeginn. Die Tiere wurden in Gruppen in Käfigen mit Sägemehleinstreu bei einer Umgebungstemperatur von  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60% und einem 12 stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Altromin-Pressfutter (siehe Tab. 1; Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland). Das Pressfutter enthielt für die Kontrolldiät einen Rohfettgehalt von ca. 4%, so dass 10% der umsetzbaren Energie des Futters aus Fett gewonnen werden. Für die Versuchsgruppe mit der Fetternährung wurde Pressfutter mit einem Rohfettgehalt von ca. 34% verwandt, d.h. 60% des umsetzbaren Energieanteils des Futters stammten aus dem Fettanteil („*high-fat diet*“). Der Versuchszeitraum erstreckte sich über 23 Wochen, wobei pro Woche jeweils das Gewicht der Tiere und der Blutzuckerspiegel mit einem Blutzuckermessgerät OneTouch® UltraEasy® (LifeScan, Neckargemünd, Deutschland) bestimmt wurden. Der Blutstropfen für die Blutzuckermessung wurde aus der Schwanzvene nüchternen Tiere entnommen. Die Angaben des Blutzuckerspiegels erfolgten in mg/dl. Zum Zeitpunkt der Euthanasie (Ende der 27 Lebenswoche) wurde keine Blutzuckermessung mehr vorgenommen, sondern nur das Gewicht bestimmt.

Der Tierversuch war genehmigungspflichtig und wurde vom Regierungspräsidium Gießen unter dem Aktenzeichen GI20/11-Nr. A17/2010 geführt.

	<b>Kontrolldiät</b>	<b>Fettdiät</b>
Eiweißanteil % (g/kg)	24 (210)	17 (214)
Fettanteil % (g/kg)	10 (40)	60 (350)
Kohlenhydratanteil % (g/kg)	66 (558)	23 (195)
Energiedichte (kJ/kg)	14.767	20.964
Vitamin D (IE/kg)	500	500
Calcium (mg/kg)	7.402	7.209
Phosphat (mg/kg)	6.522	5.348

**Tab. 1** Übersicht über die Diätkomponenten (www.Altromin.de, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland)

#### 4.1.1 Probenentnahme und Studiendesign

Für die Untersuchungen wurden jeweils 6 Tiere der Kontrollgruppe (10% des umsetzbaren Energieanteils aus Fett  $\triangleq$  Kontrolldiät) und 7 Tiere der Versuchsgruppe (60% des umsetzbaren Energieanteils aus Fett  $\triangleq$  Fetternährung) verwendet. Die Euthanasie der Mäuse erfolgte durch CO<sub>2</sub>-Inhalation. Anschließend wurde die Dual-X-Ray Absorptiometry (DXA-Messung) zur Bestimmung der Knochendichte durchgeführt. Daraufhin wurden die spezifischen Gewebeteile freipräpariert, entnommen und für die weiteren Schritte entsprechend aufgearbeitet (Abb. 5).

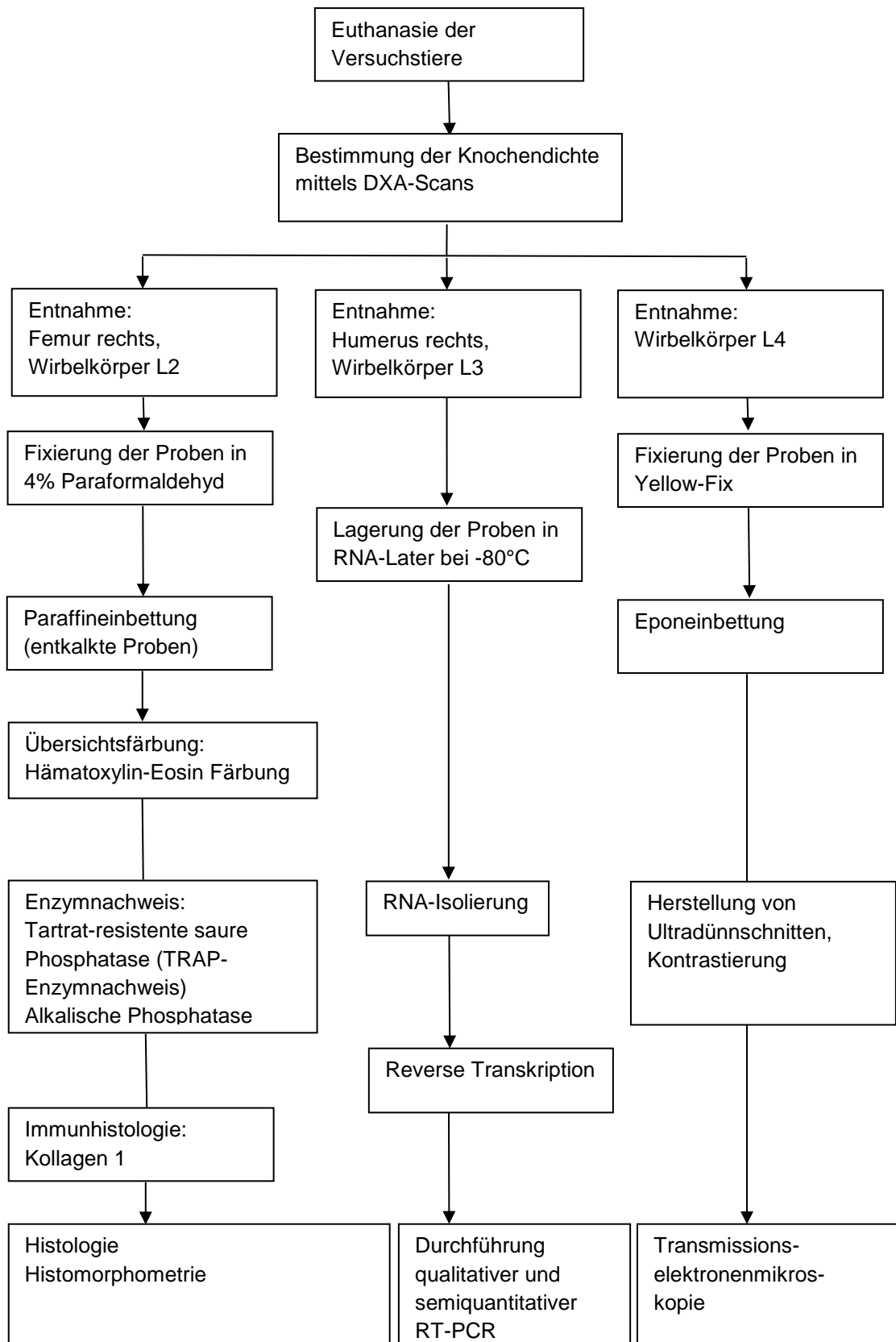


Abb. 5 Studiendesign



## 4.2 Dual-X-Ray Absorptiometry

Unmittelbar nach der Euthanasie der Versuchstiere wurde eine Knochendichtemessung mithilfe des DXA-Scans (lunar prodigy, GE Healthcare, München, Deutschland) durchgeführt. Die Mäuse wurden auf dem Gerät in Brustlage positioniert und die Messung erfolgte. Mit der DXA-Messung wurde der Knochenmineralgehalt in verschiedenen Bereichen, den sogenannten Regions of Interests (ROIs), quantitativ erfasst. Es handelt sich hierbei um Tibia links, Tibia rechts, Wirbelsäule und das gesamte Skelett. Die Messung des Mineralgehaltes des Knochens erfolgt bei dieser Methode durch zwei Energiestrahlen (Photonenstrahlen) unterschiedlicher Intensität. Die Absorption der Photonenstrahlen im Gewebe wird gemessen, wobei durch das Gerät eine automatische Korrektur der Werte bei unterschiedlicher Weichteilabsorption durchgeführt wird. Diese automatische Standardisierung des Verfahrens durch das Gerät schafft eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Daten zwischen den verschiedenen Tieren (Bartl 2004).

Der Knochenmineralgehalt in g bezogen auf die gemessene Fläche des dargestellten Bereichs in  $\text{cm}^2$  ergab die dargestellte Knochenmineraldichte (*bone mineral density*, BMD) in  $\text{g}/\text{cm}^2$ . Die Analysesoftware (enCORE software, GE Healthcare, Version 13.40, München, Deutschland) besitzt eine spezielle Kleintier-Einstellung zum Erhalt möglichst exakter Werte. Vor jedem Neustart des Geräts wurde eine Kalibration mittels eines standardisierten Phantom-Patienten nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Auswertung der Knochenmineraldichte in den verschiedenen Bereichen erfolgte mit der statistischen Analysesoftware SPSS (SPSS, Chicago, Illinois, USA) unter Verwendung des Mann-Whitney-Tests (siehe Kapitel 4.9).

## 4.3 Histologische Verfahren

Von den Versuchstieren wurden jeweils das rechte Femur und der zweite Lumbalwirbel in Paraffin eingebettet. Für die Paraffineinbettung wurden die Präparate in 4% Phosphat-gepuffertes Paraformaldehyd pH 7,4 (PFA, Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 6 Stunden (h) in den Probengefäßen gelagert und damit fixiert.

Anschließend erfolgte insgesamt eine 6-malige Spülung der Proben in den Einbettkapseln mit 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,4). Dann wurden die Proben

mit 0,281 M Tris-Puffer mit 10% Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Merck, Darmstadt, Deutschland) behandelt und damit entkalkt.

Nach dem Entkalken wurden die Proben ca. 1 h unter Leitungswasser gespült und vor der Paraffineinbettung durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70% für 2 h, 80% für 2,3 h, 96% für 2 h, 100% für 3 h, 100% für 3 h, 100% für 3 h) entwässert. Eine 3-malige Inkubation (1 h und 2 x 45 Minuten (min)) in Xylol (VWR, Fontenay-sous-Bois, Frankreich) wurde vor der anschließenden Überführung in flüssiges Paraffin durchgeführt. Diese Schritte wurden automatisch im Leica-Paraffin-Einbettautomaten TP1050 (Leica, Bensheim, Deutschland) vorgenommen. Das Ausbetten der Präparate an der Paraffinausgießstation (Leica) erfolgte am nächsten Tag, wobei die Präparate in den Paraffinblöcken auf beschrifteten Plastikformen aushärteten.

Von diesen Paraffinblöcken wurden Schnitte mit einer Dicke zwischen 4-5 µm mit einem Rotationsmikrotom (Leica RM 2155, Leica) hergestellt, auf Objektträger aufgezogen, beschriftet und im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

#### **4.3.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung)**

Zur Entparaffinierung wurden eine 2 x 5 min Inkubation in Xylol (VWR) und eine je 5 min dauernde Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte wieder in destilliertem Wasser (Aqua dest) hydriert, mit Mayers Hämalaunlösung (Kernfärbung, Merck, Darmstadt, Deutschland) 3,5 min inkubiert und dann mit Aqua dest abgespült und zum Bläuen 10 min lang in der Küvette unter fließendes Leitungswasser gestellt.

Mit einer 1% Eosinlösung (Eosin G, gelblich, Merck) erfolgte für ca. 55 Sekunden (sec) die Bindegewebsfärbung. Nach erneutem Spülen mit Aqua dest und der Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und anschließender 2 x 5 min Inkubation in Xylol wurden die Schnitte in DePex (Serva, Heidelberg, Deutschland) eingedeckelt.

## **4.4 Enzymnachweis**

### **4.4.1 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)**

Die Entparaffinierung erfolgte über die Inkubation in Xylol (VWR) und in einer absteigenden Alkoholreihe. Die Schnitte wurden für 10 min in 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,2) gespült und mit einer Färbelösung aus 25 ml Na-Acetatpuffer pH 5,2 (35 mg gelöstem Naphthol-AS-TR-Phosphat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 125 µl N-N-Dimethylformamid (DMF, Sigma-Aldrich), 57,5 mg Na-Tartrat (di-Natriumtartrat-Dihydrid, Merck) und 35 mg Echtrotsalz (Fast Red TR salt, Aldrich, Milwaukee, WI, USA)) versetzt und anschließend für 30 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Spülen in Aqua dest erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Die Präparate wurden mit Kaisers Glycingelatine (Merck) eingedeckelt und härteten über Nacht aus.

### **4.4.2 Alkalische Phosphatase**

Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte zur Anfärbung der alkalischen Phosphatase mit dem gelösten Phosphatasesubstrat 5-Bromo-4Chloro-Indolyl-Phosphat (BCIP) mit Nitro-Blau-Tetrazoliumsalz (NBT) (KPL, Gaithersburg, MD, USA) bedeckt und für 45 min in einer feuchten Kammer bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach zweimaligem Spülen mit Aqua dest erfolgte die Gegenfärbung mit Kernechtrot (Roth) mit einer Inkubationszeit von 15 min. Eine Stabilisierung der Färbung wurde durch ein 15 minütiges Spülen der Objektträger mit fließendem Leitungswasser erreicht. Anschließend erfolgte die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol (VWR) sowie das wasserfreie Eindecken mit DePex (Serva).

Alle histologischen Schnitte wurden lichtmikroskopisch mit dem Fotomikroskop vergrößert (Axiophot-2, Zeiss, Jena, Deutschland) und mit einer dem vorderen Lichtweg aufgesetzten Digitalkamera (Leica DC 500, Leica, Bensheim, Deutschland) digital dokumentiert. Bei der Beurteilung wurden jeweils die Schnittebenen in den Präparaten und die Lokalisation der Struktur im Gruppenvergleich betrachtet.

Das Einfügen einer maßstabsgerechten Skalierung wurde mit Adobe Photoshop CS5 (Adobe, San Jose, CA, USA) vorgenommen.

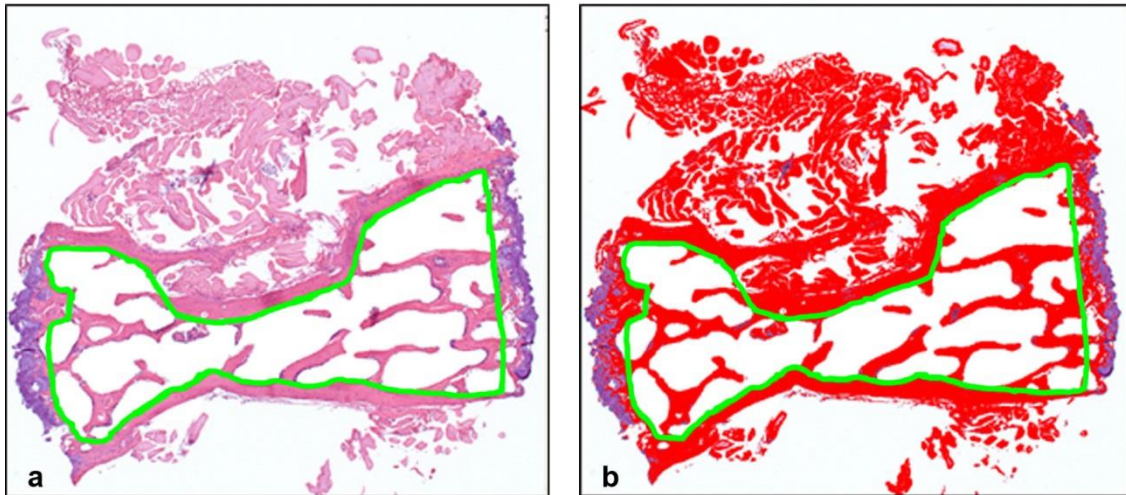
## 4.5 Histomorphometrie

Eine quantitative Aussage über die Veränderung in der Knochenstruktur kann durch die Methode der histomorphometrischen Bestimmung des Knochenanteils pro Gesamtgewebefläche in den zweidimensionalen Knochenschnitten erfolgen (Compston 1998). Durchgeführt wurde eine histomorphometrische Bestimmung der Trabekelfläche in  $\text{mm}^2$  pro markierter Gesamtfläche in beiden Gruppen.

Die Vermessung der Trabekelstruktur erfolgt an HE-Schnitten des Femurs sowie des 2. Lumbalwirbels (L2), die zuvor mit dem Fotomikroskop (Axiophot-2) bei 5-facher Vergrößerung bei einer Auflösung von 1300 x 1030 aufgenommen und mit Adobe Photoshop CS5 wieder zu einem Gesamtbild zusammengefügt wurden.

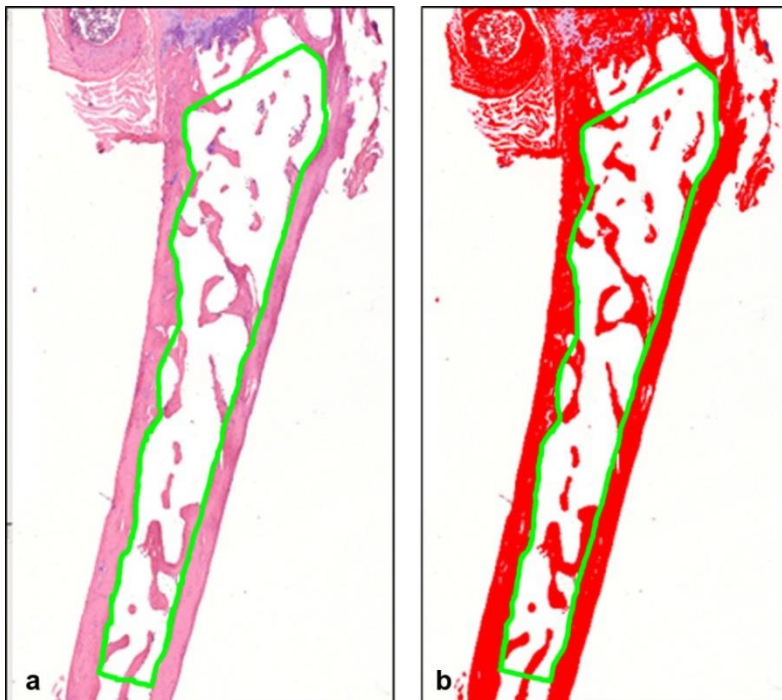
Mit der Vermessungssoftware Image-Pro Plus Software (Media Cybernetic, Maryland, USA) wurde eine sogenannte „Area of Interest“ (AOI) vom Untersucher unter Beachtung folgender Kriterien festgelegt. Ausgeschlossen aus der Markierung als AOI wurden die Kortikalisanschnitte. Die AOI wurde zur spongiösen Seite der Kortikalis gezogen und umschloss so nur den spongiösen Teil des Knochenanschnitts. Bei den Femuranschnitten wurden jeweils der proximale und der distale Anschnitt vermessen. Außerdem wurde im Bereich der Epiphysenfuge nach individueller Beurteilung des Präparates eine Linie zur Abgrenzung der AOI in der Ossifikationszone zwischen dem reinen Geflechtknochenanteil und den sich bildenden Knochen trabekeln gezogen.

Zur Berechnung der Trabekelfläche wurde diese im Programm farblich markiert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der Trabekelfläche zur vorher durch die AOI definierte Gesamtfläche (in  $\text{mm}^2$ ) berechnet. Zum Ausschluss von Verfälschungen der Messwerte durch farbliche Übereinstimmungen von Knochenmark und Trabekelstruktur wurde das Knochenmark zuvor mit Adobe Photoshop CS5 manuell geweißt.



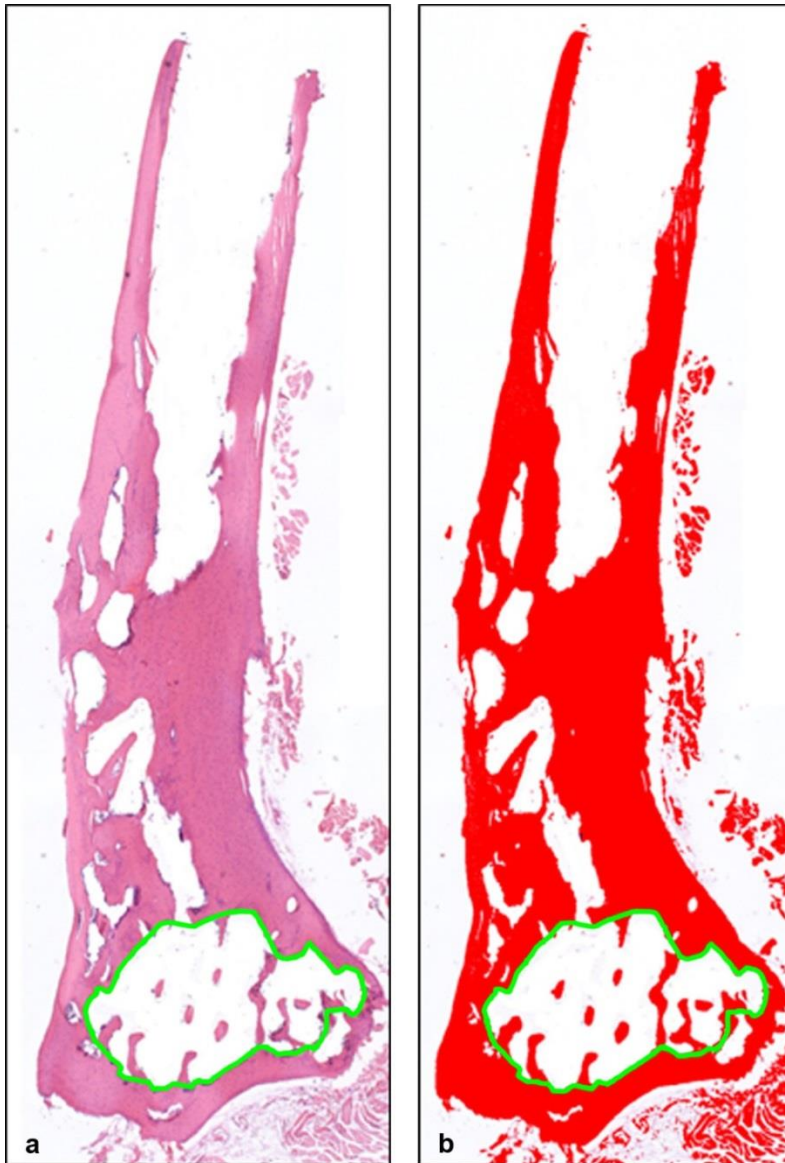
**Abb. 6** Festlegung „Area of interest“ (AOI) im Wirbelkörper L2 Paraffinschnitt bei 5-facher Vergrößerung, Maus aus der Kontrollgruppe. Die Fläche innerhalb des grün umrandeten Bereichs zeigt die Area of interest (AOI).

- a) Kontrollgruppe mit definierter AOI als Gesamtfläche
- b) Kontrollgruppe mit definierter AOI und der farblichen Markierung der Trabekelfläche für die Messung



**Abb. 7** Festlegung „Area of interest“ (AOI) im proximalen Femur Paraffinschnitt bei 5-facher Vergrößerung, Maus aus der Kontrollgruppe. Die Fläche innerhalb des grün umrandeten Bereichs zeigt die Area of interest (AOI).

- c) Proximales Femur Kontrollgruppe mit definiertem AOI als Gesamtfläche
- d) Proximales Femur Kontrollgruppe mit definiertem AOI und farblicher Markierung der Trabekelfläche für die Messung



**Abb. 8** Festlegung „Area of interest“ (AOI) im distalen Femur Paraffinschnitt bei 5-facher Vergrößerung, Maus aus der Kontrollgruppe. Die Fläche innerhalb des grün umrandeten Bereichs zeigt die Area of interest (AOI).

- a) Distaler Femur Kontrollgruppe mit definiertem AOI als Gesamtfläche
- b) Distaler Femur Kontrollgruppe mit definiertem AOI und farblicher Markierung der Trabekelfläche für die Messung

Die Ergebnisse der Beziehung zwischen der Gesamtfläche und der anteilig gemessenen Trabekelfläche wurden mithilfe der SPSS-Software unter Anwendung des Mann-Whitney-Tests ausgewertet.

## 4.6 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Um den Einfluss der *high-fat diet* der Tiere auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurde die Methode der RT-PCR gewählt. Hierbei wird die mRNA isoliert, durch reverse Transkription cDNA gewonnen und anschließend in die RT-PCR eingesetzt.

### 4.6.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels Trizol aus dem gesamten Humerus und dem Wirbelkörper L3. Die in RNA-later® (Ambion Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) konservierten und bei -80°C bis zur Aufarbeitung gelagerten Proben wurden mit einem Mörser zerkleinert, wobei das Material ständig mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde. Dieses erleichterte das Zerkleinern der Knochenproben und verbesserte damit die Qualität der Ausbeute von RNA aus dem Probenmaterial. Zur Isolierung der RNA wurde 1 ml Trizol (Trizol Reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in die Mörserschale mit dem zerkleinerten Knochenmaterial gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Knochenmehl wurde mit 200 µl Chloroform (Chloroform 99%, Sigma-Aldrich, St.-Louis, MO, USA) pro ml Trizol versetzt, leicht geschüttelt und für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Phasentrennung der Probe wurde durch das Zentrifugieren (Mikro 22R, Hettich Zentrifugen, Nierenstein, Deutschland) bei 12000 g, 4°C für 15 min erreicht. Die helle obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol (2-Propanol, Sigma-Aldrich) pro ml Trizol zur RNA-Fällung versetzt. Kurzes Durchmischen der Probe und dann erneutes Anzentrifugieren bei 12000 g, 4°C für 10 min komplettierten den Schritt der RNA-Fällung. Die RNA-Waschung des entstandenen Pellets am Cup-Boden erfolgte mit 1 ml 75% Ethanol, gelöst in 0,1% Diethylpyrocarbonat-H<sub>2</sub>O (DEPC-H<sub>2</sub>O) pro ml eingesetztem Trizol. Nach erneutem Anzentrifugieren 7500 g, 4°C für 5 min und Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 25 µl 0,1% DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und bei -80°C gelagert.

### 4.6.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Messung der RNA-Konzentration und ihrer Reinheit erfolgte mittels UV-Spektrometer (Biochrom, Cambridge, England) bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ). Das Photometer wurde zunächst mit 100 µl RNase freiem Wasser (Aqua ad injectabilia, Braun, Melsungen, Deutschland) in der Einmalküvette (Brand, Wertheim, Deutschland) geeicht. Zur Bestimmung der Konzentration wurden in die Einmalküvette 99 µl Aqua ad injectabilia vorgelegt und je 1 µl RNA der Probe hinzugegeben.

Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgte durch das Gerät nach folgender Formel:

$$\text{RNA-Konzentration} = 44 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Umrechnungsfaktor 44  $\mu\text{g/ml}$  entspricht einer Konzentration bei einem gemessenen Absorptionswert von 1 bei einer Wellenlänge von  $A_{260}$ . Bei einer Verdünnung von 1:100, sprich 99  $\mu\text{l}$  RNase freies Wasser/ Aqua ad injectabilia und 1  $\mu\text{l}$  RNA, war der Verdünnungsfaktor jeweils 100. Die Reinheit der RNA-Probe wurde durch das Verhältnis von  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  gemessen. Das Absorptionsmaximum von  $A_{280}$  misst die Verunreinigung der Probe mit Proteinen. Bei den untersuchten Proben lag die Reinheit überwiegend im Bereich von 1,4 bis 1,6. In den nachfolgenden Untersuchungen reichten diese Werte für die cDNA-Synthese aus.

### **4.6.3 cDNA-Synthese**

Die Herstellung der cDNA erfolgte mit der reversen Transkription der gesamten vorher isolierten RNA aus dem Knochenmaterial. Hierzu wurde das QuantiteTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß Herstellerangaben verwendet.

Zur reversen Transkription wurde jeweils 1  $\mu\text{g}$  isolierte RNA eingesetzt, die Probe mit 2  $\mu\text{l}/\mu\text{g}$  DNA Wipeout Buffer (Kit Bestandteil) versetzt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 14  $\mu\text{l}$  aufgefüllt.

Nun erfolgte eine 2-minütige Inkubation bei 42°C zur Elimination der genomischen DNA, die eine Kontamination der Proben darstellt und später zur Verfälschung der Werte bei der RT-PCR führen würde. Für den Schritt der reversen Transkription wurden 1  $\mu\text{l}$  Quantiscript Reverse Transcriptase, 4  $\mu\text{l}$  Quantiscript RT Buffer und 1  $\mu\text{l}$  RT Primer Mix (alles Kit Bestandteile) hinzugegeben. Der Primer-Mix besteht aus einer Mischung aus Olig(dT)- und Random-Primern. Nun erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt für 30 min bei 42°C, der durch Erhitzen auf 95°C für 3 min beendet wurde und damit die Aktivität der reversen Transkriptase stoppte. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Zur Überprüfung der Elimination der genomischen DNA mittels des ubiquitär exprimierten Referenzgenes  $\beta$ -Actin in einer qualitativen RT-PCR wurde jeweils ein RT- Ansatz im gleichen Schritt mit erstellt, bestehend aus 1  $\mu\text{l}$  RNase freiem Wasser anstatt des Enzyms der reversen Transkriptase. Alle Inkubationsschritte zur Generierung der cDNA wurden im Thermocycler (TC 3000 Techne, Bibby Scientific, USA) vorgenommen.



#### 4.6.4 Qualitative RT-PCR zur Überprüfung der Elimination der genomischen DNA

Die Überprüfung der Elimination der genomischen DNA wurde mit Hilfe einer qualitativen RT-PCR unter Verwendung des ubiquitär exprimierten Referenzgenes  $\beta$ -Actin vorgenommen. Die RT-PCR wurde mit dem AmpliAq Gold with GeneAmp Kit (Roche Applied Biosystems, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Der für die RT-PCR angesetzte Mastermix bestand aus 18,125  $\mu$ l RNase-freiem Wasser (Aqua ad injectabilia), 2  $\mu$ l  $MgCl_2$  (1 mM, Roche Applied Science), 2,5  $\mu$ l PCR-Puffer II (Roche Applied Science), 0,625  $\mu$ l dNTP-Mix (Applied Biosystems), 0,625  $\mu$ l Primer ( $\beta$ -Actin: forward+reverse, 20  $\mu$ M, siehe Tab. 2) und 0,125  $\mu$ l AmpliAq Gold Polymerase (Roche Applied Science). Diesem Gesamtvolumen von 24  $\mu$ l an Mastermix wurden jeweils 1  $\mu$ l cDNA bzw. 1  $\mu$ l der Negativkontrolle der reversen Transkription (RT-) hinzugefügt.

Die Denaturierung der DNA-Doppelstränge erfolgte bei 95°C für 12 min. Danach bestand das RT-PCR-Protokoll für 40 Zyklen aus folgenden Schritten. Die neu synthetisierte DNA wurde für 20 sec auf 95°C erhitzt und denaturierte im nächsten Zyklus erneut. Die Primeranlagerung (Annealing) erfolgte im nächsten Schritt bei 58°C für 20 sec. Der neue Strang wurde bei 72°C von der DNA-Polymerase AmpliAqGold zwischen dem forward und reversed Primer synthetisiert. Diese Schritte wurden in 40 Zyklen wiederholt. Am Ende erfolgte eine Replikationsphase von 7 min bei 72°C und anschließender Abkühlung der RT-PCR-Produkte auf 4°C. Alle Reaktionsschritte fanden im Techne Thermocycler (TC-3000 Techne) statt.

#### 4.6.5 Gelelektrophorese

Zur Beurteilung der RT-PCR-Produkte wurde die DNA elektrophoretisch in einem Gel aufgetrennt. Das Gel war ein 2% Agarosegel bestehend aus Agarose (Roth) und Trisaminomethan (Tris-Base)-Acetat-Ethyldiamintetratessigsäure (EDTA) (TAE). Das TAE setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 245 g Tris-Base (Sigma-Aldrich), 57,1 ml Essigsäure (Merck), 100 ml 0,5 M EDTA (Invitrogen) und zweifach destilliertes Wasser ( $H_2O$  bidest).

Nach Aushärtung des 2% Agarosegels erfolgte die Beladung der Geltaschen. Am Rand wurde jeweils 8  $\mu$ l des standardisierten 100 bp-Markers in die erste Tasche pipettiert. Die Zusammensetzung des 100 bp-Markers war 4  $\mu$ l PerfectSize (5Prime, Hamburg, Deutschland) 100 bp XL Ladder-100 (5Prime), 12  $\mu$ l DNA Gel Loading Buffer (5Prime) und 104  $\mu$ l  $H_2O$  bidest. Nun wurden die weiteren Taschen mit 6  $\mu$ l der

RT-PCR-Produkte, die vorher mit 2 µl DNA Gel Loading Buffer (5Prime) zur Sichtbarmachung des elektrophoretischen Auftrennvorgangs versetzt wurden, beladen.

Die Auftrennung der DNA erfolgte in einer mit TAE gefüllten Kammer bei einer Spannung von 110 mV für ca. 45 min. Zur Färbung des Gels wurde eine Färbelösung aus 60 ml TAE und 6 µl SYBR-Green Lösung (SYBRGreen I nucleic acid gel stain, Sigma-Aldrich) hergestellt, in der das Gel für ca. 30 min inkubierte.

Zur Darstellung der DNA-Banden wurde anschließend das Gel unter UV-Licht in die Geldokumentationskammer (UV Solo Manual, Biometra, Göttingen, Deutschland) gelegt und das Bild mittels Drucker auf Thermopapier ausgedruckt bzw. als elektronische Bilddatei gespeichert.

Überprüft wurde das Gelbild im Hinblick darauf, ob die Produktgröße (165 bp bei  $\beta$ -Actin) der Höhe der entsprechend mitgelaufenen Markerbande entsprach und ob bei der Negativkontrolle (RT-) eine Bande sichtbar war. Dieses entspräche einer genomischen DNA-Kontamination und würde eine weitere Verwendung ausschließen.

#### **4.6.6 Etablierung der real-time RT-PCR**

Die Etablierung der real-time RT-PCR fand im Lightcycler (LightCycler® 2.0 Roche, Roche Instrument Center AG, Rotkreuz, Schweiz) statt. Es wurden jeweils Verdünnungsreihen aus vorher gepoolter cDNA der Proben erstellt. Für jeden Primer wurden in Doppelbestimmung folgende Ansätze erstellt: unverdünnte cDNA, 1:10 verdünnte cDNA, 1:100 verdünnte cDNA und als Negativkontrolle ein Ansatz mit Aqua ad injectabilia anstelle der cDNA. Die Etablierung der PCR am Lightcycler wurde mit dem Roche Reagenz (LightCycler®FastStart DNA Master<sup>Plus</sup> SYBR Green I, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) vorgenommen. Pro Probe wurden je 0,2 µl forward und reverse Primer (je 20 µM), 2 µl Roche Reagenz (LightCycler®FastStart DNA Master<sup>Plus</sup> SYBR Green I, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) und 6,8 µl Aqua ad injectabilia verwandt und in die Glaskapillaren (LightCycler®Capillaries, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) pipettiert. Mit der Lightcyclersoftware (LightCycler Software Version 4.05, Idaho Technology Inc., USA) wurde das real-time RT-PCR-Protokoll für den jeweiligen Primer erstellt. Begonnen wurde mit einer Denaturierungsphase der cDNA bei 95°C für 10 min. Darauf folgten jeweils 40 Zyklen mit erneuter Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei 95°C für 5 sec, Primeranlagerung (Annealing) für 5 sec bei 58°C ( $\beta$ -Actin, Osteocalcin (Bglap), CathepsinK (CtsK) und bei 62°C Kollagen 1 $\alpha$ 1 (Col 1 $\alpha$ 1) sowie eine Synthesephase von 5 sec bei 72°C. Am Ende wurde jeweils eine Schmelzkurve erstellt, bei der das

Gerät kontinuierlich die Abnahme der Fluoreszenz der Proben bei Erhöhung der Temperatur um 0,1°C pro sec ab einer Temperatur von 65°C bis 95°C misst. Zum Schluss kühlte der Lightcycler die Proben auf 4°C herunter.

Ausgehend von den in den Verdünnungsreihen ermittelten Werten wurde durch die Lightcycler-Software jeweils die PCR-Effizienz für die Primer ermittelt sowie die Spezifität der PCR durch die Schmelzpunktanalyse festgestellt. Die PCR-Effizienz für die einzelnen Primer betrug für  $\beta$ -Actin 91,7%, Osteocalcin (Bglap) 92,6%, Cathepsin K (CtsK) 93,4% und für Kollagen 1 $\alpha$ 1 (Col 1 $\alpha$ 1) 93,7%.

#### 4.6.7 Auflistung der Primer

Primer	Sequenz	Länge bp
$\beta$ -Actin fwd.: rev.: Annealing-Temperatur: 58°C Accession No: NM_007393.3	TGT-TAC-CAA-CTG-GGA-CGA-CA GGG-GTG-TTG-AAG-GTC-TCA-AA	165
Osteocalcin (Bglap) fwd.: rev.: Annealing-Temperatur: 58°C Accession No: NM_007541.2	TTC-TGC-TCA-CTC-TGC-TGA-CC TAT-TGC-CCT-CCT-GCT-TGG-AC	111
Cathepsin K (CtsK) fwd.: rev.: Annealing-Temperatur: 58°C Accession No: NM_007802.3	GAG-GCG-GCT-ATA-TGA-CCA-CT CTT-TGC-CGT-GGC-GTT-ATA-CA	119
Kollagen 1 $\alpha$ 1 (Col 1 $\alpha$ 1) fwd.: rev.: Annealing-Temperatur: 62°C Accession No: NM_007742.3	TGG-CAT-CCC-TGG-ACA-GCC-TG ATG-GGG-CCA-GGC-ACG-GAA-AC	144

**Tab. 2** Primer für qualitative RT-PCR und real-time RT-PCR

Die in Tabelle 2 dargestellten Primer sind RNA-Oligonukleotide, die komplementär zum DNA-Strang binden. Von der Bindungsstelle aus startete die Synthese mit der Taq DNA-Polymerase des neuen DNA-Strangs. Die Auswahl der Primer erfolgte basierend auf veröffentlichten Gensequenzen der Gendatenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Mittels des Programms ([frodo.wi.mid.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mid.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) wurden die Primer entworfen und mit dem Blast-Programm ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) überprüft. Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert. Als Referenzgen wurde das ubiquitär vorkommende Strukturprotein  $\beta$ -Actin gewählt.

#### **4.6.8 Real-time RT-PCR**

Die erfolgreiche Abstimmung der Primer und PCR-Bedingung erlaubte nun die Durchführung einer real-time mRNA-Analyse anhand der durch die reverse Transkriptase gewonnenen cDNA. Die vorhandenen cDNA Proben sowie die Negativkontrolle (RT-) wurden zur Vergrößerung des vorhandenen Probenvolumens mit 10 µl Aqua ad injectabilia (Braun) verdünnt. Von den RT+ Ansätzen wurden jeweils Duplikate zur quantitativen Analyse verwendet, wohingegen die Negativkontrolle RT- nur einfach angesetzt wurde. Weiterhin wurde ein Ansatz mit Aqua ad injectabilia anstatt der cDNA als zusätzliche Negativkontrolle durchgeführt.

Die Proben wurden nach dem entsprechend etablierten RT-PCR-Protokoll bearbeitet und die Daten mittels der Lightcycler-Software erfasst und abgespeichert. Eine Ermittlung der Ct-Werte jeder Probe und die Analyse der Schmelzkurve erfolgten durch die Software nach jedem Lauf. Weiterhin wurden die Negativkontrollen durch die Schmelzkurvenauswertung auf eine DNA-Kontamination kontrolliert, um eine Verfälschung der Ct-Werte in den zu untersuchenden Proben auszuschließen.

Aus den durchgeführten Duplikaten wurde der Mittelwert gebildet und zur Quantifizierung der mRNA-Expression der Zielgene die (delta) Ct-Methode verwandt (Pfaffl 2001). Von dem dokumentierten Ct-Wert der Zielgene der Probe wurde der entsprechende Ct-Wert des Referenzgens subtrahiert. Dadurch wurde der  $\Delta$ Ct-Wert als vergleichende Größe zwischen den Tieren ermittelt.

Für ein Tier der Versuchsgruppe konnte aus dem Wirbel L2 nicht genügend RNA für die reverse Transkription gewonnen werden. Die Probe wurde daher nicht in die Auswertung einbezogen. Von der real-time RT-PCR im Bereich der Wirbelkörper L2 werden daher nur Daten von jeweils 6 Tieren aus den beiden Gruppen miteinander verglichen.

