

**Regulation der extrazellulären Matrix
während der Knochendefektheilung im Schafmodell der steroidale
und diätetisch induzierten Osteoporose**

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

vorgelegt von Rosch, Sebastian
aus Wittlich

Gießen 2020

Aus der
Experimentellen Unfallchirurgie sowie der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und
Wiederherstellungschirurgie, unter der Leitung des Direktors der Klinik
Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

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

Gutachter: PD Dr. med. Thomas Karrasch

Tag der Disputation: 09.06.2020

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	2
2.1 Das menschliche knöchernerne Skelett.....	2
2.2 Makroskopischer Aufbau des Knochens	2
2.3 Zusammensetzung der Extrazellulärmatix des Knochens	4
2.4 Mikroskopischer Aufbau der Knochensubstanz	4
2.5 Spezifische Zellen des Knochens	6
2.5.1 Knochenformation: Die osteoblastäre Zellreihe	6
2.5.2 Knochenresorption: Die Osteoklasten.....	10
2.6 Knochenstoffwechsel und seine Regulation.....	11
2.7 Der Knochenumbau („Bone Remodeling“)	12
2.8 Knochenzellinteraktionen	14
2.8.1 Einfluss der Osteoblasten auf Osteoklasten	15
2.8.2 Einfluss von Osteoklasten auf Osteoblasten.....	16
2.8.3 Parathyroid hormon-related protein (PTHrP).....	18
2.9 Systemische Regulation des Knochenmetabolismus.....	19
2.10 Schilddrüsenhormone	20
2.10.1 Parathormon.....	20
2.10.2 Calcitonin.....	21
2.10.3 Vitamin D.....	21
2.11 Sexualhormone	23
2.11.1 Östrogen	24
2.11.2 Androgene.....	24
2.12 Glukokortikoide	25
2.13 Frakturheilung.....	26
2.13.1 Direkte Frakturheilung.....	26
2.13.2 Indirekte Frakturheilung	28
2.14 Osteoporose und assoziierte Frakturen.....	31
2.14.1 Definition und Diagnostik	31
2.14.2 Primäre Osteoporose.....	33

Inhaltsverzeichnis

2.14.3 Sekundäre Osteoporose	34
2.14.4 Therapie der Osteoporose	37
2.14.5 Epidemiologie.....	38
3 Zielsetzung und Hypothesen	40
4 Material und Methoden	41
4.1 Versuchstiere	41
4.2 Studiendesign.....	41
4.3 Tierhaltung und Fütterung	42
4.4 Glukokortikoidinjektionen	43
4.5 Operationsablauf.....	43
4.5.1 Vorbereitung und Einleitung der Anästhesie.....	43
4.5.2 Bilaterale Ovariectomie.....	44
4.5.3 Beckenkammstanzbiopsie	44
4.6 Postoperative Versorgung	45
4.7 Euthanasie und Probenentnahme	45
4.8 Verarbeitung der Knochenproben	47
4.9 Paraffineinbettung und Anfertigen der Schnittpräparate.....	47
4.10 PMMA-Einbettung und Schliffpräparation	48
4.10.1 Fixierung, Dehydrierung und Einbettung	48
4.10.2 Entstabilisieren der Basislösung	49
4.10.3 Polymerisation.....	50
4.10.4 Anfertigen der Schlicke	50
4.11 Toluidinblau O-Färbung	51
4.12 Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner	51
4.13 Silbernitrat Färbung.....	52
4.14 Immunhistochemie	52
4.14.1 Kollagen Typ I Immunhistochemie	53
4.14.2 Kollagen Typ X Immunhistochemie	54
4.14.3 RANK-L und OPG Immunhistochemie	54
4.15 In vivo Fluoreszenzmarkierungen	55
4.16 Fotomikroskopie	55

Inhaltsverzeichnis

4.17 Auswertung	56
4.17.1 Frequenzanalyse der Toluidin Blau Färbung	56
4.17.2 Berechnung der Trabekeloberfläche	56
4.17.3 Histomorphometrie der Defektzone	57
4.17.4 Manuelle Analyse der Silbernitrat Färbung	58
4.17.5 Quantitative Analyse der IHC Kollagen Typ I Färbung	58
4.17.6 Quantitative Analyse der IHC Kollagen Typ X Färbung	59
4.17.7 Quantitative Analyse der IHC RANK-L und OPG Markierung	59
4.17.8 Bestimmung der Mineralisationsrate durch Fluoreszenzmikroskopie	60
4.18 Statistik	61
5 Ergebnisse	63
5.1 Deskriptive Bewertung von Heilungsparametern in Toluidinblau Färbung	63
5.2 Histomorphometrische Quantifizierung der mineralisierten und nicht-mineralisierten Knochenbestandteile	65
5.3 Analyse der Knochenqualität mittels Col I IHC	67
5.4 Detektion von hypertrophem Knorpel durch Col X IHC	68
5.5 Darstellung des Osteozytennetzwerks in Silbernitratfärbung	69
5.6 RANK-L- und OPG-Immunhistochemie	73
5.6.1 Aktivierung der Osteoklasten durch RANK-L-Expression	73
5.6.2 Inhibition der Osteoklastenaktivierung durch RANK-L-Fehlrezeptor OPG ...	76
5.6.3 Gleichgewicht der Osteoklastenregulierung im RANK-L/ OPG-Verhältnis ...	78
5.7 Mineralisationsanalyse mittels Fluoreszenzmarkierung	81
5.8 Ergebnisse der in vivo DXA-Messungen	83
6 Diskussion	85
6.1 Knorpelreste in den Experimentalgruppen im Vergleich zur Kontrolle mit geringstem Kollagen Typ X Gehalt in OVXDS	86
6.2 Rarefizierte Trabekelstruktur und dünnere Kortikalis nach Ovariectomie und Steroidtherapie	87
6.3 Fortbestehender großer Weichgewebekallus in OVXD und OVXDS	90
6.4 Geringster Osteoidgehalt und größter Anteil mineralisierter Matrix durch dreifache Induktion der Osteoporose	92
6.5 Geringerer Kollagen Typ I-Gehalt der neu gebildeten Knochensubstanz in OVXD und OVXDS nach achtmonatiger Heilung	94

Inhaltsverzeichnis

6.6 Steroidinjektionen vermindern die Osteozytenzahl und nehmen so entscheidenden Einfluss auf die Mineralisierung der Extrazellulärmatrix.....	96
6.7 Osteozytäre RANK-L-Überexpression mit vergrößertem RANK-L/ OPG-Quotienten in OVXDS.....	99
6.8 Geringste Mineralisationsrate in OVXDS zu beiden Zeitpunkten.....	104
7 Zusammenfassung.....	106
8 Summary	107
9 Anhang	108
<i>Material und Methoden der Dual-X-Ray Absorptiometrie (DXA)</i>	108
<i>Toluidinblau-Färbung</i>	109
<i>Trichrom Färbung nach Masson Goldner</i>	110
<i>Kollagen I Immunhistochemie</i>	112
<i>Kollagen X Immunhistochemie</i>	115
<i>Silbernitrat-Färbung</i>	117
<i>RANK-L/ OPG Immunhistochemie</i>	118
<i>Injektionslösungen der Fluoreszenz-Markierungen</i>	120
10 Literaturverzeichnis.....	121
11 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	133
12 Abkürzungsverzeichnis	135
13 Präsentationen, Publikationen, Preise	138
14 Danksagung.....	140
15 Ehrenwörtlich Erklärung	141

1 Einleitung

Die Osteoporose als systemische Erkrankung des Knochens ist durch eine verringerte Knochendichte und veränderte Mikrostruktur charakterisiert. Das Skelett verliert an Stabilität und wird mit zunehmendem Verlauf geschwächt. Als häufigste Ursache der Osteoporose wurde der postmenopausale Östrogenmangel ausgemacht und betrifft folglich überwiegend das weibliche Geschlecht. Allerdings spielt Östrogenmangel in geringerem Maße auch im männlichen Körper eine Rolle in der Genese der Osteoporose [88]. Es sind jedoch auch viele weitere Risikofaktoren – wie die Langzeit-Glukokortikoidtherapie – als sekundäre Ursachen der Osteoporose bekannt.

Gemeinsames Merkmal aller Formen der Osteoporose sind unausgewogene Knochenumbauvorgänge (Remodeling) mit Überwiegen der Resorption und vermindertem Knochenaufbau. Konsequenz dieser Veränderungen des Knochens sind Fragilitätsfrakturen, die schon bei geringem Trauma oder auch spontan auftreten können und für Patienten oft lange Leidenswege mit eingeschränkter Lebensqualität oder dauerhafter Beeinträchtigung nach sich ziehen [109].

In Deutschland lag die Prävalenz der Osteoporose im Jahre 2009 bei 14%. Dabei waren 24% der Frauen und 6% der Männer im Alter über 50 betroffen [46].

Weltweit liegt die Anzahl der Osteoporose-assoziierten Knochenbrüche jährlich bei 8,9 Mio. Neben den mitunter weitreichenden Konsequenzen für den betroffenen Patienten ergeben sich hohe Kosten für das Gesundheitssystem, die in einer Liga mit den Behandlungskosten der koronaren Herzerkrankung und den zerebrovaskulären Erkrankungen spielen. Infolge des demografischen Wandels werden in Zukunft steigende Zahlen dieser Frakturen erwartet und die Bedeutung einer professionellen chirurgischen Versorgung weiter steigen [52].

Ziel dieser Studie ist das detaillierte Verständnis der Abläufe der Knochendefektheilung im Schafmodell der Osteoporose. Dabei stehen sowohl zelluläre Veränderungen als auch die Mineralisation des Knochens im Fokus. Das Schaf eignet sich durch große Ähnlichkeit zum menschlichen Skelett hinsichtlich Größe, Gewicht und Struktur ideal für die Untersuchung der Frakturheilung unter vergleichbaren Bedingungen [102]. Die Erkenntnisse dieser Studie können in Zukunft dazu beitragen, eine suffiziente chirurgische Versorgung Osteoporose-assoziiierter Frakturen zu ermöglichen, und geeignete Implantate sowie Knochenersatzmaterialien zu entwickeln.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Das menschliche knöchernerne Skelett

Der menschliche Körper besteht aus vier Grundgewebearten. Knochen- und Knorpelgewebe bilden das Stützgewebe, das sich zum einen durch enorme Festigkeit und Belastbarkeit auszeichnet, zum anderen eine mäßige Flexibilität zulässt [11]. Diese auf den ersten Blick konträren Eigenschaften werden durch den einzigartigen Aufbau aus verzahnten Kollagenfibrillen und darin eingelagerten Kalziumphosphat – Kristallen ermöglicht [155]. Knochen, Bänder und Gelenke bilden den passiven Bewegungsapparat, den die Skelettmuskulatur als aktive Komponente zur Übertragung der Kontraktionskraft auf benachbarte oder entfernte Körperpartien nutzt [11]. Zu den weiteren Funktionen des Knochens gehört der Schutz empfindlicher Organe. Das Gehirn wird vom knöchernen Schädel ummantelt, die Brusteingeweide vom Brustkorb und die Beckenorgane vom knöchernen Becken [11]. Im reifen Skelett ist das Knochengewebe überwiegend in Form von Lamellenknochen organisiert. Während der Knochenbildung und Frakturheilung liegt die knöchernerne Matrix als Geflechtknochen vor. Im Querschnitt ist die Unterteilung des Lamellenknochens in einen äußeren kompakten Anteil ohne Zwischenräume (*Substantia compacta*) und einen inneren spongiösen Anteil mit schwammartigem Aufbau dünner Knochenbälkchen (*Substantia spongiosa*) zu erkennen [11, 155]. Auch metabolisch erfüllt das Knochengewebe eine wichtige Funktion. Als größter Kalziumspeicher des Körpers gewinnt das Knochengewebe eine zentrale Funktion bei der Regulierung der Kalziumhomöostase [11, 155].

2.2 Makroskopischer Aufbau des Knochens

Das menschliche knöchernerne Skelett besteht in der Regel aus 210 anatomisch abgrenzbaren Knochen, die sich entsprechend ihrer Funktion in Größe und Form stark unterscheiden können [11]. Anhand der Morphologie werden 1) lange Knochen (*ossa longa*), wie die Röhrenknochen der Extremitäten, 2) kurze Knochen (*ossa brevia*), wie die Hand- und Fußwurzelknochen, 3) platte Knochen (*ossa plana*), wie das Schulterblatt oder die Knochen des Schädeldachs, 4) lufthaltige Knochen (*ossa pneumatica*), wie die Knochen des Gesichtsschädels mit Nasennebenhöhlen, 5) in Sehnen als Hypomochlion eingelagerte Sesambeine (*ossa sesamoidea*), wie beispielsweise die Kniescheibe und 6) zusätzliche überzählige Knochen (*ossa accessoria*), die durch fehlende Fusion der Knochenkerne bei der Verknöcherung entstehen, unterschieden [126].

Die langen Knochen der Extremitäten (Abb. 1, Seite 3) sind wie folgt aufgebaut: der röhrenförmige Schaft (Diaphyse) in der Mitte des Knochens geht an den Enden in die verbreiterten Epiphysen über, die die knorpelüberzogenen Gelenkflächen tragen. Den Übergangsbereich bildet die Metaphyse sowie – im Längenwachstum – die knorpelige Epiphysenfuge, von der im erwachsenen Skelett nur die Epiphysenlinie (Linea epiphysialis) zurück bleibt [11]. Unter der schmalen Substantia corticalis der Epiphysen und Metaphysen sowie den weiteren Knochen des Körpers befindet sich ein dichtes Netz aus Knochenbälkchen (Substantia spongiosa), die entlang der Traktionslinien ausgerichtet sind. Zwischen den Spongiosatrabekeln ist das rote, blutbildende Knochenmark eingelagert [126]. Der diaphysäre Schaft der Röhrenknochen besteht hauptsächlich aus Substantia corticalis, die den inneren Markraum (cavitas medullaris) umgibt. Beim erwachsenen Menschen ist dieser Raum von gelbem, fettreichem Knochenmark ausgefüllt [11, 126]. Außen wird der Knochen vom Periost ummantelt, der innere Raum wird von Endost ausgekleidet [11].

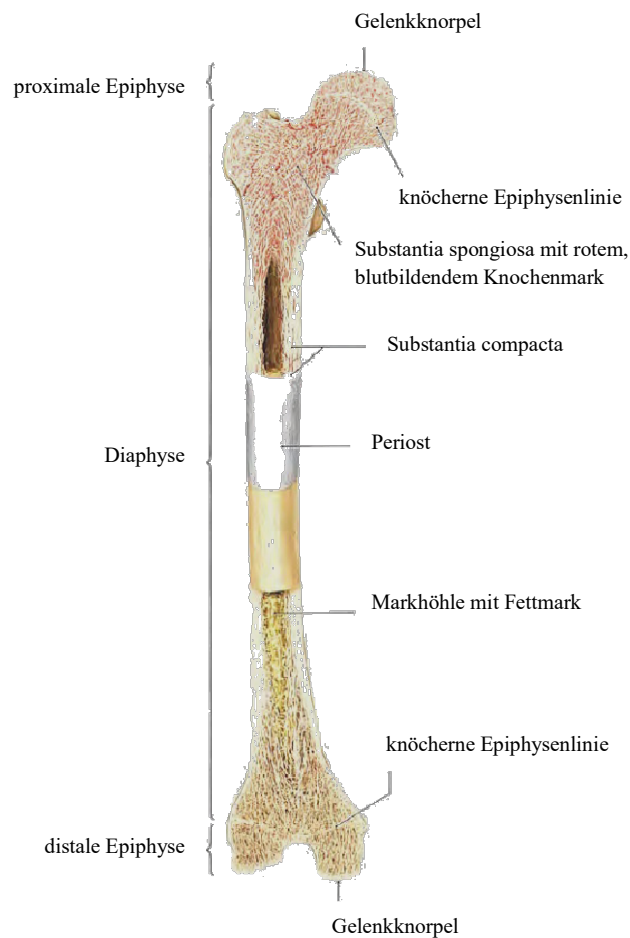


Abb.1: Aufbau eines Röhrenknochens am Beispiel eines Längsschnitts durch den menschlichen Oberschenkelknochen (Femur).

Quelle: Aus Schünke et al. [126].

2.3 Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix des Knochens

Das dicht mineralisierte Knochengewebe enthält einen Wassergehalt von 10-20%. Die übrige wasserfreie Matrix besteht zu etwa 70% aus anorganischen, mineralischen Stoffen und zu 30% aus organischen Substanzen. Mit etwa 90% bildet Kollagen Typ I (Col I) den Hauptanteil der organischen Matrixkomponenten. Col I bildet charakteristische Fibrillen, die für große Zugfestigkeit bei gleichzeitiger Elastizität sorgen. Dieses organische Grundgerüst dient als Raster für die Mineralisierung [11, 155]. Die weiteren organischen Substanzen sind Col IV, das die Fibrillenbildung des Col I reguliert, Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin sowie Proteoglykane und Bone-Sialoproteine [11, 155]. Die Hauptkomponente der anorganischen Mineralsubstanz bilden stark kalzium- und phosphathaltige Hydroxylapatit-Kristalle mit der Summenformel $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$. Gemeinsam mit geringen Anteilen von Kalziumcarbonat und Kalziumhydrogenphosphat werden diese Kristalle in das Col I Gerüst eingebaut [11, 155].

Erst das Zusammenspiel der organischen und anorganischen Komponenten sowie der Aufbau aus Kortikalis und Spongiosa ermöglicht große mechanische Robustheit der Knochensubstanz bei nur geringem Gewicht und sparsamem Materialgebrauch (etwa 4kg bei 70kg Körpergewicht) [11].

2.4 Mikroskopischer Aufbau der Knochensubstanz

Das erwachsene Skelett besteht bis auf wenige Ausnahmen aus Lamellenknochen. Strukturelemente sind 3-7 μm dicke Knochenlamelle, in denen Kollagenfibrillen in gleicher Weise orientiert sind [155]. In der Knochenmatrix liegen die Lamellen in vier verschiedenen Anordnungen vor (Abb. 2 A, Seite 5): Osteone des kompakten Knochens sind entlang der Längsrichtung der Diaphysen ausgerichtet und bestehen aus ca. 30 konzentrisch organisierten Lamellen, die den zentralen Havers-Kanal umgeben (Abb. 2 B, Seite 5). Osteone sind nahezu zylinderförmig und werden durch Zementlinien von benachbarten Osteonen abgegrenzt. Sie messen ca. 200 μm im Durchmesser und sind etwa 2,5mm lang [11]. Im zentralen Havers-Kanal verläuft ein versorgendes Gefäß mit gefenstertem Endothel, das meist von nicht-myelinisierten dünnen Nervenfasern begleitet wird [11, 155]. Transversal durch die Kompakta verlaufende Gefäße verbinden die Havers-Kanäle untereinander und werden als Volkmann-Kanäle bezeichnet. Diese Kanäle werden nicht von Osteonen begleitet. Das Lamellensystem der Osteone enthält etwa 10 x 25 μm große ellipsoide Lakunen, in die die knochentypischen Osteozyten

eingelagert sind. Schmale Zellausläufer, sogenannte Dendriten, verlaufen in dünnen Knochenkanälchen (Canaliculi) und ermöglichen die Kommunikation zwischen Osteozyten der gleichen wie auch benachbarter Lamellen [11, 155]. Die Räume zwischen den Osteonen der Kompakta werden von interstitiellen Lamellen (Schaltlamellen) ausgefüllt. Schaltlamellen sind Ausdruck des ständigen Umbaus der Knochensubstanz („bone remodeling“) und bestehen aus Resten unvollständig resorbierter Osteone [155]. Generallamellen umrahmen die Kortikalis an der periostalen und endostalen Oberfläche als dünne Schicht und dienen innen der Abgrenzung des Markraums und an der Außenseite der Verankerung des Periosts durch Sharpey-Fasern (Abb. 2 C, Seite 5) [126, 155].

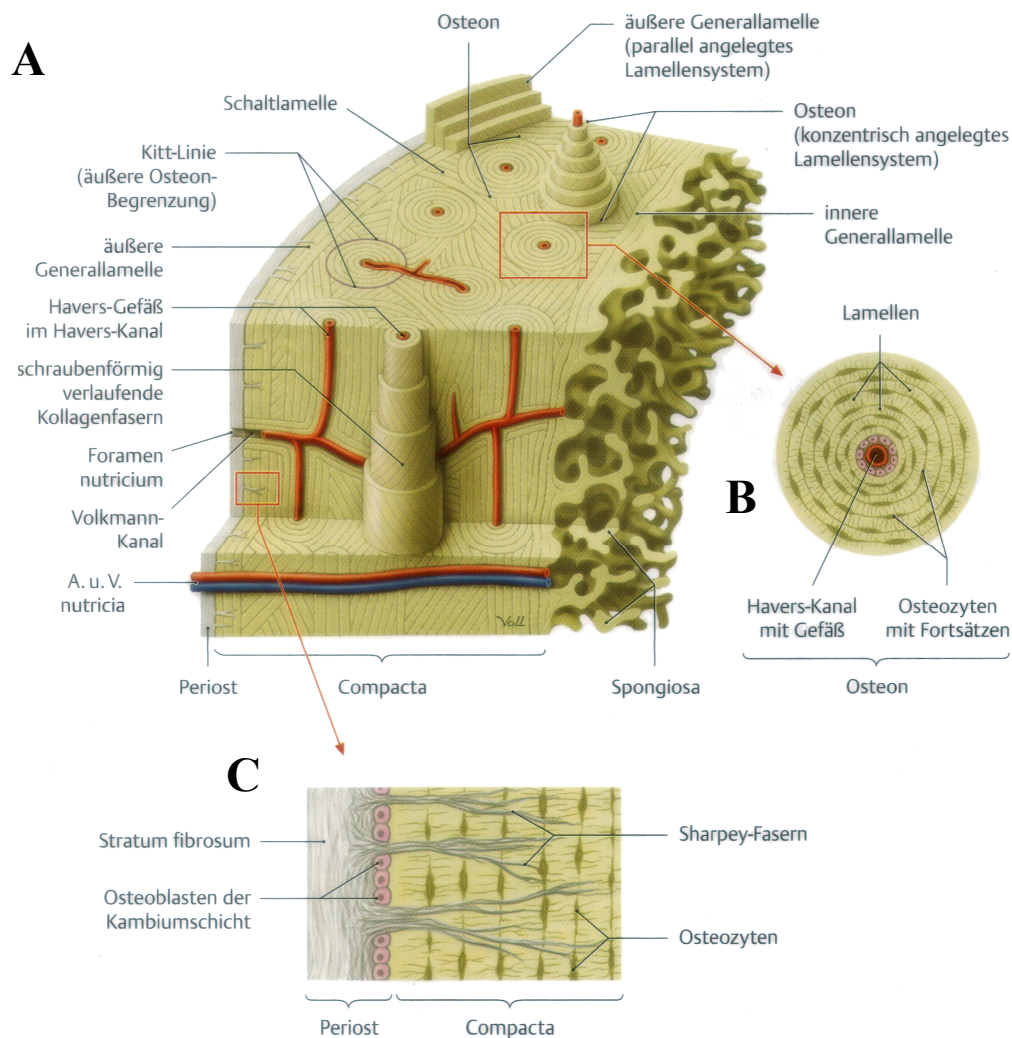


Abb. 2: Mikroskopischer Aufbau der Knochensubstanz.

Ausschnittvergrößerung der Kompakta, die in Osteon-, Schalt- und Generallamellen organisiert ist (A). Der konzentrische Aufbau eines Osteons ist in vergrößertem Querschnitt dargestellt (B). Abbildung C zeigt die Verankerung des Periosts in den äußeren Generallamellen. Quelle: Aus Schünke et al. [126].

Auch die Trabekel der Spongiosa sind in Lamellen organisiert. Aufgrund der nur geringen Dicke ($< 200\mu\text{m}$) fehlen Osteone weitgehend. Die Lamellen liegen als halbmondförmige Pakete dicht gedrängt aneinander und werden durch kollagenfreie Zementlinien voneinander getrennt [11].

Geflechtknochen liegt im ausgewachsenen menschlichen Skelett nur in wenigen Bereichen wie den Suturen des Schädels und dem Labyrinth des Felsenbeins vor [11]. Physiologisch entsteht Geflechtknochen jedoch während der Knochenneubildung und der Frakturheilung. Erst im weiteren Verlauf findet der Umbau in Lamellenknochen statt. Histologisch erscheint Geflechtknochen als dreidimensionales Netz zufällig angeordneter Trabekel, in denen Kollagenfibrillen unregelmäßig vorliegen [155]. Im Zuge des Knochenumbaus durchsetzen Osteone den Geflechtknochen und die lamellare Organisation entsteht.

2.5 Spezifische Zellen des Knochens

2.5.1 Knochenformation: Die osteoblastäre Zellreihe

Osteoprogenitorzellen, Vorläufer der Osteoblasten

Die Funktion der Osteoblasten ist die Produktion der wesentlichen organischen Bestandteile des Knochens (Osteoid), die im weiteren Verlauf mineralisiert werden. Sie entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen (MSC), die im adulten Skelett im Stratum osteogenicum des Peri- und Endost sowie im Knochenmark ruhen und als Osteoprogenitorzellen bezeichnet werden. Unter dem Einfluss von bone morphogenetic proteins (BMP) reifen sie zu bipotenten Progenitorzellen heran, die sich zu Chondroblasten und Osteoblasten differenzieren können. Auch die weitere Differenzierung in Präosteoblasten wird durch BMPs bestimmt [11, 155]. Die Rekrutierung von Progenitorzellen spielt insbesondere bei der Frakturheilung eine Rolle. Lokal entwickeln sich Chondro- und Osteoblasten, die Osteoid und Knorpel synthetisieren [11].

Osteoblasten

Reife Osteoblasten sind einkernige, kubisch geformte Zellen mit einem Durchmesser von $15\text{-}30\mu\text{m}$ (Abb. 3, Seite 7) [11]. Angepasst an ihre hohe Syntheseleistung sind Osteoblasten reich an Ribosomen und rauem endoplasmatischem Retikulum (rER). Außerdem besitzen sie einen großen Golgi-Apparat. Im histologischen Präparat erscheinen sie daher basophil [155]. Das Kennmolekül der Osteoblasten ist die

membranständige alkalische Phosphatase. In Knochenneubildungszonen lagern sich die Osteoblasten an der Osteoidgrenze zu einem palisadenförmigen Zellrasen zusammen. Sie sind untereinander über Adhärens- und Occludenskontakte verbunden und können Stoffe über Nexus austauschen. Über die autokrin wirkende Zytokine wie TGF- β , PDGF und IGF-I und -II regen Osteoblasten ihre eigene Proliferation und Osteoidbildung an. Außerdem besitzen sie Rezeptoren für Parathormon (PTH) und Calcitriol (1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃) [155].

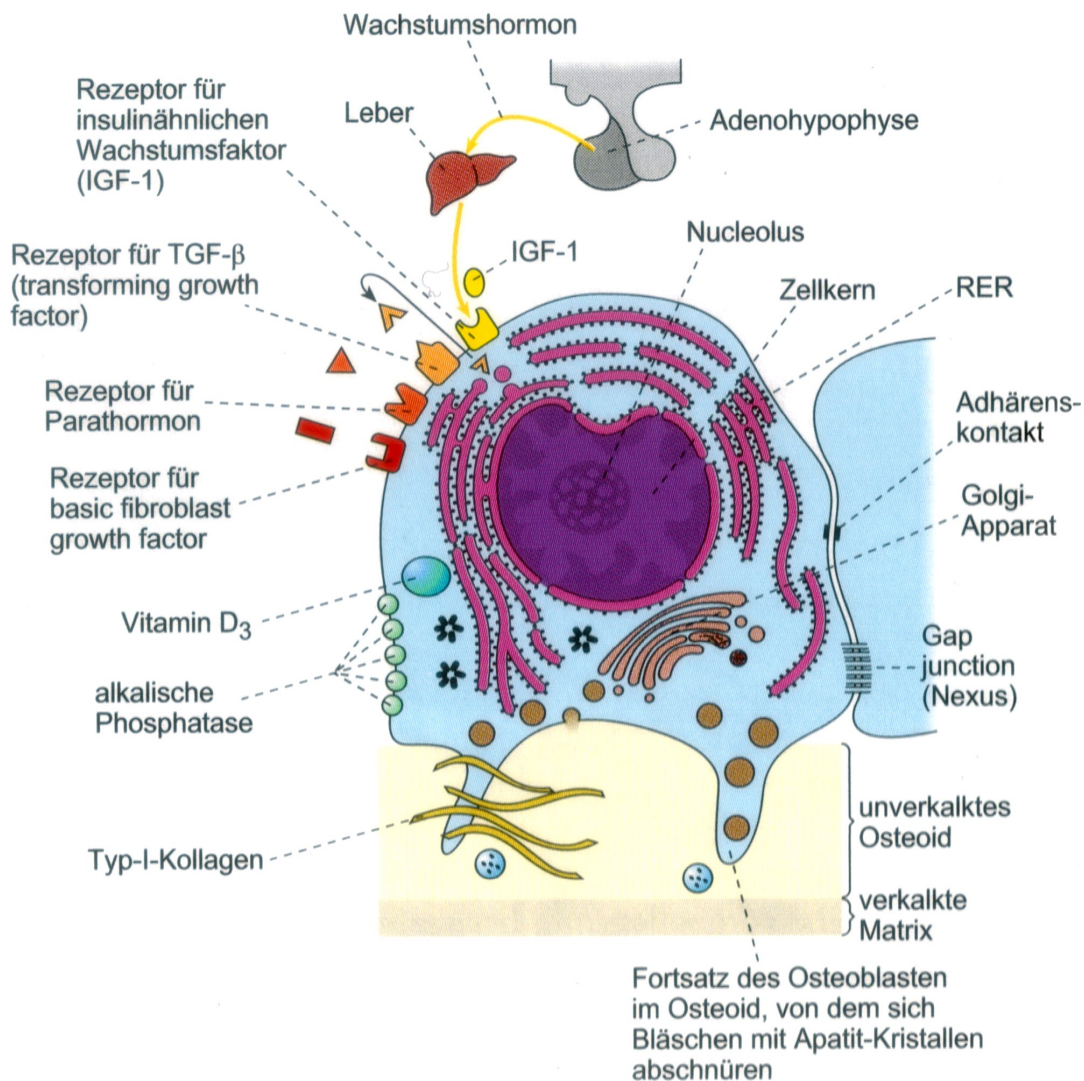


Abb. 3: Der reife Osteoblast.

Osteoblasten sind knochenbauende Zellen und synthetisieren das kollagene Grundgerüst des Knochens (Osteoid) sowie Apatit-Kristalle, die für die Mineralisation der Knochenmatrix benötigt werden. Angepasst an ihre hohe Syntheseleistung sind sie reich an rER und besitzen einen großen Golgi-Apparat. Osteoblasten besitzen zahlreiche Rezeptoren sowohl auf der Zellmembran als auch intrazellulär und können so durch Signalstoffe beeinflusst werden. Sie können jedoch auch selbst Signalstoffe ausschütten und auf umgebende Zellen wirken. Quelle: Aus Welsch [155].

Endostale Saumzellen

Osteoblasten, die nicht als Osteozyten eingelagert in Knochensubstanz vorliegen oder durch Apoptose zu Grunde gehen, liegen als inaktive, abgeflachte Osteoblasten dem gesamten Trabekelwerk, den Havers-Kanälen und der inneren Kortikalisoberfläche an [11, 155]. Die Gesamtheit dieser Zellen wird als Endost bezeichnet. Die Saumzellen, auch Lining-Zellen oder Knochendeckzellen, sind über Nexus untereinander verbunden und stehen über Zellausläufer auch mit Osteozyten in Kontakt. Es wird vermutet, dass diese ruhenden Zellen regulatorische Funktionen bei der Knochenresorption übernehmen [11].

Osteozytäre Osteoblasten

Kennzeichen der osteozytären Osteoblasten ist die nur noch geringe Restaktivität der alkalischen Phosphatase und der Proteinbiosynthese [11]. Mit nachlassender Aktivität flachen die Zellkörper ab. Die Zellen bilden Ausläufer, die mit den Osteozyten der mineralisierten Matrix in Verbindung stehen [11]. Im Zuge der Mineralisierung werden sie in die neue Knochenmatrix eingelagert und werden ab diesem Zeitpunkt Osteozyten genannt (Abb. 4, Seite 8).

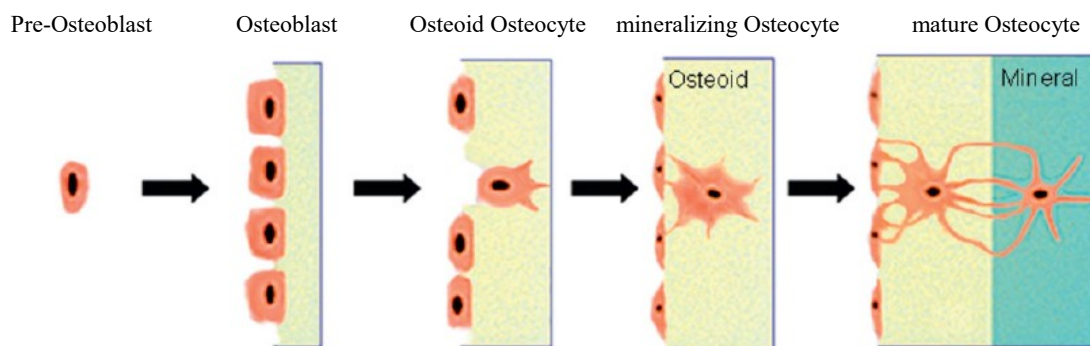


Abb. 4: Vom Osteoblast zum Osteozyt.

Zur Knochenbildung differenzieren sich Prä-Osteoblasten zu reifen Zellen und synthetisieren Osteoid sowie Mineralkristalle. Im Verlauf werden Osteoblasten im Osteoid und in die mineralisierte Matrix eingebaut. Ab diesem Stadium werden die Zellen Osteozyten genannt. Quelle: Aus Bonewald [13].

Osteozyten

Osteozyten liegen eingebettet in den Osteozyten-Lakunen der mineralisierten Knochenmatrix und sind der dominierende Zelltyp des reifen Knochens. Sie kommunizieren über Nexus an ihren zahlreichen Dendriten sowohl untereinander als auch mit den endostalen Saumzellen (Lining-Zellen) und osteozytären Osteoblasten. Zwischen Zellkörper und Knochensubstanz liegt ein schmaler flüssigkeitshaltiger

Osteoidsaum, der die Versorgung der Osteozyten rein über Diffusion aus dem Havers-Gefäß ermöglicht [11, 155]. In der jüngsten Forschung wurde gezeigt, dass Osteozyten wichtige regulatorische Aufgaben erfüllen und nicht nur eingebaute, inaktive Osteoblasten sind [13, 101]. Osteozyten gelten als Mechanosensoren und wandeln die Kraftereinwirkung auf den Knochen in biologische Signale um [101]. Auf mechanische Belastung reagieren sie mit der Sekretion verschiedener Moleküle wie Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandin E₂ (PEG₂) und Sclerostin [66]. Das osteozytenspezifische Molekül Sclerostin hemmt sowohl die Differenzierung als auch die Proliferation der Osteoblasten und reduziert so die Knochenneubildung. Fehlende Belastung des Knochens, wie beispielsweise durch Bettruhe [10] oder Schwerelosigkeit, erhöht die Sclerostinsekretion und die Knochenresorption überwiegt [117]. Der Anteil apoptotischer Osteozyten ist in nicht belastetem Knochen ebenfalls erhöht [2].

Osteozyten nehmen weiterhin Einfluss auf die Knochenmineralisierung. In osteozytenfreier Knochenmatrix wurde eine leichte Osteopenie beobachtet, die unabhängig von der Belastung auftrat. Dabei war die Funktion der Osteoblasten beeinträchtigt und das trabekuläre Netzwerk der Spongiosa reduziert [138]. Ein gestörtes Osteozytennetzwerk erhöht folglich die Rate der trabekulären Mikrofrakturen sowie die kortikale Brüchigkeit.

Auch die Aktivierung der Osteoklasten wird von Osteozyten über die Expression von RANK-L beeinflusst. Apoptotische Osteozyten exprimieren auf ihren Zellkörpern RANK-L und rekrutieren auf diese Weise Osteoklasten, die den betroffenen Knochenabschnitt resorbieren [68]. Jedoch können auch vitale Osteozyten Osteoklasten durch RANK-L rekrutieren [158]. In unmittelbarer Nähe zu Mikrofrakturen, wie sie vermehrt bei Osteoporose auftreten, schütten Osteozyten proapoptotische Moleküle aus, die die Knochenresorption und das Knochenremodeling anregen. Antiapoptotische Stoffe werden dagegen in umliegenden Bereichen ausgeschüttet, um die Apoptose lokal zu beschränken [146]. Damit haben Osteozyten sowohl protektive als auch resorptive Effekte auf die Knochenmatrix. Ein gestörtes Osteozytennetzwerk ist mit einem alternden Skelett assoziiert. Das Verständnis der Funktion dieser oft unterschätzten Zellen bietet Möglichkeiten zur Diagnostik und Therapie systemischer Knochenerkrankungen wie der Osteoporose [138].

2.5.2 Knochenresorption: Die Osteoklasten

Anders als die knochenaufbauenden Osteoblasten, entstehen die knochenresorbierenden Osteoklasten aus dem monozytären Phagozytensystem (MPS) des Knochenmarks. Die Zellen gelangen entweder direkt von dort oder über die Blutbahn ins Knochengewebe und fusionieren nach Cadherin 6 vermitteltem Zellkontakt mit Osteoblasten zu den mehrkernigen Osteoklasten (Synzytium) [11, 155]. Mit bis zu 25 Zellkernen und einem Zelldurchmesser bis zu 100µm liegen sie am Trabekelwerk in Erosionslakunen und in der Kortikalis in Erosionstunneln vor. Hauptaufgabe der Osteoklasten ist die Demineralisierung und der enzymatische Abbau der organischen Knochenmatrix. Daher nehmen sie eine Schlüsselfunktion in der Kalziumfreisetzung und des Remodelings ein [11]. Im aktiven Zustand sind die Zellen polar in einen lakunären (apikalen) und einen stromawärtigen (basolateralen) Teil orientiert (Abb. 5, Seite 11). Die basolaterale Membran liegt als Faltensaum vor. Die beiden Zellpole werden durch die Haftzone mit fokalen Zellsubstratkontakten voneinander getrennt [11, 155].

Osteoklasten sind reich an Zellorganellen. Die starke Azidophilie entsteht durch die zahlreichen Mitochondrien zur ATP-Produktion. Ein weiteres Kennzeichen ist der ausgeprägte Golgi-Apparat in der Nähe des Faltensaums, von dem zahlreiche Vesikel abgeschnürt werden [11]. Durch die exozytotische Verschmelzung der Vesikel gelangen lysosomale (z.B. Tartrat-resistente saure Phosphatase [TRAP] und Cathepsin K) sowie nicht-lysosomale Enzyme (z.B. Prokollagenase und Metalloprotease 9) zur Spaltung der Knochenmatrix in der Resorptionslakune. Das Zytosol der Zellen ist reich an Carboanhydrase II, die CO_2 und H_2O in Bicarbonat (H_3O^-) und Protonen (H^+) wandelt. ATP-abhängige Protonenpumpen befördern die H^+ Ionen in die Resorptionslakune. H_3O^- wird an der apikalen Zellmembran über den Anionenaustauscher II gegen Chloridionen (Cl^-) getauscht, die an der basolateralen Zelloberfläche über den Chloridionenkanal 7 ebenfalls in die Resorptionslakune gelangen. Gemeinsam bilden diese Ionen Salzsäure (HCl , pH 5), die die Knochensalze auflöst. Der basolaterale Faltensaum verfügt außerdem über Kalziumkanäle, die die Kalziumionen in die Zelle aufnehmen und an der apikalen Zellmembran abgeben [11, 155]. Osteoklasten werden über zahlreiche Wege reguliert: Auf ihrer Zelloberfläche tragen sie Rezeptoren für Calcitonin, das die Aktivität herunter reguliert. Parathormon (PTH) hat indirekt Einfluss auf die Osteoklasten: In Osteoblasten induziert PTH die Bildung von Faktoren wie $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 und RANK-L, die die Osteoklasten aktivieren und ihre Rekrutierung fördern [11, 155].

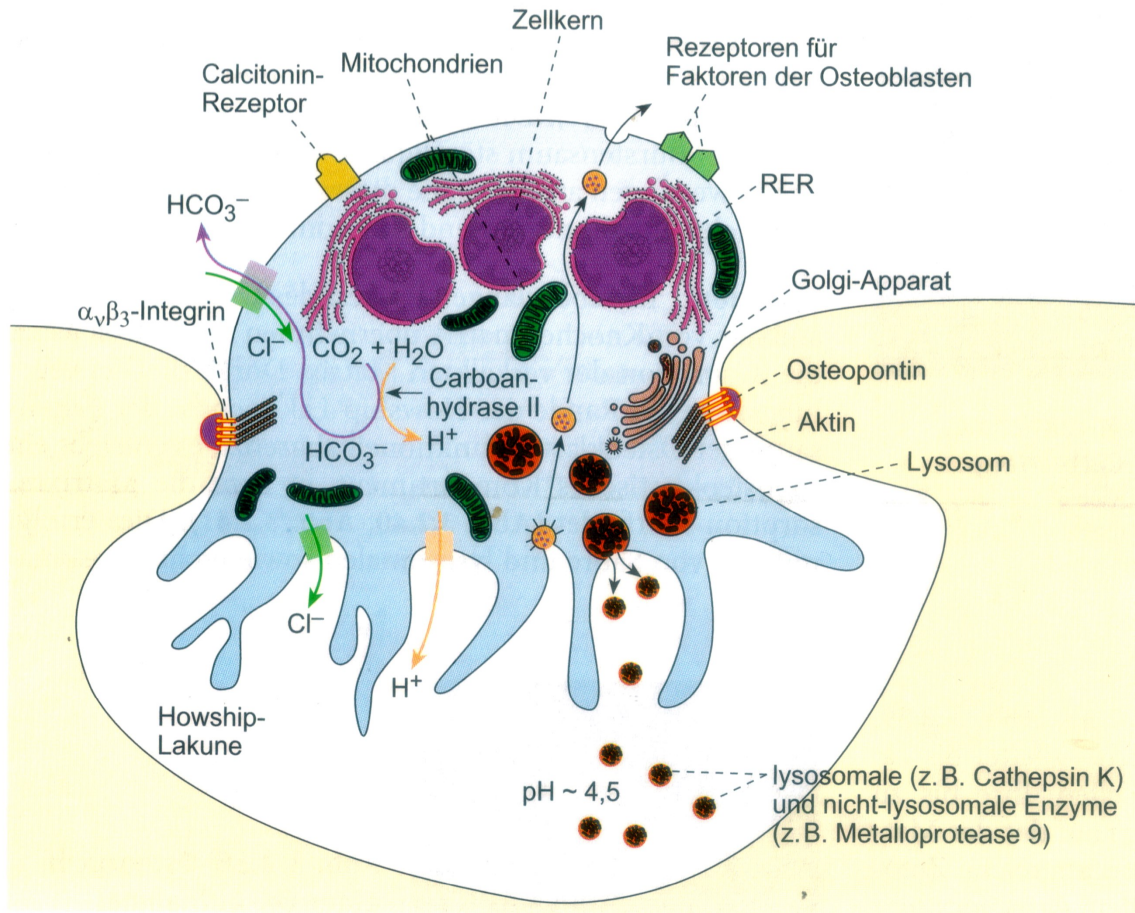


Abb. 5: Schemazeichnung eines aktiven Osteoklasten in der Resorptionslücke.

Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die durch Synzytium entstehen. Sie sind polar organisiert und durch Zell-Matrix-Kontakte in einen oberen apikalen und einen unteren basolateralen Teil mit Faltensaum geteilt. Intrazellulär werden ATP-abhängig Protonen (H^+) synthetisiert. Sie werden in die Resorptionslücke geleitet und ergänzen sich mit Chloridionen (Cl^-) zu Salzsäure zum Abbau der Mineralsalze. Synthetisierte Enzyme spalten in der Resorptionslücke das kollagene Grundgerüst. Quelle: Aus Welsch [155].

2.6 Knochenstoffwechsel und seine Regulation

Knochen unterliegt einem ständigen Umbau. Jedes Jahr werden rund 18% des gesamten skelettalen Kalziums sowohl im kortikalen als auch im trabekulären Knochen umgesetzt [155]. Dabei spielt neben der Materialerneuerung und Kalziummobilisierung insbesondere die Anpassung an mechanische Belastungen eine Schlüsselrolle [11, 88]. Als Mechanosensoren dienen die in Kapitel 2.5.1 (Seite 6) beschriebenen Osteozyten [88, 155]. Knochenabbau und -aufbau stehen in engem Zusammenhang und werden streng reguliert. Überwiegt in diesem Gleichgewicht der Knochenabbau, kommt es zur Osteoporose [11].

2.7 Der Knochenumbau („Bone Remodeling“)

Remodeling ist ein komplexer mechanisch-biologischer Prozess, der die Gesundheit des Skeletts gewährleistet. Während dieser Umbauvorgänge resorbieren Osteoklasten veraltete oder beschädigte Knochenmatrix, die von Osteoblasten im nächsten Schritt wieder aufgebaut wird und so die strukturelle Integrität erhalten bleibt [122]. Die Rekrutierung der Osteoklasten obliegt unter anderem den im Knochen einbetteten Osteozyten, die belastungsabhängig Zytokine freisetzen und so die Umbauvorgänge an die Belastungssituation des Knochens anpassen [110]. Im Zuge des Knochenumbaus werden außerdem Mikrofrakturen versorgt, die ebenfalls durch Osteozyten detektiert werden [146]. Insbesondere die Summe an Mikrofrakturen schwächt die Belastbarkeit des Skeletts, sodass diese Schäden durch Remodeling ausgebessert werden müssen [90]. Mit zunehmendem Alter verringert sich die Knochenmasse und die Osteozytendichte des Knochens sinkt. Dadurch verliert die Knochensubstanz ihre empfindlichen Sensoren, die für die Gesundheit des Skeletts garantieren. Mikrofrakturen häufen sich folglich im kortikalen [123] und spongiösen Knochen [97], insbesondere im fortschreitenden Lebensalter.

Für den Prozess des Remodelings lagern sich Osteoklasten und Osteoblasten zu einzigartigen anatomischen Strukturen zusammen, die als „basic multicellular units“ (BMUs) bezeichnet werden. Im kortikalen Knochen liegen diese vorwiegend als Erosionstunnel und im Trabekelwerk als Erosionslakunen vor [110, 122]. In dieser Arbeit liegt das Augenmerk auf den Erosionslakunen. Die BMU kann in verschiedene Abschnitte unterteilt werden (Abb. 6, Seite 13): 1) Resorptionszone, in der Osteoklasten die Erosion einleiten, 2) Umkehrzone, in der makrophagenähnliche Zellen die entkalkte Matrix abbauen und 3) die Formationszone, in der Osteoblasten die Erosionslakune durch Knochenlamellenaufbau verschließen [11, 110]. Als erster Schritt des Remodelings findet jedoch die Aktivierung über manigfaltige Auslöser statt: Mechanische Belastung des Skeletts wird von Osteozyten erkannt und in biologische Signale umgewandelt [101]. Mikrofrakturen werden von Osteozyten detektiert und das Remodeling eingeleitet [146]. Systemische Botenstoffe wie PTH und Östrogene initiieren den Knochenumbau [34]. Apoptotische Osteozyten rekrutieren Osteoklasten durch Expression von RANK-L und leiten so das Remodeling ein [68]. Ein weiterer Mechanismus ist der lokal fallende TGF- β Spiegel nach Apoptose von Osteozyten, sodass der inhibitorische Effekt auf die Osteoklastogenese verschwindet und vermehrt Osteoklasten rekrutiert werden [50]. Endostale Saumzellen reagieren auf Signale der

Osteozyten mit Produktion von RANK-L und monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1).

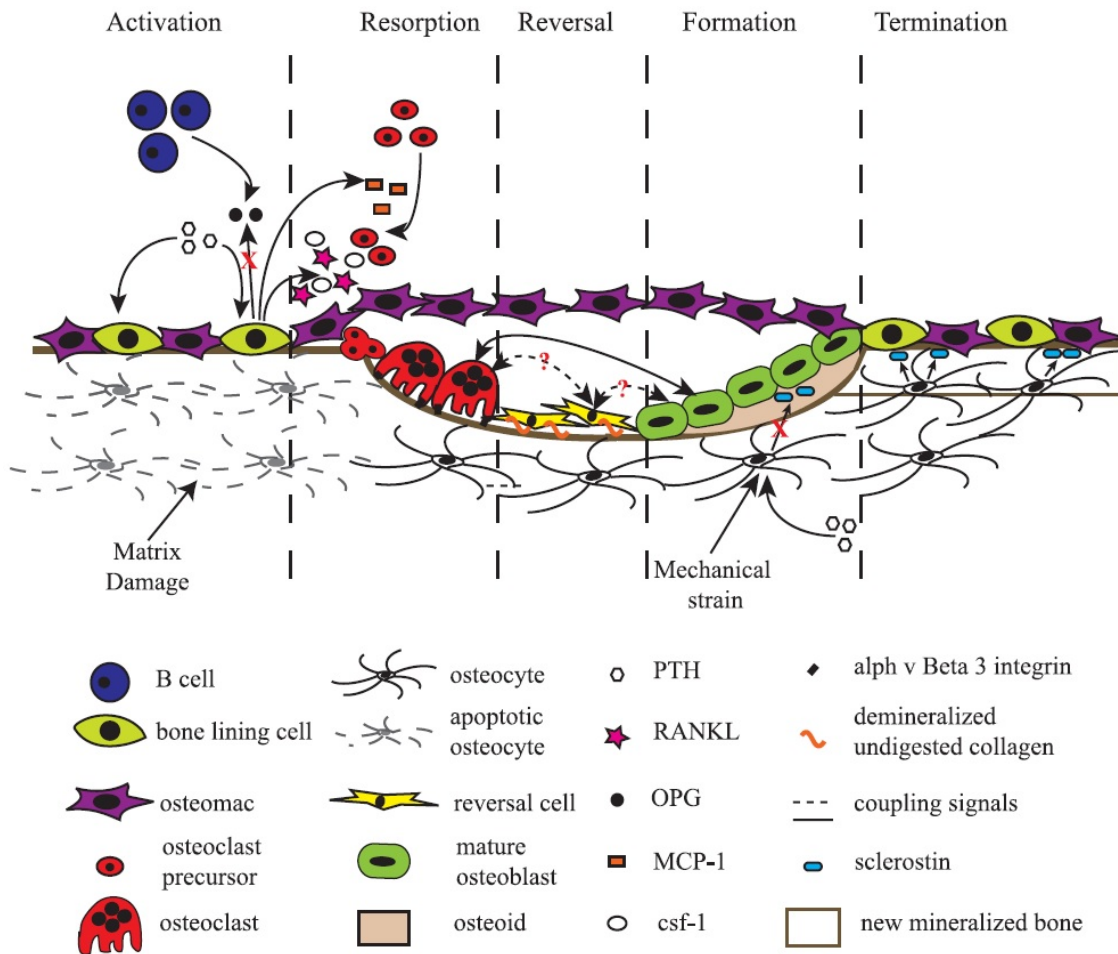


Abb. 6: Schematischer Aufbau einer BMU im Prozess des Knochenumbaus.

