

Histologische Evaluation der Osteozytenmorphologie und -lokalisierung bei einem Schafsmodell der Osteoporose

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

vorgelegt von Dirk Rosenbaum
aus Koblenz

Gießen 2019

Aus der experimentellen Unfallchirurgie, Justus-Liebig-Universität Gießen
Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Direktor der Klinik: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Gunther Schwetlick

Tag der Disputation: 11.12.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Stand der Wissenschaft	2
1.1.1 Makroskopischer Aufbau und Funktionen des Knochens.....	2
1.1.1.1 Einteilung.....	2
1.1.1.2 Knochenmark und Blutversorgung.....	3
1.1.1.3 Knochenstatik	3
1.1.2 Mikroskopischer Aufbau des Knochens	4
1.1.2.1 Knochenarten	4
1.1.3 Knochenentwicklung.....	5
1.1.3.1 Knochenwachstum	6
1.1.4 Interzellulärsubstanz	6
1.1.4.1 Organische Matrix	6
1.1.4.2 Anorganische Knochenmatrix	7
1.1.5 Knochenzellen	7
1.1.5.1 Osteoblasten	7
1.1.5.2 Lining-Zellen	8
1.1.5.3 Osteozyten	8
1.1.5.4 Osteoklasten.....	14
1.1.6 Regulation der Knochenstruktur	15
1.1.6.1 Funktioneller Knochenumbau.....	15
1.1.6.2 Mineralisation und Regulation des Knochenstoffwechsels .	16
1.1.7 Knochenkrankheiten	17
1.1.7.1 Osteopenie	17
1.1.7.2 Osteoporose	18
1.1.7.3 Osteomalazie und Rachitis	26
1.2 Hypothesen und Zielsetzung	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Schafsmodell.....	28
2.1.1 Versuchstiere.....	28
2.1.2 Tierhaltung	29
2.1.3 Versuchsanordnung und Studiendesign	29
2.1.4 Operationsablauf der Ovariectomie	30

2.1.5	Diät und Glukokortikoidgabe	30
2.2	Verarbeitung und Einbettung der Proben	31
2.2.1	Herstellung der Paraffinschnitte	31
2.2.2	Toluidinblau-Färbung	31
2.2.3	Silber-Färbung	32
2.2.4	Herstellung von Schliffen und Schnitten mit Rhodamin-Färbung.....	32
2.2.4.1	Rhodaminschliffe der Femora	32
2.2.4.2	Rhodaminschnitte der Beckenkammbiopsien	33
2.3	Lichtmikroskopie.....	34
2.4	Konfokale Laser-Mikroskopie (LCM)	35
2.5	Deskriptive Histologie und Gradingsysteme.....	35
2.5.1	Analyse der Spongiosastruktur in Toluidinblau-Färbung	35
2.6	Analyse der Osteozytenmorphologie und -häufigkeit in Silber-Färbung	37
2.6.1	Femurschnitte	37
2.6.1.1	Ermittlung der Gradingsumme.....	38
2.6.2	Lendenwirbelkörper (LWK)	39
2.7	OLCS-Analyse der Rhodaminschnitte und Schliffe	39
2.8	Histomorphometrie	39
2.8.1	ImageJ	40
2.8.1.1	Ermittlung der Trabekelfläche	40
2.8.1.2	Ermittlung der Zellzahl	40
2.8.1.3	Osteozytenkategorien	41
2.8.1.4	Partikelanalyse	42
2.9	Statistik	42
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Toluidinblau-Färbung zeigt Veränderungen in der Knochenarchitektur zwischen den Gruppen	44
3.2	Femur – Abnahme der trabekulären Vernetzung und Trabekelzahl von Kontroll- zu OVXDS-Gruppe	47
3.2.1	Kontrollgruppe	47
3.2.2	OVX-Gruppe	47
3.2.3	OVXD-Gruppe.....	48
3.2.4	OVXDS-Gruppe	48
3.3	LWK – Abnahme der trabekulären Dicke bei erhaltener Konnektivität	49
3.3.1	Kontrollgruppe	49
3.3.2	OVX-Gruppe	49

3.3.3	OVXD-Gruppe.....	50
3.3.4	OVXDS-Gruppe.....	50
3.4	Statistische Analyse der Spongiosaarchitektur in Toluidinblau-Färbung spiegelt abnehmende Knochenqualität wider	51
3.5	Analyse der Knochenfläche und Osteozytenmorphologie	52
3.5.1	Femur – Abnahme an Spindeln bei Zunahme des interzellulären Abstandes und leerer Lakunen	52
3.5.1.1	Kontrollgruppe	53
3.5.1.2	OVX-Gruppe	56
3.5.1.3	OVXD-Gruppe.....	58
3.5.1.4	OVXDS-Gruppe	60
3.5.2	LWK – Abnahme der Spindeln bei Zunahme runder Osteozyten	62
3.5.2.1	Kontrollgruppe	62
3.5.2.2	OVX-Gruppe	64
3.5.2.3	OVXD-Gruppe.....	66
3.5.2.4	OVXDS-Gruppe	68
3.6	Heterogenität des Wirbelkörpers bei linearer Gradingabnahme im Femur	70
3.7	Statistischer Vergleich von Femur und Wirbelkörper	71
3.8	Histomorphometrie: Veränderung der Knochenfläche und Osteozytenmorphologie am deutlichsten in OVXDS-Gruppe	73
3.9	Rhodamin-Färbung erlaubt Analyse des Dendritenbaums	76
3.9.1	Femur – Unterschiedliche Vernetzungsgrade des OLCS bei Zunahme an terminalen Verdickungen.....	77
3.9.1.1	Kontrollgruppe	77
3.9.1.2	OVX-Gruppe	77
3.9.1.3	OVXD-Gruppe.....	78
3.9.1.4	OVXDS-Gruppe	78
3.9.2	Beckenkammbiopsien – Veränderungen des Dendritenwerks bei Progression der Osteoporose	80
3.9.2.1	Zeitpunkt 0 Monate.....	80
3.9.2.2	Zeitpunkt 3 Monate.....	81
3.9.2.3	Zeitpunkt 8 Monate.....	81
3.10	Mikropartikelanalyse zeigt geringste OLCS-Fläche bei OVXDS-Gruppe im Femur.....	83
3.11	Heterogene Dendritennetzwerke im Beckenkamm	84
3.12	Zusammenfassung der Ergebnisse	87

4	Diskussion.....	88
4.1	Verstärkte Knochenreduktion durch additiven Effekt der Interventionen...	88
4.2	Stärkste Reduktion der Knochenfläche in OVXDS-Gruppen.....	89
4.3	Reduzierte Mikroarchitektur unter Osteoporoseinduktion	90
4.4	Reduzierte trabekuläre Vernetzung des Femurs	91
4.5	Umwandlung der Trabekelstruktur von Platten zu Stäben	92
4.6	Abhängigkeit der Spongiosaarchitektur von der Belastung.....	95
4.7	Diskrepante Morphologie der Osteozyten im Zuge der Osteoporoseinduktion und Abhängigkeit von der Lokalisation	96
4.8	Interventionen beeinflussen Osteozytenzahl und Morphologie.....	97
4.9	Abhängigkeit des dendritischen Netzwerks von Lage und Aktivität	98
4.10	Terminale dendritische Auftreibungen könnten dysfunktionales Kommunikationssystem widerspiegeln	100
4.11	Zusammenhang des Netzwerks mit der Knochenhomöostase	100
4.12	Einfluss der Tripleinduktion auf Osteozyten resultiert in verstärkter Ausbildung von Lakunen	101
4.13	Limitationen der eigenen Methodik.....	103
4.14	Das Schafsmodell als Großtiermodell der Osteoporose	104
5	Zusammenfassung/ Summary	106
6	Literaturverzeichnis.....	110
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	120
8	Abkürzungsverzeichnis	123
9	Anhang	126
9.1	Färbeprotokoll Toluidinblau-Färbung	126
9.2	Färbeprotokoll Silber-Färbung.....	127
9.3	Färbeprotokoll Rhodamin-Färbung	129
9.4	Arbeiten mit ImageJ	131
9.4.1	Ermittlung der Trabekelfläche.....	131
9.4.2	Ermittlung der Zellzahl	134
9.4.3	Mikropartikelanalyse	136
10	Publikationen und Veröffentlichungen.....	139
11	Danksagungen	140
12	Tabellarischer Lebenslauf	141

1 Einleitung

Durch die alternde Gesellschaft der Industrieländer nimmt die Bedeutung der, auch als Knochenschwund bekannten, Osteoporose enorm zu. Dabei beträgt die Prävalenz der Osteoporose in der europäischen Union 21 % bei Frauen und 6 % bei Männern im Alter von 50 bis 84 Jahren⁽¹⁾. Insgesamt sind hier etwa 27,5 Millionen Menschen betroffen⁽¹⁾. Schätzungen gehen von einer steigenden Prävalenz der Osteoporose in der europäischen Bevölkerung von bis zu 19 % im Jahr 2025 aus⁽¹⁾. Die Auslösefaktoren der Erkrankung sind vielseitig und die Auswirkung auf das Gesundheitssystem profund.

Bei der Osteoporose kommt es zur vermehrten Knochenbrüchigkeit und einer daraus resultierenden Frakturgefahr. Hierbei handelt es sich um Fragilitätsfrakturen, die schon durch geringste Traumen auftreten können. Schmerzen, Bewegungs- und Mobilitätseinschränkungen sind häufig die Folge und wirken sich auf die Selbständigkeit und Lebensqualität der Betroffenen aus. Die Osteoporose gehört daneben zu den teuren Volkskrankheiten, für die jährlich Milliardenbeträge ausgegeben werden⁽²⁾.

Kennzeichnend für die systemische Knochenerkrankung ist eine reduzierte Knochenstruktur und ein Verlust an Knochenmasse sowie die fehlregulierte Aktivität der Knochenzellen. Knochenbildende Zellen, wie Osteoblasten und die knochenabbauenden Osteoklasten spielen in diesem Prozess eine wichtige Rolle. Neuere Studien rücken hierbei eine weitere Zelle, den Osteozyten, in eine zentrale Position. Der Osteozyt scheint vielfältige Aufgaben im Knochenstoffwechsel zu übernehmen. Er ist bedeutsam für die Mechanosensorik^(3,4) des Knochens, für die endokrine Funktion und die Regulation des Knochenumbaus^(5,6). Er stellt somit einen aktiven Regulator des Knochenstoffwechsels dar. Die Rolle des Osteozyten und seines dendritischen Netzwerks ist jedoch nur unzureichend erforscht und der Zusammenhang der zellulären Veränderungen und der Osteoporose weiterhin unklar. Daneben bestehen Wissensdefizite zur Pathophysiologie der unterschiedlichen Osteoporoseformen sowie der diagnostischen und therapeutischen Optionen. Dies zeigt sich auch darin, dass nur 20 Prozent der insgesamt etwa 7,8 Millionen Patienten mit einem bei Osteoporose indizierten Arzneimittel behandelt wurden⁽⁷⁾. Außerdem fehlt es an Großtiermodellen, die mit dem Menschen vergleichbare Eigenschaften aufweisen. Bis heute gibt es kein definitiv etabliertes Tiermodell zur Osteoporose⁽⁸⁾.

Die sich bei der Osteoporose verschlechternde Knochenqualität ist gerade in der Unfallchirurgie und Orthopädie im Rahmen der Endoprothetik und Frakturversorgung von Bedeutung. Für die medizinische Versorgung stellt die sich mit dem Alter reduzierende Knochenstruktur ein zunehmendes Problem dar. Besonders für die Prävention von osteoporotischen Frakturen ist daher ein genaueres Verständnis der Pathogenese erforderlich.

1.1 Stand der Wissenschaft

1.1.1 Makroskopischer Aufbau und Funktionen des Knochens

Das menschliche Skelett besteht insgesamt aus 213 Knochen und stellt das Gerüst des Körpers und einen Bestandteil des Bewegungsapparats dar. Die Funktionen des Knochens sind allerdings vielfältig. Sie bieten eine Schutzfunktion, etwa für die Thoraxorgane oder das Gehirn, dienen des Weiteren als Calciumspeicher, der Regulation des Säure-Base-Haushalts und der Blutbildung. Der Knochen ist jedoch kein starres Gewebe, sondern unterliegt vielmehr einem dynamischen Umbau, sodass er sich regenerieren und an veränderte Belastung anpassen kann.

1.1.1.1 Einteilung

Knochen lassen sich in vier verschiedene makroskopische Typen einteilen: Lange Knochen (*Ossa longa*), wie etwa das Femur, kurze Knochen (*Ossa brevia*) z.B. die Mittelhandknochen, platte Knochen (*Ossa plana*), wie die Kalottenknochen des Schädels und irreguläre Knochen (*Ossa irregularia*). Zu letzteren zählen beispielsweise die Wirbelkörper. Einige Autoren⁽⁹⁾ teilen noch drei weitere Knochentypen ein: *Ossa pneumatica*, die luftgefüllte Hohlräume aufweisen (z.B. *Os frontale*), *Ossa sesamoidea*, die meist in Sehnen von Muskeln eingelassen sind und diese umlenken können, sowie nur unregelmäßig vorhandene Knochen: *Ossa accessoria*⁽⁹⁾.

Die Langknochen, auch Röhrenknochen genannt, lassen sich in den Schaft (*Diaphyse*) und den Kopf (*Epiphyse*) unterteilen. Zwischen *Epiphyse* und *Diaphyse* liegt die sogenannte *Metaphyse*, die die Wachstumsplatte enthält. Diese ist insbesondere in der Jugend für das Längenwachstum des Knochens bedeutsam und verschließt sich im Laufe der Adoleszenz. Dabei kann der *Epiphysenschluss* als Reifezeichen des Skelettes und somit zur Bestimmung des hormonellen Alters herangezogen werden⁽¹⁰⁾. Daneben werden *Apophysen*, knöcherne Ausziehungen, ausgebildet, an denen Muskelgruppen ansetzen oder entspringen. Als Beispiele seien hierfür der *Processus mastoideus* oder die *Tuberositas tibiae* genannt.

In der *Diaphyse* wird die Markhöhle (*Cavitas medullare*) von einer Knochenmanschette umschlossen, die aus zwei unterschiedlichen Organisationsformen des Knochens, der *Substantia Kompakta* und der *Spongiosa*, aufgebaut wird. Die äußere *Kompakta* wird von sehr dicht gebautem, lamellären Knochenmaterial, den *Osteonen*, gebildet und kann bis zu 10 mm dick sein. Die innere *Spongiosa* stellt dagegen ein geflechtartiges Werk von Knochenbälkchen dar. Von außen ist der Knochen vom *Periost* (Knochenhaut) überzogen, die für das Dickenwachstum bedeutsam ist. Im Inneren findet sich dagegen das *Endost*. Bei platten Knochen ist hingegen eine nur sehr dünne *Kompakta* zu finden,

die beim Schädelknochen als Diploe interna et externa bezeichnet wird. Dazwischen befindet sich blutbildendes Mark, das von der Spongiosa umgeben wird^(9,11).

1.1.1.2 Knochenmark und Blutversorgung

Das Knochenmark lässt sich in zwei Formen unterteilen: das blutbildende (hämatopoetische) Mark, auch rotes Knochenmark genannt und das gelbe, sogenannte Fettmark. Letzteres findet sich beim Adulten insbesondere in den Diaphysen, wohingegen blutbildendes rotes Mark beim Feten ubiquitär und beim Adulten nur in den planen Knochen und den Epiphysen zu finden ist. Auf Grund der regulativen Funktionen und der Hämatopoese, muss der Knochen gut mit Blut versorgt sein. Dazu wird er mit einem Gefäß, der Arteria nutricia, durch das Foramen nutricium mit Blut gespeist⁽¹¹⁾.

1.1.1.3 Knochenstatik

Der Knochen kann sich entsprechend der auf ihm ruhenden Belastung anpassen. Dabei kann er sowohl in seiner Dicke zunehmen als auch seine Binnenarchitektur verändern. Knochen zeichnen sich einerseits durch Härte und andererseits durch Elastizität aus. Diese Eigenschaften sind durch die Zusammensetzung der Knochenmatrix bedingt. Härte und Druckfestigkeit werden durch die enthaltenen Kalziumphosphat-Kristalle (Hydroxylapatit) hervorgerufen, wohingegen die Elastizität und die Zugfestigkeit durch die trajektorieell ausgerichteten Kollagenfibrillen entstehen⁽¹²⁾.

Dabei gilt es durch eine Leichtbauweise, höchst mögliche Stabilität mit einem geringen Eigengewicht zu erlangen. Aus diesem Grunde müssen die einwirkende Kraft und die Knochenstatik ideal aufeinander abgestimmt sein. Dafür ist insbesondere der adulte Lamellenknochen bedeutsam. Er besteht in der Kompakta aus den Osteonen, die in Spiraltouren verlaufen. Durch die gegenläufige Anordnung der einzelnen Lamellen kann bei Belastung der Druck so ausgelenkt werden, dass der Knochen versteift.

Auch die Anordnung der Spongiosabälkchen trägt entscheidend zur Leichtbauweise bei. Durch die Orientierung entlang der Druckverläufe bilden sie einen trajektorieellen Verlauf aus, der dem Druck entgegen wirkt. Hierbei lassen sich sowohl Druck- als auch Zugtrabekel unterscheiden. Letztere verlaufen häufig um den Knochen herum und stehen senkrecht zu den Drucktrabekeln⁽¹¹⁾. Dadurch ist es dem Knochen möglich, sowohl Druck- als auch Zugkräften zu widerstehen und Belastungen auf den gesamten Knochen zu verteilen oder diese in andere Kräfte umzuwandeln. Die makroskopische Architektur bildet somit eine ideale Anpassung an die einwirkende Belastung ab.

1.1.2 Mikroskopischer Aufbau des Knochens

Histologisch stellt Knochen ein hartes Bindegewebe dar, das zu etwa 70 % aus Mineralien, zu ca. 20 % aus organischer Substanz und zu 5- 10 % aus Wasser besteht. Darin enthalten sind verschiedene Zelltypen und die mineralisierte Extrazellulärmatrix (EZM). Die Knochenmatrix wird aus organischen Komponenten, wie Kollagen Typ I und anorganischen Komponenten, insbesondere aus Hydroxylapatit-Kristallen, gebildet.

Alle inneren Knochenflächen werden von der inneren Knochenhaut, dem Endost, bekleidet. Diese dünne Schicht nicht mineralisierten Osteoids liegt sowohl den Trabekeln als auch den Haverskanälen an und wird von länglichen Knochenzellen, den Lining-Zellen abgeschlossen. Auch Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten sind hier zu finden. Nach außen wird der Knochen von der äußeren Haut, dem Periost, bedeckt. Neben der Zugübertragung durch die Muskeln dient das Periost als Proliferations- und Rekrutierungszone für Knochenzellen. Daneben ist es sehr gut vaskularisiert und nerval versorgt. Von hier geht das appositionelle Dickenwachstum des Knochens aus^(12,13).

1.1.2.1 Knochenarten

Histologisch und entwicklungsgeschichtlich lassen sich zwei Knochenarten unterscheiden. Zuerst wird der Geflechtknochen gebildet, der sich im Laufe der Knochenreifung zu Lamellenknochen umwandelt. Bei ersterem sind die Kollagenfasern geflechtartig verwoben. Diese Art entsteht vor allem bei sehr schneller Knochenbildung wie bspw. nach Frakturen oder in der Knochenentwicklung. Die gebildete Knochenart wird dabei durch die Spezialisierung der Osteoblasten beeinflusst⁽¹⁴⁾.

Im Laufe der Entwicklung wird dieser primäre Knochen in den sekundären Lamellenknochen umgewandelt. Durch die Lamellen erhält er eine höhere Stabilität. Eine Knochenlamelle ist eine Knochenschicht von etwa 3- 5 µm Dicke, die aus regelmäßig angeordneten mineralisierten Knochenfibrillen besteht. Dabei wechselt die Verlaufsrichtung der Fibrillen „fischgrätenartig“ mit jeder Lamelle. In der Spongiosa sind die Lamellen überwiegend parallel zur Trabekeloberfläche angeordnet. Sie weisen einen flächigen, jedoch ebenfalls gegenläufigen Verlauf auf. Durch die geringe Trabekeldicke von etwa 300 µm werden die avaskulären Bälkchen über Diffusionsvorgänge versorgt⁽¹²⁾.

Grundbausteine des Lamellenknochens sind zylindrisch aufgebaute Osteone. Ein Osteon, auch Havers-System genannt, besteht aus verschiedenen Schichten gegenläufiger Lamellen aus mineralisierten Kollagenfibrillen und Matrix (Abb. 1b). Etwa 4- 20 konzentrische Lamellen bilden ein Osteon (Speziallamellen). Zwischen den einzelnen Lamellen liegen die Osteozyten, die mit ihren dendritischen Ausläufern über kleine Knochenkanälchen (Kanalikuli) miteinander verbunden sind.

Im Innersten des Osteons befindet sich der Havers-Kanal, ein Hohlraum dessen Wände von Endost bedeckt sind. Darin enthalten ist ein Blutgefäß zur vaskulären Versorgung sowie ein Neuron. In der Regel liegt der Durchmesser bei etwa 20 µm. Jedes Osteon wird durch eine faserarme, proteoglykanreiche Kittlinie (Linea cementalis) nach außen hin abgeschlossen und nimmt im Querschnitt etwa 100- 400 µm ein. In der Diaphyse langer Röhrenknochen umschließen jeweils mehrere konzentrische Generallamellen den Knochen (Abb. 1A/ B). Reste von alten, abgebauten Osteonen sind im Knochen histologisch häufig als Schaltlamellen zu beobachten⁽¹¹⁾. Die gute Vaskularisierung des Lamellenknochens erfolgt sowohl über die Havers-Kanäle als auch über senkrecht dazu verlaufende Volkmann-Kanäle, die erstere untereinander verbinden⁽¹⁵⁾. In Abbildung 1 wird der Aufbau des Knochens mit Spongiosa und Kompakta deutlich.

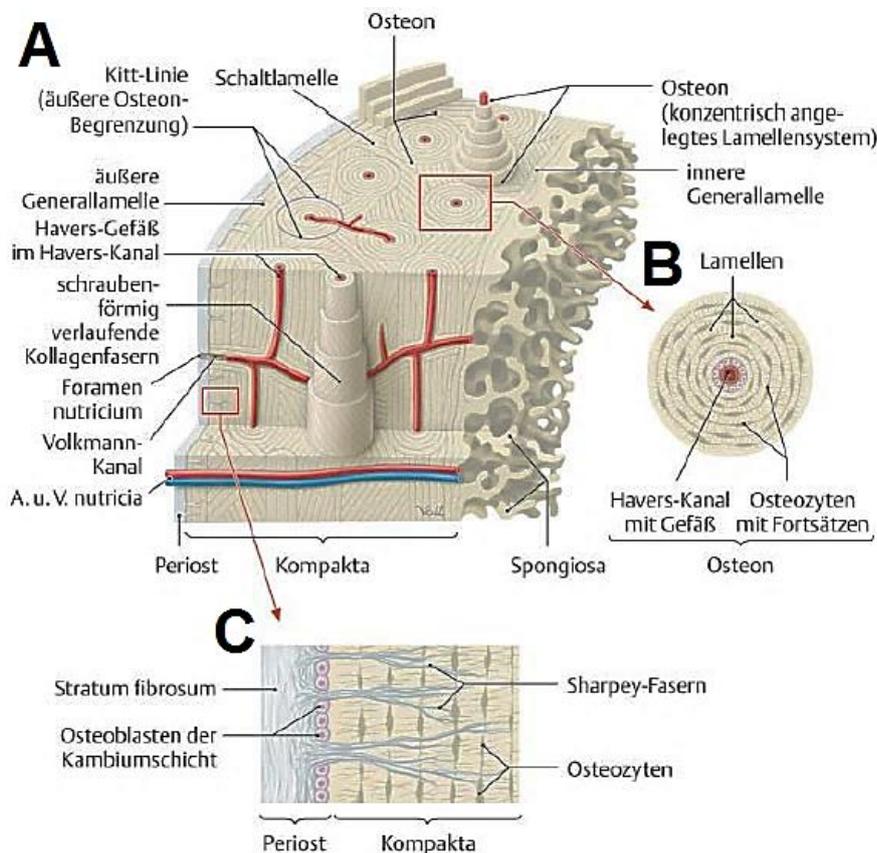


Abbildung 1: Aufbau des Lamellenknochens:

Abbildung 1A zeigt einen Knochenquerschnitt mit Spongiosa innen und Kompakta außen. Die Spongiosa besteht aus Knochenbälkchen, während die Kompakta aus Osteonen aufgebaut ist. Osteone bestehen aus schraubentourig angeordneten Lamellen von mineralisierter Matrix. Zwischen diesen Lamellen befinden sich die Osteozyten (Abb. 1B) und im Inneren der Havers-Kanal. Die Vergrößerung (Abb. 1C) zeigt die Knochenhaut (Periost) mit den entspringenden kollagenen Sharpey-Fasern.

Grafik entnommen aus: Aumüller: Duale Reihe Anatomie⁽¹¹⁾

1.1.3 Knochenentwicklung

Die Entwicklung des Knochens wird auch als Ossifikation bezeichnet. Dabei wird nicht-mineralisierte Substanz (Osteoid) extrazellulär angehäuft, anschließend mineralisiert und dadurch zu Knochengewebe umgewandelt. Bei der individuellen Knochenbildung (Osteogenese) werden zwei verschiedene Abläufe unterschieden: die *desmale und chondrale Osteogenese*.

Bei der *desmalen* Knochenbildung entsteht der Knochen ohne Umwege durch direkte Bildung von Knochenzellen mit einem primären Mineralisationskeim aus Osteoid. Dieser

wird erst interstitiell, dann appositionell von Osteoblasten vergrößert und mineralisiert⁽¹²⁾. Die *chondrale* Osteogenese läuft dagegen nicht direkt, sondern über ein knorpeliges Zwischengerüst (Primordialskelett) ab. Hierfür sind neben Mesenchymzellen initial auch Chondrozyten beteiligt. Das Knorpelmodell wird anschließend durch Osteozyten in ein Knochengerst umgebaut. In Abhängigkeit der Lage wird die enchondrale von der perichondralen Ossifikation unterschieden, auf die allerdings hier nicht näher eingegangen werden soll. Durch enchondrale Ossifikation entsteht die Spongiosa, durch perichondrale Ossifikation der Lammellenknochen der Kompakta⁽¹¹⁻¹³⁾.

1.1.3.1 Knochenwachstum

Das Knochendickenwachstum ist lebenslang über das Periost möglich. Aus diesem differenzieren sich Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten, die nicht-mineralisierte Matrix ablagern und selber wieder von andern Osteoblasten eingemauert werden. Somit entsteht schichtweise (appositionell) neue Kortikalis. Auf diese Art kann sich der Knochen, entsprechend seiner Belastung, anpassen und umbauen.

Das Längenwachstum dagegen ist zeitlich limitiert, da sich mit dem Schluss der Epiphysenfuge, die Wachstumszone des Knochens verschließt. Bei der Wachstumszone handelt es sich um einen schmalen Streifen proliferierenden, nicht-mineralisierten Knorpel, der zwischen der Epiphyse und der Metaphyse liegt. Innerhalb der Wachstumsfuge bauen Chondrozyten sich zu säulenartigen Formationen auf, die in der Folge von sich differenzierenden Osteoblasten als Grundstruktur für die Mineralisation der Knochenmatrix benutzt werden. Durch den Proliferationsstopp der Chondrozyten, werden letztere eingemauert und durch Osteozyten ersetzt, womit sich die Wachstumsplatte verschließt und das Längenwachstum sistiert⁽¹²⁾. Dabei gibt es abhängig vom Knochen unterschiedliche Schlusszeiten, die insbesondere durch die hormonelle Situation beeinträchtigt werden⁽¹⁰⁾.

1.1.4 Interzellulärsubstanz

Der Knochen besteht zu etwa 70 % aus Mineralien, zu etwa 20 % aus organischer Substanz und zu etwa 5- 10 % aus Wasser. Neben dem zellulären Anteil wird die organische von der anorganischen Matrix unterschieden.

1.1.4.1 Organische Matrix

Die organische Knochenmasse besteht aus bis zu 85 bis 90 % Kollagenfasern. Insbesondere Typ I wird exprimiert, wobei auch andere Formen wie Typ III und Typ V sowie stabilisierende und vernetzende Adaptorproteine vorkommen. Daneben finden sich weitere Proteine⁽¹⁶⁾ für die Fibrillensynthese und in der Steuerung der Mineralisation. Auch Albumin ist hierfür wichtig. Dieses Protein ist in der Lage, die alkalische Phosphatase zu binden und somit in die Knochenmineralisation einzugreifen. Daneben

kommen α_2 -HS-Glykoprotein und Proteine der extrazellulären Matrix wie: Aggrecan, Versican, Decorin und Biglycan vor. Diese Proteine wirken sich insbesondere auf die Fibrillogenese aus⁽¹³⁾.

1.1.4.2 Anorganische Knochenmatrix

Der Großteil des Knochens wird durch die anorganische Matrix gebildet, die insbesondere aus Hydroxylapatit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ sowie zu geringeren Anteilen aus Magnesium, Carbonaten und sauren Phosphaten aufgebaut ist. Die anorganischen Komponenten sind dabei wichtig für die Mineralisation, die zunächst in den Lücken zwischen den Kollagenfasern beginnt⁽¹⁷⁾. Primäre Mineralisationskeime bilden den Ursprung für weitere Kristallisationen. Auch vesikuläre Keime mit einem Zentrum aus Proteinen, sauren Phospholipiden, Calcium und Phosphaten, tragen dazu bei^(16,18). Das Ausfällen der Inhaltsstoffe, insbesondere von Hydroxylapatit, führt im Anschluss zur Mineralisation. Der genauere Prozess ist allerdings noch ungeklärt. Jedoch wirken sich Proteine, wie die membranständige alkalische Phosphatase oder das Dentin-Matrix-Protein 1 regulierend aus⁽¹⁹⁾.

Der Mineralgehalt sorgt für eine hohe Knochenrigidität, wohingegen der organische Anteil für die Flexibilität des Knochens verantwortlich ist. Beim Alterungsprozess wird organische Substanz reduziert, während der anorganische Anteil zunimmt. Es kommt zu einer vermehrten Steifheit und zu einem geringeren Biegevormögen, was sich klinisch durch eine höhere Rate an Knochenbrüchen und Absplitterungen auswirken kann.

1.1.5 Knochenzellen

1.1.5.1 Osteoblasten

Osteoblasten sind die Vorläuferzellen der Osteozyten. Sie entstammen aus mesenchymalen Stammzellen, aus den zeitlebens unter dem Einfluss verschiedener Faktoren, wie zum Beispiel Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), neue Osteoblasten nachgeliefert werden können. Durch spezielle Transkriptionsfaktoren, wie Sox9, Runx2 und Osx differenzieren sich die Vorläufer weiter zu reifen Osteoblasten^(20,21).

Aktive Osteoblasten besitzen eine kubische Form und viel raues endoplasmatisches Retikulum. Sie stellen die „Knochenbildner“ des Körpers dar und sind verantwortlich für die Kollagensynthese und die Regulation der Mineralisation. Dem Knochen liegen die Osteoblasten entweder auf der inneren Seite (Endost) oder der äußeren Seite (Periost) an, wobei sie auf einer dünnen unmineralisierten Schicht, dem Osteoid, sitzen. Der Osteoblast kann sich anschließend weiter zur *Lining-Zelle* oder zum *Osteozyten* differenzieren. Dabei verändert er nicht nur seine Morphologie, sondern auch seine Funktion⁽²²⁾.

Als Knochenbildner wird insbesondere Kollagen I produziert, das in der extrazellulären Matrix als triple-helikale Struktur vorliegt. Andere wichtige Proteine sind Osteocalcin und Osteonectin. Die Proteine stellen etwa 45 % der nicht-kollagenen Knochenmatrix dar. Osteocalcin wirkt hemmend auf die Knochenneubildung, während bei Osteonectin von einer Beeinflussung der Knochenzellendifferenzierung ausgegangen wird⁽²³⁾.

Weitere sekretierte Proteine sind Ankerproteine sowie Biglycan und Decorin. Letzteres reguliert die Fibrillogenese der Kollagen-Fasern. Ein wichtiges Markerenzym der Osteoblasten ist die alkalische Phosphatase (ALP). Dieses membranständige Enzym katalysiert Prozesse bei der Knochenmineralisation⁽¹⁶⁾. Immunhistochemisch kann es für Färbungen herangezogen werden⁽²⁴⁾.

1.1.5.2 Lining-Zellen

Eine mögliche Differenzierungsform des Osteoblasten ist die sogenannte „Lining-Zelle“, die die Knochenoberfläche zum Knochenmark hin bedeckt⁽²⁵⁾. Normalerweise ist die Oberfläche des ruhenden Knochens von einer 1- 2 µm dicken unmineralisierten Kollagenmatrix bekleidet, auf der sich die Lining-Zellen befinden. Diese nehmen eine längliche, flache Form ein. Genaue Funktionen und Aufgaben sind noch unklar, es wurde aber postuliert, dass sie sowohl Osteoklasten aktivieren und anlocken als auch für letztere die Knochenoberfläche entsprechend vorpreparieren können⁽²⁶⁾. Möglicherweise produzieren Lining-Zellen Kollagenasen, die die Matrix abbauen, damit die Osteoklasten zur eigentlichen Knochenoberfläche gelangen können⁽²⁶⁾.

1.1.5.3 Osteozyten

Morphologie

Wurde der Osteozyt früher als passive Knochenzelle oder Platzhalter angesehen, so wurde dies durch den Wissenszuwachs in den letzten Jahrzehnten revidiert. Durch eine Vielzahl von Studien und experimentellen Modellen kann der Osteozyt als endokrines Organ des Knochens beschrieben werden⁽²⁷⁾.

Der Osteozyt ist eingebettet in die Knochenmatrix und liegt in einer knöchernen Höhle, der sogenannten Lakune. Dabei bildet er 90 bis 95 % der zellulären Komponente des Knochens⁽²⁸⁾. Er weist eine durchschnittliche Größe von 15- 20 µm auf und stellt als aktiver Osteozyt eine längliche bis spindelförmige Zelle mit sternförmiger Morphologie dar. Vom Zellleib gehen dendritenartige Zytoplasmaausläufer ab, die sich in knöchernen Kanälchen (Kanalikuli) erstrecken (Abb. 2, S.11). Die Ausläufer messen etwa 250- 300 nm im Querschnitt^(28,29). Jeder Osteozyt besitzt abhängig vom Zellalter 40- 100 Dendriten pro Zelle⁽³⁰⁾. Über die Dendriten wird das osteozytäre lakunokanalikuläre System (OLCS) ausgebildet, in dem sie mit den Dendriten der Nachbarzellen und deren Lakunen

kommunizieren. Mittels bestimmter Zell-Zellkontakte, den Gap-Junction (Connexon), werden Signale an andere Knochenzellen, wie Osteoblasten und Osteoklasten (Abb. 5, S. 15), aber auch an Muskelzellen und an das Gefäßsystem übermittelt⁽³¹⁾.

Differenzierung

Osteozyten stammen von mesenchymalen Stammzellen ab und bilden eine Zellfamilie, zu der auch Zementozyten in den Zahnknospen und hypertrophe Chondrozyten in den Epiphysenfugen gezählt werden. Osteoblasten können durch Osteozyten mittels bestimmter Signale rekrutiert werden und sich weitergehend differenzieren. Durch bestimmte Transkriptionsfaktoren, wie Runx2, Osx, OSF-1⁽³²⁾, OSF-2⁽²⁰⁾ und BMP-2 sowie BMP-4⁽³³⁾, wird die Differenzierung der Stammzelle über den Osteoblasten zum Osteozyten hin angestoßen. Auch bestimmten Gewebsmediatoren, wie dem Zytokin Interleukin 6 (IL6), wird dabei eine Rolle zugesprochen. Bei Zytokinen handelt es sich um lokal wirkende Signalstoffe, die Zellen in ihrer Aktivität und Proteinexpression beeinflussen können.

Der Osteoblast kann sich terminal zum *Osteozyten* oder zur *Lining-Zelle* weiter differenzieren⁽²²⁾. Lange wurde davon ausgegangen, dass der Osteoblast durch die passive Ummauerung mit Osteoid von Nachbar-Osteoblasten immobilisiert und sich dadurch zum Osteozyten hin differenzieren und morphologisch umwandeln würde. Es konnte jedoch demonstriert werden, dass es sich vielmehr um einen aktiven Prozess handelt, bei dem der Osteozyt durch aktive Invasion die extrazelluläre Matrix degradiert. Dabei wirken membranverankerte Matrix-Metalloproteasen (MMP) mit⁽³⁴⁾.

Markerproteine und endokrine Funktionen

Bei der Transformation vom Osteoblasten zum Osteozyten werden phasenabhängig bestimmte Markerproteine exprimiert. Beispielsweise weist der Osteoblast noch einen hohen Gehalt an alkalischer Phosphatase auf, wohingegen der Osteozyt diese nicht mehr ausprägt und stattdessen Sclerostin produziert⁽³⁵⁾. Der Osteozyt nimmt trotz seiner marginalen Lage im Inneren des Knochens, mit dem Fibroblast-Wachstums-Faktor (FGF) 23, eine endokrine Funktion ein. Das lakunokanalikuläre Transportsystem ermöglicht es ihm über die Gap-Junction Stoffe in das vaskuläre Kreislaufsystem und in seine Umgebung zu sezernieren. Somit nimmt er aktiv an systemischen Regulationsmechanismen teil. Dabei spielen spezielle Proteine wie PHEX⁽³⁶⁾, MEPE⁽³⁷⁾, DMP1⁽³⁷⁾, Sclerostin⁽³⁸⁾ und das Effektorprotein Fibroblast-Wachstumsfaktor 23^(39,40) eine wichtige Rolle in der Mineralisation sowie im systemischen Calcium- und Phosphathaushalt. Auf die einzelnen Funktionen soll hier nicht näher eingegangen werden.

Dendritennetzwerk

Beim Einbau des Osteoblasten werden einige gravierende Entwicklungsschritte durchlaufen, bei denen er sowohl seine Form als auch die Proteinexpression (bestimmter Markerproteine) verändert. Durch den Umbau des Zytoskeletts wandelt sich die Morphologie vom isoprismatischen Osteoblasten hin zum sternförmigen Osteozyten^(41,42).

Daneben werden Dendriten ausgebildet die sich zur Knochenoberfläche hin orientieren. Die Ausprägung in die Knochenperipherie ist geringer. Kortikal verlaufen die Zellausläufer parallel und annähernd rechtwinklig zur Oberfläche⁽⁴³⁾. Die Gesamtheit der Dendriten bilden gemeinsam mit den Lakunen, in denen sich die Zelleiber befinden, das osteozytäre lakunokanalikuläre System (OLCS). Das Dendritenwerk ordnet sich entsprechend seiner Anforderung aus, wobei der Ausbau durch Zementlinien unterbrochen wird. Zwar orientieren sich Osteozyten parallel zu Zementlinien, ihre Dendriten können sie jedoch nicht passieren und kehren daher an ihnen ihre Orientierung um⁽⁴¹⁾. An der Regulation der Dendritenformation sind bestimmte Proteine (E11)⁽⁴³⁾ beteiligt und ermöglichen eine nachträglich veränderte Orientierung⁽⁴⁴⁾.

Das dendritische System ist somit ein dreidimensionaler Kommunikationsweg aus Zellfortsätzen, über das Signalstoffe ausgetauscht, Zellen rekrutiert und inhibiert werden können. Für die Kommunikation sind insbesondere die Gap-Junction bedeutsam⁽⁴⁵⁾. Das lakunokanalikuläre System ist allerdings nicht von statischem Aufbau, sondern verändert sich in Abhängigkeit von Alter und Funktionszustand der Zelle^(34,46). Der Transportweg über das dendritische Netzwerk ermöglicht somit den Austausch von Stoffen und die Kommunikation mit anderen Zellen. Dadurch ist ein direkter Einfluss auf die Knochenhomöostase möglich^(47,48).

Mechanosensorik

Eine wichtige Aufgabe des Osteozyten liegt in der Mechanosensorik, da der Osteozyt als Belastungssensor das zentrale Element für die Regulation des Knochenwachstums bildet. Durch verstärkte Beanspruchung des Knochens wird der Aufbau angeregt. Mangelnde Belastung führt dagegen zum Knochenschwund und zum Absterben des Osteozyten⁽³¹⁾. Letzteres findet sich bei länger hospitalisierten Patienten oder auch in der Schwerelosigkeit⁽⁴⁹⁾.

Es wird davon ausgegangen, dass mechanischer Druck zu einem Flüssigkeitsstrom im umgebenden Interstitium des lakunokanalikulären Systems führt. Der Osteozyt kann vermutlich den Strom wahrnehmen, da er sich mit seinen Fortsätzen der mechanischen Belastung nach orientiert⁽⁵⁰⁾ und mit bestimmten mechanosensitiven Proteinen (CD44-Protein) und Haftproteinen (Integrin- $\alpha_v\beta_3$) assoziiert ist^(51,52). Allerdings ist unklar, welcher Teil des Osteozyten den Scherstress detektiert. Verschiedene Forscher schreiben es

sowohl dem Zellkörper^(53,54), den Dendriten oder dem Primär-Cilium^(53,54) isoliert oder in Verbindung zu⁽⁵⁵⁾. An der Weiterleitung sind auch das Aktinfilamentsystem und die C43-Kanäle beteiligt⁽⁵⁶⁾. Die Form der Lakune könnte hier eine Verstärkungsfunktion einnehmen⁽⁵⁷⁾. Komplexe Regulationskaskaden über den Wnt/ β -Catenin Signalweg wirken sich auf die Genexpression aus und können osteoanabole Faktoren über das dendritische Netzwerk an Osteoblasten freisetzen⁽³⁾.

Osteozytäre Osteolyse und Mikropetrose

Die Lakunengröße ist jedoch keinesfalls eine stabile Variable⁽⁵⁸⁾. Vielmehr ist es dem Osteozyten möglich, sie in Abhängigkeit des Calcium- und Phosphatbedarfs zu regulieren (Abb. 2). In Zeiten von Hypocalciämie kann der Osteozyt aktiv seine Lakunengröße erweitern, indem er die extrazelluläre Matrix abbaut und resorbiert. Dieser Vorgang wird als osteozytäre Osteolyse⁽⁵⁹⁾ und von einigen Autoren als perilakunärer Umbau beschrieben⁽⁶⁰⁾. Gerade laktierende Frauen sind einem erhöhten Calciumumsatz ausgesetzt, was sich durch eine Zunahme der Lakunengröße darstellt⁽⁶¹⁾ (Lakune 1 Abb. 2). Daneben verändert sich die Kanalikulbreite sowie die Expression von Abbauenzymen (TRAP, Cathepsin K)⁽⁶²⁾. Auch bei anderen Knochenerkrankungen, wie Osteomalazie und Hyperparathyreodismus, konnten vergrößerte Volumina aufgefunden werden. Gerade das Parathormon scheint dies zu regulieren⁽⁶³⁾.

Dadurch kann von einem aktiven Umsatz der Knochensubstanz durch den Osteozyten gesprochen werden⁽⁶⁴⁾. Bei alternden Osteozyten findet sich dagegen eine Hypermineralisation des perilakunären Raumes, wodurch dieser ausgefüllt und der Osteozyt apoptotisch wird (Mikropetrose) (Lakune 3 Abb. 2). Sowohl die statischen als auch die kommunikativen Eigenschaften des Knochens werden hiervon beeinflusst^(65,66).

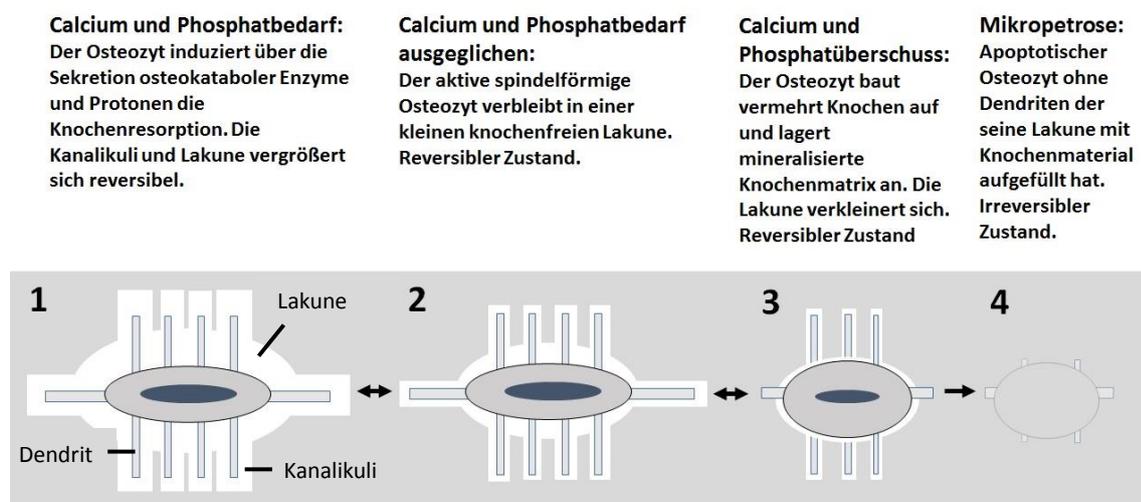


Abbildung 2: Regulation der lakunokanalikulären Mineralisation:

Die Abbildung zeigt die Größe der Osteozyten-Lakune bei unterschiedlichem Calciumbedarf. Ist dieser hoch (Lakune 1) nimmt die Lakunengröße zu, während bei geringem Bedarf, Matrix angebaut wird (Lakune 3). Beim Absterben des Osteozyten (Lakune 4) wird diese mit Mineralien aufgefüllt (Mikropetrose). (Eigene Abbildung).

Apoptose und Osteoklastenaktivierung

Die Gründe für den Zelltod der Osteozyten sind mannigfaltig. Bestimmte Toxine wie Diphtherietoxin, Glukokortikoide, Sauerstoffmangel, Immobilisation und weitere Faktoren können zur Apoptose führen⁽⁶⁷⁾. Auch Unterbrechungen des dendritischen Netzwerks werden mit der Apoptose in Verbindung gebracht^(68,69). Eng mit dem Zelltod der Osteozyten ist die Aktivierung der knochenresorbierenden Osteoklasten verbunden. Diese spielen eine entscheidende Rolle für die Regulation des Knochenstoffwechsels. Hiermit tragen sie zur Regeneration des Gewebes, zur Funktionserhaltung sowie für die belastungsgerechte Anpassung des Knochens bei.

Dabei scheinen sowohl aktive als auch präapoptische Osteozyten, die Monozytogenese und die Chemotaxis der Osteoklasten zu beeinflussen. Auch Osteoblasten sind daran beteiligt. Osteoblasten und Osteozyten produzieren ein osteoklasten-aktivierendes Protein, den sogenannte Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL). Dieser wird unter anderem auf der dendritischen Oberfläche exprimiert⁽⁶⁹⁾. Der RANK-Ligand interagiert bei der Stimulation mit dem RANK-Rezeptor auf Osteoklasten (s. Abb. 3). Allerdings regulieren nicht die apoptotischen, sondern die direkt umgebenden Osteozyten RANKL hoch („Penumbra“)⁽⁷⁰⁾. Regulatorisch können sich benachbarte Osteozyten mittels Osteoprotegerin auf das Ausmaß des Resorptionsareals auswirken⁽⁵⁾. Die nachfolgende Abbildung 3 zeigt die Einflüsse auf die Osteoklastenaktivierung sowie auf das Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten.

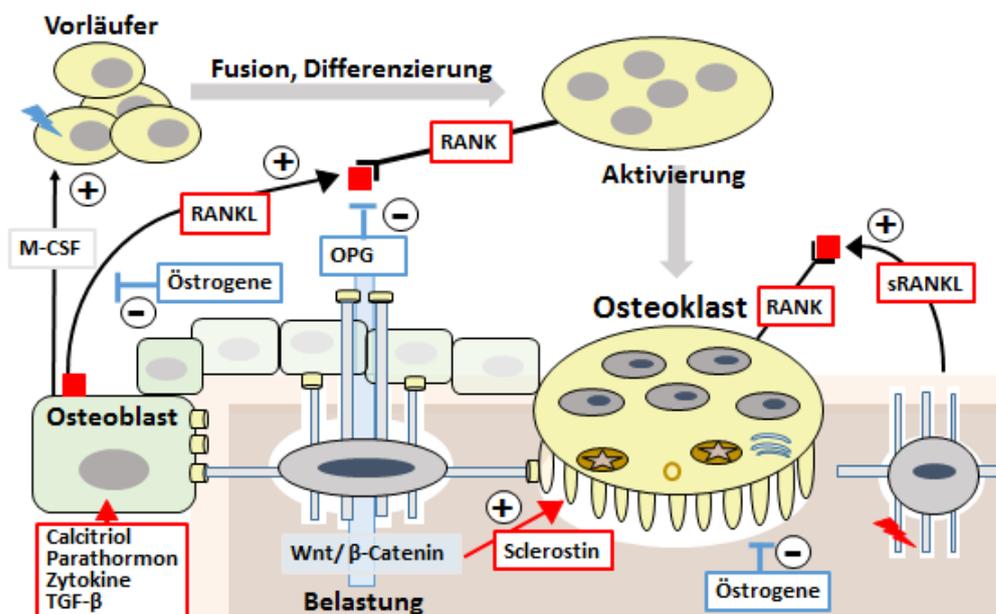


Abbildung 3: Koordination der Osteoblasten und Osteoklasten:

Osteoblasten (Ob) produzieren Osteoklasten (Ok) -stimulierende Faktoren wie M-CSF, die die Rekrutierung und Fusion aktivieren. Über aktivierende Rezeptorinteraktionen zwischen RANK und RANKL werden die Ok-Vorläufer zur Fusion zum reifen Osteoklasten angeregt. Dabei hemmt Osteoprotegerin (OPG) diese Interaktion, wohingegen Östrogene (E) die RANKL-Expression unterdrücken und auch die Aktivität der Osteoklasten beeinflussen. Viele weitere Faktoren und Hormone wirken zudem auf den Ob. ein. Der Osteozyt kann durch Belastung über den Wnt/ β -Catenin Weg die Fusion hemmen, bei Netzwerkfrakturen aber auch selber Osteoklasten aktivieren. (Eigene Abbildung).

Ein sinkender Calciumspiegel im Blut vermittelt über Parathormon aus der Nebenschilddrüse die Aktivierung von Osteoblasten. Durch Parathormon wird von Osteoblasten vermehrt der RANK-Ligand (RANKL) produziert sowie der Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor (M-CSF) freigesetzt. Dabei handelt es sich um ein Protein, das die hämatopoetischen Vorläuferzellen rekrutiert und zur Proliferation anleitet. Osteoklasten-Vorläufer besitzen hierfür einen membranständigen Rezeptor, den sogenannten RANK-Rezeptor. Über eine Aktivierung der Vorläufer mittels RANKL-RANK-Interaktion, fusionieren sie zum reifen Osteoklasten (Abb. 3).

Der Osteoblast und auch der Osteozyt reguliert die Aktivierung über Osteoprotegerin (OPG), das RANK bindet und so die RANK-RANKL-Interaktion verhindern kann. Auch Östrogene wirken sich hemmend auf die Osteoklastenrekrutierung aus, was den Einfluss von Östrogenen in der Pathogenese der postmenopausalen Osteoporose unterstreicht (Abb. 3). Auch Calcitonin wirkt osteoprotektiv, da es an Rezeptoren der Osteoklasten bindet und deren Aktivität hemmt. Zytokine und Wachstumsfaktoren aus der Matrix fördern die Proliferation der Osteoblasten und die Osteoidsynthese⁽¹²⁾. Calcitriol hingegen stimuliert die osteoklastäre Proliferation.

Mechanische Belastung durch fluiden Scherstress, wirkt sich schützend auf den Knochen aus und bewahrt ihn vor Resorption (Abb. 4). Über die Transduktion des Sensorpotentials werden sowohl Prostaglandine freigesetzt als auch der Wnt/ β -Catenin Signalweg angestoßen. Dieser resultiert in der Produktion von anti-apoptotisch wirkendem Osteoprotegerin⁽⁷¹⁾. Belastung und Mobilisation sind daher essentiell für einen gesunden Knochenhaushalt (Abb. 4).

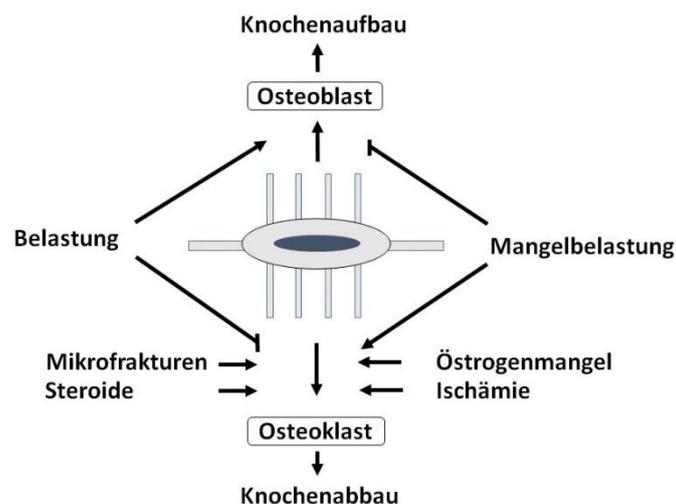


Abbildung 4: Die zentrale Rolle des Osteozyten im Knochenanabolismus und -katabolismus:

Auf der Abbildung sind hemmende und aktivierende Einflüsse auf die Knochenneubildung durch Osteoblasten und Resorption durch Osteoklasten dargestellt. Vielfältige Faktoren könnten die Apoptose des Osteozyten und somit den Knochenabbau über den Osteoklasten anstoßen. Belastung wirkt sich dagegen osteoprotektiv und knochenanabol über den Osteoblasten aus. Grafik modifiziert nach Atkins et al.: Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take⁽⁵⁸⁾.

1.1.5.4 Osteoklasten

Die schon beschriebenen Osteoklasten stellen die knochenresorbierenden Zellen dar. Sie entstehen aus der Fusion von Vorläuferzellen, die von Osteoblasten über M-CSF rekrutiert und RANKL stimuliert wurden. Osteozyten können dagegen die Aktivierung mittels OPG hemmen (Abb. 3).

Reife Osteoklasten sind große Zellen mit einem Durchmesser von 50 bis 100 μm . Durch die Fusion (Syncytium) besitzen sie etwa 10 Zellkerne und einen hohen Anteil an Mitochondrien und Lysosomen für die phagozytotische Funktion⁽⁷²⁾. Eine morphologische Besonderheit stellt ihre eingefaltete basale Membranseite dar. Sie wird auch als „ruffled-border“ bezeichnet. Die durch die Membraneinfaltungen vergrößerte Zelloberfläche schafft eine vermehrte Fläche für Protonenpumpen sowie für den Sekretions- und Resorptionsapparat (Abb. 5)⁽⁷³⁾.

Die Funktion der Osteoklasten besteht darin, die organische und anorganische Knochensubstanz abzubauen und durch Transzytose abzutransportieren. Dadurch wird die Grundlage für den funktionellen Knochenumbau geschaffen. Osteoklastentrupps fressen spezielle Gruben, sogenannte Resorptionslakunen oder „Howship-Lakunen“, in den spongiösen Knochen sowie Bohrkanäle in die Kompakta. Diese werden an den Kontaktstellen zwischen Osteoklast und dem Knochenrand über eine Versiegelungszone mittels Integrinen abgeschottet und somit als Funktionsraum isoliert⁽¹²⁾.

Im Ruffled-border-Saum der Osteoklasten befindet sich die primär aktive H^+ -ATPase, die Protonen in die Resorptionslakune pumpt. Durch die Protonen wird im abgeschotteten Raum ein pH-Wert von circa 4,5 erreicht. Dabei stammen die H^+ -Ionen von der Carboanhydrase ab, die aus H_2O und $\text{CO}_2 \rightarrow \text{HCO}_3^-$ und H^+ generiert. Ein Chloridkanal ermöglicht es Cl^- -Ionen in die Lakune zu diffundieren, sodass sich dort HCl bildet. Auch lysosomale Enzyme werden aktiv sezerniert und dienen dem Aufschluss der organischen Knochenmatrix⁽¹²⁾. Beispiele für Abbauenzyme sind Metalloproteasen und Kathepsin K, B und L. Zudem wird TRAP sezerniert, das neben der Markerfunktion in der Histologie, auch eine Rolle im Knochenabbau zu haben scheint⁽⁷⁴⁾. Abgebaute Knochensubstanz wird endozytotisch aufgenommen und transzytotisch durch die Zelle transportiert, um auf der Rückseite des Osteoklasten wieder abgegeben zu werden. Der histologische Aufbau des Osteoklasten und der Howship-Lakune ist in der folgenden Abbildung 5 dargestellt.

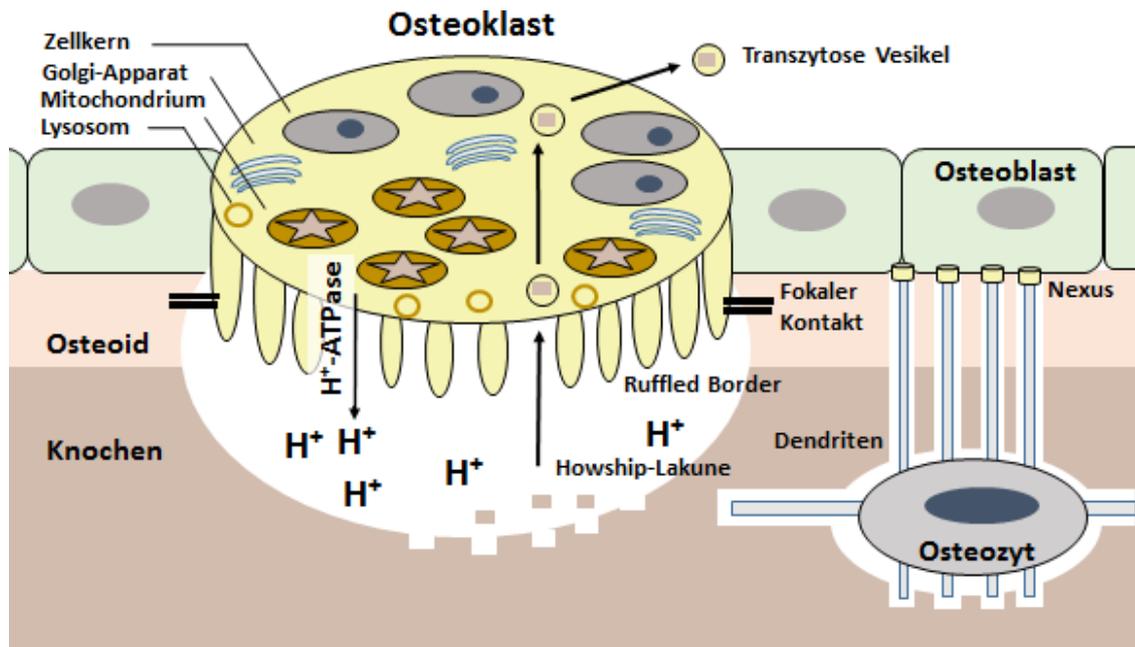


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Osteoklasten und der Howship-Lakune:

Die Grafik zeigt den Osteoklasten (Ok) mit seinem zum Knochen hin gelegenen „Ruffled-border-Saum“. Dort werden die Protonen in die Howship-Lakune sezerniert. Ebenso werden lysosomale Enzyme zur Matrix-Degradierung abgegeben. Die Mitochondrien werden insbesondere für die aktiven Sekretionspumpen benötigt. Abgebautes Knochenmaterial kann anschließend wieder aufgenommen und an der apikalen Seite sezerniert werden. Daneben zeigen sich kubische Osteoblasten, die über Nexus mit den Dendriten der Osteozyten kommunizieren. (Eigene Abbildung).