#### **4.7 Immunhistochemie**

Kollagen 1 $\alpha$ 1 wurde auf Proteinebene mittels Immunhistochemie untersucht. Hierfür wurden die Paraffinschnitte für 2 x 5 min in Xylol (VWR) entparaffiniert und dann in technischem Aceton (Sigma-Aldrich) und einem Aceton+Waschpuffer Gemisch (1+1) für 10 min hydriert. In dem Waschpuffer, ein Tris-NaCl-Puffer (pH 7,4) mit 0,025%

Triton-X-100 (TBS) (Merck), wurden die Präparate für 5 min inkubiert. Der Tris-NaCl Puffer enthält 60,57 g TrisBase (Trizma®Base, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) und 87,66 g NaCl (Merck) sowie 250 µl Triton-X-100 (Merck). Die Reagenzien werden in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst und auf einen pH von 7,4 eingestellt. Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase mit 3% Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in Waschpuffer.

Nach erneutem zweimaligen Waschen der Präparate im Waschpuffer wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper Kollagen 1 (Biomex, Heidelberg, Deutschland) mit einer Verdünnung von 1:500 in Verdünnungspuffer (Dako, North America Inc., Carpinteria, CA, USA) über Nacht (ca. 16 h) bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach zwei erneuten Waschschritten in Tris-NaCl-Puffer erfolgte eine 30 minütige Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper goat-anti-rabbit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) mit einer 1:500 Verdünnung in 1% bovinem Serumalbumin mit 1:8 Teilen Ziegenserum. Weitere zwei Waschschriffe erfolgten bevor eine 30 minütigen Inkubation mit dem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vector Laboratories Inc.) durchgeführt wurde. Die Verwendung des Nova-Red-Substrat Kit (Vector Laboratories Inc.) für Peroxidase mit einer Inkubationszeit der Schnitte für 5 min bei Raumtemperatur ermöglichte die Sichtbarmachung des Streptavidin-Biotin-Peroxidase Komplexes. Eine Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit Hämatoxylin (Shandon Inc.). Pro Objektträger wurde nur ein Präparatanschnitt angefärbt. Der zweite Schnitt wurde anstelle des Primärantikörpers nur mit dem Verdünnungspuffer als Negativkontrolle inkubiert. Am Schluss wurden die Paraffinschnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und dann mit DePex eingedeckt.

Die Dokumentation der Lichtmikroskopie und das Einfügen der exakten Skalierung in die Bilder erfolgten nach demselben Muster wie bei oben beschriebenen histologischen Verfahren (Kap. 4.4).

#### **4.8 Transmissionselektronenmikroskopie**

Um eine genauere Aussage über die Feinstruktur der Knochen trabekel zu erhalten und um die aus den vorherigen Untersuchungen festgestellten Gruppenunterschiede weiter zu verifizieren, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Beurteilt wurden in der elektronenmikroskopischen Auswertung Ausschnitte der Trabekelstruktur vom Wirbelkörper L4.

Die Einbettung der Wirbelkörper L4 erfolgte in Epon (Serva, Heidelberg, Deutschland). Die vorher in Yellow-Fix (2% PFA in 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 7,2-7,4 mit 2% Glutardialdehyd und 0,02% Pikrinsäure) fixierten Wirbelkörper wurden nach gründlichem Waschen für 2 h mit 1%iger Osmiumtetroxidlösung (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,2-7,4) versetzt, im 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Nun erfolgte die Einbettung in Epon über ein 3 maliges Waschen der Proben in Xylol (VWR) für 30 min mit dann beginnender Inkubation der Proben in einem Xylol/Epon Gemisch in einem aufsteigenden Mischungsverhältnis bis zu reinem Epon (Serva) über einen Zeitraum von 6 Tagen. Über Nacht wurden die Proben in einem Exikator einem Unterdruck von -600 mbar ausgesetzt.

Es folgte die Erstellung von Semidünnschnitten mit dem Ultramikrotom (Reichert-Ultracut, Leica, Wetzlar, Deutschland) in einer Dicke von 0,5-1  $\mu\text{m}$ , die mit Toluidinblau und Safranin-O angefärbt wurden. Auf diesen Semidünnschnitten wurden lichtmikroskopisch zu untersuchende Bereiche identifiziert, von denen jeweils Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 60-80 nm hergestellt, auf Kupfernetze aufgezogen und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert wurden. Die Ultradünnschnitte wurden im Transmissionselektronenmikroskop (LEO EM 912, LEO Electron Microscopy Ltd, Cambridge, England) untersucht und mit einem digitalen Kameraaufsatz (Slow-Scan CCD-Camera for TEM, Olympus, Münster, Deutschland) fotografisch dokumentiert.

#### **4.9 Statistische Auswertung**

Die statistische Analyse der Messung der Knochenmineraldichte, Histomorphometrie und real-time RT-PCR wurde mit der statistischen Analysesoftware SPSS (SPSS) unter Verwendung des parameterfreien Mann-Whitney-Tests ausgewertet. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in einem Boxplot, der jeweils den Bereich angibt, in dem die mittleren 50% der Daten liegen. Dies bedeutet eine Darstellung der Ergebnisse zwischen dem 1. Quartil (25%) und dem oberen/4. Quartil (75%) als oberer Grenze. Die angegebenen Whiskers zeigen die Spannweite der

Daten zwischen dem kleinsten und dem größten Wert an, wobei extreme Werte („Ausreißer“) nicht berücksichtigt wurden und mit einem Punkt gekennzeichnet sind. Als „Ausreißer“ wurden Abweichungen festgelegt, die größer als das 1,5 fache des Interquartilintervalls vom Median waren.

Die Festlegung des Signifikanzniveaus erfolgte bei  $p \leq 0,05$ , mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet. Werte von  $p < 0,01$  wurden als hochsignifikant definiert und mit zwei Sternchen (\*\*) gekennzeichnet. Werte zwischen  $0,05 < p > 0,06$  wurden als Kennzeichen einer Tendenz angesehen.

Die unterschiedliche Anzahl von Tieren in der Auswertung der Histomorphometrie der Femur-Analyse und der Auswertung des L2 Wirbels kommt durch das Fehlen eines Femurschnittes in der Versuchsgruppe zustande. Ein Femuranschnitt eines Tieres der Versuchsgruppe fehlt in der gesamten Versuchsreihe für die histologische Betrachtung sowie in der Histomorphometrie und konnte deshalb in der Auswertung nicht berücksichtigt werden.



## 5 Ergebnisse

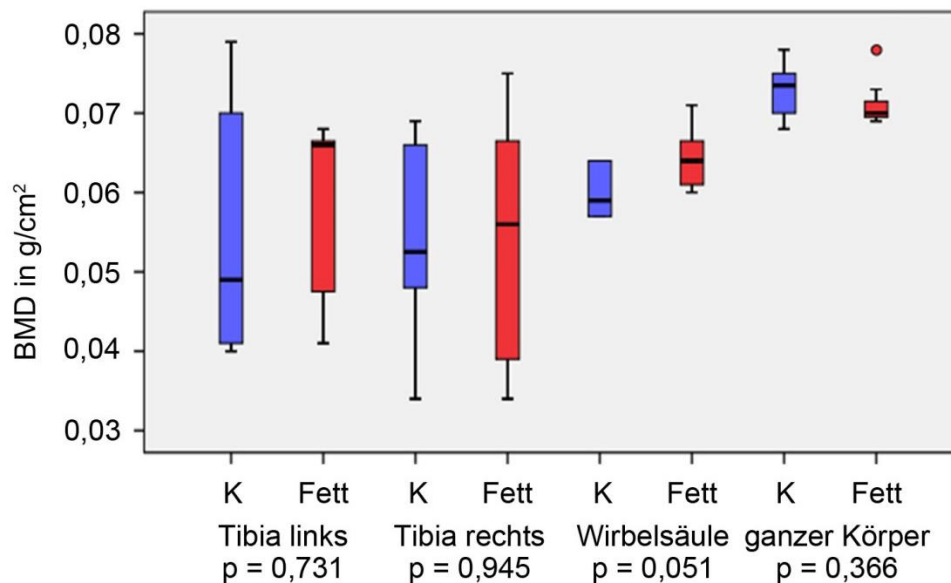
### 5.1 Dual-X-Ray Absorptiometry (DXA-Messung)

Die DXA-Messung ermöglichte die Darstellung der Knochenmineraldichte (BMD) in den verschiedenen Messbereichen des Mäuseskeletts. Wie im Methodenteil beschrieben erfolgten Messungen in den Bereichen Tibia links, Tibia rechts, Wirbelsäule und dem gesamten Skelett.

Im Messbereich der Wirbelsäule konnte eine tendenzielle Zunahme der Knochenmineraldichte der fetternährten Tiere ( $n = 7$ ) im Vergleich zu den Kontrolltieren ( $n = 6$ ) festgestellt werden ( $p = 0,051$ ). Im Bereich der Wirbelsäule wurde in der fetternährten Gruppe im Mittel eine höhere BMD  $0,0643 \text{ g/cm}^2 (\pm 0,0041)$  verglichen zur Kontrollgruppe mit  $0,06 \text{ g/cm}^2 (\pm 0,0033)$  gemessen, wenn auch der Unterschied nicht statistisch signifikant war ( $p = 0,051$ ) (siehe Tab. 3).

In den anderen Messbereichen wurden keine signifikanten Unterschiede in der Knochenmineraldichte zwischen normal- und fetternährten Tieren festgestellt (Tibia links  $p = 0,731$ , Tibia rechts  $p = 0,945$  und ganzer Körper  $p = 0,366$ ) (Abb. 9). Im Messbereich Tibia links wurde für die Kontrollgruppen eine mittlere Knochenmineraldichte von  $0,0547 \text{ g/cm}^2 (\pm 0,0162)$  und für die fetternährte Gruppe eine mittlere Knochenmineraldichte von  $0,0576 \text{ g/cm}^2 (\pm 0,0117)$  ermittelt ( $p = 0,731$ ). Im Bereich der Tibia rechts war bei der Betrachtung der Mittelwerte kein Gruppenunterschied festzustellen. Der Mittelwert für die Knochenmineraldichte in der Kontrollgruppe betrug  $0,0537 \text{ g/cm}^2 (\pm 0,013)$  und für die fetternährte Gruppe ebenfalls  $0,0537 \text{ g/cm}^2 (\pm 0,0167)$  ( $p = 0,945$ ).

Für den Messbereich „ganzer Körper“ konnten folgende Werte für die Gruppen ermittelt werden. Die mittlere Knochenmineraldichte in der Kontrollgruppe betrug  $0,073 \text{ g/cm}^2 (\pm 0,0036)$  und in der Versuchsgruppe  $0,0713 \text{ g/cm}^2 (\pm 0,0033)$ . In der statistischen Auswertung der DXA-Messung konnten keine signifikanten BMD-Unterschiede zwischen den normalernährten und fetternährten Tieren festgestellt werden.



**Abb. 9** DXA-Messung

Boxplot der einzelnen Messbereiche mit Angabe des Signifikanzniveaus. Blau = Kontrollgruppe (K), Rot = fett ernährte Versuchsgruppe (Fett)

Die im Boxplot dargestellten Ergebnisse geben den Bereich an, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Der Median der Gruppe wird durch den schwarzen Querstrich abgebildet. Dies bedeutet eine Darstellung der Ergebnisse zwischen dem 1. Quartil (25%) und dem oberen/4. Quartil (75%) als oberer Grenze. Die Spannweite der Daten zwischen dem kleinsten und dem größtem Wert wird durch die angegebenen Whiskers gekennzeichnet. Der rote Punkt markiert einen „Ausreißerwert“, der mehr als das 1,5 fache des Interquartilintervalls vom Median abweicht.

Knochenmineraldichte (BMD) in g/cm <sup>2</sup>				
Gruppe	Messbereich: Tibia links	Messbereich: Tibia rechts	Messbereich: Wirbelsäule	Messbereich: Ganzer Körper
Kontrolle	0,046	0,034	0,06	0,074
Kontrolle	0,04	0,048	0,064	0,078
Kontrolle	0,041	0,048	0,064	0,073
Kontrolle	0,079	0,069	0,057	0,075
Kontrolle	0,052	0,057	0,058	0,068
Kontrolle	0,07	0,066	0,057	0,07
Mittelwert	0,0547	0,0537	0,06	0,073
Standardabweichung	± 0,0162	± 0,0130	± 0,0033	± 0,0036
Fett	0,048	0,039	0,068	0,069
Fett	0,041	0,039	0,061	0,069
Fett	0,047	0,072	0,06	0,07
Fett	0,066	0,075	0,064	0,07
Fett	0,067	0,056	0,061	0,07
Fett	0,066	0,061	0,065	0,078
Fett	0,068	0,034	0,071	0,073
Mittelwert	0,0576	0,0537	0,0643	0,0713
Standardabweichung	± 0,0117	± 0,0167	± 0,0041	± 0,0033

**Tab. 3** Tabellarische Auflistung der Knochenmineraldichte (BMD) in g/cm<sup>2</sup> für die beiden Gruppen, geordnet nach den jeweiligen Messbereichen.

## 5.2 Histologie

Die Ergebnisse der histologischen Auswertung wurden jeweils gruppenspezifisch (Versuchsgruppe = 7 Tiere, Kontrollgruppe = 6 Tiere) und den einzelnen Färbungen zugeordnet ermittelt. Wie im Methodenteil beschrieben, fehlt ein Femuranschnitt aus der Versuchsgruppe aufgrund eines Präparationsfehlers bei der Entnahme in den gesamten histologischen Verfahren. Daher werden hier nur Anschnitte von 6 Tieren der Versuchsgruppe ausgewertet, was der Anzahl der Kontrollgruppe entspricht.

Nachfolgend werden jeweils Anschnitte des Femurs proximal und distal und des Wirbelkörpers L2 gezeigt. Jeder Darstellung wird eine Übersichtsaufnahme vorangestellt. Sie dient zur Orientierung und Einordnung der bei höheren Vergrößerungen dokumentierten Ausschnittsaufnahmen. Anschließend erfolgt die Darstellung von Besonderheiten in einzelnen Anschnitten.

Die histologische Auswertung beinhaltet die lichtmikroskopische Betrachtung der Gewebestruktur, wobei der Fokus der Untersuchungen vor allem auf den Trabekelverlauf gelegt wurde.

In den histologischen Schnitten konnten folgende Färbeergebnisse an den Strukturen beobachtet werden.

**HE-Färbung:** Das Hämalan (positiv geladener Kernfarbstoff) lagert sich an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA an, so dass die Zellkerne blau angefärbt werden. Es können aber auch weitere saure Substanzen wie Bakterien und Knorpel, oder Kalk blau erscheinen. Das Eosin (Tetrabrom-Fluorescein-Natrium) färbt die basischen Strukturen Zytoplasma und extrazytoplasmatische Strukturen, wie z.B. das Kollagen und proteinhaltige Lösungen, rot an (Welsch et al. 2010).

**TRAP-Enzymhistochemie:** Der Nachweis der sauren Phosphatase in Zellen erfolgt durch granuläre Rotfärbung. Die Rotfärbung dient zur Identifikation von Tatrat resistenten Zellen. Bei einer mehrkernigen Struktur können hierdurch Osteoklasten, Chondroklasten oder mehrkernige Makrophagen in den Knochenanschnitten identifiziert werden. Aber auch einkernige Makrophagen weisen eine granuläre Rotfärbung auf.

**Alkalische Phosphatase Enzymhistochemie:** Der Nachweis der alkalischen Phosphatase erfolgt durch Blaufärbung. Osteoblasten sind im Präparat vom blauen Saum der alkalischen Phosphatase umgeben. Der Zellkern ist durch die Gegenfärbung mit Kernechtrot rot zu identifizieren.

## 5.2.1 HE-Färbung

### Femur

Bei der histologischen Auswertung der Femuranschnitte wurden jeweils ein proximaler und distaler Schnitt ausgewertet. Die Femuranschnitte zeigen die Epiphysenregion entweder mit dem proximalen oder dem distalen Femurende mit entsprechender Gelenkfläche.

Unterschiede konnten zwischen den beiden Gruppen lichtmikroskopisch anhand der Trabekelstruktur und des Verlaufs der Lamellen in den Trabekeln festgestellt werden. In der Kontrollgruppe lag in den Trabekeln eine klare Lamellenstruktur mit säumenden Osteoblasten vor (Abb. 10). Außerdem waren die Trabekel in der Kontrollgruppe im Präparateanschnitt breiter und wiesen in ihrer Form einen geschwungenen Verlauf mit abgerundeten Schnittflächen auf. Im Gesamtbild ergab dies den Eindruck einer gleichmäßigen, geordneten physiologischen Struktur des Knochens (Abb. 10).

Die Trabekelstruktur der Versuchsgruppe war im Vergleich zur Kontrollgruppe in der lichtmikroskopischen Darstellung schmäler organisiert und zeigte eine fragile Struktur. Abzugrenzen war die Versuchsgruppe von der Kontrollgruppe auch dadurch, dass sich hier die Lamellen der Trabekel häufiger voneinander ablösten und sich zum Teil in lockerer Struktur im Präparat befanden (Abb. 11, Abb. 13). Bei einigen Trabekeln war der Geflechtknochenanteil erhöht (Abb. 11 c, d). Insgesamt konnte in den Anschnitten der Versuchsgruppe keine Veränderungen in der Zahl der Trabekel in der Spongiosa beobachtet werden. Lediglich der Verlauf und die Ausprägung der einzelnen Trabekel waren unterschiedlich.

Die in der Kontrollgruppe als physiologisch beschriebene Anordnung der Osteozyten mit ihrer Verankerung in Richtung des Lamellenverlaufs war in der Versuchsgruppe geringer ausgeprägt. Die Osteozyten lagen teilweise frei zwischen den sich voneinander lösenden Lamellen und erschienen damit im Vergleich zur Kontrollgruppe aus der Struktur herausgelöst. Diese Beobachtung konnte in nahezu allen Anschnitten des Femurs der Versuchsgruppe nachvollzogen werden. In der Kontrollgruppe waren hingegen deutlich weniger Freiräume zwischen den Lamellen.

Im Bereich der Kortikalis konnten keine Veränderungen in der Gewebestruktur festgestellt werden. Ein Gruppenunterschied in der Breite der Schnittflächen in den Präparaten als Hinweis auf belastungsabhängige oder durch die Fetternährung bedingte Veränderungen konnte nicht nachgewiesen werden.

## Beobachtungen auf Zellebene

Bei stärkerer Vergrößerung wurde die Morphologie der Zellen des Knochenstoffwechsels betrachtet. Entlang der Trabekeloberfläche wurden runde Zellkerne der Osteoblasten, die maßgeblich für die Knochensynthese verantwortlich sind, identifiziert (Abb. 10 d). Inaktive Osteoblasten, sogenannte endostale Saumzellen („*osteo-lining cells*“), bedeckten kontinuierlich die Trabekeloberfläche (Abb. 10 e). Im Trabekelknochen zeigten sich in Ausrichtung der Lamellen vitale Osteozyten (Abb. 10 b, Abb. 12 b), die sich weder in ihrer geschätzten Anzahl noch in der Ausprägung des perizellulären Raumes von der Versuchsgruppe unterscheiden.

Osteoklasten als knochenresorbierende Zellen liegen in Erosionslakunen an der Trabekeloberfläche vor. In der Kortikalis entstehen im Zuge des *Remodelings* Erosionstunnel, die später durch neu synthetisierte Knochenmatrix von Osteoblasten wieder aufgefüllt werden.

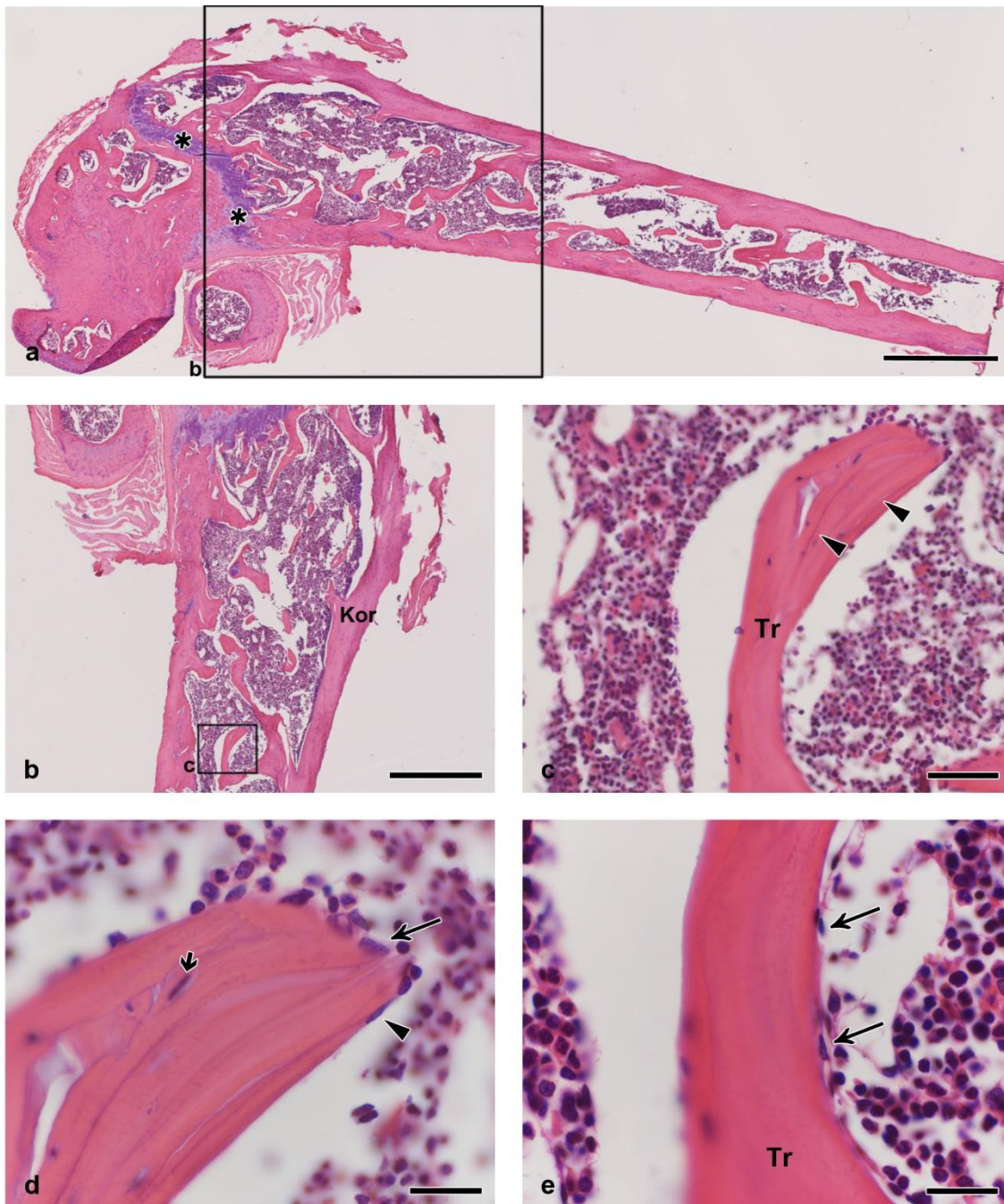
Für die knochenaufbauenden Zellen konnte kein Indiz für einen erkennbaren Unterschied in Anzahl sowie in Veränderungen von Größe und Aussehen zwischen den Versuchsgruppen gefunden werden.

Eine vermehrte Aktivität als Hinweis auf das Überwiegen eines akut ablaufenden Knochen-aufbauenden bzw. Knochen-abbauenden Prozesses konnte nicht gefunden werden.

Auch in der Versuchsgruppe ist der Trabekel von - in der Form unverändert aussehenden - endostalen Saumzellen („*osteo-lining cells*“) umgeben. Die endostalen Saumzellen bedecken in gleichmäßigem Abstand die Trabekeloberfläche. An einigen Stellen der Trabekeloberfläche sind kuboidförmige Zellkerne der Osteoblasten zu erkennen.

Auch die Osteozyten gleichen in Form und Aussehen denen der Kontrollgruppe. Ein Unterschied liegt bei der Anordnung der Osteozyten im Verlauf der Lamellen vor. In der Versuchsgruppe ist die Ordnung der Osteozyten in Richtung des Lamellenverlaufes aufgehoben (Abb. 13 b, c).

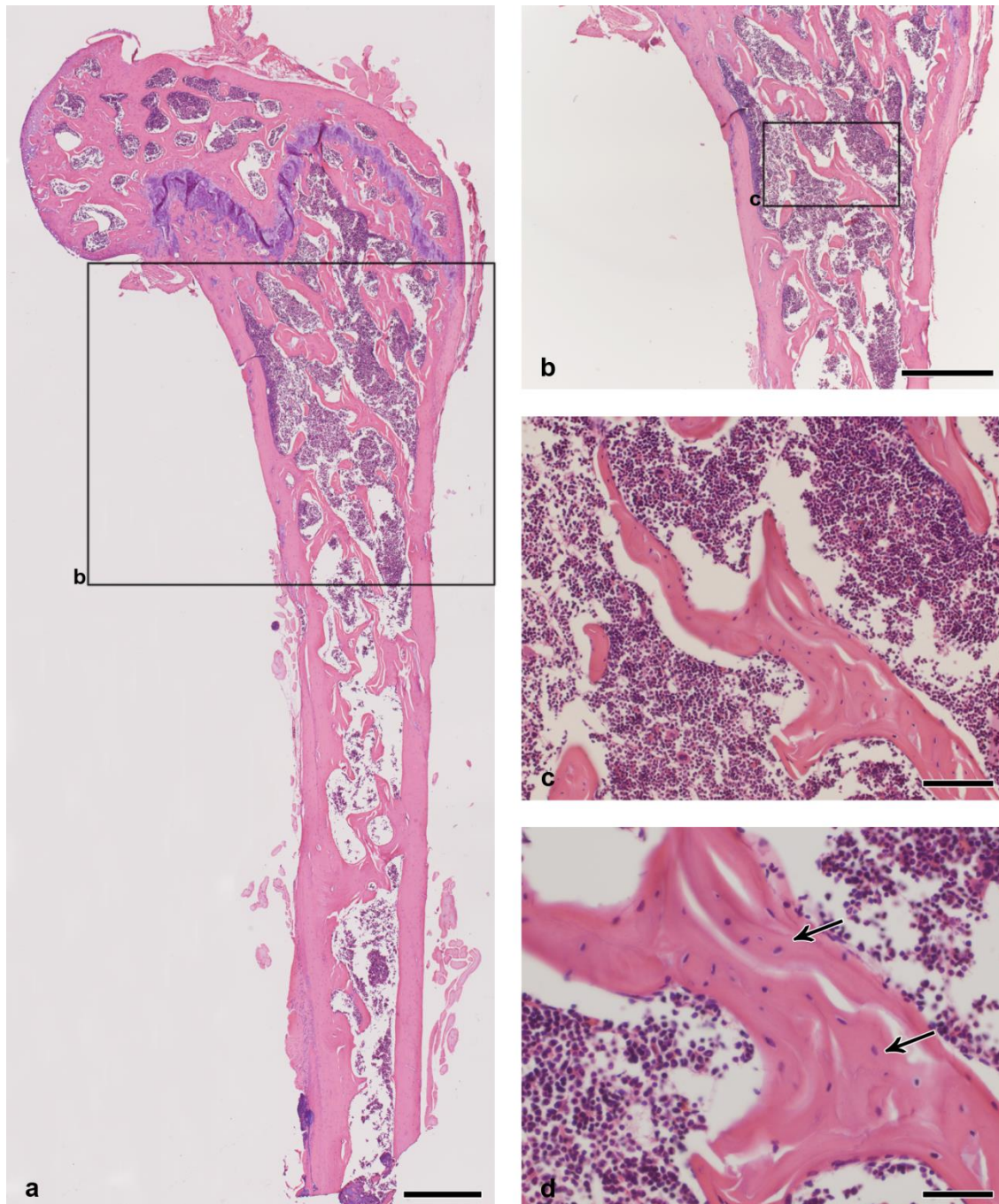
Bei der Beurteilung des Knochenmarks fiel zwischen beiden Gruppen kein Unterschied auf. Eine Verfettung des Knochenmarks durch vermehrte Adipozyten in der Versuchsgruppe konnte nicht festgestellt werden. Auch eine Veränderung der Hämatopoese, Granulozytopoese und Monozytopoese konnte nicht festgestellt werden. In einem Präparat waren Auffälligkeiten im Hinblick auf eine vermehrte Anzahl der Megakaryozyten vorhanden (Abb. 13 b). Dieser Befund konnte aber nicht für alle Femuranschnitte der Versuchsgruppe belegt werden.



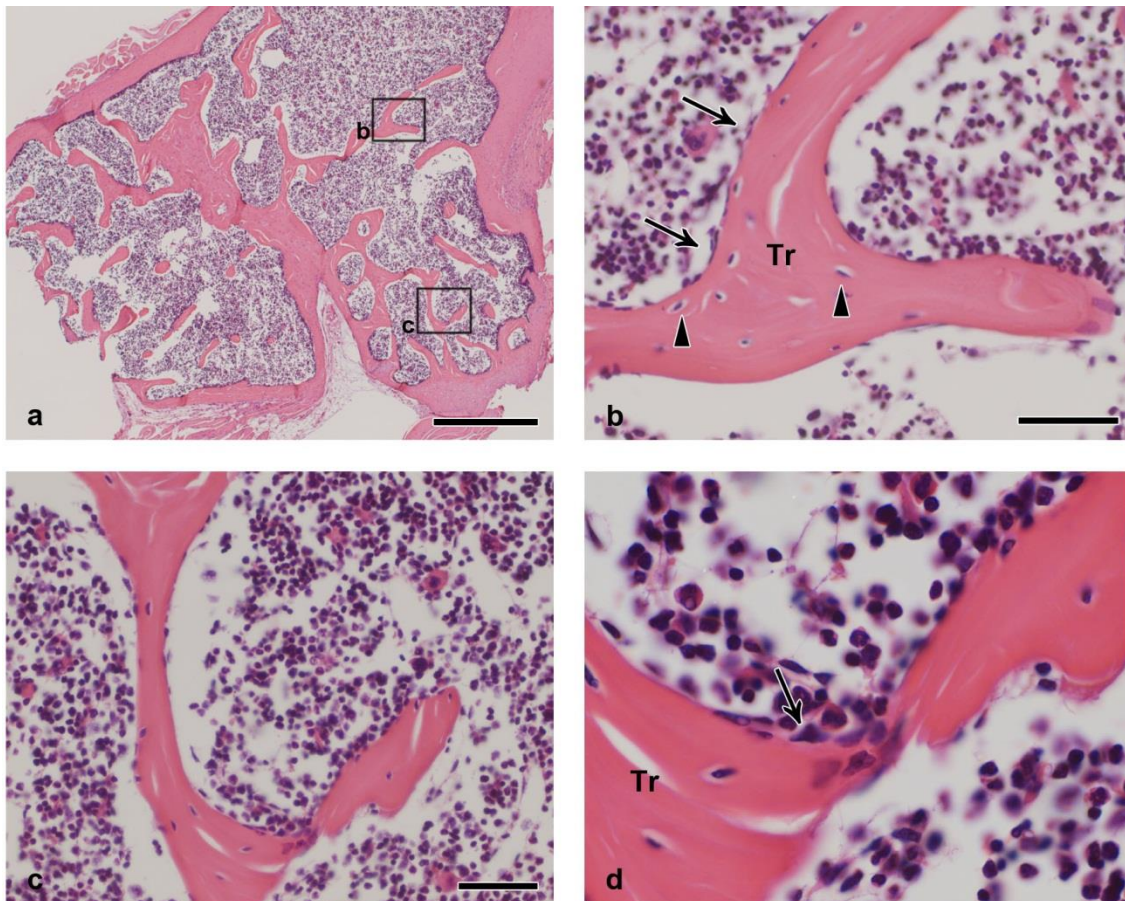
**Abb. 10** HE-Färbung, proximaler Femur, Kontrollgruppe

- Übersichtsaufnahme des proximalen Femurs der Kontrollgruppe mit den knorpeligen Anteilen der Wachstumsfuge (\*\*) (Maßstab 500 µm).
- Anschnitt des spongiösen Bereiches des proximalen Femurs mit Begrenzung durch die außenliegende Kortikalis (Kor) (Maßstab 500 µm).
- Gruppentypische Struktur eines Trabekels (Tr) mit enganeliegenden Lamellen (▼) und einem geschwungenen Verlauf (Maßstab 50 µm).
- Osteozyt (●) in Lamelle eingemauert. An der Spitze des Trabekels erkennbare Anlagerung eines Osteoblasten (↓), seitlich zeigt sich eine endostale Saumzelle (▼) (Maßstab 20 µm).
- Trabekelanschnitt (Tr) mit an der Oberfläche liegenden endostalen Saumzellen (↓) (Maßstab 20 µm).





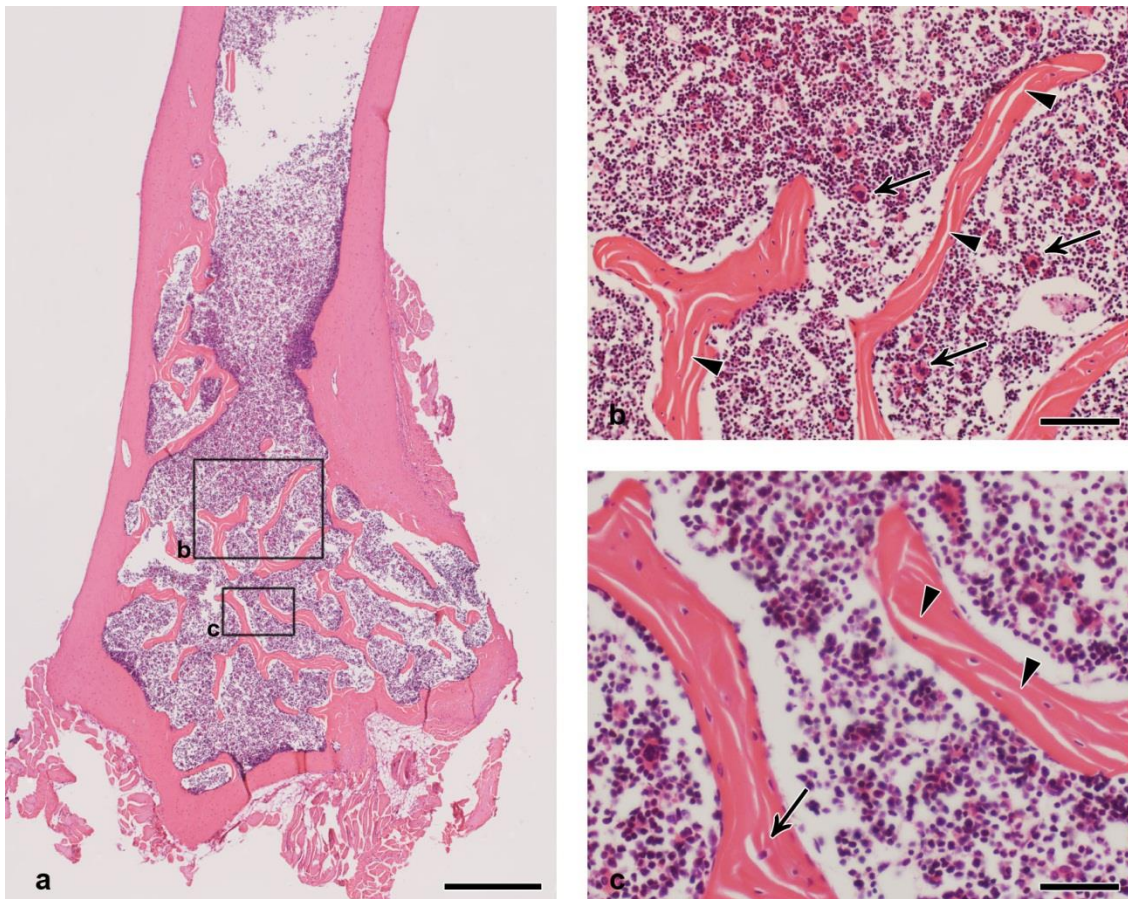
**Abb. 11** HE-Färbung, proximaler Femur, Versuchsgruppe  
 a) Übersichtsaufnahme (Maßstab 500 µm).  
 b) Ausschnittsvergrößerung der Spongiosa (Maßstab 500 µm).  
 c) Trabekelstruktur mit hohem Anteil an Geflechtknochen (Maßstab 50 µm).  
 d) Vergrößerte Darstellung des Geflechtknochens im Trabekel mit nicht geordneten Osteozyten (↓) in der Knochenmatrix (Maßstab 20 µm).



**Abb. 12** HE-Färbung, distaler Femur, Kontrollgruppe

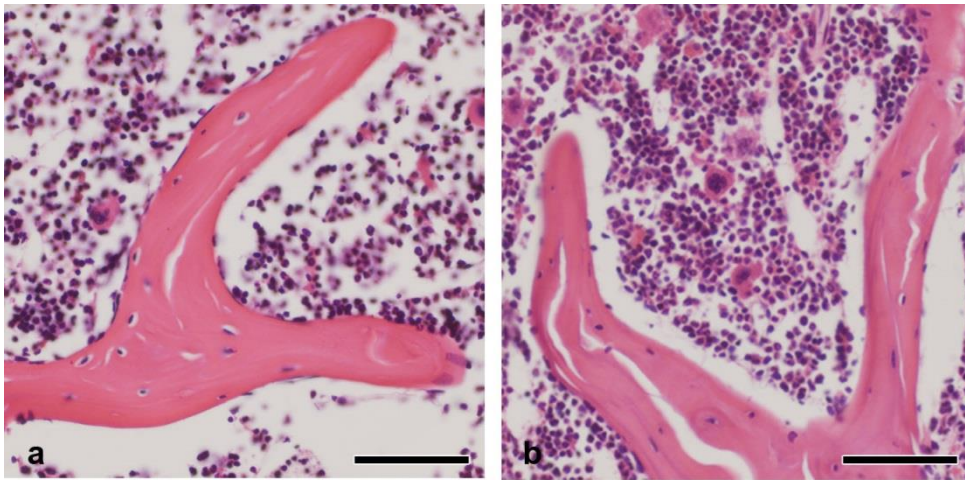
- a) Übersichtsaufnahme (Maßstab 500 µm).
- b) Trabekelanschnitt (Tr) mit in der Knochenmatrix eingebauten Osteozyten (▼). An der Trabekeloberfläche sind Zellkerne endostaler Saumzellen zu erkennen (↓) (Maßstab 50 µm).
- c) Trabekel mit einer geordneten Lamellenstruktur (Maßstab 50 µm).
- d) Umbauprozess am Trabekel (Tr) mit Anlagerung von Osteoblasten (↓) (Maßstab 20 µm).





**Abb. 13** HE-Färbung, distaler Femur, Versuchsgruppe

- a) Übersichtsaufnahme (Maßstab 500 µm).
- b) Darstellung der für die fetternährte Gruppe typischen Trabekelstruktur mit sich voneinander lösenden Lamellen (▼). Im Knochenmark sind vermehrt Megakaryozyten (↓) zu erkennen (Maßstab 100 µm).
- c) Auch in diesem Ausschnitt ist die voneinander gelöste Lamellenstruktur im Trabekel zu erkennen (▼). Die Osteozyten (↓) sind aus der Lamellenstruktur herausgelöst (Maßstab 50 µm).



