

**Etablierung und Qualitätssicherung osteoporotischer Tiermodelle -
Dual X-Ray Absorptiometry und histomorphometrische
Untersuchungen zur Bestimmung des Knochenstatus am Tiermodell
der Ratte**

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

vorgelegt von Növermann, Nathalie, geb. Schliecke
aus Hanau

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

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

Gutachter: Herr PD Dr. med. Thomas Karrasch

Tag der Disputation: 18.08.2021

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Sozioökonomische Bedeutung der Osteoporose	1
1.2 Fragestellung und Zielsetzung der Studie	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Knochen	3
2.1.1 Funktion	3
2.1.2 Histologischer Aufbau und Trabekelstruktur	4
2.1.3 Zelluläre Bestandteile des Knochens	8
2.2 Osteoporose	10
2.2.1 Definition	10
2.2.2 Epidemiologie	11
2.2.3 Ätiologie	11
2.2.4 Klinisches Erscheinungsbild und diagnostische Möglichkeiten	12
3 Material und Methoden	20
3.1 Versuchstiere	21
3.2 Operation	23
3.2.1 Narkose	23
3.2.2 Ovariectomie	24
3.2.3 Sham Operation	26
3.3 Diät und Steroidgabe	26
3.4 Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA)	27
3.5 Euthanasie und Probengewinnung	30
3.6 Herstellung und Färbung der Paraffinschnitte	32
3.7 Histologie	33
3.8 Histomorphometrie	34

3.9 Statistik.....	37
4 Ergebnisse	38
4.1 Körpergewicht.....	38
4.2 Dual X-ray Absorptiometry	41
4.2.1 Knochendichte (Bone Mineral Density)	41
4.2.2 Prozentualer Fettgehalt.....	54
4.3 Deskriptive Histologie.....	70
4.3.1 Femur	70
4.3.2 Lendenwirbelkörper	73
4.4 Histomorphometrie.....	76
4.4.1 Fläche der Trabekel.....	77
4.4.2 Fettgehalt	80
5 Diskussion	84
5.1 Tiermodell Ratte.....	85
5.2 Ergebnisse	86
5.2.1 Körpergewicht.....	86
5.2.2 Knochendichtebestimmung	88
5.2.3 Histomorphometrische Analysen	99
6 Zusammenfassung.....	105
7 Summary	106
Abkürzungsverzeichnis.....	107
Abbildungsverzeichnis	109
Tabellenverzeichnis	112
Literaturverzeichnis.....	114
Publikationsverzeichnis	127
Erklärung zur Dissertation	129
Danksagung.....	130

1 Einleitung

1.1 Sozioökonomische Bedeutung der Osteoporose

Die Osteoporose ist eine weit verbreitete Erkrankung des Knochens. Knochenbrüche stellen dabei die vorherrschende klinische Erscheinungsform dar [McCann et al. 2007]. Der Anteil von Frakturen aufgrund einer Osteoporose liegt in der Unfallchirurgie zwischen 40 und 45% [Jakob et al. 2007]. Weltweit sind ca. 200 Millionen Menschen von dieser Erkrankung betroffen, es kommt jährlich zu ca. 9 Millionen Fragilitätsfrakturen, die hauptsächlich die Wirbelsäule, die Hüfte und das Handgelenk betreffen [Jakob et al. 2007, Kumar und Bhaskar 2012].

Die Osteoporose beim Menschen ist gekennzeichnet durch eine Reduktion der Trabekeldicke, einen Abfall der Trabekelanzahl und eine Vermehrung der Trabekelseparation [Egermann, Goldhahn und Schneider 2005]. Ebenso wird eine steigende Porosität der Kortikalis als Folge des Alterns und der Osteoporose beobachtet [Egermann, Goldhahn und Schneider 2005].

Der Verlust der Sexualhormone mit zunehmendem Alter, der bei der Frau mit Eintreten der Menopause vergleichsweise akut eintritt, bedingt eine Zunahme der Knochenresorption durch Osteoklasten, welche zum Knochenverlust führt [Jakob et al. 2007].

Begründet durch die demographische Entwicklung und eine steigende Lebenserwartung wird die Osteoporose des Menschen zu einem großen sozialen und ökonomischen Problem werden. Bis 2050 wird die Anzahl der Osteoporose-assozierten Frakturen und die damit verbundenen Kosten in Deutschland deutlich ansteigen, was eine erhebliche Belastung für das Gesundheitssystem darstellen wird [Bleibler et al. 2013].

1.2 Fragestellung und Zielsetzung der Studie

Aktuell existiert kein geeignetes Kleintiermodell, das den osteoporotischen Knochenstatus des Menschen exakt abbilden kann [Egermann, Goldhahn und Schneider 2005; Turner 2001]. Ziel des Sonderforschungsbereiches/Transregio 79 (SFB/TRR 79) mit dem Titel „Werkstoffe für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen“ ist es, neue Knochenersatzmaterialien und Implantatwerkstoffe zu entwickeln, zu untersuchen und zu testen, die an die spezifischen Bedingungen eines

osteoporotischen Knochens angepasst sind. Hierfür muss ein geeignetes Kleintiermodell etabliert werden, um neuartige Lösungen für solche Formen der Knochendefekte unter erkrankungsspezifischen Bedingungen testen zu können.

Zwei Formen der Osteoporose sind in dieser Studie von Bedeutung: Die postmenopausale Osteoporose und die steroidinduzierte Osteoporose. Die Osteoporose ist eine metabolische Krankheit, die durch eine niedrige Knochenmasse, einen Strukturverlust und eine erhöhte Knochenbrüchigkeit gekennzeichnet ist. Beide Formen der Osteoporose sollen gezielt durch die Kombination aus Ovariectomie und zum einen durch Gabe eines speziellen Diät-Futters sowie zum anderen durch die Injektion eines Steroids erzeugt werden.

Die Dual X-Ray Absorptiometry (DXA) ist eine etablierte radiologische Methode zur Bestimmung der Knochendichte (BMD) in der klinischen Diagnostik der Osteoporose des Menschen und wird als solche auch in der aktuellen Osteoporose-Leitlinie empfohlen (Evidenzgrad 1A). Mit einer speziellen Software für Kleintiere ist es auch möglich, sowohl die Knochendichte als auch andere Parameter, wie z.B. den Fettgehalt des Gewebes, nicht invasiv im tierexperimentellen Modell zu bestimmen.

Die Veränderungen auf histologischer Ebene können mittels der Histomorphometrie abgebildet werden. Verschiedenste Messbereiche können individuell festgelegt und die Untersuchung somit auf die eigenen Interessensbereiche angepasst werden. So wurden gezielt die typischen Lokalisationen einer osteoporotischen Fragilitätsfraktur, wie die Lendenwirbelsäule und das Femur, untersucht. Dabei wurden spezifische histologische Veränderungen beschrieben, aber auch zur besseren Vergleichbarkeit quantitativ bestimmt. Untersucht wurden Parameter, die bei der menschlichen Osteoporose Veränderungen aufweisen. Dazu zählt die Reduktion der Trabekeldicke und –anzahl, die als prozentuale Fläche der Trabekel an der gesamt gemessenen Fläche histomorphometrisch bestimmt wurde, sowie die Vermehrung der Trabekelseparation. Dies wurde als prozentualer Anteil des Fettes im knöchernen Markraum bezogen auf die gesamte gemessene Fläche abgebildet.

In Zusammenschau aller gemessenen Parameter soll ein osteoporotisches Kleintiermodell etabliert werden, das die individuellen radiologischen wie auch histologischen Veränderungen der menschlichen Osteoporose exakt abbildet, um neue Therapieansätze krankheitsspezifisch testen zu können.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Knochen

2.1.1 Funktion

Der Knochen ist ein vitales, sich veränderndes Binde- und Stützgewebe, dessen Mikrostruktur und Zusammensetzung seine zwei wichtigsten Funktionen widerspiegelt: Der Knochen gewährleistet mechanische Stabilität für die Fortbewegung und ist ein wichtiger Bestandteil bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts der Minerale, besonders des Kalziums. Außerdem findet im Knochen die Hämatopoese statt [Morgan, Barnes und Einhorn 2008; Bab 1994; Horowitz 1992; Wein 2005]. Er setzt sich zusammen aus einer proteinreichen Extrazellulärmatrix beschichtet mit Apatitkristall [Morgan, Barnes und Einhorn 2008].

Kalzium ist ein Mineral, das hauptsächlich im Knochengewebe gespeichert wird. Der systemische Kalziumgehalt des Blutplasmas wird durch Kalziumsensoren in der Nebenschilddrüse gemessen. Fällt der Kalziumspiegel wird Parathormon (PTH) aus der Nebenschilddrüse ausgeschüttet. Dabei setzt es hauptsächlich an den Osteoblasten an. Es steigert die osteoblasten-vermittelte Vorbereitung der Knochenoberfläche durch die Sekretion von Proteasen und sorgt für den Zugang der Osteoklasten zur Knochenoberfläche. PTH führt zu einem gesteigerten Remodeling und somit zur Kalziumfreisetzung, um den Kalziumspiegel wieder in den optimalen Bereich zu bringen. Das Wachstum der hämatopoetischen Zellreihe, aus der die Osteoklasten entstammen, wird über Mediatoren gesteigert. Ebenso wird durch Sekretion verschiedener Zytokine die Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten gefördert und gleichzeitig die Apoptose verhindert. [Morgan, Barnes und Einhorn 2008; Lüllmann-Rauch 2003].

Das Knochengewebe wird stetig auf- und abgebaut. Dieser Prozess wird als Remodeling bezeichnet. Das Ausmaß des Remodelings des kortikalen Knochens kann bis zu 50% pro Jahr bezogen auf den Femurschaft in den ersten zwei Lebensjahren erreichen, bei Älteren nimmt die Rate des Remodelings schlussendlich um bis zu zwei bis fünf Prozent pro Jahr ab. Dabei ist die Rate des trabekulären Remodelings ca. fünf- bis zehnmal höher [Morgan et al. 2008]. Im mittleren Alter resultiert das Remodeling in einer negativen Knochenbalance, bei der mehr Knochen abgebaut, als aufgebaut wird.

Verantwortlich dafür ist sowohl der Abfall des Knochenvolumens, das von jeder Bone multicellular Unit (BMU) angelagert wird, als auch der Abfall des Knochenvolumens, das von jeder BMU resorbiert wird. Dieses Verhältnis führt zu Osteoporose und folglich auch zu Frakturen nach minimalen Traumata. Der Vorgang der Homöostase des Knochens hängt von externen mechanischen Einflüssen und von physiologischen Signalen des gesamten Körpers ab und überführt diese in zelluläre und chemische Prozesse [Morgan, Barnes und Einhorn 2008; Parfitt 1988, Seeman 2013].

2.1.2 Histologischer Aufbau und Trabekelstruktur

Knochen ist ein aus einem anorganischen und einem organischen Anteil zusammengesetztes Material. Auf das Gewicht bezogen macht der anorganische Anteil, also das Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$), ca. 60% aus, 8-10 % sind Wasser und der Rest wird durch den organischen Anteil gebildet, der hauptsächlich aus Kollagen Typ I und nicht kollagenen Proteinen besteht [Gong, Arnold und Cohn 1964; Einhorn 1994]. Die organische Phase beeinflusst sowohl die Struktur, als auch die mechanischen und biomechanischen Eigenschaften des Gewebes.

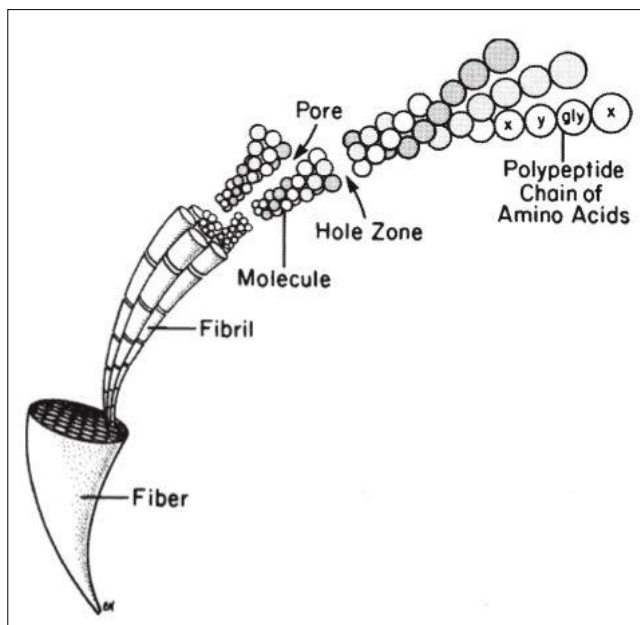


Abbildung 1: Kollagenfaser und -fibrillenstruktur [Einhorn 1994].

Typ I Kollagen ist ein sehr schwerlösliches ubiquitäres Protein und die hauptsächliche strukturelle Komponente der Knochenmatrix. Das Typ I Kollagen besteht aus drei Polypeptidketten, die in Form einer Triplehelix angeordnet sind und so ein sehr festes lineares Molekül erzeugen. Jedes Molekül ist mit dem nächsten parallel verbunden und durch stabile kovalente Bindungen quervernetzt, so dass eine Kollagenfibrille entsteht. Diese wiederum sind in Bündeln zusammengefasst und bilden die Kollagenfaser (Abb. 1).

Zu den nicht kollagenen Proteinen zählen Osteocalcin und BGP (bone Gla protein). Das Vitamin-K-abhängige Osteocalcin ist das am häufigsten vorkommende nicht kollagene Protein im Knochen. Es wird vermutet, dass dieses knochenspezifische Protein die Aktivität der Osteoklasten und der Osteoklasten-Vorläufer reguliert. Osteocalcin spielt auch eine wichtige Rolle bei der Hemmung der Knochenformation und der Bildung der Minerale [Morgan, Barnes und Einhorn 2008; Boskey et al. 1998].

Das Skelett besteht aus zwei Teilen: Das axiale Skelett, bestehend aus Schädel und Rumpf, und das appendiculäre Skelett, welches aus den Knochen der Extremitäten und dem Beckengürtel gebildet wird.

Die Röhrenknochen, wie Tibia, Femur und Humerus, bestehen aus drei Teilen (Abb. 2): Die Epiphyse, Metaphyse und Diaphyse. Die Epiphyse befindet sich an jedem Ende des Knochens und entsteht aus einem Ossifikationszentrum, das sich zu dem des Knochenschaftes unterscheidet. Abgegrenzt ist die Epiphyse durch eine knorpelige Wachstumsplatte („Wachstumsfuge“). Die Metaphyse ist die Region zwischen der Wachstumsfuge und dem zentralen Anteil des Knochens, auch Diaphyse genannt. Sie bildet den Übergang von der weiteren Epiphyse zur schmaleren Diaphyse.

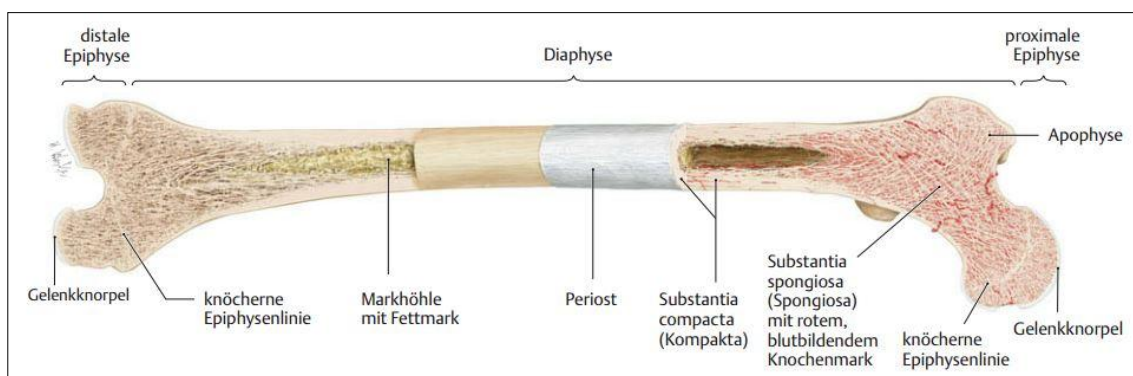


Abbildung 2: Aufbau eines Röhrenknochens am Beispiel des Femurs [Aumüller et al. 2014; Schünke et al. 2011].

Beinahe der gesamte Röhrenknochen wird vom Periost überzogen, eine Ausnahme bilden die Gelenkflächen und die Ansätze der Sehnen und Bänder. Das Periost besteht aus zwei Schichten: einer äußeren fibrösen Schicht in direktem Kontakt zur Muskulatur und einer inneren Schicht, des *Stratum osteogenicum*. Während die äußere Schicht aus straffem Bindegewebe besteht, ist die innere Schicht mit den gleichen Zellen

ausgestattet wie das *Endost*, folglich können auf der Periostseite jederzeit Umbau- und Reparaturmaßnahmen ergriffen werden. Auch bei dem appositionellen Knochenwachstum wirkt das Periost mit und sorgt für die Ausdehnung des Durchmessers des Knochens mit zunehmendem Alter [Lüllmann-Rauch 2003, Morgan, Barnes und Einhorn 2008].

Die knochenbildende Einheit besteht aus mineralisierten Kollagenfibrillen, die entweder in Schraubentouren angeordnet den Geflechtknochen bilden und sowohl im unreifen Knochengewebe als auch im Frakturkallus vorkommen oder als dünne Lagen parallel angeordnet (Lamellenknochen) im reifen Knochengewebe zu finden sind. Im Lamellenknochen wird ein Havers-Kanal konzentrisch von Kollagenfibrillen umgeben, so dass ein Osteon entsteht. Der Havers-Kanal beherbergt die Blutgefäße und Nerven [Marotti und Zallone 1980; Morgan, Barnes und Einhorn 2008; Lüllmann-Rauch 2003]. Der Volkmann-Kanal verläuft quer zu den Havers-Kanälen und versorgt den Knochen mit Blut.

Der Geflechtknochen ist isotrop, somit ist seine Steifigkeit und Stärke von der Richtung der Krafteinwirkung unabhängig. Die Steifigkeit und Stärke des Lamellenknochens ist am größten, wenn die Krafteinwirkung in Richtung der Fibrillen erfolgt [Morgan, Barnes und Einhorn 2008].

In beiden Knochengeweben sind die Osteozyten in einem Hohlraumssystem, den Lakunen, beherbergt [Mullender et al. 1996; Vashishth et al. 2000].

Makroskopisch können zwei Bauarten eines Knochens unterschieden werden: *Spongiosa* (trabekulärer Knochen) und *Kompakta* (kortikaler Knochen). Die *Spongiosa* ist im axialen Skelett und in den Meta- und Epiphysen der Röhrenknochen lokalisiert und macht etwa 20% der skelettalen Masse aus. Sie ist ein sehr poröses Gitterwerk aus dünnen Platten und Bälkchen (Trabekel) im Inneren des Knochens. Ihre Architektur ist stets so organisiert, dass die Trabekel nur auf Druck oder Zug beansprucht werden (trajektorielle Ausrichtung, Abb. 3). Die Maschen zwischen den Trabekeln sind mit Knochenmark gefüllt. Die *Spongiosa* besteht fast ausschließlich aus Lamellenknochen.

Die *Kompakta* stellt die homogen erscheinende Rindenschicht (Corticalis) eines Knochens dar und entspricht 80% der Gesamtmasse des Skeletts. Hier sind die Lamellen zu zahlreichen konzentrischen Lamellensystemen angeordnet (Osteone, Havers-Systeme) [Morgan, Barnes und Einhorn 2008; Lüllmann-Rauch 2003].

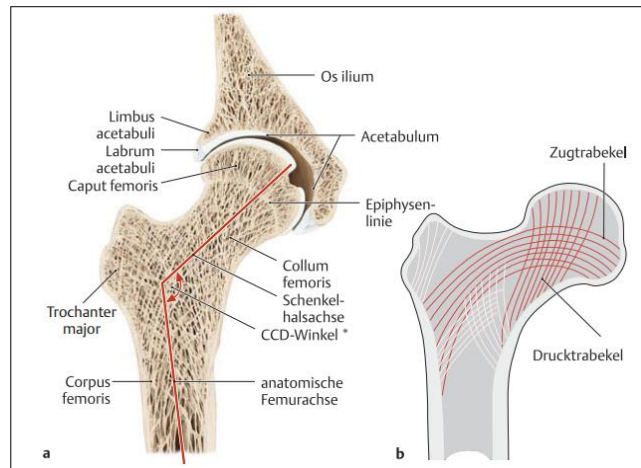


Abbildung 3 a-b: Proximale Femurepiphyse: Der Verlauf der Spongiosabälkchen in trajektoriemer Ausrichtung. a) Frontaler Sägeschnitt durch ein rechtes Hüftgelenk. b) Schematischer Verlauf der Druck- und Zugtrabekel bei physiologischem Schenkelhalswinkel [Aumüller et al. 2014; Schünke et al. 2011].

Spongiosa und Kompakta unterscheiden sich durch die Porosität. Der kortikale Knochen hat eine Porosität von 5-20%, die Spongiosa hingegen hat aufgrund des Markraums eine Porosität, die von 40% in der Hauptbelastungszone des Schenkelhalses bis zu über 95% bezogen auf die Wirbelsäule des Älteren reicht. Die Porosität bestimmt die Steifigkeit und die Stärke des Knochens [Morgan, Barnes und Einhorn 2008; Carter und Hayes 1977; Morgan und Keaveny 2001]. Die dreidimensionale Struktur des trabekulären Knochens variiert ungemein, bezogen auf die Anatomie und das Alter. Im Wirbelkörper ist die Trabekelstruktur eher bälkchenförmig, im proximalen Femur kommen hingegen Bälkchen und dünne Platten vor [Ulrich et al. 1999].

Im Alter und bei mangelnder Aktivität werden die Trabekel zunehmend dünner und können von Resorptionslakunen durchbrochen werden. In bestimmten Bereichen wie dem Wirbelkörper oder der proximalen Tibia sind bei zunehmendem Alter Veränderungen der Trabekelarchitektur, wie ein Anstieg der Anisotropie der Trabekelstruktur zu beobachten [Mosekilde 1989, Ding et al. 2002]. Mit abnehmender Knochenmasse im Alter hilft dieser Anstieg der Anisotropie die Tragfähigkeit des trabekulären Knochens entlang seiner Hauptlastachse auf Kosten der Tragfähigkeit in andere Richtungen zu erhalten. Ungewohnte Lastbedingungen wie ein Aufprall nach einem Sturz können somit den trabekulären Knochen einer Last aussetzen, die nicht der Hauptachse entspricht, so dass das Risiko für Frakturen mit dem Alter zu einem

größeren Ausmaß steigen kann, als man es durch den Abfall der Knochenmasse alleine erwarten würde [Morgan, Barnes und Einhorn 2008].

2.1.3 Zelluläre Bestandteile des Knochens

Typischerweise sind drei Zelltypen an der Homöostase des Knochens beteiligt: Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Diese drei Zelltypen stammen von unterschiedlichen Stammzelllinien ab.

Die mesenchymale Zelllinie

Die Knochenformation wird durch die mesenchymale Linie der Osteoblasten geleistet. Die Osteoblasten produzieren die Proteinmatrix des Knochens, bestehend aus Typ I Kollagen und verschiedenen nicht kollagenen Proteinen. Diese Proteinmatrix, auch Osteoid genannt, schafft eine Matrice für die Mineralisation und die Entstehung des reifen Knochens. Zusätzlich zur Knochenformation regulieren die Osteoblasten auch den Knochenabbau, in dem sie verschiedene Wirkstoffe abgeben, die die Proliferation der Osteoklasten-Vorläufer, die Fusion zu einer mehrkernigen Zelle und die Differenzierung und Aktivierung zu einem resorbierenden Osteoklasten fördern, sowie die Apoptose verhindern. Sie produzieren neutrale Proteasen, die das Osteoid abbauen und die Knochenoberfläche für das Osteoklasten vermittelte Remodeling vorbereiten. Osteoblasten stammen von mesenchymalen Stammzellen ab. Diese sind pluripotente Zellen, die eine Differenzierung in verschiedene Zelltypen, wie Myoblasten, Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten und Osteozyten, ermöglichen [Morgan, Barnes und Einhorn 2008; Lüllmann-Rauch 2003].

Ein anderer Zelltyp der mesenchymalen Zellreihe des Knochens ist der Osteozyt. Osteozyten haben überwiegend eine mechanosensorische Funktion bezogen auf den Knochen und spielen möglicherweise eine Rolle in der Kalzium Homöostase. Osteozyten entstehen aus Osteoblasten, die in mineralisierter Knochenmatrix eingemauert werden. Sie entstammen somit, unter der Regulation von bestimmten Transkriptionsfaktoren, aus der gleichen mesenchymalen Zellreihe wie diese [Morgan, Barnes und Einhorn 2008; Tate, Adamson und Bauer 2004; Franz-Odenaal, Hall und Witten 2006]. Osteozyten sind die zahlreichsten Zellen des Knochens, sie machen 95% aller Zellen im Knochen aus. Sie sind ausgesprochen langlebig und werden bis zu 25

Jahre alt, wohingegen Osteoblasten im Vergleich nur 3 Monate leben [Morgan, Barnes und Einhorn 2008; Tate, Adamson und Bauer 2004].

Osteozyten entrinnen der Apoptose, reduzieren die Produktion von Matrix Molekülen und enden ganz von mineralisierter Knochenmatrix umschlossen [Morgan, Barnes und Einhorn 2008; Lüllmann-Rauch 2003]. Zwischen den Lamellen liegen linsenförmige Lakunen (Höhlen), von denen zahlreiche Knochenkanälchen (Canaliculi) abgehen. Diese verlaufen sowohl senkrecht durch die Lamellen, als auch parallel dazu; so entsteht ein Labyrinth von Kanälchen, das die ganze mineralisierte Matrix durchzieht. In den Lakunen liegen die Zellkörper der Osteozyten, in den Kanälchen ihre Ausläufer. Das gesamte Hohraumlabyrinth stellt ein Netz von Verkehrswegen dar, über die alle Osteozyten durch Diffusion erreichbar sind. Sie unterhalten Gap junctions mit den Nachbarn in der nächsten Schicht sowie mit den Zellen des Endosts an der freien Oberfläche, durch die sie mittels Diffusion ernährt werden. Dieses Netzwerk erlaubt die Weitergabe von mechanischen und chemischen Signalen, die die Anpassung des Knochens an die externen mechanischen und chemischen Einflüsse ermöglicht und die Homöostase des Knochens gewährleistet. Osteozyten können Krafteinwirkungen erkennen und diese Information über die Gap junctions an die Osteoblasten an der Oberfläche weitergeben. Werden Osteozyten aus dem Knochen freigesetzt, können sie wieder zu aktiven Osteoblasten werden. Sterbende Osteozyten leiten durch Signalweitergabe das Remodeling des Knochens ein [Morgan, Barnes und Einhorn 2008; Lüllmann-Rauch 2003; Biehl et al. 2017].

Die hämatopoetische Zelllinie

Die Homöostase des Knochens erfordert sowohl ein konstantes Remodeling, als auch den stetigen Umbau des Knochens. Hierdurch werden jährlich vier bis zehn Prozent des menschlichen Knochens ersetzt. Während die Knochenformation durch die aus der mesenchymalen Zellreihe stammenden Osteoblasten gewährleistet wird, sind die aus der hämatopoetischen Zellreihe stammenden Osteoklasten für das Remodeling, speziell für den Abbau des Knochens verantwortlich. Sie sind mehrkernige Zellen und spielen auch eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Kalzium-Gleichgewichtes. Osteoklasten befinden sich im kortikalen Knochen und in den Resorptionsgruben, den sogenannten Howship-Lakunen, des trabekulären Knochens [Morgan, Barnes und Einhorn 2008; Lüllmann-Rauch 2003, Quinn und Gillespie 2005; Zaidi et al. 2003]. Um Knochen

abzubauen werden Osteoklasten polarisiert und formen einen dichten Faltenbesatz aus (ruffled border), der an der Knochenmatrix anliegt und Sitz einer H^+ -ATPase ist. Sie sezernieren Salzsäure zur Auflösung des Hydroxylapatit und Proteasen, um die organische Matrix anzudauen. Osteoklasten können während dieses Vorgangs auf der Knochenmatrix entlang wandern. Sie nehmen die durch die extrazelluläre Verdauung entstandenen Fragmente der Extrazellulärmatrix endozytotisch auf und geben sie nach dem Modus der Transzytose an der Rückseite wieder ab. Ein aktiver Osteoklast geht meist nach zweiwöchiger Tätigkeit durch Apoptose zugrunde [Morgan, Barnes und Einhorn 2008; Lüllmann-Rauch 2003; Biehl et al. 2017].

2.2 Osteoporose

2.2.1 Definition

Die derzeit geläufige Definition der Osteoporose stammt von der Consensus Development Conference aus dem Jahr 1991 und wurde 1994 von der World Health Organisation übernommen. Sie definiert Osteoporose als eine Krankheit, die durch eine niedrige Knochendichte und Minderung der Mikroarchitektur des Knochengewebes zu einer erhöhten Knochenbrüchigkeit und konsekutiv zu einem Anstieg der Frakturrate führt. Die Definition der Osteoporose wird durch die obligate DXA-Messung ergänzt: Jeder gemessene Wert der Knochendichte, der zwischen -1 und -2,5 Standardabweichungen unter dem Mittelwert der Referenz junger Erwachsener gemessen als T-Score liegt, wird als Osteopenie bezeichnet, Werte unter -2,5 als Osteoporose [WHO 1994]. Sind bereits Frakturen eingetreten, besteht eine manifeste Osteoporose [DVO-Leitlinie 2017].

Die Osteoporose betrifft einen großen Anteil der älteren Bevölkerung und resultiert in Frakturen, die teure Konsequenzen für den Menschen und die Ökonomie nach sich ziehen [Office of the Surgeon General 2004]. Häussler et al. berichten in einer empirischen Studie zu Krankheitskosten basierend auf Verwaltungsdaten, dass im Jahre 2003 ca. 5,4 Milliarden Euro Kosten aufgrund osteoporotischer Frakturen in Deutschland entstanden sind. Die direkten Frakturkosten, bestehend aus Krankenhausversorgung, Rehabilitation, ambulanter und Langzeitpflege, betragen im Jahr 2010 in etwa 898 Millionen Euro, dies entspricht ca. 0,5% der Gesamtausgaben der gesetzlichen Krankenversicherung in Deutschland, mit steigender Tendenz für die

Folgejahre [Häussler et al. 2007; Bleibler et al. 2013; Statistisches Bundesamt 2012]. Besonders die Hüftfrakturen führen zu einem hohen Grad der Invalidität, dem Verlust der Lebensqualität und zu einer erhöhten Mortalität [Osnes et al. 2004; Hiligsmann et al. 2008; Morin et al. 2011; Bleibler et al. 2013].

2.2.2 Epidemiologie

Die Osteoporose ist eine typische altersbedingte Erkrankung mit deutlich steigender Prävalenz ab dem 50. Lebensjahr [Kanis et al. 2000]. In Deutschland waren im Jahre 2010 ca. 3,5 Millionen Frauen (19,9%) und 1 Millionen Männer (6,4%) im Alter über 50 Jahre von Osteoporose betroffen [Bleibler et al. 2013]. Bezogen auf die WHO-Definition der Osteoporose liegt die Prävalenz laut der EPOS Studie bei postmenopausalen Frauen im Alter von 50-60 Jahren bei ca. 15% und steigt im Alter von über 70 Jahren auf 45%. Bezogen auf die männliche Population beträgt die Prävalenz im Alter von 50-60 Jahren 2,4% und steigt auf 17% im Alter von über 70 Jahren [DVO-Leitlinie 2014; Scheidt-Nave et al. 1997]. Etwa 50% der Hüftfrakturen bei Frauen über 50 Jahre sind osteoporosebedingt [Bleibler et al. 2013]. In einer retrospektiven Analyse von Versicherten der Techniker Krankenkasse im Jahr 2009 wurden Patienten mit der Diagnose einer Osteoporose, osteoporotischen Frakturen oder einer Osteoporosemedikation erfasst. Übertragen auf die Gesamtbevölkerung würde dies einer Prävalenz von 6,3 Millionen Osteoporosepatienten entsprechen. 52% der so charakterisierten Personen erlitten in einem 3-jährigen Beobachtungszeitraum von 2006 bis 2009 Frakturen [DVO-Leitlinie 2014; Hadji et al. 2013]. Die Behandlung der Osteoporose hat somit auch gerade aus sozioökonomischen Gründen oberste Priorität.

2.2.3 Ätiologie

Verschiedene Ursachen und Risikofaktoren führen zu dem Krankheitsbild der Osteoporose. Die generalisierte Osteoporose kann primär (postmenopausal und senil) oder sekundär entstehen [Lelovas et al. 2008]. In dieser Studie werden folgende Formen der Osteoporose unterschieden: die *postmenopausale* und die *sekundäre steroidinduzierte Osteoporose*. Die *postmenopausale Osteoporose* wird zum einen auf ein Kalziumdefizit und zum anderen auf das Östrogendefizit zurückgeführt [Nordin et al. 2004], das die Knochenformation direkt durch eine Erhöhung der Sensitivität des Knochens gegenüber PTH und indirekt durch eine verminderte Kalziumabsorption

sowie eine verminderte renal tubuläre Calciumreabsorption beeinflusst [Marcus et al. 2007]. Auch ein Vitamin D Mangel verursacht einen osteoporotischen Knochenstatus durch eine Erhöhung des Serum PTH Spiegels und einer daraus resultierenden erhöhten Knochenresorption [Jesudason et al. 2002].

Der Verlust an Knochenmasse geht mit einer Reduktion der Knochenformation, einer Steigerung der Knochenresorption oder einer Kombination aus beiden Mechanismen einher [Marcus et al. 2007]. Etwa 60-80% der Knochenmasse sind genetisch determiniert [Jakob et al. 2007]. Trotzdem erhöhen bestimmte Lebensgewohnheiten, Begleiterkrankungen und gesundheitsbezogene Faktoren wie das Rauchen, Alkoholismus und Diät die Osteoporose-Inzidenz [Turner et al. 2001; Jakob et al. 2007]. Als weitere Risikofaktoren sind für das Auftreten der Osteoporose bekannt: das weibliche Geschlecht und die postmenopausale Situation, das fortschreitende Alter, sowie der Bewegungsmangel und Immobilisation mit der Konsequenz verminderter mechanischer Belastung [Jakob et al. 2007]. Auch die medikamentöse Therapie mit Kortikosteroiden fördert das Auftreten der Osteoporose durch eine direkte Hemmung der Knochenformation [Marcus et al. 2007, Bressot et al. 1979] und indirekt, indem sie die Calciumabsorption verringert [Reidt und Ibbertson 1987].

2.2.4 Klinisches Erscheinungsbild und diagnostische Möglichkeiten

Die Erkrankung der Osteoporose ist klinisch asymptomatisch bis Fragilitätsfrakturen ohne adäquate Krafteinwirkung an verschiedenen Lokalisationen des menschlichen Körpers auftreten [Jakob et al. 2007, Johnell et al. 2005; Marshall, Johnell und Wedel 1996; Stone et al. 2003]. Dann liegt eine manifeste Osteoporose vor. Typische osteoporotische Frakturen betreffen am häufigsten die Wirbelsäule und in absteigender Reihenfolge das Handgelenk und das proximale Femur.

Vertebrale Kompressionsfrakturen (Abb. 4 und 5) sind altersabhängig und bei Frauen dreimal häufiger als bei Männern vertreten [Van der Klift et al. 2002]. Sie zeigen radiologisch typische Deformierungen wie Keil- oder Fischwirbel [Baum, Peters 2008]. Die Hüftfrakturen treten im Durchschnitt in einem Alter von 80 Jahren auf, ihre Inzidenz beträgt bei Frauen zwei Prozent pro Jahr, bei Männern ein Prozent [Sanders et al. 1999]. Handgelenknahe Frakturen kommen häufig bei Frauen nach der Menopause vor und sind bei Männern seltener zu finden [Cleghorn et al. 1991].



Abbildung 4: Seitliche Röntgenaufnahme der LWS: Transparenzerhöhung der Knochen mit deutlicher Rarefizierung der Trabekel und strähnigem Aussehen. Die Grund- und Deckplatten der Wirbelkörper sind eingebrochen (Fischwirbel). LWK 1 (Pfeil) ist höhengemindert, ventral stärker als dorsal (Keilwirbel) [Moritz, Beitzel 2017].

Osteoporose-bedingte Frakturen führen zu einer deutlich eingeschränkten Lebensqualität bei den betroffenen Personen mit Folgen wie akuten oder chronischen Schmerzen und funktionellen Einschränkungen [Borgstrom et al. 2006, Cockerill et al. 2004, Lips et al. 2005, Fechtenbaum et al. 2005, Peasgood et al. 2009, Edwards et al. 2010, Morin et al. 2012, Hiligsmann et al. 2008, Silverman et al. 2012, DVO-Leitlinie 2014]. Dabei haben Patienten mit osteoporosetypischen Frakturen eine erhöhte Sterblichkeit, besonders im ersten Jahr nach dem Frakturereignis, sowie ein erhöhtes Risiko für Folgefrakturen.

Typische physiognomische Merkmale eines an Osteoporose erkrankten Patienten sind (Abb. 5 b) [Peters 2013]:

- Eine zunehmende Kyphosierung der Brustwirbelsäule („Witwenbuckel“)
- Eine deutliche Abnahme der Körpergröße (>4 cm)
- Ein vorgewölbter Bauch („Osteoporosebäuchlein“)
- Eine relative Überlänge der Extremitäten
- Der untere Rippenbogen kann den Beckenkamm schmerzhaft berühren
- Typische Hautfalten vom Rücken zu den Flanken („Tannenbaumphänomen“)
- Ein unsicheres und kleinschrittiges Gangbild.

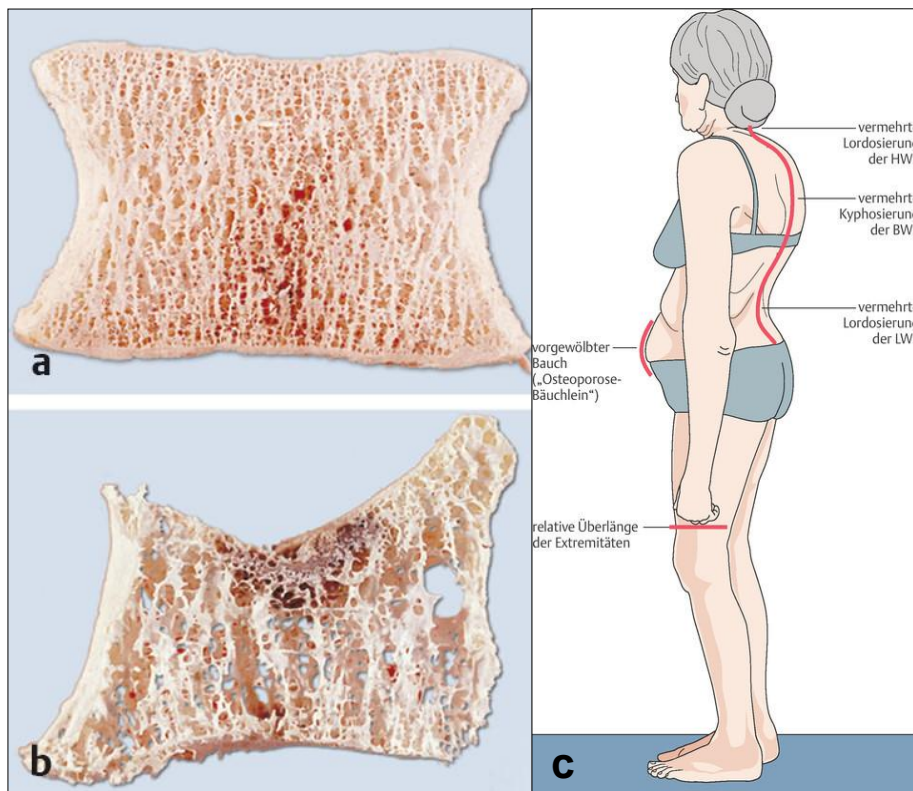


Abbildung 5 a-c: Klinisches Erscheinungsbild der Osteoporose. a) Normaler Befund eines Lendenwirbels. b) Osteoporotisch veränderter Lendenwirbel [Von Hayek et al. 2017]. c) Typische Physiognomie eines Osteoporosepatienten [Peters 2013].

Die empfohlene Basisdiagnostik der Osteoporose besteht aus der Anamneseerhebung, klinischer und laborchemischer Untersuchung und der Knochendichtemessung mittels DXA (Dual X-ray Absorptiometry), sowie ggf. einer bildgebenden Diagnostik bei Verdacht auf eine osteoporotische Wirbelkörperfraktur.

Die Anamneseerhebung dient dabei der Erfassung der Frakturrisikofaktoren, die gezielt beseitigt werden können, und des Risikoprofils in Bezug auf eine Osteoporose. Die Risikofaktoren werden in drei Kategorien unterteilt [DVO-Leitlinie 2017]:

- Allgemeine Risikofaktoren:
 - Lebensalter: Das Lebensalter als Frakturrisiko ist unabhängig von der Knochendichte und unabhängig von klinischen Risikofaktoren wie einer Immobilisation oder multiplen Stürzen, die ebenfalls mit dem Alter zunehmen. Denkbar ist, dass die Assoziation des Lebensalters mit dem Frakturrisiko über eine Verschlechterung biomechanischer Faktoren der Knochenarchitektur und der Knochenqualität mit dem Alter zustande kommt.

- **Das weibliche Geschlecht**
- Stattgehabte Wirbelkörperfrakturen
- Nicht vertebrale Frakturen nach dem 50. Lebensjahr
- Proximale Femurfraktur bei Vater oder Mutter
- Multiple intrinsische Stürze
- Immobilität
- Rauchen und chronisch obstruktive Atemwegserkrankung
- Untergewicht (Body Mass Index < 20), Gewichtsabnahme und Anorexia nervosa
- **Vitamin D- und Kalziummangel:** 25-Hydroxy-Vitamin D-Serum-Konzentration kleiner als 20 ng/ml (< 50 nmol/l), Kalziumzufuhr < 500mg täglich.
- Ein erhöhtes hsCRP (Hoch sensitives C-reaktive Protein)
- Eine hohe Kadmiumausscheidung.
- Risikofaktoren durch spezielle Grundkrankheiten:
 - Endokrinologische Erkrankungen (Cushing-Syndrom und subklinischer Hyperkortisolismus, primärer Hyperparathyreoidismus, Wachstumshormonmangel bei Hypophyseninsuffizienz, subklinische und manifeste Hyperthyreose, Diabetes mellitus Typ 1 und 2)
 - Rheumatologische Erkrankungen (Rheumatoide Arthritis, Spondylitis ankylosans, Systemischer Lupus Erythematodes)
 - Gastroenterologische Erkrankungen (Zöliakie, Gastrektomie)
 - Neurologische Erkrankungen (Epilepsie und Antiepileptika, Schizophrenie, apoplektischer Insult, Alzheimer Erkrankung, Morbus Parkinson)
 - Andere Erkrankungen (Herzinsuffizienz, Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz, Alkohol und alkoholische Lebererkrankung)
- Risikofaktoren durch medikamentöse Therapien
 - Hormonablativ Therapie, männlicher Hypogonadismus anderer Ursache
 - Aromatasehemmer
 - **Glukokortikoide**
 - Therapie mit Thiazolidindionen (Glitazonen)
 - Medikamente, die Stürze begünstigen

- Depression / Antidepressiva
- Opioide
- Protonenpumpenhemmer

Bei der körperlichen Untersuchung wird die Gesamtfunktion des Bewegungsapparates und speziell der Wirbelsäule beurteilt. Die Körpergröße, Statik, Fehlformen und Fehlfunktionen werden überprüft [DVO-Leitlinie 2017]. Bei klinischem Verdacht auf eine Wirbelkörperfraktur wird eine symptombezogene klinische und radiologische Untersuchung durchgeführt, um instabile Frakturverhältnisse, die eine Gefährdung des Patienten darstellen, zu detektieren. Besonders die neurologische Untersuchung hat einen hohen Stellenwert, da spinale Kompressionssynrome beurteilt werden können, zum anderen um die neuromuskuläre und koordinative Situation mit entsprechenden Hinweisen für ein erhöhtes Sturzrisiko abzuklären [DVO-Leitlinie 2017]. Hierfür bieten sich der Time-up-and-go-Test oder der Chair-rising-Test in Kombination mit dem Tandemstand, ggf. als Teil eines ausführlicheren geriatrischen Assessments an [DVO-Leitlinie 2017, Peters 2013].

