

Humanisierung präklinischer Studien durch Etablierung
radiologischer Referenzwerte am Schafmodell mittels DXA

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

vorgelegt von Jakob Schmitt
aus Hanau

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thaqif El Khassawna

Gutachterin: Prof. Dr. med. Gabriele Krombach

Tag der Disputation: 20.04.2021

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| INHALTSVERZEICHNIS | I |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | IV |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 2 STAND DER WISSENSCHAFT | 3 |
| 2.1 DER AUFBAU DES KNOCHENS | 3 |
| 2.1.1 Makroskopischer Aufbau des Knochens..... | 3 |
| 2.1.2 Mikroskopischer Aufbau des Knochens..... | 5 |
| 2.1.3 Diagnostik von Knochenveränderungen im klinischen Alltag | 7 |
| 2.1.4 Peak Bone Mass..... | 9 |
| 2.1.5 Diagnostische Parameter auf Basis der Knochendichte | 10 |
| 2.2 DAS SCHAF ALS VERSUCHSTIER | 12 |
| 2.3 DAS KREUZBAND | 14 |
| 2.3.1 Allgemeines | 14 |
| 2.3.2 Ruptur des vorderen Kreuzbandes..... | 15 |
| 2.3.3 Diagnostik und Therapie | 16 |
| 2.4 MATERIALEIGENSCHAFTEN DER INTERFERENZSCHRAUBEN | 17 |
| 2.5 HYPOTHESEN UND MEILENSTEINE | 18 |
| 3 MATERIAL UND METHODEN | 20 |
| 3.1 VERSUCHSAUFBAU | 20 |
| 3.1.1 Tiermodell | 20 |
| 3.1.2 Tierhaltung und Fütterung | 21 |
| 3.1.3 Versuchsanordnung | 21 |
| 3.2 ABLAUF DES VERSUCHS | 22 |
| 3.2.1 Prämedikation | 22 |
| 3.2.2 Durchführung der DXA-Scans..... | 23 |
| 3.2.2.1 Kalibrierung und Qualitätskontrolle | 24 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.2.2.2 | Der Messvorgang | 25 |
| 3.2.3 | Analyse der DXA-Scans..... | 26 |
| 3.2.4 | Operation | 28 |
| 3.2.5 | Post-OP..... | 31 |
| 3.3 | STATISTISCHE AUSWERTUNG | 32 |
| 4 | ERGEBNISSE | 34 |
| 4.1 | DESKRIPTIVE STATISTIK..... | 36 |
| 4.1.1 | Gesamtauswertung..... | 36 |
| 4.1.2 | Die BMD in den verschiedenen Regions of Interest..... | 37 |
| 4.2 | UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN VERSUCHSGRUPPEN | 39 |
| 4.3 | KORRELATIONEN ZWISCHEN DER BMD UND DEN WEITEREN KNOCHENDICHTEPARAMETERN | 41 |
| 4.3.1 | Korrelationen der BMD innerhalb der jeweiligen Gruppen..... | 45 |
| 4.3.1.1 | ROI 1, Ganzkörper | 45 |
| 4.3.1.2 | ROI 7, obere Lendenwirbelsäule | 47 |
| 4.3.1.3 | ROI 8, linker Femurkopf | 49 |
| 4.3.1.4 | ROI 9, rechter Femurkopf..... | 51 |
| 4.4 | BERECHNUNG EINER UNABHÄNGIGEN REFERENZGRUPPE..... | 53 |
| 4.4.1 | Vergleich der beiden Referenzgruppen | 54 |
| 4.4.1.1 | ROI 1, Ganzkörper | 55 |
| 4.4.1.2 | ROI 7, obere Lendenwirbelsäule | 57 |
| 4.4.1.3 | ROI 8, linker Femurkopf | 58 |
| 4.4.1.4 | ROI 9, rechter Femurkopf..... | 59 |
| 4.5 | DER ALTERSABHÄNGIGE VERLAUF DER KNOCHENDICHTEPARAMETER..... | 61 |
| 4.5.1 | Regressionsmodelle zum altersabhängigen Verlauf der Knochendichteparameter | 61 |
| 4.5.2 | Exemplarische Betrachtung des Verlaufes von BMD und BMC in ROI 7, obere LWS..... | 63 |
| 5 | DISKUSSION | 65 |
| 5.1 | ALTERNATIVMETHODEN ZUM TIERMODELL | 65 |
| 5.2 | AKTUELLE SITUATION IN DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG | 67 |

| | |
|---|------------|
| 5.2.1 Anforderungen an Studien mit Tiermodellen..... | 67 |
| 5.2.2 Tierversuche in Orthopädie und Unfallchirurgie | 70 |
| 5.3 KONTROLLGRUPPEN IN AKTUELLEN GROßTIERSTUDIEN..... | 73 |
| 5.3.1 Einflussfaktoren auf die BMD..... | 74 |
| 5.4 DIE UNABHÄNGIGE REFERENZGRUPPE | 75 |
| 5.5 DER EINFLUSS DES ALTERS AUF DIE KNOCHENDICHTEPARAMETER..... | 77 |
| 5.6 EINFLUSS AUF DAS DESIGN KÜNFTIGER STUDIEN | 78 |
| 6 AUSBLICK..... | 80 |
| 7 ZUSAMMENFASSUNG | 82 |
| 8 SUMMARY | 84 |
| 9 ANHANG..... | 86 |
| 9.1 ABLAUF DER KNOCHENDICHTESCANS..... | 86 |
| 10 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG | 94 |
| 11 LEBENS LAUF | 95 |
| 12 LITERATURVERZEICHNIS | 97 |
| 13 ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | 107 |
| 14 TABELLENVERZEICHNIS | 109 |
| 15 DANKSAGUNG | 110 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------|--|
| BMC | bone mineral content |
| BMD | bone mineral density |
| CT | Computertomographie |
| DGU | Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie |
| DXA | Dual-X-Ray-Absorptiometry |
| FDA | Food and Drug Administration |
| HA | Hydroxylapatit |
| HWS | Halswirbelsäule |
| LWS | Lendenwirbelsäule |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| PBM | peak bone mass |
| PLLA | L-Polylaktat |
| ROI | Region of Interest |
| SFB | Sonderforschungsbereich |
| WHO | World Health Organisation/ Weltgesundheitsorganisation |
| ZFE | Zentrale Forschungseinrichtung |

1 Einleitung

Tierversuche befinden sich seit geraumer Zeit unter kritischer Beobachtung der Gesellschaft. Sie stehen im Spannungsfeld zwischen ethischen Aspekten des Tierschutzes und der Notwendigkeit medizinischen Fortschrittes. An Studien, die auf dem Einsatz von Tiermodellen beruhen, werden heute hohe ethische Ansprüche gestellt. Sie werden ausschließlich genehmigt, wenn keine geeignete Alternativmethode zum Tierversuch existiert. Die Weiterentwicklung jener Alternativverfahren steht aktuell besonders im Fokus wissenschaftlicher Forschung. Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) fördert bereits seit 1980 die Erforschung alternativer Methoden. Wichtige Grundlage dieser Forschung stellt das *3R-Konzept* von Russell und Burch aus dem Jahr 1959 dar. Dieses setzt sich aus den Begriffen *Replacement*, *Reduction* und *Refinement* zusammen. *Replacement* zielt auf den Ersatz des Tiermodells durch neuere Methoden, wie etwa dem Gebrauch von Mikrochips ab. *Reduction* bedeutet, die Zahl der eingesetzten Tiere so niedrig wie möglich zu halten. *Refinement* bedeutet, einen Tierversuch möglichst effektiv durchzuführen. Maximaler Informationsgewinn bei minimalem Leid der Tiere steht hierbei im Vordergrund (Bundesministerium für Bildung und Forschung 2016; Russell und Burch 1959).

Gerade beim Einsatz von Großtiermodellen in der medizinischen Forschung ist bezogen auf *Refinement* und *Reduction* noch viel Entwicklungspotenzial vorhanden. Während Kleintiere, beispielsweise Mäuse oder Ratten, in homogenen Populationen für die entsprechende Fragestellung herangezüchtet werden können, muss beim Großtier auf heterogene Populationen aus kommerzieller Züchtung zurückgegriffen werden. Dies hat einen negativen Einfluss auf die Ergebnisse der Studien. Oft zeigt sich erst retrospektiv, welche Tiere für die Studie auch wirklich geeignet waren. Aus logistischen und wirtschaftlichen Gründen stellt die gezielte Heranzüchtung von Großtieren für eine Studie keine ernsthafte Alternative dar. Es ist daher notwendig, Großtiermodelle so gut wie möglich zu standardisieren, um die Qualität der Ergebnisse und damit die Vergleichbarkeit medizinischer Studien positiv zu beeinflussen.

Merino-Landschafe stellen ein beliebtes Großtiermodell in der Erforschung systemischer Skeletterkrankungen wie der Osteoporose dar. Weiterhin eignen sie sich aufgrund von Größe und Gewicht hervorragend als Modell für den Einsatz neuer Implantationsmaterialien in der Orthopädie und Unfallchirurgie. Zum effektiveren Informationsgewinn ist es notwendig, Referenz- und Standardwerte für dieses Tiermodell zu etablieren. Der Fokus dieser Arbeit bezieht sich auf die Knochendichte.

Die *peak bone mass (PBM)* stellt eine wichtige Referenzgröße für die Qualität des Knochens dar. In der Humanmedizin wird auf der Basis dieses Wertes der größten Knochendichte der sog. *T-Score* entwickelt. Hierbei handelt es sich um eines der wichtigsten Diagnosekriterien zur Erkennung einer Osteoporose. Durch diesen Parameter lässt sich ein individuell gemessener Wert der Knochendichte in den Kontext der Normalbevölkerung einordnen. So ist eine einfache Unterscheidung zwischen pathologischen und physiologischen Werten möglich.

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Auswertung projektübergreifender Knochendichtemessungen erste Referenzwerte für das Merino-Landschaf zu gewinnen. Hieran können sich künftige Forschungsprojekte orientieren, die die Tiere als Großtiermodell nutzen.

Ist die PBM und deren altersabhängiger Verlauf bekannt, so wird dies direkten Einfluss auf die Planung nachfolgender Studien haben. Es ist so möglich, die Auswahl der Versuchstiere zu verfeinern. Es können beispielsweise nur Tiere innerhalb eines gewissen Alterskorridors in die Studie aufgenommen werden. Mit der Etablierung eines T-Scores für Merino-Landschafe würden osteoporosebezogene Studien besser mit der aktuellen klinischen Situation vergleichbar gemacht werden. Ähnlich wie beim Menschen wäre es möglich, die gemessenen Parameter der Knochendichte nicht nur mit den Ergebnissen einer kleinen Referenzgruppe, sondern mit einem repräsentativen Referenzwert zu vergleichen. Dies würde die Qualität und deren klinische Relevanz für die Medizin deutlich erhöhen.

2 Stand der Wissenschaft

2.1 Der Aufbau des Knochens

Das Skelett übernimmt wichtige Aufgaben im Organismus. Es dient als Halte- und Stützapparat und ermöglicht durch die Bildung von Gelenken die passive, sowie als Ansatz- und Ursprungsort der Muskeln auch die aktive Beweglichkeit. Des Weiteren erfüllt es wichtige Schutzfunktionen für innere Organe, beispielsweise von Herz und Lunge im Thorax oder des Gehirns innerhalb des Schädels. Um diesen Aufgaben gerecht zu werden, ist neben mechanischer Belastbarkeit auch Elastizität gefragt. Von eminenter Bedeutung für den Organismus ist auch die Bildung von Blut- und Immunzellen im Knochenmark (Schiebler und Korf 2007).

Weiter stellt das Skelettsystem den wichtigsten Calciumspeicher des Menschen dar. Reguliert durch die Hormone der Nebenschilddrüse und Vitamin D wird Calcium, je nach den Bedürfnissen des Organismus, aus dem Knochen abgegeben oder in diesem gespeichert (Schiebler und Korf 2007).

Der Aufbau und die Struktur der Knochen bilden die Grundlage, auf der es möglich ist, all diesen Anforderungen gerecht zu werden.

2.1.1 Makroskopischer Aufbau des Knochens

Im Skelett des Menschen finden sich verschiedene Arten von Knochen, die einander im Aufbau stark ähneln. Die äußere Schicht besteht aus kompaktem Knochenmaterial, der sog. *Substantia compacta* oder *Corticalis*. Im Inneren des Knochens, unterhalb der *Corticalis*, befindet sich ein lockeres Netzwerk aus Knochenbälkchen, die sog. *Substantia spongiosa*.

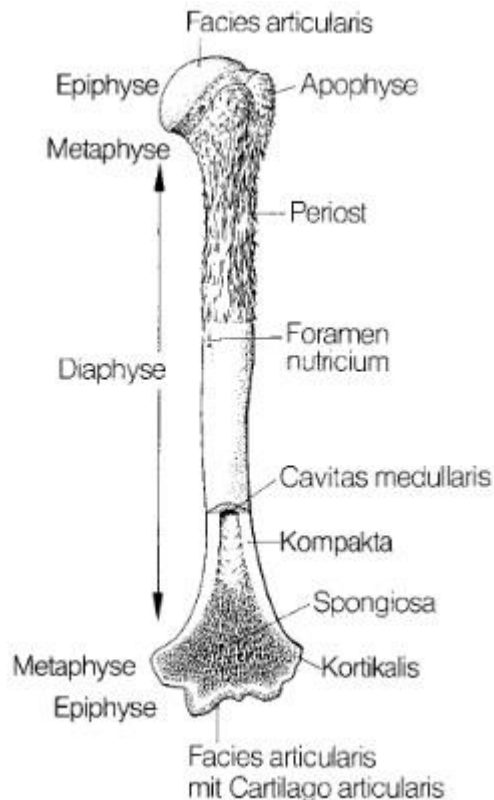


Abbildung 1: Makroskopischer Aufbau eines Röhrenknochens. Am distalen und proximalen Ende sind die *Epiphysen* an der Gelenkbildung beteiligt. Die *Metaphyse* stellt den verdickten Bereich zwischen der *Epi-* und der *Diaphyse* dar, die den Schaft des Knochens bildet. Die *Compacta* oder *Corticalis* bildet den äußeren Rand des Knochens, sie besteht aus dicht gepacktem Knochengewebe. Die *Spongiosa* dagegen besteht aus einem lockeren Netzwerk. Aus: Schiebler und Korf 2007, S. 156.

Nach der äußeren Form erfolgt eine Einteilung in verschiedene Kategorien. Man unterscheidet lange Röhrenknochen (*Ossa longa*), wie den *Humerus* (Abbildung 1), kurze Knochen (*Ossa brevia*), wie die Wirbelkörper und platte Knochen (*Ossa plana*), wie die *Scapula*. An den langen Röhrenknochen lässt sich die funktionelle Einteilung in *Epi-*, *Meta-* und *Diaphyse* anschaulich darstellen (Abbildung 1). Die *Epiphysen* bilden die Endstücke der Knochen und sind Bestandteile der Gelenke. Während der Wachstumsphase findet das Längenwachstum der Knochen in den Epiphysenfugen, am Übergang zwischen *Epi-* und *Diaphyse* statt. Die *Diaphyse* bildet den Schaft des Röhrenknochens, geschützt von stark ausgeprägter *Compacta* findet sich hier die Markhöhle. *Metaphyse* bezeichnet den verdickten Bereich der *Diaphyse* am Übergang zur *Epiphyse* (Schiebler und Korf 2007).

Neben den makroskopischen haben auch die mikroskopischen Komponenten des Knochenbaues einen nicht minder wichtigen Einfluss auf die Eigenschaften des Knochensystems.

2.1.2 Mikroskopischer Aufbau des Knochens

Man unterscheidet Lamellen- von Geflechtknochen. Während der Geflechtknochen beim Erwachsenen hauptsächlich bei der Frakturheilung vorkommt und durch eine unregelmäßige Anordnung der Kollagenfasern charakterisiert ist, findet sich der Lamellenknochen deutlich häufiger. Hier unterliegen die Kollagenfasern einer definierten Ordnung, sie bilden Lamellen. In kompaktem Knochen (Abbildung 2, (1)) findet man *Osteone* (Abbildung 2, (3)) dicht gepackt. Dabei handelt es sich um mehrere, konzentrisch verlaufende, Kollagenlamellen in deren Mitte sich der *Harvers-Kanal* (Abbildung 2, (6)) befindet. Innerhalb der Lamellen liegen Lakunen, in denen sich *Osteozyten* befinden, deren Zellfortsätze mit denen anderer *Osteozyten* kommunizieren. Über den sog. *Volkman-Kanal* (Abbildung 2, (10)) besteht eine Verbindung zwischen den einzelnen *Osteonen*. In spongiösem Knochen (Abbildung 2, (2)) sind die *Osteone* wesentlich seltener zu finden und liegen weniger dicht beieinander. Die *Harvers-Kanäle* sind hier im Vergleich zur *Compacta* deutlich erweitert (Abbildung 2, (7)) und es bildet sich ein sog. Trabekelwerk (Schiebler und Korf 2007; Lippert 2006).

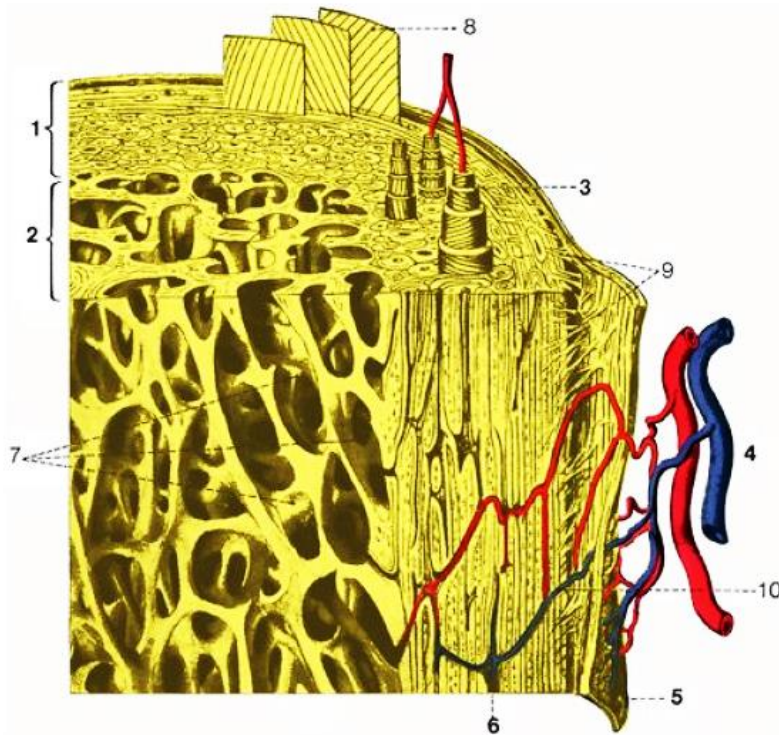


Abbildung 2: Lamellenknochen. In der *Compacta* (1) sind die *Osteone* aus konzentrischen Kollagenlamellen (3) sehr eng gepackt. die Harvers-Kanäle (6) stehen über die Volkmann-Kanäle, die auch Blutgefäße führen (10), untereinander in Verbindung. In der *Spongiosa* (2) sind die Harvers-Kanäle deutlich erweitert (7), es bilden sich Trabekel. Das Knochengewebe ist hier deutlich aufgelockert. Aus: Lippert 2006, S. 82.

Wie alle Organe des Menschen unterliegt der Knochen einem Metabolismus. Es findet ein permanenter Auf- und Abbau der Knochensubstanz statt. Hierbei arbeiten *Osteoblasten* (Aufbau) und *Osteoklasten* (Abbau) unter dem Einfluss zahlreicher Mediatoren und Hormone. Pro Jahr werden so 10% des Skelettes erneuert (Cohen Jr. 2006), bei Kindern läuft dieser *Remodeling-Prozess* schneller ab. Dies zeigt sich u.a. im schnelleren Heilungsprozess von Frakturen (Cohen Jr. 2006; Rang 1983; Sharma et al. 2003). Kommt es zu einer Dysregulation des Gleichgewichtes aus Knochenauf- und -abbau führt dies zu Erkrankungen wie *Osteoporose* oder *Osteopetrose*.

Neben zellulären Komponenten, Proteinen und Wasser, besteht der Knochen zu 40 – 45% aus Mineralien. Diese entwickeln sich zwischen den organischen Anteilen (hauptsächlich Kollagen Typ I) zu Mineralkeimen, aus denen *Hydroxylapatit* (HA) hervorgeht. Wenngleich HA das festeste Material im menschlichen Körper darstellt, ist es aufgrund

seiner Sprödigkeit als alleiniger Knochenbestandteil ungeeignet. Nur im Zusammenspiel der verschiedenen Eigenschaften der einzelnen Bestandteile ist es möglich, allen Anforderungen an den Knochen gerecht zu werden (Freyschmidt 2008).

In der Klinik stellt neben der körperlichen Untersuchung die radiologische Bildgebung einen der wichtigsten diagnostischen Wege bei Störungen der Knochenfunktion dar. Hierbei macht man sich unter anderem die unterschiedliche mikro- und makroskopische Bauweise der Knochen zu Nutze.

2.1.3 Diagnostik von Knochenveränderungen im klinischen Alltag

Verletzungen oder Erkrankungen des Knochensystems sind sehr häufig auftretende klinische Fragestellungen. In der Diagnostik hat sich dabei in den verschiedenen Fachdisziplinen die radiologische Bildgebung als eines der wichtigsten Instrumente etabliert. Mit Hilfe von konventionellen Röntgenbildern lassen sich schnell, kostengünstig und vor allem nicht-invasiv Pathologien darstellen. Dabei handelt es sich meist um Frakturen. Es lassen sich aber auch strukturelle Veränderungen, die z.B. im Rahmen einer Tumorerkrankung oder der *Osteogenesis imperfecta* auftreten können, darstellen. Durch die Bildgebung wird nicht nur die Diagnostik, sondern auch die Beurteilung von Krankheitsverläufen deutlich erleichtert. Neben dem konventionellen Röntgen, das oft schon für die Stellung einer Diagnose ausreicht, setzt man im klinischen Alltag immer häufiger auf detailliertere Verfahren, wie die Computertomographie (CT) oder die Magnetresonanztomographie (MRT). Mit Hilfe dieser Schnittbildverfahren lassen sich auch kleinere Veränderungen radiologisch darstellen. Das MRT eignet sich dabei besonders zur Darstellung des Weichteilgewebes (Seitlinger et al. 2010).

Zur Beurteilung einer Aufnahme des Skelettsystems ist es wichtig, sich mit den radiologischen Strukturparametern des Knochens vertraut zu machen. Hierbei spielt die Knochendichte eine zentrale Rolle. Sie wird radiologisch als *bone mineral density (BMD)* bezeichnet und ist eine dynamische Größe, die sich auch innerhalb eines einzelnen Knochens unterscheiden kann. So hat z.B. die *Corticalis* einen deutlich höheren BMD-Wert als die *Spongiosa*. Je dichter ein Knochen ist, desto mehr Strahlung absorbiert er, d.h. desto heller wird er im Röntgenbild dargestellt. Bei der BMD handelt es sich um eine

zweidimensionale Größe, sie wird in g/cm^2 angegeben. Neben der BMD kann radiologisch auch der Mineralgehalt des Knochens in Gramm bestimmt werden, der sog. *bone mineral content (BMC)*. Des Weiteren lässt sich mit Hilfe densitometrischer Verfahren der Fettanteil (in g) in den gemessenen Arealen bestimmen (Freyschmidt 2008).

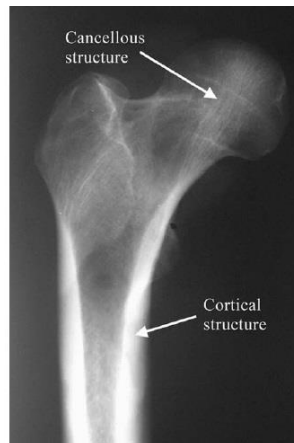


Abbildung 3: Röntgenaufnahme eines proximalen Femurs. Die dichtere *Corticalis* absorbiert deutlich mehr Strahlung als die *Spongiosa*. Aus: Walsh et al. 2010, S. 40.

Um einen allgemeinen Überblick über die Knochenqualität bzw. -dichte eines Patienten zu erlangen haben sich im klinischen Alltag allerdings andere radiologische Verfahren als die oben genannten durchgesetzt. Neben dem qCT spielt dabei das *DXA-Verfahren (Dual-X-Ray-Absorptiometry)* die Hauptrolle. Dabei handelt es sich um ein kostengünstiges Verfahren, welches auch aufgrund seiner geringen Strahlenbelastung häufig eingesetzt wird (Freyschmidt 2008; Pouilles et al. 2000). Durch den vielfachen Einsatz und die entsprechend hohe Datenlage konnte mit Hilfe des sog. *T-Scores* ein Diagnosewerkzeug entwickelt werden, welches heute eines der Hauptkriterien der Osteoporosediagnostik darstellt (Freyschmidt 2008; Felsenberg und Gowin 1999; Herold 2010; Kanis 1997; Kanis und Johnell 2005). Wichtigste Grundlage für die Entwicklung des T-Scores stellt die *peak bone mass (PBM)* dar.

2.1.4 Peak Bone Mass

Die *peak bone mass (PBM)* ist eine der wichtigsten Referenzgrößen der Osteodensitometrie. Es handelt sich dabei um den Wert der Knochendichte (BMD) nach Erreichen der Skelettreife. Dies ist beim Menschen i.d.R. zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr der Fall (WHO 1994). Mit Erreichen der PBM verbleibt der Wert der Knochendichte zunächst auf einem konstant hohen Niveau. Während dieser Plateauphase besteht ein geringes Frakturrisiko (Abbildung 4). Bei Frauen sinkt dieser Wert mit Eintritt in die Menopause wieder ab, was auch durch den fallenden Östrogenspiegel begründet wird. Der Rückgang des osteoprotektiven Hormons beeinflusst die Knochendichte negativ (Matkovic et al. 1994; Heaney et al. 2000).

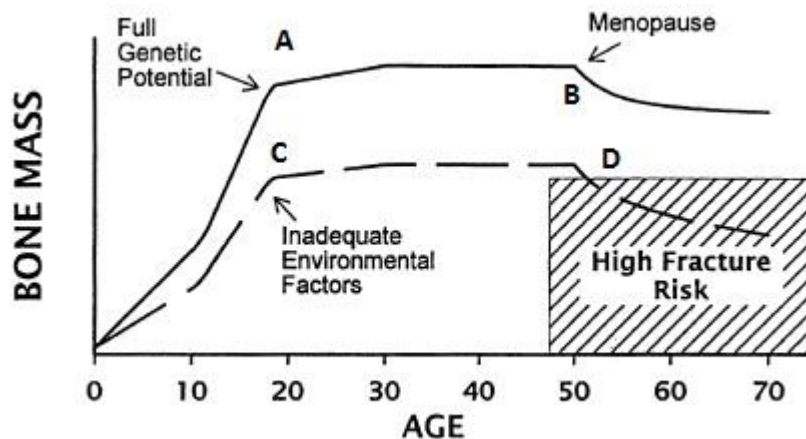


Abbildung 4: Verlauf und Einflüsse auf die PBM. Mit Erreichen des vollen genetischen Potenzials (A) wird die PBM erreicht, der Wert bleibt über Jahrzehnte stabil, bis er mit Eintritt der Menopause (B) wieder abfällt. Durch störende Umweltfaktoren kann es zu Fehlern in der Skelettreifung führen, sodass nur ein niedriger Wert erreicht werden kann (C), dadurch ist nach Eintritt in die Menopause das Frakturrisiko deutlich erhöht (D). Aus: Heaney et al. 2000, S. 986.

Ein hoher PBM-Wert lässt sich nur durch optimales Zusammenspiel aller für die Knochendichte wichtigen Faktoren erreichen. Dabei spielen externe Einflüsse wie Ernährung (u.a. die Versorgung mit ausreichend Calcium und Vitamin D), Körpergewicht und mechanische Beanspruchung eine Rolle. Der weitaus größte Anteil ist jedoch bereits genetisch determiniert und kann durch die oben genannten externen Faktoren positiv oder negativ beeinflusst werden (Heaney et al. 2000; Johnson et al. 1997; Koller et al. 1998).

Der PBM-Wert, der i.d.R. mittels densitometrischer Verfahren wie DXA oder qCT erhoben wird, lässt Rückschlüsse auf die Stabilität des Skeletts im weiteren Verlauf des Lebens zu. Von besonderem Interesse ist hier das höhere Lebensalter, in welchem Sturzgefahr und Osteoporose die Risikofaktoren für Frakturen darstellen. Ein hoher Knochendichtewert in jungen Jahren lässt auf eine größere Knochendichte im Alter schließen, ist also seltener mit Osteoporose und den häufig daraus resultierenden Frakturen assoziiert (Newton-John und Morgan 1970; Matković et al. 1979).

Auf Basis der PBM einer gesunden jungen Population wird in der Klinik der T-Score in Knochendichtemessungen bei Verdacht auf eine Osteoporoseerkrankung angewendet. Auf ihrer Basis wird also die Diagnostik dieser Erkrankung maßgeblich erleichtert (WHO 1994).

2.1.5 Diagnostische Parameter auf Basis der Knochendichte

Mit dem T-Score konnte ein wichtiges Diagnosekriterium bei Verdacht auf eine Osteoporoseerkrankung auf Basis der PBM etabliert werden. Es wurden die durchschnittlichen BMD-Werte einer jungen, gesunden Population bestimmt. Dieser Wert bildet die Basis für den T-Score und dient als Referenz für die Osteoporosediagnostik (Blake und Fogelman 2007; WHO 1994). Es wird dabei für jede Region des Skelettes ein eigener Score berechnet. Von besonderem Interesse für die Osteoporosediagnostik sind dabei die Lendenwirbelsäule und die Hüfte (Bartl und Bartl 2010). Bei der Osteoporose handelt es sich um eine multifaktoriell bedingte Erkrankung mit einem Ungleichgewicht im Knochenstoffwechsel zu Lasten des Knochenaufbaus. Aus der sinkenden Knochendichte resultiert die erhöhte Frakturneigung der Betroffenen. Besonders häufig tritt die Erkrankung bei postmenopausalen Frauen auf, was einen Zusammenhang mit sinkenden Östrogenspiegeln nahelegt (Herold 2010).

Als T-Score wird die Abweichung einer gemessenen BMD von den Werten der Referenzgruppe bestehend aus den Daten junger, gesunder Menschen bezeichnet. Je nach Alter, stattgehabter Frakturen oder anderer Risikofaktoren kann anhand dieses Verfahrens die Diagnose einer Osteoporose- oder Osteopenieerkrankung erfolgen (Herold 2010; Bartl und Bartl 2010). Neben des T-Scores wird auch der Z-Score angewendet. Hierbei

handelt es sich um einen auf das Geschlecht und Alter des Patienten angepassten Wert. Für die Einschätzung des Risikos einer Fraktur spielt der Z-Score im Vergleich zum T-Score jedoch eine eher untergeordnete Rolle. Im höheren Lebensalter ist das Frakturrisiko oftmals trotz eines unauffälligen Z-Scores erhöht (Felsenberg und Gowin 1999).

In der Klinik wird hauptsächlich der T-Score angewandt. Ab einer Abweichung von mehr als -2,5 Standardabweichungen von der PBM knochengesunder Menschen kann hier die Diagnose einer Osteoporoseerkrankung gestellt werden.

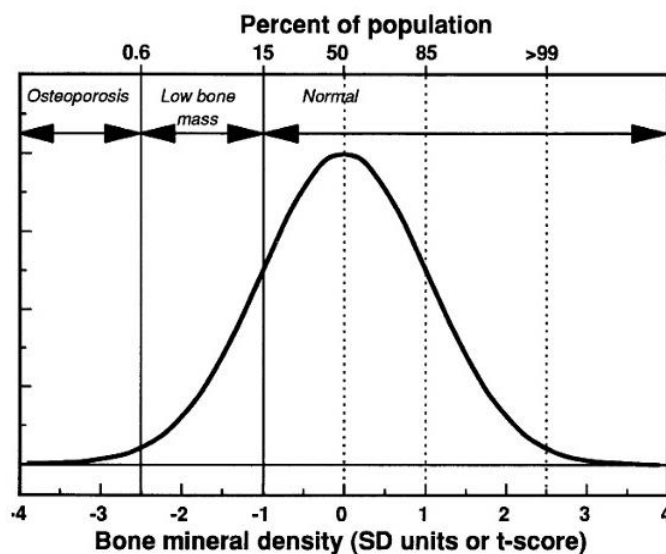


Abbildung 5: T-Score. Ausgehend von einer Normalverteilung der BMD wird vom Durchschnittswert einer jungen, gesunden Bevölkerung bestimmt. Bei Abweichungen von -1 bis -2,5 Standardabweichungen besteht eine Osteopenie, ab -2,5 Standardabweichungen eine Osteoporose. Aus: Kanis und Glüer 2000, S. 193.

Als Verfahren der Wahl hat sich dabei die *Dual-X-Ray-Absorptiometry (DXA)* durchgesetzt (Kanis 1997; Bartl und Bartl 2010; Consensus development conference 1993). Bei dieser Methode werden Strahlungen aus zwei verschiedenen Energiespektren eingesetzt. Die Strahlung aus einer niederen Energiequelle bedingt einen größeren Absorptionsunterschied zwischen Knochen und Weichteilgewebe, als die Strahlung mit höherer Energie. Aus den sog. Schwächungsprofilen beider Energien lässt sich, mit Hilfe einer passenden Software, das Schwächungsprofil des Knochens errechnen. Hieraus kann anschließend die BMD berechnet werden (Freyschmidt 2008; Felsenberg und Gowin 1999).



Abbildung 6: DXA-Gerät von Typ *Lunar Prodigy*, wie es im klinischen Alltag und für diese Studie eingesetzt wird. Der Patient befindet sich in Rückenlage auf der Liegefläche, während sich der Arm mit der Strahlenquelle über ihn bewegt. © GE Healthcare

2.2 Das Schaf als Versuchstier

In der Materialforschung stellen Tiermodelle eine unverzichtbare präklinische Methodik dar. Nur im lebenden Organismus lässt sich die Interaktion des zu erforschenden Materials mit Knochengewebe überprüfen. Beispielhaft ist hierbei der Einsatz von Schafen als Großtiermodell für neues Material in der Kreuzbandchirurgie zu nennen. Eine grundlegende Frage liegt hierbei im Einfluss der Knochendichte der Tiere auf die Integration des eingesetzten Materials in das umliegende Knochengewebe.