Die ruhende Knochenoberfläche ist von endostalen Saumzellen und Präosteoblasten bedeckt. Nach Aktivierung des Remodelings – zum Beispiel durch osteozytäre Signale oder PTH – schütten Osteoblasten MCP-1 aus und rekrutieren Präosteoklasten. Die Produktion von OPG wird reduziert und die Expression von CSF-1 und RANK-L erhöht, sodass die Differenzierung in reife Osteoklasten gefördert wird und die Knochenresorption beginnt. In der Umkehrzone phagozytieren Makrophagenähnliche Zellen die demineralisierte Kollagenmatrix auf der Oberfläche und bereiten die anschließende Knochenformation vor. Signale zum Knochenaufbau werden aus der Knochenmatrix freigesetzt oder von den aktiven Osteoklasten produziert. Osteozyten reduzieren die Sclerostinexpression und die Knochenbildung startet. In der Terminationsphase wird die Sclerostinproduktion wieder erhöht, der Knochenaufbau folglich heruntergefahren und das Osteoid mineralisiert. Osteoblasten verbleiben in der Matrix eingebaut als Osteozyten, gehen in Apoptose oder bedecken den Knochen als endostale Saumzellen. Quelle: Aus Raggatt und Partridge [110].

MCP-1 rekrutiert monozytäre Osteoklastenvorläuferzellen und verstärkt die RANK-L induzierte Osteoklastogenese [78]. Osteoblasten erhöhen insbesondere nach PTH-Stimulation die Expression von RANK-L und CSF-1 (colony-stimulating factor 1) und

reduzieren die Produktion von OPG. Dabei wirkt CSF-1 stimulierend auf die Proliferation und das Überleben der Osteoklastenvorläuferzellen, RANK-L beschleunigt ihre Fusion zu mehrkernigen Osteoklasten, erhöht ihre Aktivität und verlängert die Lebenszeit [18]. Nach der Resorption folgen in der Umkehrzone monozytenartige phagozytierende Zellen, die die demineralisierte Kollagenmatrix des Knochens abbauen und die Oberfläche für die erneute Knochenbildung durch Osteoblasten vorbereiten. Die abschließende Aufgabe der Zellen der Umkehrzone ist die Produktion von Signalstoffen, die den Knochenabbau in Knochenaufbau wandeln [110]. Der Ursprung dieser Signale ist jedoch nicht eindeutig geklärt. Osteoklasten nehmen über die Expression von Sphingosin 1-phosphat stimulierenden Einfluss auf die Rekrutierung und das Überleben von Osteoblasten [103]. Aufgrund der zeitlichen und räumlichen Distanz zwischen Knochenabbau und –aufbau werden weitere Signalwege diskutiert. Nach Differenzierung der MSC und Osteoblastenvorläuferzellen in reife Osteoblasten beginnen diese mit dem Knochenaufbau durch Produktion des organischen Grundgerüsts und der Einlagerung anorganischer Mineralsalze. Der Knochenaufbau stoppt, wenn der gleiche Anteil aufgebaut wurde, der zuvor resorbiert wurde. Auch diese Signalwege, die zur Terminierung der Knochenbildung führen, sind bislang nicht ausreichend verstanden. Nach abgeschlossener Knochenbildung verbleiben Osteoblasten als Osteozyten in der Matrix, gehen in Apoptose oder verbleiben als endostale Saumzellen auf der Oberfläche des Trabekelwerks [110].

2.8 Knochenzellinteraktionen

Im unversehrten menschlichen Skelett dürfen Knochenaufbau und –abbau nicht isoliert betrachtet werden. Sämtliche Osteoklasten und Osteoblasten mit Ausnahme derer im Periost liegen als funktionelle Einheiten (BMUs) vor. Das gemeinsame Auftreten dieser Zelltypen wird auch als Kopplung bezeichnet. Sie interagieren untereinander über verschiedene Signalwege (Kopplungsfaktoren), die Einfluss auf die Differenzierung, Proliferation und Aktivität nehmen [110]. In diesem Kapitel werden die zentralen Kopplungsfaktoren beleuchtet und der Einfluss auf die verschiedenen Zelltypen beschrieben.

2.8.1 Einfluss der Osteoblasten auf Osteoklasten

Wie in Kapitel 2.5.2 (Seite 10) beschrieben, tragen Osteoklasten verschiedene Rezeptoren, die ihre Funktion beeinflussen. Neben den Rezeptoren für körpereigene Vitamine (Calzitriol) und Hormone (Calzitonin), tragen Osteoklasten außerdem Rezeptoren für verschiedene Mediatoren der Osteoblasten, die die Rekrutierung und Differenzierung der Progenitorzellen in reife Osteoklasten steuern [88, 155]. Reife, mehrkernige Osteoklasten entstehen durch Fusion monozytärer Vorläuferzellen, die aus hämatopoetischen Stammzellen entspringen (Abb. 7, Seite 15). Der Transkriptionsfaktor PU.1 leitet in pluripotenten Stammzellen die ersten Schritte der Differenzierung zu Monozyten ein. Auf der Zellmembran wird infolge c-fms exprimiert, der Rezeptor für macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) [107]. M-CSF wird von Osteoblasten exprimiert und erhöht sowohl die Proliferation der monozytären Vorläuferzellen als auch die Expression von receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) auf ihrer Zelloberfläche [88].

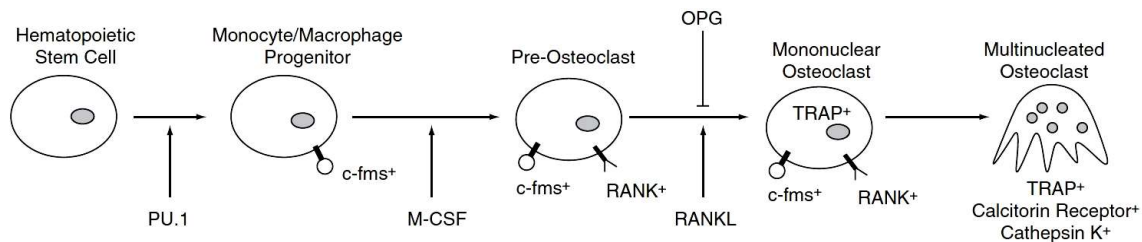


Abb. 7: Differenzierung der Osteoklasten.

Osteoblasten nehmen an vielen Stationen der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu reifen Osteoklasten Einfluss. Im frühen Stadium über die Expression von M-CSF und dessen Bindung an c-fms. Im weiteren Verlauf über die Stoffe RANK-L und OPG, die fördernd und hemmend auf die Osteoklastogenese wirken. Quelle: Aus Marcus et al. [88].

Das RANK-RANK-L-OPG System ist ein prominenter und essentieller Regulationsmechanismus der Osteoklastogenese [69]. RANK liegt als Transmembranprotein in der Zellmembran der Osteoklastenvorläuferzellen und gehört zur Tumor necrosis factor (TNF) Rezeptor Superfamilie. Der RANK-Ligand (RANK-L) befindet sich hingegen membrangebunden auf Präosteoblasten. Durch Bindung von RANK-L an RANK wird die Osteoklastogenese stimuliert und das Gleichgewicht des Remodelings zugunsten der Resorption verlagert [149]. Die Zell-Zell-Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten ist unerlässlich für die Osteoklastogenese [69].

Osteoprotegerin (OPG), ebenfalls ein Mitglied aus der TNF – Rezeptor Superfamilie, wird als löslicher Rezeptor in Präosteoblasten synthetisiert. OPG fungiert als

Fehlrezeptor für RANK-L und verhindert so die Bindung von RANK-L an RANK. Auf diese Weise wird ein notwendiger Schritt der Osteoklastogenese entzogen und die Proliferation und Differenzierung gestört. Entscheidend für die Osteoklastogenese ist folglich das lokale Gleichgewicht von RANK-L und OPG. Bei Überwiegen von RANK-L kann die ausreichende Bindung an RANK erreicht und die Osteoklastogenese gefördert werden [59]. Neben der Stimulation der Differenzierung der Präosteoklasten nimmt RANK-L auch in reifen, mehrkernigen Osteoklasten Einfluss, insbesondere auf die Aktivität der Zellen, und regt sie zur Resorption an [18]. Ebenso unterbindet der Fehlrezeptor OPG auch in differenzierten Osteoklasten den RANK-RANK-L Signalweg und unterbindet die stimulierenden Einflüsse auf die Aktivität [73]. Weitere Zytokine wie IL-1, IL-6, M-CSF und TNF- α verlängern die Überlebenszeit der Osteoklasten [107]. Osteoklasten sind in Proliferation, Differenzierung, Aktivität und Apoptose somit vielfältig durch entzündungsassoziierte Zytokine reguliert.

Osteoblasten nehmen über die RANK-L oder OPG Expression entscheidenden Einfluss darauf, ob die Resorption oder die Formation von Knochensubstanz überwiegt [88].

In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass auch Osteozyten an der Expression von RANK-L und OPG entscheidend beteiligt sind und ihrerseits Remodeling initiieren. Es gibt Hinweise, dass Osteozyten die Hauptquelle der Produktion von RANK-L und somit entscheidend für die Osteoklastogenese sind [30]. Auch in dieser Arbeit wird gezeigt, dass Osteozyten maßgeblich an diesem Prozess beteiligt sind.

2.8.2 Einfluss von Osteoklasten auf Osteoblasten

Der Knochenabbau ist eng mit Knochenaufbau verbunden. Die Organisation in BMUs legt nahe, dass eine Beeinflussung der Osteoblasten durch Osteoklasten im gleichen Maße zu erwarten ist, wie die Regulation der Osteoklasten durch Osteoblasten über M-CSF und RANK-L. Es werden viele mögliche Wege beschrieben, wie Osteoklasten Einfluss auf die Knochenbildung nehmen können (Abb. 8, Seite 17) [134]: Wachstumsfaktoren wie insulin-like growth factor (IGF) I und II, transforming growth factor (TGF) β und bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) liegen in der mineralisierten Knochenmatrix in hohem Maße vor [96]. Im Zuge der Knochenresorption werden sie freigesetzt, durch den sauren pH-Wert aktiviert und regen Osteoblastenvorläuferzellen zur Differenzierung und Knochenbildung an [92]. Auch Osteoklasten selbst produzieren Botenstoffe, die Osteoblastenvorläuferzellen rekrutieren und zur Differenzierung anregen [92]. Prominente Stoffe sind Cardiotraophin-1 [150],

2.8.3 Parathyroid hormone-related protein (PTHrP)

Die Aminosäuresequenz von PTHrP ähnelt der des Parathormons (PTH). Sie weisen strukturelle Voraussetzungen auf, die für die Bindung an den Typ 1 PTH-Rezeptor (PTHR1) notwendig sind. Im Knochen entfaltet PTHrP seine Wirkung meist durch parakrine oder autokrine Signalwege ähnlich einem Zytokin [105]. Im PTHrP Knock-out Maus Modell konnte eine essentielle Rolle von PTHrP während der enchondralen Ossifikation beobachtet werden, die durch ein anormal geformtes Skelett und Knorpeldysplasien imponierte [95].

Auch im reifen Knochen spielt PTHrP eine wichtige Rolle: In der frühen Differenzierungsphase zu Osteoblasten produzieren die frühen mesenchymalen Progenitorzellen PTHrP (Abb. 9, Seite 18). Im weiteren Verlauf der Differenzierung sistiert die PTHrP-Ausschüttung der Präosteoblasten und der PTHR1 wird exprimiert [136]. PTHrP fördert parakrin die Differenzierung von Präosteoblasten in reife, matrixproduzierende Osteoblasten. In Präosteoblasten steigt die Expression von RANK-L, das nach Bindung an den membrangebundenen RANK der Osteoklasten diese aktiviert und das Remodeling einleitet. Außerdem bewirkt PTHrP in reifen Osteoblasten und Osteozyten eine Lebenszeitverlängerung [91, 95].

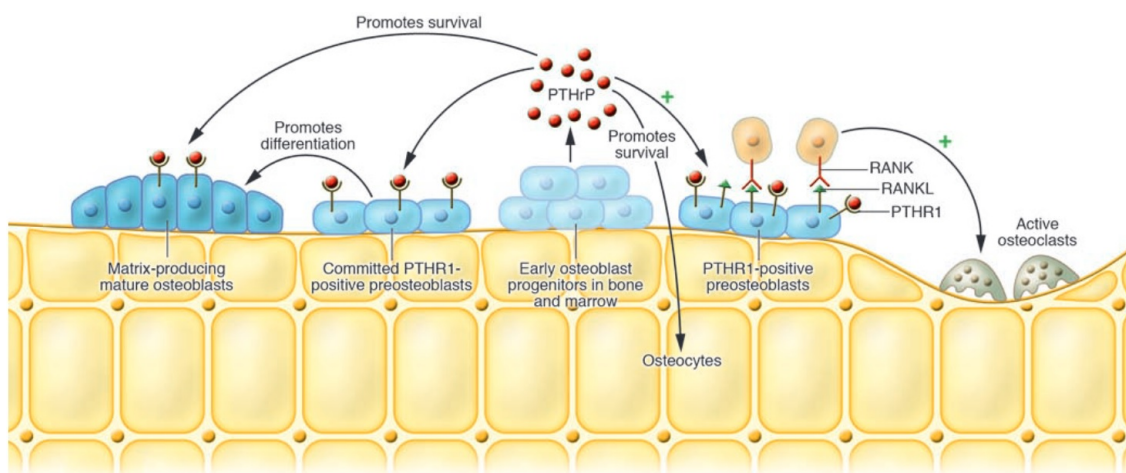


Abb. 9: Parakrine Wirkungen des PTHrP.

In der frühen Phase der Differenzierung zu Osteoblasten exprimieren Progenitorzellen PTHrP, das parakrin über PTHR1 Präosteoblasten zur Differenzierung in reife Osteoblasten anregt, die Expression RANK-L fördert und die Überlebenszeit reifer Osteoblasten und Osteozyten positiv beeinflusst. Quelle: Aus Martin [91].

2.9 Systemische Regulation des Knochenmetabolismus

Neben den beschriebenen lokalen Mechanismen unterliegt der Knochenstoffwechsel auch einer systemischen Regulation durch Hormone und Vitamine. Ziel dieser Regulation ist die Kalziumhomöostase im Blut, um schwerwiegende Komplikationen insbesondere des Herz-Kreislauf-Systems abzuwenden. Kontinuierliche Resorption und Formation beeinflusst die Knochenmasse altersabhängig. In jungen Jahren ist das Gleichgewicht im Sinne des Wachstums stark auf Seite der Knochenformation verlagert. Die Knochenmasse nimmt kontinuierlich zu. Ihren Spitzenwert – peak bone mass – erreicht die Knochenmasse (abhängig von der betrachteten Körperregion) zwischen dem zwanzigsten und dreißigsten Lebensjahr. Nach einer Plateauphase beginnt die Knochenmasse durch Überwiegen der Resorption jedoch physiologisch zu sinken (Abb. 10, Seite 19). Dabei spielen das Geschlecht, alimentäre und hormonelle Einflüsse eine entscheidende modulierende Rolle [114, 151].

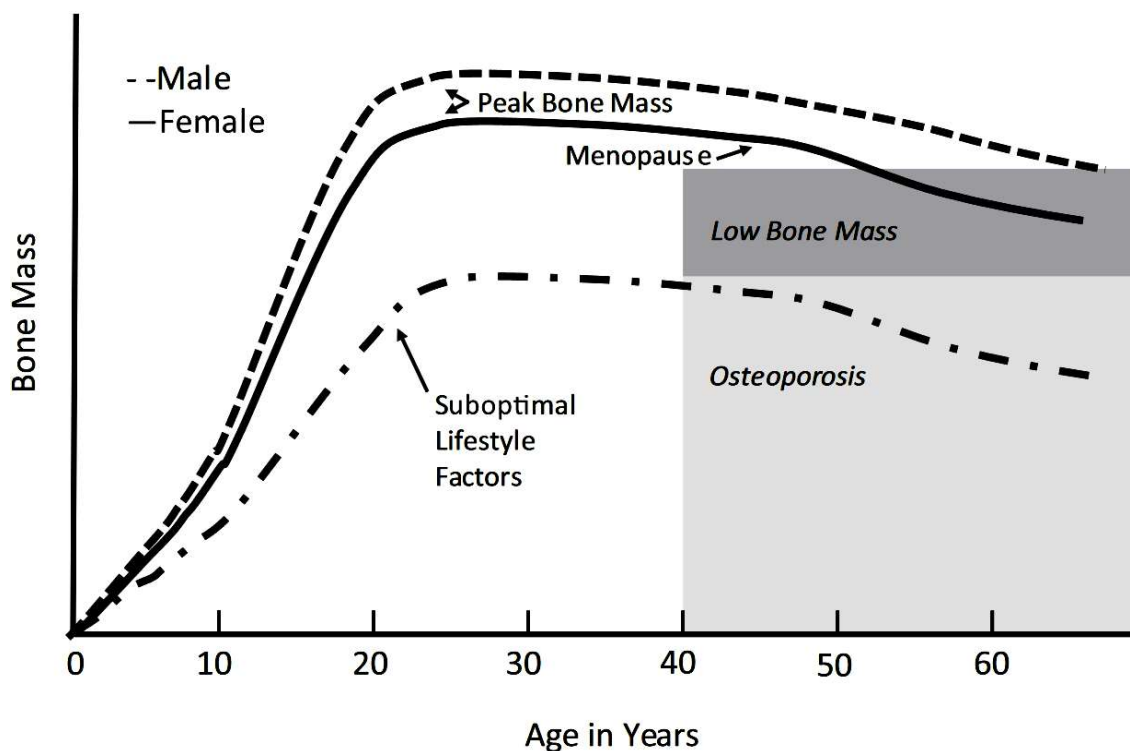


Abb. 10: Verlauf der Knochenmasse über die Lebenszeit im Vergleich der Geschlechter.

Quelle: Aus Weaver et al. [151].

In diesem Kapitel werden die Einflüsse der Schilddrüsenhormone Parathormon und Calzitonin sowie der Sexualhormone, Glukokortikoide und Vitamin-D Versorgung auf die Knochenmasse aufgezeichnet. Abbildung 11 (Seite 22) bietet einen Überblick über die verschiedenen Einflüsse und Wirkmechanismen.

2.10 Schilddrüsenhormone

Die Hormone Calcitonin und Parathormon sind entscheidend an der Regulation der Kalziumhomöostase beteiligt und sorgen mit gegenteiligen Effekten für die Feinabstimmung der Kalziumkonzentration im Serum [125].

2.10.1 Parathormon

Die Zellen der vier Nebenschilddrüsen (NSD) produzieren Parathormon (PTH), das sowohl pulsatil als auch nach Absinken der freien Ca^{2+} -Konzentration in den Extrazellulärraum freigesetzt wird. Ein massiver Phosphatüberschuss fördert ebenfalls die Freisetzung. Steigende Ca^{2+} -Spiegel hingegen reduzieren die PTH-Ausschüttung. PTH vermittelt seine Wirkung sowohl direkt über den PTHR1 als auch indirekt über die Modulation von Vitamin D. Dabei steht eine schnelle Ca^{2+} -Erhöhung im Serum im Fokus. In den Zellen des distalen renalen Tubulussystems fördert PTH die Ca^{2+} -Resorption und inhibiert die Phosphataufnahme. Im Knochen wird die Resorption durch Steigerung der Osteoklastenaktivität gefördert. Langfristige Effekte bewirkt PTH über die Stimulation der Calcitriolbildung – dem aktiven Vitamin D – in der Niere. Die enterale Resorption von Kalzium und Phosphat wird gesteigert und auf diese Weise anabole Effekte auf den Knochenstoffwechsel erzielt [132].

Nur die Knochenzellen der osteoblastären Reihe tragen den PTHR1 auf ihrer Oberfläche und reagieren direkt auf PTH-Stimulation [36]. Der wichtigste Wirkmechanismus von PTH auf die Osteoklasten wird durch das RANK-RANK-L-OPG-System vermittelt. PTH steigert in Osteozyten und Osteoblasten die RANK-L-Expression und reduziert die OPG-Freisetzung. Die Osteoklastogenese wird gefördert und sowohl die Aktivität als auch Lebenszeit der Osteoklasten erhöht. Dauerhaft erhöhte PTH-Spiegel, wie durch Hyperparathyroidismus, verschieben das Gleichgewicht auf Seiten der Resorption und vermindern so die Knochenmasse [86].

Klinisch stellt Teriparatid, ein Derivat des PTH, eine mögliche Therapieoption der Osteoporose dar. In einer großen Studie wurde gezeigt, dass PTH (1-34) bei an Osteoporose erkrankten Frauen die Knochenmasse erhöht und das Frakturrisiko sinkt [134]. Dieser Effekt ist möglicherweise durch die Bindung an PTHR1 auf den Zellen der osteoblastären Reihe erklärbar (ähnlich den parakrinen PTHrP-Effekten) [80]. Die Differenzierung der Präosteoblasten wird gefördert, die Aktivität reifer Osteoblasten erhöht sowie die Lebenszeit von Osteoblasten und Osteozyten verlängert [121,127, 181].

2.10.2 Calcitonin

Parafollikuläre Zellen der Schilddrüse (C-Zellen) und in geringerem Maße auch der NSD sowie des Thymus bilden das Peptidhormon Calcitonin, das bei Erhöhung des Plasmakalziumspiegels freigesetzt wird. Gastrointestinale Hormone wie Gastrin und Glucagon erhöhen ebenfalls die Calcitoninausschüttung [65, 114]. Osteoklasten tragen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren für Calcitonin. Nach Bindung an den Rezeptor werden Osteoklasten suffizient gehemmt und so die weitere Kalziummobilisierung verhindert [155]. Auf die Tubuluszellen der Niere wirken PTH und Calcitonin synergistisch. Spezifische Rezeptoren an Zellen der Henle-Schleife bewirken eine verstärkte Kalziumresorption bei unveränderter Phosphaturie [65]. Der vollständige Wirkmechanismus insbesondere auf die renalen Tubuluszellen ist bisher nicht hinlänglich bekannt. Dennoch kann Calcitonin bei pathologisch gesteigerter Osteoklastenaktivität als potenter Inhibitor verwendet werden [65].

Interessant ist dabei, dass sowohl chronisch erhöhte (z.B. bei C-Zell-Karzinom) als auch chronisch erniedrigte (z.B. nach Thyreoidektomie) Calcitonin-Konzentrationen den Serumkalziumspiegel nicht nennenswert beeinträchtigen. Als Ursache für dieses „Escape“-Phänomen wird eine Rezeptor-Downregulierung diskutiert [114].

2.10.3 Vitamin D

Zusätzlich zu den Hormonen Calcitonin und PTH ist Vitamin D insbesondere in seiner aktiven Form 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ (Calzitriol) ein Hauptregulator der Kalziumhomöostase. In der heutigen Betrachtung wird Calzitriol weniger als Vitamin, sondern vielmehr als Hormon verstanden [17]. Detaillierte Analysen belegen, dass die Hauptquelle des Calzitriols die endogene Produktion des Körpers selbst und nicht – wie bei Vitaminen üblich – die exogene Aufnahme aus der Nahrung ist [16]. An der endogenen Synthese sind viele Organe beteiligt. Grundbaustein der Synthese bildet, wie bei Steroidhormonen üblich, Cholesterin, das im ersten Schritt von der hepatischen Cholesterin-Dehydrogenase zu 7-Dehydro-Cholesterin umgebaut wird. Gebunden an „Vitamin D binding proteins“ (DBP) wird dieses Produkt in die Haut transportiert und der B-Ring des Cholesteringerüsts durch UVB-Strahlung gespalten, sodass die Vorstufe Cholecalciferol (Vitamin D₃) entsteht. Vitamin D₃ ist nur schwach aktiv. Nach weiteren Hydroxylierungen in Leber und Niere an den Positionen 25 und 1 entsteht der aktive Metabolit 1,25 Dihydroxy-Cholecalciferol [17, 84].

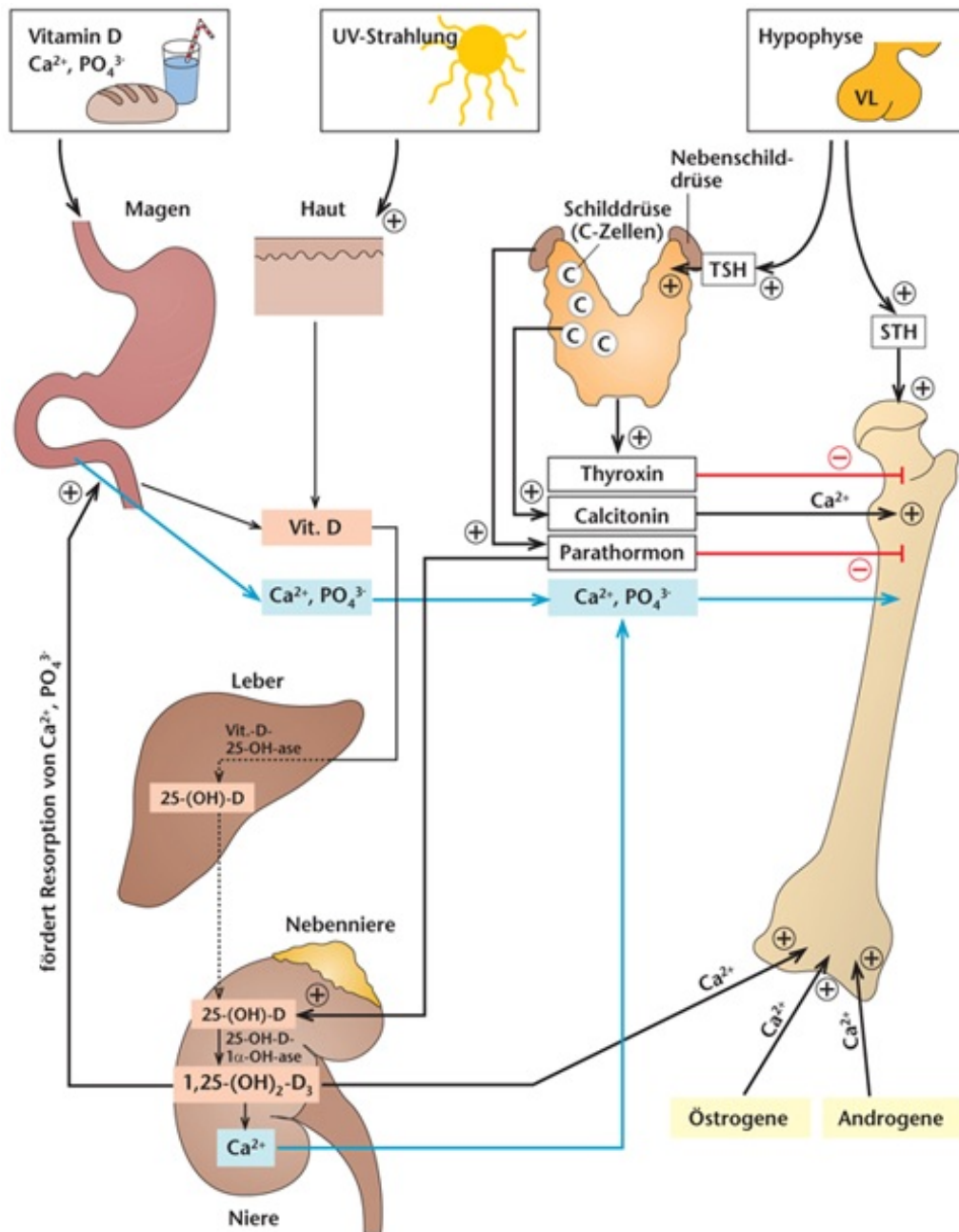


Abb. 11: Regulation des Kalzium- und Phosphathaushaltes durch Calcitonin, PTH, 1,25-Dihydroxy-Vit D₃ (Calzitriol) sowie weiterer Hormone.

Rot gekennzeichnete Linien mit abgeflachtem Ende und Minuskennzeichnung zeigen eine negative Knochenbilanz (Kalziumfreisetzung) an. Schwarze Pfeile mit Pluskennzeichnung stehen für eine positive Kalziumbilanz mit vermehrter Mineralisation. Blaue Pfeile weisen den Weg von rückresorbiertem Kalzium und Phosphat aus dem Gastrointestinal- und Harntrakt in den Blutkreislauf und den Knochen. Quelle: Aus Renz-Polster et al. [114].

Die Synthese des aktiven Calzitriols unterliegt verschiedenen Regulationsmechanismen: PTH aktiviert die 1 α -Hydroxylase der Niere und erhöht so den Serumspiegel des aktiven Vitamin D₃. Hohe Calzitriolspiegel inhibieren die 1 α -Hydroxylase im Sinne

einer negativen Rückkopplung. Ebenso induzieren hohe Calcitriolspiegel die 24-Hydroxylase der Niere, ein zentrales Enzym der Vitamin D₃ Inaktivierung [84, 88]. Im Zielorgan ermöglicht das lipophile Grundgerüst des Calcitriols die Diffusion ins Zellinnere. Die Wirkung wird durch Bindung an intrazelluläre Vitamin-D-Rezeptoren (VDR) im Zytosol vermittelt, die sich nach der Bindung in den Zellkern verlagern. Dort agieren sie als Transkriptionsfaktoren und lagern sich an Promotorregionen der DNA („Vitamin D response element“, VDRE) an. Auf diese Weise steuern sie die Aktivierung und Inaktivierung verschiedener Gensequenzen. Durch vermehrte Synthese und Einbau von Ionenkanälen in die Zellmembran wird die Resorption von Kalzium und Phosphat im Gastrointestinaltrakt gefördert und die Rückresorption aus dem Ultrafiltrat der Niere erhöht [84, 108]. VDR sind bislang in mehr als 40 Zielgeweben nachgewiesen. Neben dem Einfluss auf die Kalziumhomöostase durch Wirkung an Knochen, Darm und Niere sind Effekte bei der Zelldifferenzierung und Immunfunktion beschrieben [148]. Klinisch wurden Effekte auf kardiovaskuläre Krankheiten, Oligospermie und die Prävention von Brustkrebs gezeigt [148].

Im skelettalen System ist die Wirkung vielfältig und abhängig vom Zelltyp, Serumkalzium und Dosis [79]. So kann Calcitriol sowohl die Knochenbildung als auch den Abbau beeinflussen [5]. In Osteoblasten werden Gene induziert, die Proteine der organischen Matrix des Knochens (Kollagen, ALP, Osteopontin, Osteocalcin, etc.) kodieren und so die Knochenbildung fördern. Hohe Dosen Calcitriol bewirken eine verstärkte Expression von RANK-L auf Präosteoblasten, sodass über diesen Weg Osteoklasten und die Knochenresorption gefördert werden [88].

Generell wurde im Mausmodell allerdings ein anaboler Effekt von Calcitriol auf den Knochen gezeigt [160]. Seine vielseitigen Effekte auf den Gastrointestinaltrakt, die Niere und den Knochenstoffwechsel machen Calcitriol zu einem einflussreichen Faktor auf die Kalzium- und Phosphathomöostase im Blut und unterstreicht seine Bedeutung auf die physiologische Mineralisierung der Knochenmatrix.

2.11 Sexualhormone

Wie Abbildung 11 zeigt, nehmen neben Vitamin D und den Schilddrüsenhormonen auch Östrogene und Androgene Einfluss auf den Knochenstoffwechsel. Diese Hormone werden geschlechtsspezifisch fast ausschließlich in den Ovarien der Frau und den Testikeln des Mannes gebildet. Zu einem kleinen Prozentsatz entstammen sie jedoch auch der Nebennierenrinde und dem Fettgewebe. Grundbaustein ist wie bei den

Steroiden das Cholesterin. Aufgrund der starken Lipophilie diffundieren die Hormone ins Zellinnere und finden dort ihren Rezeptor.

2.11.1 Östrogen

Im menschlichen Organismus überwiegen die Östrogene Estron, 17 β -Estradiol und Estriol. Neben diesen körpereigenen Varianten sind pflanzliche, synthetische und xenobiotische Subtypen des Östrogens bekannt [88]. Eine weitere klinisch und therapeutisch wichtige Gruppe stellen die selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) dar, die sowohl aktivierend als auch inhibierend wirken können [45]. Die beiden bekannten Rezeptoren ER α und ER β liegen im Zellkern und gehören zur Familie der Steroidhormonrezeptoren. Diese Rezeptoren besitzen eine Domäne zur Bindung des Liganden und eine Zinkfinger-Domäne zur Bindung an spezifische DNA-Sequenzen (estrogen response element und androgen receptor element) und beeinflussen so die Expression nachgeschalteter Gene [119]. Zusätzlich zu dieser genomischen Wirkung können Östrogene zellinterne phosphorylierende Signalkaskaden, wie die adenylyl cyclase oder die mitogen-activated protein kinase (MAPK) beeinflussen, und so schnelle Effekte hervorrufen [88]. Nicht-genomische Signalwege werden auch für die Modulation des Kalziumhaushaltes sowie der Ausschüttung der oben beschriebenen Hormone und Vitamine diskutiert [106].

Im Knochen haben Östrogene sowohl Effekte auf die osteoblastäre als auch auf die osteoklastäre Zellreihe. Osteozyten wiederfahren eine Lebenszeitverlängerung und die Apoptose-assoziierte RANK-L-Expression ist vermindert, so dass Remodeling seltener stattfindet. In Osteoblasten sinkt die RANK-L-Expression und die OPG-Ausschüttung wird erhöht. Auch die Steigerung der Lebenszeit durch reduzierten oxidativen Stress führt zum Überwiegen der Knochenformation gegenüber der Resorption. Osteoklasten verringern zusätzlich zur sinkenden Expression von RANK-L ihre Sensitivität, sodass die Aktivität der Zellen sinkt und die Apoptose gesteigert wird. Insgesamt haben Östrogene somit anabole Effekte auf den Knochen [62].

2.11.2 Androgene

Testosteron als bekanntester Vertreter der Androgene wird im Zielgewebe durch die 5 α -Reduktase in den aktiveren Metaboliten Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt. Die Androgen-Rezeptoren (AR) sind ebenfalls im Zellkern gelegen und binden nach Hormonkontakt an die DNA. Obwohl AR in allen drei Knochenzellen (Osteozyten,

Osteoblasten und Osteoklasten) nachgewiesen sind, überwiegt ihre Expression in Osteoblasten. Außerdem ist eine höhere AR-Dichte in kortikalem als in spongiösem Knochen beschrieben. Als Transkriptionsfaktor sorgen Androgene über die Produktion nötiger Proteine für eine Steigerung der Osteoblastenaktivität und -differenzierung. Analog zu Östrogenen können Androgene auch über nicht-genomische Wege wirken und schnellere Effekte innerhalb der Zelle erzielen [88].

Zusammenfassend wirken die Sexualhormone Östrogen und Testosteron anabol auf den Knochenstoffwechsel und gewährleisten die nötige Stabilität durch ausreichende Knochenmasse und -dichte.

2.12 Glukokortikoide

Glukokortikosteroide (GC) werden im menschlichen Körper ebenfalls aus dem Grundbaustein Cholesterin von Zellen der Nebennierenrinde gebildet. Cortison und der aktive Metabolit Cortisol haben vielfältigen Einfluss auf den Stoffwechsel des Körpers. Neben der auch therapeutisch genutzten modulatorischen Wirkung auf das Immunsystem, haben GC Einfluss auf Gehirnfunktion, Skelett und die embryonale Entwicklung. Die GC-Ausschüttung wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse reguliert und findet sowohl im zirkadianen Rhythmus mit Höhepunkt in den frühen Morgenstunden als auch angepasst an Stresssituationen statt. In Stresssituationen mobilisieren GC Glucose und stellen die nötige Energie bereit. Wie für Steroidhormone üblich, besitzen GC intrazelluläre Hormonrezeptoren, die als Transkriptionsfaktor Differenzierung, Proliferation und Apoptose beeinflussen [48].

Physiologische GC-Spiegel im Blut sind entscheidend für eine normale Knochenentwicklung. Sie reduzieren die Frakturwahrscheinlichkeit und erhöhen die Knochenmasse insbesondere der Spongiosa [48]. Als Transkriptionsfaktor beeinflussen GC die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen in reife Osteoblasten, und erhöhen so die Anzahl und ihre Aktivität [162]. Entgegen dieser anabolen Effekte auf Wachstum und Knochenmasse im Jugendalter, wurde im Modell alter Ratten eine zunehmende Ausschüttung der GC beobachtet. Es resultierte ein gesteigertes Frakturrisiko sowie eine gestörte Vaskulogenese [154].

Ebenso hat die pharmakologische GC-Langzeittherapie, insbesondere oberhalb der Cushing-Schwelle, einen katabolen Effekt auf den Knochenstoffwechsel. Dabei wird eine frühe Phase mit massiv gesteigerter Knochenresorption durch gesteigerte Osteoklastenzahl und -aktivität von einer späteren Phase mit gestörter

Knochenbildung unterschieden [161]. Auch das RANK-L-OPG-System wird von GC beeinflusst: Pharmakologisch erhöhte GC-Spiegel inhibieren in Osteoblasten die OPG-Ausschüttung und erhöhen die RANK-L-Expression auf der Zelloberfläche. Schon in der frühen Therapiephase wird über diesen Mechanismus die Osteoklastogenese gefördert und ihre Aktivität erhöht. In der späteren Therapiephase überwiegt der negative Effekt auf die knochenbildenden Osteoblasten [161].

Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass neben der gestörten Osteoblastogenese auch die Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten eingeleitet wird und auf diese Weise die Integrität des Knochens negativ beeinflusst wird [153].

2.13 Frakturheilung

Der Knochen ist eines der wenigen Organe, die zeitlebens die Fähigkeit zur vollständigen Regeneration besitzen. Besonders erstaunlich ist dabei, dass Knochen im Gegensatz zu anderen Gewebearten ohne kollagene Narbe heilt und durch die Regeneration nahezu alle Eigenschaften vor der Fraktur zurückerlangt. Diese erstaunliche Fähigkeit wird durch lokale und zeitlich koordinierte Abläufe verschiedener Zelltypen, Wachstumsfaktoren und Proteine ermöglicht und erinnert dabei an die skelettale Entwicklung und das Wachstum [42].

Abhängig von der Größe des Bruchspaltes unterscheidet man zwei Arten der Frakturheilung, die im Folgenden betrachtet werden.

2.13.1 Direkte Frakturheilung

Die direkte oder auch primäre Frakturheilung findet statt, wenn Knochen bricht, ohne das Periost zu zerstören (z.B. Grünholzfraktur) oder die Frakturrenden in unmittelbarem Kontakt stehen [11]. Dabei ist es unerheblich, ob diese Frakturstellung bestand, oder der direkte Kontakt der Frakturrenden Ergebnis einer chirurgischen Versorgung mit interner Fixierung ist. Im Falle einer solchen Kontaktheilung (Frakturspalt $<0,01\text{mm}$), wird die Fraktur einzig über Remodeling versorgt [89]. Osteone nahe den Frakturrenden bilden Erosionstunnel und wachsen bolzenartig in das gegenüberliegende Frakturende ein (Abb. 12 A, Seite 27). Die Frakturrenden werden demnach sofort mit Osteonen aus Lamellenknochen überbrückt, die einsprossenden Haversgefäßen folgen. Täglich können so Distanzen von $50\text{-}100\mu\text{m}$ in axialer Richtung überbrückt werden [89]. Im gesunden menschlichen Organismus ist bei dieser Art der Heilung die Funktionsfähigkeit nach etwa drei Wochen wieder gegeben [11]

Neben der Kontaktheilung wird auch die Spaltheilung mit einem Frakturspalt $< 0,8\text{-}1\text{mm}$ zu der primären Frakturheilung gezählt [89]. Im Gegensatz zur Kontaktheilung finden dabei die knöcherne Überbrückung und das Remodeling nacheinander statt. Voraussetzung ist allerdings, dass die anatomisch korrekte Position besteht oder wiederhergestellt wird und Stabilität gegeben ist. In den Frakturspalt wandern Osteoblasten ein und bilden Lamellenknochen orthogonal zur Längsachse des Knochens (Abb. 2.12 B, Seite 27). Dieser Lamellenknochen ist mechanisch nicht belastbar und muss zwingend in einem weiteren Schritt durch Remodeling in mechanisch stabilen parallel zur Längsachse des Knochens orientierten Lamellenknochen umgewandelt werden. Erst nach einigen Wochen und weiterem Remodeling ist die nötige vollständige anatomische und biochemische Integrität wiederhergestellt [89].

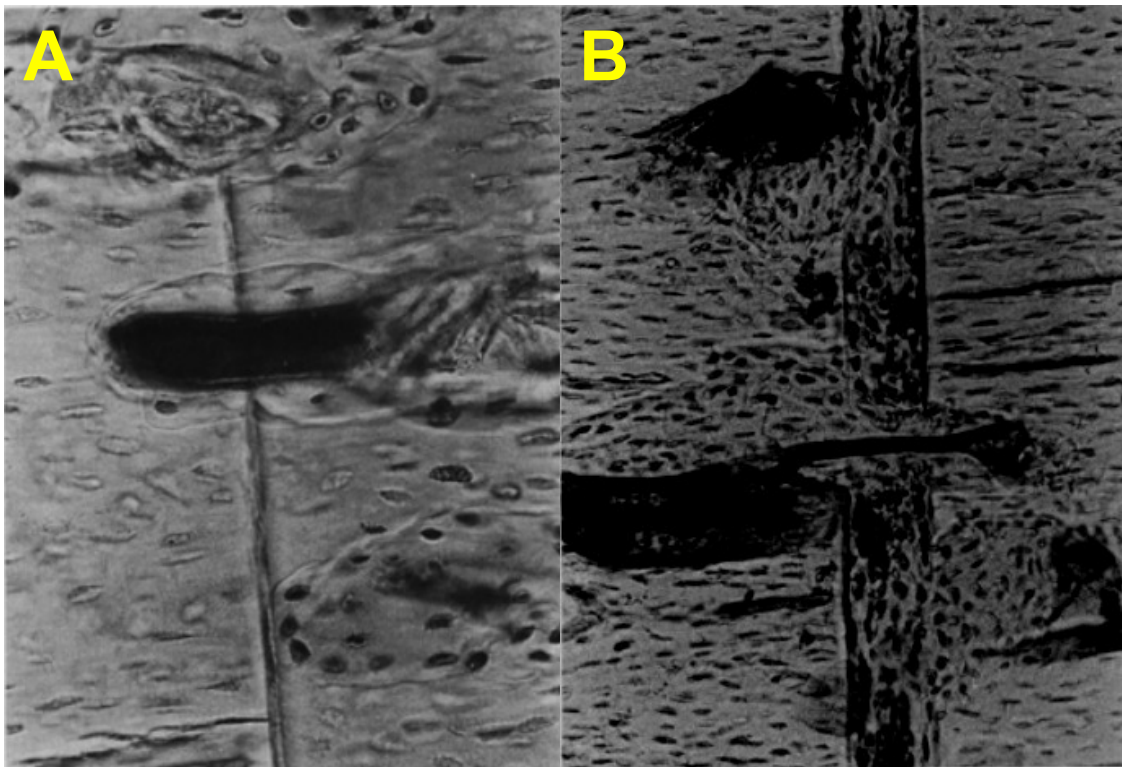


Abb. 12: Direkte Frakturheilung (A) Kontaktheilung, (B) Spaltheilung.

Bei direktem Kontakt der Frakturrenden (A), wird der Frakturspalt sofort durch Remodeling überbrückt. Bei Bruchspalten bis 1mm (B) werden diese zunächst mit orthogonal orientierten Knochenlamellen aufgefüllt und später durch parallel verlaufenden Osteone ersetzt (Remodeling). Quelle: Aus Rahn, B.A. et al. [111].

2.13.2 Indirekte Frakturheilung

Der weitaus häufigere Typ der Frakturheilung ist die indirekte Frakturheilung, die sowohl Anteile der enchondralen als auch der intramembranösen Knochenheilung aufweist [39]. Indirekte Frakturheilung findet immer dann statt, wenn die Voraussetzungen für die direkte Frakturheilung nicht gegeben sind (Stabilität des Bruchs und direkte anatomische Nähe). Im Regelfall trifft dies auf sämtliche konservativ versorgte Frakturen zu. Mikrobewegungen und mechanische Belastung verbessern die Frakturheilung. Zu starke Bewegung und Belastung führen jedoch zu einer verzögerten Heilung und Pseudarthrosenbildung [44].

Anhand histologischer Beobachtungen lässt sich die indirekte Frakturheilung in vier teils überlappende Phasen gliedern (Abb. 13, Seite 28) [124].

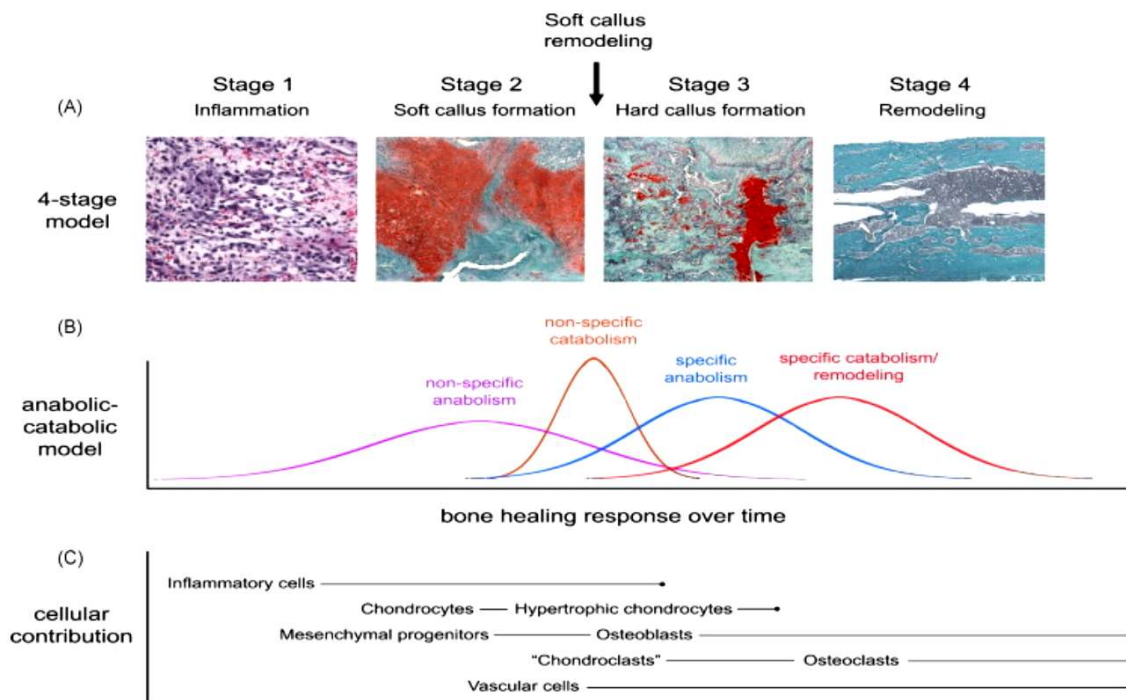


Abb. 13: Modell der indirekten Frakturheilung aufgeteilt nach histologisch definierten Phasen (A), dem Metabolismus (B) und den zellulären Einflüssen (C).

(A) Im initialen Schritt der Inflammation bildet sich das Frakturhämatom aus und Zellen des Gefäßsystems, des Knochenmarks und des umliegenden Gewebes wandern ein. Anschließend wird zur vorübergehenden Überbrückung des Frakturspalts ein Kallus aus Weichgewebe (Kollagen und Knorpel) gebildet, der im Folgenden in einen knöchernen Kallus umgebaut wird. Das finale Remodeling wandelt den Geflechtknochen in den ursprünglichen Lamellenknochen um. Damit erlangt der Knochen seine Stabilität zurück [124]. (B) Aufteilung der Vorgänge anhand der metabolischen Bilanz [82]. (C) Darstellung der beteiligten Zelltypen im Verlauf der Knochenheilung. Quelle: Aus Schindeler et al. [124].

Phase 1: Inflammation

In der Regel gehen Knochenbrüche mit einer Verletzung des umgebenden Weichgewebes, des Gefäßnetzwerks und des Knochenmarks einher. Es entsteht ein Frakturhämatom, das sowohl aus intramedullärem als auch aus peripherem Blut sowie Knochenmarkszellen besteht [89]. Thrombozyten, Makrophagen und Immunzellen (Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) infiltrieren das Frakturhämatom und bilden einen fibrösen Thrombus, stellen die Immunabwehr sicher und schütten Zytokine sowie Wachstumsfaktoren aus [40]. Im weiteren Verlauf sprossen Kapillaren in das Frakturhämatom ein, Makrophagen phagozytieren abgestorbene Zellen und zerstörtes Gewebe [124]. Die zellulären Abläufe werden durch Zytokine wie TGF- β , platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor-2 (FGF-2), vascular endothelial growth factor (VEGF) sowie IL -1 und -6 reguliert [40]. Diese Faktoren bewirken eine weitere Rekrutierung von Immunzellen sowie die Migration von multipotenten Stammzellen aus dem Periost, dem Knochenmark, dem Blutkreislauf und dem umgebenden Weichgewebe [120] in den Frakturspalt. Auch die Expression von RANK-L und OPG sind in dieser Phase erhöht [3].