1.1.6 Regulation der Knochenstruktur

1.1.6.1 Funktioneller Knochenumbau

Physiologisch wird Knochen nach einer bestimmten Zeit ab- und umgebaut. Ursächlich hierfür sind Verschleiß, die Entstehung von Mikrofrakturen, die physiologischen Gewebserneuerung und die Anpassung an veränderte Belastung. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass Knochen kein starres Gewebe ist, sondern einem dynamischen Umbau unterliegt. Auch bei der Knochenbildung, bei der Umwandlung von Geflechtknochen in Lamellenknochen und beim Wachstum spielt der Umbau eine Rolle. Während die Kompakta jährlich nur zu etwa 4 % umgebaut wird, unterliegt die Spongiosa einem deutlich stärkerem Umbau von bis zu 28 %⁽¹²⁾.

Wie bereits beschrieben, ist die Knochenresorption eine Aufgabe des Osteoklasten und die Knochenneubildung, die des Osteoblasten. Die Prozesse kommen allerdings nicht isoliert, sondern kombiniert miteinander vor. Beide Zellentitäten bilden zusammen sogenannte knochenbildende Einheiten (Basic Multicellular Unit/ BMU).

An der Spitze der BMU befindet sich ein Trupp aus Osteoklasten, die den Knochen abbauen. An den Rändern des abgebauten Knochenareals lagern sich Osteoblasten an, die erneut beginnen Osteoid abzulagern, um in die Matrix eingebettet zu werden und

sich zu Osteozyten zu differenzieren⁽²⁵⁾. Die einsprossenden Blutgefäße und Nerven sorgen für die vaskuläre Versorgung des entstehenden Areals⁽⁷⁵⁾.

Zwischen spongiösem und kompaktem Knochen unterscheiden sich die Abbauformationen. In der Zona Compacta werden röhrenförmige Tunnel ausgebildet, an deren Spitze die BMU sitzt und sich in den Knochen hinein arbeitet. Durch den Tunnel entsteht ein neues Havers System. Im spongiösen Knochen werden hingegen flache Howship-Lakunen ausgehoben. Hier lagern sich Osteoblasten ein, füllen die Gruben lamellenartig auf und werden endostnah von Lining-Zellen bedeckt⁽¹²⁾.

1.1.6.2 Mineralisation und Regulation des Knochenstoffwechsels

Calcium ist für den Körper und für die Zelle ein lebenswichtiges Ion, dessen Serumspiegel sehr eng kontrolliert wird. Etwa 99 % des Calciums ist im Knochen gespeichert und nur ein Prozent liegt im Serum vor. Die intrazelluläre Konzentration beträgt etwa $1 \cdot 10^{-4}$ mmol/L, extrazellulär finden sich etwa 2 mmol/L freies Calcium.

Es spielt eine Rolle in der Knochenmineralisation, für die Muskelkontraktion, die elektrische Herzaktivität sowie bei der Blutgerinnung und Apoptose⁽⁷⁶⁾. Verminderte Calciumspiegel können sich systemisch auswirken und bis hin zu Muskelkrämpfen und zur Tetanie führen⁽⁷⁶⁾. Da die Zelle sehr sensibel auf Veränderung zwischen extra- und intrazellulärer Konzentration reagiert, ist die enge Regulation des Calciumhaushalts bedeutsam. Dafür stehen hauptsächlich drei Hormone zur Verfügung: Parathormon, Calcitonin und Calcitriol (Vitamin-D)^(76,77).

Parathormon

Parathormon wird in den Zellen der Nebenschilddrüse gebildet. Dieses paarige Organ besteht aus insgesamt vier Epithelkörperchen, die dorsal den Schilddrüsenlappen aufgelagert sind. Als Stimulus für die Freisetzung von Parathormon (PTH) gilt ein Abfall des Calciumspiegels unter 1,25 mmol/L.

Parathormon weist physiologisch drei Wirkungen auf: Es wirkt zum einen auf Osteoblasten ein und stimuliert sie zur Aktivierung und Rekrutierung von Osteoklasten. Durch den Knochenabbau steigt der Calcium- und Phosphatspiegel im Blut an⁽¹²⁾. Dies wird vor allem über das RANKL/OPG-Gleichgewicht reguliert, wofür RANKL vermehrt exprimiert wird (Abb. 3, S.12).

Des Weiteren wird in der Niere durch PTH die Reabsorption von Calcium gesteigert und die von Phosphat gesenkt. Ferner stimuliert PTH in der Niere die Expression der 1α -Hydroxylase, die für die renale Bildung von aktivem Vitamin-D verantwortlich ist. Ein hoher Calciumspiegel hemmt hingegen die PTH-Sekretion⁽⁷⁶⁾.

Calcitonin

Dieses Hormon wird aus den C-Zellen der Schilddrüse freigesetzt, die zwischen den Thymozytenfollikeln liegen. Calcitonin stellt meist den direkten Gegenspieler zu PTH dar. Im Knochen hemmt es direkt am Osteoklasten dessen Aktivität und senkt den Serumspiegel an Calcium und Phosphat. Ähnlich dem PTH stimuliert es in der Niere die Wiederaufnahme von Calcium und hemmt die von Phosphat. Auch Calcitonin wird über den Calcium-Serumspiegel reguliert. Fällt dieser ab, sinkt die Freisetzung und steigt bei höheren Spiegeln an⁽⁷⁶⁾. Daneben stellt Calcitonin auch einen Tumormarker für das medulläre Schilddrüsenkarzinom dar.

Calcitriol (Vitamin D₃)

Vitamin D₃ kann als einziges Vitamin endogen gebildet und exogen aufgenommen werden. Bei der körpereigenen Synthese von Calcitriol wird 7-Dehydrocholesterol unter UV-Einfluss in der Haut gebildet und in Leber sowie Niere modifiziert. In der Leber erfolgt eine Hydroxylierung zu 25-OH-D₃ (Calcifediol), das in der Niere weiter durch die 1 α -Hydroxylase zu 1,25(OH)₂-D₃ (Calcitriol) verarbeitet wird. Die Regulation erfolgt über die Phosphatkonzentration, da Calcium und Phosphat physiologische Gegenspieler sind. Hohe Phosphatkonzentrationen hemmen die Synthese von Vitamin D₃ und umgekehrt⁽⁷⁷⁾. Calcitriol führt seinerseits zu einer gesteigerten enteralen Aufnahme von Calcium und Phosphat. Die Synthese von Calcitriol wird durch niedrige Calciumspiegel stimuliert. Im Gegenzug hemmt es die Synthese von PTH und nimmt indirekt Einfluss auf die Osteoklasten⁽⁷⁶⁾.

Daneben wirken sich noch viele weitere Hormone und Gewebefaktoren auf den Calciumhaushalt und somit auf den Knochen aus. Gerade Östrogene, Glukokortikoide, Prolaktin und Somatomedine (IGF) beeinflussen die Knochenhomöostase, wobei nur auf die ersten beiden Faktoren im Kapitel Osteoporose eingegangen werden soll.

1.1.7 Knochenkrankheiten

1.1.7.1 Osteopenie

Die Osteopenie wird auch als präklinische Osteoporose bezeichnet und stellt eine Minderung der Knochendichte dar. Diese ist jedoch nicht so gravierend wie bei der Osteoporose, sondern es handelt sich vielmehr um deren Vorstufe. Die Osteopenie stellt eine reversible Form dar und muss nicht deterministisch in der Osteoporose resultieren.

Histologisch zeigt die Osteopenie dieselben Charakteristika wie die Osteoporose: den Verlust an spongösem Knochen und trabekulärem Abbau (für weitere histologische

Kriterien siehe auch Osteoporose). Daneben wird die Osteopenie mit einer gesteigerten Osteoklastogenese in Verbindung gebracht⁽⁷⁸⁾.

Die Diagnose der Osteopenie erfolgt mittels Osteodensitometrie, bei einem vorliegenden T-Score von 1,0 bis 2,5 Standardabweichungen niedriger als bei einer gesunden 30-jährigen Person gleichen Geschlechts. Ab einem T-Score von unter 2,5 SD wird die Osteoporose diagnostiziert⁽⁷⁷⁾. Durch den Verlust an Knochenmasse führt die Osteopenie zu gesteigerter Frakturhäufigkeit, jedoch in geringerem Ausmaß. Gleichsam der Osteoporose tritt sie besonders häufig bei Frauen nach der Menopause als Folge des Östrogenmangels auf. Das Risiko steigt durch dieselben Mechanismen wie Östrogenmangel, Inaktivität, Rauchen oder durch die Einnahme bestimmter Medikamente⁽⁷⁹⁻⁸¹⁾.

Wichtig ist es, die Osteopenie als Vorstufe der Osteoporose zu diagnostizieren und dem Auftreten der Osteoporose entgegen zu wirken. Hierdurch kann ein progredienter Verlauf vermieden werden.

1.1.7.2 Osteoporose

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, bei der es durch eine verringerte Knochenmasse zu einer verschlechterten Mikroarchitektur des Knochengewebes kommt. Des Weiteren liegt ein dysreguliertes Verhältnis zwischen Osteoklasten und Osteoblasten sowie eine vermehrte Knochenbrüchigkeit vor. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert einen Knochenschwund unter einem T-Score von -2,5 in der Dual-X-Ray-Absorptiometrie (DXA) als Osteoporose. Im Gegensatz zur Osteomalazie ist die Knochenmasse vermindert, die Mineralisierung des Knochens jedoch normal.

Die Osteoporose ist eine der häufigsten Krankheiten im hohen Lebensalter, wobei Frauen davon am stärksten betroffen sind. Der Knochenschwund kann bei Frauen als postmenopausale Form verlaufen (etwa bei 30 %) oder als senile Verlaufsform im höheren Lebensalter. Es ist davon auszugehen, dass im Laufe der nächsten Jahrzehnte die Inzidenz der Osteoporose weiterhin steigen wird. Dies begründet sich auf dem durch den demographischen Wandel verursachten, steigenden Anteil der älteren Bevölkerung⁽⁷⁾. Klinisch bedeutsam sind besonders die Folgen der Osteoporose und die zunehmende Prävalenz an Schenkelhals-, Radius- und Wirbelkörperfrakturen. Das 10-Jahres-Risiko eine Fraktur zu erleiden, nimmt für proximale Femora ab 75 Jahre um 20 % zu. Ebenso weisen Oberschenkelhalsfrakturen immer noch eine sehr hohe Mortalität von bis zu 10 bis 20 % pro Jahr auf⁽⁷⁷⁾.

Ätiologie

Die Ursachen der Osteoporose sind überwiegend primärer Natur. Hier stehen besonders postmenopausale und senile Formen im Vordergrund. Daneben finden sich sekundäre Formen, die endokrin oder iatrogen beispielsweise durch einen Hyperkortisolismus bedingt sein können. Auch als Nebenwirkung einiger Medikamente kann sie auftreten⁽⁸²⁾.

Physiologisch nimmt die Knochenmasse in den ersten drei Lebensjahrzehnten kontinuierlich zu, wonach es zu einem allmählichen Knochenmassenverlust kommt. Mit dem Einsetzen der Menopause beschleunigt sich die Rate des Knochenverlustes. In den ersten 5 bis 10 postmenopausalen Jahren verliert die Frau etwa 2 % ihrer Knochenmasse pro Jahr. Dagegen kommt es beim Mann physiologisch nur zu einer Verminderung von 0,5 % pro Jahr⁽⁸³⁾. Pathophysiologisch kann sowohl ein mangelnder Aufbau der maximalen Knochenmasse bis zum 30. Lebensjahr (peak bone mass) als auch ein beschleunigter Knochenmassenverlust sowie eine Kombination aus beidem, zur Osteoporose führen⁽⁸³⁾.

Im Folgenden sind die verschiedenen Formen aufgelistet^(77,84,85):

Primäre Osteoporose (95 %)

- Idiopathische Osteoporose junger Menschen (selten)
- Postmenopausale Osteoporose (= Typ I-Osteoporose)
- Senile Osteoporose (= Typ II-Osteoporose): W: M= 2:1

Sekundäre Osteoporose (5 %)

- Endokrine Ursachen (Hyperkortisolismus, Hypogonadismus, Hyperthyreose, pHPT), Malabsorption
- Immobilisation
- Iatrogen/ medikamentös: Langzeittherapie mit verschiedenen Medikamenten: Kortikosteroiden, Glitazonen, Protonenpumpenhemmern, Aromatasehemmern, Antiandrogenen, Antiepileptika^(86,87)

Erkrankungen, die mit Osteoporose assoziiert sein können:

- z.B. Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Typ I-Diabetes, Epilepsie

Hereditäre Erkrankungen:

- Osteogenesis imperfecta, Ehlers-Danlos-Syndrom, Marfan-Syndrom, Homozysteinurie

Risikofaktoren

Viele Risikofaktoren begünstigen das Auftreten der Osteoporose. Ein unbeeinflussbarer Faktor stellt das Lebensalter. Da mit zunehmenden Alter sich die Knochenmasse verringert, verdoppelt sich das Frakturrisiko ab einem Alter von 50 Lebensjahren etwa mit jeder Dekade. Auch das Geschlecht wirkt sich auf die Knochenmasse aus. Dabei sind Frauen häufiger von der Osteoporose betroffen⁽⁸⁵⁾.

Da sich körperliche Belastung über den Osteozyten osteoprotektiv auswirkt, führt mangelnde Belastung, etwa durch einen inaktiven Lebensstil, körperliche Einschränkungen oder Hospitalisierung, zu Knochenverlust⁽⁷¹⁾. Außerdem begünstigen viele Medikamente, Ernährungsgewohnheiten, Untergewicht, gesteigerter Nikotinabusus sowie eine verkürzte Östrogenexpositionszeit (unter 30 Jahren) die Entstehung der Osteoporose⁽⁷⁷⁾.

Im nachfolgenden Teil soll kurz auf die Osteoporose in Bezug auf bestimmte Einflussfaktoren eingegangen werden, die sich im Studiendesign wiederfinden.

Osteoporose und Östrogenmangel

Die Entfernung der Ovarien führt zu einer starken Reduktion der Östrogenproduktion, da in den Eierstöcken Östrogene produziert werden. Östrogene senken die RANKL-Expression, erhöhen Osteoprotegerin und inhibieren die Osteoklastogenese und somit den Knochenabbau⁽⁸⁸⁾. Daher führt der Mangel an Östrogenen zu einem erhöhten Level an sRANKL im Knochenmark und zur vermehrten Bildung und Aktivierung von Osteoklasten, die knochenresorbierend wirken⁽⁸⁸⁾. Auch die vermehrte Apoptose von Osteozyten wird unter der Ovariectomie gefunden⁽⁸⁹⁾. Daneben wird angenommen, dass sich ein Östrogenmangel verlängernd auf die Überlebenszeit der Osteoklasten auswirkt. Diese können durch die größere Zeitspanne mehr Material abbauen und tiefer den Knochen erodieren, wodurch sich die trabekuläre Separation vergrößert⁽⁹⁰⁾. Ferner scheint die Hemmung von IL6 durch Östrogene eine Rolle zu spielen, da IL6 mit einer vermehrten Resorption assoziiert ist⁽⁹¹⁾. Physiologisch tritt ein Östrogenmangel bei Frauen in der Menopause auf, der das Auftreten der Osteoporose begünstigt.

Osteoporose und Mangel-Diät

Eine Mangelernährung an Vitamin-D und Calcium führt zu rachitischen Verhältnissen und zur Knochenaufweichung, da der neu gebildete Knochen (Osteoid) nicht mineralisiert werden kann. Bei einem Calciummangel wird zusätzlich weiter Calcium aus dem Knochen entzogen, sodass der Knochen an Calcium verarmt⁽⁹²⁾. Insbesondere

fördert die Kombination aus Calcium-, Vitamin-D- und Östrogen-Mangel das Auftreten der Osteoporose^(93,94).

Von einigen Autoren^(95,96) wird auch die Kombinationsform aus Osteoporose und Osteomalazie, die sogenannte Osteoporomalazie, beschrieben. Bei ihr finden sich sowohl Zeichen der Osteoporose, wie z.B. die geringere Knochenmasse im DXA, aber auch die für Osteomalazie typische Mineralisationsstörung. Bei unklaren Befunden sollte daher eine erweiterte diagnostische Abklärung eingeleitet werden⁽⁸⁶⁾.

Osteoporose und Glukokortikoide

Glukokortikosteroide werden physiologisch in der Nebennierenrinde gebildet. Neben diversen systemischen Wirkungen, besitzen sie auch einen Einfluss auf den Knochen. Der Knochenabbau wird durch Kortikosteroide stimuliert und die Zellularität reduziert. Die osteokatabole Wirkung basiert auf der vermehrten Expression von RANKL. Dies führt in der Frühphase nach 3 bis 6 Monaten zur gesteigerten Knochenresorption und langfristig zur Hemmung der Knochenneubildung⁽⁹⁷⁾. Daneben führen Glukokortikoide zu Osteonekrose sowie zu verminderter Knochenbildung durch Induktion der Apoptose und durch verminderte Osteoblastogenese. Die Überlebenszeit der Osteoklasten wird dagegen gesteigert⁽⁹⁸⁾. Da die Knochenbildung gehemmt und der Abbau angeregt wird, kommt es zum Verlust an Spongiosa, was sich auf die Knochenarchitektur durch eine minderwertige Knochenstatik auswirkt.

Einteilung der Osteoporose

Einteilen lässt sich die Osteoporose nach metabolischen Charakteristika, charakterisiert durch das Turnover, sowie nach Verteilungstypen und klinischen Stadien.

Typen der Verteilung

- Generalisierte Osteoporose
 - Postmenopausale Osteoporose (Typ I): Spongiosabetonter Knochenverlust
 - Senile Osteoporose (Typ II): Spongiosa und Kompakta betroffen
- Lokalisierte Osteoporose bei Rheumatoider Arthritis oder Morbus Sudeck

Klinische Einteilung

Die klinische Einteilung richtet sich nach der Knochendichtemessung mittels DXA und dem daraus ermittelten T-Score sowie nach auftretenden Frakturen. Klinisch werden 4 Stadien unterschieden, bei denen der Schweregrad im Verlauf zunimmt:

- 0 Osteopenie (Präklinische Osteoporose): DXA -1 bis -2,5
- 1 Osteoporose (ohne Frakturen): DXA < -2,5
- 2 Manifeste Osteoporose (mit Frakturen): DXA < -2,5
- 3 Fortgeschrittene Osteoporose (multiple Wirbelkörperfrakturen, auch extraspinale Frakturen): DXA < -2,5

Klinische Symptomatik

Häufig äußern Patienten mit Osteoporose Knochenschmerzen, die sich überwiegend belastungsabhängig zeigen. Die Schmerzen sind meist über der Wirbelsäule lokalisiert, wovon besonders der thorakolumbale Übergang betroffen ist. Daneben treten sogenannte Spontanfrakturen auf. Gerade Schenkelhalsfrakturen und Wirbelbrüche kommen verstärkt vor. Durch das Zusammensintern von Wirbelkörpern kann es zur Rundrückenbildung (Gibbus) mit verstärkter Kyphosierung der Brustwirbelsäule kommen^(77,83,99).

Diagnostik

Für die Diagnostik der Osteoporose erfolgt neben der gründlichen Anamnese, der Evaluation von Risikofaktoren und der körperlichen Untersuchung insbesondere die Osteodensitometrie als Goldstandard. Alternative Untersuchungen können Hinweise auf die Ätiologie liefern.

Bei der körperlichen Untersuchung können klinische Tests (Ott-Maß) und klinische Zeichen (Tannenbaumphänomen, Gibbusbildung) weitere Aufschlüsse geben. Aus den erhobenen Parametern lässt sich mit Hilfe verschiedener Kalkulationen (FRAX, Q-Fracture Score) das Risiko ermitteln, in den nächsten 10 Jahren eine Wirbelkörper- und oder proximale Femurfraktur zu erleiden (DVO-Leitlinien)⁽⁸⁵⁾. Nach der Risikoevaluation, bspw. über den DVO-Score, kann die DXA-Osteodensitometrie, ein Basislabor oder das Röntgen zur Frakturabklärung eingeleitet werden⁽¹⁰⁰⁾. Die Diagnostik soll bei einem Frakturrisiko von über 20 % eingeleitet werden.

Osteodensitometrie (DXA)

Bei der apparativen Diagnostik gilt die Knochendichtemessung (Osteodensitometrie) als Goldstandard gilt. Hierbei wird die Flächendichte des Knochenmineralgehaltes (g/cm^2) an der LWS (Mittelwert aus den Wirbelkörpern L1 bis L4), am proximalen Femur und am Femurhals gemessen. Der Minimalwert dieser 3 Messungen gilt als ausschlaggebend für die Therapieentscheidung.

Für den Vergleich wird der T-Score ermittelt, der die Standardabweichung vom Mittelwert der maximalen Knochendichte ("peak bone mass") einer Frau im Alter von 30 Jahren darstellt. Im Langzeitverlauf lässt sich durch die DXA-Messung ein Verlust an Knochenmasse ermitteln⁽⁷⁷⁾.

Mit Hilfe des T-Scores werden vier Kategorien der Knochendichte für Männer und Frauen auf Basis der DXA-Messungen am Femurhals definiert:

- Normal: T-Score > -1 SD
- Osteopenie: T-Score zwischen -1 und $-2,5$ SD
- Osteoporose: T-Score $< -2,5$ SD
- Schwere (manifeste) Osteoporose: T-Score $< -2,5$ SD bei mindestens einer Fraktur

Der T-Score gilt als wichtiger Parameter in die Risikokalkulation, in den nächsten 10 Jahren eine Wirbelkörper- oder proximale Femurfraktur zu erleiden. Bei bereits vorliegenden Frakturen reicht zur Diagnose der Osteoporose ein T-Score von $< -2,0$ aus. Daneben lässt sich aus der DXA auch der Trabecular Bone Score ermitteln, der die Mikroarchitektur parametrisiert und zur Risikoevaluation herangezogen werden kann⁽⁸⁵⁾.

Da die DXA als Goldstandard gilt^(77,101) und sich die Therapieempfehlungen darauf beziehen, soll auf die weitere Diagnostik nur kurz eingegangen werden.

Röntgendiagnostik

Im radiologischen Bild finden sich entkalkte Wirbel mit sogenannter Rahmenstruktur durch das Hervortreten der Grund- und Deckplatten. Daneben erscheinen die Wirbelkörper „längs gestreift“ durch eine vermehrte vertikale Trabekulierung. Auch Nachweise von Wirbeleinbrüchen sind mit zunehmendem Schweregrad zu finden. „Fisch-, Sanduhr- oder Keilwirbel“ mit konsekutiver Kyphosierung der Wirbelsäule können resultieren⁽¹⁰¹⁾.

Alternative Diagnostik

Für spezielle Fragestellungen kann zusätzlich eine Knochenbiopsie empfehlenswert sein. Daneben können über die Szintigraphie zuverlässig Regionen gesteigerten Knochenumbaus (mittels ^{99m}Techneium-markierten Bisphosphonaten) dargestellt werden. So ergeben sich Hinweise auf das dysregulierte Verhältnis zwischen Osteoblasten und Osteoklasten⁽¹⁰¹⁾. Alternativ kann auch die Ultraschalldensitometrie oder die quantitative Computertomographie (QCT) herangezogen werden.

Histologie und Histomorphometrie

Zwar spielt in der klinischen Diagnostik die Histologie eine untergeordnete Rolle, stellt aber die Grundlage der mikro- und makroskopischen Veränderungen der Knochenarchitektur dar und wird in dieser Dissertation näher untersucht.

Am auffälligsten bei der histologischen Untersuchung der Osteoporose ist die Reduktion der Knochenmasse. Dazu kann das Verhältnis des Knochenvolumens am Gesamtvolumen (BV/TV) bestimmt werden. Normalerweise nimmt der Wert bei gesunden jungen Menschen 20 % ein, kann aber mit zunehmenden Alter auf unter 12 % sinken. Bei der postmenopausalen Osteoporose verringert sich insbesondere die Anzahl der Trabekel (Tb.N.), während bei der senilen Osteoporose die trabekuläre Dicke (Tb.Th.) abnimmt und auch die kortikale Knochensubstanz betroffen ist^(86,102).

Modell der Knochenumwandlung

Bei der Osteoporose wird von einem Modell des strukturellen Umbaus ausgegangen, bei dem es zu einer Umwandlung von plattenartigen (plate-like) Trabekeln zu stabförmigen (rod-like) Formationen kommt^(103–106). Während des Umbaus nimmt der Anteil der stabförmigen Trabekel zu und die Anzahl der Platten ab. Die stabförmigen Trabekel sind dabei schlechter vernetzt, dünner und fragiler⁽¹⁰³⁾. Bei der Osteoporose werden besonders die horizontal ausgerichteten Knochenbälkchen abgebaut, wobei die vertikalen Trabekel bestehen bleiben. Dies sorgt für die gestreift wirkenden osteoporotischen Wirbelkörper im Röntgenbild. Durch eine inhomogene Knochendichte der osteoporotischen Trabekeln, resultiert eine erhöhte Frakturgefahr^(107,108). Für die Bewertung der spongiösen Strukturen wurde der sogenannte „Structure Model Index“ (SMI) entwickelt. Mit Hilfe des μ CTs und spezieller Software kann daneben errechnet werden, wie hoch der Anteil an platten- oder stabartigen Trabekeln ist^(109,110). Der SMI beinhaltet Werte von 0 bis 3. Der Wert 0 stellt die ideale Platte und 3 den idealen Stab dar. Quantitative Veränderungen der Spongiosa können hiermit beschrieben werden.

Serumparameter

Auch Blutwerte können für die Diagnose und ätiologische Klärung hilfreich sein. Neben dem Differenzialblutbild geben die Ionenverteilung von Calcium und Phosphat wichtige Aufschlüsse über den Verlauf und die Abgrenzung zu Differenzialdiagnosen. Zu den Basisparametern die evaluiert werden sollen, gehören Entzündungswerte (Leukozytenzahl, CRP) und weitere Parameter wie Ca^{2+} , PO_4^{4-} , γ -GT, ALP, Kreatinin, die BSG und TSH basal. Eine sekundäre Osteoporose kann gegebenenfalls durch Abklärung von Testosteron und Östrogenen ausgeschlossen werden. Auch Vitamin-D, seine Vorstufen und das Parathormon sollten bestimmt werden⁽⁷⁷⁾.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, Marker des Knochenaufbaus oder –abbaus zu bestimmen, auf die jedoch nicht näher eingegangen werden soll. Daneben werden einige Marker wie TRAP oder ALP zu den immunhistochemisch Standardfärbungen gezählt⁽¹¹¹⁾.

Differenzialdiagnosen

Von der Osteoporose lassen sich verschiedene andere Krankheitsbilder als Differentialdiagnosen abgrenzen. Dazu zählen neoplastische Prozesse wie Skelettmetastasen oder Knochentumore. Diese können ebenfalls osteolytisch wirken (bspw. Mamma-Karzinom Metastasen) und somit zu Knochenbrüchen führen. Auch andere endokrine Erkrankungen wie die Osteomalazie oder der Hyperparathyreodismus sollten ausgeschlossen werden. Zur Differenzierung können Blutparameter, die BSG, das Serum-Elektrophoresemuster und bildgebende Verfahren eingesetzt werden.

Therapie

Da sich diese Dissertation insbesondere mit der Pathogenese der Osteoporose beschäftigt, soll auf die Therapie nicht im Detail eingegangen werden.

Kausale und symptomatische Behandlung

Ist eine Osteoporose diagnostiziert, muss sie effektiv behandelt werden. Die Therapie richtet sich nach der Ursache der Osteoporose. Iatrogene und endokrine Ursachen sollten entsprechend therapiert werden.

Neben symptomatischer und präventiver Behandlung⁽¹⁰⁰⁾ sollte die Vitamin-D Versorgung optimiert werden. Empfohlen werden 800 IE Vit.D/d sowie etwa 1000- 1500 mg Ca/d⁽⁸⁵⁾. Die Substitutionstherapie kann bei bestimmten Indikationen pharmakologisch ergänzt werden (siehe hierzu DVO-Leitlinie Osteoporose⁽⁸⁵⁾).

Medikamentöse Therapie

Bisphosphonate wirken bspw. antiresorptiv und versiegeln die Knochenoberfläche^(85,112). Strontiumranelat verbessert auf zellulärer Ebene den Knochenaufbau und vermindert den Knochenabbau⁽¹¹³⁾. Daneben kann auf den Östrogenstoffwechsel mittels selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) Einfluss genommen werden. Ferner findet sich der monoklonale Antikörper Denosumab, der die Wirkung von RANKL blockiert und somit die Osteoklastogenese hemmt⁽¹¹⁴⁾. Selbst rekombiniertes Parathormon kann subkutan injiziert, für komplizierte Verlaufsformen oder bei glukokortikoid-induzierter Osteoporose eingesetzt werden^(77,85,112,115). Bei allen Präparaten muss die jeweilige Indikation geprüft und auf entsprechende (teils schwerwiegende) Nebenwirkungen⁽¹¹²⁾ geachtet werden.

1.1.7.3 Osteomalazie und Rachitis

Unter Osteomalazie versteht man eine ungenügende Mineralisation des Osteoids. Kalzium und Phosphat werden hierbei vermindert in den Knochen eingelagert. Nach Abschluss des Knochenwachstums wird sie als Osteomalazie, im Wachstumsprozess als kindliche Rachitis bezeichnet. Diese betrifft insbesondere die metaphysären Wachstumszonen und führt zur Knochenerweichung⁽¹¹⁶⁾.

Ursächlich ist ein Vitamin-D-Mangel, der durch Malassimilationssyndrome, mangelnde Vitamin-D-Zufuhr oder durch unzureichende UV-Exposition entstehen kann. Des Weiteren kann auch die körpereigene Synthese von Vitamin-D in Leber und Niere gestört sein. Auch seltene genetische Erkrankungen, wie die Vitamin D-abhängige Rachitis (VDDR), sind bekannt⁽¹¹⁶⁾.

Diagnostisch zeigen sich Veränderungen in den Blutwerten. Besonders Hypocalciämie und eine erhöhte alkalische Phosphatase sind typisch. Je nach Ätiologie können noch Zeichen der Malabsorption, wie Hypophosphatämie oder verminderte Vitamin-D-Spiegel gefunden werden. Bei der klinischen Untersuchung können Skelettschmerzen, Knochenverbiegungen und Gehstörungen (z.B. durch Varisierung der Schenkelhalse oder Schwäche der Glutealmuskulatur), auftreten. Zusätzlich können sich weitere klinische Zeichen wie der „rachitische Rosenkranz“, eine Schwellung der Rippen an Knorpel-Knochen-Grenze, finden. Ein klinisches Zeichen der Hypocalciämie kann die Tetanie, mit sogenannte „Pfötchenstellung der Hände“ sein⁽⁷⁷⁾.

Radiologische Charakteristika sind sogenannte Looser-Umbauzonen im Röntgenbild. Hierbei handelt es sich um bandförmige Aufhellungen quer zur Längsachse des Knochens als Zeichen unverkalktem Osteoids. Auch Knochen- und Wirbeldeformierungen kommen vor. Daneben sind „verwaschene“ Knochenstrukturen mit Rarifizierung der Knochen trabekel aufzufinden. Als weiteres Diagnostikum kann in bestimmten Fällen die Knochenbiopsie und Histologie indiziert sein^(117,118).

Handelt es sich ätiologisch um einen Vitamin-D-Mangel, kann er durch Substitution von Vitamin-D3 behandelt werden. Liegen andere Ursachen zu Grunde, sollen sie durch Behandlung der Grunderkrankung behoben werden. Eine Steuerung der Therapie erfolgt durch die Überwachung des Serumcalciums und der Calciumausscheidung^(77,117).

1.2 Hypothesen und Zielsetzung

Durch die steigende Prävalenz der Osteoporose kommt der Entwicklung neuer Therapiealternativen für die Osteoporose selbst als auch für die mit ihr assoziierten Folgen, wie Frakturen, eine wachsende Bedeutung zu. Gerade der minderwertige Knochenstatus stellt eine Herausforderung für die Frakturversorgung dar.

Zur Untersuchung wird ein dem menschlichen Knochenstatus vergleichbares Großtiermodell benötigt. Im Schafsmodell sollen daher verschiedene Formen der Osteoporose, der postmenopausale, der Calcium- und Vitamin-D-defiziente sowie der steroidinduzierte Phänotyp untersucht werden. Den Einfluss der jeweiligen Behandlung soll durch histologische Parameter der Knochenstruktur und Zellularität analysiert werden. Bei der Pathogenese steht die zentrale Rolle des Osteozyten, als Dirigent der Knochenhomöostase, im Vordergrund. Die Auswirkungen der Strategien sollen mit numerischen und morphologischen Veränderungen des Osteozyten und des OLCS in Verbindung gebracht werden. Insbesondere die quantitativen und strukturellen Veränderungen im Kommunikationsnetz sollen näher untersucht werden. Die experimentellen Untersuchungen mit neuen, sowie weiterentwickelten, objektivierbaren Methoden für histologische Färbungen stellen neue Forschungsansätze für Folgestudien dar. Die Ergebnisse sollen zur Prävention und zur Entwicklung neuer, an den osteoporotischen Knochenstatus angepasster, Biomaterialien dienen.

Es ergeben sich folgende Hypothesen, deren Überprüfung Kernziele der Arbeit sind:

- Morphologisch wird durch die Osteoporoseinduktion eine Ausdünnung des Trabekelwerks, eine Zunahme des intertrabekulären Abstandes sowie eine reduzierte Knochenfläche zu erkennen sein.
- Die Knochenfläche wird sich unter der Behandlung in den verschiedenen Gruppen korrelierend mit der Zellzahl und Morphologie der Osteozyten vermindern und unterscheiden.
- Durch die Behandlung verändert sich neben der Osteozytenzahl auch deren Morphologie, wobei die Zahl an spindelförmigen Zellen abnimmt und die Zahl runder Zellen zunimmt.
- Während es zum Anstieg von Lakunen und sphärischen Osteozytenformen kommt, wird das dendritische Kommunikationsnetzwerk zunehmend abgebaut.

2 Material und Methoden

2.1 Schafsmodell

Gemäß den aktuellen United States Food and Drug Administration (FDA) Richtlinien wurde zur Untersuchung der postmenopausalen Osteoporose zuerst ein Kleintiermodell an ovariectomierten Ratten etabliert, das danach auf das Schaf als Großtiermodell ausgeweitet wurde⁽¹¹⁹⁾. Während durch das Rattenmodell der gesteigerte postmenopausale Abbau an spongiösem Knochen („modeling“) dargestellt werden soll, ist das zweite Modell ein, für die jeweilige Fragestellung spezifisches Modell, das das pathologische „remodeling“ mit verminderter Knochenbildung sowie weitere Faktoren widerspiegelt⁽¹²⁰⁾. Durch die präklinischen Modelle soll die Sicherheit für den Menschen, etwa bei der Testung neuer antiosteoporotischer Medikamente, gewährleistet werden.

Das Schaf eignet sich besonders als Osteoporosemodell, da es knochenstrukturell viele Homologien zum Menschen aufweist⁽¹⁰²⁾ und besser auf den Menschen übertragbar ist^(111,121). Im Alter von 3 bis 4 Jahren ist bei Schafen die Skelettreife und die „peak bone mass“ erreicht⁽¹²²⁾, wonach es mit zunehmenden Alter zum beginnenden Knochenverlust kommt. Mit 7 Jahren weisen Schafe ähnliche Knochen-Turnovermarker (Osteocalcin) auf, wie postmenopausale Frauen im Alter von 65 Jahren. Daneben reagieren Schafe ähnlich wie Menschen auf bestimmte endokrine Stimuli, zum Beispiel auf Glukokortikoide mit einem Abfall des Osteocalcinspiegels⁽¹¹¹⁾ oder auf Östrogenmangel mit einer Reduktion der Knochendichte⁽¹²¹⁾. Ferner sind vergleichbare Studien vorhanden, mit denen die Ergebnisse korreliert werden können⁽¹²³⁾.

Da weiterhin ein definitiv etabliertes Großtiermodell fehlt, soll das osteoporotische Schafsmodell, gemäß den FDA Richtlinien^(119,120), in Zukunft als standardisiertes und reproduzierbares Grundlagenmodell für die Kompatibilitätstestung von Biomaterialien und Implantaten sowie dem Verständnis der Pathophysiologie der Osteoporose dienen. Dazu soll im Großtiermodell (Schaf) ein osteoporotischer/ steroidinduzierter Knochenstatus durch operative, hormonelle und diätetische Einflüsse hergestellt und durch in vivo/ ex vivo Messungen gesichert werden.

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 32 weibliche Merino Landschafe mit einem durchschnittlichen Alter von 5,5 Jahren. Diese wurden von Züchtern aus der Region Frankfurt am Main bezogen und in der zentralen Forschungseinrichtung der Universität Frankfurt (ZFE) untergebracht. Bei den Schafen, die eine Ovariectomie erhielten, erfolgte eine zweiwöchige behandlungsfreie Phase. Anschließend wurden die Tiere der Experimentalgruppen diätetisch oder diätetisch und zusätzlich medikamentös behandelt.

2.1.2 Tierhaltung

Die Tiere wurden in der zentralen Forschungseinrichtung des Klinikums der Universität Frankfurt gehalten, die sowohl entsprechend qualifiziertes Personal als auch die erforderlichen Genehmigungen vorweist. Nachdem die Tiere postoperativ wieder schmerzfrei waren, erfolgte die Verlegung zum Schafshalter Dörr (Wiesbaden). Dort standen die Schafe 8 Monate, wobei entsprechend der Versuchsplanung Biopsien zu verschiedenen Zeitpunkten und nach 8 Monaten die Euthanasie vorgenommen wurde.

2.1.3 Versuchsanordnung und Studiendesign

Das Versuchsvorhaben des Projektes T1 des SFB/ Transregio 79 wurde nach § 8b Absatz 3, Nummer 3 durch das Regierungspräsidium Darmstadt (Veterinärdezernat Wilhelminenstraße 1- 3, 64278 Darmstadt, Deutschland) genehmigt. Der Antrag erfolgte nach § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes.

Die 32 weiblichen Merino Schafe im durchschnittlichen Alter von 5,5 Jahren wurden verwandt, um Entwicklungsbedingungen der postmenopausalen Osteoporose zu untersuchen. Dazu wurden die Tiere in vier Gruppen eingeteilt. Zwei davon stellten Kontroll- (Abb. 6) und zwei Experimentalgruppen dar. Tiere der Kontrollgruppe wurden nur „schein-operiert“ (K-Gruppe, n= 8), die Tiere der zweiten Kontrollgruppe bilateral ovariectomiert (OVX-Gruppe, n= 7). Ein Tier war trächtig und wurde daher von der Studie ausgeschlossen.

Schafe der zwei Interventionsgruppen wurden bilateral ovariectomiert und zusätzlich mit einer Calcium- und Vitamin-D-armen Spezialdiät gefüttert (OVXD-Gruppe, n= 8). Daneben wurde einer Experimentalgruppe zusätzlich zur Ovariectomie und zur Mangeldiät 320 mg Methylprednisolon (Glukokortikoid) intramuskulär injiziert (OVXDS-Gruppe, n= 7). Ein Tier der OVXDS-Gruppe erlitt eine Trümmerfraktur des Femurs (dieser war dadurch für die Analyse nicht auszuwerten), ein weiteres Schaf verstarb.

Von allen Tieren wurden Beckenkammbiopsien mit einem Durchmesser von circa 4 mm und einer Tiefe von etwa 15 mm zu den Zeitpunkten 0, 3 und 8 Monate der Behandlungsdauer gewonnen. Daneben wurden nach der Euthanasie, zum Endzeitpunkt nach 8 Monaten, die linken Femora und der vierte lumbale Wirbelkörper entnommen. Die Versuchsplanung ist in Abbildung 6 dargestellt.

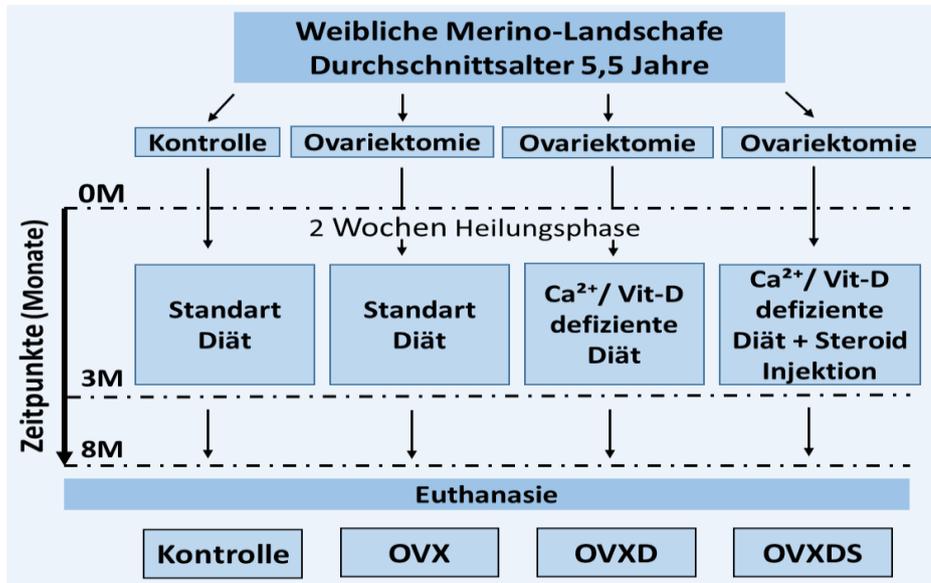


Abbildung 6: Studiendesign:

Die Abbildung zeigt das experimentelle Studiendesign zur Schafstudie der Osteoporose. Die weiblichen Merinoschafe wurden in 2 Kontroll- und 2 Experimentalgruppen unterteilt. Während eine Kontrollgruppe nur eine Scheinoperation (K) erhielt, wurde die andere ovariectomiert (OVX), ebenso wie die Experimentalgruppen. Zusätzlich erhielten diese eine Vitamin-D-defiziente Diät (OVXD) und eine Steroidinjektion (OVXDS). Die Euthanasie erfolgte nach 8 Monaten. Biopsien des Beckenkamms wurden zu den Zeitpunkten: 0, 3 und 8 Monate entnommen. (Eigene Abbildung).

2.1.4 Operationsablauf der Ovariectomie

Die operative Ovariectomie wurde durch die Arbeitsgruppe durchgeführt. Es erfolgte dabei der operative Zugang über die mediale Linie, kranial des Euters. Der Schnitt war circa 15 cm lang. Anschließend wurde in die Tiefe präpariert, wobei die Linea alba längs durchtrennt wurde. Bei den Tieren der Sham-Gruppe (Kontrolle) wurde nur eine Laparotomie durchgeführt und die Bauchdecke wieder verschlossen. Bei den Tieren, die eine Ovariectomie erhielten, wurde der Uterus intraabdominell lokalisiert und vor die Bauchdecke luxiert. Nach Darstellung der Ovarien wurden die Ovarialarterien durchtrennt und ligiert. Abschließend erfolgte das Absetzen des Ovars. Blutungen wurden gestillt und der Uterus in situ reponiert. Die 22 ovariectomierten Tiere wurden nochmals in 3 Gruppen aufgeteilt.

2.1.5 Diät und Glukokortikoidgabe

Die Schafe, die eine spezielle Diät erhielten (n= 8), bekamen Vitamin-D2/D3-armes Futter. Zudem war das Futter Vitamin K- und Calcium-arm, sojafrei, phytoestrogenarm, mit geringem Phosphorgehalt und ohne Heu-Gras-Luzerne-Anteil. Die Futtermittel wurden von der Firma Ssniff (Soest, Deutschland) bezogen. Die Gruppe der Tripleinduktion (OVXDS, n= 7) bekam eine weitere Behandlung durch die intramuskuläre Gabe von Steroiden. Hierfür wurden 320 mg Methylprednisolon (Depot-Medrate® ad us. vet. 40 mg/ml Injektionslösung, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) alle zwei Wochen abwechselnd in die Vorder- oder Hintergliedmaße intramuskulär gespritzt.

2.2 Verarbeitung und Einbettung der Proben

Um den Knochenmetabolismus sowohl auf zellulärer als auch auf interzellulärer Ebene besser analysieren zu können, mussten Paraffinschnitte angefertigt werden. An ihnen wurden anschließend histologische Färbungen durchgeführt, um Knochen und Zellen darstellen zu können. Das dendritische Netzwerk wurde über Rhodamin eingefärbt, jedoch nicht in Paraffin, sondern in Technovit 9100 / Polymethylmethacrylat (PMMA) eingebettet.

2.2.1 Herstellung der Paraffinschnitte

Für die Herstellung der Paraffinschnitte wurden die bei der Euthanasie und den Biopsien gewonnenen Knochenproben aus dem Femur, dem Lendenwirbelkörper 4 (LWK) und dem Beckenkamm zunächst für 48 Stunden in 4 prozentiger Paraformaldehydlösung (Fixierung nach Lilli) und in 0,1 M (molar) Natriumphosphatpuffer bei einem pH-Wert von 7,2 bis 7,4 im Kühlschrank fixiert.

Anschließend wurden die Proben sechsmal mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2 bis 7,4 gespült und in Einbettungskassetten umgebettet. Die Entkalkung der Proben erfolgte in 3,4 prozentiger EDTA/ 10 prozentiger Tris-Lösung (Entkalkungszeit ca. 4 Wochen, Lösungswechsel alle zwei Tage). Nach dem Entkalken wurden die Proben eine Stunde unter fließendem Leitungswasser gespült, danach in 70 prozentigem Alkohol gelegt und anschließend dem Paraffin-Einbettungsautomaten (Leica TP1050, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) zugeführt. Dies diente der Entwässerung und Einbringung in die Paraffinphase. Die jeweilige Verweildauer der Knochenproben in den unterschiedlichen Medien ist in Tabelle 29 (S.126) im Anhang aufgeführt.

Die Proben wurden anschließend in Metallförmchen umgebettet und das Paraffin auf einer Kälteplatte bei -20°Celsius zum Erstarren gebracht. Mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM355S Coolcutsystem der Firma Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland) wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt. Über eine Wasserrutsche wurden die Schnitte einem 42° Celsius warmen Wasserbad zugeführt. In diesem dehnten sich die Schnitte durch die Wärme aus und konnten danach auf SuperFrost Plus Objektträger (Firma. R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgebracht und anschließend bei 37° Celsius über Nacht im Wärmeschrank getrocknet werden.

2.2.2 Toluidinblau-Färbung

Bei Toluidinblau handelt es sich um einen blauen Farbstoff, der zur histologischen und intravitalen Färbung eingesetzt wird. Damit lässt sich die Knochenmikroarchitektur gut darstellen und Aussagen über die Zusammensetzung des Gewebes treffen. Mineralisiertes Gewebe stellt sich ungefärbt blassblau, Zellen, Zellkerne, Kollagenfasern etc. in verschiedenen Blautönen und Knorpel metachromatisch rotviolett dar. Die

unterschiedliche Blaufärbung des Gewebes hängt von der relativen Elektronendichte des Materials ab⁽¹²⁴⁾. Das Färbeprotokoll findet sich auf Seite 126 im Anhang.

2.2.3 Silber-Färbung

Die histologische Färbung mit Silber bietet die Möglichkeit, die Knochenzellen und das lakunokanalikuläre System anzufärben. Darüber hinaus erhält man Informationen über die Morphologie und kann histomorphometrische Aussagen zur Zellularität und Verteilung treffen. Somit ist die Silber-Färbung eine, für die Bestätigung der Untersuchungshypothesen, essentielle Färbemethode.

Zellkerne und Kanalikuli der Osteozyten werden dunkelbraun bis schwarz angefärbt. Silber färbt zusätzlich Zementlinien im Knochen und saure Aminosäuresequenzen. Auch die Nukleolus-Organisations-Region (NOR) des Zellkerns wird durch Silber angefärbt. Ein weiteres argyrophiles Protein ist Osteoprotegerin. Dabei scheint sich Silber an saure Proteine anzulagern, sodass die Agglomeration weiterer Silbermoleküle angestoßen wird⁽¹²⁵⁾. Die Intensität der Färbung hängt hierbei von der Dauer der Inkubation in der Dunkelkammer ab. Dafür gilt es, den Zeitpunkt herauszufinden, bei dem sich die Kanalikuli ideal anfärben und sich vom Knochen gut abgrenzen lassen. Dieser Zeitraum wurde experimentell auf 70 Minuten festgelegt und für alle Schnitte beibehalten.

Die Silber-Färbung der Schnitte wurde in liegendem Zustand in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach Entparaffinierung und Rehydrierung wurden zwei Stammlösungen (Lösung A= 1 prozentige Ameisensäure, 2 prozentige Gelatine Low Bloom in Aqua bidest. und Lösung B= 50 prozentiges Silbernitrat in Aqua bidest.) in einem Mischverhältnis von 1:2 zum Färben verwendet. Anschließend wurde der Schnitt mit 5 prozentigem Natriumthiosulfat fixiert. Das genaue Färbeprotokoll findet sich auf Seite 127 im Anhang.

2.2.4 Herstellung von Schliffen und Schnitten mit Rhodamin-Färbung

Eine Gruppe der Fluoreszenzfarbstoffe stellen die Rhodamine dar. Sie werden insbesondere in der Lasermikroskopie verwendet, da sie eine sehr günstige Quantenausbeute aufweisen. Die Quantenausbeute beschreibt das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Licht, die bei Rhodaminen bei annähernd 100 % liegt. Je nach Struktur fluoreszieren Rhodamine vom gelb-grünen bis in den orange-roten Spektralbereich⁽¹²⁶⁾. In dieser Arbeit wurde ein Rhodamin (Rhodamin 6G/ Basic Red1, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) mit roter Fluoreszenz gewählt.

2.2.4.1 Rhodaminschliffe der Femora

Die aus den Beckenkammbiopsien und Femora entnommenen Proben wurden in Mull gewickelt und über 48 Stunden in 4 prozentige Paraformaldehyd (PFA) Lösung nach Lilli

gegeben und fixiert. Danach wurden sie insgesamt sechs mal mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,2 bis 7,4) zum Entfernen der PFA-Lösung gespült. Daraufhin wurde die aufsteigende Alkoholreihe unter Rüttlung bei Raumtemperatur durchlaufen (S. 129, Tab. 30). Nach der Dehydratation wurden die Proben über mehrere Schritte gehärtet und anschließend mit 1 prozentiger Rhodaminlösung (s. o.) infiltriert.

Nach Infiltration wurde das Knochenstück in die Einbettungsform (Heraeus Kulzer-Teflonform) gegeben. Diese wurde zuvor mit etwas Polymerisationslösung angefüllt und nach Einbringung des Knochenstücks übervoll gefüllt und mit Parafilm luftdicht verschlossen. Danach wurden die Proben 2 Tage bei -4°C polymerisiert.

Nach dem Ausblocken der Blöcke wurden sie mit der EXAKT-Trennschleifsäge (310CL Exakt Apparatebau; PSI Grünewald, Laudenbach, Deutschland) zurechtgesägt. Eine Seite des Blockes und ein passender Objektträger (hier 50 mm x 100 mm x 2 mm Plexiglas, Fa. Patho-Service, Hamburg) wurden mit P80 Schleifpapier angeraut. Anschließend wurde der Probenblock mit einem Gemisch T4000/ 4002 Kleber und PMMA Pulver auf den Plexiglas-Objektträger aufgeklebt und in die Klebepresse eingebracht. Der nun mit dem Träger verbundene Block wurde anschließend planparallel geschliffen. Dazu wurde das EXAKT Mikroschleifsystem 400CS (Exakt Apparatebau; PSI Grünewald, Laudenbach, Deutschland) verwendet. Nach dem Anschleifen erfolgte die Blocktrocknung für 30 min bei 40°C . Mit der Mikrometerschraube konnte das Resultat des planparallelen Schleifens vermessen und ggf. erneut korrigiert werden. Zur Vorbereitung des Sägens wurde ein weiterer Kleber auf die andere Seite des Objektes gebracht und als „Sandwich“ zusammengeklebt. Dafür wurde Präzisionskleber T7210 (Technovit 7210, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland) aufgetragen und anschließend mit Hilfe der Präzisionsklebepresse (EXAKT Präzisionspresse und Klebevorrichtung, Exakt Apparatebau; PSI Grünewald, Laudenbach, Deutschland) verbunden. Im Anschluss konnte der Block mit dem Trennschleifsystem 310CL (s. o.) in einen etwa 700 μm dicken Schnitt zersägt werden.

Nach dem Schneiden erfolgte das weitergehende planparallele Schleifen (800er Schleifpapier) mit dem EXAKT Mikroschleifsystem 400CS (s.o.). Dies wurde mit der Mikrometerschraube überprüft. War die determinierte Dicke von etwa 80 μm erreicht, konnte im Anschluss dazu, mit einem 4000er Schleifpapier, der Schliff poliert werden. Auf den fertigen, etwa 15 μm dicken Schliff der Femora, wurde Fluorescent Mounting Medium (Dako, Hamburg, Deutschland) aufgebracht, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Nagellack die Ränder versiegelt.

2.2.4.2 Rhodaminschnitte der Beckenkammbiopsien

Zu drei verschiedenen Zeitpunkten wurden Beckenkammstanzen von ca. 4 bis 5 mm Durchmesser und 10 bis 15 mm Tiefe gewonnen. Der Ablauf der Fixierung und Infiltration

war bei der Herstellung der Schnitte derselbe wie bei den Schliffen. Erst nach dem Ausblocken der Rohform unterschieden sich die Abläufe. Nach dem Ausblocken wurde der Block mit der Trennsäge zurecht geschnitten und dann in eine Mikrotomhalterung eingespannt. Der gesamte Block wurde in 30 µm Abschnitten grob angeschnitten („trimmen“). Der Feinschnitt erfolgte in 5 µm dicken Schnitten. Dabei wurde der fertige Schnitt nicht über ein Wasserbad gestreckt, sondern mit Hilfe einer speziell aufgetragenen Klebefolie (KBM Kawamoto, Osaka, Japan) und eines Mikrotoms (Leica RM2155, Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) geschnitten und direkt auf den Objektträger aufgeklebt. Am Ende entstanden etwa 5 µm dicke Schnitte der Beckenkammbiopsien.

2.3 Lichtmikroskopie

Die initiale Analyse der toluidinblau-gefärbten Schnitte erfolgte mit einem Zeiss Axioskop 2+ Mikroskop (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland). Hierfür wurden Vergrößerungen von 25x gewählt und durch eine Vergrößerung von 40x und 200x zur detaillierteren Darstellung ergänzt. Des Weiteren wurden die gefärbten Schnitte an einem Fotomikroskop (Axioplan 2, Fa. Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) untersucht. Dieses war mit einem Photomodul Axiophot 2 (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) und einer DC500 Kamera (Leica Microsystems Ltd, Heerbrugg, Schweiz) ausgestattet. Betrieben wurde das System mit der Leica IM1000 Software Version 4.0 (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd, Cambridge, UK).

Es wurden sowohl Übersichts- als auch Detailaufnahmen angefertigt (Vergrößerungen 2,5x, 5x, 10x, 20x, 40x, 100x). Anschließend erfolgte die Bearbeitung der Fotos mit Adobe Photoshop CS2 Version 9.0 (Fa. Adobe Systems Incorporated, Dublin, Irland).

Zur Beurteilung der Knochenstatik wurden toluidinblau-gefärbte Schnitte in verschiedenen Vergrößerungen histologisch ausgewertet. Knochenarchitektur, Trabekeldicke und ihre Vernetzung zeigten sich am deutlichsten unter der Vergrößerung von 2,5x, 5x und 10x. Für die Übersichtsbilder in Toluidinblau-Färbung wurden Vergrößerungen von 2,5x gewählt. Die Insets der Übersichten wurden mit einer Vergrößerung von 20x aufgenommen. Für die Übersichten wurden Schnitte ausgewählt, die für die jeweilige Gruppe repräsentativ waren.

Die Knochenarchitektur in der Silber-Färbung wurde ebenfalls mit Vergrößerungen von 2,5x, 5x und 10x ausgewertet. Besonderes Augenmerk lag bei der Färbemethode auf den Knochenzellen. Diese wurden unter hoher Vergrößerung mit 20x und 40x analysiert. Für die histomorphometrische Analyse wurden Bilder in 20x Vergrößerung randomisiert

ausgewählt. Einzelne Bilder von exemplarischen Zellen wurden unter Verwendung von Dispersionsöl mit 100x Vergrößerung aufgenommen.

2.4 Konfokale Laser-Mikroskopie (LCM)

Zur genauen Darstellung der Osteozyten und des OLCS wurden rhodamin-gefärbte Bilder mittels LCM analysiert. Die Auswahl der Bilder aus Femur und Beckenkamm erfolgte anhand repräsentativer Tiere, die unter Silber-Färbung ausgewählt wurden. Bei der konfokalen Laser-Mikroskopie (LCM oder LSCM) wird ein vom Objektiv fokussierter Laserstrahl genutzt, um ein Objekt punktwise abzurastern. Dabei lassen sich Fluoreszenzen von speziellen Markern nachweisen. Der Laserstrahl bietet den Vorteil, genügend Licht für eine intensive Fluoreszenzanregung auf einen Punkt zu fokussieren. Somit wird immer nur ein geringer Bildbereich betrachtet, was die Auflösung erhöht. Während konventionelle Mikroskope mit Durchlichttechnik arbeiten, bei denen die Gewebeschichten von unten beleuchtet werden, verwendet das konfokale Lasermikroskop eine Auflichttechnik. Die Aufnahme wird computergesteuert und das erzeugte Bild über Computermonitore wiedergegeben⁽¹²⁷⁾. Die Konfokalmikroskopie wurde bereits für andere Fragestellungen am Knochen erfolgreich eingesetzt.⁽¹²⁸⁾

Für die eigenen Untersuchungen wurde ein Mikroskop der Marke Zeiss, LSM 710 (Fa. Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) mit einer LSM 710 Imager.Z1 Kamera verwendet. Für die Aufnahme wurde die Fluoreszenz ALEXA Fluor 555 gewählt. Die Wellenlänge des Laserstrahls betrug 543nm, der Gain lag bei 718nm. Randomisiert wurden 4 Bilder pro Schliff der Femora und 3 Bilder pro Schnitt der Beckenkammbiopsien ausgewählt und eine Vergrößerung von 63x benutzt. Die Bilder wurden anschließend mit der Zen 2011 SP3 Imaging-Software (Carl Zeiss, Version 8.1, black edition) visualisiert.