Die Indikation zum Tierversuch muss stets kritisch gestellt werden und das Tiermodell muss zum vorhandenen Studiendesign passen (Pearce, A. I., et al. 2007; Roach et al. 1989). Der Einsatz jeder Spezies hat Vor- und Nachteile, die genau gegeneinander abgewogen werden sollten. Kleintiere, wie Ratten oder Kaninchen, sind sehr einfach zu halten und können für die jeweilige Studie herangezüchtet werden. Hier kann auf eine homogene Tierpopulation zurückgegriffen werden. Alle Tiere sind dabei im gleichen Alter, gleichen Geschlechts und gleicher Abstammung. Dieser geringe interindividuelle Unterschied hat direkten Einfluss auf die Ergebnisse der Studie (Lelovas et al. 2008; Banu 2011). Beim Großtiermodell ist eine solche Form der Standardisierung kaum möglich. Die Tiere können i.d.R. nicht für die Studie herangezüchtet werden. Meist muss mit Tieren aus kommerzieller Züchtung gearbeitet werden. Dadurch entsteht eine heterogene

Population bezogen auf Alter, Größe und Gewicht. Dies erschwert die korrekte Interpretation der Versuchsergebnisse.

Beim oben angesprochenen Tiermodell für die Materialforschung in der Kreuzbandchirurgie bietet besonders das Schaf als Großtiermodell beste Voraussetzungen für eine sinnvolle und erfolgreiche Durchführung.

Beim Schaf handelt es sich um ein häufig genutztes Großtiermodell, gerade bei traumatologischen Studien (Martini et al. 2001). Sie sind relativ anspruchslos und als Herdentiere sehr gut in Kleingruppen zu halten, ohne dass bei den Tieren unnötiger Stress entstehen würde. Sie verhalten sich weder untereinander noch gegenüber dem Menschen aggressiv. Bei ausgewachsenen Schafen entsprechen sowohl das Körpergewicht, als auch die Größe der Knochen in etwa den Werten eines Menschen (Newman et al. 1995; Radford et al. 1996; Aerssens et al. 1998). Weiterhin sind sie robust und neigen selten zu postoperativen Infektionen. Für Studien zu Materialien in der operativen Kreuzbandversorgung eignen sich die Tiere nicht zuletzt durch die Größe ihrer Kniegelenke. Dem Chirurgen sind alle wichtigen Strukturen gut zugänglich und zu implantierende Materialien können in Originalgröße eingesetzt und deren Qualität unter realistischer biomechanischer Beanspruchung überprüft werden (Allen et al. 1998; Pearce, A. I., et al. 2007).

Die Knochendichte der Schafe ist höher als die des Menschen. Am distalen Femur konnte eine um den Faktor 1,5 bis 2 höhere Dichte nachgewiesen werden (Pearce, A. I., et al. 2007; Kleer 2006; Nafei et al. 2000; Liebschner 2004). Weiter ist zu beachten, dass ihre Knochendichte um bis zu 5,1% im Verlauf eines Jahres schwanken kann. Dabei werden in den Sommermonaten signifikant höhere Werte als im Winter erreicht (Arens et al. 2007). Von großem Vorteil ist jedoch die Ähnlichkeit des Einwachsens des Knochengewebes in poröse Implantate bei Schafen und Menschen (Willie et al. 2004).

Obwohl das Schaf sehr häufig als Tiermodell zu orthopädischen oder unfallchirurgischen Fragestellungen herangezogen wird und man sich der Bedeutung der Knochendichte der Tiere zur Interpretation der Ergebnisse bewusst ist, existiert kein etabliertes Standardverfahren zur Interpretation der BMD-Werte innerhalb der Spezies. Ein solches Verfahren würde die interindividuellen Unterschiede der Tiere einer Versuchsgruppe berücksichtigen. Damit würde es die Interpretation der Versuchsergebnisse und deren

Übertragbarkeit auf die klinische Anwendung beim Menschen durch korrekte Einordnung der Knochendichte deutlich erleichtern.

2.3 Das Kreuzband

2.3.1 Allgemeines

Bei Studien zur Therapie einer Kreuzbandruptur sollte auf Großtiere wie Schafe zurückgegriffen werden. Die hohe biomechanische Beanspruchung, der ein hier implantiertes Material unterliegt, kann nur in Großtieren simuliert werden, die in Größe und Gewicht dem Menschen ähneln (Newman et al. 1995).

Beim Kniegelenk handelt es sich um das größte Gelenk des menschlichen Körpers. Hier artikulieren *Femur*, *Tibia* und *Patella* miteinander. Es erlaubt Flexion und Extension sowie in geringerem Maße und gebeugter Stellung eine Außen- und Innenrotation des Unterschenkels.

Innerhalb der Gelenkkapsel, jedoch extrasynovial gelegen, befinden sich die beiden Kreuzbänder. Das vordere Kreuzband (*Ligamentum cruciatum anterius*) zieht vom *Condylus lateralis* des *Femurs* zur *Area intercondylaris anterior* der *Tibia* (Abbildung 7). Wie alle Bänder des Menschen bestehen auch die Kreuzbänder aus Kollagenfaserbündeln, deren Verlauf dem der Zugbeanspruchung entspricht (Schiebler und Korf 2007).

Beim vorderen Kreuzband handelt es sich um einen der wichtigsten Stabilisatoren des Kniegelenks. Es ist eine der Leitstrukturen der Bewegung des *Femurs* gegen die *Tibia*. Hauptsächlich sichert es das Kniegelenk gegen anteriore Translation und Innenrotation in strecknaher Stellung und verhindert eine Subluxation des Kniegelenks mit anteriorer Verschiebung der *Tibia*. Weiterhin hat es Einfluss auf die propriozeptive Wahrnehmung des Kniegelenkes (Lobenhoffer und Agneskirchner 2005).

2.3.2 Ruptur des vorderen Kreuzbandes

Die Ruptur des vorderen Kreuzbandes ist eine häufig auftretende Sportverletzung, die Inzidenz wird auf bis zu 77 pro 100.000 Einwohner geschätzt (Olsson et al. 2016). Meist sind junge, sportlich aktive Menschen betroffen. Gehäuft tritt die Verletzung bei Sportarten wie Fußball oder alpinem Skifahren auf (Majewski et al. 2006). I.d.R. ist anamnestisch eine Hyperrotation, -flexion oder -extension als Ursache der Ruptur festzustellen. Während im Erwachsenenalter meist das Kreuzband im *femoralem* Drittel zerreißt, treten im Kindesalter nicht selten knöcherne Kreuzbandausrisse, meist aus der *tibialen* Verankerung, auf. Dies wird auf die hohe Flexibilität der Bänder und die noch nicht erreichte PBM im Kindesalter zurückgeführt (Enderle und Frosch 2013; Schoepp et al. 2014; Sharma et al. 2003; Rang 1983; Micheli 1983).

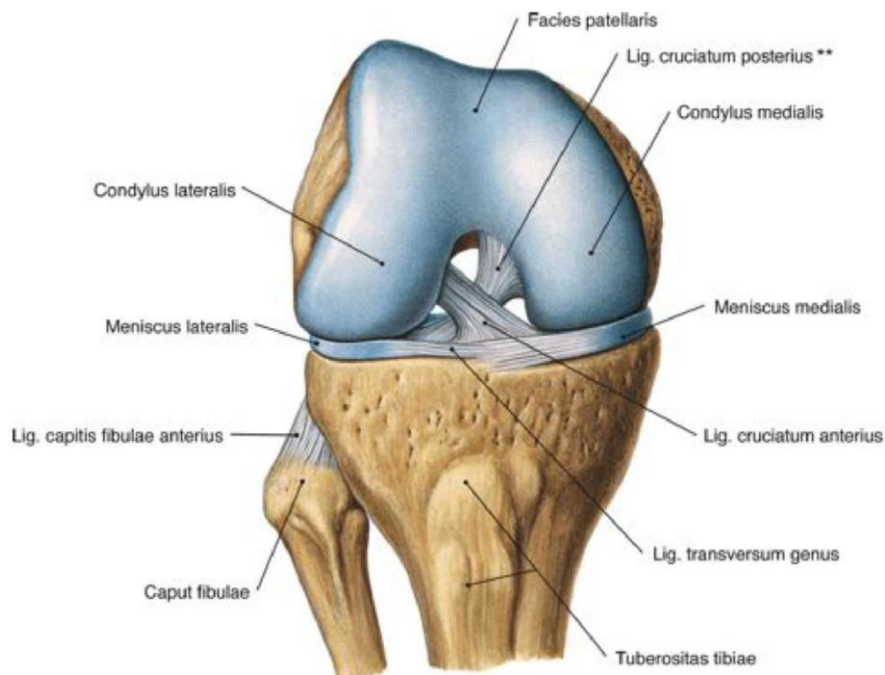


Abbildung 7: Anatomischer Verlauf des vorderen Kreuzbandes (*Lig. Cruciatum anterius*) im rechten Kniegelenk. Vom lateralen *Femurkondylus* zieht es zur *Area intercondylaris anterior* der *Tibia*. Aus Sobotta et al. 2007; S. 544.

Als Folge der Ruptur ist die Roll-Gleit-Bewegung zwischen *Femur* und *Tibia* gestört. Es kommt zur anterioren Translation der *Tibia*. Des Weiteren fehlt die Hemmung der Innenrotation. Die Patienten klagen gehäuft über ein Gefühl der Instabilität im

Kniegelenk, was durch die Störung der propriozeptiven Wahrnehmung verstärkt wird. Nicht selten kommt es zu Begleitverletzungen am Kniegelenk. Meist betrifft dies Kollateralbänder oder Menisken. Bei Patienten mit hoher körperlicher Aktivität treten gehäuft Sekundärschäden an den Menisken fünf bis zehn Jahre nach der Kreuzbandruptur auf (Lobenhoffer und Agneskirchner 2005).

2.3.3 Diagnostik und Therapie

Die Diagnostik der Verletzung beinhaltet, neben ausführlicher Anamnese des Verletzungsmechanismus, die körperliche Untersuchung. Ein positives *Lachman-Zeichen*, der sog. *Pivot-Shift* und der *Schubladen-Test* geben Hinweise auf eine Ruptur (Katz und Fingerroth 1986). Zur Bildgebung wird die Magnetresonanztomographie empfohlen, auch um mögliche Begleitverletzungen im umliegenden Weichteilgewebe darzustellen (Lobenhoffer und Agneskirchner 2005; Schäfer et al. 2002).

Die Therapie der Verletzung hängt von verschiedenen Faktoren ab. Es spielen das Alter und die körperliche Aktivität der Patienten eine Rolle, weiter auch die Schwere und Art möglicher Begleitverletzungen. Bei jungen, aktiven Patienten wird meist zu einer operativen Versorgung der Ruptur geraten, um Fehlbelastungen des Gelenks zu verhindern und um Folgeschäden, wie der Arthrose, vorzubeugen. Auch bei älteren Patienten wird immer häufiger zu einer Operation geraten, um die körperliche Aktivität zu erhalten. Dabei steht die Wiedererlangung der Gelenkstabilität und der physiologischen Belastungssituation im Vordergrund. Als Operationsverfahren hat sich in den vergangenen Jahren die autologe Sehnen transplantation etabliert. Meist werden *Hamstring-Sehnen* verwendet. Es können aber auch Teile der *Quadrizeps-* oder *Patellarsehne* eingesetzt werden. Der Eingriff sollte innerhalb einer Stunde nach dem Ereignis oder später, nach Abklingen der Entzündungsreaktion und dem Wiedererlangen der Beweglichkeit des Gelenks erfolgen (Lobenhoffer und Agneskirchner 2005; Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie 2018).

Die konservative Therapie wird von der *Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU)* hauptsächlich älteren, immobilen Patienten mit nur leicht ausgeprägter Instabilität im Gelenk empfohlen. Außerdem sprechen eine bereits bestehende höhergradige

Kniegelenksarthrose oder allgemeine Kontraindikationen gegen chirurgische Eingriffe dafür, von einem operativen Eingriff abzusehen. Bei der konservativen Therapie wird die Teilbelastung des betroffenen Beines mit Hilfe von Gehstützen, mit darauf folgender, sich steigernder Belastung bei Schmerzfreiheit des Patienten angestrebt (Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie 2018).

2.4 Materialeigenschaften der Interferenzschrauben

Die operative Versorgung einer Kreuzbandruptur ist eines von vielen Beispielen für Verletzungen, in deren Therapie implantierte Materialien eine zentrale Rolle spielen. Wegen der hohen Inzidenz und des meist jungen Lebensalters der Patienten ist eine zuverlässige Versorgung der Ruptur, nicht zuletzt aus wirtschaftlichen Aspekten, unabdingbar.

Zur Herstellung der eingesetzten Implantate werden verschiedene Materialien verwendet. An diese werden höchste Anforderungen gestellt. Verträglichkeit für den Organismus, mechanische Belastbarkeit, Stabilität im physiologischen Milieu und Integration ins umliegende Gewebe sind nur einige der Grundvoraussetzungen. Inerte Materialien müssen über lange Zeiträume stabil bleiben und dabei z.T. große Kräfte tragen können. Bioresorbierbare Materialien dagegen sollten im Laufe der Zeit vom Organismus abgebaut werden. Dies sollte jedoch erst nach Ablauf eines definierten Zeitfensters geschehen, um unmittelbar postoperativ die mechanische Stabilität zu gewährleisten (Heide et al. 1975).

Ein ideales Implantat besteht aus autologem Material. Der Einsatz autologen Knochens als Implantat ist jedoch nicht immer möglich. Um dessen Eigenschaften möglichst nahe zu kommen, setzt man auf Materialien, deren Eigenschaften denen des Knochens ähneln. Dies soll zu einer besseren Integration ins umliegende Knochengewebe führen und auch die spätere Resorption des Materials erleichtern.

In der Kreuzbandchirurgie stellten lange Zeit Titanschrauben das Mittel der Wahl dar. Titan ist sehr gut verträglich und verfügt über ausgezeichnete mechanische Eigenschaften. Jedoch ist es nicht resorbierbar und erzeugt Artefakte in der MRT-

Bildgebung. Außerdem kann es zur Wanderung der Schraube kommen, was häufig Revisionsoperationen notwendig macht (Kaeding et al. 2005; Weiler et al. 1998). Dies ist beim Einsatz einer Schraube aus PLLA (L-Polylaktat) seltener der Fall. PLLA konnte in Studien eine zum Titan vergleichbare mechanische Stabilität aufzeigen (Konan und Haddad 2009; Barber et al. 1995). Beim Einsatz von PLLA wurde allerdings gelegentlich der intraoperative Bruch der Schraube beobachtet (Marti et al. 1997). Auch die Entstehung von Zysten stellt eine mögliche Komplikation dar (Gawęda et al. 2009).

Ein vielversprechendes Material stellt das Hydroxylapatit (HA) dar. Es kommt physiologisch im menschlichen Körper vor und stellt den anorganischen Hauptbestandteil des Knochens dar. Aufgrund dieser Tatsache und seinen biomechanischen Eigenschaften eignet es sich hervorragend als Bestandteil resorbierbarer Materialien, da es sehr gut in die Knochenstruktur integriert werden kann (Suchanek und Yoshimura 1998).

2.5 Hypothesen und Meilensteine

Beim Merino-Landschaf handelt es sich um ein, in der medizinischen Forschung häufig eingesetztes, Großtiermodell. Anders als bei Kleintieren ist es hier i.d.R. nicht möglich auf eine homogene Population, bezogen auf Alter, Größe und Gewicht, zurückzugreifen. Dies kann bei der Interpretation der Versuchsergebnisse zu Schwierigkeiten führen. Daher ist es notwendig, Standards einzuführen, die eine korrekte Einordnung der in der Population vorgefundenen Parameter erlauben. Bezogen auf den Gebrauch des Merino-Landschafes als Modell in der Erforschung neuer implantierbarer Materialien, sowohl im gesunden als auch im osteoporotisch veränderten Knochen, stellt die Knochendichte zum Zeitpunkt des Materialeinsatzes einen wichtigen prädiktiven Wert für die erfolgreiche Integration ins Knochengewebe dar. Durch Bestimmung der Knochendichte einer repräsentativen Anzahl von Merino-Landschafen kann die PBM dieser Spezies bestimmt werden. Auf deren Basis lässt sich, analog zum T-Score beim Menschen, ein Standard festlegen. Dieser erlaubt eine Einordnung der vorgefundenen Knochendichte eines individuellen Tieres bezogen auf Referenzwerte, die für die gesamte Spezies gelten. Dies stellt einen wichtigen Schritt hin zur Standardisierung dieses häufig genutzten

Tiermodelles dar. Hierdurch kann es im Sinne der 3R nach Russell und Burch zu einer effektiveren Nutzung der in Studien eingesetzten Tiere mit erleichterter Übertragbarkeit der Ergebnisse in die klinische Anwendung sowie zur Reduktion der Anzahl der eingesetzten Tiere kommen.

Hypothesen:

- Merino-Landschafe gleichen Alters zeigen in der DXA-Untersuchung eine ähnliche Knochendichte (BMD)
- Merino-Landschafe erreichen ihre PBM direkt nach Abschluss der Skelett-Reifung
- Das Alter der eingesetzten Versuchstiere sollte bei der Zusammenstellung einer Versuchsgruppe beachtet werden

Meilensteine:

Mit Hilfe der klinisch etablierten DXA-Methode werden an einer repräsentativen Anzahl von Merino-Landschafen Knochendichtemessungen durchgeführt. Die Tiere werden aus drei unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Studien ausgewählt. Keines soll dabei unter dem Einfluss einer pharmakologischen Therapie oder einer Diät stehen. Nach der Knochendichtemessung werden die Daten mit Hilfe einer Software ausgewertet. Dabei soll die BMD folgender Körperregionen bestimmt werden:

- Ganzkörper
- obere Lendenwirbelsäule
- rechter Femurkopf
- linker Femurkopf

Die erhobenen Daten werden statistisch ausgewertet, dabei soll ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Tiere und ihrer durchschnittlichen BMD gezeigt, sowie eine Datenbank mit Referenzwerten etabliert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau

3.1.1 Tiermodell

Als Großtiermodell dienten weibliche Merino-Landschafe, die in Kleingruppen auf dem Außengelände der Zentralen Forschungseinrichtung (ZFE) des Universitätsklinikums Frankfurt am Main gehalten wurden. Zur Bestimmung der Referenz-BMD wurden DXA-Scans von 74 Tieren ausgewertet. Sie stammten aus drei voneinander unabhängigen Studien der Arbeitsgruppe (*T1*, *T2* und *HA-Schraube*). Je nach Design der drei Studien wurde die Knochendichte der Tiere zu Beginn des Versuches (0M) und nach weiterer Standzeit (3M, 8M, 10M) bestimmt (Tabelle 1), sodass auf insgesamt 116 Knochendichtemessungen zurückgegriffen werden konnte. Alle ausgewerteten DXA-Scans sind als repräsentativ für gesunde Merino-Landschafe anzusehen. Die Tiere waren pharmakologisch unbehandelt, unterlagen keiner Diät und hatten ausreichend Auslauf. Sie unterschieden sich lediglich in Alter, Größe und Gewicht voneinander. Das durchschnittliche Alter der Tiere lag bei 57 Monaten.

Für das Projekt *HA-Schraube* (Gruppe 3, Tabelle 1), wurden 28 Merino-Landschafe als Großtiermodell zur Testung einer neuen Interferenzschraube für die Kreuzbandchirurgie eingesetzt. Ihr Durchschnittsalter betrug 60 Monate. Hier erfolgten die DXA-Scans zum Zeitpunkt 0M und 10M, jeweils vor dem operativen Einsetzen der Interferenzschrauben.

Für diese Arbeit wurden die Daten aller Tiere aus dem Projekt *HA-Schraube* selbst- und vollständig erhoben, zudem konnte ergänzend freundlicherweise auf die von den Arbeitsgruppen *T1* und *T2* zur Verfügung gestellten Rohdaten zurückgegriffen werden. Die Daten aller drei Studien wurden im Rahmen dieser Arbeit statistisch ausgewertet.

3.1.2 Tierhaltung und Fütterung

Die Tierhaltung erfolgte unter Aufsicht erfahrener Tierpfleger und Veterinäre, die die artgerechte Haltung garantierten. Im Vorfeld der Versuche wurden die Schafe in Kleingruppen zu je acht Tieren auf dem Außengelände der ZFE der Goethe-Universität Frankfurt am Main gehalten. Wasser und Futter hatten sie *ad libidum* zur Verfügung. Präoperativ wurden jeweils zwei Tiere in eine gemeinsame Stallbox verbracht. In den letzten zwölf Stunden vor der Narkose bekamen sie außer Wasser keinerlei Nahrung mehr bereitgestellt. Die Prämedikation für die Operation erfolgte ebenfalls in den Stallboxen.

3.1.3 Versuchsanordnung

Zur Bestimmung der Referenz-BMD weiblicher Merino-Landschafe konnte, wie oben erwähnt, auf die DXA-Scans dreier voneinander unabhängiger Studien zurückgegriffen werden. In jeder der drei angesprochenen Studiengruppen wurden Knochendichtemessungen zu Beginn der Standzeit (0M) durchgeführt. Weitere Messungen erfolgten in Gruppe 1 (T1) nach drei und acht Monaten und in Gruppe 3 (HA-Schraube) nach zehn Monaten Standzeit (Tabelle 1). Alle Messungen wurden mit demselben Gerät (*Lunar Prodigy*, GE-Healthcare; Abbildung 6) durchgeführt und mit der Software (*enCORE*, v13.40, GE-Healthcare) analysiert. Die BMD des gesamten Körpers, der oberen LWS und der beiden *Femurköpfe* wurde im Anschluss statistisch ausgewertet. Im Fokus stand dabei die Korrelation zwischen Alter und BMD der Tiere.

Beim Projekt *HA-Schraube* (Gruppe 3, Tabelle 1) wurden die Merino-Landschafe als Großtiermodell zur Erprobung einer neuen Interferenzschraube für die Kreuzbandchirurgie eingesetzt. Randomisiert erfolgte hier die Einteilung in Kontroll- und Experimentalgruppe. Zunächst wurde das rechte vordere Kreuzband (0M) und zehn Monate später das linke vordere Kreuzband (10M) ersetzt und das eingesetzte autologe Sehnen transplantat mit einer klinisch bewährten Interferenzschraube (Kontrollgruppe: *Arthrex® BioComposit*) oder der zu testenden, neuen Interferenzschraube (Experimentalgruppe: *HA*) befestigt. Vor jedem operativen Eingriff wurde ein DXA-Scan durchgeführt. Sechs Wochen nach der zweiten Operation erfolgte die Euthanasie der Tiere, um biomechanische und histologische Untersuchungen von Femur und Tibia zu ermöglichen. Deren Ergebnisse stellen Basis anderer Arbeiten dar.

| | Anzahl Knochendichtemessungen nach Standzeiten und gesamt | | | | |
|--|---|-----|-----|------|--------|
| | 0 M | 3 M | 8 M | 10 M | Gesamt |
| Gruppe 1 Osteoporose (T1) | 31 | 8 | 8 | - | 47 |
| Gruppe 2 Osteoporose (T2) | 15 | - | - | - | 15 |
| Gruppe 3 Kreuzband (Biocomposit+HA) | 28 | - | - | 26 | 54 |
| Gesamt | 74 | 8 | 8 | 26 | 116 |

Tabelle 1: Übersicht über Anzahl und Zeitpunkte der Knochendichtemessungen der verschiedenen Studiengruppen. Aus Gruppe 1 konnten 47 Messungen in die Auswertungen einfließen, die Messungen erfolgten zu Beginn der Studie (0 M) und für 8 Tiere noch einmal nach 3 und 8 Monaten Standzeit. Aus Gruppe 2 konnten 15 Messungen zu Studienbeginn verwendet werden. Die Daten aus Gruppe 3 wurden zu Studienbeginn und 10 Monate später erhoben. Dabei handelt es sich um das Versuchsmodell *HA-Schraube*.

3.2 Ablauf des Versuchs

Der Ablauf der DXA-Scans in allen drei Gruppen, sowie der Ablauf der Operationen im Projekt *HA-Schraube* soll im folgenden Kapitel erläutert werden.

3.2.1 Prämedikation

Nach intramuskulärer Verabreichung der Prämedikation bestehend aus: 10mg/kg *Ketaminhydrochlorid* (*Ketavet*® 10 mg/ml, Bela- Pharm GmbH und Co.KG, Vechta), 0,01 ml/kg *Xylazin* (*Rompun*® 2%, Bayer AG, Leverkusen), 0,3 mg/kg *Midazolam* (*Midazolam Rotexmedica* 5 mg/ml, Rotexmedica GmbH, Tritttau) und 0,01 mg/kg *Atropin*

(*Atropinsulfat* B. Braun 0,5 mg/ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen), wurde zunächst der zu operierende Hinterlauf geschoren und das Gewicht der Tiere ermittelt. Im Anschluss wurden diese in den Vorbereitungsraum verbracht, wo ein intravenöser Zugang gelegt und die Narkose durch Verabreichung von 2 mg/kg *Propofol* (*Propofol* 2% (20mg/ml), Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) und 2 µg/kg *Fentanyl* (*Fentanyl-Hameln* 50µg/ml, Hameln pharmaceuticals GmbH, Hameln) eingeleitet wurde. Danach wurde ein Propofol-Dauerperfusor (50 ml/h) angehängt. Nach Intubation erfolgte zunächst eine manuelle Beutelbeatmung unter Zufuhr von Sauerstoff in die Einatemluft. Zur Sicherheit wurden die Vitalparameter während des gesamten präoperativen Verlaufs monitorassistent überwacht. Im Anschluss wurden die Schafe auf die Liegefläche des DXA-Gerätes umgelagert und mit der Messung der Knochendichte begonnen.

3.2.2 Durchführung der DXA-Scans

Mit dem DXA-Verfahren wurde der Knochenstatus der Merino-Landschafe bestimmt. Hierbei kann auf Grundlage der charakteristischen Schwächungsprofile verschiedener Gewebearten die Knochendichte, der Mineralgehalt des Knochens und der Fettanteil im Gewebe bestimmt werden. Es werden zwei energetisch unterschiedliche Strahlungen eingesetzt. Hochenergetische Strahlung passiert Weichteilgewebe und Knochen gleichermaßen ohne relevanten Intensitätsverlust durch Absorption. Anders verhält es sich bei niederenergetischer Strahlung. Diese wird vom Knochen deutlich stärker als vom Weichteilgewebe absorbiert. Aus der Differenz der beiden Strahlungsintensitäten lassen sich mathematisch Rückschlüsse auf Zusammensetzung und Dichte des durchwanderten Gewebes ziehen (Felsenberg und Gowin 1999; Freyschmidt 2008). Für die Messungen stand ein DXA-Gerät vom Typ *Lunar Prodigy*® (GE Healthcare, Deutschland; Abbildung 6) zur Verfügung. Die Analyse der Daten erfolgte mit der vom Hersteller bereitgestellten Software (*enCORE*, Version 13.40, GE-Healthcare). Das benutzte Gerät verfügt über einen sog. *Großtiermodus*, welcher u.a. auf Knochendichtemessungen am Schaf ausgelegt ist.

Die Messung konnte nur am stillliegenden Patienten durchgeführt werden, bei den Tieren war dies daher nur im Rahmen einer Vollnarkose möglich.

Ein Großteil der im folgenden Text beschriebenen Abbildungen findet sich aus Gründen der besseren Lesbarkeit im Anhang dieser Arbeit (Kapitel 9).

3.2.2.1 Kalibrierung und Qualitätskontrolle

Zu Beginn eines jeden Versuchstages wurde das DXA-Gerät auf seinen Einsatz vorbereitet. Nach Einschalten des Gerätes und des angeschlossenen Computers wurden Kalibrierung und Qualitätskontrolle durchgeführt. Die Vorgänge waren durch die eingesetzte Software vorgegeben und wurden stets auf gleiche Art und Weise durchgeführt. Die eingesetzten *Phantomkörper* waren für die Messungen am Schaf geeignet. Folgend soll der Ablauf der Kalibrierung kurz dargestellt werden:

Durch Anwählen des Buttons *Qualitätskontrolle* im Startmenü der Software (Abbildung 24) öffnete sich das entsprechende Menü. Hier erschien zunächst eine Übersicht der zuletzt durchgeführten Qualitätskontrollen. In der rechten unteren Ecke zeigte ein Ampel-Symbol den aktuellen Systemstatus an. Wurde das Gerät innerhalb der letzten 48 Stunden nicht kalibriert, zeigte dieses Symbol ein rotes Licht an (Abbildung 25). Bei diesem Status konnten keine neuen Scans durchgeführt werden. Um die Freigabe der Software zu erhalten, musste die Qualitätskontrolle durch Klicken auf das Icon *Starten* durchgeführt werden.

Zur Kalibrierung des Gerätes wurden zwei Referenzkörper eingesetzt (Abbildung 26). Diese werden an durch das Gerät festgelegten und durch nacheinander auf die Patientenliege des DXA-Gerätes gelegt. Der sogenannte *Phantomkörper* sollte die Dichte der Wirbelkörper simulieren. Während des Kalibrierungsvorganges wurde dieser unter ein mit Wasser gefülltes Behältnis gelegt, welches das Weichteilgewebe simulierte.

Der gesamte Vorgang wurde von der *enCORE-Software* gesteuert. Dabei wurde eine Abfolge verschiedener Tests durchgeführt (Abbildung 27). Erst wenn alle Tests erfolgreich durchlaufen waren, erteilte die Software die Freigabe zur Durchführung der Knochenscans.

3.2.2.2 Der Messvorgang

Die narkotisierten und intubierten Schafe wurden auf die Liegefläche des Gerätes umgelagert. Dabei war genau auf die korrekte Positionierung der Tiere zu achten. Sie wurden in Bauchlage, alle vier Extremitäten von sich streckend, platziert. Als Unterlage dienten OP-Tücher (Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland), um das Gerät vor austretenden Körperflüssigkeiten zu schützen. Der gesamte Körper lag innerhalb des Messfeldes des Gerätes. Der Kopf wurde mit Hilfe zweier Polsterungen entlang des Halses stabilisiert und durch zwei Klettbinden fixiert (Abbildung 8).

Für jedes Versuchstier wurde in der *enCORE-Software* eine eigene Patientenakte angelegt. Dies erfolgte durch Aufrufen des Menüs *Messen*, wodurch die dem Projekt zugeordnete Datenbank geöffnet wurde. Hier konnte durch Klicken auf die Schaltfläche *Neu* eine neue Patientenakte erstellt werden (Abbildung 29). Die wichtigsten Informationen über das jeweilige Tier, wie Ohrmarkennummer, Geburtsdatum, Größe und Gewicht, wurden hier festgehalten.



Abbildung 8: Ein narkotisiertes Merino-Landschaf liegt auf dem DXA-Gerät. Der Kopf ist mit Hilfe von Polsterungen und Klettbinden fixiert, Unterlagen fangen ausgetretenen Speichel auf. Das Tier ist intubiert und beatmet. Der Arm des Gerätes bewegt die Strahlenquelle über das Tier.

Im Anschluss öffnete sich durch Klick auf die Schaltfläche *Messen* das eigentliche *Messmenü*. Hier wurde *Ganzkörper* als Art der Untersuchung ausgewählt. Mit Betätigung der Schaltfläche *Position* wurde der Messarm des DXA-Gerätes in Ausgangsposition gebracht und es öffnete sich ein weiteres Menü (Abbildung 30). Hier wurde der Modus

der Untersuchung festgelegt. Aufgrund des Körperbaus der Merino-Landschafe wurden alle Scans im Modus *Dick* ($>25\text{ cm}$) durchgeführt. Durch Auswahl der Schaltfläche *Start* begann der Messvorgang. Die Dauer eines Ganzkörperscans betrug ca. zehn Minuten. Unter Einhaltung der Strahlenschutzvorschriften wurde während des Vorgangs auf Vitalparameter und Lage des Tieres geachtet. Nach der Messung wurde deren Qualität geprüft und diese ggf. wiederholt.

3.2.3 Analyse der DXA-Scans

Die in den Messungen erfassten Daten wurden ebenfalls mit der *enCORE-Software* analysiert. Durch Auswählen des Buttons *Analyse* im Startbildschirm der Software (Abbildung 24) öffnete sich das Analyse-Menü. Hier wurde die zu analysierende Untersuchung durch Klicken auf den entsprechenden *Patienten* geöffnet (Abbildung 31). Im folgenden Bildschirm war das radiologische Bild des DXA-Scans sowohl im Knochen-, als auch im Weichteilfenster zu sehen. In beiden Fenstern wurden automatisch sog. *Regions of Interest (ROIs)* eingefügt. Diese bezogen sich jedoch auf die Anatomie des menschlichen Körpers und waren daher für die Analyse der vorliegenden Messungen nicht nutzbar. Durch Klick auf *Analysieren* in der oberen Menüleiste und anwählen der Option *Benutzerspezifisch* ließen sich diese entfernen. Nun konnte durch einen Mausklick auf das Icon *ROIs* (Abbildung 32) mit dem manuellen Anlegen der gewünschten Regionen begonnen werden. Es wurden die Daten der folgenden neun ROIs erhoben (Abbildung 32 und Abbildung 33).

| Identifikationsnummer der ROI in der Analysesoftware | Anatomische Region |
|--|-------------------------|
| 1 | Ganzkörper |
| 2 | Lendenwirbelsäule |
| 3 | Linke Tibia |
| 4 | Rechte Tibia |
| 5 | Linkes Femur |
| 6 | Rechtes Femur |
| 7 | Obere Lendenwirbelsäule |
| 8 | Linker Femurkopf |
| 9 | Rechter Femurkopf |

Tabelle 2: Gegenüberstellung der anatomischen Region mit der in der Software verwendeten Identifikationsnummer der jeweiligen ROI (Abbildung 32 und Abbildung 33).

Die manuelle Erstellung der ROIs erfolgte durch Umfahren der jeweiligen Strukturen mit der Maus im Knochenfenster, nachdem in der Symbolleiste links das *Polygon*-Symbol angewählt wurde (roter unterer Kreis, Abbildung 33). Für kleinere Strukturen, wie die beiden Femurköpfe (ROI 8 und 9), konnte in das Bild hineingezoomt werden, um eine genauere Umrandung des Areals zu ermöglichen (Abbildung 33).