Zu den laborchemisch zu bestimmenden Parametern zählen die in Tab. 1 aufgelisteten Parameter.

Parameter	Bemerkung
Blutbild	
BSG/CRP	
Kalzium	
Phosphat	
Eiweißelektrophorese	
Kreatinin-Clearance	z.B. nach Cockcroft-Gault oder MDRD
Alkalische Phosphatase	
γ -GT	
TSH	
Testosteron bei Männern	Fakultativ
25-Hydroxy-Vitamin D3	Als Einzelfallentscheidung
Knochenumbaumarker	Als Einzelfallentscheidung

Tabelle 1: Osteologisches Basislabor [Peters 2013].

Ziel der Blutuntersuchung ist es, die wichtigsten laborchemisch erfassbaren Risikofaktoren und sekundären Osteoporosen und differentialdiagnostisch in Frage kommende anderen Osteopathien abzuklären. Besonders die Abgrenzung zur Osteomalazie, die ebenfalls mit einer erniedrigten Knochendichte einhergeht ist wichtig. Das Standardverfahren zur Knochendichtemessung ist die Osteodensitometrie mittels der „Dual X-Ray Absorptiometry“ an der Lendenwirbelsäule und am proximalen Femur (Abb. 6). Der Messbereich der Lendenwirbelsäule erstreckt sich von LWK 1-LWK 4. Der mittlere T-Score der Wirbelkörper, bei denen eine auswertbare Messung möglich ist, wird ermittelt (mindestens zwei Wirbelkörper).

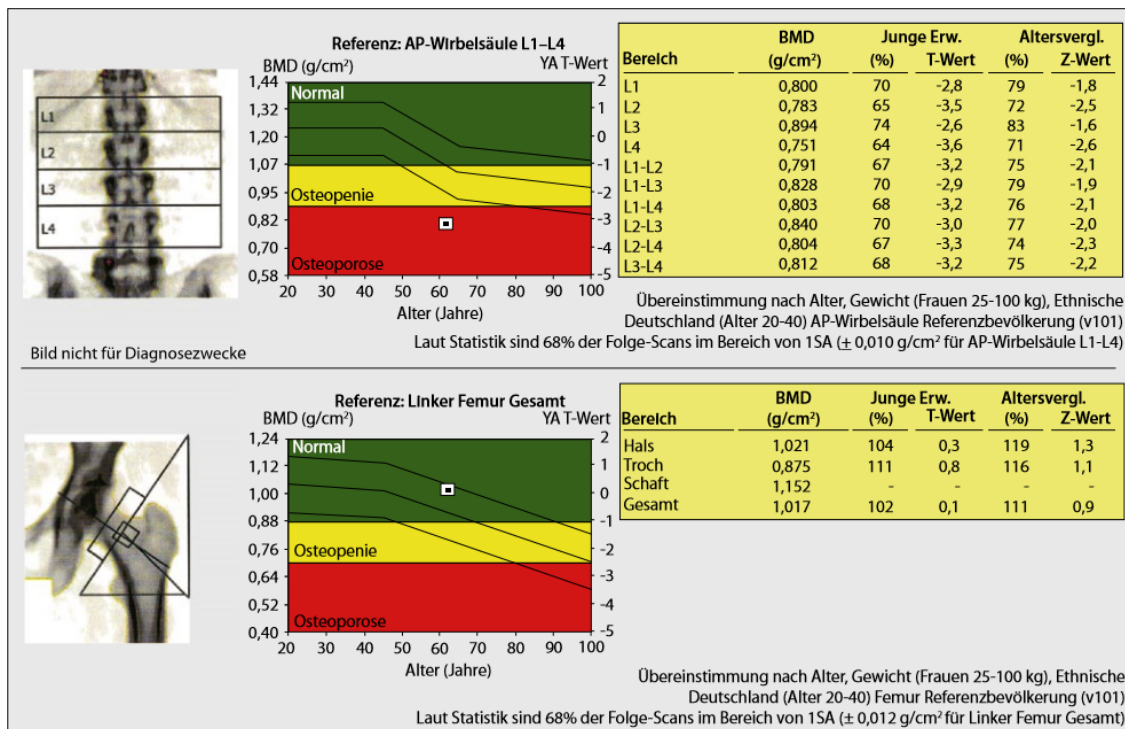


Abbildung 6: DXA-Messung der Knochendichte an LWS und Hüfte. Nachweis einer messtechnischen Osteoporose der LWS, aber Normwerte der linken Hüfte, ohne Frakturachweis [Bartl, Gradinger 2009].

Bezogen auf das Femur werden zwei Bereiche gemessen: Die Gesamtfemurregion („Total Hip“) und der T-Score am Schenkelhals. Diese Messungen ermöglichen Aussagen darüber, ob eine Osteoporose nach der Definition der WHO vorliegt (T-Score < -2,5) und wie hoch das absolute Frakturrisiko ist. Sie helfen bei der Beurteilung der medikamentösen Risikoreduktion. Es werden geschlechtsspezifische Normkollektive der Knochendichte zugrundegelegt [DVO-Leitlinie 2017]. Nach der operationalen

Definition der WHO aus dem Jahr 1994 liegt eine Osteoporose dann vor, wenn der Knochenmineralgehalt in einer DXA-Knochendichtemessung an der Lendenwirbelsäule und/oder am proximalen Femur (Gesamtareal oder Schenkelhals) um $\leq -2,5$ Standardabweichungen vom Mittelwert einer 20-29-jährigen Frau abweicht.

Die in Standardabweichungen angegebene Differenz der Knochendichte von der Knochendichte einer 20-29-jährigen Frau wird als T-Score bezeichnet (Tab. 2).

T-Score	Diagnostische Kategorie nach WHO
$\geq -1SD$	Normale Knochendichte
$< -1 SD$ und $> -2,5 SD$	Osteopenie
$\leq -2,5 SD$	Osteoporose
$\leq -2,5 SD$ plus Fraktur	Manifeste Osteoporose

Tabelle 2: Vier Kategorien der Knochendichte basierend auf der Knochendichtemessung mittels DXA nach der WHO-Definition (2003).

Diese operationale Definition kann auf Männer ab dem 50. Lebensjahr übertragen werden. Alle Aussagen zu T-Scores bei Männern sollten sich auf ein männliches Referenzkollektiv für den T-Score beziehen. Die auf den T-Scores beruhende Definition der Osteoporose gilt erst nach Ausschluss anderer Erkrankungen, die mit einer Verminderung des Knochenmineralgehalts einhergehen können. Ein T-Score in der DXA-Messung von $-3 SD$ bei einer Mineralisationsstörung ist z.B. definitionsgemäß keine Osteoporose, sondern in diesem Fall assoziiert mit einer Osteomalazie. Die Diagnose einer Osteoporose auf der Grundlage eines DXA-T-Scores kann also nie alleine aus dem Knochendichtemesswert, sondern nur im weiteren klinischen Kontext gestellt werden [DVO-Leitlinie 2017].

Die Knochendichtemessung mittels DXA ist die einzige empfohlene Methode zur Diagnostik der Osteoporose nach den aktuellen DVO-Leitlinien. Sie ist wertvoll für die Diagnostik, Prognose und Patientenselektion vor der Einleitung einer medikamentösen Behandlung. Viele Studien haben gezeigt, dass die drei normalerweise gemessenen Bereiche (Hüfte, Wirbelsäule und Unterarm) einen annähernd gleichen Vorhersagewert für generelle Frakturen haben [Black et al. 1992; Marshall, Johnell und Wedel 1996], trotzdem besteht ein Vorteil der Bereichsspezifizierung darin, dass der BMD der Hüfte der beste Vorhersagewert für Hüftfrakturen ist, ebenso wie der BMD der Wirbelsäule

der beste Vorhersagewert für Frakturen der Wirbelsäule ist [Stone et al. 2003]. Die Messungen des BMD können erfolgreich frakturgefährdete Personen identifizieren und den Behandlern helfen die Personen auszuwählen, die von der Einleitung einer Therapie am meisten profitieren. Einige Faktoren limitieren die Genauigkeit der Vorhersage des individuellen Frakturrisikos. Zum Beispiel wurden die Standarddaten für weiße Bevölkerungsgruppen erhoben, sie treffen nicht unbedingt für andere ethnische Gruppen zu. Ebenso steht der BMD in Relation zum Gewicht, dieses findet aber bei den klinischen Untersuchungen keine Beachtung [Marcus et al. 2007]. Trotzdem ist die Knochendichte der stärkste Vorhersagewert für die mechanische Verhaltensweise des trabekulären Knochens [Rice et al. 1988; Keaveny et al. 2001; Gibson 1985]. Die Tatsache, dass die in der Bone Mineral Density enthaltenen Informationen die wichtigen geometrischen, Material- und mikroarchitektonischen Eigenschaften richtig vorhersagen, rechtfertigt die BMD-Messung als diagnostisches Kriterium [Marcus et al. 2007]. Andere bildgebende Verfahren wie Computertomographie (außer q-CT), Magnetresonanztomographie und Szintigraphie haben keinen routinemäßigen Stellenwert in der Basisdiagnostik der Osteoporose [DVO-Leitlinie 2017].

3 Material und Methoden

Untersucht wurden 60 weibliche Ratten über den Zeitraum von 16 Wochen. Dabei wurden vier Gruppen gebildet: Die Kontrollgruppe (n=10) wurde unbehandelt im Alter von 14 Wochen euthanasiert und diente als Ausgangswert für die Histomorphometrie. Die Sham-Gruppe (n=10) wurde einer Scheinoperation unterzogen, um die Operation als Einflussfaktor auszuschließen. Die OVX + Diät-Gruppe (n=30) wurde ovariectomiert und erhielt im Verlauf eine Calcium- und Vitamin D₃-arme Diät. Die OVX + Steroid-Gruppe (n=10) wurde ebenfalls ovariectomiert und bekam im Intervall von drei Wochen, über den gesamten Beobachtungszeitraum, ein Steroid appliziert. Für die Gruppenteilung und Art der Behandlung siehe Tab. 3.

Gruppe	Kontrolle	Sham	OVX + Diät	OVX + Steroid
Tieranzahl	n=10	n=10	n=30	n=10
Art des Futters	Standard	Standard	Diät	Standard

Tabelle 3: Aufteilung der Studiengruppen: Die Einteilung einer bestimmten Gruppe legte die Art der Behandlung fest.

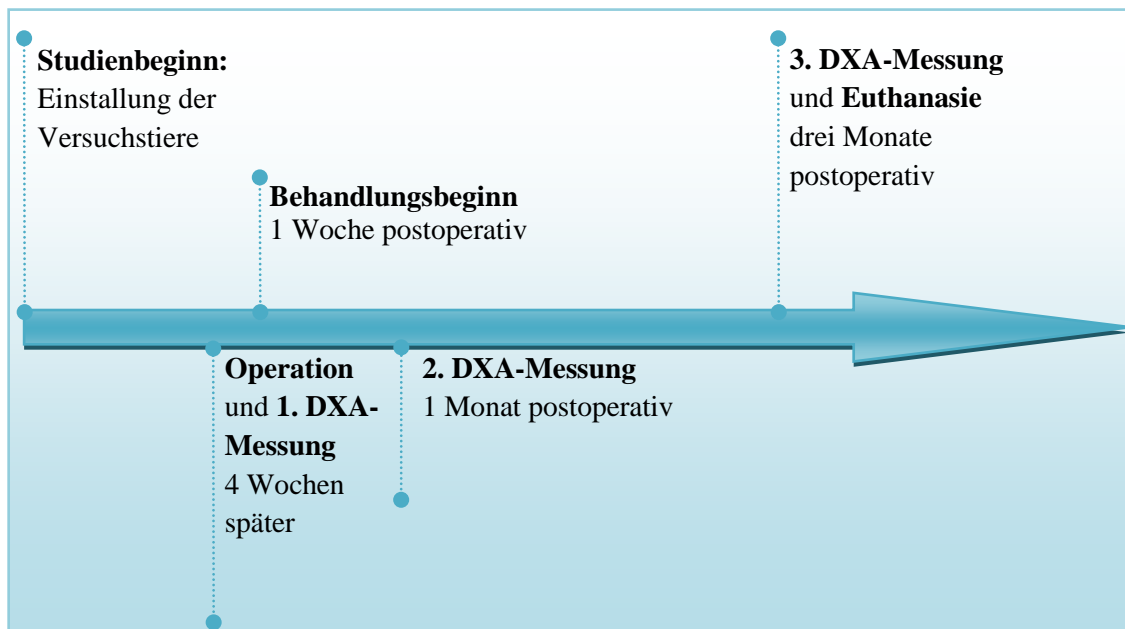


Abbildung 7: Zeitliche Versuchsplanung: Vier Wochen nach Studienbeginn erfolgte die Ovariectomie und die erste DXA-Messung, eine Woche postoperativ wurde mit der Behandlung begonnen. Die 2. DXA-Messung wurde einen Monat postoperativ durchgeführt. Die Euthanasie und die abschließende DXA-Messung erfolgten drei Monate postoperativ.

Zur Beurteilung der Knochendichte wurden im Verlauf der Studie drei Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA)-Messungen durchgeführt. Gemessen wurde die Bone Mineral Density (BMD) und der prozentuale Fettgehalt. Die Messzeitpunkte wurden wie folgt festgelegt: Messzeitpunkt t_0 unmittelbar nach der Ovariectomie (Alter: 14 Wochen), Messzeitpunkt t_1 einen Monat später (Alter: 18 Wochen) und Messzeitpunkt t_2 drei Monate nach Ovariectomie (Alter: 26 Wochen; Abb. 7). Um die Ergebnisse der Knochendichteerhebungen histologisch korrelieren zu können, erfolgte eine Aufarbeitung der Knochen nach der Euthanasie der Tiere. Bei der Durchsicht und Beschreibung der dabei entstandenen Präparate wurden Auffälligkeiten des mikroskopischen Knochenaufbaus herausgearbeitet, die dann mit Hilfe einer histomorphometrischen Analyse quantitativ untersucht werden konnten. Bei dieser Bildanalyse waren die Parameter wie Trabekelfläche und Fettgehalt von Interesse, so dass ein Vergleich der Knochendichtemessung mit der histomorphometrischen Analyse gezogen werden konnte.

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstier wurde die Ratte ausgewählt, da sie ein gut erforschtes Versuchsobjekt in der Osteoporoseforschung darstellt und die postmenopausale Osteoporose nach einer kurzen Beobachtungszeit besonders gut nachahmen kann [Egermann, Goldhahn und Schneider 2005]. Das Versuchstier Ratte ist leicht zu erwerben und wenig kostenintensiv [Bellino 2000]. Sie hat eine kurze Lebenszeit, ist einfach in der Unterbringung [Turner 2001] und die erhobenen Ergebnisse sind reproduzierbar [Hartke 1998].



Abbildung 8: Die Versuchstiere und deren Unterbringung. Sprague Dawley Ratten im Alter von 14 Wochen vor der Ovariectomie im Makrolonkäfig Typ IV (EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH und Co. KG, Emmendingen; EBECO E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel; Tecniplast S.p.a., Buguggiate, Italien).

Verwendet wurden 60 weibliche Ratten der Rasse Sprague Dawley® Crl:SD (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld) im Alter von 14 Wochen. Es handelte sich um Albinoratten mit weißer Fellfarbe (Abb. 8).

Eine Tierversuchsgenehmigung des Regierungspräsidiums Gießen (Geschäftszeichen: V54-19c20-15(1)GI20/28 Nr.89/2009) gemäß §8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes – TierSchG- in der letzten gültigen Fassung vom 24.05.2007 lag vor. Alle Tiere stammten aus derselben Zucht und wurden regelmäßig gewogen. Dabei hatte die Sham-Gruppe zu Beginn ein Durchschnittsgewicht von 281,5g +/- 8,4g, die OVX + Diät-Gruppe wog durchschnittlich 268,9g +/- 14,6g und die OVX + Steroid-Gruppe startete mit einem Gewicht von 267,1g +/- 13,1g. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich von Juli bis November.

Die Tiere wurden vier Wochen vor der Operation eingestallt, damit eine Gewöhnung an die neue Umgebung stattfinden konnte. Zu diesem Zeitpunkt waren sie zehn Wochen alt. Dabei wurden jeweils vier Tiere in Makrolonkäfigen Typ IV (EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH und Co. KG, Emmendingen; EBECO E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel; Tecniplast *S.p.a.*, Buguggiate, Italien) mit aus Polycarbonat bestehenden Käfigschalen (Abb. 8) untergebracht. Die Ratten wurden postoperativ für den Zeitraum von einer Woche einzeln in Makrolonkäfigen Typ II (EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH und Co. KG, Emmendingen; EBECO E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel; Tecniplast *S.p.a.*, Buguggiate, Italien) gehalten, bis das Nahtmaterial aus der Wunde entfernt wurde. Beide Käfigarten wurden mit Einstreu ausgestattet. Alle Tiere erhielten eine entsprechende Ohrmarke, damit eine genaue Identifizierung der Ratten möglich war.

Die Zuordnung zu den verschiedenen Gruppen entschied über die Art des Futters. Die Sham- und die OVX + Steroid-Gruppe erhielten Standardfutter für Nagetiere (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage). Die OVX + Diät-Gruppe erhielt eine Spezialdiät (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage), in dieser war der Gehalt an Vitamin D₃, Vitamin K, Calcium und Phosphor auf eine minimal nötige Konzentration vermindert. Die Zusammensetzung der Spezialdiät kann der Tab. 4 entnommen werden. Die Tiere erhielten Wasser und das ihnen zugeteilte Futter ad libitum und wurden einmal wöchentlich umgesetzt. Der Raum, in dem die Ratten untergebracht waren,

wurde zwölf Stunden am Tag beleuchtet (6.00 - 18.00 Uhr), dabei betrug die Raumtemperatur 22 +/- 2°C und die Luftfeuchtigkeit 50 +/- 5%.

Inhaltsstoff	Einheit	Gehalt Standard-futter	Gehalt Diät
Calcium	mg/kg	9310,506	1367,728
Vitamin D3	I.E./kg	500,000	0,000
Vitamin K3	mg/kg	10,000	5,000
Phosphor	mg/kg	7522,765	533,069

Tabelle 4: Zusammensetzung der Spezialdiät. Der Mineralstoffgehalt der zwei Futterarten richtete sich nach der Gruppeneinteilung, nur die OVX + Diät-Gruppe erhielt eine Spezialdiät mit einem reduzierten Gehalt an Calcium, Vit. D3, Vit. K3 und Phosphor.

3.2 Operation

3.2.1 Narkose

Vor Beginn der Narkose wurden die Ratten in einen Vorbereitungsraum gebracht und gewogen, um dann gewichtsadaptiert anästhesiert zu werden. Die Narkose wurde mit einer intraperitonealen Injektion, bestehend aus 4 mg/kg KG Xylacin (Rompun® 2%, CEVA Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf) und 100 mg/kg KG Ketamin (bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta) gelöst in körperwarmem 0,9% NaCl, eingeleitet. Für die Injektion wurden G26 Kanülen benutzt. In Ausnahmefällen wurde zur Aufrechterhaltung der nötigen Narkosetiefe ein mit Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) getränkter Zellstoff verwendet. Die Ratten wurden intraoperativ, sowie drei bis fünf Tage postoperativ mit 0,2 mg/kg KG/Tag Metacam® (Meloxicam, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein) subkutan analgesiert, um Wundschmerzen zu vermeiden.

In Narkose wurde über die Schwanzvene (Vena caudalis lateralis sinister) Blut abgenommen. War dies dort nicht möglich, wurde in Ausnahmefällen die Vena caudalis lateralis dexter verwendet. Danach wurden die Ratten zuerst mit einer Tierschermaschine für Labornager (Indulab AG, Gams (Schweiz), Model 1574) und im Anschluss mit einem Einmalrasierer enthaart. Während der Operation wurden die Tiere in Bauchlage auf einer 38°C warmen Heizmatte gelagert, so dass die Körpertemperatur

konstant gehalten werden konnte. Die Augen wurden während der Narkose mit Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Bayer Health Care AG, Leverkusen) vor Austrocknung geschützt. Zusätzlich wurde ein Rotlichtbänkchen über dem Kopf positioniert, um das helle Licht der Operationslampe abzuschirmen und die sensible Retina der Albinotiere zu schützen. Die Zunge der Ratten wurde nach exoral ausgelagert, damit zu jedem Zeitpunkt die Oxygenierung beurteilt werden konnte.

In der Aufwachphase wurden die Tiere in einer leicht kontrollierbaren Umgebung auf mit 38°C warmen Wasser gefüllten Wärmflaschen gelagert. Im Intervall von zehn Minuten wurde die Atemfrequenz und die rektal gemessene Temperatur überwacht und protokolliert. Die Narkose wurde mit der Injektion von Atipamezolhydrochlorid (Antisedan®, Pfizer GmbH, Berlin) subkutan ausgeleitet. Im Anschluss wurden die Tiere so lange in einem mit Zellstoffunterlagen ausgelegten Käfig beobachtet, bis sie selbstständig laufen und den Kopf heben konnten, um eine Aspiration des Einstreus zu vermeiden. Danach wurden sie in Einzelkäfige (Makrolonkäfigen Typ II, EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH & Co. KG, Emmendingen; EBECO E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel; Tecniplast *S.p.a.*, Buguggiate, Italien) umgesetzt, um zu verhindern, dass sie sich unter der gegebenen Schmerzmedikation gegenseitig verletzen. Sowohl das Allgemeinbefinden in Form von Bewegungsaktivität und Körpergewicht als auch die Operationswunde wurden täglich von einem Tierarzt und Tierpflegern kontrolliert und dokumentiert bis eine vollständige Wundheilung eingetreten war. Danach wurde das Körpergewicht wöchentlich gemessen.

3.2.2 Ovariectomie

Die Ovariectomie wurde bei der OVX + Diät-Gruppe und bei der OVX + Steroid-Gruppe durchgeführt. Dieser invasive Eingriff erfolgte in Vollnarkose, wie oben beschrieben. Wie auch bei der Sham-Operation wurden die Tiere in Bauchlage mit abgespreizten Extremitäten operiert. Um die Atemwege frei zu halten wurde eine Rolle aus Zellstoff geformt und unter den Brustkorb der Ratten gelegt.

Die zuvor schon rasierte Stelle am Rücken wurde mit einem nicht alkoholischen Desinfektionsmittel (Braunol®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) ausgiebig desinfiziert und steril abgedeckt.

Zu Beginn der Ovariectomie wurde mit einem Skalpell (FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Japan) ein ca. 1,5 cm langer Hautschnitt kurz unterhalb des Rippenbogens über der

Wirbelsäule gesetzt. Mit einer Schere wurde durch das Subkutangewebe stumpf präpariert, um danach die Bauchdecke mit einer Pinzette anzuheben. Unter Sicht wurde ein Scherenschlag gesetzt, so dass Luft in die Bauchhöhle eindringen konnte. Der Schnitt wurde unter Pinzettenschutz verlängert, damit eine Öffnung zur Bauchhöhle hergestellt werden konnte. Mit einer zweiten Pinzette wurden der Uterus, das Ovar und das sie umgebende Fettgewebe vorsichtig aus der Bauchhöhle ausgelagert. Das Ovar wurde freipräpariert, um eileiterwärts eine Ligatur zur Unterbrechung der Gefäßversorgung des Ovars anzubringen (Abb. 9 a). Danach wurde das Ovar abgetrennt (Abb. 9 b) und der Uterus mitsamt Fettgewebe wieder in die Bauchhöhle zurückverlagert. Je nach Größe der Öffnung in der Bauchdecke, wurde diese mit einem resorbierbaren 5-0 (UPS=1,0 metric) Faden (Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt) und zwei bis drei Einzelhäften verschlossen.

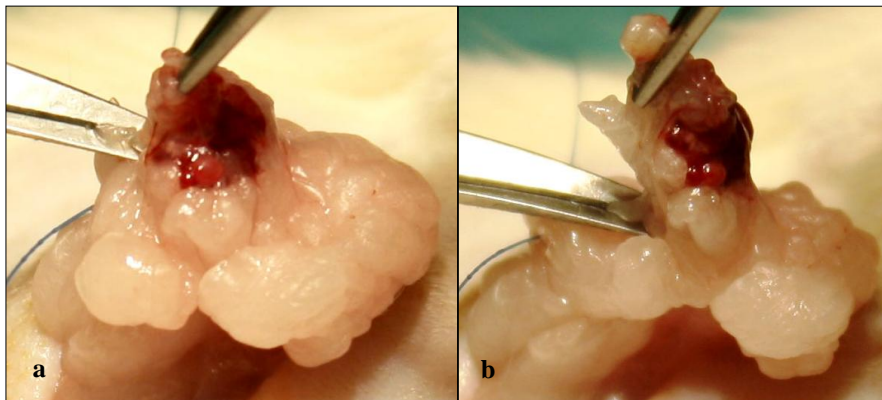


Abbildung 9 a-b: Vorgang der Ovariectomie. Ovariectomie der OVX + Diät- und der OVX + Steroid-Gruppe im Alter von 14 Wochen durch Abtrennen des Ovars mit einem Scherenschlag. a) Das vor die Bauchhöhle ausgelagerte Ovar wird dargestellt und der Eileiter ligiert, um dann b) mit der Schere abgetrennt zu werden.

Der Hautschnitt wurde im Folgenden auf die andere Seite verlagert und über eben diesen wurde mit dem identischen Verfahren die Bauchhöhle auf der kontralateralen Seite eröffnet und das Ovar entfernt. Die Haut wurde anschließend mit einem 3-0 Prolene Faden (Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt) verschlossen.

Die Wunde wurde nach der erfolgten DXA-Messung mit drei bis vier Michel-Klammern (10 x 3 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) geklammert, um eine bessere Wundadaptation zu erreichen, falls die Ratten das Nahtmaterial aufbeißen würden. Anschließend wurde der Prolene Faden entfernt und die Haut mit einem Sprühpflaster (OPSITE Spray, Smith & Nephew GmbH, Hamburg) versorgt. Die

Entfernung der Michel-Klammern erfolgte eine Woche postoperativ bei vollständig verschlossenen Wundverhältnissen.

3.2.3 Sham Operation

Eine Sham Operation wurde bei der Sham-Gruppe durchgeführt. Bei dieser Operation wurde so verfahren wie oben im Abschnitt Ovariectomie beschrieben, mit der Ausnahme, dass die Ovarien zwar vor die Bauchdecke vorgelagert, aber nicht abgetrennt wurden. Nach dem Vorziehen der Ovarien vor die Bauchdecke, wurden sie wieder in die Bauchhöhle zurückverlagert. Der Verschluss erfolgte wie oben beschrieben.

Ziel der Sham Operation ist es, die gleichen Versuchsbedingungen für die Sham-Gruppe zu schaffen und nach Möglichkeit verschiedene Einflussfaktoren wie Narkosestress und Wundschmerz, die sich auf die Knochendichte auswirken könnten, bei allen Versuchsgruppen gleichermaßen zu berücksichtigen.

3.3 Diät und Steroidgabe

Die Spezialdiät, die die OVX + Diät-Gruppe (n=30) erhielt, wurde von der Firma Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG in Lage individuell für dieses Projekt hergestellt. Die Zusammensetzung des Futters war durch einen auf ein Minimum verminderten Gehalt an Vitamin D₃, Vitamin K, Calcium und Phosphor charakterisiert. Die Ratten hatten unbegrenzt Zugriff auf das Futter. Damit sichergestellt wurde, dass nur Ratten der OVX + Diät-Gruppe die Diät erhielten, wurden ausschließlich Tiere aus einer Gruppe gemeinsam in einem Käfig gehalten. Mit der Gabe der Diät wurde eine Woche postoperativ begonnen.

Die Ratten der Sham-Gruppe und der OVX + Steroid-Gruppe erhielten ein Standardfutter für Nagetiere derselben Firma (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG in Lage), ebenfalls in unbegrenzter Menge.

Die Steroidgaben erfolgten ausschließlich in der OVX + Steroid-Gruppe. Begonnen wurde damit eine Woche postoperativ und fortgesetzt wurde die Gabe als subkutane Injektion in das Nackenfett, einmal alle drei Wochen über den gesamten Beobachtungszeitraum von drei Monaten. Verwendet wurden hierbei 0,025 ml Voren® Depot (Dexamethason-21-isonicotinat, 3mg/ml, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH

& Co. KG, Ingelheim am Rhein). Das entspricht einer Dosierung von ca. 0,3 mg/kg KG/Ratte.

3.4 Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA)

Die Dual Energy X-ray Absorptiometry ist ein radiologisches Verfahren, bei dem zwei Röntgenquellen leicht unterschiedlicher Energie auf das Gewebe auftreffen. Haben zwei gleiche Gewebearten eine unterschiedliche Dichte, so zeigen sie in Abhängigkeit von der Energie dieser Röntgenstrahlen eine andere Schwächungscharakteristik. Das heißt, dass die Strahlung in unterschiedlichem Ausmaß absorbiert wird. Diese Abschwächung ist messbar und wird als Flächenmaß wiedergegeben (BMD in g/cm²).

Vor dem Beginn der DXA-Messungen wurde eine Qualitätskontrolle mit anschließender Kalibrierung des Gerätes durchgeführt. Während der Messungen war der Messtisch stets mit einer Papiervorlage bedeckt, so dass sowohl die Qualitätskontrolle, als auch die Kalibrierung bei Aufliegen derselben durchgeführt wurden. Die Qualitätskontrolle wurde nach Anklicken des entsprechenden Feldes auf dem Bildschirm und der Positionierung des Prüfblocks automatisch gestartet und durchgeführt. Nach Beendigung erfolgte ein standardisierter Ausdruck mit dem Ergebnis der Qualitätskontrolle, das bildlich mit einem Ampelsystem dargestellt wurde. War die Kontrolle erfolgreich, wurde die Kalibrierung angeschlossen. Wenn das nicht der Fall war, musste entweder das Gerät neu gestartet oder der Serviceverantwortliche kontaktiert werden.

Die Kalibrierung wurde standardisiert mittels eines Phantomobjekts, in Form eines speziellen Metallstückes, durchgeführt. Auf das Phantom wurde ein mit Wasser gefülltes Behältnis gestellt. Danach konnte die Kalibrierung durch die enCORE Software (GE Healthcare, Deutschland) erfolgen.

Die DXA-Messungen wurden durchgeführt, um die Knochendichte in g/cm², im Folgenden als Bone Mineral Density (BMD) bezeichnet, und den prozentualen Fettgehalt bestimmen zu können. Die Messungen fanden zu drei verschiedenen Zeitpunkten an allen 50 Tieren mit Ausnahme der verstorbenen Ratten statt. Dabei war der erste Messzeitpunkt t_0 unmittelbar nach der Ovariectomie, der zweite Messzeitpunkt t_1 ein Monat nach Ovariectomie und der dritte Messzeitpunkt t_2 drei Monate nach Ovariectomie (Abb. 10).

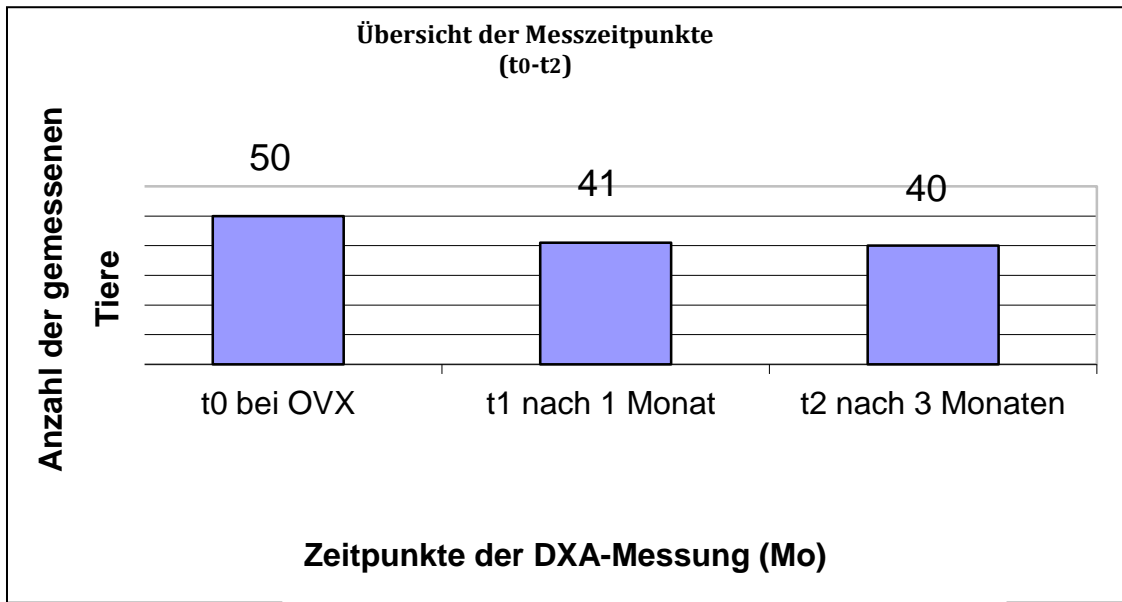


Abbildung 10: Übersicht der drei DXA-Messzeitpunkte mit der jeweiligen Anzahl der gemessenen Versuchstiere.

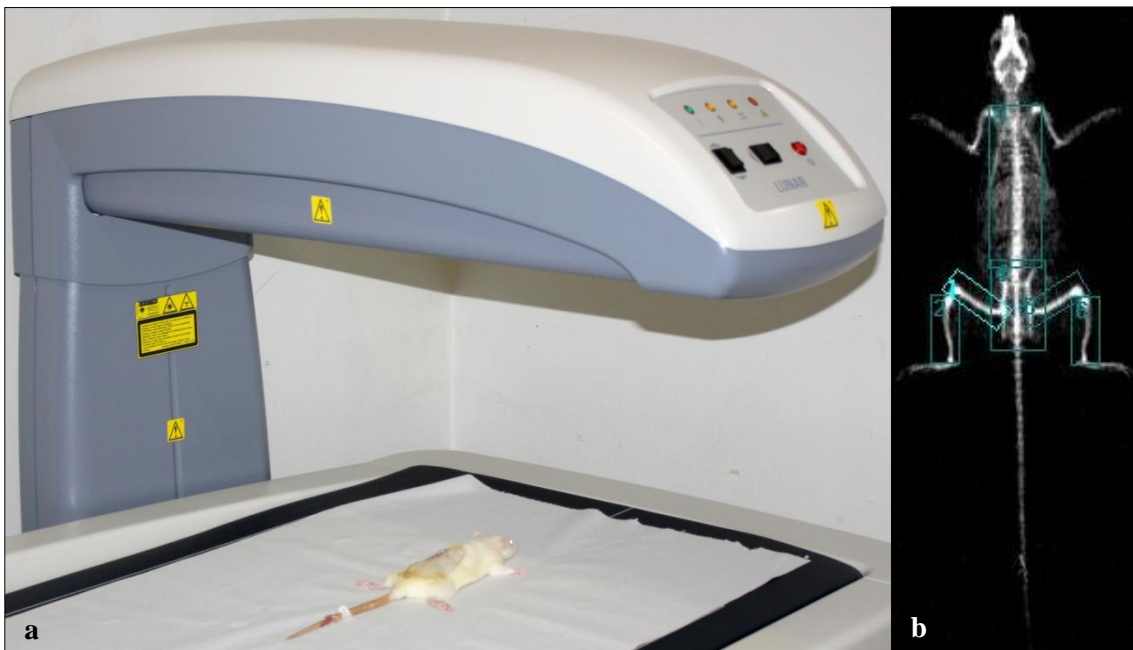


Abbildung 11 a-b: Knochendensitometer Lunar Prodigy® mit dem aus der Messung generierten Bildausschnitt. a) Knochendensitometer mit aufliegender ovariektomierter Versuchstier im Alter von 14 Wochen. b) Vom Knochendensitometer generiertes Bild der auf dem DXA-Tisch aufliegenden Ratte mit eingekreisten Messbereichen, Alter der Ratte: 14 Wochen.

Für diese Analyse wurde das Knochendensitometer Lunar Prodigy® und die enCORE Software (GE Healthcare, Deutschland) verwendet (Abb. 11 a). Grundsätzlich war für die DXA-Messung eine Vollnarkose der Ratten notwendig, damit ein scharfes Bild dargestellt werden konnte (Abb. 11 b).

Da die erste Messung direkt nach der Ovariectomie erfolgte, war die schon bestehende Narkose für diesen Analysevorgang ausreichend. Bei den anderen zwei Messzeitpunkten wurden die Ratten mit einer intraperitonealen Injektion bestehend aus 4 mg/kg KG Xylacin (Rompun® 2%, CEVA Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf) und 100 mg/kg KG Ketamin (bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta) gelöst in körperwarmem (bei Ratten zwischen 36° und 40°C [Wolfensohn und Lloyd 2003]) 0,9 % NaCl anästhesiert. Die Versuchstiere wurden im Folgenden in Bauchlage auf dem angewärmten Messtisch platziert und zusätzlich durch einen Heizlüfter gewärmt, um die Körperkerntemperatur konstant zu halten. Der Messvorgang wurde im Anschluss im Kleintiermodus (< 2 kg) gestartet und dauerte im Durchschnitt vier bis fünf Minuten pro Tier. Folgende Expositionsfaktoren kamen zur Anwendung: Spannung 76 kV, Strom 0,15 mA, Zeit: 4:21 min, Dosis 1,8 µGy.

Nach der Narkose wurden die Atemfrequenz und die rektale Temperatur der Ratten in Abständen von zehn Minuten überwacht bis sie wieder bei Bewusstsein waren.

Nachdem die Messung beendet wurde, erfolgte eine individuelle Analyse des erstellten Bildes. Es wurden verschiedene Messbereiche festgelegt (Tab. 5).

Für die Analyse des virtuellen zweidimensionalen Bildes wurden individuelle Regions of Interest (ROIs) festgelegt. Diese ROIs sind Flächen einer im Folgenden konstanten Größe, die auf die Projektion der entsprechend zu messenden Knochen platziert werden. Die Software berechnet anhand dieser ROIs die zu ermittelnden Werte, wie z.B. die Bone Mineral Density (BMD) und den prozentualen Fettgehalt. Bei jeder Messung erfolgt die Analyse manuell durch das Positionieren der passenden ROIs auf dem jeweiligen Messbereich. Dabei wurden die ROIs folgendermaßen festgelegt. Die Femora wurden von den Femurkondylen bis zum Femurkopf gemessen, die Tibiae wurden ab dem Sprunggelenk bis zum Tibiaplateau gemessen und die Wirbelsäule wurde ab der Schulterhöhe bis zum Beginn des Beckens gemessen. Das Becken wurde vollständig mit Wirbelsäule und Femurkopf in einem Messbereich erfasst. Der Messbereich „Ganzer Körper“ umfasst das gesamte gemessene Skelett der Ratte. Die Größe der ROIs blieb mit einer Ausnahme konstant. Der Messbereich der Wirbelsäule

musste aufgrund des Größenwachstums der Ratte bei den letzten beiden Analysen angepasst werden, da das ROI für diese Messzeitpunkte zu klein gewählt war. So ergeben sich die in Tab. 5 beschriebenen Größen für die gemessenen Regionen.

ROI	Bereich	t ₀ bei OVX		t ₁ nach einem Monat	t ₂ nach drei Monaten
		Breite in cm	Höhe in cm	Höhe in cm	Höhe in cm
1	Femur links	3,97	1,43	Konstant	Konstant
2	Tibia links	1,66	4012	Konstant	Konstant
3	Wirbelsäule	3,04	9,73	10,27	10,29
4	Becken	3,09	5,37	Konstant	Konstant
5	Femur rechts	3,97	1,43	Konstant	Konstant
6	Tibia rechts	1,66	4,12	Konstant	Konstant
7	Ganzer Körper	24,17	42,09	Konstant	Konstant

Tabelle 5: Übersicht der einzelnen Messbereiche mit den dazugehörigen Flächenmaßen der ROIs und zeitlichen Änderungen derselben.

3.5 Euthanasie und Probengewinnung

Nach einer Standzeit von drei Monaten wurden die Tiere erst mit einer intraperitonealen Injektion bestehend aus 4 mg/kg KG Xylacin (Rompun® 2%, CEVA Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf) und 100 mg/kg KG Ketamin (bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta) gelöst, in körperwarmem 0,9% NaCl in Narkose versetzt und einer letzten DXA-Messung unterzogen. Im Anschluss wurden sie schmerzlos mit der Insufflation von Kohlenmonoxid euthanasiert. Aus der Sham-Gruppe (n= 10) wurden insgesamt neun Tiere euthanasiert, ein Tier starb zuvor. Von den Tieren aus der OVX + Diät-Gruppe starb ebenfalls ein Tier infolge der Narkose und ein weiteres an den Operationsnachwirkungen, so dass von dieser Gruppe acht Tiere euthanasiert wurden.

Aus der OVX + Steroid-Gruppe starb ein Tier vor der Euthanasie infolge der Operation und es wurden neun Tiere euthanasiert. Die Ratten wurden hierfür einzeln in Makrolonkäfigen Typ II (EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH & Co.KG, Emmendingen; EBECO E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel; Tecniplast *S.p.a.*, Buguggiate, Italien) gesetzt und luftdicht eingeschlossen. Im Anschluss wurde das Gas mit einer Flussgeschwindigkeit von 6 l/min in den Käfig geleitet und erst dann gestoppt, wenn die Ratte ihre letzten Atemzüge vollzogen hatte.

Nachdem durch Palpation sicher gestellt wurde, dass der Herzschlag ausgesetzt hat, wurde mit der Präparation begonnen. Für die histologische und histomorphometrische Analyse wurden das linke Femur und der dritte Lendenwirbelkörper verwendet (Abb. 12 a-b). Beide Knochen wurden mit Pinzette und Skalpell (FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Japan) frei präpariert und von dem umliegenden Bindegewebe, Muskeln und Sehnenansätzen befreit.



Abbildung 12 a-b: Femur und Lendenwirbelkörper der Ratte nach Explantation. a) Präparierter linker Femur der Ratte nach einer Standzeit der Versuchstiere von drei Monaten. b) Von Muskeln und Gewebe befreiter dritter Lendenwirbelkörper mit unterbrochenem Arcus vertebrae zum gleichen Zeitpunkt.

Der dritte Lendenwirbelkörper wurde vom Arcus vertebrae abgetrennt, so dass nur noch der Corpus vertebrae vorhanden war (Abb. 12 b). Nun wurde der Wirbelkörper noch von den Bandscheiben befreit und aufgeschnitten, damit das Fixans besser in die Trabekelstruktur eindringen konnte.

Das linke Femur wurde mit dem distalen Ende in zuvor angerührtem Technovit ® 3040 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim) eingebettet. Nach Hartwerden des Kunststoffes wurde das Femur mit einer Diamantbandsäge (EXAKT 310, EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt) sagittal in der Mitte durchtrennt (Abb. 13). Auch hier erfolgte der Vorgang zur besseren Penetration der Fixierlösung in die Knochenstruktur. Das Explantationsmaterial wurde danach für 24 Stunden in 4%

Paraformaldehydlösung nach Lillie fixiert, um eine frühzeitige Autolyse zu verhindern. Der Transport zum Labor erfolgte auf Trockeneis.

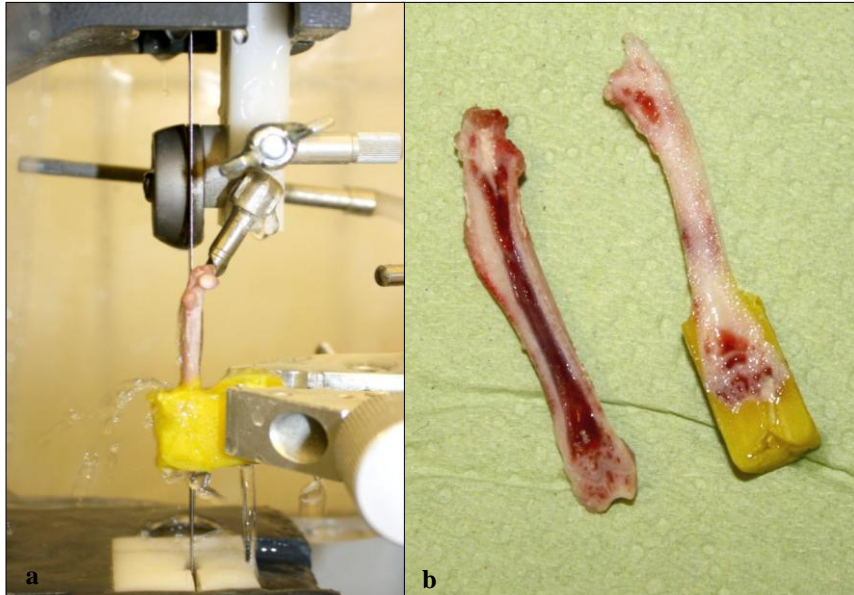


Abbildung 13 a-b: Sägevorgang und -ergebnis. a) Sägevorgang mit der Diamantbandsäge (EXAKT 310, EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt) zur Optimierung der Eindringtiefe der Fixierlösung Paraformaldehyd 4%. b) Nach dem Sägevorgang zerteilter linker Femur mit Blick auf die Schnittflächen.