2.5 Deskriptive Histologie und Gradingssysteme

2.5.1 Analyse der Spongiosastruktur in Toluidinblau-Färbung

Um die Auswirkungen der Osteoporose am Knochen zu untersuchen, wurde die Trabekelmorphologie analysiert und mit einem entwickelten Gradingssystem bewertet. Bei diesem stellt G1 den niedrigsten Wert mit der schlechtesten und G4 den höchsten Wert mit der besten Trabekelmorphologie dar. Durch das höhere Grading sollte die größere Stabilität durch die besser verbundenen Spongiosatrabekel sowie durch die höheren Trabekeldurchmesser und die größere Anzahl von Knotenpunkten in Anlehnung an den Interkonnektivitäts Index (ICI) von Le et al.⁽¹²⁹⁾, widerspiegelt werden. Die Kontrollgruppe wurde als Referenz herangezogen und es konnte in Zwischenstufen

unterschieden werden. Für die Einteilung wurde die Häufigkeit der Trabekel, die Größe der trabekelfreien Zone in der Spongiosa und die Trabekelseparation besonders berücksichtigt. Die Vernetzung der Trabekel wurde durch die Anzahl der Trabekelabgänge analysiert und die Länge vernetzungsfreier Zonen („node-to-node“ Distanz) bestimmt. Daneben wurden auch terminal endende Trabekel berücksichtigt, die nicht mit anderen Knochenbälkchen verbunden waren. Auch die Größe und Morphologie der Kavitäten, ebenso wie die Vollständigkeit des Ausschnittes und die Intaktheit des Schnittes wurden überprüft. Abbildung 7 stellt die verschiedenen Gruppen des Gradingssystem der Spongiosa dar:

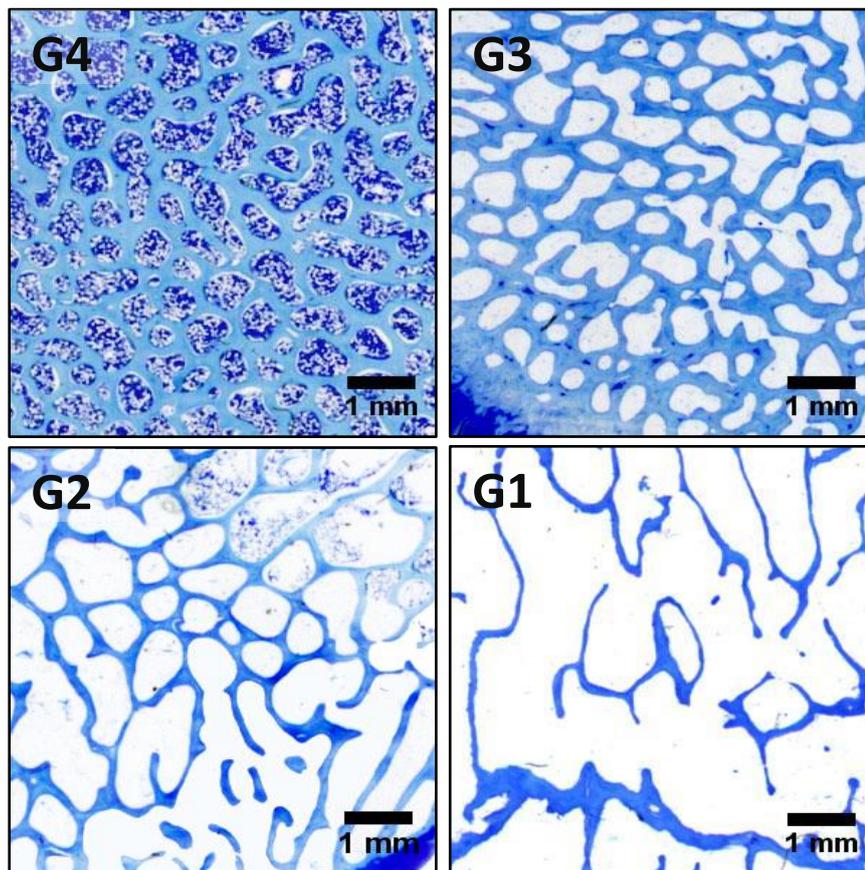


Abbildung 7: Gradingssystem Spongiosa Toluidinblau G4-G1:

Abgebildet sind Beispiele für die jeweiligen Gradingeinteilungen der Spongiosastruktur in Toluidinblau-Färbung. Dabei wurde das Trabekelwerk auf die Vernetzung, den internodalen Abstand, die Flächigkeit der Trabekel, die Trabekeldicke, die intertrabekuläre Separation und die Intaktheit der Trabekel untersucht. **Abb. 7 G4:** LWK Kontrolle K5 mit einem typischen Muster für ein Grading von G4. Es zeigen sich flächige dicke Trabekel mit vielen Abgängen pro Trabekel. Der internodale Abstand ist reduziert und die umschlossenen Hohlräume gering. **Abb. 7 G3:** Fem. OVX3 als Beispiel für ein G3-Grading. Die Trabekel sind ähnlich flächig und dick wie bei G4, jedoch sind die Kavitäten vergrößert und häufig nicht rund, sondern von polygonaler Gestalt. Der intertrabekuläre und Internodalabstand ist vergrößert. **Abb. 7 G2:** Fem. OVXD4 G2: Hier zeigen sich deutlich dünnere Trabekel, die schlechter vernetzt und voneinander distanziert sind. Es finden sich vermehrt Abbrüche und terminale Enden. Die Kavitäten sind vergrößert und unregelmäßig geformt. Der kavitäre Anteil dominiert deutlich die Bildfläche. **Abb. 7 G1:** Fem. OVXD5: Dieses Bild zeigt ein Grading von G1. Die Trabekel sind deutlich ausgedünnt und unzusammenhängend. Es finden sich viele terminale Endigungen und Abbrüche. Das Trabekelwerk ist aus mehreren Konglomeraten aufgebaut und zeigt kaum kontinuierliche Trabekelverläufe. Die Konnektivität ist deutlich herabgesetzt und die Knochenkavitäten bilden ein zusammenhängendes Hohlraumsystem. (Vergrößerung 20x).

In den Abbildungen sind die Tiere anhand der folgenden Gruppenabkürzung und Tiernummer sowie der Region gekennzeichnet. Insgesamt wurden die Schnitte der Wirbelkörper von 30 Schafen und Femora von 29 Tieren der folgenden Gruppen analysiert:

- Kontrollgruppe mit 8 Tieren, die keine Behandlung erhielt
- Ovariectomierte Gruppe (OVX) mit 7 Tieren (ein Tier wurde bei Trächtigkeit ausgeschlossen)
- Eine Gruppe, die ovariectomiert wurde und eine Calcium- und Vitamin-D-freie Diät erhielt (OVX/ Diät, n= 8)
- Eine Interventionsgruppe, die ovariectomiert wurde, eine Calcium- und Vitamin D freie Diät erhielt und zusätzlich mit Steroiden behandelt wurde (OVX/ Diät/ Steroide; n= 6, da Tier OVXDS6 verstarb und OVXDS8 eine Trümmerfraktur des Femurs erlitt und ausschied)

Um die rein deskriptiven Ergebnisse zu objektivieren und die Gruppen zu vergleichen, wurde eine Häufigkeitsanalyse der Variablen angeschlossen, die die Knochenqualität der Gruppen berücksichtigte. Dadurch wurden Unterschiede des Spongiosamusters zwischen den Gruppen und zwischen den Regionen deutlich.

2.6 Analyse der Osteozytenmorphologie und -häufigkeit in Silber-Färbung

2.6.1 Femurschnitte

Die Auswertung berücksichtigte insbesondere die Morphologie der Osteozyten sowie das lakunokanalikuläre Netzwerk. Für das Grading der Schnitte wurde die Anzahl der Osteozyten erfasst und zwischen spindelförmigen (aktiven) und rundlichen (inaktiven) Knochenzellen unterschieden. Außerdem wurde die Anzahl leerer oder remineralisierter Lakunen detektiert. Auch die Formation des kanalikulären Systems ging durch die Vernetzung und Größe des Dendritenbaumes in die Analyse ein. Daneben wurde für das Grading auch der interzelluläre Abstand berücksichtigt. Trabekelmorphologie und Vernetzung der Knochenbälkchen gingen hier nicht ins Grading ein, sondern dienten nur der späteren Korrelation. Insgesamt wurden in der Femurregion nur 29 Schafe untersucht, da OVXDS8 auf Grund einer Trümmerfraktur nicht ausgewertet werden konnte.

Folgende Kriterien wurden für die Silber-Färbungen von Femur und LWK ausgewertet:

- Zellzahl an Osteozyten
- Anteil spindelförmiger Zellen

- Anteil runder Zellen
- Anteil an leeren Lakunen
- Ausprägung des kanalikulären Netzwerks
- Interzellulärer Abstand

2.6.1.1 Ermittlung der Gradingssumme

Für die Ermittlung des Gradings wurden die Analysevariablen miteinander verrechnet. Die Anzahl der Osteozyten, Spindelform und Größe der kanalikulären Formation gingen positiv in die Wertung ein, während runde Osteozytenmorphologien, leere Lakunen und die Größe des zellfreien Raumes negativ verrechnet wurden. Dabei wurden für die jeweiligen Variablen Punkte vergeben. Die Bewertungsskala umfasst den Bereich von 1 bis 5. Jedes Kriterium ging in Abhängigkeit der Ausprägungsstärke mit einer bestimmten Punktzahl in die Gesamtsumme ein (Tab. 1).

Zur Analyse wurden die Werte entsprechend verrechnet und die Summationswerte der einzelnen Tiere mit Hilfe einer Bewertungsskala in ein entsprechendes Grading transkribiert (Tab. 2 und 3).

Daneben diente der gebildete Gruppenmittelwert jeder Gruppe dazu, repräsentative Schnitte für die Betrachtung unter dem LCM auszuwählen. Für die Silberschnitte der Femora wurde hierbei eine andere Bewertungsskala gewählt als für die LWK, da sich beide Regionen deutlich unterschieden und die Einteilung für den Wirbelkörper nicht sensitiv genug war (s. folgende Tabellen).

Wert	Ausprägung
1	Sehr selten /sehr gering
2	Selten/ gering
3	Deutlich/ mäßig
4	Häufig/ stark
5	Sehr häufig/ sehr stark

Tabelle 1: Ausprägungsmerkmale

Die Tabelle 1 gibt die Expressionsstärke der einzelnen Untersuchungsvariablen mittels Silber-Färbung wieder, die anschließend verrechnet wurden. Daraus wurde eine Gesamtgradingsumme gebildet. Die Zuordnung der Gesamtgradingsumme zu einem Zellgrading unterschied sich zwischen Femur und LWK (Tab. 2, Tab. 3).

Femur	
Gesamtsumme	Grading
< - 1	1
0 bis 1	2
2 bis 4	3
> 5	4

Tabelle 2: Grading Femur

Lumbalwirbelkörper (LWK)	
Gesamtsumme	Grading
< -3	1
-2 bis -1	2
0 bis 2	3
> 3	4

Tabelle 3: Grading LWK

Ergänzend wurde durch die Analyse der Spongiosaarchitektur die Trabekelmorphologie erfasst. Zu diesem Zweck wurde das Gradingssystem von der Toluidinblau-Färbung übernommen, um es mit dem Zellgrading zu korrelieren. Insgesamt wurden 29 Schafe der vier Gruppen untersucht.

2.6.2 Lendenwirbelkörper (LWK)

Für die Untersuchung der Wirbelkörper wurden dieselben Bewertungskriterien und Analysemethoden wie für das Femur herangezogen. Die Zuteilung der Gesamtwerte zu einem Grading musste allerdings modifiziert werden, da die Einteilung des Femurs für den Wirbelkörper nicht sensitiv genug schien (Tab. 3). Ohne die Modifikation des Gradings hätten sich die Unterschiede in der Variablenausprägung nur unzureichend dargestellt. In die Untersuchungen gingen insgesamt 30 Schafe ein.

2.7 OLCS-Analyse der Rhodaminschnitte und Schliffe

Um die Osteozytenarchitektur und besonders den Dendritenbaum hervorzuheben, wurden Schnitte des Beckenkamms und Schliffe der Femora mit Rhodamin infiltriert und unter konfokaler Laser-Mikroskopie ausgewertet. Deskriptiv wurde vor allem auf die Zellularität der Ausschnitte eingegangen, jedoch nur die Osteozyten berücksichtigt. Neben der genauen Zellform wurde darauf geachtet, ob es intrazelluläre Vakuolen gab und ob diese zentral oder peripher gelegen waren. Daneben wurden der Abstand zwischen den Zellen und die Vernetzung der Dendritenbäume analysiert. Besonders die Form der Dendriten, Länge, Flächigkeit und Verzweigungsrate wurden berücksichtigt. Ebenso wurde auf lokale und terminale Verdickungen der Dendriten (sog. Humps) eingegangen.

2.8 Histomorphometrie

Unter Histomorphometrie versteht man die Vermessung eines Gewebes nach Gestalt, Form und weiteren Parametern. Die Histomorphometrie des Knochengewebes ermöglicht eine quantitative Analyse der Knochenstruktur, der Zellularität, Morphologie und Mineralisation. Strukturelle Parameter, wie beispielsweise die Trabekeldicke (Tb.Th.), ermöglichen es, objektive Aussagen über die Knochenqualität zu treffen. Daneben bietet das Verfahren die Möglichkeit, Ergebnisse von μ CT und Histopathologie zu bekräftigen. Die Messungen werden mit Hilfe einer Analysesoftware (hier ImageJ) quantifiziert. Damit stellt sie ein nützliches Werkzeug zur Diagnostik und Bewertung metabolischer Knochenerkrankungen dar⁽¹¹¹⁾. Durch Biopsien und histomorphometrische Auswertung können verlässliche Aussagen über die Knochenstruktur, die Knochenqualität und den Umbau (Turnover) getroffen werden⁽¹⁰²⁾. Gerade auch für die Bewertung des osteoporotischen Knochenstatus ist sie bedeutsam^(130,131).

Bei der histomorphometrischen Analyse der silbergefärbten Schnitte aus Femur und LWK wurde neben der Knochenfläche, die Zellzahl und die Morphologie der Osteozyten

bestimmt. Ebenso wurde eine Mikropartikelanalyse der Rhodamin-Färbungen durchgeführt, wobei die Fläche des OLCS analysiert wurde. Hierfür wurden repräsentative Tiere anhand der Silber-Färbung ausgewählt.

2.8.1 ImageJ

Für die Analyse von Zellmorphologie, Zellzahl und Knochenfläche wurde das semi-automatische Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (ImageJ software version 1.47, National Institutes of Health, Wayne Rasband, USA) verwendet. In die Untersuchung gingen die silber-gefärbten (AgNO_3) Paraffinschnitte ein. Von jedem Objektträger erfolgte die randomisierte Auswahl von 20 Bildern. Für die bestmögliche Auflösung wurden bis zu 15 Einzelbilder zu einem Gesamtbild zusammengefügt, sodass für die histomorphometrische Auswertung 1180 einzelne Fusionsbilder aus etwa 18.000 Bildern generiert wurden. Die Aufnahme erfolgte dabei unter 20x Vergrößerung, der sich die weitere Auswertung mit dem Programm FIJI (ImageJ) anschloss. Die einzelnen Bearbeitungsschritte mit ImageJ sind im Anhang dargestellt (S. 131ff).

2.8.1.1 Ermittlung der Trabekelfläche

Für die Vermessung der trabekulären Knochenfläche mittels ImageJ wurden die Schnittbilder mittels FIJI geöffnet und anschließend die Skala eingestellt. Für die Bilder wurde ein Verhältnis von 3 Pixeln = 1 μm ermittelt und im Programm justiert. Danach musste die Knochenfläche identifiziert werden. Durch die manuelle Setzung der „region of interest“ (ROI) mit dem „Polygonal Selection Tool“ wurde die Knochenfläche markiert und nicht-knöcherner Anteile ausgeschlossen. Als Nächstes wurde die Knochenfläche ermittelt. Dies geschah durch die Konversion in ein Binärbild mittels Zuordnung von Schwarz- und Weißwerten im ROI. Bei der Auswertung wurde die Knochenfläche der 20 Einzelbilder von jedem Tier zusammengefasst. Anschließend erfolgte eine statistische Analyse der Ergebnisse mit SPSS. Die Einzelschritte sind im Anhang (S. 131ff) genau beschrieben und dargestellt.

2.8.1.2 Ermittlung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Osteozyten in ImageJ in drei Kategorien unterschieden (Abb. 8) und einer Kategorie von 1 bis 3 zugeordnet. Danach wurde jede einzelne Zelle manuell einer Kategorie zugeteilt. Insgesamt wurden in beiden Regionen über 80.000 Zellen kategorisiert. Für die Analyse wurde aus den 20 Einzelbildern die Gesamtzahl der Zellen pro Tier errechnet. Zudem konnte die Zellzahl auf die Knochenfläche in Bezug gesetzt und somit ein besserer Vergleich getroffen werden. Eine genaue Beschreibung und Bebilderung der Einzelschritte findet sich auf Seite 134f. im Anhang.

2.8.1.3 Osteozytenkategorien

1. Spindelförmig:

Hierzu wurden Osteozyten gezählt, die eine längliche „spindelförmige“ Zellform aufwiesen und sich in der Größe hervorhoben. Die Zelllänge betrug etwa das Dreifache des Durchmessers. Daneben mussten sie ein deutlich ausgeprägtes Dendritenwerk ausbilden (Abb. 8a/ d).

2. Intermediär Typ:

Diese Form umfasste alle Zellen, die nicht klar zu 1 oder 3 zuteilbar waren. Intermediäre Formen wiesen einen rundlichen bis olivenförmigen Zelleib auf, unterschieden sich jedoch in der Größe von den Spindeln. Daneben war das dendritische Netzwerk schwächer ausgebildet und die Kanalikuli kürzer. Ein Zellkern war nicht deutlich abgrenzbar (Abb. 8b).

3. Sphärischer Typ/ Lakune:

Diese Zellen waren rundlich und prägten ein reduziertes Dendritenwerk aus. Der Nukleus war nicht abgrenzbar und die Zellfläche gering. Auch mikropetrotische Formen wurden gezählt (Abb. 8c).

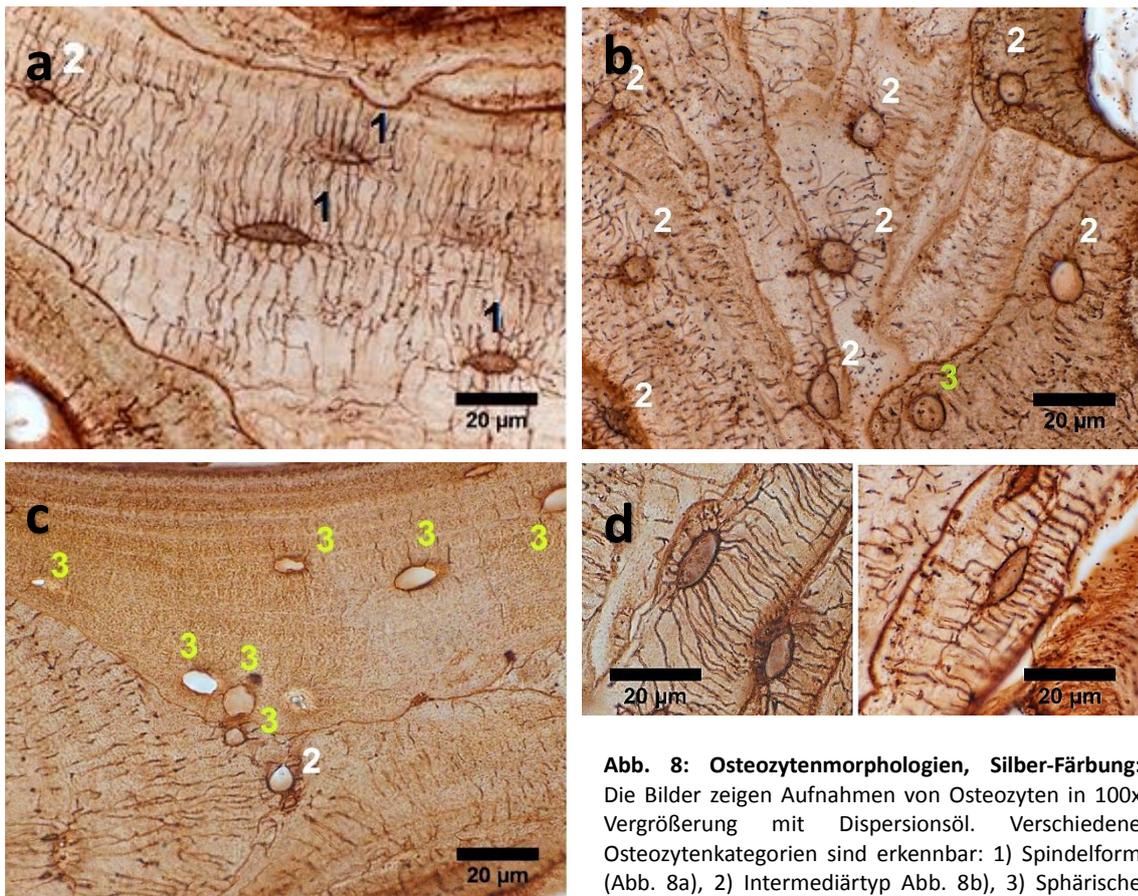


Abb. 8: Osteozytenmorphologien, Silber-Färbung: Die Bilder zeigen Aufnahmen von Osteozyten in 100x Vergrößerung mit Dispersionsöl. Verschiedene Osteozytenkategorien sind erkennbar: 1) Spindelform (Abb. 8a), 2) Intermediärtyp Abb. 8b), 3) Sphärische Form oder Lakune. Lakunen finden sich insbesondere in

Abb. 8c. Von leeren Lakunen werden keine Dendriten mehr ausgebildet. Abb. 8d zeigt verschiedene Spindelformen. Links ist die asymmetrische Dendritenexpression dargestellt. Die Dendriten gehen von einem linearen Hauptdendrit ab und streben vermehrt dem Endost zu. Die rechte Teil-Abb 8d zeigt einen deutlichen, flaschenbürstenartigen Verlauf. Die spindelförmige Zelle besitzt lineare Hauptdendriten, die sich parallel zur Knochenoberfläche ausrichten. Von diesem gehen radiäre Dendriten rechtwinklig ab und streben dem Endost zu. (Vergrößerung 100x).

2.8.1.4 Partikelanalyse

An die deskriptive Analyse schloss sich eine histomorphometrische Mikropartikelanalyse an. Für die Berechnung der osteozytären Zellfläche und des dendritischen Netzwerks wurden die rhodamin-gefärbten Schnitte und Schriffe unter dem LCM-Mikroskop mit 63x Vergrößerung analysiert und ebenfalls mit ImageJ ausgewertet. Nach entsprechender Skalierung der Bilder (20 μm = 118 Pixel) konnte das Bild in die einzelnen Farbkanäle aufgetrennt werden. Zum Teil musste der Grenzwert dazu erneut korrigiert werden. Ebenso wurden Bildartefakte manuell ausgeschlossen. Anschließend konnten Partikel einer vorher definierten Größe dargestellt und berechnet werden. Aus repräsentativen Tieren einer Gruppe wurden von den Femora pro Tier 4 Bilder und von den Beckenkämmen 3 Bilder aufgenommen. Eine genaue Beschreibung und Bebilderung der Einzelschritte findet sich im Anhang auf Seite 136f.

2.9 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte zur Beurteilung der verschiedenen Variablen mit dem Programm SPSS Version 21.0 (IBM SPSS Statistics, New York, USA). Es wurden folgende Parameter gemessen: Zahl der Osteozyten, Anzahl der spindelförmigen Zellen, Anzahl der sphärischen Osteozyten (Lakunen) und die Knochenfläche. Weiterhin gingen für die Analysen der deskriptiven Auswertungen die Zellzahl, die Zahl runder und spindelförmiger Osteozyten, die Anzahl leerer Lakunen, die Ausprägungsstärke des kanalikulären Systems und die Größe der zellfreien Zonen ein.

Die deskriptiven Daten der Knochenarchitektur von toluidinblau-gefärbten Schnitte wurden mittels Histogramm, Quantil-Quantil-Diagramm (Q-Q-Plot) und Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Aufgrund fehlender Normalverteilung und des ordinalen Datenniveaus wurde der Kruskal-Wallis-Test für mehrere unabhängige Stichproben gewählt und innerhalb der Gruppen einer Region auf Unterschiede getestet⁽¹³²⁾. Danach wurde ein Dunn-Bonferroni-Post-Hoc-Test angeschlossen und ein adjustierter p-Wert von 0,05 als Signifikanzniveau gewählt. Durch den ersten Test wird die exakte zweiseitige Signifikanz innerhalb der Region geprüft und durch den zweiten Test die genauen Gruppenunterschiede bestimmt. Die Adjustierung des Signifikanzlevels wirkt der Kumulierung des Fehlers erster Art bei mehrfachem Testen entgegen. Um die zwei Regionen zu vergleichen, wurde ein Mann-Whitney-U-Test verwendet, der die einzelnen Gruppen beider Regionen untersuchte. Gleiches Vorgehen wurde auch zur Analyse der deskriptiv ausgewerteten Silberschnitte herangezogen und auf die gleichen Tests zurückgegriffen.

Das intervallskalierte und normalverteilte Datenniveau der histomorphometrischen Zellzahl- und Knochenflächen-Daten aus den Silberschnitten, die mittels ImageJ

erhoben wurden, konnten mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet werden. Zur Überprüfung der Varianzhomogenität wurde der Levene- und bei Inhomogenität der Welch- und Brown- Forsythe Test verwendet. An die ANOVA schloss sich eine Post-Hoc-Testung nach Bonferroni bei gleicher Stichprobengröße und Varianzhomogenität sowie eine Testung nach Games Howel für inhomogene Varianzen an⁽¹³³⁾. Letztere Testung wurde jedoch nur bei einer Variablen verwendet. Die ANOVA zeigte Signifikanzen innerhalb der vier Gruppen auf, bedurfte jedoch des Post-Hoc-Tests zur Identifikation der jeweiligen Gruppe. Um zwischen den Regionen zu unterscheiden, wurde für die jeweilige Variable bei Normalverteilung ein t-Test durchgeführt.

Für die statistische Auswertung der histomorphometrischen Daten zur Berechnung des dendritischen Netzwerks wurden die Fläche der Zelle und deren Fortsätze ermittelt und zur Knochenfläche in Bezug gesetzt. Untersucht wurden die Proben des Zeitpunkts 8 Monate bei den Femora und der Zeitpunkte 0, 3 und 8 Monate bei den Beckenkämmen. Im Femur erlaubte das intervallskalierte, jedoch nicht normal-verteilte Datenniveau die Auswertung mit dem Kruskal-Wallistest und der Dunn-Bonferroni-Korrektur mit adjustiertem p-Wert von 5 %. Damit konnten Unterschiede zwischen den Gruppen zu einem Zeitpunkt aufgezeigt werden. Für die wiederholten Messungen im Beckenkamm wurden die Analysedaten mit dem Friedman-Test für abhängige Stichproben und Dunn-Bonferroni-Korrektur ausgewertet⁽¹³⁴⁾. Hierdurch konnten Unterschiede innerhalb der Gruppen zwischen den Zeitpunkten detektiert werden.

Die Daten wurden in Grafiken übertragen. Für die ordinalskalierten Daten der deskriptiven Analysen wurde der Median und das 95 % Konfidenzintervall dargestellt. Für die intervallskalierten Daten der histomorphometrischen Ergebnisse aus Silber- und Rhodamin-Färbung wurden Mittelwerte und der mittlere Standardfehler (SE) ausgegeben. Das Signifikanzniveau wurde in den Grafiken als a: $p=0,05$, b: $p=0,001$ und c: $p=0,0001$ dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Toluidinblau-Färbung zeigt Veränderungen in der Knochenarchitektur zwischen den Gruppen

Die Mikroarchitektur des spongiösen Knochens des Femurs und der Wirbelkörper wurde mit Hilfe der Toluidinblau-Färbung analysiert, um die Veränderungen des Knochens nach acht Monaten unter den jeweiligen Behandlungen zu beurteilen. Für die Analyse des Trabekelwerks wurde das Spongiosagradingssystem verwendet, das die Trabekel anhand ihrer Charakteristika in verschiedene Gradinggruppen einteilt (Abb. 7, S. 36).

Bei der histologischen Analyse der Schnitte fielen spezielle Trabekelmuster auf, die sich in den Schnitten wiederholten und spezielle Organisationsformen des spongiösen Knochens widerspiegelten. Drei verschiedene Formen konnten anhand des Balkenmusters und der Kavitätenform voneinander abgegrenzt werden.

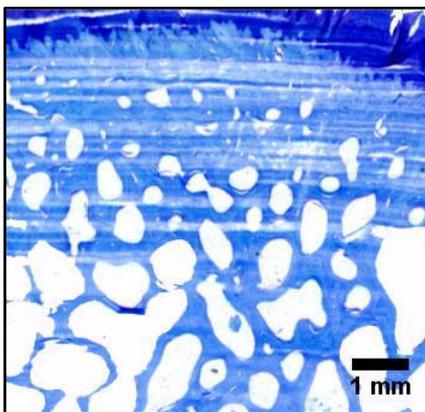


Abbildung 9: Toluidinblau OVX6 Femur:

„Lakunär ausgestanztes Muster“:

Besonders im oberen kortikalen Bildbereich fällt ein flächiges Knochenareal auf, das in die Spongiosatrabekel übergeht. Hier zeigen sich in den Übergangsbereichen kleine rundliche Kavitäten von geringer Fläche. Der Knochen nimmt den Großteil des Bildes ein, während die Kavitäten daraus ausgestanzt wirken. Im unteren Bildbereich finden sich dünnere Trabekel, die gut vernetzt sind, jedoch größere Knochenhöhlen umschließen. OVX6 bezeichnet hier Schaf Nummer 6 der ovariectomierten Gruppe (Vergrößerung 20x).

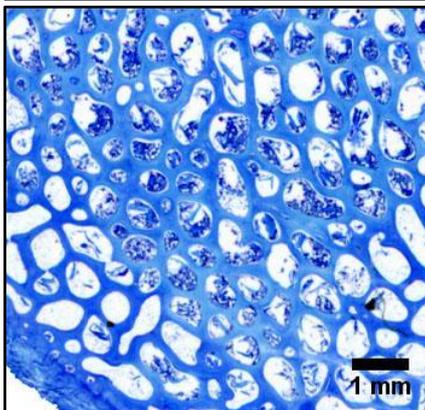


Abbildung 10: Toluidinblau OVX7 LWK:

„Schweizer-Käse-Muster“:

Der Knochen weist eine gut vernetzte Knochenarchitektur auf. Dabei fällt das groblakunäre Muster der Knochenhöhlen auf. Dieses wurde in Anlehnung an andere histopathologische Muster als „Schweizer-Käse-Muster“ bezeichnet. Hier steht die kavitäre Fläche im Vordergrund. Es finden sich annähernd runde Hohlräume, die verschiedenen große Flächen einnehmen. Dabei werden die Kavitäten von einem flächigen Trabekelwerk umfassen. Es besteht eine hohe Konnektivität und der intertrabekuläre Abstand sowie der internodale Abstand sind gering. (Vergrößerung 20x).

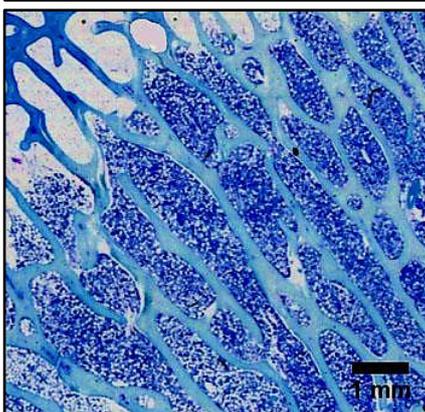


Abbildung 11: Toluidinblau Kontrolle3 Femur:

„Backsteinmuster“:

Das Bild zeigt eine Übersichtsvergrößerung des zentralen Anteils aus dem Querschnitt des Femurkopfes von Schaf K3 der Kontrollgruppe. Es ist ein „backsteinartiger“ Bälkchenverlauf erkennbar. Dieser ist durch parallele Trabekel gekennzeichnet, die über Querverbindungen quaderartige Hohlräume einschließen. Vor allem in zentralen Bildbereichen der höheren Therapiegruppen werden sie vermehrt gefunden. Die Haupttrabekel sind entsprechend der Knochenachse ausgerichtet und über annähernd rechtwinklige Quertrabekel vernetzt. (Vergrößerung 20x).

Repräsentative Übersichten mit Inset Femur:

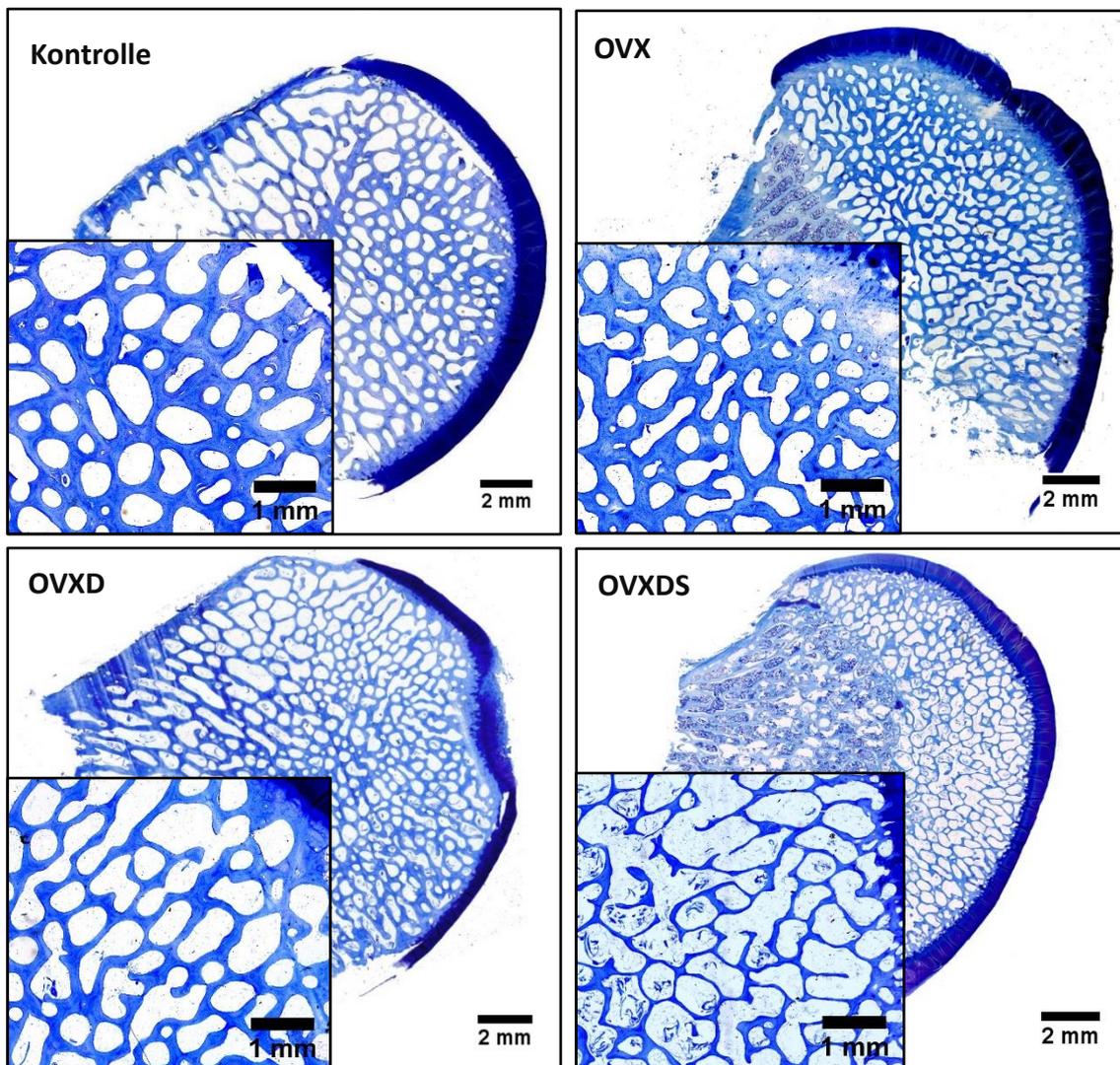


Abbildung 12: Übersichten Spongiosa Femurkopf Toluidinblau-Färbung mit Inset:

Die Bilder zeigen einen Querschnitt durch die Femurköpfe der Schafe nach 8 Monaten. Es wurden repräsentative Schnitte aus den Gruppen ausgewählt. Neben dem Querschnitt ist ein vergrößertes Inset des Tieres dargestellt, das die Trabekelcharakteristika besser wiedergibt. Für die **Kontrollgruppe** wurde Schaf K1 mit einem Grading von G4 gewählt. Hier findet sich ein flächiges, gut vernetztes Trabekelwerk. Das Schaf der **OVX**-Gruppe zeigt ein ähnliches Trabekelwerk mit etwas dünneren Trabekeln, was sich auf die Gesamtstruktur bezogen als G3 äußert. Auch Tier **OVXD8** weist ein Grading von 3 mit gut vernetztem Trabekelwerk auf. Die Trabekel wirken flächig, zeigen jedoch einige Abbrüche. Daneben finden sich Inhomogenitäten der Spongiosa. Kopfnah gibt es vermehrt kleine lochartige Kavitäten, die sich auf der lateralen Schaftseite in größere, teils „backsteinartige“ Formen wandeln. Tier **OVXDS2** wurde als G2+ gewertet. Es zeigt sich ein deutlich dünneres Trabekelnetz mit vielen terminalen Endigungen und Abbrüchen. Daneben finden sich vereinzelt gelöste Balkenkonglomerate. Das Trabekelwerk verbleibt gut vernetzt, wirkt aber fragil und schwächer als bei den vorigen Tieren. (K: Kontrolle, OVX: Ovariectomie, OVXD: Ovariectomie + Diät, OVXDS: Ovariectomie/ Diät/ Steroid. Vergrößerung Inset 20x, Bild 2,5x. Weitere Einzelheiten siehe Text).

Repräsentative Übersichten mit Inset Lendenwirbelkörper 4:

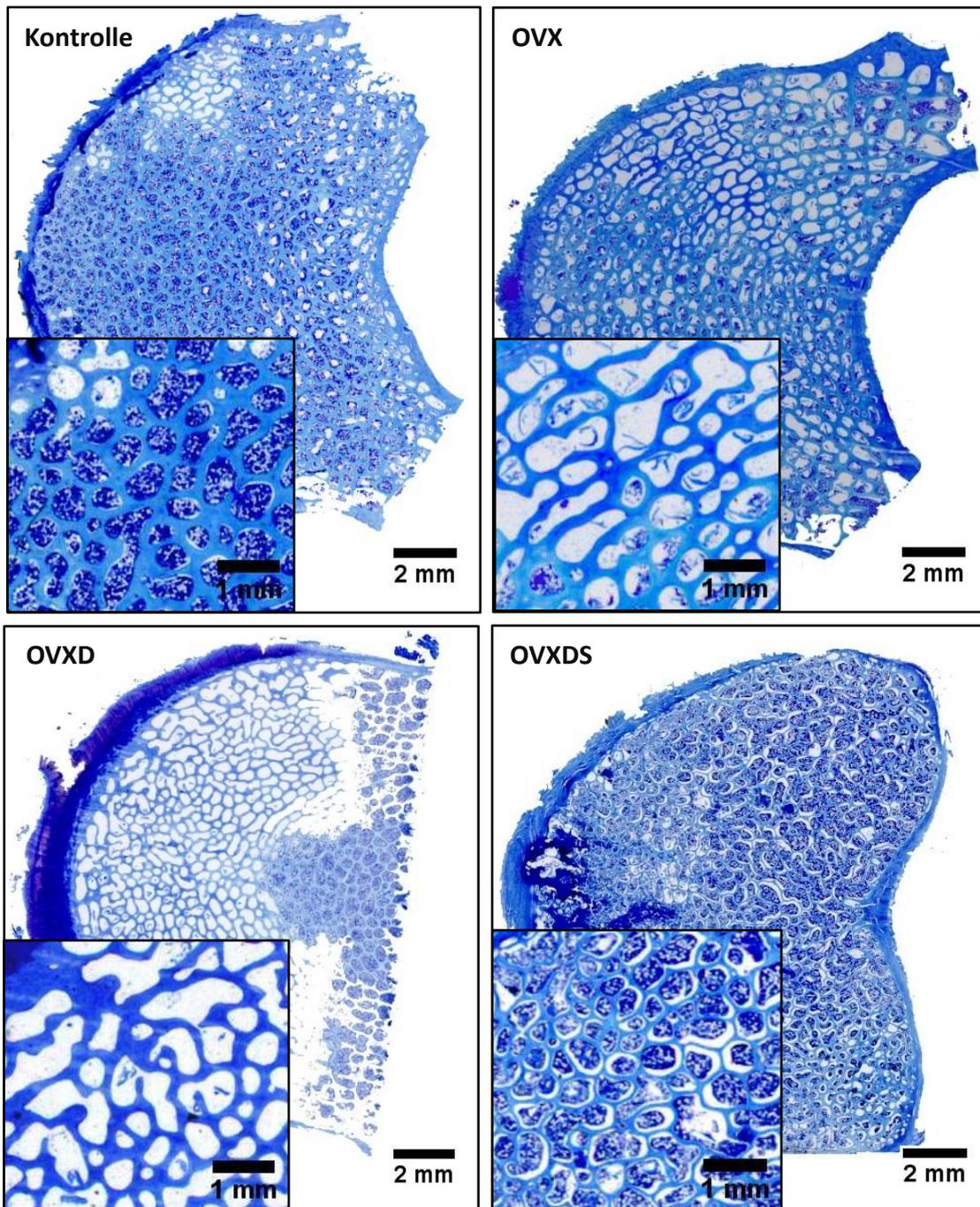


Abbildung 13: Übersichten Spongiosa Wirbelkörper Toluidinblau-Färbung mit Inset:

Die Bilder zeigen einen Querschnitt durch den vierten Lumbalwirbelkörper nach 8 Monaten. Hierbei wurden repräsentative Schnitte aus den Gruppen ausgewählt und mit einem vergrößerten Inset zur Darstellung des Trabekelwerks abgebildet. Für die **Kontrollgruppe** wurde Schaf K5 ausgewählt. Es wurde auf Grund der guten Vernetzung des Trabekelwerks mit dem hier vorliegenden „Schweizer-Käse-Muster“ als G4 gewertet. Es zeigen sich flächige Trabekel und eine runde Kavitätenform. Aus der **OVX**-Gruppe wurde Schaf OVX7 als repräsentativ im Grading von G3 ausgewählt. Die Trabekel zeigen sich ähnlich dick, die umschlossenen Kavitäten sind jedoch vergrößert und von polygonaler oder quaderartiger Gestalt. Der Internodalabstand ist etwas vergrößert. Auch **OVXD7** wurde noch als G3 gewertet, aber als G3- abgestuft. Die Kavitäten sind vergrößert und es zeigen sich etwas dünnere Trabekel. Zudem stellen sich vereinzelt Abbrüche dar. Auch hier ist die intertrabekuläre Separation nur gering. Im Unterschied dazu weist **OVXDS2** ein G2+ Grading auf. Besonders deutlich ist die stark reduzierte Trabekeldicke bei ähnlich gutem Vernetzungsgrad. Der internodale Abstand und die intertrabekuläre Separation unterscheiden sich nur geringfügig. Das gut vernetzte Trabekelwerk grenzt sich durch die reduzierte trabekuläre Fläche jedoch von den Vorgruppen ab. (Vergrößerung Bild 2,5x, Inset 20x).

3.2 Femur – Abnahme der trabekulären Vernetzung und Trabekelzahl von Kontroll- zu OVXDS-Gruppe

3.2.1 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe zeigten die meisten Schafe eine gute Mikroarchitektur der Spongiosa. Der Median lag bei 3, zwei Tiere wiesen ein hohes Grading von 4 auf. Die Werte eins und zwei fanden sich nicht. Bei den Tieren mit dem Grading von vier gab es ein gut vernetztes Trabekelmuster, das durch viele Abgänge und flächige Verbindungen gekennzeichnet war und sich im Verlauf darstellen ließ. Abbrüche waren selten vorhanden. Die Hohlräume zwischen den Trabekeln erschienen klein und wirkten lochartig ausgestanzt, sodass die intertrabekulären Abstände gering waren. Vereinzelt wurden die Hohlräume in zentralen Bildbereichen etwas größer und polygonal bis backsteinartig. Die durchweg gute Knochenstatik resultierte im Grading G4 (Abb.12 Femur Kontrolle). Das Trabekelmuster mit dem Grading G3 fand sich bei sechs Tieren der Kontrollgruppe. Hier waren die Trabekel zwar dick und kräftig, im Vergleich zu G4 allerdings dünner oder spärlicher ausgeprägt. Zudem schienen sie weniger gut vernetzt und die Maschenweite war vergrößert. Die Kavitäten nahmen polygonale Formen ein, wirkten weniger ausgestanzt und bildeten zentral meist längliche Formationen. Schaf K3 zeigte daneben eine inhomogene Architektur. Kortikal fand sich ein eng vernetztes Muster, das durch runde Hohlräume gebildet wurde und von flächigen und kräftigen Trabekeln umrahmt wurde. Zentral fand sich dagegen ein paralleles „Backsteinmuster“ (Abb. 11 Backsteinmuster) und einige terminale hakenförmige Trabekel.

3.2.2 OVX-Gruppe

In der OVX-Gruppe wiesen vier der sieben Tiere ein Grading von G3, eins ein G2+ und zwei ein Grading von G2 auf. Bei einigen G3-Tieren, wie Schaf OVX3, fanden sich knöcherne Unterschiede zwischen kortikalen und zentralen Bildbereichen. Während die kortikalen Bereiche der Spongiosa flächige und breite Trabekel aufwiesen, waren die zentralen Trabekel weniger flächig und eher lamellär aufgebaut, außerdem zeigte sich ein größerer Internodalabstand (Abb. 12 Femur OVX). Gerade kortikal fanden sich rundliche Hohlräume mit geringer Fläche und vereinzelt ein schmaler Streifen mit lakunär ausgestanztem Porenmuster (Abb. 9). Während sich die Kavitäten zentral hin ausdehnten, nahm die Vernetzung der Trabekel ab, die sich trajektorieell zum Femurschaft ausrichteten. Dagegen wies das, als G2 klassifizierte Schaf OVX6 zwar eine große trabekuläre Fläche auf, jedoch einen größeren Internodalabstand. Die Knochenhöhlen waren von polygonaler Gestalt und dominierten die Bildfläche. Auch andere Tiere desselben Gradings (bspw. OVX4) wiesen ein ähnliches Muster mit einer größeren Maschenweite auf. Die Trabekel waren allerdings dünner und schlechter

vernetzt. In zentralen schaftnahen Zonen fand sich häufig eine „backsteinartige“ Spongiosa.

3.2.3 OVXD-Gruppe

In der Doppelinduktionsgruppe lag der Median bei 2,5, die Spannweite zwischen 2 und 4. Gerade im Vergleich zu den anderen Tieren wiesen die G4 Schafe (OVXD2, OVXD5) ein breiteres Trabekelmuster mit kräftigere, besser vernetzten Trabekeln und einer geringeren intertrabekulären Separation auf. Schafe der G3-Gruppe (oder G2+ Gruppe) zeigten ein weniger dichtes Netz an Knochenbälkchen. So fand sich bei Schaf OVXD8 (Abb. 12 Femur OVXD) ein inhomogenes Knochenbild. Während kortikale Bereiche nur selten ein lakunär ausgestanztes Trabekelmuster zeigten, fielen in schaftnahen Knochenbereichen große kubische Knochenkavitäten auf. Gerade bei OVXD8 (G3) dominierte ein backsteinartiges Muster. Im Vergleich zu den G4 Tieren war die trabekuläre Fläche vermindert und der intertrabekuläre Abstand vergrößert. Die Knochenarchitektur der G2-Schafe war im Gegensatz dazu reduziert (OVXD4, Abb. 7 G2) und wies eine schlechtere Mikroarchitektur des Knochens auf. Die merklich dünneren Trabekel grenzten sich deutlich von OVXD8 ab. Dabei waren die Knochenbälkchen zwar gut verbunden, das kavitäre System war jedoch deutlich flächiger und wies einen häufig wabenartigen Verlauf auf. Daneben schienen die Trabekel dünner und von geringerem Anteil. Auch inkomplette Trabekel mit terminalen Endigungen waren häufiger ausgebildet.

3.2.4 OVXDS-Gruppe

Eindrücklich stellte sich die OVXDS-Gruppe neben den anderen Gruppen dar. Die Spongiosastruktur war besonders reduziert, was sich im geringeren Median von 2 und den niedrigeren Gradingwerten ausdrückte. Insbesondere wurde dies bei dem G1-Schaf OVXDS5 deutlich, das kein zusammenhängendes Trabekelwerk (Abb. 7 G1) ausbildete. Die Knochenbälkchen stellten einzelne unzusammenhängende, fragile Konglomerate dar. Teilweise waren sie zentral und im Halsbereich zu säulenartigen Strukturen angeordnet. Der intertrabekuläre Abstand war vergrößert und die Konnektivität deutlich reduziert. Die Knochenbälkchen ließen sich meist nicht im gänzlichen Verlauf darstellen, sondern brachen ab. Das Trabekelwerk von G1+-Schaf OVXDS1 war gegenüber OVXDS5 besser vernetzt, wenn auch dünn und mit großen Maschenweiten. Die Hohlräume nahmen den Großteil des Bildes ein und wurden von dünnen Trabekeln umgeben. Außerdem fiel der heterogene Knochenstatus auf. Stellenweise ergaben sich besser vernetzte Knochenbälkchen und kleinere Kavitäten. In anderen Bereichen überwogen deutlich die knochenfreien Zonen. Eine lageabhängige Zuordnung der unterschiedlichen Trabekelmuster konnte nicht erfolgen. Backsteinartige Trabekelformationen fanden sich zentral. Gerade die intertrabekuläre Vernetzung war

insgesamt geringer und die Abgänge pro Trabekel reduziert. Des Weiteren ergab sich ein vergrößerter Abstand der Vernetzungspunkte. Auch andere Tiere der Dreifachbehandlungsgruppe zeigten ein inhomogenes, teils unzusammenhängendes Trabekelmuster, sodass in der OVXDS-Gruppe der Knochenstatus deutlich reduziert wirkte.

3.3 LWK – Abnahme der trabekulären Dicke bei erhaltener Konnektivität

Bei den 30 Tieren wurde durchschnittlich ein hohes Grading von G3 erzielt (Median 3, SW_{Mediane} 2,25– 3,25). Daneben kamen hohe Gradingwerte deutlich häufiger vor. Die Spongiosastruktur war sehr flächig ausgebaut, sodass nur kleine Kavitäten gebildet wurden. Das „Backsteinmuster“ fand sich im Gegensatz zum „Schweizer-Käse-Muster“ selten.

3.3.1 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe zeigte sich eine sehr gut vernetzte Trabekelstruktur. Der Gruppenmedian lag bei 3,25, wobei drei Tiere als G4 und eines als G3+ eingestuft werden konnte. Das Spongiosagerüst wies eine sehr hohe Konnektivität mit vielen Abgängen pro Trabekel und einem sehr geringen internodalen Abstand auf. Durch die breite Trabekelfläche und die geringen intertrabekulären Abstände dominierte der knöcherne Bildanteil. Die Kavitäten waren zumeist von runder Form und geringer Fläche. Lakunär ausgestanzte Hohlräume fanden sich vor allem bei K4 und K5. Schaf K5 wurde dabei als repräsentatives Bild für ein G4 gewählt (Abb. 7 G4 und Abb. 13 Kontrolle). Bei den Tieren des Gratings G3 zeigten sich etwas größere Hohlräume und die Trabekel waren zum Teil geringfügig dünner ausgeprägt. Die Maschenweite war im Vergleich zur Gruppe G4 etwas vergrößert und von heterogener Morphologie. Durch die runden Kavitäten, die von den Trabekeln ringförmig eingeschlossen wurden, ergab sich häufig ein „Schweizer-Käse-Muster“ (Abb. 10). Daneben fanden sich auch runde und polygonale Trabekelformen bei geringer kavitärer Fläche. Abbrüche oder säulenartige Trabekelformen waren kaum ausgebildet.

3.3.2 OVX-Gruppe

Bei der ovariectomierten Gruppe lag der Median bei 3, die Spannweite bei 2,5- 4, sodass durchschnittlich ein hohes Grading erzielt wurde. Das G4 Schaf (OVX6) wies dicke kräftige Trabekel auf, die das Gesichtsfeld flächig ausfüllten und Hohlräume von geringer Größe umrahmten. Diese waren zumeist rund oder oval geformt und erinnerten an das bereits beschriebene „Schweizer-Käse-Muster“. Tier OVX5 wurde als G3+ gewertet, da es im Unterschied zu Schaf OVX6 eher länglich und etwas größere Hohlräume besaß.

Schaf OVX7 (G3) prägte eine teils inhomogene Knochenstruktur aus. Die Trabekel waren zwar überwiegend gut vernetzt, unterschieden sich jedoch in einigen Arealen in ihrer Dicke und in der Fläche des intertrabekulären Raumes (Abb. 13). In zentralen Bildbereichen stellte sich ein lochartiges Muster dar, das zu den lateralen Seiten eher backsteinartig auslief, sodass die Kavitäten in den peripheren Bereichen vergrößert waren. Der Vernetzungsgrad wirkte gruppenübergreifend hoch und der Internodalabstand gering.

3.3.3 OVXD-Gruppe

In der Doppelinterventionsgruppe fanden sich ein sehr homogenes Grading, wobei die meisten Schafe als G3 (n= 6) und zwei als G3- gewertet. Die Kompakta wirkte ausgedünnt, während das Mark zellreich erschien. Das Trabekelwerk war gut vernetzt und flächig ausgeprägt. Breite Trabekel umgaben Maschen von geringer Weite. Die Knochenkavitäten waren jedoch länglicher, von unterschiedlicher Größe und stellten sich nicht lakunär dar. Das „Schweizer-Käse-Muster“ war in dieser Gruppe seltener ausgeprägt als in den Vorgruppen, fand sich aber vereinzelt zentral (Abb. 10). Auch lakunär ausgestanzte Muster waren kaum ausgeprägt. Dafür zeigten sich häufiger terminale Trabekel sowie haken- und bogenförmige Abbrüche (Inset Abb. 13 LWK OVXD). Auch wenn die Trabekel weiterhin gut vernetzt waren, schienen sie im Vergleich zu der Kontrollgruppe vermindert und in ihrer Fläche reduziert. Einzelne Tiere (OVXD6) zeigten innerhalb der Gruppe eine reduzierte Spongiosastruktur, die aber auf Grund des hohen Vernetzungsgrades noch einem G3- entsprach. Auch hier zeigten sich innerhalb des Querschnittes heterogene Spongiosabereiche. Dabei waren zentrale Areale besser vernetzt als kortikale Areale und wiesen einen geringeren Intertrabekularabstand aus. Terminale abbrechende Trabekel waren eher selten vorhanden. Ebenso unterschied sich die trabekuläre Dicke in Abhängigkeit der Lokalisation im Knochen. Zentrale Trabekel waren bei OVXD7/ 8 gegenüber den peripheren Trabekeln verbreitert. Morphologisch wurden vor allem ovale und längliche Maschen ausgebildet.

3.3.4 OVXDS-Gruppe

Deutliche Unterschiede gegenüber den anderen Gruppen fanden sich unter der Dreifachbehandlung. Hier wies nur ein Schaf ein Grading von 3 auf, während der Median bei zwei lag. Es zeigten sich insbesondere dünnere Trabekel als in den Vorgruppen. Das G2 Muster wies feine, fragile Knochenbälkchen auf, die zum Teil terminal „blind“ endeten oder als einzelne Konglomerate erschienen. Das Trabekelgerüst wirkte zwar gut verstrebt, die Hohlräume waren allerdings deutlich größer. Trotz guter Quervernetzung war der Abstand zwischen den Trabekeln vergrößert. Die Maschenform variierte bei den Tieren stark von größeren rund-ovalen bis kubisch polygonalen Formationen. Vereinzelt konfluieren sie zu größeren Hohlräumen. In Abbildung 13 LWK OVXDS ist der

Wirbelkörper von Schaf OVXDS2 (G2+) dargestellt. Dieser weist ein gut vernetztes Trabekelwerk auf, das an ein „Schweizer-Käse-Muster“ erinnert, sich jedoch in der Trabekeldicke von ihm unterscheidet. Hier nahm die spongiöse Fläche nur einen geringen Bildanteil ein, die rundlichen Kavitäten überwogen deutlich. Aufgrund der guten Vernetzung war der internodale und intertrabekuläre Abstand nur geringfügig vergrößert. Die Trabekel erschienen wegen der deutlich reduzierten Dicke aber fragil. Das als G3 gewertete Schaf OVXDS4, besaßen hingegen besser vernetzte Knochenbälkchen. Besonders fiel die größere Trabekeldicke auf, sodass sie flächiger und weniger fragil wirkten. Zudem zeigten sich weniger Abbrüche und langstreckigere Trabekel.

3.4 Statistische Analyse der Spongiosaarchitektur in Toluidinblau-Färbung spiegelt abnehmende Knochenqualität wider

Mit der statistischen Auswertung sollten die Ergebnisse der deskriptiven Histologie objektiviert und miteinander verglichen werden. Dabei zeigt sich eine Veränderung der Spongiosastruktur mit zunehmender Therapiestärke. Die folgende Abbildung 14 stellt das Knochengrading zwischen den Gruppen und zwischen den Regionen gegenüber.