Waren alle ROIs festgelegt, konnte mit einem Klick auf das Symbol *Ergebnisse* auf ebendiese zugegriffen werden (Abbildung 32). Sie beinhalteten für jede Region folgende Werte:

- Knochendichte (*BMD* in g/cm^2)
- Mineralgehalt der Knochen (hier als *bone mineral content (BMC)* in g)
- Fettanteil in %

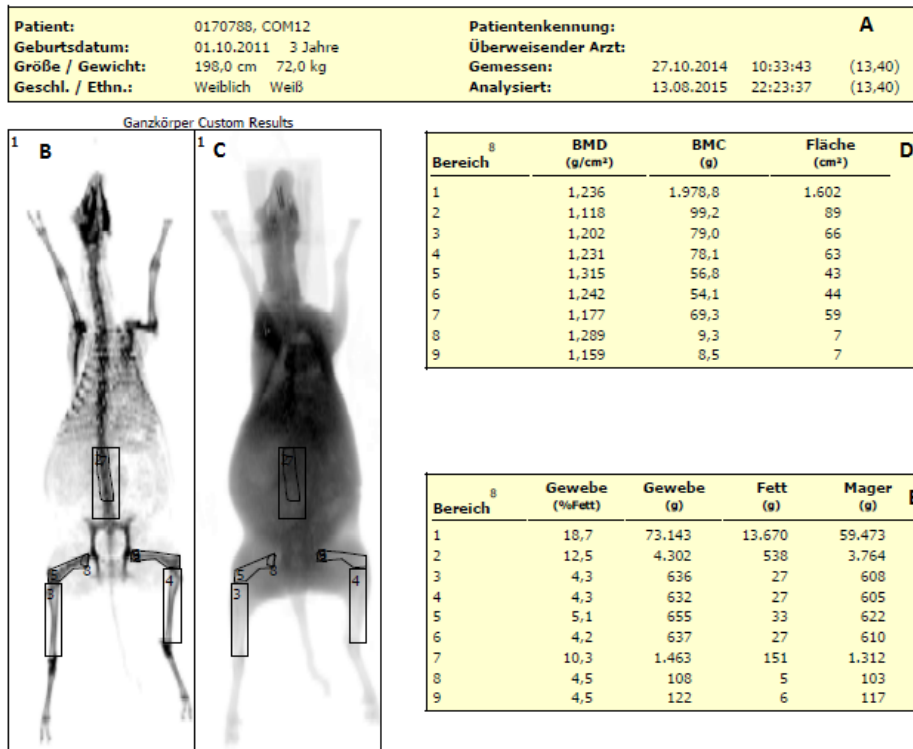


Abbildung 9: DXA-Analysebogen. (A): allgemeine Informationen zum Versuchstier. (B): Knochenfenster des DXA-Scans, die angelegten ROIs sind zu sehen. (C): Weichteilfenster des DXA-Scans. (D): Messergebnisse zu den in (B) angelegten ROIs. *BMD*=bone mineral density, *BMC*=bone mineral content. (E): Messergebnisse des Weichteilfensters.

Ein Klick auf das Icon *Bericht* erstellte den Analysebogen, der eine Übersicht aller gewonnenen Werte lieferte (Abbildung 9). Er konnte gedruckt und in Form eines PDF-Dokumentes gespeichert werden.

3.2.4 Operation

Folgender Abschnitt bezieht sich lediglich auf die Tiere, die als Modell in der Studie *HA-Schraube* (Tabelle 1, Gruppe 3) eingesetzt wurden.

Nach Abschluss des DXA-Scans wurde der zu operierende Hinterlauf mit Enthaarungscreme (*Pilca* Enthaarungscreme, DMV Diedrichs Markenvertrieb GmbH & Co. KG, Bad Pyrmont, Deutschland) und Einwegrasierern (B.Braun AG, Melsungen, Deutschland) vollständig enthaart. Im Anschluss wurde das Tier unter manueller Beutelbeatmung in den Operationssaal gebracht und auf den Operationstisch umgelagert. Hier wurde auf maschinelle Beatmung umgestellt und die Vitalparameter

monitorassistent überwacht. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde weiterhin ein Propofol-Perfusor eingesetzt.



Abbildung 10: Operationssaal der Zentralen Forschungseinrichtung der Universität Frankfurt am Main.

Die Operation wurde in Seitenlage durchgeführt, die Tiere wurden mit dem zu operierenden Lauf nach oben gelagert. Nach der Fixierung am Tisch wurde das Operationsgebiet gereinigt. Nachdem das Areal ausreichend desinfiziert war erfolgte die sterile Abdeckung. Hierbei kamen handelsübliche OP-Abdecktücher (Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland) verschiedener Größen zum Einsatz. Auch der Huf wurde mit sterilen Tüchern umwickelt, sodass von dort keine Kontamination des OP-Bereichs erfolgen konnte. Zum Einsatz kam durchweg Operationsbesteck, wie es auch bei der Operation eines Menschen gebraucht wird. Alle genutzten Materialien wurden in Originalgröße verwendet. Die Operation erfolgte nicht arthroskopisch, sondern bei vollständig eröffnetem Kniegelenk.

Der Eingriff begann mit einem etwa zehn Zentimeter langen Hautschnitt über der Achillessehne. Es wurde ein Teil der Sehne des *M. flexor digitorum superficialis* entnommen, diese verläuft beim Schaf in einer gemeinsamen Sehnenscheide mit der Achillessehne. Sie konnte erst nach sorgfältiger Präparation entfernt werden, um eine Beschädigung der Achillessehne zu vermeiden. Der Verlust der Funktionalität des *M. flexor digitorum superficialis* schränkte die Tiere in ihrer Mobilität nicht ein, weshalb

sich die Sehne hervorragend als Transplantat eignete. Nach Entnahme des Transplantates wurde dieses für seinen späteren Einsatz vorbereitet. Es wurde in die passende Form geschnitten, sowie an beiden Enden Fäden (Vicryl, Stärke 0, Johnson & Johnson Medical GmbH, New Brunswick, NJ, USA) mittels *Baseballstitch* eingebracht, um es später leichter in die Bohrkanäle einführen zu können. Nach Abschluss der Vorbereitungen, wurde das Transplantat in feuchten, NaCl-getränkten Mullkompressen eingewickelt, um eine Austrocknung zu verhindern. Die Wunde wurde durch subkutane Naht und Hautnaht (Vicryl, Stärke 2-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, New Brunswick, NJ, USA) geschlossen. Zum Einsatz kam durchweg resorbierbares Nahtmaterial, um den Tieren den Stress der Nahtentfernung zu ersparen.

Die Öffnung des Kniegelenkes erfolgte über einen etwa 20 cm langen Schnitt. Dieser wurde vom distalen *Femur*, medial der *Patella*, bis zur proximalen *Tibia* geführt. Nach Eröffnung der Gelenkkapsel wurde die *Patella* nach lateral verschoben, um die Strukturen innerhalb des Gelenkes zu erreichen. Das vordere Kreuzband wurde aufgesucht und durchtrennt. Im Anschluss legte der Operateur die Bohrkanäle an. Als Hilfsmittel diente hierbei ein Zielbogen, der die achsgerechte Bohrung ermöglichte. Der hier initial genutzte Kirschner-Draht diente später als Leitschiene für die Bohrer mit größeren Durchmessern. Der Durchmesser wurde schrittweise von sechs auf zwölf Millimeter gesteigert. Dabei ging man in Schritten von jeweils zwei Millimetern vor. Der *femorale* Kanal wurde in maximaler Beugung und Innenrotation des Gelenkes geschaffen, der *tibiale* unter maximaler Beugung. Nachdem beide Kanäle geschaffen und sorgfältig mit NaCl gespült waren, konnte das Transplantat eingesetzt werden. Mit einer *Overholt-Geissendoerfer Klemme* wurde es an den zuvor eingenähten Fäden in die Bohrkanäle gezogen. Nach Überprüfung der korrekten Lage erfolgte die Fixierung des Transplantates mit der entsprechenden Schraube. Beide Schrauben wurden von distal in die Bohrkanäle eingebracht. Zur Fixierung der Schrauben nutzte der Operateur die von den Herstellern empfohlenen Werkzeuge. Die Schraube der Kontrollgruppe (*Arthrex BioComposite*) wurde per Schraubendreher eingebracht, die der Experimentalgruppe (*HA*) mit einem Hammer und entsprechender Vorrichtung vorsichtig eingeschlagen. Nach Fixierung der Schrauben folgte die Prüfung des Transplantates auf ausreichende Spannung und festen Sitz. Die Fäden an beiden Enden des Transplantates konnten anschließend entfernt werden.

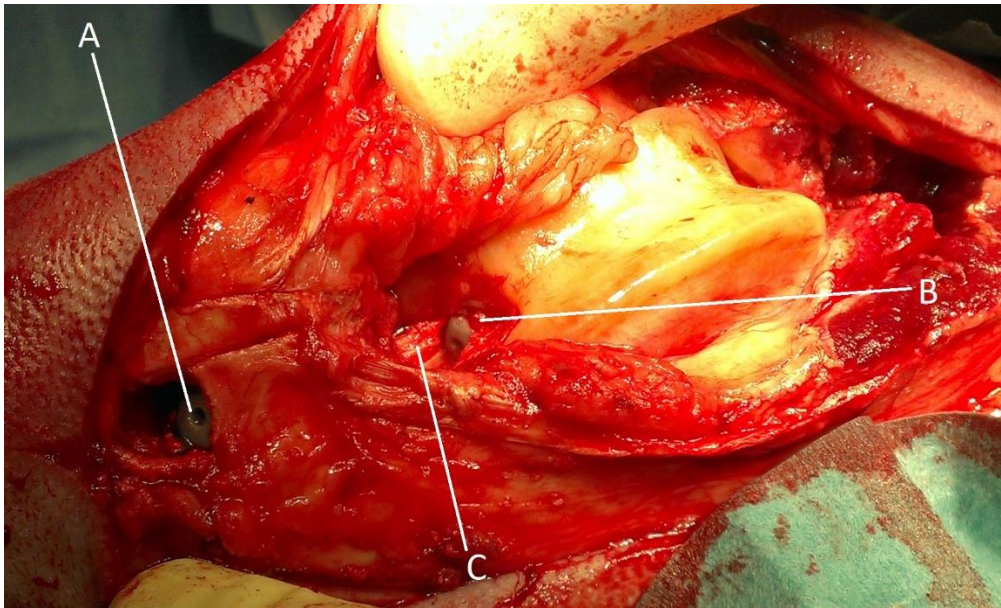


Abbildung 11: OP-Situs nach Einsetzen des Transplantates und Fixierung der Schrauben. Im eröffneten rechten Kniegelenk sind die beiden Bohrkanäle mit den eingebrachten Schrauben (A und B) zu sehen. Direkt unterhalb der femoralen Schraube befindet sich das Transplantat aus dem *M. flexor digitorum superficialis* (C).

Der Verschluss des Gelenkes erfolgte durch die Naht der Gelenkkapsel (Vicryl, Stärke 0, Johnson & Johnson Medical GmbH, New Brunswick, NJ, USA), einer Faszienleitschicht (Vicryl, Stärke 0, Johnson & Johnson Medical GmbH, New Brunswick, NJ, USA) sowie subkutane und kutane Naht (Vicryl, Stärke 2-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, New Brunswick, NJ, USA). Der Bereich der Hautnaht wurde mit dem Lokalanästhetikum Ropivacainhydrochlorid (Naropin®, AstraZeneca, London, Vereinigtes Königreich) unterspritzt, um eine durch Schmerzen hervorgerufene Manipulation der Tiere an der Naht zu verhindern.

3.2.5 Post-OP

Mit Beginn der Hautnaht wurde der Propofol-Perfusor abgeschaltet und die Aufwachphase eingeleitet. Nach Wiedereinsetzen der Spontanatmung erfolgte die Extubation und Umlagerung der Tiere vom OP-Tisch auf eine Rolltrage. Auf dieser wurden sie in eine gereinigte Stallbox verbracht, wo sie unter tierärztlicher Beobachtung das Bewusstsein wiedererlangten. Während des Aufwachprozesses verblieben die Tiere

isoliert in einer Box. Nach Einschätzung der Tierärzte konnten sie jedoch zeitnah wieder in eine Kleingruppe integriert werden.

Die postoperative Medikation orientierte sich am weltweit eingesetzten Stufenschema der Schmerztherapie der Weltgesundheitsorganisation (WHO 1996). Das Opiat *Buprenorphinhydrochlorid* (*Temgesic*® Ampullen 0,3 mg RB Pharmaceuticals GmbH, Mannheim, Deutschland) wurde zweimal täglich subkutan verabreicht. Zusätzlich erfolgte einmal täglich die Gabe des *NSAR* (nicht-steroidales Antirheumatikum) *Meloxicam* (*Metacam*® 20 mg/ml ad. us. vet., Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim/Rhein, Deutschland). Nach Einschätzung der verantwortlichen Tierärzte wurden die Schafe schrittweise von *Buprenorphinhydrochlorid* entwöhnt. Die Gabe *Meloxicam* wurde zunächst fortgesetzt. Hier erfolgte nach sorgfältiger Beobachtung die Reduktion der Dosis und schließlich die Beendigung der Medikamentengabe.

Die antibiotische Therapie mit *Penicillin* (*Veracin*® RS, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) wurde zur Infektionsprophylaxe bereits vor der Operation gestartet und bis fünf Tage nach der Operation fortgesetzt.

3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Knochenscans erfolgte durch Einsatz der Software *SPSS* (V. 24.0, IBM, CA, USA).

Es wurden die gemessenen Werte der Parameter *bone mineral density (BMD)*, *bone mineral content (BMC)*, *Alter*, *Gewicht*, *Fett (%)* sowie *Fett (g)* ausgewertet.

Mit Hilfe der Funktion *cor()* *function* der Software *R* (Version 3.4.0, R Core Team) wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman bestimmt. Das Package *Ggpubr()* lieferte Ergebnisse in Form eines *scattered plots*, mit *corrplot()* *function* konnte die Korrelationsmatrix in Form einer Heatmap dargestellt werden.

Den altersabhängigen Verlauf der Knochendichte (Kapitel 4.5.) erstellten wir in Kooperation mit Herrn Dr. rer. nat. Klaus Failing von der Arbeitsgruppe Biomathematik

Material und Methoden

und Datenverarbeitung am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Mit Hilfe der Software *R* (Version 3.4.3.; R Core Team) konnten Regressionsgerade, quadratische Regression sowie die nicht-parametrische Regression und der Korrelationskoeffizient bestimmt werden.

4 Ergebnisse

Bei der Analyse der DXA-Scans von 74 Merino-Landschafen konnte auf Tiere aus drei voneinander unabhängigen Gruppen zurückgegriffen werden. Gruppe 1 (*T1*) und 2 (*T2*) bildeten Tiere aus einer Studie zur Erforschung der Osteoporose, bei Gruppe 3 (*HA-Schraube*) dagegen handelte es sich um Tiere, die als Modell einer experimentellen Studie über neue implantierbare Schrauben zur Therapie einer Kreuzbandruptur herangezogen wurden. Die Messungen wurden in jeder Gruppe mit dem Gerät *Lunar Prodigy*® (GE Healthcare, Deutschland) durchgeführt und nach zuvor festgelegten Standzeiten wiederholt. Abhängig von der jeweiligen Gruppe konnten bis zu 9 ROIs in jeder Messung ausgewertet werden (Tabelle 3).

| Gruppe | Anzahl der gemessenen ROIs | Regions of Interest (ROIs) mit den zugehörigen Identifikationsnummern |
|--|----------------------------|--|
| Gruppe 1 Osteoporose 1 (T1) | 4 | Ganzkörper (1), obere Lendenwirbelsäule (7), linker Femurkopf (8), rechter Femurkopf (9) |
| Gruppe 2 Osteoporose 2 (T2) | 4 | Ganzkörper (1), obere Lendenwirbelsäule (7), linker Femurkopf (8), rechter Femurkopf (9) |
| Gruppe 3 Kreuzband (HA+Biocomposit) | 9 | Ganzkörper (1), Lendenwirbelsäule (2), linke Tibia (3), rechte Tibia (4), linkes Femur (5), rechtes Femur (6) obere Lendenwirbelsäule (7), linker Femurkopf (8), rechter Femurkopf (9) |

Tabelle 3: Übersicht der Anzahl und Art der gemessenen ROIs in jeder der drei Tiergruppen.

Das Merino-Landschaf gewinnt als Tiermodell immer stärker an Bedeutung. Es wird häufig in der Osteoporoseforschung (Reinwald und Burr 2011; Egermann et al. 2005) sowie der Erforschung neuer Biomaterialien der Orthopädie und Unfallchirurgie (Martini et al. 2001) eingesetzt.. Durch die Auswertung aller Knochendichte-Scans und der damit einhergehenden großen Anzahl von 682 BMD-Werten sollte ein repräsentativer Überblick über die Knochendichte des Merino-Landschafes gewonnen werden. Mit Hilfe dieses Daten-Pools sollte die PBM der Spezies ermittelt werden, auf deren Basis sich ein

T-Score etablieren lässt, wie er im klinischen Alltag seit langer Zeit angewandt wird. Er stellt einen der wichtigsten Diagnoseparameter bei Osteoporoseerkrankungen dar. Osteoporose ist eine Krankheit des höheren Lebensalters, die aufgrund der älter werdenden Gesellschaft immer häufiger auftritt.

In der Gruppe der jüngeren, sportlich aktiven Patienten stehen nicht die degenerativen Knochenerkrankungen, sondern traumatische Schädigungen des Bewegungsapparates im Vordergrund. Ein Beispiel hierfür ist die Ruptur des vorderen Kreuzbandes. Zur Erprobung neuer Biomaterialien für die operative Versorgung eines Kreuzbandrisses sind osteodensitometrische Daten des eingesetzten Tiermodells eine wichtige Grundlage der Forschung.

Um die Eigenheiten der beiden Patientengruppen auf das Tiermodell zu übertragen, wurden die Ergebnisse auch anhand des Alters der Tiere betrachtet. Hierbei sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen steigendem Alter der Tiere und Abnahme der Knochendichte bzw. der Entwicklung einer Osteopenie oder Osteoporose gezeigt werden, so wie dies beim alternden Menschen der Fall ist. Es wurde hierbei ein besonderes Augenmerk auf die Knochendichte der ROIs *obere Lendenwirbelsäule (7)* sowie *linker (8)* und *rechter Femurkopf (9)* gelegt. Analog wird im klinischen Alltag verfahren, wo Knochendichtescans der genannten Regionen mit einer Referenzdatenbank verglichen werden, um dem Verdacht auf eine Osteoporoseerkrankung nachzugehen. Bei den Tieren der Gruppe 3 (*Biocomposit* und *HA*) wurden zusätzlich die Regionen *linke (3)* und *rechte (4) Tibia* sowie *linker (5)* und *rechter (6) Femur* osteodensitometrisch untersucht. Die Daten dieser Regionen sind für die Kreuzbandchirurgie von Bedeutung, da hier die zu testenden Materialien eingebracht werden.

4.1 Deskriptive Statistik

4.1.1 Gesamtauswertung

In den DXA-Scans wurden die Parameter *bone mineral density (BMD)*, *bone mineral content (BMC)* sowie absoluter (Fett (g)) und relativer Fettanteil (Fett (%)) im Gewebe gemessen. Zur Bestimmung der PBM und des T-Score wurden alle durchgeführten Scans ausgewertet. Es wurden hierfür die Ergebnisse aller ROIs aller Tiere, unabhängig der zugehörigen Gruppe betrachtet.

Die *BMD* stellt den zentralen Wert der Osteodensitometrie mittels DXA-Verfahren dar. Es handelt sich dabei um eine zweidimensionale Größe, die die Knochenmineralisierung in g/cm^2 angibt. Bei den insgesamt 682 *BMD*-Messungen lagen die Werte zwischen $0,79 \text{ g}/\text{cm}^2$ (Minimum) und $2,09 \text{ g}/\text{cm}^2$ (Maximum), die durchschnittliche *BMD* bei [Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) in g/cm^2 : $1,1975 \pm 0,17022$]. Der *BMC* als flächenunabhängiger Wert stellt eine weitere wichtige Größe der Osteodensitometrie dar. Hier konnte auf Basis von ebenfalls 682 Messungen ein Mittelwert von [M \pm SD in g: $341,8130 \pm 674,62390$] erhoben werden. Die Werte unterlagen hier breiten Schwankungen, das Minimum lag bei 4,1 g und das Maximum bei 2973,2 g.

Die Knochendichte kann bei keiner Spezies unabhängig vom Alter betrachtet werden. Die Erlangung der Skelettreife, also der PBM, ist beim Merino-Landschaf, wie auch beim Menschen, mit dem Lebensalter assoziiert. Es lagen 734 Daten zum Alter der Tiere vor. Dabei lag der Mittelwert bei [M \pm SD in Monaten: $66,2125 \pm 20,52918$]. Das jüngste Tier war 24 Monate (Minimum) und das älteste 116 Monate (Maximum) alt.

Neben dem Alter stellt auch das Gewicht der Patienten oder des Versuchstiers einen Einflussfaktor auf den Knochenstatus dar, den es zu berücksichtigen gilt. Bei 716 Messungen lagen Daten zum Gewicht der Tiere vor. Dieses wurde vor jedem Knochenscan auf gleiche Weise bestimmt und lag zwischen 41 kg (Minimum) und 111 kg (Maximum). Der Mittelwert wurde für [M \pm SD in kg: $65,5056 \pm 13,02507$] ermittelt.

| | Anzahl Messun- gen | Minimum | Maximum | Mittelwert | | Std. Abweichung |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------|------------|-------------|--------------------|
| | | Statistik | Statistik | Statistik | Std. Fehler | Statistik |
| Gewicht (kg) | 716 | 41 | 111 | 65,5056 | 0,48677 | 13,02507 |
| Alter (Monate) | 734 | 24 | 116 | 66,2125 | 0,75775 | 20,52918 |
| BMD (g/cm ²) | 682 | 0,79 | 2,09 | 1,1975 | 0,00652 | 0,17022 |
| BMC (g) | 682 | 4,1 | 2973,2 | 341,813 | 25,83268 | 674,6239 |
| Gewebe (%Fett) | 673 | 4 | 29,6 | 6,9374 | 0,19348 | 5,01918 |
| Fett (g) | 672 | 2 | 31978 | 1613,351 | 172,49227 | 4471,51077 |

Tabelle 4: Deskriptive Statistik aller erhobenen Parameter. Zu jeder Knochendichtemessung wurden die sechs Parameter *Gewicht*, *Alter*, *BMD*, *BMC*, *relativer und absoluter Fettanteil* erhoben. Die Tabelle liefert eine Übersicht über die Minima und Maxima der Werte, sowie über Mittelwert und Standardabweichung.

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Parametern wurde in den DXA-Scans der relative und absolute Fettanteil innerhalb der jeweiligen ROI erhoben. Fett findet sich sowohl in dem den Knochen umgebenden Weichgewebe, als auch im Knochenmark, also im Knochen selbst. Anhand der Werte konnte überprüft werden, inwiefern ein hoher Fettanteil Einfluss auf die gemessene Knochendichte hat. Beim relativen Fettanteil konnte auf Basis von 673 Werten, die zwischen 4 % (Minimum) und 29% (Maximum) lagen ein Mittelwert von: $[M \pm SD \text{ in } \%: 6,9374 \pm 5,01918]$ vor. Beim absoluten Fettanteil ergab sich auf Grundlage der Betrachtung von 672 Werten, die zwischen 2 g Minimum und 31978 g (Maximum) lagen ein Mittelwert von: $[M \pm SD \text{ in } g: 1613, 3507 \pm 4471,51077]$. Die hier ermittelten Werte unterlagen ebenfalls breiten Schwankungen.

4.1.2 Die BMD in den verschiedenen Regions of Interest

Nachdem alle gemessenen Werte in der Zusammenschau betrachtet wurden, um auf Basis der großen Datenmenge einen repräsentativen Überblick über das Verhalten der

Knochendichte und der sie beeinflussenden Faktoren zu gewinnen, wurden die BMD-Werte zusätzlich für jede ROI getrennt betrachtet. Nachfolgend werden exemplarisch die BMD-Werte der bei allen Tieren analysierten ROIs (1; 7; 8; 9) beschrieben. Hierfür lagen für jede ROI 116 BMD-Messungen vor.

In ROI 1 (*Ganzkörper*) lagen die Werte der BMD zwischen 0,98 g/cm² (Minimum) und 1,38 g/cm² (Maximum). Daraus ergab sich ein Mittelwert von [M ± SD in g/cm²: 1,148 ± 0,08653]. Die Werte zeigten nach zusätzlicher Bestimmung von Schiefe (0,272) und Kurtosis (-0,354) eine Normalverteilung.

In ROI 7 (*obere Lendenwirbelsäule*) lag der Mittelwert bei [M ± SD in g/cm²: 1,224 ± 0,15977]. Die BMD erreichte hier Werte zwischen 0,92 g/cm² (Minimum) und 1,68 g/cm² (Maximum). Auch in dieser ROI zeigten sich die gemessenen Werte als normalverteilt (Schiefe: 0,366; Kurtosis: -0,49).

| ROI | | Anzahl Messungen | Minimum | Maximum | Mittelwert | Std-Abweichung |
|-----------------------|--------------------------|------------------|---------|---------|------------|----------------|
| Ganzkörper (1) | BMD (g/cm ²) | 116 | 0,98 | 1,38 | 1,148 | 0,08653 |
| | Gültige Werte | 116 | | | | |
| obere LWS (7) | BMD (g/cm ²) | 116 | 0,92 | 1,68 | 1,2244 | 0,15997 |
| | Gültige Werte | 116 | | | | |
| linker Femurkopf (8) | BMD (g/cm ²) | 116 | 0,87 | 2 | 1,2599 | 0,22002 |
| | Gültige Werte | 116 | | | | |
| rechter Femurkopf (9) | BMD (g/cm ²) | 116 | 0,79 | 2,09 | 1,2118 | 0,21558 |
| | Gültige Werte | 116 | | | | |

Tabelle 5 Übersicht über die in den ROIs 1,7,8 und 9 gemessenen BMD-Werte. Aus jeweils 116 Messungen wurden Minimum, Maximum, sowie Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Mit Hilfe von Kurtosis und Schiefe (nicht in der Tabelle aufgeführt) wurden die Parameter auf Normalverteilung überprüft.

Für ROI 8 (*linker Femurkopf*) wurde ein Minimalwert von 0,87 g/cm² und ein Maximalwert von 2,00 g/cm² gemessen. Der Mittelwert lag bei [M ± SD in g/cm²: 1,2599 ± 0,22002]. Anhand von Schiefe (0,552) und Kurtosis (0,185) ließ sich auch hier eine Normalverteilung der Werte feststellen.

Die Auswertung der BMD in ROI 9 (*rechter Femurkopf*) lieferte Werte zwischen 0,79 g/cm² (Minimum) und 2,09 g/cm² (Maximum). Als Mittelwert ergab sich [M ± SD in g/cm²: 1,2118 ± 0,21558]. Bei einer Schiefe von 0,945 und einer Kurtosis von 1,619 waren die Werte nicht normalverteilt.

4.2 Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen

Die untersuchten Merino-Landschafe stammten aus vier unterschiedlichen Versuchsgruppen. Auch wenn es sich bei allen um unbehandelte Tiere vom Wildtyp handelte, die als repräsentativ für ihre Spezies anzusehen sind, wurden die gemessenen Parameter ebenfalls getrennt nach Gruppen betrachtet, um mögliche Unterschiede aufzuzeigen.

Hierfür wurden die BMD-Werte der in allen Gruppen gemessenen ROIs (1; 7; 8; 9) getrennt nach Gruppen erhoben und verglichen. Als Post-Hoc-Verfahren wurde dafür die Bonferroni-Korrektur angewendet (Abbildung 12), mit welcher die BMD Werte der Versuchsgruppen auf signifikante Unterschiede überprüft wurden. Wird ein p-Wert von 0,05 unterschritten, ist von einem signifikanten Unterschied der untersuchten Gruppen auszugehen. In dieser Untersuchung wurden die zu Gruppe 3 zusammengefassten Gruppen *HA* und *Biocomposit* voneinander getrennt analysiert.

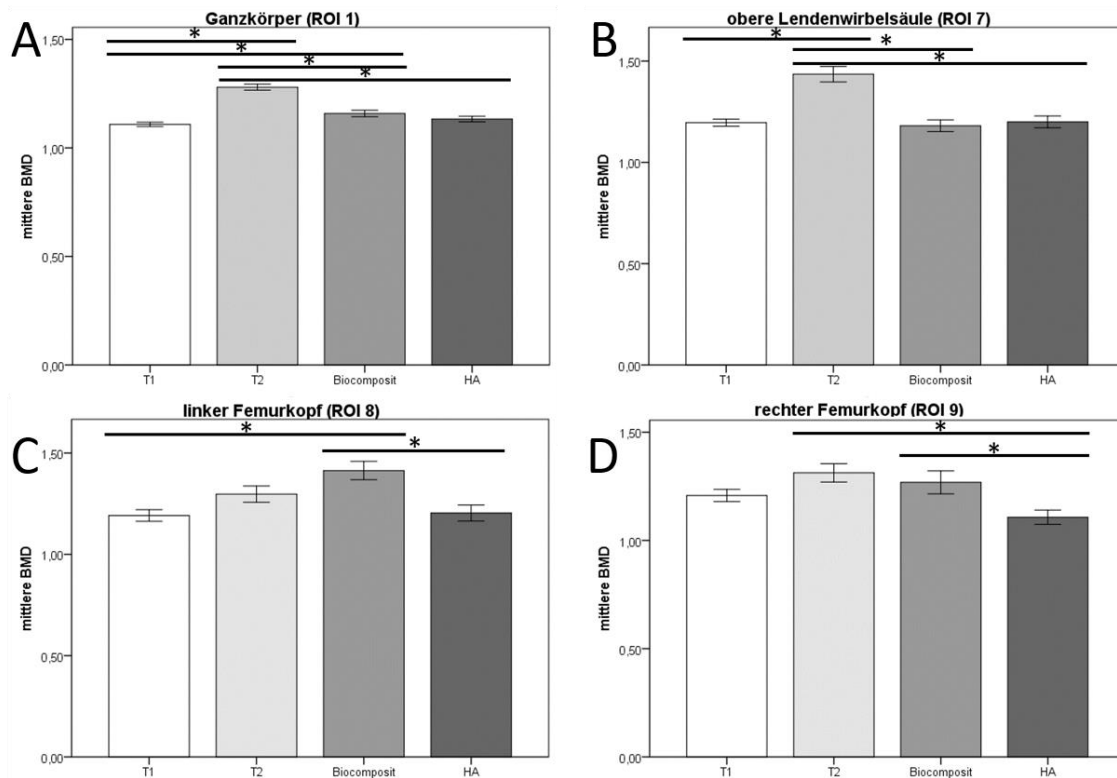


Abbildung 12: Mit der Bonferroni-Korrektur wurden die BMD-Werte der einzelnen Versuchsgruppen auf signifikante Unterschiede geprüft. Die Abbildung zeigt die mittleren BMD-Werte der ROIs *Ganzkörper* (A), *obere Lendenwirbelsäule* (B), *linker* (C) und *rechter* (D) *Femurkopf*. Gruppen, die signifikante Unterschiede aufweisen sind durch eine Linie mit Sternsymbol miteinander verbunden. Die Gruppen *Biocomposit* und *HA* bilden gemeinsam die Gruppe 3, sind in dieser Grafik jedoch als zwei getrennte Gruppen aufgeführt. Signifikanzniveau: $\{p \leq 0,05\}$

In ROI 1 (*Ganzkörper*) (Abbildung 12, A) konnte durch das Bonferroni-Verfahren ein signifikanter Unterschied zwischen den BMD-Werten einiger Gruppen gezeigt werden. Dieser ergab sich zwischen den Gruppen *T1* und *T2* $\{p < 0,001\}$ sowie *T1* und *Biocomposit* $\{p = 0,016\}$. Zusätzlich zwischen Gruppe *T2* und *Biocomposit* $\{p < 0,001\}$, *T2* und *HA* $\{p < 0,001\}$.

In ROI 7 (*obere Lendenwirbelsäule*) (Abbildung 12, B) zeigte die Analyse signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen *T1* und *T2* $\{p < 0,001\}$, *T2* und *Biocomposit* $\{p < 0,001\}$ und *T2* und *HA* $\{p < 0,001\}$ auf.

Die Analyse der BMD-Werte aus ROI 8 (*linker Femurkopf*) (Abbildung 12, C) zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Werten der Gruppen *T1* und *Biocomposit* $\{p < 0,001\}$ sowie der Gruppen *Biocomposit* und *HA* $\{p = 0,001\}$.

Die statistische Auswertung von ROI 9 (*rechter Femurkopf*) (Abbildung 12, D) lieferte signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen *T2* und *HA* { $p=0,016$ } und *Biocomposit* und *HA* { $p=0,031$ }.

4.3 Korrelationen zwischen der BMD und den weiteren Knochendichteparametern

Wie bereits beschrieben kann die Knochendichte nicht unabhängig von den weiteren erhobenen Parametern betrachtet werden. Um die Zusammenhänge zwischen der BMD und den Parametern *Gewicht*, *Alter*, *BMC* und *Fett* besser beurteilen zu können, wurde der *Spearman-Rangkorrelationskoeffizient* bestimmt. Dieser wurde zunächst unabhängig der Tiergruppen für die Regionen *Ganzkörper*, *obere Lendenwirbelsäule*, sowie *linker und rechter Femurkopf* erfasst (Tabelle 6). Das Signifikanzniveau lag bei { $p \leq 0,05$ }. Anschließend wurde er ebenfalls für jede Gruppe getrennt erhoben. Mit Hilfe des Programmes *R* konnte jeweilige Korrelationsmatrix als Heatmap dargestellt werden.

BMD: Rangkorrelation nach Spearman für jede der relevanten ROIs, alle Gruppen

| | | Gewicht (kg) | Alter (Monate) | BMD (g/cm ²) | BMC (g) | Gewebe (%Fett) | Fett (g) |
|-----------------------|-------------------------|--------------|----------------|--------------------------|---------|----------------|----------|
| BMD Ganzkörper | Korrelationskoeffizient | 0,604** | 0,111 | 1,000 | 0,791** | 0,701** | 0,743** |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,000 | 0,237 | | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| BMD obere LWS | Korrelationskoeffizient | 0,371** | 0,255** | 1,000 | 0,792** | 0,547** | 0,512** |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,000 | 0,006 | | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| BMD linker Femurkopf | Korrelationskoeffizient | 0,146 | 0,048 | 1,000 | 0,430** | 0,065 | -0,021 |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,122 | 0,609 | | 0,000 | 0,501 | 0,823 |
| BMD rechter Femurkopf | Korrelationskoeffizient | 0,150 | 0,145 | 1,000 | 0,448** | 0,151 | -0,087 |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,111 | 0,120 | | 0,000 | 0,113 | 0,363 |

Tabelle 6: Spearman-Rangkorrelation der BMD zu den Parametern *Gewicht*, *Alter*, *BMC*, *relativer Fettanteil (Fett %)* und *absoluter Fettanteil (Fett (g))*. Die Korrelationen wurden für jede der vier Regionen (*Ganzkörper*, *obere LWS*, *linker Femurkopf* und *rechter Femurkopf*) bestimmt. Das Signifikanzniveau lag bei { $p \leq 0,05$ }.