3.6 Herstellung und Färbung der Paraffinschnitte

Nach der Fixierung wurden die Proben insgesamt sechsmal mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2 - 7,4 gespült und zum Entkalken ein bis zwei Wochen in EDTA-Lösung eingelegt. Im Anschluss erfolgte eine Spülung unter fließendem Leitungswasser, die eine Stunde andauerte.

Zur weiteren Einbettung in Paraffin, wurden die Knochenproben in 70% Alkohol gelegt und mit dem Paraffin-Einbettautomat TP1050 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) weiterbearbeitet, so dass sie am Ende in einem Paraffinblock eingegossen vorlagen. Diese Blöcke wurden im Folgenden mit dem Rotationsmikrotom RM 2155 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) in vier bis sechs Mikrometer dicke Schnitte gehobelt, begonnen wurde mit einem Abstand von acht Mikrometer zur Vorderkante des Paraffinblocks. Die Paraffinschnitte wurden mit einem feuchten Pinsel vorsichtig in ein 45°C warmes Wasserbad überführt und auf einen Objektträger aufgenommen. Die Trocknung der Objektträger in Küvetten erfolgte bei 40°C in einem

Brutschrank. Gefärbt wurden die Paraffinschnitte mit Hämalaun-Eosin (H.E.), indem sie mit Xylol (Merck KGaA, Darmstadt) entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe in ein wässriges Milieu überführt wurden. Dann wurden sie mit Mayers Hämalaun (Merck KGaA, Darmstadt) gefärbt und mit destilliertem Wasser abgespült, um danach zehn Minuten lang unter fließendes Leitungswasser gestellt zu werden. Bevor und nachdem die Objektträger in 1% Eosinlösung getaucht wurden, wurden sie erneut mit destilliertem Wasser gespült. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für ca. 16-25 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe belassen, um dann mit DePex (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) eingedeckt zu werden. Das Färberegebnis gestaltet sich wie folgt: Zellkerne werden blau dargestellt, die Muskulatur erscheint rot und das Bindegewebe hat eine hellrote Farbe. Erythrozyten imponieren in dieser Färbung leuchtend rot.

3.7 Histologie

Nach der Färbung wurden die Paraffinschnitte der verschiedenen Gruppen unter dem Lichtmikroskop miteinander verglichen und qualitativ analysiert. Hierzu wurden verschiedene Vergrößerungen genutzt. Zuerst wurde ein Überblick geschaffen, in dem der Schnitt mit der 2,5 x Vergrößerung betrachtet wurde (Abb. 14 a), danach waren detailliertere Bildausschnitte von Interesse. So wurde jeder Paraffinschnitt auch in der 5x, 20x, 40x und 100x Vergrößerung begutachtet. Es wurde eine Bilddokumentation unter Zuhilfenahme des Fotomikroskop Axioplan 2 Imaging (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) und der hochauflösenden Digitalkamera DC500 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) durchgeführt, wie die Abb. 14 zeigt.

Bei der deskriptiven histologischen Analyse waren folgende Aspekte sowohl bei den Femora als auch bei den Wirbelkörpern von Bedeutung:

- Morphologie der Substantia compacta
- Trabekeldicke und -aussehen
- Ausmaß des Fettgehalts
- Aussehen des Knorpels an Epiphysenfugen und Gelenkflächen
- Anzahl und Aussehen der Volkmann- und Haverskanäle
- Zelluläre Bestandteile (Osteoklasten, Osteoblasten, Bone lining cells)

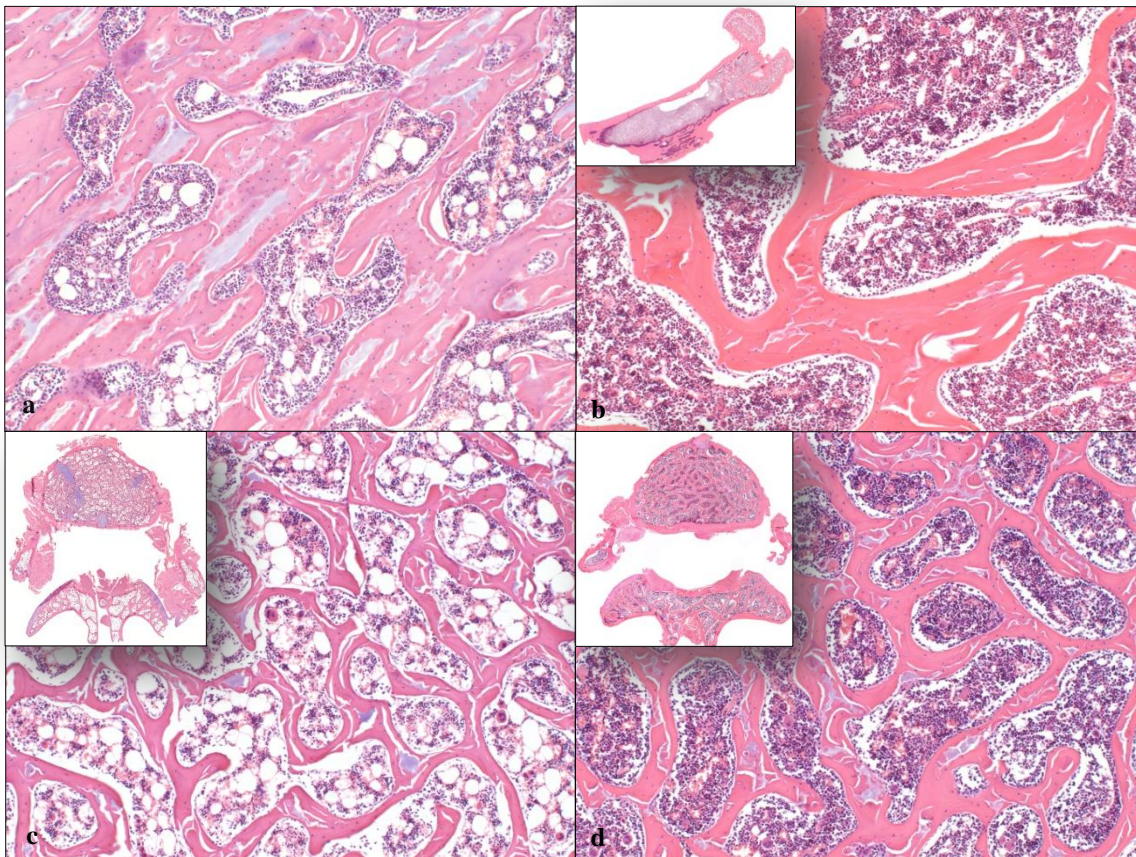


Abbildung 14 a-d: Bilddokumentation für die histologische und histomorphometrische Auswertung, H.E. a) Linkes Femur, Vergrößerung x 10, Kästchen oben links Vergrößerung x 2,5, Ratte 13, OVX + Steroid-Gruppe. b) Linkes Femur, Vergrößerung x 10, Kästchen oben links Vergrößerung x 2,5, Ratte 3, OVX + Diät-Gruppe. c) LWK 3, Vergrößerung x 10, Kästchen oben links Vergrößerung x 5, Ratte 37, OVX + Steroid-Gruppe. d) LWK 3, Vergrößerung x 10, Kästchen oben links Vergrößerung x 5, Ratte 20, OVX + Diät-Gruppe.

3.8 Histomorphometrie

Im Rahmen der histomorphometrischen Analyse wurde der Trabekel- und Fettgehalt der histologischen Schnittpräparate durch eine quantitative Messung bestimmt. Hierfür wurden die Paraffinschnittpräparate des linken proximalen Femurs und des dritten Lumbalwirbelkörpers mit dem Fotomikroskop Axioplan 2 Imaging (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) lichtmikroskopisch ab fotografiert. Zuvor wurde jedoch sowohl eine Schwarz-, als auch eine Weißreferenz von dem Softwareprogramm ermittelt und eingezogen. Bei dem Femur wurde eine 2,5-fache Vergrößerung als Objektiv gewählt, beim Lendenwirbelkörper konnte aufgrund der geringeren Größe eine 5-fache Vergrößerung genutzt werden. Bevor mit der Histomorphometrie begonnen werden konnte, wurden die digitalen Bilder entweder automatisch oder auch manuell

mit dem Programm Adobe Photoshop CS3 Extended 10.0 (Adobe Systems GmbH, München) zusammengesetzt. Nachdem die vollständigen Bilder in die Software eingespeist wurden, konnte mit der Analyse begonnen werden. Benutzt wurde die hochauflösende Digitalkamera DC500 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim), die Mikroskopsoftware AxioVision (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) und das Bildverwaltungssystem Leica Image Manager (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim). Analysiert wurden die Präparate mit der Image-Pro® Plus Software (WEISS IMAGING AND SOLUTIONS GmbH, Bergkirchen / Günding).

Zunächst wurde die zu messende Fläche (Area of interest = AOI) festgelegt, indem folgende Kriterien sowohl beim Femur als auch beim Wirbelkörper beachtet wurden: Vermessen wurde lediglich der spongiöse Anteil des Knochens, die Kortikalis, mögliche Artefakte und die Epiphysenfuge wurden aus der AOI ausgeschlossen (Abb. 15 a).

Bei dem Femur wurde ein Bereich aus der proximalen Metaphysenregion ausgewählt, wobei auch hier knorpelige Anteile und der Femurkopf keine Beachtung fanden. Vom Wirbelkörper wurde der Arcus vertebrae ausgespart und die AOI wurde im Bereich des Corpus vertebrae definiert (Abb. 15 c). Im Messbereich wurden dann manuell die Trabekel und die aus dem Präparat herausgelösten Fettzellen, als Vakuolen sichtbar, umrandet und die markierte Fläche wurde in mm² ausgemessen (Abb. 15 b und Abb. 15 d).

Zur histomorphometrischen Analyse konnten aufgrund mangelnder Qualität nicht alle Präparate herangezogen werden, da die Paraffinschnitte teilweise gerissen oder unvollständig auf dem Objektträger abgebildet waren und somit die messbare Fläche zu klein geworden wäre. Aus der Kontroll-Gruppe (Tötung im Alter von 18 Wochen) wurden daher sechs Femora und acht Wirbelkörper gemessen. Aus der Sham-Gruppe (Alter zum Zeitpunkt der Euthanasie 26 Wochen) konnten fünf Femora und neun Wirbelkörper gemessen werden. Die OVX + Diät-Gruppe ergab jeweils sechs messbare Femora und Wirbelkörper und von der OVX + Steroid-Gruppe konnten sieben Femora und acht Wirbelkörper ausgewertet werden. Einen Überblick über die Anzahl der gemessenen Schnittpräparate gibt Tab. 6.

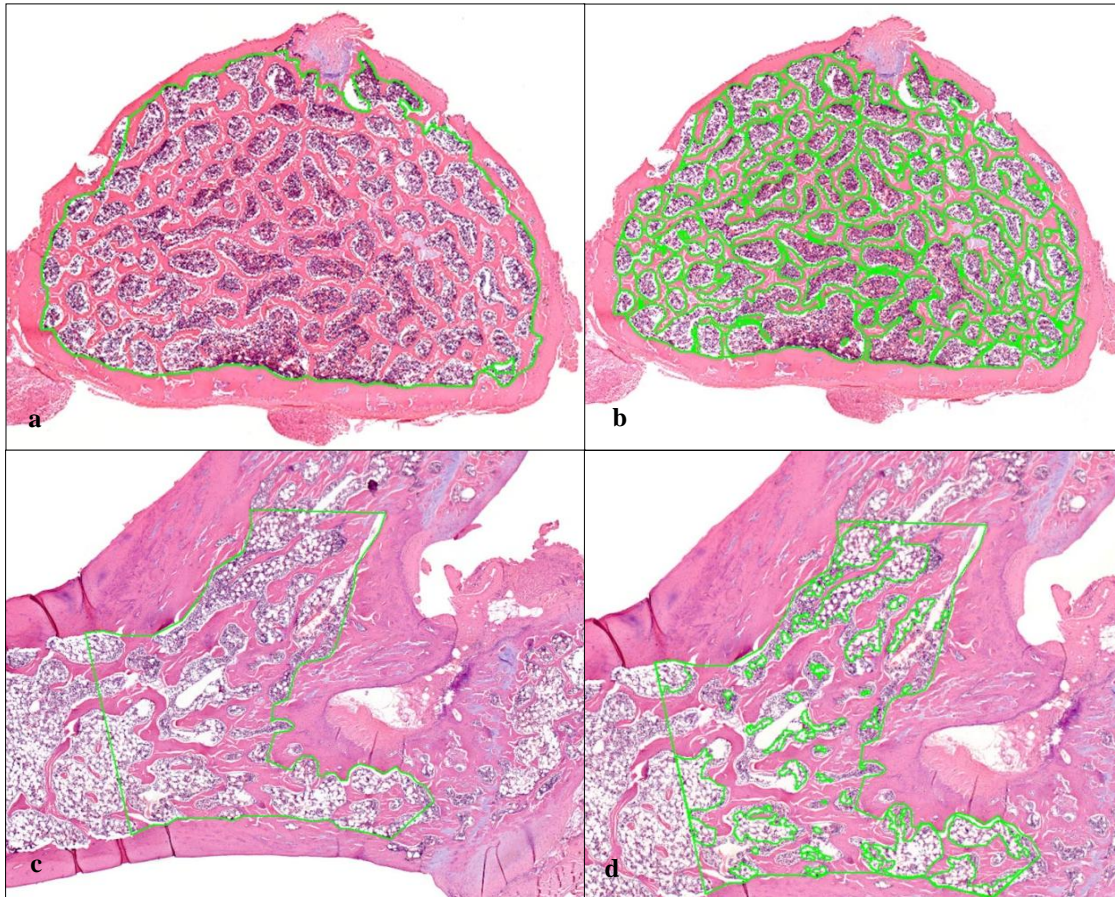


Abbildung 15 a-d: Histomorphometrische Messung in der entsprechenden AOI, H.E. a) LWK 3, Vergrößerung x 5, Ratte 20, OVX + Diät-Gruppe, grün umrandet: AOI. b) LWK 3, Vergrößerung x 5, Ratte 20, OVX + Diät-Gruppe, grün umrandet: AOI und Trabekel. c) Linkes Femur, Vergrößerung x 2,5, Ratte 13, OVX + Steroid-Gruppe, grün umrandet: AOI. d) Linkes Femur, Vergrößerung x 2,5, Ratte 13, OVX + Steroid-Gruppe, grün umrandet: AOI und markierte Fettvakuolen.

Gruppe	Anzahl der Tiere bei Euthanasie	Anzahl der gemessenen Schnitte des Femurs	Anzahl der gemessenen Schnitte des Wirbelkörpers
Kontrolle	10	6	8
Sham	9	5	9
OVX + Diät	8	6	6
OVX + Steroid	9	7	8

Tabelle 6: Übersicht über die Tieranzahl bei Euthanasie und die Anzahl der gemessenen Schnittpräparate des linken Femur und dritten Lendenwirbelkörpers.

3.9 Statistik

Die statistische Analyse der erhobenen Datensätze der Dual X-ray Absorptiometry und der Histomorphometrie wurde mit Hilfe der Statistik-Software SPSS (IBM SPSS Statistik Software 20; IBM Deutschland GmbH, Ehningen) vorgenommen. Bei der statistischen Analyse der DXA-Daten wurden zum einen alle drei Versuchsgruppen zu einem Zeitpunkt, also unabhängig voneinander ausgewertet und zum anderen eine Gruppe über mehrere Zeitpunkte verglichen, also abhängig voneinander. Bei den histomorphometrischen Daten wurden die Versuchsgruppen unabhängig voneinander untersucht. Als statistisches Mittel wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) gewählt. In dieser experimentellen Untersuchung stellt die unterschiedliche Behandlung der Versuchstiere die unabhängige Variable dar.

Die Voraussetzungen für eine ANOVA-Analyse wurden erfüllt, da die Versuchsgruppen per Losverfahren eingeteilt wurden und sowohl eine Normalverteilung als auch Varianzhomogenität vorlag.

Als Posthoc-Analyse wurde der Tukey-Test angewendet, um signifikante Unterschiede der einzelnen Behandlungsverfahren aufzudecken.

4 Ergebnisse

4.1 Körpergewicht

Zum Zeitpunkt der Ovariectomie ist das Körpergewicht aller drei Gruppen sehr homogen und liegt zwischen 271,4 +/- 14,5g und 279,3 +/- 8,4g (Abb. 16 a).

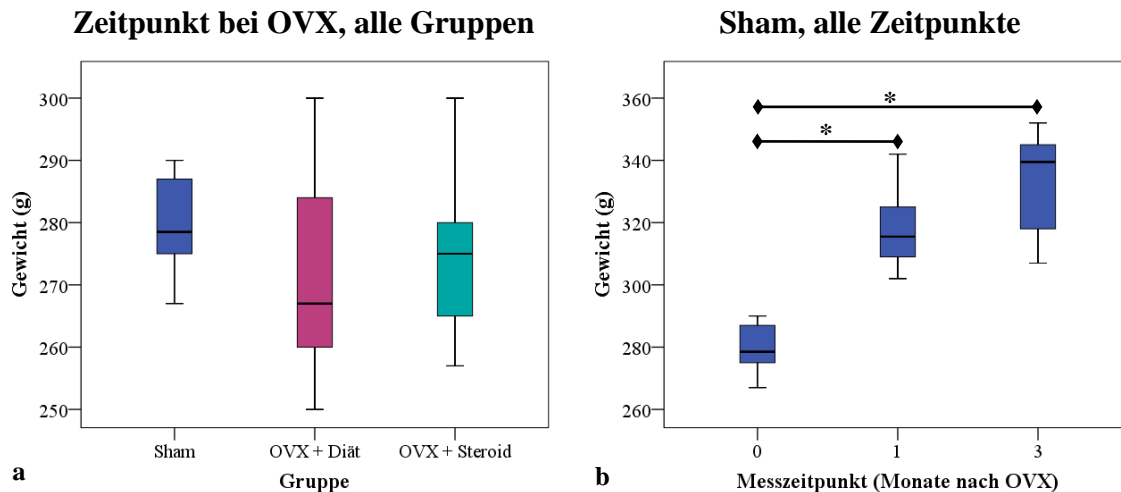


Abbildung 16 a-b: a) Übersicht des Gewichtes der drei Gruppen im Vergleich zum Zeitpunkt der Ovariectomie. b) Gewichtsverlauf der Sham-Gruppe. Diese zeigt im Verlauf von drei Monaten eine kontinuierliche Steigerung des Körpergewichtes im Vergleich zum Zeitpunkt der OVX mit $p < 0,001$. Im Vergleich des Ausgangswertes mit dem Körpergewicht nach vier Wochen ist eine Steigerung um 38,9g zu verzeichnen mit $p < 0,01$.

Alle drei Gruppen zeigen einen progredienten Anstieg des Gewichts über die drei Messzeitpunkte (Tab. 7-9).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	279,3	8,4	267	290
Nach einem Monat	318,2	14,6	302	342
Nach drei Monaten	333,5	17,4	307	352

Tabelle 7: Gewicht (g) der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.

Die Sham-Gruppe zeigt im Vergleich des ersten zum zweiten Messzeitpunkt eine Steigerung des Gewichts von 279,3 +/- 8,4g auf 318,2 +/- 14,6g, dies entspricht 13,9% ($p < 0,01$). Vergleicht man den zweiten mit dem dritten Messzeitpunkt, so ist eine Steigerung um 4,8% auf 333,5 +/- 17,4g zu verzeichnen. Diese Zunahme des

Körpergewichtes ist allerdings nicht statistisch signifikant ($p= 0,172$). Der Mittelwert des Gewichts der Sham-Gruppe zum Zeitpunkt der Ovariectomie steigt nach drei Monaten statistisch signifikant von $279,3 \pm 8,4\text{g}$ auf $333,5 \pm 17,4\text{g}$ an ($p < 0,001$; Abb. 16 b).

Die OVX + Diät-Gruppe zeigt beim Vergleich des ersten mit dem zweiten Messzeitpunkt eine Erhöhung des Gewichtes um 25,4% von $271,4 \pm 14,5\text{g}$ auf einen Wert von $340,2 \pm 20,8\text{g}$ mit $p < 0,001$ (Tab. 8).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	271,4	14,5	250	300
Nach einem Monat	340,2	20,8	314	394
Nach drei Monaten	361,3	22,0	327	407

Tabelle 8: Gewicht (g) der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.

Das Körpergewicht dieser Gruppe steigt vom zweiten zum dritten Messzeitpunkt um 6,2% auf einen Wert von $361,3 \pm 22\text{g}$ mit einer Signifikanz von $p < 0,01$ an. Nach drei Monaten nimmt das Körpergewicht verglichen mit dem Zeitpunkt der Ovariectomie um 33,1% zu ($p < 0,001$; Abb. 17 a).

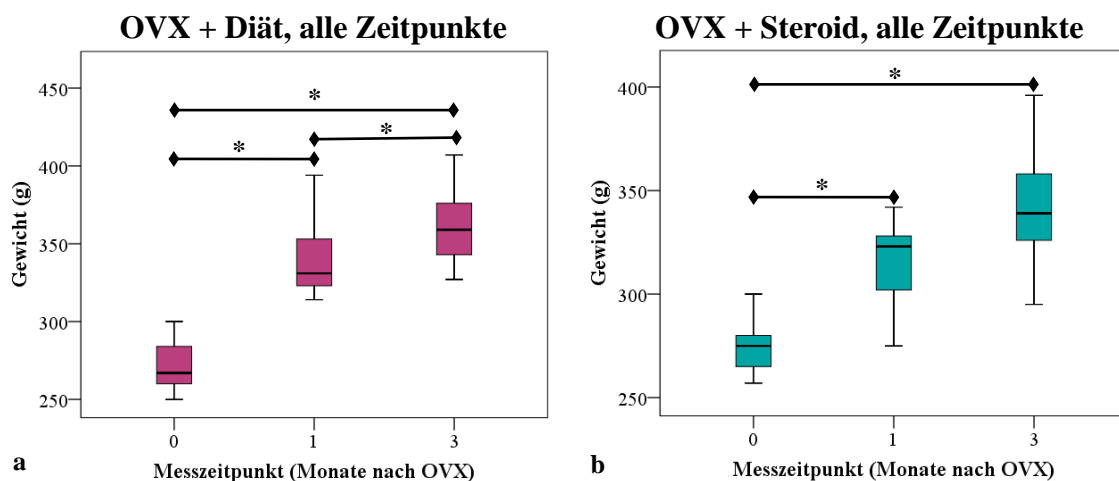


Abbildung 17 a-b: a) Gewicht der OVX + Diät-Gruppe im Verlauf der Zeitpunkte. b) Gewichtsverlauf der OVX + Steroidgruppe. Das Gewicht der OVX + Steroid-Gruppe zeigt im Zeitverlauf einen Anstieg über alle Messzeitpunkte.

Die OVX + Steroid-Gruppe startet mit einem Körpergewicht von 274,6 +/- 13,6g und nimmt einen Monat nach der Ovariectomie um 14,6% zu, auf einen Wert von 314,7 +/- 23,1g mit $p < 0,01$ (Tab. 9). Weitere zwei Monate später hat diese Gruppe ein Körpergewicht von 341,7 +/- 31,7g und somit um 27g zugenommen. Diese Steigerung des Körpergewichtes ist nicht statistisch signifikant ($p = 0,062$). Im Vergleich des Ausgangswertes mit dem Körpergewicht nach drei Monaten, hat sich das Gewicht um 24,4% auf 341,7 +/- 31,7g gesteigert mit $p < 0,001$ (Abb. 17 b).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	274,6	13,6	257	300
Nach einem Monat	314,7	23,1	275	342
Nach drei Monaten	341,7	31,7	295	396

Tabelle 9: Gewicht (g) der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.

Zeitpunkt nach drei Monaten, alle Gruppen

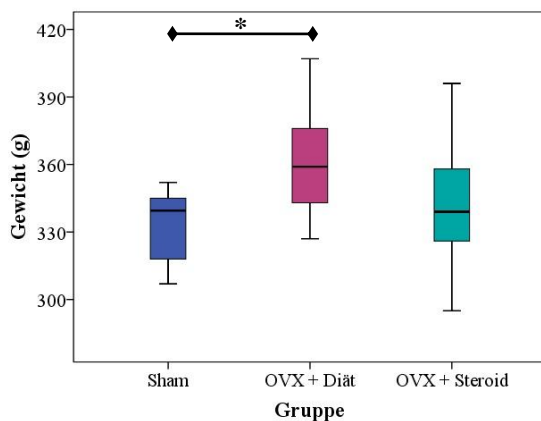


Abbildung 18: Gewicht aller Gruppen nach drei Monaten. Lediglich die OVX + Diät-Gruppe unterscheidet sich signifikant ($p < 0,05$) von der Sham-Gruppe.

Im Vergleich der Gruppen untereinander besteht beim Messzeitpunkt nach einem Monat ein signifikanter Unterschied zwischen der OVX + Diät-Gruppe und der OVX + Steroid-Gruppe mit $p < 0,05$, wobei das Gewicht der OVX + Steroid-Gruppe mit 314,7 +/- 23,1g gegenüber dem der OVX + Diät-Gruppe mit 340,2 +/- 20,8g geringer ist (Tab. 8 und 9).

Nach drei Monaten unterscheidet sich die Sham-Gruppe mit einem Gewicht von 333,5 +/- 17,4g signifikant von der OVX + Diät-Gruppe mit 361,3 +/- 22g ($p < 0,05$; Abb. 18).

4.2 Dual X-ray Absorptiometry

4.2.1 Knochendichte (Bone Mineral Density)

Tibia

Die Knochendichte der Ratten im Bereich der Tibiae ist zum Zeitpunkt der Ovariectomie für alle Gruppen sehr homogen (Abb. 19 a).

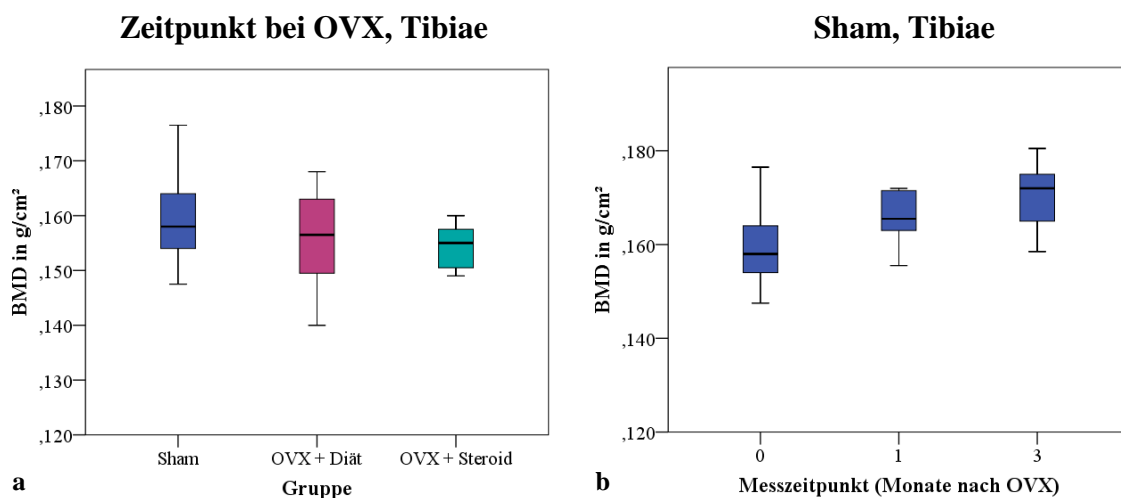


Abbildung 19 a-b: a) Knochendichte aller drei Untersuchungsgruppen im Bereich der Tibiae zum Zeitpunkt der Ovariectomie. b) Knochendichte der Sham-Gruppe im Zeitverlauf über alle Messzeitpunkte.

Der Mittelwert der Knochendichte der Sham-Gruppe beträgt $0,16 \pm 0,01 \text{ g/cm}^2$, der OVX + Diät-Gruppe $0,156 \pm 0,008 \text{ g/cm}^2$ und der OVX + Steroid-Gruppe $0,154 \pm 0,004 \text{ g/cm}^2$ (Tab. 10 - 12).

Die Sham-Gruppe zeigt nach drei Monaten zwar eine positive Tendenz des BMD in diesem Messbereich und steigt von $0,16 \pm 0,01 \text{ g/cm}^2$ auf $0,17 \pm 0,008 \text{ g/cm}^2$. Dieser Anstieg ist aber nicht statistisch relevant (Abb. 19 b, Tab. 10).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	0,160	0,010	0,148	0,177
Nach einem Monat	0,166	0,006	0,156	0,172
Nach drei Monaten	0,170	0,008	0,159	0,181

Tabelle 10: BMD (g/cm²) der Tibiae der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.

Bei der OVX + Diät-Gruppe kann nach einem Monat ein Abfall des BMD von $0,156 \pm 0,008 \text{ g/cm}^2$ auf $0,136 \pm 0,006 \text{ g/cm}^2$, somit um 12,82% beobachtet werden ($p < 0,001$, Tab. 11). Zwischen dem zweiten und dritten Messzeitpunkt sinkt die Knochendichte der OVX + Diät-Gruppe von $0,136 \pm 0,006 \text{ g/cm}^2$ auf $0,131 \pm 0,008 \text{ g/cm}^2$, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,056$). Nach drei Monaten sinkt die Knochendichte von $0,156 \pm 0,008 \text{ g/cm}^2$ um 16,03% auf $0,131 \pm 0,008 \text{ g/cm}^2$ ($p < 0,001$; Abb. 20 a; Tab. 11).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	0,156	0,008	0,140	0,168
Nach einem Monat	0,136	0,006	0,125	0,149
Nach drei Monaten	0,131	0,008	0,118	0,146

Tabelle 11: BMD (g/cm^2) der Tibiae der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.

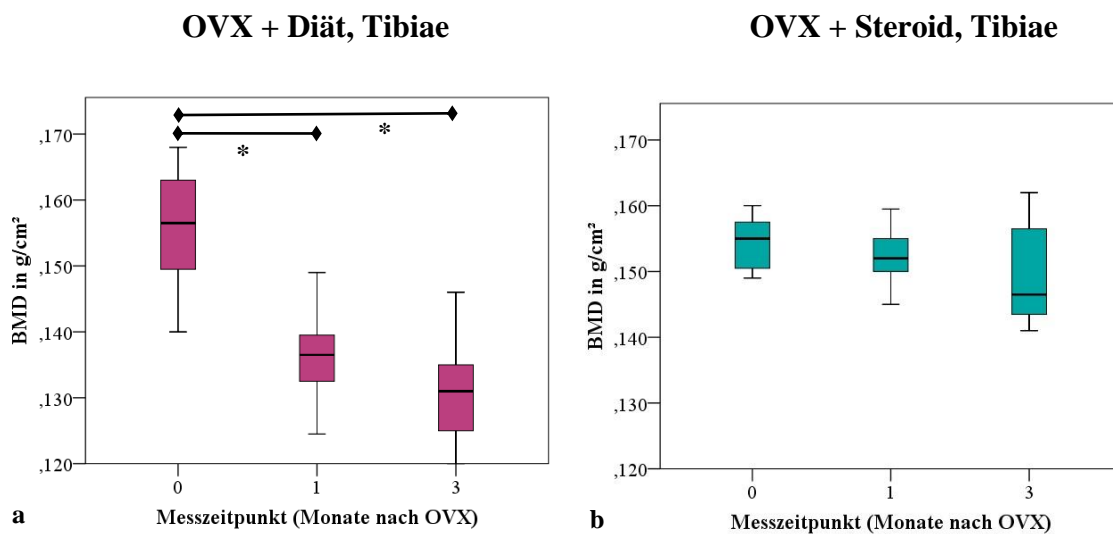


Abbildung 20 a-b: a) Knochendichte der OVX + Diät-Gruppe über alle Messzeitpunkte hinweg. Diese Gruppe zeigt einen signifikanten Abfall der Knochendichte nach einem Monat und auch drei Monate später ($p < 0,001$). b) Knochendichte der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf über alle Messzeitpunkte. Hier kann keine signifikanten Änderungen der Knochendichte gesehen werden.

Die BMD-Werte der OVX + Steroid-Gruppe bleiben über den gesamten Messzeitraum nahezu konstant (Abb. 20 b und Tab. 12). Der Ausgangswert für die Knochendichte

beträgt $0,154 \pm 0,004 \text{g/cm}^2$. Dieser fällt nach einem Monat auf $0,152 \pm 0,005 \text{g/cm}^2$ ab ($p=0,781$) und beträgt nach drei Monaten $0,15 \pm 0,008 \text{g/cm}^2$ ($p=0,333$).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	0,154	0,004	0,149	0,160
Nach einem Monat	0,152	0,005	0,145	0,160
Nach drei Monaten	0,150	0,008	0,141	0,162

Tabelle 12: BMD (g/cm^2) der Tibiae der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.

Im Vergleich der Gruppen untereinander fällt beim Messzeitpunkt t_1 auf, dass die Knochendichte der OVX + Diät-Gruppe mit $0,136 \pm 0,006 \text{g/cm}^2$ signifikant kleiner ist ($p < 0,001$) als die Knochendichte der Sham-Gruppe mit $0,166 \pm 0,006 \text{g/cm}^2$ (Abb. 21 a). Die Knochendichte der OVX + Steroid-Gruppe ist mit $0,152 \pm 0,005 \text{g/cm}^2$ bei diesem Zeitpunkt ebenfalls kleiner als die der Sham-Gruppe ($p < 0,001$), allerdings höher als die der OVX + Diät-Gruppe ($p < 0,001$).

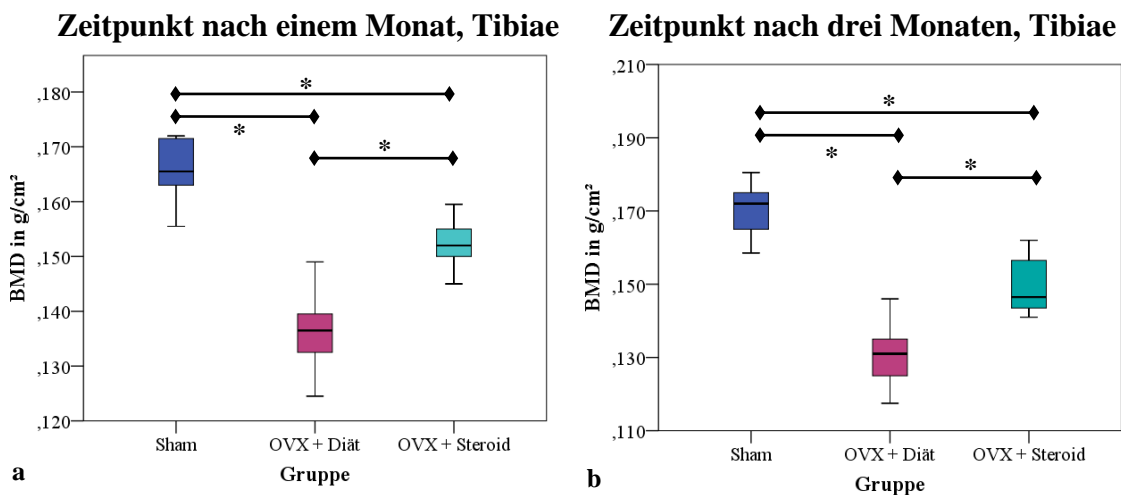


Abbildung 21 a-b: Knochendichte aller Gruppen einen und drei Monate nach Ovariectomie. a) Die Knochendichte der OVX + Diät-Gruppe nimmt im Vergleich zur Sham-Gruppe mit $p < 0,001$ um 18,07% ab, die der OVX + Steroid-Gruppe um 8,43% ($p < 0,001$). b) Die OVX + Diät-Gruppe weist hier ebenfalls die geringste Knochendichte auf mit $p < 0,001$. Die Werte der OVX + Steroid-Gruppe liegen zwischen denen der Sham-Gruppe und der OVX + Diät-Gruppe ($p < 0,001$).

Bei der dritten Knochendichtemessung liegt der Wert der OVX + Diät-Gruppe mit $0,131 \text{g/cm}^2$ wieder am niedrigsten (Tab. 11). Im Unterschied zu der Sham-Gruppe, die einen BMD von $0,17 \pm 0,008 \text{g/cm}^2$ aufweist, liegen sowohl die Werte der OVX +

Diät-Gruppe als auch die Werte der OVX + Steroid-Gruppe mit $0,15 \pm 0,008 \text{g/cm}^2$ niedriger ($p < 0,001$). Die OVX + Diät-Gruppe hat zu diesem Zeitpunkt eine um 22,94% geringere Knochendichte als die Sham-Gruppe. Auch unterscheiden sich die OVX + Diät- und die OVX + Steroid-Gruppe mit einer Signifikanz von $p < 0,001$, wobei die Knochendichte der OVX + Steroid-Gruppe mit $0,15 \text{g/cm}^2$ die Größere ist (Abb. 21 b).

Femur

Auch der BMD beider Femora ist in allen Gruppen zum Zeitpunkt t_0 etwa gleich hoch und liegt zwischen $0,185 \pm 0,006 \text{g/cm}^2$ in der OVX + Steroid-Gruppe und $0,190 \pm 0,006 \text{g/cm}^2$ in der Sham-Gruppe. Die Knochendichte der Femora ist bei allen Gruppen größer als die der Tibiae (Abb. 22 a).

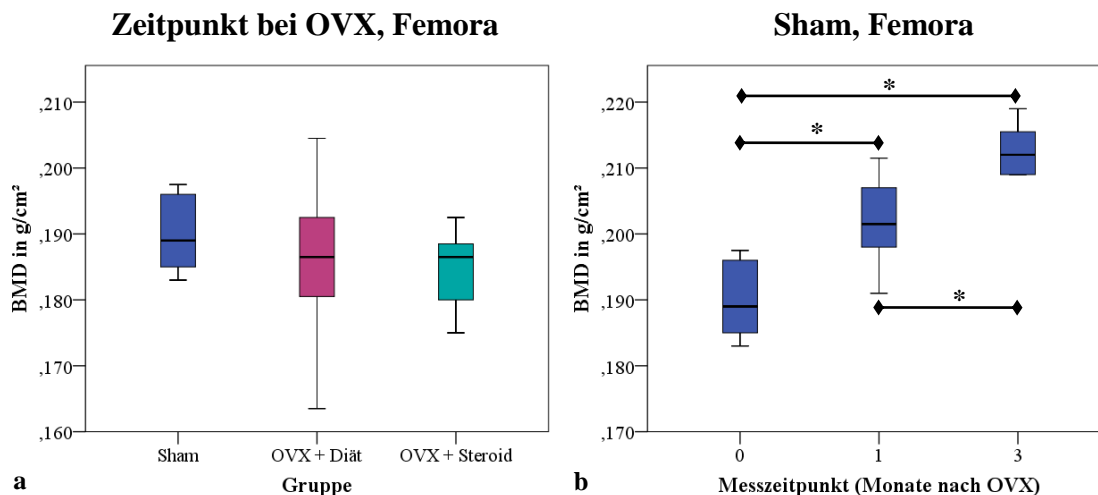


Abbildung 22 a-b: BMD der Femora aller Gruppen bei OVX und der Sham-Gruppe im Zeitverlauf. a) Die Knochendichte ist in allen drei Gruppen relativ gleich verteilt. b) Die Knochendichte der Sham-Gruppe steigt über alle Messzeitpunkte hinweg signifikant an ($p < 0,05$).

Im Bereich der Femora zeigt die Sham-Gruppe einen signifikanten Anstieg des BMD im Vergleich des Zeitpunktes der OVX mit den Messwerten von t_1 ($p < 0,01$) und t_2 ($p < 0,001$). Die genauen Werte und eine Übersicht zeigen die Tab. 13 und Abb. 22 b.

Die Knochendichte der OVX + Diät-Gruppe sinkt nach einem Monat Behandlung von $0,186 \pm 0,01 \text{g/cm}^2$ auf $0,168 \pm 0,01 \text{g/cm}^2$ ($p < 0,001$). Nach drei Monaten beträgt der BMD $0,165 \pm 0,01 \text{g/cm}^2$ und ist bezogen auf den Zeitpunkt der Ovariectomie statistisch signifikant gefallen ($p < 0,001$; Abb. 23 a; Tab. 14).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	0,190	0,006	0,183	0,198
Nach einem Monat	0,202	0,007	0,191	0,212
Nach drei Monaten	0,213	0,004	0,209	0,219

Tabelle 13: BMD (g/cm²) der Femora der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.

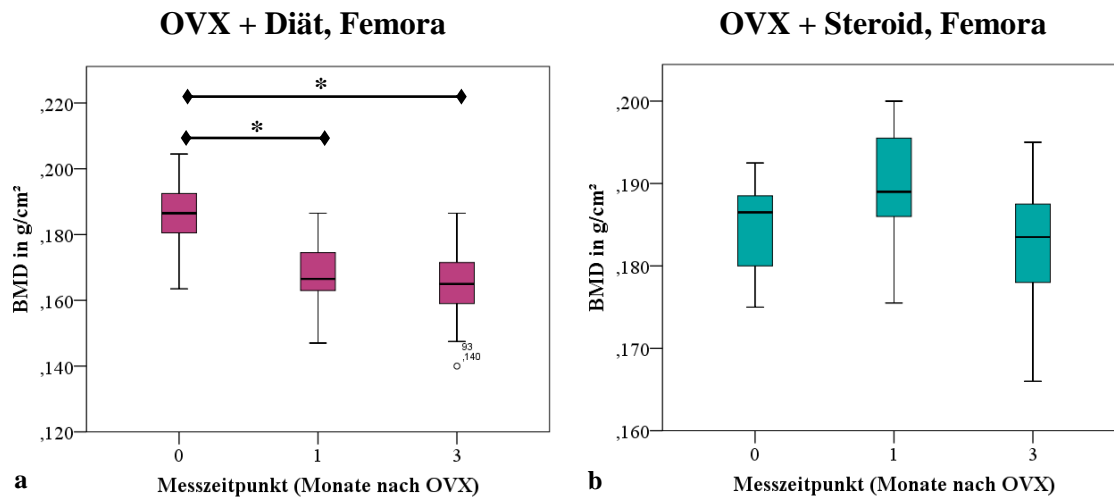


Abbildung 23 a-b: BMD der Femora der OVX + Diät- und der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf. a) Nach einem und auch nach drei Monaten ist ein Abfall der Knochendichte im Bereich beider Femora zu erkennen $p < 0,001$. b) Die Knochendichte der OVX + Steroid-Gruppe verändert sich nur minimal, aber ohne statistische Signifikanz ($p = 0,859$).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	0,186	0,010	0,164	0,205
Nach einem Monat	0,168	0,010	0,147	0,187
Nach drei Monaten	0,165	0,010	0,140	0,187

Tabelle 14: BMD (g/cm²) der Femora der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.

Die Knochendichte der Femora der OVX + Steroid-Gruppe steigt nach einem Monat Behandlungszeit minimal von $0,185 \pm 0,006 \text{ g/cm}^2$ auf $0,19 \pm 0,008 \text{ g/cm}^2$ an, um dann nach drei Monaten wieder minimal abzufallen auf $0,183 \pm 0,009 \text{ g/cm}^2$. Diese Veränderungen sind aber nicht statistisch signifikant (Tab. 15 und Abb. 23 b).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	0,185	0,006	0,175	0,193
Nach einem Monat	0,190	0,008	0,176	0,200
Nach drei Monaten	0,183	0,009	0,166	0,195

Tabelle 15: BMD (g/cm²) der Femora der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.

Im Vergleich der Gruppen ist beim Messzeitpunkt nach einem Monat ein signifikanter Unterschied zwischen der Sham- und der OVX + Diät-Gruppe, sowie zwischen OVX + Diät- und OVX + Steroid-Gruppe erkennbar ($p < 0,001$). Die Knochendichte der Sham-Gruppe beträgt $0,202 \pm 0,007 \text{ g/cm}^2$ und ist am höchsten, gefolgt von der OVX + Steroid-Gruppe mit $0,19 \pm 0,008 \text{ g/cm}^2$ und der OVX + Diät-Gruppe mit $0,168 \pm 0,01 \text{ g/cm}^2$ (Abb. 24 a).