Phase 2: Weichgewebekallus

Für die enchondrale Knochenheilung und den knöchernen Umbau des Frakturkallus (Phase 3) wird eine knorpelige Matrix benötigt. In Phase 2 dominieren demnach Fibroblasten und Chondroblasten, die einen ersten Weichgewebekallus aufbauen. Dieser Kallus gewährleistet in geringem Maße Stabilität und ermöglicht den folgenden Umbau in einen Knochenkallus.

Knorpelgewebe ist gefäßfrei. Erst beim Umbau in Geflechtknochen sprossen versorgende Gefäße ein [124]. Chondroblasten differenzieren sich in Anwesenheit von TGF- β , PDGF, IGF und FGF-2 aus den eingewanderten mesenchymalen Stammzellen und ersetzen kollagenes Gewebe durch Knorpel [40]. Verläuft dieser Vorgang fehlerhaft, bleiben kollagene Reste bestehen. Zum Ende der Synthese des Weichgewebekallus hypertrophieren die Knorpelzellen, produzieren Kollagen Typ X (Col X) und mineralisieren die umliegende Matrix bevor sie in Apoptose gehen [3, 124]. Die VEGF-Expression osteogenetischer Zellen ist in den frühen Phasen nur gering ausgeprägt. Angiopoetin I und II sorgen jedoch für das Einwachsen größerer Gefäße in die unmittelbare Umgebung und regen die Bildung von Kollateralgefäßen an [3].

Phase 3: Knochenkallus

In dieser Phase ist Knochenbildung am stärksten ausgeprägt. Sie ist gekennzeichnet durch eine hohe Aktivität der Osteoblasten und damit der schnellen Formation mineralisierter Knochenmatrix. Dazu wird der Weichgewebekallus teilweise resorbiert oder durch enchondrale Ossifikation in Knochengewebe umgewandelt. Begleitend sprossen VEGF-vermittelt Gefäße ein und versorgen den neuen, schlecht organisierten Geflechtknochen. Initial besteht der Geflechtknochen aus einer Kombination von mineralisierter Extrazellulärmatrix und proteinreichem kollagenem Gewebe, der im Verlauf immer stärker mineralisiert wird [124]. Zellulär dominieren reife Osteoblasten, die sich aus den rekrutierten mesenchymalen Vorläuferzellen im Beisein von osteogenetischen Faktoren differenzieren. Besonders bedeutend sind dabei die Mitglieder der BMP-Familie [98].

Da die Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzellen zu reifen Osteoblasten eine ausreichende Sauerstoffversorgung erfordert, hat sich die Gefäßversorgung als ein möglicher limitierender Faktor erwiesen. Förderung der Gefäßneubildung wirkte sich im Versuch stimulierend auf die Knochenbildung aus [137].

Phase 4: Remodeling

Der entstandene Knochenkallus bietet dem Skelett vorübergehend die notwendige biomechanische Stabilität, reicht jedoch kaum an die statischen Eigenschaften von gut organisiertem physiologischem Lamellenknochen heran. Im abschließenden Schritt der Knochenheilung wird folglich der neu gebildete Geflechtknochen in den ursprünglichen, gut organisierten Lamellenknochen sowohl in Kortikalis als auch im Trabekelwerk konvertiert. Das komplexe Zusammenspiel der Knochenzellen sowie ihre einzigartige Organisation in BMUs sind im Detail in Kapitel 2.7 (Seite 12) beschrieben.

Ähnlich dem Knochenremodeling, kann auch die Frakturheilung in anabole und katabole Phasen unterteilt werden (Abb. 13 B, Seite 28) [82]. Durch diese Art der Betrachtung können überlappende Vorgänge des Phasenmodells von einem anderen Standpunkt betrachtet werden. Die Einteilung der metabolischen Vorgänge in anabol und katabol sowie die Einschätzung in knochenspezifische und –unspezifische Abläufe ist Kernkriterium. Die beiden Modelle sind dabei synergistisch zu betrachten und helfen, den komplexen Vorgang der Knochenheilung besser zu verstehen [82, 124].

2.14 Osteoporose und assoziierte Frakturen

2.14.1 Definition und Diagnostik

Als systemische Knochenkrankung betrifft die Osteoporose das gesamte Skelett. Charakteristisch sind dabei die verringerte Knochendichte und –masse sowie eine gestörte Mikroarchitektur insbesondere des Trabekelwerks [151]. Resultat dieser verminderten Knochenqualität ist ein erhöhtes Frakturrisiko schon bei geringem, mechanisch oft inadäquatem Trauma [88]. Klinisch imponiert bei Osteoporose-assoziierten Frakturen eine 12-Monats-Mortalität von nahezu 20%, die aus der nötigen Hospitalisierung und damit verbundenen Komplikationen, wie Pneumonie und Thrombembolie durch Immobilisierung resultieren [109].

Die Definition der WHO stützt sich auf die Messung der Knochendichte („bone mineral density“, BMD) mittels der Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DXA) verschiedener Körperregionen. In diesem Verfahren wird Röntgenstrahlung dazu verwendet, den Knochenmineralgehalt pro Volumeneinheit zu bestimmen. Klinisch ist vor allem die Angabe des T-Scores etabliert, der die Differenz der Knochendichte zum erwarteten Mittelwert junger ausgewachsener Frauen angibt [52]. Osteoporose liegt bei T-Scores unterhalb von 2,5 Standardabweichungen (SD) des Mittelwertes vor, zwischen -1 bis -2,5 SD liegt eine Osteopenie, also eine Verminderung der Knochensubstanz vor (Abb. 14, Seite 31) [52].

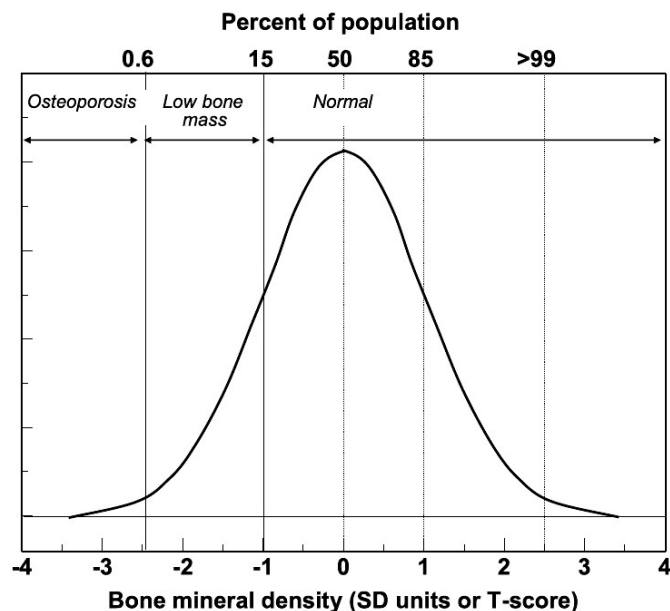


Abb. 14: Angabe der Knochendichte als T-Score.

Referenz des T-Scores bildet die normalverteilte mittlere Knochendichte junger Frauen. Liegt die Knochendichte zwischen -1 und -2,5 SD liegt eine Osteopenie vor, unterhalb von -2,5 SD liegt definitionsgemäß eine Osteoporose vor. Quelle: Aus Hernlund et al. [52].

Vorteil der DXA-Messung ist die flächendeckende Verfügbarkeit. Jedoch liegen ihre Limitationen in der nur lokalen Bestimmung der BMD meist in der Lendenwirbelsäule oder dem Oberschenkelknochen sowie der fehlenden Differenzierung der Knochengometrie [88]. Die Notwendigkeit der Osteoporose-spezifischen Behandlung zur Prävention assoziierter Frakturen wird daher im „FRAX“-Modell um wichtige Einflussfaktoren wie beispielsweise vorherige Frakturen, positive Familienanamnese und das Alter erweitert. Die Risiken für osteoporotische Frakturen unterscheiden sich bei dieser Betrachtung auch bei Frauen mit ähnlichen körperlichen Voraussetzungen (BMI, Rauchgewohnheiten, Vorerkrankungen, laufende Therapien, etc.) deutlich und ermöglichen so eine individuelle Evaluation des persönlichen Risikos und Beurteilung der Therapienotwenigkeit [77]. Dennoch ist die DXA-Messung klinisch auch weiterhin erste Grundlage zur Einschätzung des Risikos, der Diagnose und Therapieüberwachung. Osteoporose als multifaktorielle Erkrankung kann allerdings nicht allein durch eine verringerte Knochendichte erklärt werden (Abb. 15, Seite 32). Insbesondere das gestörte Verhältnis von Knochenresorption zu –formation während des Remodelings nimmt entscheidenden Einfluss auf die Knochenmasse, die Morphologie und Mikroarchitektur des Knochens sowie die Materialeigenschaften (Kollagengehalt, Mineralisierung, Dichte und Mikroschäden der Knochensubstanz). An diesem Prozess sind die spezifischen Knochenzellen und ihre Regulierung maßgeblich beteiligt [88, 109].

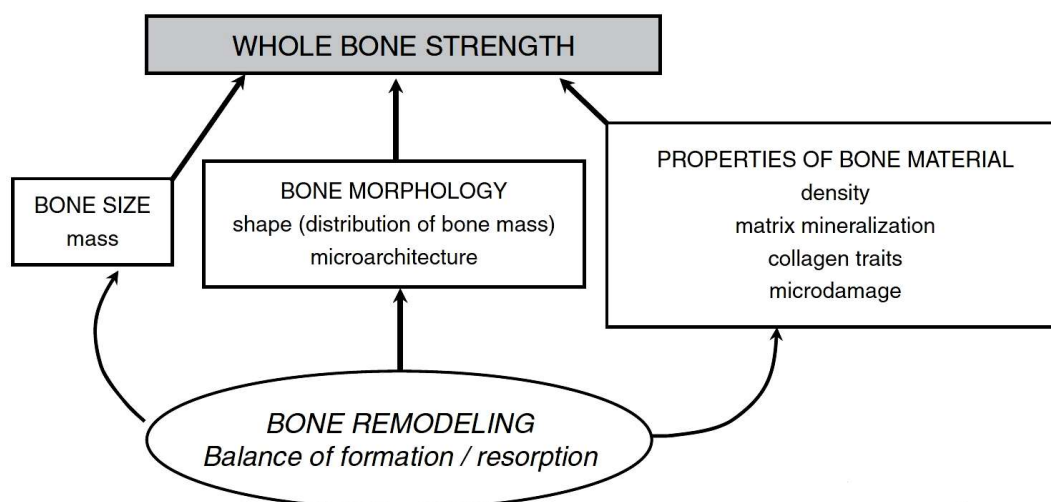


Abb. 15: Einflussfaktoren auf die Stabilität des Knochens.

Die Stabilität des Knochens wird durch Größe, Morphologie, Mikroarchitektur sowie Zusammensetzung der Knochensubstanz gewährleistet. All diese Faktoren werden wiederum von Knochenumbauvorgängen und dem Verhältnis aus Resorption und Formation von Knochen beeinflusst. Quelle: Aus Marcus et al. [88].

Ätiologisch werden primäre Formen der Osteoporose (unabhängig von Grunderkrankungen) von sekundären Formen (im Kontext anderer Erkrankungen und Therapien) unterschieden. Dabei ist die primäre Osteoporose mit etwa 95% weitaus häufiger. Unabhängig von der jeweiligen Form sind beeinflussbare und nicht beeinflussbare Risikofaktoren bekannt, die eine verminderte Knochenmasse bedingen. Dazu gehören genetische Faktoren (weiße oder asiatische Rasse, positive Familienanamnese, magerer Habitus), Lebensstil (Bewegungsarmut, Rauchen, Alkoholkonsum, kalziumarme Ernährung, Leistungssport mit Amenorrhö) und weitere Faktoren wie Nulliparität, späte Menarche, frühe Menopause und Milchunverträglichkeit [53, 114].

2.14.2 Primäre Osteoporose

Auch die primäre Osteoporose kann in zwei Typen unterteilt werden, die sich in ihrer Ätiologie und dem Verlauf unterscheiden, klinisch und radiologisch allerdings nicht sicher zu differenzieren sind:

Die postmenopausale Typ I Osteoporose tritt etwa 10-15 Jahre nach der Menopause auf und ist in den ersten Jahren durch einen jährlichen Knochenmasseverlust von bis zu 6% („high turnover“) gekennzeichnet [116]. Im weiteren Verlauf ist der jährliche Verlust geringer, aber dennoch kontinuierlich („low turnover“). Auch Männer können eine Typ I Osteoporose entwickeln, das Geschlechterverhältnis Frauen zu Männer beträgt dabei 8:1. Ursächlich ist der Verlust der knochenanabol wirkenden Sexualhormone (insbesondere Östrogene). Histologisch imponiert der Verlust trabekulärer Knochensubstanz, sodass klinisch Wirbelkörperdeformierungen und –frakturen sowie distale Radiusfrakturen resultieren [14]. In Kapitel 2.11.1 (Seite 24) sind die Effekte von Östrogenen detailliert beschrieben. Zusammengefasst wirken sie jedoch knochenanabol durch Inhibierung des Remodelings und Formierung der BMUs. Sie verhindern die Differenzierung der Osteoklasten und fördern die Rekrutierung von Osteoblasten [61]. Nach der Menopause und dem damit verbundenen Östrogenmangel fehlt dieser schützende Effekt auf den Knochenstoffwechsel und die Resorption der Knochensubstanz überwiegt die Formation. Östrogene weisen außerdem durch die verschiedene Verteilung der Rezeptoren unterschiedliche Effekte auf kortikalen und spongiösen Knochen auf. Im Trabekelwerk ist die Expression von ER β viel größer als im kortikalen Knochen. Seine inhibierenden Effekte auf den protektiven ER α erfordern deutlich höhere Östrogenspiegel, um in der Spongiosa ähnliche Effekte wie in der

Kortikalis zu erzielen. Aus diesem Grund reagiert die Knochensubstanz der Spongiosa stärker auf den postmenopausalen Östrogenmangel als die Kortikalis und der Knochensubstanzverlust ist größer [61].

Steigende Knochenresorption führt zu steigenden Blutkalziumspiegeln. Rezeptoren der Nebenschilddrüse nehmen das Kalziumüberangebot wahr und eine verminderte Ausschüttung von PTH resultiert. Daraufhin sinkt die Kalziumrückresorption sowie Calcitriolsynthese der Niere und die intestinale Kalziumaufnahme wird vermindert. Fallende PTH-Spiegel führen folglich ihrerseits zu einem Kalziumverlust und potenzieren auf diese Weise den negativen Effekt auf die Knochenmasse [130].

Der senile Typ II der Osteoporose tritt meist nach dem 70. Lebensjahr auf und betrifft Frauen und Männer im Verhältnis 2:1. Ihre Ursache ist multifaktoriell. Ein Hauptfaktor ist jedoch der diätetisch-nutritive Kalziummangel [28]. Mit steigendem Lebensalter sinkt oftmals der Appetit und die Aufnahme kalziumreicher Nahrungsmittel sinkt. Die zunehmende Altersarmut führt in vielen Fällen zum Konsum minderwertiger Lebensmittel, die den Kalziummangel zusätzlich unterstützen. Ein weiterer entscheidender Faktor ist Vitamin-D Mangel, der entweder auf eine fehlende nutritive Versorgung oder auf eine Synthesestörung durch zunehmende Niereninsuffizienz oder fehlende Sonnenlichtexposition zurückzuführen ist. Die schwindende Nierenfunktion sowie die verminderte intestinale Kalziumresorption können Ursache eines sekundären Hyperparathyroidismus sein, der seinerseits den Knochenumbau negativ beeinflusst. Die zunehmende körperliche Inaktivität im Alter veranlasst das osteozytäre Netzwerk zur vermehrten RANK-L-Expression und damit zur verstärkten Knochenresorption [14]. Auch bei der primären Typ II Osteoporose spielt der Verlust an Östrogen eine Rolle. Physiologisch schützen Östrogene Gewebe vor der reaktiven Sauerstoffspezies und damit vor Alterungsprozessen und Gewebeverfall. Sinkende Östrogenspiegel haben somit auch über diesen Mechanismus Einfluss auf den Knochenmetabolismus [23]. Der Knochenmasseverlust der senilen Typ II Osteoporose betrifft dabei sowohl Kortikalis als auch Spongiosa, sodass klinisch insbesondere proximale Humerusfrakturen und Schenkelhalsfrakturen typischerweise gehäuft auftreten [14, 114].

2.14.3 Sekundäre Osteoporose

Die sekundäre Osteoporose entsteht im Kontext anderer Erkrankungen und Therapien. Prinzipiell ist ihr Auftreten somit in jedem Lebensalter und bei beiden Geschlechtern gleichermaßen möglich. Insgesamt machen sekundäre Osteoporoseformen jedoch nur

rund 5% der Fälle aus [53]. Ihre Ursachen sind dabei verschieden und betreffen Krankheiten mit Hormonstörungen wie Hypogonadismus, Hyperkortisolismus, Hyperthyreose, Hyperparathyroidismus, Hyperprolaktinämie und Wachstumshormon-Mangel. Auch Erkrankungen mit resultierender Malabsorption (auch durch iatrogene Magen-Darm-Resektion) kommen als Auslöser in Frage. Systemische Entzündungen wie die rheumatoide Arthritis oder neoplastische Erkrankungen wie das multiple Myelom können ebenfalls eine sekundäre Osteoporose begünstigen. Die weitaus häufigste Ursache stellt jedoch die medikamentöse GC-Dauertherapie dar [22]. Weitere auslösende Medikamente sind Ciclosporin, Antikonvulsiva, Schilddrüsenhormone in suppressiver Dosis und Heparin [53, 114]. Die erste klinische Manifestation einer sekundären Osteoporose ist oftmals eine Fragilitätsfraktur. Das Risiko eine solche Fraktur unter GC-Dauertherapie zu entwickeln beträgt 30-50% [88]. Die Entwicklung einer GC-induzierten Osteoporose verläuft biphasisch: innerhalb der ersten Jahre beträgt der Knochensubstanzverlust 6-12%, in den weiteren Jahre etwa 3% [83]. Interessanterweise liegt das Frakturrisiko in den ersten drei Monaten nach Therapiebeginn bei nahezu 75%, obwohl in dieser Phase in der DXA-Messung noch keine Auffälligkeiten beobachtet werden können [144]. Die GC-Osteoporose ist dabei besonders in trabekulären Knochen ausgeprägt. Klinisch dominieren daher Frakturen der Wirbelkörper und des Schenkelhalses. Die Pathogenese ist dabei vielfältig. Histomorphometrische Studien zeigen weniger Osteoblasten und vermehrt apoptotische Osteozyten unter GC-Therapie verglichen mit einer unbehandelten Kontrolle [153]. Die vermehrte Apoptose der Osteozyten ist mit einer verringerten Expression von VEGF und einer verringerten skelettalen Angiogenese assoziiert. Diese Effekte sind eine mögliche Erklärung der massiv erhöhten Frakturwahrscheinlichkeit in den ersten Therapiemonaten [154]. GCs verringern außerdem die Differenzierung der Osteoklasten aus ihren Vorläuferzellen (Abb. 16, Seite 36). Allerdings wird die Lebenszeit der bereits differenzierten Osteoklasten verlängert und im Gegenzug die Lebenszeit der Osteoblasten verkürzt. Aus diesem Grund entsteht mit steigender Therapiedauer ein Ungleichgewicht mit nahezu normaler Osteoklastenanzahl und verringerter Osteoblastenanzahl [56]. Histologisch unterscheidet sich daher die sekundäre GC-Osteoporose deutlich von der postmenopausalen primären Osteoporose, die mehrheitlich durch ein Ungleichgewicht aus Resorption und Formation während des Remodelings bestimmt ist.

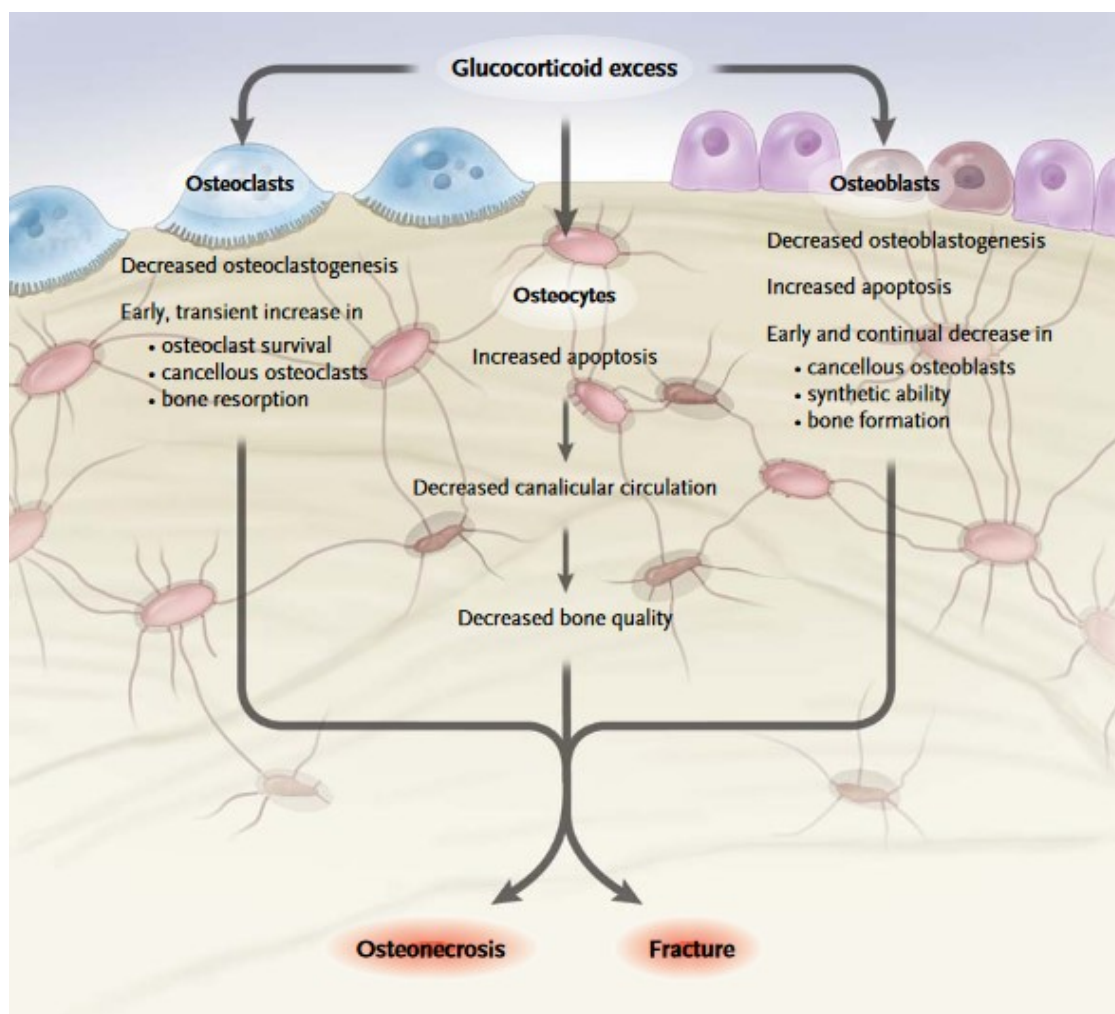


Abb. 16: Effekte der Glukokortikoide auf die Knochenzellen.

Glukokortikoide haben insbesondere langfristig und in höheren Konzentrationen ausgeprägte Effekte auf sämtliche Knochenzellen: Sie verringern die Differenzierung der Osteoblasten und leiten Apoptose ein. Ebenfalls vermindern sie die Knochenqualität durch Apoptose der Osteozyten. Auch Osteoklasten werden in ihrer Differenzierung negativ beeinflusst. Jedoch steigt vor allem in der Frühphase ihre Lebensdauer und damit verbunden die Knochenresorption. Quelle: Aus Weinstein [152].

GCs aktivieren das lokale Renin-Angiotensin-System (RAS). Dabei sind Osteoblasten und Osteoklasten sowohl in die Synthese der Stoffe eingebunden als auch gleichzeitig die Zielzellen. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II die Differenzierung der Osteoblasten inhibiert und auf diese Weise die Knochenformation beschränkt [47]. Außerdem wird die Osteoklastogenese durch die vermehrte Expression von RANK-L in Osteoblasten gefördert [129]. *In vivo* Studien zeigten, dass die negativen Effekte des RAS auf die Knochenmasse sowohl durch Sartane als auch durch ACE-Hemmer kompensiert werden können [27]. In klinischen Studien zeigten mit ACE-Hemmer behandelte Patienten höhere Knochendichten und geringere Frakturrisiken [85].

2.14.4 Therapie der Osteoporose

Wie Abbildung 10 auf Seite 19 zeigt, erreicht das menschliche Skelett seine größte Knochenmasse zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr, bevor sie in den folgenden Jahren stetig sinkt. Diese lange Genese legt nahe, dass eine effektive Therapie besonders in der frühzeitigen Vorbeugung und dem Vermeiden von Risikofaktoren liegt. Dabei wirkt sich der Verzicht auf Rauchen und Alkohol sowie das Vermeiden von Untergewicht präventiv aus. Weiterhin ist die ausreichende Versorgung mit Kalzium entscheidend. Ebenso entscheidend für die Gesundheit des Skeletts und die Stärkung der Muskelkraft ist ausreichende Bewegung sowohl in frühen Jahren als auch im Alter. Insbesondere bei älteren mehrheitlich häuslich lebenden Menschen (fehlende Sonnenlichtexposition) ist eine adäquate Versorgung mit Vitamin D für ein gesundes Skelett notwendig. Weiterhin sollten Medikamente vermieden werden, die das Sturzrisiko erhöhen (Antidepressiva, Neuroleptika, Benzodiazepine, Sedativa), sowie die Versorgung mit Hilfsmitteln wie Rollatoren, Gehstützen und Hüftprotektoren flächendeckend gewährleistet werden [53, 114]. Insgesamt wird die Indikation einer medikamentösen Osteoporosetherapie zurückhaltend gestellt. Wichtige Indikationen sind jedoch 10-Jahres-Risiken von $> 30\%$ für Wirbelkörperfrakturen, supportiv bei GC-Langzeittherapie und nach Wirbelkörperfraktur bei einem T-Wert ≤ 2 [53]. Mittel der ersten Wahl sind dabei die Bisphosphonate (Abb. 17, Seite 38). Als Pyrophosphat-(PPi)-Abkömmlinge verbinden sie sich während der Mineralisierung mit dem Hydroxylapatit und werden bei Resorptionsvorgängen freigesetzt. Über den Faltensaum gelangen Bisphosphonate in Osteoklasten und vermindern ihre Aktivität, verhindern ihre Differenzierung und induzieren die Apoptose [121]. Zum Ausgleich des postmenopausalen Östrogenmangels wurde die Wirkstoffklasse der selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERM) mit dem prominenten Vertreter Raloxifen entwickelt. Am Knochen haben sie östrogenartige Effekte und sind insbesondere bei vertebraler Osteoporose als Mittel der zweiten Wahl indiziert. Im Gegensatz zu Tamoxifen erhöht Raloxifen das Risiko eines Endometriumkarzinoms nicht. Alternativ zu Bisphosphonaten kann eine Therapie mit dem natürlichen Strontiumranelat erwogen werden. Es wird in den Knochen eingebaut, verhindert die Resorption und fördert die Formation neuer Knochensubstanz [114]. Eine weitere Therapiemöglichkeit stellen rekombinante Parathormon-Peptide dar. Parathormon und die PTHrP können dabei sowohl den Knochenabbau als auch den – aufbau stimulieren (Kapitel 2.10.1, Seite 20). Insbesondere bei schweren komplizierten Formen der Osteoporose oder nach osteoporotischer Fraktur kann Teriparatid subkutan

für maximal 18 Monate eingesetzt werden. Kurzzeitige Erhöhung des Parathormon-Spiegels im Blut stimuliert die Formation des Knochens. Langfristig werden jedoch gegenteilige Effekte erzielt [53, 114].

	Dose	Interval	Route	Efficacy against		Side-effects
				Hip fractures	Vertebral fractures	
Bisphosphonates						
Alendronate	70 mg	Weekly	Oral	Black ¹³	Cummings ¹⁴	Osteonecrosis of the jaw, subtrochanteric femur fractures
Risedronate	35 mg or 150 mg	Weekly or monthly	Oral	McClung ¹⁵	Harris ¹⁶	Oesophageal irritation
Ibandronate	150 mg	Monthly	Oral	No data	Chesnut ¹⁷	Oesophageal irritation
Ibandronate	3 mg	Every 3 months	IV	No data available	No data available	Acute-phase reaction
Zoledronic acid	5 mg	Yearly	IV	Black ¹⁸	Black ¹⁸	Acute-phase reaction, hypocalcaemia, potential renal toxic effects
Raloxifene	60 mg	Daily	Oral	No effect	Delmas ¹⁹	Thromboembolic disease
Strontium ranelate*	2 g	Daily	Oral	Reginster ²⁰	Meunier ²¹	Thromboembolic disease; drug rash with eosinophilia systemic syndrome, abdominal discomfort
Teriparatide	20 µg	Daily	SC	No effect	Neer ²²	Hypercalcaemia, nausea, diarrhoea
PTH (1-84)‡	100 µg	Daily	SC	No effect	Greenspan ²³	Hypercalcaemia, nausea, diarrhoea

Drugs that reduce the risk of vertebral (and hip) fractures when used with adequate calcium and vitamin-D supplementation. IV=intravenous. SC=subcutaneous. APR=acute-phase reaction.*Approved in more than 70 countries, but not USA. ‡Approved in Europe but not USA.

Abb. 17: Medikamentöse Therapiemöglichkeiten der Osteoporose.

Übersicht möglicher Therapiestrategien mit Angabe von Evidenzen gegenüber Frakturen und Nebenwirkungen. Quelle: Aus Rachner et al. [109].

Neue Therapiemöglichkeiten eröffnet die Antikörperbehandlung. Ein prominenter Vertreter ist Denosumab, der ähnlich dem körpereigenen OPG als Fehlrezeptor für RANK-L fungiert und über diesen Weg effektiv die Differenzierung der Osteoklasten stört und die Aktivität vermindert. Diese potente Therapie unterstreicht die entscheidende Rolle von RANK-L in der Differenzierung der Osteoklasten [109, 114]. Weitere Antikörper sind gegen Cathepsin K und die c-src Kinase der Osteoklasten verfügbar [109].

2.14.5 Epidemiologie

Osteoporose ist eine der weltweit verbreitetsten Krankheiten, die sowohl in den Industrie- als auch in den Entwicklungsländern von steigender Prävalenz ist. Legt man die Definition der WHO zugrunde, so gab es in der Europäischen Union im Jahre 2010 rund 27,6 Millionen (Mio) Erkrankte (22 Mio Frauen, 5,6 Mio Männer) [52]. In Deutschland wurden im Jahre 2003 7,8 Mio. (6,5 Mio Frauen) Betroffene ermittelt [49]. Das Deutsche Ärzteblatt veröffentlichte im Jahr 2009 die Ergebnisse der „BEST“-Studie, in der insgesamt 6,3 Mio Deutsche betroffen waren. Dabei lag die Prävalenz der über 50-jährigen bei 14% (Frauen 24%, Männer 6%). In dieser Studie konnte außerdem

die jährlich steigende Prävalenz der Osteoporose bestätigt werden. Jährlich wurden 885.000 Neuerkrankungen gezählt [46].

Hauptkomplikation der Osteoporose sind ihre assoziierten Frakturen. Die IOF (International Osteoporosis Foundation) geht von weltweit jährlich 8,9 Mio Frakturen aus. Dies entspricht einer Fraktur in jeder dritten Sekunde [57]. In der Altersklasse von über 50-jährigen erleidet weltweit somit jede dritte Frau und jeder fünfte Mann eine Osteoporose assoziierte Fraktur. Hauptsächlich sind dabei die Hüfte, Handgelenk/ Unterarm und die Wirbelsäule betroffen [57]. Starke Schmerzen und Leidenswege reduzieren die Lebensqualität und führen zu eingeschränkter Bewegung und Bettlägerigkeit, die die Osteoporose weiter verstärken. In der Therapie sollte daher auch eine ausreichende Analgesie sichergestellt werden [57, 114].

Die steigende Prävalenz der Erkrankung und die damit steigende Prävalenz der assoziierten Frakturen belasten immer stärker das Gesundheitssystem. In der Europäischen Union fielen im Jahre 2010 bereits 37 Milliarden (Mrd) Euro für die Behandlung der Osteoporose an. Prozentual wurden 66% für die Versorgung akuter Frakturen, 29% zur Behandlung chronischer Frakturen und lediglich 5% zur Prävention der Osteoporose und ihrer Komplikationen verwendet. Besonders beachtlich ist dabei, dass diese Ausgaben ähnliche Dimensionen wie zur Versorgung der koronaren Herzkrankheit (45 Mrd) und der zerebrovaskulären Erkrankungen (34 Mrd.) annehmen [52]. In Deutschland kostete im Jahre 2009 die Versorgung osteoporotischer Frakturen 860 Mio. Euro. Unter den betrachteten Frakturtypen lag der Anteil somit bei 36% des Gesamtetats und unterstreicht das Gewicht der osteoporotischen Frakturen. Den größten Anteil hatten daran die proximalen Femurfrakturen [12].

Eine weitere wichtige Komplikation osteoporotischer Frakturen ist neben der steigenden Morbidität und sinkenden Lebensqualität die frakturassoziierte Mortalität. In Deutschland wurden im Jahr 2010 bei den über 50-jährigen Frauen 349.560 Osteoporose-assoziierte Frakturen erfasst. Den größten Anteil hatten daran Hüft- (80.177) und Wirbelkörperfrakturen (48.550). In der betrachteten Population konnten 13.439 Todesfälle direkt auf die Fraktur zurückgeführt werden [38].

Entsprechend dem demografischen Wandel werden sowohl Osteoporose als auch ihre Komplikationen in den nächsten Jahren stetig zunehmen und die Belastung für Gesellschaft und Gesundheitssystem steigen [38].

3 Zielsetzung und Hypothesen

Osteoporose-assoziierte Frakturen stellen in der klinisch-chirurgischen Versorgung eine große Herausforderung dar. Die sinkende Knochenmasse und Instabilität der Knochensubstanz erfordern besondere chirurgische Techniken und Implantate.

Die Etablierung neuer osteoporotischer Tiermodelle ist entscheidend, um in einem ersten Schritt die osteoporotische Frakturheilung im Detail zu verstehen und weiterführend geeignete Materialien, Implantate und Medikamente zu entwickeln [143]. Großtiermodelle sind aufgrund der guten Vergleichbarkeit mit dem menschlichen Skelett besonders entscheidend. Schafmodelle sind aufgrund der Größenverhältnisse, des mikroskopischen und makroskopischen Aufbaus sowie der unkomplizierten Haltung schon seit vielen Jahren etabliert [102]. Zwar weisen junge Schafe eine noch plexiforme Kortikalis auf, im weiteren Verlauf wird diese allerdings in kortikalen Lamellenknochen umgewandelt. Die Datenlage zur Ovariectomie (OVX) im Schafmodell ist bisher nicht eindeutig: Zwar wird in Studien ein Knochenmasseverlust insbesondere der lumbalen Wirbelsäule und der langen Röhrenknochen beschrieben, jedoch in weiteren Studien als akute Reaktion auf die OVX ein Reboundeffekt mit zunächst steigender Knochenmasse gefunden [131]. Nach zusätzlicher Glukokortikoidbehandlung konnte jedoch ein signifikanter Knochenmasseverlust im Schafmodell nachgewiesen werden [8].

Ziel dieser Studie ist die histologische Untersuchung der Knochenheilung im Schafmodell der Osteoporose unter verschiedenen Behandlungsregimes. Neben einer nicht behandelten Kontrollgruppe (K), soll die postmenopausale Osteoporose durch OVX simuliert werden. In einer weiteren Tiergruppe wird der zusätzliche Effekt einer nutritiven Unterversorgung mittels einer Kalzium und Vitamin D-armen Diät (OVXD) auf die Knochenheilung untersucht. In der dreifachtherapierten OVXDS Gruppe, wird zusätzlich der Einfluss von Glukokortikoiden auf die Frakturheilung simuliert.

Folgende Hypothesen sollen im Verlauf der Arbeit überprüft werden:

1. Kumulative Therapien haben stärkeren Effekt auf die Knochenheilung und erhöhen die Wahrscheinlichkeit der Pseudarthrosenbildung.
2. Die Knochenheilung in pelvinen Defektzonen weist Ähnlichkeiten zur metaphysären Knochenbruchheilung der Röhrenknochen auf.
3. Die osteoporotische Knochenheilung weist Mineralisierungsstörungen auf

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Für dieses Großtiermodell der Osteoporose wurden 32 weibliche Merino-Landschafe mit einem durchschnittlichen Alter von 5,5 Jahren und einem ausgewachsenen Skelett zufällig von einem Schäfer aus der Region Wiesbaden ausgewählt. Sämtliche Versuche wurden unter tierärztlicher Aufsicht in der zentralen Forschungseinrichtung der Johann Wolfgang Goethe – Universität in Frankfurt am Main vorgenommen. Am 27.09.2012 wurde der Tierversuchsantrag (Aktenzeichen: V54 – 19c 20/15 – F 31/36) vom lokal zuständigen Regierungspräsidium Darmstadt (Wilhelminenstraße 1-3, Wilhelminenhaus, 64283 Darmstadt, Deutschland) gemäß §8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt.

4.2 Studiendesign

Die Versuchsdauer betrug acht Monate, von Ende Oktober 2012 bis Anfang Juli 2013. Zu Beginn des Versuchs wurden die Versuchstiere randomisiert vier Versuchsgruppen zugeteilt. Aufgrund der Trächtigkeit eines Schafes wurde dieses von der Studie ausgeschlossen. Die Osteoporoseinduktion erfolgte durch folgendes Stufenmodell (Abb. 18, Seite 42): Die erste Gruppe (n=8) verblieb als unbehandelte Kontrollgruppe (K) und wurde mit einer Standarddiät (Kapitel 4.3, Seite 42) versorgt. In der zweiten Gruppe (n=7) wurde zum Ausgangszeitpunkt 0 Monate (M) eine beidseitige Ovariectomie (OVX) durchgeführt. Diese Gruppe wurde ebenfalls mit der Standarddiät versorgt. In der dritten Gruppe (n=8) wurde die bilaterale Ovariectomie mit einer speziellen Kalzium- und Vitamin D- armen Diät kombiniert (OVXD). In der vierten Versuchsgruppe (n=8) wurden ebenfalls beide Ovarien entfernt und die Mangeldiät durchgeführt. Zusätzlich wurden jedem Tier regelmäßig hochdosiert Glukokortikosteroide (OVXDS) appliziert.

Zu den Zeitpunkten 0M, 3M und 8M wurde bei jedem Versuchstier in Narkose eine Dual-Röntgen-Absorptiometrie-Messung (DXA) durchgeführt. Die Knochendefekte wurden durch Stanzbiopsien des Beckenkamms zum Zeitpunkt 0M (links) und 3M (rechts) geschaffen. Es entstanden Defektzonen von 7,5 mm Durchmesser und 20 mm Länge. Am Ende des Untersuchungszeitraums (8M) wurden die Schafe euthanasiert und die Defektzonen entnommen. Folglich konnten die Heilungszeiträume 8M (0M – 8M) und 5M (3M – 8M) untersucht werden.

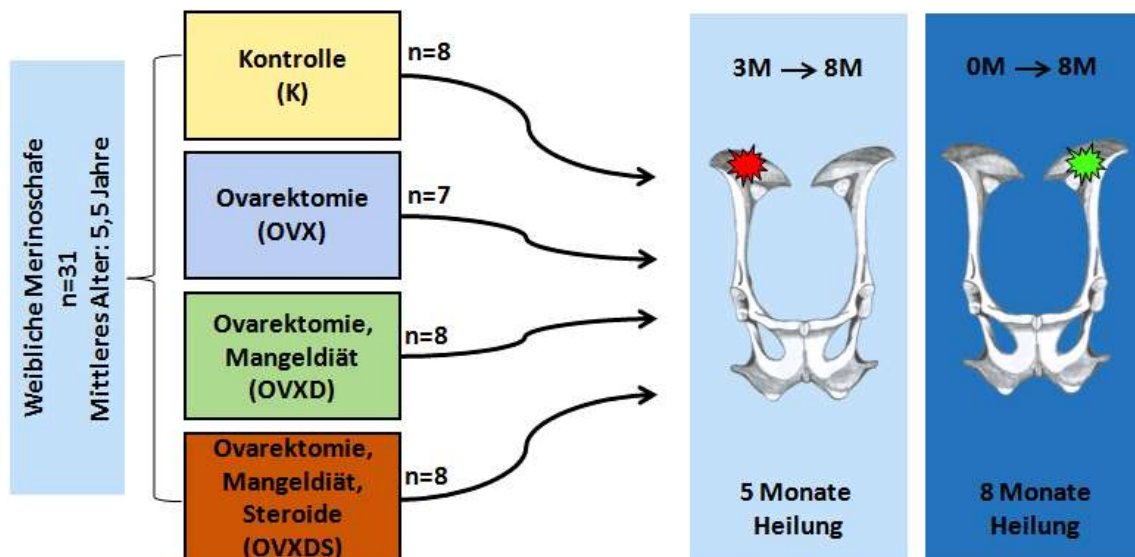


Abb. 18: Stufenmodell zur Osteoporoseinduktion im Schafmodell.

In dieser Studie wurden 31 weibliche Merino-Landschafe mit einem durchschnittlichen Alter von 5,5 Jahren in die Gruppen Kontrolle (K), Ovarektomie (OVX), OVX + spezielle Mangeldiät (OVXD) sowie OVXD + Steroide (OVXDS) eingeteilt. Stanzbiopsien am Beckenkamm wurden durchgeführt und die Heilungszeiträume 5 Monate (M) und 8M untersucht.

4.3 Tierhaltung und Fütterung

Während der gesamten Versuchsdauer wurden alle Tiere veterinärmedizinisch und pflegerisch von erfahrenem Personal betreut und artgerecht gehalten. Sämtliche Eingriffe und Narkosen sowie die postoperative Nachsorge und Euthanasie fanden unter veterinärmedizinischer Kontrolle und Anwesenheit statt.

Zwei Wochen nach Beginn der Studie und Ovarektomie wurden die Versuchstiere der K und OVX Gruppe einem Schäfer übergeben. In den Wintermonaten bekamen die Schafe zusätzlich ein Ergänzungsfuttermittel für kleine Wiederkäuer (Schaf/ Ziege) des Herstellers ssniff (V5103, Fa. ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Die Tiere der OVXD und OVXDS Gruppe wurden in Kleingruppen zusammen in mit Stroh ausgelegten überdachten Außenstallungen der zentralen Forschungseinrichtung in Frankfurt am Main gehalten. Tageslicht und Wasser standen den Tieren in unbegrenztem Maße zur Verfügung. Die kalziumarme und Vitamin D-freie Spezialdiät (S6189-S010, Fa. ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) wurde zwei Wochen nach der beidseitigen Ovariectomie begonnen. Hinsichtlich der Energiebilanz unterschieden sich Standard- und Spezialdiät nicht und deckten den nötigen Tagesbedarf eines Schafes ab.

An den 3 Untersuchungszeitpunkten 0M, 3M und 8M wurden alle Versuchstiere gewogen und tierärztlich vorgestellt. Gewichtsadaptiert wurden die Schafe mit 0,2mg/kg Febantel (Rintal 2,5% ad us. vet., Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) prophylaktisch entwurmt.

4.4 Glukokortikoidinjektionen

Zusätzlich zur speziellen Mangeldiät wurden die Tiere der OVXDS Gruppe ab zwei Wochen nach Ovariectomie mit Steroidinjektionen behandelt. Im zweiwöchentlichen Rhythmus wurde dazu 320mg Methylprednisolon (Depot-Medrate® ad us. vet. 40 mg/ml Injektionslösung, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) abwechselnd in vordere oder hintere Extremität intramuskulär injiziert.

4.5 Operationsablauf

4.5.1 Vorbereitung und Einleitung der Anästhesie

Zur Vorbereitung auf die Operation wurden die Versuchstiere zwölf Stunden vor dem geplanten Eingriff in Einzelställe im Inneren des Forschungsinstituts gebracht. Während dieser Zeit wurde den Tieren keine Nahrung angeboten, Trinkwasser war durchgehend verfügbar. Jedem Versuchstier wurde die folgende Prämedikation im Stall intramuskulär in einen Hinterlauf injiziert: 10mg/kg Ketaminhydrochlorid (Ketavet® 100 mg/ml, Bela-Pharm GmbH & Co.KG, Vechta, Deutschland), 0,01ml/kg Xylazin (Rompun® 2%, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland), 0,3mg/kg Midazolam (Midazolam Rotexmedica 5mg/ml, ROTEXMEDICA GmbH, Trittau, Deutschland) und 0,01mg/kg Atropin (Atropinsulfat 0,5mg/ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland).

Die sedierende Wirkung setzte schnell ein. Nach dem Wiegen wurden die Schafe am Abdomen geschoren und das Operationsgebiet mit einer Enthaarungscreme (Pilca Enthaarungscreme, DMV Diedrichs Markenvertrieb GmbH & Co.KG) gesäubert.

Zu den Zeitpunkten 0M und 3M wurde über eine sterile Venenverweilkanüle (Vasofix® 17G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) ein intravenöser Zugang zur Vena cephalica antebrachii geschaffen. Am Endzeitpunkt 8M wurden die Versuchstiere über einen zentralen Venenkatheter (Ein-Lumen-ZVK, 14G, ARROW GmbH, Erding, Deutschland) in der Vena jugularis versorgt. Beckenkammstanzbiopsie und Ovariectomie wurden in total-intravenöser Anästhesie durchgeführt. Zur Narkoseeinleitung wurde 2mg/kg Propofol (Propofol 2%, 20mg/1ml, Fresenius Kabi

Material und Methoden

Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) appliziert. Die Analgosedierung wurde durch 2µg/ kg Fentanyl (Fentanyl-Hameln 50µg/ kg, hameln pharmaceuticals GmbH, Hameln, Deutschland) gewährleistet. Nach anschließender Intubation wurde die Narkose über einen Propofol-Dauerperfusor mit 50ml/ h (entspricht 0,3ml/ kg/ min Propofol) aufrechterhalten. Gegebenenfalls wurden die Schafe mit einer Pansensonde vor Aspirationen geschützt.

An allen drei Zeitpunkten wurden die Versuchstiere präoperativ prophylaktisch mit 0,1mg/ kg Penicillin (Veracin® RS, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) antibiotisch abgedeckt. Die Analgesie wurde präoperativ mit 0,01mg/ kg Buprenorphinhydrochlorid (TEMGESIC ® Ampullen 0,3mg, RB Pharmaceuticals GmbH, Mannheim, Deutschland) subkutan sichergestellt.

4.5.2 Bilaterale Ovariectomie

Im Anschluss an die Narkoseeinleitung wurden die Versuchstiere zum Zeitpunkt 0M in Rückenlage auf dem Operationstisch gelagert und die Gliedmaßen mit Bandagen fixiert. Das enthaarte Operationsgebiet wurde gründlich desinfiziert und steril abgedeckt. Über einen etwa 15cm langen Hautschnitt wurde das untere Abdomen eröffnet und bis auf die Linea alba präpariert. Anschließend wurde die Linea alba und das Peritoneum durch Stichinzision eröffnet. Im weiteren Verlauf wurden die inneren Genitalorgane *in situ* dargestellt und beide Ovarien nacheinander mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl 4-0, Ethicon Johnson und Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) ligiert. Es erfolgte das Absetzen der Ovarien und die Reposition der mobilisierten Organe. Nach Kontrolle des Operationssitus hinsichtlich Blutungen und weiterer Auffälligkeiten, wurden die Muskel- und Hautschichten vernäht und das Abdomen verschlossen.

Anschließend wurden die Versuchstiere zurück in ihre Einzelbox gebracht, in der sie das volle Bewusstsein wiedererlangten. Nach Inaugenscheinnahme durch das veterinärmedizinische Personal konnten die Tiere zurück in den Stall oder dem Schäfer übergeben werden.

4.5.3 Beckenkammstanzbiopsie

Zum Zeitpunkt 0M folgte im Anschluss an die Ovariectomie eine Stanzbiopsie des linken Beckenkamms (Abb. 19 A-G, Seite 46). Dazu wurden die Schafe aus Rückenlage in Rechtsseitenlage gebracht. Die Versuchstiere der Kontrollgruppe wurden sofort in Rechtsseitenlage gelagert. Das Operationsgebiet wurde geschoren, mit Povidon-Iod-

Lösung (Braunol ®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert und steril abgedeckt. Über eine Hautinzision wurde das Operationsgebiet kleinflächig eröffnet und auf den Beckenkamm präpariert. Zur Biopsieentnahme wurde entweder eine Diamant-Hohlfräse mit 7,5mm Durchmesser und 20mm Länge oder alternativ 5mm Durchmesser und 25mm Länge verwendet. Im Anschluss wurde das Operationsgebiet mit einer mehrschichtigen Naht verschlossen und der Hautdefekt mit Sprühpflaster abgedeckt.

Zum Zeitpunkt 3M erfolgte analoges Vorgehen am rechten Beckenkamm mit Lagerung der Tiere in Linksseitenlage.

4.6 Postoperative Versorgung

Zur antibiotischen Prophylaxe wurden die Versuchstiere postoperativ in den ersten fünf Tagen im 48 stündigen Abstand mit intramuskulären Penicillininjektionen (Veracin® RS, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) versorgt. Die analgetische Therapie erfolgte täglich gemäß dem WHO Stufenplan mit 0,5mg/ kg Meloxicam (Metacam® 20mg/ ml ad us. vet., Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland) intramuskulär und zweimal täglich 0,01mg/ kg Buprenorphinhydrochlorid (TEMGESIC® Ampullen 0,3mg RB Pharmaceuticals GmbH, Mannheim, Deutschland) subkutan. Im Verlauf wurde das Opiat stufenweise durch den Veterinärmediziner ausgeschlichen. Das postoperative Wundmanagement sowie die tägliche Einschätzung des Allgemeinzustandes wurden zwei Wochen lang vom veterinärmedizinischen Personal durchgeführt.