**Abb. 14** HE-Färbung, direkter Vergleich der Trabekelstruktur beider Gruppen

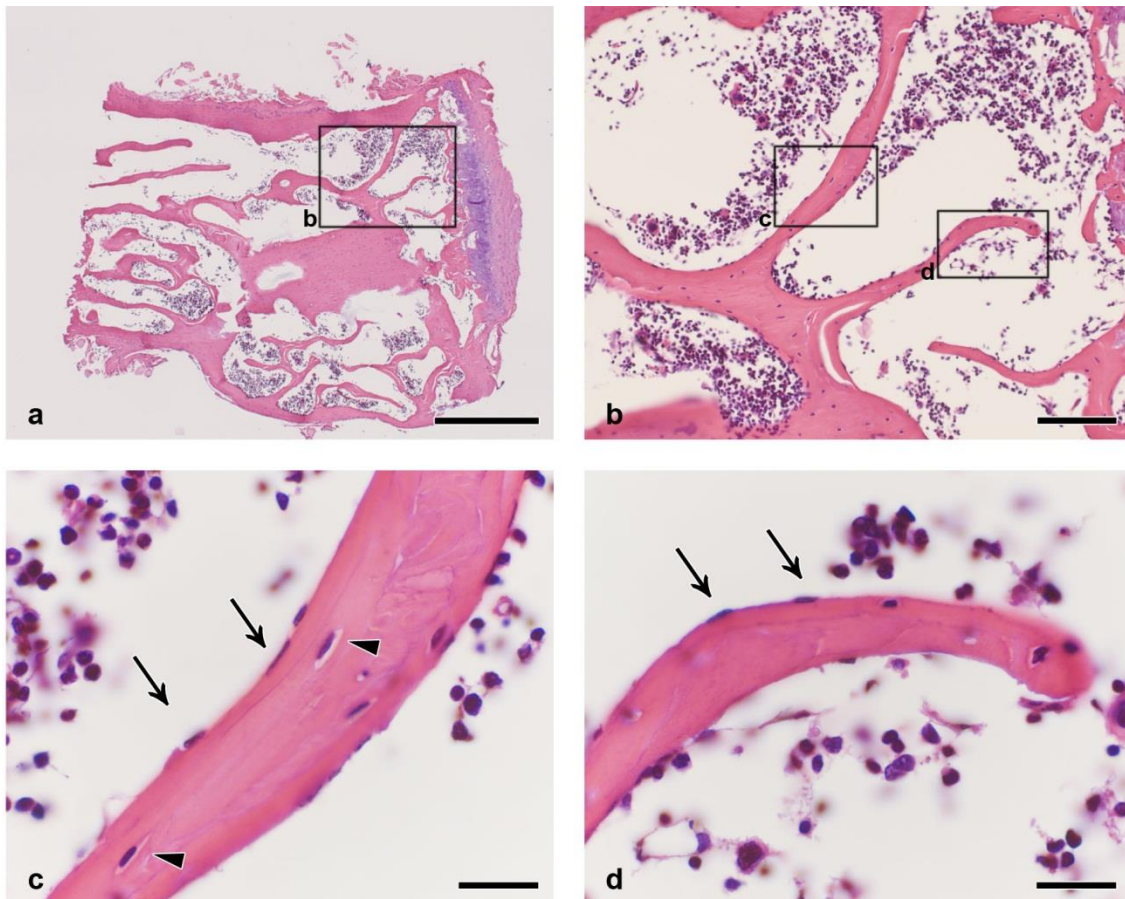
- a) Kontrollgruppe: Trabekelstruktur mit relativ breitem Trabekel und gruppenspezifischem Lamellenverlauf (Maßstab 50 µm).
- b) Versuchsgruppe: Trabekelstruktur mit voneinander gelösten Lamellen (Maßstab 50 µm).

## Wirbelkörper L2

Bei den Wirbelkörperschnitten handelt es sich zumeist um Längsschnitte durch den Wirbelkörper, an die jeweils an beiden Seiten die Deckplatten mit hyalinem Knorpel grenzen. Die spongiösen Knochenanteile mit den Trabekelknochen im Inneren des Wirbelkörpers werden von kompaktem Knochengewebe als Randbegrenzung umgeben. Im Wirbelkörper überwiegt der Anteil des spongiösen Knochens im Vergleich zum kompakten Knochen und steht somit im Kontrast zu der Struktur der langen Röhrenknochen.

Die Wirbelkörperschnitte zeigten gleiche Tendenzen hinsichtlich der Knochenstruktureigenschaften mit einer Verringerung der Lamellenstruktur im Trabekelverlauf und einer Veränderung in der Anordnung von Osteozyten, wie sie auch bei der Auswertung des Femurs beobachtet werden konnten.

Die Trabekel in der Kontrollgruppe waren mit glatten und damit dem physiologischen Bild entsprechend verlaufenden Lamellen durchzogen. Insgesamt konnte bei den meisten Präparaten eine organisierte Struktur beobachtet werden, obwohl teilweise durch die Fixation bedingte Überlappungen durch herausgelöstes Knochenmark oder abgelöste Anschnittsflächen und Brüche vorlagen. Die Trabekel waren in ihrem Verlauf glatt begrenzt mit abgerundeten Anschnittsflächen an ihren Enden (Abb. 15 b).



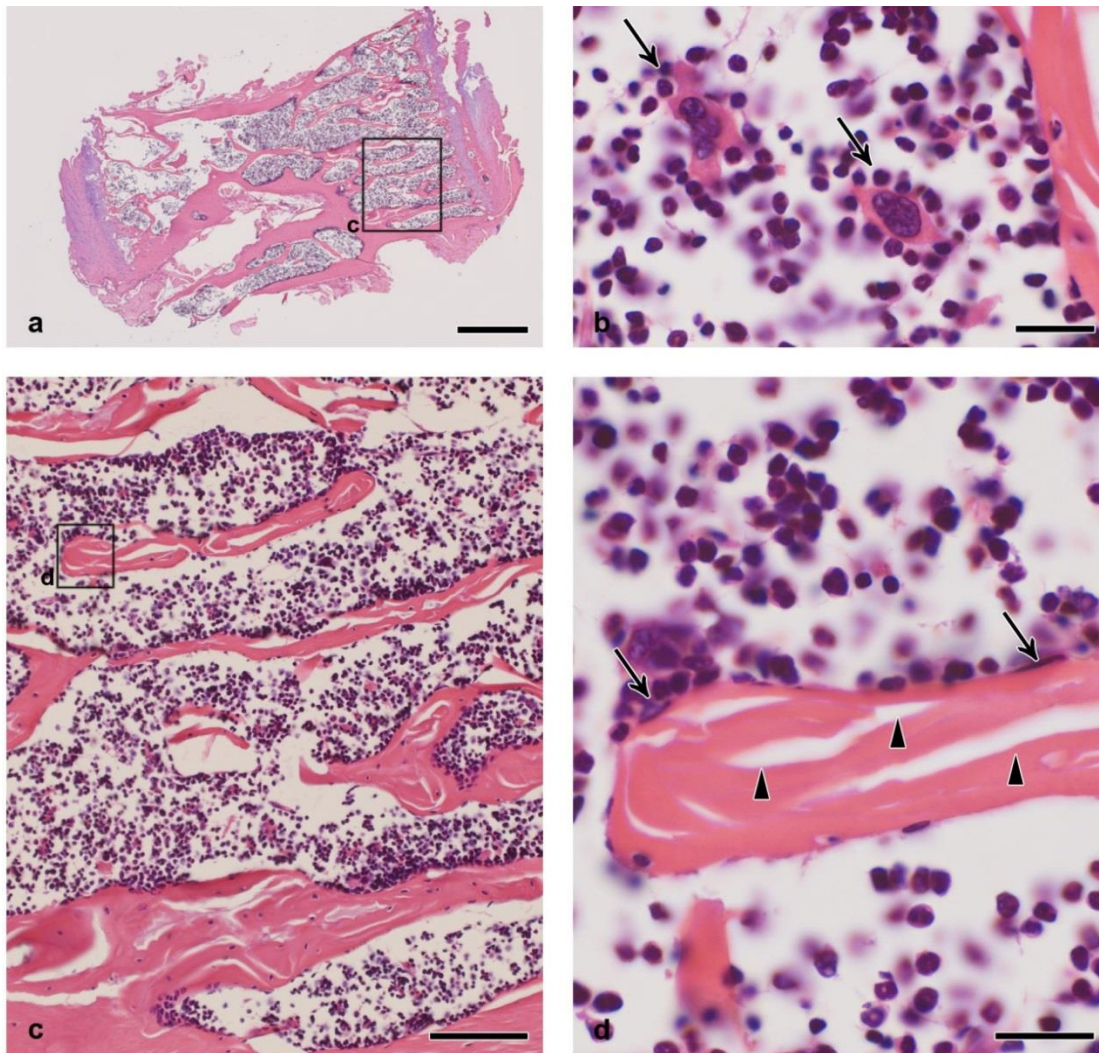
**Abb. 15** HE-Färbung, Wirbelkörper L2, Kontrollgruppe

- a) Übersichtsaufnahme (Maßstab 500 µm).
- b) Ausschnittsvergrößerung der Trabekelstruktur (Maßstab 100 µm).
- c) Trabekeloberfläche mit endostalen Saumzellen (↓), kompakte Lamellenstruktur mit eingemauerten Osteozyten (▼) (Maßstab 20 µm).
- d) Anschnittsfläche eines Trabekels mit an der Oberfläche aufliegenden endostalen Saumzellen (↓) (Maßstab 20 µm).

Auffallend war in den meisten Anschnitten der Kontrollgruppe ein stark ausgeprägtes Trabekelnetzwerk. Das im Anschnitt beurteilbare Trabekelnetzwerk wies eine recht grobe Strukturierung des spongiösen Anteils auf (Abb. 15 a).

In der Kontrollgruppe zeigte sich auf Zellebene eine gut strukturierte Zellanordnung im Trabekel. Aufliegend an der Trabekeloberfläche konnten endostale Saumzellen, die einen schmalen, langgestreckten Zellkern aufweisen, identifiziert werden. Sie umhüllen die Trabekeloberfläche vollständig (Abb. 15 c d). Eingemauert im Osteoid der Trabekel befinden sich Osteozyten mit zu den Lamellen parallel ausgerichteten Zellkernen (Abb. 15 c).





**Abb. 16** HE-Färbung, Wirbelkörper L2, Versuchsgruppe

- Übersichtsaufnahme (Maßstab 500 µm).
- Vergrößerung eines Knochenmarkausschnitts mit zwei mehrkernigen Zellen (↓) (Maßstab 20 µm).
- Darstellung der Trabekelstruktur in der Versuchsgruppe mit einer starken Separation der Lamellen (Maßstab 100 µm).
- Vergrößerung eines Trabekelausschnittes mit einer aufgelösten Trabekelstruktur (▼). An der Oberfläche des Trabekels liegen endostale Saumzellen (↓) an (Maßstab 20 µm).

Die Trabekel in der Versuchsgruppe waren in ihren Anschnittsflächen im Vergleich schmaler und liefen zu den Enden hin eher spitz zu (Abb. 16).

Bestätigt wurde bei der Betrachtung der Wirbelkörperschnitte der Eindruck aus den Femuruntersuchungen hinsichtlich der Lamellenordnung der Trabekel mit in den Zwischenräumen frei liegenden Osteozyten (Abb. 16 c). Die Ausprägung, mit der diese Lamellenveränderung auftrat, konnte aber nicht in allen Anschnitten eindeutig bestätigt werden. Zusammenfassend war der Unterschied in der Lamellenstruktur der Wirbelkörper nicht so eindeutig wie bei den Femuranschnitten zu erkennen.

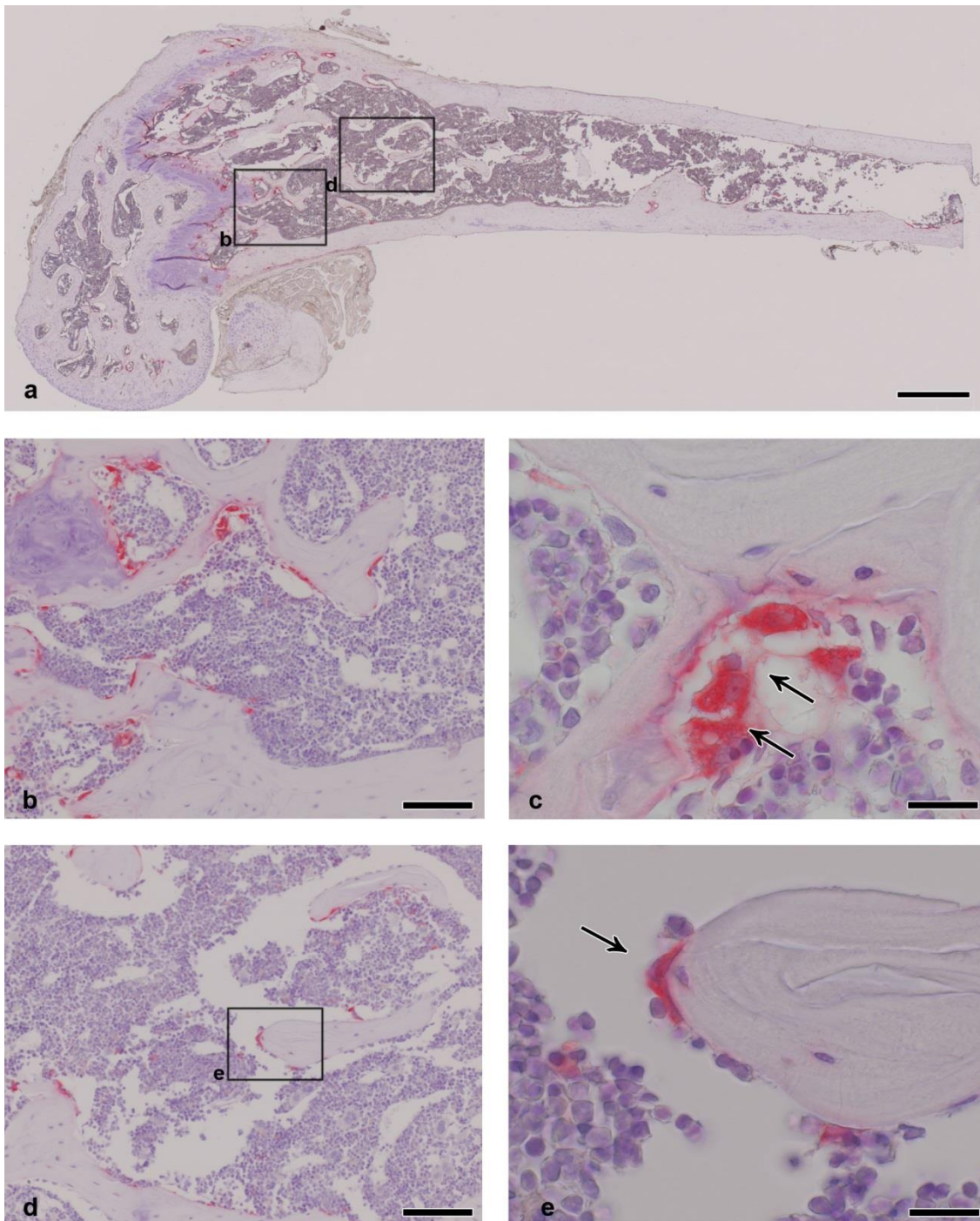
### 5.2.2 TRAP-Enzymhistochemie

Zur Identifikation der Osteoklasten im Präparatanschnitt und zur Klärung der Frage, ob in der Versuchsgruppe durch die Fetternährung eine erhöhte Osteoklastenanzahl zur Veränderung der Trabekelstruktur beigetragen hat, wurde eine TRAP-Enzymhistochemie mit einer Hämatoxylin-Gegenfärbung durchgeführt. Die Osteoklasten und ihre Ausläufer färben sich rötlich an, die Zellkerne sind bläulich gefärbt.

Bei den Kontrolltieren mit einer Standarddiät und den Versuchstieren mit einer Fetternährung über 23 Wochen konnten im Trabekelbereich nur sehr wenige Osteoklasten beobachtet werden. Diese konnten sowohl in Präparatanschnitten vom Femur als auch vom Wirbelkörper festgestellt werden. In den Femurpräparaten waren Osteoklasten vor allem im Bereich der Wachstumsfugen im proximalem Femur vorhanden (Abb. 17 und Abb. 18). Auch im Bereich des distalen Femurs konnten nur vereinzelte Osteoklasten in ihren Erosionslakunen identifiziert werden (Abb. 19 und Abb. 20). Insgesamt waren im Bereich der Spongiosa der Femurpräparatanschnitte nur sehr wenige Osteoklasten an der Trabekeloberfläche erkennbar. Eine Veränderung in der Anzahl der Osteoklasten konnte zwischen Kontrolltieren und fetternährten Tieren nicht festgestellt werden.

In den Wirbelkörperanschnitten (Abb. 21 und Abb. 22) war in den meisten Präparaten im Trabekelbereich nur eine Anfärbung von Teilen der Osteoklasten feststellbar. Ein gehäuftes Auftreten von multinukleären Osteoklasten an der Trabekeloberfläche konnte nicht nachgewiesen werden. Vor allem im Übergang zwischen dem Knorpelgewebe und dem mineralisierten Knochengewebe an Grund- und Deckplatte konnten Osteoklasten identifiziert werden. Eine Häufung bzw. Abnahme in der Anzahl wurde im Gruppenvergleich nicht festgestellt.

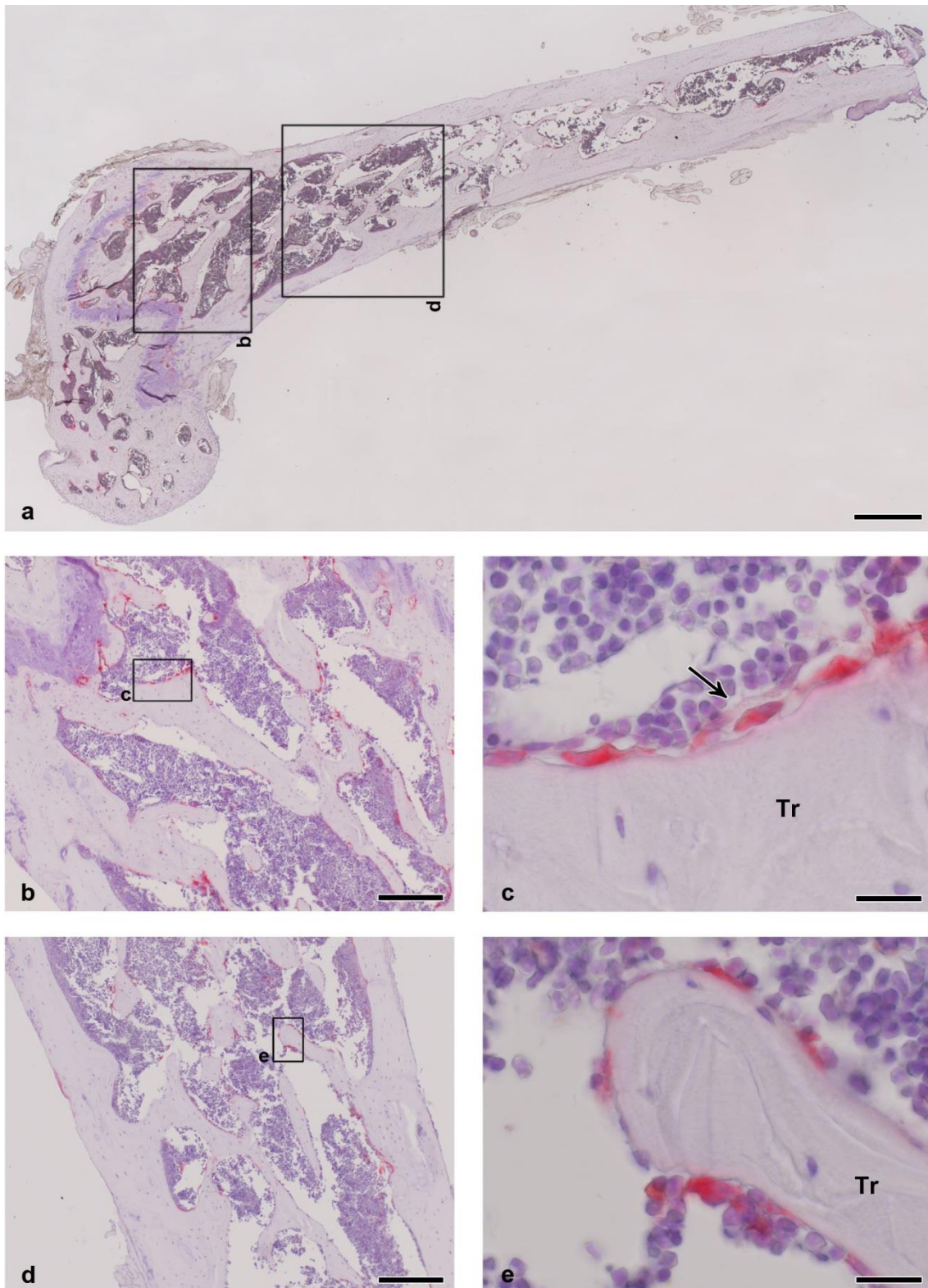
In der TRAP-Enzymhistochemie konnte in der fetternährten Versuchsgruppe keine Veränderung in der Osteoklastenanzahl oder im Aussehen der Osteoklasten festgestellt werden.



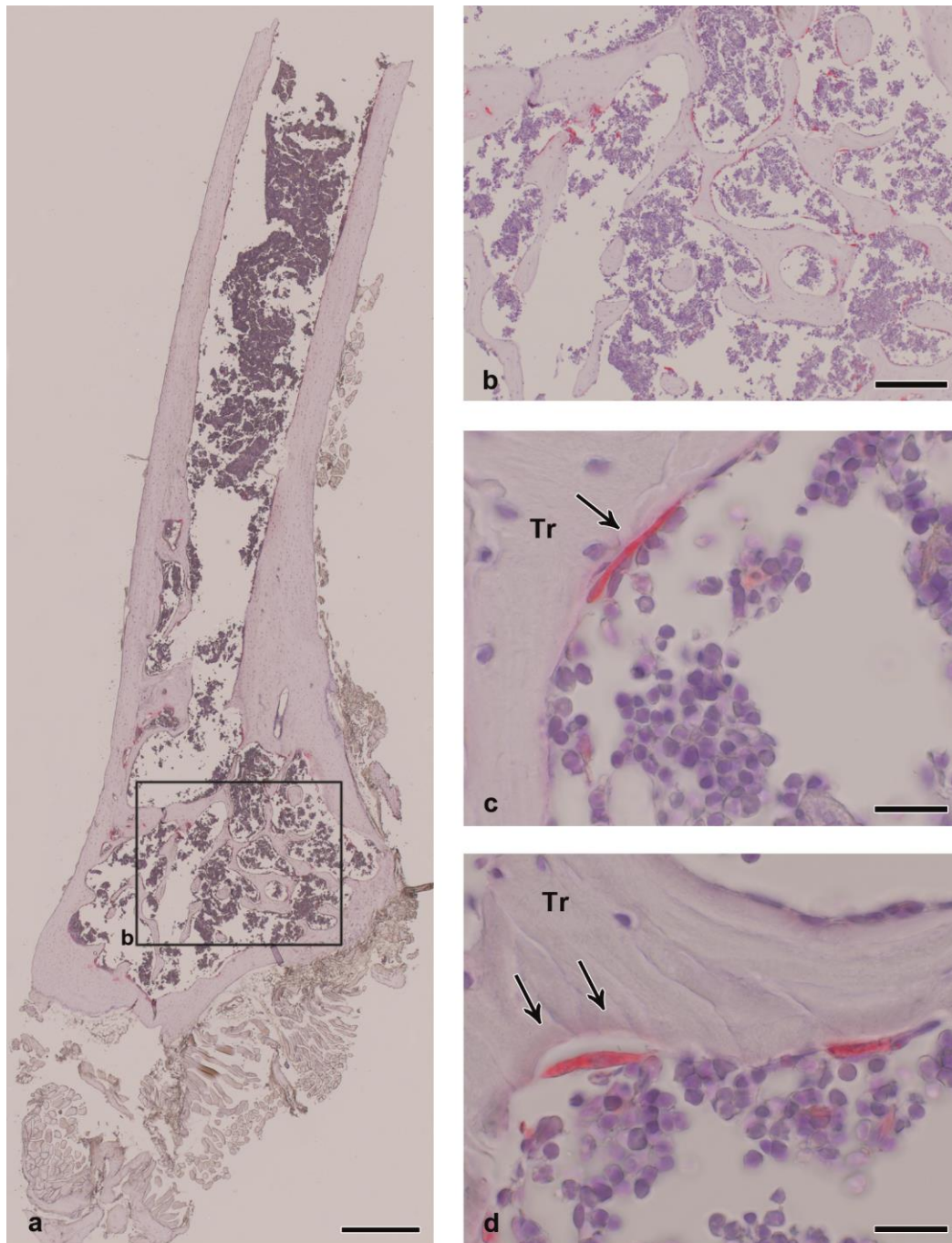
**Abb. 17** TRAP Enzymhistochemie, proximale Femur, Kontrollgruppe

- a) Übersichtsaufnahme (Maßstab 500 µm).
- b) Vergrößerungsaufnahme im Bereich der Wachstumsfuge mit vielen rötlich gefärbten Anschnitten von Osteoklasten (Maßstab 100 µm).
- c) Darstellung multinukleärer Osteoklasten (↓) (Maßstab 20 µm).
- d) Vergrößerung im Bereich der Spongiosa mit nur geringem Anteil an Osteoklasten (Maßstab 100 µm).
- e) Anschnitt eines Osteoklasten (↓) an der Trabekelspitze (Maßstab 20 µm).





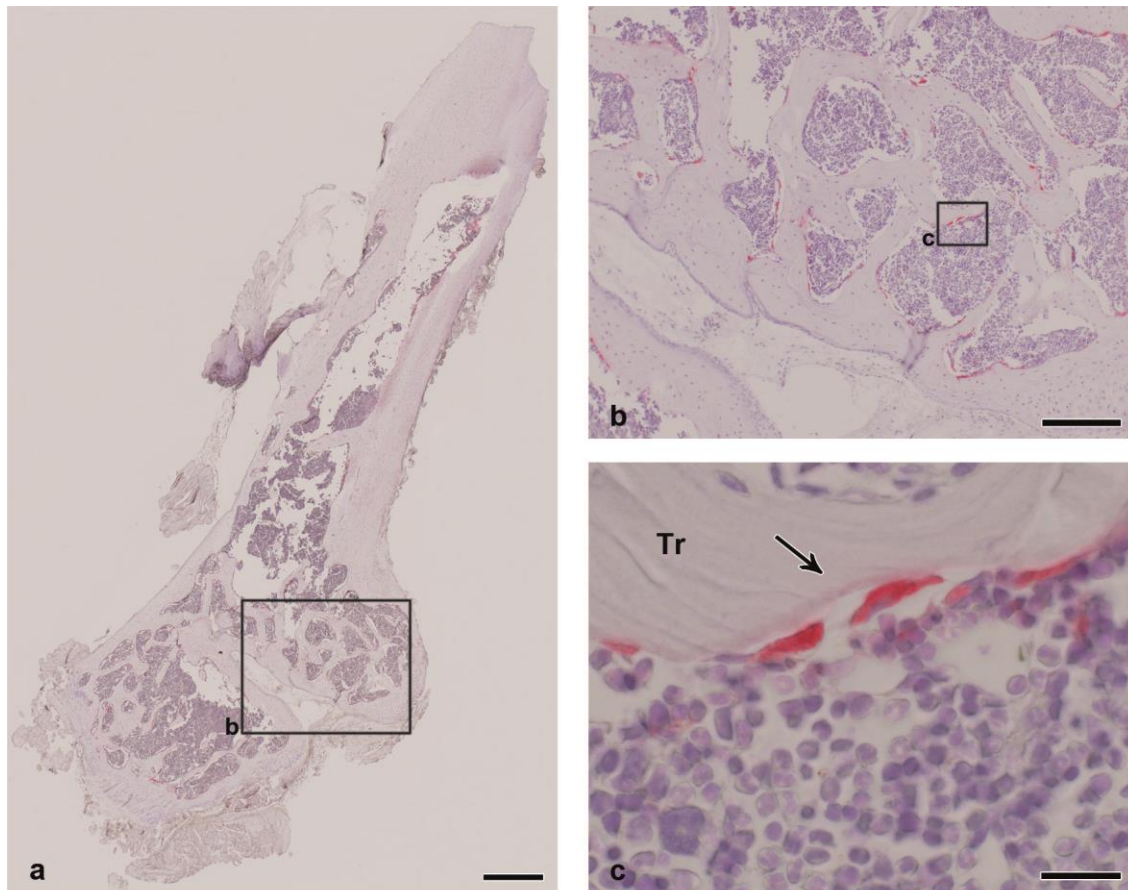
**Abb. 18** TRAP Enzymhistochemie, proximaler Femur, Versuchsgruppe  
 a) Übersichtsaufnahme (Maßstab 500 µm).  
 b) Bereich der Wachstumsfuge (Maßstab 200 µm).  
 c) Mehrere Osteoklasten (↓) an der Trabekeloberfläche (Tr) im Bereich der Wachstumsfuge (Maßstab 20 µm).  
 d) Vergrößerungsaufnahme im Bereich der Spongiosa (Maßstab 200 µm).  
 e) Trabekel (Tr) mit anliegenden Osteoklasten (Maßstab 20 µm).



**Abb. 19** TRAP Enzymhistochemie, distaler Femur, Kontrollgruppe

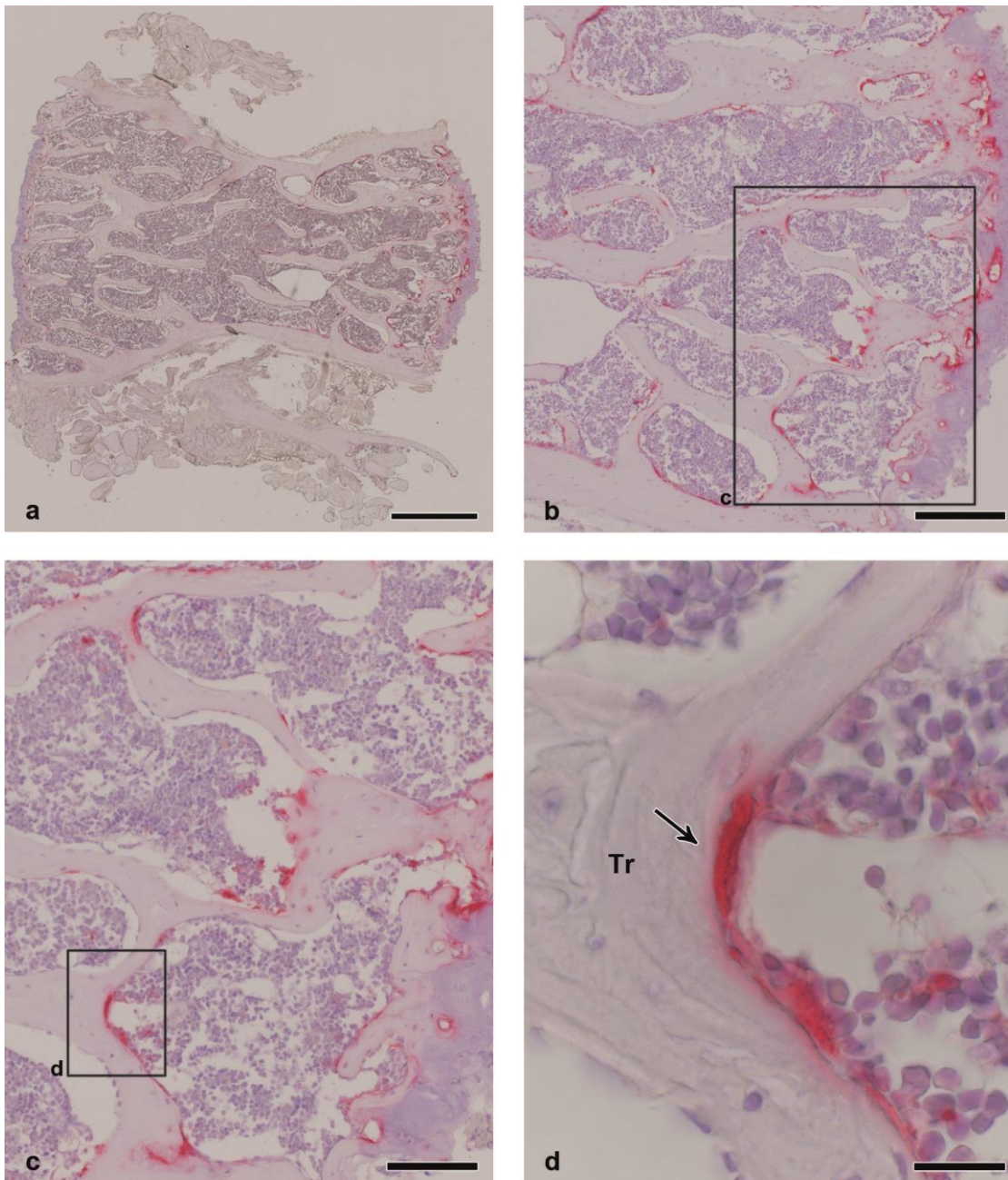
- a) Übersichtsaufnahme des Präparateanschnitts (Maßstab 500 µm).
- b) Vergrößerung mit vereinzelt rot gefärbten Anschnitten von Osteoklasten in der Spongiosa (Maßstab 200 µm).
- c) Osteoklasten (↓) an der Trabekeloberfläche (Tr) (Maßstab 20 µm).
- d) Osteoklasten (↓) mit Resorptionslakune an der Trabekeloberfläche (Tr) (Maßstab 20 µm).





**Abb. 20** TRAP Enzymhistochemie, distaler Femur, Versuchsgruppe

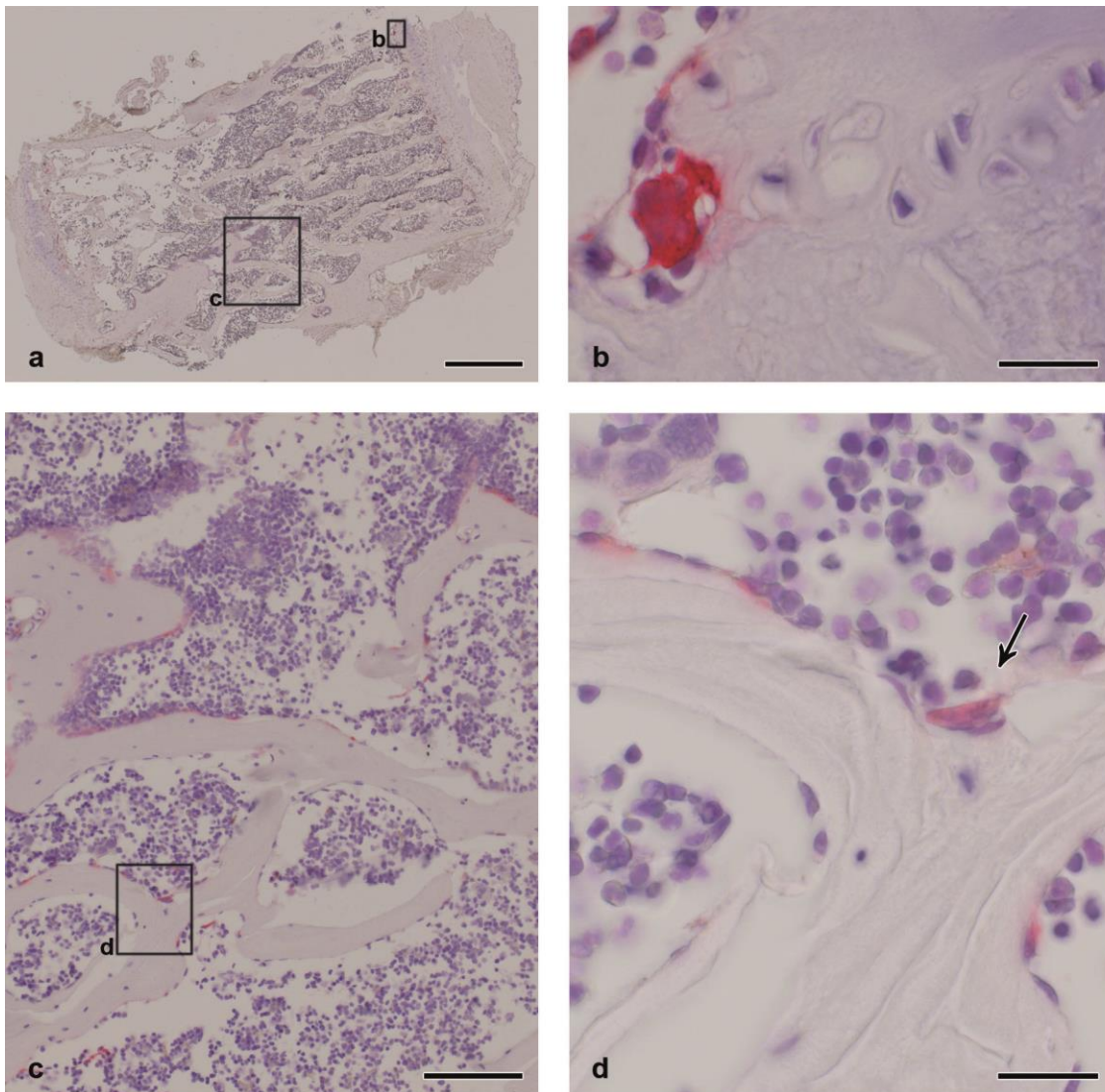
- a) Übersichtsaufnahme (Maßstab 500 µm).
- b) Vergrößerung des Ausschnitts mit Trabekelstruktur (Maßstab 200 µm).
- c) Darstellung von Osteoklasten (↓) an der Trabekeloberfläche (Tr) (Maßstab 20 µm).



**Abb. 21** TRAP Enzymhistochemie, Wirbelkörper L2, Kontrollgruppe

- a) Übersichtsaufnahme (Maßstab 500 µm).
- b) Aufnahme in der Knorpel-Knochen-Übergangszone; im unmittelbaren Kontakt mit der Wachstumsfuge befinden sich Bereiche mit deutlicher Färbereaktion der sauren Phosphatase (Maßstab 200 µm).
- c) Vergrößerung der Trabekelstruktur mit rötlich gefärbter saurer Phosphatase (Maßstab 100 µm).
- d) Darstellung von Osteoklasten (↓) an der Oberfläche des Trabekels (Tr) (Maßstab 20 µm).





**Abb. 22** TRAP Enzymhistochemie, Wirbelkörper L2, Versuchsgruppe  
a) Übersichtsaufnahme Wirbelkörper L2 der Versuchsgruppe (Maßstab 500 µm).  
b) Angefärbter Chondroblast am Knorpel - Knochenübergang (Maßstab 20 µm).  
c) Vergrößerung der Trabekelstruktur (Maßstab 50 µm).  
d) Osteoklast (↓) an der Trabekeloberfläche (Maßstab 20 µm).