Beim Messzeitpunkt nach drei Monaten bleibt diese Reihenfolge und die Unterschiede erhalten, jedoch ist die Knochendichte der OVX + Steroid-Gruppe mit $0,183 \pm 0,009 \text{ g/cm}^2$ im Vergleich zu dem BMD der Sham-Gruppe mit $0,231 \pm 0,004 \text{ g/cm}^2$ ebenfalls signifikant reduziert ($p < 0,001$; Abb. 24 b).

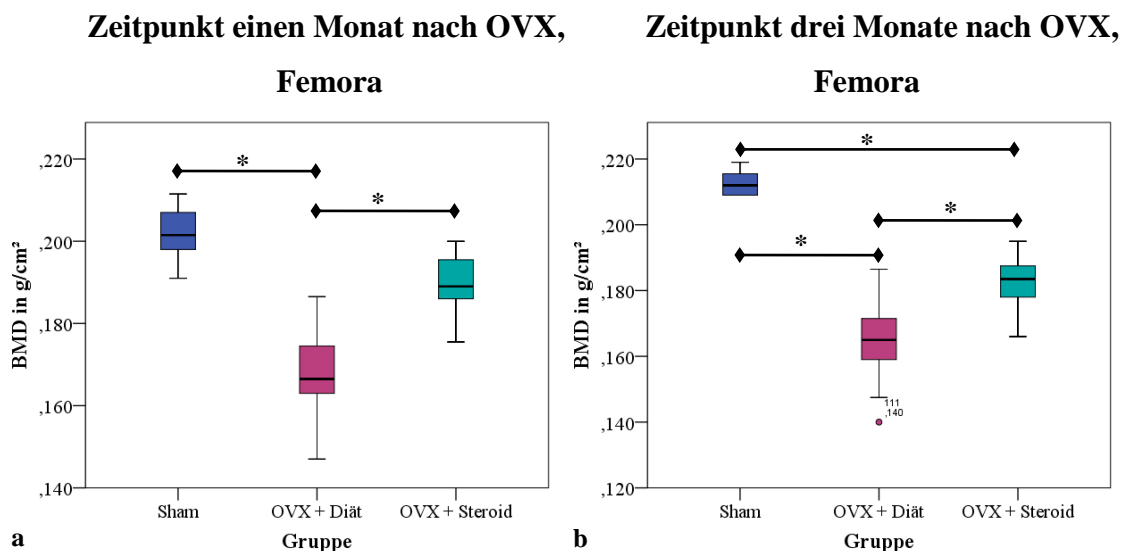


Abbildung 24 a-b: Knochendichte aller Gruppen einen und drei Monate nach Behandlungsbeginn.
a) Die OVX + Diät-Gruppe hat die geringste Knochendichte der drei behandelten Gruppen und unterscheidet sich signifikant mit $p < 0,001$ von den anderen beiden. b) Auch hier hat die OVX + Diät-Gruppe die geringste Knochendichte $p < 0,001$. Aber auch die OVX + Steroid-Gruppe nimmt in signifikantem Maße im Vergleich zur Sham-Gruppe an Knochendichte ab $p < 0,001$.

Becken

Auch beim Becken ist die Variation der Messwerte am Startpunkt des Beobachtungszeitraums zwischen den Gruppen gering.

Im diesem Bereich zeigt die Sham-Gruppe eine positive Tendenz der Knochendichte. Der Ausgangswert liegt bei $0,165 \pm 0,008 \text{g/cm}^2$ und steigt nach einem Monat auf $0,176 \pm 0,009 \text{g/cm}^2$ ($p < 0,05$) und nach drei Monaten auf $0,186 \pm 0,004 \text{g/cm}^2$ ($p < 0,05$; Abb. 25). Der Anstieg der Knochendichte vom ersten zum dritten Messzeitpunkt ist ebenfalls mit $p < 0,001$ statistisch signifikant (Tab. 16).

Vergleich der Gruppen im Bereich Becken

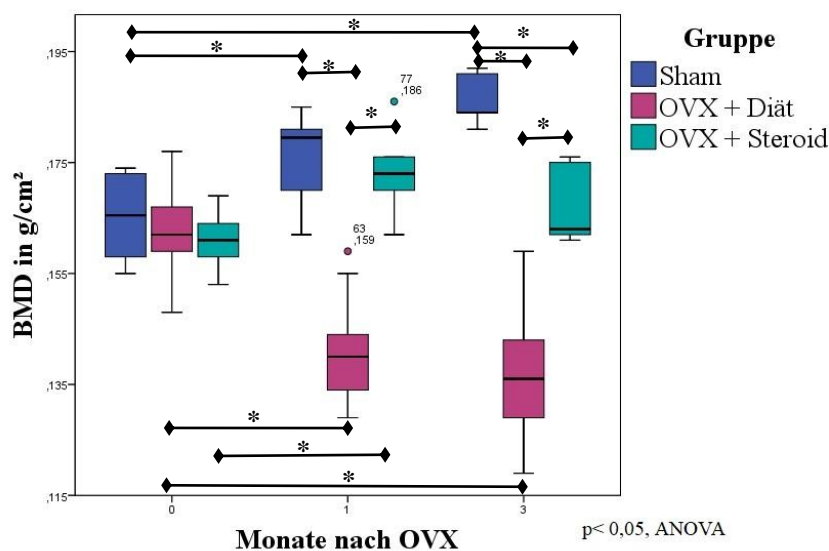


Abbildung 25: Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander bezogen auf die drei Messzeitpunkte und die ROI des Beckens. Die Knochendichte der OVX + Diät-Gruppe konnte nach einem und nach drei Monaten signifikant gesenkt werden ($p < 0,001$).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	0,165	0,008	0,155	0,174
Nach einem Monat	0,176	0,009	0,162	0,185
Nach drei Monaten	0,186	0,004	0,181	0,192

Tabelle 16: BMD (g/cm^2) des Beckens der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.

In der OVX + Diät-Gruppe ist auch im Bereich des Beckens ein signifikanter Abfall der Knochendichte vom ersten zum zweiten Messzeitpunkt zu verzeichnen ($p < 0,001$), der

BMD fällt von initial $0,162 \pm 0,007 \text{g/cm}^2$ auf $0,141 \pm 0,009 \text{g/cm}^2$ ab, wobei dieser Wert dann bei Betrachtung des dritten Messzeitpunktes mit $0,137 \pm 0,01 \text{g/cm}^2$ relativ konstant bleibt ($p = 0,203$; Abb. 25). Der Abfall des BMD vom ersten zum dritten Messzeitpunkt ist ebenfalls statistisch signifikant ($p < 0,001$; Tab. 17).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	0,162	0,007	0,148	0,177
Nach einem Monat	0,141	0,009	0,129	0,159
Nach drei Monaten	0,137	0,010	0,119	0,159

Tabelle 17: BMD (g/cm^2) des Beckens der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.

Die Knochendichte der OVX + Steroid-Gruppe steigt nach einem Monat in diesem Messbereich von $0,161 \pm 0,005 \text{g/cm}^2$ auf $0,173 \pm 0,007 \text{g/cm}^2$ an mit $p < 0,01$. Nach drei Monaten nähert sich der Wert allerdings wieder dem Ausgangswert und fällt auf $0,166 \pm 0,007 \text{g/cm}^2$ ab ($p = 0,18$ im Vergleich zum Zeitpunkt bei Ovariectomie; Abb. 25; Tab. 18).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	0,161	0,005	0,153	0,169
Nach einem Monat	0,173	0,007	0,162	0,186
Nach drei Monaten	0,166	0,007	0,161	0,176

Tabelle 18: BMD (g/cm^2) des Beckens der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.

Die Knochendichte der OVX + Diät-Gruppe ist nach einem Monat mit $0,141 \pm 0,009 \text{g/cm}^2$ im Vergleich zur Sham-Gruppe mit $0,176 \pm 0,009 \text{g/cm}^2$ signifikant vermindert ($p < 0,001$). Auch der BMD der OVX + Steroid-Gruppe ist bei diesem Messzeitpunkt mit $0,173 \pm 0,007 \text{g/cm}^2$ höher als der BMD der OVX + Diät-Gruppe ($p < 0,001$; Abb. 25).

Nach drei Monaten ist in allen Gruppen ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,001$ zu verzeichnen. Hier ist die Gruppe mit der höchsten Knochendichte die Sham-Gruppe mit

0,186 +/- 0,004g/cm², gefolgt von der OVX + Steroid-Gruppe mit 0,166 +/- 0,007g/cm² und der OVX + Diät-Gruppe mit 0,137 +/- 0,01g/cm².

Wirbelsäule

Zum Zeitpunkt der Ovariectomie ist die Knochendichte der Wirbelsäule aller drei Gruppen annähernd gleich groß (Sham-Gruppe: 0,15 +/- 0,007g/cm², OVX + Diät-Gruppe: 0,148 +/- 0,006g/cm² und OVX + Steroid-Gruppe: 0,147 +/- 0,004g/cm²).

Die Knochendichte der Sham-Gruppe steigt innerhalb eines Monats nach Behandlungsbeginn auf 0,156 +/- 0,009g/cm² an, zeigt aber erst nach drei Monaten einen signifikanten Anstieg des BMD auf 0,168 +/- 0,004 mit $p < 0,01$ (Tab. 19).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	0,150	0,007	0,141	0,161
Nach einem Monat	0,156	0,009	0,143	0,164
Nach drei Monaten	0,168	0,004	0,161	0,173

Tabelle 19: BMD (g/cm²) der Wirbelsäule der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.

Wie auch beim Becken, den Femora und den Tibiae wurde die Knochendichte der OVX + Diät-Gruppe nach einem Monat signifikant von 0,148 +/- 0,006g/cm² auf 0,127 +/- 0,008g/cm² gesenkt ($p < 0,001$) und blieb auch nach drei Monaten konstant auf diesem Niveau mit 0,125 +/- 0,004g/cm² (Tab. 20).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	0,148	0,006	0,139	0,166
Nach einem Monat	0,127	0,008	0,108	0,143
Nach drei Monaten	0,125	0,004	0,143	0,156

Tabelle 20: BMD (g/cm²) der Wirbelsäule der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.

Die Wirbelsäule ist der einzige Messbereich, in dem sich die Knochendichte der OVX + Steroid-Gruppe nach drei Monaten in relevantem Maße von 0,147 +/- 0,004g/cm² auf

0,144 +/- 0,006g/cm² vermindert hat (p< 0,05), nachdem sie nach einem Monat Beobachtungszeitraum zunächst auf 0,151 +/- 0,006g/cm² angestiegen war (Tab. 21).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	0,147	0,004	0,143	0,156
Nach einem Monat	0,151	0,006	0,145	0,162
Nach drei Monaten	0,144	0,006	0,137	0,154

Tabelle 21: BMD (g/cm²) der Wirbelsäule der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.

Nach einem Monat ist der BMD der OVX + Diät-Gruppe mit 0,127 +/- 0,008g/cm² im Vergleich zur Sham-Gruppe mit 0,156 +/- 0,009g/cm² signifikant gesunken (p< 0,001). Die OVX + Steroid-Gruppe unterscheidet sich mit einer Knochendichte von 0,151 +/- 0,006g/cm² zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant zur Sham-Gruppe, jedoch zur OVX + Diät-Gruppe (p< 0,001; Abb. 26).

Vergleich der Gruppen im Bereich Wirbelsäule

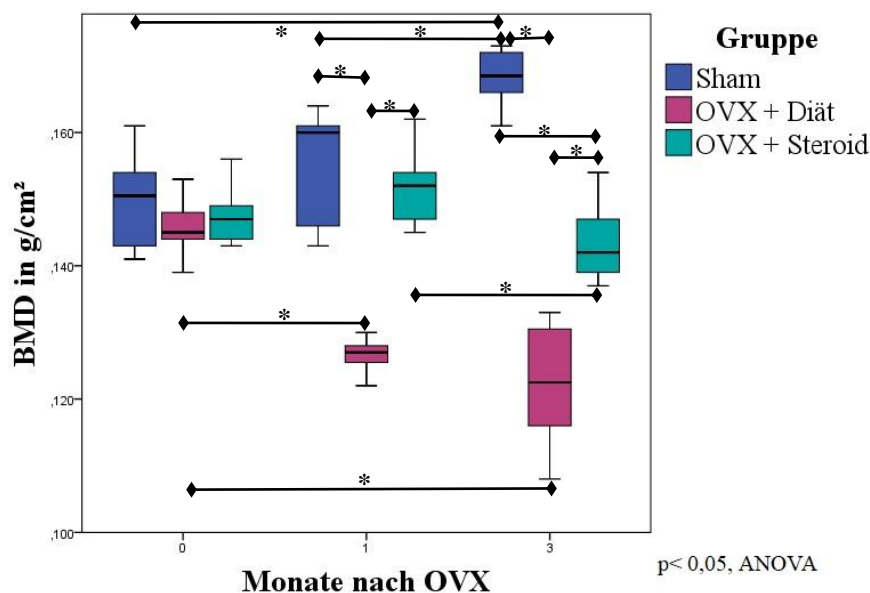


Abbildung 26: Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander bezogen auf die drei Messzeitpunkte und die ROI der Wirbelsäule. Die Behandlung mit Ovariectomie und Diätgabe senkt den BMD nach drei Monaten signifikant um 25,6% verglichen mit der Sham-Gruppe.

Nach drei Monaten ist der BMD der OVX + Diät-Gruppe mit $0,125 \pm 0,004 \text{g/cm}^2$ und der OVX + Steroidgruppe mit $0,144 \pm 0,006 \text{g/cm}^2$ signifikant geringer im Vergleich zur Knochendichte der Sham-Gruppe mit $0,168 \pm 0,004 \text{g/cm}^2$ ($p < 0,001$). Der BMD der OVX + Diät-Gruppe ist jedoch am niedrigsten und auch zum BMD der OVX + Steroid-Gruppe statistisch signifikant reduziert ($p < 0,001$; Abb. 26).

Gesamter Körper

Die Knochendichte des gesamten Körpers liegt zum Zeitpunkt der OVX in allen Gruppen auf einem äquivalenten Level zwischen $0,157 - 0,16 \text{g/cm}^2$ (Abb. 27 a). Der BMD beträgt in der Sham-Gruppe $0,16 \pm 0,005 \text{g/cm}^2$, in der OVX + Diät-Gruppe $0,158 \pm 0,006 \text{g/cm}^2$ und in der OVX + Steroid-Gruppe $0,157 \pm 0,003 \text{g/cm}^2$ (Tab. 22 - 24).

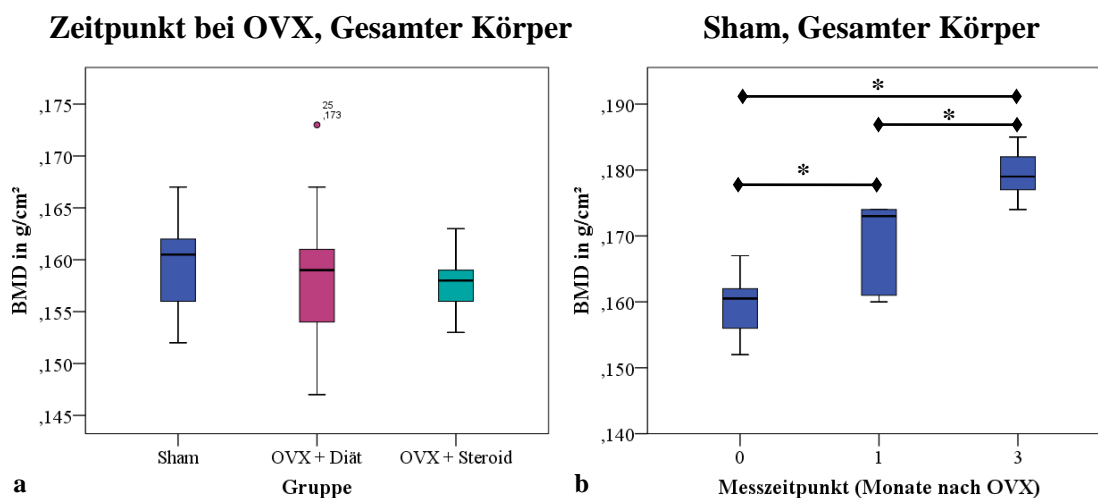


Abbildung 27 a-b: a) Knochendichte aller Gruppen zum Zeitpunkt der Ovariectomie. Die Ausgangswerte der Knochendichte sind relativ identisch. b) Knochendichte der Sham-Gruppe im Bereich des gesamten Körpers im Zeitverlauf. Diese Gruppe steigt kontinuierlich mit der Knochendichte an $p < 0,05$.

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	0,160	0,005	0,152	0,167
Nach einem Monat	0,170	0,007	0,160	0,174
Nach drei Monaten	0,180	0,004	0,174	0,185

Tabelle 22: BMD (g/cm^2) des gesamten Körpers der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.

Der BMD der Sham-Gruppe steigt nach einem Monat auf $0,17 \pm 0,007 \text{g/cm}^2$ ($p < 0,05$) und auch nach drei Monaten auf $0,18 \pm 0,004 \text{g/cm}^2$ an. Beide Veränderungen sind statistisch signifikant ($p < 0,001$; Tab. 22 und Abb. 27 b).

Auch in diesem Messbereich kann eine relevante Knochendichtereduktion der OVX + Diät-Gruppe nach einem Monat auf $0,144 \pm 0,005 \text{g/cm}^2$ beobachtet werden ($p < 0,001$). Nach drei Monaten ist der Wert jedoch unverändert verglichen mit dem Zeitpunkt nach einem Monat. Beide Zeitpunkte sind im Vergleich zum Ausgangswert statistisch signifikant ($p < 0,001$; Tab. 23 und Abb. 28 a).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	0,158	0,006	0,147	0,173
Nach einem Monat	0,144	0,005	0,136	0,155
Nach drei Monaten	0,144	0,007	0,131	0,158

Tabelle 23: BMD (g/cm^2) des gesamten Körpers der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.

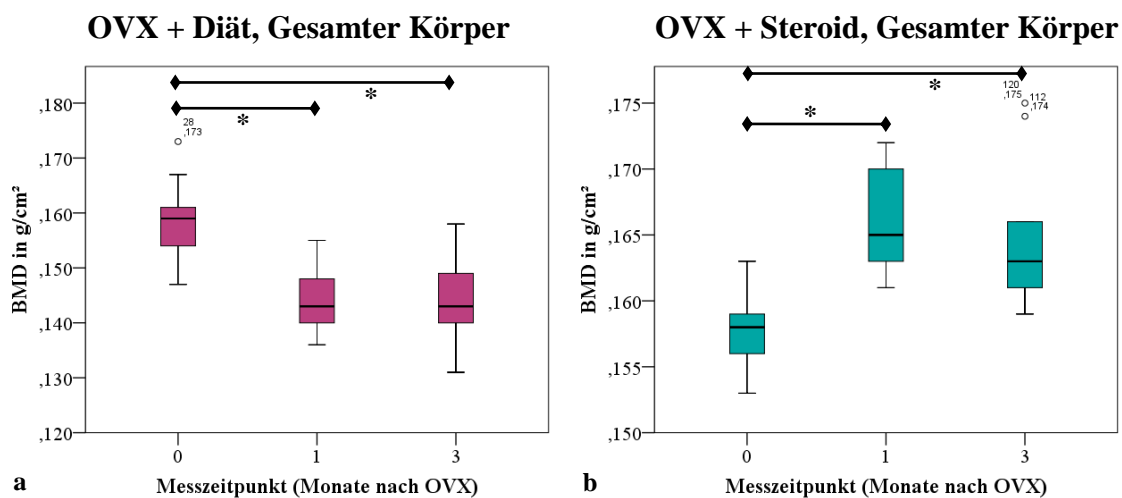


Abbildung 28 a-b: Knochendichte der OVX + Diät- und der OVX + Steroid-Gruppe im Bereich des gesamten Körpers im Zeitverlauf über drei Monate. a) Nach einem Monat Behandlungsdauer fällt der BMD signifikant ab und bleibt dann auf einem konstanten Niveau $p < 0,001$. b) Der BMD steigt nach einem Monat Behandlungszeit signifikant an, um dann im weiteren Verlauf wieder an Stärke zu verlieren ($p < 0,01$).

Die Tiere der OVX + Steroid-Gruppe zeigen nach einem Monat Behandlungsdauer einen Anstieg der Knochendichte von $0,157 \pm 0,003 \text{g/cm}^2$ auf $0,166 \pm 0,004 \text{g/cm}^2$

($p < 0,01$), um dann nach weiteren zwei Monaten auf einen BMD von $0,165 \pm 0,006 \text{ g/cm}^2$ abzufallen ($p = 0,801$). Der Anstieg des BMD ist im Vergleich zum Zeitpunkt der Ovariectomie statistisch signifikant ($p < 0,01$; Tab. 24 und Abb. 28 b).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	0,157	0,003	0,153	0,163
Nach einem Monat	0,166	0,004	0,161	0,172
Nach drei Monaten	0,165	0,006	0,159	0,175

Tabelle 24: BMD (g/cm^2) des gesamten Körpers der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.

Ein Monat nach Behandlungsbeginn unterscheidet sich der BMD der OVX + Diät-Gruppe mit $0,144 \pm 0,005 \text{ g/cm}^2$ signifikant von den beiden anderen Gruppen. Die Sham-Gruppe weist einen BMD von $0,170 \pm 0,007 \text{ g/cm}^2$, die OVX + Steroid-Gruppe von $0,166 \pm 0,004 \text{ g/cm}^2$ ($p < 0,001$) auf (Abb. 29 a).

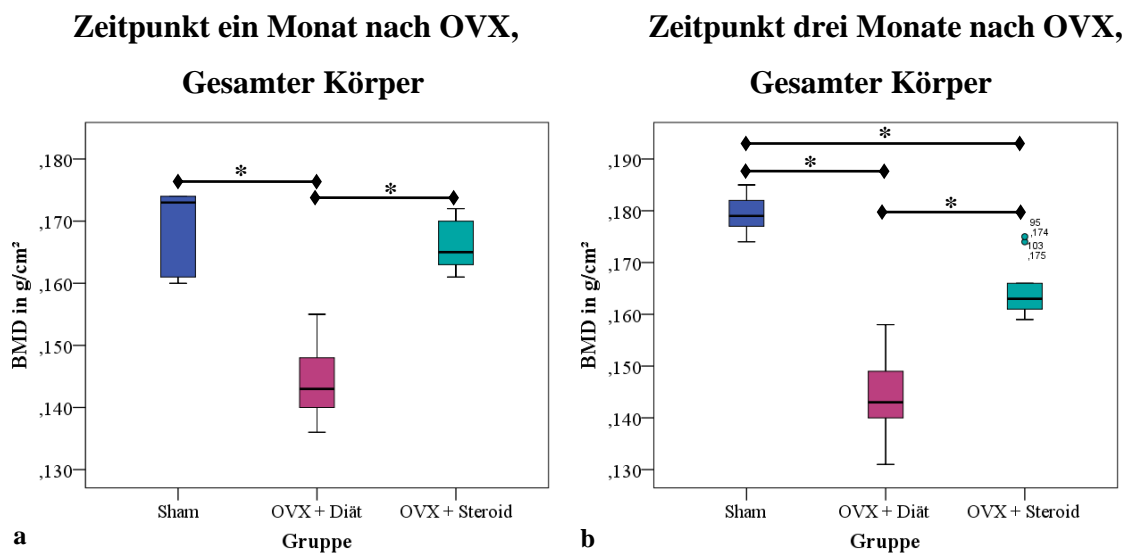


Abbildung 29 a-b: Knochendichte des gesamten Körpers nach einem und drei Monaten Behandlungsdauer. a) Die OVX + Steroid-Gruppe unterscheidet sich nach einem Monat kaum von der Sham-Gruppe. Alleine die OVX + Diät-Gruppe zeigt einen signifikanten Abfall der Knochendichte ($p < 0,001$). b) Drei Monate nach Behandlungsbeginn sind sowohl die Knochendichte der OVX + Diät-Gruppe, als auch der OVX + Steroid-Gruppe signifikant gesunken, wobei die OVX + Steroid-Gruppe noch den höheren Knochendichtegehalt aufweist ($p < 0,01$).

Zwei Monate später beträgt der BMD der Sham-Gruppe $0,18 \pm 0,004 \text{g/cm}^2$. Beide anderen Gruppen unterscheiden sich davon signifikant. Der BMD der OVX + Diät-Gruppe bleibt konstant bei $0,144 \pm 0,007 \text{g/cm}^2$ ($p < 0,001$), der BMD der OVX + Steroid-Gruppe fällt weiter ab auf $0,165 \pm 0,006 \text{g/cm}^2$ ($p < 0,01$). Die OVX + Diät-Gruppe weist gegenüber der OVX + Steroid-Gruppe einen um $0,021 \text{g/cm}^2$ niedrigeren BMD und somit den niedrigsten aller drei Gruppen auf ($p < 0,001$; Abb. 29 b).

4.2.2 Prozentualer Fettgehalt

Bei der Dual X-ray Absorptiometry (DXA) besteht die Möglichkeit eine Zusammensetzungsanalyse durchzuführen, bei der verschiedene Gewebeparameter bestimmt werden können. Darunter fällt auch der Parameter Fett als Prozentwert des gesamten Gewebes und als Prozentwert des jeweiligen Bereiches. Im Folgenden sind die Ergebnisse des prozentualen Fettgehalts der einzelnen Messbereiche (ROIs) aufgeführt.

Tibiae

Der prozentuale Fettgehalt des Gewebes im Bereich der Tibia beidseits ist zum Zeitpunkt der Ovariectomie in allen drei Gruppen gleich hoch und liegt zwischen 15,13% und 15,63% (Abb. 30 a).

Die Sham-Gruppe weist nach einem Monat Behandlungszeitraum einen um 6,31% erhöhten prozentualen Fettanteil des Messbereiches Tibia auf ($p < 0,05$). Weitere zwei Monate später sinkt der prozentuale Fettanteil allerdings wieder um 11,11% ab auf einen Wert von $10,33 \pm 2,72\%$ mit $p < 0,001$ (Tab. 25 und Abb. 30 b).

Die OVX + Diät-Gruppe zeigt über den gesamten Messzeitraum einen relativ konstanten prozentualen Fettanteil, der im Bereich von $15,1 \pm 4,6\%$ bis $15,63 \pm 5,68\%$ des Gewebes liegt (Tab. 26).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	15,13	3,28	11,00	20,3
Nach einem Monat	21,44	4,73	15,4	28,8
Nach drei Monaten	10,33	2,72	5,8	12,5

Tabelle 25: Gewebefettgehalt (%) der Tibiae der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.

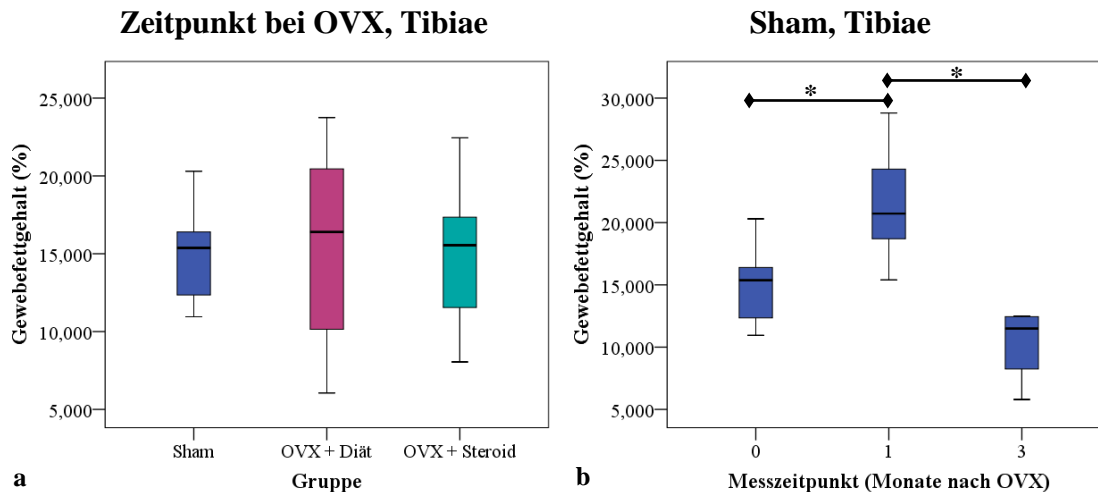


Abbildung 30 a-b: Prozentualer Fettgehalt der Tibiae aller Gruppen bei OVX und der Sham-Gruppe im Zeitverlauf. a) Der prozentuale Fettgehalt zum Zeitpunkt der Ovariectomie ist in allen drei untersuchten Gruppen etwa gleich groß. b) Der Gewebefettgehalt der Sham-Gruppe nimmt in dem ersten Monat nach OVX zu ($p < 0,05$). Weitere zwei Monate später fällt der Wert wieder ab und ist geringer als der Ausgangswert ($p < 0,001$).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	15,63	5,68	6,1	23,8
Nach einem Monat	16,66	4,52	8,0	21,9
Nach drei Monaten	15,10	4,60	5,6	24,5

Tabelle 26: Gewebefettgehalt (%) der Tibiae der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.

Der prozentuale Fettgehalt der OVX + Steroid-Gruppe steigt nach einem Monat Behandlung mit Dexamethason nur um 0,02% auf einen Wert von 15,59 +/- 4,64%. Beim dritten Messzeitpunkt, also drei Monate nach Ovariectomie hat sich der Gewebefettanteil auf 10,81% verringert (Tab. 27). Beide Veränderungen sind nicht statistisch signifikant.

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	15,57	4,82	8,1	22,5
Nach einem Monat	15,59	4,64	11,1	23,3
Nach drei Monaten	10,81	4,78	2,5	18,3

Tabelle 27: Gewebefettgehalt (%) der Tibiae der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.

Einen Monat nach Behandlungsbeginn weist die OVX + Steroid-Gruppe mit 15,59 +/- 4,64% den niedrigsten prozentualen Fettanteil auf. Die Werte der OVX + Diät-Gruppe liegen minimal höher mit 16,66 +/- 4,52%. Den größten Gewebefettanteil zeigt damit die Sham-Gruppe mit einem Wert von 21,44 +/- 4,73%. Die dargestellten Wertdifferenzen unterliegen keiner statistischen Signifikanz.

Drei Monate nach Behandlungsbeginn hat die Sham-Gruppe den niedrigsten Fettgehalt des Gewebes mit 10,33 +/- 2,72%. Den höchsten Fettgehalt im Bereich beider Tibiae weist die OVX + Diät-Gruppe auf mit einem Wert von 15,10 +/- 4,6%. Dieser Unterschied ist mit $p=0,059$ allerdings nicht statistisch signifikant. Dazwischen liegt die OVX + Steroid-Gruppe mit einem prozentualen Fettgehalt von 10,81 +/- 4,78% (Abb. 31). Sie unterscheidet sich signifikant von der OVX + Diät-Gruppe ($p < 0,05$), jedoch nicht von der Sham-Gruppe ($p=0,977$).

Zeitpunkt drei Monate nach OVX, Tibiae

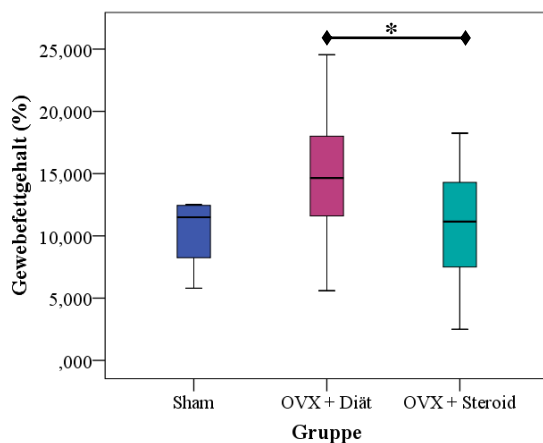


Abbildung 31: Der prozentuale Fettgehalt aller Gruppen nach drei Monaten im Bereich der Tibiae. Dieser ist in der OVX + Steroid-Gruppe drei Monate nach Ovariectomie geringer als in der OVX + Diät-Gruppe ($p < 0,05$). Der Mittelwert des Gewebefettanteils der Sham-Gruppe ist von allen Gruppen der niedrigste Wert.

Femora:

Zu Beginn der Studie sind keine signifikanten Unterschiede des prozentualen Fettgehalts im Bereich beider Femora zwischen den Gruppen zu verzeichnen (Abb. 32 a). Die Werte liegen zwischen 18,71 +/- 4,43% und 20,11 +/- 1,62%. Im diesem Bereich zeigt die Sham-Gruppe keine statistisch signifikanten Veränderung des prozentualen Fettgehalts, der nach Behandlungsbeginn zunächst von 19,3 +/- 3,32% auf 23,68 +/- 4,87% leicht ansteigt, dann aber wieder abfällt auf 22,76 +/- 2,31% (Abb. 32 b und Tab. 28).

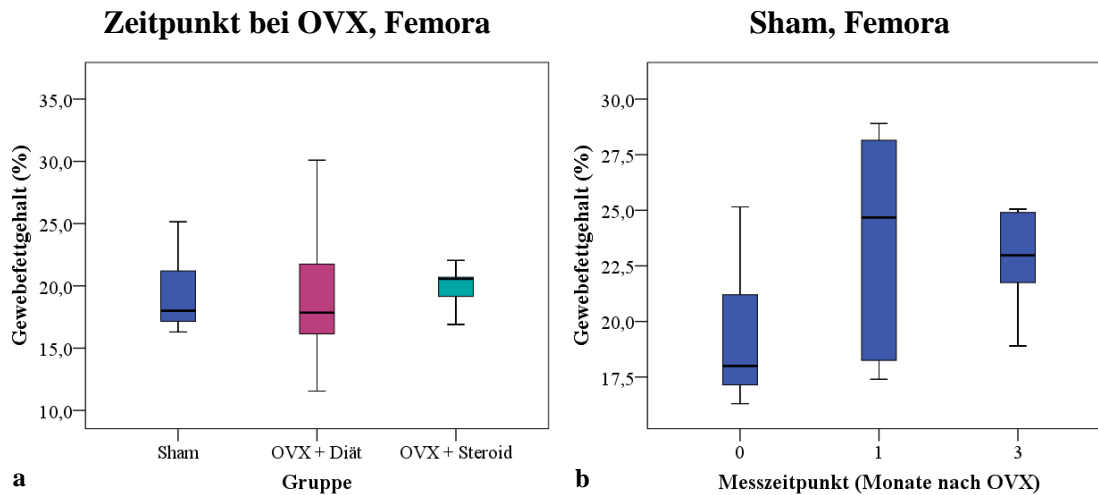


Abbildung 32 a-b: Prozentualer Fettgehalt der Femora bei OVX und Verlauf dessen bei der Sham-Gruppe. a) Vor Beginn der verschiedenen Behandlungen haben alle drei Gruppen einen relativ homogenen prozentualen Fettgehalt des Gewebes. b) Der Gewebefettgehalt der Sham-Gruppe nimmt nach vier Wochen Behandlungszeitraum um 4,38% zu. Weitere zwei Monate später fällt der Gewebefettanteil um 0,92% ab.

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	19,3	3,32	16,30	25,15
Nach einem Monat	23,68	4,87	17,4	28,9
Nach drei Monaten	22,76	2,31	11,55	30,10

Tabelle 28: Gewebefettgehalt (%) der Femora der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.

Dagegen zeigt die OVX + Diät-Gruppe eine konstante Steigerung des Fettgehalts nach drei Monaten Behandlungszeitraum beginnend mit 18,72 +/- 4,43% auf 23,46 +/- 4,89% nach drei Monaten ($p < 0,01$; Tab. 29 und Abb. 33 a).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	18,72	4,43	11,55	30,10
Nach einem Monat	20,68	3,48	13,85	25,15
Nach drei Monaten	23,46	4,89	12,40	32,20

Tabelle 29: Gewebefettgehalt (%) der Femora der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.

Auch die OVX + Steroid-Gruppe zeigt einen Anstieg des Fettgehalts in den Femora nach drei Monaten, der allerdings keiner statistischen Signifikanz unterliegt. Diese Gruppe hat zu Beginn einen Gewebefettgehalt von 20,11 +/- 1,62%. Nach einem Monat Behandlung liegt dieser bei 24,76 +/- 5,5% um nach drei Monaten sein Maximum mit 26,18 +/- 7,56% zu erreichen (Tab. 30 und Abb. 33 b).

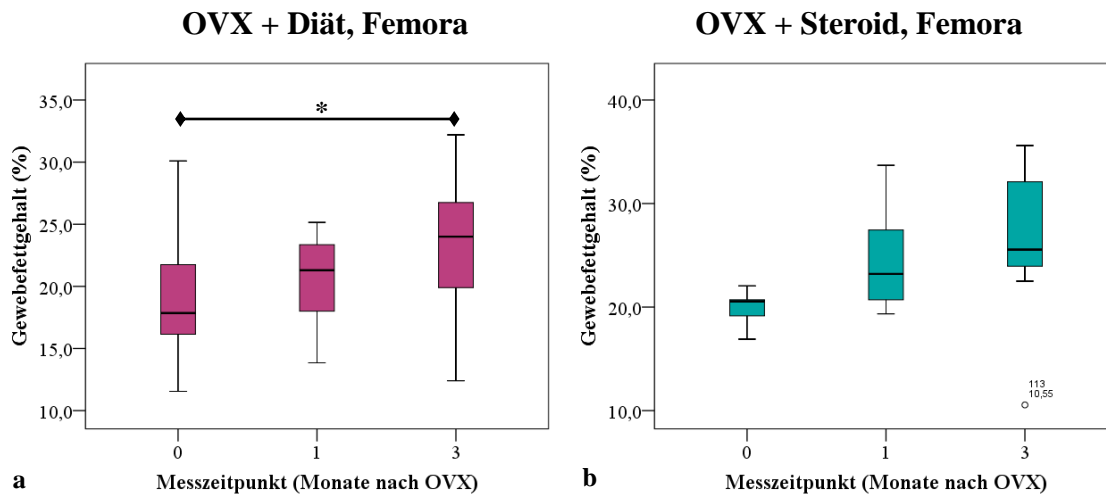


Abbildung 33 a-b: Gewebefettgehalt der Femora der OVX + Diät- und der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf. a) Der Gewebefettanteil der OVX + Diät-Gruppe nimmt über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant zu. Nach drei Monaten ist der Fettgehalt um 4,74% gestiegen ($p < 0,01$). b) Auch der prozentuale Fettgehalt der OVX + Steroid-Gruppe steigt kontinuierlich an. Nach drei Monaten ist er um 6,07%, jedoch nicht statistisch signifikant gestiegen.

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	20,11	1,62	16,90	22,05
Nach einem Monat	24,76	5,50	19,35	33,70
Nach drei Monaten	26,18	7,56	10,55	35,60

Tabelle 30: Gewebefettgehalt (%) der Femora der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.

Im Vergleich der Gruppen untereinander fällt nach einem Monat Beobachtungszeitraum auf, dass die OVX + Diät-Gruppe mit einem Wert von 20,68 +/- 3,48% den geringsten Fettanteil aufwies. Die Sham-Gruppe liegt mit 23,68 +/- 4,87% im Mittelfeld und die OVX + Steroid-Gruppe hat nach vier Wochen Behandlung einen Fettanteil des Gewebes von 24,76 +/- 5,50% und somit den größten Fettanteil (Abb. 34 a). Die

Differenz der OVX + Diät- und der OVX + Steroid-Gruppe ist statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Drei Monate nach Ovariectomie bleibt die OVX + Steroid-Gruppe den prozentualen Fettanteil der Femora betreffend führend mit einem Mittelwert von $26,18 \pm 7,56\%$. Bei diesem Zeitpunkt hat allerdings die Sham-Gruppe wieder an Fettgehalt verloren, so dass sie mit einem Mittelwert von $22,67 \pm 2,31\%$ den geringsten prozentualen Fettanteil aufweist. Somit liegt die OVX + Diät-Gruppe mit einem Mittelwert von $23,46 \pm 4,89$ zwischen den Werten der anderen beiden Gruppen. Diese Unterschiede sind nicht statistisch signifikant (Abb. 34 b).

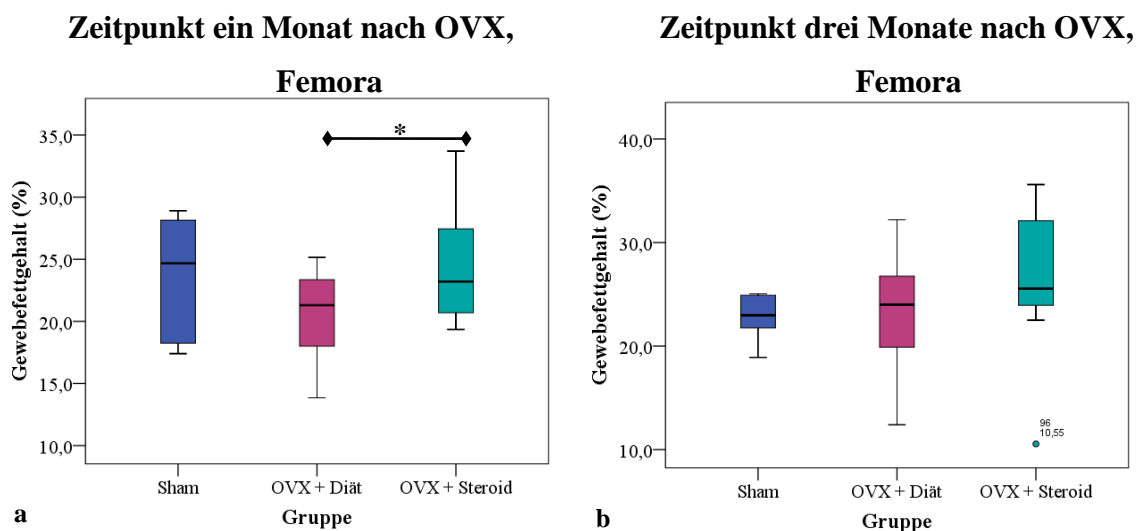


Abbildung 34 a-b: Gewebefettgehalt der Femora nach einem und drei Monaten. a) Der prozentuale Fettanteil der Femora ist nach einem Monat bei der OVX + Steroid-Gruppe am größten und unterscheidet sich signifikant von dem Wert der OVX + Diät-Gruppe mit $p < 0,05$. b) Nach einem Beobachtungszeitraum von drei Monaten hat die Sham-Gruppe den niedrigsten prozentualen Fettgehalt. Der Wert der OVX + Diät-Gruppe liegt 0,79% höher und der Wert der OVX + Steroid-Gruppe 3,51% höher als der Wert der Sham-Gruppe.

Becken:

Auch im Bereich des Beckens sind die Ausgangswerte des prozentualen Fettgehalts aller drei Gruppen auf einem gleichen Niveau (Abb. 35 a) und erstrecken sich von $16,68 \pm 3,75\%$ (Sham) bis $19,4 \pm 3,52\%$ (OVX + Steroid). Die OVX + Diät-Gruppe liegt mit einem Gewebefettgehalt von $18,68 \pm 4,13\%$ zwischen den beiden anderen Gruppen.

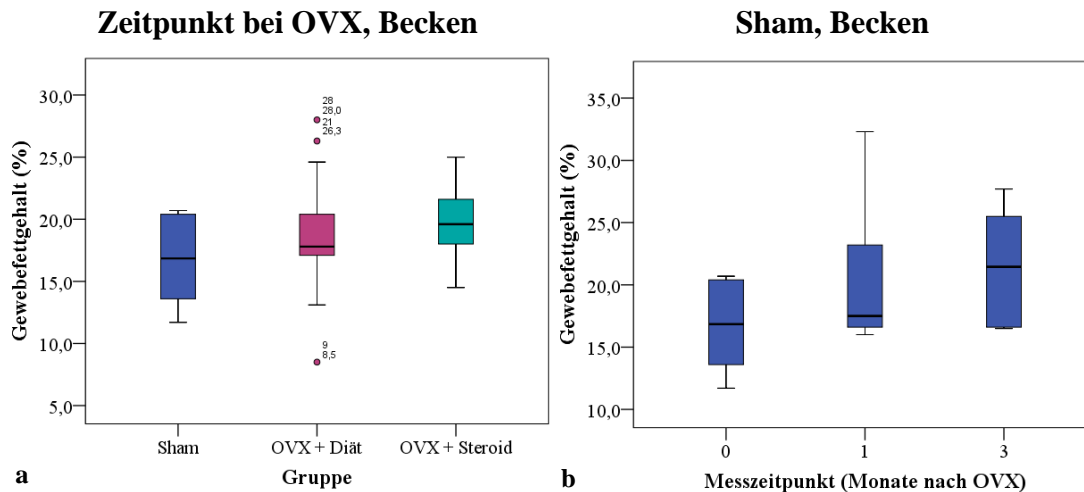


Abbildung 35 a-b: Gewebefettgehalt des Beckens zum Zeitpunkt der Ovariectomie und der Sham-Gruppe im Zeitverlauf. a) Zum Zeitpunkt der Ovariectomie starten alle drei Gruppen mit einem relativ homogenen prozentualen Fettgehalt. b) Die Sham-Gruppe zeigt über den Beobachtungszeitraum von drei Monaten insgesamt einen Anstieg des prozentualen Fettgehalts von 4,84%.