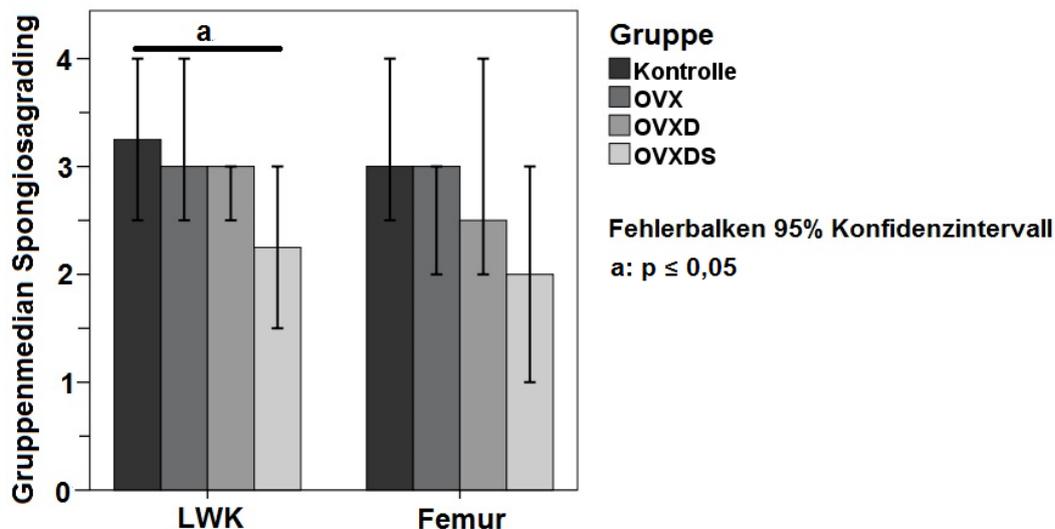


Abbildung 14: Gruppenmedian Spongiosagrating, Toluidinblau-Färbung:

Dargestellt sind die statistischen Gruppenmediane des Knochen-Grading im Lendenwirbelkörper und Femur. Daneben ist das 95% Konfidenzintervall angegeben. Es zeigt sich in beiden Regionen eine starke Abnahme des Gratings von der Kontroll- zur OVXDS-Gruppe. Im Wirbelkörper grenzt sich die OVXDS-Gruppe signifikant von der Kontrollgruppe ab ($p=0,007$). Die Mediane liegen im LWK höher als im Femur, was sich auch durch die Konfidenzintervalle in den höheren Gradingwerten darstellt. Eine signifikante Unterscheidung zwischen den Regionen findet sich nicht. ($p=0,05$).

Anhand von Abbildung 14 zur Verteilung der Mediane (M_{ed}) im Spongiosagrating lässt sich erkennen, dass die Kontrollgruppen beider Regionen, das höchste Grading mit der besten Vernetzung der Knochenbälkchen aufweisen. Im Femur fand sich ein Median von 3, im WK von 3,25. Mit Zunahme der Behandlungsstrategien nahm dabei die Qualität der Spongiosaarchitektur ab. Die Dreifachbehandlungsgruppe wies ein niedriges

Durchschnittsgrading auf und bildete somit innerhalb der Region die schlechteste Spongiosaarchitektur aus (Fem 2, WK 2,25).

Im Femur fand sich ein deutlicher Unterschied des Medians zwischen der Kontroll- und OVXDS-Gruppe (K: $M_{ed}=3$, $KI= 2,5- 4$; OVXDS: $M_{ed}=2$, $KI= 1- 3$), der die abnehmende Knochenqualität verdeutlichte. Daneben zeigte sich, dass die OVX-Gruppe des Femurs zwar ebenfalls ein Median von 3 aufwies, jedoch das Konfidenzintervall, im Gegensatz zur Kontrollgruppe niedriger, zwischen 2 bis 3 lag und somit im Vergleich (K: 2,5 bis 4) die Spongiosaarchitektur schlechter ausgebildet war.

Im Lendenwirbelkörper lagen die Mediane durchschnittlich höher. Besonders in der Kontrollgruppe stellte sich ein Median von 3,25 dar, wobei auch höhere Gradingwerte erzielt wurden ($KI 2,5$ bis 4). Die Gradingmediane nahmen ebenso von der Kontrollgruppe bis hin zur OVXDS-Gruppe auf 2,25 ab. Im Wirbelkörper war der Kontrast zwischen der Kontroll- und OVXDS-Gruppe signifikant ($p= 0,007$) ausgeprägt. Relativ homogen zeigte sich die OVXD-Gruppe, die ein enges Konfidenzintervall ($KI 2,5- 3$) aufwies. Im Gruppenverlauf wurde die abnehmende Knochenqualität durch abnehmende Gradingwerte wiedergegeben.

Im Vergleich zwischen den Femora und den Lumbalwirbelkörpern unterschieden sich beide Regionen deutlich, jedoch nicht signifikant voneinander. Höhere Gradingeinteilungen und somit eine besser vernetzte Knochenstruktur fanden sich bei den Wirbelkörpern. Ebenso zeigten diese eine homogenere Knochenstruktur, die durch das geringere Konfidenzintervall verdeutlicht wurde. Daneben kam es im LWK zu einer größeren Abnahme der Gradingwerte (bei engerem KI) als im Femur. In beiden Regionen wurde jedoch besonders der Unterschied zwischen unbehandelten (Kontrolle) und dreifach behandelten Tieren (OVXDS) deutlich (Abb. 14).

3.5 Analyse der Knochenfläche und Osteozytenmorphologie

3.5.1 Femur – Abnahme an Spindeln bei Zunahme des interzellulären Abstandes und leerer Lakunen

Um neben der Trabekelmorphologie die zellulären Veränderungen zu untersuchen, wurden mittels Silber-Färbung die Osteozyten und das kanalikuläre Netzwerk dargestellt. Dargestellt sind hier vergrößerte Ausschnitte der randomisiert aufgenommenen Bilder, sodass der Bildausschnitt nur einen Teil des Gesamtknochens und der Zellularität widerspiegelt.

3.5.1.1 Kontrollgruppe

Von den acht Tieren der Kontrollgruppe wiesen fünf Schafe ein Grading von G4 auf und zeigten somit eine hohe Ausprägung an Spindelformen und eine gute interzelluläre Vernetzung. Die folgenden Tabellen bilden die Analyse, sowohl für das Osteozyten- (Tab. 4) als auch für das Knochengrading (Tab 5.) und die Häufigkeitsverteilung der Einzelwerte ab (Tab. 6).

Femur	Grading Zellen	Häufigkeit
Kontrolle n= 8	2	1
	3	2
Median= 4	4	5

Tabelle 4: Osteozytengrading Kontrolle Femur

Femur	Grading Knochen	Häufigkeit
Kontrolle n= 8	2,5	2
	3	4
Median= 3	4	2

Tabelle 5: Spongiosagrading Kontrolle Femur

Femur	Bewertung	Ausprägung	Zellzahl	Spindel	Rund	Lakune	Kanalikuli	Zellfreie Zonen
Kontrolle n= 8	1	sehr schwach	-	-	-	6	-	5
	2	schwach	-	-	-	-	-	-
	3	mäßig/ deutlich	1	-	5	2	5	3
	4	viel/ stark	4	8	3	-	3	-
	5	sehr viel/ stark	3	-	-	-	-	-
Modus			4	4	3	1	3	1

Tabelle 6: Osteozytengrading Kontrolle Femur:

Die Tabelle gibt die Merkmalsausprägungen der Kontrollgruppe für die untersuchten Variablen in der Silber-Färbung wieder. Daneben ist die häufigste Ausprägungsform (Modus) dargestellt. In Tab. 5 und 6 sind zudem das Gesamtgrading und die Häufigkeit der einzelnen Gradingwerte von Osteozyten und Knochen dargestellt.

In der Kontrollgruppe fanden sich die meisten Schafe mit einem Zellgrading von G4 (n= 5) wieder (Tab. 4). Dies beruhte auf einer zellreichen Mikrostruktur, da viele bis sehr viele Osteozyten aufgefunden wurden. Durch die hohe Zellularität waren die interzellulären Abstände gering (Modus= 1). Fünf Tiere wiesen einen sehr geringen Abstand auf (1), bei drei Tieren fand sich eine zum Teil leicht vergrößerte Distanz zwischen den Osteozyten (3). Gerade spindelförmige Osteozyten wurden in starkem Maße angetroffen. Während überwiegend spindelförmige Zellen ausgebildet wurden, traten runde Morphologien zwar auf, waren jedoch deutlich seltener anzutreffen. Runde Osteozyten waren bei drei Tieren häufig und bei fünf Tieren in nur mäßigem Verhältnis anzutreffen. Lakunen fanden sich sehr selten (Modus= 1). Die in den Knochenkanälchen ausgeprägten Dendriten ließen sich meist deutlich (3) und bei drei Schafen häufig (4) darstellen. Daneben zeigte sich, dass vor allem kortikal vermehrt spindelförmige Zellen vorkamen. Diese wiesen mehr

Kanalikuli auf, die sich im Verlauf gut anfärbten. Die Osteozyten waren reihenartig ausgerichtet. Zentral im Knochen wurden mehr rundliche Zellen gefunden. Allerdings unterschieden sich die Tiere innerhalb der Anschnitte, sodass nicht in jedem Anschnitt die beobachteten Phänomene anzutreffen waren.

Bei der Untersuchung des Spongiosawerks (Tab. 5) zeigten sich überwiegend flächige Trabekel, die sich im Verlauf vollständig darstellten und gut vernetzt waren. Die Knochenbälkchen waren breit verbunden und wiesen das bereits beschriebene grob lakunäre Muster auf. Die Knochenkavitäten waren überwiegend klein, in ihrer Form aber inhomogen. Stellenweise fanden sich größere lakunäre Formen und polygonale, großflächigere Hohlräume. Häufig unterschieden sich die zentralen Knochenanschnitte von den kortikalen. Hier zeigte sich dickeres Trabekelwerk, das sich zentral lichtete, säulenartig fortsetzte und verjüngte.

Bei den fünf Tieren mit dem Osteozytengrading 4 fanden sich in den angeschnittenen Knochenbälkchen sehr viele Osteozyten wieder, die insbesondere kortikal spindelförmig waren (Bild 16, K8, S. 60). Runde Formen kamen zwar auch hier vor, jedoch in geringerem Maße. Besonders in zentralen Trabekelbereichen waren sie anzutreffen. Leere Lakunen traten dagegen sehr selten auf und waren zum Teil bereits remineralisiert (Mikropetrose). Diese Lakunen waren bereits mit neuem Knochenmaterial gefüllt, hoben sich aber durch Farbunterschiede ab und wurden von einer feinen Zementlinie abgegrenzt. Kanalikuli konnten bei ihnen nicht mehr dargestellt werden. Das kanalikuläre Netzwerk prägte sich bei den vitalen Osteozyten stärker aus, die Verzweigungen waren häufiger und das Dendritenwerk umfangreicher. Auch das „flaschenbürstenartige“ Muster konnte dargestellt werden. Die Osteozyten einer Mineralisationsschicht ordneten sich linear an. Auch ihre Kanalikuli verliefen parallel (Bild 16). In tieferen Mineralisationsschichten erschienen die Zellen dagegen vermehrt ungeordnet und die Dendriten reduziert, teils auch mit abweichender Orientierung.

Besonders Schaf K4 war für diese Gruppe repräsentativ und wurde mit einem Grading von 4 bewertet. Es prägte zahlreiche spindelförmige Osteozyten aus (4), die eng benachbart, aber leicht versetzt angeordnet waren. Auch rundliche Osteozyten kamen in gleichem Ausmaß vor (4). Es zeigten sich zwar leere Lakunen (1) und zellfreie Bereiche (3), allerdings waren diese vermindert und letztere mit Kanalikuli stark durchsetzt. Die Kanalikuli ließen sich in den zellfreien Zonen keiner Zelle direkt zuordnen. Auch „Flaschenbürsten-Formationen“ wurden angetroffen.

Schaf K5 und K6 wurden ebenso als G4 eingeteilt, wobei besonders bei K5 die Kanalikuli hervortraten (4). Auch im Knochengrading wurde bei diesen Schafen ein Grading von G4 vergeben, da ein engmaschiges, sehr flächiges Trabekelwerk mit lakunär ausgestanzt wirkenden Hohlräumen vorhanden war. Es fanden sich breit verbundene

Knochenbälkchen mit vielen Abgängen pro Trabekel. Insgesamt nahm die trabekuläre Fläche den Großteil des Gesichtsfeldes ein.

Schaf K2 (hier nicht dargestellt) grenzte sich als einziges Schaf mit einem Osteozytengrading von G2 deutlich ab. Die Osteozyten (2) waren zu gleichen Teilen spindelförmig oder rundlich (je Ausprägung von 4). Leere Lakunen kamen zwar vor, aber nur in mäßig starkem Ausmaß (3). Die dendritischen Ausläufer wiesen terminale Auftreibungen und einen kürzeren Verlauf auf. Insgesamt schien das kanalikuläre Netzwerk reduziert. Die Osteozyten fanden sich bei Schaf K2 selten in Reihen angesiedelt, sodass sich größere zellfreie Räume ergaben. Auch die Knochenstruktur wurde als G2+ eingeteilt. Die Trabekel stellten sich zwar flächig, jedoch nur mäßig vernetzt dar. Daneben ergaben sich größere Hohlräume von meist polygonalem und vereinzelt lakunärem Muster. Die Knochenbälkchen ließen sich häufig nicht im Verlauf verfolgen, da sie abbrachen und als haken- oder bogenförmige Ausziehungen endeten.

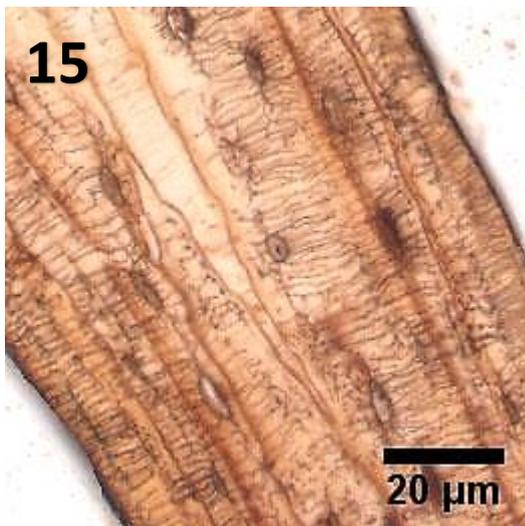


Abb. 15: Femur K6, Silber-Färbung:

Das Bild zeigt Schaf K6, welches ein Zellgrading von G4 aufweist. Dabei zeigen sich kortikal vor allem vermehrt Spindelformen. Diese weisen viele Kanalikuli und meist einen deutlichen Zellkern auf. Dabei gehen von einem parallel mit der Mineralisationslinie verlaufenden Stammdendriten, radiäre Nebendendriten ab, die dem Endost zustreben. Zum Knocheninneren hin ist die Dendritenzahl asymmetrisch vermindert. Daneben wird die lineare Anordnung der Zellen in den verschiedenen Mineralisationsschichten deutlich, die durch Zementlinien getrennt sind. Zentral im Knochen finden sich eher rundliche Osteozyten mit einer verminderten Dendritenzahl. (Vergrößerung 20x).



Abb. 16: Femur K8, Silber-Färbung:

Das Bild zeigt Schaf K8 mit einer Gradingeinteilung von G4. Im Vergleich zu K6 zeigt sich in dem dargestellten Bildausschnitt zwar eine leicht verminderte Zellzahl, jedoch sind in anderen Anschnitten gleich viele Osteozyten anzutreffen. In diesem Anschnitt finden sich endostnah Spindelformen mit zunehmender Abrundung endostfern. Des Weiteren werden die unterschiedlichen Zellvolumina und Dendritenzahlen der verschiedenen Morphologien deutlich. In einigen zentralen Zonen stellt sich die Interzellulardistanz vergrößert und kanalikulärmer dar. (Vergrößerung 20x).

3.5.1.2 OVX-Gruppe

In der ovariectomierten Gruppe lag der Modus bei einem Grading von G3. Zwei Tiere wiesen ein besseres Zellgrading von G4 und zwei ein G2 auf (Tab. 7).

Femur	Grading Zellen	Häufigkeit
OVX n= 7	2	2
	3	3
Median= 3	4	2

Tabelle 7: Osteozytengrading OVX Femur

Femur	Grading Knochen	Häufigkeit
OVX n= 7	2	2
	2,5	1
Median= 3	3	4

Tabelle 8: Knochengrading OVX Femur

Femur	Bewertung	Ausprägung	Zellzahl	Spindel	Rund	Lakune	Kanalikuli	Zellfreie Zonen
OVX n= 7	1	sehr schwach	-	-	-	2	-	3
	2	schwach	-	1	-	1	-	-
	3	mäßig/ deutlich	3	3	5	3	5	4
	4	viel/ stark	4	3	2	-	2	-
	5	sehr viel/ stark	-	1	-	-	1	-
Modus			4	3	3	3	3	3

Tabelle 9: Osteozytengrading Femur:

Die Tabelle gibt die Merkmalsausprägungen der OVX-Gruppe für die untersuchten Variablen in der Silber-Färbung wieder. Daneben ist die häufigste Ausprägungsform (Modus) dargestellt. In Tab. 7 und 8 sind zudem das Gesamtgrading und die Häufigkeit der einzelnen Gradingwerte von Osteozyten und Knochen dargestellt.

Bei den ovariectomierten Schafen kam das Grading G3 am häufigsten vor. Die Schnitte schienen zellreich (Modus 4), die meisten anderen Variablen aber nur mäßig stark ausgeprägt. Spindelformen kamen häufiger als runde Osteozyten vor. Lakunen waren im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe etwas häufiger ausgeprägt (Tab 9).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Zellzahl vermindert, jedoch waren bei der Mehrheit der Tiere (n= 4) eine häufige Osteozytenausprägung zu finden (4) (Tab. 9). Daraus resultierend zeigte sich der Abstand zwischen den Zellen leicht vergrößert, wobei deutliche Unterschiede zwischen den Tieren bestanden. Das lakunokanalikuläre System war im Vergleich zur Kontrollgruppe schwächer ausgebildet. Die Schafe wiesen ein reduzierteres Netzwerk aus (3), in dem allerdings auch Flaschenbürsten-Formationen gefunden wurden. Die Zytoplasmaausläufer schienen hier kürzer und weniger verzweigt. Terminal fanden sich zum Teil Auftreibungen (Schaf OVX3, Bild 18 S.57). Bei zwei Tieren prägte sich das OLCS zwar geringer als in der Kontrollgruppe aus (4), jedoch mit reichlich Kanalikuli, welche flaschenbürstenartig imponierten oder den Knochen durch parallele Anordnung gestreift erscheinen ließen (OVX1, OVX5).

Die Tiere mit G3 waren charakterisiert durch zahlreiche Osteozyten mit deutlicher Vernetzung und mäßigem interzellulärem Abstand (Abb. 17). Bei OVX5 und OVX6 war dieser zudem stark vermindert. In der Übersicht stellten sich die zellfreien Areale, gegenüber der Kontrollgruppe, vergrößert dar (3). Die Osteozyten waren nicht linear, sondern häufiger versetzt angeordnet. Die Form schien kortikal eher länglich und zentral oval oder rund zuzulaufen. Zudem nahm die Zahl der angefärbten Kanalikuli von kortikal nach zentral ab. Zentral waren sie spärlicher ausgeprägt, plump und kurz, kortikal dagegen flächiger und besser vernetzt. Runde Zellformationen gingen häufiger mit einer reduzierten Anzahl von Dendriten und einer kürzeren Länge einher. Daneben waren die kanalikulären Ausläufer im Inneren vermehrt quer getroffen und stellenweise endständig aufgetrieben. Zentrale Knochenbereiche beinhalteten daneben mehr leere Lakunen sowie verschieden orientierte Mineralisationslinien (OVX3, Abb. 18).

Die Spongiosastruktur war in der OVX-Gruppe recht homogen (Tab. 8) Sechs der sieben Tiere wurden als G3 klassifiziert, da sie ein gut vernetztes Trabekelmuster mit kräftigen Bälkchen aufwiesen. Häufig fand sich ein grob lakunäres Muster („Schweizer-Käse-Muster“) mit guter Vernetzung, aber größeren Kavitäten, die in zentraleren Bereichen oft polygonal ausliefen. Säulenformationen und tubuläre Ausziehungen waren ebenso vermehrt anzutreffen.

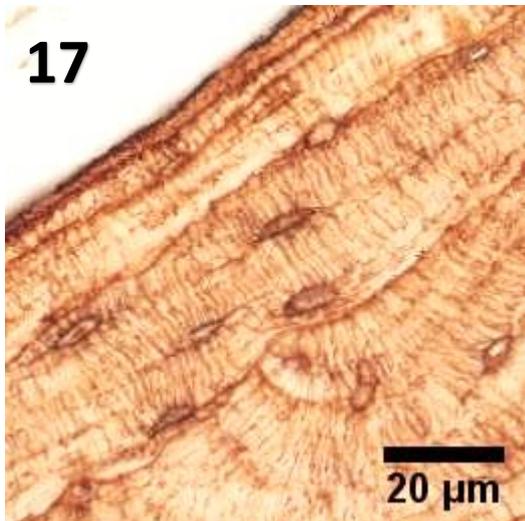


Abb. 17: Femur OVX2, Silber-Färbung:

Das Tier wurde im gesamten als G3 gewertet. Im Bild zeigen sich vor allem olivenförmige, teils spindelförmige Osteozyten die vermehrt endostnah lokalisiert sind. In anderen Anschnitten überwiegen deutlich runde und olivenförmige Zellen. Der Abstand zwischen den Zellen ist vermindert und es werden reichlich parallele Dendriten ausgebildet, die besonders kortikal auffallen. Zentraler im Knochen wirken die Osteozyten runder und separierter. (Vergrößerung 20x).

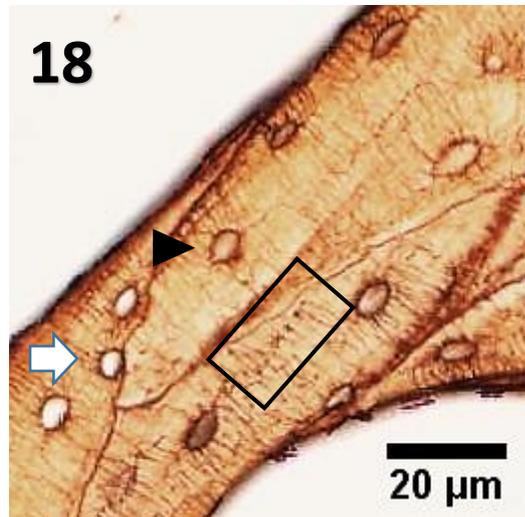


Abb. 18: Femur OVX3, Silber-Färbung:

Hier zeigen sich einige leere Lakunen (Pfeil), zum Teil noch mit Kanalikulianschnitten. Das Grading beträgt G2. Gerade im Unterschied zu OVX2 fällt die spärlichere Dendritenzahl auf. Zudem wirkt das Netzwerk stellenweise verplumpt und terminal aufgetrieben (Kasten). Die Zellen sind von ovaler Form. Klassische Spindelzellen (Typ1) finden sich nicht. Der interzelluläre Abstand ist ebenso vergrößert. Auch mikropetrotische Lakunen kommen vor (Pfeilkopf). (Vergrößerung 20x).

3.5.1.3 OVXD-Gruppe

Unter der Doppeltbehandlung wurden von acht Schafen drei Tiere als G3, drei als G2 und zwei Tiere als G1 gewertet. Der Gruppenmedian lag somit bei 2 (Tab. 10). Im Knochengrading lag der Median dagegen bei 2,5 (Tab. 11).

Femur	Grading Zellen	Häufigkeit
OVXD n= 8	1	2
	2	3
Median= 2	3	3

Tabelle 10: Osteozytengrading OVXD Femur

Femur	Grading Knochen	Häufigkeit
OVXD n= 8	2	2
	2,5	3
	3	1
Median 2,5	4	1

Tabelle 11: Knochengrading OVXD Femur

Femur	Bewertung	Ausprägung	Zellzahl	Spindel	Rund	Lakune	Kanalikuli	Zellfreie Zonen
OVXD n= 8	1	sehr schwach	-	1	-	2	1	1
	2	schwach	-	1	-	1	-	-
	3	mäßig/ deutlich	5	4	2	4	1	5
	4	viel/ stark	3	2	6	1	5	2
	5	sehr viel/ stark	-	-	-	-	1	-
Modus			3	3	4	3	4	3

Tabelle 12: Osteozytengrading OVXD Femur:

Die Tabelle gibt die Merkmalsausprägungen der OVXD-Gruppe für die untersuchten Variablen in der Silber-Färbung wieder. Daneben ist die häufigste Ausprägungsform (Modus) dargestellt. In Tab. 10 und 11 sind zudem das Gesamtgrading und die Häufigkeit der einzelnen Gradingwerte von Osteozyten und Knochen dargestellt.

Aus der Gradingtabelle der Osteozyten (Tab. 10) wurde ersichtlich, dass in der OVXD-Gruppe zwei Modi bei G2 und bei G3 vorlagen. Zwei weitere Tiere wiesen eine verminderte Zellstruktur (G1) auf. Betrachtet man dabei nicht den Modus sondern den Median, so lag dieser bei 2. In der OVXD-Gruppe lag daher ein schlechteres Zellmuster als in den Vorgruppen vor. Die Anzahl der Osteozyten in den Anschnitten war nur noch mäßig hoch (3). Eine Verschiebung fand sich ebenso in den Zellmorphologien. Hier verschob sich das Verhältnis von Spindelformen (3) zu runden Zellen (4). Spindelformen waren besonders häufig kortikal anzutreffen, wurden aber seltener ausgeprägt. Lakunen stellten sich deutlicher dar (3). Bei der Analyse des kanalikulären Systems fiel dagegen auf, dass dieses trotz verminderter Zellzahl und reduzierten Spindelformen stark ausgeprägt war. Der Abstand zwischen den Zellen wirkte allerdings vergrößert (3) (Tab. 12).

Die Tiere des zweier Gradings besaßen, mit Ausnahme von OVXD2, weniger Osteozyten (3) (Abb. 19). Auch Spindelformen kamen in nur dezentem, teilweise geringem Maße vor. OVXD2 besaß sehr wenig spindelförmige Zellen, dafür aber viele

rundliche Osteozyten, die auch kortikal aufzufinden waren. Eine lineare Anordnung ließ sich nur selten darstellen. Dennoch war das OLCS stark ausgeprägt (4) und nahm reich verzweigte Formationen an. Auch andere Schnitte des G2-Gradings wiesen vermehrt Kanalikuli auf, waren jedoch zellarm und mit vergrößertem Interzellularabstand. Besonders OVXD6 und OVXD8 hoben sich durch erweiterte Interzellularabstände hervor (4). Die Osteozyten von OVXD6 variierten daneben im Zellvolumen. Einige Zellen wirkten vom Zellvolumen verdoppelt, was besonders für kortikale, spindelförmige Osteozyten zutraf.

Die Knochenstruktur von Schaf OVXD2 wurde als G4 gewertet, während die meisten anderen Schafe als G3 klassifiziert wurden. Zellulär zeigte sich ein G2-Grading (Abb. 18). OVXD2 wies ein flächiges Trabekelwerk auf, das kleine Knochenkavitäten umgab. Der intertrabekuläre Abstand war hier verringert. Viele andere Schafe wiesen ansonsten einen leicht vergrößerten Trabekelabstand und dünnere Trabekel auf. Daneben fanden sich größere Kavitäten und Trabekelkonglomerate, die nicht mit anderen Knochenbälkchen verbunden waren.

Insgesamt schien die Zellzahl im Vergleich zu den Vorgruppen vermindert zu sein, wobei vermehrt ovale Formen vorgefunden wurden (Abb. 19). Spindelformen kamen seltener vor. Die Lakunenzahl war besonders bei OVXD4 deutlich vergrößert und der interzelluläre Abstand in den Femora beider Tiere erhöht. Ferner zeigten sich bei vielen Tieren wie bspw. OVXD3 (Abb. 20) größere Bereiche, in denen kaum Osteozyten oder Kanalikuli anzutreffen waren. Auch das OLCS war schwächer ausgeprägt, sodass das Tier als G1 klassifiziert wurde.

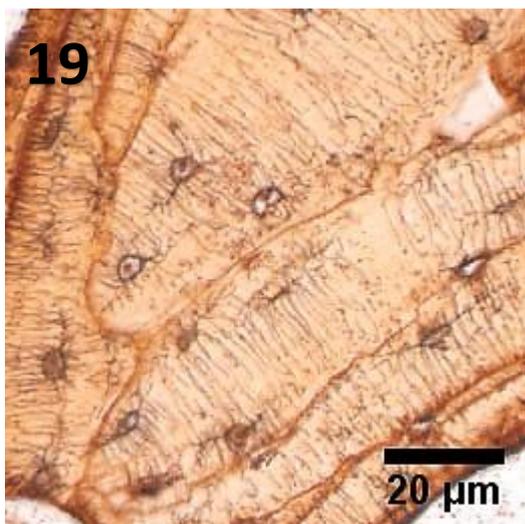


Abb. 19: Femur OVXD2, Silber-Färbung:

Endostnah fallen bei diesem G2-Tier viele kleine runde Osteozyten auf. Vereinzelt kommen peripher Spindeln vor. Im Anschnitt sind die Kanalikuli hervorgehoben, die dem Endost zustreben. Hier fällt vor allem der langstreckige unverzweigte Verlauf auf. In anderen Bereichen imponieren dagegen zellfreie Zonen. (Vergrößerung 20x).

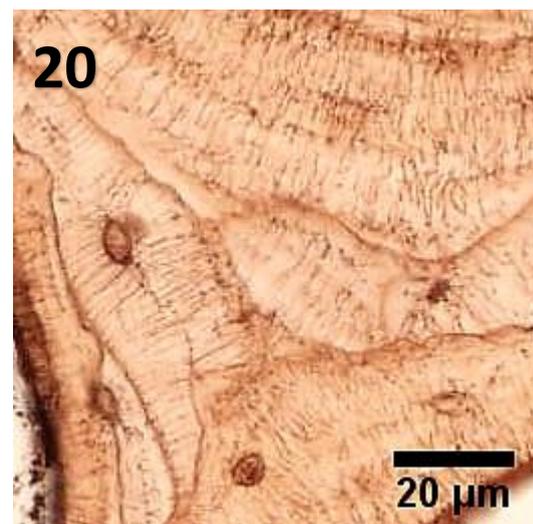


Abb. 20: Femur OVXD3, Silber-Färbung:

Im Vergleich zu OVXD2 wirkt die Zellzahl deutlich vermindert und der interzelluläre Abstand vergrößert. Morphologisch sind fast nur runde Osteozyten anzutreffen. Spindeln finden sich nicht. Das kanalikuläre System ist dabei nur gering ausgeprägt. Das Schaf wurde als G1 eingestuft. (Vergrößerung 20x).

3.5.1.4 OVXDS-Gruppe

Unter der Dreifachbehandlung zeigte sich im Femur nur eine niedrige Gradingeinteilung für die Osteozyten (Median= 1) und die Spongiosa (Median= 2) (Tab. 13/ 14).

Femur	Grading Zellen	Häufigkeit
OVXDS n= 6	1	5
Median= 1	2	1

Tabelle 13: Osteozytengrading OVXDS Femur

Femur	Grading Knochen	Häufigkeit
OVXDS n= 6	1	1
	1,5	1
	2	2
	2,5	1
Median= 2	3	1

Tabelle 14: Osteozytengrading OVXDS Femur

Femur	Bewertung	Ausprägung	Zellzahl	Spindel	Rund	Lakune	Kanalikuli	Zellfreie Zonen
OVXDS n= 6	1	sehr schwach	-	2	-	-	2	-
	2	schwach	-	4	1	1	-	-
	3	mäßig/ deutlich	3	-	1	1	1	3
	4	viel/ stark	3	-	4	4	3	3
	5	sehr viel/ stark	-	-	-	-	-	-
Modus			3	2	4	4	4	3

Tabelle 15: Osteozytengrading OVXDS Femur:

Die Tabelle gibt die Merkmalsausprägungen der OVXDS-Gruppe für die untersuchten Variablen in der Silber-Färbung wieder. Daneben ist die häufigste Ausprägungsform (Modus) dargestellt. In Tab. 13 und 14 sind zudem das Gesamtgrading und die Häufigkeit der einzelnen Gradingwerte von Osteozyten und Knochen dargestellt.

Überwiegend fanden sich in der OVXDS-Gruppe Tiere, die vom zellulären Muster als G1 klassifiziert wurden. Der Modus lag bei 1 (Tab. 13). Die Zahl der Osteozyten war gering, während die Interzellularabstände vergrößert waren (Modi 3/ 4). Die Zellen waren in ihrer Größe inhomogen und von überwiegend runder Morphologie (4). Morphologisch waren Spindeln seltener (2) und Lakunen häufiger (4) als in den Vorgruppen anzutreffen. Verstärkt zeigten sich olivenförmige oder abgerundete Zellen. Die runden Osteozyten waren von geringer Größe und prägten ein spärliches kanalikuläres Netzwerk. Diese waren wenig verflochten und häufig terminal aufgetrieben. Parallele Dendritenverläufe fanden sich selten (Tab. 15).

Daneben zeigten sich interindividuelle Unterschiede in der Ausprägung des kanalikulären Systems. Während bei den Schafen OVXDS1, OVXDS2 und OVXDS3 das Dendritenwerk vermehrt (4) ausgebildet war (Abb. 21), war dies bei den anderen Tieren deutlich reduziert. Ferner zeigten sich intraindividuelle Unterschiede (OVXDS2) in der Zellularität und Kanalikuli-Expression. In Trabekeln mit weniger Knochenkanälchen fanden sich eine geringere Zelldichte (Abb. 22). Lakunen fanden sich gehäuft. Auch die interzellulären

Abstände waren vergrößert (Abb. 23). Die OVXDS-Gruppe zeigte knochenstrukturell ein G2 Muster. Die Trabekel wirkten brüchig und schlecht vernetzt. Es fanden sich parallele Säulenmuster und vereinzelt backsteinartige Formationen. Der intertrabekuläre Abstand schien vergrößert, wobei die Kavitäten zu größeren Hohlräumen konfluieren.

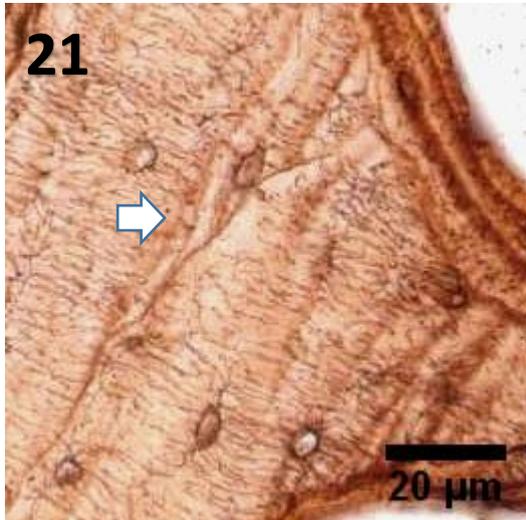


Abb. 21: Femur OVXDS2, Silber-Färbung:

Im Anschnitt sind nur wenige Osteozyten anzutreffen, die eine ovale oder runde Form besitzen (4). Spindelformen kommen nicht vor. Daneben zeigen sich bei diesem Tier viele Lakunen, die zum Teil schon remineralisiert wirken (Mikropetrose, siehe Pfeil). Eine geordnete Anordnung der Zellen liegt nicht vor. In vielen Bereichen sind die Größenunterschiede zwischen den einzelnen Zellen bzw. Lakunen auffällig. Des Weiteren bestehen größere zellfreie Areale, die lediglich mit Kanalikuli durchsetzt sind. Die Dendriten sind verzweigt und von kurzer Länge. Das Tier wurde als G1 gewertet. (Vergrößerung 20x).

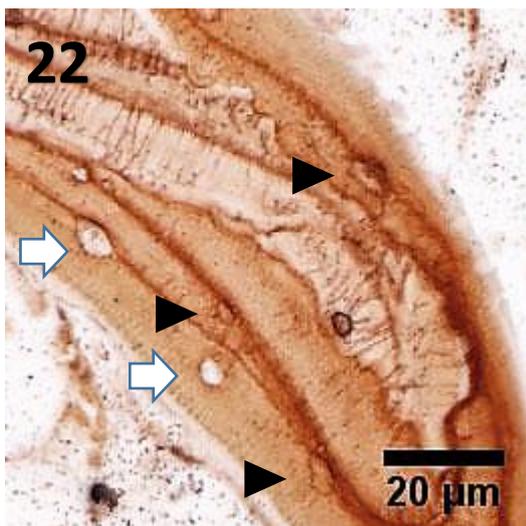


Abb. 22: Femur OVXDS4, Silber-Färbung:

Der Trabekel dieses Tieres weist viele Lakunen (Pfeil) und einige mikropetrotische Lakunen (Pfeilkopf) auf. Die Zellzahl ist stark reduziert. Das kanalikuläre Netzwerk lässt sich lediglich in einigen Mineralisationsschichten darstellen. Dabei fallen parallel laufende Dendriten auf, die von einem Stammdendrit abgehen. Auch dendritische Auftreibungen lassen sich identifizieren. Diese sind hier nahe am Stammdendriten organisiert. (Vergrößerung 20x).

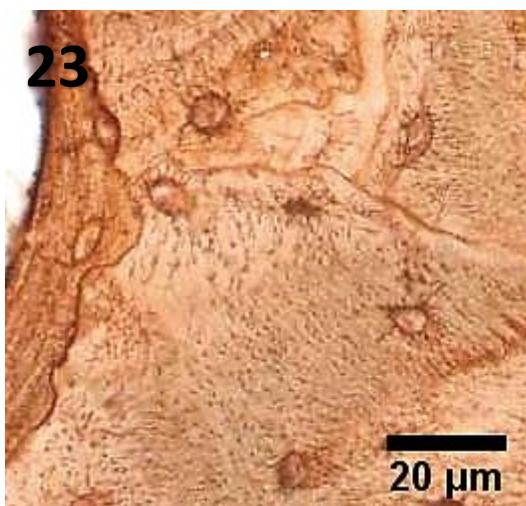


Abb. 23: Femur OVXDS7, Silber-Färbung:

Schaf OVXDS7 weist ebenfalls ein Grading von G1 auf, prägt dabei allerdings mehr Knochenzellen aus. Diese sind insbesondere rund oder oval. Spindelformen zeigen sich nur in sehr geringem Ausmaß (hier nicht abgebildet). In diesem Anschnitt sind die Kanalikuli vor allem quergetroffen, sodass das OLCS wenig flächig wirkt. Daneben fallen größere zellfreie Areale auf, in denen die Dichte der Kanalikuli vermindert ist (unterer linker Quadrant). (Vergrößerung 20x).

3.5.2 LWK – Abnahme der Spindeln bei Zunahme runder Osteozyten

Trotz gleicher Bewertungskriterien und Analysemethoden für die Wirbelkörper, musste die Zuteilung der Gesamtwerte zu einem Grading modifiziert (Grading LWK) werden, da die Einteilung des Femurs (Grading Femur) für den Wirbelkörper nicht sensitiv genug war. Insgesamt wurden 30 Schafe untersucht.

3.5.2.1 Kontrollgruppe

In diese Gruppe gingen insgesamt 8 Schafe ein, die wie folgt charakterisiert wurden:

LWK4	Grading Zellen	Häufigkeit Grading LWK	Häufigkeit Grading Femur
Kontrolle n= 8	1	2	5
	2	4	3
	3	1	-
Median= 2	4	1	-

Tabelle 16: Osteozytengrading LWK Kontrolle mit modifiziertem Grading (Grading LWK) und nicht modifizierter Einteilung (Grading Femur)

LWK4	Grading Knochen	Häufigkeit
Kontrolle n= 8	2,5	2
	3	2
	3,5	1
Median 3,25	4	3

Tabelle 17: Knochengrading LWK Kontrolle

LWK4	Bewertung	Ausprägung	Zellzahl	Spindel	Rund	Lakune	Kanalikuli	Zellfreie Zonen
Kontrolle n= 8	1	sehr schwach	-	-	-	-	-	-
	2	schwach	-	-	-	-	1	-
	3	mäßig/deutlich	6	3	3	2	5	2
	4	viel/stark	1	5	5	5	2	4
	5	sehr viel/stark	1	-	-	1	-	2
Modus			3	4	4	4	3	4

Tabelle 18: Osteozytengrading LWK Kontrolle:

Die Tabelle gibt die Merkmalsausprägungen der Kontrollgruppe für die untersuchten Variablen in der Silber-Färbung wieder. Daneben ist die häufigste Ausprägungsform (Modus) dargestellt. In Tab. 16 und 17 sind zudem das Gesamtgrading und die Häufigkeit der einzelnen Gradingwerte von Osteozyten und Knochen dargestellt. Zur Analyse der Zellstruktur wird im LWK ein modifiziertes Grading (Grading LWK) verwendet.

Aus den Analysetabellen (Tab. 16-18) wurde ersichtlich, dass in der Kontrollgruppe der Lendenwirbelkörper, das Knochengrading nicht mit dem Zellgrading korrelierte. Knochenstrukturell wiesen alle Tiere eine sehr gut vernetzte Spongiosa auf, die durch flächige und breit vernetzte Trabekel mit hoher Konnektivität und geringer „node-to-node“ Distanz gekennzeichnet war. Die Knochenkavitäten waren von geringer Größe und wirkten häufig lochartig ausgestanzt. Bei 4 Tieren (vor allem G3) fanden sich grob lakunäre Muster mit vergrößerten Kavitäten („Schweizer-Käse-Muster“). Abbrüche der Trabekel waren nicht darstellbar. Bei einzelnen Tieren (K7, G2+) wurden zentral säulenartige

Trabekel ohne viele Verknüpfungspunkte aufgefunden. Alle Tiere zeigten jedoch durchgehend ein stark verflochtenes, dichtes Bälkchengüst auf (Median 3,25).

Dem gegenüber wiesen die Tiere im Zellgrading (Tab. 16) nur sehr niedrige Werte auf (Median 2). Es zeigte sich eine Dissonanz zwischen Knochenstruktur und Zellularität, wodurch der Wirbelkörper deutlich von den Regionen des Femurs abgegrenzt wird. Im Wirbelkörper fanden sich nur mäßig viele Zellen, die in der Kontrollgruppe sowohl spindel- als auch runde Morphologie besaßen. Einzelne Tiere wiesen überwiegend runde Zellen auf (K3, K5, K7). Spindelformen fanden sich besonders kortikal, waren jedoch von unterschiedlichem Zellvolumen. Lakunen waren ebenfalls stark ausgeprägt (4), während das OLCS im Knochen vermindert ausgebildet war (3). Die Zellen wirkten weniger gut verflochten und es gab größere zellfreie Räume (4) (vgl. Übersichten TB zum Spongiosamuster: Abb. 13, S. 46 sowie Abb. 24 bis 26).

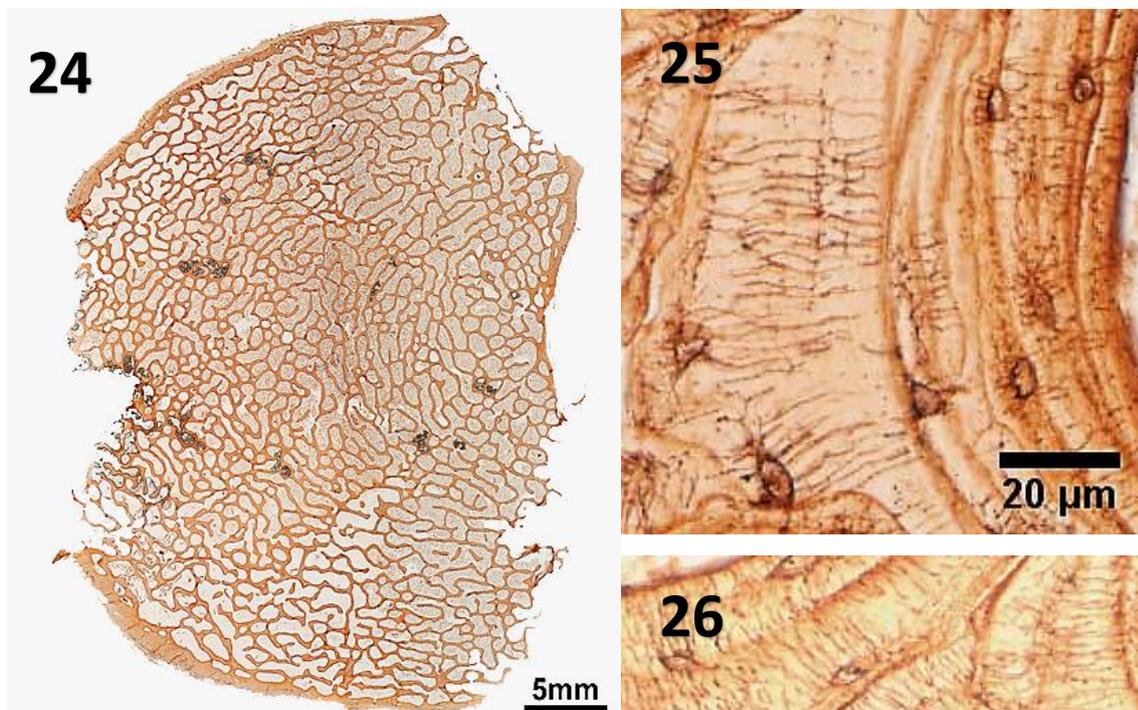


Abb. 24: Übersicht Kontrolle, Silber-Färbung:

Das Bild stellt Schaf K7 dar und weist ein Knochengrading von G3- auf. Es finden sich viele gut verbundene Trabekel, die rundliche bis polygonale Hohlräume umgeben. Zur dorsalen Seite des Wirbelkörpers werden die Kavitäten größer und es finden sich einzelne tubuläre Ausziehungen. Ventral ist das Spongiosagerüst dicker und die Kavitäten kleiner.

Abb. 25: LWK K7, Silber-Färbung: Bei diesem Tier finden sich viele leere Lakunen und nur wenig vitale Osteozyten. Die Zellularität ist stark reduziert und es ergeben sich größere zell- und dendritenfreie Zonen. Die Lakunen bilden keine Dendriten aus und wirken vereinzelt remineralisiert.

Das Bild verdeutlicht den Unterschied zwischen einem hohen Knochengrading von G3- und niedrigem Zellgrading von G2. **Abb. 26 K2, Silber-Färbung:** Hier findet sich ein zelluläres Grading von G2 (Knochengrading G3-). Im Bild sind wenige, ovale Osteozyten anzutreffen. Die Dendritenbäume stellen sich deutlicher dar. Die Osteozyten wirken linear zur Mineralisationslinie angeordnet. Durch die verschieden orientierten Mineralisationslinien wirkt der Knochen lamellenartig. Vereinzelt stellen sich Lakunen dar. (Vergrößerung Übersicht 2,5x, Abb. 25/26 20x).

3.5.2.2 OVX-Gruppe

In der ovariektomierten Gruppe lag der Modus bei G2. Allerdings fanden sich auch zwei Tiere als G3 und zwei als G4 wieder, sodass der Median bei 3 lag. In der OVX-Gruppe stellte sich somit eine andere Zellularität als in der Kontrollgruppe dar. Das Knochengrading bildete eine gut vernetzte Spongiosa ab (Median= 3) (Tab. 20).

LWK4	Grading Zellen	Häufigkeit Grading LWK	Häufigkeit Grading Femur
OVX n= 7	1	-	2
	2	3	2
	3	2	2
Median= 3	4	2	1

Tabelle 19: Osteozytengrading LWK OVX mit modifiziertem Grading (Grading LWK) und nicht modifizierter Einteilung (Grading Femur).

LWK	Grading Knochen	Häufigkeit
OVX4 n= 7	2,5	2
	3	3
	3,5	1
Median 3	4	1

Tabelle 20: Knochengrading LWK OVX

LWK4	Bewertung	Ausprägung	Zellzahl	Spindel	Rund	Lakune	Kanalikuli	Zellfreie Zonen
OVX n= 7	1	sehr schwach	-	-	-	-	-	-
	2	schwach	-	-	-	1	-	-
	3	mäßig/ deutlich	2	2	5	2	3	3
	4	viel/ stark	5	4	2	3	3	4
	5	sehr viel/ stark	-	1	-	1	1	-
Modus			4	4	3	4	3	4

Tabelle 21: Osteozytengrading LWK OVX-Gruppe:

Die Tabelle gibt die Merkmalsausprägungen der OVX-Gruppe für die untersuchten Variablen in der Silber-Färbung wieder. Daneben ist die häufigste Ausprägungsform (Modus) dargestellt. In Tab. 19 und 20 sind zudem das Gesamtgrading und die Häufigkeit der einzelnen Gradingwerte von Osteozyten und Knochen dargestellt. Zur Analyse der Zellstruktur wird im LWK ein modifiziertes Grading (Grading LWK) verwendet.

Wie aus der Gradingtabelle 19 ersichtlich, unterschieden sich die Tiere der OVX-Gruppe stark in ihrer Zellularität, während die Knochenstruktur recht homogen war (Tab. 20). Drei der sieben Schafe (OVX1, OVX5, OVX6) wurden als G2 eingeteilt. Bei diesen war die Zellzahl gering (3) und es fanden sich mehr ovale Osteozyten als Spindelformen. Die ovalen Osteozyten wiesen ein gelichtetes Dendritenmuster auf. Es fanden sich zwar längliche Dendriten, zumeist waren sie allerdings verdickt und verkürzt, sodass die Zellen weniger vernetzt wirkten. Auch Lakunen waren häufig ausgeprägt. Besonders auffallend waren daneben die vergrößerten zellfreien Zonen. Von den genannten Schafen hoben sich deutlich OVX2 und Schaf OVX4 ab. Diese wurden als G4 eingeteilt, da sich eine höhere Zelldichte mit flächigerem Kanalikuli-Muster zeigte. Insgesamt fanden sich mehr Osteozyten. Kortikal waren sie spindelförmig, zentral von ovaler Morphologie.

Lakunen kamen dagegen seltener (2) und Kanalikuli deutlich häufiger vor (5, 4). Flaschenbürstenartige Dendritenbäume wurden vereinzelt aufgefunden. Durch die höhere Zellzahl waren die interzellulären Abstände geringer ausgebildet (3). Die Tiere im Grading von 3 besaßen weniger spindelförmige Zellen als G4 Schafe. Ebenso wurden mehr Lakunen ausgeprägt (4). Die Kanalikuli wirkten gegenüber den G4-Schafen reduziert, Flaschenbürsten konnten seltener angetroffen werden (bspw. OVX6). Ansonsten präsentierte sich das Dendritenwerk gelichtet und plump. Diskrepanzen zwischen Knochen- und Zellgrading fanden sich bei Schaf OVX2, das in seiner Spongiosa als G2+, zellulär hingegen als G4 gewertet wurde. Die anderen Schafe wiesen überwiegend korrespondierende Gradingergebnisse auf.

Als repräsentativ für die OVX-Gruppe konnte Schaf OVX7 gewertet werden (Abb. 27). Es wies in beiden Einteilungen ein Grading von 3 auf. Die Trabekel zeigten sich dünn, jedoch gut vernetzt und umgaben ovale bis polygonale Waben. Somit ergab sich ein gut vernetztes Trabekelgeflecht. Kortikal waren die Kavitäten lakunär ausgestanzt, zentral eher größer und konfluierend. Zellulär fanden sich häufig Osteozyten (3), wobei sie eher oval als spindelförmig waren. Auch runde Formationen waren anzutreffen. Der interzelluläre Abstand war gegenüber der Kontrollgruppe allerdings vergrößert (4) und es zeigten sich mehr leere Lakunen (4). Daneben wirkten die Kanalikuli gelichtet (3), das OLCS schien weniger verflochten und die Dendriten kürzer und aufgetrieben. Stellenweise wurden nur sehr wenig Kanalikuli aufgefunden, sodass es größere zell- und kanalikulifreie Knochenbereiche gab. Flaschenbürstenartige Dendriten wurden seltener gefunden (vgl. Tab. 21).

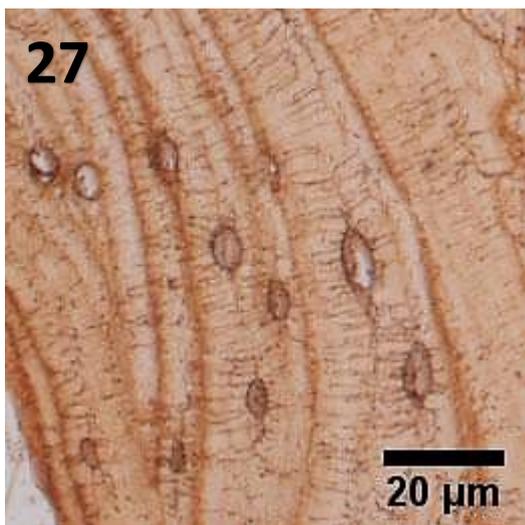


Abb. 27: LWK OVX7, Silber-Färbung:

Der Anschnitt zeigt ein Trabekel des Schafes OVX7, das zellulär und knochenarchitektonisch als G3 gewertet wird. Es stellen sich nur mäßig viele Knochenzellen in den einzelnen Mineralisationsschichten dar. Diese bilden wenige Dendriten aus. In anderen Bereichen des Knochens finden sich weniger Osteozyten und eher abgerundete Zellen mit dysarrangierten Dendritenmuster. Die Osteozyten wirken hier weniger linear orientiert. Dabei zeigen sich stellenweise zell- und kanalikuliarme Trabekelbereiche. Deutlich wird auch das inhomogene Zellvolumen zwischen den spindelförmigen und runden Osteozyten. Ebenso fällt das unterschiedlich stark ausgeprägte Dendritenmuster zwischen den verschiedenen Morphologien auf. In diesem Anschnitt liegen die Spindelzellen endostferner als die kleineren runden Osteozyten. (Vergrößerung 20x).

3.5.2.3 OVXD-Gruppe

Die Schafe unter Ovariectomie und diätetischer Behandlung wiesen einen Median von drei bei einer, gegenüber der OVX-Gruppe, vergrößerten Spannweite (SW 1- 4) mit niedrigeren Gradingwerten auf (Tab. 22) Während sich die Tiere im Osteozytengrading heterogen darstellten, resultierte ein homogenes Knochengrading von G3 (Tab. 23).

LWK4	Grading Zellen	Häufigkeit Grading LWK	Häufigkeit Grading Femur
OVXD n= 8	1	2	2
	2	1	4
	3	3	-
Median= 3	4	2	2

LWK4	Grading Knochen	Häufigkeit
OVXD n= 8	2,5	2
Median 3	3	6

Tabelle 23: Knochengrading LWK OVXD

Tabelle 22: Osteozytengrading LWK OVXD mit modifiziertem Grading (Grading LWK) und nicht modifizierter Einteilung (Grading Femur)

LWK4	Bewertung	Ausprägung	Zellzahl	Spindel	Rund	Lakune	Kanalikuli	Zellfreie Zonen
OVXD n= 8	1	sehr schwach	-	-	-	-	-	-
	2	schwach	-	-	-	1	2	-
	3	mäßig/ deutlich	-	6	2	3	1	4
	4	viel/ stark	6	1	5	3	3	4
	5	sehr viel/ stark	2	1	1	1	2	-
Modus			4	3	4	3	4	3

Tabelle 24: LWK OVXD-Gruppe:

Die Tabelle gibt die Merkmalsausprägungen der OVXD-Gruppe für die untersuchten Variablen in der Silber-Färbung wieder. Daneben ist die häufigste Ausprägungsform (Modus) dargestellt. In Tab. 22 und 23 sind zudem das Gesamtgrading und die Häufigkeit der einzelnen Gradingwerte von Osteozyten und Knochen dargestellt. Zur Analyse der Zellstruktur wird im LWK ein modifiziertes Grading (Grading LWK) verwendet.

In der dualen Interventionsgruppe ergaben sich interindividuelle Unterschiede im Osteozytengrading. Der Median (und Modus) dieser Gruppe lag bei einem Grading von G3 (n= 3), wobei in der Gruppe alle Gradingeinteilungen vorkamen (SW 1-4, Tab. 22). Alle acht Schafe präsentierten daneben ein homogenes Spongiosagrading von G3, da ein gut vernetztes Trabekelmuster mit hoher Konnektivität ausgebildet war (Tab. 23). Dem homogenen Knochengrading stand somit ein heterogenes Zellgrading gegenüber.

Im Vergleich zu den Vorgruppen wirkten die einzelnen Knochenbälkchen dünner und weniger flächig. Sowohl die Maschenweite als auch die Trabekeldurchmesser waren inhomogen. Terminale Enden wurden nur selten vorgefunden. Das kavitäre „Schweizer-

Käse-Muster“ konnte häufig identifiziert werden, wohingegen nur vereinzelt lakunär ausgestanzte Kavitäten zu finden waren. Kortikal zeigten sich bei einigen Tieren (OVXD4) längliche Hohlräume, während zentral verkleinerte Kavitäten zu finden waren.

Wie aus Tabelle 24 ersichtlich, fand sich eine höhere Zellularität des Knochens (4) als in der Kontrollgruppe. Es wurden zwar spindelförmige Osteozyten ausgeprägt (3), allerdings war das Verhältnis bei vielen Schafen zu Gunsten der runden Knochenzellen verschoben (4). Auch Lakunen waren ausgebildet (3), im Vergleich zur OVX-Gruppe aber leicht vermindert. Dagegen zeichneten sich mehr Kanalikuli ab (Abb. 28). Besonders terminal fanden sich globuläre Erweiterungen der Dendriten (Abb. 29, Pfeil). Des Weiteren waren größere Bereiche nicht von Osteozyten durchsetzt. Bei Schafen mit höherem Grading konnten Flaschenbürsten und ein verdichtetes Dendritenwerk gefunden werden (OVXD2 G4). Andere Tiere prägten besonders stark Lakunen und nur wenige vitale Osteozyten aus. Bei diesen Tieren waren der zelluläre Anteil sowie die Ausprägung des OLCS stark herabgesetzt (Abb. 30), was sich in einem niedrigeren Grading widerspiegelte. Insgesamt waren die Tiere der Gruppe sehr inhomogen in der Zellularität bei homogenen Knochengrading.