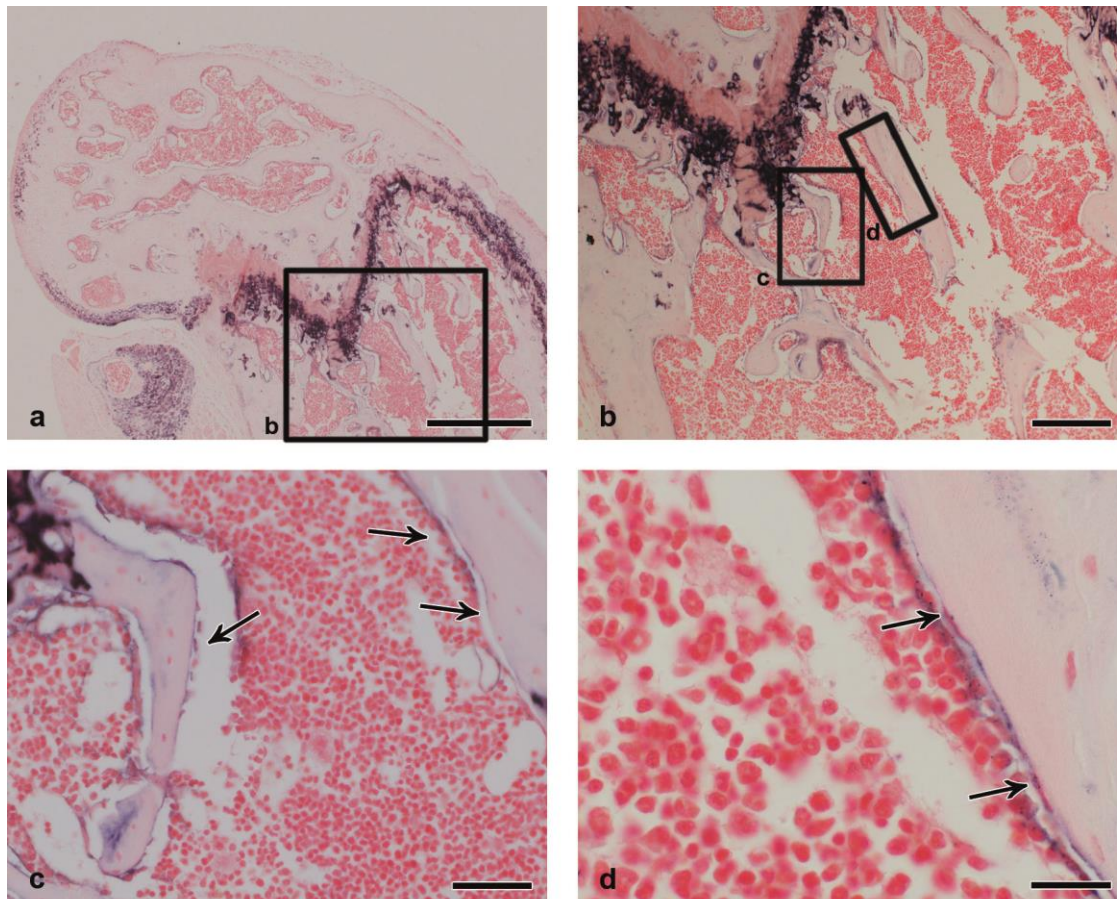
### 5.2.3 Alkalische Phosphatase Enzymhistochemie

Zur Beurteilung der Auswirkung der Fetternahrung auf die Knochenformation wurde eine enzymhistochemische Färbung der alkalischen Phosphatase in Femur- und Wirbelkörperanschnitten vorgenommen. Die alkalische Phosphatase ist ein Leitenzym der Osteoblasten. In der Färbung wird die alkalische Phosphatase blau angefärbt und bildet einen Saum entlang der Trabekeloberfläche. Die Zellkerne der Osteoblasten sind durch die Gegenfärbung mit Kernechtrot rötlich angefärbt.

In beiden Versuchsgruppen, der Kontrollgruppe und der fetternährten Gruppe war jeweils entlang der Trabekeloberflächen und der Kortikalis ein sehr schmaler blauer Saum von enzymhistochemisch gefärbter alkalischer Phosphatase zu erkennen (Abb. 23 und Abb. 24). Einen Unterschied zwischen den Gruppen in der Ausprägung oder dem Vorkommen der alkalischen Phosphatase war weder in Präparaten vom Femur noch in Präparaten des Wirbelkörpers L2 zu erkennen. Die Färbintensität schwankte dabei trotz gleicher Behandlung aller Schnitte von Tier zu Tier. In manchen Schnitten war der Saum der alkalischen Phosphatase entlang der Trabekeloberfläche sehr breit und bedeckte die Oberfläche kontinuierlich. Andere Schnitte wiesen einen von der Farbintensität stark blau gefärbten schmalen Saum der alkalischen Phosphatase auf.

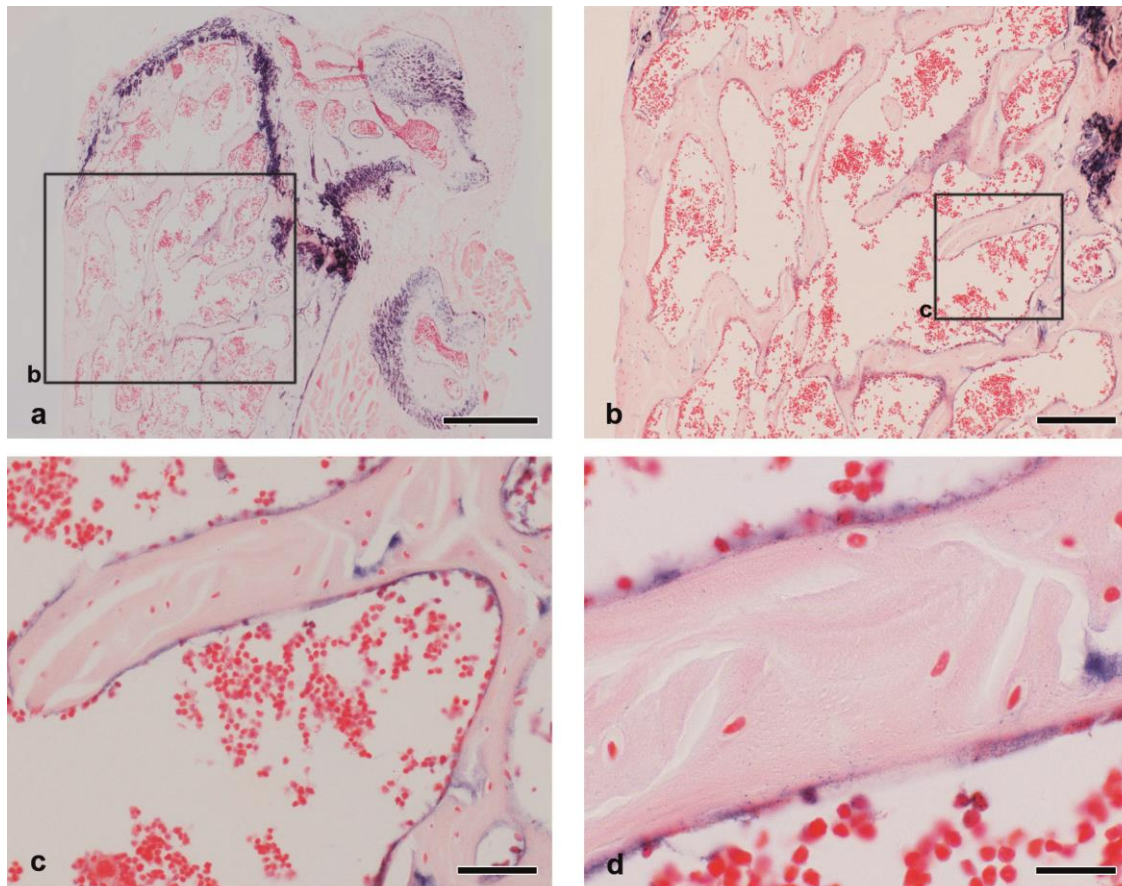
Eine stärkere Intensität der enzymhistochemischen Färbung verbunden mit einem breiteren Saum an alkalischer Phosphatase war entlang der Epiphysenfuge sowohl im Femur von Kontrolltieren als auch im Femur von fetternährten Tieren zu erkennen (Abb. 23 b Abb. 24 b).

Zusammenfassend konnte lichtmikroskopisch durch die Anfärbung der alkalischen Phosphatase kein Unterschied in der Aktivität und Verteilung der Osteoblasten zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden.



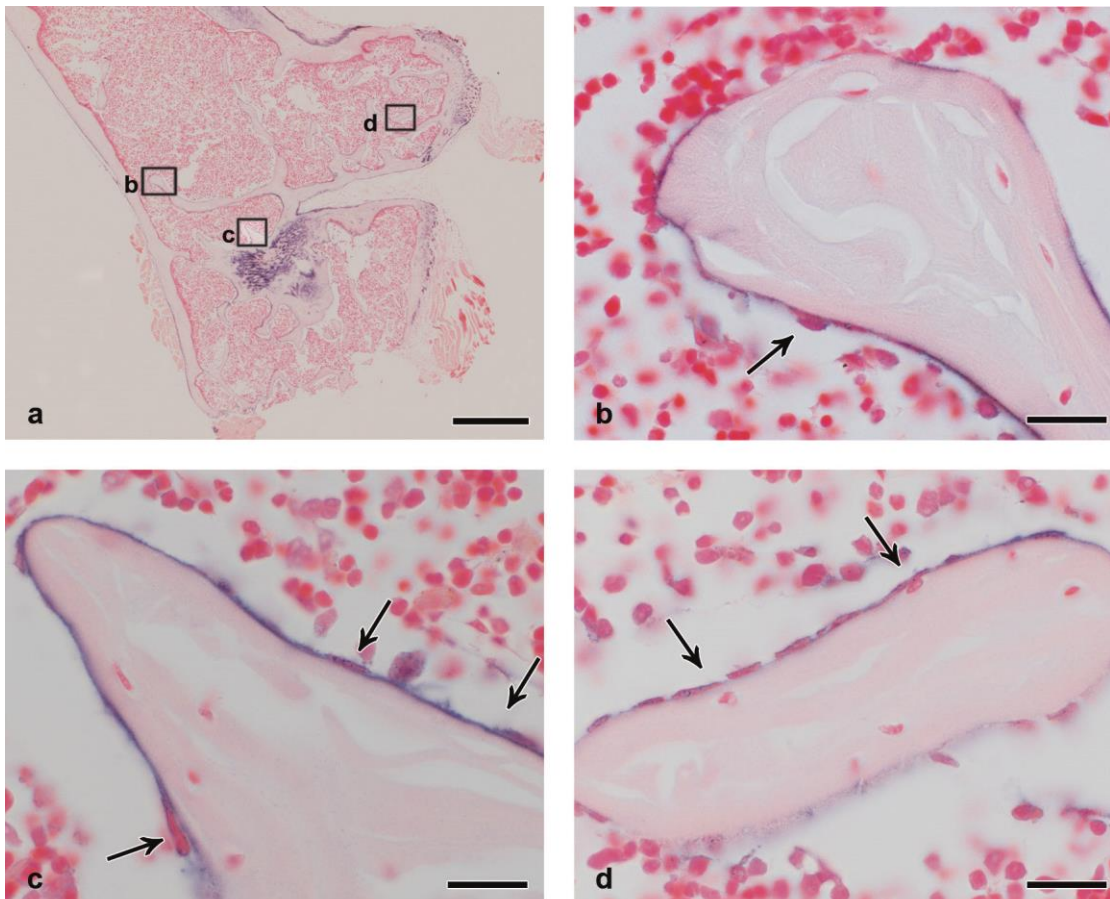
**Abb. 23** Alkalische Phosphatase Enzymhistochemie, proximaler Femur, Kontrollgruppe  
 a) Übersichtsaufnahme mit stark angefärbter Wachstumsfuge (Maßstab 500 µm).  
 b) Vergrößerung der Trabekelstruktur in der Nähe der Wachstumsfuge (Maßstab 200 µm).  
 c) Vergrößerung eines Trabekels mit erkennbarer Färbung der alkalischen Phosphatase als blauem Saum (↓) (Maßstab 50 µm).  
 d) Darstellung der Trabekeloberfläche mit blau gefärbtem Saum des Enzyms alkalische Phosphatase. Erkennbare endostale Saumzellen (↑) mit Kernechtrot angefärbten Zellkernen (Maßstab 20 µm).





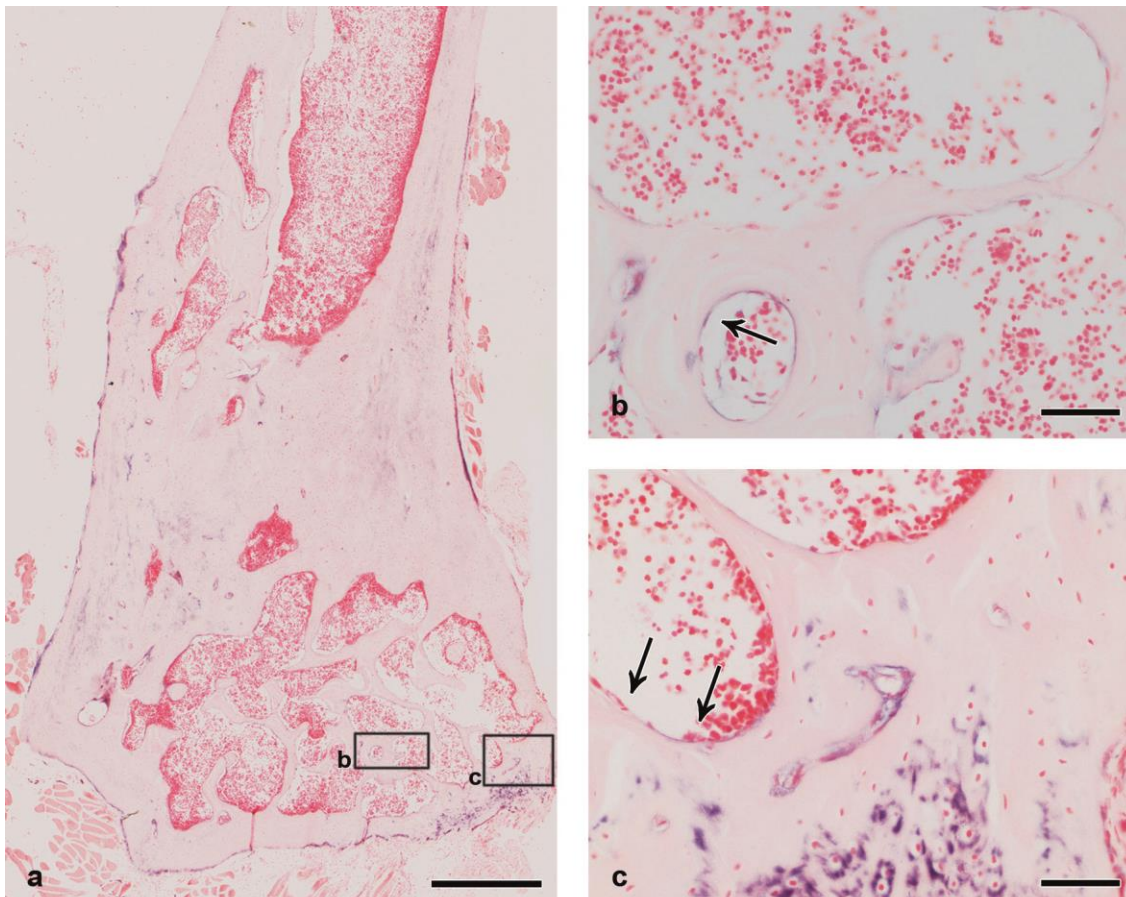
**Abb. 24** Alkalische Phosphatase Enzymhistochemie, proximaler Femur, Versuchsgruppe

- a) Übersichtsaufnahme (Maßstab 500 µm).
- b) Vergrößerung zur Darstellung der Trabekelstruktur (Maßstab 200 µm).
- c) Entlang der Trabekeloberfläche ist deutlich eine Blaufärbung des Enzyms alkalische Phosphatase zu erkennen, unterbrochen von den rot eingefärbten Zellkernen der Osteoblasten (Maßstab 50 µm).
- d) Nähere Darstellung des eingefärbten Saums der alkalischen Phosphatase mit Osteoblastenzellkernen (Maßstab 20 µm).



**Abb. 25** Alkalische Phosphatase Enzymhistochemie, distaler Femur, Kontrollgruppe

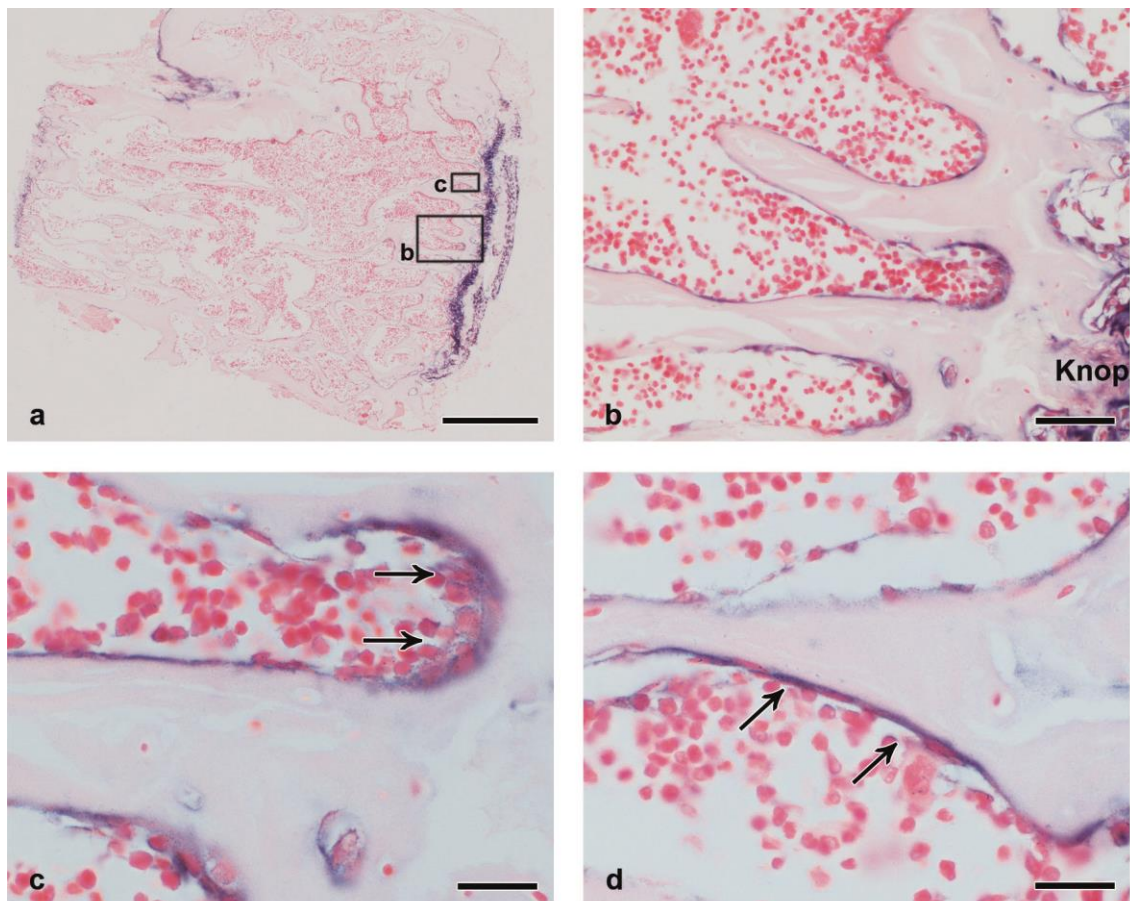
- Übersichtsaufnahme (Maßstab 500  $\mu\text{m}$ ).
- Trabekel mit Saum angefärbter alkalischer Phosphatase, Anlagerung eines Osteoblasten ( $\downarrow$ ) an die Trabekeloberfläche (Maßstab 20  $\mu\text{m}$ ).
- Zellkerne endostaler Saumzellen ( $\downarrow$ ) (Maßstab 20  $\mu\text{m}$ ).
- Aufreihung endostaler Saumzellen ( $\downarrow$ ) mit alkalischem Phosphatasesaum. Der Anschnitt zeigt eine unterschiedliche Ausprägung der Färbung des Enzyms alkalischer Phosphatase: Oberseite kräftiger Blauton, Unterseite des Trabekels nur eine relativ schwache Färbung (Maßstab 20  $\mu\text{m}$ ).



**Abb. 26** Alkalische Phosphatase Enzymhistochemie, distaler Femur, Versuchsgruppe

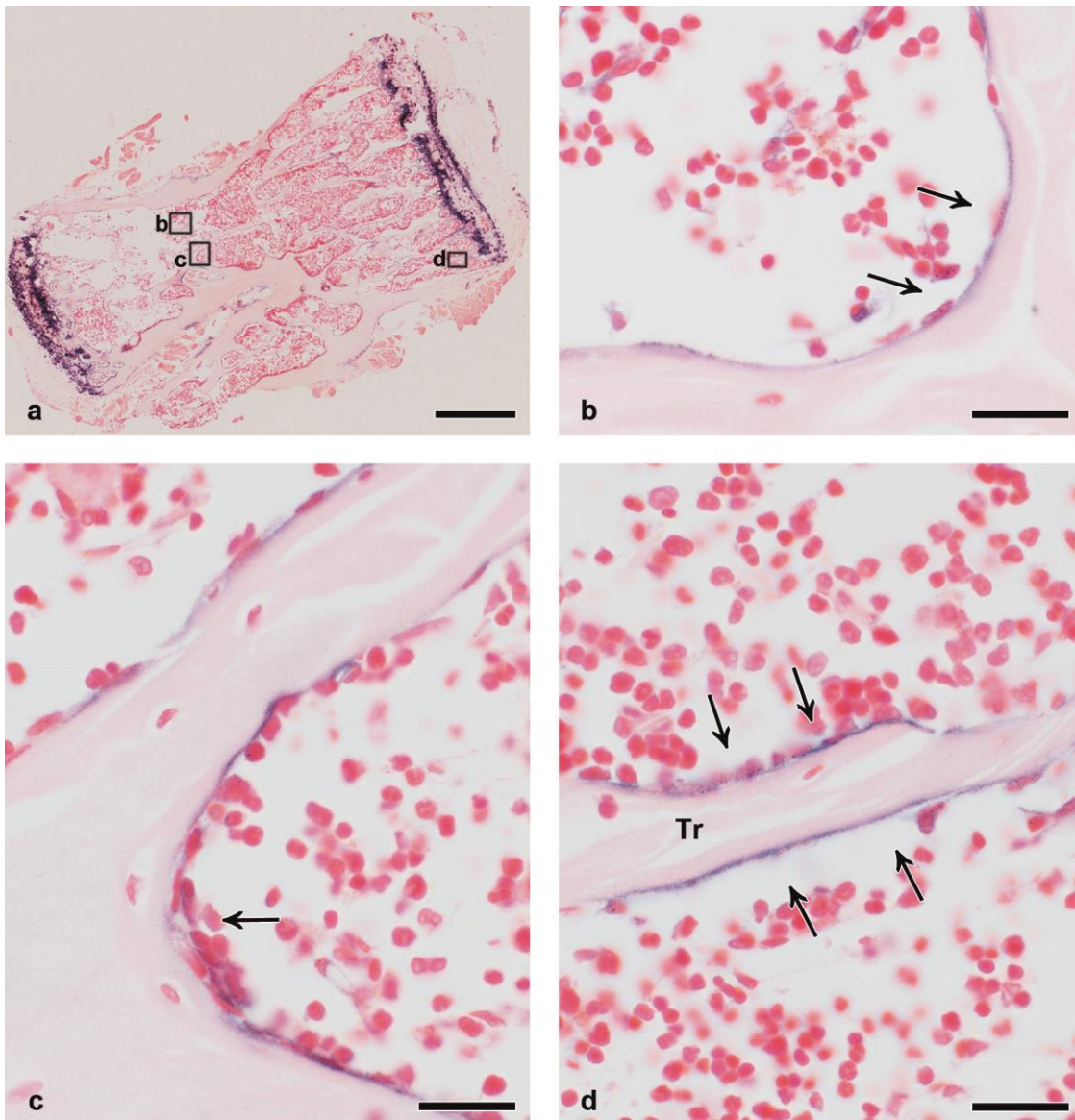
- Übersichtsaufnahme (Maßstab 500  $\mu\text{m}$ ).
- Darstellung der Trabekelstruktur. Hier ist nur ein schwach angefärbter Saum der alkalischen Phosphatase an der Trabekeloberfläche zu beobachten. In der kreisförmigen Anschnittsfläche sind endostale Saumzellen ( $\downarrow$ ) zu erkennen (Maßstab 50  $\mu\text{m}$ ).
- Leichte Färbung (sehr schmaler Saum ( $\downarrow$ )) des Enzyms alkalische Phosphatase im Bereich des distalen Endes. Im proximalen Verlauf des dargestellten Trabekels verschwindet die Anfärbung fast vollständig (Maßstab 50  $\mu\text{m}$ ).





**Abb. 27** Alkalische Phosphatase Enzymhistochemie, Wirbelkörper L2, Kontrollgruppe

- Übersichtsaufnahme (Maßstab 500 µm).
- Die alkalischen Phosphatase ist besonders stark an der Grenze zum knorpeligem Anteil (Knop) angefärbt (Maßstab 50 µm).
- Anlagerung von Osteoblasten (↓) an die Trabekeloberfläche (Maßstab 20 µm).
- Sich ausbildender Trabekel mit Saum angefärbter alkalischer Phosphatase und endostalen Saumzellen (↓) (Maßstab 20 µm).



**Abb. 28** Alkalische Phosphatase Enzymhistochemie, Wirbelkörper L2, Versuchsgruppe

- Übersichtsaufnahme Wirbelkörper L2 Versuchsgruppe (Maßstab 500  $\mu\text{m}$ ).
- Trabekelstruktur mit Anfärbung der alkalischen Phosphatase und endostalen Saumzellen ( $\downarrow$ ) (Maßstab 20  $\mu\text{m}$ ).
- An dieser Stelle ist eine Anlagerung von Osteoblasten ( $\downarrow$ ) mit angefärbtem Saum der alkalischen Phosphatase zu erkennen (Maßstab 20  $\mu\text{m}$ ).
- Starke Ausprägung der Färbung der alkalischen Phosphatase an der Trabekeloberfläche (Maßstab 20  $\mu\text{m}$ ).

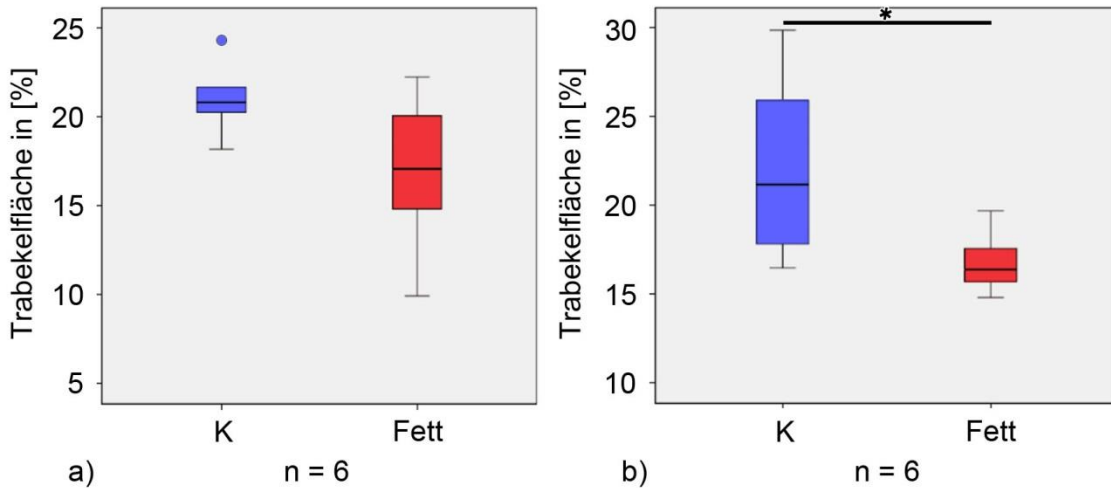
### 5.3 Histomorphometrie

Zur Erfassung der in der HE-Färbung und den enzymhistochemischen Färbungen gesehenen Veränderungen in Ausprägung und Größe der Trabekelfläche wurde eine histomorphometrische Vermessung durchgeführt. In den HE-Schnitten des proximalen und distalen Femurs sowie des Wirbelkörpers L2 wurde die Trabekelfläche bestimmt. Es stellte sich die Frage, ob sich der jeweilige Trabekelanteil (Angabe in Prozent) bezogen auf die „Area of interest“ (AOI) in den Schnitten zwischen den Gruppen unterscheidet. Die AOI bezeichnete den definierten Bereich, indem die Trabekeloberfläche gemessen wurde.

Die statistische Analyse des Messbereichs im Femur ergab eine signifikante Abnahme der Trabekelfläche im Messbereich des distalen Femurs ( $p = 0,026$ ) in der fetternährten Versuchsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe. Die mittlere gemessene Trabekelfläche im distalen Femur in der Kontrollgruppe lag bei 22,0639% ( $\pm 5,0217$ ). In der Versuchsgruppe wurde im Mittel ein geringerer prozentualer Anteil der Trabekelfläche im AOI gemessen 16,7619% ( $\pm 1,7276$ ).

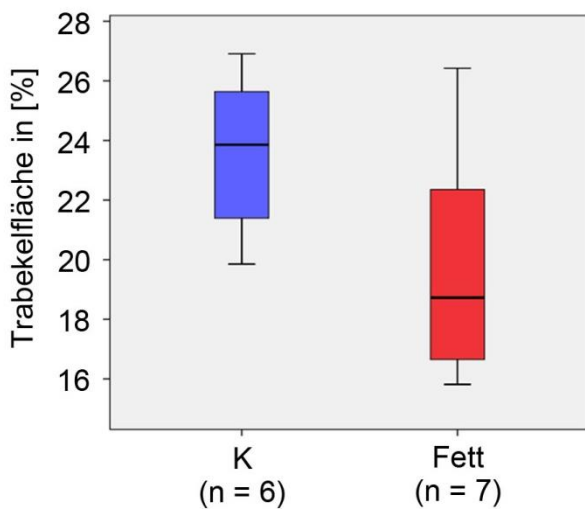
Im proximalen Femur war keine signifikante Abnahme ( $p = 0,065$ ) der Trabekelfläche in der fetternährten Gruppe erkennbar. Die mittlere gemessene Trabekelfläche im proximalen Femur lag in der Kontrollgruppe bei 21,0009% ( $\pm 2,0087$ ) und in der Versuchsgruppe bei 16,8641% ( $\pm 4,2989$ ).

Die Messungen und statistischen Auswertungen der Trabekelfläche im Wirbelkörper L2 erbrachten keinen signifikanten Unterschied in der gemessenen Trabekelfläche ( $p = 0,101$ ). Die prozentual gemessene Trabekelfläche in der AOI in der Kontrollgruppe lag im Mittel bei 23,5852% ( $\pm 2,657$ ) und in der Versuchsgruppe erniedrigt bei 19,854% ( $\pm 3,961$ ).



**Abb. 29** Histomorphometrie proximaler und distaler Femur

- a) Proximaler Femur: Es wurde kein Gruppenunterschied im statistischen Vergleich der Trabekelfläche gemessenen ( $p = 0,065$ ). Der Kreis markiert einen „Ausreißerwert“, der mehr als 1,5 fache vom Median abweicht.
- b) Distaler Femur: Es zeigte sich ein signifikanter Gruppenunterschied  $p = 0,026$  (\*) mit einer Abnahme der Trabekelfläche in der fett ernährten Gruppe.



**Abb. 30** Histomorphometrie Wirbelkörper L2

Kein Gruppenunterschied ergab sich im statistischem Vergleich der Trabekelfläche im Wirbelkörper L2 ( $p = 0,101$ ).

AOI	Gruppe	Mittelwert Trabekelfläche in [%]	Signifikanz
Proximaler Femur	K	21,0009 ( $\pm 2,0087$ )	$p = 0,065$
	Fett	16,8641 ( $\pm 4,2989$ )	
Distaler Femur	K	22,0639 ( $\pm 5,0217$ )	$p = 0,026$ (*)
	Fett	16,7619 ( $\pm 1,7276$ )	
Wirbelkörper L2	K	23,5852 ( $\pm 2,657$ )	$p = 0,101$
	Fett	19,854 ( $\pm 3,961$ )	

**Tab. 4** Darstellung der Ergebnisse der mittleren gemessenen Trabekelfläche in der AOI für die beiden Versuchsgruppen.

## 5.4 Real-time RT-PCR

Zur Analyse des mRNA Expressionslevels der verschiedenen Markerproteine Osteocalcin (= Bglap), Cathepsin K und Kollagen 1 $\alpha$ 1 wurde eine reverse Transkription der isolierten RNA aus Humerus (Kontrollgruppe n = 6, Versuchsgruppe n = 7) und Wirbelkörper L3 (Kontrollgruppe n = 6, Versuchsgruppe n = 6) mit anschließender real-time PCR durchgeführt (siehe Kap. 4.6).

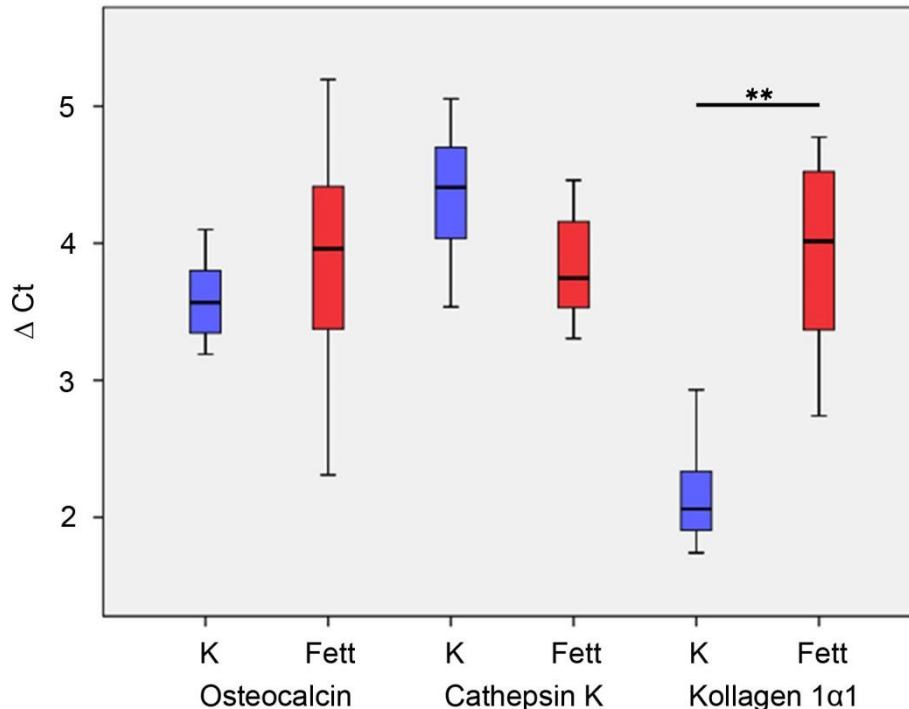
In dieser Untersuchung zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied in der Kollagen 1 $\alpha$ 1 Expression jeweils in Humerus und Wirbelkörper L3 zwischen der Kontroll- und der fetternährten Versuchsgruppe (Humerus p = 0,002; Wirbelkörper L3 p = 0,004). In der fetternährten Gruppe war die Expression an Kollagen 1 $\alpha$ 1 mRNA deutlich reduziert, was durch einen höheren  $\Delta$ Ct-Wert (Humerus  $3,901 \pm 0,77$ , Wirbelkörper L3  $3,468 \pm 0,46$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe sichtbar wird (siehe Tab. 5 und Tab. 6). Im Gegensatz hierzu waren die Mittelwerte der  $\Delta$ Ct-Werte der Kontrollgruppe der Kollagen 1 $\alpha$ 1 Expression deutlich niedriger, im Humerus bei  $2,172 (\pm 0,42)$  und im Wirbelkörper L3 bei  $2,064 (\pm 0,66)$  (siehe Tab. 5 und Tab. 6). Bei vorausgesetzter gleicher Effizienz der real-time RT-PCR und unter Berücksichtigung der exponentiellen Amplifikation der cDNA ist somit ein deutlicher Unterschied in der Expressionsmenge an Kollagen 1 $\alpha$ 1 mRNA zwischen den beiden Versuchsgruppen feststellbar.

Bei dem für Osteoblasten typischen Expressionsmarker für den Knochenaufbau Osteocalcin (= Bglap) konnte in der statistischen Auswertung kein signifikanter Gruppenunterschied festgestellt werden (Humerus p = 0,366, Wirbelkörper L3 p = 0,31). Die Ergebnisse zeigen, dass in der fetternährten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Reduktion der Osteocalcinexpression stattfand.

Für den Osteoklastenmarker Cathepsin K konnte bei der statistischen Auswertung kein signifikanter Unterschied (Humerus p = 0,138; Wirbelkörper L3 p = 0,937) zwischen den Gruppen festgestellt werden. Eine erhöhte Expression des Osteoklastenmarkers Cathepsin K als Hinweis auf einen vermehrten knochenresorbierenden Prozess konnte in der fetternährten Gruppe nicht gezeigt werden.

Darstellung der $\Delta$ Ct-Werte für den Humerus			
Gruppe	Osteocalcin	Cathepsin K	Kollagen 1 $\alpha$ 1
Kontrolle	3,8	5,055	2,93
Kontrolle	3,19	4,035	2,335
Kontrolle	4,1	4,625	2
Kontrolle	3,345	4,19	1,905
Kontrolle	3,41	4,7	2,12
Kontrolle	3,725	3,535	1,74
Mittelwert	3,595 ( $\pm$ 0,34)	4,357 ( $\pm$ 0,54)	2,172 ( $\pm$ 0,42)
Fett	3,96	4,46	4,735
Fett	3,885	3,745	4,015
Fett	2,31	3,38	2,74
Fett	2,865	3,305	3,35
Fett	4,375	4,275	3,385
Fett	4,455	4,04	4,775
Fett	5,195	3,68	4,31
Mittelwert	3,864 ( $\pm$ 0,98)	3,841 ( $\pm$ 0,44)	3,901 ( $\pm$ 0,77)

**Tab. 5** Real-time RT-PCR Humerus: Tabellarische Darstellung der einzelnen  $\Delta$ Ct-Werte, geordnet nach den Primern Osteocalcin, Cathepsin K und Kollagen 1 $\alpha$ 1 für die beiden Gruppen.

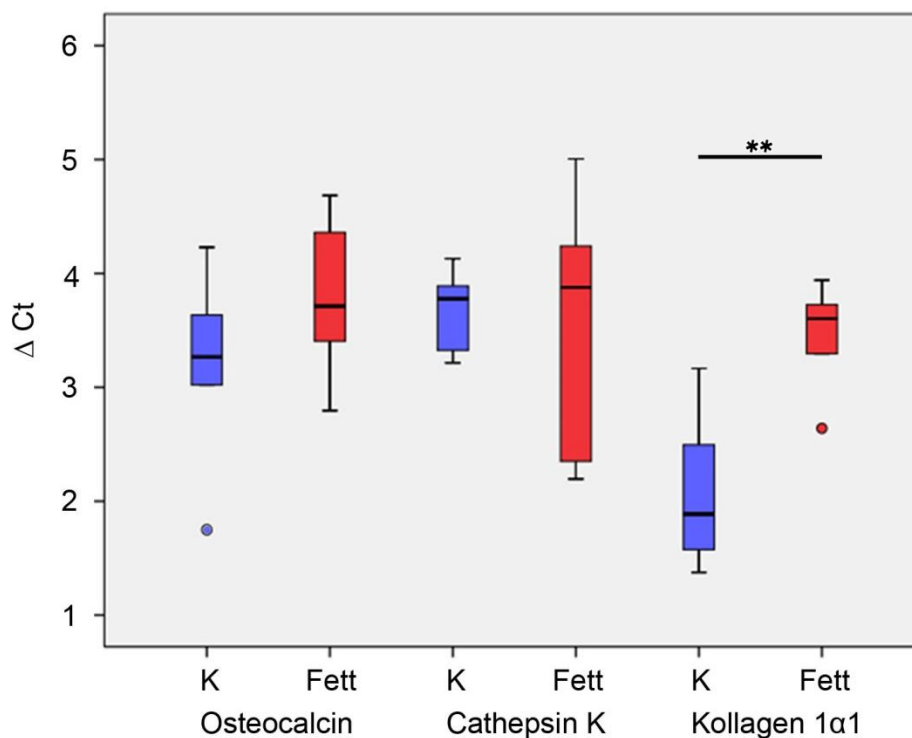


**Abb. 31** Real-time RT-PCR Humerus  
Darstellung der Ergebnisse für die Kontrollgruppe (K; n = 6) und die fetternährte Gruppe (Fett; n = 7) im Boxplot für die Primer Osteocalcin ( $p = 0,366$ ), Cathepsin K ( $p = 0,138$ ), Kollagen 1 $\alpha$ 1 ( $p = 0,002$ ).