Die Sham-Gruppe nimmt im Bereich des Beckens über den Zeitraum von drei Monaten stetig an Fettgehalt zu. Zum Zeitpunkt der Ovariectomie beträgt der prozentuale Fettgehalt 16,68 +/- 3,75% (Tab. 31, Abb. 35 b), einen Monat später ist der Fettgehalt um 3,84% gestiegen, nach drei Monaten beträgt der prozentuale Fettgehalt weitere 1,01% mehr. Die beschriebenen Veränderungen sind nicht statistisch signifikant.

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	16,68	3,75	11,7	20,7
Nach einem Monat	20,52	6,34	16,0	32,3
Nach drei Monaten	21,53	5,04	16,5	27,7

Tabelle 31: Gewebefettgehalt (%) des Beckens der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.

Besonders die OVX + Diät-Gruppe zeigt nach drei Monaten verglichen mit dem Zeitpunkt der OVX eine relevante Steigerung des prozentualen Fettgehalts von 18,68 +/- 4,13% auf 23,93 +/- 4,30% mit $p < 0,001$. Der Fettanstieg derselben Gruppe ist auch im Zeitintervall von vier Wochen bis drei Monaten signifikant mit $p < 0,001$ (Tab. 32, Abb.36 a).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	18,68	4,13	8,5	28,0
Nach einem Monat	19,59	2,69	14,8	26,5
Nach drei Monaten	23,93	4,30	15,5	32,3

Tabelle 32: Gewebefettgehalt (%) des Beckens der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.

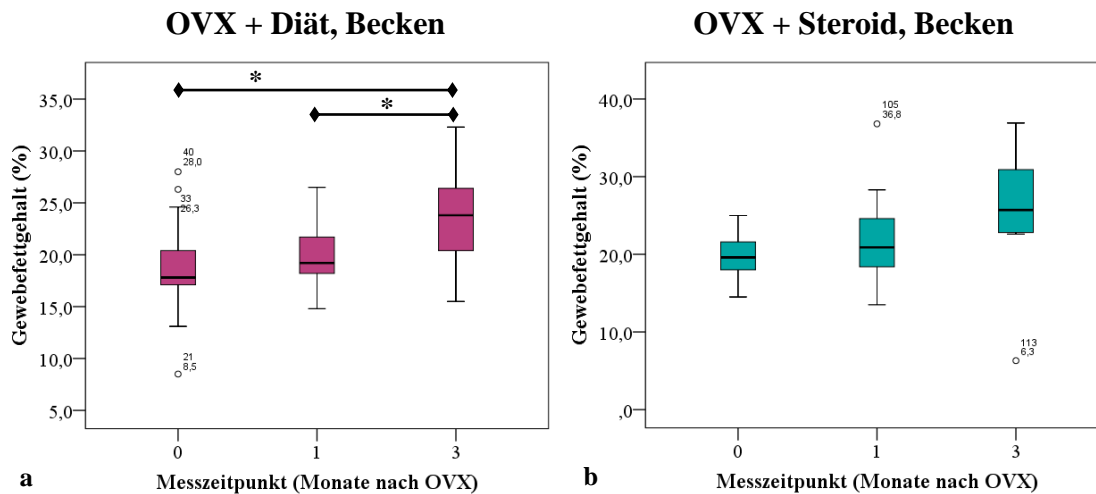


Abbildung 36 a-b: Der prozentuale Fettgehalt des Beckens der OVX + Diät- und der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf. a) Der Gewebefettgehalt der OVX + Diät-Gruppe steigt im Bereich des Beckens nach einem Monat um 0,91%, nach drei Monaten erhöht sich derselbe nochmal um 4,34% mit $p < 0,001$. b) Auch bei der OVX + Steroid-Gruppe ist eine positive Tendenz des prozentualen Fettgehalts zu erkennen, diese ist aber nicht statistisch signifikant.

Die OVX + Steroid-Gruppe zeigt ebenfalls nach einem Monat eine positive Tendenz des prozentualen Fettgehalts im Bereich des Beckens. Der Wert steigert sich um 3,37% auf $22,77 \pm 6,74\%$. Nach drei Monaten hat der Fettgehalt im Bereich des Beckens im Vergleich zum Zeitpunkt bei Ovariectomie um 6,6% auf $26 \pm 9,07\%$ zugenommen. Diese Veränderungen sind nicht statistisch signifikant (Tab. 33 und Abb. 36 b).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	19,40	3,52	14,5	25,0
Nach einem Monat	22,77	6,74	13,5	36,8
Nach drei Monaten	26,00	9,07	6,3	36,9

Tabelle 33: Gewebefettgehalt (%) des Beckens der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.

Im Vergleich der Gruppen untereinander, ein Monat nach dem Studienbeginn, hat die OVX + Diät-Gruppe den niedrigsten prozentualen Fettgehalt im Bereich des Beckens mit einem Wert von $19,59 \pm 2,69\%$. Die Sham-Gruppe liegt $0,93\%$ höher mit einem Wert von $20,52 \pm 6,34\%$ ($p=0,892$). Die OVX + Steroid-Gruppe zeigt im Bereich des Beckens den höchsten prozentualen Fettgehalt mit $22,77 \pm 6,74\%$ und liegt somit $3,11\%$ höher als der Wert der OVX + Diät-Gruppe ($p=0,174$) und auch höher als die Sham-Gruppe ($p=0,609$). Die hier beschriebenen Unterschiede der Gruppen sind nicht statistisch signifikant (Abb. 37 a).

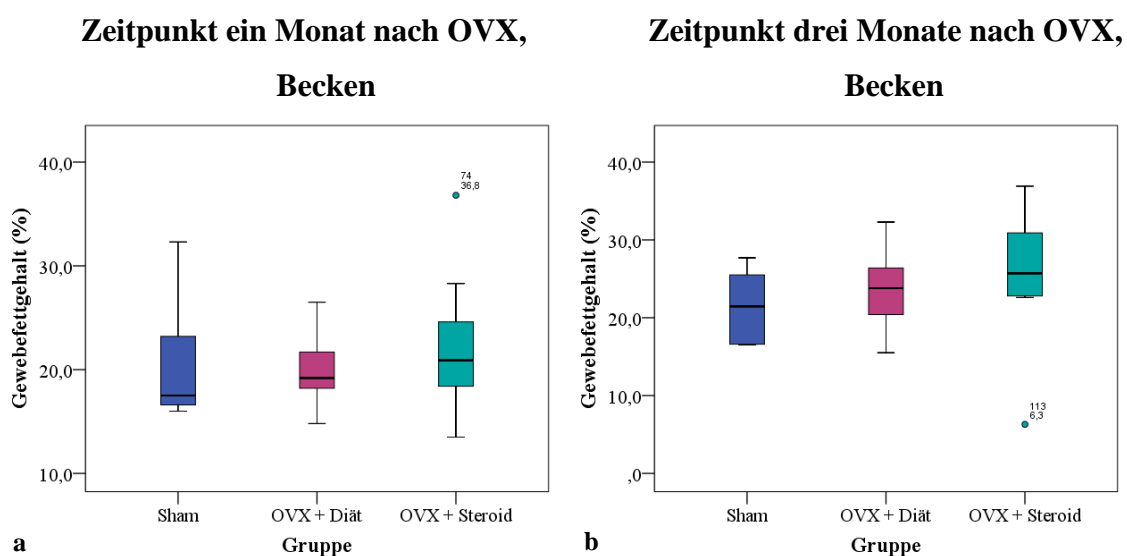


Abbildung 37 a-b: Der prozentuale Fettgehalt des Beckens aller Gruppen nach einem und drei Monaten. a) Zum Zeitpunkt ein Monat nach Ovariectomie ist der Gewebefettgehalt der OVX + Steroid-Gruppe am niedrigsten. b) Nach drei Monaten Beobachtungszeitraum weist die Sham-Gruppe mit den niedrigsten Gewebefettgehalt auf. Den höchsten Wert zeigt auch hier die OVX + Steroid-Gruppe.

Zum Zeitpunkt nach drei Monaten hat sich die Reihenfolge der Gruppen, den prozentualen Fettgehalt des Beckens betreffend, insofern geändert, dass nun die Sham-Gruppe den niedrigsten Wert mit $21,53 \pm 5,04\%$ aufweist. Die OVX + Diät-Gruppe liegt $2,4\%$ höher mit einem Wert von $23,93 \pm 4,3\%$ ($p=0,635$, Tab. 32). Auch zu diesem Zeitpunkt weist die OVX + Steroid-Gruppe mit $26 \pm 9,07\%$ den höchsten Gewebefettgehalt auf (Tab. 33) und liegt somit $4,47\%$ höher als der Wert der Sham-Gruppe ($p=0,322$, Abb. 37 b). Auch diese Unterschiede unterliegen keiner statistischen Signifikanz.

Wirbelsäule:

Der prozentuale Fettgehalt der Wirbelsäule ist grundsätzlich niedriger als in allen anderen Bereichen. Er liegt hier zum Zeitpunkt der Ovariectomie zwischen 6,13 +/- 1,47% (Sham) und 7,81 +/- 2,35% (OVX + Diät), in den anderen Bereichen liegt er zu diesem Zeitpunkt zwischen 15,13 +/- 3,28% (Bereich Tibiae, Sham, Tab. 25) und 20,11 +/- 1,62% (Bereich Femora, OVX + Steroid, Tab. 30).

Zum Zeitpunkt der Ovariectomie gibt es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen. Die Sham-Gruppe weist mit 6,13 +/- 1,47% den niedrigsten Gewebefettanteil auf. Den höchsten Wert zeigt hier die OVX + Diät-Gruppe mit einem Gewebefettgehalt von 7,81 +/- 2,35%. Dazwischen liegt die OVX + Steroid-Gruppe mit einem Gewebefettanteil von 7,36 +/- 1,97% (Abb. 38 a).

Bei der Betrachtung der Sham-Gruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg, fällt eine kontinuierliche Steigerung des prozentualen Fettgehalts auf. Nach einem Monat ist der Wert von 6,13 +/- 1,47% (Tab. 34) um 4,37% auf einen Gewebefettgehalt von 10,5 +/- 2,35% gestiegen. Drei Monate nach Beginn der Behandlung ist der prozentuale Fettanteil um 6,57% auf einen Wert von 12,7 +/- 5,65% angestiegen und unterscheidet sich damit signifikant mit $p < 0,05$ von dem Wert des Startzeitpunktes (Abb. 38 b).

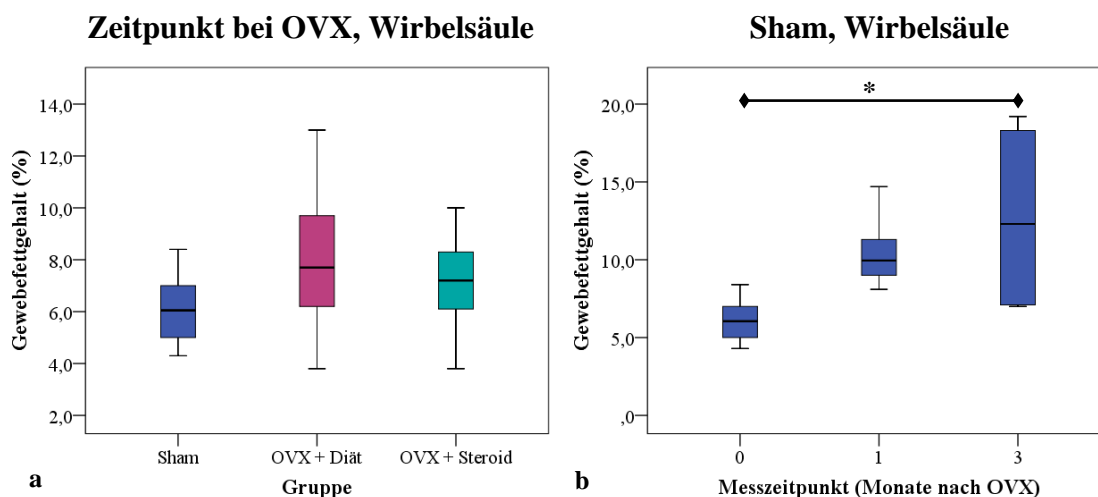


Abbildung 38 a-b: Prozentualer Fettgehalt der Wirbelsäule bei OVX und Verlauf dessen bei der Sham-Gruppe. a) Zum Zeitpunkt der Ovariectomie unterscheiden sich die drei Gruppen nicht statistisch signifikant voneinander. b) Der Gewebefettgehalt der Sham-Gruppe ist nach drei Monaten signifikant angestiegen ($p < 0,05$).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	6,13	1,47	4,3	8,4
Nach einem Monat	10,5	2,35	8,1	14,7
Nach drei Monaten	12,7	5,65	7,0	19,2

Tabelle 34: Gewebefettgehalt (%) der Wirbelsäule der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.

Auch die OVX + Diät-Gruppe zeigt eine kontinuierliche Steigerung des prozentualen Fettgehalts über den Beobachtungszeitraum von drei Monaten hinweg. Der Ausgangswert in dieser Gruppe im Bereich der Wirbelsäule beträgt 7,81 +/- 2,35% (Tab. 35).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	7,81	2,35	3,8	13,0
Nach einem Monat	11,62	2,61	7,0	16,9
Nach drei Monaten	16,08	3,52	10,1	24,5

Tabelle 35: Gewebefettgehalt (%) der Wirbelsäule der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.

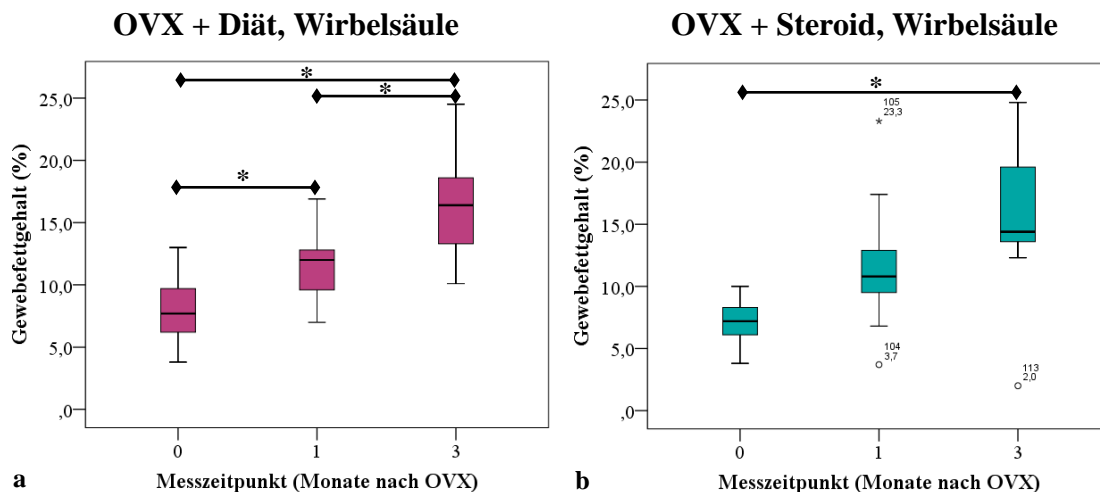


Abbildung 39 a-b: Der prozentuale Fettgehalt der Wirbelsäule der OVX + Diät- und der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf. a) Der prozentuale Fettgehalt der OVX + Diät-Gruppe steigt sowohl nach einem als auch nach drei Monaten signifikant an. b) Bei der OVX + Steroid-Gruppe erhöht sich der Gewebefettgehalt nach drei Monaten signifikant ($p < 0,01$).

Nach einem Monat steigert sich dieser Wert um 3,81% auf einen Gewebefettanteil von 11,62 +/- 2,61% mit $p < 0,001$. Drei Monate nach Ovariectomie liegt der prozentuale Fettgehalt bei 16,08 +/- 3,52% und somit 8,27% höher als der Ausgangswert des prozentualen Fettgehalts im Bereich der Wirbelsäule mit $p < 0,001$ (Abb. 39 a).

Der Gewebefettanteil der OVX + Steroid-Gruppe steigt ebenfalls über den gesamten Beobachtungszeitraum stetig an (Abb. 39 b), er beträgt zum Zeitpunkt der Ovariectomie 7,36 +/- 1,97% (Tab. 36). Nach einem Monat steigt der Ausgangswert um 4,42% auf einen Wert von 11,62 +/- 2,61% an. Nach drei Monaten hat sich der prozentuale Fettgehalt im Vergleich zum Ausgangswert um 7,87% gesteigert ($p < 0,01$) und liegt somit bei 15,23 +/- 6,4%.

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	7,36	1,97	3,8	10,0
Nach einem Monat	11,78	5,75	3,7	23,3
Nach drei Monaten	15,23	6,40	2,0	24,8

Tabelle 36: Gewebefettgehalt (%) der Wirbelsäule der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.

Im Vergleich der Gruppen untereinander, ein Monat nach der Ovariectomie, weist die Sham-Gruppe mit 10,5 +/- 2,35% den niedrigsten Gewebefettgehalt auf. Die OVX + Diät- und die OVX + Steroid-Gruppe unterscheiden sich nur um 0,16%, wobei die OVX + Steroid-Gruppe mit 11,78 +/- 5,75% den höchsten Gewebefettgehalt aufweist. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind zu diesem Zeitpunkt im Bereich der Wirbelsäule nicht signifikant (Abb. 40 a).

Drei Monate nach Behandlungsbeginn verteilt sich der prozentuale Fettgehalt der drei Gruppen folgendermaßen: Auch hier hat die Sham-Gruppe im Bereich der Wirbelsäule den geringsten Fettgehalt im Gewebe mit 12,7 +/- 5,65%. Den größten Gewebefettanteil zeigt zu diesem Zeitpunkt allerdings die OVX + Diät-Gruppe mit 16,08 +/- 3,52%. Dazwischen liegt die OVX + Steroid-Gruppe, deren prozentualer Fettgehalt um 2,53% höher liegt als der Wert der Sham-Gruppe ($p = 0,554$; Tab. 36). Diese Unterschiede zwischen den Gruppen sind ebenfalls nicht statistisch signifikant (Abb. 40 b).

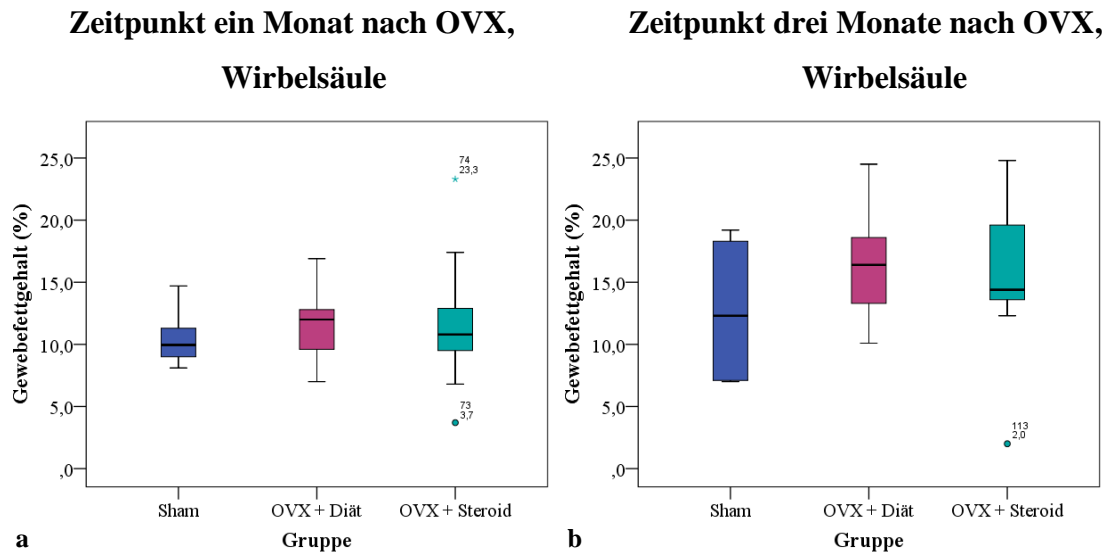


Abbildung 40 a-b: Der prozentuale Fettgehalt der Wirbelsäule aller Gruppen nach einem und drei Monaten. a) Einen Monat nach OVX zeigen die Gruppen bezogen auf den prozentualen Fettgehalt keine signifikanten Unterschiede. b) Drei Monate nach Behandlungsbeginn hat die Sham-Gruppe weiterhin den niedrigsten Fettgehalt. Die OVX + Diät-Gruppe hat hier den höchsten Gewebefettgehalt.

Gesamter Körper:

Bei der Betrachtung der Werte für den gesamten Körper liegen die Ausgangswerte zum Zeitpunkt der Ovariectomie wiederum, ähnlich wie bei den Bereichen Femora, Tibiae und Becken, zwischen 17,93 +/- 1,67% (Sham) und 18,76 +/- 2,39% (OVX + Steroid).

Alle drei Gruppen haben bei Behandlungsbeginn einen relativ homogenen prozentualen Fettgehalt im Bereich des ganzen Körpers (Abb. 41 a). Den geringsten Gewebefettgehalt weist die Sham-Gruppe mit 17,93 +/- 1,67% auf (Tab. 37). Die OVX + Diät-Gruppe hat den zweitgrößten Fettgehalt mit 18,44 +/- 2,94% und die OVX + Steroid-Gruppe weist mit 18,76 +/- 2,39% den höchsten Fettgehalt auf (Abb. 41 a).

Die Sham-Gruppe zeigt nach einem Monat eine Steigerung des Gewebefettgehalts um 5,09% auf einen Wert von 23,02 +/- 4,3%. Nach drei Monaten erhöht sich der prozentuale Fettgehalt erneut um 2,25% auf einen Wert von 25,27 +/- 4,78%. Damit unterscheidet sich der Ausgangswert vom prozentualen Fettgehalt nach drei Monaten statistisch signifikant mit $p < 0,05$ (Abb. 41 b und Tab. 37).

Der prozentuale Fettgehalt der OVX + Diät-Gruppe steigt über den Zeitraum von drei Monaten stetig an. Zu Beginn der Behandlung mit Ovariectomie und der Diätgabe haben die Tiere dieser Gruppe einen Gewebefettgehalt von 18,44 +/- 2,94% (Tab. 38).

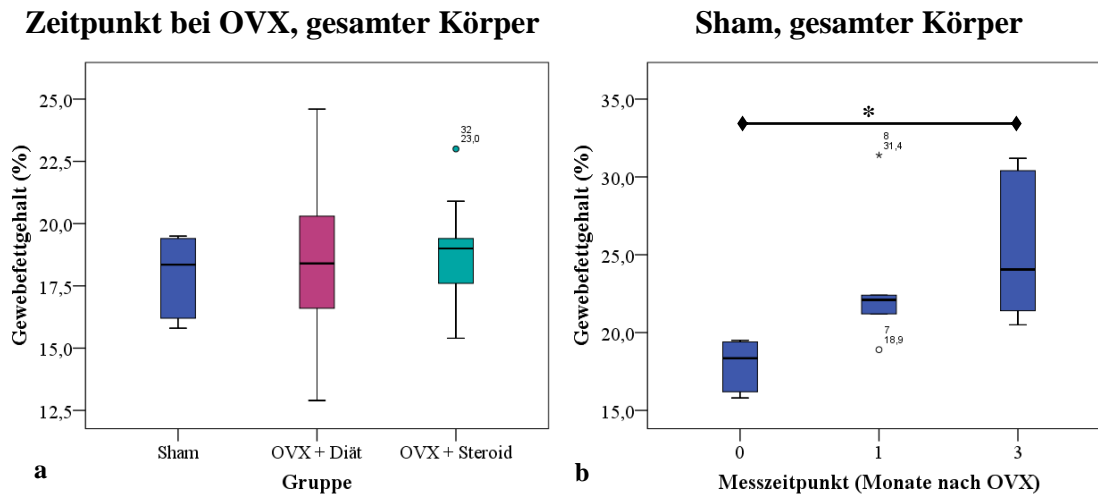


Abbildung 41 a-b: Gewebefettgehalt des gesamten Körpers bei Ovariectomie und der Sham-Gruppe im Zeitverlauf. a) Zum Zeitpunkt der OVX unterscheiden sich die drei Gruppen im Bereich des gesamten Körpers nicht statistisch signifikant. b) Der prozentuale Fettgehalt der Sham-Gruppe liegt nach drei Monaten 7,34% höher als der Ausgangswert.

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	17,93	1,67	15,8	19,5
Nach einem Monat	23,02	4,30	18,9	31,4
Nach drei Monaten	25,27	4,78	20,5	31,2

Tabelle 37: Gewebefettgehalt (%) des gesamten Körpers der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	18,44	2,94	12,9	24,6
Nach einem Monat	22,66	2,30	18,9	27,4
Nach drei Monaten	27,88	3,83	21,2	34,9

Tabelle 38: Gewebefettgehalt (%) des gesamten Körpers der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.

Einen Monat später hat sich dieser Wert mit $p < 0,001$ um 4,22% erhöht auf einen prozentualen Fettgehalt von 22,66 \pm 2,30% (Abb. 42 a). Nach drei Monaten weist diese Gruppe im Bereich des gesamten Körpers einen um 5,22% gesteigerten Gewebefettgehalt im Vergleich zum zweiten Messzeitpunkt nach einem Monat auf mit $p < 0,001$ (Tab. 38). Beim Vergleich des Ausgangswertes mit dem prozentualen

Fettgehalt nach drei Monaten ist eine Steigerung dieses Wertes um 9,44% zu erkennen mit $p < 0,001$.

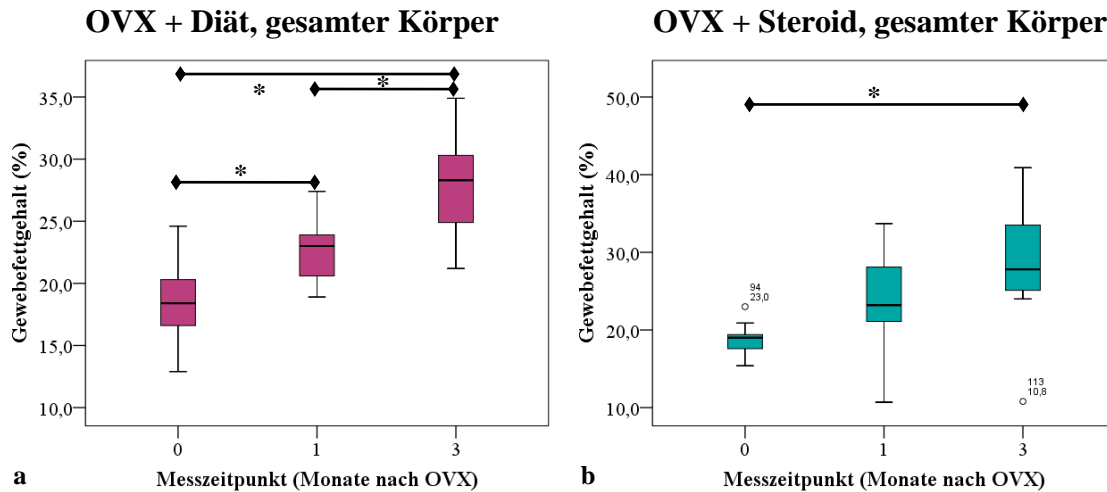


Abbildung 42 a-b: Gewebefettgehalt des gesamten Körpers der OVX + Diät- und der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf. a) Die OVX + Diät-Gruppe zeigt im Verlauf über drei Monate einen wachsenden prozentualen Fettgehalt im Bereich des gesamten Körpers mit $p < 0,001$. b) Der prozentuale Fettgehalt der OVX + Steroid-Gruppe steigt nach drei Monaten signifikant an mit $p < 0,05$.

Die OVX + Steroid-Gruppe zeigt ebenfalls einen steigenden prozentualen Fettgehalt über den Beobachtungszeitraum von drei Monaten. Zum Zeitpunkt der Ovariectomie liegt der Gewebefettgehalt bei dieser Gruppe bei $18,76 \pm 2,39\%$. Nach einem Monat Behandlung mit Dexamethason hat sich dieser Wert um 4,88% gesteigert auf einen prozentualen Fettgehalt von $23,64 \pm 6,74\%$ (Tab. 39). Drei Monate nach Behandlungsbeginn liegt der Gewebefettanteil bei $28,44 \pm 8,75\%$ und somit 9,68% höher als bei der ersten DXA-Messung mit $p < 0,05$ (Abb. 42 b).

	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Bei OVX	18,76	2,39	15,4	23,0
Nach einem Monat	23,64	6,74	10,7	33,7
Nach drei Monaten	28,44	8,75	10,8	40,9

Tabelle 39: Gewebefettgehalt (%) des gesamten Körpers der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.

Bei dem Vergleich der Gruppen untereinander, weist die OVX + Diät-Gruppe einen Monat nach Ovariectomie mit 22,66 +/- 2,30% den niedrigsten prozentualen Fettgehalt auf. Der Wert der Sham-Gruppe liegt 0,36% höher und die OVX + Steroid-Gruppe hat mit 23,64 +/- 6,74% den höchsten Gewebefettgehalt zu diesem Zeitpunkt (Abb. 43 a).

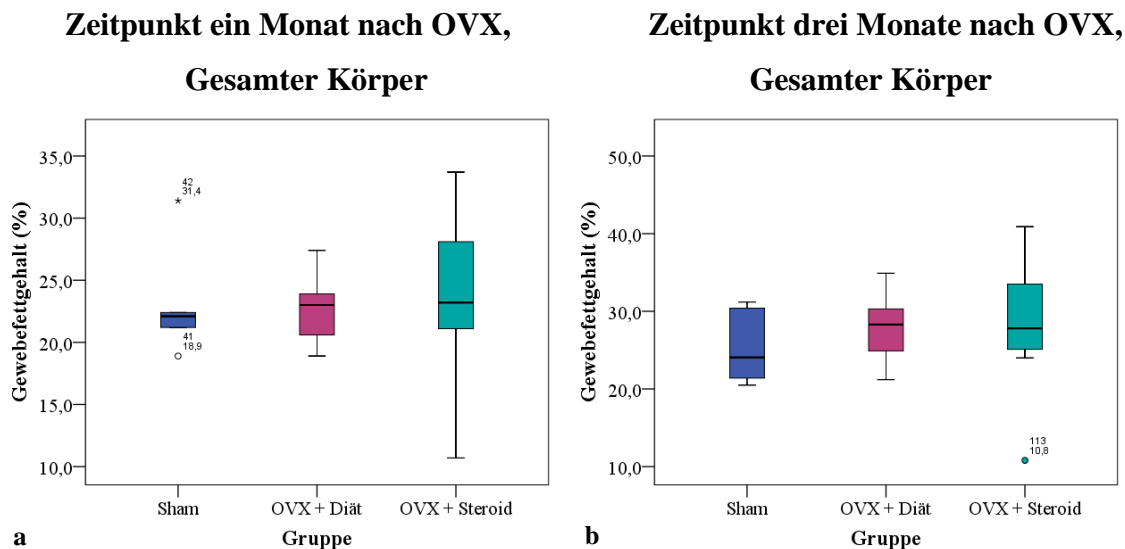


Abbildung 43 a-b: Gewebefettgehalt des gesamten Körpers nach einem und drei Monaten. a) Der prozentuale Fettgehalt der drei Versuchsgruppen unterscheidet sich einen Monat nach der Ovariectomie nur gering. Die OVX + Steroid-Gruppe hat den höchsten Fettgehalt. b) Drei Monate nach dem Behandlungsbeginn ist der prozentuale Fettgehalt der OVX + Steroid-Gruppe weiterhin am höchsten.

Die Gruppenunterschiede sind einen Monat nach Ovariectomie nicht statistisch signifikant. Die OVX + Diät-Gruppe weist den niedrigsten prozentualen Gewebefettgehalt mit 22,66% auf. Die Sham-Gruppe liegt mit einem prozentualen Gewebefettgehalt von 23,02% zwischen den beiden Gruppen und die OVX + Steroid-Gruppe zeigt mit 23,64% den höchsten Wert.

Drei Monate nach Behandlungsbeginn verteilt sich der prozentuale Fettgehalt der Gruppen folgendermaßen: Die Sham-Gruppe hat mit 25,27 +/- 4,78% den niedrigsten Fettgehalt im Bereich des gesamten Körpers (Abb. 43 b). Die OVX + Diät-Gruppe liegt mit 27,88 +/- 3,83% um 2,61% höher. Den höchsten Gewebefettgehalt zeigt zu diesem Zeitpunkt die OVX + Steroid-Gruppe mit 28,44 +/- 8,75% und liegt damit 3,17% über dem Wert der Sham-Gruppe. Auch diese Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht statistisch signifikant.

4.3 Deskriptive Histologie

Die deskriptive Histologie erfolgte, um einen ersten Überblick über die histologischen Veränderungen am Rattenknochen zu erhalten, da die Osteoporose als eine systemische Skeletterkrankung mit niedriger Knochenmasse und mikroarchitektonischer Verschlechterung des Knochengewebes definiert wird.

Die qualitative Analyse der Paraffinschnittpräparate erfolgte ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit und wurde danach den Versuchsgruppen zugeordnet, so dass im Folgenden die deskriptive Analyse des linken proximalen Femurs und des dritten Lendenwirbelkörpers entsprechend der Einteilung zu den verschiedenen Behandlungsalternativen und auch zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt werden kann.

4.3.1 Femur

Zeitpunkt Ovariectomie, Alter 14 Wochen:

Im Alter von 14 Wochen imponiert die Substantia compacta als sehr stabil und dick. Die Trabekeldicke (TD) und die Trabekelzwischenräume sind variabel, bei weit verzweigten Trabekeln (Abb. 44 a). Der Fettgehalt im Markraum ist minimal bis kaum vorhanden (Fettvakuole= FV, Abb. 44 a). Die Volkmann- und Haverskanäle sind mäßig häufig vorhanden. Die Schicht der Bone lining cells ist dünn (* im kleinen Bildausschnitt Abb. 44 a). An der Knochen/Knorpelgrenze bildete der unorganisierte Blasenknorpel den Hauptanteil. Der Osteoblastenanteil ist sehr gering, es können nur wenige bis gar keine Osteoklasten gesehen werden.

Zeitpunkt einen Monat nach Ovariectomie, Alter 18 Wochen:

Bei der Sham-Gruppe stellt sich die Substantia compacta nach einem Monat Beobachtungszeitraum ca. im Verhältnis 2:1 zum Markraum dar. Die Trabekeldicke zeigt keine Auffälligkeiten und auch der Fettgehalt im Markraum stellt sich mäßig stark und weitgehend unauffällig dar. Bei dieser Gruppe können reichlich Osteoklasten, aber dafür nur wenige Osteoblasten gesehen werden.

Betrachtet man die OVX + Diät-Gruppe, so fällt eine deutlich dünnere Substantia compacta im Vergleich zur Sham-Gruppe auf. Sowohl der Trabekelzwischenraum, als auch der Fettgehalt des Knochenmarks imponiert hier deutlich größer im Vergleich zu

dem der Sham-Gruppe. Bei der Betrachtung mit einer größeren Vergrößerung kann man ebenso eine geringere Anzahl an Volkmann- und Haverskanälen erkennen. Die Osteoblastenanzahl ist bei dieser Gruppe unauffällig, die Anzahl der Osteoklasten scheint vermindert zu sein.

Die Substantia compacta ist in der OVX + Steroid-Gruppe im Alter von 18 Wochen mitteldick. Die Trabekel sind dünn bei einem weiten Trabekelzwischenraum (Abb. 44 b). In diesem Alter fällt auch schon ein vermehrter Fettgehalt im Markraum auf. Bei der Betrachtung der Volkmann- und Haverskanäle, der Bone lining cells und der Osteoblasten und -klasten lassen sich keine Besonderheiten feststellen.

Zeitpunkt 3 Monate nach Ovariectomie, Alter 26 Wochen:

Bei der Sham-Gruppe ist die Substantia compacta drei Monate nach Behandlungsbeginn weiterhin dick ausgeprägt. Die Trabekelzwischenräume weisen wenig bis kein Fett auf und sind eher eng (Abb. 44 c). Die Trabekel sind gut verzweigt und von unterschiedlicher Dicke. Es imponieren viele Volkmann- und Havers-Kanäle im Bereich der Substantia compacta. Die Schicht der Bone lining cells bleibt weiterhin dünn. Die Knorpel-Knochengrenze zeigt eine heterogene Struktur. Hier wechseln sich schon teilweise verknöchernder Säulen- und Blasenknorpel ab. Es können mäßig viele Osteoblasten und nur sehr wenige Osteoklasten differenziert werden.

Die OVX + Diät-Gruppe weist eine dicke Substantia compacta auf. Die Trabekelzwischenräume sind nur wenig oder mäßig viel mit Fett gefüllt und unterscheiden sich kaum von der Sham-Gruppe (Abb. 44 d). Die Trabekeldicke variiert ebenso wie die Qualität der Vernetzung. Die Trabekelzwischenräume sind dabei weit. Es fällt eine vermehrte Anzahl an Volkmann- und Havers-Kanälen auf. Die Schicht der Bone lining cells ist vergrößert im Vergleich zur Sham-Gruppe. Im Bereich der Knorpel-Knochengrenze ist nur noch wenig Blasenknorpel zu finden, der schon teilweise in Verknöcherung begriffen ist. In diesem Alter kann eine Vermehrung der Osteoblasten (kleiner Bildausschnitt Abb. 44 d) bei ebenso mäßiger Vermehrung der Osteoklasten beobachtet werden.

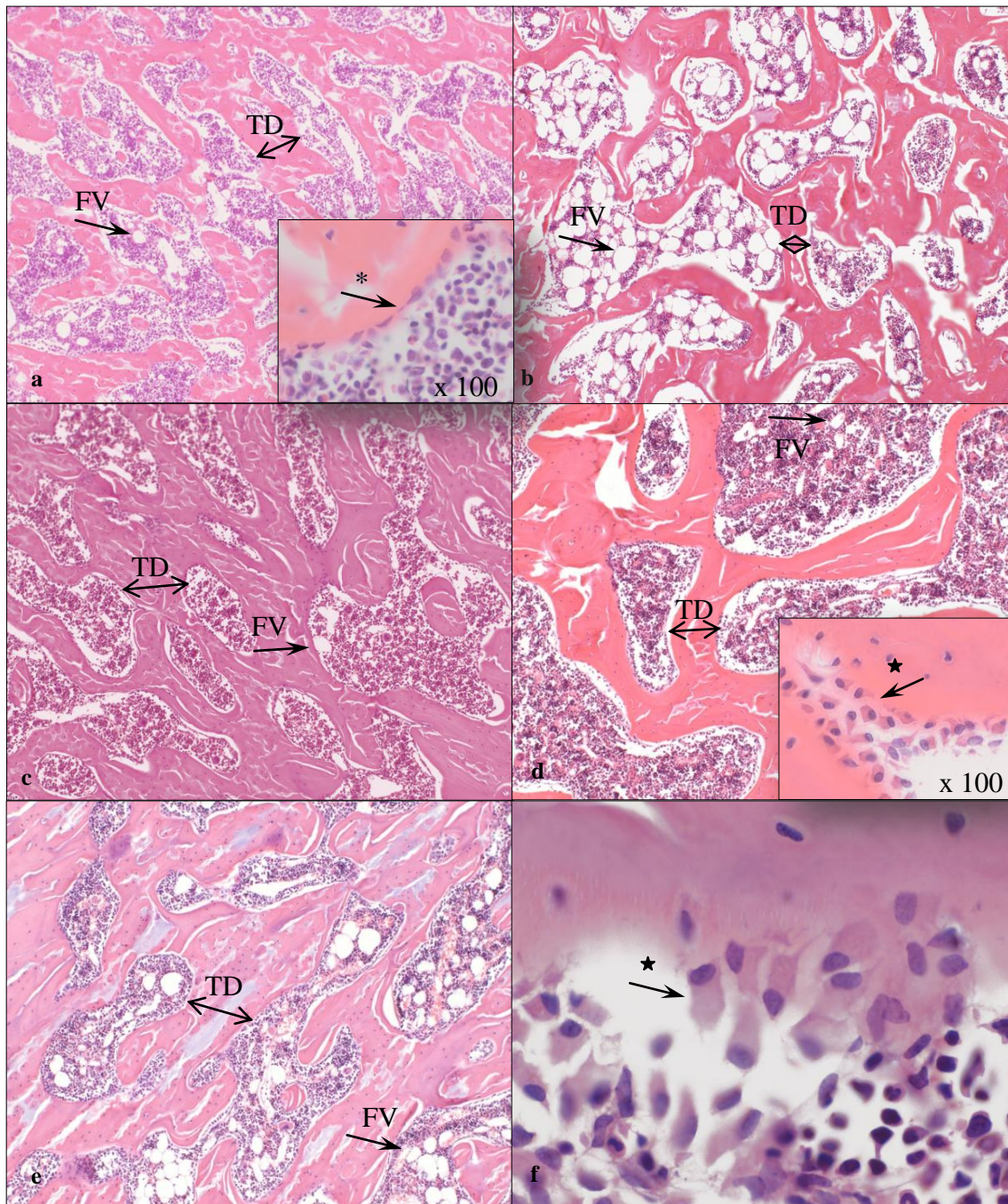


Abbildung 44 a-f: Histologische Darstellung linkes Femur, H.E. a) Vergrößerung x 10, Ratte 96, Alter 14 Wochen. b) Vergrößerung x 10, Ratte 55, OVX + Steroid, Alter 18 Wochen. c) Vergrößerung x 10, Ratte 92, Sham, Alter 26 Wochen. d) Vergrößerung x 10, Ratte 3, OVX + Diät, Alter 26 Wochen. e) Vergrößerung x 10, Ratte 13, OVX + Steroid, Alter 26 Wochen. f) Vergrößerung x 100, Ratte 13, OVX + Steroid, Alter 26 Wochen. FV= Fettvakuolen. TD= Trabekeldicke. *= Bone lining cells.★= Osteoblasten.

In der OVX + Steroid-Gruppe ist die Substantia compacta ebenfalls dick. Auffällig ist hier eine deutliche Vermehrung des Fettanteils im Markraum (Abb. 44 e). Die Trabekel sind hier gut verzweigt, aber dünn. Die Trabekelzwischenräume sind im Gegensatz zu der Auswertung der OVX + Diät-Gruppe schmal. Bei dieser Gruppe sind viele Volkmann- und Haverskanäle angeschnitten. Die Bone lining cells sind auch hier wie in der Sham-Gruppe auf einen schmalen Saum begrenzt. Die Knorpel-Knochengrenze zeigt eine weitgehende Durchbauung. Die Anzahl der Osteoblasten erscheint gesteigert, während weiterhin nur wenige Osteoklasten vorhanden sind (Abb. 44 f).

4.3.2 Lendenwirbelkörper

Zeitpunkt Ovariectomie, Alter 14 Wochen:

Zu Beginn der Studie wirkt die Substantia compacta bei dem dritten Lendenwirbelkörper mitteldick. Der Fettanteil zwischen den weit verzweigten und eher dünnen Trabekeln ist gering bei mittelweiten bis weiten Trabekelzwischenräumen (Abb. 45 a).