In ROI 1, *Ganzkörper*, (Tabelle 6; Abbildung 13) fand sich eine signifikante Korrelation zwischen BMD und Gewicht. Der Korrelationskoeffizient $[\rho]$ lag bei $[\rho=0,604]$, bei einer Signifikanz von $\{p<0,001\}$. In Bezug auf das Alter zeigte sich bei einem Korrelationskoeffizienten von $[\rho=0,111]$ keine signifikante Korrelation $\{p=0,237\}$. Zwischen BMD und BMC konnte eine signifikante Korrelation $\{p<0,001\}$ bei einem Korrelationskoeffizienten von $[\rho=0,791]$ nachgewiesen werden. Für den relativen Fettanteil im Gewebe fand sich ebenfalls eine signifikante Korrelation mit $\{p<0,001\}$ und $[\rho=0,701]$. Für den absoluten Fettanteil ergaben sich Werte von $\{p<0,001\}$ und $[\rho=0,743]$.

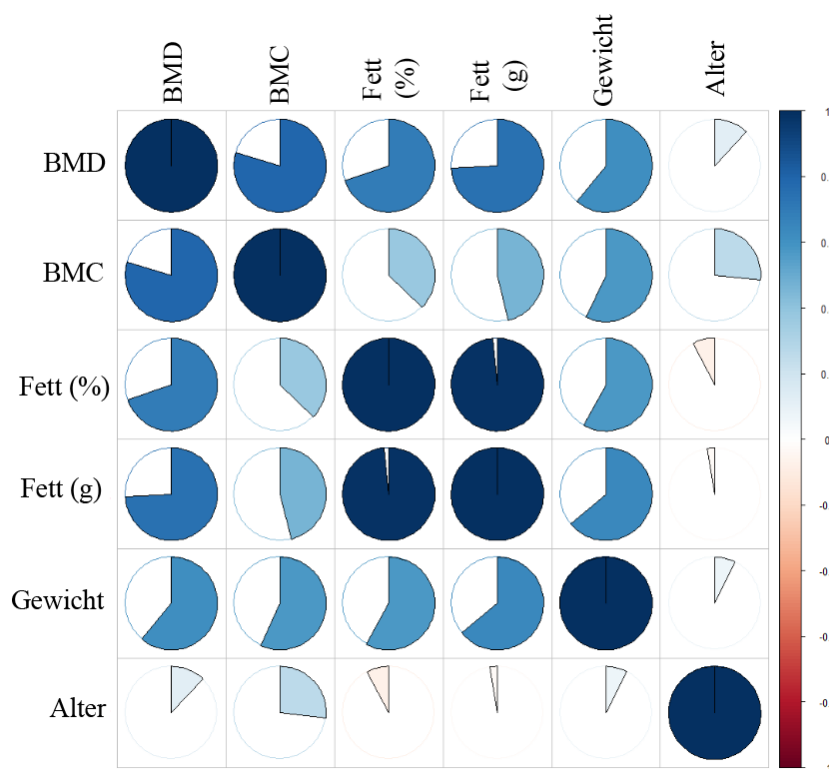


Abbildung 13: Die Heatmap gibt einen Überblick über den Korrelationskoeffizienten nach Spearman für die ROI Ganzkörper. Je dunkler die Färbung eines Diagrammes, desto höher der Korrelationskoeffizient der beiden Parameter. Zusätzlich lässt sich anhand der dargestellten Kuchendiagramme das Ausmaß der Korrelation ablesen. Es finden sich signifikante Korrelationen zwischen BMD und BMC, Gewicht, Fett (%) und Fett (g). Signifikanzniveau: $\{p\leq 0,05\}$.

Im Bereich *obere Lendenwirbelsäule* fanden sich signifikante Korrelationen zwischen der BMD und allen weiteren erhobenen Parametern (Tabelle 6; Abbildung 14). Zwischen BMD und Gewicht ergab sich ein Signifikanzniveau von $\{p<0,001\}$ bei einem

Korrelationskoeffizienten von $[\rho=0,371]$. Bezogen auf das Alter der Tiere konnte bei einem Signifikanzniveau von $\{p=0,006\}$ ein Korrelationskoeffizient von $[\rho=0,255]$ berechnet werden. In Bezug auf den BMC fanden sich Werte von $\{p<0,001\}$ und $[\rho=0,792]$. Zwischen dem relativen Fettanteil im Gewebe und der BMD wurde ein Signifikanzniveau von $\{p<0,001\}$ und ein Korrelationskoeffizient von $[\rho=0,547]$ berechnet. Bei Betrachtung des absoluten Fettanteils im Gewebe lagen die Werte bei $\{p<0,001\}$ und $[\rho=0,512]$.

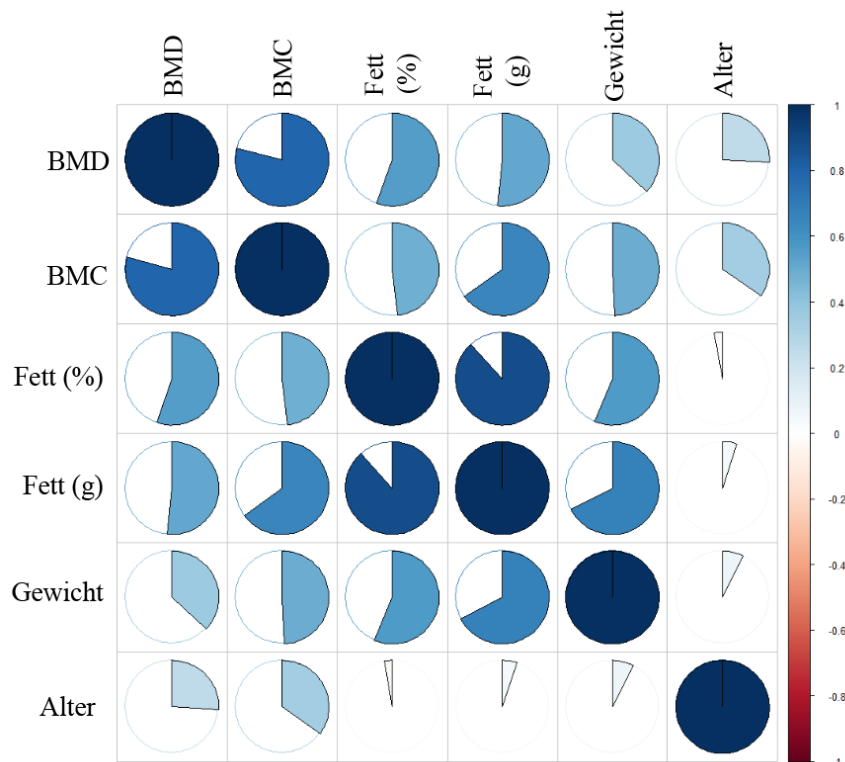


Abbildung 14: Die Heatmap zeigt den Korrelationskoeffizienten nach Spearman zwischen den gemessenen Parametern der ROI *obere Lendenwirbelsäule*. Es fanden sich signifikante Korrelationen zwischen der BMD und Gewicht, Alter, BMC, sowie dem relativen und absoluten Fettanteil im Gewebe. Signifikanzniveau: $\{p\leq 0,05\}$.

Die Auswertung der ROI *linker Femurkopf* erbrachte eine signifikante Korrelation zwischen der BMD und dem BMC mit $\{p<0,001\}$ und $[\rho=0,430]$ (Tabelle 6, Abbildung 15). Zwischen BMD und Gewicht ergaben sich Werte von $\{p=0,122\}$ und $[\rho=0,146]$. Zwischen der BMD und dem Alter der Tiere ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $[\rho=0,048]$ und ein Signifikanzniveau von $\{p=0,609\}$. In Bezug auf den relativen Fettanteil im Gewebe ergaben sich Werte von $[\rho=0,065]$ und $\{p=0,501\}$. Zum absoluten

Fettanteil im Gewebe wurde ein Korrelationskoeffizient von $[\rho=-0,021]$ bei einem Signifikanzniveau von $\{p=0,823\}$ berechnet. In der analysierten ROI fand sich also lediglich eine signifikante Korrelation zwischen BMD und BMC.

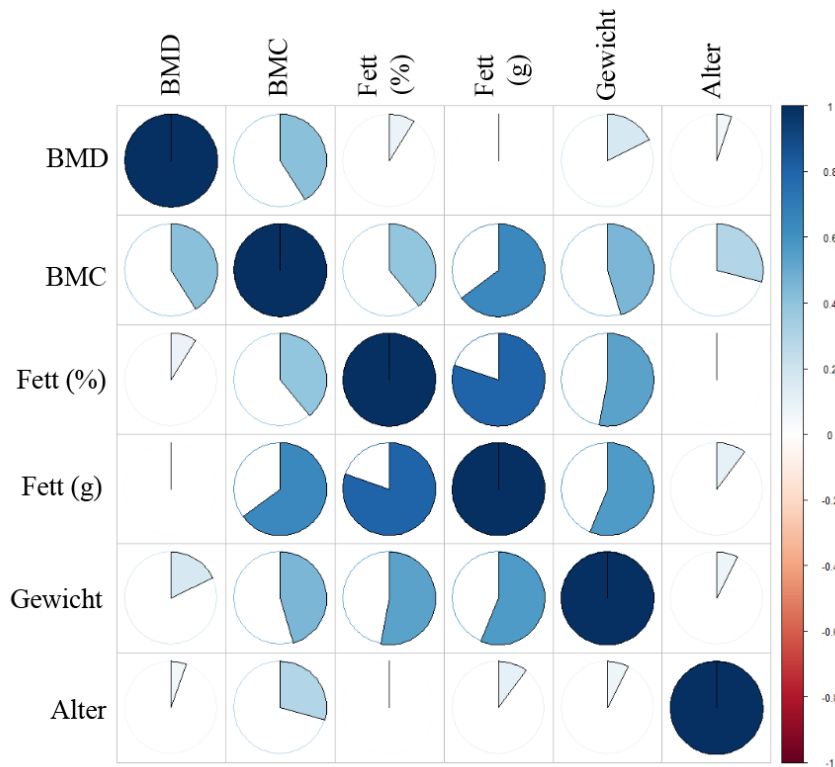


Abbildung 15: Heatmap zur Rangkorrelation nach Spearman für die ROI *linker Femurkopf*. Es wurde der Korrelationskoeffizient zwischen allen in den DXA-Scans erhobenen Parametern berechnet. Es fiel eine signifikante Korrelation zwischen BMD und BMC auf. Signifikanzniveau: $\{p \leq 0,05\}$.

In der ROI *rechter Femurkopf* konnte eine signifikante Korrelation zwischen der BMD und dem BMC berechnet werden (Tabelle 6; Abbildung 16). Der Korrelationskoeffizient nach Spearman lag bei $[\rho=0,448]$, das Signifikanzniveau bei $\{p < 0,001\}$. Zwischen der BMD und dem Gewicht der Tiere ergaben sich für die beiden Parameter Werte von $[\rho=0,150]$ und $\{p=0,111\}$. Bezogen auf das Alter der Schafe wurde ein Korrelationskoeffizient von $[\rho=0,145]$ und ein Signifikanzniveau von $\{p=0,120\}$ berechnet. Zwischen dem relativen Fettanteil im Gewebe und der BMD wurden $[\rho=0,151]$ und $\{p=0,113\}$ errechnet. Beim Vergleich der BMD mit dem absoluten Fettanteil ergaben sich $[\rho=-0,087]$ und $\{p=0,363\}$.

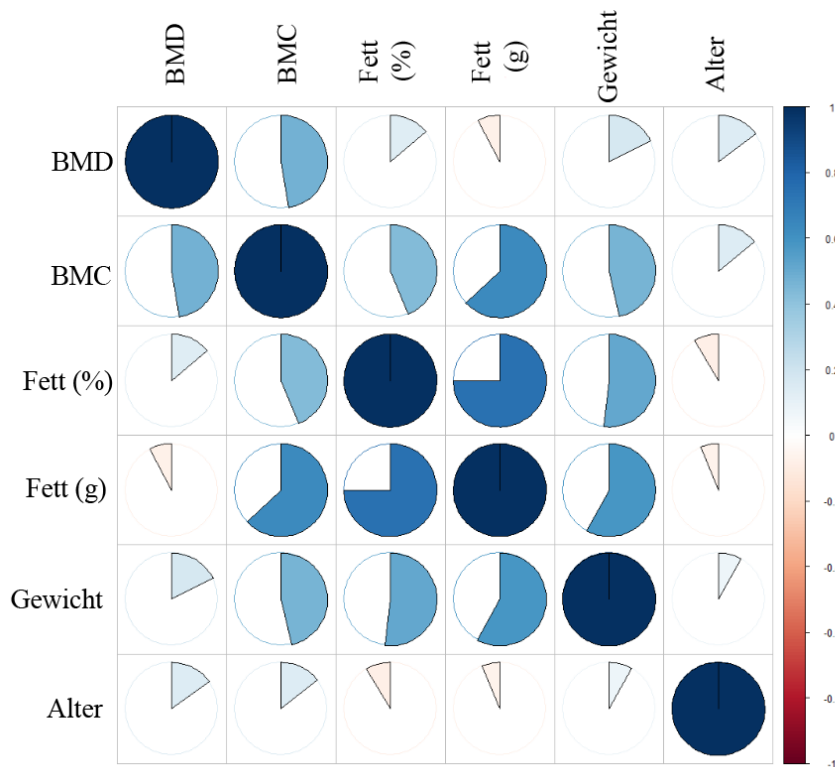


Abbildung 16: Die Heatmap zeigt den Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman für die ROI rechter Femurkopf. Es wurden dabei alle in den Scans erhobenen Parameter miteinander verglichen. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen BMD und BMC nachgewiesen werden. Signifikanzniveau: $\{p \leq 0,05\}$.

4.3.1 Korrelationen der BMD innerhalb der jeweiligen Gruppen

Im Anschluss wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman in jeder der vier relevanten Regionen getrennt nach der jeweiligen Versuchsgruppe betrachtet. In diesem Verfahren wurden die Tiere ebenfalls in vier Gruppen eingeteilt. Gruppe 3 (*Kreuzband*) wurde in die Gruppen *Biocomposit* und *HA* aufgeteilt.

4.3.1.1 ROI 1, Ganzkörper

Für die ROI *Ganzkörper* zeigte sich in der Gruppe *Osteoporose 1 (T1)* eine signifikante Korrelation zwischen der BMD und dem Gewicht der Tiere. Es fand sich ein Signifikanzniveau von $\{p < 0,001\}$ bei einem Korrelationskoeffizienten von $[\rho = 0,611]$. Beim Vergleich von BMD und BMC wurden Werte von $\{p < 0,001\}$ und $[\rho = 0,786]$

ermittelt. Auch für den relativen Fettanteil im Gewebe fand sich eine signifikante Korrelation mit $\{p < 0,001\}$ und $[\rho = 0,550]$. Ebenso verhielt es sich beim absoluten Fettanteil mit $\{p < 0,001\}$ und $[\rho = 0,609]$. Es fand sich jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der BMD und dem Alter der Tiere. Die Werte lagen bei $\{p = 0,085\}$ und $[\rho = 0,254]$ (Tabelle 7).

In Gruppe *Osteoporose 2 (T2)* konnten zwischen der BMD und dem Gewicht der Tiere Werte von $\{p = 0,776\}$ und $[\rho = -0,080]$ bestimmt werden. Bezogen auf das Alter der Tiere fand sich ein Signifikanzniveau von $\{p = 0,054\}$ und ein Rangkorrelationskoeffizient von $[\rho = 0,848]$. Zwischen BMD und BMC konnte eine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Die Werte lagen hier bei $\{p = 0,001\}$ und $[\rho = 0,749]$. Bezogen auf den relativen Fettanteil im Gewebe lagen diese bei $\{p = 0,147\}$ und $[\rho = -0,934]$. Beim absoluten Fettanteil fand sich ebenfalls ein negativer Korrelationskoeffizient von $[\rho = -0,425]$ bei einem Signifikanzniveau von $\{p = 0,114\}$ (Tabelle 7).

BMD: Rangkorrelation nach Spearman, getrennt betrachtet nach Gruppen für die ROI Ganzkörper

| Gruppe | | Gewicht (kg) | Alter (Monate) | BMD (g/cm ²) | BMC (g) | Gewebe (%Fett) | Fett (g) |
|----------------------------|-------------------------|--------------|----------------|--------------------------|---------|----------------|----------|
| Osteoporose 1 (T1) | Korrelationskoeffizient | 0,611** | 0,254 | 1,000 | 0,786** | 0,550** | 0,609** |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,000 | 0,085 | | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Osteoporose 2 (T2) | Korrelationskoeffizient | -0,080 | 0,054 | 1,000 | 0,749** | -0,394 | -0,425 |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,776 | 0,848 | | 0,001 | 0,147 | 0,114 |
| Kreuzband (Biocomposit) | Korrelationskoeffizient | 0,209 | -0,335 | 1,000 | 0,607** | 0,689** | 0,666** |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,294 | 0,088 | | 0,001 | 0,000 | 0,000 |
| Kreuzband (HA) | Korrelationskoeffizient | 0,158 | -0,141 | 1,000 | 0,667** | 0,817** | 0,823** |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,450 | 0,483 | | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

Tabelle 7: Rangkorrelation nach Spearman der ROI *Ganzkörper*. Es wurde der Korrelationskoeffizient zwischen der BMD und den weiteren Parametern für jede der vier Gruppen getrennt betrachtet. Das Signifikanzniveau lag bei $\{p \leq 0,05\}$.

In der Gruppe *Biocomposit* fand sich für die BMD in Bezug auf das Gewicht der Tiere ein Korrelationskoeffizient von $[\rho=0,209]$ bei einem Signifikanzniveau von $\{p=0,294\}$. Zum Alter der Schafe ergab sich eine negative Korrelation von $[\rho=-0,335]$ bei einem Signifikanzniveau von $\{p=0,088\}$. Zwischen BMD und BMC ließ sich eine signifikante Korrelation mit $[\rho=0,607]$ und $\{p=0,001\}$ berechnen. Bezogen auf den relativen Fettanteil im Gewebe ließ sich ebenfalls eine signifikante Korrelation mit Werten von $[\rho=0,689]$ und $\{p<0,001\}$ nachweisen. Beim absoluten Fettanteil verhielt es sich ebenso mit einem Korrelationskoeffizienten von $[\rho=0,666]$ und einem Signifikanzniveau von $\{p<0,001\}$ (Tabelle 7).

Die Gruppe *HA* lieferte zwischen der BMD und dem Gewicht der Merino-Landschafe keine signifikante Korrelation. Es wurden Werte von $[\rho=0,158]$ und $\{p=0,450\}$ berechnet. Auch zum Gewicht ließ sich keine signifikante Korrelation nachweisen. Der Rangkorrelationskoeffizient lag bei $[\rho=-0,141]$ und das Signifikanzniveau bei $\{p=0,483\}$. Dagegen konnte zur BMC eine signifikante Korrelation mit $[\rho=0,667]$ und $\{p<0,001\}$ berechnet werden. Ebenso verhielt es sich beim absoluten Fettanteil im Gewebe mit einem Korrelationskoeffizienten von $[\rho=0,817]$ und einem Signifikanzniveau von $\{p<0,001\}$. Auch beim relativen Fettanteil fand sich eine signifikante Korrelation mit $[\rho=0,823]$ und $\{p<0,001\}$ (Tabelle 7).

4.3.1.2 ROI 7, obere Lendenwirbelsäule

In ROI 7, *obere Lendenwirbelsäule* (Tabelle 8), zeigte sich im Spearman-Verfahren für Gruppe *Osteoporose 1 (T1)* eine signifikante Korrelation zwischen der BMD und jedem der anderen erhobenen Parameter. Bezogen auf das Gewicht der Tiere fand sich ein Korrelationskoeffizient von $[\rho=0,433]$ und ein Signifikanzniveau von $\{p=0,002\}$. Vergleich man die BMD mit dem Alter der Schafe, erhielt man Werte von $[\rho=0,305]$ und $\{p=0,037\}$. Der BMC korrelierte mit der BMD mit einem Koeffizienten von $[\rho=0,780]$ auf einem Signifikanzniveau von $\{p<0,001\}$. Beim relativen Fettanteil im Gewebe konnten Werte von $[\rho=0,475]$ und $\{p=0,001\}$ bestimmt werden. Beim absoluten Fettanteil lagen die Werte bei $[\rho=0,574]$ und $\{p<0,001\}$.

In Gruppe *Osteoporose 2 (T2)* konnte im Spearman-Verfahren zwischen der BMD und dem Alter der Merino-Landschafe ein Rangkorrelationskoeffizient von [$\rho=0,448$] und ein Signifikanzniveau von $\{p=0,094\}$ berechnet werden. Das Gewicht der Tiere korrelierte mit einem Koeffizienten von [$\rho=-0,151$] auf einem Signifikanzniveau von $\{p=0,591\}$ mit der BMD. In Bezug auf den BMC fand sich eine signifikante Korrelation mit Werten von [$\rho=0,768$] und $\{p=0,001\}$. Für den relativen Fettanteil im Gewebe wurden Werte von [$\rho=0,104$] und $\{p=0,713\}$ berechnet. Beim absoluten Fettanteil ergaben sich Werte von [$\rho=0,175$] und $\{p=0,533\}$ (Tabelle 8).

BMD: Rangkorrelation nach Spearman, getrennt betrachtet nach Gruppen für die ROI obere Lendenwirbelsäule

| Gruppe | | Gewicht (kg) | Alter (Monate) | BMD (g/cm ²) | BMC (g) | Gewebe(%Fett) | Fett(g) |
|-------------------------|-------------------------|--------------|----------------|--------------------------|---------|---------------|---------|
| Osteoporose 1 (T1) | Korrelationskoeffizient | 0,433** | 0,305* | 1,000 | 0,780** | 0,475** | 0,574** |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,002 | 0,037 | | 0,000 | 0,001 | 0,000 |
| Osteoporose 2 (T2) | Korrelationskoeffizient | 0,448 | -0,151 | 1,000 | 0,768** | 0,104 | 0,175 |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,094 | 0,591 | | 0,001 | 0,713 | 0,533 |
| Kreuzband (Biocomposit) | Korrelationskoeffizient | -0,058 | -0,032 | 1,000 | 0,813** | 0,304 | 0,218 |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,773 | 0,874 | | 0,000 | 0,124 | 0,274 |
| Kreuzband (HA) | Korrelationskoeffizient | -0,100 | 0,169 | 1,000 | 0,765** | 0,509** | 0,269 |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,635 | 0,399 | | 0,000 | 0,007 | 0,176 |

Tabelle 8: Rangkorrelation nach Spearman für die ROI *obere Lendenwirbelsäule*, getrennt betrachtet nach den vier verschiedenen Tiergruppen. Das Signifikanzniveau lag bei $\{p \leq 0,05\}$.

In der Gruppe *Biocomposit* wurde zwischen der BMD und dem Gewicht der Schafe ein Korrelationskoeffizient von [$\rho=-0,058$] und ein Signifikanzniveau von $\{p=0,773\}$ berechnet. In Bezug auf das Alter der Tiere ergaben sich Werte von [$\rho=-0,032$] und $\{p=0,874\}$. Zum BMC fand sich hier eine signifikante Korrelation zur BMD mit einem Koeffizienten von [$\rho=0,813$] und einem Signifikanzniveau $\{p < 0,001\}$. Bezogen auf den relativen Fettanteil im Gewebe wurden Werte von [$\rho=0,304$] und $\{p=0,124\}$ berechnet. Beim absoluten Fettanteil ergaben sich Werte von [$\rho=0,218$] und $\{p=0,274\}$ (Tabelle 8).

In Gruppe *HA* fand sich zwischen der BMD und dem Gewicht der Tiere ein Korrelationskoeffizient von $[\rho=-0,100]$ bei einem Signifikanzniveau von $\{p=0,635\}$. Mit dem Alter der Schafe korrelierte die BMD mit einem Koeffizienten von $[\rho=0,169]$ bei einer Signifikanz von $\{p=0,399\}$. Zum BMC fand sich eine signifikante Korrelation mit Werten von $[\rho=0,765]$ und $\{p<0,001\}$. Ebenso verhielt es sich beim relativen Fettanteil im Gewebe mit $[\rho=0,509]$ und $\{p=0,007\}$. In Bezug auf den absoluten Fettanteil wurden $[\rho=0,269]$ und $\{p=0,176\}$ berechnet (Tabelle 8).

4.3.1.3 ROI 8, linker Femurkopf

Die Analyse der ROI 8, *linker Femurkopf* (Tabelle 9), mit Hilfe des Spearman-Verfahrens erbrachte in der Gruppe *Osteoporose 1 (T1)* zwischen der BMD und dem Gewicht der Merino-Landschafe einen Korrelationskoeffizienten von $[\rho=0,141]$ bei einer Signifikanz von $\{p=0,344\}$. In Bezug auf das Alter der Tiere wurden Werte von $[\rho=-0,043]$ und $\{p=0,774\}$ berechnet. Zwischen der BMD und dem BMC konnte eine signifikante Korrelation mit einem Koeffizienten von $[\rho=0,355]$ und einer Signifikanz von $\{p=0,014\}$ nachgewiesen werden. Beim relativen Fettanteil im untersuchten Gewebe fand sich eine Korrelation von $[\rho=-0,047]$ bei einer Signifikanz $\{p=0,759\}$. Beim absoluten Fettanteil wurden Werte von $[\rho=-0,196]$ und $\{p=0,193\}$ berechnet (Tabelle 9).

Die Gruppe *Osteoporose 2 (T2)* zeigte in der Region *linker Femurkopf* keine signifikanten Korrelationen zwischen der BMD und den weiteren erhobenen Parametern. Zwischen der BMD und dem Gewicht der Tiere lagen die errechneten Werte bei $[\rho=-0,181]$ und $\{p=0,344\}$. In Bezug auf das Alter der Tiere wurde ein Korrelationskoeffizient von $[\rho=0,299]$ bei einer Signifikanz von $\{p=0,279\}$ berechnet. Zwischen BMD und BMC erbrachte das Verfahren Werte von $[\rho=0,279]$ und $\{p=0,315\}$. In Bezug auf den relativen Fettanteil im Gewebe wurden $[\rho=0,375]$ und $\{p=0,168\}$ berechnet. Beim absoluten Fettanteil lag der Korrelationskoeffizient bei $[\rho=0,165]$ und $\{p=0,558\}$ (Tabelle 9).

**BMD: Rangkorrelation nach Spearman, getrennt betrachtet nach Gruppen
für die ROI linker Femurkopf**

| Gruppe | | Gewicht (kg) | Alter (Monate) | BMD (g/cm ²) | BMC (g) | Gewebe(%Fett) | Fett(g) |
|----------------------------|-------------------------|--------------|----------------|--------------------------|---------|---------------|---------|
| Osteoporose 1 (T1) | Korrelationskoeffizient | 0,141 | -0,043 | 1,000 | 0,355* | -0,047 | -0,196 |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,344 | 0,774 | | 0,014 | 0,759 | 0,193 |
| Osteoporose 2 (T2) | Korrelationskoeffizient | -0,181 | 0,299 | 1,000 | 0,279 | 0,375 | 0,165 |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,519 | 0,279 | | 0,315 | 0,168 | 0,558 |
| Kreuzband (Biocomposit) | Korrelationskoeffizient | -0,020 | -0,173 | 1,000 | 0,447* | 0,292 | 0,054 |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,920 | 0,388 | | 0,019 | 0,156 | 0,797 |
| Kreuzband (HA) | Korrelationskoeffizient | -0,145 | 0,369 | 1,000 | 0,475* | -0,032 | -0,105 |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,489 | 0,058 | | 0,012 | 0,880 | 0,617 |

Tabelle 9: Die Tabelle gibt einen Überblick über die Rangkorrelation nach Spearman für die ROI linker Femurkopf. Die Korrelation der in den DXA-Scans erhobenen Parameter wurde für jede der vier Versuchsgruppen getrennt betrachtet. Das Signifikanzniveau lag bei $\{p \leq 0,05\}$.

In der Gruppe *Biocomposit* wurde zwischen der BMD und dem Gewicht der Versuchstiere ein Korrelationskoeffizient von $[\rho = -0,020]$ bei einer Signifikanz von $\{p = 0,920\}$ berechnet. Beim Alter der Schafe wurden Werte von $[\rho = -0,173]$ und $\{p = 0,388\}$ berechnet. Zwischen BMD und BMC konnte eine signifikante Korrelation mit einem Koeffizienten von $[\rho = 0,447]$ bei einer Signifikanz von $\{p = 0,019\}$ nachgewiesen werden. In Bezug auf den relativen Fettanteil im untersuchten Gewebe wurden Werte von $[\rho = 0,292]$ und $\{p = 0,156\}$ berechnet. Beim absoluten Fettanteil lagen diese bei $[\rho = 0,054]$ und $\{p = 0,797\}$ (Tabelle 9).

In der Gruppe *HA* lag der Korrelationskoeffizient zwischen der BMD und dem Gewicht der Tiere bei $[\rho = -0,145]$ bei einer Signifikanz von $\{p = 0,489\}$. Bezogen auf das Alter der Schafe wurden Werte von $[\rho = 0,369]$ und $\{p = 0,058\}$ berechnet. Zwischen BMD und BMC konnte eine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Der Korrelationskoeffizient lag hier bei $[\rho = 0,475]$, die Signifikanz bei $\{p = 0,012\}$. Zum relativen Fettanteil im Gewebe wurde ein negativer Korrelationskoeffizient von $[\rho = -$

0,032] bei einer Signifikanz von $\{p=0,880\}$ berechnet. Auch beim absoluten Fettanteil fand sich ein negativer Koeffizient mit $[\rho=-0,105]$ und einer Signifikanz von $\{p=0,617\}$ (Tabelle 9).

4.3.1.4 ROI 9, rechter Femurkopf

In ROI 9, *rechter Femurkopf*, fand sich in der Rangkorrelation nach Spearman (Tabelle 10) für die Gruppe *Osteoporose 1 (T1)* ein Korrelationskoeffizient von $[\rho=0,108]$ bei einer Signifikanz von $\{p=0,471\}$ zwischen BMD und dem Gewicht der Versuchstiere. Bezogen auf das Alter der Tiere wurden Werte von $[\rho=0,089]$ und $\{p=0,552\}$ berechnet. Zwischen BMD und BMC konnte eine signifikante Korrelation mit einem Koeffizienten von $[\rho=0,318]$ bei einer Signifikanz von $\{p=0,029\}$ nachgewiesen werden. In Bezug auf den relativen Fettanteil im Gewebe fanden sich Werte von $[\rho=-0,025]$ und $\{p=0,872\}$. Zum absoluten Fettanteil konnte ebenfalls eine signifikante Korrelation mit $[\rho=-0,229]$ und $\{p=0,043\}$ berechnet werden.

In Gruppe *Osteoporose 2 (T2)* zeigten sich keine signifikanten Korrelationen zwischen der BMD und den weiteren untersuchten Parametern. Bezogen auf das Gewicht der Tiere wurde ein Korrelationskoeffizient von $[\rho=-0,027]$ bei einer Signifikanz von $\{p=0,923\}$ berechnet. Zum Alter der Schafe hin ergaben sich Werte von $[\rho=0,146]$ und $\{p=0,604\}$. Zwischen BMD und BMC wurde der Korrelationskoeffizient mit $[\rho=0,248]$ bei einer Signifikanz von $\{p=0,372\}$ berechnet. Der relative Fettanteil im untersuchten Gewebe korrelierte mit der BMD mit einem Koeffizienten von $[\rho=-0,125]$ und einer Signifikanz von $\{p=0,657\}$. Für den absoluten Fettanteil lagen die Werte bei $[\rho=-0,188]$ und $\{p=0,503\}$ (Tabelle 10).

BMD: Rangkorrelation nach Spearman, getrennt betrachtet nach Gruppen für die ROI rechter Femurkopf

| Gruppe | | Gewicht (kg) | Alter (Monate) | BMD (g/cm ²) | BMC (g) | Gewebe(%Fett) | Fett(g) |
|-------------------------|-------------------------|--------------|----------------|--------------------------|---------|---------------|----------|
| Osteoporose 1 (T1) | Korrelationskoeffizient | 0,108 | 0,089 | 1,000 | 0,318* | -0,025 | -0,299* |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,471 | 0,552 | | 0,029 | 0,872 | 0,043 |
| Osteoporose 2 (T2) | Korrelationskoeffizient | -0,027 | 0,146 | 1,000 | 0,248 | -0,125 | -0,188 |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,923 | 0,604 | | 0,372 | 0,657 | 0,503 |
| Kreuzband (Biocomposit) | Korrelationskoeffizient | 0,012 | -0,134 | 1,000 | 0,552** | 0,261 | 0,052 |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,954 | 0,504 | | 0,003 | 0,208 | 0,805 |
| Kreuzband (HA) | Korrelationskoeffizient | -0,314 | 0,400* | 1,000 | 0,322 | -0,248 | -0,660** |
| | Signifikanz (2-seitig) | 0,126 | 0,039 | | 0,101 | 0,221 | 0,000 |

Tabelle 10: Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Rangkorrelation nach Spearman für die ROI rechter Femurkopf. Es wurde der Rangkorrelationskoeffizient für jede der vier Gruppen getrennt betrachtet. Das Signifikanzniveau lag bei $\{p \leq 0,05\}$.

In der Gruppe *Biocomposit* zeigte sich zwischen der BMD und dem Gewicht der Tiere ein Korrelationskoeffizient von $[\rho=0,012]$ bei einer Signifikanz von $\{p=0,954\}$. Zum Alter der Tiere hin erbrachte das Verfahren Werte von $[\rho=-0,134]$ und $\{p=0,504\}$. Zwischen BMD und BMC wurde eine signifikante Korrelation bei einem Koeffizienten von $[\rho=0,552]$ und einer Signifikanz von $\{p=0,003\}$ berechnet. In Bezug auf den relativen Fettanteil im untersuchten Gewebe ergaben sich Werte von $[\rho=0,261]$ und $\{p=0,208\}$. Beim absoluten Fettanteil wurde ein Korrelationskoeffizient von $[\rho=0,052]$ mit einer Signifikanz von $\{p=0,805\}$ berechnet (Tabelle 10).