Darstellung der $\Delta\text{Ct}$ -Werte für den Wirbelkörper L3			
Gruppe	Osteocalcin	Cathepsin K	Kollagen 1 $\alpha$ 1
Kontrolle	1,75	3,325	3,165
Kontrolle	3,635	3,705	1,845
Kontrolle	3,485	3,85	2,495
Kontrolle	3,02	3,89	1,575
Kontrolle	4,23	4,13	1,93
Kontrolle	3,05	3,215	1,375
Mittelwert	3,195 ( $\pm$ 0,84)	3,686 ( $\pm$ 0,35)	2,064 ( $\pm$ 0,66)
Fett	3,57	2,35	3,725
Fett	3,855	3,67	2,64
Fett	4,36	5,005	3,295
Fett	3,405	4,24	3,94
Fett	4,685	4,085	3,61
Fett	2,795	2,195	3,595
Mittelwert	3,778 ( $\pm$ 0,68)	3,591 ( $\pm$ 1,11)	3,468 ( $\pm$ 0,46)

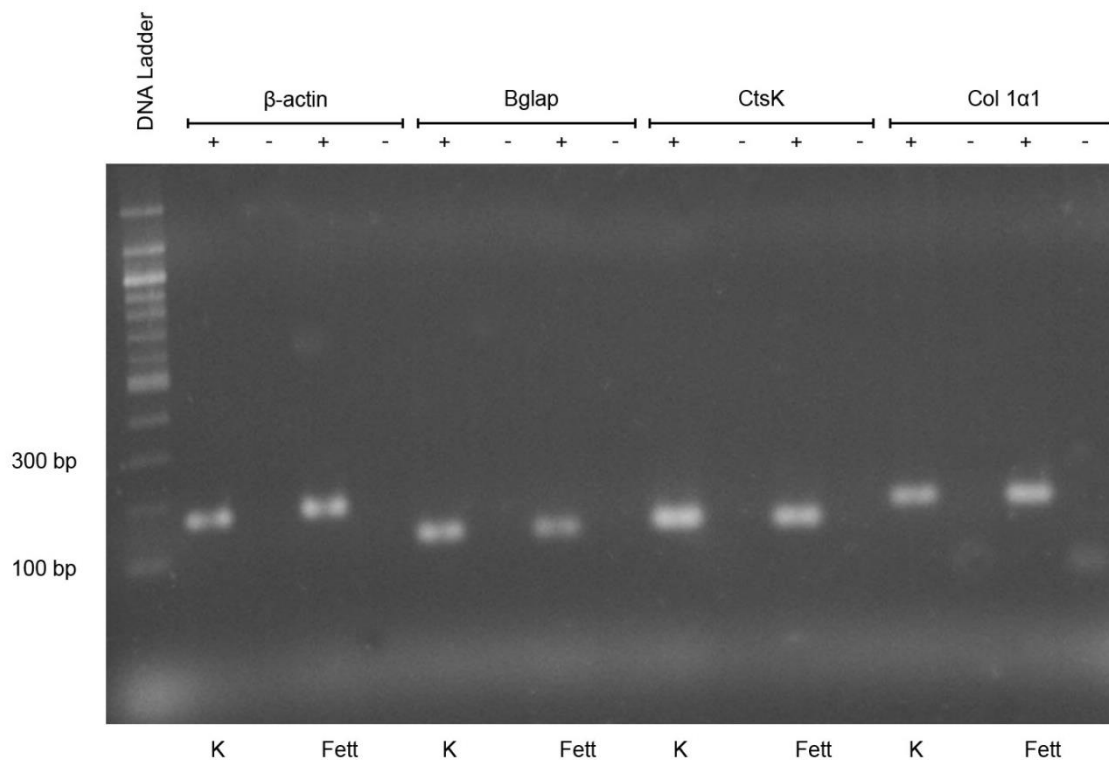
**Tab. 6** Real-time RT-PCR Wirbelkörper L3: Tabellarische Darstellung der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte, geordnet nach den Primern Osteocalcin, Cathepsin K und Kollagen 1 $\alpha$ 1 für die beiden Gruppen.



**Abb. 32** Real-time RT-PCR Wirbelkörper L3

Darstellung der Ergebnisse im Boxplot für die Kontrollgruppe (K; n = 6) und die fetternährte Gruppe (Fett; n = 6) für die Primer Osteocalcin ( $p = 0,31$ ), Cathepsin K ( $p = 0,937$ ) und Kollagen 1 $\alpha$ 1 ( $p = 0,004$ ) im Wirbelkörper L3. Die Kreise markieren die „Ausreißer“, die mehr als das 1,5 fache vom Median abweichen.

Zur Kontrolle der real-time RT-PCR wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurde exemplarisch eine Probe von der Kontrollgruppe und der fetternährten Gruppe geelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 33). Aus dem Gelbild geht hervor, dass die eingesetzten Primer zu einem Produkt der erwarteten Größe geführt haben. In den Negativ-Kontrollen konnte kein Produkt nachgewiesen werden.



**Abb. 33** Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte aus der real-time RT-PCR Produkte für die Kontrollgruppe (K) und die Versuchsgruppe (Fett). Die Positiv-Kontrolle (+) mit cDNA und Negativ-Kontrolle (-) ohne cDNA sind für die einzelnen Primer  $\beta$ -actin, Osteocalcin (Bglap), Cathepsin K (CtsK) und Kollagen 1 $\alpha$ 1 (Col 1 $\alpha$ 1) markiert.

## 5.5 Kollagen 1 Immunhistochemie

Ziel der immunhistochemischen Färbung von Kollagen 1 war die Sichtbarmachung der in der real-time RT-PCR festgestellten deutlichen Reduktion der Expressionsmenge von Kollagen 1 $\alpha$ 1 in der fetternährten Versuchsgruppe. Die lichtmikroskopische Auswertung der angefärbten Paraffinschnitte des proximalen und distalen Femurs sowie des Wirbelkörpers L2 zeigten eine rötliche Färbung der Knochensubstanz für



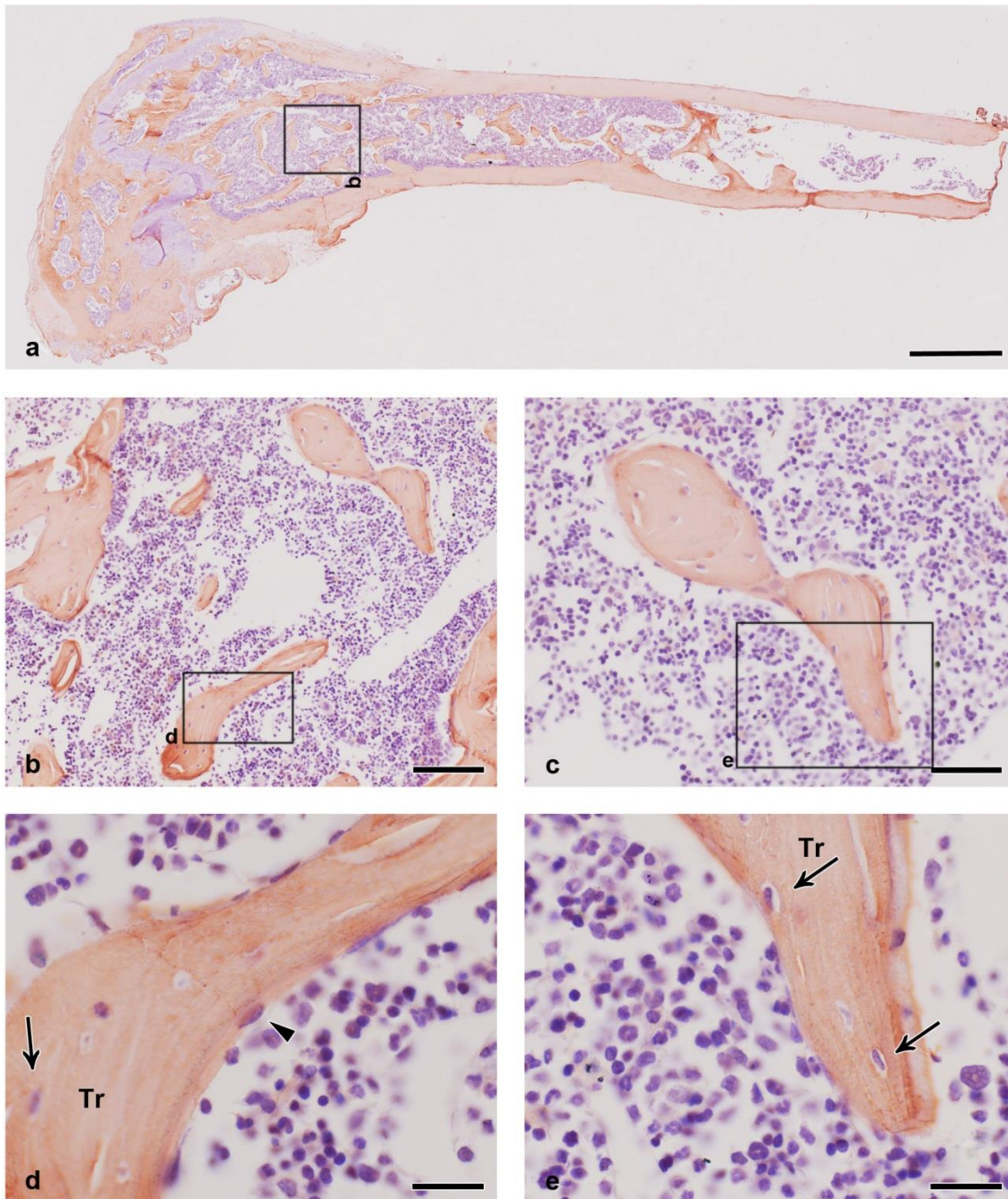
Kollagen 1. Knorpelanteile wurden in keinem Präparat angefärbt. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämatoxylin.

Beim Vergleich der Färbung innerhalb der Trabekelstruktur entstand der Eindruck einer homogeneren Rotfärbung in der Kontrollgruppe verglichen mit der Versuchsgruppe. In der Versuchsgruppe schwankte die Farbintensität sehr stark. Jede Lamelle für sich war unterschiedlich angefärbt (Abb. 34 und Abb. 37). In einem Trabekel gab es Lamellenstrukturen mit starker Rotfärbung, wo hingegen die direkt anliegende Lamelle deutlich schwächer gefärbt war (Abb. 35 d). Es entstand der Eindruck einer geflechtknochenartigen Lamellenstruktur (Abb. 35 c).

Die unterschiedliche Färbung der Trabekelstruktur war auch in den Anschnitten der Wirbelkörper erkennbar. In den Schnitten der Kontrolltiere konnte eine homogenere Färbung der Lamellen in den Trabekeln beobachtet werden (Abb. 38) als in der Versuchsgruppe (Abb. 39).

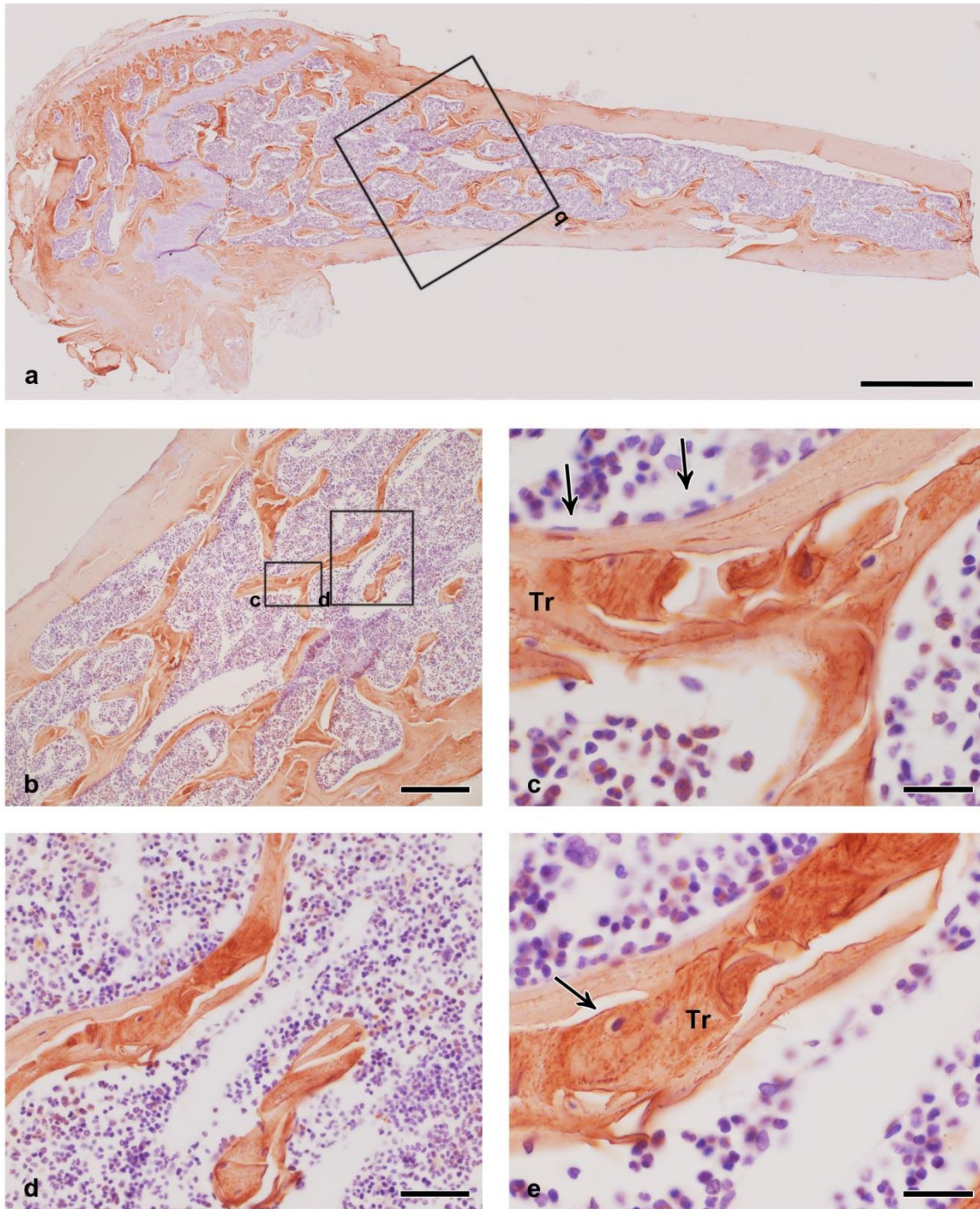
Eine spezifische Region im Präparateanschnitt für eine Gruppe mit erhöhter oder reduzierter Intensität der Färbung konnte lichtmikroskopisch nicht festgestellt werden. Die Intensität der Kollagen 1 Färbung variierte innerhalb eines Präparates und zwischen den einzelnen Tieren zum Teil sehr stark.

Auf eine quantifizierende Messung der Farbintensität wurde aufgrund der starken Varianz innerhalb der Gruppen und der schwierigen Standardisierung der Anschnittsflächen der Präparate verzichtet.



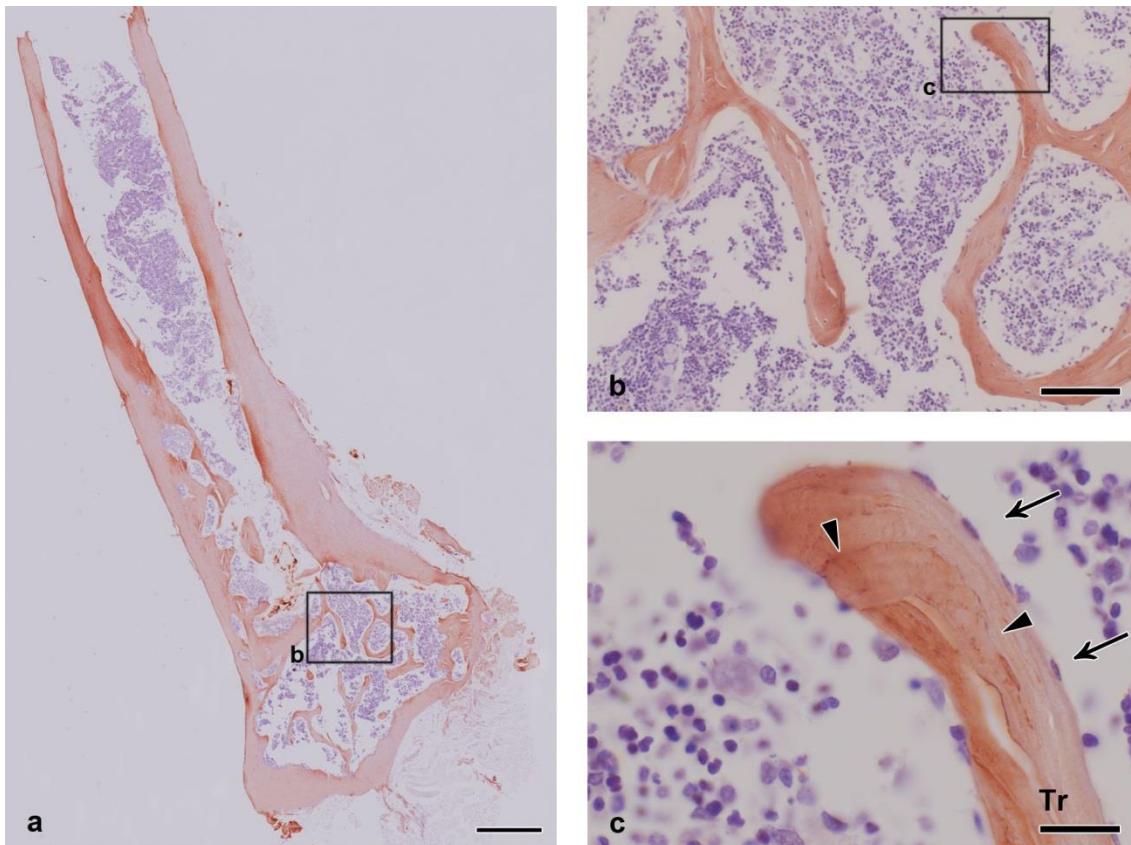
**Abb. 34** Kollagen 1 Immunhistochemie, proximaler Femur, Kontrollgruppe  
 a) Übersichtsaufnahme (Maßstab 500 µm).  
 b) Ausschnittsvergrößerung aus der Spongiosa mit einzelnen Trabekeln (Maßstab 100 µm).  
 c) Ausschnittsvergrößerung aus der Spongiosa (Maßstab 50 µm).  
 d) Homogene Trabekelstruktur, einzelne Lamellen sind abgrenzbar, gleichmäßige Kollagen 1 Anfärbung innerhalb des Trabekels, Osteoblasten (▼) und Osteozyten (↓) im Trabekel (Tr) (Maßstab 20 µm).  
 e) Lamellenverlauf im Trabekel mit eingeschlossenen Osteozyten (↓) (Maßstab 20 µm).





**Abb. 35** Kollagen 1 Immunhistochemie, proximaler Femur, Versuchsgruppe

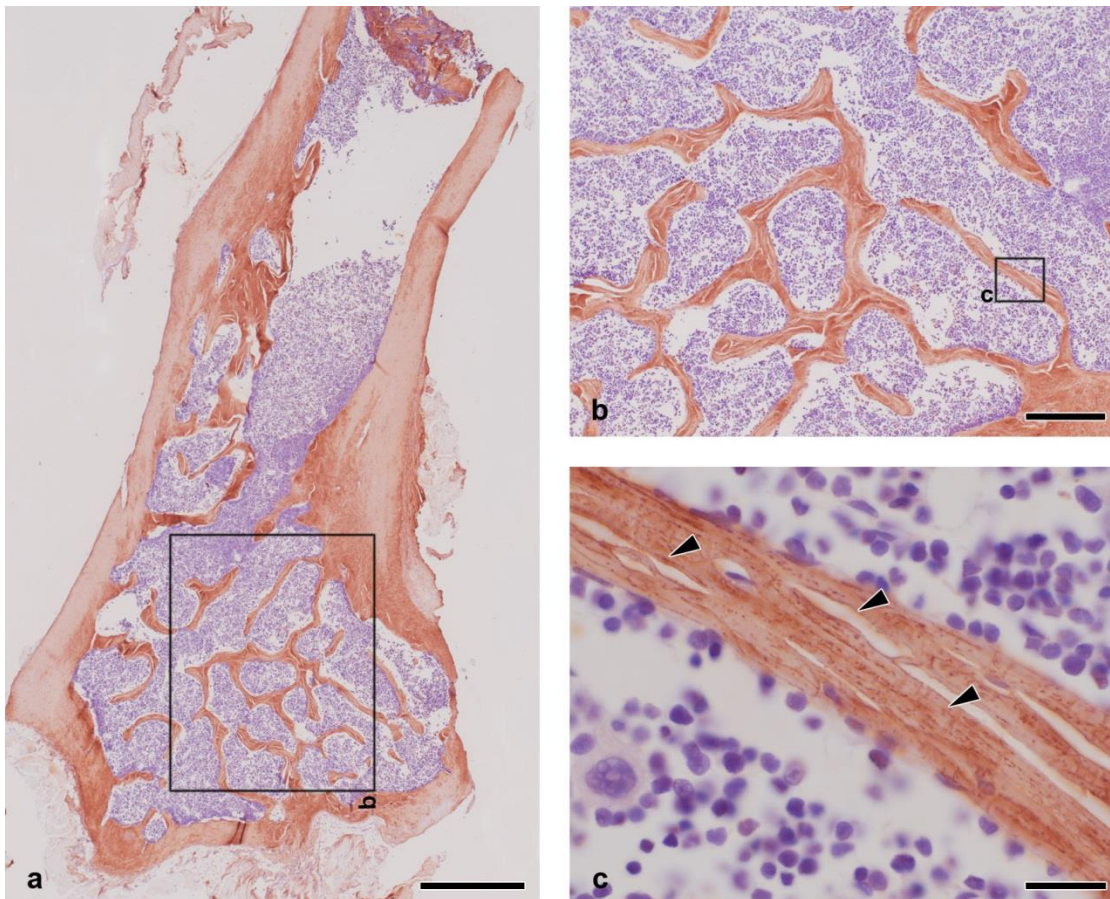
- a) Übersichtsaufnahme (Maßstab 500  $\mu$ m).
- b) Trabekel im Bereich der Spongiosa (Maßstab 200  $\mu$ m).
- c) Trabekel (Tr) mit unterschiedlich starkem Nachweis von Kollagen 1 und einer geflechtknochenartigen Lamellenstruktur. Zwei aufliegende endostale Saumzellen ( $\downarrow$ ) (Maßstab 20  $\mu$ m).
- d) Vergrößerung Trabekelstruktur mit sich ablösenden Lamellen (Maßstab 50  $\mu$ m).
- e) Unterschiedliche Intensität der Färbung des Kollagens. In der Mitte des Trabekels liegt ein Osteozyt ( $\downarrow$ ) (Maßstab 20  $\mu$ m).



**Abb. 36** Kollagen 1 Immunhistochemie, distaler Femur, Kontrollgruppe

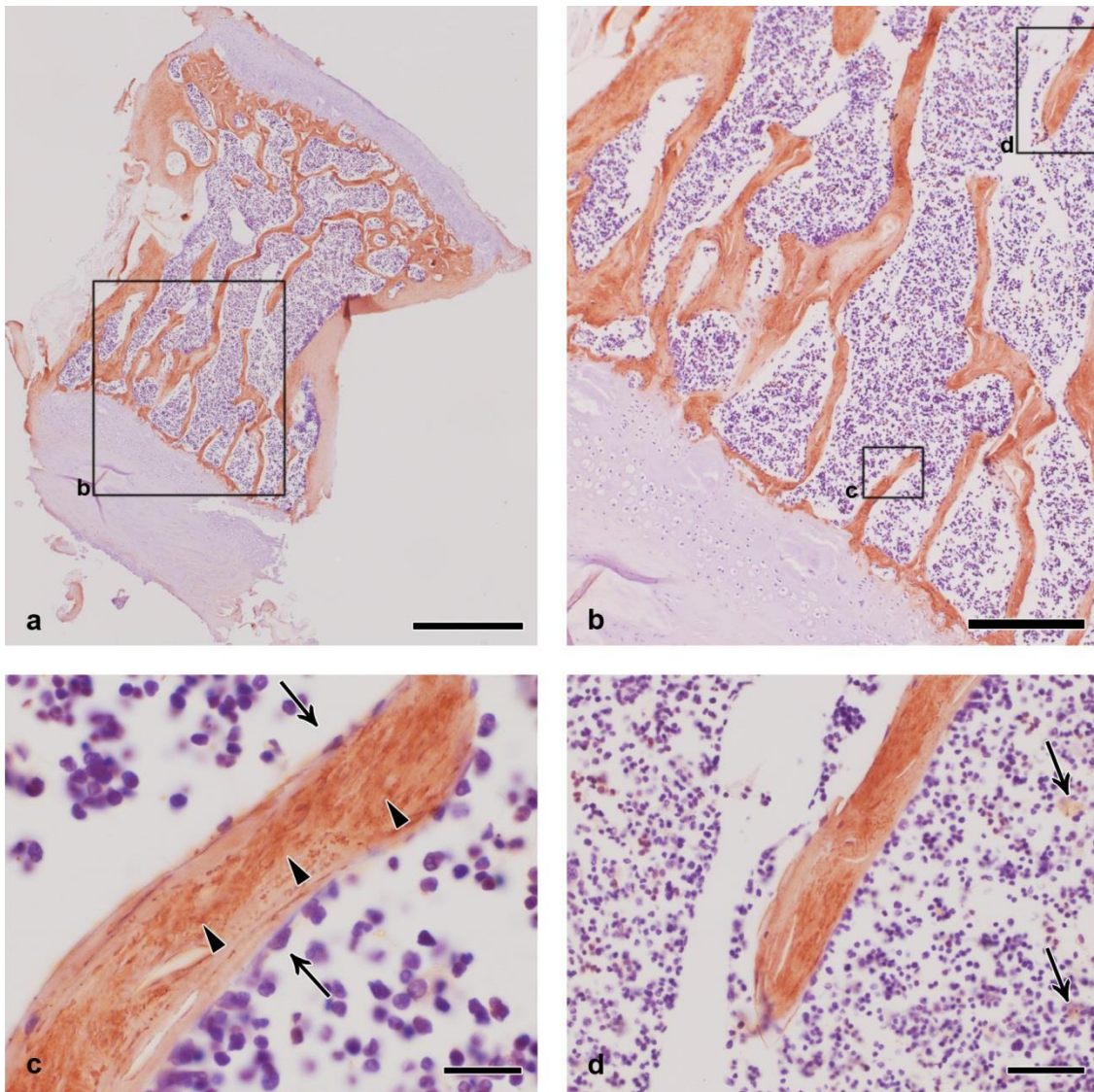
- a) Übersichtsaufnahme des distalen Femurs der Kontrollgruppe (Maßstab 500 µm).
- b) Vergrößerung der Trabekelstruktur (Maßstab 100 µm).
- c) Darstellung eines Trabekelausschnittes (Tr) mit den einzelnen Lamellen: Die Lamellengrenzen sind verstärkt angefärbt (▼). An der Trabekeloberfläche liegen endostale Saumzellen (↓) (Maßstab 20 µm).





**Abb. 37** Kollagen 1 Immunhistochemie, distaler Femur, Versuchsgruppe

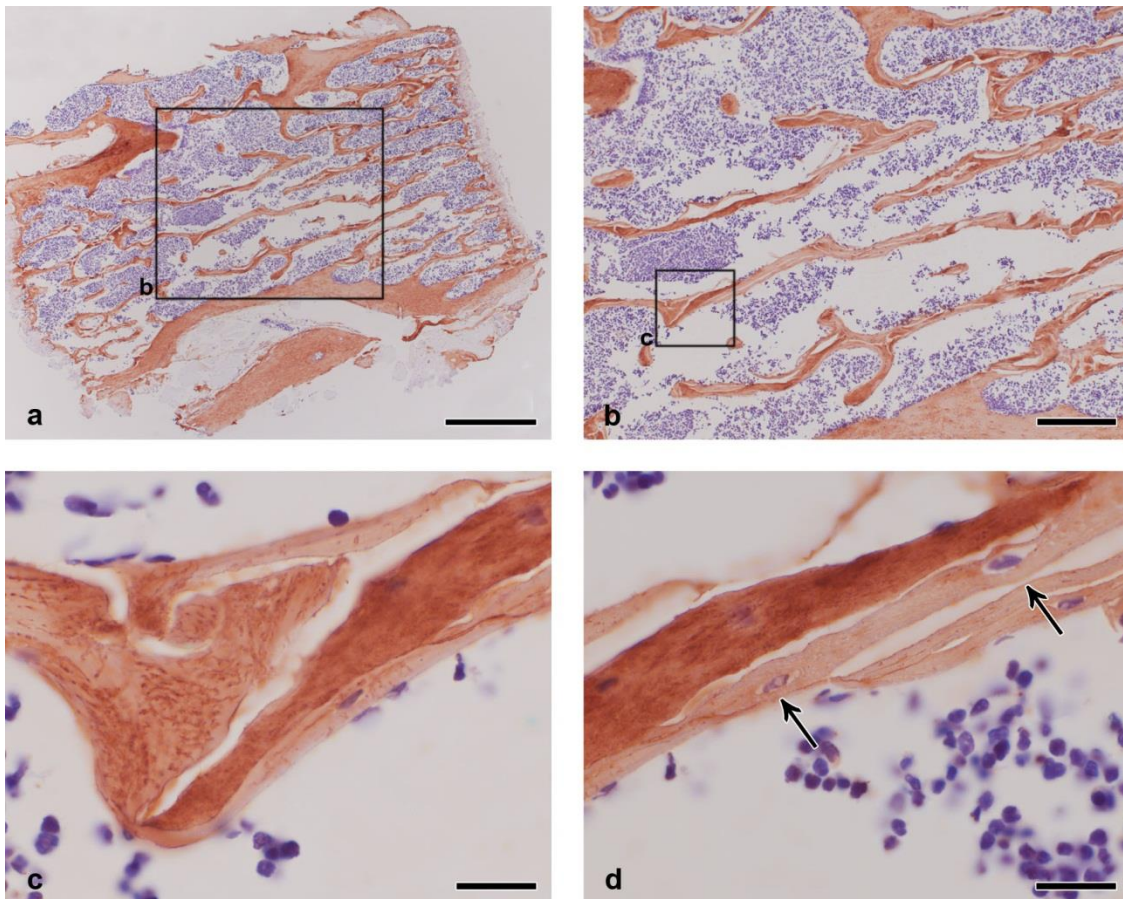
- a) Übersichtsaufnahme (Maßstab 500  $\mu\text{m}$ ).
- b) Vergrößerung Trabekelstruktur im distalen Femur mit verzweigtem Trabekelnetzwerk (Maßstab 200  $\mu\text{m}$ ).
- c) Darstellung eines Trabekels mit dem abgrenzbaren Lamellenverlauf, randbetonter Nachweis von Kollagen an den Lamellengrenzen ( $\blacktriangledown$ ) (Maßstab 20  $\mu\text{m}$ ).



**Abb. 38** Kollagen 1 Immunhistochemie, Wirbelkörper L2, Kontrollgruppe

- a) Übersichtsaufnahme (Maßstab 500 µm).
- b) Vergrößerung der Trabekelstruktur (Maßstab 200 µm).
- c) Vergrößerung eines im Präparat randständigen Trabekelausläufers: Regionen mit fast wolkenförmiger Anfärbung des Kollagens (▼) sind im Trabekelanschnitt zu erkennen. Zellkerne von endostalen Saumzellen (↓) liegen der Trabekeloberfläche an (Maßstab 20 µm).
- d) Vergrößerte Darstellung eines Trabekels und vereinzelter Nachweis von Kollagen im retikulären Gewebe (↓) des Knochenmarks (Maßstab 50 µm).





**Abb. 39** Kollagen 1 Immunhistochemie, Wirbelkörper L2, Versuchsgruppe

- Übersichtsaufnahme (Maßstab 500 µm).
- Vergrößerung der Trabekelstruktur zur Orientierung (Maßstab 200 µm).
- Trabekelstruktur mit unterschiedlich stark gefärbten Lamellenanteilen (Maßstab 20 µm).
- Darstellung eines Trabekels mit einer abgrenzbaren Lamellenstruktur, mit in den Lamellen verankerten Osteozyten (↓). Auch hier weisen die Lamellen eine unterschiedlich starke Farbintensität auf (Maßstab 20 µm).

## 5.6 Tabellarische Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse

	Versuchsgruppe	Kontrollgruppe
<b>HE-Färbung</b>		
<b>Femur:</b>		
- Trabekelstruktur	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enden der Trabekel eher spitz zu laufend</li> <li>- Trabekel sind schmaler</li> <li>- Lamellen in den Trabekeln lösen sich voneinander</li> <li>- Osteozyten aus der Lamellenstruktur herausgelöst</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Abgerundete Anschnitte der Trabekel</li> <li>- Trabekel im Vergleich breiter</li> <li>- Geschwungener Verlauf der Trabekel</li> <li>- Osteozyten sind in den Verlauf der Lamellenstruktur eingebettet</li> </ul>
- Knochenmark	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Keine Verfettung des Markraumes nachweisbar</li> </ul>	
<b>Wirbelkörper L2:</b>		
- Trabekelstruktur	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Weniger vernetzte Struktur</li> <li>- Spitz zu laufende Trabekel</li> <li>- Lamellen lösen sich voneinander ab</li> <li>- Osteozyten aus der Lamellenstruktur herausgelöst</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Osteozyten sind in den Verlauf der Lamellenstruktur eingebettet</li> </ul>
<b>TRAP-Enzymhistochemie</b>		
	Kein Unterschied	
<b>Alkalische Phosphatase Enzymhistochemie</b>		
	Kein Unterschied	
<b>Kollagen 1 Immunhistochemie</b>		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- deutlicher Unterschied in der Intensität der Rotfärbung der einzelnen Lamellen im Trabekel</li> <li>- erhöhter Geflechtknochenanteil</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Trabekel homogen rot angefärbt</li> </ul>

**Tab. 7** Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse

## 5.7 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Ultrastruktur der Trabekel im Wirbelkörper L4 wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Exemplarisch wurde der Wirbelkörper L4 an je 2 Tieren pro Gruppe aufgearbeitet.

In den Semidünnschnitten der Versuchsgruppe fiel ein deutlich schmalerer Osteoidsaum (nichtmineralisierte Kollagenfibrillen) im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. An manchen Stellen grenzte der mineralisierte Knochen direkt an die Trabekeloberfläche an, ohne dass ein Saum aus nicht mineralisierten Kollagenfibrillen bestand.

Bei den Ultradünnschnitten bestätigte sich das Ergebnis eines kaum oder nur sehr schmal ausgeprägten Osteoidsaumes entlang der Trabekelfläche in der Versuchsgruppe. Nur ein geringer Anteil unmineralisierter Kollagenstrukturen war zu erkennen (Abb. 45). In den Ultrastrukturaufnahmen der Kontrolltiere konnte hingegen deutlich zwischen dem mineralisierten Knochengewebe und dem nichtmineralisierten Osteoidsaum unterschieden werden (Abb. 40 und Abb. 41). Im direkten Vergleich war der nichtmineralisierte Osteoidsaum in der Versuchsgruppe wesentlich schmaler ausgeprägt als in der Kontrollgruppe.

Die entlang der Trabekeloberfläche anliegenden Osteoblasten und endostalen Saumzellenverbände scheinen sich in der Versuchsgruppe aufzulösen. Die Zellen lagen zum Teil einzeln, ohne ausgeprägte Zellkontakte zu den Nachbarzellen auf der Trabekeloberfläche (Abb. 45 b und Abb. 46). Ein zusammenhängender Zellverband aus über Zellkontakte verknüpften Osteoblasten, wie er in der Kontrollgruppe (Abb. 42) vorliegt, konnte nicht identifiziert werden. Die Trabekeloberfläche der Kontrollgruppe war durch den intakten zusammenhängenden Zellverbund aus Osteoblasten und endostalen Saumzellen als Abgrenzung zum Knochenmark charakterisiert. Die Verdichtungszone der Zellkontakte waren auf den Elektronenmikroskopaufnahmen deutlich zu erkennen (Abb. 42 b). Selbst sich gerade zu Osteozyten differenzierende Osteoblasten wurden schon von neu angelagerten Osteoblasten überdeckt, so dass der Zellverband keine Lücken aufwies.

Bei Betrachtung des Zytoplasmas der Osteoblasten der fetternährten Gruppe fällt ein geringer Anteil an rauem endoplasmatischem Retikulum (rER) auf (Abb. 46 d). Insgesamt besaßen die Osteoblasten der Versuchsgruppe nur sehr wenig Zytoplasma (Abb. 46 c). Im Kontrast hierzu waren die Osteoblastenkerne der Kontrollgruppe von relativ viel Zytoplasma umgeben, das einen hohen Anteil an rauem

endoplasmatischem Retikulum besaß (Abb. 43). Der größte Teil des endoplasmatischen Retikulums befand sich im Teil des Zytoplasmas, welches der Trabekeloberfläche zugewandt war.

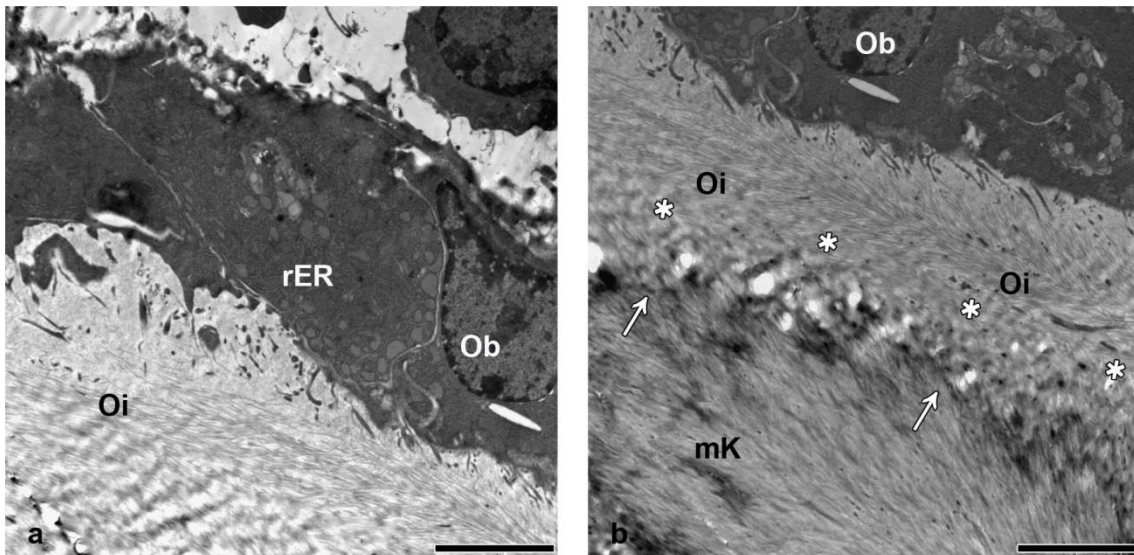
Im Zytoplasma der Osteoblasten der Versuchsgruppe wurden nur wenige für die Exozytose bestimmte Vesikel beobachtet. Extrazellulär befanden sich zur Trabekeloberfläche hin im Vergleich nur wenig neu synthetisierte Kollagenfibrillen. Der Osteoidsaum mit einer strukturierten Anordnung der Kollagenfibrillen, wie er in der Kontrollgruppe vorkam, war bei den Versuchstieren nicht zu erkennen.

Bei manchen Osteoblasten in der Versuchsgruppe waren nicht nur ein geringer Zytoplasmaanteil sondern auch Lücken in der Zellmembran zu erkennen (Abb. 47). Einige Osteoblasten zeigten Anzeichen von Apoptose durch Zellkernveränderung mit Auflösung der Kernhülle und fehlender bzw. lückenhafter Zellmembran.

Auch die bereits in den Kochen eingemauerten Osteozyten unterschieden sich in ihrer Zellmorphologie von denen in der Kontrollgruppe (Abb. 48 b). Veränderungen im Zytoplasmaanteil waren zu erkennen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die Zellkerne in der Versuchsgruppe meist durch einen wesentlich schmaleren Zytoplasmasaum eingerahmt. Außerdem waren eine starke Auffaltungen der Membran und eine eher lückenhafte Abgrenzung zum perizellulären Raum zu erkennen (Abb. 48).