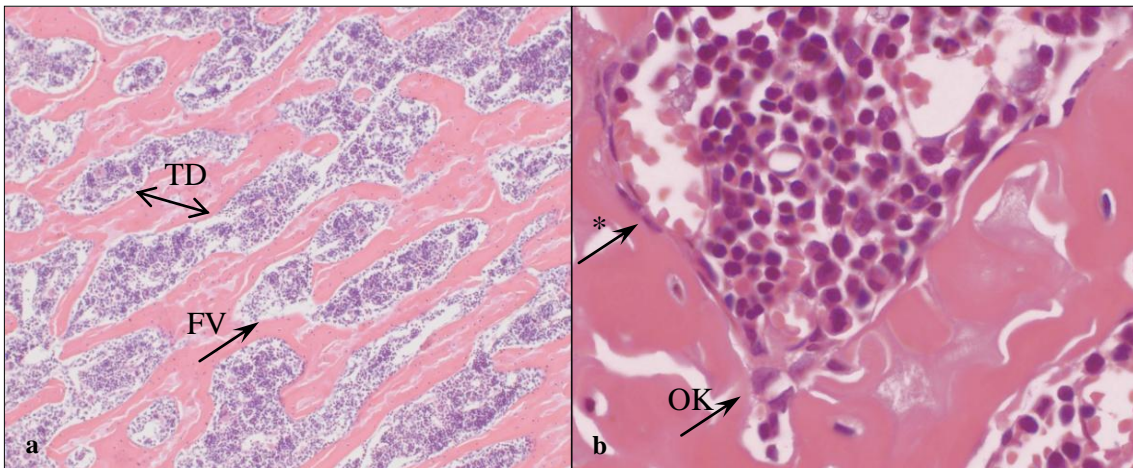


Abbildung 45 a-b: Histologische Darstellung LWK 3, H.E. a) Vergrößerung x 10, Ratte 96, Kontrolle, Alter 14 Wochen. b) Vergrößerung x 100, Ratte 98, Kontrolle, Alter 14 Wochen. Eine dünne Schicht Bone lining cells (*) begrenzt die Trabekel. Es sind wenige Osteoklasten (OK) sichtbar. FV= Fettvakuolen. TD= Trabekeldicke.

Es sind nur wenige Volkmann- und Haverskanäle vorhanden. Die Schicht der Bone lining cells ist auch hier wie beim Femur dünn. An der Knorpel-Knochen-Grenze überwiegt ein geordneter Säulenknorpel. Es sind einige Osteoblasten sichtbar, dagegen können wenige bis kaum Osteoklasten identifiziert werden (Abb. 45 b).

Zeitpunkt ein Monat nach Ovariectomie, Alter 18 Wochen:

Im Alter von 18 Wochen ist die Substantia compacta in der Sham-Gruppe mitteldick. Es ist wenig Fett im Markraum vorhanden. Das Trabekelwerk ist mäßig gut verzweigt bei weiten Trabekelzwischenräumen. Es sind nur wenige Volkmann- und Haverskanäle vorhanden. Die Schicht der Bone lining cells ist dicker als zuvor. Bezüglich des Knorpels und der Osteoblasten und –klasten gibt es keine Besonderheiten.

Bei der OVX + Diät-Gruppe ist die Substantia compacta unverändert. Der Trabekelzwischenraum ist eng, es ist wenig Fett vorhanden. Die Trabekel sind gut verzweigt und dick. Die Anzahl der Volkmann- und Haverskanäle ist unauffällig. Die Bone lining cells bilden lediglich eine dünne Schicht und es sind viele Osteoblasten (Abb. 46 a) und –klasten vorhanden.

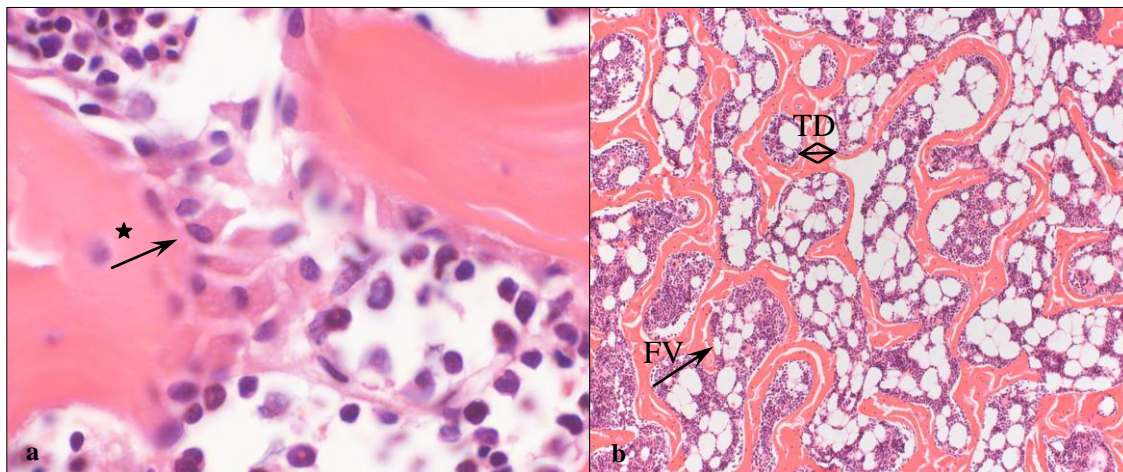


Abbildung 46 a-b: Histologische Darstellung LWK 3, H.E. a) Vergrößerung x 100, Ratte 73, OVX + Diät, Alter 18 Wochen. Es sind viele Osteoblasten (★) an die Trabekel angelagert. b) Vergrößerung x 10, Ratte 75, OVX + Steroid, Alter 18 Wochen. Der Fettgehalt des Markraums in dieser Gruppe ist deutlich höher als in den anderen Gruppen, die Trabekel erscheinen dünn und wenig verzweigt. FV= Fettvakuolen. TD= Trabekeldicke.

In der OVX + Steroid-Gruppe ist die Substantia compacta dicker, als in den anderen beiden Gruppen. Die Trabekel sind gut verzweigt, eher dünn und die Trabekelzwischenräume sind eng (Abb. 46 b). Auffallend ist der hohe Fettgehalt der Trabekelzwischenräume. Die Anzahl der Volkmann- und Haverskanäle differiert zwischen den verschiedenen Schnitten, so dass hierzu keine Aussage getroffen werden kann. Die Schicht der Bone lining cells ist auch hier relativ dick. Es ist kein Knorpel angeschnitten. Die Osteoblasten und –klasten sind vermehrt.

Zeitpunkt 3 Monate nach Ovariectomie, Alter 26 Wochen:

Drei Monate nach Ovariectomie ist die Substantia compacta im Bereich des dritten Lendenwirbelkörpers bei der Sham-Gruppe unverändert zum Startpunkt der Studie. Die Trabekelzwischenräume weisen mäßig viel Fett auf. Die Trabekel sind dünn und gut verzweigt, die Trabekelzwischenräume meist weit (Abb. 47 a). Es sind hier nur wenige Volkmann- und Havers-Kanäle angeschnitten. Die Schicht der Bone lining cells ist auch hier wieder dünn. Die Knorpel-Knochengrenze ist weitgehend verknöchert und weist teilweise noch Blasen- oder Säulenknorpel auf. Die Osteoblastenzahl ist zu diesem Zeitpunkt vermehrt, die Anzahl der Osteoklasten ist wie zu Beginn der Studie sehr gering.

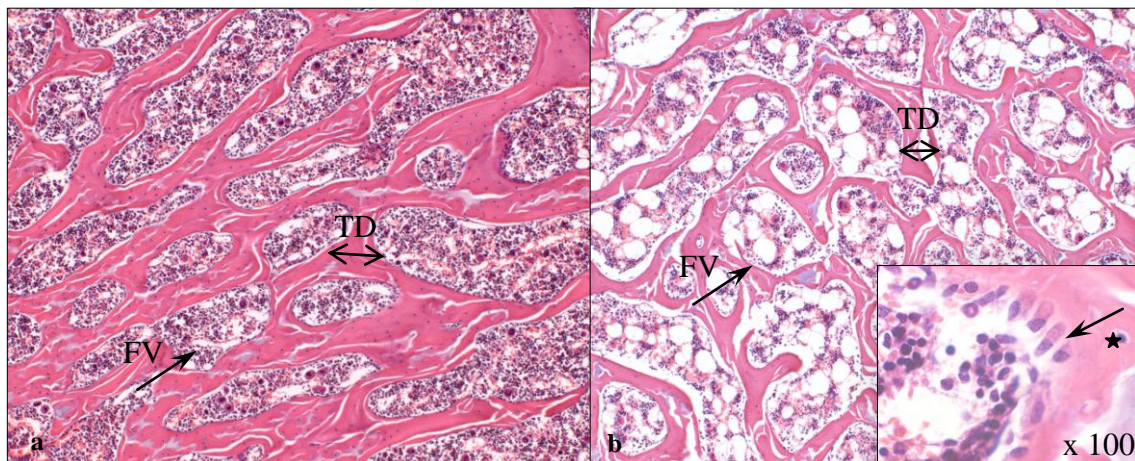


Abbildung 47 a-b: Histologische Darstellung LWK 3, H.E. a) Vergrößerung x 10, Ratte 92, Sham, Alter 26 Wochen. Dünne, aber gut verzweigte Trabekel umschließen den Markraum mit geringem Fettgehalt. b) Vergrößerung x 10, Ratte 37, OVX + Steroid, Alter 26 Wochen. Die Trabekelzwischenräume sind weit und beinhalten viel Fett. Kleiner Bildausschnitt: Ratte 16, OVX + Steroid, Alter 26 Wochen. Markiert sind hier die aktiven Osteoblasten in der typisch kubischen Form. FV= Fettvakuolen. TD= Trabekeldicke. ★ = Osteoblasten.

Die OVX + Diät-Gruppe zeigt ebenfalls eine unveränderte Substantia compacta. Im Gegensatz zur Sham-Gruppe sind die Trabekel der OVX + Diät-Gruppe zu diesem Zeitpunkt wenig verzweigt und dünn. Es ist mäßig viel Fett im weiten Trabekelzwischenraum vorhanden. Die Knorpel-Knochengrenze gleicht morphologisch der Beschreibung in der Sham-Gruppe, ebenfalls sind nur wenige Volkmann- und Haverskanäle vorhanden. Die Bone lining cells sind in einer dünnen Schicht angeordnet, es fällt auf, dass darauf eine dicke Zellschicht angeordnet ist. Es sind viele

Osteoblasten vorhanden, wohingegen wieder nur wenige Osteoklasten gefunden werden können.

Die Substantia compacta der OVX + Steroid-Gruppe ist dünner als in den beiden bereits beschriebenen Gruppen. Bei der Betrachtung dieser Schnitte ist der Fettanteil des Trabekelzwischenraums im Vergleich zu den anderen Gruppen erhöht (Abb. 47 b). Die Trabekelzwischenräume sind weit, die Trabekel sind dünn und haben wenige Verzweigungen. Die Schicht der Bone lining cells ist auch hier wieder dünn. Es sind wenige Volkmann- und Haverskanäle angeschnitten. Der Knorpel ist weitgehend in Verknöcherung begriffen und zeigt keine Auffälligkeiten bezogen auf die anderen Gruppen. Es sind viele Osteoblasten (Kleiner Bildausschnitt Abb. 47 b), aber nur wenige Osteoklasten vorhanden.

4.4 Histomorphometrie

Um die durch Osteoporose entstandene Veränderung der Mikroarchitektur nicht nur qualitativ durch die deskriptive Histologie, sondern auch quantitativ bestimmen zu können, wurde die Histomorphometrie als zusätzliche apparative Methode in die Auswertung dieser experimentellen Studie mit einbezogen, nicht zuletzt da die Analyse der Mikroarchitektur des Knochens entscheidend für das Erkennen von Stoffwechselerkrankungen ist.

Bei der histomorphometrischen Analyse wurden zwei Parameter bestimmt. Zum einen die prozentuale Fläche der Trabekel als Anteil der gesamten gemessenen Fläche, also der Area of Interest (AOI), und zum anderen die prozentuale Fläche des im Markraum des Knochens befindlichen Fettes, ebenfalls als Anteil der gesamten gemessenen Fläche.

Bei dieser quantitativen Bestimmung wurde extra eine weitere Gruppe eingeführt. Diese Gruppe stellt die Kontroll-Gruppe zum Zeitpunkt der Ovariectomie dar und beinhaltet zehn Tiere, die im Alter von 14 Wochen, ohne eine Behandlung erhalten zu haben, getötet wurden. Die anderen drei Gruppen wurden nach einem Beobachtungszeitraum von drei Monaten, also im Alter von 26 Wochen, euthanasiert und analysiert.

4.4.1 Fläche der Trabekel

Für die histomorphometrische Analyse des Trabekelgehalts der zu vermessenden Knochen wurde die Fläche der Trabekel markiert und im Verhältnis zur gemessenen Gesamtfläche analysiert. Betrachtet wurden hier das linke proximale Femur und der dritte Lendenwirbelkörper. Aufgrund der schlechten Qualität der histologischen Schnittpräparate der Kontroll-Gruppe, musste bei diesen Tieren das rechte Femur gemessen werden.

Femur:

Der Mittelwert der prozentualen Trabekelfläche im Verhältnis zur gesamten gemessenen Fläche des Femurs der Kontroll-Gruppe beträgt 43,18 +/- 5,35%.

Im Vergleich dazu beträgt der Mittelwert der Sham-Gruppe nach drei Monaten Behandlungsdauer 54,5 +/- 4,91% und ist somit mit $p < 0,01$ um 11,32% gestiegen und die höchste prozentuale Trabekelfläche der drei Gruppen.

Die prozentuale Trabekelfläche der OVX + Diät-Gruppe ist nach drei Monaten die niedrigste der drei behandelten Gruppen und beträgt 28,07 +/- 5,88%. Sie ist mit $p < 0,001$ und 26,43% geringer als der Wert der Sham-Gruppe (Tab. 40).

Gruppe	Alter in Wochen	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	14	43,18	5,35	36,5	48,5
Sham	26	54,50	4,91	46,2	58,0
OVX + Diät	26	28,07	5,88	21,5	37,5
OVX + Steroid	26	32,67	4,59	26,5	39,1

Tabelle 40: Fläche der Trabekel (%) des Femurs aller Gruppen.

Die OVX + Steroid-Gruppe liegt mit einer prozentualen Trabekelfläche von 32,67 +/- 4,59% zwischen der Sham- und der OVX + Diät-Gruppe (Abb. 48). Sie hat eine um 21,83% geringere Trabekelfläche als die Sham-Gruppe mit $p < 0,001$, aber eine um 4,6% größere Trabekelfläche als die OVX + Diät-Gruppe. Der Unterschied zwischen der OVX + Diät- und der OVX + Steroid-Gruppe ist nicht statistisch signifikant.

Vergleicht man die OVX + Steroid-Gruppe mit der Kontroll-Gruppe im Alter von 14 Wochen, so hat sie eine um 10,51% geringere Fläche der Trabekel ($p < 0,01$).

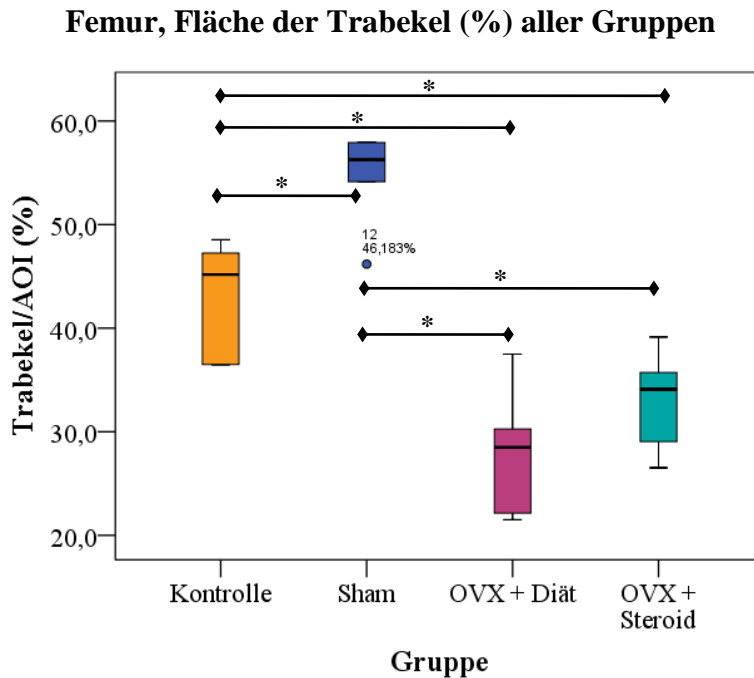


Abbildung 48: Fläche der Trabekel des Femurs aller Gruppen. Die prozentuale Fläche der Trabekel im Bereich des Femurs steigt bei der Sham-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nach drei Monaten signifikant an ($p < 0,01$). Die OVX + Diät-Gruppe weist nach drei Monaten Behandlung die niedrigste Trabekelfläche auf. Die OVX + Steroid-Gruppe zeigt im Vergleich mit der Sham-Gruppe eine um 21,83% kleinere Trabekelfläche mit $p < 0,001$.

Wirbelkörper:

Beim prozentualen Trabekelgehalt des Wirbelkörpers weist die Kontroll-Gruppe einen Wert von $43,62 \pm 5,97\%$ auf und hat somit einen mit dem prozentualen Trabekelgehalt des Femurs vergleichbar hohen Wert.

Nach drei Monaten Behandlung hat die Sham-Gruppe einen prozentualen Trabekelgehalt von $37,45 \pm 3,64\%$ und damit den höchsten Wert der drei behandelten Gruppen (Tab. 41). Im Vergleich zur Kontroll-Gruppe hat sie einen um 6,17% geringeren prozentualen Trabekelgehalt, dieser Unterschied ist allerdings nicht statistisch signifikant. Vergleicht man diese Gruppe allerdings mit der OVX + Steroid-Gruppe fällt auf, dass der prozentuale Trabekelgehalt der OVX + Steroid-Gruppe um 11,25% geringer ist mit $p < 0,01$ (Abb. 49).

Gruppe	Alter in Wochen	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	14	43,62	5,97	36,1	53,0
Sham	26	37,45	3,64	30,7	42,0
OVX + Diät	26	28,32	4,79	20,2	33,7
OVX + Steroid	26	26,20	6,04	13,8	34,3

Tabelle 41: Fläche der Trabekel (%) des Wirbelkörpers aller Gruppen.

Wirbelkörper, Fläche der Trabekel (%) aller Gruppen

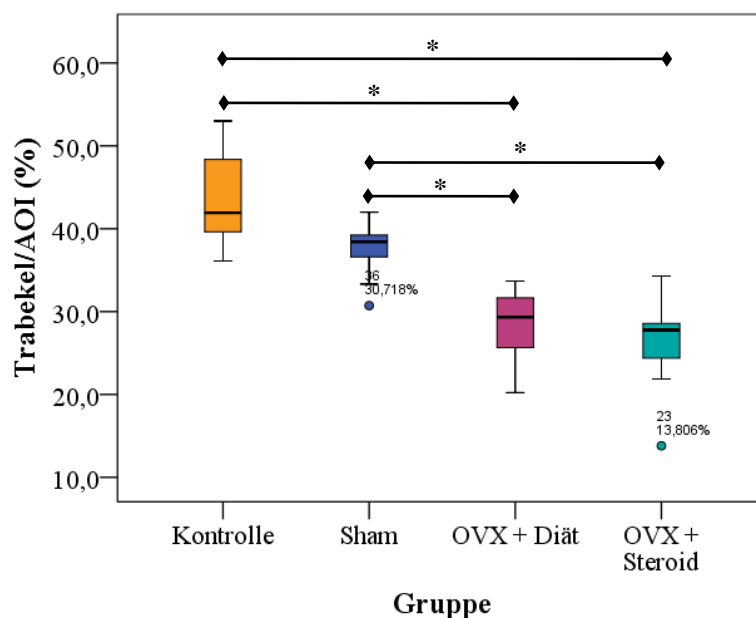


Abbildung 49: Fläche der Trabekel des Wirbelkörpers aller Gruppen. Der prozentuale Trabekelgehalt im Bereich des Wirbelkörpers sinkt bei der Sham-Gruppe nach drei Monaten Behandlung im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe. Vergleicht man die drei behandelten Gruppen, so hat die OVX + Steroid-Gruppe den geringsten prozentualen Trabekelgehalt. Der Wert der OVX + Diät-Gruppe ist verglichen mit der Sham-Gruppe signifikant gefallen ($p < 0,05$).

Die OVX + Diät-Gruppe hat im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe einen um 15,3% geringeren prozentualen Trabekelgehalt mit $p < 0,001$ und liegt mit $28,32 \pm 4,79\%$ zwischen der Sham- und der OVX + Steroid-Gruppe. Der prozentuale Trabekelgehalt der OVX + Diät-Gruppe beträgt 9,13% weniger als der Trabekelgehalt der Sham-Gruppe mit $p < 0,05$.

Die OVX + Steroid-Gruppe hat nach dreimonatiger Behandlung einen prozentualen Trabekelgehalt von 26,20 +/- 6,04% und damit den niedrigsten Wert der drei behandelten Gruppen (Abb. 49). Im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ist der Wert um 17,42% geringer mit $p < 0,001$. Die OVX + Diät-Gruppe hat einen um 2,12% höheren prozentualen Trabekelgehalt. Dieser Unterschied ist allerdings nicht statistisch signifikant.

4.4.2 Fettgehalt

Bei der histomorphometrischen Bestimmung des Fettgehalts wurde das im Markraum des Knochens befindliche Fett manuell markiert und dann im Verhältnis zur gesamten gemessenen Fläche analysiert. Durch die Fixierung der Knochen in 4% Paraformaldehydlösung wurde das im Knochenmark befindliche Fett herausgelöst und damit als leere Fettvakuole sichtbar, so dass es dann per Mausclick markiert werden konnte. Wie auch beim prozentualen Trabekelgehalt waren hier das linke Femur und der dritte Lendenwirbelkörper Gegenstand der Analyse. Auch beim Fettgehalt wurde bei der Kontroll-Gruppe das rechte Femur gemessen, da die Qualität der Schnittpräparate des linken Femurs für eine Analyse nicht ausreichend war.

Femur:

Der prozentuale Fettgehalt des Femurs bei der Kontroll-Gruppe beträgt im Alter von 14 Wochen 1,20 +/- 1,28% (Tab. 42).

Gruppe	Alter in Wochen	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	14	1,20	1,28	0,2	3,7
Sham	26	8,40	8,49	0,7	19,8
OVX + Diät	26	23,85	15,95	1,0	42,9
OVX + Steroid	26	35,99	22,67	1,3	61,1

Tabelle 42: Fettgehalt (%) des Femurs aller Gruppen.

Im Vergleich dazu hat die Sham-Gruppe einen um 7,2% höheren Fettgehalt und mit 8,40 +/- 8,49% noch den geringsten Fettgehalt der behandelten Gruppen (Abb. 50).

Die OVX + Diät-Gruppe weist einen prozentualen Fettgehalt von 23,85 +/- 15,95% auf und liegt damit 15,45% über dem Wert der Sham-Gruppe und 12,14% unter dem Mittelwert des prozentualen Fettgehalts der OVX + Steroid-Gruppe. Vergleicht man die OVX + Diät-Gruppe allerdings mit der Kontroll-Gruppe, so hat die OVX + Diät-Gruppe einen um 22,65% höheren Fettgehalt. Diese Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.

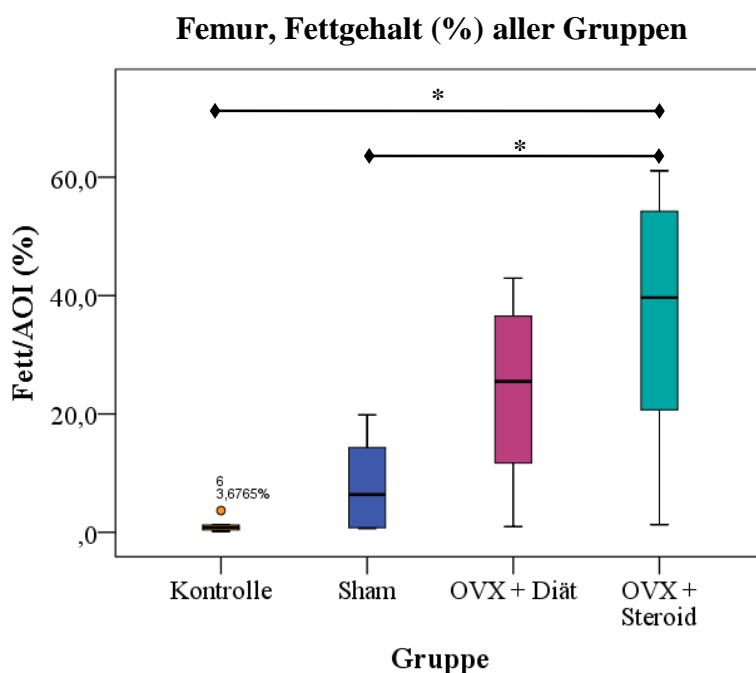


Abbildung 50: Prozentualer Fettgehalt des Femurs aller Gruppen. Die Sham-Gruppe zeigt unter den behandelten Gruppen den niedrigsten Fettgehalt und unterscheidet sich signifikant von der OVX + Steroid-Gruppe ($p < 0,05$). Die OVX + Steroid-Gruppe hat im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe einen signifikant höheren Wert mit $p < 0,01$.

Die OVX + Steroid-Gruppe zeigt mit einem prozentualen Fettgehalt von 35,99 +/- 22,67% den höchsten Fettgehalt aller analysierten Gruppen. Sie hat einen um 34,79% höheren Mittelwert in Bezug auf den Fettgehalt als die Kontroll-Gruppe mit $p < 0,01$. Auch die Sham-Gruppe weist einen um 27,59% geringeren Fettgehalt als die OVX + Steroid-Gruppe auf mit $p < 0,05$.

Wirbelkörper:

Der prozentuale Fettgehalt des Wirbelkörpers beträgt bei der Kontroll-Gruppe 3,55 +/- 2,16%.

Die Sham-Gruppe zeigt im Gegensatz zum Fettgehalt des Femurs im Bereich des Wirbelkörpers einen geringeren prozentualen Fettgehalt als die Kontrollgruppe mit einem Wert von 1,28 +/- 0,94%. Im Vergleich zur OVX + Diät-Gruppe hat die Sham-Gruppe einen um 9,25% geringeren Fettgehalt im Markraum. Diese Unterschiede sind nicht statistisch signifikant (Abb. 51).

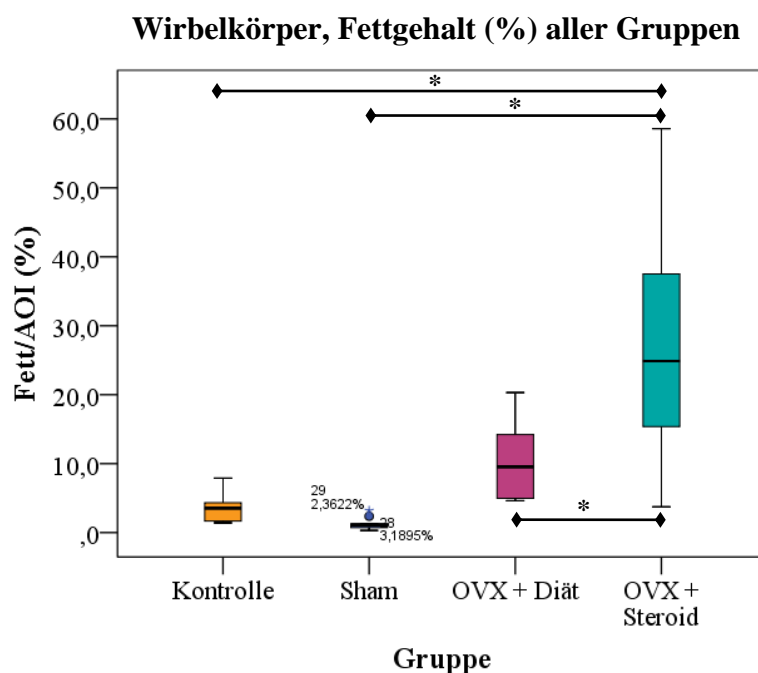


Abbildung 51: Prozentualer Fettgehalt des Wirbelkörpers aller Gruppen. Der prozentuale Fettgehalt gemessen im Verhältnis zur gesamten Fläche ist in der Sham-Gruppe am niedrigsten. Die OVX + Steroid-Gruppe hat den höchsten prozentualen Fettgehalt und unterscheidet sich signifikant von allen anderen Gruppen.

Die OVX + Diät-Gruppe hat im Vergleich zur Kontroll-Gruppe den prozentualen Fettgehalt um 6,98% gesteigert, liegt aber dennoch 16,7% unter dem Mittelwert für den prozentualen Fettgehalt der OVX + Steroid-Gruppe mit $p < 0,05$.

Die OVX + Steroid-Gruppe weist wie auch beim Femur im Bereich des Wirbelkörpers insgesamt den höchsten prozentualen Fettgehalt auf. Im Vergleich der OVX + Steroid-Gruppe mit der Kontroll-Gruppe, hat die OVX + Steroid-Gruppe einen um 23,68% höheren Fettgehalt bezogen auf die gemessene Fläche im Bereich des Wirbelkörpers mit

$p < 0,001$. Auch im Vergleich mit der Sham-Gruppe hat die OVX + Steroid-Gruppe mit $p < 0,001$ den höheren prozentualen Fettgehalt mit $27,23 \pm 17,15\%$ (Tab. 43).

Gruppe	Alter in Wochen	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Kontrolle	14	3,55	2,16	1,4	7,9
Sham	26	1,28	0,94	0,3	3,2
OVX + Diät	26	10,53	6,06	4,6	20,3
OVX + Steroid	26	27,23	17,15	3,7	58,6

Tabelle 43: Fettgehalt (%) des Wirbelkörpers aller Gruppen.

5 Diskussion

Der Dachverband Osteologie e.V. definiert die Osteoporose 2014 wie folgt: „Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine mikroarchitektonische Verschlechterung des Knochengewebes charakterisiert ist, mit einem konsekutiven Anstieg der Knochenfragilität und der Neigung zu Frakturen.“

Die Osteoporose wird unter anderem eingeteilt in die postmenopausale und die steroidinduzierte Osteoporose. Das Ziel dieser experimentellen Studie ist es, ein geeignetes Kleintiermodell für speziell diese zwei Formen der Osteoporose zu etablieren, um neue medikamentöse Therapien individuell anpassen und testen zu können.

Im Hinblick auf diese Einteilung der Osteoporose wurden drei Gruppen gebildet. Die Sham-Gruppe zeigte nach einem Beobachtungszeitraum von drei Monaten das niedrigste Körpergewicht und histomorphometrisch sowie in der DXA-Messung den niedrigsten Fettgehalt, weist aber die höchste Knochendichte und Trabekelfläche in allen gemessenen Bereichen auf. Die OVX + Diät-Gruppe, als Tiermodell für die postmenopausale Osteoporose, zeigte nach drei Monaten Behandlung das höchste Körpergewicht, aber die niedrigste Knochendichte der drei Gruppen in allen gemessenen Bereichen. Die OVX + Steroid-Gruppe (sekundäre Osteoporose) weist drei Monate nach Behandlungsbeginn in allen Bereichen eine niedrigere Knochendichte und ein geringeres Körpergewicht als die Sham-Gruppe auf. Gleichzeitig besteht aber ein deutlich gesteigerter Fettgehalt in den Bereichen Femur und Becken, sowie analog im Wirbelkörper und Femur gemessen mittels Histomorphometrie.

Das Ziel der Osteoporoseinduktion im Kleintiermodell der Ratte ist für das Modell der postmenopausalen Osteoporose durch Hormonentzug mittels Ovariectomie und Nährstoffreduktion mittels Diätgabe gelungen. Im Hinblick auf die steroidinduzierte Osteoporose konnte ein deutlicher Anstieg des Fettgehalts im Knochenmark beobachtet werden, bei einer geringeren Knochendichtereduktion. Hier bleibt ein Präparatewechsel anzustreben, um bei einem geringeren Nebenwirkungsprofil einen größeren Abfall der Knochendichte zu erreichen.

5.1 Tiermodell Ratte

Die Osteoporose als systemische Skeletterkrankung kommt auf dem natürlichen Weg nur beim Menschen und bei nichtmenschlichen Primaten vor [Egermann, Goldhahn und Schneider 2005]. Um die Pathogenese der Erkrankung besser verstehen zu können, neue Therapieansätze zu testen und prothetische Versorgungen im osteoporotischen Knochen zu bewerten [Turner 2001], ist ein geeignetes Kleintiermodell dringend nötig. Die Herausforderung besteht darin, ein Tiermodell zu finden, das den menschlichen Knochenstatus der Osteoporose bestmöglich imitiert.

Nur Primaten weisen in ihrem Zyklus eine Menopause auf, so dass es kein heimisches Tiermodell für die Knochendichtereduktion nach Verlust der Ovarialfunktion gibt, das die menschliche Situation perfekt widerspiegelt [Rodgers, Faugere und Malluche 1993]. Zu den Tiermodellen, die in der Osteoporoseforschung eingesetzt werden, gehören Hunde, Schafe, Schweine, nicht-menschliche Primaten, Hasen, Katzen, Frettchen und Nagetiere, wie Mäuse und Ratten.

Das Tiermodell der Ratte ist das am besten erforschte Kleintiermodell für Osteoporose und die ovariectomierte Ratte als Modell für postmenopausale Osteoporose ist wissenschaftlich akzeptiert [McCann et al. 2007]. Die Ratte ist leicht verfügbar, kostengünstig und gut erforscht, um die Wirkung des Östrogens und ähnlicher Substanzen, im Hinblick auf die Vermeidung von Ovariectomie abhängigem Knochenverlust, zu verstehen [Bellino 2000]. Sie weist eine kurze Lebenszeitspanne von zweieinhalb bis dreieinhalb Jahren auf, was ebenfalls besonders im Hinblick auf die Studiendauer und das Erforschen von altersbedingten Veränderungen von Vorteil ist [Turner et al. 2001; Rodgers, Faugere und Malluche 1993; Sharp und Villano 2013]. Das Genom der Ratte ist gut untersucht [Rodgers, Faugere und Malluche 1993] und die grundlegenden biologischen Mechanismen, die für den Knochenzuwachs und -verlust während des normalen Wachstums und im Erwachsenenleben, wie auch bei der Osteoporose, verantwortlich sind, sind bei Mensch und Ratte gut vergleichbar [Frost und Jee 1992]. Ebenso betrifft der Knochenverlust bei beiden Spezies mehr den trabekulären als den kortikalen Knochen [McCann et al. 2007].

In dieser experimentellen Studie wurden 60 weibliche Sprague Dawley Ratten Crl:SD (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld) im Alter von 14 Wochen analysiert. In diesem Alter ist das Skelett der Ratten noch nicht ausgewachsen und es kann dadurch eine niedrige Knochenmasse erreicht werden. Diese

niedrige Knochenmasse stellt bei der humanen Osteoporose einen bedeutenden Risikofaktor dar [Jee und Yao 2001].

Wie in den FDA-Guidelines empfohlen, wurden die Tiere zunächst ovariektomiert und danach den verschiedenen Behandlungspfaden zugeführt. Zusätzlich wurde eine Gruppe einer Schein-Operation unterzogen, um den Einfluss der Operation auf die Veränderung der Knochendichte beurteilen zu können. Auf eine nicht operierte gesunde Kontrollgruppe bei der DXA-Messung konnte verzichtet werden, da die Effekte der Operation und der dazugehörigen Behandlung keine Auswirkung auf die Veränderung des BMD (Bone Mineral Density) zeigen [Kruger und Morel 2016]. Jedoch wurde für die histomorphometrischen Untersuchungen eine zusätzliche Kontrollgruppe eingeführt, die im Alter von 14 Wochen ohne jegliche Behandlung euthanasiert wurde.

Die FDA-Guidelines fordern für die medikamentöse Prävention und Behandlung der Osteoporose präklinische Studien zur Knochenqualität. Die Knochenqualität wird durch die Architektur, Masse und Stärke des Knochens definiert. Es gibt verschiedene Messmethoden, um diese drei Charakteristika abzubilden. Wie in den Guidelines formuliert, wurde in dieser Studie für die Beurteilung der Knochenarchitektur die Histomorphometrie verwendet, die Knochendichte wurde mittels Dual X-ray Absorptiometry gemessen und bezüglich der Knochenstärke wurden biomechanische Messungen durchgeführt, die hier allerdings nur am Rande erwähnt werden sollen. Verwendet wurden Röhrenknochen (Femur und Tibia) und Wirbelkörper. Die Ratte stellt hierbei das optimale Tiermodell dar, da sie aufgrund der geringen Größe einfach in der Haltung und im Gegensatz zur Maus groß genug ist, um zum Beispiel auch neue Biomaterialien in der Fraktur-Defekt-Heilung zu testen. Außerdem ist die Größe der Ratte ausreichend, um bei der Dual X-ray Absorptiometry einzelne Knochen zu erfassen. Sie ist ein adäquates Modell, um die Veränderungen der Spongiosa im Menschen zu imitieren und zu vergleichen. Die ovariektomierte Ratte ist bestens als Kleintiermodell für die Osteoporoseforschung geeignet.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Körpergewicht

Das Körpergewicht ist ein Indikator für den Gesundheitszustand und das Verhalten der Ratten. Die Abweichung des aktuellen vom erwarteten Körpergewicht kann

Unterernährung, Überfütterung, Entwicklungsprobleme und eine Vielzahl von peripheren oder zentralen Problemen widerspiegeln [Suckow, Weisbroth und Franklin 2006]. Daher wurde es für alle Zeitpunkte und alle Gruppen bestimmt.

Zu Beginn der Studie lag das durchschnittliche Körpergewicht der 14-Wochen-alten Ratten zwischen 271,4 +/- 14,5g und 279,3 +/- 8,4g. Dieses anfängliche Körpergewicht war zwischen allen Gruppen gleichmäßig verteilt und auch mit dem durchschnittlichen Körpergewicht der Sprague Dawley Ratte in diesem Alter vereinbar.

Die ovariectomierten und mit einer Diät ernährten Tiere zeigten nach drei Monaten das höchste Körpergewicht mit einem Mittelwert von 361,3g (Tab. 44). Francisco et al. beschrieben ebenfalls, dass die ovariectomierten Ratten nach 12 Wochen schwerer waren als die Sham-operierten Tiere. In dieser Studie wurden die ovariectomierten Ratten allerdings nicht mit einer speziellen Diät ernährt. Bagi et al. und Tou et al. konnten diese Gewichtsentwicklung durch ihre Studien bestätigen.

Die Ovariectomie und der damit verbundene Hormonentzug wirken sich positiv auf das Körpergewicht aus. Östrogene sind Steroidhormone und werden im Ovar unter dem Einfluss des Follikel stimulierenden Hormons gebildet. Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist das Estradiol. Barros und Gustafsson et al. beschrieben in ihrer Studie 2011, dass Estradiol zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme und Fettanreicherung führt. Somit kann aus dem Fehlen der Estradiolproduktion bei den ovariectomierten Ratten geschlossen werden, dass es zu einer vermehrten Nahrungsaufnahme und Fettproduktion kommt. Ebenso kommt es bei ovariectomierten Ratten zu einer Zunahme des abdominalen Fettspeichers, was nach der Gabe von Estradiol wieder rückgängig ist [Liang et al. 2002]. Auch eine Hormonersatztherapie nach Eintreten der Menopause verringert die abdominale Adipositas [Salpeter et al. 2005]. Folglich kann die Erhöhung des Körpergewichts der ovariectomierten und mit Diät-behandelten Tiere auf ein Fehlen der Östrogene zurückgeführt werden.

Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Sham	333,5	17,4	307	352
OVX + Diät	361,3	22,0	327	407
OVX + Steroid	341,7	31,7	295	396

Tabelle 44: Gewicht (g) aller Gruppen im Vergleich 3 Monate nach OVX.

Das Gewicht der OVX + Steroid-Gruppe lag nach einem Beobachtungszeitraum von drei Monaten zwischen dem der Sham- und der OVX + Diät-Gruppe. Verwendet wurde Dexamethason-21-isonicotinat, da es durch seine Depotwirkung und die Möglichkeit der intramuskulären Injektion einfach in der Handhabung ist. Dieser Wirkstoff ist ein stark wirksames Kortikosteroid [Institut für Veterinärpharmakologie und –toxikologie, 2012]. Da es ein langwirksames Präparat ist, war lediglich eine Injektion in drei Wochen nötig. Außerdem sei die mineralokortikoide Wirkung des Präparates nur gering ausgeprägt. Nach einer Beobachtungszeit von drei Monaten entwickelten die Ratten dieser Gruppe allerdings einen eher cushinoiden Habitus mit Muskelatrophie und struppigem Fell. Sie waren im Vergleich zu den Tieren anderer Gruppen eher träge. Aufgrund dieser starken unerwünschten Nebenwirkungen wurde in weiterführenden Studien auf Methylprednisolon gewechselt [El Khassawna et al. 2017].

5.2.2 Knochendichtebestimmung

Methodik

Die Dual X-ray Absorptiometry ist neben der Anamnese, einer ausführlichen körperlichen Untersuchung und der Labordiagnostik das einzige vom Dachverband der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften (DVO) empfohlene Verfahren zur Osteoporosediagnostik. Es ist kostengünstig durchzuführen, hat eine geringe Strahlenbelastung und ist aufgrund der Nicht-Invasivität besonders für die Mehrfachmessungen am Tiermodell geeignet. Mittels Dual X-ray Absorptiometry kann auch der Behandlungserfolg einer medikamentösen Therapie überwacht werden. Diese Methode eignet sich somit hervorragend für die Einschätzung des Behandlungserfolges in dieser Studie.

Die Knochenfestigkeit wird zu 70-75% durch die Knochendichte bestimmt. Der verbleibende Anteil wird durch die Knochenarchitektur und andere Faktoren variiert [Krug, Burghardt und Majumdar 2010]. Die Bestimmung der Knochendichte als Bone Mineral Density (BMD) ist daher ein geeignetes Verfahren, um den bestehenden Knochenstatus abzubilden.

Es gibt verschiedene Methoden die Knochendichte zu bestimmen. Hierzu gehören verschiedene Formen der Computertomographie, unter anderem die periphere quantitative Computertomographie (pQCT), die hochauflösende periphere quantitative

Computertomographie (HR-pQCT) und die volumetrische quantitative Computertomographie (vQCT). Das Magnetic Resonance Imaging (MRI), die Mikro-Computer-Tomographie (μ CT) und natürlich die Dual X-ray Absorptiometry (DXA) sind weitere Methoden zur Bestimmung der Knochendichte.

Das pQCT arbeitet mit einer höheren Dosis der ionisierenden Strahlung und erlaubt die Differenzierung zwischen kortikalem und trabekulärem Knochen [Adams 2009]. Ein Nachteil dieser und vieler anderer Methoden ist es, dass die WHO-Definition der Osteoporose nur auf die DXA-Messung angewendet werden kann [Adams 2009].

Das vQCT erlaubt die Untersuchung diverser Knochengemetrien im dreidimensionalen Raum und kann wie die pQCT auch zwischen Kortikalis und Spongiosa differenzieren [Krug, Burghardt und Majumdar 2010].

Das Mikro-CT erlaubt die Analyse von Knochenbiopsien mit einer isotropen Voxelgröße von $8\mu\text{m}$ [Krug, Burghardt und Majumdar 2010]. Es ist eine dreidimensionale Messmethode, die mineralisiertes Gewebe positiv kontrastiert. Nachteilig dabei ist sowohl die Invasivität, sowie die Limitation auf kleine Messbereiche.

Bei der peripheren quantitativen Computertomographie (HR-pQCT) kann eine isotrope Voxelgröße von bis zu $41\mu\text{m}$ aufgelöst werden.

Das Magnetic Resonance Imaging (MRI) ist eine *in vivo*-Messmethode, die nicht invasiv und ohne ionisierende Strahlung arbeitet [Krug, Burghardt und Majumdar 2010]. Sie ermöglicht sowohl den Informationsgewinn bezüglich Knochenstruktur, Topologie und Orientierung des trabekulären Netzwerkes, als auch der Dicke der Kortikalis.

Die Dual X-ray Absorptiometry ist ein zweidimensionales Verfahren zur Knochendichtemessung. Es ist das am weitesten verbreitete Verfahren in der Osteodensitometrie und arbeitet mit Röntgenstrahlen und deren Absorption im Gewebe. Die Knochendichte, gemessen als Bone Mineral Density, wird hierbei in einer zuvor definierten Fläche gemessen. Somit wird die Knochendichte der Kortikalis und des trabekulären Knochens gemeinsam ermittelt. Die DXA-Messung nutzt 2 Photonenstrahlen unterschiedlicher Energie, die je nach Absorptionsverhalten der gemessenen Materie unterschiedlich stark abgeschwächt werden. Aus den nicht absorbierten Strahlungen kann die Knochendichte bestimmt werden. Bei der

Knochendichtemessung werden der Knochen selbst, in Form von Hydroxylapatit, und die umgebenden Weichteile gemessen [Blake und Fogelman 2010].