4.7 Euthanasie und Probenentnahme

Wie im Operationsbericht (Kapitel 4.5.1, Seite 43) beschrieben, wurden die Versuchstiere zum Zeitpunkt 8M in Narkose versetzt und intravenös über einen sicher liegenden zentralen Venenkatheter 50mg/ kg Pentobarbital-Natrium (Anestesal®, Pfizer, Mexiko-Stadt, Mexiko) appliziert. Das Einschläfern verlief schnell und schmerzfrei.

Nach Feststellung des sicheren Todes durch den Veterinärmediziner wurden beide Beckenkämme entnommen und die Defektzonen aufgesucht. Die Proben wurden median in der Sagittalebene geteilt. Die weitere histologische Aufarbeitung fand im Institut für experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen in Gießen statt.

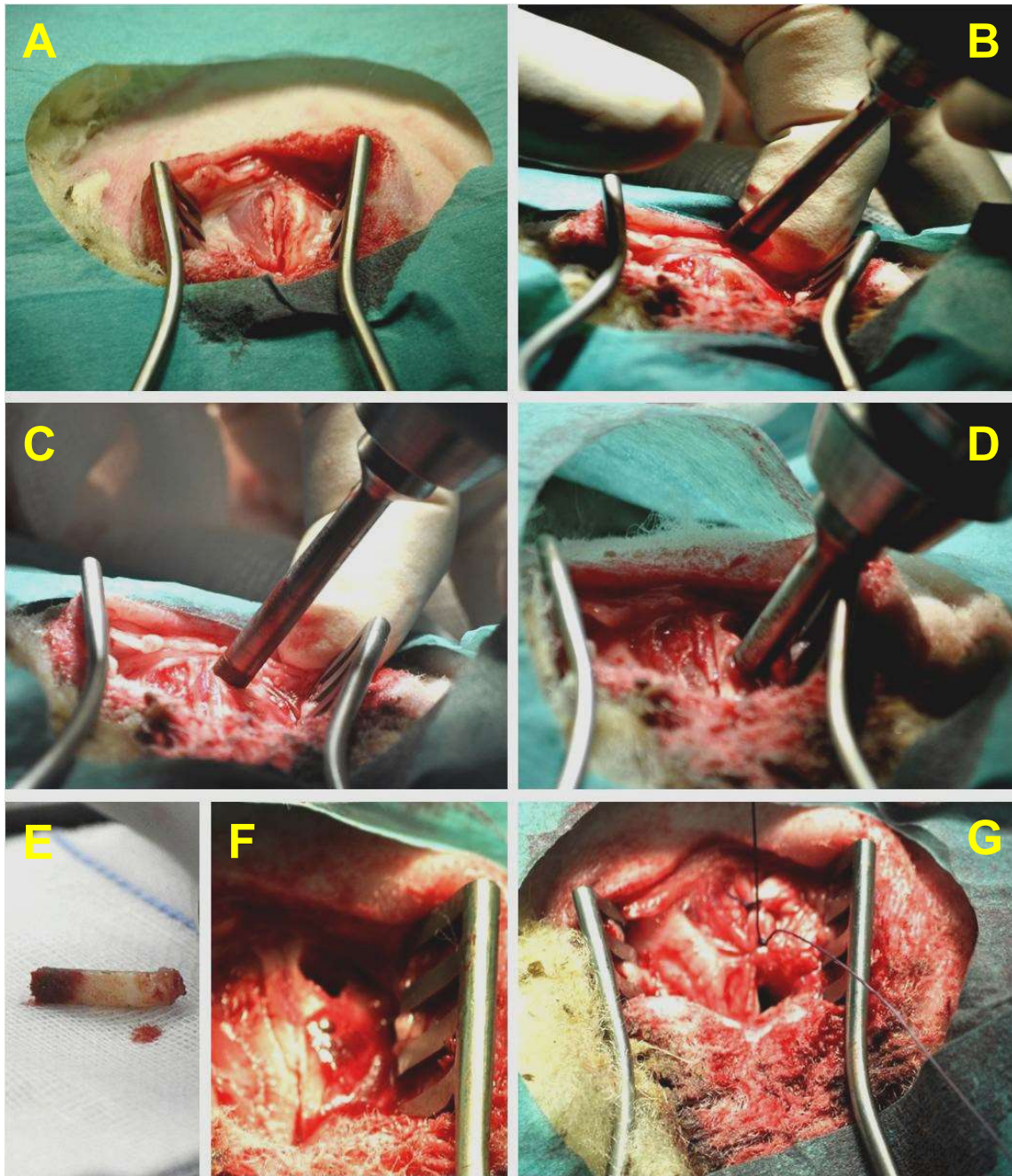


Abb. 19: Entnahme der Beckenkammstanzen mit resultierender Defektzone.

Zu den Zeitpunkten 0M und 3M wurden den Tieren am linken und rechten Beckenkamm Stanzbiopsien entnommen, wodurch die Defektzonen entstanden.

- (A) Hautschnitt und Präparation des Operationsfeldes bis zum Beckenkamm
- (B) – (D) Aufsuchen und Positionieren der Diamant-Hohlfräse mit Entnahme von Stanzbiopsien
- (E) Exemplarische Darstellung einer Knochenbiosie
- (F) Darstellung der Defektzone nach Biospieentnahme
- (G) Verschluss des Operationsgebietes mittels mehrschichtiger Naht

4.8 Verarbeitung der Knochenproben

Um die vielfältigen histologischen Analysemethoden ausschöpfen zu können, wurde von den gewonnenen Proben je eine Hälfte in Paraffin und eine Hälfte in PMMA eingebettet. Anhand der Paraffinschnitte konnten eine deskriptive Analyse, Knochenzellbestimmungen, Histomorphometrie und immunhistochemische Nachweise durchgeführt werden. Eine Charakterisierung sowohl des zellulären Osteozytennetzwerks als auch der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix wurde vorgenommen. Die PMMA-Schliffpräparate wurden dazu verwendet, *in vivo* erzeugte Fluoreszenzbanden im Knochen darzustellen.

4.9 Paraffineinbettung und Anfertigen der Schnittpräparate

Die Knochenproben wurden gemäß der Technik nach Lillie (4% Paraformaldehydlösung in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2 – 7,4) über 48 Stunden bei 4°C fixiert. Das anschließende Entfernen der Formalinlösung aus den fixierten Proben erfolgte durch sechsmaliges Spülen mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2 – 7,4). Im nächsten Schritt wurden die Proben in Einbettkassetten gelagert und über vier Wochen in 3,4%iger Ethylendiamintetraacid (EDTA)/ 10%iger Tris-Lösung bei 4°C schonend entkalkifiziert. Um eine Kalziumsättigung der EDTA Lösung zu verhindern, wurde alle zwei Tage die Lösung erneuert. Anschließend wurden die Knochenproben etwa eine Stunde unter fließendem Wasser gesäubert. Die Dehydrierung und Einbettung der Präparate in das Paraffinmedium wurde mit einem Einbettungsautomaten (Leica TP1050, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) vorgenommen. Folgendes Schema wurde zur Dehydrierung und Paraffineinbettung der Proben verwendet:

Medium	70% Alkohol	80% Alkohol	96% Alkohol	100% Alkohol	Xylol	Xylol	Paraffin
Dauer	2 h	2,5 h	2 h	3 x 3 h	1 h	2x45min	3x40min

Tab. 1: Protokoll der Paraffineinbettung

Zum Aushärten der entstandenen Paraffinblöcke wurden die Proben in Metallförmchen umgebettet und bei -20°C auf einer Kälteplatte gekühlt. Im Folgenden wurden 5µm dicke Schnittpräparate dieser Paraffinblöcke mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM355S Coolcutsystem Fa Thermo Scientific, Waltham, MA) angefertigt. Die einzelnen Schnitte wurden über eine Wasserbrücke in ein 42°C warmes Wasserbad

Material und Methoden

geleitet, in dem sie sich entfalteteten. Im letzten Schritt wurden sie auf SuperFrost Plus Objektträger (Fa. R Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen und bei 37°C im Brutschrank getrocknet.

4.10 PMMA-Einbettung und Schliffpräparation

Mithilfe PMMA-Einbettung (Technovit® 9100, Tab. 2, Seite 48) ist es möglich, Knochengewebe im kalzifizierten Zustand zu belassen und auf diese Weise die Knochenmineralisierung zu analysieren. Die Entkalkung der Präparate entfällt daher in diesem Protokoll.

<u>Komponente</u>	<u>Produktbezeichnung</u>
Basislösung (stabilisiert)	Technovit® 9100 Basislösung stabilisiert
Härter 1	Technovit® 9100 Härter 1
Härter 2	Technovit® 9100 Härter 2
PMMA-Pulver	Technovit® 9100 PMMA-Pulver
Polymerisationsregler	Technovit® 9100 Regler

Tab. 2: Verwendete Komponenten der PMMA-Einbettung
(64715444, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland)

4.10.1 Fixierung, Dehydrierung und Einbettung

Analog zu den Paraffinpräparaten erfolgte auch bei den PMMA-Proben die Fixierung anhand des Protokolls nach Lillie (4% Paraformaldehydlösung in 0,1M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2 – 7,4) über 48 Stunden bei 4°C. Die Überführung der Proben von der hydrophilen in die lipophile Phase mittels aufsteigender Alkoholreihe und anschließender Infiltration in das Einbettmedium verlief jeweils über einige Tage. Tabelle 3 (Seite 48) zeigt das verwendete Schema. Täglich wurde bei jedem der Schritte mehrmals ein Vakuum von -200mbar für zehn Minuten im Exikator aufgebaut und so die Lösungen in die Tiefe der Proben eingebracht.

<u>Arbeitsschritt</u>	<u>Medium</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>
Dehydrierung	Alkohol 70%	RT, bewegen	2 d
	Alkohol 70%	RT, bewegen	2 d
	Alkohol 80%	RT, bewegen	3 d
	Alkohol 96%	RT, bewegen	3 d
	Alkohol 100%	RT, bewegen	4 d
	Alkohol 100%	RT, bewegen	3 d
	Alkohol 100%	RT, bewegen	4 d
	Alkohol 100%	RT, bewegen	3 d
	Alkohol 100%	RT, bewegen	4 d
	Xylol	RT, bewegen	12 h
	Xylol	RT, bewegen	12 h
Präinfiltration 1	Präinfiltrationslösung 1	RT, bewegen	5 d
Präinfiltration 2	Präinfiltrationslösung 2	RT, bewegen	5 d
Präinfiltration 3	Präinfiltrationslösung 3	4°C	4 d
Infiltration	Infiltrationslösung	4°C	11 d

Tab. 3: Protokoll der PMMA-Einbettung.

4.10.2 Entstabilisieren der Basislösung

Die stabilisierte Basislösung wurde durch eine mit 50g Aluminiumoxid gefüllte Chromatographiesäule geleitet. Insgesamt wurden etwa vier Liter der entstabilisierten Basislösung benötigt. Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen sind in Tabelle 4 (Seite 50) aufgeführt.

<u>Lösung</u>		<u>Zusammensetzung</u>
Präinfiltrationslösung	1	125 ml Basislösung (stabilisiert) + 125 ml Xylol
	2	250 ml Basislösung (stabilisiert) + 1,25 g Härter
	3	250 ml Basislösung (entstabilisiert) + 1,25 g Härter 1
Infiltrationslösung		250 ml Basislösung (entstabilisiert) + 20 g PMMA-Pulver + 1 g Härter 1
Stammlösung	A	500 ml Basislösung (entstabilisiert) + 80 g PMMA-Pulver + 3 g Härter 1
	B	44 ml Basislösung (entstabilisiert) + 4 ml Härter 2 + 2 ml Polymerisationsregler

Tab. 4: Zusammensetzung und Mischungsverhältnis der verwendeten Gebrauchslösungen.

4.10.3 Polymerisation

Das Polymerisationsgemisch wurde im Verhältnis 9:1 aus der gekühlten Stammlösung A und Stammlösung B angefertigt. Die vorbereiteten Proben wurden in Einbettkassetten eingebracht und in den vorgekühlten Exikator gegeben. Die Kassetten wurden so lange mit dem angefertigten Polymerisationsgemisch aufgefüllt, bis sie bis zum Rand gefüllt waren. Daraufhin wurde im Exikator ein Vakuum von -200mbar für fünf bis zehn Minuten aufgebaut. Auf diese Weise konnte das Medium bis tief in das Präparat eindringen und die Luft im Inneren der Proben bestmöglich entfernt werden. Nachdem die Kassetten wieder vollständig mit Polymerisationsgemisch aufgefüllt wurden, wurden sie luftdicht mit Parafilm verschlossen und über 48 Stunden bei -4°C gelagert. Anschließend konnten die eingebetteten Proben zur Weiterverarbeitung behutsam auf Raumtemperatur (RT) aufgewärmt werden.

4.10.4 Anfertigen der Schliffe

Im ersten Schritt wurden die eingebetteten Knochenproben grob mit dem Trennschleifsystem 310 CL[#] auf die geeignete Form gesägt. Im Folgenden wurden die auf diese Weise vorbereiteten Präparate mithilfe von Technovit 4000 (64708458, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) auf einen zuvor angerauten Plexiglas-Objektträger (304150, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) geklebt. Störende Lufteinschlüsse wurden durch eine Vakuum-Klebevorrichtung[#] vermieden. Die dem

Objektträger abgewandte Seite wurde nun so lange mit dem Mikroschleifsystem 400 CS[#] bei grober Körnung bearbeitet, bis die gewünschte Knochenschicht sichtbar und das Präparat parallel ausgerichtet war. Diese Seite wurde mithilfe eines Präzisionsklebers (405 110, T7210 Präzisionskleber, patho-service GmbH, Oststeinbeck, Deutschland) in einer Präzisionsklebepresse[#] auf einem Glasobjektträger fixiert. Mit einer Mikrometerschraube wurde bei jedem Arbeitsschritt die Dicke des Präparates samt Objektträger und Präzisionskleber bestimmt. Im folgenden Schritt wurde das Präparat mit den beiden aufgeklebten Objektträgern mittig mit dem Trennschleifsystem 310 CL[#] zerteilt. Beide Schnittflächen wurden nun im Mikroschleifsystem 400 CS[#] mit feiner Körnung bearbeitet bis der Knochenschliff eine Dicke von 10 - 20µm aufwies. Abschließendes Polieren finalisierte die Schliffpräparate. ([#] EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland)

4.11 Toluidinblau O-Färbung

Bei Entnahme der Defektzonen am Endzeitpunkt 8M wurden die betreffenden Stellen an den Beckenkämmen durch Abtasten und Augenschein aufgesucht. Im ersten histologischen Schritt wurde daher die physikalische Standardfärbung Toluidinblau verwendet, um sicherzustellen, dass die gewonnenen Präparate die Defektzone abbilden. Dazu wurde von jeder Probe der zweite Paraffinschnitt ausgewählt. Präparate, die lichtmikroskopisch keine Defektzone aufwiesen, wurden von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Die Toluidinblau Färbung ermöglicht außerdem eine erste Gewebedifferenzierung. Das Färbergebnis stellt sich wie folgt dar: In die mineralisierte Hartgewebematrix des Knochens kann bei dieser physikalischen Färbemethode nur wenig Farbstoff eindringen, sodass sie ungefärbt bis blassblau erscheint. Zelluläre Bestandteile und Weichgewebe erscheinen in verschiedenen Blautönen, die verkalkte Knorpelmatrix färbt sich dunkelblau an. Mastzellgranula und Knorpelgewebe erscheinen metachromatisch rotviolett. Die Auswertung der Knochenparameter erfolgte deskriptiv mittels Frequenzanalyse. (Färbvorschrift und –reagenzien im Anhang, Seite 109)

4.12 Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner

Diese Färbetechnik ermöglicht eine genauere Gewebedifferenzierung der Knochenpräparate hinsichtlich mineralisiert und nicht mineralisiert [4]. Reifer mineralisierter Knochen wird leuchtend grün angefärbt, Osteoid erscheint rot. Die

Material und Methoden

Hämatoxylinkomponente färbt Zellkerne blauschwarz an, das Zytoplasma orange. Bindegewebige Strukturen stellen sich ebenfalls grün dar, die Muskulatur blassrot.

Lichtmikroskopisch wurde für jedes Präparat eine individuelle adaptive Region Of Interest (ROI) definiert, in der die Defektzone anhand histologischer Merkmale sicher zu identifizieren war. Die Auswertung durch eine quantitative Histomorphometrie wurde innerhalb dieser ROI halbautomatisch mithilfe von ImageJ durchgeführt. Dabei wurde in mineralisiertes Gewebe und Osteoid unterschieden, um Veränderungen der Gewebezusammensetzung des neu entstandenen Knochens in den verschiedenen Behandlungsgruppen aufdecken zu können. (Färbvorschrift und –reagenzien im Anhang, Seite 110)

4.13 Silbernitrat Färbung

Mithilfe der Silbernitratfärbung ist es möglich, Osteozyten sowie ihr kanalikuläres Netzwerk darzustellen. Das Ausmaß der Zellausläufer gibt Hinweise auf die Interaktion zwischen den Zellen. Dabei ist sowohl eine Kommunikation zwischen verschiedenen Osteozyten, als auch eine Interaktion zwischen Osteozyten und Osteoklasten oder Osteoblasten denkbar. Die Morphologie des Zellkörpers der Osteozyten gibt Hinweise auf die Aktivität und das Alter der Zellen. Dabei sind runde große Zellkörper in großen Knochenlakunen Kennzeichen erst kürzlich entstandener und aktiver Osteozyten. Während der Mineralisierung wurden sie als Osteoblasten in die Knochenmatrix eingebaut. Spindelförmige Zellkörper deuten auf in den Lammellenknochen integrierte Zellen hin. Sie sind in gut organisierter Knochenmatrix zu finden. Leere Knochenlakunen sind Merkmal apoptotischer Osteozyten.

Anhand deskriptiver Kriterien wurden aus jeder der vier Versuchstiergruppen zu beiden Zeitpunkten drei Präparate ausgewählt (n=24). Die Auswertung erfolgt durch manuelles Typisieren und Zählen der Osteozyten innerhalb der individuell definierten adaptiven ROI in die drei oben beschriebenen Zelltypen. (Färbvorschrift und –reagenzien im Anhang, Seite 117)

4.14 Immunhistochemie

Immunhistochemische (IHC) Färbetechniken werden verwendet, um bestimmte Antigene schon in geringen Konzentrationen auf Zellen oder in der extrazellulären Matrix sichtbar zu machen oder die genaue Verteilung der Antigene im Gewebe zu analysieren. Dabei wird eine direkte von einer in dieser Studie verwendeten indirekten

Methode unterschieden. Das Prinzip der direkten Methode besteht darin, dass ein Antikörper passend zum gesuchten Antigen auf den Gewebeschnitt pipettiert wird und an das Epitop bindet. An diesen Antikörper ist ein Enzym gekoppelt, das nach Entstehung des Antigen-Antikörper-Komplexes aktiviert wird und eine Farbreaktion erzeugt. Die indirekte Technik basiert auf einem primären Antikörper gegen das gesuchte Antigen sowie einem sekundären Antikörper passend zum Fc-Teil des primären Antikörpers. Es entsteht ein Antigen-Antikörper-Antikörper-Komplex, der nach Zugabe eines Chromogensubstrats durch eine Farbreaktion sichtbar wird.

4.14.1 Kollagen Typ I Immunhistochemie

Zur genauen Evaluation des Heilungsverlaufs wurde die IHC Markierung des Col I (purified rabbit anti-human type I collagen, Cat. No. 20111, BIOMEX, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Kombiniert mit einer Hämatoxylin Gegenfärbung entsteht eine gemischt physikalisch-chemische Färbemethode, die eine Differenzierung des Knochenstatus hinsichtlich des Gehalts an Col I ermöglicht. In tief violett gefärbten Bereichen überwiegt die physikalische Färbekomponente. Die kollagenen Fasern liegen locker aneinander und gewährleisten nur wenig Stabilität, der Gehalt an Col I ist sehr gering. Magentafarbene Bereiche weisen einen hohen Gehalt an Col I auf. Die mineralisierte kollagene Matrix ist allerdings noch wenig geordnet. Ein hoher Gehalt an Col I sowie eine noch wenig geordnete Knochenstruktur wurde in dieser Arbeit als neu gebildeter Knochen (Geflechtknochen) definiert. In den zartrosafarbenen Bereichen liegen die Kollagenfasern dicht gedrängt. Die physikalische Färbekomponente kann nicht in die Knochenmatrix eindringen und hinterlässt nur blass angefärbte Bereiche. Definitionsgemäß werden solche Bereiche als dicht mineralisierter Lamellenknochen angesehen, die nicht im Zuge der Defektheilung entstanden sind oder bereits durch Remodeling umgebaut wurden.

Um ein gutes Färbeergebnis zu erzielen, wurden vor Zugabe des primären Antikörpers unspezifische Bindungsstellen im Gewebe geblockt. Dazu wird neben einer Bloxall blocking Lösung (BLOXALL, Best.Nr. SP-6000, Vector Laboratories, Burlingame, CA) Serum verwendet, das aus der Tiergattung stammt, in der der sekundäre Antikörper gewonnen wurde (Goat Serum Donor Herd, Best.Nr. G6767-100ml, Fa. Sigma, Darmstadt, Deutschland).

Die Auswertung wurde innerhalb der oben beschriebenen ROIs halbautomatisch mittels ImageJ durchgeführt. Dabei wurde in magentafarbene neu entstandene Knochenmatrix

sowie weiteres Gewebe und Hintergrund unterschieden. (Färbvorschrift und – reagenzien im Anhang, Seite 112)

4.14.2 Kollagen Typ X Immunhistochemie

Die Identifizierung hypertropher Knorpelbereiche wurde mittels der IHC Färbung von Col X (Collagen X Antibody, rabbit polyclonal, Cat. No. 251204, Abbiotec, San Diego, CA) durchgeführt. Die in der Toluidinfärbung identifizierten Knorpelüberreste wurden auf diese Weise genauer hinsichtlich des weiteren Heilungsverlaufes analysiert. Hypertropher Knorpel exprimiert Col X und wird im Folgenden mineralisiert. Proliferativer Knorpel zeigt keine Col X Expression und nimmt nicht an der Knochenbildung teil [32, 147]. Ein geringer Col X Gehalt der Knorpelreste weist daher auf eine verzögerte Heilung mit fortbestehendem proliferativem Knorpel hin.

Zusätzlich zu der unter der Col I IHC beschriebenen Blockade unspezifischer Rezeptoren, wurde in der Col X IHC eine Vorbehandlung mit 0,2%iger Hyaluronidaselösung durchgeführt, um die Spezifität des Kollagennachweises zu erhöhen.

Die in der Trichrom Färbung nach Masson-Goldner beschriebenen ROIs konnten für die Auswertung dieser Färbung nicht verwendet werden. Definitionsgemäß enthalten die ROIs den neu gebildeten Knochen, knorpelige Bereiche wurden nicht berücksichtigt. Daher wurden zur Analyse der Knorpelreste hinsichtlich der Col X Expression angepasste adaptive ROIs der Knorpelmatrix angefertigt. (Färbvorschrift und – reagenzien im Anhang, Seite 115)

4.14.3 RANK-L und OPG Immunhistochemie

Während der Knochendefektheilung fungieren RANK-L und OPG als wichtige Regulatoren der Osteogenese sowie des Remodelings. Sie steuern die Aktivierung reifer Osteoklasten und die Osteoklastogenese aus Vorläuferzellen. Gebunden auf der Zelloberfläche reifer Osteoblasten und Osteozyten bindet RANK-L an RANK auf der Oberfläche der Osteoklastenvorläuferzelle. Diese Verbindung führt zur Aktivierung und weiteren Differenzierung in reife Osteoklasten. OPG kann diesen Signalweg unterbrechen. Als löslicher Rezeptor bindet es an freies RANK-L und inhibiert so die Aktivierung der Osteoklasten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass an der Expression dieser Stoffe und somit an der Regulation des Osteoblasten-Osteoklasten-Gleichgewichts Osteozyten eine entscheidende Rolle spielen.

Nach IHC Markierung von RANK-L (Anti-RANK-L Antikörper, Maus monoklonal, Verdünnung 1:100 in Puffer, Best. Nr. 12A668, Abcam, Cambridge, UK) und OPG (Osteoprotegerin Antikörper, Kaninchen polyklonal, Verdünnung 1:100 in Puffer, Best. Nr. 250800, Abbiotec, CA) wurde auf eine Gegenfärbung verzichtet. Die Auswertung erfolgte histomorphometrisch mittels ImageJ innerhalb der adaptiven ROI jedes Präparats. Es wurde in angefärbte Osteozyten und dem Knochen anliegende angefärbte Knochendeckzellen unterschieden. (Färbevorschrift und –reagenzien im Anhang, Seite 118)

4.15 In vivo Fluoreszenzmarkierungen

Die Extrazellulärmatrix des Knochens unterliegt ständigem Umbau. In das kollagene Grundgerüst des Knochens werden Hydroxylapatit-Kristalle ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) eingelagert, die für die Stabilität des Grundgerüsts sorgen. Hydroxylapatit ist in hohem Maße kalziumhaltig. Wird dem Körper insbesondere in der anabolen Phase der Knochenheilung Kalzium angeboten, so wird dieses dazu verwendet, neue Knochensubstanz zu mineralisieren. Durch Koppelung dieser Kalziumionen mit Fluorochromen, können in den nicht entkalzifizierten PMMA-Schliffpräparaten bei Belichtung mit bestimmten Wellenlängen, Fluoreszenzbanden dargestellt werden. Durch diese Signale konnte die Mineralisationsrate pro Tag berechnet werden.

Randomisiert wurden zu diesem Zweck jeweils drei Versuchstiere jeder Gruppe ausgewählt. Zunächst wurde 15 Tage vor Euthanasie der rote Fluoreszenzfarbstoff Alizarin Complexone (A3882, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) gespritzt, 14 sowie 7 Tage vor Euthanasie der grüne Farbstoff Calcein (C0875, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland). Gewichtsadaptiert wurden den Versuchstieren die Lösungen an mehreren Stellen subkutan injiziert. (Zusammensetzung und Vorbereitung der Injektionslösungen im Anhang, Seite 120)

4.16 Fotomikroskopie

Die Experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen verfügt über zwei verschiedene Fotomikroskope, die beide für diese Arbeit verwendet wurden. Die Präparate der Toluidinblau Färbung sowie der Col I IHC wurden bei 2,5-facher Vergrößerung in Übersicht mit dem Fotomikroskop Axioplan 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland), der Kamera Leica DC 500 (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) sowie der Software Axio Vision (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena,

Material und Methoden

Deutschland) fotografiert. Das gleiche Gerät wurde dazu verwendet, Detailaufnahmen der RANK-L und OPG IHC in 40-facher Vergrößerung anzufertigen.

Die Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner sowie die Col X IHC wurden in 5-facher Vergrößerung als Übersicht fotografiert. Die Digitalisierung dieser Färbungen wurde mit dem Mikroskop Leica DM5500 (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland), der Kamera Leica DCF 7000 T (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) sowie der zugehörigen Software Leica Application Suite X, 1.9.13747 (LAS X, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) vorgenommen. Für die Darstellung der Fluoreszenzbanden wurde bei diesem Fotomikroskop der Texas-Red-Filter (Exzitation: $559 \pm 17\text{nm}$, Emission: $630 \pm 34,5\text{nm}$) und der Green-Fluorescent-Protein-Filter (Exzitation: $469 \pm 17,5\text{nm}$, Emission: $525 \pm 19,5\text{nm}$) verwendet und in 40-facher Vergrößerung fotografiert.

Zur nachfolgenden Bearbeitung der Fotografien wurden die Programme ImageJ (Version: 2.0.0-rc-15/ 1.49m, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) und Adobe Photoshop CS 2 (Adobe Systems Incorporated, San José, CA) verwendet.

4.17 Auswertung

4.17.1 Frequenzanalyse der Toluidin Blau Färbung

Im ersten Schritt wurden die Präparate deskriptiv unter dem Lichtmikroskop analysiert. Dazu wurde ein Rangsystem verwendet, das die gesuchten Parameter in drei Ausprägungsgrade klassifizierte. Dabei wurde insbesondere auf folgende Parameter geachtet: Größe des umgebenden Frakturkallus, Knorpelmenge sowie kortikale und trabekuläre Dicke. Außerdem wurden weitere Besonderheiten notiert. Präparate, die augenscheinlich keine Defektzone zeigten, wurden von den weiteren Färbungen ausgeschlossen.

4.17.2 Berechnung der Trabekeloberfläche

Die Fotografien der Trichrom Färbung nach Masson-Goldner wurden im Programm ImageJ geöffnet und die zugehörige ROI auf der Fotografie dargestellt. Die Skalierung wurde über einen mikroskopspezifischen Umrechnungsfaktor von Pixel auf μm korrigiert. Unter dem Reiter „Edit“ wurde der Befehl „Clear Outside“ ausgewählt und auf diese Weise die Präparatfläche außerhalb der ROI ausgeschnitten. Über den Programmpfad „Image“, „Adjust“ und „Auto Crop“ wurde das Bild auf die nun kleinstmögliche Größe zugeschnitten. Um den Fehler durch umgebendes Gewebe zu

minimieren, wurde das Foto in die Farbkanäle aufgetrennt („Image“, „Color“, „Split Channels“) und der Blaukanal ausgewählt. Große Teile des Knochenmarks konnten so aus der Berechnung ausgeschlossen werden. Im nächsten Schritt wurde ein binäres Bild („Process“, „Binary“, „Make Binary“) erzeugt und restliche Gewebereste, die nicht dem Knochen zugehörig waren, manuell entfernt. Im Anschluss wurde die Funktion „Measure“ ausgewählt („Analyse“, „Measure“) und der prozentuale Anteil der Trabekelfläche bestimmt. Multipliziert mit der Gesamtfläche des Präparates, konnte die absolute Trabekeloberfläche in μm^2 berechnet werden. Diese Werte wurden für die jeweiligen Auswertungen zur Normalisierung verwendet.

4.17.3 Histomorphometrie der Defektzone

Quantitative Analyse der Trichrom Färbung nach Masson-Goldner mittels ImageJ. Gemäß dem in Kapitel 4.12 (Seite 51) beschriebenen Protokoll (ausführliche Färbvorschrift im Anhang Seite 110) wurde ein Paraffinschnitt jedes Präparates in der Trichrom Masson-Goldner Färbung angefertigt. Im Folgenden wurden Übersichtsfotografien aller Schnitte in fünffacher Vergrößerung aufgenommen. Das Programm ImageJ wurde dazu verwendet, die adaptiven ROIs auf die Fotografien zu übertragen und sie entsprechend zuzuschneiden. Die histomorphometrische Analyse wurde innerhalb dieser Flächen durchgeführt. Dazu wurde das ImageJ Plugin „Trainable Weka Segmentation“ verwendet. Dieses Plugin ordnete jeden Pixel des Bildes anhand seines Farbcodes einer Klasse zu. Es wurden die Klassen mineralisierte Matrix, Osteoid und Hintergrund/ Knochenmark erstellt und ihnen die entsprechenden Farbcodes zugewiesen. Zur mineralisierten Matrix wurden dabei sowohl die leuchtend grün gefärbten als auch die bräunlich angefärbten Knochenbereiche gezählt. Osteoid wurde als rote Pixel definiert. Sämtliche andere Farben wurden der dritten Klasse zugewiesen. Nachdem eine exakte Differenzierung erzeugt werden konnte, wurde diese Zuordnung als sogenannter „classifier“ gespeichert und für jedes Präparat verwendet. Für den Fall, dass Bereiche des Knochenmarks fälschlicher Weise einer anderen Gruppen zugewiesen wurden, wurden diese Stellen manuell in Photoshop nachbearbeitet und in der korrekten Farbe eingefärbt. Das Makro „Weka Stats“ wurde anschließend verwendet, um die prozentualen Anteile jeder Klasse an der Gesamtfläche zu errechnen. Diese Werte wurden in eine Tabelle übertragen. Zur besseren Vergleichbarkeit und Übersicht wurden die Werte der dritten Klasse in der Auswertung

heraus gerechnet. Auf diese Weise konnten die Anteile der mineralisierten Matrix und des Osteoids in jeder Versuchstiergruppe zu beiden Zeitpunkten bestimmt werden.

4.17.4 Manuelle Analyse der Silbernitrat Färbung

Das osteozytäre Netzwerk sowie die Zellmorphologie konnte durch die Silbernitrat-Färbung dargestellt werden. Die ausgesuchten Präparate jeder Tiergruppe zu beiden Zeitpunkten wurden gemäß dem im Anhang beschriebenen Protokoll (Seite 117) gefärbt. Auf die fertigen eingedeckelten Präparate wurde eine transparente Folie aufgebracht, auf der die adaptive ROI jedes Präparates eingezeichnet wurde. Innerhalb dieser ROI wurde ein Raster aufgezeichnet, das bei 40-facher Vergrößerung etwa ein Gesichtsfeld groß war. Lichtmikroskopisch wurden die Präparate durchmustert und die Osteozyten mithilfe eines Hand-Klick-Zählers quantifiziert. Dabei wurde außerdem eine Differenzierung in die drei morphologischen Zelltypen rund, spindelförmig und apoptotisch vorgenommen. Auf diese Weise wurde sowohl die absolute Gesamtzellzahl als auch die genaue Aufteilung in die verschiedenen Zellmorphologien bestimmt.

Die Vergleichbarkeit der Werte wurde durch Normalisierung auf die Trabekelfläche gewährleistet.

4.17.5 Quantitative Analyse der IHC Kollagen Typ I Färbung

Ein Paraffinschnitt jedes Präparates wurde dazu verwendet, Col I in der Knochenmatrix immunhistochemisch zu markieren. Anschließend wurden sämtliche Präparate in fünffacher Vergrößerung als Übersicht fotografiert. Mithilfe des Programms ImageJ wurde die adaptive ROI in die Fotografien übertragen und passend zugeschnitten. Die Bestimmung des Gehaltes an Col I wurde ausschließlich innerhalb dieser ROI durchgeführt. Wie in Kapitel 4.14.1 (Seite 53) beschrieben, besteht diese Färbung aus einer physikalischen und einer chemischen Komponente, die drei verschiedene Differenzierungen zuließ. Auch die Analyse dieser Färbung wurde mithilfe des Programms ImageJ und dem Plugin „Trainable Weka Segmentation“ durchgeführt. Dabei wurden die magentafarbenen Bereiche als erste Klasse definiert und sämtliche übrigen Farbcodes als zweite Klasse. Das Makro „Weka Stats“ generierte die prozentualen Anteile der beiden Klassen. Abschließend wurde der Gehalt an Col I auf die jeweilige Trabekelfläche normalisiert.

4.17.6 Quantitative Analyse der IHC Kollagen Typ X Färbung

Die immunhistochemische Färbung wurde gemäß dem Färbeprotokoll im Anhang (Seite 115) durchgeführt und anschließend in fünffacher Vergrößerung als Übersicht fotografiert. Da die zuvor definierten adaptiven ROIs definitionsgemäß keine knorpeligen Bereiche enthielten, wurden zur Auswertung dieser Färbung an den Knorpel angepasste ROIs verwendet. Präparate, die keinen Knorpel aufwiesen, wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Zur Quantifizierung wurde bei dieser Färbung ebenfalls das Programm ImageJ mit dem Plugin „Trainable Weka Segmentation“ verwendet. Die durch Nova Red rotbraun angefärbten Col X positiven Bereiche wurden als erste Klasse definiert, alle übrigen Bereiche als weitere Klasse. Das Makro „Weka Stats“ generierte die prozentualen Anteile der beiden Klassen.

4.17.7 Quantitative Analyse der IHC RANK-L und OPG Markierung

Die Färbung wurde gemäß dem Färbeprotokoll im Anhang (Seite 118) durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden die Präparate innerhalb der jeweiligen adaptiven ROI in 40-facher Vergrößerung durchmustert und angefärbte Osteozyten sowie dem Knochen in Lakunen anliegende Lining Zellen fotografiert. Mit den beiden Programmen Photoshop und ImageJ wurden diese Aufnahmen so bearbeitet, dass nur solche Bereiche verblieben, die in die Auswertung aufgenommen werden sollten. Alle übrigen Bildabschnitte wurden einheitlich weiß eingefärbt und auf diese Weise der Fehler minimiert. Auch bei diesen Färbungen wurde die Quantifizierung der positiven Areale halbautomatisiert mit ImageJ und dem Plugin „Trainable Weka Segmentation“ durchgeführt. Dabei wurden die magentafarbenen positiv angefärbten Bereiche als eine Klasse definiert, alle übrigen Farben als weitere Klasse. Das Makro „Weka Stats“ lieferte die zugehörigen prozentualen Werte der Klassen. Multipliziert mit der Gesamtfläche eines Bildes, konnten auf diese Weise die absoluten Werte errechnet werden. Anhand dieser Einzelwerte konnten verschiedene Quotienten errechnet werden: Die absoluten Werte für RANK-L und OPG sowohl der Osteozyten als auch der Lining Cells normalisiert auf die Trabekelfläche des jeweiligen Präparates, die Gesamtmenge an RANK-L und OPG (Osteozyten + Lining Zellen) in Bezug zur Trabekelfläche und der Quotient aus den Werten für RANK-L und OPG. Außerdem wurden die absoluten Anzahlen der RANK-L und OPG positiven Osteozyten bestimmt und auf die Trabekelfläche normalisiert.

4.17.8 Bestimmung der Mineralisationsrate durch Fluoreszenzmikroskopie

Randomisiert wurden jeweils drei Versuchstieren jeder Gruppe *in vivo* an drei verschiedenen Zeitpunkten Fluoreszenzfarbstoffe appliziert. Der rot fluoreszierende Farbstoff Alizarin Complexone wurde 15 Tage vor Euthanasie injiziert, die grüne Fluoreszenz-Markierung Calcein 14 sowie sieben Tage vor Studienende.

Für die Darstellung der Fluoreszenz-Markierungen wurden die nicht entkalkifizierten PMMA Schliffpräparate verwendet. In 40-facher Vergrößerung wurden die Präparate durchmustert und randomisiert fünf verschiedene Stellen mit sichtbarer Fluoreszenz-Markierung ausgewählt. Diese Bereiche wurden mit jeweils vier Bildern (2x2) zunächst im Lichtbild und anschließend in den Fluoreszenzkanälen fotografiert, zusammengesetzt und überlagert. Für die Auswertung wurde der Grünfilter verwendet. Mit Ausnahme der OVXDS Gruppe zum Zeitpunkt 5M zeigten alle übrigen Präparate beide grünen Fluoreszenzmarkungen, die im Abstand von sieben Tagen erzeugt wurden. Nach Öffnen der Fotografien in ImageJ wurde der Maßstab über einen mikroskopspezifischen Umrechnungsfaktor von Pixel auf μm verändert. Das Plugin „Distance between Polylines“ wurde dazu verwendet, den kleinstmöglichen Abstand zweier Linien durch senkrechte Verbindungslinien zu bestimmen. Zunächst wurde eine parallel zu den Fluoreszenz-Markierungen verlaufende „Direction Line“ eingezeichnet, auf der die Messungen senkrecht verliefen. Im nächsten Schritt wurden die beiden Fluoreszenzbanden mittig mit weiteren Linien markiert und auf diese Weise Anfangs- und Endpunkt der Messung definiert. Das Plugin bestimmte über unzählige Messungen zwischen diesen beiden Linien senkrecht zur „Direction Line“ den mittleren Abstand der beiden Linien. Insbesondere wenn der Trabekelverlauf nicht geradlinig verlief, musste der Abstand in vielen Einzelmessungen bestimmt werden, da nur für einen kleinen Bereich die „Direction Line“ den kleinstmöglichen Abstand durch senkrechte Messungen lieferte. Die Auswertung der OVXDS Gruppe zum Zeitpunkt 5M wurde durch analoges Vorgehen zwischen der roten Alizarin- und der zweiten grünen Calcein-Markierung durchgeführt.

Der Mittelwert aller Einzelmessungen eines Präparates ergab die durchschnittliche Mineralisation. Dividiert durch die Anzahl an Tagen zwischen den Fluorochrom-Injektionen, ergab sich die Mineralisationsrate pro Tag.

4.18 Statistik

Die Berechnung der statistischen Auswertungen wurde mit dem Programm SPSS (IBM SPSS Statistics 21, IBM, Armonk, New York) durchgeführt.

Die Frequenzanalyse der Toluidinblau Präparate wurde mithilfe des Chi-Quadrat Tests berechnet und grafisch dargestellt. Histomorphometrisch wurde das Knochengewebe der Defektzone in mineralisierte Matrix und Osteoid eingeteilt und auf diese Weise eine Aussage über die Zusammensetzung des Knochens getroffen. Die Analyse des Col I Gehaltes wurde ebenfalls histomorphometrisch durchgeführt und die entstandenen Werte auf die Knochenfläche der jeweiligen adaptiven ROI normalisiert. Auch der Col X Gehalt wurde histomorphometrisch bestimmt. Die Normalisierung wurde auf die gesamte Knorpelmenge durchgeführt und auf diese Weise das Verhalten des Knorpels beschrieben. Das osteozytäre Netzwerk wurde in der Silbernitrat-Färbung dargestellt und die Osteozytenzahlen der verschiedenen Morphologien manuell mittels Hand-Klick-Zähler ermittelt. Auch hier wurde auf die Knochenfläche innerhalb der adaptiven ROI der Präparate normalisiert. Die immunhistochemische Markierung der Signalmoleküle RANK-L und OPG wurde getrennt nach Osteozyten und dem Knochen anliegenden Lining-Zellen betrachtet. Dabei wurde sowohl die Anzahl der RANK-L und OPG positiven Osteozyten als auch die RANK-L und OPG positive Fläche der Osteozyten und Lining-Zellen betrachtet. Die Normalisierung fand auch in diesem Fall auf die ausgewertete Knochenfläche innerhalb der ROIs der Präparate statt. Addition der RANK-L- und OPG-Expression der Osteozyten und Lining-Zellen ergab den Gesamtgehalt an RANK-L und OPG der Knochenzellen. Weiterhin wurden sämtliche normalisierten Werte dazu verwendet den RANK-L/ OPG-Quotienten zu berechnen. Dabei wurden sowohl die Anzahl der positiven Osteozyten, als auch die positive Fläche der Osteozyten und Lining-Zellen sowie der Gesamtgehalt betrachtet. Auf diese Weise wurde das Gleichgewicht der RANK-L- und OPG-Expression sowohl getrennt nach Zelltyp als auch insgesamt im Knochen betrachtet.

Dynamische Knochenvorgänge wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie der Präparate dargestellt. Dazu wurde die Distanz zweier Fluoreszenzmarkierungen vermessen und auf die Mineralisation pro Tag berechnet.

Eine erste deskriptive Auswertung zeigte, dass es sich in keinem Fall um eine Normalverteilung der Werte handelte. Zur Berechnung der Statistik wurde demnach der Mann-Whitney-U Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p=0,05$ festgelegt.

Material und Methoden

Grafisch wurden die Ergebnisse in Diagrammen präsentiert. Außer den Ergebnissen der Col X IHC wurden alle weiteren Ergebnisse als Balkendiagramm mit dargestellt. Dazu wurde der jeweilige Mittelwert zugrundegelegt und der Standardfehler als Fehlerbalken (± 1 Standardfehler) angezeigt. Im Falle der Col X IHC wurden die Ergebnisse mittels Boxplot präsentiert und der Median angezeigt.

5 Ergebnisse

5.1 Deskriptive Bewertung von Heilungsparametern in Toluidinblau Färbung

Die Qualität der Präparate wurde im ersten Schritt mithilfe der Toluidinblau Standardfärbung evaluiert. Neben dem Identifizieren der Defektzone wurde das Augenmerk insbesondere auf die trabekuläre und kortikale Dicke der Schnitte sowie die Größe des umgebenden Frakturkallus und die Knorpelmenge gelegt.

Lichtmikroskopisch wurden die Präparate bei 2,5-facher Vergrößerung begutachtet und die oben beschriebenen Merkmale in drei Ausprägungsgrade klassifiziert. In Bezug auf die trabekuläre Dicke (Abb. 20 A, Seite 64) fiel auf, dass die K Gruppe zu beiden Zeitpunkten ein kräftiges, gut vernetztes Trabekelwerk aufwies und der Median zum Zeitpunkt 8M größer war als zum Zeitpunkt 5M. In OVXD konnte nach 8M eine größere Dicke der Trabekel im Vergleich zum Zeitpunkt 5M gezeigt werden. Die OVX Gruppe wies zu beiden Zeitpunkten Trabekel mittlerer Dicke auf. Das zum Zeitpunkt 5M mitteldicke trabekuläre Netzwerk der OVXDS Gruppe, zeigte sich am Zeitpunkt 8M dünner und nur wenig vernetzt.

Für die kortikale Dicke (Abb. 20 C, Seite 64) konnten ähnliche Effekte nachgewiesen werden: In K konnte nach 8M eine kräftigere Kortikalis als nach fünfmonatiger Heilung gezeigt werden. Auch die OVXD Gruppe wies zum Zeitpunkt 8M eine größere Dicke als zum Zeitpunkt 5M auf. In OVX verblieb die Dicke der Kortikalis zu beiden Zeitpunkten auf stabil hohem Niveau. Analog zur geringeren trabekulären Dicke konnte in OVXDS ebenfalls eine verminderte Dicke der Kortikalis an beiden Zeitpunkten gezeigt werden.

Die deskriptive Graduierung der Größe des umgebenden Frakturkallus (Abb. 20 B, Seite 64) zeigte sowohl in K als auch in OVX zum Zeitpunkt 8M einen kleineren Kallus als zum Zeitpunkt 5M. Auch der Median der OVXD Gruppe lag zum Zeitpunkt 8M etwas tiefer als zum Zeitpunkt 5M. Die OVXDS Gruppe zeigte hingegen zu beiden Zeitpunkten einen ausgeprägten Frakturkallus.

Bei der Bewertung der Menge an knorpeligem Gewebe (Abb. 20 D, Seite 64) konnten in K nach achtmonatiger Heilung nur noch vereinzelte Bereiche nachgewiesen werden, zum Zeitpunkt 5M war die Knorpelmenge etwas größer. OVX wies zu beiden Zeitpunkten ein hohes Maß an knorpeliger Matrix auf. Der Median lag dabei zum Zeitpunkt 8M höher als zum Zeitpunkt 5M. In OVXD konnte zum Zeitpunkt 8M im Vergleich zum Zeitpunkt 5M vermehrt Knorpelgewebe nachgewiesen werden. Die

Ergebnisse

OVXDS-Gruppe wies zu beiden Zeitpunkten Knorpelgewebe auf, der Median lag zum Zeitpunkt 8M höher als nach fünfmonatiger Heilung.

Zusammenfassend wiesen die Gruppen OVX, OVXD und OVXDS zum Zeitpunkt 8M vermehrt Knorpelüberreste auf. Insbesondere für OVXD und OVXDS konnte zum Zeitpunkt 8M ein fortbestehender Frakturkallus gezeigt werden. Im Vergleich der Dicke der Trabekelstruktur und der Kortikalis wurden insbesondere in OVXDS zum Zeitpunkt 8M geringere Werte im Vergleich der Gruppen nachgewiesen.

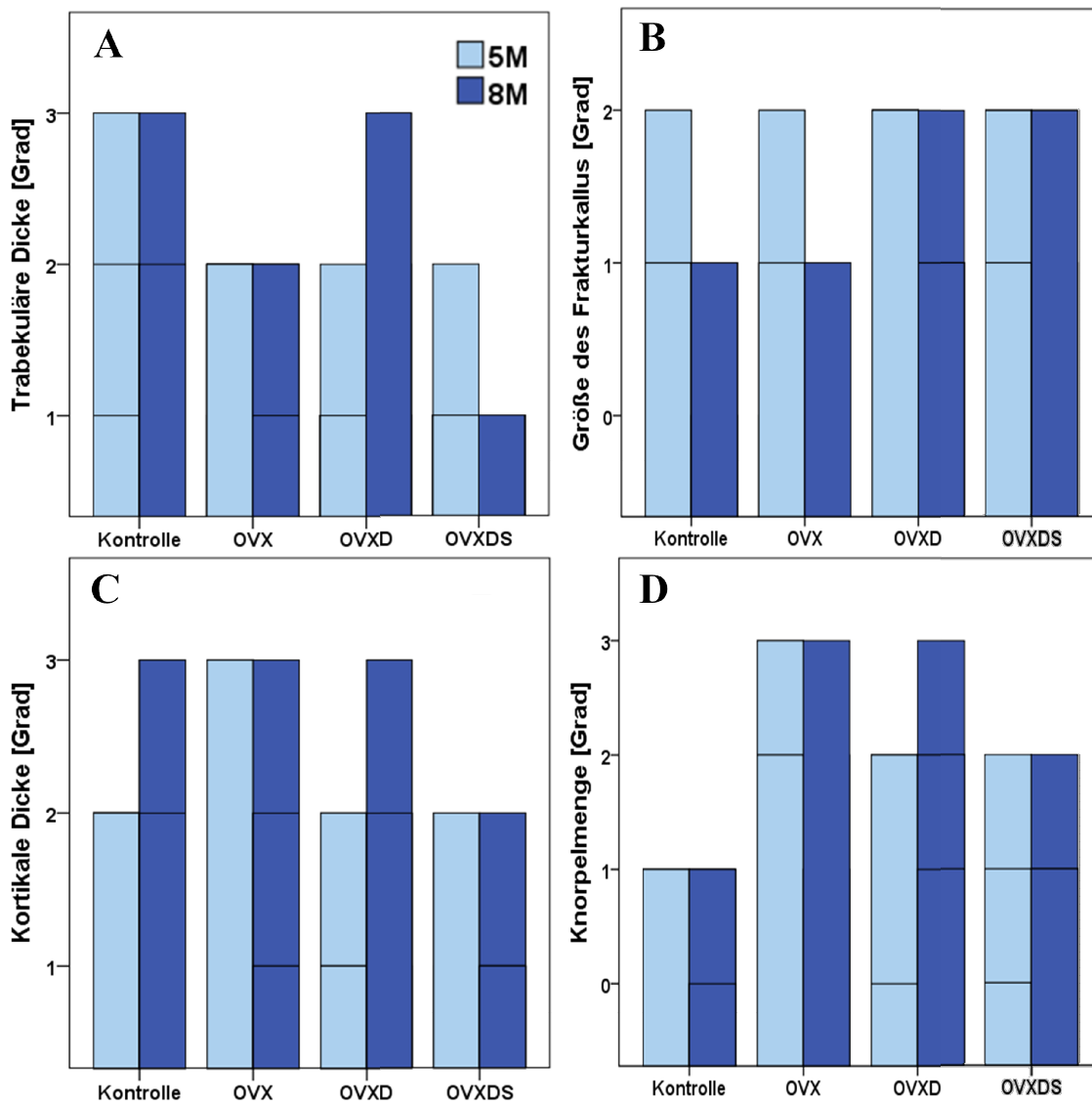


Abb. 20: Ergebnisgrafik der Frequenzanalyse.