In Gruppe *HA* wurde zwischen der BMD und dem Gewicht der Tiere ein Korrelationskoeffizient von $[\rho=-0,314]$ und eine Signifikanz von $\{p=0,126\}$ berechnet. In Bezug auf das Alter der Merino-Landschafe konnte eine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Die errechneten Werte lagen hier bei $[\rho=0,400]$ und $\{p=0,039\}$. Bezogen auf den BMC wurde ein Korrelationskoeffizient von $[\rho=0,322]$ und eine

Signifikanz von $\{p=0,101\}$ berechnet. Zum relativen Fettanteil im untersuchten Gewebe lagen die beiden Werte bei $[\rho=-0,248]$ und $\{p=0,221\}$. Zum absoluten Fettanteil ließ sich eine signifikante Korrelation bei einem Koeffizienten von $[\rho=-0,660]$ und einer Signifikanz von $\{p<0,001\}$ nachweisen (Tabelle 10).

4.4 Berechnung einer unabhängigen Referenzgruppe

Auf Basis der mit den DXA-Scans erhobenen BMD-Werte kann ein T-Score für jedes einzelne Merino-Landschaf berechnet werden, wodurch eine Einordnung des individuellen Messergebnisses in den Kontext der Spezies getroffen werden kann. Als Basis zur Berechnung des jeweiligen T-Scores diente die Peak-Bone-Mass der Spezies. Ähnlich wie beim Menschen wurde als Referenzgruppe für den T-Score die BMD von Tieren kurz nach Erlangung der Skelettreife herangezogen. Nach Literaturangaben wird diese beim Merino-Landschaf zwischen drei und vier Jahren erreicht (Duque und Watanabe 2011; Augat et al. 2003; Reinwald und Burr 2011; Pearce, A. I., et al. 2007). Es wurden daher alle Tiere, deren Alter zwischen 48 und 72 Monaten zum Zeitpunkt der Messung lag, zur Bestimmung dieses Basiswertes herangezogen. Mit dem Mittelwert der BMD dieser Tiergruppe und der entsprechenden Standardabweichung kann für jedes Tier nach folgender Formel ein T-Score berechnet werden:

$T - Score =$

$$\frac{(\text{gemessene BMD} - \text{Mittelwert der BMD aller Tiere im Alter von 48} - 72 \text{ Monaten})}{\text{Standardabweichung der mittleren BMD der Tiere im Alter von 48} - 72 \text{ Monaten}}$$

Tabelle 11 liefert einen Überblick über die Daten, aus denen die Referenzgruppe gebildet wurde, die als Grundlage zur Berechnung des T-Scores diente. Es konnten für jede der vier relevanten ROIs 48 Messungen von Tieren im Alter zwischen 48 und 72 Monaten ausgewertet werden. In der Region *Ganzkörper* ließ sich eine durchschnittliche BMD von $[M=1,1321 \text{ g/cm}^2 \pm 0,08348 \text{ (SD)}]$ berechnen. In der Region *obere Lendenwirbelsäule*

fand sich [$M=1,2114 \text{ g/cm}^2 \pm 0,16122 \text{ (SD)}$]. Die Region *linker Femurkopf* lieferte Werte von [$M=1,2511 \text{ g/cm}^2 \pm 0,21901 \text{ (SD)}$]. Beim *rechten Femurkopf* ergaben sich [$M=1,2079 \text{ g/cm}^2 \pm 0,23861 \text{ (SD)}$].

**Deskriptive Daten der unabhängigen Referenzgruppe aus Tieren
im Alter von 48-72 Monaten**

| | Ganzkörper | obere LWS | linker Femurkopf | rechter Femurkopf |
|--------------------|-------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Messungen | 48 | 48 | 48 | 48 |
| Mittelwert | 1,1321 | 1,2114 | 1,2511 | 1,2079 |
| Median | 1,1175 | 1,1960 | 1,2160 | 1,1730 |
| Standardabweichung | 0,08348 | 0,16122 | 0,21901 | 0,23861 |
| Minimum | 0,98 | 0,93 | 0,87 | 0,79 |
| Maximum | 1,37 | 1,68 | 2,00 | 2,09 |

Tabelle 11: Übersicht über die zur Berechnung des T-Scores herangezogenen BMD-Messungen der Merino-Landschafe im Alter zwischen 48 und 72 Monaten. Für jede der vier relevanten Regionen konnte auf 48 Messungen zurückgegriffen werden.

4.4.1 Vergleich der beiden Referenzgruppen

Im Gegensatz zu der hier gebildeten unabhängigen Referenzgruppe wurde in den Studien, mit deren Daten diese Referenzgruppe gebildet werden konnte (*T1, T2 und HA-Schraube*) abhängige Referenzgruppen innerhalb der Studien gebildet. Es wurden entweder die BMD-Werte vor Beginn der Versuche bestimmt (Prätest-BMD) oder mit Hilfe der Daten einer unbehandelten Kontrollgruppe eine Einordnung der Versuchsergebnisse vorgenommen. Im Folgenden sollten die Daten der abhängigen Referenzgruppen mit denen der unabhängigen Referenzgruppe verglichen werden.

Zum besseren Vergleich wurden die beiden Referenzgruppen jeder ROI gegenübergestellt. Mit Hilfe von Boxplot-Diagrammen und dem Mann-Whitney-U-Test konnte so der Unterschied der Verteilung der einzelnen BMD-Werte dargestellt werden.

Es wurde dabei die Verteilung der BMD-Werte der unabhängigen Referenzgruppe, bestehend aus 48 Messungen an Tieren im Alter zwischen 48 und 72 Monaten, mit den Daten der in den jeweiligen Studien zum Zeitpunkt 0M durchgeführten DXA-Messungen verglichen. Weiterhin wurden die Ergebnisse der in den Studien zu späteren Zeitpunkten durchgeführten Knochendichtescans mit den beiden Referenzgruppen verglichen, um mögliche Unterschiede in der Interpretation der Versuchsergebnisse aufzuzeigen.

In der Gruppe *Kreuzband* wurde die jeweilige Referenzgruppe mit den Messergebnissen der beiden Untergruppen *HA* und *Biocomposit* zum Zeitpunkt 10 Monate verglichen. Für die Gruppe *Osteoporose*, in welcher die Daten der Studien *T1* und *T2* zusammengefasst wurden, wurden die beiden Referenzgruppen mit den Messwerten zum Zeitpunkt 3 Monate (*3M*) und 8 Monate (*8M*) verglichen.

4.4.1.1 ROI 1, Ganzkörper

In der Region *Ganzkörper* fand sich in der Gruppe *Kreuzband* eine breitere Streuung der BMD-Werte in der unabhängigen Referenzgruppe der Tiere im Alter zwischen 48 und 72 Monaten (Abbildung 17, B) im Vergleich zu den präoperativ bestimmten BMD-Werten der beiden Untergruppen *HA* und *Biocomposit* (Abbildung 17, A). Der Mann-Whitney-U-Test zeigte signifikante Unterschiede zwischen der präoperativ bestimmten Referenzgruppe und den BMD Werten der Gruppe *HA* { $p=0,028$ } und *Biocomposit* { $p=0,015$ }, die zum Zeitpunkt 10M gemessen wurden. Das Signifikanzniveau lag bei { $p\leq 0,05$ }. Setzte man die vier- bis sechsjährigen Tiere als Referenzgruppe ein, so fand sich ein signifikanter Unterschied zur Gruppe *Biocomposit* mit { $p=0,033$ }.

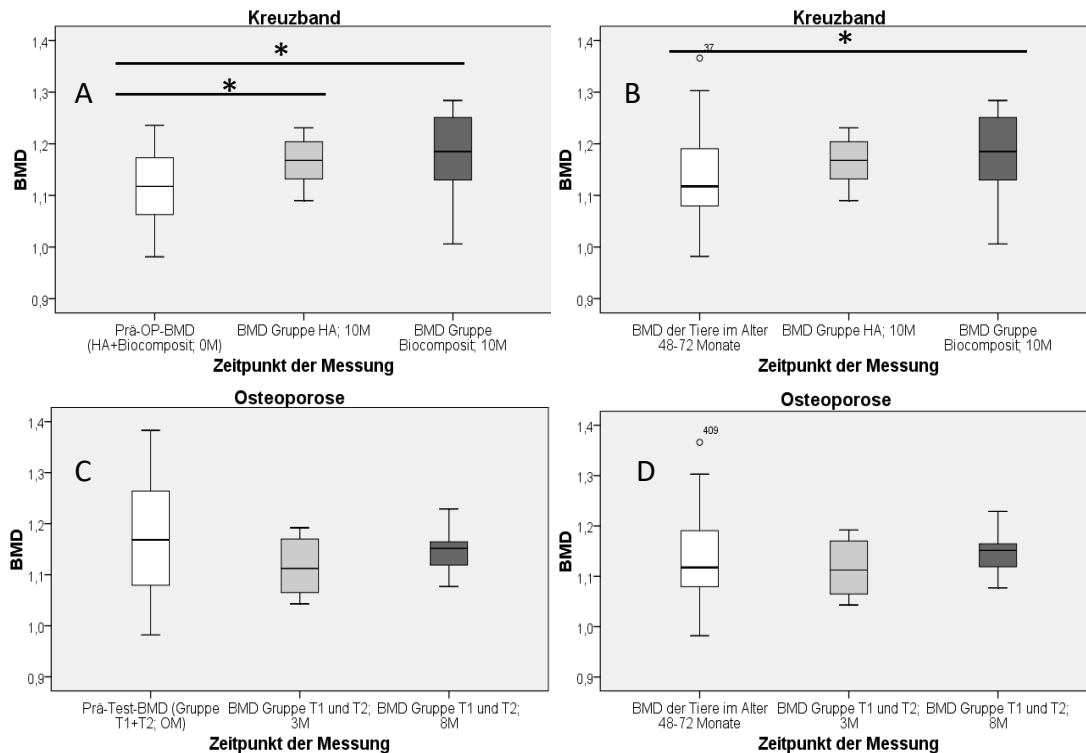


Abbildung 17: Übersicht der in ROI 1, *Ganzkörper*, gemessenen BMD-Werte. In Gruppe *Kreuzband* fanden sich signifikante Unterschiede zwischen der präoperativ gemessenen BMD zu den zum Zeitpunkt 10M gemessenen Werten der Untergruppen *HA* und *Biocomposit* (A). Die unabhängige Referenzgruppe aus den 4-6-jährigen Tieren zeigte, bei breiter gestreuten Werten, signifikante Unterschiede zur Untergruppe *Biocomposit* zum Zeitpunkt 10M (B). In der Gruppe *Osteoporose* zeigten die Prä-Test-BMD-Werte eine breitere Streuung als die Referenzgruppe der 4-6-jährigen Tiere (C; D). Anders als in der Gruppe *Kreuzband* fanden sich hier keine signifikanten Unterschiede zu den späteren Messzeitpunkten für keine der beiden Referenzgruppen. Signifikanzniveau: $\{p \leq 0,05\}$.

In der Gruppe *Osteoporose* zeigten sich breiter gestreute BMD-Werte in der Prätest-Referenzgruppe, bestehend aus den Werten der Untergruppen *T1* und *T2* zum Zeitpunkt 0M (Abbildung 17,C), verglichen mit der Referenzgruppe der vier- bis sechs-jährigen Tiere (Abbildung 17, D). Es fanden sich von beiden Referenzgruppen ausgehend keine signifikanten Unterschiede zu den Knochendichtemessungen zu den Zeitpunkten 3M und 8M.

4.4.1.2 ROI 7, obere Lendenwirbelsäule

In ROI 7, *obere Lendenwirbelsäule*, fanden sich in der Gruppe *Kreuzband* signifikante Unterschiede zwischen den präoperativ gemessenen BMD-Werten und den zum Zeitpunkt 10M gemessenen BMD-Werten der Untergruppen *HA* { $p < 0,001$ } und *Biocomposit* { $p = 0,05$ } (Abbildung 18, A). Im Mann-Whitney-U-Test ließ sich für die unabhängige Referenzgruppe, bestehend aus den BMD-Werten der vier- bis sechsjährigen Tiere, ein signifikanter Unterschied zur Untergruppe *HA* mit { $p = 0,047$ } zum Zeitpunkt 10M nachweisen (Abbildung 18, B). Beide Referenzgruppen zeigten eine ähnliche Verteilung der Messwerte.

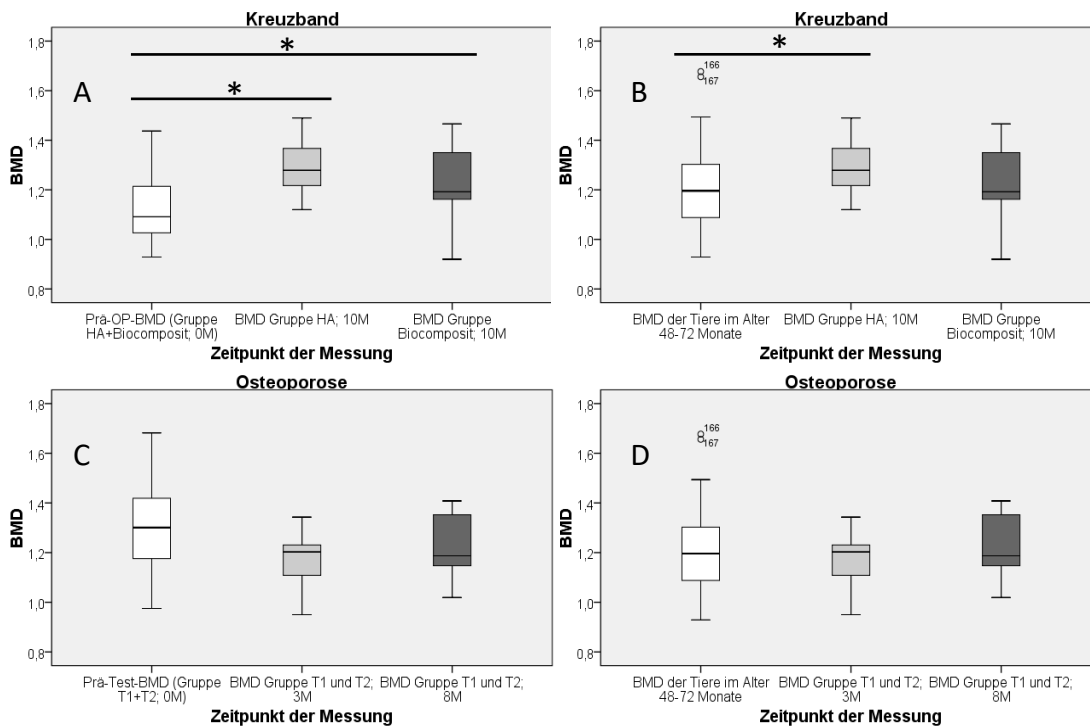


Abbildung 18: Übersicht der in ROI 7, *obere LWS*, gemessenen BMD-Werte. In der Gruppe *Kreuzband* fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den präoperativ gemessenen Werten und denen der Untergruppen *HA* und *Biocomposit* zum Zeitpunkt 10M (A). Die alternative Referenzgruppe der 4-6-jährigen Tiere zeigte lediglich einen signifikanten Unterschied zur Gruppe *HA* (B). Beide Referenzgruppen zeigten hier eine ähnliche Verteilung der Messwerte. In der Gruppe *Osteoporose* fanden sich für keine der beiden Referenzgruppen signifikante Unterschiede zu denen zu den Zeitpunkten 3M und 8M gemessenen Werten. Es fiel jedoch eine breitere Streuung der Werte innerhalb der Prätest-BMD-Gruppe auf (C; D). Signifikanzniveau: { $p \leq 0,05$ }.

In der Gruppe *Osteoporose* fand sich für keine der beiden Referenzgruppen ein signifikanter Unterschied zu denen zum Zeitpunkt 3M und 8M gemessenen BMD-Werten (Abbildung 18, C und D). Die Prätest-BMD-Werte zeigten jedoch eine breitere Streuung.

4.4.1.3 ROI 8, linker Femurkopf

In ROI 8, *linker Femurkopf*, fand sich für die Gruppe *Kreuzband* im Mann-Whitney-U-Test ein signifikanter Unterschied zwischen der alternativen Referenzgruppe der vier- bis sechsjährigen Tiere und der Untergruppe *Biocomposit* zum Zeitpunkt 10M { $p=0,05$ } (Abbildung 19; B).

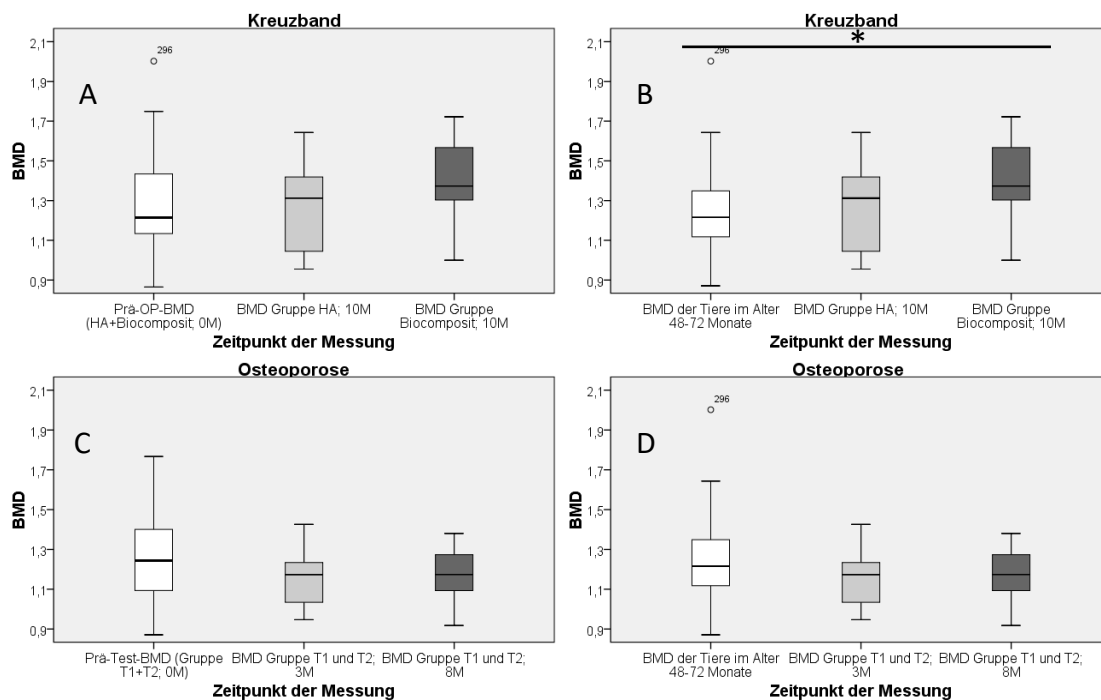


Abbildung 19: Übersicht der in ROI 8, *linker Femurkopf*, gemessenen BMD-Werte. In der Gruppe *Kreuzband* fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen der alternativen Referenzgruppe der 4-6-jährigen Tiere und der Untergruppe *Biocomposit* zum Zeitpunkt 10M (B). Zudem zeigten die Werte der Prä-OP-BMD-Gruppe (A) eine breitere Streuung als die alternative Referenzgruppe (B).

In der Gruppe *Osteoporose* fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Referenzgruppen und den zu späteren Zeitpunkten gemessenen BMD-Werten (C; D). Hier zeigte sich ebenfalls eine breitere Streuung der Werte in der Prä-Test-BMD-Gruppe im Vergleich zur alternativen Referenzgruppe. Signifikanzniveau: { $p \leq 0,05$ }.

In der Gruppe *Osteoporose* konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen einer der beiden Referenzgruppen und den zu einem späteren Zeitpunkt gemessenen BMD-Werten nachgewiesen werden. In der Prä-Test-BMD Gruppe fanden sich breiter gestreute Werte, als in der alternativen Referenzgruppe der vier- bis sechsjährigen Tiere (Abbildung 19; C und D).

4.4.1.4 ROI 9, rechter Femurkopf

In ROI 9, rechter Femurkopf, fanden sich in Gruppe *Kreuzband* im Mann-Whitney-U-Test signifikante Unterschiede zwischen den präoperativ gemessenen BMD-Werten und denen der Untergruppe *HA* zum Zeitpunkt 10M { $p=0,018$ } (Abbildung 20; A). Auch für die alternative Referenzgruppe aus den BMD-Werten der vier- bis sechsjährigen Tiere wurde ein signifikanter Unterschied zur Untergruppe *HA* nachgewiesen { $p=0,018$ } (Abbildung 20; B). Zwischen den beiden Untergruppen *HA* und *Biocomposit* fand sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied { $p=0,028$ }. Die Gruppe der präoperativ bestimmten BMD-Werte unterlag dabei einer breiteren Streuung der einzelnen Werte.

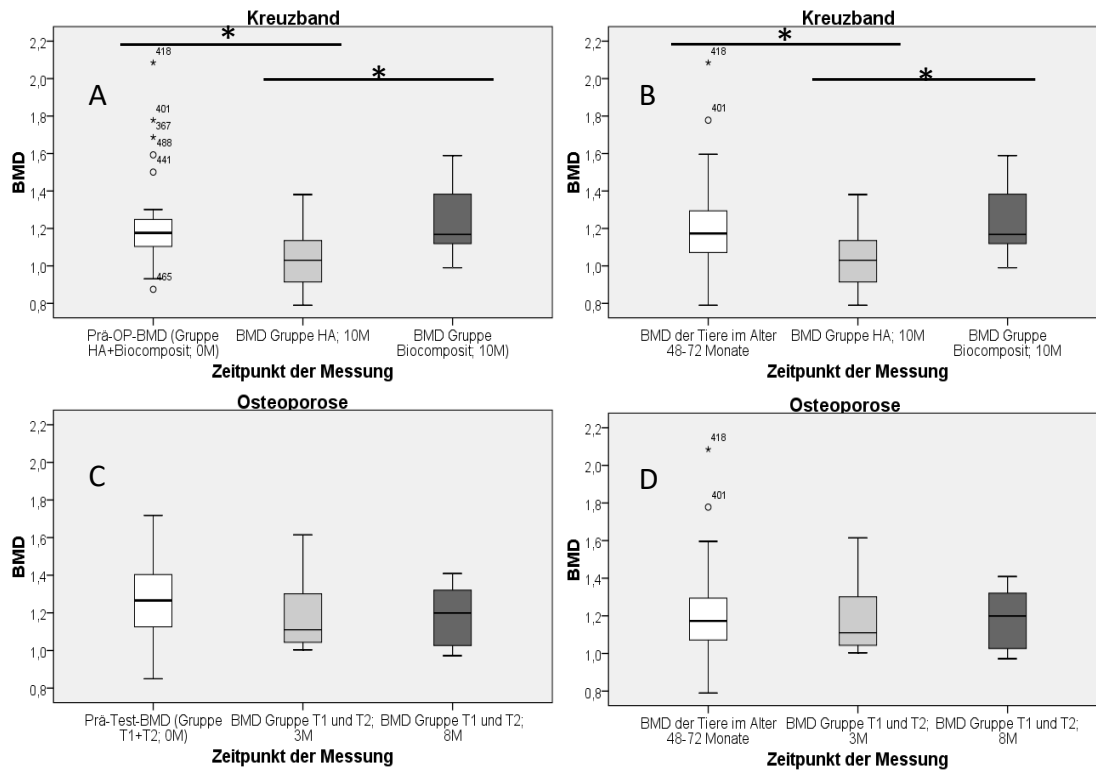


Abbildung 20: Übersicht der in ROI 9, *rechter Femurkopf*, gemessenen BMD-Werte. In der Gruppe *Kreuzband* fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den BMD-Werten der Untergruppe *HA* zum Zeitpunkt 10M und den beiden Referenzgruppen (A; B). Zudem wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Untergruppen *HA* und *Biocomposit* zum Zeitpunkt 10M nachgewiesen. Die Werte der Prä-OP-BMD-Gruppe unterlagen einer breiteren Streuung als die der alternativen Referenzgruppe.

In der Gruppe *Osteoporose* fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den BMD-Werten der einzelnen Untergruppen (C; D). Hier zeigte sich jedoch eine breitere Streuung der Werte der alternativen Referenzgruppe. Signifikanzniveau: $\{p \leq 0,05\}$.

In der Gruppe *Osteoporose* konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden (Abbildung 20; C und D). Hier unterlagen die Werte der alternativen Referenzgruppe einer breiteren Streuung als die Werte der präoperativ bestimmten BMD.

4.5 Der altersabhängige Verlauf der Knochendichteparameter

Die peak bone mass (PBM) stellt den höchsten Wert der Knochendichte dar. Dieser wird beim Menschen mit Abschluss der Skelettreife im jungen Erwachsenenalter erreicht. Bis zum Abfallen des Wertes im höheren Lebensalter, meist nach Eintritt der Menopause, zeigt die Knochendichte einen plateauartigen Verlauf (Abbildung 4). Beim Merino-Landschaf ist der physiologische Verlauf des Knochenmetabolismus noch weitgehend unerforscht. Durch Kenntnis der PBM und deren Verlauf lässt sich Einfluss auf die Qualität von Studien nehmen, bei denen die Knochendichte der Tiere eine wichtige Rolle spielt. Werden beispielsweise Studien am osteoporoseinduzierten Schafmodell durchgeführt, sollten die in der Studie eingesetzten Tiere vor Beginn der Versuche ihre PBM erreicht haben, um den pathophysiologischen Verlauf der Osteoporoseerkrankung des Menschen möglichst realistisch abbilden zu können.

Die in dieser Studie gemessenen BMD- und BMC-Werte des Merino-Landschafes wurden daher bezüglich ihrer Abhängigkeit zum Alter der Tiere untersucht, um den Zeitpunkt des Erreichens der PBM und deren weiteren Verlauf bestimmen zu können.

4.5.1 Regressionsmodelle zum altersabhängigen Verlauf der Knochendichteparameter

Mit Hilfe von Regressionsmodellen wurde der altersabhängige Verlauf von BMD und BMC betrachtet. Für die BMD zeigte sich im linearen Regressionsmodell eine signifikante stetige Zunahme in ROI 7, *obere Lendenwirbelsäule* ($p=0,043$). Für die BMC fanden sich signifikante Steigungen in den linearen Regressionsmodellen der Regionen 1 (*Ganzkörper*), 7 (*obere LWS*) und 8 (*linker Femurkopf*). In allen Regionen fand sich eine breite Streuung der Werte. Bei der BMD lag die größte Streuung der Werte in ROI 1 (*Ganzkörper*) [$R^2=0,019$] und die geringste Streuung in ROI 7 (*obere LWS*) [$R^2=0,069$]. Die Werte des BMC zeigten die breiteste Streuung in ROI 9 (*rechter Femurkopf*) [$R^2=0,029$] und die geringste Streuung in ROI 7 (*obere LWS*) [$R^2=0,14$] (Tabelle 12).

| Merkmal | Lineares Modell | | Quadratisches Modell | | | Nichtparametrische Regression |
|-----------|-----------------------------|----------------|-------------------------|-------------------------|----------------|-------------------------------|
| | Signifikanz Steigung p-Wert | R ² | Signifikanz b1 (p-Wert) | Signifikanz b2 (p-Wert) | R ² | R ² |
| BMD ROI 1 | 0,14 (n.s.) | 0,019 | 0,83 (n.s.) | 0,63 (n.s.) | 0,021 | 0,028 |
| BMC ROI 1 | 0,0027 | 0,076 | 0,081 (n.s.) | 0,21 (n.s.) | 0,089 | 0,0997 |
| BMD ROI 7 | 0,0043 | 0,069 | 0,48 (n.s.) | 0,84 (n.s.) | 0,0696 | 0,084 |
| BMC ROI 7 | 0,000032 | 0,14 | 0,86 (n.s.) | 0,56 (n.s.) | 0,14 | 0,16 |
| BMD ROI 8 | 0,71 (n.s.) | 0,0012 | 0,12 (n.s.) | 0,13 (n.s.) | 0,022 | 0,055 |
| BMC ROI 8 | 0,017 | 0,049 | 0,06 (n.s.) | 0,14 (n.s.) | 0,068 | 0,085 |
| BMD ROI 9 | 0,13 (n.s.) | 0,02 | 0,91 (n.s.) | 0,88 (n.s.) | 0,021 | 0,041 |
| BMC ROI 9 | 0,068 (n.s.) | 0,029 | 0,25 (n.s.) | 0,4 (n.s.) | 0,035 | 0,046 |

Tabelle 12: Übersicht der Regressionsmodelle für die Beziehung zwischen Alter und BMD bzw. BMC in den verschiedenen ROIs. Betrachtet wurden lineare, quadratische und nicht-parametrische Regression. Die lineare Regressionsgerade zeigt für die BMD in ROI 7 signifikante Steigungswerte. Für die BMC findet sich dies in ROI 1, ROI 7 und ROI 8. Für die quadratische Regression finden sich keine signifikanten Werte. Das Bestimmtheitsmaß R² deutet auf breitgestreute Werte in allen Regionen hin. Signifikanzniveau: {p≤0,05}.

Im quadratischen Regressionsmodell fand sich sowohl für die BMD als auch für den BMC keine Signifikanz in den ermittelten Regressionskurven. Auch hier lag eine breite Streuung der Werte vor. Für die BMD lagen diese zwischen [R²=0,021] in ROI 1 und ROI 9 und [R²=0,0696] in ROI 7. Der BMC erbrachte Bestimmtheitsmaße zwischen [R²=0,035] in ROI 9 und [R²=0,14] in ROI 7.

4.5.2 Exemplarische Betrachtung des Verlaufes von BMD und BMC in ROI 7, obere LWS

In der klinischen Diagnostik der Osteoporose wird besonderes Augenmerk auf die Knochendichte im Bereich der Lendenwirbelsäule gelegt. Hier treten gehäuft osteoporose-assoziierte Frakturen auf. Aufgrund dieser hohen klinischen und praktischen Relevanz in der Humanmedizin wird hier exemplarisch der Verlauf von BMD und BMC des Merino-Landschafes in ROI 7, obere Lendenwirbelsäule, betrachtet (Abbildung 21).

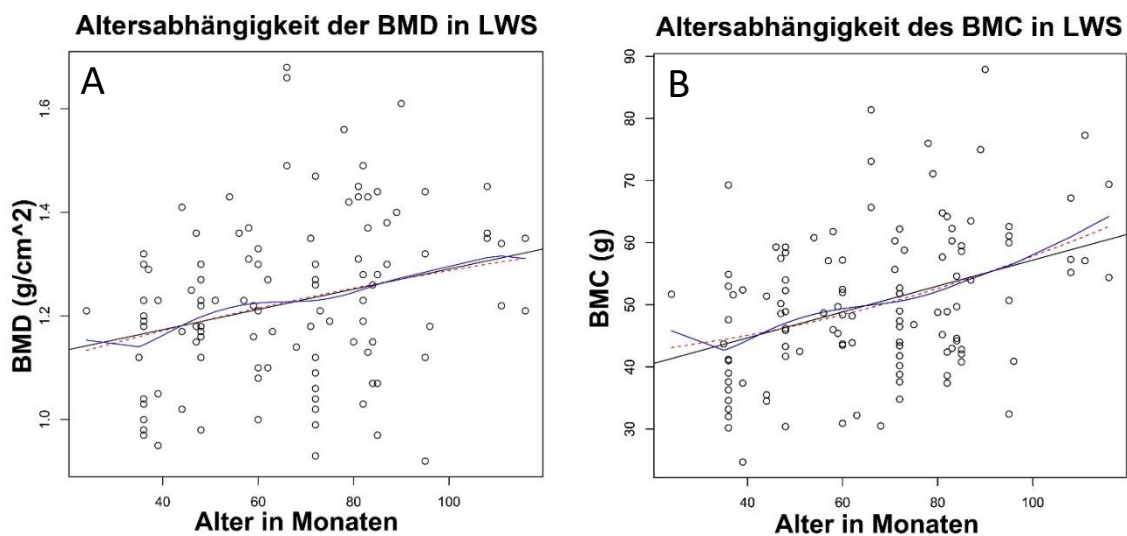


Abbildung 21: Altersabhängiger Verlauf von BMD und BMC in ROI7, obere LWS. Für die BMD (A) konnte eine signifikante Korrelation zwischen zum Alter der Tiere nachgewiesen werden ($p=0,043$). Bei Betrachtung des BMC (B), wurde ebenfalls eine signifikante Korrelation beobachtet ($p\leq 0,001$). Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten erfolgte mit dem Pearson-Verfahren, bei $\{p\leq 0,05\}$. Schwarz: lineare Regressionsgerade, blau: quadratische Regressionskurve, rot: nicht-parametrische Regression.

Bei der altersabhängigen Betrachtung der BMD (Abbildung 21, (A)) fand sich ein stetiger Anstieg der linearen Regressionsgerade mit zunehmendem Lebensalter. Mit dem Pearson-Verfahren konnte eine signifikante Korrelation zwischen BMD und Alter bei einer Signifikanz von $\{p=0,043\}$ und einem Korrelationskoeffizienten von $[\rho=0,2631]$ festgestellt werden. Ab einem Alter von ca. 50 Monaten ist eine Häufung höherer BMD-Werte zu beobachten, die Streuung der Werte oberhalb der linearen Regressionsgerade nimmt bis zum 90. Monat zu, der Maximalwert wird im Alter zwischen 60 und 80 Monaten beobachtet. Ab einem Lebensalter von ca. 90 Monaten findet sich eine breitere

Streuung der BMD-Werte unterhalb der linearen Regressionsgerade, wengleich der durchschnittliche BMD-Wert weiter ansteigend ist.

Bei der Betrachtung des altersabhängigen Verlaufs des BMC (Abbildung 21, (B)) findet sich ebenfalls eine stetige Zunahme des durchschnittlich ermittelten Wertes mit steigendem Alter der Tiere. Im Pearson-Verfahren konnte für die Steigung der linearen Regressionsgerade eine signifikante Korrelation mit $\{p < 0,001\}$ und einem Korrelationskoeffizienten von $[\rho = 0,376]$ nachgewiesen werden. Ab dem 40. Monat nimmt die Streuung der Werte oberhalb der linearen Regressionsgerade zu. Der Maximalwert wird bei 90 Monaten erreicht. Danach ist eine breitere Streuung unterhalb der linearen Regressionsgeraden zu beobachten, während der durchschnittliche BMC-Wert, ähnlich der BMD, weiter ansteigt.

Für den Verlauf der quadratischen Regressionskurven von BMD und BMC konnten keine signifikanten Eigenschaften nachgewiesen werden.

5 Diskussion

5.1 Alternativmethoden zum Tiermodell

Tierversuche stellen seit geraumer Zeit einen viel diskutierten und kritisch beäugten Teil wissenschaftlicher Forschung dar. Bereits im Jahr 1959 wurde von Russell und Burch die Notwendigkeit einer kritischen Auseinandersetzung mit der Thematik auch von Seiten der Wissenschaft angeregt (Russell und Burch 1959). Das von ihnen beschriebene Prinzip der *3R (Reduction, Refinement und Replacement)* stellt bis heute eine wichtige Grundlage der Forschung zu alternativen Verfahren und zum Studiendesign von Tierversuchen dar (Hooijmans et al. 2010).