Der große Vorteil dieser Methode besteht darin, dass mehrere Messungen an einem Tier möglich sind, da es eine nicht invasive Methode ist und beim Tiermodell lediglich eine kurze Narkose erfordert. So können verschiedene Einflüsse auf den Knochenstatus über eine bestimmte Zeitspanne beobachtet werden. Auch die Ganzkörpermessung ist durch die Nutzung einer speziellen Kleintiersoftware möglich.

Beim Menschen ermöglicht diese Methode die Diagnosestellung der Osteoporose, die Berechnung des Frakturrisikos, sowie die Überwachung, ob ein Osteoporose-Medikament die erwünschte Wirkung zeigt [Blake und Fogelman 2010].

Um die Übertragbarkeit der Studienergebnisse auf den Menschen zu gewährleisten, wurde die Dual X-ray Absorptiometry für diese Studie als Standardverfahren ausgewählt. Nur bei dieser Methode ist die Berechnung des T-Scores, der zur Einstufung der Osteoporose und zur Berechnung der Frakturwahrscheinlichkeit genutzt werden kann, möglich. Die DXA-Messung ist auch zeitlich den anderen Methoden überlegen, da nur einige Minuten für die Bestimmung des BMD benötigt werden. Die DXA-Messung benötigt im Vergleich zum QCT nur 1/30 der Röntgenstrahlung, was auch im Hinblick auf den Strahlenschutz von Vorteil ist [Grier, Turner und Alvis 1996]. Ein Nachteil der Dual X-ray Absorptiometry ist gewiss die Zweidimensionalität, die das reale Volumen des Knochens nicht erfasst.

Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei wiederholten Messungen wird erhöht, wenn die Fläche der Region of Interest (ROI) unverändert bleibt, so können auch Einflüsse durch das natürliche Knochenwachstum ausgeschaltet werden [Grier, Turner und Alvis 1996]. In dieser Studie wurden deshalb für alle Messungen die ROIs beibehalten. Lediglich bei der Messung der Wirbelsäule musste aufgrund des Größenwachstums der Ratten eine minimale Anpassung des ROIs bei den Messzeitpunkten nach vier Wochen, sowie drei Monaten vorgenommen werden (Tab. 5, Seite 30).

Ein kritischer Punkt bei der Durchführung der Messungen war die identische Positionierung der Versuchstiere auf dem DXA-Tisch [Grier, Turner und Alvis 1996]. Die Dual X-ray Absorptiometry wandelt zur Bestimmung der Knochendichte einen dreidimensionalen Knochen in ein zweidimensionales Bild um. Dieser Knochen kann abhängig von der Form und der Position bei mehrfachen Messungen unterschiedliche Knochendichten aufweisen. Bei der Durchführung der Messungen wurde darauf

geachtet, dass die Versuchstiere immer in der gleichen Art und Weise auf dem Tisch gelagert wurden. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Messungen zu erreichen, wäre eine Einspannvorrichtung oder Schablone empfehlenswert gewesen. Der Nachteil dabei ist allerdings, dass ein Material gefunden werden muss, welches Röntgenstrahlen nicht in großem Maße abschwächt oder Artefakte in den Messbildern erzeugt. Um diese Fehler auszuschließen, wurde in der vorliegenden experimentellen Studie bewusst darauf verzichtet.

Eine weitere Maßnahme, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhöhen, ist die Mehrfachmessung eines Tieres mit zwischenzeitlicher Neupositionierung. Aus den Ergebnissen der Mehrfachmessungen könnte dann der Mittelwert berechnet werden, der anschließend zu vergleichen wäre [Grier, Turner und Alvis 1996].

Die Sensitivität der Messergebnisse kann durch den Vergleich des gemessenen BMD eines Knochens inklusive des umgebenden Bindegewebes mit einer isolierten Knochen *ex vivo* erhöht werden, indem die gemessenen Knochen, jeweils vom Bindegewebe befreit, erneut gemessen werden [Grier, Turner und Alvis 1996]. Eine solche Verbesserung der Sensitivität der Messergebnisse stellt für diese Langzeitstudie keine Lösung dar. Es wurde bewusst eine Methode gewählt, die wiederholte Messungen über einen Zeitraum von drei Monaten erlaubt, daher wurde auch auf invasivere Methoden verzichtet.

Die Messbeständigkeit des Gerätes wurde durch tägliche Messungen des Phantoms gewährleistet. Trotzdem kann die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch die Messung des BMD (Bone Mineral Density) anstelle des BMC (Bone Mineral Content) verbessert werden. Um die Streuung der Ergebnisse so klein wie möglich zu halten, wurden in dieser Studie alle Messungen und Auswertungen von einer Person vorgenommen, da die Ergebnisschwankungen hierdurch reduziert werden können [Grier, Turner und Alvis 1996].

Im Gegensatz zum Mikro-CT bietet die DXA-Messung den Vorteil eine Ganzkörpermessung vornehmen zu können. Das Mikro-CT kann Objekte einer Größe von bis zu 5-10µm erfassen [Engelke et al. 1999]. Allerdings ist die maximale Probengröße begrenzt, was in Bezug auf die Vergleichbarkeit mit dem Menschen ein immenser Nachteil ist. Daher wurde in dieser Studie bewusst auf das Mikro-CT als Methode der Knochendichtemessung verzichtet.

Trotzdem treten bei der DXA-Messung auch Fehlerquellen auf. Hier wäre beispielsweise die fehlende Kontrolle nicht-operierter Tiere zu nennen. Um die Tieranzahl möglichst gering zu halten, wurde auf eine solche Kontrollgruppe verzichtet, zumal die Effekte der Operation und der dazugehörigen Behandlung keine Auswirkung auf die Veränderung des BMD (Bone Mineral Density) zeigen [Kruger und Morel 2016]. Daher erfolgte der Vergleich der Ergebnisse der DXA-Messung nur an einem Messzeitpunkt zwischen den Gruppen oder im Vergleich der Messzeitpunkte innerhalb einer Gruppe. Um äußere Einflussfaktoren sicher auszuschließen, wäre eine Gruppe mit nicht-operierten Kontrolltieren, die eine Standard-Ernährung erhalten, sinnvoll gewesen.

Ergebnisse BMD

1. Sham-Gruppe:

Die Bone Mineral Density der Sham-Gruppe stieg nach Sham-Operation und drei Monaten ohne Behandlung bezogen auf die anatomischen Bereiche Femur, Becken, Wirbelsäule und ganzer Körper signifikant an. Auch der Bereich der Tibia zeigte einen tendenziellen Anstieg, der allerdings nicht statistisch signifikant ist. Francisco et al. konnten ebenfalls einen Anstieg des BMD in den Bereichen der proximalen Tibia und des proximalen Femur nachweisen. In dieser Studie wurden die Ratten bereits im Alter von 12 Wochen, also zwei Wochen früher operiert. Es wurden Wistar-Ratten anstelle Sprague Dawley Ratten verwendet. Die Studie von Kishi et al. belegt ebenso den Anstieg des BMD in der Sham-Gruppe im Zeitverlauf von drei Monaten. In dieser Studie wurden sechs Monate alte weibliche Wistar-Ratten zwei Versuchsaugen zugeführt. Ein Teil der Ratten wurde ovariektomiert, der andere Teil wurde Sham operiert. Im Zeitverlauf nach drei Monaten konnte ein leichter Anstieg des BMD in den Bereichen Lumbalwirbelkörper, distaler Femur und proximale Tibia dokumentiert werden [Kishi et al. 1998].

Der Anstieg des BMD in der Sham-Gruppe kann durch einen signifikanten Anstieg der histomorphometrisch gemessenen Trabekelfläche nach drei Monaten Beobachtungszeit erklärt werden. Diese Aussage gilt zumindest für den Bereich des Femur (Abb. 48, Seite 78). Im Bereich des Lendenwirbelkörpers war eine negative Tendenz zu beobachten, die allerdings nicht statistisch signifikant war.

Fang et al. konnten zeigen, dass der BMD der LWK 5 und LWK 6 (sechsgliedrige Lendenwirbelsäule als anatomische Besonderheit der Ratten) nach Sham Operation im Alter von sechs Monaten bei Sprague Dawley Ratten noch bis zu einem Alter von 14 Monaten ansteigt, erst dann scheint die höchste Knochendichte erreicht zu sein. Anschließend fällt die Knochendichte im Zeitverlauf ab.

2. OVX + Diät-Gruppe:

Die Kombination aus bilateraler Ovariectomie und einer calcium-, Vitamin D- und phosphatarmen Diät senkte die Knochendichte der Sprague Dawley Ratten nach drei Monaten signifikant bezogen auf alle in dieser Studie gemessenen Bereiche. Der größte Knochendichteverlust ergab sich nach drei Monaten bei der Tibia im Vergleich zum Ausgangswert. Auch Jee beschrieb 2001 den frühesten Knochendichteverlust in der Tibia. Dieser trat bereits nach 14 Tagen ein, nach 30-60 Tagen betrug der Verlust der Knochenmasse 50%.

Die postmenopausale Osteoporose wurde in der vorliegenden Studie durch die Ovariectomie der Ratten simuliert. Im Ovar, genauer in den Thekazellen und Granulosazellen, und der Nebennierenrinde werden Steroidhormone, die Östrogene, produziert. Östrogene fördern neben verschiedenen anderen Wirkungen die Osteoblastentätigkeit, so dass sich der Verlust von Knochenmasse nach der Menopause oder hier im Modell nach der Ovariectomie durch den Mangel an Östrogenen erklären lässt [Silbernagl und Despopoulos 2007]. Nach der Ovariectomie übersteigt die Knochenresorption die Knochenformation, dieser Vorgang resultiert in einer niedrigen Knochenmasse [Lelovas et al. 2008]. Das Fehlen des Östrogens im Stoffwechsel der postmenopausalen Frauen führt zu einer verringerten Calciumaufnahme und -bereitstellung und bedingt einen osteoporotischen Knochenstatus bei älteren Frauen [Jagtap, Ganu und Nagane 2011]. Die wichtigste Funktion der Steroidhormone ist es die Knochenformation zu verhindern, indem sie auf die Differenzierung, die Aktivität und die Lebensdauer der Osteoblasten und Osteozyten Einfluss nehmen und das Überleben der Osteoklasten unterstützen [Santos et al. 2008, Bitto et al. 2009].

Die ovariectomierte Ratte ist in der Osteoporoseforschung ein anerkanntes Tiermodell [Lelovas et al. 2008]. Der Osteoporose liegt eine multifaktorielle Genese zugrunde, die beim Tiermodell der ovariectomierten Ratte nicht ausreichend dargestellt und untersucht

werden kann. Daher wurden in dieser Studie auch die nutritiven Aspekte der Osteoporoseentstehung beachtet, indem zusätzlich zur Ovariectomie eine spezielle Diät verabreicht wurde, die unter anderem calciumarm war [El Khassawna et al. 2013]. Es ist bewiesen, dass eine calciumarme Diät bei Ratten einen signifikanten Knochenverlust verursacht [Lindgren, Merchant und DeLuca 1982; Gruber und Stover 1994].

Calcium ist ein zweiwertiges Kation, das 1,9% unseres Körpergewichtes ausmacht [Nordin 1976]. 99% des Calciums im Körper befindet sich im Knochenskelett, hier macht es 25% des Trockengewichtes des Knochens aus. Der menschliche Organismus absorbiert Calcium aus dem Darm oder resorbiert es aus dem Knochen. Ausgeschieden wird Calcium über den Gastrointestinaltrakt, die Niere oder die Haut und es wird mittels Knochenformation in den Knochen eingebaut [FAO/WHO 2001]. Der Calciumhaushalt wird mittels eines Rückkopplungsmechanismus der Calciumrezeptoren in der Nebenschilddrüse gesteuert, der die Ausschüttung von Parathormon reguliert [Brown und Hebert 1997]. Das Parathormon beeinflusst die tubuläre Calcium-Reabsorption in der Niere, fördert die intestinale Calciumabsorption und falls nötig wird Calcium aus dem Knochen resorbiert. Diese Regulationsmechanismen sind Vitamin D-abhängig. Es ist eine etablierte Methode Osteoporose im Tiermodell mittels Calcium-defizitärer Diät zu erzeugen [FAO/WHO 2001], daher erfolgte eine Kalziumrestriktion der Nahrung auf ein notwendiges Minimum.

In der Menopause steigt die Calciumausscheidung im Urin. Es kommt zu einem mäßigen Anstieg von ionisiertem Calcium im Serum ohne Anstieg des PTH und einem erheblichen Abfall der intestinalen Calciumabsorption [Nordin et al. 2004, 1999]. Dies lässt auf eine negative Calcium Balance schließen, die den durchschnittlichen Knochenverlust von 0,5-1% pro Jahr nach der Menopause erklärt. Zusätzlich wird auch die Knochenresorption gesteigert [FAO/WHO 2001].

Die Diät war nicht nur Calcium-, sondern ebenfalls Vitamin D3-arm. Vitamin D ist in seiner aktivierten Form, dem 1,25 Dihydroxyvitamin D [1,25 (OH)₂D], auch genannt Calcitriol, für einen normalen Calciumspiegel im Blut und die Knochenmineralisation verantwortlich [FDA/WHO 2001]. Calcitriol ist das doppelt hydroxylierte Vitamin D3, das von tierischen Organismen aus Cholesterin synthetisiert werden kann. Es steigert die Resorption von Calcium in Darm und Niere bis auf 90% und erhöht so den Blutcalciumspiegel. Bei einer ausgeglichenen Calcium Bilanz wird das mit der Nahrung

aufgenommene Calcium größtenteils über den Stuhl ausgeschieden. Das im Blut befindliche Calcitriol ist an dem Vitamin D-bindenden Protein gebunden. Freies Calcitriol passiert die Plasmamembran und interagiert mit dem Vitamin-D-Rezeptor [Haussler 1986], dieser Komplex bindet an ein Vitamin D responsives Element und führt mit assoziierten Transkriptionsfaktoren zu der Steigerung der mRNA Transkription, die für die Kodierung der Kalziumtransportproteine, Knochenmatrixproteine und Zellzyklus-Regulationsproteine zuständig ist [Jones, Strugnell und DeLuca 1998]. Calcitriol ist so auch für den Aufbau des Knochens verantwortlich, daher wird auch die Phosphatresorption gefördert. Über einen Anstieg des Calcium-Phosphat-Ionenproduktes wird die Mineralisation des Knochens verstärkt. Vitamin D3 ist die Vorstufe des Calcitriols und wird im menschlichen Organismus entweder mit der Nahrung aufgenommen oder unter dem Einfluss von UV-Strahlen in der Haut aus 7-Dehydrocholesterin gebildet. Durch Hydroxylierung in der Leber entsteht Calcidiol, das dann in der Niere durch die 1- α -Hydroxylase zum wirksamen Calcitriol umgewandelt wird. Der Calcitriolspiegel wird durch das Parathormon, das bei Hypocalcämie ausgeschüttet wird, durch Hypophosphatämie oder Prolactin geregelt [Huppelsberg und Walter 2005].

Der Mangel an Vitamin D3 führt bei Erwachsenen zu dem Krankheitsbild der Osteomalazie, das durch eine mangelnde Knochenmineralisation charakterisiert ist. Somit wird klar, dass in dieser Studie auch auf dieses Vitamin in der Nahrung verzichtet wurde, um eine möglichst niedrige Knochenmasse zu erreichen.

Vitamin K, auch genannt Menachinon, ist ein fettlösliches Vitamin, das als Kofaktor bei der Bildung von γ -Carboxyglutamat (Gla) benötigt wird. Osteoblasten produzieren drei verschiedene Gla enthaltende Proteine: Osteocalcin, Matrix Gla-Protein und Protein S. Nach der Sekretion aus der Zelle bleiben diese Proteine an der Hydroxylapatit-Oberfläche des Knochens gebunden, die genaue Funktion ist jedoch unklar.

Osteocalcin ist ein Calcium bindendes Protein, das bei steigender Knochendichte vermehrt nachgewiesen werden kann [Hauschka et al. 1989]. Im Knochen bindet Osteocalcin an der mineralisierten Matrix. Das carboxyterminale Ende des Osteocalcins hat eine chemisch anziehende Aktivität für Osteoclasten Progenitor Zellen, die eine Rolle bei der Knochenresorption spielen. Es wird angenommen, dass Osteocalcin eine modulierende Wirkung auf das Knochenremodeling hat [Binkley und Suttie 1995].

Diese Hypothese unterstützend konnte Lian in einem Tierversuch an Ratten 1984 zeigen, dass Osteocalcin defizitärer Knochen bei subcutaner Implantation gegen Resorptionsvorgänge resistent ist [Lian, Tassinari und Glowacki 1984]. Bei Osteoporose-Patienten konnte ein um 50% erhöhter Gla-Spiegel im Urin im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt werden, wobei der Serum Osteocalcin-Spiegel normal war [Gundberg et al. 1983].

Eine Assoziation zwischen einer suboptimalen Vitamin K-Versorgung und einem erhöhten Knochenbruchrisiko ist wahrscheinlich [FDA/WHO 2001]. So wurde auch bei älteren Osteoporose-Patienten mit einer Schenkelhalsfraktur festgestellt, dass die Vitamin-K-Konzentration auf ein Drittel der Normalbevölkerung gesunken war [Hauschka et al. 1989].

Auch bei der Synthese der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X stellt Vitamin K einen essentiellen Kofaktor bei der γ -Karboxylierung dar [Huppelsberg und Walter 2005; Klinke, Pape und Silbernagl 2005]. Auf diesen Aspekt der Wirkung soll hier bei fehlender Relevanz für diese Studie aber nicht weiter eingegangen werden.

Des Weiteren war die verabreichte Diät auch phosphorarm. Phosphat, somit die oxidierte Form des Phosphors, wird im proximalen Tubulus der Niere resorbiert. Bei gesunden Menschen führt ein Phosphor-Mangel zu einer Calciummobilisation aus dem Knochen und einer vermehrter Calciumausscheidung im Urin [Takeda et al. 2012].

Osteoporose liegt per definitionem (WHO) vor, wenn der mittels DXA ermittelte T-Wert $\leq -2,5$ beträgt. Dies betrifft etwa 15% der postmenopausalen Frauen im Alter 50-60 Jahre. Im Alter von 70 Jahren steigt die Prävalenz auf 45% an [DVO 2014]. Das bedeutet, dass beinahe jede zweite postmenopausale Frau in Deutschland unter Osteoporose leidet, was die Bedeutung der Osteoporoseforschung unterstreicht.

Osteoporotische Frakturen betreffen vor allem die Hüfte, die Wirbelsäule und den Unterarm [WHO Scientific Group 2003].

In Bezug auf den Femurknochen konnte eine Knochendichtereduktion nach drei Monaten von 11,29% erreicht werden, bei der Wirbelsäule betrug die Reduktion 15,54%. Auch Gala et al. konnten 2001 bei ovariektomierten Ratten drei Monate nach OVX im Bereich des Femurs einen signifikanten Abfall des BMD um 21,4% bezogen

auf die Sham-Gruppe beobachten. Auch im Bereich der Wirbelsäule wurde hier eine Reduktion des BMD um 19,5% verglichen mit der Sham-Gruppe erreicht.

Die Knochendichtereduktion der Tibia betrug nach drei Monaten Beobachtungszeitraum 16,03% und war im Vergleich zu den anderen Bereichen die höchste Reduktion. Francisco et al. haben diesen Knochendichteverlust 2010 ebenfalls beobachten können. In dieser Vergleichsstudie wurden weibliche Wistar-Ratten im Alter von 12 Wochen ovariectomiert oder sham-operiert und die Knochendichte wurde unter anderem nach zwei, fünf, zehn und 15 Wochen untersucht. Hier konnte auch ein signifikanter Verlust des BMD in der Tibia und dem Femur drei Monate nach Ovariectomie beobachtet werden [Francisco et al. 2010]. Auch Miyagawa et al. wiesen 2011 bei weiblichen ovariectomierten Wistar-Ratten einen signifikanten Verlust des BMD mit $p < 0,001$ bezogen auf die Tibia 15 Wochen nach Ovariectomie nach.

Insgesamt nahm die Knochendichte aller gemessenen Bereiche nach drei Monaten im Vergleich zur Sham-Gruppe um über 20% ab. Bei der Berechnung des zugehörigen T-Wert, liegen alle gemessenen Bereiche der OVX + Diät-Gruppe unter 2,5 [Heiss et al. 2012]. Dieser Wert definiert nach den WHO Richtlinien die Osteoporose beim Menschen. Somit wurde mit der Methode der Ovariectomie plus der Diätgabe ein suffizientes Tiermodell für die Erforschung der Osteoporose und deren Behandlung etabliert.

3. OVX + Steroid-Gruppe:

Die Tiere der OVX + Steroid-Gruppe wurden nach 14 Wochen wie die OVX + Diät-Gruppe ovariectomiert und erhielten Standardfutter. Alle drei Wochen wurde eine subcutane Steroidinjektion mit einem Depotpräparat (Voren® Depot) vorgenommen. Hierfür wurde der Wirkstoff Dexamethason-21-isonicotinat verwendet. Dies ist ein stark wirksames Kortikosteroid mit langer Wirkungsdauer. Dexamethason hat eine 30-fach stärkere glukokortikoide Wirkung als Cortisol, während die mineralokortikoide Wirkung zu vernachlässigen ist [CliniPharm, CliniTox 2016].

Die Knochendichte fiel in dieser Gruppe nach vier Wochen nur in den Bereichen Becken und gesamter Körper signifikant ab. Nach drei Monaten Beobachtungszeitraum war lediglich eine signifikante Reduktion in den Bereichen Wirbelsäule und gesamter Körper zu beobachten. Im Vergleich mit der Sham-Gruppe zeigte die OVX + Steroid-Gruppe allerdings einen signifikant niedrigeren BMD in allen gemessenen Bereichen.

Ahmed et al. 2012 konnten durch die orale Gabe von 5mg/kg KG Prednisolon täglich bei ausgewachsenen Sprague Dawley Ratten, eine signifikante Minderung des BMD des Femurs über einen Beobachtungszeitraum von sechs Monaten im Vergleich zur Kontrollgruppe induzieren. Auch Liu et al. 2012 zeigten an dem Tiermodell des Hasen, dass die Ovariectomie in Kombination mit der Glucocorticoidgabe (Methylprednisolon 1mg/kg KG tgl.) über einen Zeitraum von vier Wochen zu einem signifikanten Abfall des BMD der Lendenwirbelkörper und der Femurkondyle führt.

Die dauerhafte orale Glukokortikoidtherapie ist die Hauptursache der sekundären Osteoporose [Albaum et al. 2014]. Weltweit erhalten 1-3% der Erwachsenen eine dauerhafte Therapie mit Glukokortikoiden [Kim et al. 2009], wobei wiederum 30-50% dieser Patienten auch eine Fraktur erleiden [Cohen et al. 1999; Wallach et al. 2000; Angeli et al. 2006, Böcker et al. 2014]. Die Ursache ist eine Veränderung des Knochenmetabolismus durch Glukokortikoide [Egermann, Goldhahn und Schneider 2005]. Die Reduktion des BMD kann durch die Induktion der Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten erklärt werden, was wiederum zu einer geringeren Knochenformation führt [Migliaccio et al. 2007]. Deswegen wurde im Teilprojekt T1 des SFB/TRR 79 auch die Osteoklastenzahl untersucht, die bei den OVX + Steroid Tieren im Bereich des Lendenwirbelkörpers signifikant angestiegen waren [Böcker et al. 2014]. Auch die Biomechanik der Lendenwirbelkörper wurde untersucht, hierbei ergab sich eine signifikant geringere Kompressionskraft der Wirbelkörper der OVX + Steroid-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe [Böcker et al. 2014]. Beim humanen Knochen ist nach einer Steroidtherapie ein signifikanter Abfall des BMD des Femurs und der Lendenwirbelsäule zu beobachten [Reid et al. 1992; Buckley et al. 1995]. Somit wurde gezeigt, dass die Osteoporoseinduktion am Tiermodell der Ratte auch anhand des Steroidmodells gelungen ist und in Zukunft weitere Testungen medikamentöser Therapien gegen Osteoporose an diesem Modell angewendet werden können.

Abschließend bleibt zu sagen, dass die unerwünschten Nebenwirkungen des Dexamethasons sehr stark ausgeprägt waren. Dies äußerte sich in einem cushinoiden Habitus der Ratten mit Umverteilung des Fettes, Muskelatrophie und struppigem Fell. Daher sollte für weiterführende Studien ein alternatives Präparat Verwendung finden, auch wenn negative Konsequenzen bei der Applizierbarkeit entstehen.

Ergebnisse prozentualer Fettgehalt

In der Sham-Gruppe stieg der prozentuale Fettgehalt im Bereich der Tibia nach einem Monat signifikant an. In den Bereichen Wirbelsäule und gesamter Körper war nach drei Monaten ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen, wobei auch parallel das Körpergewicht und die Knochendichte anstiegen.

Nach drei Monaten war der prozentuale Fettgehalt des Gewebes in der OVX + Diät-Gruppe in allen Bereichen, außer der Tibia, signifikant gestiegen. Nach einem Monat war der Fettgehalt bei der Wirbelsäule und dem gesamten Körper bereits signifikant erhöht. Zu keinem Zeitpunkt ließ sich ein signifikanter Unterschied der OVX + Diät-Gruppe verglichen mit der Sham Gruppe aufzeigen.

Die OVX + Steroid-Gruppe zeigte einen signifikanten Anstieg des prozentualen Fettgehalts nach drei Monaten bezogen auf die Wirbelsäule und den gesamten Körper. Auch hier ergab sich kein relevanter Unterschied zur Sham-Gruppe.

In dem Bereich der Tibia unterschied sich die OVX + Diät-Gruppe zum Zeitpunkt nach drei Monaten signifikant von der OVX + Steroid-Gruppe, wobei der prozentuale Fettgehalt der OVX + Diät-Gruppe deutlich höher lag. Nach einem Monat war bezogen auf das Femur der prozentuale Fettgehalt der OVX + Steroid-Gruppe deutlich höher als der Wert der OVX + Diät-Gruppe.

5.2.3 Histomorphometrische Analysen

Die histomorphometrische Analyse ist eine quantitative Methode zur Beurteilung der Knochenstruktur auf histologischen Schnittpräparaten [Gerstenfeld et al. 2005]. Die Osteoporose wird durch zwei Charakteristika definiert, zum einen eine verminderte Knochendichte, die mittels Dual X-ray Absorptiometry gemessen werden kann, zum anderen durch eine Veränderung der Mikroarchitektur, die mittels Histomorphometrie beurteilt werden kann. Die Analyse der Mikroarchitektur des Knochens ist entscheidend für das Erkennen von Stoffwechselerkrankungen wie der Osteoporose [Vidal et al. 2012]. Die Histologie kann benutzt werden, um eine zweidimensionale Auswertung der Knochenmasse und Architektur zu erhalten [Turner et al. 2001]. Diese Methode hat eine wesentlich größere Auflösung als die Densitometrie und die meisten alternativen bildgebenden Verfahren [Turner et al. 2001].

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der histomorphometrischen Untersuchung des Knochens. In dieser Studie wurde die Histomorphometrie an H.E. gefärbten Paraffinschnitten nach dem Beispiel von Safadi 1988 durchgeführt. Die Proben wurden zuerst in 4% Paraformaldehydlösung fixiert, in Phosphatpuffer (pH 7,2) gespült, in EDTA Lösung entkalkt und in einen Paraffinblock eingegossen [Safadi et al. 1988]. Eine andere Möglichkeit ist das Färben der Paraffinschnitte mit TRAP (Tartrat Resistente Alkalische Phosphatase), auch diese Methode wurde im Zuge der Studie angewendet, findet hier allerdings keine Erwähnung.

Es wurde eine Schnittdicke von 4-6 μm gewählt, da strukturelle und statische Parameter analysiert werden sollten [Vidal et al. 2012]. Die Schnitte wurden im Anschluss unter Zuhilfenahme eines Pinsels faltenfrei auf einen Objektträger aufgebracht [Vidal et al. 2012].

Bei der histomorphometrischen Analyse wurden der dritte Lendenwirbelkörper und das linke Femur untersucht, weil die zwei wichtigsten Bereiche für osteoporotische Frakturen beim Menschen die Wirbelkörper und der femorale Schenkelhals sind [Mosekilde 1995]. Wichtig bei der Analyse der Proben war, dass die ausgewählte Area of Interest für alle untersuchten Schnitte gleich blieb [Vidal et al. 2012]. Dies konnte durch die isolierte Messung des spongiösen Knochens erreicht werden. Die Kortikalis, mögliche Artefakte und die Epiphysenfuge wurden aus der AOI ausgeschlossen. Bei dem Femur wurde ein Bereich aus der proximalen Metaphysenregion ausgewählt, wobei auch hier knorpelige Anteile und der Femurkopf keine Beachtung fanden. Vom Wirbelkörper wurde der Arcus vertebrae ausgespart und die AOI wurde im Bereich des Corpus vertebrae definiert.

Gemäß der American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) wurde die Bone Area als prozentual mit verkalktem Knochen besetzte zweidimensionale Fläche in Relation zur gesamten Fläche gemessen [Vidal et al. 2012]. Ebenso wurde die prozentuale Fläche des Fettgehalts gemessen.

Ein Nachteil der Histomorphometrie ist die Invasivität der Methode und auch der große Zeitaufwand [Rauch 2006]. Trotzdem bleibt sie die Methode der Wahl für diese Studie, da nur durch die Histomorphometrie verschiedene Stoffwechselerkrankungen des Knochens unterschieden werden können, sie bleibt der Goldstandard für die Untersuchung des Knochenstoffwechsels und der Knochenmineralisation [Vidal et al. 2012].

Fläche der Trabekel

Die Trabekelfläche stieg in der Sham-Gruppe nach drei Monaten im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe signifikant an und bildete den höchsten Wert der drei Gruppen. Die Trabekelfläche der OVX + Diät-Gruppe war signifikant geringer als die der Sham-Gruppe und der Kontroll-Gruppe zum Zeitpunkt der Ovariectomie. Die Trabekelfläche der OVX + Steroid-Gruppe lag mit 32,67% zwischen dem Wert der OVX + Diät-Gruppe und der Sham-Gruppe und unterschied sich signifikant zur Sham-Gruppe.

Diese Aussagen korrelieren mit der Erkenntnis, dass auch die Knochendichte bei der OVX + Diät-Gruppe nach drei Monaten bezogen auf das Femur signifikant sank, obwohl die Tiere dieser Gruppe das höchste Körpergewicht nach drei Monaten aufwiesen. Lee et al. 2016 bestätigten den Verlust der Trabekelfläche bei weiblichen Wistar-Ratten. In dieser Studie wurde das trabekuläre Knochenvolumen, also die dreidimensionale histomorphometrische Analyse des Knochens, fünf Monate nach Ovariectomie im Vergleich zu einer Sham operierten Gruppe gemessen.

Naruse et al. verglichen weibliche Wistar-Ratten, die im Alter von 40 Wochen ovariectomiert oder sham-operiert wurden. Fünf Wochen nach Behandlungsbeginn wiesen die ovariectomierten Tiere einen signifikant geringeren Knochengehalt als die sham-operierten Tiere bezogen auf die gesamte gemessene Fläche auf [Naruse et al. 2015].

Bei dem Wirbelkörper konnte keine signifikante Veränderung der Trabekelfläche in der Sham-Gruppe beobachtet werden, trotzdem sank die Fläche der Trabekel um 6,17%. In der OVX + Diät-Gruppe sank die Fläche der Trabekel um 15,3% signifikant bezogen auf die Kontroll-Gruppe. Die OVX + Steroid-Gruppe wies den größten Verlust der Trabekelfläche mit 17,42% auf, dieses Ergebnis war ebenfalls statistisch signifikant. Auch bei dem Vergleich der OVX + Diät-Gruppe und der OVX + Steroid-Gruppe mit der Sham-Gruppe wiesen beide behandelten Gruppen eine signifikant niedrigere prozentuale Trabekelfläche auf.

Diese Ergebnisse korrelieren auch mit den Erkenntnissen der Studie von Miyagawa et al. 2011. Hier wurden weibliche Wistar-Ratten adäquat zu der vorliegenden Studie im Alter von 14 Wochen entweder ovariectomiert oder Sham-operiert und im Alter von 29 Wochen, also 15 Wochen später, nachuntersucht. Die μ -CT Ergebnisse des vierten Lendenwirbelkörpers zeigen einen signifikanten Abfall des BV/TV in der OVX-Gruppe

nach 15 Wochen Behandlung mit $p < 0,05$ bezogen auf die Kontrollgruppe zu Beginn der Studie [Miyagawa et al. 2011].

Die μ CT-Messungen der vorliegenden experimentellen Studie können diese Ergebnisse, bezogen auf die Tibia, bestätigen [El Khassawna et al. 2013]. Drei Monate nach Ovariectomie und Diätgabe sank der prozentuale Knochengehalt in Bezug auf die gesamte gemessene Fläche im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich.

Prozentualer Fettgehalt

Der prozentuale Fettgehalt des Femurs stieg in der Sham-Gruppe und in der OVX + Diät-Gruppe drei Monate nach Studienbeginn an, dieser Anstieg war allerdings nicht statistisch signifikant. Im Bereich des Wirbelkörpers war ein Abfall des prozentualen Fettgehalts der Sham-Gruppe verglichen mit der Kontroll-Gruppe zu beobachten. Der Wert der OVX + Diät-Gruppe stieg wie auch beim Femur verglichen mit der Kontroll-Gruppe an, war aber auch hier nicht statistisch signifikant.

Allein der Anstieg des prozentualen Fettgehalts der OVX + Steroid-Gruppe war bei beiden untersuchten Knochen statistisch signifikant, sowohl im Vergleich zur Sham-Gruppe als auch bezogen auf die Kontroll-Gruppe und somit der höchste Wert der untersuchten Gruppen.

Wie zuvor beschrieben wurde der prozentuale Fettgehalt des Gewebes auch im Rahmen der DXA-Messung analysiert. Hierbei wurde ebenfalls ein signifikanter Anstieg bei der OVX + Steroid-Gruppe in den anatomischen Bereichen gesamter Körper und Wirbelsäule verglichen mit dem Studienbeginn dokumentiert.

Lin et al. haben 2014 bei drei Monate alten männlichen Sprague Dawley Ratten nach einem Behandlungszeitraum von 12 Wochen in der proximalen Tibiametaphyse einen Anstieg der Fettgewebsfläche des Knochenmarks unter dem Einfluss von Prednisolon beobachtet.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Steroidgabe bei Ratten einen positiven Einfluss auf die Lipogenese und einen negativen Einfluss auf die Osteogenese der mesenchymalen Stammzellen haben könnte [Lin et al. 2014].

Fazit

In dieser tierexperimentellen Studie ist es mittels Ovariectomie und Diätgabe gelungen einen osteoporotischen Knochenstatus bei der Ratte zu erzeugen, der sowohl die radiologischen wie auch histologischen Veränderungen der menschlichen postmenopausalen Osteoporose exakt abbildet. Durch den Östrogenentzug kombiniert mit einer defizitären Diät konnte der BMD über den Zeitraum von drei Monaten bezogen auf alle gemessenen anatomischen Bereiche signifikant gesenkt werden. Dabei stieg das Körpergewicht bedingt durch den Hormonentzug ähnlich der postmenopausalen Stoffwechsellage an. Die deskriptive Histologie konnte die nach Ovariectomie erwartete gesteigerte Knochenresorption nicht bestätigen, hier war eher die Osteoblastenzahl vermehrt. Die histomorphometrischen Ergebnisse dieser Gruppen wiesen jedoch eine signifikant reduzierte prozentuale Trabekelfläche auf.

Die steroidinduzierte Osteoporose konnte als sekundäre Form der Osteoporose mittels Ovariectomie und Steroidgabe induziert werden. Der BMD und auch die prozentuale Trabekelfläche der OVX + Steroid-Gruppe konnte nach drei Monaten signifikant in allen Bereichen verglichen mit der Sham-Gruppe reduziert werden. Begleitend stiegen der prozentuale Fettgehalt und das Körpergewicht deutlich an. Die Tiere entwickelten einen cushinoiden Habitus, während die Knochendichtereduktion verglichen mit der OVX + Diät-Gruppe geringer war. Daher sollte in zukünftigen Studien ein Präparatewechsel auf Methylprednisolon erfolgen.

Die DXA-Messung stellt ein geeignetes Verfahren dar, um auch im Kleintiermodell nicht invasiv wiederholte Messungen der Knochendichte durchzuführen. Durch die Bestimmung des BMD ist eine Vergleichbarkeit mit der menschlichen Osteoporose gegeben, die nach WHO-Definition über den T-Score, somit über die Standardabweichung des BMD vom Referenzkollektiv, definiert wird. Diese Methode ist mit einer geringen Strahlenbelastung und auch einem geringen Zeitaufwand verbunden. Ein Nachteil besteht in der Zweidimensionalität der Messung, die das reale Volumen des Knochens unberücksichtigt lässt. In weiterführenden Studien wäre eine röntgendurchlässige Positionierungshilfe für die Tiere sinnvoll.

Die Ratte hat sich als optimales Tiermodell für diese experimentelle Studie erwiesen, da sie durch ihre Größe einfach in der Handhabung, jedoch auch groß genug war, um einzelne anatomische Bereiche mittels DXA-Messung analysieren zu können. Ebenso

eignen sich die anatomischen Gegebenheiten für die Testung neuer Biomaterialien in der Frakturdefektheilung.

Die Ergebnisse aus dieser experimentellen Studie zur Etablierung eines Kleintiermodells für Osteoporose können in Zukunft auf ein Groß-Tiermodell übertragen werden. Es ist möglich neue Knochenersatzmaterialien und Implantatwerkstoffe am osteoporotischen Knochen in dem nun etablierten Kleintiermodell zu testen, und diese an die spezifischen Bedingungen eines osteoporotischen Knochens anzupassen. Ebenso können neue Therapieansätze der Osteoporose krankheitsspezifisch getestet werden.

6 Zusammenfassung

Für diese tierexperimentelle Studie wurden 60 weibliche Sprague Dawley Ratten im Alter von 14 Wochen in vier Gruppen aufgeteilt und über einen Zeitraum von 12 Wochen beobachtet. Die Kontroll-Gruppe (n=10) wurde unbehandelt im Alter von 14 Wochen euthanasiert. Die Sham-Gruppe (n=10) wurde einer Scheinoperation unterzogen. Die OVX + Diät-Gruppe (n=30) wurde ovariectomiert und erhielt im Verlauf eine Calcium- und Vitamin D₃-arme Diät (postmenopausale Osteoporose). Die OVX + Steroid-Gruppe (n=10) wurde ebenfalls ovariectomiert und bekam zusätzlich alle drei Wochen eine subkutane Injektion mit Dexamethason (steroidinduzierte Osteoporose). Zum Zeitpunkt der Ovariectomie, nach einem Monat und nach drei Monaten, wurde eine Dual X-ray Absorptiometry-Messung (DXA) an sieben zuvor definierten Messbereichen (Femur und Tibia beidseits, Becken, Wirbelsäule, sowie gesamter Körper) durchgeführt. Ebenso erfolgten zum Zeitpunkt des Studienbeginns und nach drei Monaten histomorphometrische Untersuchungen am linken Femur und am dritten Lendenwirbelkörper.

Es ist gelungen mittels OVX + Diät nach drei Monaten Behandlungszeitraum einen signifikanten Abfall ($p < 0,001$) des BMD und der histomorphometrisch gemessenen Trabekelfläche verglichen mit den Ausgangsmessungen in allen Messbereichen zu induzieren. Dabei steigt der prozentuale Fettgehalt, gemessen mittels DXA, mit $p < 0,001$ signifikant an. Auch bei der OVX + Steroid-Gruppe konnte ein signifikanter Verlust der Knochendichte des gesamten Körpers und der Wirbelsäule erreicht werden. Hierbei wurde zusätzlich eine signifikante Steigerung des histomorphometrischen Fettgehalts bezogen auf die Kontrollgruppe erzielt.

Das Ziel der Osteoporoseinduktion am Tiermodell der Ratte konnte mittels Ovariectomie und anschließender Diätgabe nach drei Monaten Behandlungszeitraum umgesetzt werden. Die Bone Mineral Density (BMD) wurde in signifikantem Maße und im Vergleich zur Kontrollgruppe um bis zu 28% verringert. Um eine steroidinduzierte Osteoporose herbeizuführen, ist eine Optimierung der Steroidtherapie anzustreben. Die DXA-Messung eignet sich hervorragend, um den bestehenden Knochenstatus in unterschiedlichen anatomischen Regionen im Kleintiermodell zu beurteilen. Diese ist mit einem geringen Zeitaufwand verbunden und sehr schonend für die Versuchstiere, da lediglich eine kurze Narkose notwendig ist.

7 Summary

For this animal experimental study 60 female Sprague Dawley rats aged 14 weeks were divided into four groups and observed for a period of 12 weeks. A control-group (n=10) was killed untreated at the age of 14 weeks. A sham-group (n=10) was subjected to a sham operation. A OVX + diet-group (n=30) was ovariectomized and fed a calcium- and vitamin D3 reduced diet during the further procedure (postmenopausal osteoporosis). A OVX + steroid-group (n=10) was ovariectomized either and got an additional subcutaneous injection with Dexamethason once in three weeks (steroid induced osteoporosis). At the timepoint of ovariectomy, one and three month later a Dual X-ray Absorptiometry (DXA) investigation was done for seven predefined regions of interest (tibiae, femora, pelvis, spine and whole body). The histomorphometric analysis was done of the left femur and the third lumbar vertebral body at the beginning of the study and three month later.

With OVX + diet after three month of treatment it was managed to induce a significant reduction ($p < 0,001$) of BMD and the trabecular area measured by histomorphometry compared to the initial investigations at study begin for all regions of interest. At the same time the percentage fat content, measured by DXA, increased significant with $p < 0,001$. A significant reduction of bone mineral density of the whole body and the spine was achieved for the OVX + steroid-group also. Additionally, a significant increase of histomorphometric measured content of fat compared to the control-group was obtained.

The aim of inducing osteoporosis on the rat animal model was achieved by ovariectomy combined with an adjacent multi-deficiencies diet over a three month treatment period. The bone mineral density (BMD) was decreased significantly compared to the control-group up to 28%. To achieve a steroid induced osteoporosis, there has to be an improvement of the steroid therapy. The DXA-measurement is suited excellent for assessing the present bone status of a small animal model for different anatomical regions. Less time is needed and the measurement is a gentle method for the experimental animals, as simply a short anaesthesia is necessary.