Die Graduierung der Trabekeldicke (A) ergab insbesondere zum Zeitpunkt 8M in OVXDS ein rarefiziertes Trabekelwerk mit dünnen, schlecht vernetzten Trabekeln. Auch die kortikale Dicke (B) war in der OVXDS Gruppe nach achtmonatiger Heilung geringer als in den übrigen Gruppen. Dagegen war der Frakturkallus (C) in OVXD und OVXDS zum Zeitpunkt 8M stärker ausgeprägt als in K und OVX. Alle Gruppen wiesen zu beiden Untersuchungszeitpunkten im Vergleich zur Kontrolle Knorpelreste auf (D).

5.2 Histomorphometrische Quantifizierung der mineralisierten und nicht-mineralisierten Knochenbestandteile

In dieser Auswertung wurde der neu gebildete Knochen innerhalb der Defektzone (Abb. 21 A, schwarze Umrahmung, Seite 66) in die beiden Klassen mineralisierte Matrix und Osteoid (Abb. 21 B, mineralisierte Matrix grün, Osteoid rot, Seite 66) kategorisiert. Auf diese Weise konnte die Zusammensetzung des Knochens untersucht und mögliche Defizite aufgedeckt werden. Durch Bereinigen der Werte von der dritten Klasse (Hintergrund und umgebendes Gewebe, Abb. 21 B, violett, Seite 66) wurden die Messwerte im gleichen Schritt auf die Trabekelfläche der jeweiligen ROI normalisiert.

Nach fünfmonatiger Heilung war der Anteil der mineralisierten Matrix (Abb. 21 C, Seite 66) in OVXDS am größten (96,2941%) und unterschied sich signifikant von K (83,7234%, $p=0,013$) und OVXD (83,625%, $p=0,028$). Zwischen K, OVX (89,5636%) und OVXD wurde kein signifikanter Unterschied nachgewiesen. Auch nach achtmonatiger Heilung wies die OVXDS Gruppe mit 94,5315% den größten Anteil an mineralisierter Matrix auf. Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen OVXDS und (75,1905%) sowie OVXD (67,5247%, $p=0,028$) gezeigt werden. K, OVX (84,4289%) und OVXD Gruppe unterschieden sich nach achtmonatiger Heilung nicht signifikant voneinander. Innerhalb dieser Gruppen konnten zum Zeitpunkt 5M jeweils höhere Werte als zum Zeitpunkt 8M nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied lag nicht vor.

Der Anteil des Osteoids (Abb. 21 D, Seite 66) war nach fünfmonatiger Heilung in OVXDS (3,7059%) am niedrigsten. Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen OVXDS und K (16,2766%, $p=0,013$) sowie OVXD (16,375%, $p=0,028$) nachgewiesen. Zwischen K, OVX (10,4364%) und OVXD wurde kein signifikanter Unterschied gefunden. Nach achtmonatiger Heilung wies die OVXDS Gruppe ebenfalls den niedrigsten Osteoidanteil (5,4685%) auf, der sich signifikant von der OVXD Gruppe (32,4753%, $p=0,028$) unterschied. Die Werte der K (24,8095%), OVX (15,5711%) und OVXD Gruppe unterschieden sich untereinander nicht signifikant. Zwischen den Zeitpunkten wiesen sämtliche Gruppen zum Zeitpunkt 8M höhere Osteoidanteile als zum Zeitpunkt 5M auf. Eine Signifikanz lag nicht vor.

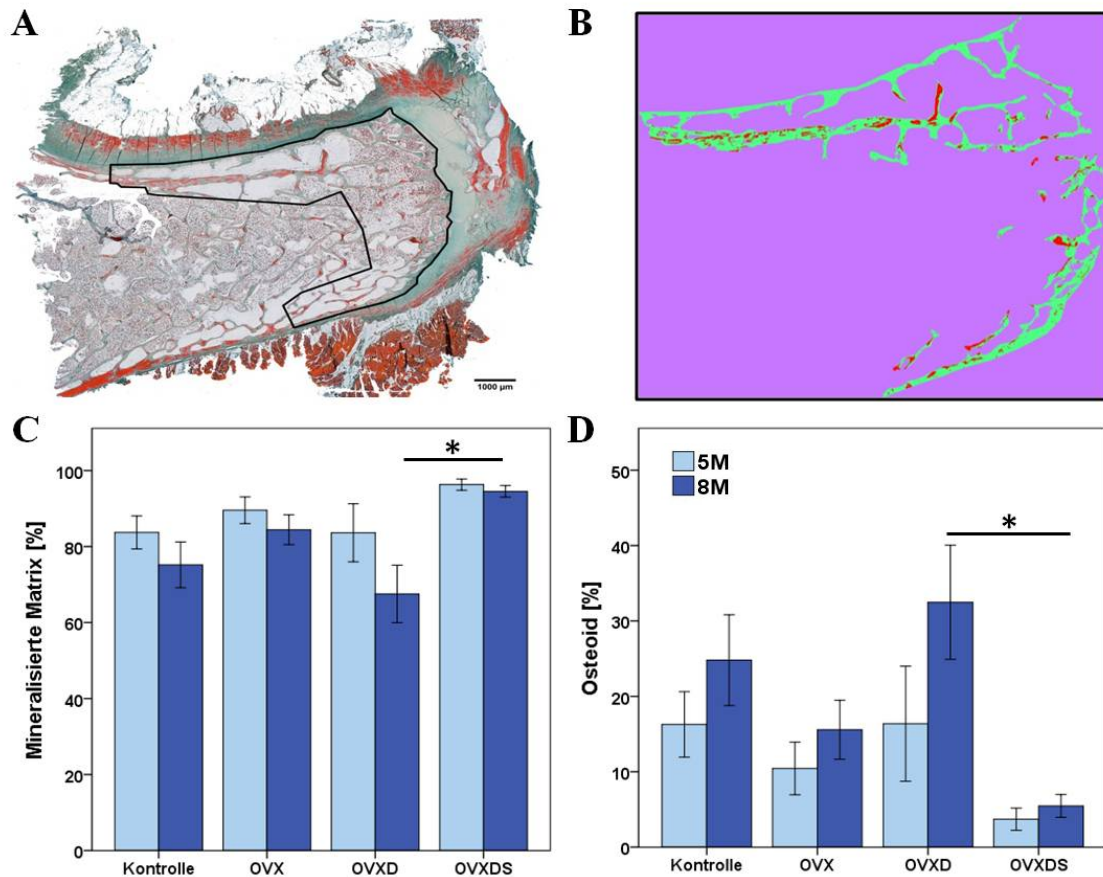


Abb. 21: Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung der Defektzone.

Im ersten Schritt (A) wurde für jedes Präparat (hier OVXD Gruppe zum Zeitpunkt 8M) anhand histologischer Parameter eine adaptive ROI (schwarze Markierung) definiert. Gewebe außerhalb der ROI wurde entfernt und die „Trainable Weka Segmentation“ innerhalb der ROI durchgeführt. Die Ergebnisgrafik (B) zeigt die Aufteilung in mineralisiert (grün), Osteoid (rot) sowie Hintergrund/weiteres Gewebe (violett). Prozentual konnten in OVXDS die größten Anteile der mineralisierten Matrix (C) zu beiden Zeitpunkten gefunden werden. Osteoid (D) war hingegen zu beiden Zeitpunkten (5M, 8M) am geringsten ausgeprägt.

5.3 Analyse der Knochenqualität mittels Col I IHC

Die Bestimmung des knochentypischen Col I wurde dazu verwendet, den neu gebildeten Knochen innerhalb der ROI hinsichtlich seiner Qualität zu beurteilen. Ein hoher Gehalt an Col I zusammen mit einer ausreichenden Mineralisierung sorgt im ausgereiften Knochengewebe für die nötige Stabilität bei gleichzeitiger Flexibilität des Skeletts. Der mittels ImageJ bestimmte prozentuale Anteil des neu gebildeten Col I wurde zur besseren Vergleichbarkeit auf die jeweilige Trabekelfläche der ROI normalisiert.

Die K Gruppe wies mit einem mittleren Gehalt an Col I von 2,9389%/ μm^2 nach achtmonatiger Heilung einen nahezu doppelt so hohen Col I Gehalt als nach fünfmonatiger Heilung (1,6678%/ μm^2) auf (Abb. 22, Seite 68). Es konnte ein signifikanter Unterschied ($p=0,041$) nachgewiesen werden. Ein ähnlicher Heilungsverlauf konnte in OVX gezeigt werden: Zum Zeitpunkt 5M betrug der Col I Gehalt 1,537%/ μm^2 , nach achtmonatiger Heilung wurde 3,0573%/ μm^2 gemessen. Für die OVXD Gruppe wurden zu beiden Zeitpunkten nahezu identische Werte bestimmt (5M: 1,3521%/ μm^2 , 8M: 1,271%/ μm^2). Nach achtmonatiger Heilung wurde somit ein etwas geringerer Kollagengehalt als nach fünfmonatiger Heilung ermittelt. In OVXDS betrug der Col I Gehalt zum Zeitpunkt 5M lediglich 0,76%/ μm^2 . Nach achtmonatiger Heilung konnte ein höherer, jedoch nicht signifikanter Col I Anteil von 1,0154%/ μm^2 nachgewiesen werden.

Im Vergleich der Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt konnte nach fünfmonatiger Heilung in K der höchste Gehalt an Col I nachgewiesen werden. OVX zeigte einen gering niedrigeren Gehalt als K, OVXD wiederum einen geringeren Wert als die OVX Gruppe. Für OVXDS wurde zum Zeitpunkt 5M der geringste Col I Anteil nachgewiesen, der nur etwa 50% des Wertes der K Gruppe betrug. Dieser Unterschied war auf dem 5-Prozent-Niveau signifikant ($p=0,023$). Durch die Gruppen hinweg wurde ein stetig fallender Kollagengehalt zum Zeitpunkt 5M beobachtet.

Zum Zeitpunkt 8M konnte ein anderer Verlauf zwischen den Gruppen skizziert werden: K wies größere Werte an Col I als die OVXD ($p=0,004$) und OVXDS ($p=0,002$). Gruppe auf. In OVX zeigte sich ebenfalls ein höherer Wert als nach 5M, die Unterschiede zu OVXD ($p=0,026$) und OVXDS ($p=0,026$) nach 8M waren signifikant. Sowohl die doppelt- als auch die dreifach behandelte Versuchstiergruppe zeigte dabei nur rund ein Drittel des Gehaltes an Col I im Vergleich zur K und OVX Gruppe. Der Wert der OVXDS Gruppe war am geringsten.

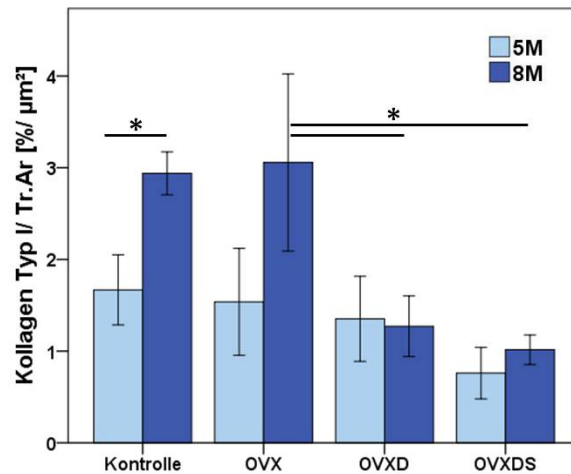


Abb. 22: Ergebnisse der Kollagen Typ I Immunhistochemie.

Zum Zeitpunkt 5M konnten zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Jedoch scheint der Kollagen Typ I-Gehalt mit zunehmenden Behandlungen schwach negativ korreliert zu sein. Nach achtmonatiger Heilung zeigten K und OVX einen signifikant größeren Kollagen Typ I-Gehalt als zum Zeitpunkt 5M. In OVXD und OVXDS unterschied sich der Kollagengehalt zum Zeitpunkt 8M nicht signifikant im Vergleich zum Zeitpunkt 5M der gleichen Gruppe.

5.4 Detektion von hypertrophem Knorpel durch Col X IHC

Während der enchondralen Knochenbildung durchläuft der Knorpel verschiedene Stadien bevor die Mineralisation zu neuer Knochensubstanz stattfindet. Im finalen Schritt vor Mineralisierung hypertrophieren die Knorpelzellen und exprimieren Col X. Die immunhistochemische Markierung dieses Kollagentyps kann daher zur Differenzierung zwischen proliferativem und hypertrophem Knorpel herangezogen werden.

Nach fünfmonatiger Heilung war der Median von Col X in Bezug zum gesamten Knorpel in K mit 13,9178% gegenüber allen weiteren Gruppen am größten (Abb. 23, Seite 69). Die Werte der OVX (9,2777%) und der OVXDS Gruppe (9,4858%) ähnelten sich dabei zum Zeitpunkt 5M. In OVXD war der Col X-Gehalt mit 6,6123% am geringsten.

Durch den physiologischen Heilungsverlauf wird die Knorpelsubstanz immer weiter in mineralisierte Knochenmatrix umgewandelt. In K lag daher der Median der Col X-Expression nach achtmonatiger Heilung bei 12,2211% und war damit geringer als zum Zeitpunkt 5M. OVX zeigte nach achtmonatiger Heilung (10,7475%) hingegen einen vergleichbaren Col X-Gehalt zum Zeitpunkt 5M. In der OVXD Gruppe war der Col X-Gehalt zum Zeitpunkt 8M mit 10,8036% im Vergleich zum Zeitpunkt 5M größer. Die Heilungsvorgänge finden mit einer Verzögerung statt.

Viele Präparate der OVXDS Gruppe zum Zeitpunkt 8M wiesen lichtmikroskopisch nur eine diffuse Verteilung des Col X auf. Knorpelmatrix war nur in einem Fall sicher zu identifizieren. Nach achtmonatiger Heilung wurde in OVXDS ein Col X-Gehalt von 7,8446% ermittelt. Im Vergleich aller Gruppen war der Anteil von hypertrophem Knorpel in OVXDS gegenüber den weiteren Gruppen am geringsten.

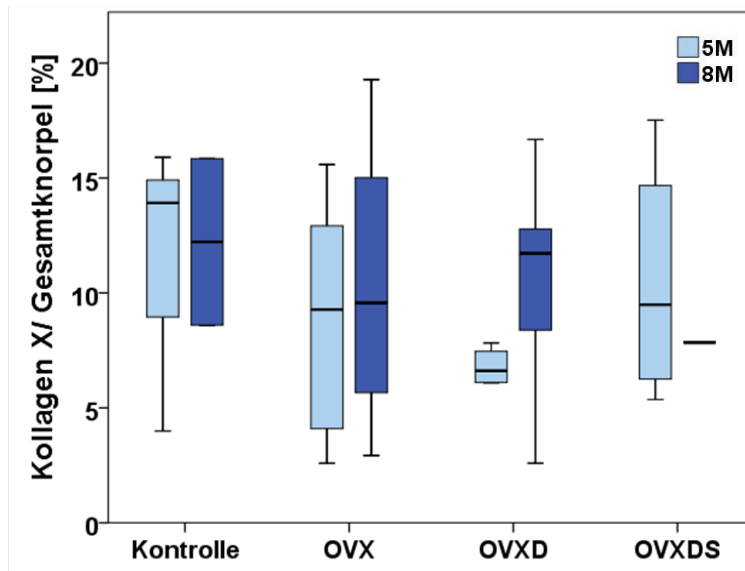


Abb. 23: Ergebnisse der Kollagen Typ X Immunhistochemie.

Die Kontrollgruppe zeigte nach fünfmonatiger Heilung den größten Anteil hypertropher Knorpelmatrix im Vergleich aller Gruppen. Zum Zeitpunkt 8M lag ein geringerer Anteil an Col X vor. OVX zeigte zu beiden Untersuchungszeitpunkten vergleichbare Werte. In OVXD war der Col X Gehalt nach achtmonatiger Heilung größer als zum Zeitpunkt 5M. OVXDS zeigte zum Zeitpunkt 8M den geringsten Col X-Gehalt.

5.5 Darstellung des Osteozytennetzwerks in Silbernitratfärbung

Diese Färbemethode lässt genaue Aussagen über die Anzahl und die Morphologie der Osteozyten und deren kanalikuläres Netzwerk zu. Jeweils drei Präparate jeder Versuchstiergruppe zu beiden Zeitpunkten wurden zu diesem Zweck innerhalb der adaptiven ROI manuell ausgezählt und die Osteozytenmorphologien den Untergruppen spindelförmig, rund oder apoptotisch zugewiesen und auf die jeweilige Trabekelfläche normalisiert.

In der Betrachtung der gesamten Osteozytenanzahl (Abb. 24 D, Seite 72) konnte für die K Gruppe zum Zeitpunkt 8M (63,5265/ mm²) ein höherer Wert als zum Zeitpunkt 5M (148,6384/ mm²) ermittelt werden. Auch OVX zeigte nach achtmonatiger Heilung (219,8455/ mm²) höhere Werte als zum Zeitpunkt 5M (147,9438/ mm²). Ein signifikanter Unterschied konnte für beide Gruppen nicht nachgewiesen werden. Die

Ergebnisse

OVXD Gruppe wies zu beiden Zeitpunkten nahezu identische Osteozytenzahlen auf (5M: 164,4320/ mm²; 8M: 164,1607/ mm²). Für OVXDS wurde zum Zeitpunkt 8M (62,1421/ mm²) ein geringerer Wert als zum Zeitpunkt 5M (111,2907/ mm²) ermittelt. Zu beiden Zeitpunkten wies OVXDS die geringsten Osteozytenzahlen auf. Nach achtmonatiger Heilung war der Wert signifikant am geringsten gegenüber allen weiteren Gruppen (K: p=0,05, OVX: p=0,05, OVXD: p=0,05), zum Zeitpunkt 5M konnte eine Signifikanz gegenüber der OVX (p=0,05) und OVXD (p=0,05) gezeigt werden.

Die Kontrolle wies zu beiden Zeitpunkten im Vergleich der Gruppen die größten Anteile der spindelförmigen Osteozyten auf (Abb. 24 B, Seite 72). Nach fünfmonatiger Heilung (32,3511/ mm²) lag der Wert etwas höher als zum Zeitpunkt 8M (31,1771/ mm²). Alle weiteren Tiergruppen zeigten nach achtmonatiger Heilung höhere Werte als nach fünfmonatiger Heilung: OVX wies zum Zeitpunkt 5M durchschnittlich 18,8089/ mm² auf, zum zweiten Zeitpunkt 22,7923/ mm². Für OVXD wurden nach fünfmonatiger Heilung 12,9403/ mm² und zum Zeitpunkt 8M 17,8072/ mm² gezählt. Die OVXDS Gruppe zeigte zum Zeitpunkt 5M durchschnittlich 5,6905/ mm² und zum Zeitpunkt 8M 12,59587/ mm². Ein signifikanter Unterschied konnte für keine Versuchstiergruppe zwischen den Zeitpunkten nachgewiesen werden. Im Vergleich der Gruppen zu den Zeitpunkten fiel auf, dass die Werte der K bis zur OVXDS Gruppe zu beiden Zeitpunkten stetig geringer wurden. Eine negative Korrelation der Anzahl spindelförmiger Osteozyten und der Behandlungen kann angenommen werden. Signifikante Unterschiede wurden zwischen K und OVXD (jeweils p=0,05) zu beiden Zeitpunkten sowie zwischen der K und der OVXDS (p=0,05) zum Zeitpunkt 5M beobachtet.

Der Anteil der runden Osteozyten (Abb. 24 A, Seite 72) war in den ersten drei Versuchstiergruppen nach achtmonatiger Heilung größer als zum Zeitpunkt 5M: Für K wurde zum ersten Zeitpunkt eine Anzahl von 102,9717/ mm² bestimmt, zum Zeitpunkt 8M 111,1483/ mm². In OVX lag der Wert zum Zeitpunkt 5M bei 70,939/ mm² und zum Zeitpunkt 8M bei 137,2606/ mm². Die Zählung ergab in OVXD nach fünfmonatiger Heilung 91,0285/ mm² und zum zweiten Zeitpunkt 99,3127/ mm². Für OVXDS wurde zum Zeitpunkt 8M (26,3691/ mm²) eine signifikant niedrigere Anzahl runder Osteozyten als zum Zeitpunkt 5M (40,8778/ mm², p=0,05) bestimmt.

Der Quotient aus der Anzahl der spindelförmigen und den runden Osteozyten (Abb. 24 C, Seite 72) lieferte folgende Ergebnisse: Die K Gruppe wies zum Zeitpunkt 5M

(0,3323) einen höheren Wert als nach achtmonatiger Heilung (0,2890) auf. Auch OVX zeigte mit einem Quotient von 0,1716 zum zweiten Zeitpunkt einen geringeren Wert als zum Zeitpunkt 5M (0,2816). In den weiteren Gruppen konnte ein gegenteiliger Verlauf gezeigt werden: OVXD wies nach fünfmonatiger Heilung (0,1385) einen geringeren Wert als zum Zeitpunkt 8M (0,1827) auf. In OVXDS unterschieden sich die Werte signifikant: Zum Zeitpunkt 8M wurde ein Quotient von 0,4089 errechnet, am ersten Zeitpunkt betrug er 0,1417 ($p=0,05$). Im Vergleich der Gruppen unterschied sich K zum Zeitpunkt 5M signifikant von OVXD ($p=0,05$) und OVXDS ($p=0,05$) und wies insgesamt den höchsten Wert auf. Zum Zeitpunkt 8M wurde ein signifikanter Unterschied zwischen K und OVX ($p=0,05$) berechnet, die OVXDS Gruppe lieferte den höchsten Wert.

In der Betrachtung der apoptotischen Osteozyten (Abb. 24 E, Seite 72) wurden für die Gruppen folgende Werte bestimmt: Die K Gruppe lieferte zum Zeitpunkt 5M (13,3156/ mm²) einen niedrigeren Wert als zum zweiten Zeitpunkt (21,2011/ mm²). In OVX wurden zu beiden Zeitpunkten ähnliche Werte (5M: 58,1950/ mm²; 8M: 59,7926/ mm²) ermittelt. OVXD wies nach achtmonatiger Heilung (47,0408/ mm²) einen geringeren Wert als zum Zeitpunkt 5M (60,463/ mm²) auf. Für die dreifach therapierte OVXDS Gruppe wurde am zweiten Untersuchungszeitpunkt (23,1773/ mm²) ein signifikant niedrigerer Wert als zum Zeitpunkt 5M (64,7223/ mm², $p=0,05$) gezeigt. Im Vergleich der Gruppen war der Wert in K nach fünfmonatiger Heilung gegenüber allen anderen Gruppen signifikant am niedrigsten (OVX: $p=0,05$, OVXD: $p=0,05$, OVXDS: $p=0,05$) und betrug lediglich rund 20% gegenüber dem Wert in OVXDS. Auch zum Zeitpunkt 8M war der Wert in K am geringsten, OVX wies den größten Anteil auf. Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen OVX und OVXDS ($p=0,05$) berechnet.

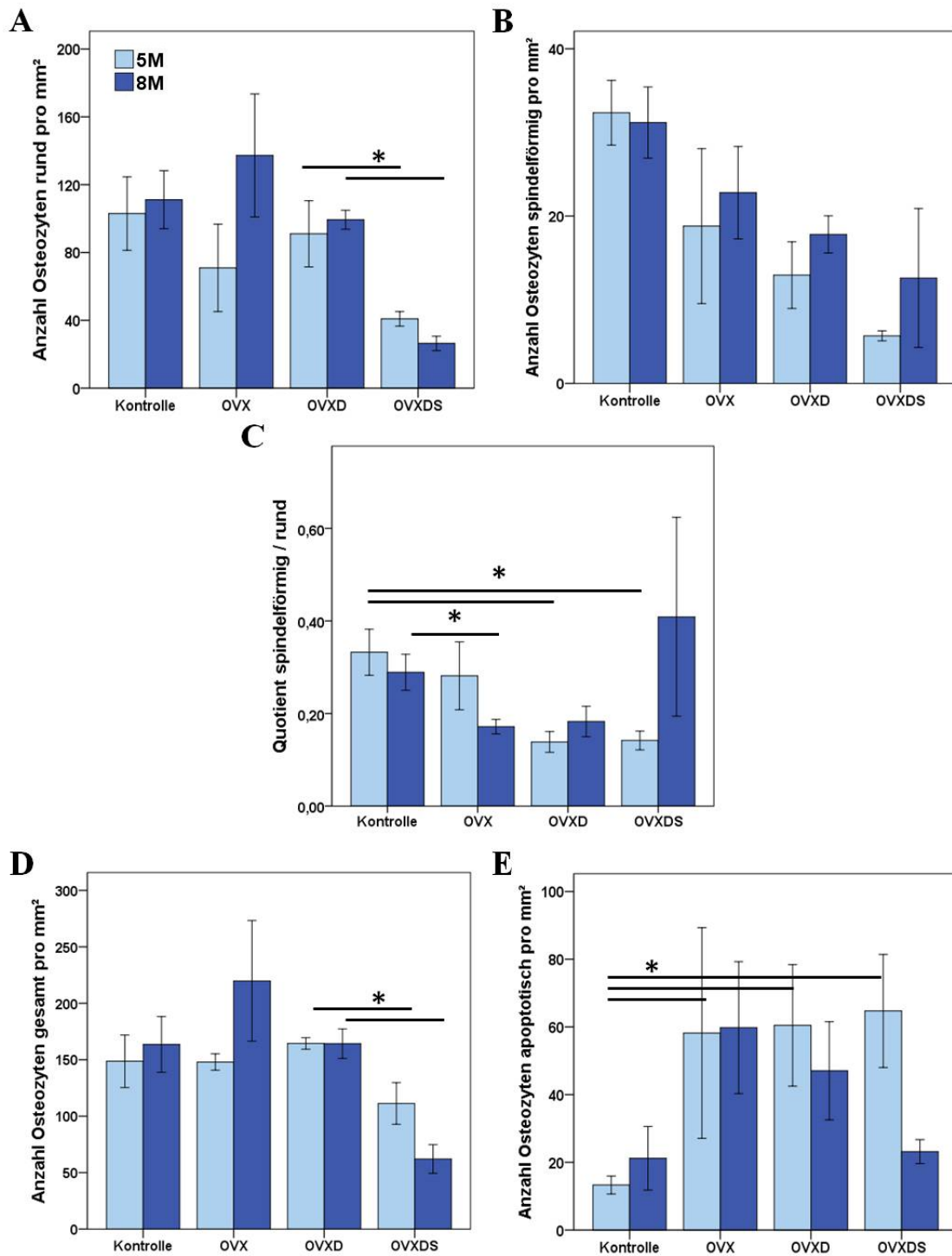


Abb. 24: Ergebnisse der Analyse der Osteozytenmorphologie und -anzahl.

Die Anzahl runder Osteozyten (A) war in OVXDS zu beiden Zeitpunkten am geringsten. Die weiteren Gruppen zeigten im Gegensatz zu OVXDS zum Zeitpunkt 8M mehr runde Osteozyten als zum Zeitpunkt 5M. Die Anzahl spindelförmiger Osteozyten (B) ist zu beiden Zeitpunkten mit zunehmender Behandlung negativ korreliert. K und OVX zeigten nach fünfmonatiger Heilung ein größeres Verhältnis spindelförmiger zu runden Osteozyten (C) als zum Zeitpunkt 8M. OVXD und OVXDS zeigten einen gegenteiligen Verlauf. Die Gesamtzahl der Osteozyten (D) war in OVXDS zu beiden Zeitpunkten am geringsten. Dabei lagen zum Zeitpunkt 5M die meisten apoptotischen Osteozyten (E) in OVXDS vor.

5.6 RANK-L- und OPG-Immunhistochemie

Osteoporose ist eine systemische Knochenerkrankung, die auf einem Ungleichgewicht der knochenbildenden Osteoblasten und den knochenresorbierenden Osteoklasten basiert. Die Regulation dieser Zellen unterliegt verschiedenen komplexen Signalwegen. RANK-L und OPG gehören zu den zentralen Regulationsmolekülen der Knochenzellen und steuern die Aktivierung sowie Rekrutierung insbesondere der Osteoklasten. In dieser Arbeit wurde die Expression von RANK-L und OPG (angefärbte Fläche) innerhalb der adaptiven ROI sowohl histomorphometrisch quantifiziert als auch in Osteozyten und dem Trabekelwerk außen anliegende Lining-Zellen differenziert. Aus diesen Werten wurde der Gesamtgehalt des zellulären RANK-L und OPG berechnet. Positiv angefärbte Osteozyten wurden gezählt und unter den Gruppen verglichen. Das Gleichgewicht der Regulierung wurde als Quotient der RANK-L- und OPG-Expression sowohl gesamt als auch auf die Zelltypen verteilt dargestellt. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde durch Normalisierung auf die Trabekelfläche innerhalb der ROI gewährleistet.

5.6.1 Aktivierung der Osteoklasten durch RANK-L-Expression

Die Quantifizierung der RANK-L positiven Osteozyten (Abb. 25 A, Seite 75) ergab in jeder Versuchsgruppe höhere Werte zum Zeitpunkt 8M im Vergleich zum Zeitpunkt 5M. K wies nach fünfmonatiger Heilung eine Zellzahl von $0,000323/\mu\text{m}^2$ auf. Zum Zeitpunkt 8M wurde die etwa doppelte Anzahl nachgewiesen ($0,000639/\mu\text{m}^2$). In OVX wurden zum Zeitpunkt 5M $0,000403/\mu\text{m}^2$ gezählt. Zum Zeitpunkt 8M wurde eine Verdreifachung der Zellzahl auf $0,001219/\mu\text{m}^2$ beobachtet. Signifikante Unterschiede wurden sowohl innerhalb der OVX Gruppe ($p=0,028$) als auch zwischen K und OVX zum Zeitpunkt 8M ($p=0,028$) gezeigt. Die Zellzahl der RANK-L positiven Osteozyten lag in OVXD zum Zeitpunkt 5M bei $0,000373/\mu\text{m}^2$. Nach achtmonatiger Heilung wurde eine mehr als zehnfache Zellzahl ($0,00433/\mu\text{m}^2$) im Vergleich zum Zeitpunkt 5M gezeigt. Signifikante Unterschiede wurden zum Zeitpunkt 8M sowohl zwischen K und OVX ($p=0,028$) als auch zwischen K und OVXD ($p=0,012$) berechnet. Auch innerhalb der OVXD Gruppe unterschieden sich die Zellzahlen zu beiden Zeitpunkten signifikant ($p=0,028$). Nach fünfmonatiger Heilung wurde eine Signifikanz zwischen OVXD und OVXDS ($0,000124/\mu\text{m}^2$, $p=0,011$) gezeigt. In der OVXDS Gruppe wurde zum Zeitpunkt 8M eine knapp 37-fach erhöhte Anzahl ($0,004587/\mu\text{m}^2$) der RANK-L positiven Osteozyten beobachtet. Damit unterschieden sich die Werte der OVXDS

Ergebnisse

Gruppe nach achtmonatiger Heilung sowohl von K ($p=0,009$) als auch von OVX ($p=0,018$) signifikant. Innerhalb OVXDS unterschieden sich die Werte ebenfalls signifikant ($p=0,009$).

Histomorphometrisch wurde die RANK-L positive Fläche ermittelt. In Bezug auf die osteozytäre Expression (Abb. 25 B, Seite 75) wurde in jeder Tiergruppe eine größere Menge RANK-L pro Trabekelfläche zum Zeitpunkt 8M im Vergleich zum Zeitpunkt 5M gezeigt. Die K Gruppe zeigte zum Zeitpunkt 5M ein RANK-L-Gehalt von 0,90186%. Zum Zeitpunkt 8M wurde ein RANK-L-Gehalt von 1,699277% bestimmt. In OVX wurde zum Zeitpunkt 5M ein osteozytärer RANK-L-Gehalt von 0,829901% nachgewiesen, zum Zeitpunkt 8M lag er bei 1,627872%. Der Wert von OVX unterschied sich zum Zeitpunkt 5M signifikant vom RANK-L-Gehalt in OVXD (2,106235%, $p=0,045$). Nach achtmonatiger Heilung lag der RANK-L-Anteil in OVXD bei 7,26934% und unterschied sich damit signifikant vom Wert der OVX Gruppe ($p=0,022$) zum gleichen Zeitpunkt. In OVXDS Gruppe lag der Wert der osteozytären RANK-L-Expression zum Zeitpunkt 5M bei 1,678601%. Eine Signifikanz wurde im Vergleich zu K ($p=0,045$) berechnet. Die insgesamt größte osteozytäre RANK-L-Expression im Vergleich aller Gruppen wurde in OVXDS nach achtmonatiger Heilung (13,570773%) gezeigt. Damit war der Wert zum Zeitpunkt 8M etwa achtfach höher als zum Zeitpunkt 5M und unterschied sich signifikant ($p=0,009$). Weitere Signifikanzen wurden zum Zeitpunkt 8M zwischen OVXDS und OVX ($p=0,006$) sowie K ($p=0,009$) gezeigt. Bei Betrachtung der Lining-Zellen fiel augenscheinlich auf, dass die Werte der RANK-L-Expression zum Zeitpunkt 8M geringer im Vergleich zum Zeitpunkt 5M waren (Abb. 25 C, Seite 75). Für K wurde nach fünfmonatiger Heilung ein RANK-L-Anteil von 6,333583% bestimmt, zum Zeitpunkt 8M lag der Wert bei 2,454811%. OVX zeigte zum Zeitpunkt 5M einen RANK-L-Gehalt von 5,321284%. Nach achtmonatiger Heilung lag der Wert bei 1,863066% und war somit signifikant geringer ($p=0,045$). Auch in OVXD war der Wert der RANK-L-Expression zum Zeitpunkt 8M (2,470367%) geringer als nach fünfmonatiger Heilung (7,286134%). Die insgesamt höchste RANK-L-Expression der Lining-Zellen wurde zu beiden Zeitpunkten in OVXDS gezeigt. Nach fünfmonatiger Heilung wurde ein Anteil von 12,047199% nachgewiesen. Zum Zeitpunkt 8M lag der Wert der OVXDS Gruppe bei 10,277964% und war damit signifikant höher als der RANK-L-Gehalt aller anderen Gruppen (K: $p=0,009$, OVX: $p=0,006$, OVXD: $p=0,006$). Nach Addition der Werte der osteozytären als auch der RANK-L-Expression der Lining-Zellen ergab sich ein anderes Muster der

RANK-L-Expression (Abb 25 D, Seite 75): In K (7,235443%) und OVX (6,151185%) war der Wert zum Zeitpunkt 5M höher als zum Zeitpunkt 8M (K: 4,154088%; OVX: 3,490938%). Gegenteiliger Effekt wurde für OVXD und OVXDS gezeigt. In OVXD wurde nach fünfmonatiger Heilung ein RANK-L-Anteil von 9,392369% nachgewiesen. Zum Zeitpunkt 8M lag der Wert bei 10,41076%. Die zu beiden Zeitpunkten höchsten Werte wurden in OVXDS gezeigt: Nach fünfmonatiger Heilung lag der RANK-L-Gehalt bei 13,725799%. Zum Zeitpunkt 8M wurde ein Anteil von 23,848737% nachgewiesen, der somit signifikant größer war als die Anteile in K ($p=0,009$), OVX ($p=0,006$) und OVXD ($p=0,028$).

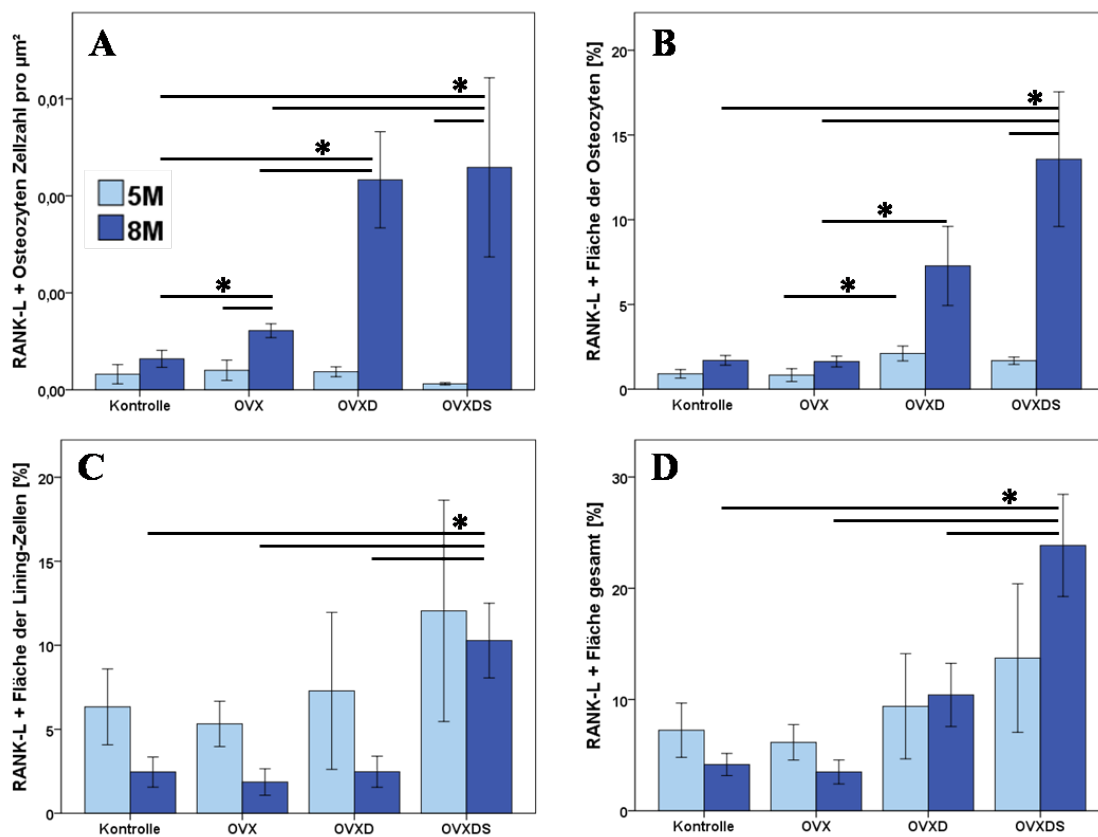


Abb. 25: Ergebnisse der RANK-L Immunhistochemie.

Die Anzahl der RANK-L positiven Osteozyten (A) war in OVXD und OVXDS zum Zeitpunkt 8M signifikant größer als in K und OVX. Die histomorphometrisch bestimmte RANK-L positive Fläche der Osteozyten (B) war in OVXDS zum Zeitpunkt 8M am größten. Auch die Lining-Zellen (C) zeigten dieses Expressionsmuster. Der RANK-L Gesamtgehalt (D) war somit in OVXDS zum Zeitpunkt 8M ebenfalls signifikant am größten. Dabei ist der Anteil der Osteozyten am Gesamtwert größer als der Anteil der Lining-Zellen.

5.6.2 Inhibition der Osteoklastenaktivierung durch RANK-L-Fehlrezeptor OPG

Die OPG positiv markierten Osteozyten (Abb. 26 A, Seite 77) wurden gezählt und die Anzahl auf die Trabekelfläche normalisiert. In K lag die Anzahl pro μm^2 bei 0,000302 zum Zeitpunkt 5M. Zum Zeitpunkt 8M wurde in K eine Anzahl von 0,000508/ μm^2 bestimmt. Auch in OVX konnte zum Zeitpunkt 8M (0,000631/ μm^2) eine höhere Anzahl im Vergleich zum Zeitpunkt 5M (0,000353/ μm^2) bestimmt werden. Zu beiden Zeitpunkten waren die Zellzahlen in OVXD am größten, mit gering größerer Anzahl nach 8M (0,000676/ μm^2) als zum Zeitpunkt 5M (0,000656/ μm^2). Signifikanzen wurden zum Zeitpunkt 5M zwischen OVXD und den weiteren Gruppen (K: $p=0,028$, OVX: $p=0,014$, OVXDS: $p=0,04$) berechnet. Ein signifikanter Unterschied nach 8M wurde zwischen OVXD und OVXDS (0,000346/ μm^2 , $p=0,042$) gezeigt. OVXDS zeigte im Vergleich der Gruppen höhere Osteozytenzahlen nach fünfmonatiger Heilung (0,000409/ μm^2) im Vergleich zum Zeitpunkt 8M. Die histomorphometrisch bestimmte OPG positive osteozytäre Expression (Abb. 26 B, Seite 77) war in K zu beiden Zeitpunkten am geringsten. Nach fünfmonatiger Heilung lag die OPG positive Fläche der Osteozyten bei 0,537882%, zum Zeitpunkt 8M wurde ein Anteil von 0,866525% nachgewiesen. Damit war der Wert in K zum Zeitpunkt 5M signifikant am geringsten im Vergleich aller Gruppen (OVX: $p=0,006$, OVXD: $p=0,003$, OVXDS: $p=0,016$). OVX wies einen OPG-Gehalt von 1,527377% zum Zeitpunkt 5M auf. Nach achtmonatiger Heilung war er mit 1,376878% etwas geringer. OVXD wies zu beiden Zeitpunkten die größten OPG-Anteile auf. Zum Zeitpunkt 5M (2,499848%) war der Wert in OVXD im Vergleich aller Versuchstiergruppen signifikant am größten (K: $p=0,003$, OVX: $p=0,039$, OVXDS: $p=0,008$). Innerhalb OVXD war der OPG-Anteil zum Zeitpunkt 8M (1,556118%) signifikant geringer als nach 5M ($p=0,049$). In OVXDS wurde zum Zeitpunkt 5M ein OPG-Gehalt von 1,157361% nachgewiesen. Nach achtmonatiger Heilung war der Wert mit 1,318732% gering höher. Der OPG-Gehalt der Lining-Zellen (Abb. 26 C, Seite 77) war in allen Tiergruppen zum Zeitpunkt 8M geringer als zum Zeitpunkt 5M. Nach fünfmonatiger Heilung lag der Wert in K bei 7,63419%, in OVX bei 3,503648%, in OVXD bei 5,618266% und in OVXDS bei 11,791969%. Signifikante Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden. In der K Gruppe lag der OPG-Gehalt der Lining-Zellen zum Zeitpunkt 8M bei rund einem Sechstel (1,268064%) des Wertes zum Zeitpunkt 5M. Ein signifikanter Unterschied wurde in OVX gezeigt: Nach achtmonatiger Heilung lag der Wert bei 0,56466% ($p=0,006$). OVXD wies zum Zeitpunkt 8M einen OPG-Gehalt von 2,630664% der

Lining-Zellen auf. Die Werte in OVXDS waren zu beiden Zeitpunkten am größten. Zum Zeitpunkt 8M wurde eine Signifikanz zwischen OVXDS (5,211268%) und OVX ($p=0,047$) berechnet. Bei Betrachtung des gesamten zellulären OPG-Gehaltes waren die Werte in OVXDS am größten. Zum Zeitpunkt 5M lag der Wert der OVXDS Gruppe bei 12,94933% und somit etwa doppelt so hoch im Vergleich zum Zeitpunkt 5M (6,53%). Signifikante Unterschiede wurden zwischen den Zeitpunkten innerhalb OVX ($p=0,006$) und OVXD ($p=0,049$) gezeigt: OVX wies zum Zeitpunkt 5M einen gesamtzellulären OPG Gehalt von 5,031025% und zum Zeitpunkt 8M von 1,537976% auf. In OVXD wurde nach fünfmonatiger Heilung ein Wert von 8,118115% nachgewiesen. Zum Zeitpunkt 8M lag der OPG-Gehalt bei 4,186781%. Der OPG Anteil in K lag zum Zeitpunkt 5M bei 8,172081% und damit etwa vierfach höher als nach 8M (2,191016%).

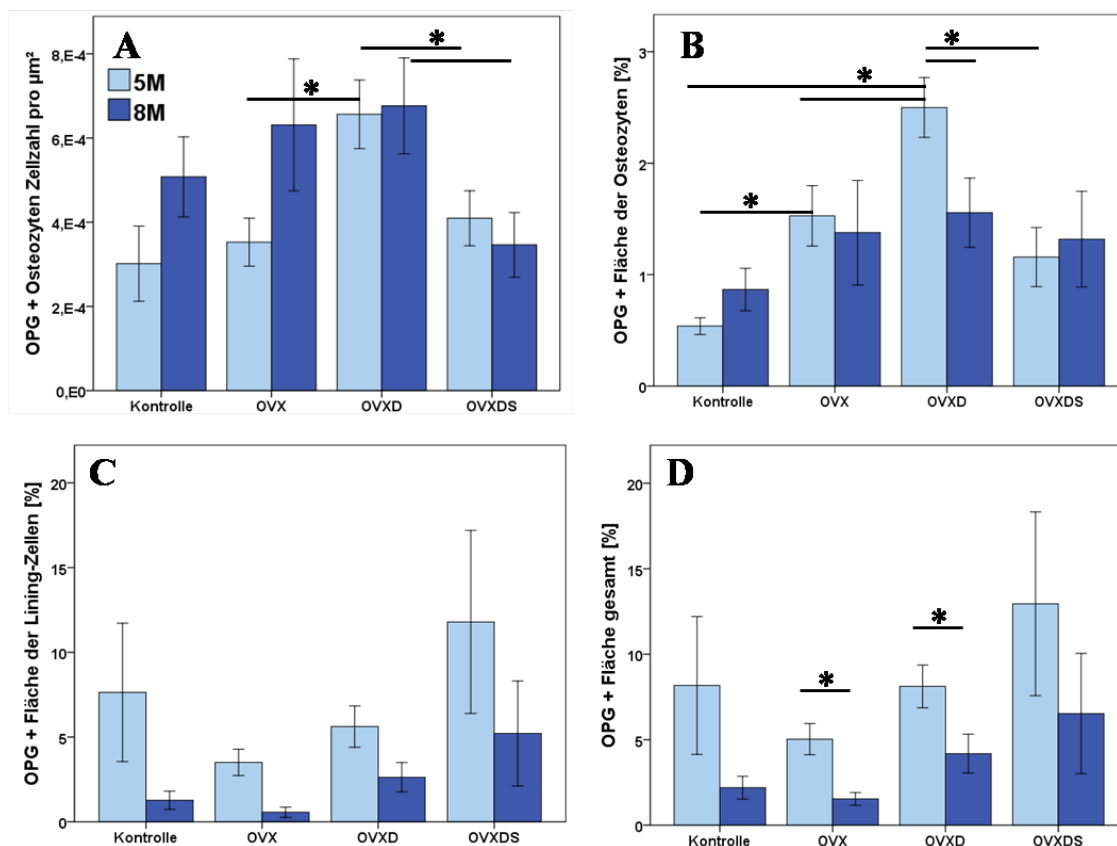


Abb. 26: Ergebnisse der OPG Immunhistochemie.

Die Anzahl OPG positiver Osteozyten (A) war zum Zeitpunkt 8M kleiner als zum Zeitpunkt 5M. Die OPG positive Fläche der Osteozyten (B) verhielt sich umgekehrt. Der OPG Gehalt der Lining-Zellen (C) war in OVXDS zu beiden Zeitpunkten am größten. Auch insgesamt (D) war der OPG Gehalt zu beiden Zeitpunkten in OVXDS am größten und wurde maßgeblich durch die Lining-Zellen bestimmt.

5.6.3 Gleichgewicht der Osteoklastenregulierung im RANK-L/ OPG-Verhältnis

Das Verhältnis des Osteoklasten stimulierenden Signalmoleküls RANK-L zu seinem Gegenspieler OPG gibt Aufschluss darüber, zu welcher Seite das Gleichgewicht verschoben ist.

Ein erster Eindruck wurde durch das Verhältnis der Anzahlen der RANK-L sowie OPG positiven Osteozyten normalisiert auf die Trabekeloberfläche der ROI gewonnen (Abb. 27 A, Seite 80). Einzig in K war der Quotient zum Zeitpunkt 8M (7×10^{-6}) kleiner als zum Zeitpunkt 5M (13×10^{-6}). Nach fünfmonatiger Heilung war der Wert in K im Vergleich aller Gruppen am größten, zum Zeitpunkt 8M war der Wert der K Gruppe signifikant am kleinsten (OVX: $p=0,028$, OVXD: $p=0,019$, OVXDS: $p=0,009$). In OVX war der Quotient zum Zeitpunkt 8M mit 33×10^{-6} etwa achtfach höher als zum Zeitpunkt 5M (4×10^{-6}). Auch in OVXD wurde nach achtmonatiger Heilung ein größerer Quotient als zum Zeitpunkt 5M berechnet. Mit 44×10^{-6} war der Wert zum Zeitpunkt 8M elf-fach höher als zum Zeitpunkt 5M (4×10^{-6}). In OVXDS war der Quotient zum Zeitpunkt 5M (2×10^{-6}) am geringsten im Vergleich aller Gruppen. Zum Zeitpunkt 8M war der Wert mit 102×10^{-6} 51-fach höher als zum Zeitpunkt 5M und unterschied sich innerhalb der Gruppe signifikant ($p=0,047$). Des Weiteren fiel zum Zeitpunkt 5M eine negative Korrelation zwischen dem RANK-L/ OPG-Quotienten und der zunehmenden Osteoporoseinduktion auf, die sich zum Zeitpunkt 8M in eine stark positive Korrelation wandelte.