Es existiert bereits eine ganze Reihe vielversprechender Verfahren, durch die, im Sinne der 3R, ein Ersatz oder eine Reduktion der *in vivo* Testung am Tier ermöglicht wird (Knight 2008). Neben den *in vitro*-Verfahren, wie den Zellkulturen und deren Weiterentwicklung, dem *organ-* oder *body-on-a-chip*, seien noch beispielhaft computergestützte Simulationsprogramme, also *in silico*-Verfahren, genannt (Exner 2016).

In allen Verfahren wurden in den vergangenen Jahren große Fortschritte erzielt, so konnte im Gebiet des *Tissue-Engineerings* durch die Weiterentwicklung von 2D- auf 3D-Zellkulturen die Komplexität eines lebenden Organismus realitätsnaher nachgebildet werden (Nam et al. 2015; Skardal et al. 2016). Ferner wurden bereits Zellkulturen einzelner Organe, wie Leber und Lunge, als sogenannte *Organ-on-a-chip-Modelle* etabliert und stetig weiterentwickelt (Skardal et al. 2016; Kang et al. 2015). Hier lassen sich bereits in präklinischen Studien Aussagen über die Toxizität neuer Wirkstoffe bezogen auf einzelne Organe treffen (Skardal et al. 2016). Um ein Tiermodell vollständig ersetzen zu können, ist es jedoch notwendig, den vollständigen Organismus in einem *in vitro*-Modell abzubilden. Mit dem *Body-on-a-Chip* wird bereits an einer sehr vielversprechenden Lösung gearbeitet (Marx et al. 2012; Abbildung 22). Dieses Verfahren bedarf jedoch noch einiger Forschung und Weiterentwicklung (Hartung 2007; Marx et al. 2012). So lassen sich z.B. die komplexen und teilweise noch unverstandenen Abläufe in einem lebendigen Organismus noch nicht in einem der oben genannten Verfahren

abbilden (Murthy 2007). Es wird daher in den nächsten Jahren nicht zu einem gänzlichen *Replacement* von Tierversuchen durch *in vitro*-Verfahren kommen. In der Zwischenzeit können durch die Standardisierung von Tiermodellen jedoch Verbesserungen in *Refinement und Reduction* erreicht werden.

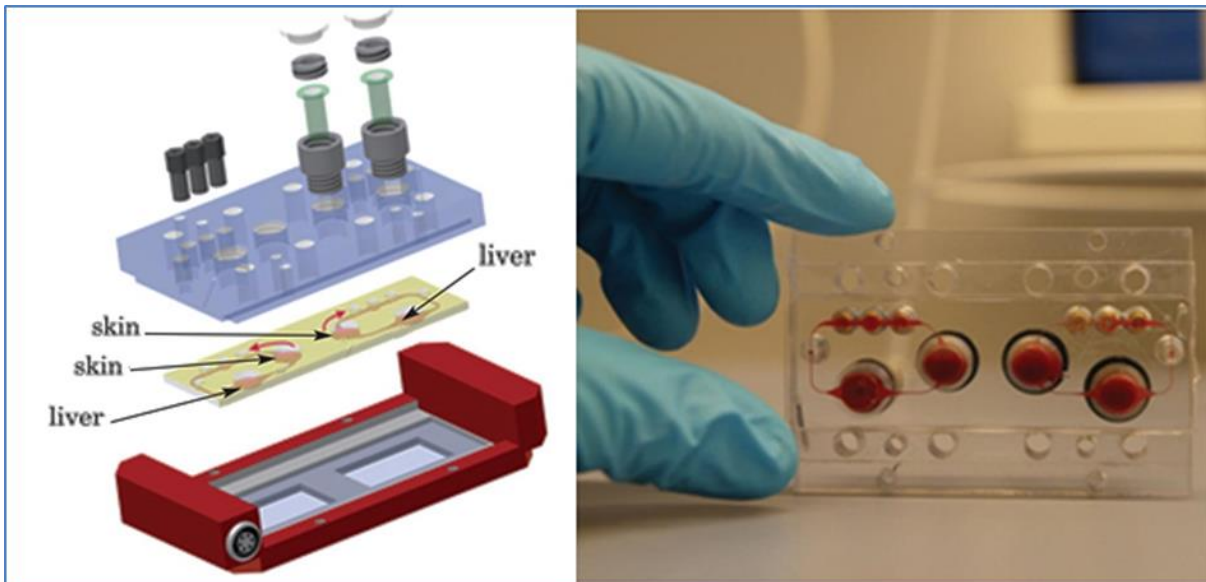


Abbildung 22: Modell eines Multi-Organ-Chips. Hier wurden Haut- und Leberzellen auf einen Chip gebracht und miteinander über einen Blutkreislauf gekoppelt. Dadurch kann der Einfluss einer Noxe auf Haut- und Leberzellen überprüft werden. Aus: Marx et al. 2012, S. 244

Auch bei den *in silico*-Verfahren lässt sich parallel zur Entwicklung immer leistungsfähigerer Computer ein deutlicher Progress beobachten. Im Rahmen des *Human Brain Projects* (Markram 2012) kam es bereits zu großen Fortschritten in der computergestützten Simulation eines Mäusehirns (Melozzi et al. 2017). Dies könnte in absehbarer Zeit zu einem geringeren Gebrauch von Mausmodellen in der neurobiologischen Forschung führen. Mit Hilfe eines virtuellen Knochenmodells ließe sich analog dazu etwa künftig der Einfluss neuer Medikamente auf osteoporotischen Knochen simulieren, sodass auf Tiermodelle verzichtet werden könnte. Die *in silico*-Verfahren können in Zukunft besonders im Bereich der Grundlagenforschung zu einer spürbaren Reduktion von Tiermodellen führen. Im Bereich der Erforschung neuer Implantatmaterialien in der Orthopädie und Unfallchirurgie findet sich jedoch auch hier kein adäquater Ersatz für die *in-vivo*-Testung am Großtiermodell. Nur hier kann das Material in Originalgröße eingebracht, sein Verhalten im komplexen

Knochenmetabolismus beobachtet und die biomechanischen Eigenschaften überprüft werden. Auch kann die Osteoporoseforschung aufgrund der weiterhin nur teilweise verstandenen pathologischen Mechanismen der Erkrankung nicht auf die in-vivo-Testung verzichten.

Alle genannten Alternativmethoden können in Zukunft zu einer deutlichen Verminderung der Anzahl der Versuchstiere führen und stellen ohne jeden Zweifel wichtige und vielversprechende Perspektiven im Sinne der 3R dar. Aktuell und auch in naher Zukunft können diese Verfahren jedoch das Tiermodell nicht vollständig ersetzen. Solange kein vollständiges *Replacement* erreicht werden kann, bedarf es der ständigen Optimierung der bestehenden Tiermodelle. Hierbei nimmt die Standardisierung der Modelle einen hohen Stellenwert ein. In der Humanmedizin stellen Referenzbereiche eine wichtige Säule klinischer Diagnostik und Therapie dar. Das untersuchte Individuum wird in Relation zu einem gesunden Kollektiv betrachtet. Zur besseren Übertragbarkeit eines Tiermodells auf den Menschen sollten daher auch die Eigenschaften der einzelnen Tiere innerhalb der Tiermodelle auf das gesunde Kollektiv der entsprechenden Spezies bezogen werden. In der Unfallchirurgie und Orthopädie stellt die Knochendichte eine wichtige diagnostische Grundlage zur Interpretation des Knochenstatus dar, auf dessen Basis beispielsweise die Diagnose *Osteoporose* gestellt werden kann. Mit Hilfe der Daten dieser Studie soll ein Schritt hin zur Standardisierung der präklinischen Studien am Schafmodell zur Knochendichte gegangen werden.

5.2 Aktuelle Situation in der wissenschaftlichen Forschung

5.2.1 Anforderungen an Studien mit Tiermodellen

Zur präklinischen Testung neuer Therapien sind Tierversuche weiterhin ein wichtiger und nicht wegzudenkender Teil wissenschaftlichen Arbeitens. Für die Genehmigung der Durchführung der Versuche müssen hohe Hürden überwunden werden. Neben der *Unerlässlichkeit* der Durchführung am Tiermodell muss auch nachgewiesen werden, dass keine sinnvolle Alternativmethode hierzu existiert. Zudem dürfen die Versuche nur von sachkundigem Personal durchgeführt werden (Exner 2016).

In nationalen und internationalen Zentren, wie in Deutschland der ZEBET (*Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch*) am Deutschen Zentrum zum Schutz von Versuchstieren (Bf3R), werden neue 3R-Verfahren auch von öffentlicher Seite gefördert und validiert (Spielmann et al. 2008). Hier findet sich auch die AnimAlt-ZEBET-Datenbank, in der sich wissenschaftliche Bewertungen anerkannter 3R-Methoden finden¹.

Beim Einsatz eines Tiermodelles kommt es in besonderem Maße auf sorgfältige und sinnvolle Auswahl und Planung des Studiendesigns an. Dies beinhaltet neben der Wahl der genutzten Tierart auch weitere Eigenschaften, wie Geschlecht, Alter und Gewicht der Tiere. Von besonderer Wichtigkeit ist zudem die Größe der Versuchs- und Kontrollgruppen sowie die randomisierte Einteilung der einzelnen Tiere in die jeweiligen Gruppen (Kilkenny et al. 2009). Mit den ARRIVE-Guidelines (Kilkenny et al. 2010) existiert zudem eine Leitlinie zur standardisierten Dokumentation und Veröffentlichung von Ergebnissen aus Tiermodellen. In internationalen Fachzeitschriften, in denen ausschließlich Literatur zu alternativen Methoden zum Tierversuch veröffentlicht wird, werden in regelmäßigen Abständen neue Forschungsergebnisse rund um das Thema *Alternativen zum Tierversuch* veröffentlicht. Als Beispiele seien hier ALTEX² (*Alternatives to Animal Experimentation, Schweiz*), ATLA³ (*Alternatives to Laboratory Animals, Großbritannien*) und AATEX⁴ (*Alternatives to Animal Testing and Experimentation, Japan*) genannt.

In qualitativ hochwertigen Veröffentlichungen, sowie dem Austausch von Daten und Ergebnissen liegt ein weiterer Schritt hin zur Reduzierung von Tierversuchen. Durch Kooperationen zwischen forschenden Unternehmen und Institutionen lassen sich etwa über den Austausch von Daten, z. B. aus der Grundlagenforschung zur Toxizität von

¹ online verfügbar unter: <https://apps.bfr.bund.de/animalt-zebet/index.cfm>; zuletzt geprüft am 26.08.2020

² online verfügbar unter: <https://www.altex.org/index.php/altex>; zuletzt geprüft am 26.08.2020

³ online verfügbar unter: <http://www.atla.org.uk/>; zuletzt geprüft am 26.08.2020

⁴ online verfügbar unter: <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/aatex>; zuletzt geprüft am 26.08.2020

Chemikalien, unnötige Tierversuche vermeiden (Knight 2008). So verpflichtete beispielsweise die *Europäische Chemikalienagentur (ECHA)* alle Unternehmen, die neue Chemikalien in der Europäischen Union zu registrieren beabsichtigen, zur engen Zusammenarbeit untereinander und dem Austausch von Daten, um unnötige Forschung und auch Tierversuche zu vermeiden. Ferner wird die Durchführung von Tierversuchen auch hier nur dann empfohlen, wenn kein sinnvolles Alternativverfahren existiert (ECHA 2016).

Die Daten dieser Arbeit stammen aus drei verschiedenen Projekten eines Sonderforschungsbereiches. Es konnten die Knochendichtescans aus den drei Teilbereichen *T1*, *T2* und *HA-Schraube* ausgewertet werden. Es handelte sich dabei um Studien zur Osteoporose am Schafsmodell, sowie zur Testung neuer Biomaterialien in der Kreuzbandchirurgie. Durch Nutzung der Daten der DXA-Scans konnten so auch aus den bereits abgeschlossenen Tiermodellen *T1* und *T2* noch Informationen gewonnen werden. Der Einsatz eines eigenen Tiermodelles für die Fragestellung dieser Arbeit war somit nicht notwendig. Es wurden 682 BMD-Messungen von 74 Tieren ausgewertet. Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des Projektes *HA-Schraube*, in dem 28 Tiere gescannt wurden. Ohne die Nutzung der bereits vorhandenen Daten aus den anderen beiden Projekten wären der Umfang und die Aussagekraft der gewonnenen Ergebnisse deutlich geringer. Die Daten werden zudem als *open-source*-Dokumente unter <http://DXAdb.glycosciences.de/> öffentlich zugänglich gemacht. Ferner besteht mit der Zentralen Forschungseinrichtung in Frankfurt am Main, der in Hessen führenden Einrichtung für Versuche am Merino-Landschaf, die Übereinkunft, dass alle dort narkotisierten Schafe vor dem jeweiligen operativen Eingriff einem DXA-Scan unterzogen werden und die Daten an unsere Datenbank übermittelt werden. Die Knochendichtemessung stellt dabei für die bereits narkotisierten Tiere bei sehr geringer Strahlenbelastung eine vertretbare Zusatzbelastung dar. Durch Nutzung desselben DXA-Gerätes wie in dieser Studie lassen sich die Daten problemlos in die bestehende Datenbank integrieren. Zudem ist der Aufruf an alle am Merino-Landschaf Forschenden ergangen, ihre Daten zur Knochendichtemessung mit uns zu teilen. Dies kann über die E-Mail-Adresse DXA@chiru.med.uni-giessen.de getan werden. Über diese verschiedenen Wege soll der Datenpool in den nächsten Jahren erweitert und die Qualität und Übertragbarkeit der Ergebnisse weiter verbessert werden.

5.2.2 Tierversuche in Orthopädie und Unfallchirurgie

In der Orthopädie und Unfallchirurgie stellt die Osteoporoseforschung ein wichtiges Einsatzgebiet von Tiermodellen dar (Simon Turner 2001; Burge et al. 2007; Karlsson et al. 2005). Bei der Osteoporose handelt sich um eine Erkrankung multifaktorieller Genese, deren genaue Pathogenese bis heute nicht ins Detail verstanden ist und weiterer Grundlagenforschung bedarf (Manolagas 2010). Zum aktuellen Zeitpunkt existiert noch keine Alternativmethode zum Tierversuch, in der die vielen bekannten und auch unbekanntenen Faktoren des Knochenmetabolismus und damit auch der Osteoporoseerkrankung, simuliert werden könnten. Beispielhaft sei hier der nachgewiesene Zusammenhang eines erhöhten Risikos osteoporose-assoziiierter Frakturen bei zusätzlich bestehender Diabeteserkrankung genannt (Hamann et al. 2012). Ein Tiermodell ist daher zum aktuellen Zeitpunkt zur Erforschung der Erkrankung unerlässlich (Simon Turner 2001). Die US-amerikanische *Food and Drug Administration (FDA)* schlägt in ihren Leitlinien zur präklinischen Testung neuer Therapien der Osteoporose die Durchführung eines Klein- und, im weiteren Verlauf, auch eines Großtiermodells vor (Thompson et al. 1995; Simon Turner 2001). Als Kleintiermodell wird hierbei auf die ovariectomierte Ratte verwiesen. Zum Großtiermodell gab es im Jahr 1995 keine explizite Empfehlung der Autoren.

Das Merino-Landschaf eignet sich aufgrund seiner Knocheneigenschaften, Größe und Gewicht als ebensolches und wird immer häufiger eingesetzt (Newman et al. 1995; Radford et al. 1996; Aerssens et al. 1998; Allen et al. 1998; Pearce, A. I., et al. 2007). Anders als bei Kleintieren, wie Ratten, kann hier jedoch nicht auf ein standardisiertes Modell zurückgegriffen werden. Die Tiere werden in der Regel direkt vom Züchter für die jeweilige Studie gekauft, was zu einer starken Heterogenität innerhalb der meist kleinen Versuchsgruppen führt. Aufgrund fehlender Referenzwerte werden meist die vor den Versuchen erhobenen Werte als Kontrollparameter herangezogen (Zarrinkalam et al. 2009). Diese Daten stellen jedoch keine für die gesamte Art gültigen Referenzwerte dar, da sie lediglich auf Basis kleiner Stichproben erhoben wurden. Daraus resultiert ein direkter Einfluss auf die Interpretation der Ergebnisse (Heiss et al. 2017).

Die Diagnose der Osteoporose erfolgt im klinischen Alltag auf Basis radiologischer Bildgebung bei Verdacht auf Frakturen, sowie der Knochendichtemessung mittels DXA zur Sicherung der Verdachtsdiagnose (Bartl und Bartl 2010). Von besonderer klinischer Relevanz sind dabei die Regionen *obere Lendenwirbelsäule* und die *Femurköpfe*, die auch in der vorliegenden Arbeit detailliert betrachtet wurden. Es flossen für jede dieser Regionen 116 Messergebnisse in die Auswertung ein. Mit dem T-Score existiert ein weltweit angewandtes und standardisiertes Instrument (WHO 1994), welches es erlaubt, den Knochenstatus eines Patienten in Bezug auf eine gesunde Referenzgruppe, also die *peak bone mass (PBM)*, zu betrachten. Liegt der Wert des Patienten um mindestens 2,5 Standardabweichungen unter dem Mittelwert der Referenzgruppe, so ist die Diagnose der Osteoporose zu stellen (Kanis et al. 1994; Kanis 1997). Um die Übertragbarkeit einer präklinischen Studie am Tiermodell auf den am Menschen angewendeten Goldstandard zu gewährleisten, war es Ziel dieser Studie, osteodensitometrische Referenzwerte für das Merino-Landschaf zu bestimmen. Die Daten dieser Studie wurden mit Hilfe des DXA-Verfahrens gewonnen, welches sich schnell und ohne nennenswerte Zusatzbelastung für die Tiere im Vorfeld eines ohnehin geplanten operativen Eingriffes durchführen ließ. Es war keine zusätzliche Narkose der Schafe notwendig, auch hat das Verfahren aufgrund seiner niedrigen Strahlenbelastung (Bartl und Bartl 2010) kaum negative Folgen für die Tiere. Mit Hilfe der vorliegenden Daten und den Daten zukünftiger Studien am Schafmodell kann eine aussagekräftige Datenbank mit Referenzwerten erstellt werden. Die von der *International Society for Clinical Densitometry* empfohlene Referenzgruppe auf deren Basis die Werte des T-Score für alle Knochendichtemessungen weltweit berechnet werden sollten, setzt sich aus den Daten der *NHANES-III-Studie* zusammen, in der die BMD-Werte von 409 weißen Frauen im Alter von 20-29 Jahren ausgewertet werden konnten (Lewiecki et al. 2008; Looker et al. 1997; Hanson 1997). Die in dieser Arbeit gebildete Referenzgruppe konnte aus den Daten von 48 Messungen gebildet werden. Durch die stetige Erweiterung des Datenpools kann in Kürze eine vergleichbar große Datenbank für das Merino-Landschaf erreicht werden. Setzt man die Größen der beiden Referenzgruppen zu der Anzahl der jährlich durchgeführten Knochenscans an Menschen und Schafen in Relation, scheint bereits durch die vorliegenden Daten eine ausreichende große Datenbank für das Merino-Landschaf vorhanden zu sein.

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Alternativmethoden, kann mit Hilfe dieser Daten bereits in naher Zukunft die Anzahl der in Tiermodellen eingesetzten Schafe, je nach Studiendesign, um bis zu 50 % reduziert werden. Bis sich andere Verfahren etablieren, mit denen ein vollständiges *Replacement* erreicht werden könnte, kann so bereits jetzt mit einfachen Mitteln Abhilfe geschaffen werden und eine deutliche *Reduction* erreicht werden. Auch im Sinne des *Refinement* haben grundlegende Daten zum Verhalten der Knochendichte Einfluss auf Design und Ergebnisse von Studien. So kann durch eine gezieltere Auswahl der Versuchstiere, beispielsweise auf Basis des Alters, verhindert werden, dass ungeeignete Tiere in eine Studie einbezogen werden. Dies führt zu einer höheren Aussagekraft und Übertragbarkeit der Ergebnisse und verhindert eventuell notwendige Zusatzstudien. Zudem wird verhindert, dass Tiere dem Stress eines Versuches ausgesetzt werden, ohne dass es durch deren Einsatz im Nachhinein zu einem Erkenntnisgewinn kommt.

Bei der Osteoporose handelt es sich um eine Erkrankung, die in der Regel ältere Menschen betrifft. Es ist daher von großer Wichtigkeit, für ein entsprechendes Tiermodell auf Tiere zurückzugreifen, bei welchen der Reifungsprozess des Skelettes bereits abgeschlossen ist. Anders verhält es sich bei der Ruptur des vorderen Kreuzbandes. Hierbei handelt es sich um eine Verletzung, die ebenso wie die Osteoporoseerkrankung, von hoher sozioökonomischer Bedeutung ist (Rupp und Kohn 2002; Häussler et al. 2007). Im Gegensatz zur Osteoporose sind hier gehäuft junge, sportlich aktive Menschen betroffen, die ihre PBM noch nicht oder gerade erst erreicht haben (Clayton und Court-Brown 2008).

Zur präklinischen Testung neuer Operationstechniken oder Schraubenmaterialien kann auch hier zum aktuellen Zeitpunkt nicht auf Großtiermodelle verzichtet werden. Nur hier kann die Integration neuer Materialien in den Knochen unter mechanischer Belastung adäquat und über einen längeren Zeitraum überprüft werden. Es lässt sich mit Hilfe der gewonnenen Daten ebenfalls Einfluss auf die Altersstruktur einer Population von Versuchstieren nehmen, um im Sinne des *Refinements* Versuche an ungeeigneten Tieren zu verhindern, die den Knochenmetabolismus im jungen Patienten nicht ausreichend abbilden könnten.

Ein weiteres Beispiel für die weiterhin hohe Bedeutung und den noch alternativlosen Einsatz von Tiermodellen in der klinisch angewandten Chirurgie stellt der Einsatz von individuell angepassten Implantaten und Prothesen dar (Abbildung 23). Durch die in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewinnenden 3D-Druck-Verfahren lassen sich an komplexe anatomische Strukturen, beispielsweise nach schweren Traumata oder der operativen Entfernung knöcherner Tumore, angepasste Implantate und Prothesen herstellen (Martelli et al. 2016; Saijo et al. 2009). Zur präklinischen Testung der Stabilität und Bioverträglichkeit, aber auch zur Überprüfung des geeigneten Operationsverfahrens, wird auch hier weiterhin auf Großtiermodelle wie Schafe zurückgegriffen werden müssen (Yang et al. 2014).

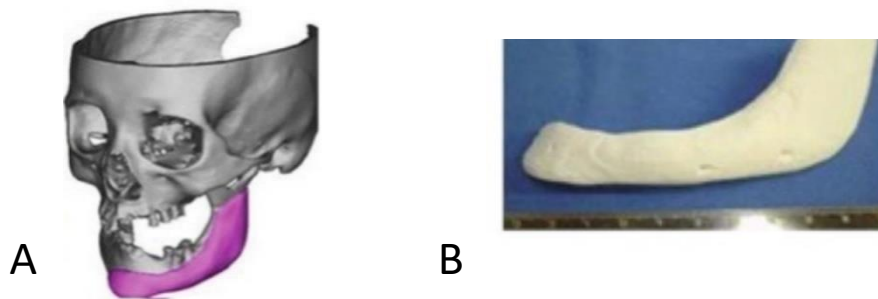


Abbildung 23: Beispiel für ein in der maxillofazialen Chirurgie angewandtes und durch 3D-Druck hergestelltes Knochenersatz des Unterkiefers. Nach der Planung mit Hilfe eines dreidimensionalen CT-Scans (A) kann ein passgenauer Knochenersatz mittels 3D-Druck hergestellt werden (B). ©: Saijo et al. 2009, S. 201

5.3 Kontrollgruppen in aktuellen Großtierstudien

Zum aktuellen Zeitpunkt nutzen Studien, in denen ein Großtiermodell eingesetzt wird, zum größten Teil keine unabhängigen Referenzwerte. In der Regel werden zu Beginn der Studie Ausgangswerte bestimmt und/oder eine unbehandelte Kontrollgruppe eingesetzt (Zarrinkalam et al. 2009). Für diese Studie wurden Knochendichtescans von unbehandelten Tieren aus drei Teilprojekten eines Sonderforschungsbereiches ausgewertet. In den Teilprojekten bildeten die Tiere ursprünglich vier Untergruppen. In dieser Studie wurden daher auch die Eigenschaften dieser Gruppen betrachtet. In der

statistischen Analyse fiel auf, dass in jeder der vier untersuchten ROIs signifikante Unterschiede zwischen den Werten der *bone mineral density (BMD)* mehrerer Gruppen nachgewiesen werden konnten (Abbildung 12). Die Gruppen bestanden aus 47 (*T1*), 15 (*T2*) und jeweils 13 Tieren (*HA und Biocomposit*). Bis auf Gruppe *T1* handelte es sich also um kleine Kontrollgruppen, die eine Referenz für alle Merino-Landschafe darstellen sollten. Die signifikanten Unterschiede zwischen den BMD-Werten der Gruppen verdeutlichen, dass es von Nöten ist, eine unabhängige Referenzgruppe zu etablieren, um die Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen verschiedener Studien zur Knochendichte zu verbessern. Die sinnvolle Einordnung der Ergebnisse verschiedener Studien sollte auf einer vergleichbaren Grundlage erfolgen. Mit Hilfe der Daten dieser Studie kann die Basis für unabhängige Referenzwerte zur Knochendichte der Merino-Landschafe gelegt werden. Durch die bereits beschriebene *Open-Source*-Datenbank soll eine rasche Etablierung und eine Vergrößerung des Datenpools erreicht werden. Im Sinne der 3R nach Russel und Burch kann mit Hilfe einer unabhängigen Referenzgruppe in Zukunft auf unbehandelte Kontrollgruppen bei Studien zur Knochendichte des Merino-Landschafes verzichtet sowie die Qualität und Vergleichbarkeit der Studienergebnisse erhöht werden.

5.3.1 Einflussfaktoren auf die BMD

Die BMD ist keine Größe, die isoliert betrachtet werden kann. In früheren Studien konnte etwa ein Zusammenhang zwischen Osteoporose und steigendem Fettanteil im Knochen beobachtet werden (Sekiya et al. 2004; Rosen und Bouxsein 2006). Auch das Alter hat Einfluss auf die Knochendichte der Tiere (Reinwald und Burr 2011).

In den DXA-Scans wurde daher zusätzlich zu BMD und BMC (*bone mineral content*) auch der relative und absolute Fettanteil in der untersuchten ROI gemessen. Auch das im Vorfeld der Messungen ermittelte Gewicht der Tiere und deren Alter flossen in die Auswertung der Daten mit ein. In der statistischen Analyse wurde die Korrelation zwischen der BMD und den weiteren Parametern untersucht. Die Ergebnisse wurden, getrennt nach den vier relevanten ROIs, zunächst für die Gesamtheit aller Tiere und auch für jede der vier Untergruppen isoliert betrachtet.

In der Auswertung der großen Gruppe aus allen Tieren fielen in Bezug auf signifikante Korrelationen zwischen der BMD und den weiteren Parametern deutliche Unterschiede zwischen den vier ROIs auf. Die beiden ROIs *linker* und *rechter Femurkopf* lieferten bei Betrachtung aller Werte jedoch vergleichbare Ergebnisse. Es zeigte sich jeweils eine signifikante Korrelation zwischen BMD und BMC. Vergleich man jedoch die Ergebnisse der einzelnen ROIs aller Gruppen mit den Ergebnissen der ROIs in den Untergruppen, so zeigten sich z.T. deutliche Unterschiede in den signifikanten Korrelationen. Lediglich in Gruppe *T1* konnten signifikante Korrelationen zwischen denselben Werten, wie in der sich aus allen Messungen zusammensetzenden Gruppe nachgewiesen werden.

Auch hier zeigte sich, dass die kleinen Kontrollgruppen aufgrund der großen interindividuellen Unterschiede zwischen den Tieren keine vergleichbaren Ergebnisse liefern können. Die Gruppe *T1*, die vergleichbare Ergebnisse zu der Gesamtheit aller Messungen lieferte, war mit 47 Messungen die mit Abstand größte der vier Untergruppen. Dies unterstreicht erneut, dass es von Nöten ist, auf große Referenzgruppen zurückzugreifen, um die Realität des komplexen Knochenmetabolismus mit all seinen Einflussgrößen korrekt abzubilden. Mit den Daten der hier etablierten, öffentlich zugänglichen Datenbank kann sich jede zukünftige Studie auf eine breite Referenzgruppe stützen, ohne selbst Tiere für die Bildung einer eigenen ausreichend großen Referenzgruppe einsetzen zu müssen.

5.4 Die unabhängige Referenzgruppe

Ziel eines Tiermodelles sollte es sein, die Gegebenheiten im menschlichen Organismus möglichst detailgetreu zu simulieren und dadurch die Übertragbarkeit neuer Therapien in den klinischen Alltag der Humanmedizin zu ermöglichen. Die Knochendichte eines einzelnen untersuchten Menschen wird hier immer im Kontext zu einem jungen, gesunden Kollektiv gesehen (WHO 1994). Zur besseren Übertragbarkeit der Ergebnisse sollte daher in der präklinischen Testung ähnlich vorgegangen werden und eine unabhängige Referenzgruppe bestehend aus den Daten junger, gesunder Tiere gebildet werden.

Die Knochenreife setzt bei Merino-Landschafen zwischen dem dritten und vierten Lebensjahr ein (Reinwald und Burr 2011). Analog zur Referenzgruppe für den T-Score entschlossen wir uns, die Tiere in unsere unabhängige Referenzgruppe aufzunehmen, die kurz nach der Erlangung der Skelettreife standen. Wir schlossen daher alle Schafe ein, deren Alter zwischen 48 und 72 Monaten lag. Für jede der vier ROIs fanden sich 48 Knochendichtescans an Tieren im entsprechenden Alter, die in die Analyse einfließen konnten.

Um aufzuzeigen, welchen Einfluss eine unabhängige Referenzgruppe auf die Ergebnisse von präklinischen Studien hat, wurde ein Vergleich zu den abhängigen Prätest-Referenzgruppen der drei Teilprojekte des Sonderforschungsbereichs gezogen.

In dem Projekt *Kreuzband (HA-Schraube)* wurde zum Beginn des Versuches die Knochendichte von 28 Merino-Landschafen (abhängige Referenzgruppe) bestimmt. 10 Monate später wurden die Messungen an den 26 verbliebenen Tieren, die in zwei Untergruppen (*HA und Biocomposit*) aufgeteilt wurden, wiederholt. Die beiden Referenzgruppen wurden auf signifikante Unterschiede zu den BMD-Werten der beiden Untergruppen zum Zeitpunkt 10 Monate untersucht (Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 20). Nur in einer der vier Regionen (ROI 9, Abbildung 20) lieferten beide Referenzgruppen ein vergleichbares Ergebnis mit signifikanten Unterschieden zu den Werten der beiden Untergruppen zum späteren Messzeitpunkt. In den anderen drei Regionen ist durch Anwendung der unabhängigen Referenzgruppe ein signifikanter Einfluss auf die Interpretation der Knochendichte zu beobachten.

In der Gruppe *Osteoporose*, die sich aus den Daten der DXA-Scans der Teilprojekte *T1* und *T2* zusammensetzt, wurden Knochendichtemessungen zu Beginn des Versuches, sowie zum Zeitpunkt 3M und 8M durchgeführt. Die beiden Referenzgruppen lieferten hier in allen vier Regionen vergleichbare Ergebnisse. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zu den BMD-Werten nach drei und acht Monaten (Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 20). Im Gegensatz zur Referenzgruppe des Teilprojektes *Kreuzband* konnte hier mit den Daten von 46 Messungen auf eine deutlich größere Referenzgruppe zurückgegriffen werden.

Die Gegenüberstellung der beiden Referenzgruppen macht erneut deutlich, dass eine unabhängige Referenzgruppe Einfluss auf die Interpretation von Studienergebnissen hat.

In der Gruppe *Osteoporose*, in der die Daten der beiden Teilprojekte *T1* und *T2* gemeinsam betrachtet wurden, zeigte sich aufgrund der Größe der abhängigen Referenzgruppe kein signifikanter Unterschied zur unabhängigen Gruppe. Um vergleichbare Ergebnisse in Studien zu erreichen, bedarf es daher einer ausreichend großen Referenzgruppe. Kleine Gruppen bilden die Normwerte einer gesamten Tierart nur unzureichend ab. Im Sinne der 3R kann der Einsatz großer, abhängiger Referenzgruppen in Großtierstudien jedoch keine praktikable Alternative sein. Die mit den Daten dieser Studie initiierte und ständig erweiterbare Datenbank kann dagegen sogar zu einer Reduktion der für Tiermodelle eingesetzten Schafe sorgen und, bei flächendeckender Nutzung, zu belastbaren und besser miteinander vergleichbaren Ergebnissen der Studien verschiedener Forschungsgruppen führen.

5.5 Der Einfluss des Alters auf die Knochendichteparameter

Die *peak bone mass (PBM)* wird beim Menschen mit Abschluss der Skelettreifung erlangt. Dies ist in der Regel im jungen Erwachsenenalter der Fall, weshalb die unabhängige Referenzgruppe zur Berechnung des T-Scores aus den Daten 20 bis 29-jähriger Frauen gebildet wurde. In der Literatur wird für das Erreichen der Skelettreife beim Schaf ein Alter von drei bis vier Jahren angegeben. Bei der Auswertung unserer Daten konnte in der Tat ein Anstieg der Knochendichte um das vierte Lebensjahr herum beobachtet werden. Anders als beim Menschen verläuft die Knochendichte nach diesem ersten Peak nicht für mehrere Jahre auf einem Plateau, sondern nimmt mit zunehmendem Lebensalter stetig zu. Um das siebte Lebensjahr herum lässt sich ein weiterer Peak der Knochendichte ausmachen, nach dessen Erreichen sich der Beginn einer Plateauphase andeutet. Mit Hilfe der vorliegenden Daten lässt sich dies jedoch nicht zweifelsfrei nachweisen, da keine Informationen über die Knochendichte jenseits des zehnten Lebensjahres vorliegen. Die vorhandenen Daten lassen jedoch einen Rückgang der stetigen Zunahme der Knochendichte erahnen.