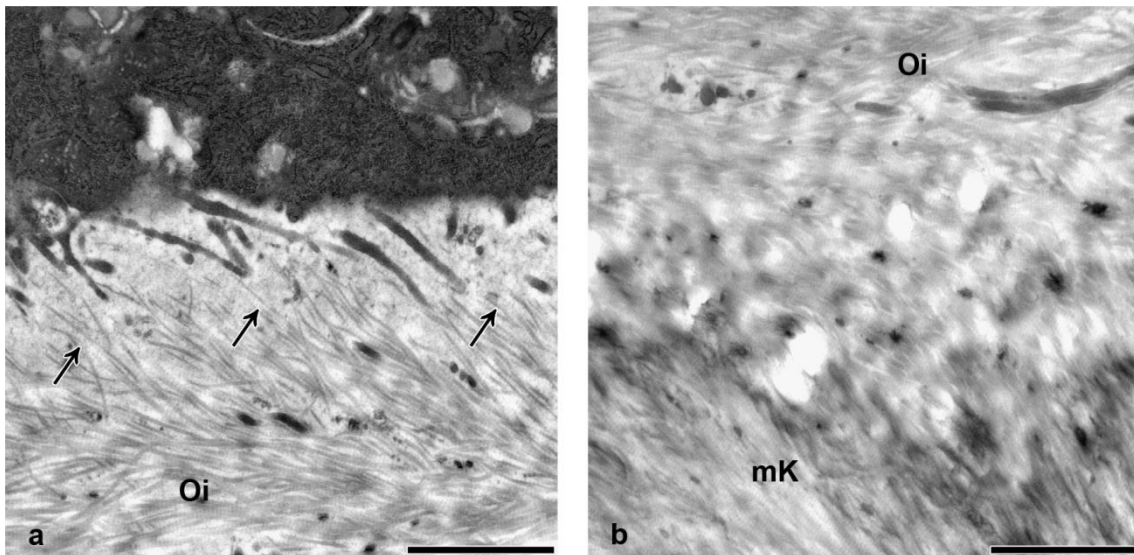
In den Anschnitten aus der Kontrollgruppe wie auch in der Versuchsgruppe konnten die für die Interaktion wichtigen Canaliculi ossei in der Nähe der eingemauerten Osteozyten identifiziert werden (Abb. 44, Abb. 46 d).

Zusammenfassend zeigte sich in der fetternährten Versuchsgruppe eine Auflösung des Zellverbandes der Osteoblasten. Die am Trabekel anliegenden Osteoblasten wiesen apoptotische Veränderungen in ihrer Zellmorphologie und eine geringere Kollagenbiosyntheseaktivität durch einen geringeren Anteil an rauem endoplasmatischem Retikulum auf. Eine Auflösung der Zellmembran von Osteoblasten an der Trabekeloberfläche war zu erkennen. Außerdem war die Kernhülle in einigen Osteoblasten beschädigt (Abb. 47 b). Diese Beobachtungstendenzen an den außenliegenden Osteoblasten können teilweise sogar auf die bereits in den Knochen eingemauerten Osteozyten übertragen werden. Die beobachteten Osteozyten zeigten ebenfalls Veränderungen in ihrer Zellmembranstruktur durch ein verstärkte Auffaltung. Um die geschlossene Kernhülle der Osteozyten war fast kein Zytoplasma mehr vorhanden.



**Abb. 40** TEM, Wirbelkörper L4, Kontrollgruppe

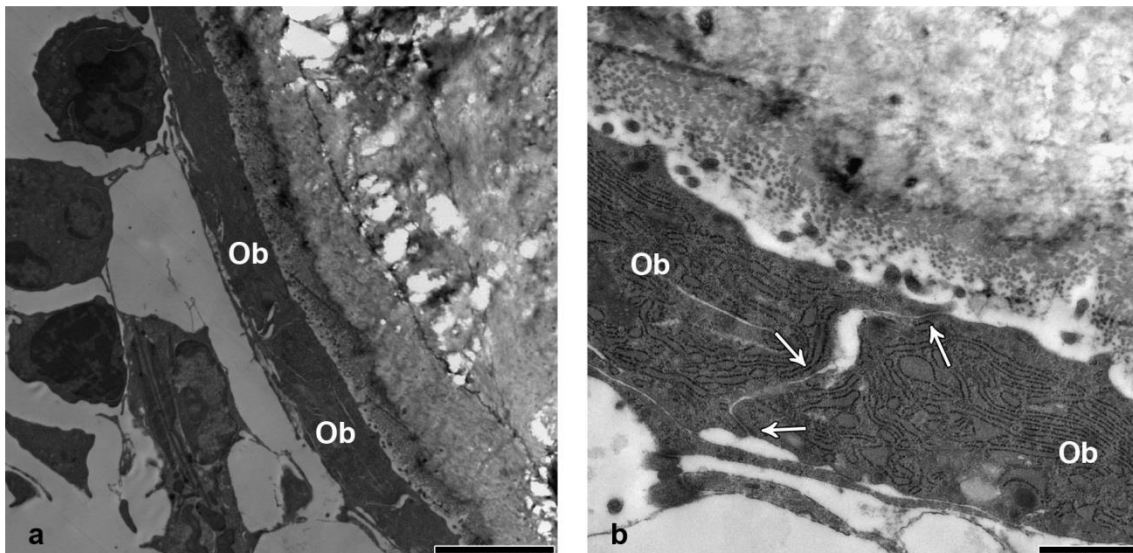
- Trabekeloberfläche geprägt durch den Osteoidsaum (Oi). Die aufliegenden Osteoblasten (Ob) besitzen ein rER reiches Zytoplasma (Maßstab 5  $\mu$ m).
- Lamellengrenze ( $\downarrow$ ) und Übergangzone (\*) zwischen dem mineralisiertem Knochengewebe (mK) und dem nichtmineralisierten Osteoid (Oi) im Bereich der Trabekeloberfläche (Maßstab 5  $\mu$ m).



**Abb. 41** TEM, Wirbelkörper L4, Kontrollgruppe

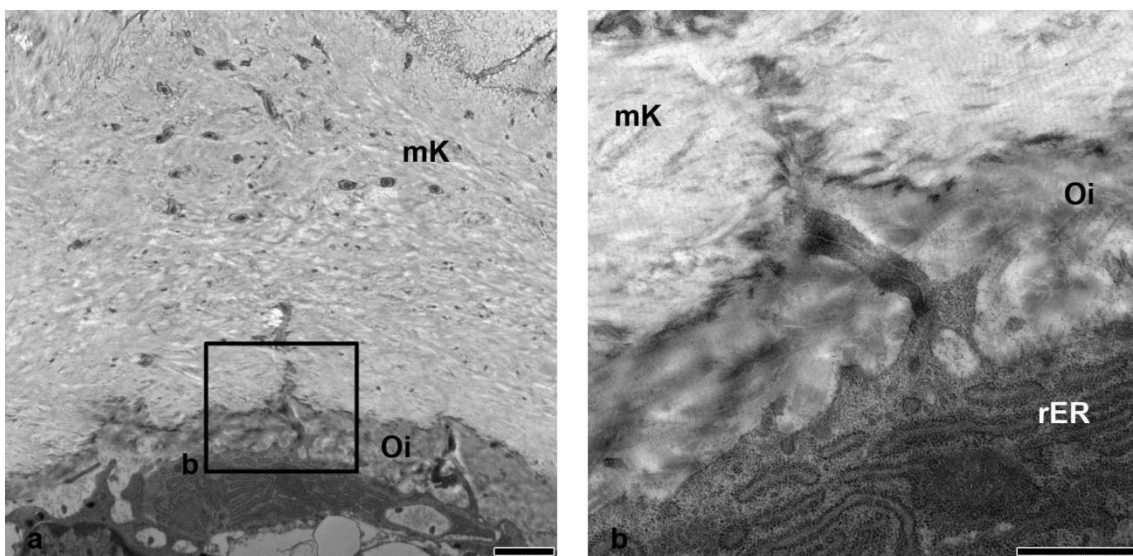
- Kollagenfibrillen ( $\downarrow$ ) im Osteoidsaum (Oi) (Maßstab 2  $\mu$ m).
- Abgrenzung des Osteoids (Oi) vom mineralisierten Knochengewebe (mK) (Maßstab 2  $\mu$ m).





**Abb. 42** TEM, Wirbelkörper L4, Kontrollgruppe

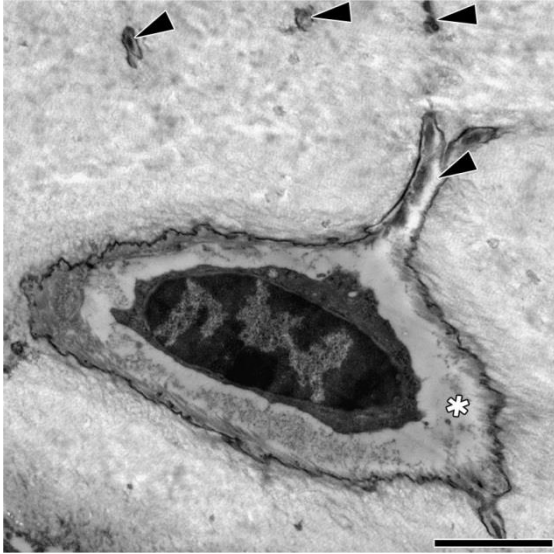
- Zellverband aus an der Trabekeloberfläche anliegenden Osteoblasten (Ob) (Maßstab 5 µm).
- Darstellung der Zellgrenzen von zwei benachbarten Osteoblasten (Ob). Erkennbar sind die Verdichtungszone an der Zytoplasmamembran für die Zellkontakte (↓). Das Zytoplasma der Osteoblasten ist reich an rauem endoplasmatischen Retikulum (Maßstab 1 µm).



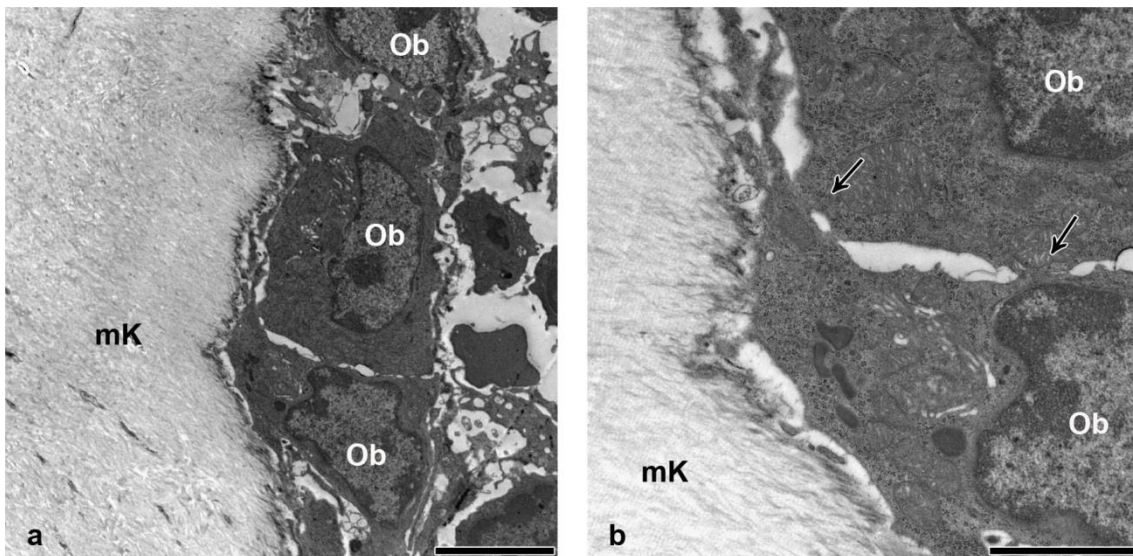
**Abb. 43** TEM, Wirbelkörper L4, Kontrollgruppe

- Übersichtsaufnahme der Trabekeloberfläche mit dem nicht mineralisierten Osteoidsaum (Oi) (Maßstab 2 µm).
- Zytoplasmaausläufer mit rauem Endoplasmatischem Retikulum (rER) für die Kollagenbiosynthese, liegt dem Osteoidsaum an (Maßstab 1 µm).



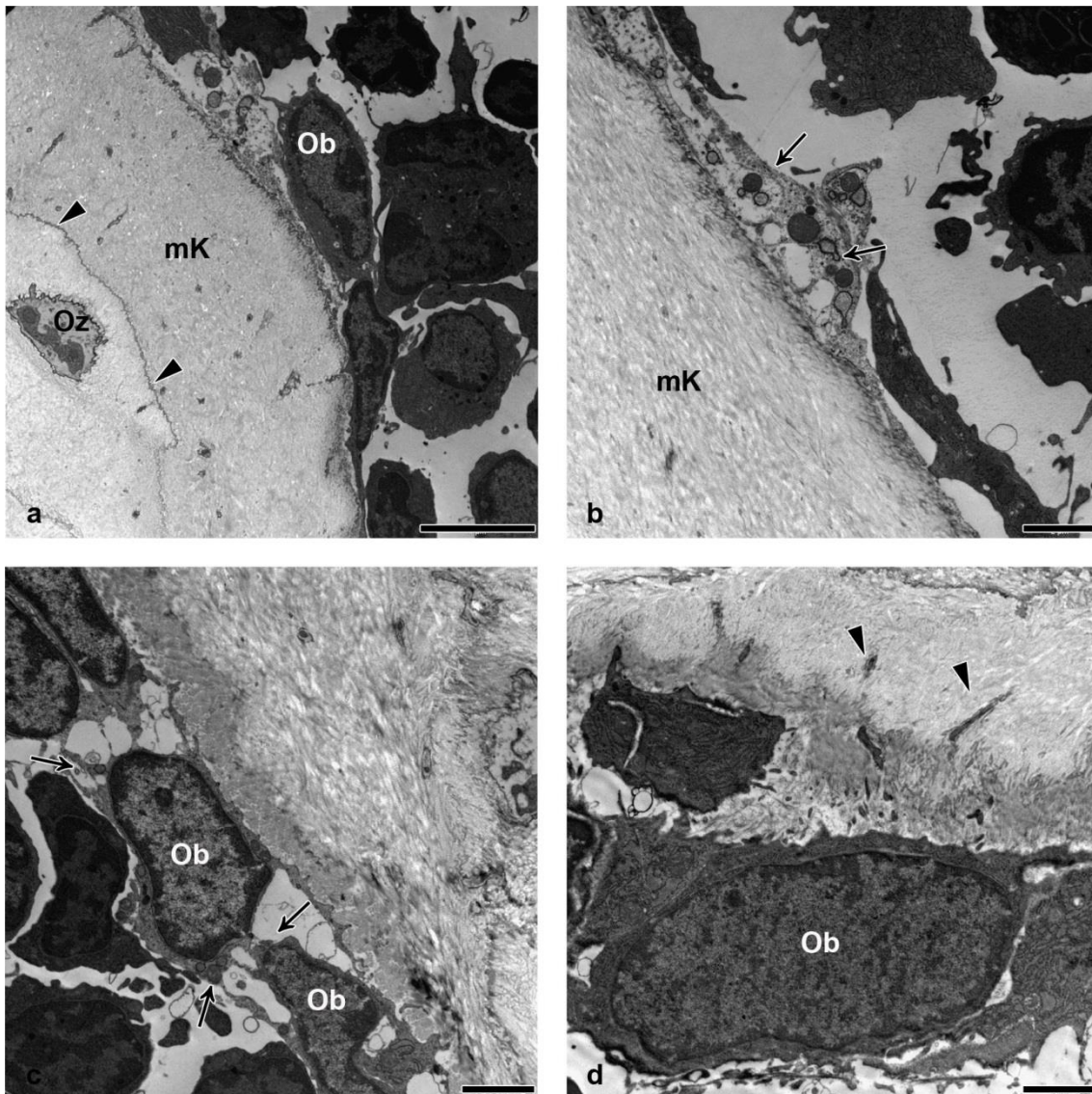


**Abb. 44** TEM, Wirbelkörper L4, Kontrollgruppe  
Erkennbar ist ein eingemauerter Osteozyt in den Trabekelknochen. Um den Zellkern herum befindet sich ein Zytoplasmasaum mit rER. Das weiße Sternchen markiert den perizellulären Raum, der den Osteozyten umgibt und bis in die Canaliculi ossei (▼) hineinreicht (Maßstab 2 µm).



**Abb. 45** TEM, Wirbelkörper L4, Versuchsgruppe

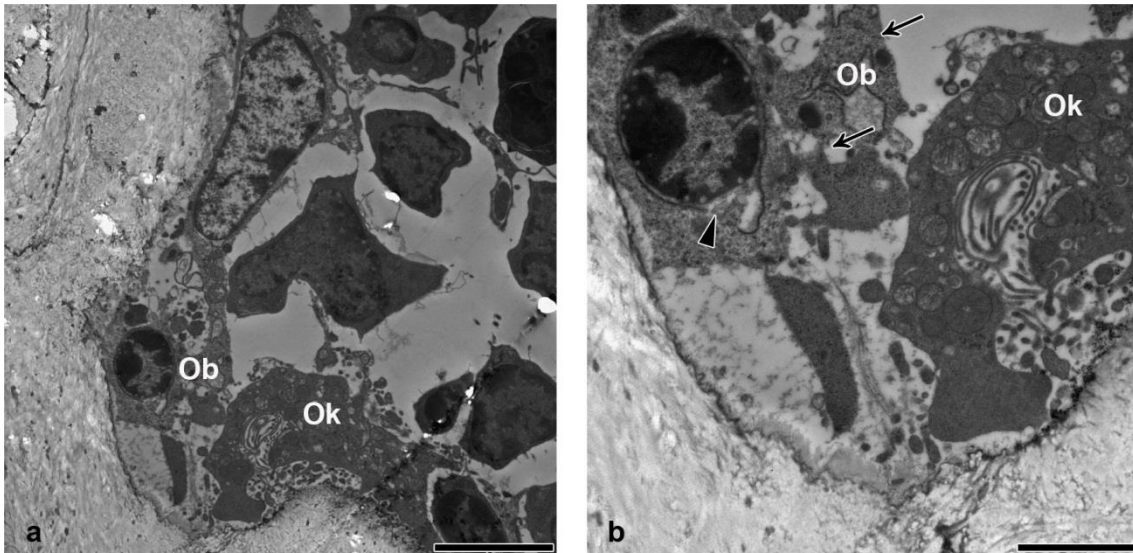
- a) An der Trabekeloberfläche befindet sich ein lockerer Zellverbund aus Osteoblasten (Ob), der der mineralisierten Knochenmatrix direkt aufliegt. Ein Osteoidsaum ist nicht erkennbar (Maßstab 5 µm).
- b) Die Zellkontakte (↓) zwischen den Osteoblasten (Ob) sind im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer ausgeprägt (Maßstab 2 µm).



**Abb. 46** TEM, Wirbelkörper L4, Versuchsgruppe

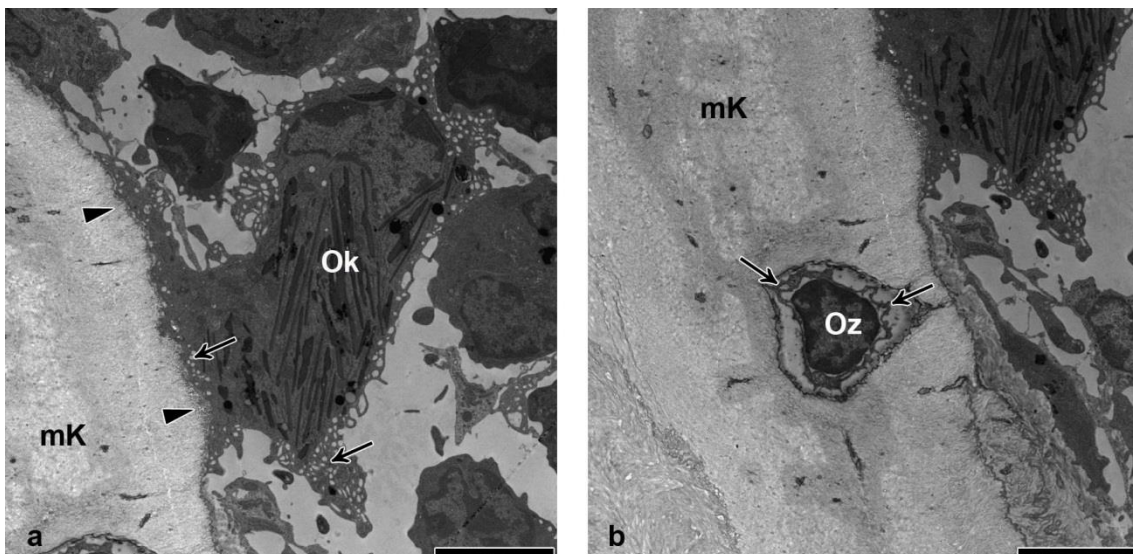
- a) Osteoblasten (Ob), die vereinzelt direkt der mineralisierten Knochenmatrix (mK) des Trabekels anliegen. Die einzelnen Lamellengrenzen (▼) im Trabekel und ein eingemauerter Osteozyt (Oz) sind erkennbar (Maßstab 5 µm).
- b) Reste (↓) einer untergegangenen Zelle, die der mineralisierten Knochenmatrix (mK) aufliegen und von den Zytoplasmaausläufern der benachbarten Zellen eingerahmt werden (Maßstab 2 µm).
- c) Trabekeloberfläche mit anliegenden Osteoblasten (Ob), die kaum Zytoplasma besitzen (Maßstab 2 µm).
- d) Darstellung eines an der Trabekeloberfläche liegenden Osteoblasten (Ob) mit nur geringem Anteil an Zytoplasma. Erkennbar sind angeschnittene Canaliculi ossei (▼) in der mineralisierten Knochenmatrix (Maßstab 2 µm).





**Abb. 47** TEM, Wirbelkörper L4, Versuchsgruppe

- Übersicht über eine Erosionslakune mit Anschnitt eines Osteoklasten (Ok). Der Zellkörper des benachbarten Osteoblasten (Ob) löst sich auf (Maßstab 5 µm).
- Vergrößerung des Osteoklasten (Ok) und des Osteoblasten (Ob). Gut zu erkennen ist die aufgefaltete Zellmembran („ruffled border“) (↓) des Osteoklasten. Beginnende Auflösung der Zellmembranstruktur des Osteoblasten sowie Eröffnung der Kernmembran (▼) des Osteoblasten als Hinweis auf eine beginnende Apoptose sind erkennbar (Maßstab 2 µm).



**Abb. 48** TEM, Wirbelkörper L4, Versuchsgruppe

- Anlagerung eines Osteoklasten (Ok) an die mineralisierte Knochenmatrix (mK) des Trabekels. Erkennbar sind die Auffaltungen der „ruffled border“ (▼) und im Zytoplasma befindliche lysosomale Einschlüsse (↓), sowie die längs angeordneten Aktinfilamente (Maßstab 5 µm).
- In der mineralisierten Knochenmatrix (mK) befindet sich ein Osteozyt, dessen Zellmembran sich in den perizellulären Raum vorwölbt (↓). Das Zytoplasma hebt sich deutlich von der Kernmembran ab (Maßstab 5 µm).

## 6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung eines hohen Fettanteils im Futter der Versuchstiere über einen Fütterungszeitraum von 23 Wochen auf den Knochenstatus zu untersuchen, um die in der Literatur kontrovers diskutierten Aussagen hinsichtlich einer Minderung der Knochenqualität und Beeinflussung des Knochenstoffwechsels zu überprüfen und insbesondere durch histologische und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen zu ergänzen. Im Folgenden werden die eigenen Ergebnisse diskutiert und mit den Aussagen aus anderen Studien zu ähnlichen Fragestellungen verglichen und bewertet.

### 6.1 Das Tierversuchsmodell als Grundlage der Untersuchung

Der Tierversuch wurde in der Arbeitsgemeinschaft von Herrn Prof. Dr. med. Linn, Medizinische und Poliklinik 3 der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Die in der Arbeitsgemeinschaft von Herrn Prof. Dr. Linn gewonnenen Daten wurden freundlicherweise für die vorliegende Studie zur Verfügung gestellt und werden daher hier im Diskussionsteil aufgeführt.

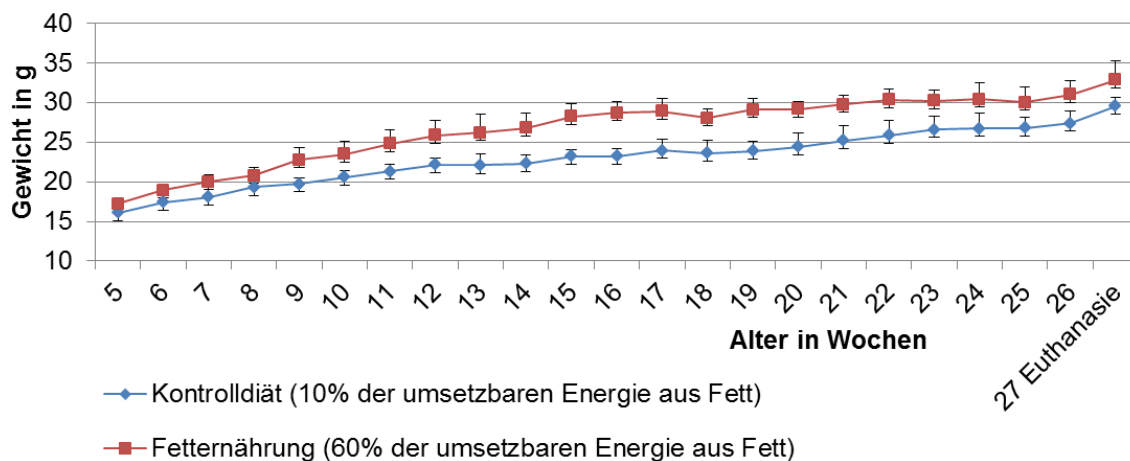
Die unterschiedliche Ernährung der Tiere mit der Kontrolldiät mit 10% der umsetzbaren Energie aus Fett (ca. 4% Rohfettgehalt) und der fettreichen Diät mit 60% der umsetzbaren Energie aus Fett (ca. 34% Rohfettgehalt) spiegelte sich in der Gewichtsentwicklung der Kontroll- und Versuchstiere wider (siehe Abb. 49). Die fettreiche Ernährung der Versuchsmäuse ist vergleichbar mit der Ernährungsweise der Menschen in den westlichen Industrienationen und führt auch im Mausmodell zu den unerwünschten Folgen wie Adipositas, hyperinsulinämische und hyperglykämische Stoffwechsellagen, Insulinresistenz und Hypertonie (Surwit et al. 1988).

Wie erwartet, konnte bereits ab der 9. Woche beobachtet werden, dass die Gewichtsentwicklung sich in den Gruppen deutlich unterschied. Im Mittel erreichten die Tiere der Kontrollgruppe in der 9. Woche ein Gewicht von 19,72 g ( $\pm 0,82$ ) und in der fetternährten Gruppe ein Gewicht von 22,77 g ( $\pm 1,48$ ). Im weiteren Versuchsverlauf zeigte sich eine stärkere Gewichtszunahme in der Versuchsgruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Zum Zeitpunkt der Euthanasie im Alter von 27 Wochen betrug das mittlere Gewicht der Kontrollgruppe 29,53 g ( $\pm 1,09$  g) und das der Versuchsgruppe 32,83 g ( $\pm 2,41$  g). Dabei fiel auf, dass die Streuung der Gewichte der Tiere innerhalb

der fett ernährten Gruppe (Versuchsgruppe) mit einer Standardabweichung von 2,41 g relativ groß war. Das schwerste Tier der Gruppe wog 37,1 g zum Zeitpunkt der Euthanasie. Das leichteste Tier der Versuchsgruppe wog 30,8 g und war damit nur geringfügig schwerer als die Tiere der Kontrollgruppe.

Bei der Kontrollgruppe waren nicht so große Gewichtsschwankungen am Ende des Versuchszeitraumes zu beobachten. Das schwerste Tier wog 30,8 g und das leichteste Tier 27,7 g.

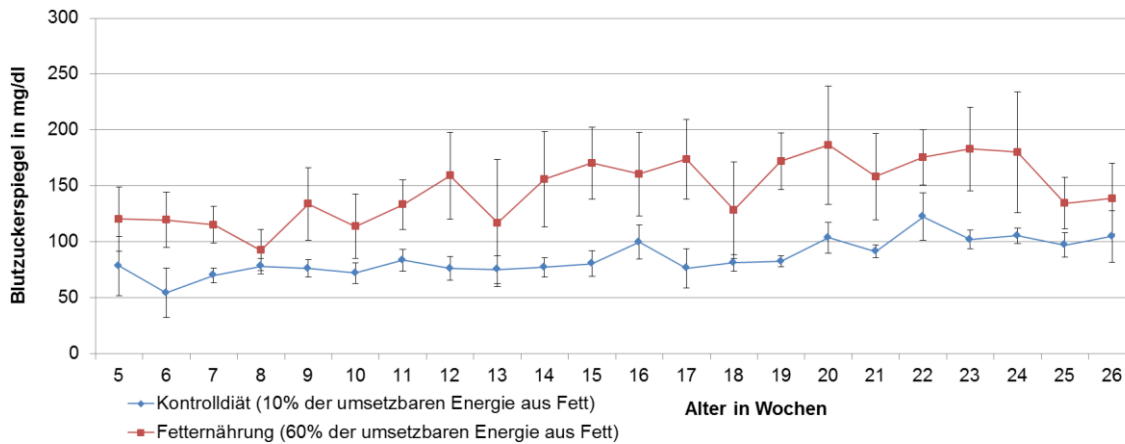
In einer vergleichbaren Studie von Patsch et al. (2011) mit männlichen C57BL/6J Mäusen, die bei Versuchsbeginn 7 Wochen alt waren und über 24 Wochen mit einer fettreichen Diät gefüttert wurden, betrug das Gewicht der Tiere zum Ende des Versuchszeitraumes 50,8 g ( $\pm 0,8$  g) (Patsch et al. 2011). Im Vergleich zur vorliegenden Studie fällt auf, dass die Mäuse nicht nur deutlich schwerer waren, sondern die Gewichtsverteilung in der fett ernährten Gruppe ( $n = 6$ ) auch eine geringere Streuung ( $\pm 0,8$  g) aufweist. Beachtet werden müssen beim Vergleich der Studien das Alter der Tiere von 7 Wochen bei Versuchsbeginn, 3 Wochen älter als in der vorliegenden Studie, und der um 1 Woche längere Versuchszeitraum.



**Abb. 49** Gewichtsentwicklung der Versuchsgruppen über den Versuchszeitraum von 23 Wochen

Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung der Gewichtsentwicklung der beiden Gruppen über den Versuchszeitraum bezogen auf das Alter der Versuchstiere (Daten der Arbeitsgemeinschaft Prof. Dr. med. Linn, Medizinische Klinik und Poliklinik 3, Justus-Liebig Universität Gießen).





**Abb. 50** Blutzuckermessung. Darstellung der Mittelwerte (Alter von 5 Wochen: Kontrollgruppe 78,33 mg/dl  $\pm$ 26,68 mg/dl; fetternährte Gruppe 120,5 mg/dl  $\pm$ 28,75 mg/dl; Alter von 26 Wochen: Kontrollgruppe 104,83 mg/dl  $\pm$ 22,82 mg/dl; fetternährte Gruppe 138,71 mg/dl  $\pm$ 31,66 mg/dl) des Blutzuckerspiegel bis zur 26 Woche (1 Woche vor Euthanasie). (Daten der Arbeitsgemeinschaft Prof. Dr. med. Linn, Medizinische Klinik und Poliklinik 3, Justus-Liebig Universität Gießen)

Neben der Kontrolle des Gewichtes wurde eine Blutzuckermessung von der Arbeitsgemeinschaft Prof. Dr. med. Linn durchgeführt. Die Messungen des Blutzuckers (Abb. 50) zeigen, dass keine diabetische Situation vorlag.

## 6.2 Wirkung von Fetternährung auf die Knochenmineralisierung und Knochenstruktur

In dieser Arbeit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Fetternährung den Knochenstatus, insbesondere die Trabekelstruktur und den Knochenstoffwechsel beeinflussen. Der lange Versuchszeitraum ermöglicht auch eine Betrachtung der Langzeitfolgen dieser Ernährung für den Knochen.

### 6.2.1 Bewertung der Auswirkung auf die Knochenmineralisierung

Über die DXA-Messungen kann eine Berechnung der Knochenmineraldichte vorgenommen werden. Ein grundsätzlicher Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Knochenmineraldichte (BMD) wurde in einer norwegischen Studie zur Analyse der Knochenmineraldichte bei Versuchspersonen der Jahrgänge 1925-27 und 1950-51 im Raum Bergen hergestellt (Gjesdal et al. 2008).

In der DXA-Messung der vorliegenden Studie konnte nur eine Tendenz zu einer leicht erhöhten Knochenmineraldichte im Bereich der Wirbelsäule beobachtet werden. Eine

signifikante Erhöhung der Knochenmineraldichte in der fetternährten Versuchsgruppe wurde in keinem Messbereich festgestellt. Die Ergebnisse aus den Messbereichen „Femur“ und „ganzer Körper“ decken sich mit denen aus der Literatur, die keinen Unterschied in diesen Messbereichen in der Knochenmineraldichte feststellen konnten (Ionova-Martin et al. 2010). Hingegen wurde in der Studie von Ionova-Martin et al. im Bereich der Wirbelsäule ein signifikanter Gruppenunterschied mit der Zunahme der Knochenmineraldichte in der fetternährten Gruppe festgestellt.

Im Gegensatz zu der in der Studie von Ionova-Martin et al. (2010) festgestellten erhöhten Knochenmineraldichte in der Wirbelsäule wiesen Xia et al. (2010) in ihren DXA-Messungen eine Abnahme der Knochenmineraldichte im linken Femur in ihrer fetternährten Gruppe nach (Xiao et al. 2010). In dieser Studie wurden allerdings ausschließlich Daten der Knochenmineraldichte im linken Femur im Mausmodell gezeigt. Messergebnisse anderer Körperregionen wurden nicht dargestellt. Die Diskrepanz zwischen den in der vorliegenden Studie ermittelten Daten und den bisher in der Literatur veröffentlichten, könnte durch unterschiedlich lange Versuchszeiträume der Fütterung, bei Xia et al. nur 12 Wochen, bedingt sein.

Auch in einer Studie von Patsch et al. aus dem Jahr 2011 mit Mäusen, die über Zeiträume von 3 Wochen bzw. 24 Wochen eine Fütterung erhielten, bei der 60% des Energie aus Fetten stammten, zeigte sich eine signifikante Reduktion der Knochenmineraldichte in der Wirbelsäule im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Patsch et al. 2011). In dieser Studie bestand allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen der Knochenmineraldichte der kurzzeitfettertnährten (3 Wochen) und der langzeitfettertnährten Versuchsgruppe (24 Wochen).

Die Schwierigkeit der exakten Messung des sehr kleinen Mausskelettes ist bei der Betrachtung der Ergebnisse ebenfalls zu beachten. Weiterhin muss grundsätzlich bei der DXA-Messung bedacht werden, dass dieses Messverfahren nur eine zweidimensionale Bilddarstellung ermöglicht. Eine Differenzierung zwischen Veränderungen der Knochenmineraldichte in Spongiosa oder Kortikalis ist somit nicht möglich. Es kann lediglich eine Veränderung der Knochenmineraldichte bezogen auf die Gesamtheit des untersuchten Knochens festgestellt werden.

Eine weitere Methode zur Messung der Knochenmineraldichte ist die Quantitative Computertomographie (pQCT) des Knochenskelettes. Hier zeigten sich signifikante Abnahmen der Knochenmineraldichte im Femur bei Mäusen, die bis zu 7 Monate eine fettreiche Ernährung erhielten (Parhami et al. 2001), und stützen damit die Ergebnisse

der Studie von Xiao et al. (2010). Bei Messungen der Knochenmineraldichte mittels Mikro-Computertomographie ( $\mu$ CT) an der linken Tibia männlicher C57BL Mäuse konnten Lu et al. (2013) keinen Unterschied zwischen ihrer fetternährten Gruppe (Futter mit 45% der umsetzbaren Energie aus dem Fettanteil) und der Kontrollgruppe (14% der umsetzbaren Energie aus dem Fettanteil) bestätigen. Der Versuchszeitraum betrug bei dieser Studie aber nur 60 Tage (Lu et al. 2013). Unter Berücksichtigung des Gewichtes der Tiere ergab sich in der statistischen Auswertung für die fetternährte Gruppe eine Abnahme der Knochenmineraldichte, sowohl in der Messregion der Trabekel als auch in der Messregion der Kortikalis.

Außer in Mausmodellen wurde auch in Rattenmodellen der Einfluss der Fetternährung auf die Knochenmineraldichte untersucht. Im Tiermodell der Ratte konnte gezeigt werden, dass sich eine fettreiche Ernährung der Tiere über einen Zeitraum von 10 Wochen negativ auf die Knochenmineraldichte, ermittelt mit der DXA-Methode, auswirkt und einen besonders schädigenden Einfluss während der Wachstumsphase besitzt (Lac et al. 2008). Gleichzeitig gibt es auch bei den Rattenmodellen kontroverse Aussagen im Hinblick auf den Effekt der Fetternährung auf die Knochenmineraldichte. Bei Ratten, die für 16 Wochen eine fettreiche Diät erhielten, zeigte sich im Messbereich des gesamten Körpers eine erhöhte Knochenmineraldichte im Vergleich zur Kontrollgruppe mit der Standarddiät (Gerbaix et al. 2012). Gerbaix et al. konnten aber im Bereich der Tibia keinen Unterschied in der Knochenmineraldichte zwischen den Gruppen feststellen. Wohingegen Chen et al. in ihrem Rattenmodell bei zu Versuchsbeginn 20 Tage alten Ratten nach einer 4 wöchigen fettreichen Diät eine Knochenmineraldichteabnahme zeigen (Chen et al. 2010).

Diese unterschiedlichen Auswirkungen der Fetternährung im Maus- sowie im Rattenmodell zeigen, dass der Einfluss der Fetternährung auf die Knochenmineraldichte im Kleintiermodell nicht abschließend geklärt ist. Auch die vorliegende Studie konnte keine Veränderung der Knochenmineraldichte bei fetternährten Mäusen zeigen.

### **6.2.2 Histologische Bewertung der Knochenstruktur**

Die im Rahmen der histologischen Untersuchungen festgestellten strukturellen Veränderungen im Trabekelaufbau zeigen sehr deutlich, dass die Fetternährung einen starken Einfluss auf die Knochenstruktur hat. Besonders bei der Beurteilung der HE gefärbten Schnitte wurde eine vermehrte Lamellenseparation in den Trabekeln festgestellt. Hierbei lagen die Lamellen voneinander gelöst in den Trabekeln vor. Diese

Lamellenseparation lässt vermuten, dass die biomechanischen Eigenschaften der Knochen sich durch die Fetternährung verändern.

Der Einfluss der Fetternährung auf den Knochen mit der Folge, schon bei geringen Lasten zu brechen, wurde ebenfalls im Mausmodell von Ionova-Martin nachgewiesen (Ionova-Martin et al. 2010). Die Diätensammensetzung der Studie von Ionova-Martin et al. gleicht dem vorliegenden Versuchsmodell, wobei der Versuchszeitraum mit 19 Wochen um 4 Wochen kürzer war als im Tiermodell von 23 Wochen in dieser Studie.

In einer weiteren Untersuchung von Ionova-Martin et al. konnte festgestellt werden, dass die Abnahme der Festigkeit des Knochens durch die Fetternährung nicht durch das Alter der Mäuse beeinflusst wird. In dieser Studie wurden 3 Wochen und 15 Wochen alte Mäuse über 16 Wochen mit einer fettreichen Diät mit ähnlicher Zusammensetzung wie in der vorliegenden Studie ernährt. Ergebnis war, dass die mechanische Belastbarkeit gemessen am Femur in beiden Versuchsgruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen reduziert war (Ionova-Martin et al. 2011).