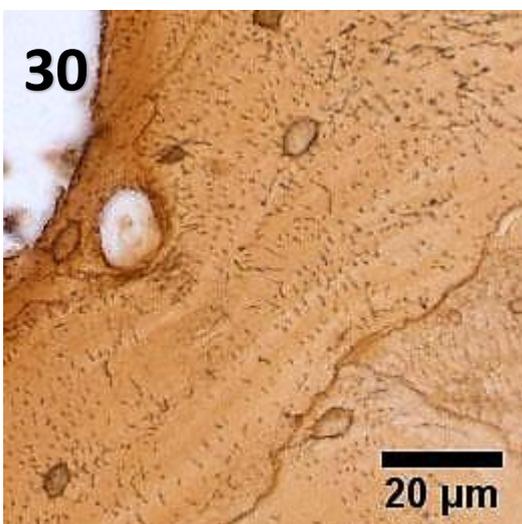
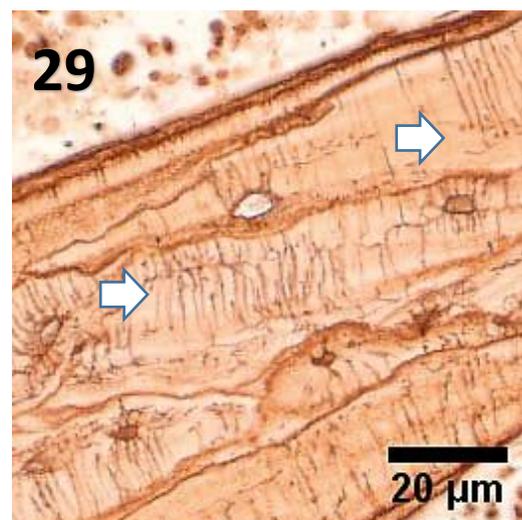
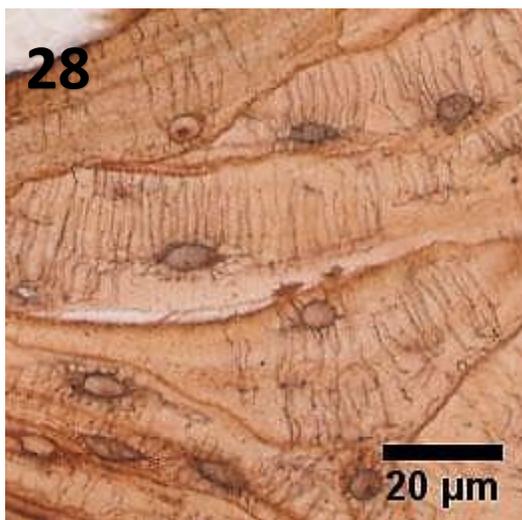


Abb. 28: LWK OVXD2, Silber-Färbung: Das Schaf wird auf Grund der zellreichen Knochenareale als G4 gewertet. Im Anschnitt zeigen sich überwiegend spindelförmige Zellen sowie einige rundliche Osteozyten. Unterschiedlich stellt sich der Dendritenbaum abhängig von der Zellmorphologie dar. Korrelierend zeigt sich das Knochengrading ebenso als G4. **Abb. 29: LWK OVXD7, Silber-Färbung:** Das Schaf wird als G3 gewertet. Im Vergleich zu OVXD2 werden weniger Osteozyten ausgeprägt. Morphologisch sind diese überwiegend rund. Gerade zentral fallen auch terminale Auftreibungen der Dendriten auf (Pfeile). **Abb. 30: LWK OVXD3, Silber-Färbung:** Dieses Tier wird wegen der geringen Zellzahl an runden Osteozyten sowie der sehr geringen Dendritendichte und des großen interzellulären Abstands als G1 gewertet. Knochenstrukturell weist es hingegen ein G3 auf. (Vergrößerung 20x).

3.5.2.4 OVXDS-Gruppe

Unter dreifach induktiver Behandlung wurden die meisten Schafe als G2 klassifiziert (n=3). Der Median lag in dieser Gruppe mit 2 und einer Spannweite von 1 bis 3 niedriger als in den Vorgruppen und bildet eine verminderte zelluläre Knochenstruktur ab (Tab. 25). Knochenstrukturell lag der Median bei 2 (Tab. 26).

LWK4	Grading Zellen	Häufigkeit Grading LWK	Häufigkeit Grading Femur
OVXDS n= 7	1	2	4
	2	3	3
Median= 2	3	2	-

Tabelle 25: Osteozytengrading LWK OVXDS mit modifiziertem Grading (Grading LWK) und nicht modifizierter Einteilung (Grading Femur)

LWK4	Grading Knochen	Häufigkeit
OVXDS n= 7	1,5	1
	2	3
	2,5	2
Median 2	3	1

Tabelle 26: Knochengrading LWK OVXDS

LWK4	Bewertung	Ausprägung	Zellzahl	Spindel	Rund	Lakune	Kanalikuli	Zellfreie Zonen
OVXDS n= 7	1	sehr schwach	-	-	-	-	1	-
	2	schwach	-	-	-	-	-	-
	3	mäßig/ deutlich	4	5	1	1	1	1
	4	viel/ stark	3	2	3	4	4	5
	5	sehr viel/ stark	-	-	3	2	1	1
Modus			3	3	4	4	4	4

Tabelle 27: Osteozytengrading LWK OVXDS-Gruppe:

Die Tabelle gibt die Merkmalsausprägungen der OVXDS-Gruppe für die untersuchten Variablen in der Silber-Färbung wieder. Daneben ist die häufigste Ausprägungsform (Modus) dargestellt. In Tab. 26 und 27 sind zudem das Gesamtgrading und die Häufigkeit der einzelnen Gradingwerte von Osteozyten und Knochen dargestellt. Zur Analyse der Zellstruktur wurde im LWK ein modifiziertes Grading (Grading LWK) verwendet.

Von den vorigen Untersuchungsgruppen unterschied sich diese Gruppe merklich. Zellulär wurde ein deutlich schlechteres Muster ausgeprägt, das sich in den meisten Analysevariablen widerspiegelte (Tab. 27). Unter zusätzlicher Steroidgabe wurde somit eine verminderte zelluläre Knochenqualität ausgebildet. Auch die Spongiosaarchitektur war schlechter ausgeprägt.

Bedingt durch die geringe Zahl von Osteozyten, wirkte der Knochen zellarm und die interzellulären Abstände entsprechend ausgedehnt. Da Spindelformen nur selten vorkamen, war das morphologische Verhältnis zur Seite der runden Osteozyten verschoben. Diese waren sehr stark ausgeprägt (5). Auch leere Lakunen imponierten verstärkt und kamen bei zwei Schafen (OVXDS4, OVXDS7) in sehr großer Anzahl vor (5). Das kanalikuläre Expressionsmuster präsentierte sich inhomogen. Dendriten waren zwar deutlich

ausgeprägt, wiesen jedoch einen verkürzten Verlauf und interindividuelle Schwankungen auf. Bei Schaf OVXDS5 waren sie nur in sehr schwachem Maße vorhanden (1) (Abb. 32). Gegenüber den Vorgruppen war die Ausprägung des OLCS im Wirbelkörper nur unwesentlich verändert, gegenüber dem Femur aber deutlich reduziert.

Als repräsentative Schnitte konnten in der zellulären Analyse Schaf OVXDS2 als G2 (Abb. 31) und OVXDS5 (Abb. 32) als G2+ identifiziert werden. Knochenstrukturell fand sich ein dünnes, fragiles Trabekelwerk, das nur mäßig vernetzt schien. Die Knochenbälkchen waren von reduzierter Dicke, zeigten häufig terminale Abbrüche oder Ausziehungen und umgaben vergrößerte Knochenhöhlen. Die Kavitäten nahmen eine hexagonale bis polygonale Form an, die an Waben erinnerten. Der Großteil der Bildfläche wurde von den Knochenkavitäten eingenommen, da das Trabekelwerk stark ausgedünnt war. Beide Schafe wiesen nur geringe Zellanzahlen auf (3), bei denen insbesondere runde Osteozyten (5) und leere Lakunen (3) sichtbar wurden. Der Knochen wirkte zellarm und dendritisch schlecht vernetzt. Die zellfreien Zonen waren vergrößert (4) und die Kanalikuli nur spärlich ausgeprägt (3). Die Dendriten erschienen in ihrer Länge reduziert und terminal aufgetrieben. Flaschenbürsten oder perpendikuläre Formationen der Dendriten waren nur selten ausgebildet.

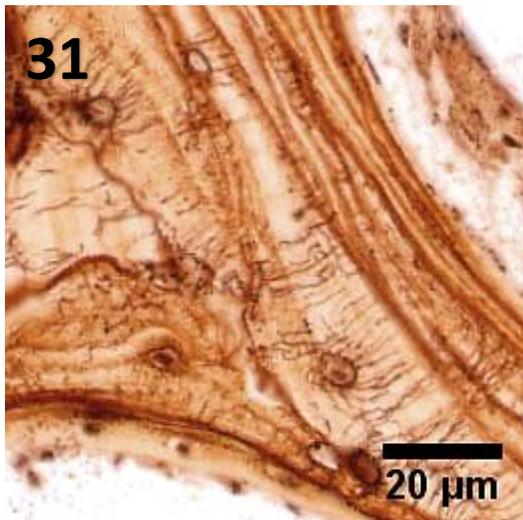


Abb. 31: LWK OVXDS2, Silber-Färbung:

Hier zeigen sich nur wenige Osteozyten von runder Morphologie. Die Dendritenbäume sind meist gut ausgebaut. Daneben finden sich einige Zellen mit wenigen Ausläufern. Durch die geringe Anzahl der Osteozyten ergeben sich größere zellfreie Knochenbereiche. Vereinzelt sind diese von Kanalikuli durchzogen. Auffällig sind auch die verschiedenen Mineralisationslinien sowie einige leere Lakunen. Knochenstrukturell wird das Schaf als G3, zellulär als G2 gewertet. (Vergrößerung 20x).



Abb. 32: LWK OVXDS5, Silber-Färbung:

Hier fällt vor allem der sehr dünne Trabekeldurchmesser auf. Dieser wird aus nur wenigen Mineralisationsschichten aufgebaut. Es zeigen sich im Inneren einige, vereinzelt spindelförmige Osteozyten. Die Gesamtzahl der Osteozyten ist allerdings gering und der Interzellularabstand vergrößert. Die Dendritenbäume sind hier besser darstellbar und streben perpendikulär dem Endost zu. In einigen Mineralisationslinien lassen sich keine Osteozyten mehr finden. Andere Anschnitte zeigen dagegen vermehrt Osteozyten, sodass dieses Tier als G2+ gewertet wurde. (Vergrößerung 20x).

3.6 Heterogenität des Wirbelkörpers bei linearer Gradingabnahme im Femur

Das nachfolgende Diagramm (Abb. 33) zeigt die Gruppenmediane der Grading-Analysen nach Region. Bei der Darstellung der ordinalskalierten Daten wurde sich für die Angabe des Medians entschieden. Dieser gibt einen besseren Überblick über die Variablenausprägungen als der Modus. Zudem kamen in einigen Gruppen mehrere Modi vor. Für die Analyse innerhalb der Gruppe ist jedoch der Modus aussagekräftiger (siehe Ergebnisteil Silber-Färbung). Durch die veränderte Translation zwischen Femur und LWK (mod) ist kein direkter Regionsvergleich möglich. Lediglich die Gruppen können innerhalb einer Region unterschieden werden (Balken). Um zwischen den Regionen vergleichen zu können, wurde ebenso das nicht modifizierte Femur-Grading (Grading LWK, gepunkteter Balken) dargestellt.

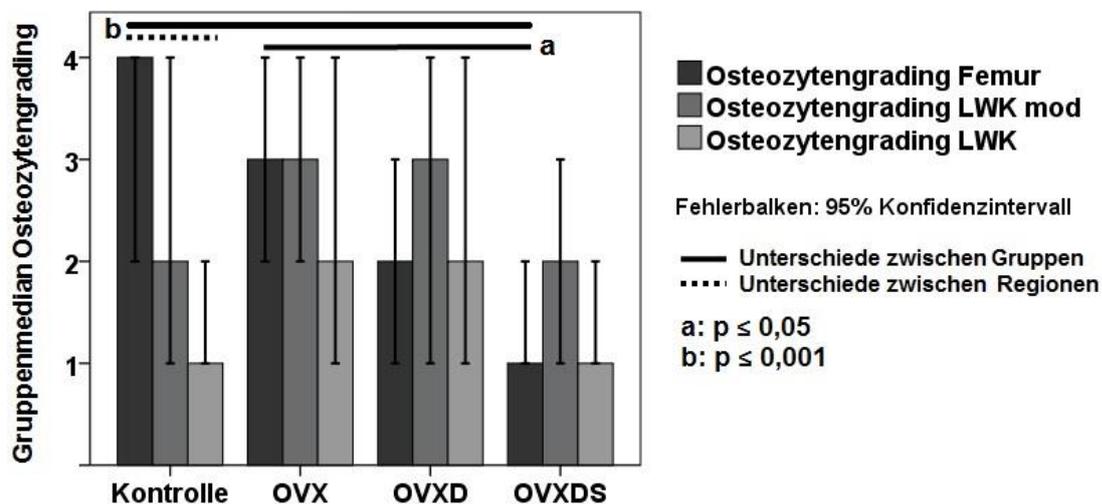


Abbildung 33: Übersicht Gradingssysteme zur Darstellung der zellulären Veränderungen:

Das Diagramm zeigt die verschiedenen Gradingssysteme abhängig von der Region für das Osteozytengrading in der Silber-Färbung. Im Wirbelkörper (LWK) wird ein modifiziertes Grading (LWK mod) eingeführt. Dadurch lassen sich die Gruppen in dieser Region besser unterscheiden, jedoch ist ein Regionsvergleich mit dem Femur nicht mehr möglich. Für den Vergleich der Regionen kann aber die nicht modifizierte Einteilung (LWK) herangezogen werden. Mit zunehmender Therapiestärke nimmt dabei der Unterschied zwischen den Regionen ab. ($p = 0,05$).

Aus dem Gradingdiagramm wird ersichtlich, dass in den Femora das Grading homogen von der Kontrollgruppe zur OVXDS-Gruppe abnimmt. In der Kontrollgruppe findet sich hierbei das höchste Osteozytengrading mit der besten Zellularität. Es sind am meisten Spindelformen und am wenigsten Lakunen ausgeprägt und gleichzeitig liegt ein stark vernetztes Dendritenwerk vor, sodass sich diese signifikant von der OVXDS-Gruppe unterscheidet ($p \leq 0,001$). Auch die OVX-Gruppe grenzt sich signifikant ab ($p = 0,022$).

Anders verhalten sich die Gradingwerte im Wirbelkörper. Hier liegt keine lineare Abnahme des Gradings und innerhalb der Region kein signifikanter Unterschied vor. Die Kontrollgruppe weist ein niedrigeres Grading als die OVX- und OVXD-Gruppe auf. In der Kontrollgruppe werden weniger Zellen mit vor allem runder Morphologie gefunden. Auch

Lakunen kommen häufig vor. Daneben fällt besonders im Wirbelkörper die vergrößerte Spannweite auf. Zellulär stellt sich dieser somit heterogen dar. Im Kontrast dazu liegt in den einzelnen Gruppen des Wirbelkörpers eine sehr gute Knochenarchitektur vor (Abb. 14 S. 51). Mit zunehmender Behandlungsintensität wirkt lediglich die trabekuläre Dicke reduziert, die Vernetzung davon allerdings wenig beeinträchtigt. Somit finden sich zwischen dem Knochengrading im Wirbelkörper und den osteozytären Kriterien wenige Zusammenhänge unter geringer Therapiestärke. Im Femur scheint dagegen der makroskopische Knochenstatus gut mit der mikroskopischen Zellqualität zu korrelieren.

Im Regionsvergleich, dargestellt durch Grading Femur und Grading LWK, fanden sich starke Kontraste, insbesondere in der Kontrollgruppe in der zellulären Knochenqualität ($p=0,001$). Das Femur prägt ein deutlich dichteres Zellmuster als der Wirbelkörper aus. Die höheren Therapiegruppen nähern sich dagegen im Grading wieder an, wobei im LWK ein höheres Grading als im Femur erzielt wird. Im Femur findet sich hingegen eine stärkere Beeinflussung der Zellularität durch die zusätzlichen Interventionen.

3.7 Statistischer Vergleich von Femur und Wirbelkörper

Das folgende Diagramm 34 zeigt die Analysevariablen für Femur und LWK in Silberfärbung. Da es sich nur um die Betrachtung der einzelnen Variablen und nicht um das Gesamtgrading der Regionen handelt, ist ein direkter Regionsvergleich möglich. Zur genaueren Untersuchung der Gruppen wurde der Median berechnet.

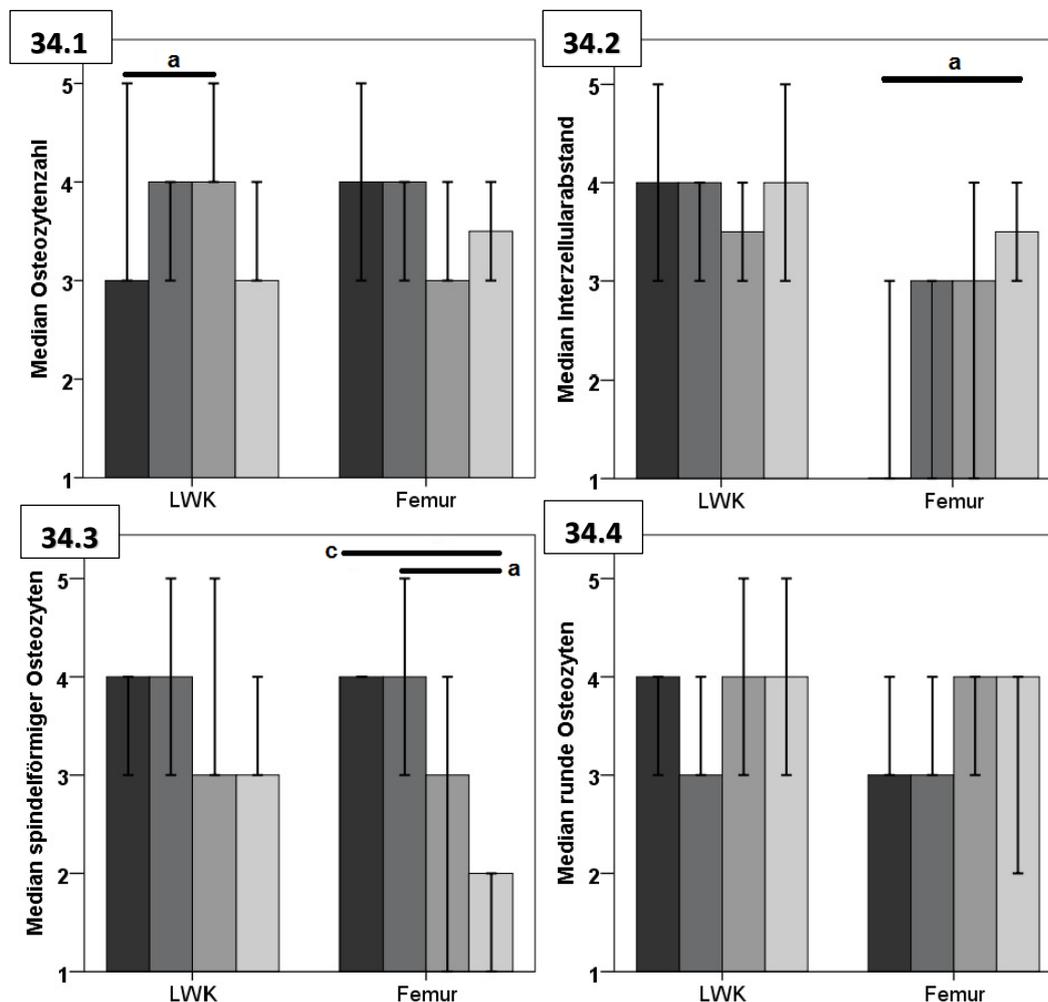
Die Osteozytenzahl zeigte im Femur eine abnehmende Tendenz von der Kontrollgruppe zu den Interventionsgruppen hin. Im Wirbelkörper fand sich dagegen die höchste Zellzahl in der OVXD- und OVX-Gruppe. In der Kontrollgruppe des LWK waren, im Vergleich zur OVXD-Gruppe, signifikant weniger Osteozyten ausgeprägt ($p=0,027$). Zwar lagen in der Kontroll- und OVXDS-Gruppe des WK die gleichen Mediane von 3 vor, jedoch wies die Kontrollgruppe eine größere Spannweite zu höheren Merkmalsausprägungen und somit mehr Osteozyten auf (Abb. 34.1). Der Vergleich beider Regionen zeigte in den Kontrollgruppen einen signifikanten Unterschied in der Osteozytenzahl ($p=0,034$), wobei das Femur mehr Zellen aufwies (Balken in Diagramm nicht dargestellt). Insgesamt stellte sich die Femurregion homogener dar, was an den geringeren Spannweiten deutlich wurde.

Der größte Unterschied fand sich im Femur zwischen der Kontroll- und OVXDS-Gruppe, was sich durch eine signifikante Abnahme der Spindeln ($p\leq 0,001$) und Zunahme der Lakunen ($p=0,007$) und des Interzellulärabstandes ($p=0,017$) zeigte. Auch die ovariektomierten Tiere unterschieden sich in der Spindelzahl von den OVXDS-Tieren signifikant ($p=0,01$). Daneben fand sich in beiden Regionen eine zunehmende

Ausprägung von runden Osteozyten. Ebenso wies der Wirbelkörper im Verlauf eine deutliche Reduktion an spindelförmigen Zellen, bei allerdings erhöhter interindividueller Variabilität und daher vermutlich mangelnder Signifikanz auf (Abb. 34.3).

Im Vergleich beider Regionen zeigte sich daneben, dass sich die Ausprägungsstärke leerer Lakunen sowohl in der Kontroll- ($p=0,001$) als auch in der OVX-Gruppe ($p=0,032$) signifikant unterschied (Abb. 34.5, Signifikanzbalken nicht dargestellt). Auch der Interzellularabstand war im Wirbelkörper in der Kontroll- ($p=0,001$) und OVX-Gruppe ($p=0,02$) im Vergleich zu den Femora signifikant erhöht. Daneben lagen in der OVXD-Gruppe des Femurs weniger Osteozyten ($p=0,013$) und in der OVXDS-Gruppe weniger Spindeln ($p=0,001$) vor (Balken nicht dargestellt).

In der Ausbildung des kanalikulären Netzwerks konnten auf Grund der Inhomogenität keine signifikanten Veränderungen zwischen den Gruppen oder Regionen gefunden werden (Abb. 34.6). Es zeigte sich in beiden Regionen eine verstärkte Ausprägung in den höheren Interventionsgruppen, bei allerdings vergrößerten Spannweiten (1 bis 5). Das Femur wies eine mittlere Netzwerkausprägung (Median) von 3,25, der Wirbelkörper von 4 auf. Die Variabilität der OLCS-Ausprägung innerhalb der Behandlungsgruppen einer Region ist in Abb. 34.6 dargestellt.



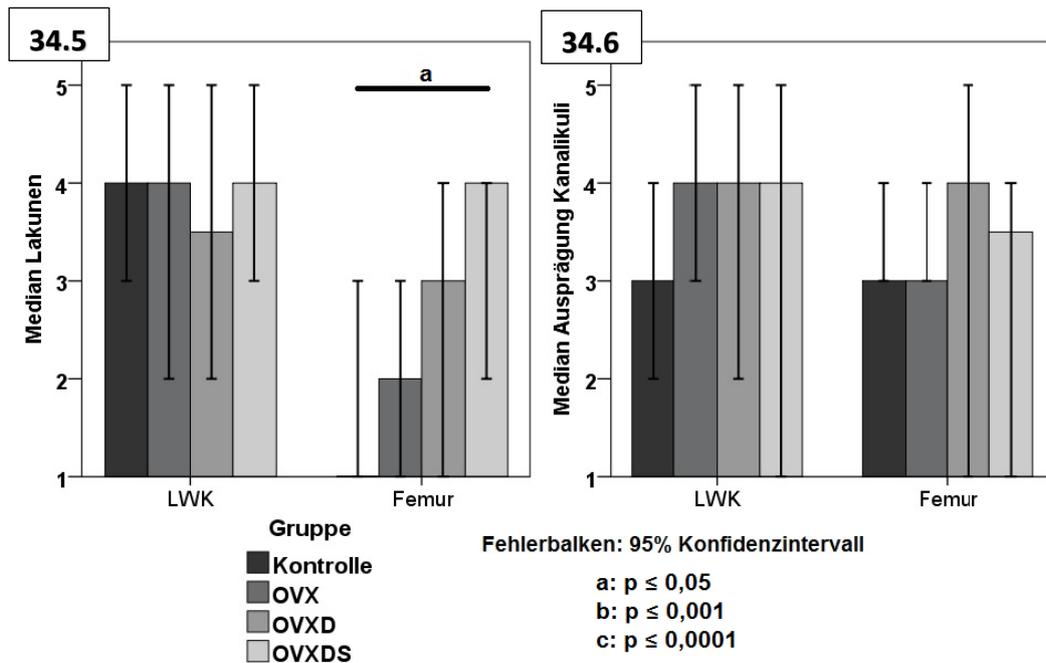


Abbildung 34: Häufigkeitsanalyse der zellulären Parameter, Silber-Färbung:

Die Diagramme stellen die Ergebnisse der Häufigkeitsanalyse von deskriptiv erworbenen Analysevariablen der silbergefärbten Schnitte aus Femur und LWK dar. Es handelt sich somit nicht um absolute Werte. Bei der Untersuchung wird auf die Zellzahl (34.1), die Morphologie der Osteozyten: Spindelförmig (34.3), rund (34.4) sowie auf leere Lakunen (34.5) und den Interzellularabstand (34.2) eingegangen. Daneben wird die Flächigkeit des OLCS bewertet (34.6). Entsprechend der Expressionsstärke werden Werte von 1- 5 zugeordnet. Durch die Diagramme werden zelluläre Veränderungen des Knochens in den verschiedenen Gruppen im Zuge der Osteoporose abgebildet. Weitere Einzelheiten sind im Text dargestellt. (Signifikanzniveau $p = 0,05$).

3.8 Histomorphometrie: Veränderung der Knochenfläche und Osteozytenmorphologie am deutlichsten in OVXDS-Gruppe

Die semi-automatisierte Analyse mittels ImageJ objektiviert die Aussagen zu Veränderungen des osteoporotischen Knochens in seiner Fläche und Zellularität. Bei der Auswertung der silbergefärbten Knochenschnitte aus Femur und Wirbelkörper zeigte sich, dass es zu einer starken Abnahme der Knochenfläche unter Behandlung kam.

Im Wirbelkörper fand sich eine homogene Reduktion der Knochenfläche von der Kontrollgruppe zur OVXDS-Gruppe hin. Eine starke, signifikante Abnahme ließ sich ab Stufe der Doppelintervention ($p \leq 0,001$), am stärksten in der Triplelintervention gegenüber der Kontrollgruppe ($p \leq 0,001$) finden. Im Femur stellte sich die Knochenfläche hingegen inhomogener dar. Dabei zeigte die OVX-Gruppe eine, gegenüber der Kontroll- und OVXD-Gruppe, niedrigere Knochenfläche. Nur bei der OVXDS-Gruppe war die Knochenfläche noch geringer ausgeprägt. Die OVXD-Gruppe wies die durchschnittlich größte Knochenfläche pro Analysefeld von $1279993,74 \mu\text{m}^2$ auf (Abb. 35.1).

Die ermittelte Gesamtzahl der Osteozyten in 20 Bildern eines Tieres lag in den Femora mit 1544,87 Zellen deutlich höher als in den Wirbelkörpern, mit durchschnittlich 1150,53 Zellen. Im Regionsvergleich unterschieden sich alle Gruppen signifikant ($p \leq 0,04$)

(Balken nicht dargestellt), wobei im Femur mehr Zellen ausgeprägt waren. Mit zunehmender Stärke der Interventionsstrategien fand sich in beiden Regionen eine abnehmende Zellzahl (Abb. 35.3). Besonders im Femur hob sich die dreifach behandelte Gruppe signifikant von der Kontroll- ($p=0,012$) und der OVXD-Gruppe ($p=0,004$) ab. Die OVX-Gruppe unterschied sich dabei nicht signifikant. In beiden Regionen wurde daneben in der OVXD-Gruppe eine leicht erhöhte Zellzahl gefunden, die einen großen Kontrast zur Dreifachbehandlungs-Gruppe bildete (Femur $p=0,004$, LWK $p=0,051$).

Durch die Normalisierung der Osteozytenzahl auf die Knochenfläche, ließen sich bessere Aussagen über die Zellularität des Knochens treffen. Im Wirbelkörper ergab sich eine homogene Zunahme der Zellen pro Knochenfläche, sodass die Zellularität des Knochens anstieg (Abb. 35.2). Die OVX-Gruppe unterschied sich von den höheren Therapiegruppen ($p\leq 0,009$) ebenso, wie die OVXD-Gruppe von der OVXDS- ($p=0,038$) und Kontroll-Gruppe ($p=0,014$). Die Dreifachbehandlungsgruppe wies signifikant mehr Osteozyten als alle anderen Gruppen pro Fläche auf ($p\leq 0,038$). Dabei nahm bei annähernd gleich bleibender Osteozytenzahl pro Tier (außer OVXDS) die Knochenfläche zur OVXDS-Gruppe übermäßig stark ab (Abb. 35.1).

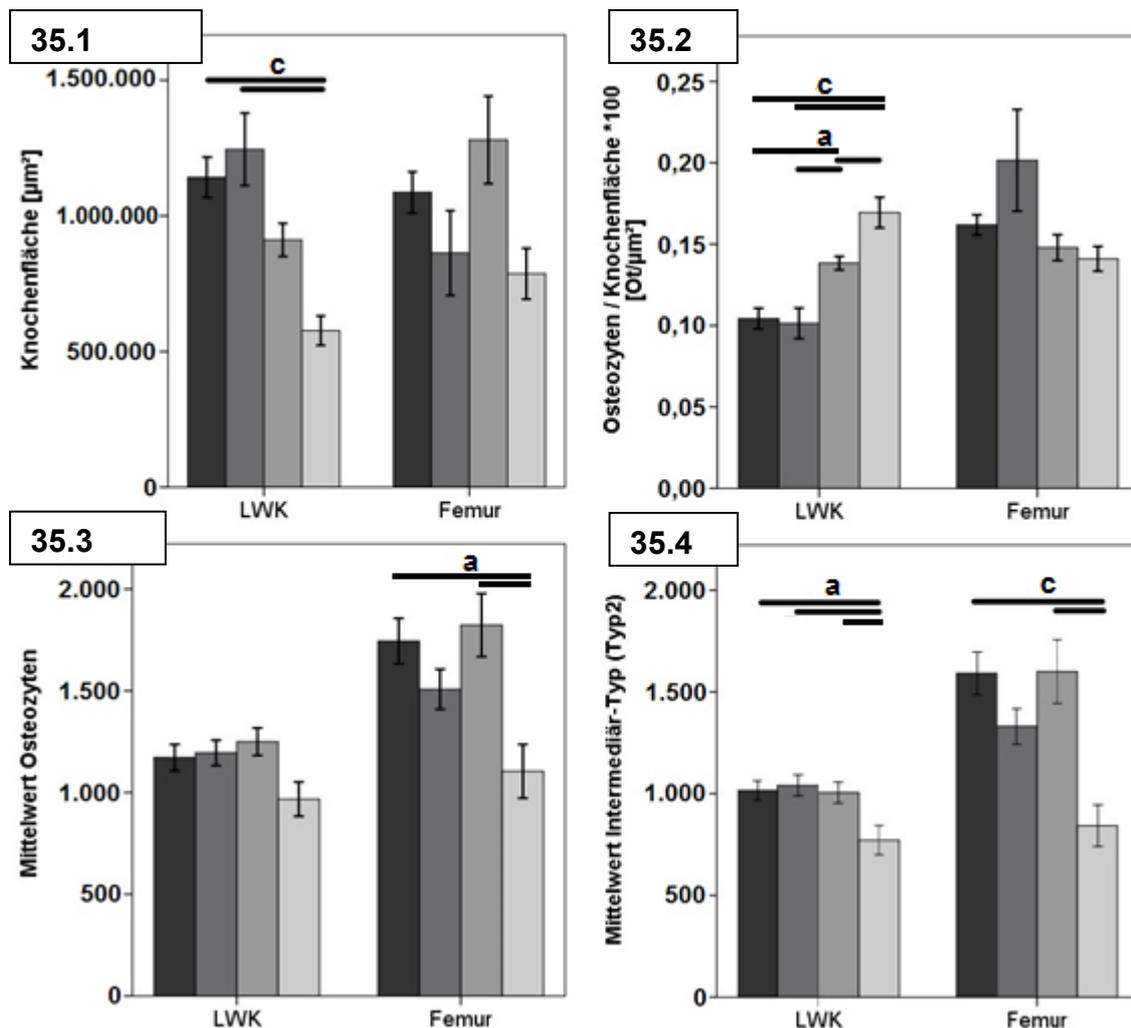
Im Femur verminderte sich dagegen die Zellularität des Knochens. Die größte Reduktion zeigte sich in der Zelldichte zwischen der Kontroll- und OVXDS-Gruppe. Die OVX-Gruppe stach hingegen durch eine merklich erhöhte Zelldichte, bei ebenso erhöhter Variabilität, hervor (Abb. 35.2). Die geringe Knochenfläche und höhere Zellularität resultierte in einer erhöhten Zelldichte in dieser Gruppe. Die Inhomogenität führte allerdings zu einer mangelnden Signifikanz zu den anderen Gruppen.

Unterteilte man die Zellformen in die bereits beschriebenen drei Typen zeigte sich, dass die Zahl spindelförmiger Osteozyten im Wirbelkörper zur OVXDS-Gruppe hin deutlich abnahm. Im Femur kam es hingegen zum Anstieg der Spindeln. Der Anteil spindelförmiger Zellen an der Gesamtzellzahl zeigte im Wirbelkörper eine abnehmende Tendenz, sodass sich, mit zunehmender Behandlungsstärke, der Anteil an Spindeln verringerte. Im Femur kam es dagegen zum Anstieg des Quotienten, da in den höheren Therapiegruppen vermehrt spindelförmige Osteozyten zu finden waren (Abb. 35.6).

Die Osteozyten vom Typ 2 (Intermediärtyp) waren im Femur, außer in der OVXDS-Gruppe, häufiger als im LWK vorhanden ($p\leq 0,018$). Bis auf die OVXDS-Gruppen, die ähnlich niedrige Osteozytenzahlen aufwiesen, unterschieden sich die Regionen in allen Gruppen signifikant ($p\leq 0,018$). Komplementär zur abnehmenden Zellzahl fand sich eine signifikant reduzierte Anzahl an Intermediärtypen in der OVXDS-Gruppe im Vergleich zur OVXD-Gruppe (LWK $p=0,001$, Femur $p=0,039$). Daneben unterschied sich die OVXDS-Gruppe im Femur von der Kontroll- ($p=0,001$) und im LWK von der OVX-Gruppe ($p=0,017$, Abb. 35.4). Gemeinsamkeiten zwischen beiden Regionen fanden sich bei der

Zahl von Typ3 (sphärischen, lakunären) Osteozyten (Abb. 35.7). Im Femur prägte sich eine deutliche Zunahme der Zellen mit Stärke der Intervention aus, sodass sich die OVXDS-Gruppe signifikant von der Kontrollgruppe ($p= 0,038$) unterschied. Im Wirbelkörper hob sich insbesondere die OVXD-Gruppe signifikant von den niedrigeren Interventionsgruppen ab ($p\leq 0,01$). Auch die OVXDS-Gruppe wies deutlich mehr Lakunen als die ersten beiden Gruppen auf. Im Vergleich der absoluten Lakunenzahl ergab sich im LWK im Durchschnitt eine leicht, jedoch nicht signifikant verminderte Lakunenzahl gegenüber dem Femur (Femur 171,17; LWK 167,70) (Balken nicht dargestellt).

Bezog man die Veränderungen der Lakunen auf die Gesamtzahl der Osteozyten, stellte sich in beiden Knochenregionen eine sehr starke Verschiebung der Morphologien, zu sphärischen Formen hin, dar (Abb. 35.8). Gerade im Wirbelkörper wurde signifikant deutlich, dass sich die OVXDS-Gruppe von der Kontroll- und OVX-Gruppe unterschied ($p\leq 0,001$). Gleiches galt ebenso für die OVXD-Gruppe ($p\leq 0,001$). Im Femur hob sich alle Gruppen stark von der Tripleinterventionsgruppe ab ($p\leq 0,001$), deren lakunärer Anteil deutlich erhöht war. Die folgende Abbildung 35 zeigt die Ausprägung der histomorphometrischen Analysevariablen in beiden Regionen.



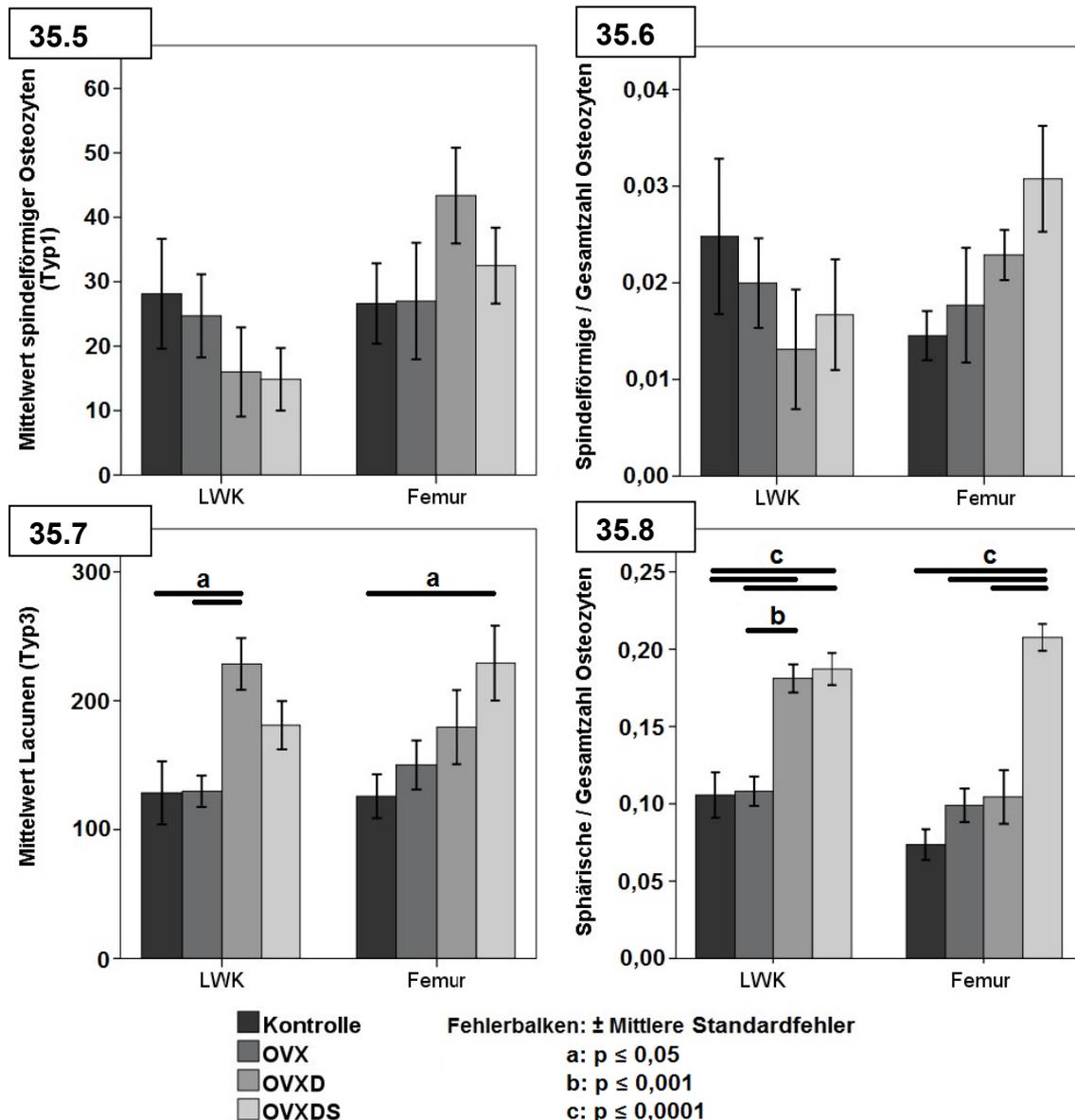


Abbildung 35: Histomorphometrie Silber-Färbung:

Die Diagramme zeigen die Untersuchungsvariablen der histomorphometrischen Analyse der silbergefärbten Schnitte aus Femur und LWK. Dazu ist die Knochenfläche (35.1) sowie die Mittelwerte der absoluten Zellzahlen an Osteozyten (35.3) und der verschiedenen Morphologien dargestellt. Daneben wird die Zellzahl auf die Knochenfläche normalisiert (35.2) und der Anteil spindelförmiger (35.6) und sphärischer Osteozyten (35.8) auf die Gesamtzahl bezogen. Gerade im Wirbelkörper zeigt sich eine stark abnehmende Knochenfläche (35.1) und eine verminderte Spindelzahl in der OVXDS-Gruppe (35.5). Daneben wird die abnehmende Osteozytenzahl und die zunehmende Lakunenzahl in beiden Regionen deutlich (35.7, 35.8). Gerade die OVXDS-Gruppe stellen sich in vielen Variablen deutliche Unterschiede zu den Vorgruppen dar. Signifikanzbalken der Regionsvergleiche sind nicht dargestellt. (Signifikanzniveau $p = 0,05$).

3.9 Rhodamin-Färbung erlaubt Analyse des Dendritenbaums

Um die Osteozytenarchitektur und den Dendritenbaum des OLCS hervorzuheben, wurden Schnitte des Beckenkamms und Schliffe der Femora mit Rhodamin infiltriert und nach LCM Mikroskopie mittels Mikropartikelanalyse ausgewertet. Die Bilder wurden

randomisiert aufgenommen und anhand repräsentativer Tiere aus der Silber-Färbung ausgewählt.

Die deskriptive Analyse bezog sich insbesondere auf die Zellularität der Osteozyten, die Morphologie, den Interzellularabstand, intrazelluläre Vakuolen und speziell auf die Ausprägung des Dendritenwerks. Besonders die Verflechtung der Dendritenbäume, die Form, Länge, Flächigkeit und Verzweigungsrate der Dendriten wurden berücksichtigt. Ebenso wurde auf die terminalen Verdickungen der Dendriten (sog. Humps) eingegangen.

3.9.1 Femur – Unterschiedliche Vernetzungsgrade des OLCS bei Zunahme an terminalen Verdickungen

3.9.1.1 Kontrollgruppe

Die Tiere der Kontrollgruppe wiesen eine überwiegend hohe Zellularität mit spindelförmigen bis ovalen Osteozyten auf. Endostnahe Osteozyten waren vermehrt spindelförmig, während zentrale Zellen in endostferneren Knochenbereichen rundliche Formen annahmen. Anschnittsabhängig variierte die Zellzahl leicht im Mikroskopiefeld. Bei Schaf K5 fanden sich sowohl Bereiche mit verminderter Zellzahl als auch stellenweise eine erhöhte Zelldichte (Abb. 36 Kontrolle, S. 78). Aufgrund der erhöhten Zellzahl und der geordneten Anordnung war der Interzellularabstand gering. Intrazelluläre Lakunen fanden sich nur selten und zentral im Zelleib. Der Dendritenbaum war überwiegend stark ausgebildet und gut vernetzt. Die Dendriten strebten parallel zum Endost hin und gingen meist von einem Hauptdendriten ab, der mit der Osteozytenachse ausgerichtet war. Terminale Auftreibungen konnten angetroffen werden, jedoch eher als Verbindungsstelle verschiedener Osteozyten (Kasten Abb. 36 Kontrolle). Terminal endende, aufgetriebene Dendriten kamen nur selten vor.

3.9.1.2 OVX-Gruppe

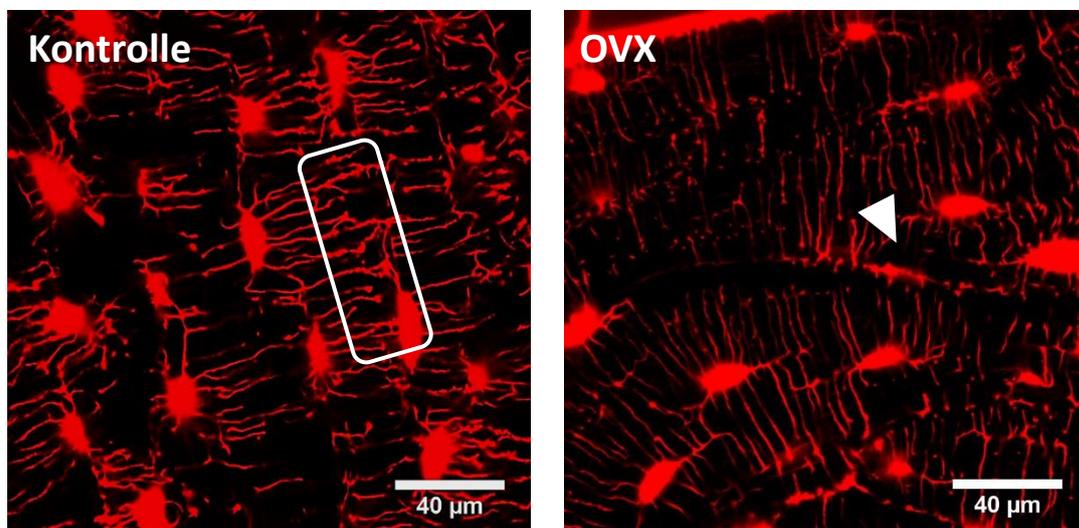
Die Tiere der ovariectomierten Gruppe unterschieden sich nur geringfügig von der Kontrollgruppe. Die einzelnen Anschnitte stellten sich zum Teil heterogen dar. Stellenweise war die Zellzahl vermindert. Die Vernetzung und die Organisation der zellulären Ausläufer unterschieden sich jedoch kaum. Zellmorphologisch fanden sich insbesondere Spindeln, die linear aufgereiht waren. Die meisten Tiere wiesen ein dichtes Dendritennetzwerk auf, das die Zellen eng miteinander verknüpfte. An den Mineralisationslinien endeten die Dendriten, wobei sie sich hier häufig als Auftreibung darstellten (Pfeilspitze). Ferner wurden „flaschenbürstenartige“ Dendritenbäume angetroffen (Abb. 36 OVX unten links). Durch den parallelen Dendritenverlauf, die radiär dem Endost zustrebten, ergaben sich „leitersprossenartige“ Formationen.

3.9.1.3 OVXD-Gruppe

In dieser Gruppe fanden sich weniger Knochenzellen im Bildbereich als in den Vorgruppen und ein daraus resultierender vergrößerter Interzellularabstand. Das Dendritenwerk wirkte insgesamt verkürzt und dicker. Terminale Auftreibungen konnten bei den Schafen häufiger aufgefunden werden. Daneben wurden auch in der Doppelinterventionsgruppe größere interindividuelle Unterschiede deutlich. Gerade innerhalb des Tieres OVXD3 zeigten sich schnittabhängige Unterschiede. Abbildung 36 OVXD_a wies insbesondere endostnah spindelförmige Zellen mit parallelem Dendritenverlauf, zentral hingegen eher runde Osteozyten und vermehrt terminale Verdichtungen auf. Besonders deutlich zeigte sich an den unterschiedlichen Mineralisationslinien die abweichende, jedoch reihenartige Anordnung der Osteozyten. Perinukleäre Vakuolen ließen sich nur selten darstellen. Abbildung 36 OVXD_b zeigt ovale Osteozyten mit quer angeschnittenen Dendriten. Diese wirken deutlich verkürzt und verdickt. Daneben sind sie meist unvernetzt und heterogen im Durchmesser.

3.9.1.4 OVXDS-Gruppe

In der Gruppe der Tripleintervention war die Zellzahl anschnittsweise deutlich reduziert. Gruppenübergreifend fanden sich vermehrt abgerundete oder ovale Zellformen (bspw. OVXDS₂, OVXDS₃). Spindelformen waren seltener. Auf Grund der reduzierten Zellzahl war der interzelluläre Abstand größer. Weniger flächig und dünner schien das Dendritensystem mit ausgedünnten und faserigen Fortsätzen (OVXDS₃). Die Zellfortsätze waren vermehrt gekrümmt und die Dendritenlänge verkürzt. Untereinander wirkte der Dendritenbaum weniger verflochten, was insbesondere bei OVXDS₂ dargestellt werden konnte (Abb. 36 OVXDS_b). Im abgebildeten dünnen Trabekel des selben Tieres war die Zellzahl dagegen stark reduziert. Andere Bereiche stellten deutlich mehr Osteozyten dar, die eine ovale bis spindelförmige Morphologie besaßen. Dabei fielen besonders terminale Verdickungen der Dendriten auf (Abb. 36 OVXDS_a Kasten).



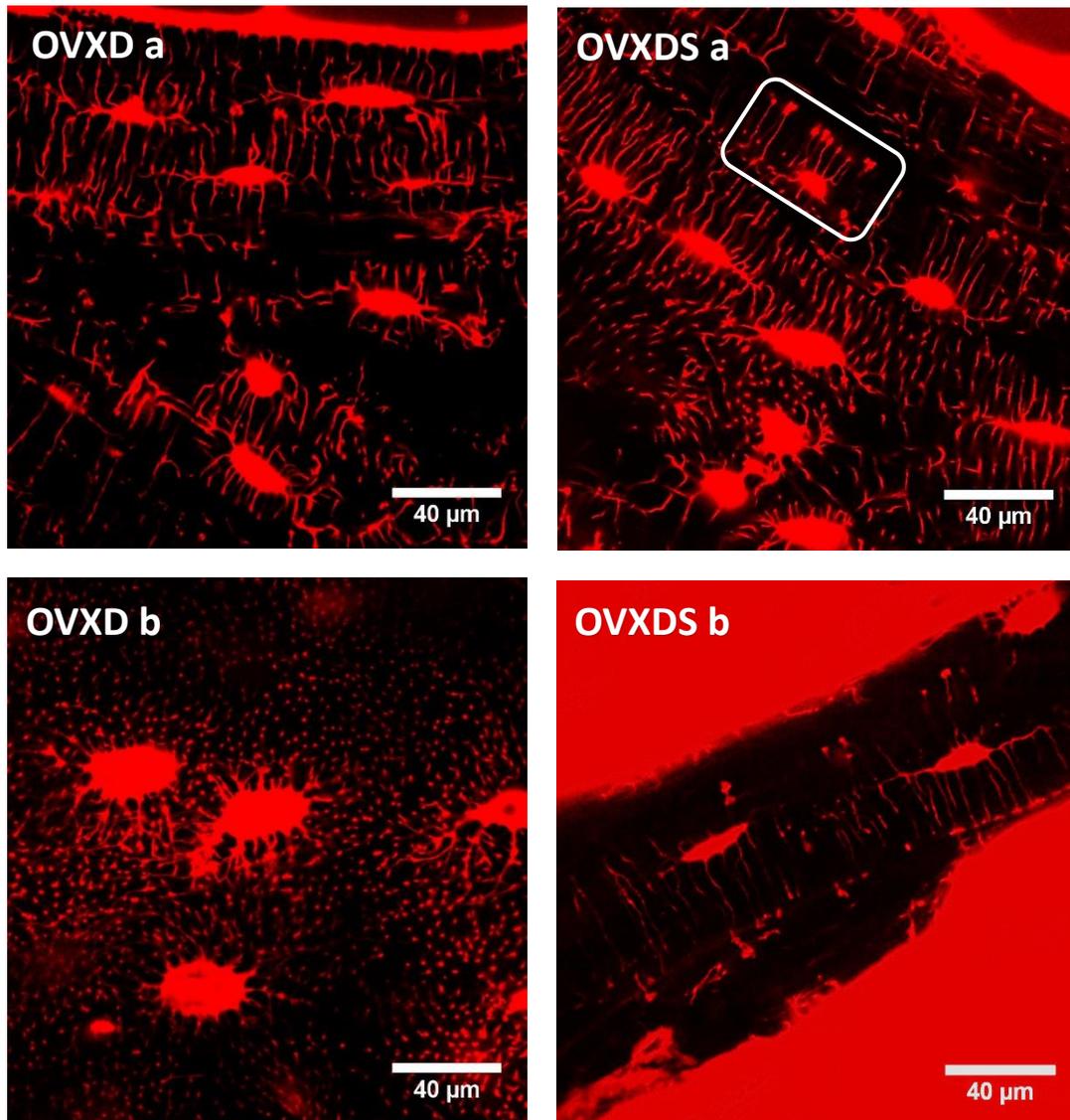


Abbildung 36: Rhodamin-Färbung Femur Osteozytenmorphologie und OLCS:

Die repräsentativen Bilder stellen Schiffe aus dem Femur der einzelnen Gruppen nach 8 Monaten dar. Für einige Gruppen sind zwei Bilder ausgewählt, da sich das OLCS hier heterogen darstellt. Bild **Kontrolle**: Schaf K5 Hier fanden sich überwiegend spindelförmige Osteozyten mit reich vernetztem Dendritenbaum. Daneben fällt eine Asymmetrie in der Zahl der Dendriten pro Osteozytenseite auf. Zu den peripheren (endostnahen) Bildrändern werden vermehrt Dendriten exprimiert, zentral sind sie spärlicher. Im weißen Kasten sind verdickte terminale Dendriten (Humps) dargestellt, die mit Nachbardendriten vernetzt sind. Bild **OVX** (OVX4) zeigt ebenso ein reich vernetztes OLCS. Gerade im unteren Bildbereich finden sich linear angeordnete Osteozyten einer Mineralisationsreihe mit annähernd parallel ausgebildeten Dendriten. Zwischen den einzelnen Mineralisationslinien verlaufen Zementlinien (Pfeilspitze). Bei Schaf **OVXD a** (OVXD4) wirken die Dendriten etwas kürzer und plumper. Zudem erkennt man verschiedene Anordnungsrichtungen der Zellen. Diese sind überwiegend spindelförmig. **OVXD b** (OVXD3) zeigt vermutlich quer getroffene Dendriten, die sich um die sternförmigen Osteozyten gruppieren. Hier werden ebenso Größenunterschiede zwischen den Dendritenanschnitten und intrazellulären Vakuolen deutlich. Schaf OVXDS2 weist eine heterogene Struktur auf. Stellenweise finden sich gut vernetzte Zellen mit reichem Dendritenwerk (**OVXDS a**), während die Zellzahl in anderen Bereichen des Femur stark reduziert ist (**OVXDS b**). Auch hier fallen terminale Verdickungen der Dendriten auf (Kasten). (Vergrößerung 63x).

3.9.2 Beckenkammbiopsien – Veränderungen des Dendritenwerks bei Progression der Osteoporose

Die Schnitte der Beckenkammbiopsien demonstrierten die Progression der Osteoporose im Knochen zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten: T1= 0 Monate, T2= 3 Monate und T3= 8 Monate. Zwischen den Schnitten und Schliffen differierte jedoch die Bildqualität. In den Beckenkammschnitten waren das Dendritenwerk und auch die Zellen zum Teil durch Knochenmatrix überlagert, die sich schlechter heraussubtrahieren ließ. Die Dendritenbäume waren weniger stark infiltrierte und hoben sich in geringerem Maße von der umgebenden Matrix ab. Es stellten sich schnittabhängige inter- und intraindividuelle Unterschiede dar, sodass sich die Gruppen nur in geringem Maße unterschieden. Im Vergleich zu den Femora schien die Zellzahl deutlich vermindert (Abb. 37).

3.9.2.1 Zeitpunkt 0 Monate

Die Beckenkammbiopsien aller Gruppen, die zum Zeitpunkt T1 entnommen wurden, unterlagen den gleichen Einflussfaktoren, da die verschiedenen Interventionsfaktoren hier noch nicht einwirken konnten. Es zeigten sich allerdings interindividuelle Unterschiede in der Zellzahl und im Kommunikationsnetz. Ein Vergleich der Tiere wurde durch die heterogene Zellularität erschwert. Die teils schlechte Darstellbarkeit der Dendriten erschwerte die Zuordnung eines Musters zu einer Zellmorphologie.

Tiere der Kontrollgruppe wiesen eine geringe Zellzahl auf, wobei insbesondere Spindel- und ovale Zellformen ausgeprägt wurden. Daneben fanden sich gehäuft intrazelluläre Vakuolen. Das Dendritennetzwerk war spärlich ausgeprägt, die Dendriten meist kurz aber verzweigt. Bei einzelnen Zellen prägten sich längere Dendriten aus, die sich zur Knochenoberfläche hin orientierten. Die Zellzahl der ovariectomierten Schafe schien ebenso reduziert zu sein. In den Osteozyten zeigten sich zentrale perinukleäre Vakuolen und ein ausgedünntes Dendritenwerk. Vereinzelt stellten sich Osteozyten mit „flaschenbürstenartigen“ Dendritenbäumen dar (Abb. 37, OVX5, T1).

In der OVXD-Gruppe zeigten die Tiere eine ähnliche Zellzahl mit meist ovalen, vereinzelt auch spindelförmigen Zellen. Die Dendriten waren spärlich, wobei ein perpendikulärer Verlauf zur Knochenoberfläche hin beobachtet werden konnte. Daneben fanden sich terminale Verdickungen der Dendriten an den Kittlinien. Auch zentrale und periphere Vakuolen der Osteozyten konnten dargestellt werden. Gleiches wurde bei den Tieren der OVXDS-Gruppe beobachtet. Hier lagen insbesondere spindelförmige und ovale Osteozyten vor. Die zelluläre Vernetzung konnte auf Grund der reduzierten Dendritenzahl nur selten deutlich dargestellt werden, während sich terminale Auftreibungen gehäuft fanden. Ebenso waren intrazelluläre Vakuolen vorhanden (Abb. 37, OVXDS8, T1).

3.9.2.2 Zeitpunkt 3 Monate

Drei Monate nach Interventionsbeginn wurden erneut Beckenkammbiopsien entnommen. Bei der Analyse zeigte sich eine geringe Anzahl an Osteozyten in den Schnitten. Zwischen den Gruppen fand sich jedoch ein leichter Unterschied in der Zellmorphologie. Tiere aus der Kontrollgruppe wiesen zwar wenige, aber überwiegend spindelförmige und stellenweise ovale Zellen auf. In den anderen Gruppen fanden sich überwiegend ovale Zellformen. Zwar wurden in allen Gruppen auch spindelförmige Osteozyten ausgeprägt, jedoch waren sie weniger zahlreich als in der Kontrollgruppe. Auf Grund des reduzierten dendritischen Netzwerks, wirkten die Zellen untereinander schlecht oder nur geringfügig vernetzt. Im Allgemeinen war das Dendritenwerk wenig flächig und stellte sich unverzweigt, verkürzt und verplumpt dar. Ein paralleler, dem Endost zustrebender Verlauf der Zellfortsätze fand sich nur vereinzelt (Abb. 37, K5, T2). Flaschenbürstenartigen Dendritenformationen wurden kaum vorgefunden. Dagegen präsentierten sich endständige Verdickungen der Zellfortsätze bei den ovariectomierten Tieren und in der dualen Interventionsgruppe (OVXD2, T2). Besonders an Kittlinien schienen sie vermehrt ausgebildet zu sein. Bei den zusätzlich mit Steroiden behandelten Tieren waren Humps seltener. In allen Gruppen konnten des Weiteren intrazelluläre Lakunen identifiziert werden. Zum Teil waren sie peripher in der Zelle, bei einigen Tieren wie bspw. OVXDS4 (T2) jedoch auch perinukleär oder zentral gelegen.