Abkürzungsverzeichnis

AOI	Area of Interest
ASBMR	American Society for Bone and Mineral Research
BGP	Bone Gla Protein
BMC	Bone Mineral Content
BMD	Bone Mineral Density
BMU	Bone multicellular Unit
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
BV/TV	Bone Volume over Total Volume
CCD	Centrum-Collum-Diaphysen-Winkel
DVO	Dachverband Osteologie
DXA	Dual X-ray Absorptiometry
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FV	Fettvakuole
Gla	Gamma-Carboxyglutamat
H.E.	Hämalaun-Eosin
HR-pQCT	Hochauflösende periphere quantitative Computertomographie
hsCRP	Hoch sensitives C-reaktive Protein
KG	Körpergewicht
LWK	Lendenwirbelkörper
M	Molare Masse
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
MRI	Magnetic Resonance Imaging
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
nmol/l	Nanomol pro Liter
OK	Osteoklast
OVX	Ovariectomie
pQCT	Periphere quantitative Computertomographie

PTH	Parathormon
p-Wert	Empirisches Signifikanzniveau
qCT	Quantitative Computertomographie
ROI	Region of Interest
SD	Standardabweichung
SFB/TRR 79	Sonderforschungsbereich/Transregio 79
t ₀	Messzeitpunkt unmittelbar nach Ovariectomie
t ₁	Messzeitpunkt ein Monat nach Ovariectomie
t ₂	Messzeitpunkt drei Monate nach Ovariectomie
TD	Trabekeldicke
TierSchG	Tierschutzgesetz
TRAP	Tartrat Resistente Alkalische Phosphatase
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
Vit.	Vitamin
vQCT	Volumetrische quantitative Computertomographie
γGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
μCT	Mikro-Computertomographie
μGy	Mikrogray

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kollagenfaser und –fibrillenstruktur [Einhorn 1994].	4
Abbildung 2: Aufbau eines Röhrenknochens am Beispiel des Femurs [Aumüller et al. 2014; Schünke et al. 2011].	5
Abbildung 3 a-b: Proximale Femurepiphyse: Der Verlauf der Spongiosabälkchen in trajektorieller Ausrichtung [Aumüller et al. 2014; Schünke et al. 2011].	7
Abbildung 4: Seitliche Röntgenaufnahme der LWS [Moritz, Beitzel 2017].	13
Abbildung 5 a-c: Klinisches Erscheinungsbild der Osteoporose [Von Hayek et al. 2017, Peters 2013].	14
Abbildung 6: DXA-Messung der Knochendichte an LWS und Hüfte [Bartl, Gradinger 2009].	17
Abbildung 7: Zeitliche Versuchsplanung	20
Abbildung 8: Die Versuchstiere und deren Unterbringung.	21
Abbildung 9 a-b: Vorgang der Ovariectomie.	25
Abbildung 10: Übersicht der drei DXA-Messzeitpunkte mit der jeweiligen Anzahl der gemessenen Versuchstiere.	28
Abbildung 11 a-b: Knochendensitometer Lunar Prodigy® mit dem aus der Messung generierten Bildausschnitt.	28
Abbildung 12 a-b: Femur und Lendenwirbelkörper der Ratte nach Explantation.	31
Abbildung 13 a-b: Sägevorgang und -ergebnis.	32
Abbildung 14 a-d: Bilddokumentation für die histologische und histomorphometrische Auswertung, H.E.	34
Abbildung 15 a-d: Histomorphometrische Messung in der entsprechenden AOI, H.E.	36
Abbildung 16 a-b: a) Übersicht des Gewichtes der drei Gruppen im Vergleich zum Zeitpunkt der Ovariectomie. b) Gewichtsverlauf der Sham-Gruppe.	38
Abbildung 17 a-b: a) Gewicht der OVX + Diät-Gruppe im Verlauf der Zeitpunkte. b) Gewichtsverlauf der OVX + Steroidgruppe.	39
Abbildung 18: Gewicht aller Gruppen nach drei Monaten.	40
Abbildung 19 a-b: a) Knochendichte aller drei Untersuchungsgruppen im Bereich der Tibiae zum Zeitpunkt der Ovariectomie. b) Knochendichte der Sham-Gruppe im Zeitverlauf über alle Messzeitpunkte.	41

Abbildung 20 a-b: a) Knochendichte der OVX + Diät-Gruppe über alle Messzeitpunkte hinweg. b) Knochendichte der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf über alle Messzeitpunkte.....	42
Abbildung 21 a-b: Knochendichte aller Gruppen einen und drei Monate nach Ovariectomie.....	43
Abbildung 22 a-b: BMD der Femora aller Gruppen bei OVX und der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.	44
Abbildung 23 a-b: BMD der Femora der OVX + Diät- und der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.....	45
Abbildung 24 a-b: Knochendichte aller Gruppen einen und drei Monate nach Behandlungsbeginn.	46
Abbildung 25: Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander bezogen auf die drei Messzeitpunkte und die ROI des Beckens.	47
Abbildung 26: Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander bezogen auf die drei Messzeitpunkte und die ROI der Wirbelsäule.....	50
Abbildung 27 a-b: a) Knochendichte aller Gruppen zum Zeitpunkt der Ovariectomie. b) Knochendichte der Sham-Gruppe im Bereich des gesamten Körpers im Zeitverlauf. ...	51
Abbildung 28 a-b: Knochendichte der OVX + Diät- und der OVX + Steroid-Gruppe im Bereich des gesamten Körpers im Zeitverlauf über drei Monate.....	52
Abbildung 29 a-b: Knochendichte des gesamten Körpers nach einem und drei Monaten Behandlungsdauer.	53
Abbildung 30 a-b: Prozentualer Fettgehalt der Tibiae aller Gruppen bei OVX und der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.	55
Abbildung 31: Der prozentuale Fettgehalt aller Gruppen nach drei Monaten im Bereich der Tibiae.....	56
Abbildung 32 a-b: Prozentualer Fettgehalt der Femora bei OVX und Verlauf dessen bei der Sham-Gruppe.	57
Abbildung 33 a-b: Gewebefettgehalt der Femora der OVX + Diät- und der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.	58
Abbildung 34 a-b: Gewebefettgehalt der Femora nach einem und drei Monaten.	59
Abbildung 35 a-b: Gewebefettgehalt des Beckens zum Zeitpunkt der Ovariectomie und der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.	60

Abbildung 36 a-b: Der prozentuale Fettgehalt des Beckens der OVX + Diät- und der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.	61
Abbildung 37 a-b: Der prozentuale Fettgehalt des Beckens aller Gruppen nach einem und drei Monaten.	62
Abbildung 38 a-b: Prozentualer Fettgehalt der Wirbelsäule bei OVX und Verlauf dessen bei der Sham-Gruppe.	63
Abbildung 39 a-b: Der prozentuale Fettgehalt der Wirbelsäule der OVX + Diät- und der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.	64
Abbildung 40 a-b: Der prozentuale Fettgehalt der Wirbelsäule aller Gruppen nach einem und drei Monaten.	66
Abbildung 41 a-b: Gewebefettgehalt des gesamten Körpers bei Ovariectomie und der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.	67
Abbildung 42 a-b: Gewebefettgehalt des gesamten Körpers der OVX + Diät- und der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.	68
Abbildung 43 a-b: Gewebefettgehalt des gesamten Körpers nach einem und drei Monaten.	69
Abbildung 44 a-f: Histologische Darstellung linkes Femur, H.E.	72
Abbildung 45 a-b: Histologische Darstellung LWK 3, H.E. a) Vergrößerung x 10, Ratte 96, Kontrolle, Alter 14 Wochen. b) Vergrößerung x100, Ratte 98, Kontrolle, Alter 14 Wochen.	73
Abbildung 46 a-b: Histologische Darstellung LWK 3, H.E. a) Vergrößerung x100, Ratte 73, OVX + Diät, Alter 18 Wochen. b) Vergrößerung x 10, Ratte 75, OVX + Steroid, Alter 18 Wochen.	74
Abbildung 47 a-b: Histologische Darstellung LWK 3, H.E. a) Vergrößerung x 10, Ratte 92, Sham, Alter 26 Wochen. b) Vergrößerung x 10, Ratte 37, OVX + Steroid, Alter 26 Wochen.	75
Abbildung 48: Fläche der Trabekel des Femurs aller Gruppen.	78
Abbildung 49: Fläche der Trabekel des Wirbelkörpers aller Gruppen.	79
Abbildung 50: Prozentualer Fettgehalt des Femurs aller Gruppen.	81
Abbildung 51: Prozentualer Fettgehalt des Wirbelkörpers aller Gruppen.	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Osteologisches Basislabor [Peters 2013].	16
Tabelle 2: Vier Kategorien der Knochendichte basierend auf der Knochendichtemessung mittels DXA nach der WHO-Definition (2003).	18
Tabelle 3: Aufteilung der Studiengruppen.	20
Tabelle 4: Zusammensetzung der Spezialdiät.	23
Tabelle 5: Übersicht der einzelnen Messbereiche mit den dazugehörigen Flächenmaßen der ROIs und zeitlichen Änderungen derselben.	30
Tabelle 6: Übersicht über die Tieranzahl bei Euthanasie und die Anzahl der gemessenen Schnittpräparate des linken Femur und dritten Lendenwirbelkörpers.	36
Tabelle 7: Gewicht (g) der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.	38
Tabelle 8: Gewicht (g) der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.	39
Tabelle 9: Gewicht (g) der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.	40
Tabelle 10: BMD (g/cm ²) der Tibiae der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.	41
Tabelle 11: BMD (g/cm ²) der Tibiae der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.	42
Tabelle 12: BMD (g/cm ²) der Tibiae der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.	43
Tabelle 13: BMD (g/cm ²) der Femora der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.	45
Tabelle 14: BMD (g/cm ²) der Femora der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.	45
Tabelle 15: BMD (g/cm ²) der Femora der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.	46
Tabelle 16: BMD (g/cm ²) des Beckens der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.	47
Tabelle 17: BMD (g/cm ²) des Beckens der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.	48
Tabelle 18: BMD (g/cm ²) des Beckens der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.	48
Tabelle 19: BMD (g/cm ²) der Wirbelsäule der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.	49
Tabelle 20: BMD (g/cm ²) der Wirbelsäule der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.	49
Tabelle 21: BMD (g/cm ²) der Wirbelsäule der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.	50
Tabelle 22: BMD (g/cm ²) des gesamten Körpers der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.	51
Tabelle 23: BMD (g/cm ²) des gesamten Körpers der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.	52
Tabelle 24: BMD (g/cm ²) des gesamten Körpers der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.	53
Tabelle 25: Gewebefettgehalt (%) der Tibiae der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.	54
Tabelle 26: Gewebefettgehalt (%) der Tibiae der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.	55

Tabelle 27: Gewebefettgehalt (%) der Tibiae der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.	55
Tabelle 28: Gewebefettgehalt (%) der Femora der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.....	57
Tabelle 29: Gewebefettgehalt (%) der Femora der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.	57
Tabelle 30: Gewebefettgehalt (%) der Femora der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.	58
Tabelle 31: Gewebefettgehalt (%) des Beckens der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.	60
Tabelle 32: Gewebefettgehalt (%) des Beckens der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.	61
Tabelle 33: Gewebefettgehalt (%) des Beckens der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.	61
Tabelle 34: Gewebefettgehalt (%) der Wirbelsäule der Sham-Gruppe im Zeitverlauf...	64
Tabelle 35: Gewebefettgehalt (%) der Wirbelsäule der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.	64
Tabelle 36: Gewebefettgehalt (%) der Wirbelsäule der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.	65
Tabelle 37: Gewebefettgehalt (%) des gesamten Körpers der Sham-Gruppe im Zeitverlauf.	67
Tabelle 38: Gewebefettgehalt (%) des gesamten Körpers der OVX + Diät-Gruppe im Zeitverlauf.	67
Tabelle 39: Gewebefettgehalt (%) des gesamten Körpers der OVX + Steroid-Gruppe im Zeitverlauf.	68
Tabelle 40: Fläche der Trabekel (%) des Femurs aller Gruppen.	77
Tabelle 41: Fläche der Trabekel (%) des Wirbelkörpers aller Gruppen.	79
Tabelle 42: Fettgehalt (%) des Femurs aller Gruppen.	80
Tabelle 43: Fettgehalt (%) des Wirbelkörpers aller Gruppen.	83
Tabelle 44: Gewicht (g) aller Gruppen im Vergleich 3 Monate nach OVX.	87

Literaturverzeichnis

- 1 Adams J. Quantitative computed tomography. *Eur J Radiol.* 2009;71:415-424.
- 2 Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: Potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology.* 1998;139(2):663-670.
- 3 Ahmed HH, Morcos NYS, Eskander EF, Seoudi DMS, Shalby AB. Potential role of leptin against glucocorticoid-induced secondary osteoporosis in adult female rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012;16:1446-1452.
- 4 Albaum JM, Youn S, Lévesque LE, Gershon AS, Cadarette SM. Osteoporosis management among chronic glucocorticoid users: a systematic review. *J Popul Ther Clin Pharmacol.* 2014;21(3):486-504.
- 5 Alt V, Thormann U, Ray S, Zahner D, Dürselen L, Lips K, El Khassawna T, Heiss C, Riedrich A, Schlewitz G, Ignatius A, Kampschulte M, von Dewitz H, Heinemann S, Schnettler R, Langheinrich A. A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures. *Acta Biomater.* 2013;9:7035-7042.
- 6 Angeli A, Guglielmi G, Dovio A, Capelli G, de Feo D, Giannini S, Giorgino R, Moro L, Giustina A. High prevalence of asymptomatic vertebral fractures in post-menopausal women receiving chronic glucocorticoid therapy: a cross-sectional outpatient study. *Bone.* 2006;39:253-259.
- 7 Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wennemuth G, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch HG. *Anatomie. Duale Reihe. 3. Auflage.* Stuttgart, New York, Delhi, Rio: Thieme; 2014.
- 8 Bab IA, Einhorn TA. Polypeptide factors regulating osteogenesis and bone marrow repair. *J Cell Biochem.* 1994;55:358-365.
- 9 Bagi CM, Ammann P, Rizzoli R, Miller SC. Effect of estrogen deficiency on cancellous and cortical bone structure and strength of the femoral neck in rats. *Calc Tissue Int.* 1997;61:336-344.
- 10 Barros RPA, Gustafsson JA. Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell Metab.* 2011;14:289-299.
- 11 Bartl R, Gradiniger R. Aktuelle Diagnostik und Therapie der Osteoporose auf der Basis der „European Guidance 2008“. *Der Orthopäde.* 2009;38:365-380.

- 12 Bauer W, Aub JC, Albright F. A study of the bone trabeculae as a readily available reserve supply of calcium. *J Exper Med.* 1929;49:145-161.
- 13 Baum E, Peters KM. Primäre Osteoporose-leitliniengerechte Diagnostik und Therapie. *Dtsch Arztebl.* 2008;105(33):573-82.
- 14 Bellino FL. Nonprimate animal models of menopause: workshop report. *Menopause.* 2000;7(1):14-24.
- 15 Biehl C, Merboth F, El Khassawna T, Rupp M, Heiß C. Physiologie des Knochenmetabolismus und Knochenzell-Interaktionen. *Arthritis und Rheuma.* 2017;4:239-246.
- 16 Binkley NC, Suttie JW. Vitamin K nutrition and osteoporosis. *J Nutr.* 1995;125(7):1812-1821.
- 17 Bitto A, Burnett BP, Polito F et al. Genistein aglycone reverses glucocorticoid-induced osteoporosis and increases bone breaking strength in rats: a comparative study with alendronate. *Br J Pharmacol.* 2009;156:1287-95.
- 18 Black DM, Cummings SR, Genant HK, Nevitt MC, Palermo L, Browner W. Axial and appendicular bone density predict fractures in older women. *J Bone Miner Res.* 1992;7:633-638.
- 19 Blake GM, Fogelman I. An update on dual-energy x-ray absorptiometry. *Semin Nucl Med.* 2010;40:62-73.
- 20 Bleibler F, Konnopka A, Benzinger P, Rapp K, König HH. The health burden and costs of incident fractures attributable to osteoporosis from 2010 to 2050 in Germany-a demographic simulation model. *Osteoporos Int.* 2013;24:835-847.
- 21 Böcker W, El Khassawna T, Bauer N, Brodsky K, Weisweiler D, Govindarajan P, Schlewitz G, Kampschulte M, Dürselen L, Thormann U, Szalay G, Schnettler R, Langheinrich AC, Heiss C. Short-term glucocorticoid treatment causes spinal osteoporosis in ovariectomized rats. *Eur Spine J.* 2014;23(11):2437-48.
- 22 Borgstrom F, Zethraeus N, Johnell O, Lidgren L, Ponzer S, Svensson O, Abdon P, Ornstein E, Lunsjo K, Thorngren KG, Sernbo I, Rehnberg C, Jonsson B. Costs and quality of life associated with osteoporosis-related fractures in Sweden. *Osteoporos Int.* 2006;17(5):637-50.
- 23 Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducy P, Karsenty G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone.* 1998;23:187-196.

- 24 Bressot C, Meunier PJ, Chapuy MC, Lejeune E, Edouard C, Darby AJ. Histomorphometric profile, pathophysiology and reversibility of corticosteroid-induced osteoporosis. *Metab Bone Dis Rel Res.* 1979;1:303-311.
- 25 Brown EM, Hebert SC. Calcium-receptor-regulated parathyroid and renal function. *Bone.* 1997;20:303-309.
- 26 Buckley LM, Leib ES, Cartularo KS, Vacek PM, Cooper SM. Effects of low dose corticosteroids on the bone mineral density of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1995;22(6):1055-9.
- 27 Carter DR, Hayes WC. The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure. *J Bone Joint Surg.* 1977;59-A:954-962.
- 28 Cleghorn DB, Polley KJ, Bellon MJ, Chatterton J, Baghurst PA, Nordin BEC. Fracture rates as a function of forearm mineral density in normal postmenopausal women: retrospective and prospective data. *Calcif Tissue Int.* 1991;49:161-163.
- 29 Cockerill W, Lunt M, Silman AJ, Cooper C, Lips P, Bhalla AK, Cannata JB, Eastell R, Felsenberg D, Gennari C, Johnell O, Kanis JA, Kiss C, Masaryk P, Naves M, Poor G, Raspe H, Reid DM, Reeve J, Stepan J, Todd C, Woolf AD, O'Neill TW. Health-related quality of life and radiographic vertebral fracture. *Osteoporos Int.* 2004;15(2):113-9.
- 30 Cohen S, Levy RM, Keller M, Boling E, Emkey RD, Greenwald M, Zizic TM, Wallach S, Sewell KL, Lukert BP, Axelrod DW, Chines AA. Risedronate therapy prevents corticosteroid-induced bone loss: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheum.* 1999;42:2309-2318.
- 31 Consensus Development Conference. Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med.* 1993;94:646-650.
- 32 Dachverband der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V. DVO-Leitlinie 2017 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und Männern.
- 33 Dachverband Osteologie e.V. DVO-Leitlinie 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen. *Osteologie* 4/2009:304-324.
- 34 Dachverband Osteologie e.V. DVO-Leitlinie 2014 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen.
- 35 Ding M, Odgaard A, Linde F, Hvid I. Age-related variations in the microstructure of human tibial cancellous bone. *J Orthop Res.* 2002;20:615–621.

- 36 Edwards BJ, Song J, Dunlop DD, Fink HA, Cauley JA. Functional decline after incident wrist fractures- study of osteoporotic fractures: prospective cohort study. *BMJ*. 2010;8:341-3324.
- 37 Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2005;16:129-138.
- 38 Einhorn TA. Bone metabolism and metabolic bone disease. In: *Orthopaedic Knowledge Update 4 Home Study Syllabus* (J. W. Frymoyer, ed.). Am Acad Orthop Surg, Rosemont. 1994;69-88.
- 39 El Khassawna T, Böcker W, Govindarajan P , Schlieffe N, Hürter B, Kampschulte M, Schlewitz G , Alt V, Lips KS, Faulenbach M, Möllmann H, Zahner D, Dürselen L, Ignatius A, Bauer N, Wenisch S, Langheinrich AC, Schnettler R, Heiss C. Effects of multi-deficiencies-diet on bone parameters of peripheral bone in ovariectomized mature rat. *Plos One*. 2013;8(8):e71665.
- 40 El Khassawna T, Merboth F, Malhan D, Bauer N, Böcker W, Daghma DES, Stoetzel S, Kern S, Hassan F, Rosenbaum D, Langenstein J, Schlagenhauf A, Rösen-Wolff A, Schulze F, Rupp M, Hose D, Secklinger A, Ignatius A, Wilke HJ, Lips KS, Heiß C. Osteocyte regulation of receptor activator of NF- κ B ligand/osteoprotegerin in a sheep model of osteoporosis. *Am J Pathol*. 2017;187(8):1686-1699.
- 41 Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W. Mikro-CT. Technologie und Applikationen zur Erfassung von Knochenarchitektur. *Radiologe*. 1999;39:203-212.
- 42 Fang J, Yang L, Zhang R, Zhu X, Wang P. Are there differences between Sprague-Dawley and Wistar rats in long-term effects of ovariectomy as a model for postmenopausal osteoporosis? *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(2):1491-1502.
- 43 FAO/WHO. Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation; 2001.
- 44 Fechtenbaum J, Cropet C, Kolta S, Horlait S, Orcel P, Roux C. The severity of vertebral fractures and health-related quality of life in osteoporotic postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2005;16(12):2175-9.
- 45 Food and Drug Administration. Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. Division of Metabolic and Endocrine Drug Products; 1994.

- 46 Francisco JI, Yu Y, Oliver RA, Walsh WR. Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. *J Orthop Res.* 2010;29:189-196.
- 47 Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn.* 2006;235:176-190.
- 48 Frost HM, Jee WSS. On the rat model of human osteopenias and osteoporosis. *Bone Mineral.* 1992;18:227-236.
- 49 Gala J, Diaz-Curiell M, De La Piedra C, Calero J. Short- and long-term effects of calcium and exercise on bone mineral density in ovariectomized rats. *Br J Nutr.* 2001; 86,521–527.
- 50 Genant HK, Jiang Y. Advanced imaging assessment of bone quality. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1068:411-426.
- 51 Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA. Perspective Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Miner Res.* 2005; Vol.20(10):1715-1722.
- 52 Gibson L. The mechanical behaviour of cancellous bone. *J Biomech.* 1985;18:317-328.
- 53 Gong JK, Arnold JS, Cohn SH. Composition of trabecular and cortical bone. *Anat Rec.* 1964;149:325-332.
- 54 Grier SJ, Turner AS, Alvis MR. The use of dual-energy x-ray absorptiometry in animals. *Investigative Radiology.* 1996;31(1):50-62.
- 55 Gruber H, Stover S. Maternal and weanling bone: The influence of lowered calcium intake and maternal dietary history. *Bone.* 1994;15:167-176.
- 56 Gundberg CM, Lian JB, Gallop PM, Steinberg JJ. Urinary -y-carboxyglutamic acid and serum osteocalcin as bone markers. Studies in osteoporosis and Paget's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983;56:1221-1225.
- 57 Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, Steinle T, Verheyen F, Linder R. The epidemiology of osteoporosis—Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110(4):52-7.
- 58 Hartke J. Non-primate models of osteoporosis. *Laboratory Animal Science.* 1998;48(6):623-629.
- 59 Hauschka PV, Lian JB, Cole DEC, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K dependent proteins in bone. *Phys Rev.* 1989;69:990-1047.

- 60 Häussler B, Gothe H, Gol D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D. Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany—the BoneEVA Study. *Osteoporos Int.* 2007;18:77-84.
- 61 Haussler MR. Vitamin D receptors: nature and function. *Ann Revs Nutr.* 1986;6:527-562.
- 62 Heiss C, Govindarajan P, Schlewitz G, Hemdan NYA, Schliefer N, Alt V, Thormann U, Lips KS, Wenisch S, Langheinrich AC, Zahner D, Schnettler R. Induction of osteoporosis with its influence on osteoporotic determinants and their interrelationships in rats by DEXA. *Med Sci Monit.* 2012;18(6):199-207.
- 63 Hiligsmann M, Ethgen O, Richy F, Reginster JY. Utility values associated with osteoporotic fracture: a systematic review of the literature. *Calcif Tissue Int.* 2008;82:288-292.
- 64 Horowitz M, Jilka RL. Colony stimulating factors in bone remodeling. In: *Cytokines and Bone Metabolism* (M. Gowen, ed.). Boca Raton: CRC Press; 1992:185-227.
- 65 Huppelsberg J, Walter K. *Kurzlehrbuch Physiologie.* Stuttgart: Thieme; 2005:218-219.
- 66 Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie. *CliniPharm, CliniTox.* 2016. http://www.vetpharm.uzh.ch/reloader.htm?tak/03000000/00033875.01?inhalt_c.htm. Abgerufen am 02.04.2016.
- 67 Jagtap VR, Ganu JV, Nagane NS. BMD and serum intact osteocalcin in postmenopausal osteoporosis women. *Ind J Clin Biochem.* 2011;26:70-73.
- 68 Jakob F, Seefried L, Ebert R, Eulert J, Wolf E, Schieker M, Böcker W, Mutschler W, Amling M, Pogoda P, Schinke T, Liedert A, Blakytyn R, Ignatius A, Claes L. Frakturheilung bei Osteoporose. *Osteol.* 2007;16:71-84.
- 69 Jee WSS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskel Neuron Interact.* 2001;1(3):193-207.
- 70 Jesudason D, Need AG, Horowitz M, O'Loughlin PD, Morris HA, Nordin BEC. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and bone resorption markers in vitamin D insufficiency. *Bone.* 2002;31:626-630.
- 71 Jiang Y, Zhao J, Genant HK, Dequeker J, Geusens P. Long-term changes in bone mineral and biomechanical properties of vertebrae and femur in aging, dietary calcium restricted, and/or estrogen-deprived/-replaced rats. *J Bone Miner Res.* 1997;12(5):820-31.

- 72 Johnell O, Kanis JA, Oden A, Johansson H, De Laet C, Delmas P, Eisman JA, Fujiwara S, Kroger H, Mellstrom D, Meunier PJ, Melton LJ 3rd, O'Neill T, Pols H, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A. Predictive value of BMD for hip and other fractures. *J Bone Miner Res.* 2005;20:1185-1194.
- 73 Jones G, Strugnell S, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Revs.* 1998;78:1193-1231.
- 74 Kanis JA, Johnell O, Oden A, Jonsson B, De Laet C, Dawson A. Risk of hip fracture according to the World Health Organization criteria for osteopenia and osteoporosis. *Bone.* 2000;27:585-590.
- 75 Keaveny TM, Morgan EF, Niebur GL, Yeh OC. Biomechanics of trabecular bone. *Annu Rev Biomed Eng.* 2001;3:307-333.
- 76 Kharode YP, Sharp MC, Bodine PVN. Utility of the ovariectomized rat as a model for human osteoporosis in drug discovery. *Methods Mol Biol.* 2008;455:111-124.
- 77 Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrich M, van den Boom D, Meyer J, Hubner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H, Scholer HR. Induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell.* 2009;136:411-419.
- 78 Kishi T, Hagino H, Kishimoto H, Nagashima H. Bone responses at various skeletal sites to human parathyroid hormone in ovariectomized rats: effects of long-term administration, withdrawal, and readministration. *Bone.* 1998;22:515-522.
- 79 Klinker R, Pape HC, Silbernagl ST. *Physiologie.* Stuttgart: Thieme; 2005: 457-471.
- 80 Krug R, Burghardt AJ, Majumdar S. High-resolution imaging techniques for the assessment of osteoporosis. *Radiol Clin North Am.* 2010;48(3):601-621.
- 81 Kruger MC, Morel PC. Experimental control for the ovariectomized rat model: use of sham versus nonmanipulated animal. *J Appl Anim Welf Sci.* 2016;19(1):73-80.
- 82 Kumar KHS, Bhaskar P. Osteoporosis - an emerging disease of the 21st century, Part 1: an overview. *J Fam Med Prim Care.* 2012;1:66-68.
- 83 Lee CM, Terrizzi AR, Bozzini C, Piñeiro AE, Conti MI, Martínez MP. Chronic lead poisoning magnifies bone detrimental effects in an ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *Exp Toxicol Pathol.* 2016;68(1):47-53.
- 84 Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med.* 2008;58(5):424-430.

-
- 85 Lian JB, Tassinari M, Glowacki J. Resorption of implanted bone prepared from normal and warfarin-treated rats. *1 Clin Invest.* 1984;73:1223-2650.
- 86 Liang YQ, Akishita M, Kim S, Ako J, Hashimoto M, Iijima K, Ohike Y, Watanabe T, Sudoh N, Toba K, Yoshizumi M, Ouchi Y. Estrogen receptor β is involved in the anorectic action of estrogen. *Int J Obes.* 2002; 26:1103-1109.
- 87 Lin S, Huang J, Zheng L, Liu Y, Liu G, Li N, Wang K, Zou L, Wu T, Qin L, Cui L, Li G. Glucocorticoid-induced osteoporosis in growing rats. *Calcif Tissue Int.* 2014; 95:362-373.
- 88 Lindgren J, Merchant C, DeLuca H. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteopenia induced by prednisolone in adult rats. *Calcif Tissue Int.* 1982;34:253-257.
- 89 Lips P, van Schoor NM. Quality of life in patients with osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2005;16(5):447-55.
- 90 Liu X, Lei W, Wu Z, Cui Y, Han B, Fu S, Jiang C. Effects of glucocorticoid on BMD, micro-architecture and biomechanics of cancellous and cortical bone mass in OVX rabbits. *Medical Engineering & Physics.* 2012;34:2-8.
- 91 Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2003.
- 92 Marcus R, Feldman D, Nelson DA, Rosen CJ. Osteoporosis. Third edition. London, Oxford, Boston, New York und San Diego: Academic Press; 2007.
- 93 Marotti G, Zallone AZ. Changes in the vascular network during the formation of Haversian systems. *Acta Anat (Basel).* 1980;106:84-100.
- 94 Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ.* 1996;312:1254-1259.
- 95 McCann RM, Colleary G, Geddis C, Clarke SA, Jordan GR, Dickson GR, Marsh D. Effect of osteoporosis on bone mineral density and fracture repair in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res.* 2008;26:384-393.
- 96 Melton LJ, 3rd. Hip fractures: A worldwide problem today and tomorrow. *Bone.* 1993;14(Suppl 1):1-8.
- 97 Migliaccio S, Brama M, Fornari R, Greco EA, Spera G, Malavolta N. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an osteoblastic disease. *Aging Clin Exp Res.* 2007;19(3 Suppl):5-10.
- 98 Miyagawa K, Kozai Y, Ito Y, Furuhashi T, Naruse K, Nonaka K, Nagai Y, Yamato H, Kashima I, Ohya K, Aoki K, Mikuni-Takagaki Y. A novel underuse model shows that inactivity but not ovariectomy determines the deteriorated material properties and

- geometry of cortical bone in the tibia of adult rats. *J Bone Miner Metab.* 2011;29:422-436.
- 99 Morgan EF, Barnes GL, Einhorn TA. The bone organ system: form and function. Osteoporosis. Third edition. London, Oxford, Boston, New York und San Diego: Academic Press; 2007;1:3-25.
- 100 Morgan EF, Keaveny TM. Dependence of yield strain of human trabecular bone on anatomic site. *J Biomech.* 2001;34:569-577.
- 101 Morin S, Lix LM, Azimae M, Metge C, Caetano P, Leslie WD. Mortality rates after incident non-traumatic fractures in older men and women. *Osteoporos Int.* 2011;22:2439-2448.
- 102 Morin S, Lix LM, Azimae M, Metge C, Majumdar SR, Leslie WD. Institutionalization following incident non-traumatic fractures in community-dwelling men and women. *Osteoporos Int.* 2012;23(9):2381-6.
- 103 Moritz J, Beitzel K. Osteoporose. In: Reiser M, Kuhn F, Debus J. *Duale Reihe Radiologie.* 4. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2017. doi:10.1055/b-004-132212
- 104 Mosekilde L. Assessing bone quality- animal models in preclinical osteoporosis research. *Bone.* 1995;17(4):343-352.
- 105 Mosekilde L. Sex differences in age-related loss of vertebral trabecular bone mass and structure- Biomechanical consequences. *Bone.* 1989;10:425-432.
- 106 Mullender MG, Vandermeer DD, Huiskes R, Lips P. Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. *Bone.* 1996;18:109-113.
- 107 Namba S, Yamaoka-Tojo M, Hashikata T, Ikeda Y, Kitasato L, Hashimoto T, Shimohama T, Tojo T, Takahira N, Masuda T, Ako J. Long-term warfarin therapy and biomarkers for osteoporosis and atherosclerosis. *BBA Clinical.* 2015;4:76-80.
- 108 Naruse K, Uchida K, Suto M, Miyagawa K, Kawata A, Urabe K, Takaso M, Itoman M, Mikuni-Takagaki Y. Alendronate does not prevent long bone fragility in an inactive rat model. *J Bone Miner Metab.* 2015;1-12.
- 109 Nordin BEC, Need AG, Morris HA, Horowitz M. Biochemical variables in pre- and postmenopausal women: reconciling the calcium and estrogen hypotheses. *Osteoporos Int.* 1999;9:351-357.

- 110 Nordin BEC, Need AG, Morris HA, O'Loughlin PD, Horowitz M. Effect of age on calcium absorption in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:998-1002.
- 111 Nordin BEC. Nutritional considerations. In: Calcium, phosphate and magnesium metabolism. Clinical physiology and diagnostic procedures. Edinburgh, London, New York: Churchill Livingstone;1976:1-35.
- 112 Office of the Surgeon General. Bone health and osteoporosis: a report of the surgeon general. In: U.S. Department of Health and Human Services. Rockville: MD; 2004.
- 113 Osnes EK, Lofthus CM, Meyer HE, Falch JA, Nordsletten L, Cappelen I, Kristiansen IS. Consequences of hip fracture on activities of daily life and residential needs. *Osteoporos Int.* 2004;15:567-574.
- 114 Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987;2:595-610.
- 115 Parfitt AM. Bone remodeling. *Henry Ford Hosp Med J.* 1988;36:143-144.
- 116 Peasgood T, Herrmann K, Kanis JA, Brazier JE. An updated systematic review of health state utility values for osteoporosis related conditions. *Osteoporos Int.* 2009;20(6):853-68.
- 117 Peters KM. Osteoporose. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date* 2013;8(05):403-415.
- 118 Price PA, Otsuka AS, Poser JW, Kristaponis I, Raman N. Characterization of a gammacarboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976;73:1447-51.
- 119 Quinn JM, Gillespie MT. Modulation of osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328:739-745.
- 120 Rauch F. Watching bone cells at work: what we can see from bone biopsies. *Pediatr Nephrol.* 2006;21:457-62.
- 121 Reid IR, Evans MC, Wattie DJ, Ames R, Cundy TF. Bone mineral density of the proximal femur and lumbar spine in glucocorticoid-treated asthmatic patients. *Osteoporos Int.* 1992;2(2):103-5.
- 122 Reid IR, Ibbertson HK. Evidence for decreased tubular reabsorption of calcium in glucocorticoid-treated asthmatics. *Horm Res.* 1987;27:200-204.
- 123 Rice JC, Cowin SC, Bowman JA. On the dependence of the elasticity and strength of cancellous bone on apparent density. *J Biomech.* 1988;21(2):155-168.

- 124 Rodgers JB, Faugere MCM, Malluche H. Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function. *Bone*. 1993;14:369-377.
- 125 Safadi M, Shapira D, Leichter I, Reznick A, Silbermann M. Ability of different techniques of measuring bone mass to determine vertebral bone loss in aging female rats. *Calcif Tissue Int*. 1988;42:375-382.
- 126 Salpeter SR, Walsh JME, Ormiston TM, Greyber E, Buckley NS, Salpeter EE. Meta-analysis: effect of hormone-replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Diabetes Obes Metab*. 2005;8:538-554.
- 127 Sanders KM, Seeman E, Ugoni AM, Pasco JA, Martin TJ, Skoric B, Nicholson GC, Kotowicz MA. Age- and gender-specific rate of fractures in Australia: a population-based study. *Osteoporos Int*. 1999;10:240-247.
- 128 Santos C, Emilio C, Raquel L et al. Characterization of a new experimental model of osteoporosis in rabbits. *J Bone Miner Metab*. 2008;26:53-59.
- 129 Scheidt-Nave C, Banzer D, Abendroth K. Schlussbericht Multizentrische Studie zu Verteilung, Determination und prädiktivem Wert der Knochendichte in der deutschen Bevölkerung. Förderprojekt des Bundesministeriums für Forschung und Technologie. Förderkennzeichen 01KM 9304/0. 1997;1-45.
- 130 Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll, M. Prometheus. Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. 3. Auflage. Stuttgart, New York, Delhi, Rio: Thieme; 2011.
- 131 Seeman E. Age- and menopause-related bone loss compromise cortical and trabecular microstructure. *Journals of Gerontology: Biological Sciences*. 2013;68(10):1218-1225.
- 132 Sharp PE, Villano J. The laboratory rat. 2nd edition. Boca Raton: CRC Press; 2013.
- 133 Silbernagl S, Despopoulos A. Taschenatlas der Physiologie. Stuttgart, New York, Delhi, Rio: Thieme. 2007;180-181, 292-295, 304-306.
- 134 Silverman S1, Viswanathan HN, Yang YC, Wang A, Boonen S, Ragi-Eis S, Fardellone P, Gilchrist N, Lips P, Nevitt M, Palacios Gil-Antuñano S, Pavelka K, Revicki D, Simon J, Macarios D, Siris ES. Impact of clinical fractures on health-related quality of life is dependent on time of assessment since fracture: results from the FREEDOM trial. *Osteoporos Int*. 2012;23(4):1361-9.
- 135 Statistisches Bundesamt. Die Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Ausgaben, Kosten, Finanzierung [Federal health monitoring: expenditures, costs and financing]. 2012.

- https://www.gbebund.de/gbe10/abrechnung.prc_abr_test_logon?p_uid0gast&p_aid051115479&p_sprache0E&p_knoten0 TR19200.
- 136 Stone KL, Seeley DG, Lui LY, Cauley JA, Ensrud K, Browner WS, Nevitt MC, Cummings SR. BMD at multiple sites and risk of fracture of multiple types: Longterm results from the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res.* 2003;18:1947-1954.
- 137 Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL. *The laboratory rat (Second edition).* American College of Laboratory Animal Medicine. 2006;191-218.
- 138 Takeda E, Yamamoto H, Yamanaka-Okumura H, Taketani Y. Dietary phosphorus in bone health and quality of life. *Nutr Rev.* 2012;70:311-321.
- 139 Tate M, Adamson Jr TA, Bauer TW. Cells in focus. The osteocyte. *IJBCB.* 2004;36:1-8.
- 140 Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone.* 1995;17(4):125-133.
- 141 Tou JC, Foley AF, Yuan YV, Arnaud S, Wade CE, Brown M. The effect of ovariectomy combined with hindlimb unloading and reloading on the long bones of mature Sprague-Dawley rats. *Menopause.* 2008;15(3):494-502.
- 142 Turner AS. Animal models of osteoporosis- necessity and limitations. *Eur Cells Mater.* 2001;1:66-81.
- 143 Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, Sibonga JD. Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001;2:117-127.
- 144 Ulrich D, Van Rietbergen B, Laib A, Rueeggsegger P. The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. *Bone.* 1999;25:55-60.
- 145 US National Institutes of Health. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. NIH Consensus Statement. 2000;17:1-45.
- 146 Van Der Klift M, De Laet CEDH, McCloskey EV, Hofman A, Pols AP. The incidence of vertebral fractures in men and women: The Rotterdam Study. *J Bone Miner Res.* 2002;17:1051-1056.
- 147 Vashishth D, Verborgt O, Divine G, Schaffler MB, Fyhrie DP. Decline in osteocyte lacunar density in human cortical bone is associated with accumulation of microcracks with age. *Bone.* 2000;26:375-380.
- 148 Vermeer C, Jie KSG, Knapen MHJ. Role of Vitamin K in Bone Metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1995;15:1-22.

- 149 Vidal B, Pinto A, Galvão MJ, Santos AR, Rodrigues A, Cascão R, Abdulghani S, Caetano-Lopes J, Ferreira A, Fonseca JE, Canhao H. Bone histomorphometry revisited. *Acta Reumatol Port.* 2012;37(4):294-300.
- 150 Von Hayek D, Werschmöller S. Ursachen. In: Thiemes Pflege (Schewior-Popp S, Sitzmann F, Ullrich L, Hrsg.). 13. aktualisierte und erweiterte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2017.
- 151 Wallach S, Cohen S, Reid DM, Hughes RA, Hosking DJ, Laan RF, Doherty SM, Maricic M, Rosen C, Brown J, Barton I, Chines AA. Effects of risedronate treatment on bone density and vertebral fracture in patients on corticosteroid therapy. *Calcif Tissue Int.* 2000;67:277-285.
- 152 Wein MN, Jones DC, Glimcher LH. Turning down the system: Counter-regulatory mechanisms in bone and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2005;208:66-79.
- 153 WHO Scientific Group. Prevention and management of osteoporosis. WHO Technical Report Series. 2003;921.
- 154 Wolfensohn S, Lloyd M. Handbook of laboratory animal - management and welfare. Hoboken, New Jersey, Vereinigte Staaten: Blackwell Publishing; 2003.
- 155 World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical Report Series, Geneva. 1994;843.
- 156 Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calc Tissue Int.* 1988;43:179-183.
- 157 Zaidi M, Blair HC, Moonga BS, Abe E, Huang CL. Osteoclastogenesis, bone resorption, and osteoclast-based therapeutics. *J Bone Miner Res.* 2003;18:599-609.

Publikationsverzeichnis

- August 2010 Beginn mit der Arbeit an der Promotion „Osteoporoseinduktion am Tiermodell der Ratte, Dual-X-ray-absorptiometry und histomorphometrische Untersuchungen“.
- Juni 2012 Mitautorenschaft bei der Publikation von Heiss C, Govindarajan P, Schlewitz G, Hemdan NY, Schliefske N, Alt V, Thormann U, Lips KS, Wenisch S, Langheinrich AC, Zahner D, Schnettler R. Induction of osteoporosis with its influence on osteoporotic determinants and their interrelationships in rats by DEXA. *Med Sci Monit.* 2012;18(6):199-207.
- Februar 2013 Mitautorenschaft bei der Publikation von Govindarajan P, Schlewitz G, Schliefske N, Weisweiler D, Alt V, Thormann U, Lips KS, Wenisch S, Langheinrich AC, Zahner D, Hemdan NY, Böcker W, Schnettler R, Heiß C. Implications of combined ovariectomy/multi-deficiency diet on rat bone with age-related variation in bone parameters and bone loss at multiple skeletal sites by DEXA. *Med Sci Monit Basic Res.* 2013;28(19):76-86.
- August 2013 Mitautorenschaft bei der Publikation von El Khassawna T, Böcker W, Govindarajan P, Schliefske N, Hürter B, Kampschulte M, Schlewitz G, Alt V, Lips KS, Faulenbach M, Möllmann H, Zahner D, Dürselen L, Ignatius A, Bauer N, Wenisch S, Langheinrich AC, Schnettler R, Heiß C. Effects of multi-deficiencies-diet on bone parameters of peripheral bone in ovariectomized mature rat. *PLOS ONE.* 2013;8(8):e71665.
- April 2015 Mitautorenschaft bei der Publikation von Bauer NB, El Khassawna T, Goldmann F, Stirn M, Ledieu D, Schlewitz G, Govindarajan P, Zahner D, Weisweiler D, Schliefske N, Böcker W, Schnettler R, Heiss C, Moritz A.

Characterization of bone turnover and energy metabolism in a rat model of primary and secondary osteoporosis. *Exp Toxicol Pathol.* 2015;67(4):287-296.

Vortrag und Posterpräsentationen:

- | | |
|---------------|--|
| November 2011 | Posterpräsentation mit dem Titel „Untersuchung der Knochendichte am Tiermodell der Ratte mittels Dual-X-ray-absorptiometry“ auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien |
| April 2012 | Wissenschaftlicher Vortrag mit dem Thema „Knochendichtemessung am Tiermodell der Ratte mittels Dual-X-ray-absorptiometry“ im Rahmen des VSOU-Nachwuchsförderpreises |
| Oktober 2012 | Posterpräsentation mit dem Titel „Bestimmung der Bone Mineral Density (BMD) am osteoporotischen Tiermodell durch Dual-X-ray-absorptiometry (DEXA)“ auf dem Deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie |

Erklärung zur Dissertation

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

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Herr Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß, Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie - Operative Notaufnahme am Uniklinikum Gießen und Marburg, Standort Gießen, für die Überlassung dieses interessanten Themas und der damit verbundenen Möglichkeit bedanken, an einem überregionalen Projekt wie dem Sonderforschungsbereich des Transregio 79 mitzuarbeiten. Vielen Dank für die investierte Zeit, die stets sehr gute Zusammenarbeit und Erreichbarkeit, die Gelegenheit an Kongressen mit eigenen Posterpräsentationen oder Vorträgen teilzunehmen und nicht zuletzt auch für die Geduld.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thaqif El Khassawna bedanken, der immer ein fachlich kompetenter und hilfsbereiter Ansprechpartner war und viel Zeit in meine Promotionsarbeit investierte.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. Christoph Biehl, Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie - Operative Notaufnahme und Labor für Experimentelle Unfallchirurgie des Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Gießen für die effiziente und konstruktive Korrektur meiner Promotionsarbeit.

Lieben Dank auch an Frau Dr. med. Gudrun Schlewitz für das Begleiten der Tierversuche, die gute Zusammenarbeit bei der Studienplanung und die schnelle Hilfe bei sämtlichen anderen Belangen.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Prof. Dr. Katrin Susanne Lips, sowie an alle Mitarbeiter des Labors für experimentelle Unfallchirurgie in Gießen für die stets freundliche Hilfe, die Anfertigung und Aufarbeitung der histologischen Schnitte und die Möglichkeit der Probenauswertung durch Bereitstellung der nötigen technischen Ausstattung.

Ich bedanke mich auch für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgesellschaft geförderten Sonderforschungsbereiches/Transregio 79, die meine Promotionsarbeit erst ermöglichte.

Vielen Dank an Dr. Daniel Zahner und an die Mitarbeiter des Zentralen Tierlabors der Universität Gießen für die wohlwollenden Ratschläge und die Versorgung und Betreuung der Versuchstiere.

Außerdem möchte ich mich bei Wolfgang Pabst für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung bedanken.

Von Herzen vielen Dank an meine Familie, die mich nicht nur während der Promotionsarbeit unterstützte, stets an mich glaubte und es mir erst ermöglichte diese Arbeit zu verfassen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Ehemann Oliver für die Geduld, das Verständnis und seine immerwährende Unterstützung.