Auch im Tiermodell der Ratte bei ähnlichem Versuchsaufbau konnten Li et al. 1990 und Zernicke et al. 1995 mit Fett- und Saccharose reichen Diät eine Abnahme der Festigkeit der Knochen in der Dreipunktmessung feststellen (Li et al. 1990; Zernicke et al. 1995). Ward et al. bestätigten in ihren Rattenversuchen mit einer fettreichen Diät („*western-style diet*“) eine erhöhte Brüchigkeit im Femurknochen mittels Dreipunktmessung (Ward et al. 2003). Alle Studien bestätigen einen negativen Zusammenhang zwischen der Bruchfestigkeit der Knochenstruktur und einer fettreichen Diät im Tiermodell.

Ratten, die nur 5 Wochen einer fettreichen Ernährung ausgesetzt waren, zeigten keine Veränderung in ihren mechanischen Eigenschaften. Bei dieser relativ kurzen Versuchsdauer scheint der Effekt der fettreichen Ernährung auf die Knochenstruktur und die Knochenfestigkeit gering zu sein (Smith et al. 2000).

Ma et al. hingegen stellten in ihrer Studie eine Adaptation des Femurs mit einer verbesserten Knochenfestigkeit sowie eine Anpassung auf Mikrostrukturebene bei 6 Wochen alten Mäusen fest, die über 21 Wochen eine *high-fat diet* erhielten (Ma et al. 2010). Dieses Ergebnis widerspricht den oben aufgeführten Studien, die eine Abnahme der Knochenfestigkeit bei Fetternährung im Mausmodell eindeutig beschreiben. Trotz des relativ langen Versuchszeitraumes von 21 Wochen in der Studie von Ma et al. wird dort ein positiver Effekt auf die Knochenfestigkeit beschrieben. Die tatsächliche Rolle der *high-fat diet* in Bezug auf die Knochenfestigkeit wird demnach kontrovers diskutiert. Die in der vorliegenden Studie beobachtete verstärkte Lamellenseparation in den

Trabekeln der fett ernährten Tiere lassen einen negativen Zusammenhang zwischen fettreicher Diät und Knochenfestigkeit vermuten.

In der vorliegenden Studie konnte histologisch bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen der Präparateanschnitte keine Veränderung im Kortikalisbereich der Knochen beobachtet werden.

Eine Quantifizierung der Dicke der Kortikalis kann mittels einer Strukturanalyse durch  $\mu$ CT-Untersuchungen vorgenommen werden. Außerdem ermöglicht eine  $\mu$ CT-Untersuchung eine dreidimensionale Darstellung des Knochenpräparates und somit eine bessere Unterscheidung zwischen dem spongiösen und kortikalen Knochenanteil. Mithilfe von  $\mu$ CT-Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die Veränderung der Knochenstruktur bei Fetternahrung vor allem im Bereich der Trabekel auftritt und den Aufbau der Kortikalis nur gering beeinflusst (Cao et al. 2009). Bei der Beurteilung der Trabekelstruktur und dem Vergleich der vorliegenden Studie mit anderen Studien im Mausmodell ist zu berücksichtigen, in welchem Alter die Mäuse sich zum Untersuchungszeitpunkt befanden, da eine physiologisch schädigende Veränderung der Trabekelstruktur mit zunehmendem Alter vor allem in langen Röhrenknochen beobachtet wurde (Glatt et al. 2007; Willingham et al. 2010).

Auch Halloran et al. beschreiben mithilfe von  $\mu$ CT-Untersuchungen an der Tibia von männlichen C57BL/6/J Mäusen eine physiologische Veränderung der Trabekelstruktur und Kortikalis über die Lebenszeit der Mäuse (Halloran et al. 2002).

In der vorliegenden Studie konnte keine Verfettung des Knochenmarks mit vermehrtem Auftreten von Adipozyten festgestellt werden. Hingegen wiesen Halade et al. bei 18 Monate alten Mäusen, die über 6 Monate (1 Woche länger als in der vorliegenden Studie) eine fettreiche Diät mit 10% Maisöl erhielten, eine Verfettung des Markraumes in Tibia und Femur im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Abnahme der Knochenmineraldichte nach (Halade et al. 2010). Beim Tiermodell von Halade et al. fällt auf, dass die Mäuse am Ende des Versuchszeitraumes im Vergleich deutlich schwerer waren ( $37.18 \pm 0.85$  g) als die fett ernährte Gruppe in der vorliegenden Studie mit einem Durchschnittsgewicht von  $32,83$  g ( $\pm 2,41$  g). Der Gewichtsunterschied von ca. 5 g zwischen der fett ernährten Gruppe aus der vorliegenden Studie und der Versuchsgruppe von Halade et al. und das Alter von 18 Monaten zum Ende des Versuchszeitraumes könnten als Erklärung für die Verfettung des Knochenmarks dienen.

Altersabhängig nimmt die Verfettung des Knochenmarks bei gleichzeitiger Abnahme der Osteoblastenaktivität und Zunahme der Osteoklastenaktivität mit dem Resultat



eines Knochenverlustes zu. Auch bei sekundärer Osteoporose wird, am häufigsten durch Glukokortikoide induziert (de Gregorio et al. 2006), eine Verfettung des Knochenmarks beobachtet (Rosen et al. 2006).

Das Tiermodell von Halade et al. (2010) kann nach Aussagen der Autoren als Modell für den postmenopausalen Knochenverlust im Zusammenhang mit Adipositas dienen und für die Erforschung medikamentöser Interventionen und diätetischer Therapien herangezogen werden.

### **6.3 Bewertung der histomorphometrischen Ergebnisse**

Die histomorphometrische Betrachtung der Trabekelstruktur zeigte eine signifikante Reduktion der Trabekelfläche im distalen Femur. In den beiden anderen untersuchten Bereichen, proximaler Femur und Wirbelkörper, war keine signifikante Abnahme der Trabekelfläche zu ermitteln. Die Abnahme der Trabekelfläche im distalen Femur bestätigt den Eindruck einer brüchigen Trabekelstruktur aus den lichtmikroskopischen Untersuchungen mit kleineren eher spitz zulaufenden Trabekeln und sich ablösenden Lamellen in der Versuchsgruppe.

Trotz des systemischen Einflusses der Fetternährung auf den Knochenstoffwechsel ist bei der Betrachtung der Ergebnisse die unterschiedliche mechanische Belastungssituation in den spezifischen Knochenregionen zu beachten. Der Knochen passt sich kontinuierlich neuen Belastungssituationen an. Veränderungen an den Trabekeln sowohl im distalen als auch im proximalen Femur und im Wirbelkörper können auch auf unterschiedliche lokal einwirkende mechanische Kräfte zurückzuführen sein.

Unter Berücksichtigung der schwierigen Definition eines standardisierten Messbereichs im Präparateschnitt und der Schwierigkeit, den Präparateschnitt aus vergleichbaren Abschnitten des Knochens für jedes Tier zu erstellen, können die durch histomorphometrische Untersuchungen gewonnenen Daten einen Hinweis auf eine Abnahme der Trabekelfläche in der Spongiosa der fetternährten Mäuse geben.

In der Literatur wird für histomorphometrische Untersuchungen im Femur fetternährter Mäuse eine signifikante Abnahme des Verhältnisses Bone volume/Tissue volume, der Trabekeldicke und der Anzahl der Trabekel im Femur beschrieben. Außerdem nimmt die Trabekelseparation in fetternährten Tieren im Femur zu (Graham et al. 2010).

Auch bei Untersuchungen mit dem  $\mu$ CT in Wirbelkörpern von fett ernährten Mäusen wurde eine Abnahme der Trabekelanzahl und eine Zunahme der Trabekelseparation festgestellt (Patsch et al. 2011).

Die vorliegenden Ergebnisse der histomorphometrischen Untersuchung im distalen Femur bestätigen diese in der Literatur beschriebenen Veränderungen der Mikroarchitektur der Trabekelstruktur in Femur und Wirbelkörper.

#### **6.4 Auswirkung der Fetternährung auf die Knochenzellen**

Der schmaler organisierte Trabekelverlauf und die Lamellenseparation innerhalb der Trabekel in den Präparatanschnitten der fett ernährten Mäuse lassen eine Veränderung des Gleichgewichtes zwischen Osteoblasten und Osteoklasten vermuten. Die Trabekelstruktur kann aktiv durch Osteoblasten und Osteoklasten verändert werden und befindet sich in einem dauerhaften Umbauprozess. Nach der Literaturoswertung und dem gewählten Versuchsaufbau wurden in dieser Studie in den histologischen Präparatanschnitten der fett ernährten Gruppe deutlich mehr Osteoklasten erwartet. In Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, dass Zellkulturen aus dem Knochenmark von Mäusen mit einer fettreichen Ernährung (45% der Energie aus dem Fettanteil) mehr TRAP-positive Zellen aufweisen als Zellkulturen aus Knochen von Kontrolltieren (Kyung et al. 2009; Cao et al. 2010). Weiterhin konnten Cao et al. (2010) in der Studie eine erhöhte Serumkonzentration von TRAP als Marker für den knochenabbauenden Prozess in der fett ernährten Gruppe zeigen.

Zur besseren Beurteilung der Veränderung auf Zellebene wurden enzyspezifische Färbungen durchgeführt (siehe Kapitel 5.2.2 – 5.2.3). Die zum Nachweis der sauren Phosphatase durchgeführte TRAP-Enzymhistochemie diente zur Identifikation von Osteoklasten, einkernigen oder mehrkernigen Makrophagen in den Knochenanschnitten. In der vorliegenden Untersuchung wurden keine Gruppenunterschiede festgestellt.

Trotz der vorher in der HE-Färbung gesehenen Veränderungen mit einer schmaler und fragiler erscheinenden Trabekelstruktur von Femur und Wirbelkörper konnten durch die spezifische TRAP-Enzymhistochemie keine Anzeichen für vermehrte Knochen umbauende oder abbauende Prozesse gefunden werden. In den Anschnitten beider

Gruppen wurden nur sehr wenige mehrkernige Osteoklasten identifiziert. Häufig waren durch die Lage der Schnittebene nur Segmente von Osteoklasten zu erkennen.

In den histologischen Präparatanschnitten konnte keine Häufung von Osteoklasten in der fett ernährten Gruppe festgestellt werden. Da der Tierversuch über einen Zeitraum von 23 Wochen angelegt war, kann vermutet werden, dass maßgebliche Veränderungen im Knochenumbau schon während der Adoleszenz der Mäuse passieren und im Alter von 27 Wochen der Knochenstatus nur erhalten wird.

Die Beobachtungen aus der TRAP-Enzymhistochemie decken sich mit den Ergebnissen der Expressionsanalyse von Cathepsin K aus der real-time RT-PCR. Auch hier konnte in der fett ernährten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe keine vermehrte Genexpression festgestellt werden.

Auch bei der Anfärbung der alkalischen Phosphatase zur besseren Identifikation der Osteoblasten und endostalen Saumzellen konnte in der vorliegenden Studie lichtmikroskopisch keine Veränderung als Grund für den unterschiedlichen Trabekelaufbau zwischen den Gruppen festgestellt werden.

In Untersuchungen von Gautam et al. zeigte sich eine Abnahme der Aktivität der alkalischen Phosphatase im Zellkulturexperiment von extrahierten Zellen aus dem Femur von C57BL/6 Mäusen, die über 10 Wochen eine fettreiche Diät (60% des Energieanteils aus Fett) erhielten (Gautam et al. 2014). Auch diese Studie ergab einen negativen Zusammenhang zwischen fettreicher Ernährung von Mäusen und deren Knochenstatus.

Ein weiterer Marker für einen knochenaufbauenden Prozess ist die Serumkonzentration von Osteocalcin. Studien von Cao et al. zeigen eine Abnahme der Serumkonzentration von Osteocalcin in der fett ernährten Gruppe (Cao et al. 2010). Beide Studien zeigen durch die Veränderung der Serummarker den negativen Effekt der Fett ernährung auf den Knochenstoffwechsel.

Kollagen 1 als Hauptbestandteil der organischen Komponente der Knochenmatrix wird von Osteoblasten synthetisiert. In der vorliegenden Studie führte die immunhistochemische Anfärbung des Kollagen 1 in den Präparateanschnitten von Femur und Wirbelkörper L2 in der lichtmikroskopischen Auswertung im Gruppenvergleich zu keinem Unterschied. Eine Veränderung der Menge an vorhandenem Kollagen 1 in den Trabekeln konnte aufgrund gleicher Farbintensität nicht festgestellt werden. Die Herabregulation der Kollagen 1 $\alpha$ 1 Expression in der real-time RT-PCR konnte durch die lichtmikroskopischen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Die Sensitivität der immunhistochemischen Färbung von Kollagen 1 ist

wahrscheinlich zu gering, um die in der RT-PCR gemessenen Veränderungen in der Expression von Kollagen 1 $\alpha$ 1 darzustellen.

Berücksichtigt werden muss bei den histologischen Auswertungen, dass die Präparate aufgrund der kleinen Knochen nicht immer in gleicher Höhe angeschnitten wurden und dadurch eine direkte Vergleichbarkeit zwischen den Tieren erschwert war. Alle Proben wurden nach dem gleichen Protokoll in Paraffin eingebettet, sodass ein Verfahrensfehler für die unterschiedlich ausgeprägte Trabekelstruktur in den Gruppen ausgeschlossen werden kann.

## **6.5 Wirkung der Fetternährung auf die Genexpression im Knochenstoffwechsel**

Die Einwirkung der Fetternährung auf den Knochenstoffwechsel zeigen die Ergebnisse der real-time RT-PCR mit einer signifikanten Abnahme der Expression von Kollagen 1 $\alpha$ 1 sowohl im Humerus als Beispiel für einen langen Röhrenknochen als auch im Wirbelkörper als Beispiel für einen unregelmäßigen Knochen.

Veränderungen in der Expression von Osteocalcin (Bglap) als Marker für die Osteoblasten und Cathepsin K als Marker für Osteoklasten, verursacht durch die Fetternährung, konnten in der vorliegenden Studie nicht festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den lichtmikroskopischen Untersuchungen, in denen keine erhöhte Anzahl von Osteoblasten oder Osteoklasten in der fetternährten Gruppe nachgewiesen werden konnte.

In Zellkulturstudien mit Zellen, die aus Tibia und Femur von fetternährten Mäusen entnommen wurden, stellten Cao et al. für die Expression von Osteocalcin keine Unterschiede fest (Cao et al. 2009). Auch für die Kollagen 1 $\alpha$ 1 Expression konnten Cao et al. keinen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen feststellen (Cao et al. 2009). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu dem Ergebnis aus der vorliegenden Studie mit einer deutlichen Reduktion der Kollagen 1 $\alpha$ 1 Expression. Die Expressionsanalyse in der Studie von Cao et al. erfolgte am 14. Tag der Zellkultur. Zu diesem Zeitpunkt war der Einfluss der Fetternährung auf die Knochenzellen nicht mehr vorhanden. Dies kann eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse in der Genexpressionsanalyse von Kollagen 1 $\alpha$ 1 sein.

Untersuchungen, die direkt das Expressionsmuster von Genen des Knochenstoffwechsels aus Proben des Femurs von fettreich ernährten Mäusen ermittelt haben, zeigten unter anderem eine erhöhte Expression von Cathepsin K, Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B Ligand (RANKL), Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK) und NADPH Oxidase 2 als Indikatoren für einen vermehrten Knochenabbau (Xiao et al. 2010). Im Unterschied zur vorliegenden Studie stellten Xia et al. (2010) eine erhöhte Expression von Cathepsin K fest. Osteoblasten spezifische Gene, wie Osteocalcin (Bglap) und alkalische Phosphatase 1, wurden in der fett ernährten Gruppe von Xiao et al. (2010) im Vergleich zur Kontrollgruppe herunterreguliert. In der vorliegenden Studie konnte keine Veränderung der Expression von Osteocalcin festgestellt werden. Jedoch zeigten Xiao et al. (2010) wie auch die vorliegende Studie eine verringerte Expression von Kollagen 1 $\alpha$ 1 in Proben des Femurs bei fett ernährten Mäusen. Zusätzlich beschreiben Xiao et al. (2010) eine Reduktion der Expression von Kollagen 1 $\alpha$ 2. Die Autoren schlussfolgern, dass die Fetternahrung zu einer Veränderung des skelettalen Wachstums führt und einen schlechteren Knochenstatus zur Folge hat.

Bei der Betrachtung des Studiendesigns der Studie von Xia et al. (2010) fällt auf, dass die Mäuse dort nur über einen Versuchszeitraum von 12 Wochen mit einer 21,2% fettreichen Diät gefüttert wurden. In der vorliegenden Studie beträgt der Versuchszeitraum hingegen 23 Wochen mit einer ca. 34% fettreichen Diät. Außerdem wurde für die DNA Microarray Analyse nur das proximale Drittel des Femurs und nicht - wie in der vorliegenden Studie - der gesamte Röhrenknochen verwendet.

Insgesamt bestätigt die gemessene Reduktion der Kollagen 1 $\alpha$ 1 Expression in Humerus und Wirbelkörper L3 die in der vorliegenden Studie festgestellten Veränderungen der Lamellenstruktur der Trabekel in den HE gefärbten Präparatanschnitten und stützt deutlich die Annahme, dass die Fetternahrung eine destruiende Wirkung auf den Knochenstatus hat.

## **6.6 Ultrastrukturanalyse der Trabekel**

Die in den elektronenmikroskopischen Abbildungen sichtbare geringere Ausprägung des Osteoidsaumes an der Trabekeloberfläche und die im Zytoplasma der Osteoblasten geringen Anteile an rauem endoplasmatischem Retikulum in den Versuchstieren decken sich mit den Ergebnissen aus der real-time RT-PCR. Die in der



real-time RT-PCR festgestellte verminderte Expression von Kollagen 1 $\alpha$ 1 konnte elektronenmikroskopisch bildlich durch geringere Zytoplasmaanteile der Osteoblasten und einen geringeren Gehalt an rauem endoplasmatischem Retikulum sowie einen nur sehr schmal ausgeprägten Osteoidsaum belegt werden.

Die Zellmorphologie der Osteoblasten war nicht nur wegen des geringen Zytoplasmaanteils besonders auffallend, sondern einige Osteoblasten zeigten Zeichen einer beginnenden Apoptose mit Veränderung im Zellkern und Auflösung der Zytoplasmamembran. Diese Verbindung von Fetternährung und Apoptose wird in den DNA-Microarray Ergebnissen von Xiao et al. (2010) deutlich beschrieben. Xia et al. (2010) stellen eine stärkere Expression von p53 in Knochenproben von fetternährten Mäusen fest (Xiao et al. 2010). Die Hochregulation von p53 als Apoptose Marker hemmt die Osteoblastendifferenzierung und die Knochenausbildung (Wang et al. 2006). Der Zusammenhang zwischen Osteoblastendifferenzierung und p53 sowie die Beeinflussung des gesamten *bone-remodeling* Prozesses wird von Liu et al. erneut unterstrichen (Liu et al. 2010). Im Einklang damit beschreiben Hirasawa et al. (2007), dass bei Apolipoprotein E defizienten Mäusen unter Fetternährung eine p53 vermittelte Apoptose von Osteoblasten zu einer Veränderung der Knochenstruktur führt (Hirasawa et al. 2007). Diese durch Apoptose von Osteoblasten induzierte Hemmung der Knochenbildung wird auch in anderen Krankheiten, wie rheumatoider Arthritis (Armour et al. 2001), Glukokortikoid-induzierter Osteoporose (O'Brien et al. 2004) und nicht belastungsinduzierter Osteoporose (Sakai et al. 2002; Aguirre et al. 2006) beschrieben. Auch Zhou et al. diskutieren die Rolle von p53 im Alterungsprozess des Knochens durch Beeinflussung der Osteoblastendifferenzierung aus den mesenchymalen Stammzellen (Zhou et al. 2008).

Eine verminderte Expression von Markern für die Osteoblastogenese wurde im Knochenmark von fetternährten Ratten mit reduzierter Knochenmineraldichte in der Tibia festgestellt und führte zu einer geringeren Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten mit resultierender schlechterer Knochenstruktur (Bielohuby et al. 2010).

Die Auflösung der Zellverbandsstruktur von Osteoblasten und endostalen Saumzellen an der Trabekeloberfläche in der Versuchsgruppe zeigt, dass auch die Interaktion und Adhäsion der Zellen untereinander durch die Fetternährung stark beeinflusst wird. Die adhärenen Zellkontakte, die die Osteoblasten und endostalen Saumzellen an der Trabekeloberfläche miteinander verbinden (Shin et al. 2000), weisen in der Versuchsgruppe deutliche Anzeichen einer Lockerung auf. Es wird vermutet, dass die

Fetternahrung die Zellen so stark schädigt, dass eine Veränderung des Zytoskelettes mit Lockerung der adhärenen Zellkontakte eintritt.

Die über *gap-junctions* mit den Osteoblasten verbundenen Osteozyten scheinen ihre Zellmorphologie durch die Fetternahrung negativ zu verändern. Ionova-Martin et al. (2010) beschreiben Veränderungen in der Anordnung der Osteozyten im Bereich der Kortikalis von fetternährten Mäusen (Ionova-Martin et al. 2010). *Gap-junctions* stellen eine metabolische und elektrische Verbindung zwischen den im Knochen liegenden Osteozyten und den auf der Oberfläche liegenden Osteoblasten her (Plotkin et al. 2002). Somit könnten Veränderungen im Zellmetabolismus der Osteoblasten auch die Osteozyten beeinflussen und zu einer weiteren Schädigung der Trabekelstruktur führen. Diese Beeinträchtigung der Osteozyten wiegt umso schwerer für die Knochenstruktur bei der Annahme der von Rochefort et al. (2010) beschriebenen Rolle der Osteozyten. Sie beschreiben die Osteozyten als entscheidene Zellen für die Koordination von Osteoblasten und Osteoklasten im *bone-remodeling* Prozess (Rochefort et al. 2010).

Untersuchungen der Frakturheilung an Mäusen mit einer Defizienz für den *gap-junction* Bestandteil Connexin 43 (Civitelli 2008; Lloyd et al. 2010) zeigten, dass sich die Frakturheilung bei den *Knock-out* Mäusen mit einer reduzierten Knochenmineralisation und geringerem Knochenvolumen vollzieht (Loiselle et al. 2013). Diese Studie unterstreicht die Bedeutung eines intakten Zellsynzytiums von Osteozyten und Osteoblasten zum Erhalt der physiologischen Knochenstruktur. Auch Bivi et al. (2012 und 2013) beschreiben die Bedeutung von Connexin 43 und den Erhalt der *gap-junctions* für das Überleben der Osteozyten (Bivi et al. 2012; Bivi et al. 2013). Stains et al. (2014) unterstreichen die Bedeutung des Connexin 43 als Bestandteil der *gap-junctions* für die Kommunikation zwischen Osteoblasten und Osteozyten zur Anpassung der Knochenstruktur an die Belastungssituation (Stains et al. 2014). Ein besseres Verständnis der Kommunikationssignale über *gap-junctions* zwischen Osteozyten und Osteoblasten kann somit ein Ansatzpunkt für eine medikamentöse Intervention zur Beeinflussung der Knochenstruktur sein.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte in der Nähe einer Fraktur im Bereich der Kortikalis bei Mäusen mit Fetternahrung eine Reduktion der Anordnung der Osteozyten in den Lakunen und eine Veränderung der Lamellenstruktur beobachtet werden (Ionova-Martin et al. 2011). In der vorliegenden Studie zeigten sich ähnliche Veränderungen hinsichtlich der gering ausgeprägten Lamellenanordnung im Trabekel und der verminderten Ordnung der Osteozyten in den HE gefärbten Präparatanschnitten von Femur und Wirbelkörper (siehe Abb. 10 - 16).

Somit unterstreichen die auf ultrastruktureller Ebene beobachteten Veränderungen an der Trabekeloberfläche und Morphologie, insbesondere der Osteoblasten, den negativen Einfluss der Fetternährung auf die Trabekelstruktur.

## **6.7 Erklärungsansätze für die Wirkung der Fetternährung auf den Knochen**

### **6.7.1 Auswirkungen in Abhängigkeit von den Bestandteilen der Fetternährung**

Ein direkter Einfluss von Diätkomponenten auf den Knochenstoffwechsel ist zu diskutieren. Die verwendete Diät besitzt eine höhere Energiedichte pro Kilogramm und einen geringeren Kohlenhydratanteil im Vergleich zur Kontrolldiät. Die höhere Energiedichte ist daher maßgeblich durch den hohen Fettanteil bedingt.

Beschrieben werden unterschiedliche Auswirkungen der Bestandteile einer Fetternährung auf den Knochen. Unterschieden wird zwischen Diäten mit einem hohen Anteil an gesättigten Fettsäuren, der westlichen Ernährungsweise entsprechend, sowie Diäten mit einem erhöhten Anteil an ungesättigten Fettsäuren. In der hier verwendeten Diät handelt es sich im Fettanteil um tierisches Fett (Schweineschmalz), das überwiegend aus gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren besteht; 20-30% Palmitinsäure (16:0), 8-22% Stearinsäure (18:0) und 35-45% Ölsäure (18:1) (www.Altromin.de, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland). Von diesen Fettsäuren ist bekannt, dass sie Entzündungsvorgänge unterstützen, während höhergradig ungesättigte Fettsäuren Entzündungen eher hemmen.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass ein negativer Einfluss zwischen einer Fetternährung, vor allem aus gesättigten Fettsäuren bestehend, vorliegt. Eine direkte Einwirkung von Fettsäuren auf die Knochenzellen insbesondere Osteoklasten ist zu diskutieren.

Im viszeralen Fettgewebe induziert die Freisetzung von gesättigten Fettsäuren eine Inflammation und stimuliert die Gewebsmakrophagen (Suganami et al. 2009). In Zellkulturstudien von Osteoklasten, gewonnen aus fetternährten Mäusen, scheinen gesättigte Fettsäuren über eine Signalkaskade in Verbindung mit Toll-like-Rezeptoren die Apoptose von Osteoklasten zu verhindern und deren Überleben zu verlängern (Oh et al. 2010).

Die Ergebnisse von Oh et al. zeigen eine direkte Interaktion von gesättigten Fettsäuren und Osteoklasten auf. Dies könnte die destruiierende Wirkung der Fetternährung auf die Knochenstruktur miterklären.

Im Widerspruch zu dieser Annahme steht, dass in der vorgelegten Studie keine erhöhte Expression von Cathepsin K als Marker für den Knochenabbau gefunden wurde. Auch histologisch konnte keine vermehrte Anzahl von Osteoklasten in den histologischen Präparaten gesehen werden. Eine Lebenszeitverlängerung von Osteoklasten kann durch die vorliegende Studie nicht widerlegt werden.

Die vorgelegte Studie zeigt eher eine Beeinflussung des knochenbauenden Armes durch die Fettdiät durch Reduktion der Kollagen 1 Expression und Veränderung in der Ultrastruktur von Osteoblasten und Osteozyten.

Nach klinischen Studien mit mehrfach ungesättigten Omega-3 Fettsäuren als Zusatz zur Nahrung scheint ein schützender Effekt für den Knochenstoffwechsel im Menschen durch diese Fettsäuren zu bestehen (Griel et al. 2007).

In Bezug auf die Auswirkung von ungesättigten Fettsäuren auf den Knochen wird ein moderater positiver Effekt auf die Knochenmineraldichte bei älteren Frauen beschrieben (Jarvinen et al. 2012). Fraglich bleibt, ob sich dieser Effekt auch auf die Frakturinzidenz auswirkt (Mangano et al. 2013).

Eine Studie von Xiao et al. (2011) im Mausmodell zeigt, dass beim Zusatz des Antioxidans Liponsäure zu einer Fettdiät aus gesättigten Fettsäuren die Reduktion der Osteoblasten spezifischen Genexpression Osteocalcin und Kollagen 1 $\alpha$ 1 gehemmt wird und gleichzeitig die erhöhte Expression Osteoklasten spezifischer Gene wie Cathepsin K vermindert wird (Xiao et al. 2011a).

In einer weiteren Studie von Xiao et al. wird der schützende Effekt von Liponsäure auf die Genexpression im Knochen bei Fetternährung nochmals unterstrichen. Auch hier wird aufgezeigt, dass im Vergleich zur fetternährten Gruppe bei Zusatz von Liponsäure die Expression für Osteoblasten spezifische Gene, wie Kollagen 1 $\alpha$ 1 und alkalische Phosphatase, im Vergleich zur Gruppe mit reiner Fetternährung erhöht ist und dass die für die Osteoklasten spezifische Genexpression wie Cathepsin K reduziert ist (Xiao et al. 2011b). Vermutet wird, dass ein dem Knochenstoffwechsel assoziiertes antioxidatives System einen entscheidenden Einfluss auf den durch Fetternährung hervorgerufenen Knochenstrukturverlust hat.

Bezüglich der bekannten Einflussfaktoren für den Knochenstoffwechsel, Vitamin D, Calcium und Phosphat, bestand kein Unterschied zwischen den Diäten. Daher können damit auch keine unterschiedlichen Auswirkungen mit dem Knochenstatus verbunden sein.

Soweit bekannt, scheinen Kohlenhydratkomponenten keinen Einfluss auf Entzündungsvorgänge zu besitzen.

### 6.7.2 Endokrine Interaktion von Adipozyten und Knochenzellen

In der Beurteilung der Interaktion zwischen Fettgewebe und Knochenzellen müssen auch die endokrinen Funktionen von Adipozyten betrachtet werden. Zusammenhänge zwischen Fetternährung und Knochenstruktur sind im Hinblick auf eine vom Botenstoff Leptin vermittelte Signalkaskade mit einer zentralen Wirkung über die Hypothalamusregion sowie eine direkte, periphere Einwirkung auf die Knochenzellen beschrieben worden. Leptin kann an Rezeptoren von Osteoblasten binden und hat einen anabolischen Effekt auf den Knochenstoffwechsel (Thomas et al. 1999; Cornish et al. 2002). Gleichzeitig wird aber auch eine inhibierende Wirkung auf den Knochenaufbau über eine zentrale Wirkung in der Region des Hypothalamus beschrieben (Ducy et al. 2000).

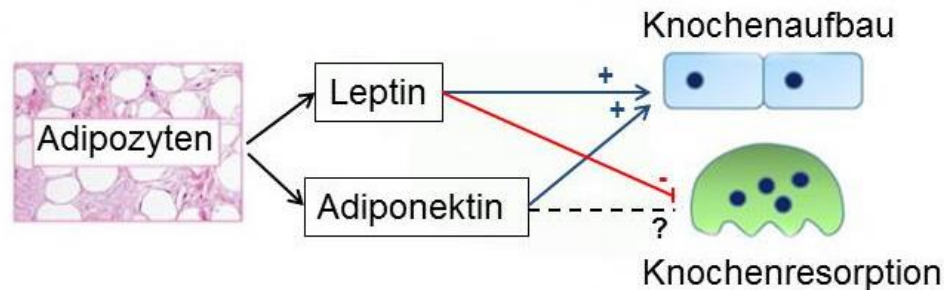
Diese unterschiedlichen Effekte können zum Beispiel durch eine zirkadiane Rhythmik oder das Alter beeinflusst werden. Die genaue Regulation der Knochenzellen über die Leptin-Signalkaskade ist nicht abschließend geklärt (Abb. 51) (Gimble 2011; Naot et al. 2014).

Adiponektin, hauptsächlich produziert von Adipozyten, ein Hormon für die Regulation von Energiehaushalt, Glukosehaushalt und Fettstoffwechsel sowie mit anti-inflammatorischen Effekten, kann den Knochenstoffwechsel beeinflussen. Adiponektin scheint die Osteoblastendifferenzierung aus mesenchymalen Stammzellen zu stimulieren und könnte somit die Knochenstruktur beeinflussen (Luo et al. 2005; Oshima et al. 2005).

Neuere von Adipozyten produzierte Adipokine wie z.B. Visfatin, Vaspin, Resistin oder *fasting-induced adipose factor* (Magni et al. 2010) könnten als weitere endokrine Signalmoleküle auf die Zellen des Knochenstoffwechsels wirken. Aber auch hier scheinen die Interaktionen zwischen Knochenstoffwechsel und Adipozyten nicht vollständig geklärt oder untersucht zu sein (Naot et al. 2014).

Auch die von Pankreaszellen sezernierten Hormone Insulin, Preptin und Amylin scheinen Einfluss auf die Knochenzellen zu haben und müssen bei energiereichen Diäten als Einflussfaktoren beachtet werden, genauso wie die vom Darm produzierten

Hormone Ghrelin, Glucagon-like Peptid 1 und 2 sowie *Glucose-dependent insulinotropic peptide*.



**Abb. 51** Mögliche endokrine Interaktion zwischen Fettgewebe und Knochen. Modifiziert nach Naot et al. (2014).

### 6.7.3 Differenzierung von Osteoblasten

Betrachtet man die Herkunft der Osteoblasten gibt es bereits bei der Entstehung einen direkten Zusammenhang zwischen dem Energiehaushalt des Körpers und dem Knochenmetabolismus. Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten sowie Myozyten differenzieren sich aus einem gemeinsamen mesenchymalen Stammzellpool (Gregoire et al. 1998).

Die Osteoblastendifferenzierung kann hierbei durch mechanische Stimulation positiv beeinflusst werden bei gleichzeitiger Inhibierung der Adipozytendifferenzierung (David et al. 2007; Sen et al. 2008). Zusätzlich wird bei verstärkter Energieaufnahme die Adipogenese im Knochenmark gesteigert. Hier besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem Energiemetabolismus im Körper und der Speicherung von Triglyzeriden in den Fettzellen im Knochenmark. Vermutet werden unterschiedliche Funktionen von Fettzellen im Knochenmark, z.B. als Energiespeicher wie im weißen Fettgewebe oder als direkter Energielieferant für das *bone-remodelling*, die hämatopoetische Zelldifferenzierung und die mesenchymale Zelldifferenzierung, vor allem im spongiösen Knochenanteil mit Charakteristika von braunen Fettgewebszellen (Krings et al. 2012; Lecka-Czernik 2012).



#### 6.7.4 Inflammation durch das Fettgewebe

Adipositas induziert eine chronische Entzündungsreaktion im Körper, die mit klinischen Krankheitsbildern wie einer vermehrten Insulinresistenz, Diabetes und Arteriosklerose einhergehen kann (Ferrante 2007). Halade et al. (2011) untersuchten den Zusammenhang zwischen Adipositas vermittelter Inflammation und den Knochenveränderungen im Mausmodell. Hier führte die Fetternährung zur vermehrten Expression von Osteoklasten spezifischen Genen, wie zum Beispiel Cathepsin K in Proben aus dem Femur der fetternährten Mäuse (Halade et al. 2011).

Bekannt ist, dass Adipozyten proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1, 6 und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  produzieren und dieser Prozess im Mausmodell mit dem Alter zunimmt (Wu et al. 2007). Ein Zusammenhang zwischen diesen Zytokinen und vermehrter Knochenresorption wurde bereits von Kwan Tat et al. beschrieben (Kwan Tat et al. 2004). Auch Zhang et al. erwähnten die Stimulation der Osteoklastogenese durch den Entzündungsmediator Tumornekrosefaktors  $\alpha$  (Zhang et al. 2001). Gleichzeitig wird die Osteoblastendifferenzierung bei einer Entzündungsreaktion mit einhergehender Ausschüttung von Tumornekrosefaktor  $\alpha$  reduziert (Gilbert et al. 2000). Interleukin 6 beeinflusst ebenfalls die Osteoblastendifferenzierung und kann bei reifen Osteoblasten die Apoptose induzieren (Li et al. 2008). Beide Mechanismen, die Stimulation der Osteoklastogenese und die Hemmung der Osteoblastogenese, könnten bei einer chronischen Entzündungsreaktion durch Fetternährung die Veränderung der Knochenstruktur erklären.

Auch Kyung et al. zeigen in einer weiteren Studie einen Zusammenhang zwischen einer chronisch niedrigen Entzündungsreaktion bei Fetternährung über 13 Wochen bei männlichen Mäusen und der vermehrten Osteoklastogenese auf (Kyung et al. 2009).

Parhami et al. weisen einen Zusammenhang zwischen einer atherogenen Diät (Fettanteil 15,8%) und der Inhibierung der Osteoblastendifferenzierung für den Knochenaufbau sowie einer Reduktion der Knochenmineralisierung nach (Parhami et al. 1999; Parhami et al. 2001).

Diese Ansätze für die Erklärung des Zusammenhanges zwischen Adipozyten und Knochenzellen zeigen, dass die Verzahnung zwischen Energiemetabolismus und Knochenstoffwechsel deutlich enger ist als bisher angenommen und dass der Knochenstoffwechsel nicht als separates Regelkreissystem betrachtet werden kann.

Die vorliegende Studie unterstreicht eindeutig den Zusammenhang zwischen Fetternährung und Knochenstoffwechsel.

Abgesehen von den endogenen Mechanismen zwischen Adipozyten und Knochenzellen bleibt zu klären, in welchem Umfang eine unmittelbare Wirkung von gesättigten Fettsäuren eine Inflammation induziert und die Zellen des Knochenstoffwechsels beeinflusst.

Die Fetternährung hat im verwendeten Mausmodell einen negativen Einfluss auf die Knochenstruktur und insbesondere die Osteoblasten scheinen in ihrer Funktion durch die Fetternährung geschädigt zu werden. Der lange Versuchszeitraum ermöglicht auch eine Betrachtung der Langzeitfolgen dieser Ernährung für den Knochen.

## 7     **Ausblick**

In dieser Arbeit wurde die Fragestellung der Beeinflussung der Knochenstruktur und der Knochenhomöostase durch Fetternährung experimentell bearbeitet. Eine negative Beeinflussung der Trabekelstruktur des Knochens, eine Reduktion der Kollagen1 $\alpha$ 1-Expression der Osteoblasten und Veränderungen auf Ultrastrukturebene durch die Fetternährung konnten nachgewiesen werden.

Weiterer Forschungsbedarf besteht vor allem in der Aufklärung der molekularen Signalkaskaden, die durch eine fettreiche Ernährung beeinflusst werden und die zu den Mikrostrukturveränderungen im Knochen führen. Eine Klärung der genauen Beziehungen in dem vermuteten „cross-talk“ zwischen Energiehaushalt und Knochenstoffwechsel ist für das Verständnis der Veränderung des Knochens durch Fetternährung entscheidend. Durch die weitere Erforschung der molekularen Signalkaskaden, die durch Fetternährung beeinflusst werden und zur Regulation des Knochenstoffwechsel beitragen, könnten sich Möglichkeiten für eine protektive pharmakologische Therapie ergeben.

Weiterhin ist von Interesse, ob die festgestellte Knochenstrukturveränderung nach Fetternährung eine Reversibilität aufweist und somit Änderungen in Ernährungsgewohnheiten wieder zu einer Verbesserung des Knochenstatus führen könnten. Dieses wäre auch im Hinblick auf die Abstimmung von Therapiekonzepten, z.B. bei Fragen der Verankerung von Endoprothesen in Knochen von Bedeutung. Im Vergleich zu den Untersuchungen von Fetternährung und Adipositas auf Stoffwechselerkrankungen und auf kardiovaskuläre Erkrankungen besteht hinsichtlich der Auswirkung auf Skelett und Knochenaufbau noch vielfältiger Klärungsbedarf.

## 8 Zusammenfassung

Adipositas als Risikofaktor für Stoffwechsel- oder kardiovaskuläre Erkrankungen ist allgemein akzeptiert, wohingegen der Einfluss von Fetternährung auf den Knochenstoffwechsel weiterhin kontrovers diskutiert wird. Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss der Fetternährung auf die Knochenstruktur und den Knochenstoffwechsel im Mausmodell grundlegend zu untersuchen.