3.9.2.3 Zeitpunkt 8 Monate

Nach 8 Monaten fand sich eine verminderte Anzahl an Osteozyten gegenüber den vorigen Zeitpunkten wieder. Die einzelnen Gruppen unterschieden sich in der Zellmorphologie, jedoch nicht in der Zellzahl. Ovale Zellen und vereinzelte Spindelformen wurden insbesondere in der Kontrollgruppe gefunden. In den anderen Gruppen fanden sich vermehrt runde Osteozytenformen. Perinukleäre Hohlräume konnten sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der OVXD-Gruppe dargestellt werden. Schafe der OVX-Gruppe wiesen kleinere periphere und in der OVXDS-Gruppe eher zentrale Vakuolen auf (Abb. 37, OVXDS1, T3).

Gruppenübergreifend war das dendritische Netzwerk spärlich ausgeprägt. In allen Gruppen fanden sich verkürzte Dendriten, deren Anzahl pro Zelle vermindert schien. Die Schafe der Kontrollgruppe prägten vereinzelt perpendikuläre oder flaschenbürstenartige Dendriten aus, während sie in den anderen Gruppen kaum vorkamen. Insbesondere in der OVXDS-Gruppe wirkte das Netzwerk stark reduziert. Hier schienen die Ausläufer ausgedünnt und verkürzt. Ähnlich stellte sich dies auch bei den Schafen der OVXD-Gruppe dar, während sich bei den ovariectomierten Tieren verdickte und verkürzte Dendriten sowie terminale Auftreibungen fanden. Gerade an Kittlinien verdickten und

akkumulierten die Dendriten. Mit Höhe des Interventionszweiges schien die Anzahl der terminalen dendritischen Auftreibungen zuzunehmen. Die folgenden Bilder zeigen die Progression der Osteoporose zu den verschiedenen Zeitpunkten in den Gruppen.

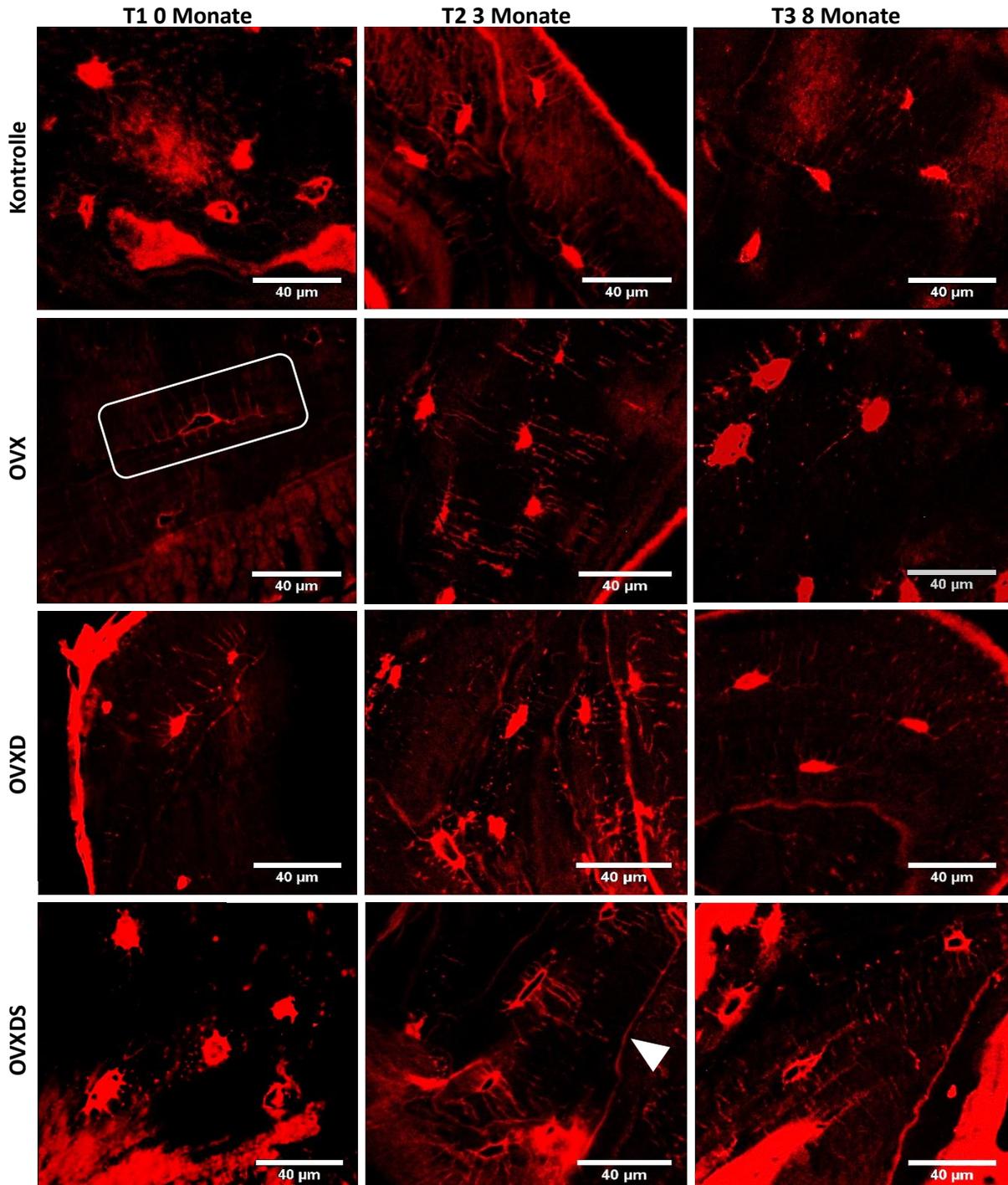
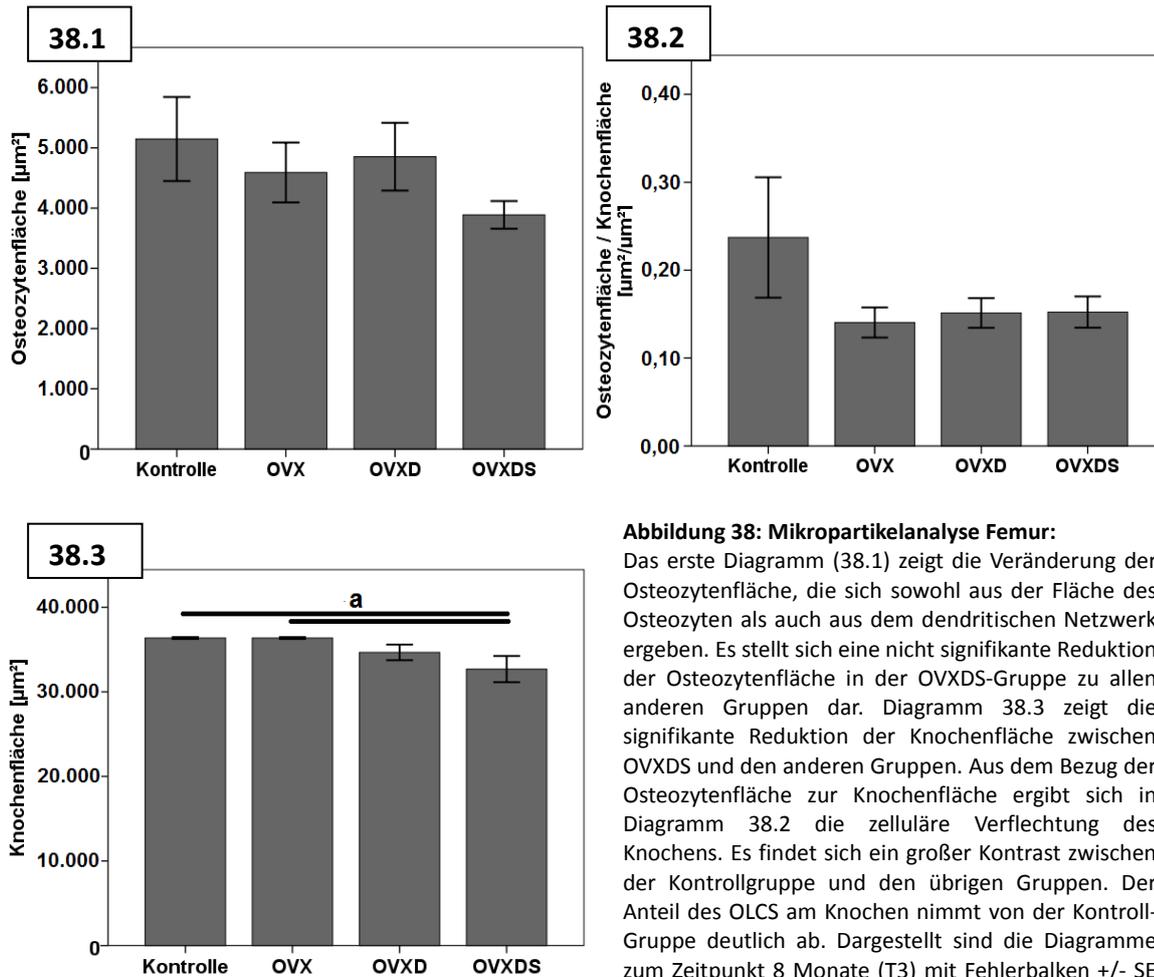


Abb. 37: Rhodamin-Färbung Beckenkammbiopsien im zeitlichen Verlauf: Osteozytenmorphologie und OLCS:

Dargestellt sind die Stanzten der verschiedenen Gruppen zu den Zeitpunkten 0, 3 und 8 Monate mittels Rhodamin-Färbung in 63x Vergrößerung. In der Kontrollgruppe stellen sich zu Beginn (**K2**) mehrere Osteozyten mit rundlicher Morphologie dar. Die Dendriten ragen von den Zellen sternförmig weg. Daneben fallen zentrale Vakuolen auf. Im Anschnitt nach 3 Monaten finden sich ovale bis spindelförmige Zellen, die sich entsprechend der Mineralisationslinie anordnen. Es wird ein perpendikulärer Dendritenverlauf und die „Flaschenbürsten-Morphologie“ gefunden (**K5**). Ähnliche Zellformen finden sich auch nach 8 Monaten, wobei hier die Dendriten weniger deutlich darstellbar sind und die Osteozyten dysarrangiert wirken (**K1**). Schaf **OVX5** zeigt bei 0 Monaten nur wenige Osteozyten, deren flaschenbürstenartiger Dendritenbaum stellenweise deutlich wird (Kasten). Im Teilbild 37, OVX T2 werden annähernd linear angeordnete Osteozyten mit rundlicher Morphologie sichtbar, deren Dendritenbaum parallel der Knochenoberfläche zustrebt (**OVX1**). Zum Zeitpunkt T3 finden sich ovale Osteozyten mit eher spärlichem Dendritenwerk. Die Osteozyten besitzen teilweise ein vergrößertes Zellvolumen (**OVX6**). Schaf **OVXD8** weist bei T1 nur sehr wenig Osteozyten auf. Diese sind von rundlicher Morphologie und orientieren sich parallel über der Mineralisationslinie. Im Bild wird ein perpendikulärer Dendritenverlauf deutlich. Bei T2 (**OVXD2**) finden sich ovale bis spindelförmige Zellen mit merklich reduziertem Dendritennetz. Daneben sind dendritische Auftreibungen und intrazelluläre Hohlräume sichtbar. Auch nach 8 Monaten scheint das Dendritenwerk spärlich ausgeprägt. Bei den hier dargestellten spindelförmigen Zellen findet sich ein sehr feines, aber langstreckiges OLCS (**OVXD7**). In der **OVXDS**-Gruppe fallen nach 0 Monaten ungeordnete, rundliche Osteozyten mit plumpen Dendritenwerk und zellulären Vakuolen auf (**OVXDS8**). Nach 3 Monaten zeigen sich bei **OVXDS4** dagegen heterogene Zellmorphologien. Deutlich werden intrazelluläre Hohlräume und das etwas markanter darstellbare Dendritenwerk. Die Dendriten verlaufen in Abhängigkeit der Mineralisationslinie parallel auf die Zementlinie zu (Pfeilspitze). Auch zum Zeitpunkt T3 werden die zellulären Hohlräume sichtbar. In diesem Bild sind weniger Osteozyten mit eher rundlicher Formation sowie plumpere Dendriten und mehr terminale Auftreibungen dargestellt (**OVXDS1**). (Vergrößerung 63x).

3.10 Mikropartikelanalyse zeigt geringste OLCS-Fläche bei OVXDS-Gruppe im Femur

Bei der Untersuchung der osteozytären Fläche im Femur unter konfokaler Laser-Mikroskopie fand sich eine deutliche Reduktion im Gruppenverlauf (Abb. 38.1). Insbesondere die OVXDS-Gruppe wies eine deutlich geringere Osteozytenfläche auf. Daneben stellte sich durch die vergrößerten Abweichungen die Heterogenität dar. Für die Knochenfläche zeigte sich eine Reduktion im Gruppenverlauf, sodass sich die OVXDS-Gruppe signifikant von der Kontroll- und OVX-Gruppe ($p_K = 0,017$; $p_{OVX} = 0,008$) unterschied (Abb. 38.3). Bezog man die gesamte osteozytodendritische Fläche auf die Knochenfläche, ergab sich die Größe des OLCS im Knochen (Abb. 38.2) und somit der zelluläre Anteil des Knochens. Es ließen sich insbesondere Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den anderen Interventionsgruppen erkennen. Der Anteil des OLCS am Knochen nahm von der Kontrollgruppe zu den anderen Gruppen hin merklich ab. Dabei imponierte die OVX-Gruppe am niedrigsten. In Abbildung 38.2 wird der starke Kontrast der Kontrollgruppe zu den anderen Gruppen deutlich. Daneben fällt in der Kontrollgruppe die erhöhte Variabilität auf, die durch den mittleren Standardfehler dargestellt ist.



3.11 Heterogene Dendritennetze im Beckenkamm

Im Beckenkamm sollte die Progression der Osteoporose durch wiederholte Messungen abgebildet werden. Zu den verschiedenen Zeitpunkten fanden sich jedoch in der Analyse dieser Region nur geringe Unterschiede in der Ausprägung des OLCS zwischen den einzelnen Gruppen. Nach 8 Monaten war die mittlere OLCS-Fläche aller Gruppen am niedrigsten, normalisiert jedoch nach drei Monaten, da sich zwischen T2 und T3 nur eine geringe Veränderung der Osteozytenfläche, bei gleichzeitig größerer Veränderung der abgebildeten Knochenfläche ergab (s. Tab.28).

Besonders in Abbildung 39.1 und 39.2 wird die inhomogene OLCS-Fläche deutlich. Bereits in der Kontrollgruppe zeigten sich starke Schwankungen zwischen den Tieren, die keinem Behandlungseffekt unterlagen. In den höheren Interventionszweigen stellte sich jedoch nach 8 Monate eine Verminderung des OLCS dar. Der Ausgangswert war in diesen Gruppen zum Zeitpunkt T1 allerdings geringer, sodass die erfasste Fläche zwischen T1 und T2 leicht zunahm.

Zwischen 3 und 8 Monaten zeigte sich, dass es in den Gruppen zu einem erhöhten zellulären Anteil im Knochen kam (Abb. 39.3). Daneben fand sich in allen Gruppen, außer OVX, eine Reduktion des OLCS-Anteils zwischen dem Zeitpunkt T1 und T2. Signifikante Unterschiede prägten sich zwischen den einzelnen Therapiegruppen nicht aus. Die Heterogenität wurde unter anderem durch die signifikanten Unterschiede innerhalb der OVXD-Gruppe zwischen Zeitpunkt 1 und 2 in der normalisierten Osteozytenfläche (Abb. 39.3 $p=0,029$, Balken in Abb. 39.4 nicht dargestellt) und in der OVX-Gruppe bezüglich der Knochenfläche zwischen T2 und T3 ($p=0,014$) deutlich (Abb. 39.3 u. 39.5).

Auch die Knochenfläche zeigte keine homogene Veränderung auf. Mit zunehmender Einwirkzeit der Behandlung stellte sich lediglich in der Kontrollgruppe eine Verminderung dar. Die anderen Therapiegruppen wiesen dagegen eine sogar vermehrte Fläche auf. In der OVX- und OVXD-Gruppe fand sich nach 8 Monaten eine deutlich vergrößerte Fläche (Abb. 39.5). Im weiteren Verlauf ergaben sich keine entsprechenden signifikanten Veränderungen zwischen den Variablen.

Einen Überblick über die mittlere Variablenausprägung zu den Zeitpunkten gibt Tabelle 28, während Abbildung 39 die einzelnen Variablen innerhalb der Gruppen und zu den Zeitpunkten aufschlüsselt. Die Variabilität innerhalb der Beckenkammschnitte mindert somit die Aussagekraft bei der statistischen Analyse zur Veränderung des dendritischen Netzwerks im Rahmen des osteoporotischen Progresses.

Zeitpunkt [Monate]	Variable	Mittelwert [μm^2]	Standardabweichung [μm^2]
T1 0 Monate	Osteozytenfläche	1170.55	2289.70
	Knochenfläche	17851.68	10914.07
	Osteozytenfläche /Knochenfläche	0.0921	0.1039
T2 3 Monate	Osteozytenfläche	695.66	470.19
	Knochenfläche	17215.00	12394.43
	Osteozytenfläche /Knochenfläche	0.0511	0.0700
T3 8 Monate	Osteozytenfläche	612.86	549.98
	Knochenfläche	23025.83	9357.53
	Osteozytenfläche /Knochenfläche	0.0890	0.1309

Tabelle 28: Mikropartikelanalyse Beckenkamm:

Tabelle 28 gibt einen Überblick über die Veränderungen des OLCS beim osteoporotischen Progress im Knochen. Dargestellt ist der Mittelwert aller Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten. Dabei wird die Osteozytenfläche, Knochenfläche sowie das Verhältnis beider erfasst. Daneben ist die Standardabweichung der Mittelwerte angegeben. Mit zunehmender Dauer der Behandlung nimmt die osteozytäre Fläche ab, wobei der Anteil des OLCS am Knochen zwischen T1 und T8 annähernd konstant bleibt. Zu berücksichtigen ist jedoch die erhöhte Standardabweichung als Ausdruck der interindividuellen Inhomogenitäten.

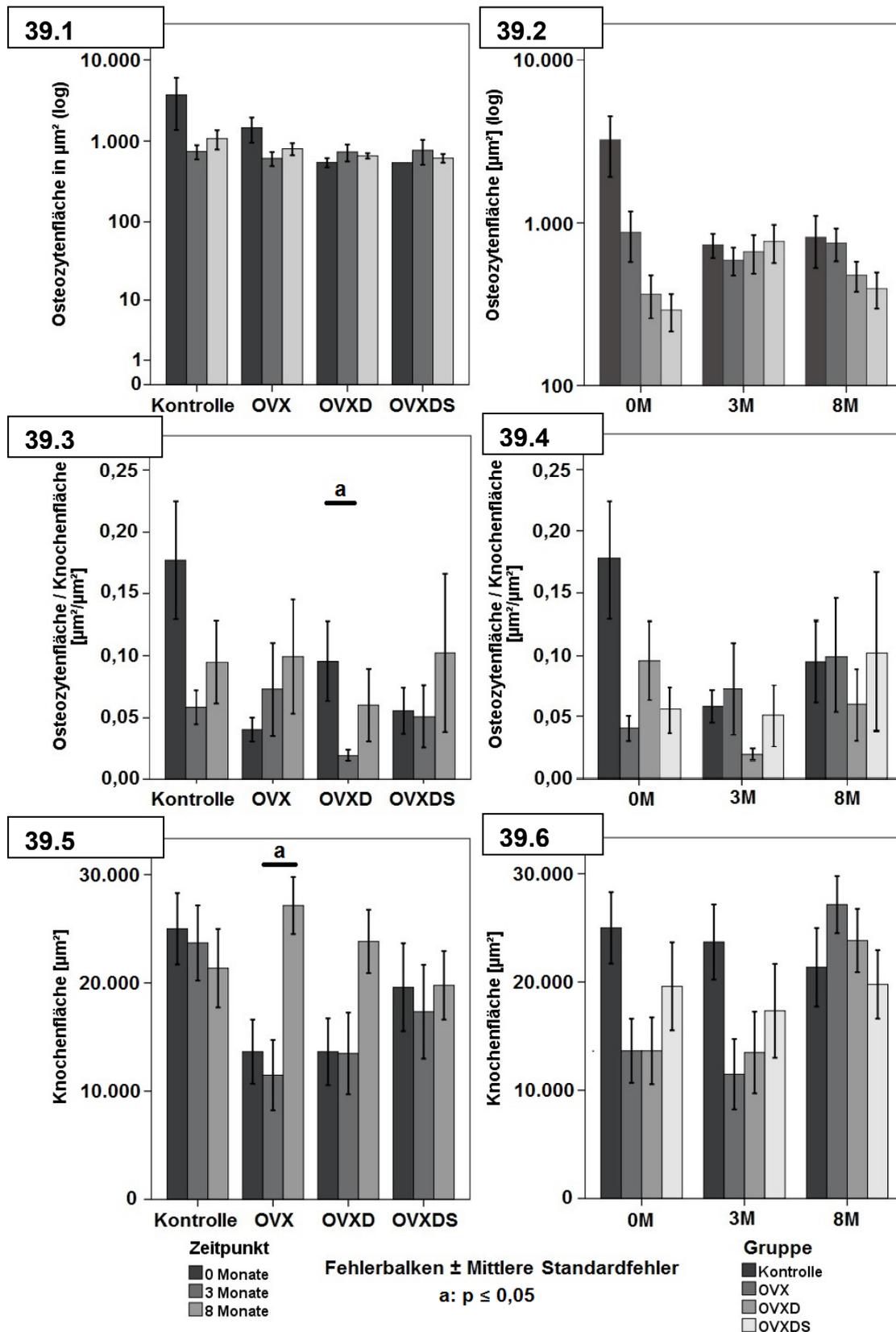


Abbildung 39: Histomorphometrische Partikelanalyse Rhodamin:

Die Diagramme zeigen die Ergebnisse aus den histomorphometrischen Analysen der rhodamin-gefärbten Schnitte der Beckenkammbiopsien zu drei Zeitpunkten. Dargestellt ist die Fläche des OLCS während der Progression der Osteoporose in den verschiedenen Interventionszweigen. Daneben wurde die Knochenfläche erfasst, um den Flächenanteil des OLCS am Knochen bestimmen zu können. Das OLCS zeigt im Beckenkamm keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitpunkten. Ebenso ist die Entwicklung der Knochenflächen innerhalb der Gruppen unterschiedlich. Daneben fallen die vergrößerten Fehlerbalken und somit eine Inhomogenität auf. (a: $p = 0,05$).

3.12 Zusammenfassung der Ergebnisse

Unter der Behandlung zeigte sich ein osteoporosetypischer Knochenumbau in den verschiedenen Untersuchungsregionen. Die unterschiedliche Belastung der Regionen spiegelte sich sowohl an der Spongiosaarchitektur als auch in der Zellularität wider. Insbesondere in der OVXDS-Gruppe war die Auswirkung auf den Knochen am deutlichsten. Die Knochenstruktur schien in ihrer Qualität durch die Behandlung beeinflusst zu werden, da sich sowohl histologisch, als auch histomorphometrisch ein Umbau der Spongiosa zeigte. Im Femur kam es zum Verlust der Horizontaltrabekel und zur starken Rarifizierung der trabekulären Anzahl, während im Wirbelkörper die Trabekel besonders unter Dreifachbehandlung an Dicke verloren, jedoch gut vernetzt blieben. In der Kontrollgruppe der Wirbelkörper bildeten die Trabekel schalenartige Formen aus, die sich mit Zunahme der Therapieregime zu dünneren Stäben umwandelten.

Daneben wurden zelluläre Veränderungen des Osteozyten deutlich. In beiden Regionen fand sich durch die zusätzliche Steroidgabe eine signifikante Reduktion der Knochenzellen. Bezogen auf die Fläche nahm der zelluläre Anteil im Femur ab, während er im Wirbelkörper, bedingt durch die übermäßige Knochenflächenreduktion, zunahm. Des Weiteren zeigte die Analyse unterschiedliche Osteozytenmorphologien in Abhängigkeit der Lokalisation und Behandlungsstärke. Besonders endostnah im Trabekel fanden sich in den Regionen vermehrt spindelförmige Osteozyten mit gut vernetztem OLCS. Im Wirbelkörper ergaben sich unter der Behandlung Hinweise darauf, dass die Anzahl spindelförmiger Osteozyten ab- und die runder Zellen bzw. leerer Lakunen zunahm. Letztere wurden besonders in den OVXDS-Gruppen beider Regionen vermehrt gefunden. In den Kontrollgruppen war die Anzahl runder Osteozyten und Lakunen dagegen vermindert, wobei sie besonders in zentralen Trabekelbereichen gefunden wurden.

Histologisch stellte sich die Ausprägung des OLCS inhomogen in Abhängigkeit zur Zellmorphologie und Interventionsgruppe dar. Die Vernetzung der Osteozyten und die Flächigkeit des OLCS wirkten in den Behandlungsgruppen des Femurs deutlich reduziert, wobei insbesondere terminale Verdickungen des Dendritenwerks auffielen. Diese waren vermehrt an Kittlinien, vereinzelt auch zu anderen Osteozyten ausgebildet. Während spindelförmige Osteozyten einen flächigen und weit verzweigten Dendritenverlauf aufwiesen, war die Anzahl der Ausläufer bei runden Osteozyten oder Lakunen stark vermindert. Die Beckenkammstanzen, die zur Darstellung der Progression des Knochenmasseverlustes untersucht wurden, wiesen neben zellulären Veränderungen auch größere interindividuelle Inhomogenitäten auf. Neben der signifikant höheren Lakunenzahl bei den mit Steroiden behandelten Tieren, fanden sich ebenso vermehrt intrazelluläre Vakuolen. Gerade auch mikropetrotische Lakunen konnten in der OVXDS-Gruppe in verschiedenen Regionen dargestellt werden.

4 Diskussion

Die systemische Skeletterkrankung Osteoporose ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung mit steigender Prävalenz in der europäischen Bevölkerung⁽¹¹⁵⁾. Kennzeichnend für die Erkrankung ist eine Reduktion der Knochenmasse, die zu einer verschlechterten Mikroarchitektur des Knochens führt. Die daraus resultierende Frakturanfälligkeit spiegelt sich vor allem im Wirbelkörper, distalen Radius und Schenkelhals wider⁽⁷⁷⁾. Nach erfolgreicher Osteoporoseinduktion der Schafe im experimentellen Studiendesign, zeigt sich eine minderwertige Knochenstruktur, die sich in der spongiösen Knochenstatik und in zellulären Veränderungen widerspiegelt.

4.1 Verstärkte Knochenreduktion durch additiven Effekt der Interventionen

Als Kleintiermodell der Osteoporose werden häufig Ratten zur Untersuchung der postmenopausalen und glukokortikoid-induzierten Osteoporose herangezogen. Hierfür werden überwiegend Sprague Dawley Ratten verwendet⁽¹³⁵⁾. Durch eine Ovariectomie lässt sich bei diesen nach kurzer Zeit eine Osteoporose erzeugen. Nach 30 Tagen wurde dabei im Femurhals und nach 60 Tagen im Wirbelkörper eine signifikante Reduktion des Knochens erreicht werden⁽⁸¹⁾. Nach der erfolgreichen Etablierung mehrerer OVX-Rattenmodelle zur Osteoporose^(136–138) konnten diese, gemäß den FDA-Leitlinien, auf ein Großtiermodell übertragen werden.

Der Vorteil des Schafes als Großtiermodell der Osteoporose liegt in der besseren Übertragbarkeit auf den Menschen. Der Schafsknochen weist im Gegensatz zur Ratte mehr Gemeinsamkeiten im strukturellen Aufbau, der Morphologie und der Knochenumwandlung auf⁽¹¹¹⁾. Um bei Schafen eine Osteoporose zu erzeugen, führte Wu et al. eine Ovariectomie zur Östrogendeprivation durch, sodass sich eine Reduzierung des BMD um 30 % nach einem Jahr erzeugen ließ⁽¹³⁹⁾. Dies reichte jedoch nicht aus, um einen mit der Osteoporose vergleichbaren Knochenverlust zu erzielen⁽¹⁴⁰⁾. Daher musste die Ovariectomie mit weiteren Strategien gekoppelt werden⁽¹³⁹⁾. Zur Minimierung des Beobachtungszeitraums und zur Verstärkung des Knochenverlustes entwickelten Egermann et al.⁽⁸⁾ und Lill et al.⁽¹⁴¹⁾ ein mit dieser Studie vergleichbares Modell, in dem sie ovariectomierte Schafe einer Calcium- und Vitamin-D-freien Diät unterzogen und zusätzlich Steroide verabreichten. Hierdurch konnte ein Knochenverlust von 30 % (des BMD) schon nach 6 Monaten induziert werden⁽⁸⁾.

Außerdem müssen die Interventionen über eine ausreichende Zeitspanne einwirken können. Ding et al. legte mit Hilfe seiner Forschungsergebnisse den minimalen Zeitpunkt der Dreifachbehandlung auf 7 Monate fest. Erst nach dieser Zeit wurde mit einer

zusätzlichen Glukokortikoidgabe (Prednisolon 0,6 mg/Kg/d x5/w) ein signifikanter Knochenverlust in der Wirbelsäule erzielt⁽⁷⁹⁾. Bei der sich einstellenden glukokortikoid-induzierten Osteoporose zeigte sich ein typischer zweiphasiger Verlauf. Im ersten Jahr kam es zu einem „High-Turnover“ mit erhöhtem Umsatz von bis zu 12 %, wohingegen sich danach ein langsamerer Umsatz („Low-Turnover“) einstellte^(142,143).

Der erhöhte Knochenumsatz in der kurzen Untersuchungszeit (8 Monate) unterstreicht somit die Rolle der kombinierten Applikationen im eigenen Schafsmodell. Der additive Effekt der Strategien^(8,123,141) fällt besonders in den Wirbelkörpern auf, wobei diese vor allem durch die Steroidgabe in ihrer Wirkung potenziert werden.

4.2 Stärkste Reduktion der Knochenfläche in OVXDS-Gruppen

Die verminderte Knochenqualität im Zuge der erfolgreich induzierten Osteoporose lässt sich an strukturellen Parametern zeigen, die sich gut in der Toluidinblau-Färbung darstellen lassen. Histologisch wurde insbesondere eine Verminderung des Trabekelwerks und eine reduzierte Vernetzung der Spongiosa unter der Behandlung deutlich. Mit abnehmendem spongiösem Knochenvolumen wurden die Knochenkavitäten größer und der Gehalt an Adipozyten im Knochenmark nahm zu. Besonders unter Steroiden schienen die Fettzellen vermehrt, wobei gezeigt werden konnte, dass sich Glukokortikoide stimulierend auf die Adipozytogenese auswirken⁽¹⁴⁴⁾. Die histomorphometrisch berechnete Knochenfläche zeigte zwischen den Gruppen eine signifikante Reduktion, die sowohl in der Silber-Färbung als auch in der Rhodamin-Färbung dargestellt werden konnte. Die starke Abnahme der trabekulären Fläche wurde vor allem in der OVXDS-Gruppe im Wirbelkörper (-50 %) und in milderer Form auch am Femur sichtbar und deutet auf eine vermehrte Knochenresorption hin. Auch Zarrinkalam et al. untersuchte, unter anderem histomorphometrisch, am Schafsmodell die Auswirkungen der Osteoporose und kam ebenfalls zum Ergebnis, dass sich der Anteil des spongiösen Knochens reduziert. Unter sechsmonatiger Tripleinduktion kam es im Wirbelkörper zu einer Reduktion des trabekulären Volumens von 27 %⁽¹⁴⁵⁾. Er sah dabei ähnliche Veränderungen in der Mikroarchitektur des Schafes und des Menschen und legte daher die Verwendung des Schafsmodells nahe.

Um den Abbau der Spongiosa nachvollziehen zu können, wird häufig das Bone Volume/Tissue Volume (BV/TV) verwendet⁽¹⁴⁶⁾, das beim osteoporotischen Umbau eine Reduktion des mineralisierten Anteils am Gesamtvolumen gut wiedergibt. Dieser Parameter kann sowohl mit dem μ CT als auch histomorphometrisch bestimmt werden. Bei der Untersuchung des osteoporotischen Knochens von postmenopausalen Frauen konnte in verschiedenen Körperregionen eine Reduktion des spongiösen Knochens nachgewiesen werden. Daneben zeigte sich ein struktureller Umbau zu einem

minderwertigeren Knochengerüst^(103,147). Auch am Schafsmodell wurden ähnliche Ergebnisse gefunden⁽¹²³⁾, die mit den eigenen Ergebnissen übereinstimmen.

Die in den eigenen Analysen gefundene stärkere Abnahme der Knochenfläche des Wirbelkörpers unter Steroidapplikation deckt sich mit Aussagen von van't Hof et al., der postulierte, dass Wirbelkörper stärker von Osteoporose betroffen seien als die Femora. Dies führte er auf den höheren Anteil an Spongiosa im Wirbelkörper zurück, sodass diese stärker affiziert würden⁽¹¹¹⁾. Dabei bezog sich van't Hof et al. auf Studien von Modder et al.⁽¹⁴⁸⁾ und Yao et al.⁽¹⁴⁹⁾, bei denen die Abnahme der BMD mittels DXA und pQCT in verschiedenen Knochenarealen bei Mäusen untersucht wurden. Hier konnte gezeigt werden, dass im Wirbelkörper der BMD um bis zu 10 % abnahm, während im Femur nur von einer 5 %igen Abnahme ausgegangen werden konnte. Mittels Dreifachbehandlung kam es im Schafsmodell sogar zu einer Reduktion des BMD von 25 % im LWK⁽¹⁴⁵⁾. Der trabekuläre Knochenverlust in der Studie von Zarrinkalam et al. war jedoch im Wirbelkörper geringer als im Femur (33 % WK, 42 % PF), was sich aber nicht auf den BMD bezog⁽¹⁴⁵⁾. Dies deutet auf ein unterschiedlich starkes Ansprechen der Regionen hin.

Weitere Autoren erzielten dagegen übereinstimmend einen größeren Effekt im Wirbelkörper als im Femur^(141,150). Auch die eigenen Ergebnisse, mit einer Flächenreduktion von etwa 50% und Abnahme des BMD um 32 % im LWK und um 29 % im Femur, legen dies nahe. Daneben klassifizieren sie den Knochen als osteoporotisch, da ein reduzierter BMD von über 25 % in etwa einem negativ abweichendem T-Wert von -2,5 entspricht^(123,151). Die beobachtete stärkste Knochenreduktion unter Dreifachinduktion in verschiedenen Regionen hebt besonders die potenzierende Wirkung⁽¹⁴²⁾ der Steroide hervor.

4.3 Reduzierte Mikroarchitektur unter Osteoporoseinduktion

Die verminderte Knochenqualität zeigte sich insbesondere durch eine minderwertige Statik der Spongiosa. Dies wurde an verschiedenen Trabekelparametern deutlich. Im eigenen Modell wurde versucht, durch die Behandlung einen postmenopausalen osteoporotischen Phänotyp (Typ 1) zu erzeugen. In der histologischen Analyse zeigten sich im Femur deutliche Tendenzen zur Abnahme der trabekulären Anzahl (Tb.N.) und im LWK zur Dickenreduktion der Trabekel (Tb.Th.) (Bild 12/ 13 S. 45f), wogegen der Abstand zwischen ihnen (Tb.Sp.) in beiden Regionen zunahm. Bonucci und Ballanti stellten dies ebenso bei der Untersuchung von verschiedenen Formen der Osteoporose fest. Bei dem postmenopausalen Typ 1 fand sich eine signifikante Abnahme der trabekulären Anzahl, während die senile Verlaufsform (Typ 2) eine Reduktion der trabekulären Dicke aufwies⁽¹⁰²⁾. Ebenso fand Bouvard et al. bei der glukokortikoid-induzierten (sekundären)

Osteoporose eine reduzierte trabekuläre Dicke⁽¹⁵²⁾. Die vor allem unter Steroidgabe beobachtete Dickenabnahme legt somit deren Einfluss am eigenen Modell nahe. Glukokortikoide wirken sich auf eine verstärkte Knochenresorption aus und hemmen gleichzeitig die Knochenbildung⁽⁸²⁾. Die Folge ist ein vermehrter Abbau der Trabekel. Für die glukokortikoid-induzierte Osteoporose besteht jedoch noch eine inhomogene Datenlage zu den einzelnen Parametern⁽¹⁵³⁾.

Auf Grund der reduzierten trabekulären Anzahl und Fläche im eigenen Modell ist von einem Mischtyp eines High-Turnovers zwischen postmenopausaler und glukokortikoid-induzierter Osteoporose auszugehen. Die reduzierte Trabekeldicke könnte jedoch in geringerem Maße auch auf Einflüsse einer senilen Form hinweisen, da einzelne ältere Schafe im Alter von 9 Jahren in die Studie eingeschlossen wurden. Auch bei diesen wären demnach eine reduzierte Trabekeldicke zu erwarten⁽¹⁰²⁾. Des Weiteren könnte die Anschnittsebene das Ergebnis beeinflusst haben^(109,145).

Der Abbau der Spongiosa im Zuge der Osteoporose wurde durch viele weitere Autoren^(102,103,105,145,147) beschrieben. Wronski et al. demonstrierte im Rattenmodell unter Östrogendefizienz die Entwicklung eines postmenopausalen Typ I, mit reduzierter Trabekeldicke, Vernetzung, Anzahl und Separation, sowie den osteoprotektiven Effekt von Östrogenen⁽⁸⁰⁾. Den auch beim Menschen gefundenen erhöhten intertrabekulären Abstand führte Eriksen et al. auf eine längere Lebenszeit der Osteoklasten zurück. Für diese ergäbe sich eine längere knochenresorptive Zeitspanne, die sich insbesondere in der Spongiosa durch einen vermehrten Knochenverlust darstellten ließe⁽⁹⁰⁾. Auch Zarrinkalam et al. demonstrierte mit histomorphometrischen Untersuchungen am Schafsmo- dell den Umbau der Spongiosa. Im Wirbelkörper kam es bei ihm zur Reduktion der Trabekeldicke um 33 %, im Femur um 29 %. Während der intertrabekuläre Abstand und die Anzahl der Trabekel sich im WK nicht signifikant änderten, kam es im Femur zu einer Verminderung der Trabekel um 39 % und zu einem Anstieg des Abstandes um 115 %⁽¹²³⁾. Dies zeigt deutlich den Einfluss der kombinierten Behandlungen auf den Knochen und deutet auf regionsabhängige Unterschiede hin. Gerade die starke Trabekelabnahme im Femur korreliert gut mit den eigenen Ergebnissen. Ebenso wie bei Zarrinkalam et al.⁽¹²³⁾ fand sich im WK dagegen keine stärkere Abnahme der Trabekelzahl.

4.4 Reduzierte trabekuläre Vernetzung des Femurs

In den eigenen Analysen unterlag das Femur einem stärkeren Abbau des Trabekelnetzwerks als der Wirbelkörper. Die Vernetzung des Trabekelgeflechts kann neben den histologischen Analysen durch weitere Parameter untersucht werden. Histomorphometrisch kann die Verflechtung der Trabekel durch den Interkonnektivitäts-Index (ICI) und mittels μ CT über die Euler Poincaré Charakteristik⁽¹⁵⁴⁾ berechnet werden. Die Konnektivitätsparameter werden hierbei, ähnlich wie in der eigenen Arbeit, durch Charakteristika

der Trabekelstruktur bestimmt. Hierfür wird die Anzahl und der Abstand der Knotenpunkte voneinander sowie die Zahl terminale Äste bestimmt⁽¹⁵⁵⁾. Der Interkonnektivitäts-Index wurde initial durch Le et al. zur Beschreibung der Konnektivität von porösem Biomaterial beschrieben⁽¹²⁹⁾ und kann am Knochen sowohl für die Trabekel als auch für die Kavitäten verwendet werden. Harrar et al. zeigte, dass sich der ICI bei osteoporotischen Patienten verändert. Wegen des Verlustes spongiöser Knochenmasse und der trabekulären Verbindungen kam es zur Ausdünnung des Netzwerks. Die steigende Zahl terminaler Äste, die reduzierte Anzahl der Trabekel und der Knotenpunkte resultierte in einer erhöhten Frakturgefahr⁽¹⁵⁵⁾.

Besonders im Femur zeigte sich eine starke Abnahme der Vernetzung, wogegen im Wirbelkörper eher die trabekuläre Dicke abnahm und somit die Knotenpunkte sich nur leicht distanzierten. Auch Rosen et al. fand im Wirbelkörper eine reduzierte Dicke der Trabekel, ohne dass sich der ICI stark veränderte⁽¹⁴³⁾. Die zweidimensionale Analyse wird jedoch durch die Anschnittsebene beeinflusst. Nach Hildebrand et al. ist die Spongiosa, abhängig von der Knochenregion, unterschiedlich aufgebaut⁽¹⁵⁶⁾. Das unterschiedliche Vernetzungsmuster könnte dies widerspiegeln, wobei auch die Belastung des Knochens für dessen trajektorialen Aufbau verantwortlich ist⁽¹⁵⁷⁾. Die reduzierte Vernetzung, als Ausdruck einer minderwertiger Spongiosa im Zuge des osteoporotischen Umbaus, wurde durch verschiedene Autoren^(103,158) beschrieben. In der eigenen Arbeit spiegelte sich die Reduktion des Trabekelwerks deutlich im entwickelten Knochengradingsystem der Toluidinblau-Färbungen wider (Abb. 14, S. 51). Das niedrigere Grading der OVXDS-Gruppe im Femur begründete sich hierbei unter anderem auf einen größeren Verlust an Knotenpunkten als im WK.

Der Vergleich osteoporotischer und osteoarthritischer Patienten mit Hüftfrakturen im μ CT durch Montoya et al. zeigte eine reduzierte Konnektivität, trabekuläre Anzahl sowie eine vermehrte stabartige (rod-like) Trabekelformation im osteoporotischen Knochen⁽¹⁴⁷⁾. Auch im Alveolarknochen postmenopausaler Patientinnen konnte ein reduziertes Knochenvolumen, ein erhöhter intertrabekulärer Abstand und ein ausgedünntes und dyskonnektiertes trabekuläres Netzwerk angetroffen werden⁽¹⁰³⁾. Nach Knothe et al. scheint die Konnektivität direkt mit dem Schweregrad der Osteoporose zu korrelieren⁽¹⁵⁹⁾. Die histologischen Ergebnisse stehen somit im Einklang mit der Literatur und zeigen besonders im Femur, ein durch die reduzierte Konnektivität verursachtes, minderwertiges Spongiosagerüst und somit eine erhöhte Frakturgefahr bei der Osteoporose auf.

4.5 Umwandlung der Trabekelstruktur von Platten zu Stäben

Typisch für die Osteoporose ist vor allem ein spongiöser Knochenschwund, der sich schon histologisch in der veränderten Trabekelmorphologie widerspiegelt. Mit Hilfe des μ CTs und der Analyse des Structure Model Index (SMI) konnte Liu et al. zeigen, dass

sich durch Altern oder Osteoporose die Architektur des spongiösen Knochens von Platten zu Stäben verändert⁽¹⁶⁰⁾. Hierbei kommt es insbesondere zum Verlust an horizontalen Trabekeln, während die vertikalen Trabekel erhalten bleiben und teilweise an Dicke zunehmen⁽¹⁶¹⁾. Letzteres kann als belastungsabhängiger Umbau angesehen werden. Dass jedoch nicht nur die Anzahl der Trabekel allein entscheidend für die Stabilität des Knochens ist, zeigte Ciarelli et al. in einer klinischen Studie. Dabei wurden Frauen mit und ohne Hüftfraktur untersucht. Frauen mit erlittener Hüftfraktur zeigten zwar dieselbe Gesamtanzahl an Trabekeln, jedoch einen deutlichen Stabilitätsverlust des Knochens unter Belastung. Es fiel auf, dass speziell die Horizontaltrabekel abgebaut waren und nur zentrale vertikale Trabekel verblieben⁽¹⁶²⁾. Die Stabilität des Knochens wird somit nicht nur durch die trabekuläre Dicke⁽¹⁴⁷⁾, sondern vielmehr durch die räumliche Anordnung und Vernetzung der Trabekel beeinflusst.

Besonders deutlich konnte dies histologisch am Femur der Schafe im eigenen Modell dargestellt werden. Die in zentralen Knochenbereichen vermehrten säulenartigen Trabekelmorphologien spiegeln somit das Ergebnis des osteoporotischen Knochenverlusts der Horizontaltrabekel wider. Daneben stellen die zentral vermehrten „backsteinartigen“ Trabekel-Formationen (Abb. 11, S. 44) vermutlich Übergangsformen zur Säule dar, bei denen noch Horizontaltrabekel enthalten sind. Im Zuge des osteoporotischen Umbaus werden sie zunehmend abgebaut, wodurch es zum Verlust an Knotenpunkten kommt. Vertikale Anteile verbleiben dagegen intakt⁽¹⁶¹⁾. Dies lässt sich auch mit der Reduktion des ICI in Verbindung bringen⁽¹⁵⁵⁾. Zu berücksichtigen ist aber, dass auch physiologisch im Knochen trajektorielle Trabekelverläufe⁽¹¹⁾ vorkommen, die sich an der Belastungsachse orientieren. Neben dem Verlust an Horizontaltrabekeln reduziert sich die trabekuläre Dicke belastungsabhängig. Gerade im Wirbelkörper scheint es mit zunehmendem Alter zum vermehrten trabekulären Knochenverlust zu kommen.

Besonders der postmenopausale Knochen ist durch den vermehrten Abbau plattenartiger Trabekel charakterisiert⁽⁷⁹⁾. Von einem Zusammenhang mit Östrogenmangel ist daher auszugehen. Da seniler Knochen vom Umbau der Trabekel ebenfalls signifikant betroffen ist⁽¹⁶³⁾, kann ein alleiniger Östrogenmangel jedoch nicht ursächlich sein. Aus diesem Grund ist vielmehr ein multifaktorielles Geschehen anzunehmen. Dies steht ebenso im Einklang mit dem Versuchsaufbau, da eine reine Östrogendeprivation zur Induktion der Osteoporose bei Schafen nicht ausreicht⁽¹³⁹⁾.

Biomechanisch ist osteoporotischer Knochen weniger belastbar⁽¹³⁹⁾. Dies begründet sich darauf, dass die verbleibenden vertikalen stabförmigen Trabekel die gesamte Last des Körpers tragen müssen. Gleichzeitig schützt aber die Belastung auch die Osteozyten vor dem Zelltod⁽⁷¹⁾, sodass ein vitaler, aber dünner Knochen verbleibt. Änderungen in

Anzahl oder Dicke der stabförmigen Trabekel wirken sich somit aber stark auf die Fragilität des Knochens aus⁽¹⁴⁷⁾. Daneben erhöht übermäßiger belastungsinduzierter Stress in den verbleibenden Trabekeln das Frakturrisiko. Das lässt sich darauf zurückführen, dass die zu einer Fraktur führende Knickbelastung indirekt proportional zum Quadrat der vernetzungsfreien Länge der Trabekel ist⁽¹⁶⁴⁾. Je länger also die „Node-to-Node-Distance“, desto geringer ist die mögliche Belastung und desto schneller kommt es zum Knochenbruch. Eindrucksvoll stellte sich dies im Femur eines OVXDS-Schafs dar, da dieses eine Trümmerfraktur erlitt.

Daneben konnte durch Wang et al. dargestellt werden, dass die stabartigen Trabekel besonders inhomogen in ihrer Dichte (Tissue Mineral Density (TMD))⁽¹⁰⁴⁾ sind und vermutlich einem erhöhten Umsatz unterliegen. Eben dieser Punkt stellt einen interessanten Forschungsansatz dar, da die lasttragenden Trabekel eigentlich vor Knochenabbau geschützt sein sollten. Mehrere Autoren demonstrierten in ihren Studien, dass sich Last auf den Knochen osteoprotektiv auswirkt^(31,67,71,165). Durch Belastung verändert sich die Proteinexpression, der als Mechanosensor fungierenden Osteozyten⁽³⁾, sodass vermehrt schützendes Osteoprotegerin gebildet wird⁽⁷¹⁾.

Die in den Wirbelkörpern gefundene „lakunär-ausgestanzte“ Struktur (Abb. 9, S. 44) oder das „Schweizer-Käse-Muster“ (Abb. 10) mit den runden Markräumen lassen sich jedoch nicht anhand der Literatur einordnen. Der Begriff „Schweizer-Käse-Muster“ wurde wegen der charakteristischen zystenartigen Struktur der Kavitäten gewählt und wird analog auch in der Fachliteratur für ähnliche histopathologische Muster verwendet (bspw. polyzystisches Ovarialsyndrom)⁽¹⁶⁶⁾. Vor allem in der Kontrollgruppe der LWK fand sich das lakunär ausgestanzte Muster am häufigsten. Somit könnte dies mit einer vitalen Knochenarchitektur korrelieren.

Auf Grund der runden und nicht quadratischen Kavitätenform liegt es nahe, dass vor allem das plattenartige Modell des gesunden Knochens erweitert werden sollte. Es lässt sich daher postulieren, dass es sich bei dem „plate-like“ Modell⁽¹⁵⁶⁾ eher um ein „bowl-like“ Modell handelt. Die schalenartige Trabekelmorphologie stellt sich im zweidimensionalen Anschnitt lochartig dar und könnte mit den beschriebenen histologischen Lochmustern in Kongruenz gebracht werden. Diese Hypothese müsste jedoch durch weitere radiologische Untersuchungen (μ CT) und mathematische Verfahren gestützt werden. Die eher im Kortex auftretenden lakunären Muster könnten mit dem inhomogenen Aufbau des Wirbelkörpers zusammenhängen⁽¹⁶⁷⁾. Da es sich gerade in Übergangsbereichen der Spongiosa und Kortikalis vermehrt findet, könnte es sich hierbei um die von Zarrinkalam et al. beschriebene Subendplatte handeln⁽¹⁴⁵⁾. Ein Grund, warum diese Muster seltener im Femur dargestellt werden konnten, legte Hildebrand et al. nahe, der verschiedenen Regionen unterschiedliche Trabekelmorphologien zuschreibt⁽¹¹⁰⁾. Dies steht im Zusammenhang mit dem belastungsabhängigen Knochenumbau⁽¹⁵⁷⁾. Schalenartige

Trabekel scheinen besonders für den Wirbelkörper charakteristisch zu sein und dort auf einen vitalen Knochen hinzuweisen. Die in der Literatur beschriebene Umwandlung der Trabekel zu stabartigen Formationen im Zuge der Osteoporose kann durch die eigenen Untersuchungen bestätigt werden.

4.6 Abhängigkeit der Spongiosaarchitektur von der Belastung

Das Schaf ist zwar als Großtiermodell gut auf den Menschen übertragbar⁽¹²³⁾, jedoch ergeben sich Unterschiede in der Belastung der jeweiligen Knochenregion und in der Biomechanik, die sich auf den knöchernen Aufbau auswirken^(157,168). Das Schaf hat, als Quadrupede (Vierfüßer), eine andere Fortbewegungsweise als der Mensch und ist als Fluchttier diesem Verhalten auch morphologisch angepasst. Die Anatomie des Schafknochens ist entsprechend der Belastung aufgebaut und unterscheidet sich, in Abhängigkeit der einwirkenden Kräfte, von der des Menschen⁽¹⁶⁹⁾. Sowohl der spezielle spongiöse Knochenaufbau als auch die unterschiedlich starke Auswirkung der Behandlung auf die Mikroarchitektur des Knochens in den verschiedenen Regionen können darauf zurückgeführt werden.

Während das Schafsfemur große Teile des Körpergewichtes, insbesondere beim Laufen, trägt, ist der Lendenwirbelkörper ständigen Kompressions- und Scherkräften ausgesetzt⁽¹⁵⁰⁾. Funktionell stellt der Wirbelkörper eine Art „Stoßdämpfer“ dar, während das Femur als Hebel fungiert, der die Muskelarbeit in Bewegung umsetzt. Dieser ist damit aber keiner Verformung, sondern lediglich der Last und Kompression ausgesetzt. Smit et al. geht davon aus, dass in der Wirbelsäule des Schafes sogar eine höhere Spannung herrscht als in der des Menschen⁽¹⁷⁰⁾. Dabei ist in der Wirbelsäule beim Schaf nicht die Schwerkraft dafür verantwortlich, sondern die über die Muskeln des Rumpfes und Rückens ausgeübte Zugkraft. Diese Muskeln sind insbesondere für die Haltung und Stabilisierung des Rückgrates verantwortlich. Besonders für die aufrechte Haltung des relativ schweren Kopfes ist eine große muskuläre Spannung erforderlich⁽¹⁰⁹⁾. Durch diesen sogar höheren axialen Stress kommt es zu einer gesteigerten Knochendichte (BMD), da sich der Knochen an die physikalische Belastung anpasst⁽¹⁶⁹⁾. Die höhere Dichte der Wirbelkörper beim Schaf macht diese stabiler, deutet aber auch die, im Vergleich mit dem Menschen, höhere Belastung an⁽¹⁷¹⁾. Der zunehmende Verlust horizontaler Trabekel im Wirbelkörper des Menschen könnte dem fehlenden radialen Stress geschuldet sein, der sich durch den aufrechten Gang reduziert⁽¹⁷²⁾. Somit ergeben sich entsprechende Diskrepanzen im Wirbelkörper zwischen Schaf und Mensch, die aus der unterschiedlichen Anpassung resultieren.

Während sich die Humeri entsprechend der Funktion unterscheiden, lässt sich das Femur dagegen gut vergleichen. Durch die annähernd lineare Belastung des Femurs

sind die säulenartigen, wenig quervernetzten Trabekel vermutlich geringer frakturgefährdet, als dies bei einer gleichartigen vertikale Trabekulierung im Wirbelkörper der Fall wäre. Der zunehmende Abbau der Horizontaltrabekel im Zuge der Osteoporose sorgt jedoch für einen progredienten Stabilitätsverlust⁽¹⁶²⁾. Histologisch zeigt sich demnach die Anpassung des Knochens an die jeweilig auftretenden Kräfte durch Druck- und Zugtrabekel im Femur⁽⁹⁾ und durch ein stark vernetztes, geflechtartiges Muster im Wirbelkörper. Die Trabekel sind der individuellen Belastung angepasst⁽¹⁵⁷⁾ und werden erst durch die Osteoporose pathologisch verändert.

Allerdings wirkt sich die Osteoporose nicht nur über veränderte trabekuläre Parameter auf die Knochenqualität und -Stabilität, sondern auch auf die gesamte Knochenhomöostase aus. Die Belastung scheint hierbei ursächlich für die Unterschiede in den jeweiligen Knochenregionen zu sein. Die Veränderungen im Knochen sind sowohl zellulär als auch molekular gesteuert. Während es an diesem Schafsmodell weitergehende Untersuchungen zu Osteoblasten, Osteoklasten und der Proteinexpression gab, fokussiert sich die eigene Studie auf den Osteozyten als zentrales Bindeglied und Modulator der Osteoporose.

4.7 Diskrepante Morphologie der Osteozyten im Zuge der Osteoporoseinduktion und Abhängigkeit von der Lokalisation

In den eigenen qualitativen Analysen der Schnitte mittels Silber-Färbung zeigten sich deutliche zelluläre Unterschiede in den Untersuchungsregionen. Der Osteozyt stellte sich dabei keinesfalls einheitlich als sternförmige Zelle mit konstantem Volumen⁽¹⁷³⁾ dar. Vielmehr ließen sich zwei Hauptformen, nämlich spindelförmige und runde Zellen abgrenzen, deren Dendritenbaum sich deutlich voneinander unterschied. Dabei ist von einer Veränderung der Morphologie im Zuge der Osteoporose auszugehen. Statistisch stellten sich im Femur eine signifikante Abnahme der Spindelformen und eine Zunahme der Lakunen dar, wohingegen die Zahl runder Osteozyten nur leicht zunahm. Im LWK war dies deutlicher zu sehen. Histomorphometrisch konnte dies jedoch nur für den WK bestätigt werden. Auch andere Autoren zeigten histologisch, dass der Osteozyt unterschiedliche Formen in Abhängigkeit seiner Entwicklung und auch durch die Therapie aufwies^(158,174).

Junger Knochen enthielt eher rundliche Zellen mit ungeordneten Dendriten, die sich nach etwa 8 Wochen im Mausmodell zu den spindelförmigen Osteozyten mit dem geordnetem OLCS des adulten Knochens umwandelten^(158,174,175). Während vitaler Knochen typischerweise spindelförmige Zellen besaß, nahmen diese mit Intensität der Therapie ab, wohingegen vermehrt runde Osteozyten mit reduziertem Dendritenbaum dargestellt werden konnten. Von diesen verblieb beim Absterben der Zelle eine leere Lakune⁽⁶⁵⁾. Im LCM ließ sich bei den runden Osteozyten der Kern schlechter darstellen

und es fielen intrazelluläre Hohlräume auf. Somit könnte es sich um prä-apoptische Übergangsformen handeln.