Bei Betrachtung des Quotienten der RANK-L- und OPG-Expression der Osteozyten wurden folgende Ergebnisse erzielt (Abb 27 B, Seite 80): Im Gegensatz zu allen weiteren Gruppen war der Quotient der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 5M (23×10^{-6}) größer als zum Zeitpunkt 8M (13×10^{-6}). In OVX war der Quotient zum Zeitpunkt 5M im Vergleich aller Gruppen mit 2×10^{-6} am geringsten. Es lag ein signifikanter Unterschied zu K zum Zeitpunkt 5M ($p=0,047$) vor. Innerhalb OVX war der Unterschied zwischen den Zeitpunkten (8M: 25×10^{-6} , $p=0,011$) signifikant. In OVXD wurden ähnliche Werte beobachtet: Zum Zeitpunkt 5M lag der Quotient bei 6×10^{-6} und zum Zeitpunkt 8M identisch mit der OVX Gruppe bei 25×10^{-6} . Zwischen den Zeitpunkten lag auch in OVXD ein signifikanter Unterschied ($p=0,022$) vor. In OVXDS lag der RANK-L/ OPG-Quotient zum Zeitpunkt 5M bei 14×10^{-6} und unterschied sich signifikant von OVX zum gleichen Zeitpunkt ($p=0,016$). Der größte Quotient wurde mit 98×10^{-6} nach achtmonatiger Heilung in OVXDS beobachtet. Signifikanzen wurden sowohl innerhalb der OVXDS Gruppe zwischen den Zeitpunkten ($p=0,009$) als auch

zwischen OVXDS und den übrigen Versuchsgruppen (K: $p=0,009$, OVX: $p=0,011$, OVXD: $p=0,004$) zum Zeitpunkt 8M nachgewiesen.

Der Quotient der RANK-L- und OPG-Expression der Lining-Zellen (Abb. 27 C, Seite 80) war in allen Versuchstiergruppen zum Zeitpunkt 8M größer verglichen mit dem Zeitpunkt 5M. In der Kontrollgruppe wurde nach fünfmonatiger Heilung ein Quotient von 13×10^{-6} berechnet. Zum Zeitpunkt 8M (47×10^{-6}) war er mehr als dreimal so groß. OVX wies zum Zeitpunkt 8M mit 58×10^{-6} einen nahezu sechsfach höheren Quotienten als zum Zeitpunkt 5M (1×10^{-5}) auf. Die Quotienten in OVXD waren zu beiden Zeitpunkten am geringsten im Vergleich der Gruppen. Dennoch war der Wert nach 8M mit 15×10^{-6} etwa doppelt so groß im Vergleich zum Zeitpunkt 5M (7×10^{-6}). OVXDS wies zum Zeitpunkt 5M einen Quotienten von 23×10^{-6} auf. Nach achtmonatiger Heilung wurde ein Quotient von 5×10^{-5} errechnet.

Bei Betrachtung des gesamten zellulären RANK-L im Verhältnis zum gesamten zellulären OPG innerhalb der adaptiven ROI konnte gezeigt werden, dass K, OVX und OVXD ähnliche Quotienten zu beiden Zeitpunkten aufwiesen. Für K wurde zum Zeitpunkt 5M ein Quotient von 11×10^{-6} berechnet. Nach achtmonatiger Heilung betrug er 2×10^{-5} . OVX wies zum Zeitpunkt 5M einen Wert von 7×10^{-6} auf, nach achtmonatiger Heilung war der Quotient 22×10^{-6} . Auch in OVXD betrug der Quotient zum Zeitpunkt 5M 7×10^{-6} . Nach achtmonatiger Heilung wurde ein Wert von 2×10^{-5} errechnet. OVXDS wies zu beiden Zeitpunkten die größten Quotienten auf. Zum Zeitpunkt 5M betrug der Quotient 14×10^{-6} und unterschied sich signifikant zum Zeitpunkt 8M (62×10^{-6} , $p=0,047$) innerhalb der OVXDS Gruppe.

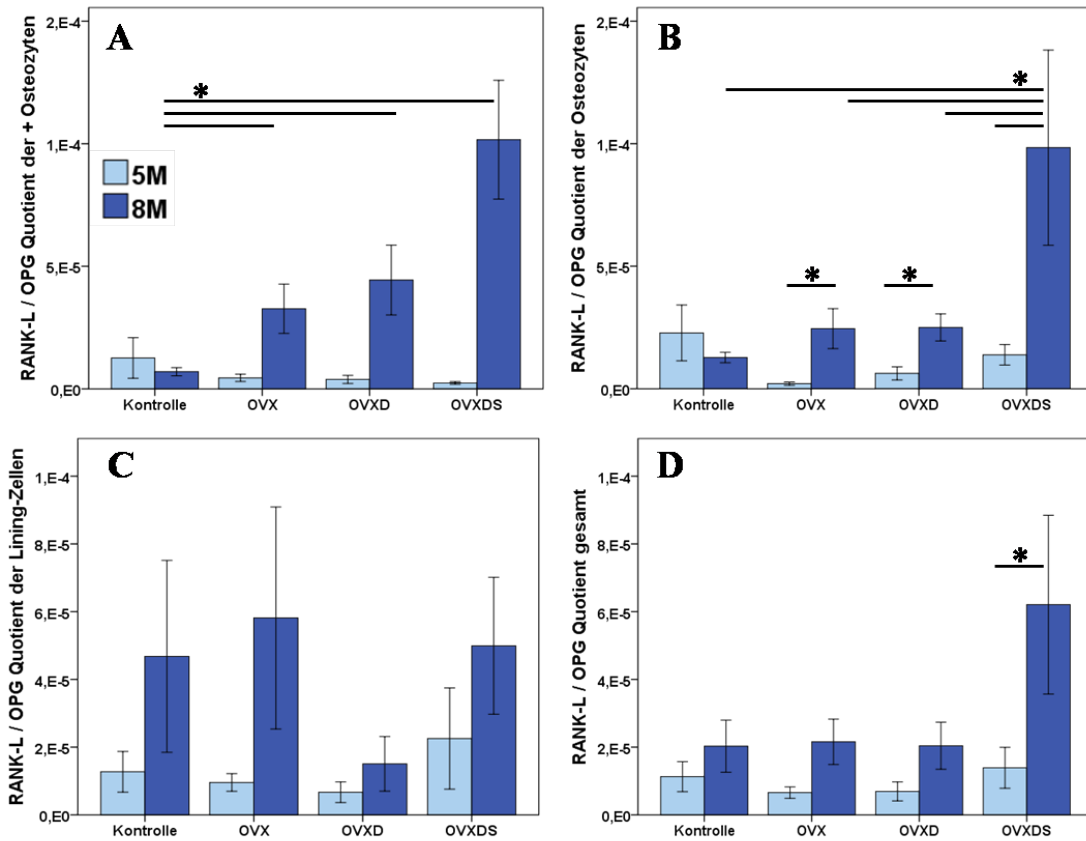


Abb. 27: Ergebnisgrafiken der RANK-L/ OPG-Quotienten.

Zum Zeitpunkt 5M war das Verhältnis der Anzahl positiv angefarbter Osteozyten (A) mit zunehmender Behandlung negativ korreliert. Nach achtmonatiger Heilung lag eine stark positive Korrelation vor. Der Quotient der Expression der Osteozyten (B) war zum Zeitpunkt 8M in OVXDS gegenüber allen weiteren Versuchsgruppen am größten. In OVX, OVXD und OVXDS war außerdem das Verhältnis zum Zeitpunkt 8M signifikant größer als zum Zeitpunkt 5M. Der RANK-L/ OPG Quotient der Lining-Zellen (C) war in OVXDS hingegen zum Zeitpunkt 5M am größten. OVXD wies zu beiden Zeitpunkten das geringste Verhältnis auf. Insgesamt war der Quotient in jeder Tiergruppe zum Zeitpunkt 8M größer als zum Zeitpunkt 5M. Signifikant waren die Unterschiede in OVXD und OVXDS. Das Verhältnis der OVXDS Gruppe war zu beiden Zeitpunkten am größten im Vergleich aller Gruppen.

5.7 Mineralisationsanalyse mittels Fluoreszenzmarkierung

Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde die Mineralisation der Defektzonen dynamisch betrachtet. *In vivo* wurden dazu jeweils drei Versuchstiere jeder Gruppe Fluorochrome im sieben- bzw. achttägigem Intervall verabreicht. Zur Analyse wurden die nicht entkalkzierten PMMA-Schliffpräparate verwendet. Nach fünfmonatiger Heilung war die Mineralisationsrate in K am größten ($4,6549\mu\text{m}/\text{d}$) und unterschied sich signifikant von den Werten aller Gruppen (OVX: $p=0,025$, OVXD: $p=0,021$, OVXDS: $p<0,001$). Zum Zeitpunkt 8M betrug die Mineralisationsrate in K $2,5167\mu\text{m}/\text{d}$ und unterschied sich signifikant vom Wert zum Zeitpunkt 5M innerhalb der Gruppe ($p=0,001$). OVX wies zum Zeitpunkt 5M eine Mineralisationsrate von $3,3585\mu\text{m}/\text{d}$ auf und unterschied sich signifikant vom Zeitpunkt 8M ($2,3973\mu\text{m}/\text{d}$, $p=0,035$). Eine weitere Signifikanz wurde zwischen OVX und K zum Zeitpunkt 5M berechnet ($p=0,025$). Auch in OVXD war die Mineralisationsrate zum Zeitpunkt 5M ($3,1123\mu\text{m}/\text{d}$) größer als zum Zeitpunkt 8M ($2,737\mu\text{m}/\text{d}$). Im Gegensatz dazu war die Rate in OVXDS zum Zeitpunkt 5M ($0,768\mu\text{m}/\text{d}$) signifikant kleiner als zum Zeitpunkt 8M ($1,6633\mu\text{m}/\text{d}$, $p=0,038$). Im Vergleich aller Gruppen wurden in OVXDS zu beiden Zeitpunkten signifikant die geringsten Mineralisationsraten nachgewiesen ($p<0,001$). Interessanterweise war die Mineralisationsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt 5M negativ zur zunehmenden Stufentherapie korreliert. Zum Zeitpunkt 8M konnte zwischen K, OVX und OVXD kein Unterschied gefunden werden. Die Mineralisationsrate in OVXDS war im Vergleich der Gruppen zum Zeitpunkt 8M signifikant am geringsten ($p<0,001$).

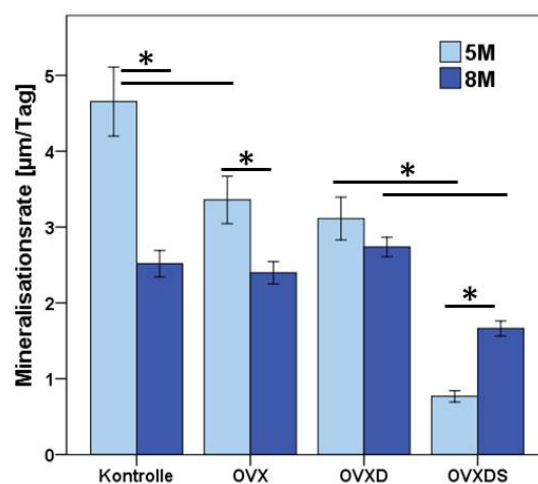


Abb. 28: Ergebnisse der Messung der Mineralisationsrate.

Die Kontrolle zeigte zum Zeitpunkt 5M gegenüber den übrigen Gruppen signifikant die größte Mineralisation pro Tag. Die Mineralisationsrate der OVXDS Gruppe war zu beiden Zeitpunkten im Vergleich der Gruppen signifikant am geringsten. Zum Zeitpunkt 5M war die Mineralisationsrate mit zunehmender Behandlung negativ korreliert.

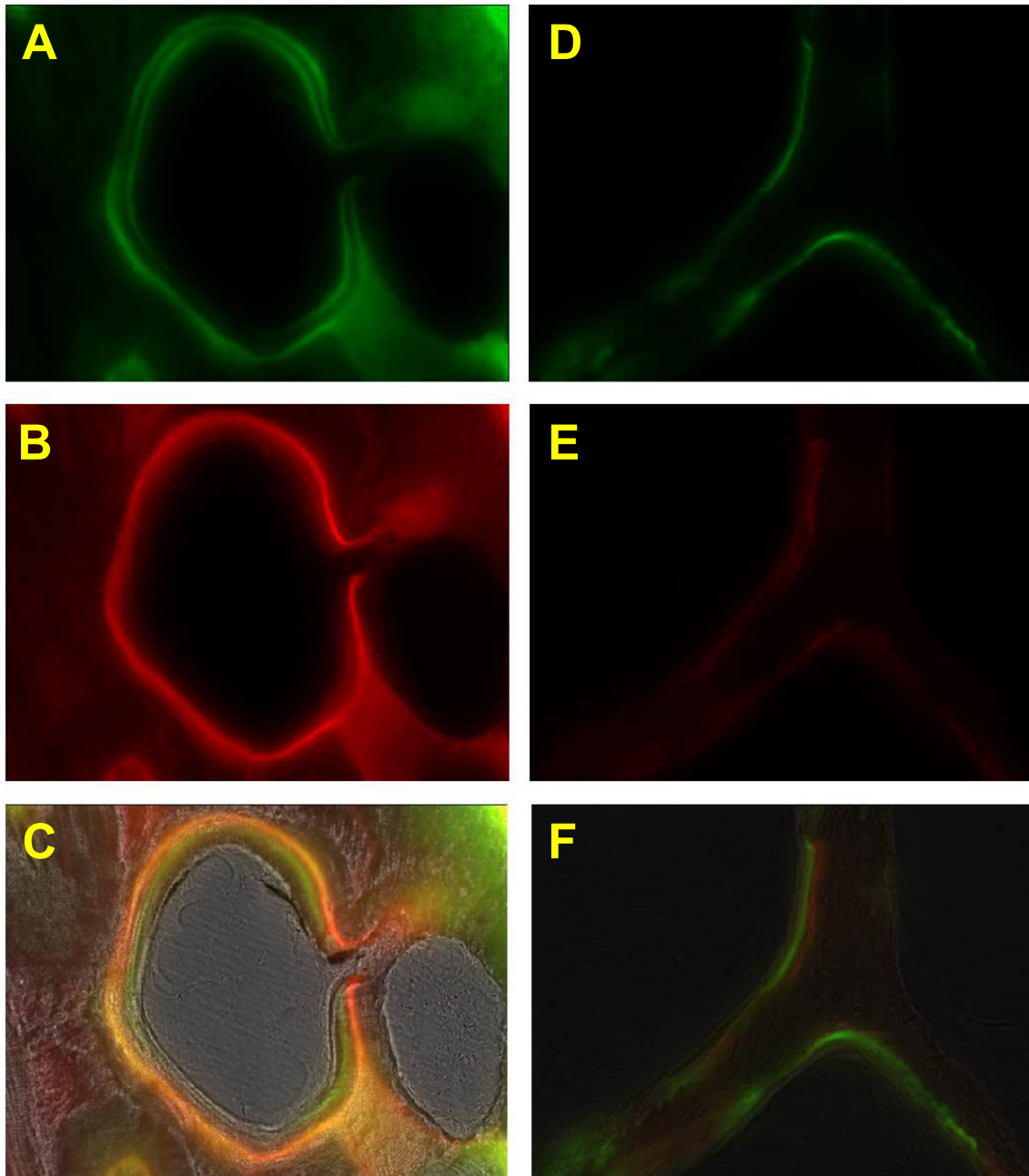


Abb. 29: Vergleich der Fluoreszenzmarkierungen in K (8M) und OVXDS (5M).

In K sind beide grünen Calcein Markierungen (A) sowie eine ausgeprägte rote Alizarin Bande (B) sichtbar. Im überlagerten Bild (C) wird deutlich, dass die rote und die erste grüne Markierung sehr nah aneinander liegen und insgesamt eine orange Bande resultiert. Der eintägige Abstand der beiden Banden konnte daher nicht zur Berechnung der Mineralisationsrate herangezogen werden. Daher wurde das siebentägige Intervall der Calcein-Markierungen zur Bestimmung der Mineralisation verwendet.

In OVXDS war insbesondere zum Zeitpunkt 5M meist nur eine grüne Bande (D) erkennbar. Dabei stellte sich heraus, dass es sich um die zweite Markierung handelte. Der eintägige Abstand der roten Alizarin- (E) und ersten Calceininjektion reichte in OVXDS zum Zeitpunkt 5M nicht aus, um die Osteoblasten wieder empfänglich für den neuen Farbstoff zu machen. Die Mineralisationsrate wurde im überlagerten Bild (F) zwischen der roten und zweiten grünen Markierung berechnet (acht-tägiges Intervall).

5.8 Ergebnisse der *in vivo* DXA-Messungen

Weitere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe analysierten zu den Operationszeitpunkten 0M, 3M und 8M *in vivo* die Knochendichte („bone mineral desity“, BMD), den Mineralgehalt („bone mineral content“, BMC) sowie den Fettgehalt des Knochens. In dieser Arbeit werden die Ergebnisse dieser Messungen in der Beckenregion diskutiert. Im Anhang (Seite 108) sind Material und Methoden beschrieben.

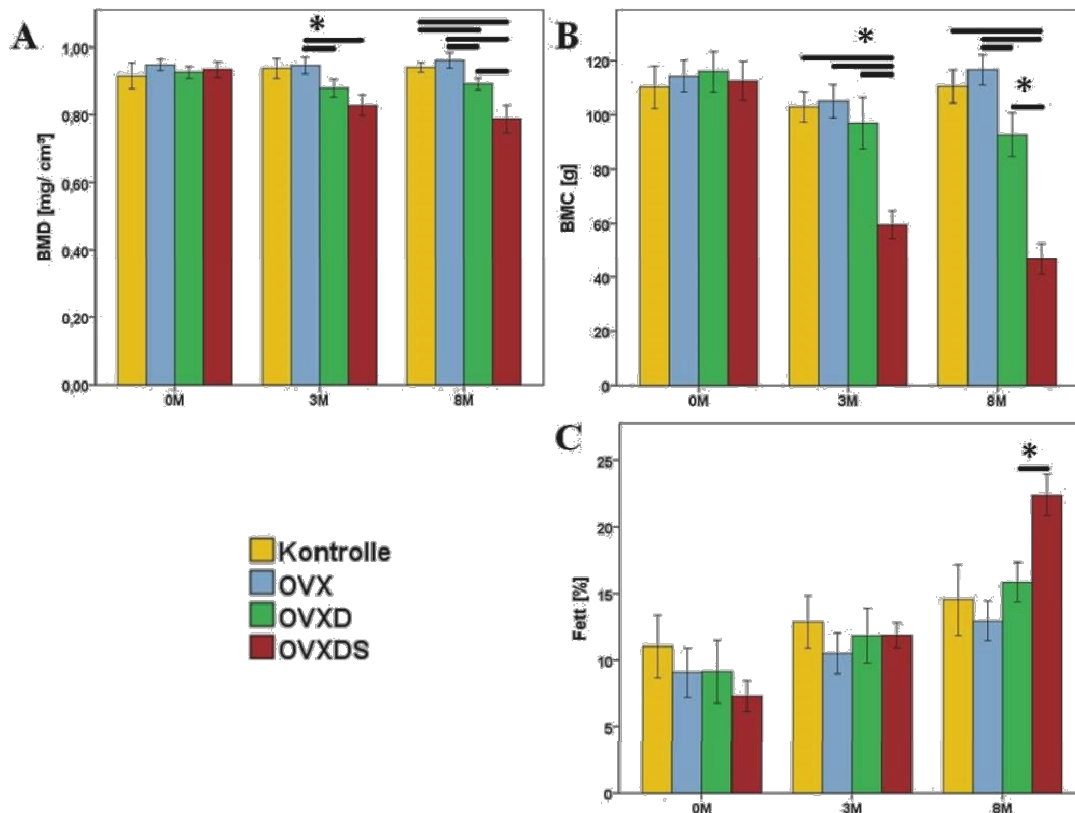


Abb. 30: Ergebnisse der *in-vivo* DXA-Messungen.

Zum Zeitpunkt 0M gab es in keiner Messung signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Schon zum Zeitpunkt 3M zeigte OVXDS die signifikanten Werte der BMD (A) und BMC (B). Zum Zeitpunkt 8M verstärkte sich die Abnahme der BMD und BMC weiter. Zum Zeitpunkt 8M zeigte OVXDS außerdem den größten Fettgehalt (C).

Zu Beginn dieser Studie (0M) konnte in keiner Messung ein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden. Die Ausgangssituation war somit in jeder Gruppe identisch. Die Knochendichte (BMD) der K Gruppe lag bei 0,9156g/ cm³, OVX bei 0,9474g/ cm³, OVXD bei 0,9255g/ cm³ und OVXDS bei 0,9336g/ cm³. Am Zeitpunkt 3M konnten jedoch signifikante Unterschiede gemessen werden: Die BMD lag in K bei 0,9373g/ cm³ und in OVX bei 0,9459g/ cm³. Somit unterschied sich OVX signifikant von OVXD (0,8768g/ cm³, p=0,047) und OVXDS (0,8286g/ cm³, p=0,007). Deutlicher noch war der Unterschied in der Messung zum Zeitpunkt 8M. K wies eine BMD von 0,94g/ cm³

Ergebnisse

auf, in OVX wurde ein Wert von $0,9610\text{g}/\text{cm}^3$ bestimmt. K und OVX Gruppe unterschieden sich zum Zeitpunkt 8M somit signifikant von den Messwerten in OVXD ($0,8914\text{g}/\text{cm}^3$, K: $p=0,027$, OVX: $p=0,007$) und OVXDS ($0,7884\text{g}/\text{cm}^3$, K: $p=0,007$, OVX: $p=0,003$). Ein signifikanter Unterschied konnte außerdem zwischen OVXD und OVXDS zum Zeitpunkt 8M ($p=0,032$) berechnet werden.

Auch in der Bestimmung des Mineralgehaltes des Beckenknochens (BMC) wurde zwischen den Gruppen zum Zeitpunkt 0M keine signifikanten Unterschiede gefunden. In K lag der Mineralgehalt bei $110,25\text{g}$, in OVX bei $114,3857\text{g}$, in OVXD bei $115,975\text{g}$ und in OVXDS bei $112,5625\text{g}$. Nach dreimonatiger Behandlung konnte in K eine BMC von $103,0625\text{g}$ gemessen werden. In OVX wurden $105,0143\text{g}$ und in OVXD 97g ermittelt. Zwischen diesen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied berechnet werden. In OVXDS lag der Mineralgehalt zum Zeitpunkt 3M nur bei $59,3875\text{g}$ und unterschied sich signifikant von den übrigen Tiergruppen (K: $p<0,001$, OVX: $p<0,001$, OVXD: $p=0,007$). Die BMC-Messung zum Zeitpunkt 8M ergab in K einen Wert von $110,5125\text{g}$, in OVX von $116,6429\text{g}$, in OVXD von $92,675\text{g}$ und in der dreifach therapierten OVXDS Gruppe einen Wert von $46,8\text{g}$. Statistisch konnte so ein signifikanter Unterschied zwischen K und OVXDS ($p<0,001$) berechnet werden. Weiter unterschied sich OVX signifikant von OVXD ($p=0,014$) und OVXDS ($p<0,001$). Auch zwischen der OVXD und OVXDS Gruppe wurde ein signifikanter Unterschied berechnet. Zusammengefasst wurden in OVXDS zu den Zeitpunkten 3M und 8M die geringsten Werte des Mineralgehaltes bestimmt.

Neben diesen beiden Messungen, die die Knochensubstanz charakterisieren, wurde außerdem der prozentuale Fettgehalt des Knochens ermittelt. Zum Startzeitpunkt 0M wurde in K ein Fettgehalt von $11,025\%$, in OVX von $9,0571\%$, in OVXD von $9,125\%$ und in OVXDS von $7,2875\%$ ermittelt. Signifikante Unterschiede konnten zwischen den verschiedenen Gruppen nicht errechnet werden. Im weiteren Verlauf zeigte K zum Zeitpunkt 3M einen Fettgehalt von $12,875\%$, OVX $10,5\%$, OVXD $11,8375\%$ und OVXDS $11,875\%$. Auch zu diesem Zeitpunkt unterschieden sich die Fettgehalte der verschiedenen Tiergruppen nicht signifikant. Zum Zeitpunkt 8M wies K einen Fettgehalt von $14,525\%$ auf. Die OVX Gruppe zeigte $12,9429\%$ und OVXD $15,8375\%$ Fettgehalt. Nach achtmonatiger Dreifachbehandlung konnte in OVXDS ein durchschnittlicher Fettgehalt von $22,3875\%$ bestimmt werden. Damit war der Fettgehalt in OVXDS signifikant größer als in OVXD ($p=0,005$) zum Zeitpunkt 8M.

6 Diskussion

Knochenbrüche gehören zum chirurgischen Alltag. Jedoch stellen insbesondere Osteoporose-assoziierte Frakturen in der klinischen Versorgung oft große Schwierigkeiten dar. Sinkende Knochenmasse und veränderte Knochenarchitektur sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch führen zu einer geringeren mechanischen Belastbarkeit und zu erhöhter Brüchigkeit der Knochensubstanz. Im osteoporotischen Knochen kann daher die suffiziente chirurgische Versorgung mit herkömmlichen Materialien meist nicht erreicht werden. Die Etablierung von Großtiermodellen, die in Größe, Gewicht und Struktur dem menschlichen Skelett ähneln, ist daher von hoher Priorität, um die chirurgische Versorgung für die steigende Anzahl osteoporotischer Frakturen in Zukunft professionell sicherstellen zu können [113]. Ziel der hier diskutierten histologischen Untersuchungen ist das detaillierte Verständnis der Frakturheilung im systemisch erkrankten, osteoporotischen Knochen im Schafmodell. Aufgrund vieler Gemeinsamkeiten zu menschlichem Knochen und der unkomplizierten Haltung sind Schafe ideal für die Untersuchung der Osteoporose [58]. Die FDA (Food and Drug Administration) sieht die 3R-Regel (Refine, Replace, Reduce) als wichtigsten Grundsatz der Tierversuche vor. In diesem osteoporotischen Großtiermodell wurden die Zeitpunkte 0M, 3M und 8M gewählt und auf diese Weise die Heilungszeiträume 5M (3M-8M) und 8M (0M-8M) untersucht (Abb. 18, Seite 42). Vorteil dieser Studie ist somit, dass der Verlauf der Osteoporose und die Frakturheilung unter Osteoporose gleichzeitig untersucht werden können. Sämtliche Vorgänge wurden außerdem an die ARRIVE-Guidelines angepasst [63]. Bislang waren in der Literatur einzig Schafmodelle der Osteoporose beschrieben, die den osteoporotischen Knochenstatus nach 3M und 6M/ 7M Behandlung [81, 163] oder bis zu 18M beobachteten [131]. Das hier verwendete Studiendesign ermöglicht eine verlässliche Aussage über den Verlauf der Heilung. Definitionsgemäß wird nach 3-6M von einem verzögerten Heilungsverlauf („delayed healing“) gesprochen, nach mehr als sechsmonatigem Heilungsverlauf ohne Erfolg liegt eine Pseudarthrose („non union“) vor [43]. Anhand der Heilungszeiträume 5M und 8M kann so zwischen diesen beiden Formen differenziert werden. Klinisch konnte außerdem gezeigt werden, dass die Mortalität Osteoporose-assoziiierter Frakturen in den ersten sechs Monaten am größten ist [99]. Das detaillierte Verständnis der Frakturheilung im systemisch erkrankten

Knochen kann helfen, die Mortalität zu senken und die Häufigkeit der Pseudarthrosenbildung (2-10%) zu vermindern [41].

6.1 Knorpelreste in den Experimentalgruppen im Vergleich zur Kontrolle mit geringstem Kollagen Typ X Gehalt in OVXDS

Die Frequenzanalyse der Toluidinblau Färbung ergab in der Kontrollgruppe nach fünfmonatiger Heilung nur noch minimale Knorpelreste, die bis zum Zeitpunkt 8M nahezu vollständig in mineralisierte Matrix umgewandelt wurden. In den Interventionsgruppen konnte hingegen zu beiden Zeitpunkten Knorpelmatrix gefunden werden. Physiologisch entsteht Knorpelmatrix in der zweiten Phase der Frakturheilung während der Formierung des Weichgewebekallus. Im weiteren Heilungsverlauf dient dieser als Grundlage für die enchondrale Ossifikation und den Aufbau des harten Kallus [124]. Knorpelmatrix entsteht folglich in der frühen Phase der Knochenheilung und wird im weiteren Verlauf in mineralisierte Matrix umgewandelt. Der Mangel an Östrogen, wie er in diesem Modell durch Ovariectomie erzwungen wurde und klinisch postmenopausal zu beobachten ist, stellt einen möglichen Faktor dar, der für das Fortbestehen des Knorpels verantwortlich ist. Im OVX-Rattenmodell metaphysärer Frakturen konnten ebenfalls vermehrt Knorpelreste nachgewiesen werden [139]. Östrogene können direkt über die Rezeptoren ER α und ER β auf die Knorpelsubstanz wirken. Physiologisch wirken sie protektiv auf den Knorpel, sodass postmenopausal ein Verlust an Knorpelsubstanz zu verzeichnen ist [115]. Während der Frakturheilung überwiegen jedoch die Effekte auf die Knochenzellen. Physiologisch verlängern Östrogene die Lebenszeit der Osteozyten und Osteoblasten. Gleichzeitig sinkt die RANK-L-Expression der Osteoblasten und die Ausschüttung des Fehltrezeptors OPG wird erhöht [15]. Über diesen Signalweg wird die Aktivierung und Differenzierung der Osteoklasten vermindert. Die anabolen Effekte auf die Knochensubstanz überwiegen. In diesem Modell wurden durch Ovariectomie die protektiven Östrogene entzogen. Folglich erhöhen Osteoblasten die RANK-L-Expression auf der Oberfläche und die Resorption der Knochensubstanz wird vorangetrieben. Außerdem reduzieren Östrogene den oxidativen Stress und erhöhen auf diese Weise die Lebenszeit der Knochenzellen [62]. Östrogenmangel führt daher zu einer erhöhten Apoptoserate der Osteozyten und Osteoblasten. Auf der Zelloberfläche apoptischer Osteozyten wird RANK-L exprimiert und ein Remodeling findet häufiger statt [62]. Insgesamt führt der Östrogenmangel somit zur geringeren Knochenbildung und Heilungsverzögerung. Dabei ist insbesondere

die Formierung des harten Kallus betroffen. Es verbleibt vermehrt Knorpel- und Weichgewebe im Frakturspalt [31].

Im Zuge der enchondralen Ossifikation durchlaufen Knorpelzellen verschiedene Stadien. Im finalen Schritt vor Mineralisation befinden sie sich im hypertrophen Stadium und exprimieren Col X [32]. Knorpelmatrix, die in der Col X-IHC positiv gefärbt war, deutet auf Hypertrophie und den Übergang zum harten Kallus hin. Fehlende Col X-Expression kennzeichnet hingegen den proliferativen Knorpel des weichen Kallus. In der Kontrolle war der physiologische Ablauf der Defektheilung durch den höchsten Median der Col X-Expression zum Zeitpunkt 5M und einem geringeren Col X-Gehalt nach achtmonatiger Heilung gekennzeichnet. OVX zeigte zu beiden Zeitpunkten einen ähnlich hohen Col X-Anteil. Die Heilung findet verzögert statt und dauert weiter an. In OVXD ist der Median der Col X-Expression zum Zeitpunkt 5M am geringsten, steigt jedoch zum Zeitpunkt 8M auf das Niveau von K und OVX an. Die Heilung ist somit verzögert, durchläuft aber die physiologischen Abläufe der Frakturheilung (Abb. 13, Seite 28). OVXDS hingegen zeigte nach achtmonatiger Heilung den geringsten Anteil an Col X gemessen am Gesamtknorpel. Diese Tatsache impliziert, dass insbesondere in OVXDS die enchondrale Knochenbildung gestört ist. Histomorphometrisch konnte für OVXDS innerhalb der Defektzone jedoch der größte Anteil mineralisierter Matrix gefunden werden (Abb. 21 C, Seite 66). Diese Befunde sprechen für eine Mineralisierungsstörung in OVXDS, bei der die Knorpelmatrix mineralisiert wird, ohne zuvor das Stadium der Hypertrophie zu durchlaufen. Deskriptiv konnten jedoch zu beiden Untersuchungszeitpunkten Knorpelreste gefunden werden. Verglichen mit dem Heilungsverlauf in K liegt in OVXDS somit zum Zeitpunkt 5M eine verzögerte Heilung vor. Nach achtmonatiger Heilung weisen die Knorpelreste hingegen definitionsgemäß auf eine Pseudarthrose hin. Reste von proliferativem Knorpel in Verbindung mit verstärkter Mineralisierung sprechen zusätzlich zur Entwicklung der Pseudarthrose in OVXDS für eine Mineralisierungsstörung mit unkontrollierter Verknöcherung des Gewebes.

6.2 Rarefizierte Trabekelstruktur und dünnere Kortikalis nach Ovariectomie und Steroidtherapie

Deskriptiv wurden nach fünfmonatiger Heilung die dicksten Trabekel in K nachgewiesen (Abb. 20 A, Seite 64). In den Interventionsgruppen hingegen waren die Trabekel dünner und schlechter vernetzt. Physiologisch findet in der vierten Phase der

Diskussion

Frakturheilung das Remodeling statt. Geflechtknochen des harten Kallus wird in dieser Phase zu stabilem und mechanisch belastbarerem Lamellenkochen umgewandelt [124]. In der Kontrollgruppe konnte dieser Prozess nach achtmonatiger Heilung durch kräftigere Trabekel und eine stärker ausgebildete Kortikalis als nach fünfmonatiger Heilung bestätigt werden (Abb. 20 A, Seite 64). Im hier vorliegenden Schafmodell konnten für die OVX Gruppe in der deskriptiven Beurteilung des Trabekelwerks dünnere und weniger Trabekel im Vergleich zu K gezeigt werden. Östrogen wirkt durch Lebensverlängerung der Osteoblasten und Osteozyten bei gleichzeitiger Inhibition der Osteoklasten knochenanabol [62]. Dabei ist zu beachten, dass die Verteilung der Östrogenrezeptoren ER α und ER β im Knochen nicht überall gleich ist. Die osteoprotektiven Effekte vermitteln Östrogene über den Rezeptor ER α . Der ER β wirkt hingegen inhibierend auf den ER α . Aufgrund der deutlich größeren Expression von ER β im trabekulären Knochen sind höhere Östrogenspiegel notwendig, um die anabolen Effekte über den ER α auf den trabekulären Knochen zu erzielen. Im Umkehrschluss zeigen geringere Östrogenspiegel besonders in der Spongiosa Effekte, da nun die notwendige Stimulation des ER α nicht mehr im ausreichenden Maße stattfindet [62]. Insgesamt spiegeln diese Effekte dabei die Auswirkungen einer postmenopausalen Osteoporose wider. Östrogenmangel führt in den ersten Jahren zu einem „high turnover“ mit schnellem Knochenmasseverlust und stärkerem Effekt auf das Trabekelwerk als auf die Kortikalis. In den folgenden Jahren verringert sich der jährliche Knochenmasseverlust („low turnover“) [118]. Nach zusätzlicher diätetischer Behandlung der Versuchstiere der OVXD Gruppe zeigten sich jedoch Trabekelwerk und Kortikalis zu beiden Zeitpunkten ähnlich ausgeprägt wie in K. Entsprechend der Resultate von Lill et al. konnte in dieser Studie somit kein Unterschied in OVXD im Vergleich zu K gefunden werden (Abb. 20 A, Seite 64) [80]. Erst durch Kombinationsbehandlung mit zusätzlichen Steroidinjektionen zeigten sich im Schafmodell deutliche Effekte [33, 80]. Dabei wurden vor allem Effekte auf das Trabekelwerk (Dicke und Anzahl) sowie die Verbindung der Trabekel untereinander beschrieben: Micro-CT Analysen zeigten vor allem für die im Dreifachkombination behandelte Tiergruppe eine um mehr als 50% reduzierte Trabekelanzahl und –dicke. Der Knochenmarkraum zwischen den Trabekeln wurde mit 150% gegenüber Kontrolltieren gemessen [80]. Die Ergebnisse in Bezug auf OVXDS konnten in dieser Studie bestätigt werden. Schon zum Zeitpunkt 5M zeigte OVXDS ein deutlich vermindertes Trabekelwerk. Nach achtmonatiger Heilung wurde dieser Effekt weiter

verstärkt. Außerdem konnten zum Zeitpunkt 8M negative Effekte der additiven Behandlung aus OVX, Mangeldiät und Steroiden auf die Kortikalis gefunden werden (Abb. 20 A+C, Seite 64).

In OVXDS wurde die Glukokortikoid (GC)-induzierte Osteoporose (GIO) als häufigster sekundärer Osteoporosetyp simuliert. Anders als der Östrogenmangel der primären Osteoporose zeigen GCs weitreichende Effekte sowohl auf Kortikalis als auch auf Spongiosa (Abb. 20 A+C, Seite 64) [80]. Die vermehrte Apoptose der Osteozyten erhöht die RANK-L-Expression sowie die Initiierung von Remodelingprozessen [68]. Die Osteoblastogenese wird inhibiert und die Lebenszeit ausdifferenzierter Osteoblasten vermindert. Auch die Osteoklastogenese wird vermindert. Jedoch erhöht sich die Lebenszeit ausdifferenzierter Zellen und ein Ungleichgewicht aus Resorption und Formation von Knochen resultiert [153]. Lill et al. beschreiben nach 6M Kombinationsbehandlung (OVXDS) im Schafmodell einen Verlust von 22% kortikaler und 57,7% trabekulärer Knochensubstanz [80]. Im vorliegenden Schafmodell zeigte die DXA-Messung des Beckenkamms (Abb. 30, Seite 83) bereits nach 3M signifikant geringere Werte der BMD („bone mineral density“, Abb. 30 A, Seite 83, $p=0,047/0,007$) in OVXD und OVXDS. Zum Zeitpunkt 8M verstärkte sich dieser Effekt weiter, sodass sich sowohl die OVXD und OVXDS Gruppe signifikant von der K und OVX ($p=0,027/0,007$) unterschieden als auch OVXDS durch geringere Werte von OVXD ($p=0,032$). Eindrucksvoll waren außerdem die Ergebnisse der BMC-Messung („bone mineral content“, Abb. 30 B, Seite 83). OVXD und OVXDS Gruppe zeigten insbesondere in den ersten drei Therapiemonaten einen rapiden Verlust des Mineralgehaltes. Die schwankenden Werte aller Tiergruppen können auf saisonal verschiedene Knochendichten des Schafes zurückgeführt werden. So unterscheidet sich die BMD im Schafmodell um 5,1% zwischen Winter und Sommer. Die geringste BMD wurde dabei im Winter gemessen, ehe über den Frühling bis hin zum Sommer ein 5,1%iger BMD-Zuwachs zu verzeichnen ist [7]. Die hier besprochene Studie begann im Oktober 2012 und endete im Juni 2013, sodass diese saisonalen Änderungen der BMD bei der Interpretation im vorliegenden Schafmodell berücksichtigt werden müssen.

Weiterhin auffällig war der signifikant größere Fettgehalt des Knochenmarks in OVXDS zum Zeitpunkt 8M (Abb. 30 C, Seite 83, $p=0,005$). GCs nehmen Einfluss auf den Fettstoffwechsel. Klinisch zeigen Patienten nach Langzeit GC-Therapie ein cushingoides Erscheinungsbild mit vermehrter Fettanlagerung an Körperstamm, Nacken und Gesicht. Der größere Fettgehalt in OVXDS kann als Nebenwirkung der

Diskussion

Steroidtherapie erklärt werden [114]. Außerdem sorgen GCs für eine verstärkte Differenzierung von MSCs in Fettzellen. Auf diese Weise steigt der Fettgehalt des Knochenmarks und des gesamten Körpers [35]. Das stark erhöhte Frakturrisiko einer GIO konnte eindrucksvoll im Verlauf der Studie nachvollzogen werden: Ein Versuchstier der OVXDS Gruppe erlitt einen Schenkelhalsbruch des rechten Femurs und wurde frühzeitig aus der Studie ausgeschlossen. Neben der schwindenden BMD und der Rarefizierung des Trabekelwerks spielt dabei auch die Architektur der Spongiosa eine Schlüsselrolle. Die Trabekel ordnen sich im osteoporotischen Knochen immer stärker säulenförmig, parallel zur Kortikalis an und verlieren an Quervernetzungen [25]. Die auf diese Weise erhöhte Stabilität axialer Belastungen wird auf Kosten eines erhöhten Frakturrisikos bei Scherbelastungen gewährleistet [88].

In dieser Studie zeigt insbesondere OVXDS Gruppe einen starken Effekt auf das Trabekelwerk und die Kortikalis. Im Vergleich zur physiologischen Heilung in K zeigten sich klare Anzeichen einer unvollständigen Heilung in OVXDS und deuten nach achtmonatigem Verlauf auf die Entwicklung einer Pseudarthrose hin.

6.3 Fortbestehender großer Weichgewebekallus in OVXD und OVXDS

Nach initialer Inflammation (Phase 1 der Frakturheilung, Abb. 13, Seite 28) beginnen Fibroblasten und Chondroblasten den Weichgewebekallus aufzubauen (Phase 2) [124]. Im weiteren Verlauf wird der weiche Kallus mineralisiert und der harte Kallus aus Geflechtknochen entsteht. In der letzten Phase der Knochenheilung findet Remodeling statt. Dazu wird der Geflechtknochen resorbiert und in gut organisierten Lamellenknochen umgewandelt. Dieser physiologische Heilungsverlauf konnte in der hier diskutierten Arbeit anhand der Größe des Weichgewebekallus in K und OVX nachvollzogen werden. Zum Zeitpunkt 5M zeigten alle Versuchsgruppen einen ähnlich stark ausgeprägten weichen Kallus (Abb. 20 B, Seite 64). Am Untersuchungszeitpunkt 8M war jedoch der Kallus in K und OVX geringer ausgeprägt als in OVXD und OVXDS. Der Median in OVXD lag dabei zum Zeitpunkt 8M niedriger als der in OVXDS. Diese Beobachtungen sind im vorliegenden Schafmodell nicht durch alleinigen Östrogenmangel durch Ovariectomie zu erklären. Vitamin D kann in verschiedenen Zielorganen an den VDR binden und so über unterschiedliche Mechanismen in den Kalziumstoffwechsel und die Mineralisierung eingreifen. Im Verdauungstrakt und in der Niere führt die Bindung von Vitamin D an VDR zur verstärkten (Rück-)Resorption von Kalzium. Diätetischer Entzug von Vitamin D und

Kalzium reduziert somit die Kalziumaufnahme in den Körper [5]. Zugunsten der Homöostase im Blut muss Kalzium aus dem Knochen mobilisiert werden. Sinkende Blutkalziumspiegel werden von empfindlichen Rezeptoren der Nebenschilddrüse (NSD) wahrgenommen und reaktiv PTH in die Blutbahn ausgeschüttet [130]. PTH bindet an den PTHR1, der nur auf der Zellmembran von Knochenzellen der osteoblastären Reihe zu finden ist [36]. Osteoklasten werden von PTH indirekt über die Modulation des RANK-L-OPG-Systems beeinflusst. Nach Bindung von PTH an den PTHR1 erhöhen Osteoblasten und Osteozyten die RANK-L-Expression auf der Zellmembran und vermindern die Ausschüttung seines Gegenspielers OPG. Dieser Mechanismus führt zur Steigerung der Aktivität und Lebenszeit von Osteoklasten. Die Resorption von Knochenmatrix beginnt und Knochenaufbau findet seltener statt [76]. Vitamin D kann jedoch auch direkt an den VDR der Osteoblasten binden. Dabei gilt, dass Calcitriol unterschiedliche Effekte bei negativer und positiver Kalziumbilanz hat [79]. Die anabolen Effekte bei positiver Kalziumbilanz wandeln sich bei negativer Bilanz in katabole Effekte. So führt bei geringem Kalziumspiegel die Bindung von Vitamin D an seinen Rezeptor in Osteoblasten zur vermehrten Expression von RANK-L [64]. Die Versuchstiere hatten über die gesamte Versuchsdauer freien Zugang zum normalen Tageslicht, sodass davon ausgegangen werden kann, dass Vitamin D in geringem Maße im Körper vorlag. Kalzium wurde hingegen durch spezielle Diät aus der Nahrung ausgeschlossen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die RANK-L-Expression der Osteozyten in OVXD gegenüber K und OVX signifikant größer ist, sowohl in Bezug auf Anzahl der positiven Osteozyten als auch auf die RANK-L positive Fläche (Abb. 25 A+B, Seite 75, $p=0,012/ 0,022$).

Verstärkt wird dieser Effekt durch zusätzliche GC-Applikation. GCs führen zur gesteigerten Apoptose der Osteozyten und Osteoblasten. Weiterhin fördern GCs die Expression von RANK-L auf der Zellmembran der Osteoblasten und vermindern die Sekretion des Fehlrezeptors OPG [154]. Apoptotische Osteozyten exprimieren ihrerseits RANK-L auf der Zelloberfläche und fördern auf diese Weise die Osteoklastogenese [100]. Additiv zu den Effekten in OVXD konnte für OVXDS eine stärkere zelluläre RANK-L-Expression gezeigt werden. Dabei wurde nachgewiesen, dass die Anzahl RANK-L positiver Osteozyten in OVXDS am größten war. Auch die RANK-L positive Fläche sowohl der Osteozyten als auch der endostalen Saumzellen war zum Zeitpunkt 8M in OVXDS am größten im Vergleich aller Gruppen (Abb. 25 B+C, Seite 75). Ein nach achtmonatiger Heilung weiterhin bestehender weicher Kallus deutet zusammen

mit Knorpelresten auf einen gestörten Heilungsverlauf mit Entwicklung einer Pseudarthrose hin. RANK-L-Überexpression stellt ebenfalls ein Kennzeichen des gestörten Heilungsverlaufes dar.

6.4 Geringster Osteoidgehalt und größter Anteil mineralisierter Matrix durch dreifache Induktion der Osteoporose

Mithilfe der Trichrom Färbung nach Masson Goldner wurden histomorphometrisch innerhalb der ROI die Anteile der mineralisierten Matrix und des Osteoids bestimmt. OVXDS zeigte dabei die geringsten Anteile an Osteoid zu beiden Zeitpunkten gegenüber allen anderen Gruppen. Diese Beobachtung impliziert, dass die GC-Gabe entscheidend für die verminderte Knochenbildung mit verringertem Osteoidgehalt gegenüber den übrigen Tiergruppen ist. Knochenbildende Osteoblasten werden durch GCs über verschiedene Wege direkt in ihrer Funktion beeinträchtigt. So wird die Rekrutierung und Differenzierung aus Vorläuferzellen vermindert, die Aktivität herunter reguliert und die Lebenszeit verkürzt [153]. Osteozyten gehen in Apoptose und exprimieren vermehrt RANK-L auf ihrer Zelloberfläche. Auf diese Weise formieren sich vermehrt BMUs und ein Remodeling findet häufiger statt [110]. Obwohl auch die Differenzierung der Osteoklasten gestört wird, erhöht sich dennoch deren Lebenszeit und Aktivität durch verstärkte Expression von RANK-L der Osteoblasten. Die vermehrten ungleichen Umbauprozesse führen folglich zum schnellen Verlust von Knochensubstanz bei nur geringer Formation [20]. Osteoblasten vermindern durch pharmakologisch erhöhte GC-Spiegel die Ausschüttung des RANK-Fehlrezeptors OPG und die Expression von RANK-L auf der Zelloberfläche wird erhöht. OVXDS Induktion führt folglich zu vermehrtem Remodeling, dessen Gleichgewicht stark auf Seiten der Resorption liegt. Neben den direkten GC-Effekten auf die Knochenzellen (Abb. 16, Seite 36) [22], spielen dabei auch systemische GC-Wirkungen eine Rolle. Ähnlich der Vitamin D Wirkung sind auch für GCs inhibierende Wirkungen auf die Kalziumresorption in Darm und Niere beschrieben [20]. Niedrige Kalziumspiegel im Serum werden von Rezeptoren der NSD detektiert [125] und PTH ausgeschüttet. Niedrige Serumkalziumspiegel führen zu einem sekundären Hyperparathyroidismus, der seinerseits fördernd auf die Knochenresorption wirkt. Osteoblasten erhöhen nach PTH-Stimulation die Expression von RANK-L auf der Zelloberfläche. Indirekt werden auf diese Weise Osteoklasten durch PTH stimuliert [20]. Gestützt wird die Beobachtung

der verminderten Knochenbildung bei verstärkter Resorption durch die verringerte BMD und BMC der DXA-Messung in OVXDS.

Kontrovers erscheint daher zunächst das Ergebnis der mineralisierten Matrix. In OVXDS war der Anteil der mineralisierten Matrix zu beiden Untersuchungszeitpunkten gegenüber allen weiteren Gruppen signifikant am größten ($p=0,013/ p=0,028$). In der Interpretation der Daten ist daher entscheidend, dass einzig die Anteile von mineralisierter Matrix und Osteoid bestimmt wurden und keine Aussage über die Gesamtmenge der Knochenmatrix getroffen werden kann. Im Kontext der geringen BMD und BMC in OVXDS erscheint der Anteil der mineralisierten Matrix folglich dennoch gering. GCs verlagern insbesondere durch Langzeittherapie das Gleichgewicht des Remodelings zugunsten der Resorption und die Knochenbildung ist gering. In der frühen Phase der GIO liegt der jährliche Knochenmasseverlust zwischen 6 und 12%, ehe er sich in den folgenden Jahren bei etwa 3% einpendelt [118]. Einen Hinweis auf vermehrt katabole Prozesse gibt ebenfalls die gestörte Trabekelarchitektur in OVXDS, die bei einem Versuchstier zum Bruch des Schenkelhalses des rechten Femurs führte. Weiter erklärt die in Kapitel 6.1 (Seite 86) beschriebene Mineralisierungsstörung mit unkontrollierter Verknöcherung von kollagenem Gewebe die zu beiden Zeitpunkten erhöhten Anteile mineralisierter Matrix der OVXDS Gruppe.