Um eine genauere Aussage über den altersabhängigen Verlauf der Knochendichte beim Merino-Landschaf treffen zu können, wäre eine Studie von Nöten, die sich hauptsächlich mit der Knochendichte von Tieren im Alter von mehr als zehn Jahren befasst. Schafe

können durchaus ein Alter von 19-20 Jahren erreichen (Bérubé et al. 1999), das höchste dokumentierte Alter eines Merino-Schafes liegt gar bei 23 Jahren (Hans 2009). Die Bildung einer Versuchsgruppe aus Tieren hohen Alters scheint jedoch kaum realisierbar zu sein, da bei der Zusammenstellung der Gruppen auf Tiere aus kommerzieller Züchtung zurückgegriffen werden muss. Hier werden die Tiere hauptsächlich in der Milch-, Fleisch- und Wollproduktion eingesetzt. Aufgrund abnehmender Produktivität mit steigendem Alter finden sich hier aus wirtschaftlichen Gründen kaum Tiere, die älter als 10 Jahre sind (Brown et al. 1966). Die Durchführung einer solchen Studie zum weiteren altersabhängigen Verlauf der Knochendichte scheint daher aktuell nur schwer umsetzbar zu sein.

5.6 Einfluss auf das Design künftiger Studien

Das Merino-Landschaf wird in der Orthopädie und der Unfallchirurgie als häufiges Tiermodell in der Osteoporoseforschung sowie zur Testung neuer Materialien in der Versorgung von akuten Traumata, wie zum Beispiel dem Kreuzbandriss eingesetzt.

Die Osteoporose stellt dabei in der Regel eine Erkrankung des hohen Lebensalters dar (Felsenberg et al. 2002), die Jahrzehnte nach Erlangung der Skelettreife der Patienten auftritt. Ein für diese Erkrankung geeignetes Tiermodell sollte daher ebenso bereits seine Skelettreife erreicht haben, um eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zu ermöglichen. Die Daten dieser Studie zum altersabhängigen Verlauf lassen die Vermutung zu, dass die Merino-Landschafe um ihr siebtes Lebensjahr herum eine Plateauphase der Knochendichte erreichen. Zur effektiveren Nutzung der Tiere und der Vermeidung unnötiger Versuche an ungeeigneten Tieren sollte daher in künftigen Studien zur Osteoporose am Merino-Landschaf auf Tiere, deren Alter mindestens sieben Jahre beträgt, zurückgegriffen werden.

Von akuten Traumata wie dem Kreuzbandriss sind, im Gegensatz zur Osteoporose, eher junge, sportlich aktive Menschen betroffen (Majewski et al. 2006; 2010). Die betroffenen Patienten haben also ihre PBM noch nicht oder gerade erst erreicht. Bei den untersuchten Schafen findet sich nach dem vierten Lebensjahr ein erster Peak im Verlauf der BMD. Es erscheint daher sinnvoll, zur Simulation des jungen Organismus und

Knochenmetabolismus, Tiere in diesem Alter als Tiermodell für die Versorgung traumatologischer Verletzungen heranzuziehen.

Neben der deutlichen Reduktion der Anzahl der Versuchstiere durch den Einsatz der in dieser Studie bestimmten unabhängigen Referenzgruppe kann durch Berücksichtigung des Alters der Tiere bei der Planung eines Tiermodelles weiteres *Refinement* erreicht werden. So können im Sinne der 3R nach Russell und Burch zeitnah weitere Schritte hin zur effektiveren und sinnvolleren Nutzung der Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung gegangen werden.

6 Ausblick

Mit der durch die Daten dieser Studie entstandenen, öffentlich zugänglichen Datenbank ist ein erster wichtiger Schritt hin zur Standardisierung orthopädischer und traumatologischer Großtiermodelle am Merino-Landschaf vollzogen worden. Neben den hier untersuchten vier ROIs lassen sich durch Veröffentlichung der Rohdaten dieser Studie Referenzwerte für jede Knochenregion der Tiere bestimmen. Schafe werden beispielsweise häufig in der neurochirurgischen präklinischen Forschung als Modell der menschlichen Halswirbelsäule eingesetzt (Long et al. 2018). Unabhängige Referenzwerte der Knochendichte im HWS-Bereich ließen sich über unsere Rohdaten schnell und unkompliziert erheben.

Für diese Studie wurden ausnahmslos weibliche Merino-Landschafe untersucht, in künftigen Studien sollte auch der Fokus auf die Knochendichte am männlichen Tier gelegt werden, um auch hier eine vergleichbare Datenbank mit Referenzwerten zu etablieren.

Im Bereich der Osteoporoseforschung sind zudem nicht nur die Knochendichtedaten gesunder Tiere von großem Wert. Durch das Anlegen einer Datenbank der DXA-Scans der verschiedenen angewendeten Osteoporoseinduktionsmodellen am Merino-Landschaf kann ein Überblick über die verschiedenen Verfahren gewonnen werden. Dies kann die Planung entsprechender Tiermodelle deutlich vereinfachen, mögliche Fehlerquellen reduzieren und somit zur effektiveren Nutzung der Tiermodelle führen.

Zur weiteren Verbesserung der Studiendesigns und Reduktion der in einem Modell eingesetzten Tiere sollte weiter an der Etablierung von Referenzwerten gearbeitet werden. Neben der Knochendichte besteht hier in der Orthopädie und Unfallchirurgie großes Potenzial in der biomechanischen Forschung. Durch Austausch und von Daten verschiedener Arbeitsgruppen sowie der Erstellung einer *open-access*-Datenbank ließen sich auch in diesem Gebiet der Forschung die Anzahl der Tiermodelle reduzieren und durch die Vielfalt an Daten die Weiterentwicklung von *in vitro*- und *in silico*-Simulationsmodellen vorantreiben. Ähnliches kann auch durch die Veröffentlichung histologischer Daten erreicht werden.

Das Potenzial der unabhängigen Referenzwerte durch *open-access*-Datenbanken lässt sich auf alle Tierarten und jeden Fachbereich, in welchem am Tiermodell geforscht wird, übertragen. So kann es gelingen, bereits in kurzer Zeit eine spürbare Reduktion der eingesetzten Tiere zu erreichen.

7 Zusammenfassung

Obwohl Tierversuche unter kritischer Beobachtung der Gesellschaft stehen, stellen sie weiterhin einen wichtigen und unverzichtbaren Bestandteil wissenschaftlicher Forschung dar. Bereits im Jahr 1959 wurden von Russell und Burch die 3R, bestehend aus *Reduction*, *Refinement* und *Replacement*, eingeführt. Diese stellen bis heute eine wichtige Grundlage wissenschaftlicher Forschung zu alternativen Verfahren zum Tierversuch dar.

Das Merino-Landschaf hat in der orthopädischen und traumatologischen Forschung in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Sowohl in der Osteoporoseforschung, als auch in der Erprobung neuer Materialien für die chirurgische Versorgung von Kreuzbandrupturen spielen sie als Großtiermodell eine bedeutende Rolle. Die Tiere müssen hierfür, anders als viele Kleintiere, aus kommerzieller Züchtung erworben werden. Dies kann zu einer starken Heterogenität innerhalb der meist kleinen Versuchsgruppen führen. Bisher wurden in Studien zur Knochendichte der Schafe keine unabhängigen Referenzgruppen eingesetzt, sondern die Ergebnisse der Studien mit den Prätest-Messungen der Tiere oder den Daten einer Kontrollgruppe verglichen.

Im Sinne der 3R war es Ziel dieser Studie, Referenzwerte für die Knochendichte des Merino-Landschafes zu etablieren, auf deren Basis sich, analog zum T-Score in der Humanmedizin, eine belastbare Einordnung eines einzelnen Messwertes auf die gesamte Spezies treffen lässt. Hierfür wurden die Knochendichteparameter aus 116 DXA-Messungen an 74 Tieren aus drei verschiedenen Studien ausgewertet. Besonderes Augenmerk wurde auf die Regionen *Ganzkörper*, *obere Lendenwirbelsäule* sowie *linker* und *rechter Femurkopf* gelegt. Diese sind allesamt für die Osteoporosediagnostik im klinischen Alltag von Bedeutung. Die Diagnose der Osteoporose wird hier mit Hilfe des T-Scores gestellt. Hier wird die Abweichung des individuellen Messergebnisses von einer unabhängigen Referenzgruppe bestimmt. Je nach Abweichung des Wertes kann die Diagnose *Osteoporose* gestellt werden

In Anlehnung an die Referenzgruppe des T-Scores wurde eine unabhängige Referenzgruppe aus 48 Messungen an Tieren, die sich im Alter zwischen vier und sechs Jahren befanden, gebildet. In der aus den Daten der Studie *HA-Schraube* bestehenden Gruppe *Kreuzband* ließen sich signifikante Unterschiede zwischen der unabhängigen Referenzgruppe und der kleineren Prätest-Kontrollgruppe (n=28) der Studie nachweisen.

Bei der aus den Daten der Studien *T1* und *T2* bestehenden Gruppe *Osteoporose* ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der unabhängigen und der ähnlich großen (n=46) abhängigen Referenzgruppe finden.

Das Alter stellt einen der wichtigsten Einflussfaktoren auf die Erlangung der Skelettreife dar. Beim Menschen wird die *peak bone mass (PBM)* zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr erreicht und fällt mit dem Erreichen der Menopause nach einer Plateauphase wieder ab. Analog dazu sollte in dieser Studie der altersabhängige Verlauf der *bone mineral density* beim Schaf betrachtet werden. Es zeigte sich ein stetiger Anstieg der Knochendichte mit dem Alter der Tiere. Um das vierte Lebensjahr konnte ein erster Peak beobachtet werden, zudem zeichnete sich nach dem siebten Lebensjahr ein weiterer Peak mit beginnender Plateauphase ab.

Der nachgewiesene Verlauf der Knochendichte erlaubt Empfehlungen für das Design künftiger Studien am Merino-Landschaf. So eignen sich zur Simulation junger, sportlich aktiver Menschen, die besonders häufig von Verletzungen, wie dem Riss des vorderen Kreuzbandes betroffen sind, Schafe ab dem vierten Lebensjahr. Tiere dieses Alters spiegeln am ehesten den Knochenmetabolismus junger Menschen wider, die kurz vor dem Erreichen ihrer PBM stehen oder diese gerade erreicht haben. Bei der Zusammenstellung einer Tiergruppe für ein Osteoporosemodell sollte dagegen auf Tiere ab dem siebten Lebensjahr zurückgegriffen werden. Die Erkrankung betrifft in der Regel Menschen nach Abschluss der Skelettreifung und stellt eine Krankheit des höheren Alters und des körperlich weniger aktiven Menschen dar. Durch gezieltere Auswahl der Versuchstiere lässt sich so ein positiver Einfluss auf die klinische Übertragbarkeit der Studienergebnisse nehmen.

Durch die unabhängige Referenzgruppe kann in künftigen Studien auf den Gebrauch einer Kontrollgruppe verzichtet werden. So lässt sich im Sinne der 3R bereits zeitnah eine Reduktion der benötigten Anzahl an Versuchstieren erreichen. Zum aktuellen Zeitpunkt setzt sich die unabhängige Referenzgruppe aus 48 Knochendichtescans zusammen. Die Daten sind frei zugänglich und werden ständig erweitert, sodass zeitnah eine vergleichbar große Referenzgruppe, zu der für den in der Humanmedizin verwendeten T-Score erreicht werden kann.

So können bereits in naher Zukunft *Reduction* und *Refinement* erreicht werden, bis durch die Weiterentwicklung von Alternativverfahren eines Tages ein *Replacement* von Tiermodellen vollzogen werden kann.

8 Summary

Although animal experiments are critically observed by the society, they remain an important and irreplaceable part of scientific research. The 3R, meaning *Reduction*, *Refinement* and *Replacement*, established by Russell and Burch in 1959, remain the basic concept of any research for alternative methods to animal testing.

The usage of Merino-Sheep as large animal models in orthopaedical and traumatological research is increasing over the last years. The animals are often used as osteoporotic models and for testing new materials and surgical methods for injuries of the cruciate ligament. For the studies, the sheep need to be bought from commercial breeders, in contrast to most small animal models they cannot be bred for each study. This leads to heterogeneity within the mostly small groups of sheep used as large animal models. Until present no independent reference values for the bone density of sheep exist. Usually the bone density is measured before starting the experiments or a control group within the study is used for gaining reference data.

It was an aim of this study to establish independent reference values for the bone density of Merino-Sheep, which can be used according to the T-Score in human medicine. This can increase the quality of animal experiments as defined in the 3R by Russell and Burch. We analyzed 116 DXA-scans on 74 Merino-Sheep out of three different studies. We focused on four *Regions of Interest* which are highly relevant in clinical practice: *whole body*, *upper lumbar vertebra*, *left femoral head* and *right femoral head*. On basis of an independent reference group in humane medicine osteoporosis can be diagnosed if the individual result differs more than 2,5 standard deviations from the mean value of this reference group.

In dependence of the reference group for the T-Score we established an independent reference group including 48 measurements of animals aged four to six years. We compared the data of this group with the non-independent pretest values used as references in the original studies (*Kreuzband* and *Osteoporose*). In group *Kreuzband* significant differences between the dependent reference group (n=28 animals) and the new independent reference group could be observed. In group *Osteoporose* no significant differences were found between the dependent (n=46) and the independent reference group.

Summary

Age is one of the most important factors for gaining skeletal maturity. Humans reach their Peak Bone Mass (PBM) between 20 and 30 years of age until bone density decreases with the beginning of menopause after a plateau-phase of many years. With our data we wanted to observe the age-dependency of bone mineral density in sheep. We found continuously increasing values of BMD with increasing age. At the age of four we observed a first peak in BMD, a second peak was evident around the age of seven years. After the second peak the possible beginning of a plateau-phase is observable.

By knowing the age-dependency in Merino-Sheep it's possible to recommend certain ages for certain study types using sheep as large animal models. For studies dealing with the treatment of ruptures of the cruciate ligament animals around the age of four should be chosen. Sheep of this age represent the bone metabolism of young sportive humans, which are more often suffering of an ACL-rupture, more accurate than older sheep. For studies on Osteoporosis it seems to make sense to choose animals older than 7 years. Since osteoporosis is a disease which mostly occurs in older people who have already reached their PBM it should be simulated in older sheep which have at least reached the plateau-phase of BMD. By choosing the animals by age a positive impact on quality and transferability of animal models can be achieved easily.

By using our independent reference group future studies can spare the usage of control groups which leads directly into a reduction of the number of used animals according to the 3R. Currently our independent reference group consists data of 48 DXA-measurements. The access to the database is free and it will be permanently expanded. In near future it will be as big as the reference database of the T-Score in human medicine. By using the database and knowing the age-dependency of bone density Reduction and Refinement can be reached soon, until animal experiments can hopefully be totally replaced in future after the advancement of promising alternatives.

9 Anhang

9.1 Ablauf der Knochendichtescans

1. Tägliche Qualitätskontrolle

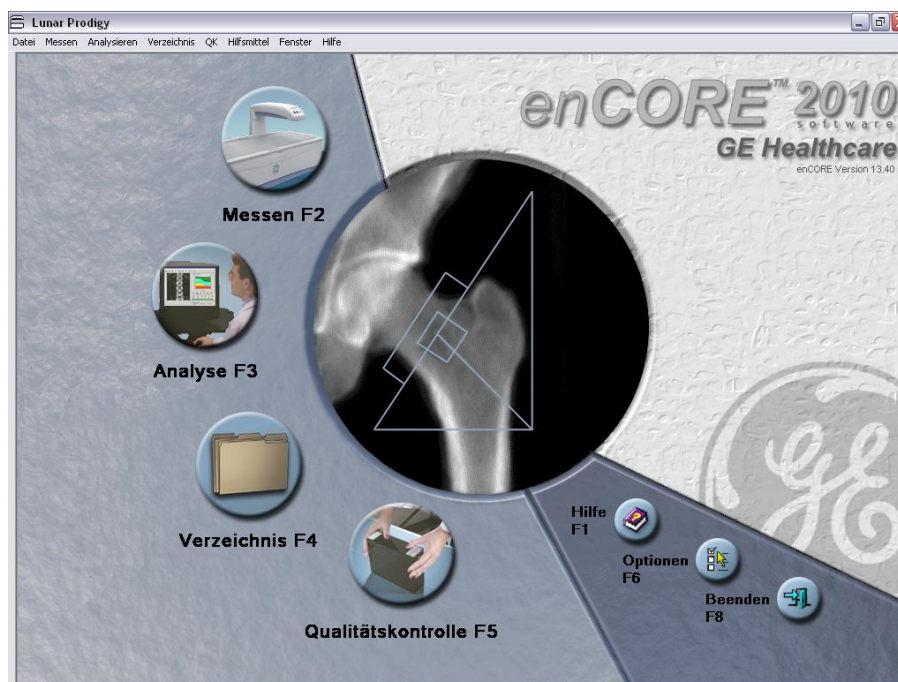


Abbildung 24: Startbildschirm der enCORE-Software. Mit einem Klick auf das Icon *Qualitätskontrolle* im Startbildschirm der Software gelangt der Benutzer in das entsprechende Menü (Abbildung 25).

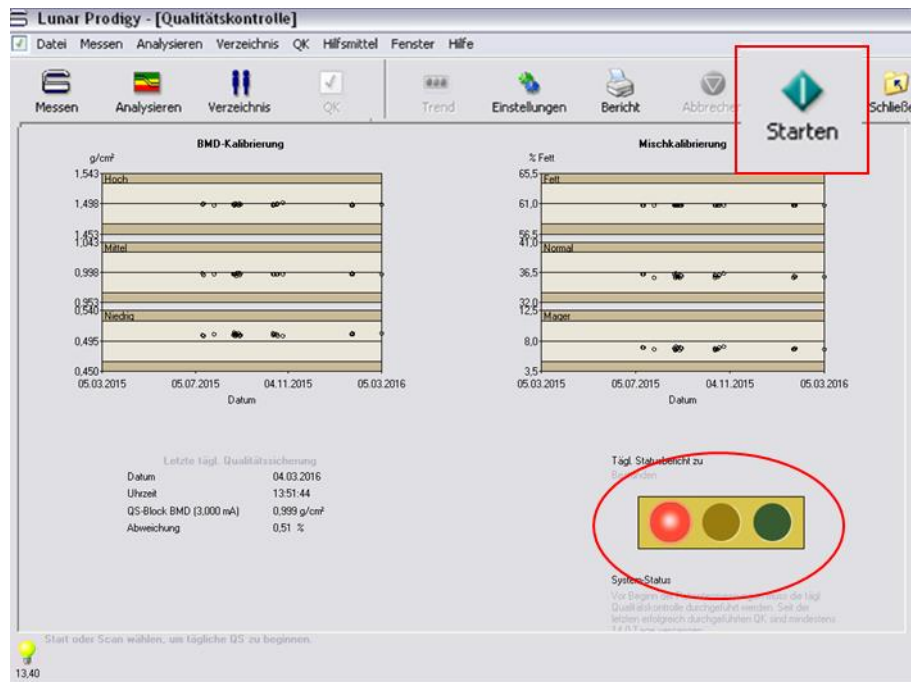


Abbildung 25: Übersicht über die letzten Qualitätskontrollen. Die Systemampel steht auf *Rot* (roter Kreis), ohne das Durchführen einer Kalibrierung unterbindet die Software die Durchführung von DXA-Messungen. Die Kalibrierung kann durch einen Klick auf das Symbol *Start* begonnen werden.

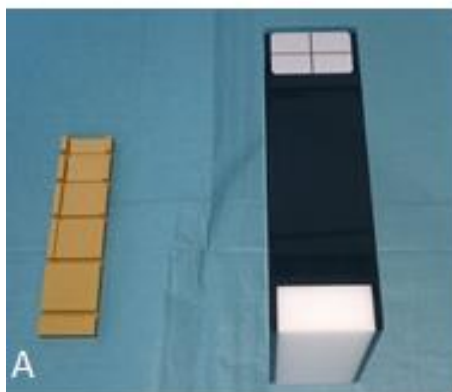


Abbildung 26: (A): Die beiden Testkörper, die zur Kalibrierung des DXA-Gerätes eingesetzt werden. Links im Bild befindet sich der *Phantomkörper*, der die Dichte menschlicher Wirbelkörper simuliert. (B): Der Phantomkörper wurde bereits auf der Liege platziert. Zur Simulation des Weichteilgewebes wird noch ein Behälter mit Wasser darüber gestellt.

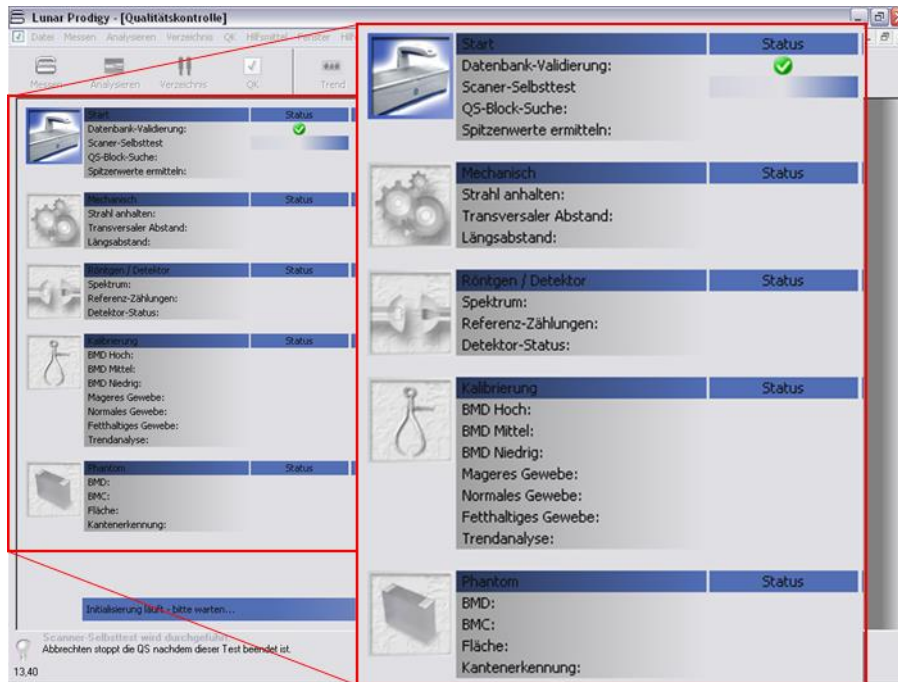


Abbildung 27: Während des Kalibrierungsvorgangs zeigt die Software dessen Fortschritt und die Ergebnisse der durchgeführten Tests an. Nach erfolgreicher Absolvierung schaltet die Ampel auf *Grün*, Messungen können nun durchgeführt werden.

2. Messvorgang



Abbildung 28: Vor Beginn der Messungen wird das zu untersuchende Schaf auf der Liegefläche des Gerätes fixiert. Im Startbildschirm der Software (Abbildung 24) wird durch Klick auf das Icon *Messen* das dazugehörige Menü geöffnet.

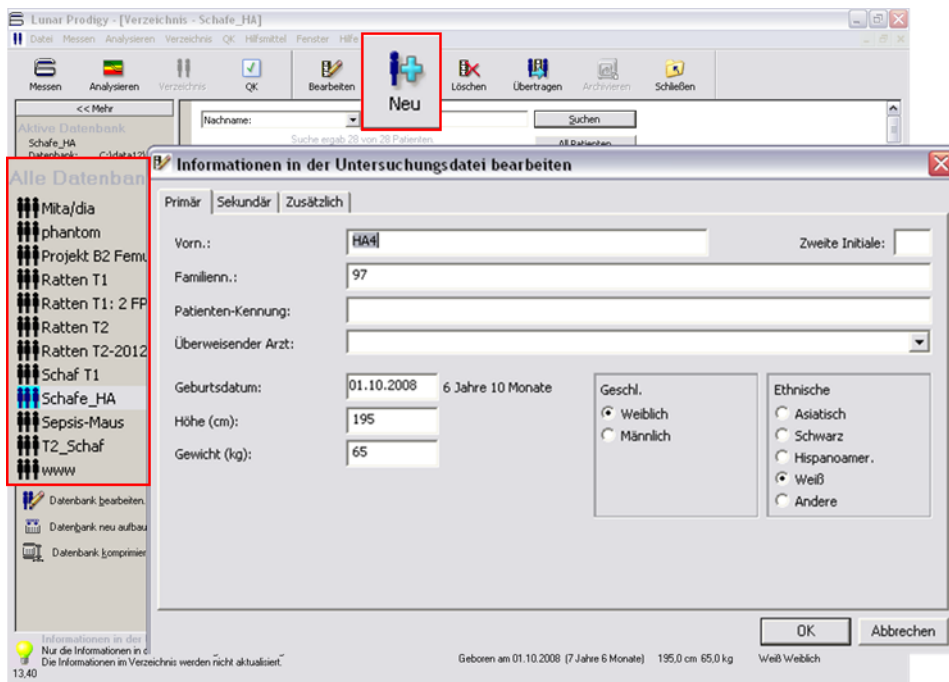


Abbildung 29: Nach Auswählen der gewünschten Datenbank (rotes Rechteck links) kann durch Klicken auf das Icon „Neu“ (rotes Rechteck oben) eine neue Patientenakte angelegt werden. Im Fenster im Vordergrund werden die wichtigsten Daten des Tieres dokumentiert.

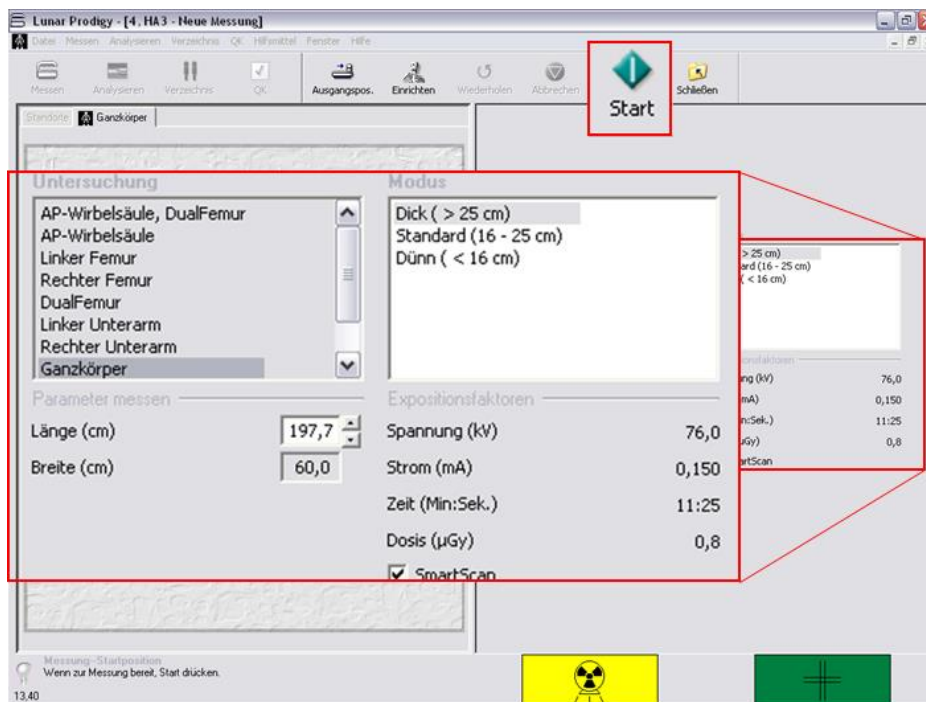


Abbildung 30: Als Art der Untersuchung wird *Ganzkörper* ausgewählt, der Modus *Dick (>25cm)* eignet sich zur Messung am Schaf. Nachdem Untersuchungsart und Modus korrekt ausgewählt sind, kann durch Betätigung der Schaltfläche *Start* (rotes Rechteck oben) mit dem Messvorgang begonnen werden.

3. Analyse der Messungen

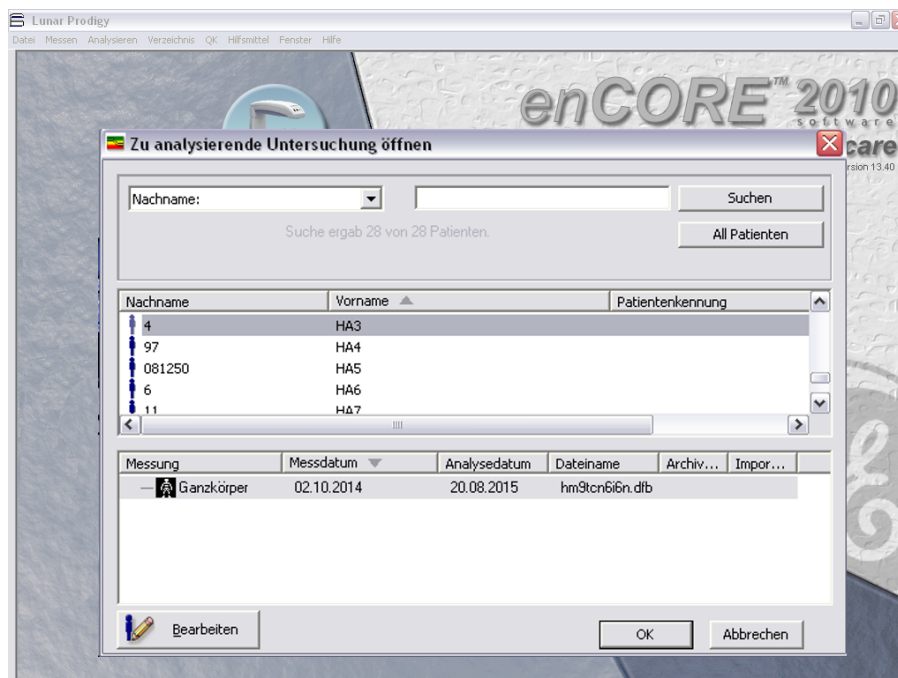


Abbildung 31: Nach Betätigung des Feldes *Analysieren* im Startbildschirm der Software (Abbildung 24) öffnet sich die Datenbank, in der die zu analysierende Messung ausgewählt wird.

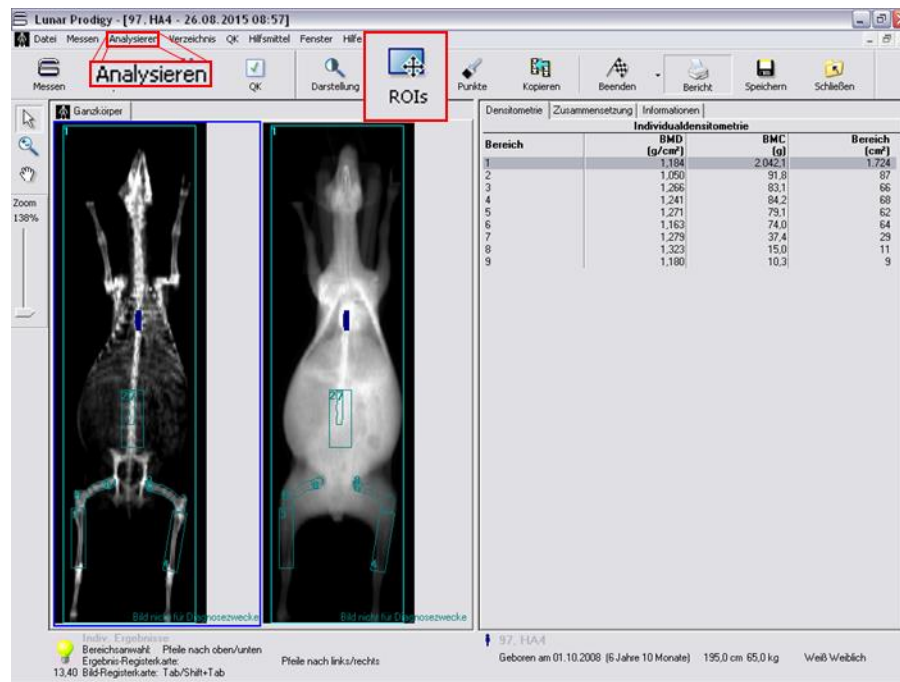


Abbildung 32: Nach Auswahl es gewünschten Tieres öffnet sich dieser Bildschirm mit Knochen- (links) und Weichteilfenster (rechts). Zunächst werden die vom System vorgegebenen ROIs durch Aufrufen des Menüs *Analysieren* (rotes Rechteck links) und Anwählen der Option *Benutzerspezifisch* entfernt wurden. Nun kann mit dem manuellen Anlegen der ROIs per Mauszeiger begonnen werden, die in beiden Messfenstern grün dargestellt werden. Das entsprechende Menü öffnet sich durch Klick auf *ROIs* (rotes Rechteck rechts).

The screenshot shows the Lunar Prodigy software interface. The main window displays two views of a bone scan: a grayscale image on the left and a color-coded image on the right. Both images show a spine with two rectangular ROIs (Regions of Interest) marked on the femur heads. The zoom level is set to 418%. The toolbar on the left includes a zoom slider (circled in red) and a polygon selection tool (circled in red). The results table on the right is titled 'Ergebnisse' (Results) and contains the following data:

| ROI | MM (x, y) | Breite (cm) | Höhe (cm) | Winkel (Grad) |
|-----|-----------|-------------|-----------|---------------|
| 1 | 61,76 | 52,87 | 196,78 | 0 |
| 2 | 64,90 | 8,81 | 22,76 | 0 |
| 3 | 19,126 | 5,68 | 23,61 | 0 |
| 4 | 99,127 | 5,68 | 23,61 | 9 |
| 5 | 33,112 | 16,25 | 12,41 | 0 |
| 6 | 92,114 | 16,45 | 12,61 | 0 |
| 7 | 64,87 | 2,41 | 13,41 | 0 |
| 8 | 45,109 | 4,21 | 4,60 | 0 |
| 9 | 78,110 | 3,21 | 3,60 | 0 |

At the bottom of the interface, there is a status bar with the following information: '97, HA4', 'Geboren am 01.10.2008 (6 Jahre 10 Monate)', '195,0 cm 65,0 kg', and 'Weiß Weiblich'. A small yellow lightbulb icon indicates a tip: 'ROI erstellen: Linke Maustaste drücken, um alle Scheitelpunkte zu setzen. Mit Doppelklicken schließen.' The time '13:40' is displayed in the bottom left corner.

Abbildung 33: Durch Vergrößerung des Knochen- und des Weichteilfensters mit Hilfe des Zoomreglers (roter Kreis oben links) lassen sich kleine ROIs, wie die beiden Femurköpfe, präziser markieren. Zur individuellen Umrandung einer Struktur sollte in dem Auswahlmenü links das *Polygon* ausgewählt werden (roter Kreis unten links). Nachdem alle ROIs korrekt platziert wurden, öffnet ein Klick auf *Ergebnisse* (rotes Rechteck) den Analysebogen.