Über 23 Wochen wurden 13 vier Wochen alte C57BL/6J Mäuse mit einer *high-fat diet* (60% der umsetzbaren Energie aus Fett) oder einer Standarddiät (10% der umsetzbaren Energie aus Fett) gefüttert. Der Knochenstatus der Tiere wurde mittels Knochendichtemessungen (DXA-Messung), enzym- und immunhistologischer Untersuchungen, histomorphometrischer Untersuchungen sowie durch Transmissionselektronenmikroskopie und real-time RT-PCR ermittelt. Zur statistischen Auswertung der experimentellen Ergebnisse wurde der Mann-Whitney-Test angewendet, wobei  $p = 0,05$  als Signifikanzniveau festgelegt wurde.

Die DXA-Messungen zur Bestimmung der Knochenmineraldichte ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. In den histologischen Untersuchungen zeigte sich ein Unterschied in Struktur und Größe der Trabekel sowie im Verlauf der Lamellen innerhalb der Trabekel in der fetternährten Gruppe. Eine signifikante Reduktion ( $p = 0,026$ ) der Trabekelfläche konnte histomorphometrisch im distalen Femur nach Fetternährung gemessen werden. Die Osteoblasten und Osteoklasten, die mittels enzymhistochemischer Methoden markiert waren, wiesen keine lichtmikroskopischen Unterschiede auf. Im Transmissionselektronenmikroskop waren bei der Versuchsgruppe die Zellkontakte der Osteoblasten an der Trabekeloberfläche deutlich verändert. Weiterhin wurde bei der Versuchsgruppe ein verminderter Osteoidsaum festgestellt. Auf molekularer Ebene wurde eine signifikante Reduktion in der Kollagen-1 Expression sowohl im Humerus ( $p = 0,002$ ) als auch im Wirbelkörper L3 ( $p = 0,004$ ) der Versuchsgruppe gezeigt.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen mittels zell- und molekularbiologischer Methoden nach, dass eine fettreiche Ernährung einen negativen Einfluss auf den Knochenstatus hat. Die Befunde stehen damit im Einklang mit biomechanischen (Ionova-Martin et al. 2010), molekularbiologischen (Xiao et al. 2010) und  $\mu$ CT-Analysen (Cao et al. 2009; Cao et al. 2010; Patsch et al. 2011), die ebenfalls einen negativen Einfluss einer fettreicher Diät im Mausmodell zeigen konnten. Diese experimentellen Daten bestätigen den im klinischen Alltag bekannten Einfluss von Adipositas auf das Frakturrisiko. Sie weisen darauf hin, dass das Frakturrisiko als Folge der Adipositas nicht nur durch die mangelnde Koordinationsfähigkeit übergewichtiger Patienten

bedingt ist, sondern wahrscheinlich auch durch molekularbiologische Prozesse im Knochenstoffwechsel beeinflusst wird.

## 9 Summary

Obesity is well known to be a risk-factor for metabolic and cardiovascular diseases. But the influence of a high-fat diet on bone metabolism has been discussed controversially. The purpose of this study was to gain a broader view of changes in bone structure and bone metabolism in high-fat diet mice.

The study was conducted with thirteen 4 week old C57BL/6J male mice, which were fed either a high-fat diet (HFD) (60 kcal% as fat) or regular laboratory chow (10 kcal% as fat) for 23 weeks. To explore the effects of high-fat diet on bone structure we used DXA-Scan, enzyme- and immune-histology, bone histomorphometry, real-time RT-PCR and transmission electron microscopy (TEM). The results were statistically evaluated with the Mann-Whitney-Test. Differences were considered to be significant at  $p = 0.05$ .

Results of bone densitometry using DXA-scanning did not show significant differences between the groups. Histology of cancellous bone revealed group differences in size and lamellar structure. Histomorphometric results showed a significant reduction ( $p = 0.026$ ) of trabecular surface in distal femora of HFD mice. Differences in number or differentiation grade of osteoblasts and osteoclasts could not be detected by means of enzyme histochemistry. Transmission electron microscopy images of the vertebra of HFD mice showed loose cell-cell contacts between osteoblasts on the trabecular surface and a smaller osteoid rim. The Collagen 1 expression was significantly reduced in humeri ( $p = 0.002$ ) and vertebrae L3 ( $p = 0.004$ ) of HFD mice. The results of this study underline the negative effects of a high-fat diet on the bone status of mice.

The results are in coincidence with biomechanical (Ionova-Martin et al. 2010), molecular biology (Xiao et al. 2010) and  $\mu$ CT-analysis (Cao et al. 2009; Cao et al. 2010; Patsch et al. 2011) findings also demonstrating negative effects of a high-fat diet on bone metabolism. They confirm the in clinical trials well established relation between obesity and a higher fracture risk because of poorer posture control. In addition changes in microstructure or bone metabolism through a high-fat diet might also contribute to an increased fracture incidence of obese patients.



## 10 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AOI	Area of Interest
Aqua dest.	destilliertes Wasser (H <sub>2</sub> O)
°C	Grad Celsius
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-Phosphat
Bglap	bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein (Synonym: Osteocalcin)
BMD	Bone mineral density (Knochendichte) in g pro cm <sup>2</sup>
BMI	Body-Mass-Index
BMP-2	bone-morphogenetic protein-2
BMU	„Basic multicellular Unit“
bp	Basenpaare
Col 1α1	Kollagen 1α1
CtsK	Cathepsin K
DEPC-H <sub>2</sub> O	Diethylpyrocarbonat-H <sub>2</sub> O
DEGS	Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland des Robert Koch-Instituts
DXA-Scan	Dual-X-Ray Absorptiometry-Scan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fett	fetternährte Versuchsgruppe
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GIP	Glucose-dependent insulinotropic peptide
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin Färbung
H <sub>2</sub> O bidest	zweifach destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IE	Internationale Einhei
K	Kontrollgruppe
kg	Kilogramm
KiGGS	Kinder- und Jugend-Gesundheitssurvey des Robert Koch-Instituts
kJ	Kilojoule
L2	2. Lumbalwirbelkörper
L3	3. Lumbalwirbelkörper
L4	4. Lumbalwirbelkörper

M	Molarität
M-CSF	Macrophage-colony-stimulating factor
$\mu$ CT	Mikro-Computertomographie
min	Minuten
Na	Natrium
NBT	Nitro-Blau-Tetrazoliumsalz
PFA	phosphat-gepuffertes Paraformaldehyd-Lösung pH 7,4
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
ROI	Region of Interest
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
TAE	Trisaminomethan (Tris-Base)-Acetat-Ethyldiamintetratessigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TBS	Tris-NaCl- Puffer (pH 7,4) mit 0,025% Triton-X-100
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
WHO	World Health Organization

## 11 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung der Einteilung eines langen Röhrenknochens (Tibia einer Ratte) in die verschiedenen Abschnitte..	4
Abb. 2	Schematische Darstellung eines Längsschnittes durch einen Femur.	5
Abb. 3	Darstellung von Osteoblasten an der Trabekeloberfläche.	9
Abb. 4	Multinukleäre Osteoklasten resorbieren die Knochenmatrix und formen die Resorptionslakune (Howship Lakune).	10
Abb. 5	Studiendesign	16
Abb. 6	Festlegung „Area of interest“ (AOI) im Wirbelkörper L2 Paraffinschnitt bei 5-facher Vergrößerung, Maus aus der Kontrollgruppe.	21
Abb. 7	Festlegung „Area of interest“ (AOI) im proximalen Femur Paraffinschnitt bei 5-facher Vergrößerung, Maus aus der Kontrollgruppe.	21
Abb. 8	Festlegung „Area of interest“ (AOI) im distalen Femur Paraffinschnitt bei 5-facher Vergrößerung, Maus aus der Kontrollgruppe.	22
Abb. 9	DXA-Messung	34
Abb. 10	HE-Färbung, proximaler Femur, Kontrollgruppe	38
Abb. 11	HE-Färbung, proximaler Femur, Versuchsgruppe	39
Abb. 12	HE-Färbung, distaler Femur, Kontrollgruppe	40
Abb. 13	HE-Färbung, distaler Femur, Versuchsgruppe	41
Abb. 14	HE-Färbung, direkter Vergleich der Trabekelstruktur beider Gruppen	42
Abb. 15	HE-Färbung, Wirbelkörper L2, Kontrollgruppe	43
Abb. 16	HE-Färbung, Wirbelkörper L2, Versuchsgruppe	44
Abb. 17	TRAP Enzymhistochemie, proximaler Femur, Kontrollgruppe	46
Abb. 18	TRAP Enzymhistochemie, proximaler Femur, Versuchsgruppe	47
Abb. 19	TRAP Enzymhistochemie, distaler Femur, Kontrollgruppe	48
Abb. 20	TRAP Enzymhistochemie, distaler Femur, Versuchsgruppe	49
Abb. 21	TRAP Enzymhistochemie, Wirbelkörper L2, Kontrollgruppe	50
Abb. 22	TRAP Enzymhistochemie, Wirbelkörper L2, Versuchsgruppe	51
Abb. 23	Alkalische Phosphatase Enzymhistochemie, proximaler Femur, Kontrollgruppe	53
Abb. 24	Alkalische Phosphatase Enzymhistochemie, proximaler Femur, Versuchsgruppe	54
Abb. 25	Alkalische Phosphatase Enzymhistochemie, distaler Femur, Kontrollgruppe	55
Abb. 26	Alkalische Phosphatase Enzymhistochemie, distaler Femur, Versuchsgruppe	56
Abb. 27	Alkalische Phosphatase Enzymhistochemie, Wirbelkörper L2, Kontrollgruppe	57
Abb. 28	Alkalische Phosphatase Enzymhistochemie, Wirbelkörper L2, Versuchsgruppe	58
Abb. 29	Histomorphometrie proximaler und distaler Femur	60
Abb. 30	Histomorphometrie Wirbelkörper L2	60
Abb. 31	Real-time RT-PCR Humerus	62
Abb. 32	Real-time RT-PCR Wirbelkörper L3	63
Abb. 33	Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte aus der real-time RT-PCR Produkte für die Kontrollgruppe (K) und die Versuchsgruppe (Fett).	64

---

Abb. 34 Kollagen 1 Immunhistochemie, proximaler Femur, Kontrollgruppe .....	66
Abb. 35 Kollagen 1 Immunhistochemie, proximaler Femur, Versuchsgruppe .....	67
Abb. 36 Kollagen 1 Immunhistochemie, distaler Femur, Kontrollgruppe .....	68
Abb. 37 Kollagen 1 Immunhistochemie, distaler Femur, Versuchsgruppe .....	69
Abb. 38 Kollagen 1 Immunhistochemie, Wirbelkörper L2, Kontrollgruppe .....	70
Abb. 39 Kollagen 1 Immunhistochemie, Wirbelkörper L2, Versuchsgruppe .....	71
Abb. 40 TEM, Wirbelkörper L4, Kontrollgruppe .....	75
Abb. 41 TEM, Wirbelkörper L4, Kontrollgruppe .....	75
Abb. 42 TEM, Wirbelkörper L4, Kontrollgruppe .....	76
Abb. 43 TEM, Wirbelkörper L4, Kontrollgruppe .....	76
Abb. 44 TEM, Wirbelkörper L4, Kontrollgruppe .....	77
Abb. 45 TEM, Wirbelkörper L4, Versuchsgruppe .....	77
Abb. 46 TEM, Wirbelkörper L4, Versuchsgruppe .....	78
Abb. 47 TEM, Wirbelkörper L4, Versuchsgruppe .....	79
Abb. 48 TEM, Wirbelkörper L4, Versuchsgruppe .....	79
Abb. 49 Gewichtsentwicklung der Versuchsgruppen über den Versuchszeitraum von 23 Wochen .....	81
Abb. 50 Blutzuckermessung. ....	82
Abb. 51 Mögliche endokrine Interaktion zwischen Fettgewebe und Knochen. ....	97

## 12 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Übersicht über die Diätkomponenten .....	15
Tab. 2 Primer für qualitative RT-PCR und real-time RT-PCR .....	28
Tab. 3 Tabellarische Auflistung der Knochenmineraldichte (BMD) in $\text{g}/\text{cm}^2$ für die beiden Gruppen, geordnet nach den jeweiligen Messbereichen. ....	34
Tab. 4 Darstellung der Ergebnisse der mittleren gemessenen Trabekelfläche in der AOI für die beiden Versuchsgruppen. ....	60
Tab. 5 Real-time RT-PCR Humerus: Tabellarische Darstellung der einzelnen $\Delta\text{Ct}$ - Werte, geordnet nach den Primern Osteocalcin, Cathepsin K und Kollagen 1 $\alpha$ 1 für die beiden Gruppen. ....	62
Tab. 6 Real-time RT-PCR Wirbelkörper L3: Tabellarische Darstellung der $\Delta\text{Ct}$ -Werte, geordnet nach den Primern Osteocalcin, Cathepsin K und Kollagen 1 $\alpha$ 1 für die beiden Gruppen. ....	63
Tab. 7 Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse .....	72

**13 Literaturverzeichnis**

- Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser 2000; 894: i-xii, 1-253.
- Aguirre, J. I., Plotkin, L. I., Stewart, S. A., Weinstein, R. S., Parfitt, A. M., Manolagas, S. C. and Bellido, T. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res* 2006; 21(4): 605-615.
- Albala, C., Yanez, M., Devoto, E., Sostin, C., Zeballos, L. and Santos, J. L. Obesity as a protective factor for postmenopausal osteoporosis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996; 20(11): 1027-1032.
- Armour, K. J., Armour, K. E., van't Hof, R. J., Reid, D. M., Wei, X. Q., Liew, F. Y. and Ralston, S. H. Activation of the inducible nitric oxide synthase pathway contributes to inflammation-induced osteoporosis by suppressing bone formation and causing osteoblast apoptosis. *Arthritis Rheum* 2001; 44(12): 2790-2796.
- Arola, D., Bajaj, D., Ivancik, J., Majd, H. and Zhang, D. Fatigue of Biomaterials: Hard Tissues. *Int J Fatigue* 2010; 32(9): 1400-1412.
- Bartl, R. (2004). *Osteoporose Prävention-Diagnostik-Therapie*. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.
- Bielohuby, M., Matsuura, M., Herbach, N., Kienzle, E., Slawik, M., Hoeflich, A. and Bidlingmaier, M. Short-term exposure to low-carbohydrate, high-fat diets induces low bone mineral density and reduces bone formation in rats. *J Bone Miner Res* 2010; 25(2): 275-284.
- Bivi, N., Condon, K. W., Allen, M. R., Farlow, N., Passeri, G., Brun, L. R., Rhee, Y., Bellido, T. and Plotkin, L. I. Cell autonomous requirement of connexin 43 for osteocyte survival: consequences for endocortical resorption and periosteal bone formation. *J Bone Miner Res* 2012; 27(2): 374-389.
- Bivi, N., Pacheco-Costa, R., Brun, L. R., Murphy, T. R., Farlow, N. R., Robling, A. G., Bellido, T. and Plotkin, L. I. Absence of Cx43 selectively from osteocytes enhances responsiveness to mechanical force in mice. *J Orthop Res* 2013; 31(7): 1075-1081.
- Bonewald, L. F. Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *Bonekey Osteovision* 2006; 3(10): 7-15.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S. and Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423(6937): 337-342.
- Brodsky, B. and Persikov, A. V. Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem* 2005; 70: 301-339.
- Buo, A. M. and Stains, J. P. Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells. *FEBS Lett* 2014; 588(8): 1315-1321.
- Cantatore, F. P., Crivellato, E., Nico, B. and Ribatti, D. Osteocalcin is angiogenic in vivo. *Cell Biol Int* 2005; 29(7): 583-585.
- Cao, J. J., Gregoire, B. R. and Gao, H. High-fat diet decreases cancellous bone mass but has no effect on cortical bone mass in the tibia in mice. *Bone* 2009; 44(6): 1097-1104.
- Cao, J. J., Sun, L. and Gao, H. Diet-induced obesity alters bone remodeling leading to decreased femoral trabecular bone mass in mice. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1192: 292-297.
- Cardoso, L., Herman, B. C., Verborgt, O., Laudier, D., Majeska, R. J. and Schaffler, M. B. Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. *J Bone Miner Res* 2009; 24(4): 597-605.
- Chen, J. R., Lazarenko, O. P., Wu, X., Tong, Y., Blackburn, M. L., Shankar, K., Badger, T. M. and Ronis, M. J. Obesity reduces bone density associated with activation



- of PPARgamma and suppression of Wnt/beta-catenin in rapidly growing male rats. *PLoS One* 2010; 5(10): e13704.
- Civitelli, R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473(2): 188-192.
- Clarke, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3 Suppl 3: S131-139.
- Clemens, T. L. and Karsenty, G. The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis. *J Bone Miner Res* 2011; 26(4): 677-680.
- Colne, P., Frelut, M. L., Peres, G. and Thoumie, P. Postural control in obese adolescents assessed by limits of stability and gait initiation. *Gait Posture* 2008; 28(1): 164-169.
- Compston, J. E., Watts, N. B., Chapurlat, R., Cooper, C., Boonen, S., Greenspan, S., Pfeilschifter, J., Silverman, S., Diez-Perez, A., Lindsay, R., Saag, K. G., Netelenbos, J. C., Gehlbach, S., Hooven, F. H., Flahive, J., Adachi, J. D., Rossini, M., Lacroix, A. Z., Roux, C., Sambrook, P. N. and Siris, E. S. Obesity is not protective against fracture in postmenopausal women: GLOW. *Am J Med* 2011; 124(11): 1043-1050.
- Cornish, J., Callon, K. E., Bava, U., Lin, C., Naot, D., Hill, B. L., Grey, A. B., Broom, N., Myers, D. E., Nicholson, G. C. and Reid, I. R. Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. *J Endocrinol* 2002; 175(2): 405-415.
- David, V., Martin, A., Lafage-Proust, M. H., Malaval, L., Peyroche, S., Jones, D. B., Vico, L. and Guignandon, A. Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. *Endocrinology* 2007; 148(5): 2553-2562.
- de Gregorio, L. H., Lacativa, P. G., Melazzi, A. C. and Russo, L. A. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006; 50(4): 793-801.
- Drenckhahn, D. (2008). *Anatomie: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem*. München, Elsevier, Urban & Fischer.
- Ducy, P. The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodelling and energy metabolism. *Diabetologia* 2011; 54(6): 1291-1297.
- Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A. F., Beil, F. T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J. M. and Karsenty, G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 2000; 100(2): 197-207.
- Edelstein, S. L. and Barrett-Connor, E. Relation between body size and bone mineral density in elderly men and women. *Am J Epidemiol* 1993; 138(3): 160-169.
- Edwards, J. R. and Mundy, G. R. Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7(4): 235-243.
- Ehrlich, P. J. and Lanyon, L. E. Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporos Int* 2002; 13(9): 688-700.
- Eriksen, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord* 2010; 11(4): 219-227.
- Ferrante, A. W., Jr. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med* 2007; 262(4): 408-414.
- Gautam, J., Choudhary, D., Khedgikar, V., Kushwaha, P., Singh, R. S., Singh, D., Tiwari, S. and Trivedi, R. Micro-architectural changes in cancellous bone differ in female and male C57BL/6 mice with high-fat diet-induced low bone mineral density. *Br J Nutr* 2014; 111(10): 1811-1821.
- Gerbaix, M., Metz, L., Mac-Way, F., Lavet, C., Guillet, C., Walrand, S., Masgrau, A., Linossier, M. T., Vico, L. and Courteix, D. Impact of an obesogenic diet program on bone densitometry, micro architecture and metabolism in male rat. *Lipids Health Dis* 2012; 11: 91.

- Gilbert, L., He, X., Farmer, P., Boden, S., Kozlowski, M., Rubin, J. and Nanes, M. S. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology* 2000; 141(11): 3956-3964.
- Gimble, J. M. Leptin's balancing act between bone and fat. *J Bone Miner Res* 2011; 26(8): 1694-1697.
- Gjesdal, C. G., Halse, J. I., Eide, G. E., Brun, J. G. and Tell, G. S. Impact of lean mass and fat mass on bone mineral density: The Hordaland Health Study. *Maturitas* 2008; 59(2): 191-200.
- Glatt, V., Canalis, E., Stadmeier, L. and Bouxsein, M. L. Age-related changes in trabecular architecture differ in female and male C57BL/6J mice. *J Bone Miner Res* 2007; 22(8): 1197-1207.
- Gordon, J. A., Tye, C. E., Sampaio, A. V., Underhill, T. M., Hunter, G. K. and Goldberg, H. A. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone* 2007; 41(3): 462-473.
- Goulding, A., Taylor, R. W., Jones, I. E., McAuley, K. A., Manning, P. J. and Williams, S. M. Overweight and obese children have low bone mass and area for their weight. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24(5): 627-632.
- Graham, L. S., Tintut, Y., Parhami, F., Kitchen, C. M., Ivanov, Y., Tetradis, S. and Effros, R. B. Bone density and hyperlipidemia: the T-lymphocyte connection. *J Bone Miner Res* 2010; 25(11): 2460-2469.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M. and Sul, H. S. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998; 78(3): 783-809.
- Griel, A. E., Kris-Etherton, P. M., Hilpert, K. F., Zhao, G., West, S. G. and Corwin, R. L. An increase in dietary n-3 fatty acids decreases a marker of bone resorption in humans. *Nutr J* 2007; 6: 2.
- Halade, G. V., El Jamali, A., Williams, P. J., Fajardo, R. J. and Fernandes, G. Obesity-mediated inflammatory microenvironment stimulates osteoclastogenesis and bone loss in mice. *Exp Gerontol* 2011; 46(1): 43-52.
- Halade, G. V., Rahman, M. M., Williams, P. J. and Fernandes, G. High fat diet-induced animal model of age-associated obesity and osteoporosis. *J Nutr Biochem* 2010; 21(12): 1162-1169.
- Halloran, B. P., Ferguson, V. L., Simske, S. J., Burghardt, A., Venton, L. L. and Majumdar, S. Changes in bone structure and mass with advancing age in the male C57BL/6J mouse. *J Bone Miner Res* 2002; 17(6): 1044-1050.
- Hills, A. P. and Parker, A. W. Locomotor characteristics of obese children. *Child Care Health Dev* 1992; 18(1): 29-34.
- Hirasawa, H., Tanaka, S., Sakai, A., Tsutsui, M., Shimokawa, H., Miyata, H., Moriwaki, S., Niida, S., Ito, M. and Nakamura, T. ApoE gene deficiency enhances the reduction of bone formation induced by a high-fat diet through the stimulation of p53-mediated apoptosis in osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 2007; 22(7): 1020-1030.
- Ionova-Martin, S. S., Do, S. H., Barth, H. D., Szadkowska, M., Porter, A. E., Ager, J. W., 3rd, Ager, J. W., Jr., Alliston, T., Vaisse, C. and Ritchie, R. O. Reduced size-independent mechanical properties of cortical bone in high-fat diet-induced obesity. *Bone* 2010; 46(1): 217-225.
- Ionova-Martin, S. S., Wade, J. M., Tang, S., Shahnazari, M., Ager, J. W., 3rd, Lane, N. E., Yao, W., Alliston, T., Vaisse, C. and Ritchie, R. O. Changes in cortical bone response to high-fat diet from adolescence to adulthood in mice. *Osteoporos Int* 2011; 22(8): 2283-2293.
- Ishijima, M., Tsuji, K., Rittling, S. R., Yamashita, T., Kurosawa, H., Denhardt, D. T., Nifuji, A., Ezura, Y. and Noda, M. Osteopontin is required for mechanical stress-dependent signals to bone marrow cells. *J Endocrinol* 2007; 193(2): 235-243.
- James, P. T., Rigby, N. and Leach, R. The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2004; 11(1): 3-8.

- Jarvinen, R., Tuppurainen, M., Erkkila, A. T., Penttinen, P., Karkkainen, M., Salovaara, K., Jurvelin, J. S. and Kroger, H. Associations of dietary polyunsaturated fatty acids with bone mineral density in elderly women. *Eur J Clin Nutr* 2012; 66(4): 496-503.
- Jilka, R. L. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol* 2003; 41(3): 182-185.
- Khosla, S., Westendorf, J. J. and Oursler, M. J. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. *J Clin Invest* 2008; 118(2): 421-428.
- Kirchengast, S., Knogler, W. and Hauser, G. Protective effect of moderate overweight on bone density of the hip joint in elderly and old Austrians. *Anthropol Anz* 2002; 60(2): 187-197.
- Kopelman, P. G. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404(6778): 635-643.
- Krings, A., Rahman, S., Huang, S., Lu, Y., Czernik, P. J. and Lecka-Czernik, B. Bone marrow fat has brown adipose tissue characteristics, which are attenuated with aging and diabetes. *Bone* 2012; 50(2): 546-552.
- Kurth, B. M. and Schaffrath Rosario, A. [The prevalence of overweight and obese children and adolescents living in Germany. Results of the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2007; 50(5-6): 736-743.
- Kwan Tat, S., Padrines, M., Theoleyre, S., Heymann, D. and Fortun, Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15(1): 49-60.
- Kyung, T. W., Lee, J. E., Phan, T. V., Yu, R. and Choi, H. S. Osteoclastogenesis by bone marrow-derived macrophages is enhanced in obese mice. *J Nutr* 2009; 139(3): 502-506.
- Lac, G., Cavalie, H., Ebal, E. and Michaux, O. Effects of a high fat diet on bone of growing rats. Correlations between visceral fat, adiponectin and bone mass density. *Lipids Health Dis* 2008; 7: 16.
- Lecka-Czernik, B. Marrow fat metabolism is linked to the systemic energy metabolism. *Bone* 2012; 50(2): 534-539.
- Li, K. C., Zernicke, R. F., Barnard, R. J. and Li, A. F. Effects of a high fat-sucrose diet on cortical bone morphology and biomechanics. *Calcif Tissue Int* 1990; 47(5): 308-313.
- Li, Y., Backesjo, C. M., Haldosen, L. A. and Lindgren, U. IL-6 receptor expression and IL-6 effects change during osteoblast differentiation. *Cytokine* 2008; 43(2): 165-173.
- Liu, H. and Li, B. p53 control of bone remodeling. *J Cell Biochem* 2010; 111(3): 529-534.
- Lloyd, S. A. and Donahue, H. J. Gap Junctions and Biophysical Regulation of Bone Cells. *Clin Rev Bone Miner Metab* 2010; 8(4): 189-200.
- Loiselle, A. E., Paul, E. M., Lewis, G. S. and Donahue, H. J. Osteoblast and osteocyte-specific loss of Connexin43 results in delayed bone formation and healing during murine fracture healing. *J Orthop Res* 2013; 31(1): 147-154.
- Lu, X. M., Zhao, H. and Wang, E. H. A high-fat diet induces obesity and impairs bone acquisition in young male mice. *Mol Med Rep* 2013; 7(4): 1203-1208.
- Lüllmann-Rauch, R. and Paulsen, F. (2012). *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart, Thieme.
- Luo, X. H., Guo, L. J., Yuan, L. Q., Xie, H., Zhou, H. D., Wu, X. P. and Liao, E. Y. Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res* 2005; 309(1): 99-109.
- Ma, H., Torvinen, S., Silvennoinen, M., Rinnankoski-Tuikka, R., Kainulainen, H., Morko, J., Peng, Z., Kujala, U. M., Rahkila, P. and Suominen, H. Effects of diet-induced obesity and voluntary wheel running on bone properties in young male C57BL/6J mice. *Calcif Tissue Int* 2010; 86(5): 411-419.

- Magni, P., Dozio, E., Galliera, E., Ruscica, M. and Corsi, M. M. Molecular aspects of adipokine-bone interactions. *Curr Mol Med* 2010; 10(6): 522-532.
- Mangano, K. M., Sahni, S., Kerstetter, J. E., Kenny, A. M. and Hannan, M. T. Polyunsaturated fatty acids and their relation with bone and muscle health in adults. *Curr Osteoporos Rep* 2013; 11(3): 203-212.
- Manias, K., McCabe, D. and Bishop, N. Fractures and recurrent fractures in children; varying effects of environmental factors as well as bone size and mass. *Bone* 2006; 39(3): 652-657.
- Naot, D. and Cornish, J. Cytokines and Hormones That Contribute to the Positive Association between Fat and Bone. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; 5: 70.
- Neve, A., Corrado, A. and Cantatore, F. P. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res* 2011; 343(2): 289-302.
- Nguyen, N. D., Pongchaiyakul, C., Center, J. R., Eisman, J. A. and Nguyen, T. V. Abdominal fat and hip fracture risk in the elderly: the Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study. *BMC Musculoskelet Disord* 2005; 6: 11.
- O'Brien, C. A., Jia, D., Plotkin, L. I., Bellido, T., Powers, C. C., Stewart, S. A., Manolagas, S. C. and Weinstein, R. S. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology* 2004; 145(4): 1835-1841.
- Oh, S. R., Sul, O. J., Kim, Y. Y., Kim, H. J., Yu, R., Suh, J. H. and Choi, H. S. Saturated fatty acids enhance osteoclast survival. *J Lipid Res* 2010; 51(5): 892-899.
- Oshima, K., Nampei, A., Matsuda, M., Iwaki, M., Fukuhara, A., Hashimoto, J., Yoshikawa, H. and Shimomura, I. Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331(2): 520-526.
- Owen, M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988; 10: 63-76.
- Parhami, F., Jackson, S. M., Tintut, Y., Le, V., Balucan, J. P., Territo, M. and Demer, L. L. Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 1999; 14(12): 2067-2078.
- Parhami, F., Tintut, Y., Beamer, W. G., Gharavi, N., Goodman, W. and Demer, L. L. Atherogenic high-fat diet reduces bone mineralization in mice. *J Bone Miner Res* 2001; 16(1): 182-188.
- Patsch, J. M., Kiefer, F. W., Varga, P., Pail, P., Rauner, M., Stupphann, D., Resch, H., Moser, D., Zysset, P. K., Stulnig, T. M. and Pietschmann, P. Increased bone resorption and impaired bone microarchitecture in short-term and extended high-fat diet-induced obesity. *Metabolism* 2011; 60(2): 243-249.
- Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): e45.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-147.
- Plotkin, L. I., Manolagas, S. C. and Bellido, T. Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J Biol Chem* 2002; 277(10): 8648-8657.
- Ralston, S. H. What determines peak bone mass and bone loss? *Baillieres Clin Rheumatol* 1997; 11(3): 479-494.
- Rana, A. R., Michalsky, M. P., Teich, S., Groner, J. I., Caniano, D. A. and Schuster, D. P. Childhood obesity: a risk factor for injuries observed at a level-1 trauma center. *J Pediatr Surg* 2009; 44(8): 1601-1605.
- Reid, I. R. Relationships between fat and bone. *Osteoporos Int* 2008; 19(5): 595-606.
- Reid, I. R. Fat and bone. *Arch Biochem Biophys* 2010; 503(1): 20-27.
- Rocheffort, G. Y., Pallu, S. and Benhamou, C. L. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int* 2010; 21(9): 1457-1469.

- Rosen, C. J. and Bouxsein, M. L. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2(1): 35-43.
- Ross, F. P. and Teitelbaum, S. L.  $\alpha$  and  $\beta$ 3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol Rev* 2005; 208: 88-105.
- Sakai, A., Sakata, T., Tanaka, S., Okazaki, R., Kunugita, N., Norimura, T. and Nakamura, T. Disruption of the p53 gene results in preserved trabecular bone mass and bone formation after mechanical unloading. *J Bone Miner Res* 2002; 17(1): 119-127.
- Scheidt-Nave, C., Kamtsiuris, P., Goesswald, A., Hoelling, H., Lange, M., Busch, M. A., Dahm, S., Doelle, R., Ellert, U., Fuchs, J., Hapke, U., Heidemann, C., Knopf, H., Laussmann, D., Mensink, G. B., Neuhauser, H., Richter, A., Sass, A. C., Schaffrath Rosario, A., Stolzenberg, H., Thamm, M. and Kurth, B. M. German health interview and examination survey for adults (DEGS) - design, objectives and implementation of the first data collection wave. *BMC Public Health* 2012; 12(1): 730.
- Sen, B., Xie, Z., Case, N., Ma, M., Rubin, C. and Rubin, J. Mechanical strain inhibits adipogenesis in mesenchymal stem cells by stimulating a durable beta-catenin signal. *Endocrinology* 2008; 149(12): 6065-6075.
- Shin, C. S., Lecanda, F., Sheikh, S., Weitzmann, L., Cheng, S. L. and Civitelli, R. Relative abundance of different cadherins defines differentiation of mesenchymal precursors into osteogenic, myogenic, or adipogenic pathways. *J Cell Biochem* 2000; 78(4): 566-577.
- Smith, E. E., Ferguson, V. L., Simske, S. J., Gayles, E. C. and Pagliassotti, M. J. Effects of high fat or high sucrose diets on rat femora mechanical and compositional properties. *Biomed Sci Instrum* 2000; 36: 385-390.
- Stains, J. P., Watkins, M. P., Grimston, S. K., Hebert, C. and Civitelli, R. Molecular mechanisms of osteoblast/osteocyte regulation by connexin43. *Calcif Tissue Int* 2014; 94(1): 55-67.
- Stein, G. S., Lian, J. B., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Montecino, M., Javed, A., Zaidi, S. K., Young, D. W., Choi, J. Y. and Pockwinse, S. M. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene* 2004; 23(24): 4315-4329.
- Suganami, T., Yuan, X., Shimoda, Y., Uchio-Yamada, K., Nakagawa, N., Shirakawa, I., Usami, T., Tsukahara, T., Nakayama, K., Miyamoto, Y., Yasuda, K., Matsuda, J., Kamei, Y., Kitajima, S. and Ogawa, Y. Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated Fatty acid/toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. *Circ Res* 2009; 105(1): 25-32.
- Surwit, R. S., Kuhn, C. M., Cochrane, C., McCubbin, J. A. and Feinglos, M. N. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* 1988; 37(9): 1163-1167.
- Taylor, A. F., Saunders, M. M., Shingle, D. L., Cimbala, J. M., Zhou, Z. and Donahue, H. J. Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292(1): C545-552.
- Taylor, E. D., Theim, K. R., Mirch, M. C., Ghorbani, S., Tanofsky-Kraff, M., Adler-Wailes, D. C., Brady, S., Reynolds, J. C., Calis, K. A. and Yanovski, J. A. Orthopedic complications of overweight in children and adolescents. *Pediatrics* 2006; 117(6): 2167-2174.
- Teitelbaum, S. L. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol* 2007; 170(2): 427-435.
- Thomas, T., Gori, F., Khosla, S., Jensen, M. D., Burguera, B. and Riggs, B. L. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology* 1999; 140(4): 1630-1638.
- Vaananen, H. K., Zhao, H., Mulari, M. and Halleen, J. M. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 2000; 113 ( Pt 3): 377-381.

- Wang, X., Kua, H. Y., Hu, Y., Guo, K., Zeng, Q., Wu, Q., Ng, H. H., Karsenty, G., de Crombrughe, B., Yeh, J. and Li, B. p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling. *J Cell Biol* 2006; 172(1): 115-125.
- Ward, W. E., Kim, S. and Bruce, W. R. A western-style diet reduces bone mass and biomechanical bone strength to a greater extent in male compared with female rats during development. *British Journal of Nutrition* 2007; 90(03): 589.
- Ward, W. E., Kim, S. and Robert Bruce, W. A western-style diet reduces bone mass and biomechanical bone strength to a greater extent in male compared with female rats during development. *Br J Nutr* 2003; 90(3): 589-595.
- Welsch, U. and Mulisch, M. (2010). *Romeis Mikroskopische Technik*, Spektrum Akademischer Verlag.
- Willingham, M. D., Brodt, M. D., Lee, K. L., Stephens, A. L., Ye, J. and Silva, M. J. Age-related changes in bone structure and strength in female and male BALB/c mice. *Calcif Tissue Int* 2010; 86(6): 470-483.
- Wilson, S. R., Peters, C., Saftig, P. and Bromme, D. Cathepsin K activity-dependent regulation of osteoclast actin ring formation and bone resorption. *J Biol Chem* 2009; 284(4): 2584-2592.
- Wongdee, K., Krishnamra, N. and Charoenphandhu, N. Endochondral bone growth, bone calcium accretion, and bone mineral density: how are they related? *J Physiol Sci* 2012; 62(4): 299-307.
- Wu, D., Ren, Z., Pae, M., Guo, W., Cui, X., Merrill, A. H. and Meydani, S. N. Aging up-regulates expression of inflammatory mediators in mouse adipose tissue. *J Immunol* 2007; 179(7): 4829-4839.
- Xiao, Y., Cui, J., Li, Y. X., Shi, Y. H. and Le, G. W. Expression of genes associated with bone resorption is increased and bone formation is decreased in mice fed a high-fat diet. *Lipids* 2010; 45(4): 345-355.
- Xiao, Y., Cui, J., Li, Y. X., Shi, Y. H., Wang, B., Le, G. W. and Wang, Z. P. Dyslipidemic high-fat diet affects adversely bone metabolism in mice associated with impaired antioxidant capacity. *Nutrition* 2011a; 27(2): 214-220.
- Xiao, Y., Cui, J., Shi, Y. and Le, G. Lipoic acid increases the expression of genes involved in bone formation in mice fed a high-fat diet. *Nutr Res* 2011b; 31(4): 309-317.
- Zernicke, R. F., Salem, G. J., Barnard, R. J. and Schramm, E. Long-term, high-fat-sucrose diet alters rat femoral neck and vertebral morphology, bone mineral content, and mechanical properties. *Bone* 1995; 16(1): 25-31.
- Zhang, Y. H., Heulsmann, A., Tondravi, M. M., Mukherjee, A. and Abu-Amer, Y. Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem* 2001; 276(1): 563-568.
- Zhou, S., Greenberger, J. S., Epperly, M. W., Goff, J. P., Adler, C., Leboff, M. S. and Glowacki, J. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell* 2008; 7(3): 335-343.



## 14 Publikationsverzeichnis

### Originalarbeiten

Fehrendt, H., Linn, T., Hartmann, S., Szalay, G., Heiss, C., Schnettler, R. and Lips, K. S. Negative Influence of a Long-Term High-Fat Diet on Murine Bone Architecture. International Journal of Endocrinology; 2014: 1-9.

### Vortrag

Vortrag beim endokrinologischen Seminar der Medizinischen Klinik und Poliklinik III Universitätsklinikum Gießen Marburg, Standort Gießen, Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Schäffler (2014), Titel: „Schützt Fett das Knochengewebe?“

### Posterbeitrag

GBM Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V (2012), Günzburg a. d. Donau

Analysis of bone structure in high-fat diet mice

Fehrendt H., Hartmann S, Heiss C, Linn T, Schnettler R , Lips KS

## 15 Erklärung zur Dissertation

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

---

Ort, Datum

Unterschrift

## 16 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie - Operative Notaufnahme des Universitätsklinikums Gießen und Marburg unter Anleitung von Frau Professorin Dr. Katrin Susanne Lips Leiterin des Labors durchgeführt.

Für die hervorragende Betreuung in allen Phasen der Arbeit danke ich Frau Prof. Dr. Lips sehr herzlich. Außerdem möchte ich ihr für die motivierende Unterstützung und neuen Denkanstöße beim Abfassen der Arbeit danken. Die vielen interessanten Diskussionen haben mein Interesse für die medizinische Forschung dauerhaft geweckt.

Herrn Professor Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler und Herrn Univ.-Prof. Dr. Christian Heiß möchte ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die finanzielle Unterstützung bei den Laborarbeiten danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Linn, Medizinische Klinik und Poliklinik III des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, und seinen Mitarbeiter/-innen möchte ich mich für die Bereitstellung des Probenmaterials aus dem Tierexperiment bedanken.

Dem Team des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie, insbesondere Frau Dr. Ursula Sommer, Frau Ivonne Bergen, Frau Martina Fink, Frau Ida Oberst, Frau Iris Schütz und Frau Dr. Janet Beckmann danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten. Erst in dem netten Arbeitsklima im Labor konnte diese Arbeit gelingen.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich mit aufmunternden Worten während der gesamten Bearbeitungszeit unterstützt hat.