Morphologisch konnten außerdem „fibroblast-like cells“ identifiziert werden. Abhängig von den lokalen Stimuli können diese Zellen als Abkömmlinge der MSC sowohl den Abbau als auch die Bildung von Knochensubstanz beeinflussen. So können sie zu reifen Fibroblasten differenzieren und kollagenes Gewebe synthetisieren, osteoblastenähnliche Funktion übernehmen oder Knochensubstanz resorbieren [51]. *In vitro* sowie im Nagetiermodell konnte gezeigt werden, dass MSCs des Knochenmarks in Gegenwart des connective tissue growth factor (CTGF) zu „fibroblast-like cells“ differenzieren können [75]. Sie exprimieren fibroblastentypische Oberflächenproteine und können die extrazellulären Proteine Col I und Tenacin-C synthetisieren. Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass „fibroblast-like cells“ für pathologische Fibrosen von Organen und die heterotope Ossifikation verantwortlich gemacht werden können [75]. Ebenfalls konnte die Möglichkeit der Reparatur von Bändern und der Schädelkalotte im Rattenmodell gezeigt werden [75]. Im Hundemodell wurde gezeigt, dass Implantation von „fibroblast-like cells“ die Heilung von periodontalen Defekten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe beschleunigen konnte [26]. Auf dieser Grundlage gilt die Annahme, dass auch die Differenzierung in Osteoblasten möglich ist. Im Sinne der

Frakturheilung nehmen Osteoblasten die Mineralisation der Matrix vor und wandeln den weichen in harten Kallus um. Geringe Anteile des Col X als Marker hypertropher Knorpelsubstanz bei großen Anteilen mineralisierter Matrix implizieren eine fehlregulierte Differenzierung der „fibroblast-like cells“ zu Osteoblasten. Die deskriptiv beschriebenen Knorpelreste werden mineralisiert, ohne das hypertrophe Stadium zu durchlaufen. Es entsteht insuffiziente mineralisierte Matrix, die keine ausreichende mechanische Stabilität gewährleistet. „Fibroblast-like cells“ stehen als Abkömmling der MSCs ebenfalls im Verdacht RANK-L zu exprimieren und Osteoklasten zu aktivieren. So konnten Baharuddin et al. im Schafmodell zeigen, dass nach chirurgisch provozierten periodontalen Defekten das umgebende Weichgewebe im Verlauf der Heilung RANK-L exprimiert [9].

Geringe Knochenneubildung bei überstimulierter Resorption der Matrix stellt in OVXDS einen Faktor der verzögerten Heilung dar. Die Identifizierung von „fibroblast-like cells“ mit fehlregulierter Mineralisation von weichem Kallus erklärt die hohen Anteile mineralisierter Matrix bei dennoch vergrößertem Weichteilkallus. Insgesamt stützen diese Beobachtungen die Entwicklung einer Pseudarthrose in OVXDS.

6.5 Geringerer Kollagen Typ I-Gehalt der neu gebildeten Knochensubstanz in OVXD und OVXDS nach achtmonatiger Heilung

Die These der fehlregulierten Ossifikation mit ungezielter Mineralisierung von Weichteilkallus und Knorpelresten wurde durch die immunhistochemische Markierung von Col I überprüft. Die Synthese knochentypischer Kollagene als organische Grundlage der nachfolgenden Mineralisierung mit anorganischen Mineralsalzen ist entscheidend für die Flexibilität bei gleichzeitiger Stabilität des Skeletts [11]. Physiologisch erhöht sich folglich der Gehalt an Col I im Verlauf der Knochenheilung. In der hier vorliegenden Studie konnte der so charakterisierte suffiziente Heilungsverlauf in K und OVX nachgewiesen werden. Schon zum Zeitpunkt 5M – am Übergang zwischen Weich- und Hartgewebekallus – konnten höhere Werte als in OVXD und OVXDS gezeigt werden. Bei Betrachtung des Col I-Gehaltes zum Zeitpunkt 8M konnten in K und OVX etwa die doppelte Menge im Vergleich zum Zeitpunkt 5M gemessen werden. OVXD und OVXDS zeigten dagegen nur marginale Änderungen des Col I-Gehaltes. Diese Beobachtungen implizieren, dass die Biosynthese der organischen Knochensubstanz in diesem Schafmodell nicht maßgeblich durch alleinigen Östrogenmangel beeinflusst wurde, sondern erst die Kombination mit

Vitamin D- und kalziumarmer Ernährung sowie Steroidinjektionen die Qualität des neu gebildeten Knochens negativ beeinflusst. Schon 1988 publizierten Franceschi et al., dass die Synthese von Col I ebenso wie die Aktivität der Osteoblasten selbst durch Vitamin D reguliert wird [37]. Die fehlende nutritive Versorgung mit Calcitriol entzieht somit einen wichtigen Faktor, der in Knochenzellen höhere Aktivität und vermehrte Produktion essentieller Knochenbestandteile veranlasst. Neben dem direkten Effekt auf die Knochenzellen über den VDR [141], nimmt Vitamin D auch über systemische Effekte indirekt Einfluss auf die Knochenbildung. So werden Kalziumresorption und – rückresorption in Darm und Niere [84] durch Vitamin D erhöht und der Einbau in den Knochen gefördert [114]. Vitamin D-Unterversorgung zusätzlich zur kalziumarmen Diät sorgt dafür, dass zugunsten der Kalziumhomöostase im Blut die Resorption des Knochens der Formation und der damit verbundenen Col I-Synthese überwiegt [160]. Dauerhaft niedrige Kalziumspiegel führen weiterhin zu einem sekundären Hyperparathyroidismus, der die Resorption der Knochensubstanz fördert und einer physiologischen Knochenheilung entgegenwirkt.

GCs nehmen ebenfalls auf verschiedene Arten Einfluss auf die Knochenheilung. In kultivierten Rattenzellen konnte ein biphasischer Verlauf der GC-Wirkung beobachtet werden. In den ersten Tagen der GC-Applikation konnte ein stimulierender Effekt auf die Col I-Synthese nachgewiesen werden, der sich jedoch im Folgenden unter Langzeitbehandlung in einen inhibitorischen Effekt wandelte [19]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass dabei sowohl die Zellzahl, als auch die Syntheseleistung jeder einzelnen Zelle vermindert ist [72]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den GC-Wirkungen auf die Knochenzellen. Osteoblasten werden in ihrer Differenzierung und Aktivität gestört sowie ihre Lebenszeit verringert (Abb. 16, Seite 36) [100]. Weiterhin sind Wechselwirkungen der GCs auf die Expression des VDRs beschrieben. Ähnlich einem Steroidhormonrezeptor befindet sich der VDR intrazellulär und kann durch GCs in seiner Expression reguliert werden [87].

Insbesondere in OVXD und OVXDS können die geringen Anteile des Col I und die damit verbundene mindere Knochenqualität zu beiden Zeitpunkten über direkte und systemische Effekte des Vitamin D-Mangels auf die Zellen zurückgeführt werden. Weiterhin beeinflussen GCs sowohl die Aktivität als auch Differenzierung und Lebenszeit der anabolen Knochenzellen negativ. Über diese Signalwege kann eine verzögerte Knochenheilung sowie eine mögliche Pseudarthrose diagnostiziert werden.

6.6 Steroidinjektionen vermindern die Osteozytenzahl und nehmen so entscheidenden Einfluss auf die Mineralisierung der Extrazellulärmatrix

Als Zellen der Knochenmatrix erfüllen Osteozyten wichtige Aufgaben, die die Gesundheit der Knochensubstanz garantieren. Zusammengefasst fungieren sie als Mechanosensoren des Körpers und initiieren Remodeling, um das Skelett an die geforderten Belastungen anzupassen. Weiterhin detektieren Osteozyten Mikrofrakturen und exprimieren RANK-L auf der Zelloberfläche, um Resorption und Reparatur der Matrix in Gang zu setzen [13]. Experimentelle Studien einer osteozytenfreien Knochensubstanz konnten zeigen, dass Osteozyten in die Mineralisierung eingebunden sind [138]. Die Gesundheit des Skeletts ist daher eng mit einem funktionierenden Osteozytennetzwerk verknüpft. Dabei können Osteozyten sowohl knochenanabole als auch –katabole Prozesse initiieren.

Osteozyten stehen untereinander über Dendriten in Canaliculi des Knochens in Verbindung. Gap junctions an diesen Fortläufern ermöglichen den Stoffaustausch und auf diese Weise die Kommunikation der Zellen. Ein erster Indikator eines funktionierenden Netzwerks ist die Anzahl der Osteozyten pro Fläche ungeachtet ihrer Morphologie. Dabei stellte sich im vorliegenden Schafmodell heraus, dass zu beiden Untersuchungszeitpunkten in OVXDS signifikant die wenigsten Osteozyten gezählt wurden ($p=0,05$). Zwischen den weiteren Tiergruppen bestand kein signifikanter Unterschied. Im vorliegenden Stufenmodell der Osteoporoseinduktion kann daher für diese signifikante Abnahme der Osteozytenzahl die GC-Applikation verantwortlich gemacht werden. Wie Abb. 16 (Seite 36) zeigt, stören GCs als Hauptursache der sekundären Osteoporose das osteozytäre Gleichgewicht. Verstärkte Apoptose der Osteozyten reißt immer größer werdende Löcher in das canaliculäre Netzwerk und vermindert so die Knochenqualität [153]. Mikrofrakturen, wie sie durch alle Formen der Osteoporose vermehrt auftreten, können nicht mehr adäquat registriert und notwendige Reparaturvorgänge initiiert werden. Das Frakturrisiko steigt. Weiterhin exprimieren apoptotische Osteozyten RANK-L auf der Zelloberfläche, sodass Remodeling verstärkt stattfindet und Knochensubstanz vermehrt abgebaut wird [100].

Vatsa et al. zeigten, dass sowohl die Lokalisation als auch die Morphologie der Osteozyten mit der Registrierung mechanischer Reize assoziiert ist [145]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zu beiden Zeitpunkten die Anzahl spindelförmiger Osteozyten negativ zur Anzahl der Osteoporoseinduktionsbehandlungen korreliert war. Physiologisch entstehen spindelförmige Osteozyten durch Remodeling und liegen

eingebaut in organisiertem Lamellenknochen. Die mit kumulativer Osteoporose-induktion sinkende Zahl spindelförmiger Osteozyten in der Defektzone impliziert einen verzögerten Heilungsverlauf der Versuchstiergruppen, da Lamellenknochen in der letzten Phase der Knochenheilung entsteht. Verstärkt wird diese Annahme durch die größere Anzahl spindelförmiger Osteozyten zum Zeitpunkt 8M als zum Zeitpunkt 5M in allen Gruppen. Physiologisch findet Remodeling in der vierten Phase der Frakturheilung statt (Abb 13, Seite 28). Dabei wird der harte Geflecht-knochenkallus in Lamellenknochen umgebaut. Die zu beiden Untersuchungszeitpunkten höchsten Anzahlen der spindelförmigen Osteozyten in K zeigten den physiologischen Ablauf an. Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass Osteozyten nach OVX vermehrt in Apoptose gingen. Nach pharmakologischer Substitution konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden, sodass eine entscheidende Rolle der Östrogene auf die Gesundheit der Osteozyten angenommen werden muss [140]. Weiterhin steigt durch OVX die RANK-L-Expression der Osteoblasten und Osteozyten (Abb. 25 A+B, Seite 75) [135] wohingegen der Gegenspieler OPG weniger ausgeschüttet wird [15]. Insgesamt entsteht ein fehlreguliertes Remodeling mit verstärkter Aktivität der Osteoklasten im Sinne einer postmenopausalen Osteoporose. In OVXD wurden diese Effekte durch Vitamin D- und Kalziummangel verstärkt. Wie in Kapitel 2.10.3 (Seite 21) beschrieben, hat Vitamin D dabei sowohl lokale als auch systemische Effekte auf den Knochen. Systemisch steht dabei die verminderte Kalziumaufnahme in Verdauungstrakt und Niere im Vordergrund [5]. Die lokalen Wirkungen auf die Knochenzellen werden über den VDR vermittelt. Bei negativer Kalziumbilanz erhöht Vitamin D die RANK-L-Expression der Knochenzellen und somit die Aktivität der resorbierenden Osteoklasten [64]. In der RANK-L-IHC konnte dieser Effekt bestätigt werden (Abb. 25 D, Seite 75). GC-Applikation hat ebenfalls lokale und systemische Effekte auf den Knochen. Dabei wird das Missverhältnis des Remodelings aus Resorption und Formation von Knochen verstärkt. OVXDS zeigte daher die wenigsten spindelförmigen Osteozyten.

Die Quantifizierung leerer Lakunen (apoptotische Osteozyten) im Knochen zeigte in K die geringste Anzahl pro Fläche zu beiden Zeitpunkten. Nach fünfmonatiger Heilung war der Unterschied zwischen K und den weiteren Gruppen signifikant (Abb. 24 E, Seite 72, $p=0,05$). Geringere Anzahlen spindelförmiger bei vermehrt apoptotischer Osteozyten implizieren ein gestörtes osteozytäres Netzwerk der Interventionsgruppen. Jahani et al. konnten in einer Computersimulation zeigen, dass durch vermehrt apoptotische Osteozyten wichtige Signalwege im Knochen gestört sind [55].

Diskussion

Osteozyten sind die Mechanosensoren des Skeletts und passen die Struktur des Knochens an Belastungen an [13]. In den Versuchstiergruppen wurde deskriptiv ein vermindertes Trabekelwerk mit wenigen, dünnen und schlecht vernetzten Trabekeln beschrieben (Abb. 20, Seite 64). Dabei orientieren sie sich immer stärker säulenförmig, parallel zur Kortikalis [25]. Die Belastung jedes einzelnen Trabekels steigt. Osteozyten erhöhen die Signalrate und beeinflussen die Proliferation von Osteoblasten und Osteozyten über Integrine und weitere Moleküle der Zelladhäsion [127]. Vermehrt apoptotische Osteozyten unterbinden diesen Mechanismus [138]. In Studien wurde gezeigt, dass mechanische Belastung wichtig für die Knochenheilung ist [93]. Das gestörte Osteozytennetzwerk insbesondere in OVXDS entzieht dem Knochen seine Sensoren und stört entscheidend die Knochenheilung [74].

Während der Knochenbildung werden Osteoblasten in die Knochensubstanz eingebaut und werden zu Osteozyten (Abb. 4, Seite 8). Diese neu entstandenen Osteozyten behalten zunächst die runde Form der Osteoblasten bei und nehmen weiter aktiv an der Synthese neuer Knochensubstanz und deren Mineralisation teil [13]. Die Quantifizierung der runden Osteozyten im hier durchgeführten osteoporotischen Schafmodell zeigte, dass OVXDS zum Einen zu beiden Zeitpunkten die signifikant wenigsten runden Osteozyten aufwies ($p=0,05$) und zum Anderen als einzigste Tiergruppe nach 8M signifikant weniger Osteozyten als nach 5M zeigte (Abb. 24 A, Seite 72, $p=0,05$). Diese Resultate weisen darauf hin, dass die Knochenbildung in OVXDS gegenüber allen weiteren Tiergruppen am geringsten war. Pathophysiologisch liegt der Osteoporose ein Missverhältnis aus Knochenresorption und -formation zugrunde. Geringe Zellzahlen der runden Osteozyten implizieren, dass die Knochenbildung nur in geringem Maße stattfindet. Die Langzeit-GC-Behandlung ist eine mögliche Ursache: GCs reduzieren die intestinale Kalziumresorption und erhöhen die renale Kalziumausscheidung [21]. Sinkende Serumkalziumspiegel führen zur vermehrten Ausschüttung von PTH [132]. Sowohl PTH als auch die GCs selbst führen zur gesteigerten Expression von RANK-L auf der Zelloberfläche der Osteoblasten und der verminderten Ausschüttung des Fehltreptors OPG. Weiterhin fördern GCs die Synthese der Kollagenase 3, die am Abbau des organischen Knochengestüts beteiligt ist. So beschleunigen GCs neben der Demineralisation der Knochenmatrix auch den Abbau des kollagenen Grundgerüsts [21]. Den sicherlich größten Effekt zeigen GCs jedoch durch zelluläre Wirkungen. Die Differenzierung der Osteoblasten wird vermindert und auf diese Weise die Knochenbildung reduziert [104]. Weiterhin führt

die Apoptose-assoziierte RANK-L-Expression der Osteozyten zur Aktivitätssteigerung der Osteoklasten und zur verstärkten Knochenresorption [68]. Das Ungleichgewicht aus Resorption und Formation der Knochensubstanz wird durch kumulative Osteoporoseinduktion vergrößert und die Knochenbildung massiv verringert (Abb. 21 D, Seite 66). Dabei wird in dieser Arbeit besonders der Langzeiteffekt deutlich, der sich dadurch abzeichnet, dass in OVXDS die Anzahl runder Osteozyten zum Zeitpunkt 8M signifikant kleiner als nach 5M ist (Abb. 24 A, Seite 72, $p=0,05$). Zwar reduzieren GCs ebenfalls die Osteoklastogenese, verlängern allerdings die Lebenszeit und erhöhen die Aktivität bereits differenzierter Osteoklasten. Dauerhaft zeichnet sich so der stark knochenresorptive Effekt der GC-Applikation ab [56, 153].

Vatsa et al. beschrieben, dass sich die Morphologie der Osteozyten belastungsabhängig verändert. In belastetem Knochen (Fibula) lagen dabei mehr spindelförmige und in der unbelasteten Schädelkalotte vermehrt runde Osteozyten vor [145]. Das Verhältnis der spindelförmigen zu runden Osteozyten gibt Auskunft, welcher Zelltyp dabei überwiegt. El Khassawna et al. zeigten im Rattenmodell, dass OVX zu einem geringeren Quotienten führt [29]. Im vorliegenden Schafmodell war das Verhältnis erst durch Kombination der Osteoporoseinduktion aus OVXD und OVXDS signifikant kleiner im Vergleich zu K zum Zeitpunkt 5M ($p=0,05$). Nach achtmonatiger Heilung konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen K und OVX berechnet werden (Abb. 24 C, Seite 72 $p=0,05$).

In OVXDS konnten insgesamt die wenigsten Osteozyten gezählt werden. Das gestörte Netzwerk der Osteozyten ist dabei durch eine geringere Anzahl spindelförmiger Osteozyten bei vermehrt apoptotischen Osteozyten charakterisiert. Im Kontext der Ergebnisse der BMD und BMC kann geschlussfolgert werden, dass die Knochenbildung in OVXDS am geringsten war. Weiterhin sinkt die Qualität der Knochensubstanz durch vermehrt apoptotische Osteozyten und das Frakturrisiko steigt [118]. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Osteozyten maßgeblich am Aufbau und der Architektur der extrazellulären Matrix beteiligt sind.

6.7 Osteozytäre RANK-L-Überexpression mit vergrößertem RANK-L/ OPG-Quotienten in OVXDS

In vielen Studien konnte bislang gezeigt werden, dass Osteozyten maßgeblich an der Expression von RANK-L und somit an der Aktivierung von Osteoklasten beteiligt sind [158]. Die osteozytäre RANK-L-Expression spielt in der Spongiosa eine entscheidende

Diskussion

Rolle beim Remodeling. Im Knockout-Mausmodell der Osteozyten-spezifischen RANK-L-Expression wurde ein 70%iger Verlust des trabekulären Knochens beschrieben [159]. Neben Osteozyten können auch weitere Matrixzellen in die RANK-L-Expression eingreifen. So zeigten Xiong et al., dass auch hypertrophe Chondrozyten RANK-L exprimieren und auf diese Weise die Mineralisierung der Matrix beeinflussen [157]. Zu beachten ist dabei, dass RANK-L sowohl membrangebunden auf der Zelloberfläche als auch in löslicher Form exprimiert werden kann. Auch MSCs und „fibroblast-like cells“ können RANK-L exprimieren [67]. In dieser Arbeit wurde daher der zellgebundene RANK-L- und OPG-Gehalt der Osteozyten sowie der endostalen Saumzellen bestimmt. Auf diese Weise kann der Einfluss der Osteozyten isoliert betrachtet und Fehleinflüsse minimiert werden. Hier konnte der große Anteil der Osteozyten an der gesamten RANK-L-Expression bestätigt werden. Es wurde gezeigt, dass der postmenopausale Östrogenmangel Einfluss auf die Anzahl der RANK-L exprimierenden Osteozyten nimmt (Abb. 25 A+B, Seite 75). In OVX war dabei die Anzahl RANK-L positiver Osteozyten zum Zeitpunkt 8M signifikant größer als in K zum gleichen Zeitpunkt ($p=0,028$). Jabbar et al. konnten zeigen, dass die RANK-L-Expression postmenopausaler Frauen erhöht ist und auf diese Weise die Resorption von Knochenmatrix gefördert wird [54]. Shevde et al. zeigten, dass 17β -Estradiol die RANK-L und MSC-F abhängige Osteoklastendifferenzierung herunter reguliert. Auch Sims et al. beschrieben, dass Östrogene die RANK-L-Expression mindern und anabol auf den Knochenstoffwechsel wirken. Dieser Effekt wird dabei über den ER vermittelt und die Transkription von für die RANK-L-Expression notwendiger Gene wie des c-Jun vermindert. Weiterhin könnte die Expression des JNK1-Proteins durch Östrogenmangel vermindert werden und so ein wichtiges intrazelluläres Signalmolekül der RANK-L-Signaltransduktion entzogen werden [128]. Durch kumulative Osteoporoseinduktion in OVXD und OVXDS konnte die Anzahl der RANK-L positiven Osteozyten zusätzlich gesteigert werden. Zu beiden Untersuchungszeitpunkten unterschieden sie sich signifikant von K und OVX ($p=0,018$). Die RANK-L positive Fläche der Osteozyten unterschied sich dabei in OVXD zu beiden Zeitpunkten signifikant von OVX ($p=0,045/0,022$). Anderson et al. publizierten im Jahre 2008, dass Vitamin D Einfluss auf die RANK-L-Expression und somit auf die Osteoklastogenese nimmt. Dabei war der Einfluss auf den spongiösen Knochen größer als auf die Kortikalis [6]. Systemisch erhöht Vitamin D die (Rück-) Resorption von Kalzium in Verdauungstrakt und Niere. Niedrige Serumkalziumspiegel führen langfristig zu einem sekundären

Hyperparathyroidismus, der in Osteoblasten zur gesteigerten RANK-L-Expression führt [95]. PTH bindet dazu an den PTHR1 der Osteoblasten und vermittelt intrazellulär die Expression von RANK-L auf der Zelloberfläche. Die Wirkung von PTH auf Osteoklasten ist folglich indirekt [94]. Neben dieser systemischen Wirkung kann Vitamin D auch direkt die Knochenzellen beeinflussen. Bei negativer Kalziumbilanz – klinisch durch Mangelernährung und im hier vorliegenden Tiermodell durch kalziumarme Ernährung – bindet Vitamin D intrazellulär in Osteoblasten an den VDR. Die RANK-L-Expression wird gesteigert und die Knochenresorption zugunsten der Blutkalziumhomöostase erhöht [79].

Zwischen OVXD und OVXDS unterschieden sich die Anzahl und Fläche der RANK-L positiven Osteozyten nicht signifikant. Jedoch war die RANK-L positive Fläche der Osteozyten zum Zeitpunkt 8M in OVXDS signifikant größer als in K und OVX ($p < 0,009$). Insgesamt zeigte OVXDS die größte osteozytäre RANK-L positive Fläche (Abb. 25 B, Seite 75). Im Kontext der geringsten Osteozytenzahlen ist die osteozytäre Expression in OVXDS pro Zelle umso größer. Kennedy et al. beschrieben, dass apoptotische Osteozyten vermehrt RANK-L und weniger OPG exprimieren [60]. Weiterhin wurde vermutet, dass apoptotische Osteozyten umliegende Osteozyten ebenfalls zur vermehrten RANK-L-Expression anregen, um Remodeling einzuleiten und den Knochen zu erneuern [24]. Im Kontext der Ergebnisse der Silbernitratfärbung mit vermehrt apoptotischen Osteozyten in den osteoporotischen Tiergruppen konnten diese Beobachtungen im hier diskutierten Schafmodell bestätigt werden. Die Anzahl OPG positiver Osteozyten war im Vergleich der Gruppen zum Zeitpunkt 8M in OVXDS am geringsten (Abb. 26 A, Seite 77), die Anzahl RANK-L positiver Osteozyten am höchsten (Abb. 25 A, Seite 75). Die OPG-Expression pro Osteozyt war in OVXDS hingegen am größten. Im Sinne der Knochenheilung versuchen die Osteozyten vermehrt OPG auszuschütten und den Knochenstoffwechsel in Richtung Formation zu lenken. In allen Versuchsgruppen war dabei der OPG-Gehalt der endostalen Saumzellen maßgeblich für die OPG Gesamtmenge (Abb. 26 C+D, Seite 77). Ganz im Gegensatz zur RANK-L-Expression, die entscheidend durch die osteozytäre Expression bestimmt wird (Abb. 25 B+D, Seite 75). Die Expression von OPG wird durch verschiedene Stoffe moduliert. Physiologisch verstärken Östrogene die OPG Synthese [15] und verringern die Expression von RANK-L auf der Oberfläche von Osteoblasten [135]. Postmenopausaler Östrogenmangel verringert folglich die Ausschüttung von OPG und die RANK-L-Expression steigt. Der RANK-L/ OPG-

Diskussion

Quotient steigt und die Knochenresorption wird beschleunigt. In OVX ($p=0,006$) und OVXD ($p=0,049$) war der OPG-Gehalt nach fünfmonatiger Heilung signifikant größer als nach achtmonatiger Heilung. Ebenso war die OPG-Expression pro Osteozyt in OVX und OVXD zum Zeitpunkt 5M signifikant größer als zum Zeitpunkt 8M (Abb. 26 B, Seite 77). Diese Beobachtung impliziert, dass zum Zeitpunkt 5M verstärkt OPG benötigt wurde, um die Osteoklastogenese zu unterbinden und die Frakturheilung voranzutreiben. Zwischen den Zeitpunkten ist in K sowohl in der gesamten OPG-Expression als auch in der Aktivität pro Zelle kein Unterschied festzustellen. Zusammen mit den weiteren histologischen Beobachtungen kann in OVX und OVXD von einer verzögerten Heilung gesprochen werden. Erst zum Zeitpunkt 8M sinkt die OPG-Expression und Remodeling der Defektzone findet statt. Diese These stützt der RANK-L/ OPG-Quotient, der in OVXDS zum Zeitpunkt 8M signifikant größer als zum Zeitpunkt 5M war (Abb. 27 D, Seite 80, $p=0,047$). Auch Vitamin D nimmt Einfluss auf die OPG-Ausschüttung. Physiologisch erhöhen differenzierte Osteoblasten nach Bindung von Vitamin D an VDR die Expression von OPG. Vitamin D-Unterversorgung führt folglich zur sinkenden OPG-Synthese. Zusammen mit der VDR-vermittelten gesteigerten RANK-L-Expression bei negativer Kalziumbilanz erhöht Vitamin D-Mangel den RANK-L/ OPG-Quotienten [79]. Im Gegensatz zu K, zeigten alle osteoporotischen Tiergruppen nach achtmonatiger Heilung einen signifikant größeren RANK-L/ OPG-Quotienten als nach fünfmonatiger Heilung bei Betrachtung der Anzahl positiver Osteozyten und der jeweiligen osteozytären Expression (OVX: $p=0,011$ / OVXD: $p=0,022$ / OVXDS: $p=0,009$). In OVXDS war der Quotient der osteozytären Expression zum Zeitpunkt 8M signifikant größer als in allen weiteren Gruppen (Abb. 27 A+B, Seite 80, $p<0,011$). Diese Beobachtung stützt die Annahme, dass Osteozyten maßgeblich die RANK-L-Expression bestimmen [158]. OVXDS-Induktion vereint dabei die negativen Effekte des Östrogenmangels, der Vitamin D-Unterversorgung und der GC-Therapie auf den Knochen.

Das gestörte Osteozytennetzwerk gepaart mit dem vergrößerten RANK-L/ OPG-Quotienten erhöht das Frakturrisiko. So konnten Abdallah et al. zeigen, dass der RANK-L/ OPG-Quotient bei postmenopausalen Frauen mit Schenkelhalsfraktur in Biopsien des Beckenkamms erhöht war [1]. Köttstorfer et al. untersuchten die RANK-L- und OPG-Expression während der menschlichen Frakturheilung. Physiologische Knochenheilung war dabei durch geringe RANK-L-Expression gekennzeichnet, in verzögerten Heilungsformen bot sich ein variables Expressionsmuster [70]. *In vitro*

wurde nachgewiesen, dass ein großer RANK-L/ OPG-Quotient der Osteozyten die Synthese von Sclerostin erhöht und über diesen Weg die Knochenbildung inhibiert [156]. Apoptotische Osteozyten exprimieren RANK-L [68] und initiieren Remodeling. Lokal führt Sclerostin durch verminderte Knochenbildung zum Überwiegen der Resorption. Die Korrelation von Sclerostinexpression und der Anzahl apoptotischer Osteozyten wurde im Rattenmodell der Osteoporose gezeigt [29].

Im Kontext der Frakturheilung ist der große RANK-L/ OPG-Quotient für eine Heilungsverzögerung bis hin zur Pseudarthrosenbildung in OVXDS verantwortlich. Verstärkte Resorption bei geringer Formation von Knochensubstanz verhindert die physiologische Knochenheilung. Die dreifache Osteoporoseinduktion in OVXDS hat dabei ebenfalls weitreichende Konsequenzen für das osteozytäre Netzwerk. Vermehrte Apoptose und der Verlust spindelförmiger Osteozyten verstärkt weiter das Ungleichgewicht aus Resorption und Formation von Knochen durch erhöhte RANK-L-Expression. Die Knochenqualität sinkt.

In der Zusammenschau der hier diskutierten Ergebnisse wurden in OVXDS zu beiden Zeitpunkten Knorpelreste gefunden, die im Vergleich der Gruppen den geringsten Anteil an Col X (hypertropher Knorpel) aufwiesen (Abb. 23, Seite 69). Die geringe BMD und BMC zeichneten sich morphologisch durch ein rarefiziertes Trabekelwerk und dünne Kortikalis ab. Histomorphometrisch wurde in der Defektzone weniger Osteoid nachgewiesen und vermehrt „fibroblast-like cells“ beobachtet. Weiterhin bestand in OVXDS der Weichgewebekallus bis zum Zeitpunkt 8M fort. Es zeigte sich ein gestörtes osteozytäres Netzwerk durch die insgesamt geringsten Osteozytenzahlen in OVXDS zu beiden Zeitpunkten. Dabei war der Anteil physiologischer, spindelförmiger Osteozyten im Vergleich der Gruppen in OVXDS am geringsten. Zum Zeitpunkt 5M zeigte OVXDS die meisten apoptotischen Osteozyten. RANK-L als potenter Aktivator der Osteoklasten war in OVXDS zum Zeitpunkt 8M sowohl in Betrachtung der osteozytären Expression als auch der Expression der endostalen Saumzellen am größten. Das RANK-L/ OPG-Verhältnis in OVXDS war sowohl bei osteozytärer Betrachtung als auch in Betrachtung der gesamten Knochenzellen am größten.

Diese histologischen Ergebnisse der Frakturheilung im osteoporotischen Schafmodell unterstreichen die Bedeutung der Osteozyten und der Signalmoleküle RANK-L und OPG auf den Knochen. Die Modulation dieses Signalwegs bietet Möglichkeiten, den Heilungsverlauf günstig zu beeinflussen.

In allen osteoporotischen Tiergruppen konnten Abweichungen vom physiologischen Heilungsverlauf in K gefunden werden. Zum Zeitpunkt 8M kann der Heilungsverlauf in OVXDS als Pseudarthrose bezeichnet werden, da eine vollständige Frakturheilung auch nach acht Monaten nicht erreicht wurde.

6.8 Geringste Mineralisationsrate in OVXDS zu beiden Zeitpunkten

Histologische Untersuchungen erfordern die Explantation von Gewebe. Dynamische Prozesse wie die Knochenbildung und das Remodeling können nur durch Messungen am Endezeitpunkt bewertet werden. Zur Bewertung dieser Vorgänge hat sich neben Biolumineszenz und nicht-invasiver radiologischer Methoden die Fluoreszenzmarkierung als histologische Standardtechnik etabliert. Anhand dieser Markierungen können dynamische Knochenprozesse trotz Gewebeentnahme bewertet werden [142]. In Studien am Menschen wurden Fluoreszenzmarker zur Bestimmung des Knochenmasseverlustes postmenopausaler Frauen in Biopsien des Beckenkamms verwendet [112]. Im hier diskutierten Schafmodell wurde die Fluoreszenzmikroskopie verwendet, um Aussagen über die Mineralisierungsrate der verschiedenen Tiergruppen treffen zu können. Auf diese Weise können die Prozesse der Knochenheilung dynamisch betrachtet werden. Dabei wurden die Zeitintervalle ein Tag, sieben Tage und acht Tage abgebildet. Der eintägige Unterschied stellte sich jedoch im Verlauf als nicht praktikabel heraus, da die Konzentration des ersten grünen Farbstoffs am nächsten Tag noch so hoch war, dass die Osteoblasten nicht empfänglich für den neuen roten Fluoreszenzmarker waren. Die weiteren Intervalle konnten jedoch zur Bestimmung der Mineralisierung pro Tag herangezogen werden. In K zeigte sich zum Zeitpunkt 5M signifikant die größte Mineralisierungsrate gegenüber allen weiteren Tiergruppen ($p < 0,025$). Innerhalb der Kontrolle wurde zwischen den Zeitpunkten ebenfalls ein signifikanter Unterschied gefunden ($p = 0,001$). In K ist somit der physiologische Ablauf der Frakturheilung zu beobachten, der sich durch eine hohe Mineralisierungsrate zum Zeitpunkt 5M auszeichnet und das Remodeling der Defektzone andeutet. Zum Zeitpunkt 8M war die Rate hingegen wieder auf dem Basisniveau. Östrogenmangel machte sich in OVX durch eine signifikant geringere Mineralisation zum Zeitpunkt 5M in Vergleich zu K deutlich ($p = 0,025$). Im Vordergrund stehen dabei die Effekte auf die Osteoblasten, die durch Östrogenmangel verstärkt RANK-L exprimieren und die Synthese von OPG herunter regulieren [15]. Auf diese Weise werden verstärkt Osteoklasten aktiviert und Remodeling eingeleitet. Die Verteilung der ER α und ER β

begünstigte dabei Effekte auf den trabekulären Knochen [62], der hauptsächlich in den definierten ROIs dieser Untersuchungen vorlag. In OVX unterschieden sich die Mineralisationsraten zwischen den Zeitpunkten signifikant ($p=0,035$). So wurde nach achtmonatiger Heilung ein ähnlicher Wert wie in K gemessen. Dies impliziert, dass der Heilungsverlauf zwar verzögert ablief (5M) zum Zeitpunkt 8M jedoch abgeschlossen war. In OVXD bietet sich nahezu ein identisches Bild. Zum Zeitpunkt 5M war die Mineralisationsrate signifikant geringer als in K ($p=0,021$), ehe zum Zeitpunkt 8M kein signifikanter Unterschied berechnet werden konnte. Auch zwischen den Zeitpunkten unterschieden sich die Raten nicht. Daher kann in dieser Bewertung der Einfluss des Vitamin D-Mangels als weitere Ursache der verzögerten Heilung diskutiert werden. Sowohl über systemische Effekte auf die Kalzium(rück-)resorption als auch über lokale Effekte auf die Knochenzellen beeinflusst Vitamin D dabei den Knochenstoffwechsel [79]. Physiologisch erhöht Vitamin D die Kalziumaufnahme in Darm und Niere und erhöht VDR-vermittelt den Aufbau von Knochensubstanz bei ausreichendem Kalziumangebot [5]. Bei geringem Serumkalzium entsteht dauerhaft ein sekundärer Hyperparathyroidismus, der die Knochenresorption durch verstärkte RANK-L-Expression der Osteoblasten begünstigt. Auch Vitamin D kann selbst an den VDR der Osteoblasten binden und die RANK-L-Expression modulieren. So konnten Anderson et al. zeigen, dass niedrige Vitamin D-Spiegel mit verstärkter RANK-L-Expression assoziiert sind und das Frakturrisiko erhöhen [6]. Auch in dieser Studie wurde eine verstärkte RANK-L-Expression in OVXD nachgewiesen (Abb. 25 A+B, Seite 75).

OVXDS zeigte zu beiden Zeitpunkten signifikant die geringste Mineralisationsrate ($p<0,001$). Das gestörte Osteozytennetzwerk mit vergrößertem RANK-L/ OPG-Quotienten und einem resultierenden unausgewogenem Remodeling mit Überwiegen der Resorption bietet eine plausible Erklärung für die verminderte Mineralisation in OVXDS. Verstärkte RANK-L-Expression erhöht die Sclerostinsynthese und inhibiert die Knochenbildung [29]. Der verzögerte Heilungsverlauf in OVXDS wird außerdem durch die signifikant größere Mineralisationsrate nach achtmonatiger Heilung als zum Zeitpunkt 5M deutlich ($p=0,038$). Zum Zeitpunkt 5M liegt die Mineralisationsrate in OVXDS bei weniger als 20% des Wertes in K. Jedoch ist auch zum Zeitpunkt 8M die Mineralisationsrate signifikant kleiner als in allen anderen Versuchsgruppen ($p<0,001$). In diesem Fall ist die Frakturheilung folglich auch nach achtmonatigem Verlauf nicht abgeschlossen, sodass diese Beobachtung ergänzend zu den weiteren histologischen Merkmalen in OVXDS auf eine Pseudarthrose hindeutet.

7 Zusammenfassung

Osteoporose als systemische Erkrankung des Skeletts imponiert histologisch durch eine gestörte Knochenarchitektur und unausgewogene Knochenumbauvorgänge. Die Knochendichte sinkt. In der klinischen Diagnostik spielt daher die DXA-Messung eine zentrale Rolle. Pathophysiologisch steht bei diesem Krankheitsbild das Missverhältnis aus gesteigerter Resorption mit geringer Formation von Knochensubstanz im Fokus. In dieses Gleichgewicht nehmen viele verschiedene Faktoren Einfluss. Die mit 95% häufigste Form der Osteoporose wird durch den postmenopausalen Östrogenmangel der Frau bedingt. In Deutschland lag die Prävalenz der Osteoporose im Jahre 2009 bei 14% der über 50 jährigen beider Geschlechter.

Das Lebenszeitrisiko eine Osteoporose-assoziierte Fragilitätsfraktur zu erleiden liegt derzeit für Frauen bei bis zu 50%, bei Männern bis zu 22%. In Zukunft werden durch den demografischen Wandel diese Zahlen weiter anwachsen, sodass ein detailliertes Verständnis der Abläufe der osteoporotischen Defektheilung immer bedeutender wird.

Anders als im menschlichen Körper konnte in dieser Studie im Schafmodell eine manifeste Osteoporose mit Abnahme der Knochendichte erst durch eine dreifache Osteoporoseinduktion mittels Ovariectomie, Kalzium- und Vitamin D-arme Diät sowie Glukokortikoidinjektionen (OVXDS) erreicht werden. Histologische Kennzeichen der Defektheilung in OVXDS waren der bis nach achtmonatiger Heilung verbleibende Weichteilkallus und bestehende Knorpelreste mit geringem Col X-Gehalt. Strukturelle Veränderungen konnten sowohl in Spongiosa als auch in Kortikalis beobachtet und auf diese Weise die weitreichenden Auswirkungen der Osteoporose dokumentiert werden. Weiterhin war der Anteil des knochentypischen Col I in OVXDS am geringsten und das osteozytäre Netzwerk gestört. Zusammen mit der osteozytären Überexpression von RANK-L mit gesteigertem RANK-L/ OPG-Quotienten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich in OVXDS definitionsgemäß nach achtmonatiger Heilung eine Pseudarthrose entwickelte. Zusätzlich zur insuffizienten Heilung konnte histomorphometrisch eine Mineralisierungsstörung aufgedeckt werden, in der unkoordiniert kollagenes Gewebe verknöchert wird. *In vivo* wurden diese Vorgänge durch die geringste Mineralisationsrate bewiesen.

Diese Erkenntnisse können in Zukunft dazu beitragen, die chirurgische Behandlung osteoporotischer Frakturen an die Herausforderungen anzupassen und die suffiziente Versorgung durch Entwicklung neuer Implantate und Materialien zu gewährleisten.

8 Summary

Osteoporosis is systemic disease hallmarked by disturbed bone structure and bone remodeling through cellular imbalance. The reduction of bone density is clinically diagnosed using DEXA measurement in potentially osteoporotic patients. The imbalance, caused by increased resorption and decreased formation of bone, mark the pathophysiological symptoms of the diseases. The bone remodeling imbalance is multifactorial and most observed is the postmenopausal estrogen deficiency in women. Nevertheless, in Germany 14% of patients over 50 years of age are diagnosed with osteoporosis in both genders. Osteoporotic fragility fractures are associated to high mortality rate, 50% in females and 22% in males. Prospectively, mortality rates will grow even bigger in the aging community in industrial countries. Therefore, the profound understanding of the healing process of osteoporotic fractures is detrimental. The current study aims at understanding the fracture healing pattered in a sheep model of osteoporosis. The triple therapy of bilateral ovariectomy, multideficient diet and glucocorticoid administration (OVXDS) resulted in a lower bone density characterized by DEXA. A major study milestone was the reduction of number of experimental animals utilized. Therefore, defects were created in the iliac crest to serve characterization of osteoporosis progression and later time points of defect healing. After 8 months (M) of healing cartilaginous remnant with small areas of hypertrophic cartilage. The structural alterations in the bony bridging of cortices and formation of trabeculae reflected the effect of osteoporosis manifestation. Furthermore, inferior bone quality was correlated to small type I collagen positive areas. Osteocyte networking was disturbed with less spindle shaped osteocytes compared to spherical ones. Interestingly, overexpression of RANK-L in osteocytes despite a high RANK-L/ OPG global ratio correlated exponentially with treatment progression. Besides the delayed healing, inhomogeneous mineralized patches within the collagenous tissue were present. The double fluorochrome labelling of dynamic mineralization reflect the inferior mineralization rate in OVXDS after 8M of healing. Altogether, the lack of boney bridging, presence of deficient mineralization and cartilaginous remnants are hallmarks of pseudoarthrosis formation in osteoporotic fractures. The results gained in this work will serve as building block for the development of bone substitute materials designed to aid healing of osteoporotic fractures and avoid the formation of pseudoarthrotic tissue.

9 Anhang

Material und Methoden der Dual-X-Ray Absorptiometrie (DXA)

Die Knochendichte sämtlicher Versuchstiere (n=31) wurde vor Biopsieentnahme an den Zeitpunkten 0M und 3M sowie vor Euthanasie am Endzeitpunkt 8M *in vivo* bestimmt. Dazu wurde die im klinischen Alltag etablierte Dual-X-Ray Absorptiometrie (DXA) verwendet.

Die DXA-Scans wurden von weiteren Mitarbeitern und Doktoranden der Experimentellen Unfallchirurgie sowie der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie durchgeführt und die Rohdaten gesammelt.

Dazu wurden die Versuchstiere in Intubationsnarkose (siehe Kapitel 4.5.1, Seite 43) in Brust-Bauch-Lage gebracht und am Untersuchungstisch fixiert. Nachfolgend wurden mit dem DXA-Gerät (Lunar Prodigy, GE Healthcare GmbH, Solingen) Scans des gesamten Körpers der Tiere angefertigt und mit der Software (enCORE software, GE Healthcare GmbH, Solingen, Version 13.40) prozessiert. Zur Auswertung wurden die zwei-dimensionalen Bilder in Regions Of Interest (ROI) eingeteilt. Jede dieser ROIs wies eine konstante Fläche auf und wurde auf verschiedene Skelettregionen übertragen. Als Referenz wurde in dieser Studie die ROI „abdominal width“ verwendet. Dazu wurde die ROI nach jeder Messung manuell auf das Abdomen und die Lendenwirbelsäule (LWS) L1 – L6 ausgerichtet. Daraufhin berechnete die Software die Knochendichte („bone mineral density“, BMD [g/ cm³]), den Mineralgehalt („bone mineral content“, BMC [g]) und den prozentualen Fettgehalt des Gewebes. Vor jeder Messung wurde eine Kalibrierung des Gerätes durchgeführt.

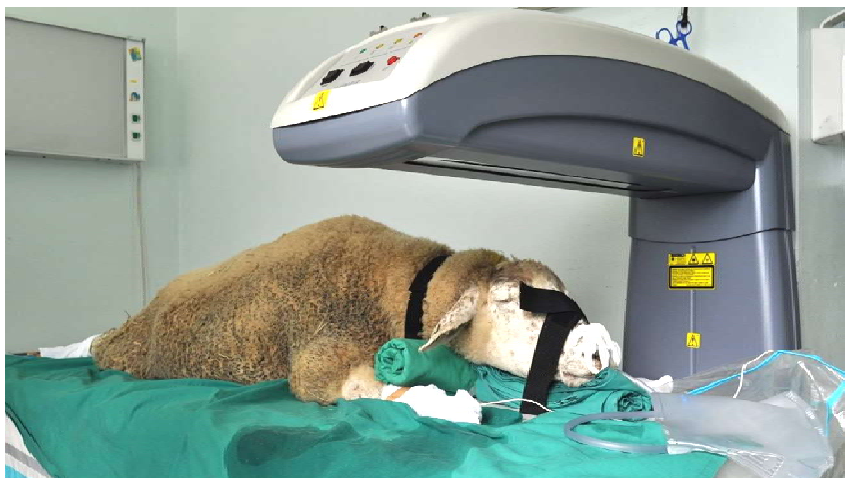


Abb. 31: *In vivo* DXA-Scan eines Versuchstiers in Brust-Bauch-Lagerung und Intubationsnarkose.

Toluidinblau-Färbung

Lösungen:

Alkohol:	Ethanol 522 vergällt mit 1% Petroläther Stockmeier Chemie, Bielefeld, Deutschland, Best. Nr. 1001043227002, 16kg, 20,3 l
Xylol:	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland, Best. Nr. 9713.3, 2,5l
DePex:	Serva, Heidelberg, Deutschland, Best. Nr. 18243.01

Toluidinblau O-Pyronin G nach Prof. Donath:

Lösung A: 8 g Natrium – Tetraborat + 8g Toluidinblau O + 800 ml Aqua dest
15 Minuten auf dem Magnetrührer rühren

Lösung B: 2 g Pyronin G + 200 ml Aqua dest
15 Minuten auf dem Magnetrührer rühren

Lösung A + Lösung B vermischen und 15 Minuten auf dem Magnetrührer
rühren sowie doppelt filtrieren

di-Natriumtetraborat (Borax)	Merck, Darmstadt, Deutschland, Best. Nr. 1.06306.0250
Pyronin G	Merck, Darmstadt, Deutschland, Best. Nr. 7518
Toluidinblau O	Chroma, Kreuzau, Deutschland, Best. Nr. 1B481

Färbeprotokoll:

1. Entparaffinieren in Xylol 2 x 5 Minuten
2. Absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest je 2 – 5 Minuten
3. Toluidinblau O Lösung 10 – 60 Sekunden
4. Aqua dest abspülen
5. Aufsteigende Alkoholreihe je 2 – 5 Minuten
6. Fixieren in Xylol 2 x 5 Minuten
7. eindecken in DePex

Anhang

Trichrom Färbung nach Masson Goldner

Lösungen:

- 1 % Essigsäure in Aqua dest Eisessig von Merck 1 Liter
Best. Nr. 1.00063.1000
- 0,5 % HCl-Alkohol 25 % HCl von Riedel-de Häen, Best. Nr. 07104
20 ml 25 % HCl + 980 ml 70 % vergällter Alkohol in Aqua dest

Eisenhämatoxylin nach Weigert:

- Lösung A: Firma Roth Best. Nr. X906.1 500 ml
Lösung B: Firma Roth Best. Nr. X907.1 500 ml

Gebrauchslösung: Lösung A mit Lösung B im Verhältnis 1:1 mischen (7 Tage haltbar)

Masson – Gebrauchslösung:

- Lösung A: 1 g Fuchsin-Ponceau Masson in 100 ml Aqua dest aufkochen +
1 ml Eisessig

Fuchsin-Ponceau Masson: Firma Roth, Best. Nr.1A 350 10 g

- Lösung B: 1 g Ponceau de Xylidine in 100 ml Aqua dest aufkochen +
1 ml Eisessig und anschließend filtrieren

Pulver Ponceau de Xylidine: Firma Chroma, Best. Nr. 1B 207 100 g

Fertige Gebrauchslösung im Verhältnis 1:2 mischen.