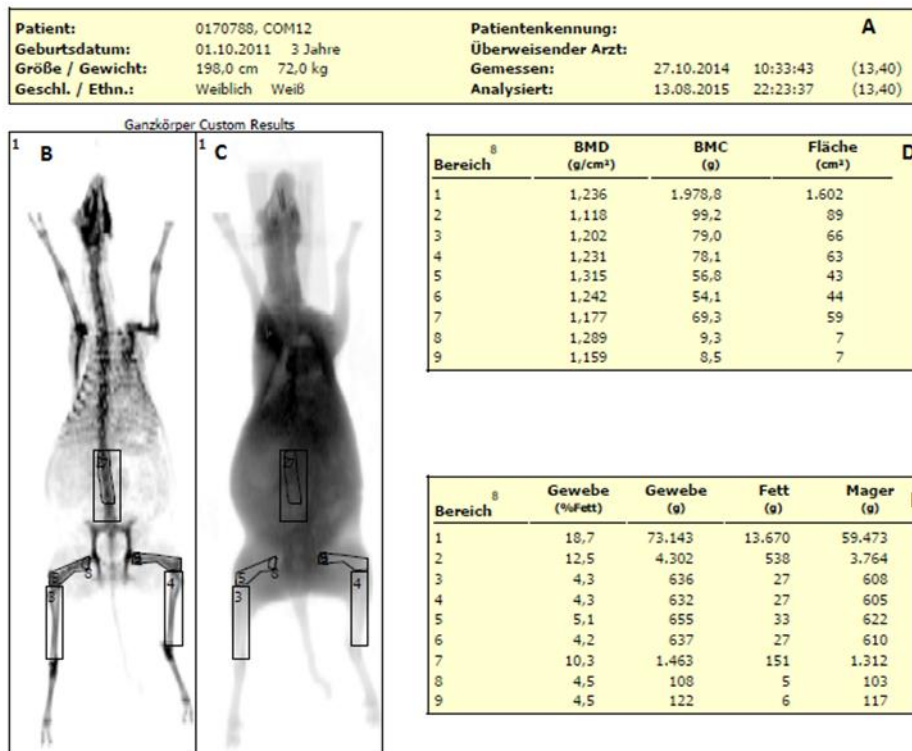


Abbildung 34: Nach Abschluss der Markierungen öffnet sich der DXA-Analysebogen. Dieser beinhaltet alle Messergebnisse und kann im Anschluss im PDF-Format gespeichert oder gedruckt werden.

10 Ehrenwörtliche Erklärung

Erklärung zur Dissertation

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

(Ort und Datum)

(Unterschrift)

11 Lebenslauf

12 Literaturverzeichnis

Aerssens, J.; Boonen, S.; Lowet, G.; Dequeker, J. (1998): Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. In: *Endocrinology* 139 (2), S. 663–670. DOI: 10.1210/endo.139.2.5751.

Allen, Matthew J.; Houlton, John E. F.; Adams, Sephen B.; Rushton, Neil (1998): The Surgical Anatomy of the Stifle Joint in Sheep. In: *Vet Surgery* 27 (6), S. 596–605. DOI: 10.1111/j.1532-950X.1998.tb00536.x.

Arens, Daniel; Sigrist, Ilonka; Alini, Mauro; Schawalder, Peter; Schneider, Erich; Egermann, Marcus (2007): Seasonal changes in bone metabolism in sheep. In: *The Veterinary Journal* 174 (3), S. 585–591. DOI: 10.1016/j.tvjl.2006.10.001.

Augat, Peter; Burger, Johannes; Schorlemmer, Sandra; Henke, Thomas; Peraus, Manfred; Claes, Lutz (2003): Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model. In: *J. Orthop. Res.* 21 (6), S. 1011–1017. DOI: 10.1016/S0736-0266(03)00098-6.

Banu, Jameela (2011): The Ovariectomized Mice and Rats. In: Gustavo Duque und Ken Watanabe (Hg.): *Osteoporosis Research*. London: Springer London, S. 101–114.

Barber, F.Alan; Elrod, Burton F.; McGuire, David A.; Paulos, Lonnie E. (1995): Preliminary results of an absorbable interference screw. In: *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 11 (5), S. 537–548. DOI: 10.1016/0749-8063(95)90129-9.

Bartl, Reiner; Bartl, Christoph (2010): *Osteoporose. Prävention - Diagnostik - Therapie ; 12 Tabellen*. 4., vollst. überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart u.a.: Thieme. Online verfügbar unter www.thieme-connect.de/products/ebooks/book/10.1055/b-001-1073.

Bérubé, Céline H.; Festa-Bianchet, Marco; Jorgenson, Jon T. (1999): Individual differences, longevity, and reproductive senescence in Bighorn Ewes. In: *Ecology* 80 (8), S. 2555–2565. DOI: 10.1890/0012-9658(1999)080[2555:IDLARS]2.0.CO;2.

Blake, Glen M.; Fogelman, Ignac (2007): The role of DXA bone density scans in the diagnosis and treatment of osteoporosis. In: *Postgraduate medical journal* 83 (982), S. 509–517. DOI: 10.1136/pgmj.2007.057505.

Brown, G. H.; Turner, H. N.; Young, S. S.Y.; Dolling, C. H.S. (1966): Vital statistics for an experimental flock of Merino sheep. III. Factors affecting wool and body characteristics, including the effect of age of ewe and its possible interaction with method of selection. In: *Aust. J. Agric. Res.* 17 (4), S. 557. DOI: 10.1071/AR9660557.

- Bundesministerium für Bildung und Forschung (2016): Bundesministerium für Bildung und Forschung. Alternativen zum Tierversuch. Hg. v. Bundesministerium für Bildung und Forschung. Online verfügbar unter <https://www.bmbf.de/de/alternativen-zum-tierversuch-412.html>.
- Burge, Russel; Dawson-Hughes, Bess; Solomon, Daniel H.; Wong, John B.; King, Alison; Tosteson, Anna (2007): Incidence and Economic Burden of Osteoporosis-Related Fractures in the United States, 2005-2025. In: *J Bone Miner Res* 22 (3), S. 465–475. DOI: 10.1359/jbmr.061113.
- Clayton, Robert A. E.; Court-Brown, Charles M. (2008): The epidemiology of musculoskeletal tendinous and ligamentous injuries. In: *Injury* 39 (12), S. 1338–1344. DOI: 10.1016/j.injury.2008.06.021.
- Cohen Jr., M. Michael (2006): The new bone biology. Pathologic, molecular, and clinical correlates. In: *Am. J. Med. Genet.* 140A (23), S. 2646–2706. DOI: 10.1002/ajmg.a.31368.
- Consensus development conference. Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis (1993). In: *The American Journal of Medicine* 94 (6), S. 646–650.
- Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie (2018): S1-Leitlinie 012/005 "Vordere Kreuzbandruptur, zuletzt geprüft am 17.06.2020.
- ECHA (2016): How to use alternatives to animal testing to fulfil the information requirements for REACH registration. Helsinki: ECHA (Practical guide (European Chemicals Agency)).
- Egermann, Marcus; Goldhahn, J.; Schneider, E. (2005): Animal models for fracture treatment in osteoporosis. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 16 Suppl 2, S129-38. DOI: 10.1007/s00198-005-1859-7.
- Enderle, E.; Frosch, K.-H. (2013): Arthroskopisch unterstütztes Frakturmanagement am Kniegelenk. In: *Unfallchirurg* 116 (4), S. 311–317. DOI: 10.1007/s00113-012-2346-1.
- Exner, Cornelia (2016): Tierversuche in der Forschung. Herausgegeben von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Ständige Senatskommission für tierexperimentelle Forschung. Stand: 01.02.2016. Online verfügbar unter http://dfg.de/dfg_magazin/forschungspolitik_standpunkte_perspektiven/tierexperimentelle_forschung/index.html.
- Felsenberg, D.; Gowin, W. (1999): Knochendichtemessung mit Zwei-Spektren-Methoden. In: *Der Radiologe* 39 (3), S. 186–193. DOI: 10.1007/s001170050495.

- Felsenberg, D.; Silman, A. J.; Lunt, M.; Armbrecht, G.; Ismail, A. A.; Finn, J. D. et al. (2002): Incidence of vertebral fracture in Europe. Results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17 (4), S. 716–724. DOI: 10.1359/jbmr.2002.17.4.716.
- Freyschmidt, Jürgen (2008): Skeletterkrankungen. Klinisch-radiologische Diagnose und Differentialdiagnose. 3. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10225244>.
- Gawęda, Krzysztof; Walawski, Jacek; Węglowski, Robert; Krzyżanowski, Wojciech (2009): Comparison of bioabsorbable interference screws and posts for distal fixation in anterior cruciate ligament reconstruction. In: *International Orthopaedics (SICO)* 33 (1), S. 123–127. DOI: 10.1007/s00264-007-0482-y.
- Hamann, Christine; Kirschner, Stephan; Günther, Klaus-Peter; Hofbauer, Lorenz C. (2012): Bone, sweet bone--osteoporotic fractures in diabetes mellitus. In: *Nature reviews. Endocrinology* 8 (5), S. 297–305. DOI: 10.1038/nrendo.2011.233.
- Hans, Barbara (2009): Wollene Berühmtheit. Ältestes Schaf der Welt gestorben. Hg. v. Spiegel Online. Online verfügbar unter <http://www.spiegel.de/panorama/wollene-beruehmtheit-aeltestes-schaf-der-welt-gestorben-a-662986.html>, zuletzt geprüft am 15.08.2018.
- Hanson, J. (1997): Standardization of femur BMD. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 12 (8), S. 1316–1317. DOI: 10.1359/jbmr.1997.12.8.1316.
- Hartung, Thomas (2007): Food for thought... on cell culture. In: *ALTEX* 24 (3), S. 143–152.
- Häussler, B.; Gothe, H.; Göl, D.; Glaeske, G.; Pientka, L.; Felsenberg, D. (2007): Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany—the BoneEVA Study. In: *Osteoporos Int* 18 (1), S. 77–84. DOI: 10.1007/s00198-006-0206-y.
- Heaney, R. P.; Abrams, S.; Dawson-Hughes, B.; Looker, A.; Marcus, R.; Matkovic, V.; Weaver, C. (2000): Peak bone mass. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 11 (12), S. 985–1009. DOI: 10.1007/s001980070020.
- Heide, Helmut; Köster, Kari; Lukas, Helmut (1975): Neuere Werkstoffe in der medizinischen Technik. In: *Chemie Ingenieur Technik* 47 (8), S. 327–333. DOI: 10.1002/cite.330470803.

Heiss, Christian; Kern, Stefanie; Malhan, Deeksha; Böcker, Wolfgang; Engelhardt, Markus; Daghma, Diah Eldin S. et al. (2017): A New Clinically Relevant T-Score Standard to Interpret Bone Status in a Sheep Model. In: *Med Sci Monit Basic Res* 23, S. 326–335. DOI: 10.12659/MSMBR.905561.

Herold, Gerd (Hg.) (2010): *Innere Medizin 2011*. Köln: Selbstverl.

Hooijmans, C. R.; Leenaars, M.; Ritskes-Hoitinga, M. (2010): A gold standard publication checklist to improve the quality of animal studies, to fully integrate the Three Rs, and to make systematic reviews more feasible. Online verfügbar unter <http://repository.uibn.ru.nl/bitstream/2066/89153/1/89153.pdf>.

Johnson, Mark L.; Gong, Guodong; Kimberling, William; Recker, Susan M.; Kimmel, Donald B.; Recker, Robert R. (1997): Linkage of a Gene Causing High Bone Mass to Human Chromosome 11 (11q12-13). In: *The American Journal of Human Genetics* 60 (6), S. 1326–1332. DOI: 10.1086/515470.

Kaeding, Christopher; Farr, Jack; Kavanaugh, Tim; Pedroza, Angela (2005): A prospective randomized comparison of bioabsorbable and titanium anterior cruciate ligament interference screws. In: *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 21 (2), S. 147–151. DOI: 10.1016/j.arthro.2004.09.012.

Kang, Young Bok Abraham; Sodunke, Temitope R.; Lamontagne, Jason; Cirillo, Joseph; Rajiv, Caroline; Bouchard, Michael J.; Noh, Moses (2015): Liver sinusoid on a chip. Long-term layered co-culture of primary rat hepatocytes and endothelial cells in microfluidic platforms. In: *Biotechnology and bioengineering* 112 (12), S. 2571–2582. DOI: 10.1002/bit.25659.

Kanis, J. A. (1997): Diagnosis of osteoporosis. *Osteoporosis International*. In: *Osteoporosis Int* 7 (3), S. 108–116. DOI: 10.1007/BF03194355.

Kanis, J. A.; Glüer, C.-C. (2000): An Update on the Diagnosis and Assessment of Osteoporosis with Densitometry. In: *Osteoporosis International* 11 (3), S. 192–202. DOI: 10.1007/s001980050281.

Kanis, J. A.; Johnell, O. (2005): Requirements for DXA for the management of osteoporosis in Europe. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 16 (3), S. 229–238. DOI: 10.1007/s00198-004-1811-2.

Kanis, John A.; Melton, L. Joseph; Christiansen, Claus; Johnston, Conrad C.; Khaltayev, Nikolai (1994): The diagnosis of osteoporosis. In: *J Bone Miner Res* 9 (8), S. 1137–1141. DOI: 10.1002/jbmr.5650090802.

Karlsson, M. K.; Gerdhem, P.; Ahlborg, H. G. (2005): The prevention of osteoporotic fractures. In: *J Bone Joint Surg Br* 87 (10), S. 1320–1327. DOI: 10.1302/0301-620X.87B10.16578.

Katz, J. W.; Fingerth, R. J. (1986): The diagnostic accuracy of ruptures of the anterior cruciate ligament comparing the Lachman test, the anterior drawer sign, and the pivot shift test in acute and chronic knee injuries. In: *Am J Sports Med* 14 (1), S. 88–91. DOI: 10.1177/036354658601400115.

Kilkenny, Carol; Browne, William J.; Cuthill, Innes C.; Emerson, Michael; Altman, Douglas G. (2010): Improving bioscience research reporting. The ARRIVE guidelines for reporting animal research. In: *PLoS biology* 8 (6), e1000412. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000412.

Kilkenny, Carol; Parsons, Nick; Kadoszewski, Ed; Festing, Michael F. W.; Cuthill, Innes C.; Fry, Derek et al. (2009): Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals. In: *PloS one* 4 (11), e7824. DOI: 10.1371/journal.pone.0007824.

Kleer, V. de (2006): Development of bone. In: *Bone in Clinical Orthopedics. G. Sumner-Smith. Philadelphia, WB Saunders Co*, S. 1–80.

Knight, Andrew (2008): Non-animal methodologies within biomedical research and toxicity testing. In: *ALTEX* 25 (3), S. 213–231.

Koller, D. L.; Rodriguez, L. A.; Christian, J. C.; Slemenda, C. W.; Econs, M. J.; Hui, S. L. et al. (1998): Linkage of a QTL Contributing to Normal Variation in Bone Mineral Density to Chromosome 11q12-13. In: *J Bone Miner Res* 13 (12), S. 1903–1908. DOI: 10.1359/jbmr.1998.13.12.1903.

Konan, S.; Haddad, F. S. (2009): A clinical review of bioabsorbable interference screws and their adverse effects in anterior cruciate ligament reconstruction surgery. In: *The Knee* 16 (1), S. 6–13. DOI: 10.1016/j.knee.2008.06.001.

Lelovas, Pavlos P.; Xanthos, Theodoros T.; Thoma, Sofia E.; Lyritis, George P.; Dontas, Ismene A. (2008): The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. In: *Comparative medicine* 58 (5), S. 424–430.

Lewiecki, E. Michael; Gordon, Catherine M.; Baim, Sanford; Leonard, Mary B.; Bishop, Nicholas J.; Bianchi, Maria-Luisa et al. (2008): International Society for Clinical

Densitometry 2007 Adult and Pediatric Official Positions. In: *Bone* 43 (6), S. 1115–1121. DOI: 10.1016/j.bone.2008.08.106.

Liebschner, Michael A. K. (2004): Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. In: *Biomaterials* 25 (9), S. 1697–1714.

Lippert, Herbert (2006): Lehrbuch Anatomie. 184 Tabellen. 7., erw. Aufl. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer, zuletzt geprüft am 02.03.2016.

Lobenhoffer, P.; Agneskirchner, J. D. (2005): Vorderes Kreuzband? Was ist gesichert? In: *Arthroskopie* 18 (1), S. 11–14. DOI: 10.1007/s00142-004-0290-y.

Long, Rose G.; Zderic, Ivan; Gueorguiev, Boyko; Ferguson, Stephen J.; Alini, Mauro; Grad, Sibylle; Iatridis, James C. (2018): Effects of Level, Loading Rate, Injury and Repair on Biomechanical Response of Ovine Cervical Intervertebral Discs. In: *Ann Biomed Eng* 33 (6), E166. DOI: 10.1007/s10439-018-2077-8.

Looker, A. C.; Orwoll, E. S.; Johnston, C. C.; Lindsay, R. L.; Wahner, H. W.; Dunn, W. L. et al. (1997): Prevalence of low femoral bone density in older U.S. adults from NHANES III. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 12 (11), S. 1761–1768. DOI: 10.1359/jbmr.1997.12.11.1761.

Majewski, M.; Susanne, Habelt; Klaus, Steinbrück (2006): Epidemiology of athletic knee injuries. A 10-year study. In: *The Knee* 13 (3), S. 184–188. DOI: 10.1016/j.knee.2006.01.005.

Majewski, Martin (2010): Epidemiologie der Sportunfälle. In: *Schweizerische Zeitschrift für «Sportmedizin und Sporttraumatologie* 58 (2), S. 38–42.

Manolagas, Stavros C. (2010): From estrogen-centric to aging and oxidative stress. A revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. In: *Endocrine reviews* 31 (3), S. 266–300. DOI: 10.1210/er.2009-0024.

Markram, Henry (2012): The human brain project. In: *Scientific American* 306 (6), S. 50–55.

Martelli, Nicolas; Serrano, Carole; van den Brink, Hélène; Pineau, Judith; Prognon, Patrice; Borget, Isabelle; El Batti, Salma (2016): Advantages and disadvantages of 3-dimensional printing in surgery. A systematic review. In: *Surgery* 159 (6), S. 1485–1500. DOI: 10.1016/j.surg.2015.12.017.

Marti, C.; Imhoff, A. B.; Bahrs, C.; Romero, J. (1997): Metallic versus bioabsorbable interference screw for fixation of bone-patellar tendon-bone autograft in arthroscopic

anterior cruciate ligament reconstruction. In: *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 5 (4), S. 217–221. DOI: 10.1007/s001670050053.

Martini, L.; Fini, M.; Giavaresi, G.; Giardino, R. (2001): Sheep model in orthopedic research: a literature review. In: *Comparative medicine* 51 (4), S. 292–299.

Marx, Uwe; Walles, Heike; Hoffmann, Silke; Lindner, Gerd; Horland, Reyk; Sonntag, Frank et al. (2012): 'Human-on-a-chip' developments. A translational cutting-edge alternative to systemic safety assessment and efficiency evaluation of substances in laboratory animals and man? In: *ATLA* 40 (5), S. 235–257.

Matkovic, V.; Jelic, T.; Wardlaw, G. M.; Ilich, J. Z.; Goel, P. K.; Wright, J. K. et al. (1994): Timing of peak bone mass in Caucasian females and its implication for the prevention of osteoporosis. Inference from a cross-sectional model. In: *The Journal of clinical investigation* 93 (2), S. 799–808. DOI: 10.1172/JCI117034.

Matković, V.; Kostial, K.; Simonović, I.; Buzina, R.; Brodarec, A.; Nordin, B. E. (1979): Bone status and fracture rates in two regions of Yugoslavia. In: *The American journal of clinical nutrition* 32 (3), S. 540–549.

Melozzi, Francesca; Woodman, Marmaduke; Jirsa, Viktor; Bernard, Christophe (2017): The Virtual Mouse Brain. A Computational Neuroinformatics Platform To Study Whole Mouse Brain Dynamics.

Micheli, L. J. (1983): Overuse injuries in children's sports: the growth factor. In: *The Orthopedic clinics of North America* 14 (2), S. 337–360.

Murthy, Balakrishna (2007): Relevance of in vitro toxicology studies in risk assessment. In: *ALTEX* 24 (3), S. 174–177.

Nafei, A.; Danielsen, C. C.; Linde, F.; Hvid, I. (2000): Properties of growing trabecular ovine bone. In: *Bone & Joint Journal* 82-B (6), S. 910–920. Online verfügbar unter <http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/content/jbjsbr/82-B/6/910.full.pdf>.

Nam, Ki-Hwan; Smith, Alec S. T.; Lone, Saifullah; Kwon, Sunghoon; Kim, Deok-Ho (2015): Biomimetic 3D Tissue Models for Advanced High-Throughput Drug Screening. In: *Journal of laboratory automation* 20 (3), S. 201–215. DOI: 10.1177/2211068214557813.

Newman, E.; Turner, A. S.; Wark, J. D. (1995): The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. In: *Bone* 16 (4 Suppl), S. 277–284.

Newton-John, H. F.; Morgan, D. B. (1970): The loss of bone with age, osteoporosis, and fractures. In: *Clinical orthopaedics and related research* 71, S. 229–252.

- Olsson, O.; Isacson, A.; Englund, M.; Frobell, R. B. (2016): Epidemiology of intra- and peri-articular structural injuries in traumatic knee joint hemarthrosis – data from 1145 consecutive knees with subacute MRI. In: *Osteoarthritis and Cartilage* 24 (11), S. 1890–1897. DOI: 10.1016/j.joca.2016.06.006.
- Pearce, A. I., et al. (2007): Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. In: *Eur Cell Mater* (13), zuletzt geprüft am 17.01.2016.
- Pouilles, J. M.; Collard, P.; Tremollieres, F.; Frayssinet, P.; Railhac, J. J.; Cahuzac, J. P. et al. (2000): Accuracy and Precision of In Vivo Bone Mineral Measurements in Sheep Using Dual-Energy X-ray Absorptiometry. In: *Calcified Tissue International* 66 (1), S. 70–73. DOI: 10.1007/s002230050014.
- R Core Team (2018): R: A Language and Environment for Statistical Computing. Version 3.4.3. Wien, Österreich: R Foundation for Statistical Computing.
- Radford, W. J. P.; Amis, A. A.; Stead, A. C. (1996): The Ovine Stifle as a Model for Human Cruciate Ligament Surgery. In: *Vet Comp Orthop Traumatol* 9 (3), S. 44–49.
- Rang, Mercer (1983): Children's fractures. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott.
- Reinwald, Susan; Burr, David B. (2011): Other Large Animal Models. In: Duque und Watanabe (Hg.): Osteoporosis Research. Animal Models. London: Springer London, S. 159–174.
- Roach, H. I.; Shearer, J. R.; Archer, C. (1989): The choice of an experimental model. A guide for research workers. In: *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 71 (4), S. 549–553.
- Rosen, Clifford J.; Bouxsein, Mary L. (2006): Mechanisms of disease. Is osteoporosis the obesity of bone? In: *Nature clinical practice. Rheumatology* 2 (1), S. 35–43. DOI: 10.1038/ncprheum0070.
- Rupp, S.; Kohn, D. (2002): Vorderes Kreuzband im Mittelpunkt des Interesses. In: *Orthopäde* 31 (8), S. 701. DOI: 10.1007/s001320200000.
- Russell, William Moy Stratton; Burch, Rex Leonard (1959): The principles of humane experimental technique.
- Saijo, Hideto; Igawa, Kazuyo; Kanno, Yuki; Mori, Yoshiyuki; Kondo, Kayoko; Shimizu, Koutaro et al. (2009): Maxillofacial reconstruction using custom-made artificial bones fabricated by inkjet printing technology. In: *Journal of artificial organs : the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs* 12 (3), S. 200–205. DOI: 10.1007/s10047-009-0462-7.

- Schäfer, F. K. W.; Order, B.; Bolte, H.; Heller, M.; Brossmann, J. (2002): Sportverletzungen des Kniestreckapparates. In: *Der Radiologe* 42 (10), S. 799–810. DOI: 10.1007/s00117-002-0794-2.
- Schiebler, Theodor Heinrich; Korf, Horst-Werner (2007): Anatomie. Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie. 10., vollständig überarbeitete Auflage. Darmstadt: Steinkopff Verlag. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7985-1771-4>.
- Schoepp, Christian; Martin, Wolfgang; Rixen, Dieter (2014): Knöcherner vorderer Kreuzbandausriss. In: *OP-JOURNAL* 29 (03), S. 216–220. DOI: 10.1055/s-0033-1360155.
- Seitlinger, G.; Scheurecker, G.; Högler, R.; Kramer, J.; Hofmann, S. (2010): Bildgebende Diagnostik des Patellofemoralgelenks. In: *Arthroscopie* 23 (3), S. 176–183. DOI: 10.1007/s00142-010-0567-2.
- Sekiya, Ichiro; Larson, Benjamin L.; Vuoristo, Jussi T.; Cui, Jian-Guo; Prockop, Darwin J. (2004): Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 19 (2), S. 256–264. DOI: 10.1359/JBMR.0301220.
- Sharma, P.; Luscombe, K.; Maffulli, N. (2003): Sports injuries in children. In: *Trauma* 5 (4), S. 245–259. DOI: 10.1191/1460408603ta291oa.
- Simon Turner, A. (2001): Animal models of osteoporosis - necessity and limitations. In: *eCM* 1, S. 66–81. DOI: 10.22203/eCM.v001a08.
- Skardal, Aleksander; Shupe, Thomas; Atala, Anthony (2016): Organoid-on-a-chip and body-on-a-chip systems for drug screening and disease modeling. In: *Drug discovery today* 21 (9), S. 1399–1411. DOI: 10.1016/j.drudis.2016.07.003.
- Sobotta, Johannes; Putz, Reinhard; Pabst, Reinhard (Hg.) (2007): Anatomie des Menschen. Der komplette Atlas in einem Band ; allgemeine Anatomie, Bewegungsapparat, innere Organe, Neuroanatomie ; Tabellenheft ; [Online-Zugang + interaktive Extras www.studentconsult.de]. 22., neu bearb. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer. Online verfügbar unter http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?id=2929722&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm.
- Spielmann, Horst; Grune, Barbara; Liebsch, Manfred; Seiler, Andrea; Vogel, Richard (2008): Successful validation of in vitro methods in toxicology by ZEBET, the National Centre for Alternatives in Germany at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment). In: *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie* 60 (2-3), S. 225–233. DOI: 10.1016/j.etp.2008.01.012.

Suchanek, Wojciech; Yoshimura, Masahiro (1998): Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. In: *J. Mater. Res.* 13 (01), S. 94–117. DOI: 10.1557/JMR.1998.0015.

Thompson, D. D.; Simmons, H. A.; Pirie, C. M.; Ke, H. Z. (1995): FDA guidelines and animal models for osteoporosis. In: *Bone* 17 (4), S125-S133. DOI: 10.1016/8756-3282(95)00285-L.

Walsh, William R.; Walton, Mark; Bruce, Warwick; Yu, Yan; Gillies, Ronald M.; Svehla, Martin (2010): Cell Structure and Biology of Bone and Cartilage. In: Yuehuei H. An (Hg.): *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. 1. softcover ed. of orig. ed. 2003. Totowa NJ u.a.: Humana Press, S. 35–58.

Weiler, Andreas; Windhagen, Henning J.; Raschke, Michael J.; Laumeyer, Andrea; Hoffmann, Reinhard F. G. (1998): Biodegradable Interference Screw Fixation Exhibits Pull-Out Force and Stiffness Similar to Titanium Screws. In: *Am J Sports Med* 26 (1), S. 119–128. Online verfügbar unter <http://ajs.sagepub.com/content/26/1/119.full>.

WHO (1994): Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO study group (WHO technical report series).

WHO (1996): Cancer pain relief. With a guide to opioid availability. 2nd ed. Geneva: World Health Organization.

Willie, Bettina M.; Bloebaum, Roy D.; Bireley, William R.; Bachus, Kent N.; Hofmann, Aaron A. (2004): Determining relevance of a weight-bearing ovine model for bone ingrowth assessment. In: *Journal of biomedical materials research. Part A* 69 (3), S. 567–576. DOI: 10.1002/jbm.a.30038.

Yang, Jun; Cai, Hong; Lv, Jia; Zhang, Ke; Leng, Huijie; Sun, Chuiguo et al. (2014): In vivo study of a self-stabilizing artificial vertebral body fabricated by electron beam melting. In: *Spine* 39 (8), E486-92. DOI: 10.1097/BRS.0000000000000211.

Zarrinkalam, M. R.; Beard, H.; Schultz, C. G.; Moore, R. J. (2009): Validation of the sheep as a large animal model for the study of vertebral osteoporosis. In: *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 18 (2), S. 244–253. DOI: 10.1007/s00586-008-0813-8.

13 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Makroskopischer Aufbau des Röhrenknochens. | 4 |
| Abbildung 2: Lamellenknochen..... | 6 |
| Abbildung 3: Röntgenaufnahme eines proximalen Femurs | 8 |
| Abbildung 4: Verlauf und Einflüsse auf die PBM..... | 9 |
| Abbildung 5: T-Score..... | 11 |
| Abbildung 6: DXA-Gerät von Typ <i>Lunar Prodigy</i> | 12 |
| Abbildung 7: Anatomischer Verlauf des vorderen Kreuzbandes | 15 |
| Abbildung 8: Ein narkotisiertes Merino-Landschaf liegt auf dem DXA-Gerät. | 25 |
| Abbildung 9: DXA-Analysebogen..... | 28 |
| Abbildung 10: Operationssaal der Zentralen Forschungseinrichtung..... | 29 |
| Abbildung 11: OP-Situs. | 31 |
| Abbildung 12: Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen..... | 40 |
| Abbildung 13: Heatmap ROI 1, <i>Ganzkörper</i> | 42 |
| Abbildung 14: Heatmap ROI 7, <i>obere LWS</i> | 43 |
| Abbildung 15: Heatmap ROI 8, <i>linker Femurkopf</i> | 44 |
| Abbildung 16: Heatmap ROI 9, <i>rechter Femurkopf</i> | 45 |
| Abbildung 17: Übersicht der in ROI 1, <i>Ganzkörper</i> , gemessenen BMD-Werte..... | 56 |
| Abbildung 18: Übersicht der in ROI 7, <i>obere LWS</i> , gemessenen BMD-Werte | 57 |
| Abbildung 19: Übersicht der in ROI 8, <i>linker Femurkopf</i> , gemessenen BMD-Werte . | 58 |
| Abbildung 20: Übersicht der in ROI 9, <i>rechter Femurkopf</i> , gemessenen BMD-Werte. | 60 |
| Abbildung 21: Altersabhängiger Verlauf von BMD und BMC in ROI7, <i>obere LWS</i> . . | 63 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 22: Modell eines Multi-Organ-Chips..... | 66 |
| Abbildung 23: Beispiel für ein in der maxillofazialen Chirurgie angewandten und durch 3D-Druck hergestellten Knochenersatz des Unterkiefers..... | 73 |
| Abbildung 24 Startbildschirm der enCORE-Software | 86 |
| Abbildung 25: Übersicht über die letzten Qualitätskontrollen. | 87 |
| Abbildung 26: Test- und Phantomkörper | 87 |
| Abbildung 27: Kalibrierungsvorgang..... | 88 |
| Abbildung 28: Merino-Schaf während der DXA-Messung | 88 |
| Abbildung 29: Erstellen einer Datenakte. | 89 |
| Abbildung 30: Auswahl der Untersuchungsart..... | 89 |
| Abbildung 31: Analyse der Messung..... | 90 |
| Abbildung 32: Anlegen der gewünschten ROIs | 91 |
| Abbildung 33: Vergrößerung des Knochenfensters..... | 92 |
| Abbildung 34: DXA-Analysebogen..... | 93 |

14 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Übersicht Knochendichtemessungen | 22 |
| Tabelle 2: Übersicht gemessene ROIs. | 27 |
| Tabelle 3: Übersicht Anzahl und Art der gemessenen ROIs in jeder der drei Tiergruppen. ... | 34 |
| Tabelle 4: Deskriptive Statistik aller erhobenen Parameter | 37 |
| Tabelle 5: Übersicht über die in den ROIs 1,7,8 und 9 gemessenen BMD-Werte | 38 |
| Tabelle 6: Spearman-Rangkorrelation der BMD zu den Parametern <i>Gewicht, Alter, BMC, relativer Fettanteil (Fett %)</i> und <i>absoluter Fettanteil (Fett (g))</i> | 41 |
| Tabelle 7: Rangkorrelation nach Spearman der BMD in ROI <i>Ganzkörper</i> | 46 |
| Tabelle 8: Rangkorrelation nach Spearman der BMD in ROI <i>obere Lendenwirbelsäule</i> | 48 |
| Tabelle 9: Rangkorrelation nach Spearman der BMD in ROI <i>linker Femurkopf</i> | 50 |
| Tabelle 10: Rangkorrelation nach Spearman der BMD in ROI <i>rechter Femurkopf</i> | 52 |
| Tabelle 11: Übersicht über die zur Berechnung des T-Scores herangezogenen BMD-Messungen | 54 |
| Tabelle 12: Übersicht der Regressionsmodelle für die Beziehung zwischen Alter und BMD bzw. BMC in den verschiedenen ROIs | 62 |

15 Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Thaqif El Khassawna für die Überlassung und ständige Weiterentwicklung meines Promotionsthemas sowie die Betreuung und die vertrauensvolle Zusammenarbeit bedanken. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Dr. Markus Engelhardt, der einen Großteil der Operationen durchgeführt hat sowie David Weisweiler und Matthias Ivo für die gute Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima bedanken. Auch dem Team der Zentralen Forschungseinrichtung an der Universität Frankfurt um Herrn Dr. Alf Theisen und Frau Dr. Christa Tandi möchte ich meinen Dank aussprechen.

Ein besonderer Dank gilt zudem Herrn Prof. Christian Heiß und den Mitgliedern der Arbeitsgruppen *T1* und *T2* für die freundliche Überlassung der Rohdaten.

Dem gesamten Team des *Labors für Experimentelle Unfallchirurgie* um Frau Prof. Katrin Lips möchte ich für die Zusammenarbeit danken.

Herrn Dr. Klaus Failing, Frau Dr. Sabine Stötzel und Frau Dr. Deeksha Malhan möchte ich für die geduldige Unterstützung bei der statistischen Auswertung herzlich danken.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Stephanie Krämer für die beratende Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ein zusätzlicher Dank an Frau Dr. Sabine Stötzel, Herrn Dr. Gero Knapp sowie Herrn Dr. Christoph Biehl für die hilfreichen Korrekturen und Anmerkungen.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern, Ines und meiner gesamten Familie, ohne deren geduldige Unterstützung und Motivation ich diese Arbeit sicher nicht hätte fertigstellen können.

Danke!