Im eigenen Modell wurden Spindelformen insbesondere endostnah gefunden, während sich in zentralen Knochenbereichen plumpe Zellen mit unregelmäßigem OLCS darstellen ließen. Gleiches wurde auch von Ubaidus et al. beschrieben⁽¹⁷⁴⁾. Ebenso fiel die deutlich stärkere Vernetzung der kortikalen Zellen mit Nachbarzellen und Osteoblasten auf. Auch Ejiri et al. sieht die Spindelformen als aktive Osteozyten an. Da sich über dem perpendikulärem Dendritenverlauf spindelförmiger Osteozyten vermehrt flache Osteoblasten zeigten⁽¹⁷⁶⁾, ist von einer verstärkten Kommunikations- und regulativen Funktion auszugehen. Die sich in der Silber- und Rhodamin-Färbung zeigende geringere Dendritenzahl der zentralen Osteozyten spiegelt somit die verminderte kommunikative Rolle wider. Die Asymmetrie zwischen peripheren und zentralen Osteozyten konnte in verschiedenen Regionen beschrieben werden^(174,177). Histomorphometrisch wurde im eigenen Modell gezeigt, dass besonders im Wirbelkörper mit zunehmender Behandlung die Anzahl der Spindeln ab- und der runden Osteozyten zunahm, wodurch von einer Umwandlung auszugehen ist. Auch leere und hypermineralisierte Lakunen wurden vermehrt histologisch in den OVXDS-Gruppen nachgewiesen. Die beim Absterben des Osteozyten verbleibenden Lakunen wurden ebenso von Carpentier et al. gehäuft im osteoporotischen Knochen gefunden⁽⁶⁵⁾ und wiesen vereinzelt noch DNA-Reste darin auf⁽¹⁷⁸⁾. Daneben war das OLCS im osteoporotischen Knochenstatus vermindert exprimiert.

4.8 Interventionen beeinflussen Osteozytenzahl und Morphologie

Dass sich die Osteoporose nicht nur auf die Knochenarchitektur auswirkt, sondern auch auf die Zellmorphologie und Zellzahl, wurde durch die histomorphometrischen Ergebnisse der Silber- und Rhodamin-Färbung dargestellt. Ebenso ist der knöchernen Abbau Resultat zellulärer Prozesse zwischen Osteoklasten und Osteoblasten und wird durch den Osteozyten moduliert.

Überraschenderweise wies der spongiös deutlich besser vernetzte Wirbelkörper mit der größeren Knochenfläche histologisch und histomorphometrisch eine verminderte Zellzahl gegenüber dem Femur auf. Die Osteozytenzahl im Femur war durchschnittlich höher als im Wirbelkörper (1544,86 Ot. im Femur zu 1146,21 im LWK) und zeigte eine stärkere Reduktion der Zellen unter osteoporotischer Induktion. Bezogen auf die Knochenfläche nahm jedoch die Zellularität im Wirbelkörper zu, während sie im Femur abnahm. Dies ist durch eine stärkere Abnahme der Knochenfläche im Wirbelkörper begründet. Interessanterweise könnte dies auf den Einfluss der Belastung zurück zu führen sein. Druck wird von den Osteozyten wahrgenommen und schützt sie vor Apoptose^(3,31). Der im Wirbelkörper physiologisch vorherrschende hohe Druck⁽¹⁷⁰⁾ wirkte

sich somit protektiv auf die Zellen^(67,71) unter Steroidgabe aus, während die Knochenfläche erodiert wurde. Im Femur fehlte jedoch durch die geringere Belastung der ausreichende Schutz, sodass hier der apoptotische Einfluss der Steroide zum Tragen kam.

Auf Grund der höheren Belastung im Wirbelkörper würde man mehr Osteozyten, weniger Lakunen und vor allem spindelförmige Zellen mit gut ausgeprägten Dendriten erwarten. Die höhere Belastung müsste sich nach Smit et al. anti-apoptotisch auf die Osteozyten auswirken⁽¹⁷⁰⁾ und aktive, spindelförmige Zellen bedingen⁽⁷¹⁾. Bereits histologisch zeigte sich jedoch die niedrigere Zellularität in der Kontrollgruppe. Ein Erklärungsansatz könnte durch eine höhere metabolische Aktivität gegeben sein, sodass die regulative Funktion durch wenige, aber besser vernetzte Osteozyten übernommen würde. Weiterführende immunhistochemische Analysen, bspw. zu Osteoprotegrin oder Sclerostin, könnten darüber Aufschluss geben.

Da es histomorphometrisch ab der dualen Intervention im WK zu einer profunden Reduktion der Spindeln und zum signifikanten Anstieg der Lakunen kam, könnte daraus ebenfalls geschlossen werden, dass der Osteozyt als zentraler Drucksensor⁽³⁾ bis zu einem gewissen Grad anti-apoptotische Signale erhält. Mit zunehmender Stärke der osteoporotischen Behandlungsstrategien könnten diese jedoch aufgehoben werden. Diese These wurde auch von Komori et al. angenommen, der davon ausgeht, dass bei einer kritischen Dosis von Glukokortikoiden die Schutzfunktion des Wnt/ β -Catenin Wegs überwunden wird und in der Apoptose resultiert⁽¹⁵³⁾. Die Abnahme metabolisch aktiver Osteozyten könnte aus diesem Grund die Knochenbildung und Resorption beeinflussen, was sich durch die signifikante Abnahme der Knochenfläche unter Steroidapplikation zeigt.

Der aktive Osteozyt gilt heute auf Grund seines Netzwerks^(22,179) als zentraler Regulator der Knochenhomöostase⁽²⁷⁾. Da sowohl die Knochenfläche als auch die Zellzahl durch die Steroid-Kombination signifikant reduziert wurden, wird das osteokatabole Potential von Glukokortikoiden deutlich⁽⁹⁷⁾.

4.9 Abhängigkeit des dendritischen Netzwerks von Lage und Aktivität

Histomorphometrisch sollte die beobachtete Reduktion des OLCS mit Rhodamin-Färbung quantifiziert werden. Ähnliche Untersuchungen wurden auch durch Bozal et al. im Alveolarknochen durchgeführt⁽¹⁷⁷⁾. Die Vorteile der Konfokalmikroskopie gegenüber anderen Techniken wie bspw. dem TEM, liegen nach Bozal et al. in der Möglichkeit, größere Bereiche zu untersuchen und diese umfassender zu evaluieren. Bisher ist die genaue Rolle der zytoplasmatischen Ausläufer unklar. Sie dienen zwar zur interzellulären Kommunikation⁽⁴⁵⁾ und können darüber die Knochenhomöostase

regulieren⁽⁴¹⁾, jedoch ist weitgehend ungeklärt, welche Einflussfaktoren von ihnen bei der Osteoporose ausgehen. Gerade auch die Ausprägung des OLCS und dessen Einfluss auf den osteoporotischen Knochenumbau ist nur in geringem Maße untersucht. Der mit zunehmender Stärke der Behandlung abnehmende Quotient aus osteozytärer Fläche und Knochenfläche bedeutet, dass der Knochen weniger Dendriten des OLCS aufweist. Die Kommunikationsmöglichkeiten des Osteozyten werden hierdurch eingeschränkt. Allerdings ergeben sich hier regionale sowie behandlungsabhängige Unterschiede, sodass dies abhängig von der Region und der Belastung gesehen werden sollte. Die Verminderung des OLCS ist jedoch gut mit dem Einfluss der Steroide in Einklang zu bringen⁽¹⁸⁰⁾. Es ist anzunehmen, dass Steroide neben dem Einfluss auf die Lebenszeit der Osteozyten auch das Netzwerk beeinträchtigen. Ebenso konnte beschrieben werden, dass es sich beim OLCS nicht um ein konstantes System handelt, sondern, dass auch die Dendriten umgebaut werden können⁽⁴⁴⁾. Ein direkter Einfluss von Steroiden auf dendritenregulierende Proteine wie E11^(43,44) oder deren Expression ist bis dato nicht beschrieben aber anzunehmen.

In der Literatur wurden daneben positive Zusammenhänge zwischen dem Alter der Tiere und der Kanalikulanzahl gefunden⁽¹⁸¹⁾. Diese Ergebnisse wurden auch von Beno et al.⁽³⁰⁾, Holmbeck et al.⁽³⁴⁾ und Okada et al.⁽⁴⁶⁾ bestätigt. Eben dies würde implizieren, dass auch ältere Osteozyten vermehrt Kanalikuli exprimieren müssten. Ältere Osteozyten finden sich insbesondere in zentralen Knochenbereichen, da diese vermehrt eingemauert sind. Die eigenen Analysen zeigten jedoch, dass das dendritische Netzwerk hier eher spärlich ausgebildet war. Auch Bozal et al.⁽¹⁷⁷⁾ und Ejiri et al.⁽¹⁷⁶⁾ beschrieben unterschiedlich stark ausgeprägte OLCS, abhängig von der Zellform und der Region. In stärker belasteten Zonen stellten sich spindelförmige Zellen mit komplexerem Dendritenwerk dar, zentrale Zellen bildeten daneben ein irreguläres und vermindertes OLCS aus⁽¹⁷⁶⁾. Die eigenen Untersuchungsergebnisse werden somit durch diese Autoren gestützt.

Ein möglicher Grund für die mangelnde Signifikanz der histomorphometrischen Ergebnisse der OLCS-Messungen könnte im Anschnitt und in der Darstellbarkeit der Dendriten begründet sein. Daneben ist die Vermessung des OLCS vielen Störfaktoren unterlegen, die nur teilweise ausgeschaltet werden konnten.

Ebenso wirkt sich der Calciumspiegel auf die peridendritischen Knochenkanälchen aus. Dieser Vorgang wurde von Qing und Bonewald⁽⁶⁴⁾ dargestellt und von Bélanger⁽⁵⁹⁾ als osteozytäre Osteolyse bezeichnet. Calciummangel führt zur Resorption des perizellulären Knochens durch den Osteozyten, wodurch sich die Lakunen und die Kanalikulifläche vergrößern. Somit müssten ab Stufe der dualen Intervention vergrößerte Kanälchen in der Silber-Färbung vorliegen. Einen Einfluss auf die Rhodamindiffusion und die gemessene Osteozytenfläche ist daneben nicht sicher auszuschließen.

Die gezeigte Veränderung des OLCS deutet aber auf eine Beeinflussung des Osteozyten durch die Osteoporose hin. Die verwendete Methode stellt dabei eine innovative Forschungsmethode dar, die großflächigere Analysen ermöglicht.

4.10 Terminale dendritische Auftreibungen könnten dysfunktionales Kommunikationssystem widerspiegeln

Kerschnitzki et al. beschrieb im OLCS einen perpendikulären Dendritenverlauf, der zur Knochenoberfläche hin orientiert sei. Er schloss daraus, dass das Netzwerk die Matrixorganisation widerspiegeln^(43,182). Ein solcher Dendritenverlauf fand sich gehäuft im eigenen Modell bei Osteozyten des Beckenkamms und Femurs. Dabei zeigte sich ein linear mit dem Osteozyten orientierter Hauptdendrit, aus dem radiäre Dendriten entsprangen, die parallel dem Endost zustrebten. Diese charakteristische Struktur wurde als „Flaschenbürste“ bezeichnet und stellte sich vermehrt bei Schafen der Kontrollgruppe dar (Abb. 8d, S. 41).

Ebenso kehrten die Dendriten an Kittlinien um oder brachen ab⁽¹⁸²⁾. Dabei fanden sich häufig terminale Auftreibungen der Dendriten (Humps). Gerade in den höheren Interventionszweigen traten sie vermehrt hervor. Besonders prominent waren sie an Kittlinien ausgeprägt (Abb. 36a, OVXDSa, S. 79). Somit kann diskutiert werden, ob ihr Auftreten mit Steroiden assoziiert ist und ob sie ein infunktionelles Netzwerk darstellen.

Da die Dendriten die Osteozyten miteinander vernetzen, als Drucksensor⁽⁵¹⁾ dienen und auch Knochenbildung und -abbau⁽⁷¹⁾ beeinflussen können, ist ein möglicher Einfluss auf die Pathogenese der Osteoporose gegeben. Dies würde im Einklang mit Kerschnitzkis Schlussfolgerung stehen⁽⁴³⁾. Es ist jedoch auch denkbar, dass es sich bei den terminalen Verdickungen um synapsenartige Strukturen, ähnlich der der prä- und postsynaptischen Endigung von Neuronen handelt. Dem würde allerdings das verstärkte Auftreten solcher Auftreibungen an Kittlinien entgegenstehen. Da Kittlinien Grundlage anderer Mineralisationslinien mit abweichender Orientierung sind, ist eine Kommunikation über diese eher unwahrscheinlich. Mögliche Hinweise könnte die immunhistochemische Untersuchung auf Connexin 43 darstellen, das zur Kommunikation der Osteozyten bedeutsam ist⁽⁴⁵⁾. Eine verminderte Vernetzung würde mit einer reduzierten Kommunikationsfunktion einhergehen und sich auf die Knochenhomöostase auswirken.

4.11 Zusammenhang des Netzwerks mit der Knochenhomöostase

Da über die Kanalikuli der Knochenstoffwechsel beeinflusst wird, können kanalikulireiche Osteozyten besonders aktiv in die Regulation eingreifen. Dies würde erklären, warum gerade kortikalere Osteozyten spindelförmige, dendritenreiche

Morphologien besaßen, sich im zentralen Knochenanteil abrundeten und die Dendritenzahl reduzierten. Daneben scheint ein Zusammenhang zwischen dem kanalikulären Netzwerk, dem Aktivitätszustand des Knochens⁽⁴⁶⁾ und der Knochenqualität zu bestehen⁽¹⁸³⁾. Der Schweregrad der Osteoporose spiegelt sich nach Knothe et al. an der Vernetzung der Osteozyten wider, wobei im Endstadium ein vermindertes und irreguläres OLCS verbleibt⁽¹⁵⁹⁾. Seeman et al. sieht dabei einen Beeinflussungsfaktor der Knochenqualität durch das OLCS⁽¹⁸³⁾. Diese These lässt sich mit den Funktionen des Netzwerks unter anderem für die Kommunikation und Regulation der Knochenformation in Einklang bringen.

Die genaue Rolle des Netzwerks als Weg der Aktivierung oder Hemmung der Knochenbildung bleibt weiterhin unklar. Einige Autoren sehen eher die Hemmung im Vordergrund^(48,179), während andere dem Netzwerk einen aktivierenden Einfluss zuschreiben^(47,182). Die eigenen Analysen zeigten die Reduktion des Netzwerks im Zuge des osteoporotischen Knochenumbaus auf und weisen darauf hin, dass osteoanabole Signale über das Netzwerk vermittelt werden. Durch Wegfall der Signale kommt es zur vermehrten Osteoklastenaktivierung und Knochenresorption. Auch die Beziehung zwischen dem Tod der Osteozyten und der Osteoporose bleibt unklar. Einige Autoren gehen davon aus, dass gerade Mikrofrakturen im Osteozytennetzwerk zur Apoptose führen^(68,69). Es wurde daneben nachgewiesen, dass durch Mikrofrakturen die Freisetzung von sRANKL gesteigert wird⁽¹⁸⁴⁾ und daraus eine verstärkte Knochenresorption resultierte. Chen et al. sieht wiederum den Anlass für neue Mikrofrakturen in der Osteoporose, die sich somit auf das Netzwerk und auf die Knochenqualität auswirkt⁽¹⁸⁵⁾. Es resultiere eine Beeinflussung der Knochenstärke, die sich durch ein abnehmendes BMD ermitteln ließe⁽¹⁸⁶⁾.

Ein Zusammenhang der Osteoporose mit der Ausprägung des Netzwerks kann daher postuliert werden, da die Reduktion mit verminderter Regulationsmöglichkeit der Osteozyten einhergeht. Da die Apoptose des Osteozyten aus einer Zerstörung des Netzwerks resultieren kann, der Abbau des OLCS aber auch konsekutiv mit dem Tod der Osteozyten verbunden ist und somit dessen regulative Funktion erlischt, ist die Osteoporose als Folge einer multifaktoriellen Dysregulation der Knochenhomöostase anzusehen.

4.12 Einfluss der Tripleinduktion auf Osteozyten resultiert in verstärkter Ausbildung von Lakunen

Die Zunahme der Lakunen unter der osteoporosedinduktiven Behandlung stützt die These, dass sie Überreste post-apoptotischer Osteozyten sind. Nach Abrundung und Reduktion der Dendriten bei der Apoptose scheinen die Osteozyten eine leere Lakune

zu hinterlassen. Diese kann, ebenso wie die Kanalikuli, remineralisiert werden (Mikropetrose)⁽⁶⁵⁾. Gerade unter Steroidgabe ließen sich transelektronenmikroskopisch typische Charakteristika für apoptotische Osteozyten vermehrt finden⁽¹⁸⁷⁾. Im Mausmodell stieg die Zahl leerer Lakunen bei Steroidbehandlung an⁽¹⁸⁸⁾. Daneben können Steroide zur Osteonekrose führen^(67,180).

Histologisch zeigten sich bei der Analyse die Lakunen vermehrt in morphogenetisch älteren, zentralen Knochenbereichen. Ein höheres Lebensalter (mit älteren Osteozyten) scheint daneben mit einer höheren Anzahl leerer Lakunen einherzugehen^(189–191). Zu diesem Schluss kam auch Knothe et al., der einen erhöhten Anteil von toten Osteozyten im senilen Knochen fand (1 % bei Geburt versus 75 % mit 80 Jahren)⁽¹⁵⁹⁾. Mullender et al. fand in altem Knochen zwar weder einen höheren Anteil toter Osteozyten noch eine reduzierte Zellzahl, dafür aber mehr leere Lakunen⁽¹⁹²⁾. Somit können positive Korrelationen zwischen dem Lebensalter und leeren Lakunen gezogen werden^(58,179,193). Die erhöhte Anzahl an Lakunen führt zu erhöhter Porosität des Knochens und könnte mit einem Stabilitätsverlust einher gehen⁽¹¹³⁾.

Es ist davon auszugehen, dass jede Zunahme der Lakunengröße oder deren Anzahl zu einer Schwächung des Knochens und somit zur Steigerung der Frakturgefährdung beiträgt. Ebenso ist anzunehmen, dass sich die Mechanosensorik dadurch verändert, da die Lakune am Signalgeneratorpotential mitwirkt⁽⁵⁷⁾. Besonders im osteoporotischen Knochen wurden vermehrt auch hypermineralisierte Lakunen gefunden⁽⁶⁵⁾, was am eigenen Modell in der OVXDS-Gruppe beider Regionen dargestellt werden konnte. Von hypermineralisierten Lakunen geht somit aber kein positiver Effekt auf die Knochenstatik aus, sondern es kommt zu geringerer Flexibilität und erhöhter Frakturgefährdung. Interessanter Weise ergaben sich regionale Unterschiede für das Vorliegen der leeren Lakunen. Im Femur korrelierten sie mit dem Alter, jedoch nicht im Wirbelkörper⁽¹⁹¹⁾. Dies führte Dunstan et al. auf einen gesteigerten Knochenumsatz im Wirbelkörper zurück⁽¹⁹¹⁾. Die erhöhte Belastung im Wirbelkörper und die davon ausgehende osteoprotektive Wirkung lassen sich damit in Verbindung bringen.

Die eigenen Ergebnisse stehen weitgehend im Einklang mit der Literatur und erweitern sie zur Rolle und Expression des OLCS bei der Osteoporose. Die Morphologie aktiver Osteozyten scheint im vitalen Knochen spindelförmig zu sein. Der gut ausgebaute (perpendikuläre) Dendritenbaum spiegelt die kommunikative und protektive Funktion wider⁽¹⁷⁶⁾ und untermauert die Hypothese, dass es sich bei spindelförmigen Zellen um aktive Osteozyten handelt. Die Umwandlung der Zelle wäre das morphologische Korrelat des Funktionsverlustes eines Osteozyten. Die steigende Zahl an Lakunen verdeutlicht daneben die apoptotische Wirkung⁽¹⁸⁰⁾ der Steroide. Auch die ohnehin reduzierte Knochenstatik wird durch die zunehmende Zahl leerer Lakunen progredient verschlechtert, was die Frakturgefährdung erhöht.

4.13 Limitationen der eigenen Methodik

Der Vorteil der deskriptiven Histologie gegenüber anderen Methoden besteht darin, auch komplexe Prozesse beschreiben zu können. Daneben ist es ein kostengünstiges und einfaches Verfahren, an das sich weitere Analysen gut anschließen lassen. Die Objektivierbarkeit und Reproduzierbarkeit müssen durch ein entsprechendes Analysedesign ermöglicht werden. Dazu wurde sowohl das Spongiosa- als auch das zelluläre Gradingssystem eingeführt. Inhaltlich beziehen sie sich auf Variablen aus früheren Studien und Literaturergebnissen^(145,158,176), wurden aber in dieser Form noch nicht beschrieben. Eine weitere Objektivierungsmöglichkeit wird durch die sich anschließenden statistischen Häufigkeitsanalysen der einzelnen Merkmale gegeben.

Eine Verblindung konnte auf Grund des Analysedesigns mit dem Vergleich der Schnitte zur Kontrollgruppe nicht erfolgen, jedoch wurden einige Schnitte (Beckenkammstanzen und Femora) durch mehrere Untersucher ausgewertet. Auch andere Studien verwendeten ein vergleichbares Design⁽¹⁹⁴⁾. Ergänzend und vertiefend kann die Histomorphometrie an die deskriptiven Analysen angeschlossen werden und diese objektivieren. Auch letztere unterliegt bestimmten Einflussfaktoren mit möglichen Fehlerquellen. Diese können in untersucherabhängig und -unabhängig unterteilt werden und müssen für die Analyse berücksichtigt werden^(192,195,196).

Mögliche Störfaktoren, wie zum Beispiel eine Subjektivität bei der Auswahl des Bildausschnittes oder die Präzision bei der Erfassung der Variablen wie bspw. der Knochenfläche oder Osteozytenzahl, wurden durch Randomisierung und präzises Arbeiten versucht auszuschalten. Daneben erfolgten Nachkontrollen. Des Weiteren war es zum Teil erforderlich, die semi-automatische Knochenflächenmessung von ImageJ zu korrigieren, falls die Fläche falsch niedrig erfasst wurde (Abb. 50a/ b S. 133). Auf Grund der Einflussfaktoren ist jedoch von gewissen untersucherabhängigen Unterschieden auszugehen⁽¹⁹²⁾. Ferner könnten sich auch interindividuelle Variationen der Schafe sowie das unterschiedliche Alter der Tiere auf die Ergebnisse auswirken. Spontane Schwankungen des Knochenhaushaltes^(197,198) wurden deshalb durch die Wahl des Merino-Landschafts minimiert⁽¹²³⁾.

Die Osteozyten histologisch als apoptotisch oder prä-apoptotisch zu definieren, ist mit den verwendeten Untersuchungen allerdings nicht sicher möglich. Nach Kerr et al. ^(199,200) zeigen apoptotische Zellen histologisch eine deutliche Kondensation des Chromatins, zytoplasmatische Fragmente sowie intra- und extrazelluläre Chromatinfragmente („Mikronuklei“). Da sowohl die apoptotischen Zellen und die Apoptosekörperchen für nur einen geringen Zeitraum darstellbar und im Gewebe inhomogen verteilt sind, ist die Abgrenzung und Unterscheidung schwierig. Für zukünftige Studien wäre es interessant, Färbungen für tote Osteozyten zu wählen, um diese darzustellen und die Veränderungen

der Osteoporose zu erfassen. Dazu könnten prinzipiell Färbungen wie Annexin V, DAPI oder TUNEL^(187,201) sowie andere Untersuchungsmethoden, zum Beispiel die TEM-Mikroskopie verwendet werden⁽¹⁸⁷⁾. Auf Grund der eingeschränkten Auswertbarkeit der TUNEL-Färbung im Knochen wurde diese allerdings zurückgestellt.

Daneben wirkt sich die Färbung und die exakte Knochendicke auf die Analysegenauigkeit aus. Das zeigte sich unter anderem durch den Unterschied der Rhodaminschliffe von den Schnitten, wodurch sich vermutlich nicht signifikante Ergebnisse ergaben. Eine nachfolgende Analyse über eine „Trainable Weka Segmentation“ mittels ImageJ könnte die Mikropartikelanalyse weitergehend ergänzen⁽²⁰²⁾. Daneben stellt die Vermessung des OLCS immer noch ein Problem dar, sodass nur wenige Studien^(158,174,175) dazu existieren. Die gebräuchlichen Verfahren, wie bspw. die Auflösung des in Resin eingebetteten Knochens mittels Säure zur Freilegung des OLCS und anschließender elektronenmikroskopischer Analyse, ist durch eine geringe Untersuchungsfläche limitiert. Die Vermessung mittels LCM und Mikropartikelanalyse stellt ein neuartiges und innovatives Verfahren dar, das jedoch durch weitere 3D-Messungen, wie den „Z-Stack“^(203,204) ergänzt werden kann. Untersuchungen am ovinen Knochen wurden durch Kerschnitzki et al. beschrieben⁽¹⁸²⁾. Die Analyse der OLCS Fläche im osteoporotischen Knochen ist bisher jedoch nicht untersucht worden.

Um Störfaktoren zu minimieren, wurde versucht die Anzahl der Schnitte groß zu halten und die untersucherabhängigen Fehler durch Randomisierung, mehrere Untersucher und Gegenkontrollen auszuschließen.

4.14 Das Schafsmodell als Großtiermodell der Osteoporose

Aufgrund der skelettalen Nähe zum Menschen lassen sich am Schafsmodell vergleichbare Aussagen über die Pathophysiologie der Osteoporose treffen. Darauf aufbauend können weitere experimentelle Untersuchungen, wie das Einbringen von osteosynthetischen Materialien oder Studien zur Frakturheilung, durchgeführt werden. Gerade für orthopädische Studien werden sie als Großtiermodell bevorzugt eingesetzt⁽¹¹¹⁾. Die im Schafsmodell gewonnenen Ergebnisse stellen ein Teilergebnis im Frakturheilungsmodell und zum Verständnis der Osteoporose dar.

Allerdings unterliegt der Knochen des Schafes vielen Einflussfaktoren, wie zum Beispiel jahreszeitlichen Schwankungen des BMD. Der BMD ist im Winter erniedrigt^(197,198), wobei dies nicht für die hier gewählte Merino-Rasse gilt⁽¹²³⁾. Das gewählte Multi-Interventions-Modell diene laut Zarrinkalam et al. der Erzeugung eines raschen Knochenverlusts, spiegle aber nicht gänzlich einen postmenopausalen oder steroid-induzierten osteoporotischen Zustand im Menschen wider⁽¹²³⁾.

Zu beachtende Unterschiede am Schafsmodell ergeben sich für die biomechanische Testung. Aerssens et al. stellte dar, dass sich Schaf und Mensch im Knochengewicht, dem BMD (Mensch 178, Schaf 437 mg/cm³) und in der Widerstandsfähigkeit des Knochens unterscheiden⁽¹⁶⁸⁾. Ebenso ist zu bedenken, dass der Schafsknochen eine andere Morphologie⁽¹⁶⁸⁾ besitzt. Die aus der Anatomie des Schafes resultierende Belastung spiegelt sich im höheren BMD wider^(157,172). Für die eigenen Untersuchungen ist dieser Punkt zwar zu vernachlässigen, jedoch wird die Übertragbarkeit auf den humanen Knochen dadurch reduziert.

Der Knochenverlust lässt sich beim Schaf gut an den Wirbelkörpern und Femora untersuchen, wobei das Knochen-Turnover durch eine starke Reduktion des BMD angezeigt wird⁽⁸⁾. Die Nutzung des Wirbelkörpers zur Untersuchung der Osteoporose wurde durch Tavakoli et al. empfohlen. Demnach sollten insbesondere der Lumbalwirbelkörper L2 oder L3 verwendet werden, da hier kaum Unterschiede zum menschlichen Wirbelkörper vorlagen. Allerdings könne auch L4 herangezogen werden, wobei sich dieser durch einen höheren BMD von postmenopausalen Frauen unterscheidet⁽²⁰⁵⁾. Auf Grund der klinischen Relevanz und erhöhter Frakturhäufigkeit in den unteren Lendenwirbelkörpern und den Femora wurde sich in dieser Arbeit für die Analyse LWK4 und der Femurregion entschieden. Des Weiteren liegen vergleichbare Studien vor, mit denen die eigenen Ergebnisse verglichen werden können.

Der Erfolg des Schafsmodells hängt nach Reinwald und Burr et al. insbesondere von einer sorgsamem Versuchsplanung ab, um physiologische Einflussfaktoren auszuschließen und den Behandlungen eine ausreichend lange Einwirkzeit zu geben⁽¹¹¹⁾. Im verwendeten Schafsmodell wurden alle Proben zur selben Zeit entnommen. Somit werden jahreszeitliche Schwankungen der Knochendichte ausgeschlossen. Durch die Wahl der Schafe im durchschnittlichen Alter von 5,5 Jahren kann ein ausgereiftes Skelett vorausgesetzt werden. Jedoch ist bei den älteren Tieren im Alter von 9 Jahren ein Verzerrungspotential möglich. Durch eine ausreichende Anzahl an Versuchstieren und das entsprechende Studiendesign wurde beabsichtigt dem entgegen zu wirken. Durch die Beckenkambbiopsien kann daneben die Entwicklung des Knochenverlusts im Verlauf beobachtet werden.

Es lässt sich also folgern, dass das Schaf im Vergleich verschiedener Großtiermodelle dem Menschen in vielen Prozessen sehr nahe kommt⁽²⁰⁶⁾. Die Osteoporose lässt sich deshalb erfolgreich am Schafsmodell untersuchen. Allerdings müssen im Hinblick auf die Übertragbarkeit Abstriche gemacht werden und spätere Ergebnisse mit klinischer Anwendung durch klinische Studien am Menschen evaluiert werden.

5 Zusammenfassung/ Summary

Die systemische Skeletterkrankung Osteoporose führt zu einem gesteigerten Knochenabbau und einer daraus resultierenden erhöhten Frakturgefahr. Auf Grund der zunehmenden Prävalenz der Erkrankung in den Industrieländern besitzt die Grundlagenforschung zur Pathogenese für die Prävention, Diagnostik und Behandlung eine besondere Bedeutung.

Ziel der Dissertationsarbeit war es, die Veränderungen des Knochens und der Osteozyten, die als Dirigenten des Knochenstoffwechsels angesehen werden können, im Zuge der Osteoporose zu analysieren

Für die experimentelle Studie wurden 32 weibliche Merinolandschafe in vier Gruppen aufgeteilt: 1) unbehandelte Kontrolle, 2) bilaterale Ovariectomie (OVX), 3) OVX und Calcium- sowie Vitamin-D-arme Diät (OVXD) und 4) OVX, Diät und Steroidinjektionen (OVXDS). Nach acht Monaten wurden die Tiere euthanasiert und das Femur sowie der LWK4 entnommen.

Mit Hilfe von histologischen und neuen histomorphometrischen Untersuchungsmethoden wurde gezeigt, dass es zur Abnahme der spongiösen Knochenfläche kommt und dass das „Turnover-Modell“ des Knochens modifiziert werden sollte. Gesunder Knochen weist eher schalenartiges als plattenartiges, Trabekelwerk auf, das sich zu stabförmigen Bälkchen umwandelt. Auf Grund unterschiedlicher Belastung des Knochens in verschiedenen Regionen wirkt sich diese sowohl auf den Spongiosaaufbau, die Osteozyten als auch auf den Ausprägungsgrad der Osteoporose aus. Die reduzierte Osteozytenzahl, die steigende Zahl sphärischer Formen und Lakunen im Zuge der Osteoporose deutet die Umwandlung und Apoptose des Osteozyten an. Eine signifikante Reduktion der spindelförmigen Zellen und des dendritischen Netzwerks konnte histomorphometrisch nicht gefunden werden. Allerdings legen histologische Schnitte dies nahe und es bedarf der weitergehenden Analyse mit modifizierten Untersuchungsmethoden.

Histologisch konnten Veränderungen des osteozytären lakunokanalikulären System (OLCS) beschrieben werden, dessen Ausprägung stark von der Osteoporose beeinflusst zu werden scheint. Die Veränderungen des dendritischen Netzwerks könnten somit den Funktionsverlust des Osteozyten in der Osteoporose widerspiegeln. Eine wechselseitige Beziehung zwischen Mikrofrakturen im Netzwerk, dem Tod des Osteozyten und der gesteigerten Knochenresorption ist anzunehmen. Die geringe Datenlage zu Veränderungen des dendritischen Netzwerks im osteoporotischen Knochen kann durch die Forschungsergebnisse erweitert werden.

Die eigenen Untersuchungsergebnisse untermauern die neuen Erkenntnisse zur Rolle des Osteozyten und decken sich weitgehend mit der Fachliteratur. Für die Praxis muss der Einsatz von Glukokortikosteroiden kritisch diskutiert und entsprechende knochenschützende Maßnahmen ergriffen werden. Da sich Belastung anti-apoptisch auf den Osteozyten auswirkt, kommt besonders der Mobilisation älterer Patienten sowie der ausgewogenen Beanspruchung des Knochens in der Jugend und der davon beeinflussten „peak-bone-mass“ eine große Bedeutung zu.

Daneben wurde gezeigt, dass das Schaf als Großtiermodell der Osteoporose dienen kann. Durch die vielen Homologien mit dem Menschen kann es gut zur histologischen Evaluation und zur Untersuchung der Zellularität herangezogen werden. Auch Biomaterialien und Implantate können am Schafmodell auf Grund der Größe besser getestet werden.

Summary

The systemic bone disease osteoporosis leads to an increased bone turnover and results in an extended fracture risk. Due to the growing prevalence of the disease in the industrial countries, research of its pathogenesis is fundamental for the prevention, diagnostic and treatment. Since the dogma of osteocytes as dormant, inactive bystanders embedded in bone matrix has fundamentally changed, the dissertation focusses on the analysis of changes in bone status as well as the morphological osteocyte transformation during osteoporotic turnover.

For this experimental study 32 female merino sheep were divided into four groups: 1) untreated control group, 2) bilaterally ovariectomized group (OVX), 3) OVX + calcium and vitamin-D deficient diet group (OVXD), 4) OVX+ diet+ steroid injection group (OVXDS). After eight months, the animals were euthanized and samples of the femur and fourth lumbar vertebral body were taken.

Histological and histomorphometrical methods have shown, that osteoporosis leads to a reduction of bone mass. Furthermore, results indicated that the initial bone transformation model should be adjusted. The varying load on bone in different locations influences the cancellous bone structure, osteocytes and thusly the manifestation of osteoporosis. Morphological osteocyte transformation is characterized by reduced numbers of osteocytes, increased numbers of spherical morphologies and empty lacunae. A reduction of spindle-shaped cells and a loss of the dendritic network could not be determined. However, histological findings implicate such changes. Hence, further advanced analysis with different modified methods are needed. Furthermore, histological analysis has shown that the osteocytic lacunar-canalicular system (OLCS) is strongly affected by osteoporosis. Thus, changes of the dendritic network could reflect the loss of function of osteocytes in the pathophysiology of osteoporosis. In addition, a reciprocal relationship between microfractures of the network, the death of osteocytes and the osteoporotic turnover could be assumed. On the basis of the presented findings of this study, the limited data on changes in the dendritic network in osteoporotic bone can be extended.

The collected data strongly support recent insights reported in literature on the role of the osteocyte. Based on the results, medical use of glucocorticoids has to be considered carefully. In case of steroid therapy, appropriate bone protective treatments should be undertaken. Due to the osteoprotective effect of loaded to bone, the impact of physiological mobilization of aging people as well as strain on bone in the adolescence has to be considered important.

Finally, it could be demonstrated that sheep can be used as large animal model for osteoporosis. Due to many homologies with human bone, use of the osteoporotic sheep model can be recommended for research of osteoporosis and testing of biomaterials an implants.

6 Literaturverzeichnis

1. Hernlund E, Svedbom A, Ivergard M, et al. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos*. 2013;8:136.
2. Häussler B, Gothe H, Mangiapane S, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D. Versorgung von Osteoporose-Patienten in Deutschland: Ergebnisse der BoneEVA-Studie. *Deutsches Ärzteblatt* 2006; 103(39): A-2542 / B-2199 / C-2120. 2006.
3. Bonewald LF. Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *Bonekey Osteovision*. 2006;3(10):7–15.
4. Kamel MA, Picconi JL, Lara-Castillo N, Johnson ML. Activation of β -catenin signaling in MLO-Y4 osteocytic cells versus 2T3 osteoblastic cells by fluid flow shear stress and PGE2: Implications for the study of mechanosensation in bone. *Bone*. 2010;47(5):872–81.
5. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat. Med*. 2011;17(10):1231–4.
6. Noble BS, Reeve J. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;159(1-2):7–13.
7. Häussler B, Gothe H, Göl D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D. Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. *Osteoporos Int*. 2007;18(1):77–84.
8. Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2005;16 Suppl 2:S129-38.
9. Schulte E, Schumacher U, Schünke M, Voll M, Wesker K. *Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem: 182 Tabellen*. 2nd ed. Prometheus : LernAtlas der Anatomie / Michael Schünke. Vol. 1. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2007.
10. Lazar L, Phillip M. Pubertal disorders and bone maturation. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am*. 2012;41(4):805–25.
11. Aumüller G. *Anatomie*. 2nd ed. Duale Reihe. Stuttgart: Thieme; 2010.
12. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie: Histologie- ganz nah dran!* 2nd ed.; 2006.
13. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3 Suppl 3:S131-9.
14. Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater*. 2008;15:53–76.
15. Schiebler TH. *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs*. 9th ed. Heidelberg: Springer; 2005.
16. Boskey AL. Matrix proteins and mineralization: an overview. *Connect. Tissue Res*. 1996;35(1-4):357–63.
17. Landis WJ. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone*. 1995;16(5):533–44.
18. Fratzl P, Fratzl-Zelman N, Klaushofer K, Vogl G, Koller K. Nucleation and growth of mineral crystals in bone studied by small-angle X-ray scattering. *Calcif Tissue Int*. 1991;48(6):407–13.
19. Feng JQ, Ward LM, Liu S, et al. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat. Genet*. 2006;38(11):1310–5.
20. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997;89(5):747–54.
21. Karsenty G. Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:183–96.

22. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J. Bone Miner. Res.* 1998;13(5):793–802.
23. Ducy P, Desbois C, Boyce B, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature.* 1996;382(6590):448–52.
24. Frick P, editor. *Blut- und Knochenmarksmorphologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2003.
25. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J. Cell. Biochem.* 1994;55(3):273–86.
26. Parfitt AM, Mundy GR, Roodman GD, Hughes DE, Boyce BF. A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. *J. Bone Miner. Res.* 1996;11(2):150–9.
27. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J. Bone Miner. Res.* 2011;26(2):229–38.
28. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone.* 2008;42(4):606–15.
29. Marotti G, Ferretti M, Remaggi F, Palumbo C. Quantitative evaluation on osteocyte canalicular density in human secondary osteons. *Bone.* 1995;16(1):125–8.
30. Beno T, Yoon Y-J, Cowin SC, Fritton SP. Estimation of bone permeability using accurate microstructural measurements. *J Biomech.* 2006;39(13):2378–87.
31. Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, et al. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab.* 2007;5(6):464–75.
32. Imai S, Heino TJ, Hienola A, et al. Osteocyte-derived HB-GAM (pleiotrophin) is associated with bone formation and mechanical loading. *Bone.* 2009;44(5):785–94.
33. Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, et al. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J. Bone Miner. Res.* 2000;15(4):663–73.
34. Holmbeck K, Bianco P, Pidoux I, et al. The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *J. Cell. Sci.* 2005;118(Pt 1):147–56.
35. Poole, Kenneth E S, van Bezooijen, Rutger L, Loveridge N, et al. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J.* 2005;19(13):1842–4.
36. Seitz S, Rendenbach C, Barvencik F, et al. Retinol deprivation partially rescues the skeletal mineralization defects of Phex-deficient Hyp mice. *Bone.* 2013;53(1):231–8.
37. Feng JQ, Huang H, Lu Y, et al. The Dentin matrix protein 1 (Dmp1) is specifically expressed in mineralized, but not soft, tissues during development. *J. Dent. Res.* 2003;82(10):776–80.
38. Robling AG, Niziolek PJ, Baldridge LA, et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J. Biol. Chem.* 2008;283(9):5866–75.
39. Miyamoto K-i, Ito M, Kuwahata M, Kato S, Segawa H. Inhibition of intestinal sodium-dependent inorganic phosphate transport by fibroblast growth factor 23. *Ther Apher Dial.* 2005;9(4):331–5.
40. Gattineni J, Bates C, Twombly K, et al. FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2009;297(2):F282–91.
41. Tanaka-Kamioka K, Kamioka H, Ris H, Lim SS. Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. *J. Bone Miner. Res.* 1998;13(10):1555–68.
42. Kamioka H, Sugawara Y, Honjo T, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. Terminal differentiation of osteoblasts to osteocytes is accompanied by dramatic changes in the distribution of actin-binding proteins. *J. Bone Miner. Res.* 2004;19(3):471–8.
43. Kerschnitzki M, Wagermaier W, Roschger P, et al. The organization of the osteocyte network mirrors the extracellular matrix orientation in bone. *J. Struct. Biol.* 2011;173(2):303–11.

44. Zhang K, Barragan-Adjemian C, Ye L, et al. E11/gp38 selective expression in osteocytes: regulation by mechanical strain and role in dendrite elongation. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26(12):4539–52.
45. Doty SB. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int.* 1981;33(5):509–12.
46. Okada S, Yoshida S, Ashrafi SH, Schraufnagel DE. The canalicular structure of compact bone in the rat at different ages. *Microsc. Microanal.* 2002;8(2):104–15.
47. Bivi N, Condon KW, Allen MR, et al. Cell autonomous requirement of connexin 43 for osteocyte survival: consequences for endocortical resorption and periosteal bone formation. *J. Bone Miner. Res.* 2012;27(2):374–89.
48. Moriishi T, Fukuyama R, Ito M, et al. Osteocyte network; a negative regulatory system for bone mass augmented by the induction of Rankl in osteoblasts and Sost in osteocytes at unloading. *PLoS ONE.* 2012;7(6):e40143.
49. Dodd JS, Raleigh JA, Gross TS. Osteocyte hypoxia: a novel mechanotransduction pathway. *Am. J. Physiol.* 1999;277(3 Pt 1):C598-602.
50. Vatsa A, Semeins CM, Smit TH, Klein-Nulend J. Paxillin localisation in osteocytes--is it determined by the direction of loading? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;377(4):1019–24.
51. Cowin SC, Weinbaum S, Zeng Y. A case for bone canaliculi as the anatomical site of strain generated potentials. *J Biomech.* 1995;28(11):1281–97.
52. You J, Yellowley CE, Donahue HJ, Zhang Y, Chen Q, Jacobs CR. Substrate deformation levels associated with routine physical activity are less stimulatory to bone cells relative to loading-induced oscillatory fluid flow. *J Biomech Eng.* 2000;122(4):387–93.
53. Xiao Z, Zhang S, Mahlios J, et al. Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *J. Biol. Chem.* 2006;281(41):30884–95.
54. Adachi T, Aonuma Y, Tanaka M, Hojo M, Takano-Yamamoto T, Kamioka H. Calcium response in single osteocytes to locally applied mechanical stimulus: differences in cell process and cell body. *J Biomech.* 2009;42(12):1989–95.
55. Vatsa A, Mizuno D, Smit TH, Schmidt CF, MacKintosh FC, Klein-Nulend J. Bio imaging of intracellular NO production in single bone cells after mechanical stimulation. *J. Bone Miner. Res.* 2006;21(11):1722–8.
56. Wang Y, McNamara LM, Schaffler MB, Weinbaum S. A model for the role of integrins in flow induced mechanotransduction in osteocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007;104(40):15941–6.
57. Bonivitch AR, Bonewald LF, Nicoletta DP. Tissue strain amplification at the osteocyte lacuna: a microstructural finite element analysis. *J Biomech.* 2007;40(10):2199–206.
58. Atkins GJ, Findlay DM. Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take. *Osteoporos Int.* 2012;23(8):2067–79.
59. Bélanger LF. Osteocytic osteolysis. *Calcif Tissue Res.* 1969;4(1):1–12.
60. Bélanger LF, ROBICHON J. Parathormone-induced osteolysis in dogs. Radiographic and alphanradiographic survey. *J Bone Joint Surg Am.* 1964;46:1008–12.
61. Zamboni Zallone A, Teti A, Primavera MV, Pace G. Mature osteocytes behaviour in a repletion period: the occurrence of osteoplastic activity. *Basic Appl Histochem.* 1983;27(3):191–204.
62. Nakano Y, Toyosawa S, Takano Y. Eccentric localization of osteocytes expressing enzymatic activities, protein, and mRNA signals for type 5 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). *J Histochem Cytochem.* 2004;52(11):1475–82.
63. Tazawa K, Hoshi K, Kawamoto S, Tanaka M, Ejiri S, Ozawa H. Osteocytic osteolysis observed in rats to which parathyroid hormone was continuously administered. *J Bone Miner Metab.* 2004;22(6):524–9.

64. Qing H, Bonewald LF. Osteocyte remodeling of the perilacunar and pericanalicular matrix. *Int J Oral Sci.* 2009;1(2):59–65.
65. Carpentier VT, Wong J, Yeap Y, et al. Increased proportion of hypermineralized osteocyte lacunae in osteoporotic and osteoarthritic human trabecular bone: implications for bone remodeling. *Bone.* 2012;50(3):688–94.
66. Busse B, Djonic D, Milovanovic P, et al. Decrease in the osteocyte lacunar density accompanied by hypermineralized lacunar occlusion reveals failure and delay of remodeling in aged human bone. *Aging Cell.* 2010;9(6):1065–75.
67. Weinstein RS, Manolagas SC. Apoptosis and osteoporosis. *Am. J. Med.* 2000;108(2):153–64.
68. Verborgt O, Tatton NA, Majeska RJ, Schaffler MB. Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation? *J. Bone Miner. Res.* 2002;17(5):907–14.
69. Kogianni G, Mann V, Noble BS. Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *J. Bone Miner. Res.* 2008;23(6):915–27.
70. Kennedy OD, Herman BC, Laudier DM, Majeska RJ, Sun HB, Schaffler MB. Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations. *Bone.* 2012;50(5):1115–22.
71. Kitase Y, Barragan L, Qing H, et al. Mechanical induction of PGE2 in osteocytes blocks glucocorticoid-induced apoptosis through both the β -catenin and PKA pathways. *J. Bone Miner. Res.* 2010;25(12):2657–68.
72. Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr. Rev.* 1996;17(4):308–32.
73. Welsch. *Lehrbuch Histologie.* 2nd ed. Elsevier GmbH, Urban und Fischer-Verlag; 2006.
74. Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, et al. Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J. Biol. Chem.* 1996;271(21):12517–24.
75. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* 2000;21(2):115–37.
76. Hick C, Hartmann J. *Intensivkurs Physiologie.* 5th ed. Vorklinik. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer; 2006.
77. Herold G. *Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis.* 2015th ed. Köln: Herold; 2015.
78. Chen M, Qiao H, Su Z, Li H, Ping Q, Zong L. Emerging therapeutic targets for osteoporosis treatment. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2014;18(7):817–31.
79. Ding M, Cheng L, Bollen P, Schwarz P, Overgaard S. Glucocorticoid induced osteopenia in cancellous bone of sheep: validation of large animal model for spine fusion and biomaterial research. *Spine.* 2010;35(4):363–70.
80. Wronski TJ, Cintrón M, Doherty AL, Dann LM. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinology.* 1988;123(2):681–6.
81. Li M, Shen Y, Wronski TJ. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone.* 1997;20(1):55–61.
82. Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int.* 2007;18(10):1319–28.
83. Renz-Polster H, editor. *Basislehrbuch Innere Medizin: Kompakt, greifbar, verständlich ; [Online-Zugang + interaktive Extras].* 4th ed. StudentConsult. München, Jena: Elsevier, Urban & Fischer; 2008.
84. Lane NE. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194(2 Suppl):S3-11.

85. Thomasius F, Baum E, Bernecker P, et al. DVO Leitlinie 2017 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und Männern. *Osteologie*. 2018;27(03):154–60.
86. Bartl C, Bartl R. Sekundäre Osteoporosen: Pathogenese, Formen, Diagnostik und Therapie. [Secondary osteoporosis: pathogenesis, types, diagnostics and therapy]. *Radiologe*. 2011;51(4):307–24.
87. Bartl R. Osteoporose-Manual: Diagnostik, Prävention und Therapie. Berlin: Springer; 2004.
88. Proell V, Xu H, Schüler C, Weber K, Hofbauer LC, Erben RG. Orchiectomy upregulates free soluble RANKL in bone marrow of aged rats. *Bone*. 2009;45(4):677–81.
89. Emerton KB, Hu B, Woo AA, et al. Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. *Bone*. 2010;46(3):577–83.
90. Eriksen EF, Langdahl B, Vesterby A, Rungby J, Kassem M. Hormone replacement therapy prevents osteoclastic hyperactivity: A histomorphometric study in early postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* 1999;14(7):1217–21.
91. Bellido T, Jilka RL, Boyce BF, et al. Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor. *J. Clin. Invest.* 1995;95(6):2886–95.
92. Sunyecz JA. The use of calcium and vitamin D in the management of osteoporosis. *Ther Clin Risk Manag.* 2008;4(4):827–36.
93. Bruyère O, Slomian J, Beaudart C, et al. Prevalence of vitamin D inadequacy in European women aged over 80 years. *Arch Gerontol Geriatr.* 2014;59(1):78–82.
94. Bruyère O, Malaise O, Neuprez A, Collette J, Reginster J-Y. Prevalence of vitamin D inadequacy in European postmenopausal women. *Curr Med Res Opin.* 2007;23(8):1939–44.
95. Bartl R, Bartl C. Drug-Induced Osteoporomalacia. In: Bartl R, Bartl C, editors. *Bone disorders: Biology, diagnosis, prevention, therapy*. Switzerland: Springer; 2017. p. 441.
96. Keck E. Therapie der postmenopausalen Osteoporose. [Therapy of postmenopausal osteoporosis]. *Orthopade.* 2003;32(12):1104–9.
97. Clarke BL. Corticosteroid-induced osteoporosis: an update for dermatologists. *Am J Clin Dermatol.* 2012;13(3):167–90.
98. Manolagas SC. Cell number versus cell vigor--what really matters to a regenerating skeleton? *Endocrinology.* 1999;140(10):4377–81.
99. Stobbe H. *Innere Medizin: Grundlagen und Klinik innerer Krankheiten*. 7th ed. Berlin: Ullstein-Mosby; 1996.
100. Bartl R. *Osteoporose: - Diagnostik, Prävention und Therapie*. 4th ed. Stuttgart - New York: Georg Thieme Verlag KG; 2011.
101. Arastéh K, Baenkler H-W. *Innere Medizin*. 3rd ed. Duale Reihe. Stuttgart: Thieme; 2013.
102. Bonucci E, Ballanti P. *Osteoporosis--Bone Remodeling and Animal Models*. Toxicol Pathol. 2013.
103. Yamashita-Mikami E, Tanaka M, Sakurai N, et al. Correlations between alveolar bone microstructure and bone turnover markers in pre- and post-menopausal women. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013;115(4):e12-9.
104. Wang J, Kazakia GJ, Zhou B, Shi XT, Guo XE. Distinct Tissue Mineral Density in Plate- and Rod-like Trabeculae of Human Trabecular Bone. *J. Bone Miner. Res.* 2015.
105. Milovanovic P, Djonic D, Marshall RP, et al. Micro-structural basis for particular vulnerability of the superolateral neck trabecular bone in the postmenopausal women with hip fractures. *Bone.* 2012;50(1):63–8.
106. Idris AI, Greig IR, Bassonga-Landao E, Ralston SH, van 't Hof, Rob J. Identification of novel biphenyl carboxylic acid derivatives as novel antiresorptive agents that do not impair parathyroid hormone-induced bone formation. *Endocrinology.* 2009;150(1):5–13.
107. Kleerekoper M, Villanueva AR, Stanciu J, Rao DS, Parfitt AM. The role of three-dimensional trabecular microstructure in the pathogenesis of vertebral compression fractures. *Calcif Tissue Int.* 1985;37(6):594–7.

- 108.Recker RR. Architecture and vertebral fracture. *Calcif Tissue Int.* 1993;53(S1):S139-S142.
- 109.Thompson DW. On growth and form. 2nd ed. Cambridge: Univ. Pres; 1942.
- 110.Hildebrand T, Laib A, Muller R, Dequeker J, Ruegsegger P. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *J. Bone Miner. Res.* 1999;14(7):1167–74.
- 111.Duque G, Watanabe K. Osteoporosis research: Animal models. London, New York: Springer; ©2011.
- 112.Herdegen T. Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie: 328 Tabellen. 2nd ed. Stuttgart, New York, NY: Thieme; 2010.
- 113.Thormann U, Ray S, Sommer U, et al. Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. *Biomaterials.* 2013;34(34):8589–98.
- 114.Cummings SR, Martin JS, McClung MR, et al. Denosumab for Prevention of Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N Engl J Med.* 2009;361(8):756–65.
- 115.Dachverband Osteoporose. DVO-Leitlinie 2014: zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und Männern ab dem 60. Lebensjahr. Kitteltaschenversion; 2014. Available from: http://www.dv-osteologie.org/dvo_leitlinien/osteoporose-leitlinie-2014.
- 116.Paterson CR, Ayoub D. Congenital rickets due to vitamin D deficiency in the mothers. *Clin Nutr.* 2014.
- 117.Reuss-Borst MA. Metabolische Knochenkrankheit Osteomalazie. [Metabolic bone disease osteomalacia]. *Z Rheumatol.* 2014;73(4):316–22.
- 118.Rader CP, Corsten N, Rolf O. Osteomalazie und Vitamin-D-Hypovitaminose. [Osteomalacia and vitamin D deficiency]. *Orthopade.* 2015;44(9):695–702.
- 119.Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis // FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone.* 1995;17(4 Suppl // 4):125S-133S.
- 120.Division of metabolic and endocrine drug products, Food and Drug Administration. Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. Division of Metabolism and Endocrine Drug Products, Food and Drug Administration. 1994.
- 121.Arens D, Sigrist I, Alini M, Schawalder P, Schneider E, Egermann M. Seasonal changes in bone metabolism in sheep. *Vet. J.* 2007;174(3):585–91.
- 122.Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater.* 2007;13:1–10.
- 123.Zarrinkalam MR, Beard H, Schultz CG, Moore RJ. Validation of the sheep as a large animal model for the study of vertebral osteoporosis. *Eur Spine J.* 2009;18(2):244–53.
- 124.Sridharan G, Shankar AA. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;16(2):251–5.
- 125.Christine Gaudin-Audrain¹, Yves Gallois^{1,2}, Florence Pascaretti-Grizon, Laurent Hubert, Philippe Massin, Michel-Félix Baslé and Daniel Chappards. Osteopontin is histochemically detected by the AgNOR acid-silver staining: and Daniel Chappard¹. *Histology and Pathology.* 2008(23):469–78.
- 126.Demchenko AP. Advanced fluorescence reporters in chemistry and biology I: Fundamentals and molecular design. Springer Series on Fluorescence, Methods and Applications. Vol. 8. Berlin, Heidelberg: Springer; 2010.
- 127.Cox G. Optical imaging techniques in cell biology. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis; 2007.
- 128.FROST HM. Presence of microscopic cracks in vivo in bone. *Henry Ford Hospital Medical Bulletin.* 1960;8.
- 129.Le H. M., Holmes R. E. , Shors E. C., Rosenstein D. A. Computerized quantitative analysis of the interconnectivity of porous biomaterials. *Acta Stereologica.* 1992(11):267–72.

130. Barger-Lux MJ, Recker RR. Bone microstructure in osteoporosis: transiliac biopsy and histomorphometry. *Top Magn Reson Imaging*. 2002;13(5):297–305.
131. Recker RR. Bone biopsy and histomorphometry in clinical practice. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 1994;20(3):609–27.
132. Kruskal WH, Wallis WA. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*. 1952;47(260):583.
133. Field A. *Discovering Statistics Using IBM SPSS Statistics*. SAGE Publications; 2013.
134. Sheskin DJ. *Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures*. 4th ed. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC; 2009.
135. Komori T. Animal models for osteoporosis. *Eur. J. Pharmacol.* 2015;759:287–94.
136. Bauer NB, Khassawna TE, Goldmann F, et al. Characterization of bone turnover and energy metabolism in a rat model of primary and secondary osteoporosis. *Exp Toxicol Pathol.* 2015;67(4):287–96.
137. Bocker W, El Khassawna T, Bauer N, et al. Short-term glucocorticoid treatment causes spinal osteoporosis in ovariectomized rats. *Eur Spine J.* 2014;23(11):2437–48.
138. El Khassawna T, Bocker W, Brodsky K, et al. Impaired extracellular matrix structure resulting from malnutrition in ovariectomized mature rats. *Histochem Cell Biol.* 2015;144(5):491–507.
139. Wu Z-x, Lei W, Hu Y-y, et al. Effect of ovariectomy on BMD, micro-architecture and biomechanics of cortical and cancellous bones in a sheep model. *Med Eng Phys.* 2008;30(9):1112–8.
140. Augat P, Schorlemmer S, Gohl C, Iwabu S, Ignatius A, Claes L. Glucocorticoid-treated sheep as a model for osteopenic trabecular bone in biomaterials research. *J Biomed Mater Res A.* 2003;66(3):457–62.
141. Lill CA, Fluegel AK, Schneider E. Effect of ovariectomy, malnutrition and glucocorticoid application on bone properties in sheep: a pilot study. *Osteoporos Int.* 2002;13(6):480–6.
142. Mazziotti G, Angeli A, Bilezikian JP, Canalis E, Giustina A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17(4):144–9.
143. Rosen CJ, Bouillon R, Compston J, Rosen V. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 8th ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2013.
144. Vande Berg BC, Malghem J, Lecouvet FE, Devogelaer J-P, Maldague B, Houssiau FA. Fat conversion of femoral marrow in glucocorticoid-treated patients: A cross-sectional and longitudinal study with magnetic resonance imaging. *Arthritis & Rheumatism.* 1999;42(7):1405–11.
145. Zarrinkalam M-R, Schultz CG, Parkinson IH, Moore RJ. Osteoporotic characteristics persist in the spine of ovariectomized sheep after withdrawal of corticosteroid administration. *J Osteoporos.* 2012;2012:182509.
146. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J. Bone Miner. Res.* 2013;28(1):2–17.
147. Montoya MJ, Giner M, Miranda C, et al. Microstructural trabecular bone from patients with osteoporotic hip fracture or osteoarthritis: its relationship with bone mineral density and bone remodelling markers. *Maturitas.* 2014;79(3):299–305.
148. Modder, Ulrike I L, Riggs BL, Spelsberg TC, et al. Dose-response of estrogen on bone versus the uterus in ovariectomized mice. *Eur. J. Endocrinol.* 2004;151(4):503–10.
149. Yao G-Q, Wu J-J, Ovadia S, Troiano N, Sun BH, Insogna K. Targeted overexpression of the two colony-stimulating factor-1 isoforms in osteoblasts differentially affects bone loss in ovariectomized mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009;296(4):E714–20.
150. Zhang Y, Li Y, Gao Q, et al. The variation of cancellous bones at lumbar vertebra, femoral neck, mandibular angle and rib in ovariectomized sheep. *Arch. Oral Biol.* 2014;59(7):663–9.