Azophyloxin – Lösung:

- 0,5 g Azophyloxin in 100 g Aqua dest + 0,2 ml Eisessig und filtrieren
Azophyloxin: Firma Chroma Best. Nr. 1B103

Ponceau – Säurefuchsin – Azophyloxin – Gebrauchslösung (PSA – Lösung):

- 10 ml Masson – Gebrauchslösung + 2 ml Azophyloxin – Lösung
+ 88 ml 0,2 % Essigsäure

Phosphormolybdänsäure – Orange G – Gemisch:

- 3 g Phosphormolybdänsäure (Phosphorwolframsäure; Wolframatophosphorsäure
Hydrat) + 2 g Orange G + 100 g Aqua dest und anschließend filtrieren
Phosphormolybdänsäure: Merck, Best. Nr. 1.00583.0250 250 g
Orange G: Firma Chroma Best. Nr. 1B 221 100 g

0,2 % Lichtgrün:

0,2 g Lichtgrün + 0,2 ml Eisessig + 100 ml Aqua dest und filtrieren

Lichtgrün: Firma Fluka, Best. Nr. 62110 25g

Färbeprotokoll:

- | | |
|--|---------------------|
| 1. Entparaffinieren in Xylol | 2 x 5 Minuten |
| 2. Absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest | je 2 – 5 Minuten |
| 3. Eisenhämatoxylin - Lösung nach Weigert | 15 Minuten |
| 4. Aqua dest | abspülen |
| 5. 0,5 % HCl – Alkohol | kurz differenzieren |
| 6. Aqua dest | abspülen |
| 7. Fließendes Leitungswasser (Bläuen) | 10 Minuten |
| 8. Aqua dest | abspülen |
| 9. Ponceau-Säurefuchsin-Azophyloxin – Lösung | 5 Minuten |
| 10. 1 % Essigsäure | abspülen |
| 11. Phosphormolybdänsäure – Orange G Gemisch | 8 – 10 Minuten |
| 12. 1 % Essigsäure | abspülen |
| 13. Lichtgrün | 4 – 5 Minuten |
| 14. 1 % Essigsäure | abspülen |
| 15. Aqua dest | abspülen |
| 16. Aufsteigende Alkoholreihe | je 2 – 5 Minuten |
| 17. Fixieren in Xylol | 2 x 5 Minuten |
| 18. Eindecken in DePex | |

Anhang

Kollagen I Immunhistochemie

Lösungen:

Technisches Aceton p.a.: Merck, Darmstadt, Deutschland, Best. Nr. 1.00014.1011, 1L

Waschpuffer:

TBS (Tris-NaCl)- Puffer Stammlösung: 60,57 g Tris Base + 87,66 g NaCl
in 1000 ml Aqua dest, pH mit 25%iger HCl auf 7,4 einstellen

TBS - Puffer: Stammlösung 1:10 mit Aqua dest verdünnen

TBS - Puffer pH 7,4 + 0,025% Triton-X-100

100 ml Stammlösung + 900 ml Aqua dest + 0,25 ml Triton-X-100 (Tris-Pufferan, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland; Triton-X-100, Merck, Darmstadt, Deutschland)

BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland):

1% BSA in TBS: 1 g BSA in 100 ml TBS

BLOXALL Endogenous Peroxidase and Alkaline Phosphatase Blocking Solution

(Vector Laboratories, Burlingame, CA, Best. Nr. SP-6000, 100ml)

ImmEdge PEN

(Vector Laboratories, Burlingame, CA, Best. Nr. H-4000)

Dako Verdünnungspuffer

(Dako Antibody Diluent, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark,
Best. Nr. S0809)

Antikörper:

(1) Kollagen Typ I Antikörper (Purified rabbit anti-human Type I Collagen,
Biomex GmbH, Heidelberg, Deutschland, Best. Nr. 20111)

(2) Sekundärantikörper (Goat Anti-Rabbit IgG H&L, abcam, Cambridge,
Großbritannien, Best. Nr. ab6722)

Tierseren:

Ziegenserum (Goat Serum Donor Herd, Sigma-Aldrich, München, Deutschland,
Best. Nr. G6767)

Schafserum (Bio&SELL, Nürnberg, Deutschland, Best. Nr. SCA.SE.0100)

ABC-AP Komplex (Anti Rabbit IgG, Vector Laboratories, Burlingame, CA,
Best. Nr. AK-5200)

VectorRed Substrat (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Best. Nr. SK-5100)

5ml Tris-HCl Puffer	+ 2 Tropfen Reagenz 1	→vortexen
	+ 2 Tropfen Reagenz 2	→vortexen
	+ 2 Tropfen Reagenz 3	→vortexen

Hämalaunlösung sauer nach Mayer pH 4,2 (Carl Roth, GmbH + Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland, Best. Nr. T865)

Färbeprotokoll:

1. Entparaffinieren in Xylol 2 x 5 Minuten
2. Technisches Aceton 10 Minuten
3. Technisches Aceton + Waschpuffer (Verhältnis 1:1) 10 Minuten
4. Waschpuffer 2 x 10 Minuten
5. Aqua dest 5 Minuten
6. Umkreisen der Präparate mit ImmEdge Pen
7. BLOXALL Blocking 10 Minuten
8. Waschpuffer 2 x 5 Minuten
9. Serumblockade (50µl Ziegenserum + 5ml TBS) 20 Minuten
10. Waschpuffer 2 x 5 Minuten
11. Kollagen Typ I Antikörper 1:250 24 Stunden
in Dako Verdünnungspuffer bei 4°C
12. Entfernen des Antikörpers
13. Waschpuffer 3 x 5 Minuten
14. Sek. Antikörper 1:500 gelöst in Schafserum 30 Minuten
(1µl Antikörper + 62,5µl Schafserum + 436,5µl TBS/BSA)
15. Waschpuffer 2 x 5 Minuten
16. ABC-AP Komplex Vektor 30 Minuten
5µl Reagenz A + 5µl Reagenz B in 500µl TBS
(30 Minuten vor Benutzung mischen)
17. Waschpuffer 2 x 5 Minuten
18. Aqua dest 5 Minuten
19. VektorRed Substrat 8 Minuten
in 5ml 150mM Tris-HCl puffer pH 8,3

Anhang

- | | |
|--|---------------|
| 20. Aqua dest | 3 x 5 Minuten |
| 21. Gegenfärben mit Hämatoxylin sauer nach Meyers pH 4,2 | 30 Sekunden |
| 22. Fließendes Wasser | 2 Minuten |
| 23. Aufsteigende Alkoholreihe | je 1 Minute |
| 24. Fixieren in Xylol | 2 x 5 Minuten |
| 25. Eindecken in Vitro clud | |

Kollagen X Immunhistochemie

Lösungen:

Hyaluronidase Lösung	(Biologo, Kronshagen, Deutschland, Best. Nr. HYA02-50)
PBS	(Phosphate Buffered Saline 10x pH 7,4, LifeTechnologies, Darmstadt, Deutschland, Best. Nr. 70011-036)
ABC elite Komplex	(Vector Laboratories, Burlingame, CA, Best. Nr. PK-6100)

Antikörper:

- (1) Kollagen Typ X Antikörper (Rabbit Polyclonal Antibody, Abbiotec, San Diego, CA, Best. Nr. 251204)
- (2) Sekundärantikörper (Biotinylated Anti-Rabbit IgG H+L, Vector Laboratories, Burlingame, CA, Best. Nr. BA-1000)

Vector NovaRED (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Best. Nr. SK-4800)

5ml Aqua dest	+ 3 Tropfen Reagenz 1	→vortexen
	+ 2 Tropfen Reagenz 2	→vortexen
	+ 2 Tropfen Reagenz 3	→vortexen
	+ 2 Tropfen Hydroperoxidase	→vortexen

Färbeprotokoll:

1. Entparaffinieren in Xylol 2 x 5 Minuten
2. Technisches Aceton 10 Minuten
3. Technisches Aceton + Waschpuffer (Verhältnis 1:1) 10 Minuten
4. Waschpuffer 2 x 10 Minuten
5. Aqua dest 5 Minuten
6. Umkreisen der Präparate mit ImmEdge Pen
7. Vorbehandlung mit Hyaluronidase 0,2% 30 Minuten
1:100 in PBS pH 5,0 bei 37°C
8. Aqua dest 5 Minuten
9. Waschpuffer 2 x 5 Minuten
10. BLOXALL blocking 10 Minuten
11. Waschpuffer 2 x 5 Minuten

Anhang

12. Serumblockade (50µl Ziegenserum + 5ml TBS)	20 Minuten
13. Waschpuffer	2 x 5 Minuten
14. Kollagen Typ X Antikörper 1:100 in Dako Verdünnungspuffer bei 4°C	24 Stunden
15. Entfernen des Antikörpers	
16. Waschpuffer	3 x 5 Minuten
17. Sek. Antikörper 1:500 gelöst in Schafserum (1µl Antikörper + 62,5µl Schafserum + 436,5µl TBS/BSA)	30 Minuten
18. Waschpuffer	2 x 5 Minuten
19. ABC elite Komplex 9µl Reagenz A + 9µl Reagenz B + 500µl TBS (30 Minuten vor Benutzung mischen)	30 Minuten
20. Waschpuffer	2 x 5 Minuten
21. Aqua dest	5 Minuten
22. Nova Red Vector in 5ml Aqua inject	2:20 Minuten
23. Aqua dest	3 x 5 Minuten
24. Gegenfärbung mit Hämatoxylin sauer nach Mayer pH 4,2	2:30 Minuten
25. Aqua dest	abspülen
26. Fließendes Wasser	2 Minuten
27. Aqua dest	abspülen
28. Aufsteigende Alkoholreihe	je 1 Minute
29. Fixieren in Xylol	2 x 5 Minuten
30. Eindecken in Vitro clud	

Silbernitrat-Färbung

Färbelösungen:

Solutionmix:

Solution A: 24,75 ml Aqua bidest + 250 µl Ameisensäure + 0,5 g Gelatine Low Bloom

Bei 37°C unter ständiger Bewegung lösen.

Kühl lagern, vor Benutzung auf 37°C erwärmen.

Solution B: 50% Silbernitrat = 10 g Silbernitrat + 20 ml Aqua bidest

Ameisensäure: Merck, Darmstadt, Deutschland, Best. Nr. 1,00264

Gelatine, from bovine skin: Sigma-Aldrich, United Kingdom, Best. Nr. G9391-100G

Silver nitrate: Sigma-Aldrich, United Kingdom, Best. Nr. 31630-100G-R

Natriumthiosulfat-Pentahydrat: Merck, Darmstadt, Deutschland,
Best. Nr. 1.06509.0100)

Färbeprotokoll:

- | | |
|--|---------------|
| 1. Entpraffinieren in Xylol | 2 x 5 Minuten |
| 2. Absteigende Alkoholreihe | je 5 Minuten |
| 3. Aqua bidest | 2 x 5 Minuten |
| 4. Einkreisen mit Pap Pen | |
| 5. Solutionmix A+B (Verhältnis 1:2) in feuchter Kammer | 70 Minuten |
| 6. Aqua dest | 5 Minuten |
| 7. Natriumthiosulfat 5% | 10 Minuten |
| 8. Aqua dest | 5 Minuten |
| 9. Aufsteigende Alkoholreihe | je 5 Minuten |
| 10. Fixieren in Xylol | 2 x 5 Minuten |
| 11. Eindecken in DePex | |

Anhang

RANK-L/ OPG Immunhistochemie

Lösungen:

Citratpuffer:

41 ml 0,1 M Natrium-Citrat in 400 ml Aqua dest. + 0,1 M Citronensäure bis pH 6,0

Anschließend mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen

Citronensäure-Monohydrat: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland, Best. Nr. 3958.2

Tri-Sodium citrate dehydrate: Merck, Darmstadt, Deutschland, Best. Nr. 1.06448

Antikörper:

- (1) RANK-L Antikörper (Maus monoklonal, Abcam, Cambridge, UK, Best.Nr. 12A668)
- (2) Osteoprotegerin Antikörper (Kaninchen polyklonal, Abbiotec, CA, Best.Nr. 250800)
- (3) Biotinylierter Universalantikörper (Anti-Maus/ Kaninchen IgG, Vector, CA, Best. Nr. BA-1400)

Färbeprotokoll:

- | | |
|--|----------------|
| 1. Entparaffinieren in Xylol | 2 x 5 Minuten |
| 2. Technisches Aceton | 10 Minuten |
| 3. Technisches Aceton + Waschpuffer (Verhältnis 1:1) | 10 Minuten |
| 4. Waschpuffer | 2 x 10 Minuten |
| 5. Citratpuffer pH 6,0 bei Raumtemperatur | 60 Minuten |
| 6. Waschpuffer | 2 x 5 Minuten |
| 7. BLOXALL Blocking | 10 Minuten |
| 8. Waschpuffer | 5 Minuten |
| 9. Serumblockade (AP-kit) | 20 Minuten |
| (1 Tropfen Universalserum (45µl) + 5ml TBS) | |
| 10. Präparate säubern | |
| 11. RANK-L/ OPG Antikörper 1:100 | 24 Stunden |
| in Dako Verdünnungspuffer bei 4°C | |
| 12. Entfernen des Antikörpers | |
| 13. Waschpuffer | 3 x 5 Minuten |
| 14. Sek. Antikörper | 30 Minuten |

- (1Tropfen Universalserum + 1Tropfen Universalantikörper + 2,5 ml TBS)
15. Waschpuffer 2 x 5 Minuten
 16. ABC-AP Komplex Vektor 30 Minuten
5µl Reagenz A + 5µl Reagenz B in 500µl TBS
(30 Minuten vor Benutzung mischen)
 17. Waschpuffer 2 x 5 Minuten
 18. Aqua dest 5 Minuten
 19. VektorRed Substrat 27 Minuten
in 5ml 150mM Tris-HCl puffer pH 8,3
 20. Fließendes Wasser
 21. 70% Ethanol kurz eintauchen
 22. 100% Ethanol 10 Minuten
 23. Trocknen bei 65°C 30 Minuten
 24. Eindecken in Vitro clud

Anhang

Injektionslösungen der Fluoreszenz-Markierungen

Injektionslösungen:

Alizarin-Rot Komplex:

3% Alizarin Complexone in Aqua inj. + 2% NaHCO₃ ergibt pH 7,4

Anschließend mit 0,22 µm Filter steril filtrieren

Alizarin Complexone: Sigma-Aldrich, MO, USA, Best. Nr. A3882

NaHCO₃: Cellpure, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland,

Best. HN01.1

Calcein-Grün Komplex:

3% Calcein in Aqua inj. + 4% NaHCO₃ ergibt pH 7,4

Anschließend doppelt mit 0,45 µm und 0,22 µm Filter steril filtrieren

Calcein: Sigma-Aldrich, MO, Best. Nr. C0875

NaHCO₃: Cellpure, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland,

Best. Nr. HN01.1

Sämtliche Schritte wurden in einer Sterilbank durchgeführt sowie sterile Gefäße und Utensilien verwendet. Aufgrund hoher Filterverluste wurden die Lösungen in doppelter Menge angesetzt.

10 Literaturverzeichnis

- [1] Abdallah, B.M., et al., *Increased RANKL/OPG mRNA ratio in iliac bone biopsies from women with hip fractures*. *Calcif Tissue Int*, 2005. **76**(2): p. 90-7.
- [2] Aguirre, J.I., et al., *Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss*. *J Bone Miner Res*, 2006. **21**(4): p. 605-15.
- [3] Ai-Aql, Z.S., et al., *Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis*. *J Dent Res*, 2008. **87**(2): p. 107-18.
- [4] An, Y.H., *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. 2003, Totowa, N.J.: Humana Press. 587 S.
- [5] Anderson, P.H., et al., *The pleiotropic effects of vitamin D in bone*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2013. **136**: p. 190-4.
- [6] Anderson, P.H., et al., *Vitamin D depletion induces RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone loss in a rodent model*. *J Bone Miner Res*, 2008. **23**(11): p. 1789-97.
- [7] Arens, D., et al., *Seasonal changes in bone metabolism in sheep*. *Vet J*, 2007. **174**(3): p. 585-91.
- [8] Augat, P., et al., *Glucocorticoid-treated sheep as a model for osteopenic trabecular bone in biomaterials research*. *J Biomed Mater Res A*, 2003. **66**(3): p. 457-62.
- [9] Baharuddin, N.A., et al., *Localization of RANK, RANKL and osteoprotegerin during healing of surgically created periodontal defects in sheep*. *J Periodontal Res*, 2015. **50**(2): p. 211-9.
- [10] Battaglini, R.A., et al., *Circulating sclerostin is elevated in short-term and reduced in long-term SCI*. *Bone*, 2012. **51**(3): p. 600-5.
- [11] Benninghoff, A. and H. Ferner, *Lehrbuch der Anatomie des Menschen makroskop. u. mikroskop. Anatomie unter funktionellen Gesichtspunkten*. M©*nchen, Berlin, Wien: Urban & Schwarzenberg.
- [12] Bleibler, F., et al., *[Cost of fractures in German hospitals--what role does osteoporosis play?]*. *Gesundheitswesen*, 2014. **76**(3): p. 163-8.
- [13] Bonewald, L.F., *The amazing osteocyte*. *J Bone Miner Res*, 2011. **26**(2): p. 229-38.
- [14] Bono, C.M. and T.A. Einhorn, *Overview of osteoporosis: pathophysiology and determinants of bone strength*. *Eur Spine J*, 2003. **12 Suppl 2**: p. S90-6.

- [15] Bord, S., et al., *The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts*. Bone, 2003. **32**(2): p. 136-41.
- [16] Borel, P., D. Caillaud, and N.J. Cano, *Vitamin D bioavailability: state of the art*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2015. **55**(9): p. 1193-205.
- [17] Brincat, M., et al., *The role of vitamin D in osteoporosis*. Maturitas, 2015. **80**(3): p. 329-32.
- [18] Burgess, T.L., et al., *The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts*. J Cell Biol, 1999. **145**(3): p. 527-38.
- [19] Canalis, E., *Effect of glucocorticoids on type I collagen synthesis, alkaline phosphatase activity, and deoxyribonucleic acid content in cultured rat calvariae*. Endocrinology, 1983. **112**(3): p. 931-9.
- [20] Canalis, E., et al., *Perspectives on glucocorticoid-induced osteoporosis*. Bone, 2004. **34**(4): p. 593-8.
- [21] Canalis, E. and A.M. Delany, *Mechanisms of glucocorticoid action in bone*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **966**: p. 73-81.
- [22] Canalis, E., et al., *Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy*. Osteoporos Int, 2007. **18**(10): p. 1319-28.
- [23] Cauley, J.A., *Estrogen and bone health in men and women*. Steroids, 2015. **99**(Pt A): p. 11-5.
- [24] Chen, H., T. Senda, and K.Y. Kubo, *The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis*. Med Mol Morphol, 2015. **48**(2): p. 61-8.
- [25] Ciarelli, T.E., et al., *Variations in three-dimensional cancellous bone architecture of the proximal femur in female hip fractures and in controls*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(1): p. 32-40.
- [26] Dogan, A., et al., *Healing of artificial fenestration defects by seeding of fibroblast-like cells derived from regenerated periodontal ligament in a dog: a preliminary study*. Tissue Eng, 2003. **9**(6): p. 1189-96.
- [27] Donmez, B.O., et al., *Effect of angiotensin II type I receptor blocker on osteoporotic rat femurs*. Pharmacol Rep, 2012. **64**(4): p. 878-88.
- [28] Eastell, R. and H. Lambert, *Strategies for skeletal health in the elderly*. Proc Nutr Soc, 2002. **61**(2): p. 173-80.
- [29] El Khassawna, T., et al., *Impaired extracellular matrix structure resulting from malnutrition in ovariectomized mature rats*. Histochem Cell Biol, 2015. **144**(5): p. 491-507.

- [30] El Khassawna, T., et al., *Osteocyte Regulation of Receptor Activator of NF-kappaB Ligand/Osteoprotegerin in a Sheep Model of Osteoporosis*. Am J Pathol, 2017. **187**(8): p. 1686-1699.
- [31] El Khassawna, T., et al., *Deterioration of fracture healing in the mouse model of NF1 long bone dysplasia*. Bone, 2012. **51**(4): p. 651-60.
- [32] Elima, K., et al., *The mouse collagen X gene: complete nucleotide sequence, exon structure and expression pattern*. Biochem J, 1993. **289 (Pt 1)**: p. 247-53.
- [33] Eschler, A., et al., *The standardized creation of a lumbar spine vertebral compression fracture in a sheep osteoporosis model induced by ovariectomy, corticosteroid therapy and calcium/phosphorus/vitamin D-deficient diet*. Injury, 2015. **46 Suppl 4**: p. S17-23.
- [34] Favus, M.J., *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 3rd ed ed., Philadelphia u.a.: Lippincott-Raven. XXIII, 477 S.
- [35] Feldman, B.J., *Glucocorticoids influence on mesenchymal stem cells and implications for metabolic disease*. Pediatr Res, 2009. **65**(2): p. 249-51.
- [36] Fermor, B. and T.M. Skerry, *PTH/PTHrP receptor expression on osteoblasts and osteocytes but not resorbing bone surfaces in growing rats*. J Bone Miner Res, 1995. **10**(12): p. 1935-43.
- [37] Franceschi, R.T., P.R. Romano, and K.Y. Park, *Regulation of type I collagen synthesis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human osteosarcoma cells*. J Biol Chem, 1988. **263**(35): p. 18938-45.
- [38] Gauthier, A., et al., *Burden of postmenopausal osteoporosis in Germany: estimations from a disease model*. Arch Osteoporos, 2012. **7**: p. 209-18.
- [39] Gerstenfeld, L.C., et al., *Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis*. J Histochem Cytochem, 2006. **54**(11): p. 1215-28.
- [40] Gerstenfeld, L.C., et al., *Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation*. J Cell Biochem, 2003. **88**(5): p. 873-84.
- [41] Giannoudis, P., et al., *Fracture healing in osteoporotic fractures: is it really different? A basic science perspective*. Injury, 2007. **38 Suppl 1**: p. S90-9.
- [42] Giannoudis, P.V., T.A. Einhorn, and D. Marsh, *Fracture healing: the diamond concept*. Injury, 2007. **38 Suppl 4**: p. S3-6.
- [43] Gomez-Barrena, E., et al., *Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions*. Bone, 2015. **70**: p. 93-101.

- [44] Green, E., J.D. Lubahn, and J. Evans, *Risk factors, treatment, and outcomes associated with nonunion of the midshaft humerus fracture*. J Surg Orthop Adv, 2005. **14**(2): p. 64-72.
- [45] Grese, T.A. and J.A. Dodge, *Selective estrogen receptor modulators (SERMs)*. Curr Pharm Des, 1998. **4**(1): p. 71-92.
- [46] Hadji, P., et al., *The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data*. Dtsch Arztebl Int, 2013. **110**(4): p. 52-7.
- [47] Hagiwara, H., et al., *Deceleration by angiotensin II of the differentiation and bone formation of rat calvarial osteoblastic cells*. J Endocrinol, 1998. **156**(3): p. 543-50.
- [48] Hartmann, K., et al., *Molecular Actions of Glucocorticoids in Cartilage and Bone During Health, Disease, and Steroid Therapy*. Physiol Rev, 2016. **96**(2): p. 409-47.
- [49] Haussler, B., et al., *Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study*. Osteoporos Int, 2007. **18**(1): p. 77-84.
- [50] Heino, T.J., T.A. Hentunen, and H.K. Vaananen, *Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen*. J Cell Biochem, 2002. **85**(1): p. 185-97.
- [51] Hematti, P., *Mesenchymal stromal cells and fibroblasts: a case of mistaken identity?* Cytotherapy, 2012. **14**(5): p. 516-21.
- [52] Hernlund, E., et al., *Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA)*. Arch Osteoporos, 2013. **8**: p. 136.
- [53] Herold, G., *Innere Medizin eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die ärztliche Prüfung ; mit ICD-10 Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. 2015, Köln: Herold. 1002 S.
- [54] Jabbar, S., et al., *Osteoprotegerin, RANKL and bone turnover in postmenopausal osteoporosis*. J Clin Pathol, 2011. **64**(4): p. 354-7.
- [55] Jahani, M., et al., *The effect of osteocyte apoptosis on signalling in the osteocyte and bone lining cell network: a computer simulation*. J Biomech, 2012. **45**(16): p. 2876-83.
- [56] Jia, D., et al., *Glucocorticoids act directly on osteoclasts to increase their life span and reduce bone density*. Endocrinology, 2006. **147**(12): p. 5592-9.

- [57] Johnell, O. and J.A. Kanis, *An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures*. Osteoporos Int, 2006. **17**(12): p. 1726-33.
- [58] Johnson, R.B., et al., *Effect of estrogen deficiency on skeletal and alveolar bone density in sheep*. J Periodontol, 2002. **73**(4): p. 383-91.
- [59] Kearns, A.E., S. Khosla, and P.J. Kostenuik, *Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease*. Endocr Rev, 2008. **29**(2): p. 155-92.
- [60] Kennedy, O.D., et al., *Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations*. Bone, 2012. **50**(5): p. 1115-22.
- [61] Khosla, S., L.J. Melton, 3rd, and B.L. Riggs, *The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed?* J Bone Miner Res, 2011. **26**(3): p. 441-51.
- [62] Khosla, S., M.J. Oursler, and D.G. Monroe, *Estrogen and the skeleton*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(11): p. 576-81.
- [63] Kilkenny, C., et al., *Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research*. PLoS Biol, 2010. **8**(6): p. e1000412.
- [64] Kim, S., et al., *Activation of receptor activator of NF-kappaB ligand gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is mediated through multiple long-range enhancers*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(17): p. 6469-86.
- [65] Klinke, R. and R. Baumann, *Physiologie 68 Tabellen*. 6., vollst. ©*berarb. Aufl. ed. 2010, Stuttgart u.a.: Thieme. XII, 944 S.
- [66] Knothe Tate, M.L., et al., *The osteocyte*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(1): p. 1-8.
- [67] Kobayashi, Y., N. Udagawa, and N. Takahashi, *Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2009. **19**(1): p. 61-72.
- [68] Kogianni, G., V. Mann, and B.S. Noble, *Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction*. J Bone Miner Res, 2008. **23**(6): p. 915-27.
- [69] Kong, Y.Y., et al., *OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis*. Nature, 1999. **397**(6717): p. 315-23.
- [70] Kottstorfer, J., et al., *Are OPG and RANKL involved in human fracture healing?* J Orthop Res, 2014. **32**(12): p. 1557-61.

- [71] Kristensen, H.B., et al., *Osteoblast recruitment routes in human cancellous bone remodeling*. Am J Pathol, 2014. **184**(3): p. 778-89.
- [72] Kruse, N.J., et al., *Inhibitory effects of glucocorticoids on collagen synthesis by mouse sponge granulomas and granuloma fibroblasts in culture*. Biochim Biophys Acta, 1978. **540**(1): p. 101-16.
- [73] Kwon, B.S., et al., *TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption*. FASEB J, 1998. **12**(10): p. 845-54.
- [74] Lacroix, D., et al., *Biomechanical model to simulate tissue differentiation and bone regeneration: application to fracture healing*. Med Biol Eng Comput, 2002. **40**(1): p. 14-21.
- [75] Lee, C.H., et al., *CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model*. J Clin Invest, 2015. **125**(10): p. 3992.
- [76] Lee, S.K. and J.A. Lorenzo, *Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation*. Endocrinology, 1999. **140**(8): p. 3552-61.
- [77] Li, G., et al., *An overview of osteoporosis and frailty in the elderly*. BMC Musculoskelet Disord, 2017. **18**(1): p. 46.
- [78] Li, X., et al., *Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts*. J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 33098-106.
- [79] Lieben, L. and G. Carmeliet, *Vitamin D signaling in osteocytes: effects on bone and mineral homeostasis*. Bone, 2013. **54**(2): p. 237-43.
- [80] Lill, C.A., A.K. Fluegel, and E. Schneider, *Effect of ovariectomy, malnutrition and glucocorticoid application on bone properties in sheep: a pilot study*. Osteoporos Int, 2002. **13**(6): p. 480-6.
- [81] Lill, C.A., et al., *Bone changes due to glucocorticoid application in an ovariectomized animal model for fracture treatment in osteoporosis*. Osteoporos Int, 2002. **13**(5): p. 407-14.
- [82] Little, D.G., M. Ramachandran, and A. Schindeler, *The anabolic and catabolic responses in bone repair*. J Bone Joint Surg Br, 2007. **89**(4): p. 425-33.
- [83] LoCasco, V., et al., *Bone loss in response to long-term glucocorticoid therapy*. Bone Miner, 1990. **8**(1): p. 39-51.

- [84] Löffler, G., *Biochemie und Pathobiochemie mit 192 Tabellen ; [+ online specials]*. 8., vollst. neu bearb. Aufl. ed. Springer-Lehrbuch. 2007, Heidelberg: Springer.
- [85] Lynn, H., et al., *Angiotensin converting enzyme inhibitor use is associated with higher bone mineral density in elderly Chinese*. *Bone*, 2006. **38**(4): p. 584-8.
- [86] Ma, Y.L., et al., *Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation*. *Endocrinology*, 2001. **142**(9): p. 4047-54.
- [87] Manolagas, S.C., D.C. Anderson, and G.A. Lumb, *Glucocorticoids regulate the concentration of 1,25-dihydroxycholecalciferol receptors in bone*. *Nature*, 1979. **277**(5694): p. 314-5.
- [88] Marcus, R., et al., *Fundamentals of osteoporosis*. 2010: Elsevir. 537 S.
- [89] Marsell, R. and T.A. Einhorn, *The biology of fracture healing*. *Injury*, 2011. **42**(6): p. 551-5.
- [90] Martin, R.B., *Fatigue microdamage as an essential element of bone mechanics and biology*. *Calcif Tissue Int*, 2003. **73**(2): p. 101-7.
- [91] Martin, T.J., *Osteoblast-derived PTHrP is a physiological regulator of bone formation*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(9): p. 2322-4.
- [92] Martin, T.J. and N.A. Sims, *Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption*. *Trends Mol Med*, 2005. **11**(2): p. 76-81.
- [93] Mavcic, B. and V. Antolic, *Optimal mechanical environment of the healing bone fracture/osteotomy*. *Int Orthop*, 2012. **36**(4): p. 689-95.
- [94] McSheehy, P.M. and T.J. Chambers, *Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone*. *Endocrinology*, 1986. **118**(2): p. 824-8.
- [95] Miao, D., et al., *Osteoblast-derived PTHrP is a potent endogenous bone anabolic agent that modifies the therapeutic efficacy of administered PTH 1-34*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(9): p. 2402-11.
- [96] Mohan, S. and D.J. Baylink, *Bone growth factors*. *Clin Orthop Relat Res*, 1991(263): p. 30-48.
- [97] Mori, S., et al., *Trabecular bone volume and microdamage accumulation in the femoral heads of women with and without femoral neck fractures*. *Bone*, 1997. **21**(6): p. 521-6.
- [98] Nakase, T. and H. Yoshikawa, *Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration*. *J Bone Miner Metab*, 2006. **24**(6): p. 425-33.

- [99] Negrete-Corona, J., J.C. Alvarado-Soriano, and L.A. Reyes-Santiago, [*Hip fracture as risk factor for mortality in patients over 65 years of age. Case-control study*]. *Acta Ortop Mex*, 2014. **28**(6): p. 352-62.
- [100] O'Brien, C.A., et al., *Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength*. *Endocrinology*, 2004. **145**(4): p. 1835-41.
- [101] Pajevic, P.D., et al., *Osteocyte biology and space flight*. *Curr Biotechnol*, 2013. **2**(3): p. 179-183.
- [102] Pearce, A.I., et al., *Animal models for implant biomaterial research in bone: a review*. *Eur Cell Mater*, 2007. **13**: p. 1-10.
- [103] Pederson, L., et al., *Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(52): p. 20764-9.
- [104] Pereira, R.M., A.M. Delany, and E. Canalis, *Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture*. *Bone*, 2001. **28**(5): p. 484-90.
- [105] Philbrick, W.M., et al., *Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology*. *Physiol Rev*, 1996. **76**(1): p. 127-73.
- [106] Prince, R.L., *Counterpoint: estrogen effects on calcitropic hormones and calcium homeostasis*. *Endocr Rev*, 1994. **15**(3): p. 301-9.
- [107] Quinn, J.M. and M.T. Gillespie, *Modulation of osteoclast formation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **328**(3): p. 739-45.
- [108] Rachez, C. and L.P. Freedman, *Mechanisms of gene regulation by vitamin D(3) receptor: a network of coactivator interactions*. *Gene*, 2000. **246**(1-2): p. 9-21.
- [109] Rachner, T.D., S. Khosla, and L.C. Hofbauer, *Osteoporosis: now and the future*. *Lancet*, 2011. **377**(9773): p. 1276-87.
- [110] Raggatt, L.J. and N.C. Partridge, *Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(33): p. 25103-8.
- [111] Rahn, B.A., et al., *Primary bone healing. An experimental study in the rabbit*. *J Bone Joint Surg Am*, 1971. **53**(4): p. 783-6.
- [112] Recker, R.R., et al., *Static and tetracycline-based bone histomorphometric data from 34 normal postmenopausal females*. *J Bone Miner Res*, 1988. **3**(2): p. 133-44.
- [113] Reinwald, S. and D. Burr, *Review of nonprimate, large animal models for osteoporosis research*. *J Bone Miner Res*, 2008. **23**(9): p. 1353-68.

- [114] Renz-Polster, H. and S. Krautzig, *Basislehrbuch innere Medizin kompakt - greifbar - verständlich*. 5. Aufl. ed. Mediscript. 2013, München: Elsevier. XIX, 1202 S.
- [115] Richette, P., M. Corvol, and T. Bardin, *Estrogens, cartilage, and osteoarthritis*. Joint Bone Spine, 2003. **70**(4): p. 257-62.
- [116] Riggs, B.L. and L.J. Melton, 3rd, *The prevention and treatment of osteoporosis*. N Engl J Med, 1992. **327**(9): p. 620-7.
- [117] Robling, A.G., et al., *Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin*. J Biol Chem, 2008. **283**(9): p. 5866-75.
- [118] Rosen, C.J., et al., *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 8th ed. 2013, Ames, Iowa: Wiley-Blackwell. 1 online resource (xxvi, 1078 pages).
- [119] Ruh, M.F., L.K. Cox, and T.S. Ruh, *Estrogen receptor interaction with specific histones. Binding to genomic DNA and an estrogen response element*. Biochem Pharmacol, 1996. **52**(6): p. 869-78.
- [120] Rumi, M.N., et al., *The origin of osteoprogenitor cells responsible for heterotopic ossification following hip surgery: an animal model in the rabbit*. J Orthop Res, 2005. **23**(1): p. 34-40.
- [121] Russell, R.G., *Bisphosphonates: mode of action and pharmacology*. Pediatrics, 2007. **119 Suppl 2**: p. S150-62.
- [122] Ryser, M.D. and K.A. Murgas, *Bone remodeling as a spatial evolutionary game*. J Theor Biol, 2017. **418**: p. 16-26.
- [123] Schaffler, M.B., K. Choi, and C. Milgrom, *Aging and matrix microdamage accumulation in human compact bone*. Bone, 1995. **17**(6): p. 521-25.
- [124] Schindeler, A., et al., *Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture*. Semin Cell Dev Biol, 2008. **19**(5): p. 459-66.
- [125] Schmidt, R.F., *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie ; mit ... 77 Tabellen ; [+ IMPP-Fragen Physiologie online]*. 30., neu bearb. und aktualisierte Aufl. ed. Springer-Lehrbuch. 2007, Heidelberg: Springer. XXII, 1030 S.
- [126] Schünke, M., E. Schulte, and U. Schumacher, *Prometheus - LernAtlas der Anatomie allgemeine Anatomie und Bewegungssystem ; 182 Tabellen*. 3., ©*bearb. und erw. Aufl. ed. 2011, Stuttgart u.a.: Thieme. XV, 607 S.
- [127] Schwartz, M.A., *Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(12): p. a005066.

Literaturverzeichnis

- [128] Shevde, N.K., et al., *Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 7829-34.
- [129] Shimizu, H., et al., *Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts*. FASEB J, 2008. **22**(7): p. 2465-75.
- [130] Siegenthaler, W. and B.R. Amann-Vesti, *Klinische Pathophysiologie 239 Tabellen*. 9., vöellig neu bearb. Aufl. ed. 2006, Stuttgart u.a.: Thieme. XLI, 1178 S.
- [131] Sigrist, I.M., et al., *The long-term effects of ovariectomy on bone metabolism in sheep*. J Bone Miner Metab, 2007. **25**(1): p. 28-35.
- [132] Silva, B.C. and J.P. Bilezikian, *Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton*. Curr Opin Pharmacol, 2015. **22**: p. 41-50.
- [133] Sims, N.A. and J.H. Gooi, *Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption*. Semin Cell Dev Biol, 2008. **19**(5): p. 444-51.
- [134] Sims, N.A. and T.J. Martin, *Coupling Signals between the Osteoclast and Osteoblast: How are Messages Transmitted between These Temporary Visitors to the Bone Surface?* Front Endocrinol (Lausanne), 2015. **6**: p. 41.
- [135] Sims, N.A., et al., *Increased bone resorption precedes increased bone formation in the ovariectomized rat*. Calcif Tissue Int, 1996. **59**(2): p. 121-7.
- [136] Suda, N., et al., *Expression of parathyroid hormone-related protein in cells of osteoblast lineage*. J Cell Physiol, 1996. **166**(1): p. 94-104.
- [137] Tarkka, T., et al., *Adenoviral VEGF-A gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues*. J Gene Med, 2003. **5**(7): p. 560-6.
- [138] Tatsumi, S., et al., *Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction*. Cell Metab, 2007. **5**(6): p. 464-75.
- [139] Thormann, U., et al., *Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats*. Injury, 2014. **45**(3): p. 487-93.
- [140] Tomkinson, A., et al., *The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(8): p. 1243-50.
- [141] Uitterlinden, A.G., et al., *Interaction between the vitamin D receptor gene and collagen type Ialpha1 gene in susceptibility for fracture*. J Bone Miner Res, 2001. **16**(2): p. 379-85.

- [142] van Gaalen, S.M., et al., *Use of fluorochrome labels in in vivo bone tissue engineering research*. Tissue Eng Part B Rev, 2010. **16**(2): p. 209-17.
- [143] Van Lieshout, E.M. and V. Alt, *Bone graft substitutes and bone morphogenetic proteins for osteoporotic fractures: what is the evidence?* Injury, 2016. **47 Suppl 1**: p. S43-6.
- [144] Van Staa, T.P., et al., *Bone density threshold and other predictors of vertebral fracture in patients receiving oral glucocorticoid therapy*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(11): p. 3224-9.
- [145] Vatsa, A., et al., *Osteocyte morphology in fibula and calvaria --- is there a role for mechanosensing?* Bone, 2008. **43**(3): p. 452-8.
- [146] Verborgt, O., et al., *Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation?* J Bone Miner Res, 2002. **17**(5): p. 907-14.
- [147] von der Mark, K., et al., *Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy*. Arthritis Rheum, 1992. **35**(7): p. 806-11.
- [148] Wacker, M. and M.F. Holick, *Vitamin D - effects on skeletal and extraskelatal health and the need for supplementation*. Nutrients, 2013. **5**(1): p. 111-48.
- [149] Wada, T., et al., *RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease*. Trends Mol Med, 2006. **12**(1): p. 17-25.
- [150] Walker, E.C., et al., *Cardiotrophin-1 is an osteoclast-derived stimulus of bone formation required for normal bone remodeling*. J Bone Miner Res, 2008. **23**(12): p. 2025-32.
- [151] Weaver, C.M., et al., *The National Osteoporosis Foundation's position statement on peak bone mass development and lifestyle factors: a systematic review and implementation recommendations*. Osteoporos Int, 2016. **27**(4): p. 1281-386.
- [152] Weinstein, R.S., *Clinical practice. Glucocorticoid-induced bone disease*. N Engl J Med, 2011. **365**(1): p. 62-70.
- [153] Weinstein, R.S., et al., *Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone*. J Clin Invest, 1998. **102**(2): p. 274-82.
- [154] Weinstein, R.S., et al., *Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis, vascularity, hydration, and strength in aged mice*. Aging Cell, 2010. **9**(2): p. 147-61.

Literaturverzeichniss

- [155] Welsch, U., T. Deller, and J. Sobotta, *Lehrbuch Histologie*. 3. Aufl. ed. 2010, München: Elsevier. XI, 596 S.
- [156] Wijenayaka, A.R., et al., *Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25900.
- [157] Xiong, J., et al., *Matrix-embedded cells control osteoclast formation*. Nat Med, 2011. **17**(10): p. 1235-41.
- [158] Xiong, J., et al., *Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0138189.
- [159] Xiong, J., et al., *Osteocyte-derived RANKL is a critical mediator of the increased bone resorption caused by dietary calcium deficiency*. Bone, 2014. **66**: p. 146-54.
- [160] Xue, Y., et al., *Exogenous 1,25-dihydroxyvitamin D3 exerts a skeletal anabolic effect and improves mineral ion homeostasis in mice that are homozygous for both the 1alpha-hydroxylase and parathyroid hormone null alleles*. Endocrinology, 2006. **147**(10): p. 4801-10.
- [161] Yao, W., et al., *Glucocorticoid excess in mice results in early activation of osteoclastogenesis and adipogenesis and prolonged suppression of osteogenesis: a longitudinal study of gene expression in bone tissue from glucocorticoid-treated mice*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(6): p. 1674-86.
- [162] Zaidi, M., *Skeletal remodeling in health and disease*. Nat Med, 2007. **13**(7): p. 791-801.
- [163] Zarrinkalam, M.R., et al., *Changes in osteocyte density correspond with changes in osteoblast and osteoclast activity in an osteoporotic sheep model*. Osteoporos Int, 2012. **23**(4): p. 1329-36.
- [164] Zhao, C., et al., *Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis*. Cell Metab, 2006. **4**(2): p. 111-21.

11 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Aufbau eines Röhrenknochens am Beispiel eines Längsschnitts durch den menschlichen Oberschenkelknochen (Femur).	Seite 3
Abb. 2	Mikroskopischer Aufbau der Knochensubstanz.	Seite 5
Abb. 3	Der reife Osteoblast.	Seite 7
Abb. 4	Vom Osteoblast zum Osteozyt.	Seite 8
Abb. 5	Schemazeichnung eines aktiven Osteoklasten in der Resorptionslakune.	Seite 11
Abb. 6	Schematischer Aufbau einer BMU im Prozess des Knochenumbaus.	Seite 13
Abb. 7	Differenzierung der Osteoklasten.	Seite 15
Abb. 8	Einflüsse der Osteoklasten auf die Osteoblasten.	Seite 17
Abb. 9	Parakrine Wirkungen des PTHrP.	Seite 18
Abb. 10	Verlauf der Knochenmasse über die Lebenszeit im Vergleich der Geschlechter.	Seite 19
Abb. 11	Regulation des Kalzium- und Phosphathaushaltes durch Calzitonin, PTH, 1,25-Dihydroxy-Vit D ₃ (Calzitriol) sowie weitere Hormone.	Seite 22
Abb. 12	Direkte Frakturheilung (A) Kontaktheilung, (B) Spaltheilung.	Seite 27
Abb. 13	Modell der indirekten Frakturheilung aufgeteilt nach histologisch definierten Phasen (A), dem Metabolismus (B) und den zellulären Einflüssen (C).	Seite 28
Abb. 14	Angabe der Knochendichte als T-Score.	Seite 31
Abb. 15	Einflussfaktoren auf die Stabilität des Knochens.	Seite 32
Abb. 16	Effekte der Glukokortikoide auf die Knochenzellen.	Seite 36
Abb. 17	Medikamentöse Therapiemöglichkeiten der Osteoporose.	Seite 38
Abb. 18	Stufenmodell zur Osteoporoseinduktion im Schafmodell.	Seite 42
Abb. 19	Entnahme der Beckenkammstanzen mit resultierender Defektzone.	Seite 46
Abb. 20	Ergebnisgrafik der Frequenzanalyse.	Seite 64
Abb. 21	Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung der Defektzone.	Seite 66
Abb. 22	Ergebnisse der Kollagen Typ I Immunhistochemie.	Seite 68
Abb. 23	Ergebnisse der Kollagen Typ X Immunhistochemie.	Seite 69

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 24	Ergebnisse der Analyse der Osteozytenmorphologie und – anzahl.	Seite 72
Abb. 25	Ergebnisse der RANK-L Immunhistochemie.	Seite 75
Abb. 26	Ergebnisse der OPG Immunhistochemie.	Seite 77
Abb. 27	Ergebnisgrafiken der RANK-L/ OPG-Quotienten.	Seite 80
Abb. 28	Ergebnisse der Messung der Mineralisationsrate.	Seite 81
Abb. 29	Vergleich der Fluoreszenzmarkierungen in K (8M) und OVXDS (5M).	Seite 82
Abb. 30	Ergebnisse der in-vivo DXA-Messungen.	Seite 83
Abb. 31	<i>In vivo</i> DXA-Scan eines Versuchstiers in Brust-Bauch- Lagerung und Intubationsnarkose.	Seite 108
Tab. 1	Protokoll der Paraffineinbettung.	Seite 47
Tab. 2	Verwendete Komponenten der PMMA-Einbettung.	Seite 48
Tab. 3	Protokoll der PMMA-Einbettung.	Seite 49
Tab. 4	Zusammensetzung und Mischungsverhältnis der verwendeten Gebrauchslösungen.	Seite 50

12 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
AR	Androgen Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BEST	Bone Evaluation Study
BMC	Bone mineral content
BMD	Bone mineral density
BMP	Bone morphogenetic protein
BMU	basic multicellular unit
c-fms	<i>Colony stimulating factor 1 receptor</i>
c-Jun	cellular Jun (Transkriptionsfaktor und Protoonkogen)
Col I	Kollagen Typ I
Col X	Kollagen Typ X
CSF	colony stimulating factor
CTGF	connective tissue growth factor
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Desoxynucleinacid
DXA	Dual-X-Ray Absorptiometrie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Estrogenreceptor
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast growth factor
FRAX	Fracture risk assesement tool
GC	Glucocorticoid
GIO	Glucocorticoid-induzierte Osteoporose
IGF	Insulin-like growth factor
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IOF	International Osteoporosis Foundation
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
K	Kontrollgruppe
M	Monat

Abkürzungsverzeichnis

MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP	Monocyte chemotactic protein
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor
Mio	Millionen
MPS	Monozytäres Phagozytensystem
Mrd	Milliarden
mRNA	messenger Ribonucleinacid
MSC	mesenchymalen Stammzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NSD	Nebenschilddrüse
OPG	Osteoprotegerin
OVX	Ovarektomie
OVXD	Ovarektomie + spezielle Mangeldiät
OVXDS	Ovarektomie + spezielle Mangeldiät + Steroidinjektionen
ZVK	zentrale Venenkatheter
PDGF	plateled-derived growth factor
PEG2	Prostaglandin E2
PMMA	Polymethylmetacrylat
PPi	Pyrophosphat
PTH	Parathormon
PTHR1	Parathormon Rezeptor 1
PTHrP	Parathormon related Protein
PU.1	(Transkriptionsfaktor)
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RANK-L	Receptor Activator of NF- κ B-Ligand
RAS	Renin-Angiotensin-System
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
ROI	Region of Interest
SD	Standard deviation/ Standardabweichung
SERM	selektive Östrogenrezeptor Modulatoren
Tab	Tabelle
TGF- β	Transforming growth factor β
TNF- α	Tumor necrosis factor α

TRAP	Tartrat Resistant Acidic Phosphatase
VDR	Vitamin D Rezeptor
VDRE	Vitamin D Response Element
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation

13 Präsentationen, Publikationen, Preise

Posterpräsentationen:

ECTS-IBMS Kongress (Rotterdam 2015):

„Delayed healing in a sheep model of osteoporosis is hallmarked by persisting cartilage and osteoid formation”

S. Rosch, A. Schäfer, D. Weisweiler, W. Böcker, C. Heiss, T. El Khassawna

Von-Behring-Röntgen Symposium (Gießen 2015):

„Cartilage remnants and higher osteoid portion indicate bone healing delays in an osteoporotic sheep model“

S. Rosch, A. Schäfer, D. Weisweiler, W. Böcker, C. Heiss, T. El Khassawna

ARRP (Bad Kreuznach 2016):

„Histologische Untersuchungen zur Knochendefektheilung im osteoporotischen Schafmodell“

S. Rosch, A. Schäfer, D. Weisweiler, W. Böcker, K.S. Lips, D. Malhan, C. Heiss, T. El Khassawna

DGRh Kongress (Frankfurt 2016):

„Fehlregulierte Mineralisierung der extrazellulären Matrix während der Knochendefektheilung im Schafmodell der Osteoporose“

S. Rosch, A. Schäfer, S. Kern, D. Weisweiler, W. Böcker, K.S. Lips, C. Heiss, T. El Khassawna

DKOU (Berlin 2016):

„Evaluation of the anabolic and catabolic metabolism during fracture healing in an osteoporotic sheep model”

S. Rosch, A. Schäfer, D. Weisweiler, W. Böcker, K.S. Lips, C. Heiss, S. Malhan, T. El Khassawna

ARRP (Bad Kreuznach 2017):

„RANK-L- und OPG- vermittelte Regulierung der Knochenzellen während der Knochendefektheilung im Schafmodell der Osteoporose“

S. Rosch, A. Schäfer, D. Weisweiler, W. Böcker, K.S. Lips, C. Heiss, D. Malhan, T. El Khassawna

Vorträge:

DGRh Kongress (Frankfurt 2016)

„Fehlregulierte Mineralisierung der extrazellulären Matrix während der Knochendefektheilung im Schafmodell der Osteoporose“

S. Rosch, A. Schäfer, S. Kern, D. Weisweiler, W. Böcker, K.S. Lips, C. Heiss, T. El Khassawna

Preise:

Posterpreis ARRP 2016 (Bad Kreuznach)

„Histologische Untersuchungen zur Knochendefektheilung im osteoporotischen Schafmodell“

S. Rosch, A. Schäfer, D. Weisweiler, W. Böcker, K.S. Lips, D. Malhan, C. Heiss, T. El Khassawna

Posterpreis DGRh 2016 (Frankfurt)

„Fehlregulierte Mineralisierung der extrazellulären Matrix während der Knochendefektheilung im Schafmodell der Osteoporose“

S. Rosch, A. Schäfer, S. Kern, D. Weisweiler, W. Böcker, K.S. Lips, C. Heiss, T. El Khassawna

Publikationen:

„An optimized plugin to perform automated histomorphometry of bone parameters“

Journal: *Frontiers in Endocrinology*, section Bone Research

D. Malhan, M. Mülke, S. Rosch, A. Schäfer, F. Merboth, D. Weisweiler, C. Heiss, I. Arganda-Carreras,
T. El Khassawna

14 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einen herzlichen Dank meinem Doktorvater und Erstgutachter Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Heiß für die Möglichkeit der Promotion unter seiner Leitung aussprechen. Ich danke für die exzellente Betreuung und Förderung während der gesamten Zeit.

Die Arbeit in der Experimentellen Unfallchirurgie im Sonderforschungsbereich Transregio 79 Projekt war eine sehr lehrreiche Zeit, an die ich mich in meinem weiteren Werdegang immer sehr gerne zurückerinnern werde.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thaqif El Khassawna, der mich zu jedem Zeitpunkt gefördert, wissenschaftlich ausgebildet und in meiner Arbeit bestärkt hat. Ich danke für die engmaschige Betreuung und ständige Motivation, die mich immer weiter angetrieben hat.

Ich danke allen Mitarbeitern der Experimentellen Unfallchirurgie für die gute und kollegiale Zusammenarbeit. Dabei möchte ich besonders Annette Stengel hervorheben, die mich bei der praktischen wissenschaftlichen Arbeit im Labor anleitete und mich bei der Durchführung unterstützte.

Weiter danke ich meinen Mitdoktoranden für die hilfsbereite und produktive Zusammenarbeit. Ich denke dabei besonders an Annemarie Schäfer, mit der ich gemeinsam dieses Thema bearbeiten durfte. Außerdem danke ich Matthias Mülke und Felix Merboth für die Zusammenarbeit und gute Freundschaft, die meine Studienzeit geprägt hat. Ich danke Deeksha Malhan für die Zusammenarbeit bei Bildbearbeitung und Publikation.

Mein tiefer Dank gilt meiner Freundin, meinen Eltern, Großeltern sowie meiner Schwester und meinen Freunden, die mich unterstützen und auf die ich mich immer verlassen kann.

Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

15 Ehrenwörtliche Erklärung

Erklärung zur Dissertation

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

Ort, Datum

Unterschrift