151. Lill CA, Gerlach UV, Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E. Bone changes due to glucocorticoid application in an ovariectomized animal model for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2002;13(5):407–14.
152. Bouvard B, Gallois Y, Legrand E, Audran M, Chappard D. Glucocorticoids reduce alveolar and trabecular bone in mice. *Joint Bone Spine.* 2013;80(1):77–81.
153. Komori T. Glucocorticoid Signaling and Bone Biology. *Horm Metab Res.* 2016;48(11):755–63.
154. Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J. Bone Miner. Res.* 1989;4(1):3–11.
155. Harrar K. An Interconnectivity Index for Osteoporosis Assessment Using X-Ray Images. *J. Med. Biol. Eng.* 2013;33(6):569.
156. Hildebrand TO, Rüegsegger P. Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 1997;1(1):15–23.
157. Matarazzo SA. Trabecular architecture of the manual elements reflects locomotor patterns in primates. *PLoS ONE.* 2015;10(3):e0120436.
158. Hirose S, Li M, Kojima T, et al. A histological assessment on the distribution of the osteocytic lacunar canalicular system using silver staining. *J Bone Miner Metab;*25(6):374–82.
159. Knothe Tate, Melissa L, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(1):1–8.
160. Liu XS, Sajda P, Saha PK, et al. Complete volumetric decomposition of individual trabecular plates and rods and its morphological correlations with anisotropic elastic moduli in human trabecular bone. *J. Bone Miner. Res.* 2008;23(2):223–35.
161. M. Ding, I. Hvid. Quantification of age-related changes in the structure model type and trabecular thickness of human tibial cancellous bone. *Bone.* 2000(26):291–5.
162. Ciarelli TE, Fyhrie DP, Schaffler MB, Goldstein SA. Variations in three-dimensional cancellous bone architecture of the proximal femur in female hip fractures and in controls. *J. Bone Miner. Res.* 2000;15(1):32–40.
163. Green JO, Nagaraja S, Diab T, Vidakovic B, Guldborg RE. Age-related changes in human trabecular bone: Relationship between microstructural stress and strain and damage morphology. *J Biomech.* 2011;44(12):2279–85.
164. Marcus R, Feldman D, Nelson DA. *Fundamentals of Osteoporosis.* San Diego, CA, USA: Elsevier Science; 2009.
165. Shahnazari M, Martin BR, Legette LL, Lachcik PJ, Welch J, Weaver CM. Diet calcium level but not calcium supplement particle size affects bone density and mechanical properties in ovariectomized rats. *J. Nutr.* 2009;139(7):1308–14.
166. Krams M. *Kurzlehrbuch Pathologie: 126 Tabellen.* Stuttgart, New York, NY: Thieme; 2010.
167. Thomsen JS, Ebbesen EN, Mosekilde L. Zone-dependent changes in human vertebral trabecular bone: clinical implications. *Bone.* 2002;30(5):664–9.
168. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology.* 1998;139(2):663–70.
169. Wolff J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen.* Berlin: Hirschwald; 1892.
170. Smit TH. The use of a quadruped as an in vivo model for the study of the spine - biomechanical considerations. *Eur Spine J.* 2002;11(2):137–44.
171. Hauerstock D. *Telemetric measurement of compressive loads in the sheep lumbar spine;* 2000.
172. Alexander C. Idiopathic osteoporosis: an evolutionary dys-adaptation? *Ann. Rheum. Dis.* 2001;60(6):554–8.
173. van Oers, René F M, Wang H, Bacabac RG. Osteocyte Shape and Mechanical Loading. *Curr Osteoporos Rep.* 2015.

174. Ubaidus S, Li M, Sultana S, et al. FGF23 is mainly synthesized by osteocytes in the regularly distributed osteocytic lacunar canalicular system established after physiological bone remodeling. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 2009;58(6):381–92.
175. Haga M, Nozawa-Inoue K, Li M, et al. A morphological analysis on the osteocytic lacunar canalicular system in bone surrounding dental implants. *Anat Rec (Hoboken)*. 2011;294(6):1074–82.
176. Ejiri S, Ozawa H. Scanning electron microscopic observations of rat tibia using the HCl-collagenase method. *Arch Histol Jpn*. 1982;45(4):399–404.
177. Bozal CB, Sanchez LM, Ubios AM. The lacuno-canalicular system (LCS) and osteocyte network of alveolar bone by confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Acta Odontol Latinoam*. 2012;25(1):123–31.
178. Mutijima E, Maertelaer V de, Deprez M, Malaise M, Hauzeur J-P. The apoptosis of osteoblasts and osteocytes in femoral head osteonecrosis: its specificity and its distribution. *Clin Rheumatol*. 2014;33(12):1791–5.
179. Komori T. Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass. *Cell Tissue Res*. 2013;352(2):191–8.
180. Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2000;85(8):2907–12.
181. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr. Rev*. 2013;34(5):658–90.
182. Kerschnitzki M, Kollmannsberger P, Burghammer M, et al. Architecture of the osteocyte network correlates with bone material quality. *J. Bone Miner. Res*. 2013;28(8):1837–45.
183. Martin TJ, Seeman E. Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*. 2008;22(5):701–22.
184. Mulcahy LE, Taylor D, Lee TC, Duffy GP. RANKL and OPG activity is regulated by injury size in networks of osteocyte-like cells. *Bone*. 2011;48(2):182–8.
185. Chen TH-P, Swarnkar G, Mbalaviele G, Abu-Amer Y. Myeloid lineage skewing due to exacerbated NF- κ B signaling facilitates osteopenia in Scurfy mice. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1723.
186. Riggs BL, Melton LJ. Evidence for two distinct syndromes of involuntional osteoporosis. *Am. J. Med*. 1983;75(6):899–901.
187. Xiong M, Wang K, Dang X. An experimental study on osteocyte apoptosis in steroid-induced early osteonecrosis of femoral head. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2007;21(3):262–5.
188. Bai R, Feng W, Liu WL, et al. Roles of osteocyte apoptosis in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head. *Genet Mol Res*. 2016;15(1).
189. FROST HM. In vivo osteocyte death. *J Bone Joint Surg Am*. 1960;42-A:138–43.
190. Wong SY, Kariks J, Evans RA, Dunstan CR, Hills E. The effect of age on bone composition and viability in the femoral head. *J Bone Joint Surg Am*. 1985;67(2):274–83.
191. Dunstan CR, Somers NM, Evans RA. Osteocyte death and hip fracture. *Calcif Tissue Int*. 1993;53 Suppl 1:S113-6; discussion S116-7.
192. Mullender MG, van der Meer, D D, Huiskes R, Lips P. Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. *Bone*. 1996;18(2):109–13.
193. Qiu S, Rao DS, Palnitkar S, Parfitt AM. Relationships between osteocyte density and bone formation rate in human cancellous bone. *Bone*. 2002;31(6):709–11.
194. Faller H. *Medizinische Psychologie und Soziologie*. [S.l.]: Springer; 2015.
195. Boussein ML, Myers KS, Shultz KL, Donahue LR, Rosen CJ, Beamer WG. Ovariectomy-induced bone loss varies among inbred strains of mice. *J. Bone Miner. Res*. 2005;20(7):1085–92.
196. Ballanti P, Della Rocca C, Bonucci E, Milani S, Lo Cascio V, Imbimbo B. Sensitivity of bone histomorphometry in the diagnosis of metabolic bone diseases. *Pathol. Res. Pract*. 1989;185(5):786–9.

197. Arens D. Seasonal changes of bone metabolism in sheep. Univ., Vetsuiss-Fak., Diss.--Bern, 2006.
198. Hornby SB, Ford SL, Mase CA, Evans GP. Skeletal changes in the ovariectomised ewe and subsequent response to treatment with 17 beta oestradiol. *Bone*. 1995;17(4 Suppl):389S-394S.
199. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239–57.
200. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980;68:251–306.
201. Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, et al. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem*. 1998;46(3):327–34.
202. Arganda-Carreras I, Kaynig V, Rueden C, et al. Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinformatics*. 2017;33(15):2424–6.
203. Brad Larson PB. Z-Stacking of Single Plane Digital Widefield Fluorescent Images: Z-Stacking of Single Plane Digital Widefield Fluorescent Images Incorporation of Cytation™ Cell Imaging Multi-Mode Readers and Gen5™ Incorporation of Cytation™ Cell Imaging Multi-Mode Readers and Gen5™ Data Analysis Software to create Deconvoluted, Stacked Images of 3D Cellular Structures. Available from: www.biotek.de/assets/tech_resources/Z-Stacking_App_Note.pdf.
204. Dunaevsky A, Tashiro A, Majewska A, Mason C, Yuste R. Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(23):13438–43.
205. Tavakoli MB, Salamat MR, Tavakoli M. Comparative study of the density of L2, L3, and L4 vertebrae in menopausal women aged over 50 years with osteoporosis. *J Educ Health Promot*. 2015;4:43.
206. Oheim R1, Amling M, Ignatius A, Pogoda P. Large animal model for osteoporosis in humans: the ewe. 1Department of Osteology and Biomechanics, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. *Eur Cell Mater*. 2012 Nov 12:24:372-85.

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

<i>Abbildung 1: Aufbau des Lamellenknochens</i>	Seite 5
<i>Abbildung 2: Regulation der lakunokanalikulären Mineralisation</i>	Seite 11
<i>Abbildung 3: Koordination der Osteoblasten und Osteoklasten</i>	Seite 12
<i>Abbildung 4: Die zentrale Rolle des Osteozyten im Knochenanabolismus und –katabolismus</i>	Seite 13
<i>Abbildung 5: Schematische Darstellung des Osteoklasten und der Howship-Lakune</i>	Seite 15
<i>Abbildung 6: Studiendesign</i>	Seite 30
<i>Abbildung 7: Gradingsystem Spongiosa Toluidinblau G4-G1</i>	Seite 36
<i>Abbildung 8: Osteozytenmorphologien Silber-Färbung</i>	Seite 41
<i>Abbildung 9: Toluidinblau OVX6 Femur: „Lakunär ausgestanztes Muster“</i>	Seite 44
<i>Abbildung 10: Toluidinblau OVX7 LWK: „Schweizer-Käse-Muster“</i>	Seite 44
<i>Abbildung 11: Toluidinblau Kontrolle3 Femur: „Backsteinmuster“</i>	Seite 44
<i>Abbildung 12: Übersichten Spongiosa Femurkopf Toluidinblau Färbung mit Inset</i>	Seite 45
<i>Abbildung 13: Übersichten Spongiosa Wirbelkörper Toluidinblau Färbung mit Inset</i>	Seite 46
<i>Abbildung 14: Gruppenmediane Spongiosagrading Toluidinblau</i>	Seite 51
<i>Abbildung 15: Femur K6, Silber-Färbung</i>	Seite 55
<i>Abbildung 16: Femur K8, Silber-Färbung</i>	Seite 55
<i>Abbildung 17: Femur OVX2, Silber-Färbung</i>	Seite 57
<i>Abbildung 18: Femur OVX3, Silber-Färbung</i>	Seite 57
<i>Abbildung 19: Femur OVXD2, Silber-Färbung</i>	Seite 59
<i>Abbildung 20: Femur OVXD3, Silber-Färbung</i>	Seite 59
<i>Abbildung 21: Femur OVXDS2, Silber-Färbung</i>	Seite 61
<i>Abbildung 22: Femur OVXDS7, Silber-Färbung</i>	Seite 61
<i>Abbildung 23: Femur OVXDS4, Silber-Färbung</i>	Seite 61
<i>Abbildung 24: Übersicht Kontrolle, Silber-Färbung</i>	Seite 63
<i>Abbildung 25: LWK K7, Silber-Färbung</i>	Seite 63
<i>Abbildung 26: LWK K2, Silber-Färbung</i>	Seite 63
<i>Abbildung 27: LWK OVX7, Silber-Färbung</i>	Seite 65
<i>Abbildung 28: LWK OVXD2, Silber-Färbung</i>	Seite 67
<i>Abbildung 29: LWK OVXD7, Silber-Färbung</i>	Seite 67
<i>Abbildung 30: LWK OVXD3, Silber-Färbung</i>	Seite 67
<i>Abbildung 31: LWK OVXDS2, Silber-Färbung</i>	Seite 69

<i>Abbildung 32: LWK OVXDS5, Silber-Färbung</i>	<i>Seite 69</i>
<i>Abbildung 33: Übersicht Gradingssysteme zur Darstellung der zellulären Veränderungen</i>	<i>Seite 70</i>
<i>Abbildung 34: Häufigkeitsanalyse der zellulären Parameter, Silber-Färbung</i>	<i>Seite 72f</i>
<i>Abbildung 35: Histomorphometrie Silber-Färbung</i>	<i>Seite 75f</i>
<i>Abbildung 36: Rhodamin Färbung Femur Osteozytenmorphologie und OLCS</i>	<i>Seite 79f</i>
<i>Abbildung 37: Rhodamin-Färbung Beckenkammbiopsien im zeitlichen Verlauf: Osteozytenmorphologie und OLCS</i>	<i>Seite 82f</i>
<i>Abbildung 38: Mikropartikelanalyse Femur</i>	<i>Seite 84</i>
<i>Abbildung 39: Histomorphometrische Partikelanalyse Rhodamin</i>	<i>Seite 86</i>
<i>Abbildung 40: Arbeiten mit ImageJ, Scale</i>	<i>Seite 131</i>
<i>Abbildung 41: Arbeiten mit ImageJ, Einstellung Scale</i>	<i>Seite 131</i>
<i>Abbildung 42: Arbeiten mit ImageJ, Measurements</i>	<i>Seite 131</i>
<i>Abbildung 43: Arbeiten mit ImageJ, Einstellung Measurements</i>	<i>Seite 131</i>
<i>Abbildung 44: Arbeiten mit ImageJ, Polygonal Tool</i>	<i>Seite 132</i>
<i>Abbildung 45: Arbeiten mit ImageJ, Setzung des Roi</i>	<i>Seite 132</i>
<i>Abbildung 46: Arbeiten mit ImageJ, Make Binary</i>	<i>Seite 132</i>
<i>Abbildung 47: Arbeiten mit ImageJ, Binary</i>	<i>Seite 132</i>
<i>Abbildung 48: Arbeiten mit ImageJ, Measurement</i>	<i>Seite 133</i>
<i>Abbildung 49: Arbeiten mit ImageJ, prozentuale Knochenfläche</i>	<i>Seite 133</i>
<i>Abbildung 50a: Fehlerquelle ImageJ, Justierung der Zellfläche bei falsch niedriger Knochenfläche</i>	<i>Seite 133</i>
<i>Abbildung 50b: Fehlerquelle ImageJ, Korrektur der falsch niedrigen Knochenfläche</i>	<i>Seite 133</i>
<i>Abbildung 51: Arbeiten mit ImageJ, Analyse der Zellzahl</i>	<i>Seite 134</i>
<i>Abbildung 52: Arbeiten mit ImageJ, Cell-Counter</i>	<i>Seite 134</i>
<i>Abbildung 53: Arbeiten mit ImageJ, Initialize to count</i>	<i>Seite 134</i>
<i>Abbildung 54: Arbeiten mit ImageJ, Berechnung der Zellzahl</i>	<i>Seite 134</i>
<i>Abbildung 55: Arbeiten mit ImageJ, Results</i>	<i>Seite 135</i>
<i>Abbildung 56: Arbeiten mit ImageJ, Partikelanalyse</i>	<i>Seite 136</i>
<i>Abbildung 57: Arbeiten mit ImageJ, Einstellung der Skala</i>	<i>Seite 136</i>
<i>Abbildung 58: Arbeiten mit ImageJ, Mikropartikelanalyse, Split Channels</i>	<i>Seite 136</i>
<i>Abbildung 59: Arbeiten mit ImageJ, Mikropartikelanalyse, Nach Kanaltrennung</i>	<i>Seite 136</i>
<i>Abbildung 60: Arbeiten mit ImageJ, Mikropartikelanalyse, Einstellung des Threshold</i>	<i>Seite 137</i>
<i>Abbildung 61: Arbeiten mit ImageJ, Mikropartikelanalyse, Entfernung des Artefakts</i>	<i>Seite 137</i>

<i>Abbildung 62: Arbeiten mit ImageJ, Mikropartikelanalyse, Analyse und Summation der einzelnen Partikel</i>	<i>Seite 137</i>
--	------------------

Tabellen:

<i>Tabelle 1: Ausprägungsmerkmale</i>	<i>Seite 38</i>
<i>Tabelle 2: Grading Femur</i>	<i>Seite 38</i>
<i>Tabelle 3: Grading LWK</i>	<i>Seite 38</i>
<i>Tabelle 4: Osteozytengrading Kontrolle Femur</i>	<i>Seite 53</i>
<i>Tabelle 5: Spongiosagrading Kontrolle Femur</i>	<i>Seite 53</i>
<i>Tabelle 6: Osteozytengrading Kontrolle Femur</i>	<i>Seite 53</i>
<i>Tabelle 7: Osteozytengrading OVX Femur</i>	<i>Seite 56</i>
<i>Tabelle 8: Knochengrading OVX Femur</i>	<i>Seite 56</i>
<i>Tabelle 9: Osteozytengrading Femur</i>	<i>Seite 56</i>
<i>Tabelle 10: Osteozytengrading OVXD Femur</i>	<i>Seite 58</i>
<i>Tabelle 11: Knochengrading OVXD Femur</i>	<i>Seite 58</i>
<i>Tabelle 12: Osteozytengrading OVXD Femur</i>	<i>Seite 58</i>
<i>Tabelle 13: Osteozytengrading OVXDS Femur</i>	<i>Seite 60</i>
<i>Tabelle 14: Knochengrading OVXDS Femur</i>	<i>Seite 60</i>
<i>Tabelle 15: Osteozytengrading OVXDS Femur</i>	<i>Seite 60</i>
<i>Tabelle 16: Osteozytengrading LWK Kontrolle mit modifiziertem Grading (Grading LWK) und nicht modifizierter Einteilung (Grading Femur)</i>	<i>Seite 62</i>
<i>Tabelle 17: Knochengrading LWK Kontrolle</i>	<i>Seite 62</i>
<i>Tabelle 18: Osteozytengrading LWK Kontrolle</i>	<i>Seite 62</i>
<i>Tabelle 19: Osteozytengrading LWK OVX mit modifiziertem Grading (Grading LWK) und nicht modifizierter Einteilung (Grading Femur)</i>	<i>Seite 64</i>
<i>Tabelle 20: Knochengrading LWK OVX</i>	<i>Seite 64</i>
<i>Tabelle 21: Osteozytengrading LWK OVX-Gruppe</i>	<i>Seite 64</i>
<i>Tabelle 22: Osteozytengrading LWK OVXD mit modifiziertem Grading (Grading LWK) und nicht modifizierter Einteilung (Grading Femur)</i>	<i>Seite 66</i>
<i>Tabelle 23: Knochengrading LWK OVXD</i>	<i>Seite 66</i>
<i>Tabelle 24: LWK OVXD-Gruppe</i>	<i>Seite 66</i>
<i>Tabelle 25: Osteozytengrading LWK OVXDS mit modifiziertem Grading (Grading LWK) und nicht modifizierter Einteilung (Grading Femur)</i>	<i>Seite 68</i>
<i>Tabelle 26: Knochengrading LWK OVXDS</i>	<i>Seite 68</i>
<i>Tabelle 27: Osteozytengrading LWK OVXDS-Gruppe</i>	<i>Seite 68</i>
<i>Tabelle 28: Mikropartikelanalyse Beckenkamm</i>	<i>Seite 85</i>
<i>Tabelle 29: Entwässerungsschema zur Paraffineinbettung</i>	<i>Seite 126</i>
<i>Tabelle 30: Entwässerungsschema Rhodamin</i>	<i>Seite 129</i>

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.: Abbildung

ALP: Alkalische Phosphatase

Bidest.: Bidestilliert

BMD: Bone Mineral Density

BMP: Bone Morphogenetic Protein

BMU: Basic Multicellular Unit

BSG: Blutsenkgeschwindigkeit

BV/TV: Bone Volume/ Total Volume

C43: Connexin 43

CD44-Protein: Cluster of Differentiation 44 – Protein

CRP: C-reaktives Protein

Dest.: Destilliert

Diagr.: Diagramm

DMP1: Dentin Matrix Protein

DVO: Dachverband Osteologie

DXA: Osteodensitometrie/ Dual-Energy X-ray Absorptiometry

E: Östrogene

E11: E11/ Glykoprotein 38/ Podoplanin

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

EZM: Extrazelluläre Matrix

F/M: Female/ Male

Fa.: Firma

FDA: Food and Drug Administration

Fem: Femur

FGF23: Fibroblast Growth Factor

i.m.: Intramuskulär

ICI: Interkonnektivitäts-Index

IE/d: Internationale Einheiten pro Tag

IGF: Somatomedine

IL: Interleukin

K: Kontrolle

KI: Konfidenzintervall

LCM: Laser Confocal Microscopy

LWK: Lendenwirbelkörper
LWS: Lendenwirbelsäule
M.: Morbus
M: Molar
M_{ed}: Median
M-CSF: Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor
MEPE: Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein
μCT: Micro Computertomographie
MMP: Matrix-Metalloproteasen
MT1-MMP: Membrantyp1-Matrix-Metalloprotease
NOR: Nukleolus Organisationsregion
Ob.: Osteoblasten
Ok.: Osteoklasten
OLCS: Osteozytäres Lakunäres Kanalikuläres System
OSF: Osteoblasten stimulierende Faktor
Osx: Osterix
Ot.: Osteozyten
OVX: Ovariectomie
OVXD: Ovariectomie + Diät
OVXDS: Ovariectomie + Diät + Steroid Applikation
PF: Proximaler Femur
PHEX: Phosphate-regulating Neutral Endopeptidase on the Chromosome X
pHPT: Primärer Hyperparathyreodismus
PMMA: Polymethylmethacrylat
pQCT: Periphere quantitative Computertomographie
PTH: Parathormon
QCT: Quantitative Computertomographie
Q-Q-Plot: Quantil-Quantil-Diagramm
RANK: Receptor Activator of NF-κB
RANKL: Receptor Activator of NF-κB Ligand
RT: Raumtemperatur
Runx2: Runt-related Transcription Factor 2
SD: Standard Deviation
SE: Mittlere Standardfehler
SERM: Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren

SFB: Sonderforschungsbereich

SMI: Structure Model Index

Sox9: SRY-Box 9

sRANKL: Lösliches RANKL

SW: Spannweite

T.: Zeitpunkt

Tab.: Tabelle

Tb.N.: Trabekelzahl

Tb.Sp.: Trabekelabstand

Tb.Th.: Trabekeldicke

TEM: Transmissionselektronenmikroskopie

TGF-beta: Transforming Growth Factor-Beta

TMD: Tissue Mineral Density

TSH: Thyreoidea Stimulierendes Hormon

TRAP: Tartrate-resistant saure Phosphatase

TUNEL: Terminal Desoxynucleotidyl Transferase - Mediated dUTP-Biotin Nick End
Labeling

WHO: World Health Organisation

WK: Wirbelkörper

Wnt/ β -Catenin: Wingless - Int-1/ β -Catenin

ZFE: Zentrale Forschungseinrichtung

9 Anhang

Entwässerungsschema Paraffineinbettung für Toluidinblau

Medium	Dauer
70 % Alkohol	2 Stunden
80 % Alkohol	2,5 Stunden
96 % Alkohol	2 Stunden
100 % Alkohol	3 Stunden
100 % Alkohol	3 Stunden
100 % Alkohol	3 Stunden
Xylol	60 Minuten
Xylol	45 Minuten
Xylol	45 Minuten
Paraffin	40 Minuten
Paraffin	40 Minuten
Paraffin	40 Minuten

Tabelle 29: Entwässerungsschema zur Paraffineinbettung

9.1 Färbeprotokoll Toluidinblau-Färbung

- | | |
|--|------------------|
| 1. Xylol | 2 x 5 Minuten |
| 2. Absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest. | je 2 – 5 Minuten |
| 3. Toluidinblau O Färbelösung | 10– 60 Sekunden |
| 4. Aufsteigende Alkoholreihe | je 2 – 5 Minuten |
| 5. Xylol | 2 x 5 Minuten |
| 6. Eindecken mit DePex | |

Färbelösungen:

Toluidinblau Lösung:

- Lösung A: 8 g Natriumtetraborat (Borax, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland), 8 g Toluidinblau O (Fa. Chroma, Münster, Deutschland) und 800 ml Aqua destilliert
- Lösung B: 2 g Pyronin G (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) und 200 ml Aqua destilliert
- Lösung A und B jeweils 15 Minuten auf dem Magnetrührer rühren
- Lösung A und B mischen, nochmals 15 Minuten auf dem Magnetrührer rühren, zweimal filtrieren
- Zur Färbung von Paraffinschnitten die Färbelösung 1 + 1 mit Aqua destilliert verdünnen

Chemikalien:

Xylol (Fa. Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe, Deutschland)

Ethanol vergällt (Fa. Stockmeier, Bielefeld, Deutschland)

DePex (Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland)

9.2 Färbeprotokoll Silber-Färbung**Entparaffinierung:**

- 2 x 5 Minuten Xylol
Dies dient vor allem der Entfernung des Paraffins.
- je 5 Minuten jeder Konzentration der absteigenden Alkoholreihe
Hierbei werden Konzentrationen von 100 %, 96 %, 80 % und 70 % durchlaufen. Durch den sinkenden Alkoholgehalt werden die Schnitte wieder rehydriert.
- 1 x 5 Minuten in aqua destilliert
- Währenddessen Stammlösungen im 1:2 Verhältnis (A:B) mischen
Dies entspricht bei 5 Schnitten ca. 1 ml Lösungsgemisch. Dafür wird etwa 333 µl Lösung A zu 666 µl Lösung B gegeben, die mit dem Vortexer gemischt werden. Dabei erst kurz vor Anwendung beide Lösungen zusammengeben und in einem lichtgeschützten Gefäß aufbewahren.

Färbung:

- Objektträger vorsichtig abwischen und Objekt (Knochenschnitt oder Biopsie) mit Fettstift (PapPen) einkreisen und in Inkubationsbox (feuchte Kammer) in eine Reihe legen.
- pro Schnitt 200 µl des Stammlösungsmixes zugeben, 70 Min. bei Raumtemperatur (RT) im Dunklen inkubieren, abklopfen
- 5 Minuten aqua destilliert
- 10 Minuten 5 prozentiges Natriumthiosulfat, pro Schnitt 200 µl
Dadurch wird der Schnitt fixiert und reduziert, was der Haltbarkeit und der Qualität dient. Natriumthiosulfat immer frisch mit aqua bidest. ansetzen (0,5 g Natriumthiosulfat für 10 ml).
- 5 Minuten aqua destilliert
- je 5 Minuten in jeder Konzentration der aufsteigenden Alkoholreihe:
Folgende Konzentrationen werden durchlaufen: 70 %, 80 %, 96 % und 100%. Die zunehmende Konzentration an Alkohol entwässert den Schnitt.
- 2 x 5 Minuten Xylol
Xylol ist wichtig für die Aufbringung des DePex
- Eindeckeln mit DePex, über Nacht bei RT aushärten lassen

Eine kleine Menge DePex-Eindeckmittel wird auf den Objektträger gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Mit Hilfe einer Nadel werden Luftblasen vermieden. Nach etwa 5 Minuten können die Schnitte mit einem Gewicht beschwert werden, sodass sich das DePex gleichmäßig dünn verteilt und keine Unebenheiten entstehen.

Färbelösungen Silbernitrat-Färbung:

- Lösung A: 24,75 ml aqua bidest. + 250 µl Ameisensäure + 0,5 g Gelatine Low Bloom. Komponenten mischen und bei 37°C unter schütteln lösen. Vor Benutzung immer im Inkubator auf 37°C erwärmen lassen.
- Insgesamt werden hierfür 333 µl Lösung A für etwa 5 Schnitte verwendet.
- Lösung B: 50 prozentiges Silbernitrat (10 g Silbernitrat + 20 ml aqua bidest.)
- Von Lösung B werden 666 µl verwendet.

9.3 Färbeprotokoll Rhodamin-Färbung

Entwässerungsschema Rhodamin

Alkoholkonzentration	Dauer bei RT; rütteln
70 %	2 Tage
70 %	2 Tage
80 %	3 Tage
96 %	3 Tage
100 % (1)	4 Tage
100 % (2)	3 Tage
100 % (3)	4 Tage
100 % (4)	3 Tage
100 % p.A.	4 Tage
Xylol (1)	morgens
Xylol (2)	abends

Tabelle 30: Entwässerungsschema Rhodamin

- Präinfiltration 1: Dauer bei RT, rütteln 5 Tage
- Präinfiltration 2: Dauer bei RT, rütteln 5 Tage
- Präinfiltration 3: Dauer im Kühlschrank (4°C) 4 Tage
- Infiltration: Dauer im Kühlschrank (4°C) 11 Tage

Ab diesem Schritt wird 1% Rhodamin 6G Lösung (Firma Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) Lösung zugegeben. Dabei wird die Infiltrationslösung 3x gewechselt.

Herstellung der Gebrauchslösungen:

- Präinfiltration 1: Basislösung (Technovit 9100), stabilisiert + Xylol 1 : 1
(125 ml + 125 ml)
Die Stabilisierung erfolgt über Al_2O_3 , das in eine Chromatographiesäule gefüllt und mit der Technovit 9100 Basislösung durchlaufen wird.
- Präinfiltration 2: Basislösung, stabilisiert + Härter 1
(250 ml + 1,25 g Härter 1)
- Präinfiltration 3: Basislösung, entstabilisiert + Härter 1
(250 ml + 1,25 g Härter 1)
- Infiltration: Basislösung, entstabilisiert + PMMA (Pulver 2) + Härter 1
(250 ml + 20 g PMMA + 1 g Härter1)
Zugabe von 15 ml 1%iger Rhodamin 6G Lösung

Herstellung der Polymerisationslösungen:

- Stammlösung A: 500 ml Basislösung, entstabilisiert 250 125
80 g PMMA 40 20
3 g Härter 1 1,5 0,75
- Stammlösung B: 44 ml / 7,6 ml Basislösung, entstabilisiert
4 ml / 1,6 ml Härter 2
2 ml / 0,8 ml Polymerisationsregler
Lagerung bei - 20°C im Gefrierschrank
- Polymerisationsgemisch: 9 Volumenteile Stammlösung A
1 Volumenteil Stammlösung B

Herstellung des T4000/4002/PMMA-Klebers:

- Zum Kleben wird der Einkomponentensirup T4000/4002/ und PMMA Pulver benutzt. Zum Ansetzen wird Sirup in einen Einnahmebecher gefüllt und das PMMA Pulver zugegeben bis eine breiige Konsistenz erreicht wird.

Chemikalien

Technovit 9100 (Basislösung), Liquid, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland

PMMA-Pulver, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland

Technovit, Härter 1, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland

Technovit 9100, Härter 2, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland

Technovit 9100, Regler, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland

Technovit 4000 Puder, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland

Sirup: Technovit 4000/4002 Liquid, 1-Component-Liquid, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland

Technovit 7210 VLC, Präzisionskleber, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland

9.4 Arbeiten mit ImageJ

9.4.1 Ermittlung der Trabekelfläche

Für die Vermessung der trabekulären Knochenfläche mittels ImageJ, wurden folgende Schritte durchlaufen: Zuerst das entsprechende Bild mit FIJI geöffnet und anschließend eine Skala eingestellt. Für das Einstellen der Skala klickt man auf „Analyze“ und danach öffnet man „Set Scale“. Hier können die Einstellungen angepasst werden. Für die Bilder wurde ein Verhältnis von 3 Pixel= 1 µm ermittelt, das im Programm eingestellt wurde (Abb. 40f).

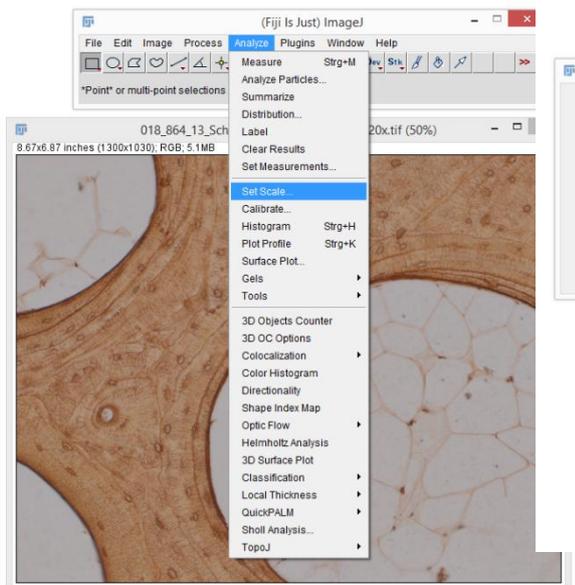


Abbildung 40: Arbeiten mit ImageJ, Scale.

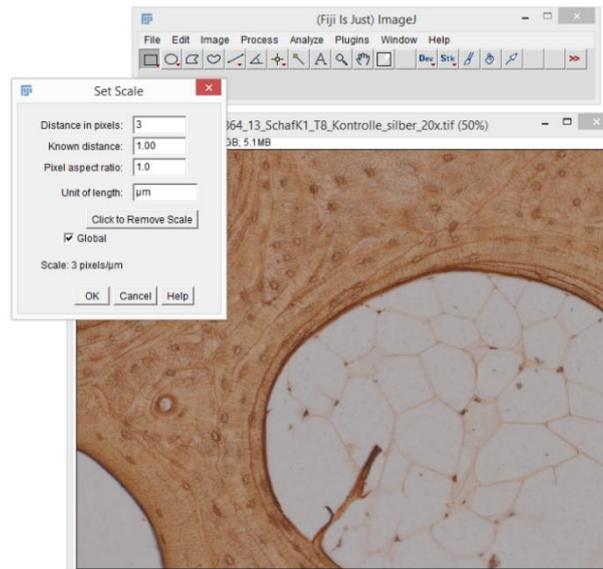


Abbildung 41: Arbeiten mit ImageJ, Einstellung Scale.

Ebenso mussten die Messgrößen festgelegt werden. Dies geschah über „Analyze“ und über die Einstellung „Set Measurements“ (Abb. 42). Hier wurde eingestellt, dass neben der „Area“, die „Area Fraction“ und „Min & max gray value“, sowie „Mean gray value“ ermittelt werden sollte (Abb. 43).

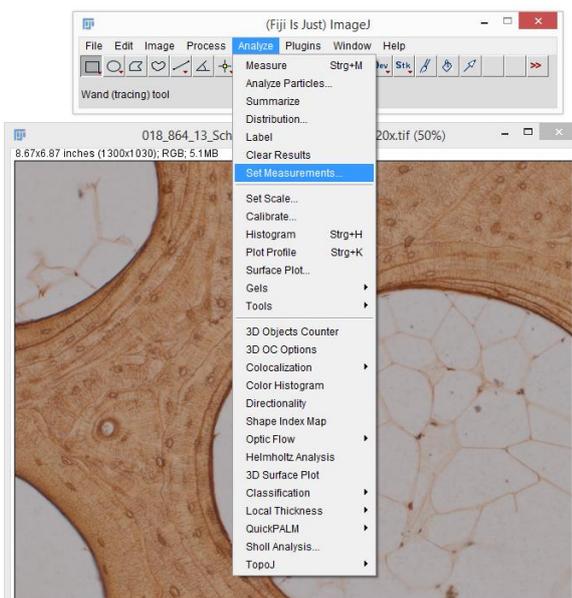


Abbildung 42: Arbeiten mit ImageJ, Measurements.

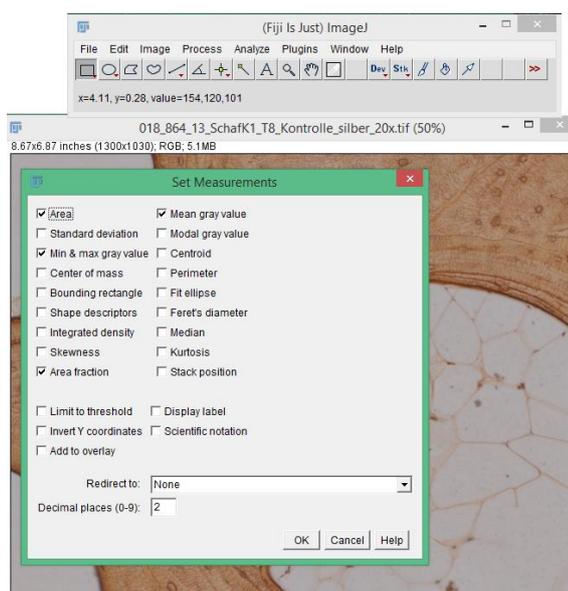


Abbildung 43: Arbeiten mit ImageJ, Einstellung

Anschließend wurde der „Roi Manager“ (Abb. 44) gestartet und aus der Werkzeugleiste „Polygonal Selection“ ausgewählt und das sogenannte „Roi“ (Region of interest) gesetzt. Mit Hilfe des Werkzeuges wurde der auf dem Bild erkennbare Trabekelteil präzise umfahren und daraufhin durch die Schaltfläche „Add“ im gestarteten „Roi Manager“ (Abb. 45) der Liste des „Roi Managers“ hinzugefügt. Nicht-knöcherner Teile wurden ausgeschnitten (siehe Pfeil). Gab es mehrere Knochenanschnitte, so wurden diese mit einem eigenem „Roi“ ausgewählt und hinzugefügt.

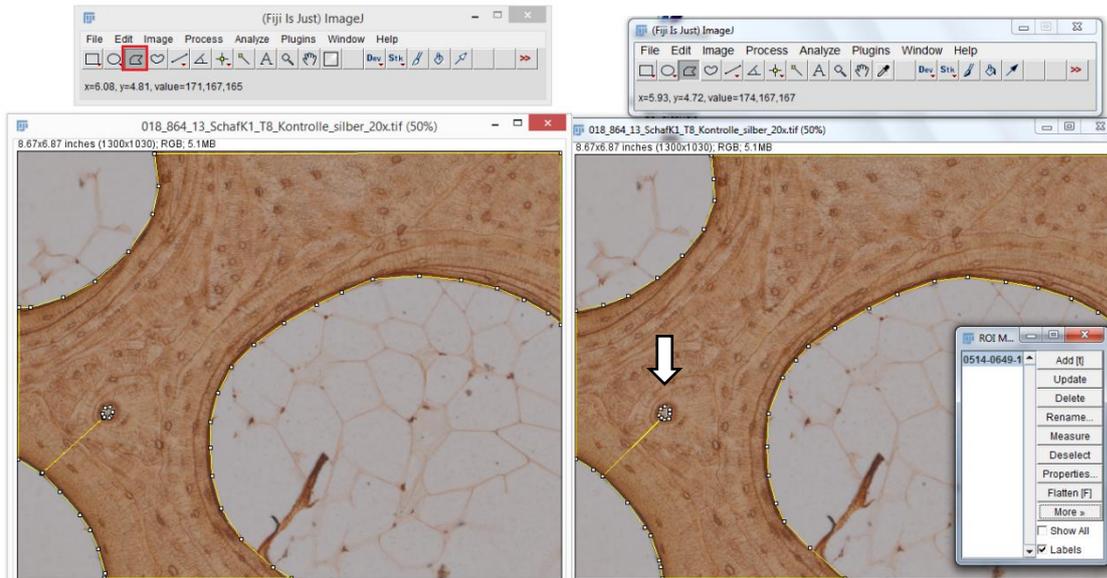


Abbildung 44: Arbeiten mit ImageJ, Polygonal Tool.

Abbildung 45: Arbeiten mit ImageJ, Setzung des Roi

Des Weiteren wurde das Bild zu einem Binärbild konvertiert. Dafür wurde über „Process“ > „Binary“ und „Make Binary“ dem Bild Schwarz- und Weißwerte zugeordnet (Abb. 46f).

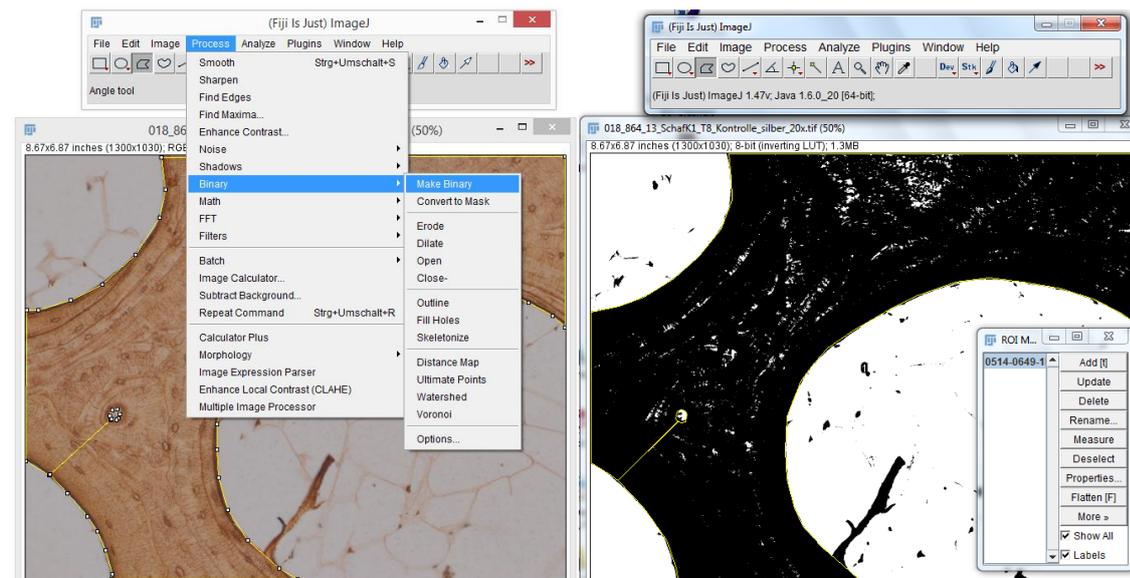


Abbildung 46: Arbeiten mit ImageJ, Make Binary.

Abbildung 47: Arbeiten mit ImageJ, Binary

Daraufhin erfolgte die Vermessung der mit dem „Roi“ ausgewählten Knochenfläche. Dazu wurde im Roi Manager „Measure“ ausgewählt. Im Results-Fenster wird die Fläche der Area (roter Kasten) und der prozentuale Anteil an Knochen im Roi (grüner Kasten) angezeigt (Abb. 49). Daneben wurde die korrekte Erfassung der Knochenfläche überprüft und ggf. korrigiert (Abb. 50f).

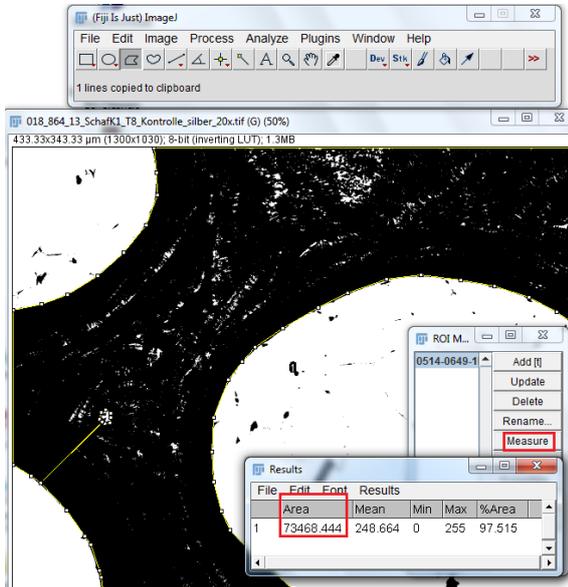


Abbildung 48: Arbeiten mit ImageJ, Measurement.

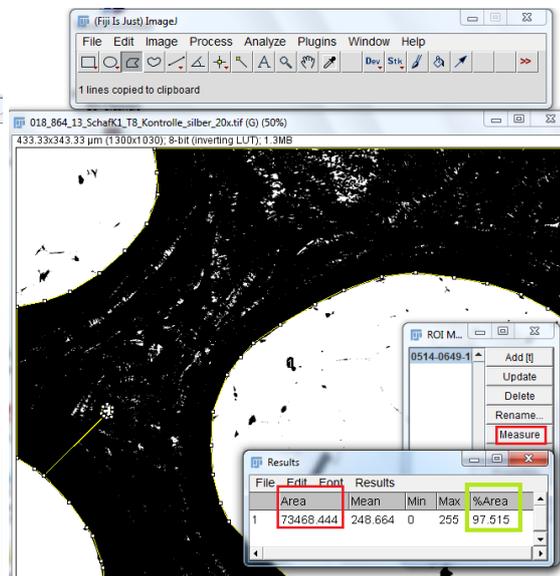


Abbildung 49: Arbeiten mit ImageJ, prozentuale Knochenfläche.

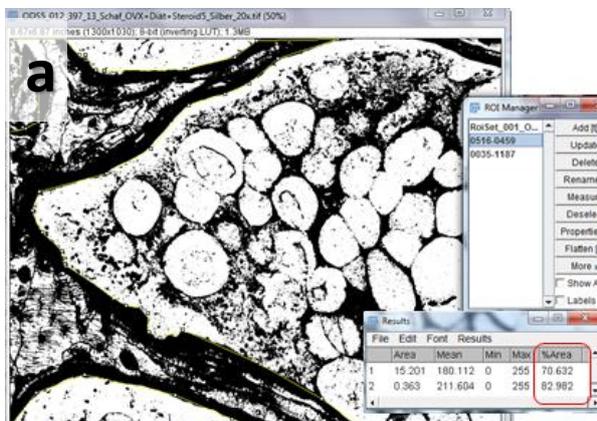


Abb. 50a: Fehlerquelle ImageJ, Justierung der Zellfläche bei falsch niedriger Knochenfläche. Die Abbildung zeigt die Erfassung der Knochenfläche. Dabei wurde der Knochen manuell umrandet und ein Roi gesetzt. Dieser wird im Roi-Manager rechts angezeigt. Im Results-Kasten stellt sich eine fälschlich zu geringe Knochenfläche von 70 % innerhalb des Rois dar.

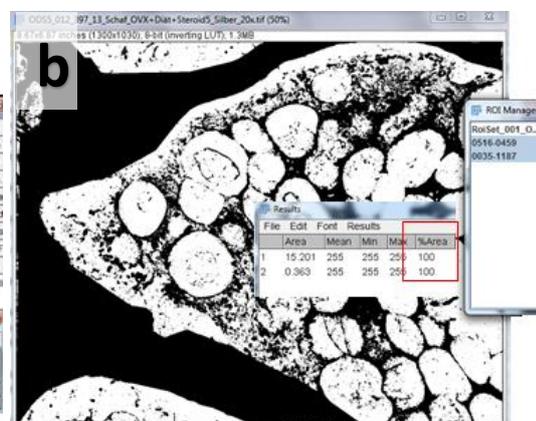


Abb.50b: Fehlerquelle ImageJ, Korrektur der falsch niedrigen Knochenfläche. Nach präziserer Setting des Rois wurde die gesamte markierte Knochenfläche als 100 % gesetzt. Dadurch wird das Ergebnis korrigiert.

Die Fläche der Trabekel wurde aus dem Ergebnissenfenster kopiert und in Excel übertragen. Alle Schritte wurden mit den einzelnen Bildern durchgeführt. Für die Auswertung wurde die Knochenfläche der 20 Einzelbilder von jedem Tier zusammengefasst. Anschließend wurde eine statistische Analyse der Ergebnisse mit SPSS durchgeführt.

9.4.2 Ermittlung der Zellzahl

Für die Zellzahlbestimmung wurde die Datei mit ImageJ geöffnet und über „Plugins“ unter „Analyze“ der „Cell-Counter“ aufgerufen (Abb. 51).

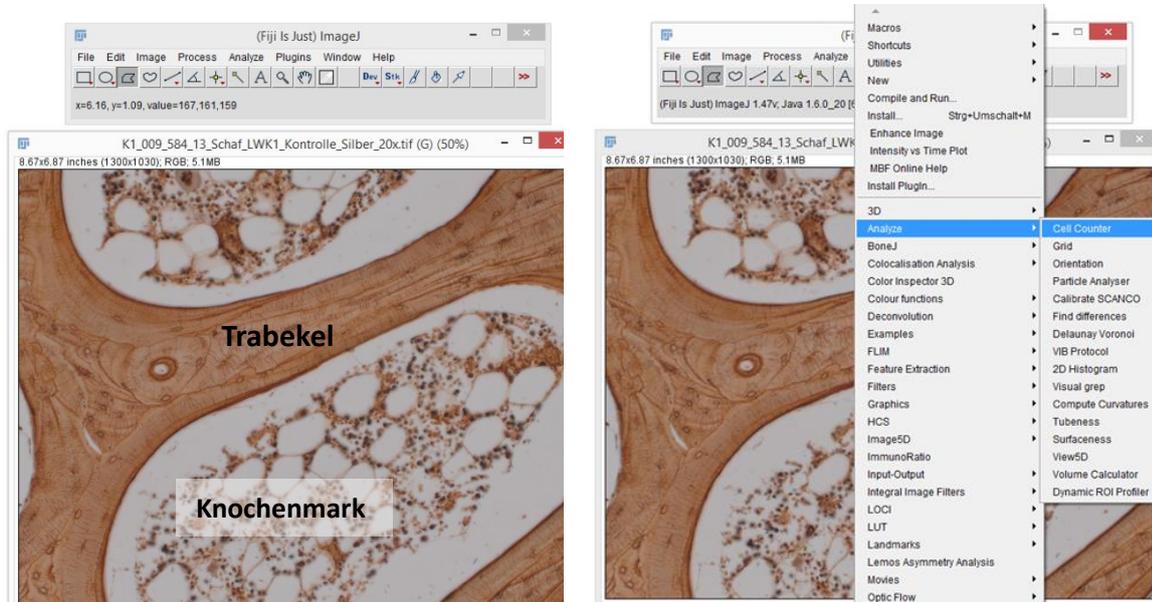


Abbildung 51: Arbeiten mit ImageJ, Analyse der Zellzahl. Daneben ist ein Trabekel und das Knochenmark gekennzeichnet.

Abbildung 52: Arbeiten mit ImageJ, Cell-Counter.

Wird der Cell-Counter geöffnet, kann man beliebig viele Kategorien definieren. Für die Analyse der Zellzahl wurden die Osteozyten in drei Kategorien eingeteilt (siehe S.41) und unter ImageJ einer Nummer von 1-3 zugeordnet. Zur Bearbeitung des Bildes, mussten sie jedoch erst initialisiert werden. Dies geschah durch Klicken auf „initialize“ (Abb. 53). Danach konnten die Zellen einer Kategorie manuell, durch Anklicken jeder einzelnen Zelle, hinzugefügt werden (Abb. 54).

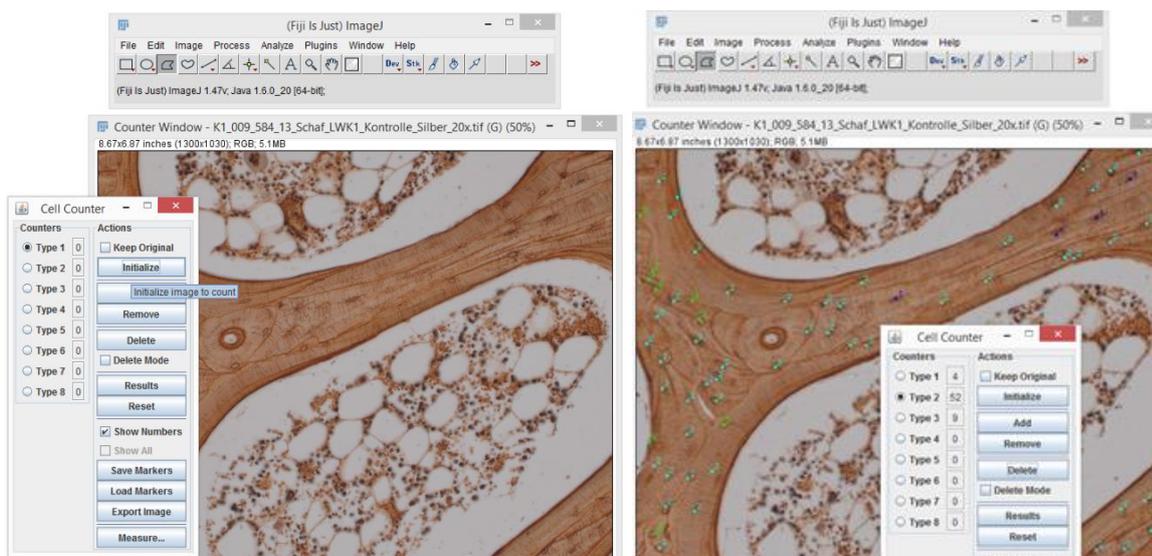


Abbildung 53: Arbeiten mit ImageJ, Initialize to count.

Abbildung 54: Arbeiten mit ImageJ, Berechnung der Zellzahl.

Durch das Klicken auf den „Results-Button“ wird die Gesamtzahl der Zellen einer Kategorie angezeigt (Abb. 55). Anschließend wurde die Zellzahl über „File“> „Save“, als Exceldatei gespeichert. Für die Analyse aus den 20 Einzelbildern wurde die Gesamtzahl der Zellen pro Tier errechnet.

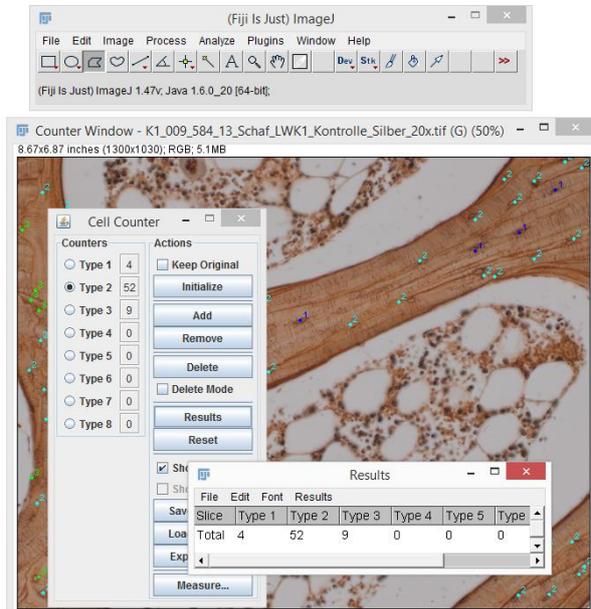


Abbildung 55: Arbeiten mit ImageJ, Results. Einzelheiten siehe Text.

9.4.3 Mikropartikelanalyse

An die deskriptive Analyse schloss sich eine objektive Mikropartikelanalyse mit dem Programm ImageJ an. Für die Berechnung der osteozytären Zellfläche und des dendritischen Netzwerks wurden die rhodamin-gefärbten Schnitte und Schlicke unter dem LCM-Mikroskop analysiert und ebenfalls mit ImageJ ausgewertet (Abb. 56). Dazu wird die entsprechende .ism- oder .tif-Datei mit FIJI geöffnet. Anschließend wird auf gleiche Weise die Skalierung eingestellt: „Analyse“ > „Set Scale“. Dabei entsprechen hier 20 μm 118 Pixel. Ebenso muss die Einstellung: Global übernommen werden (Abb. 57)

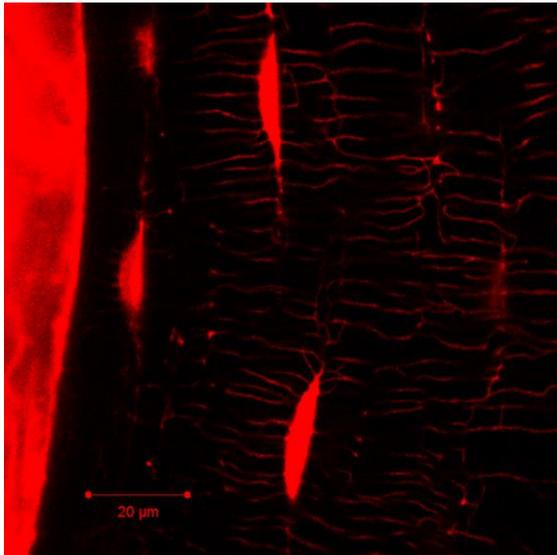


Abbildung 56: Arbeiten mit ImageJ, Partikelanalyse.

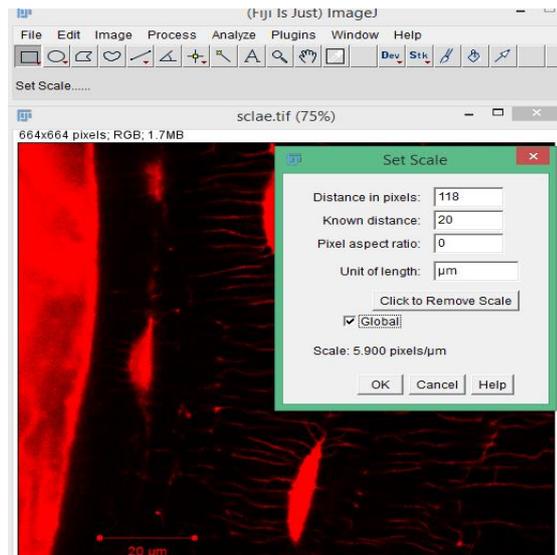


Abbildung 57: Arbeiten mit ImageJ, Einstellung der Skala

Über das Tool: „Image“ > „Colour“ > „Split Channels“ lässt sich das Bild auftrennen (Abb. 58). Dabei muss eine 8 bit Bilddatei vorliegen oder über „Image“ > „Type“ > „8 bit“ (ggf. als RGB-STACK) generiert werden. Ggf. muss der Grenzwert über: „Image“ > „Adjust“ > „Threshold“ mit den Einstellungen: „Default, Black and White“, „Dark Background“, eingestellt werden. Nach Kanaltrennung entsteht ein Schwarz-Weiß-Bild (Abb. 59).

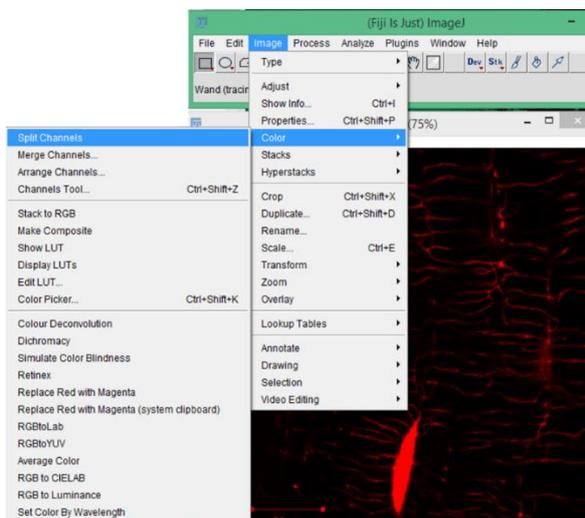


Abbildung 58: Arbeiten mit ImageJ, Mikropartikelanalyse, Split Channels.

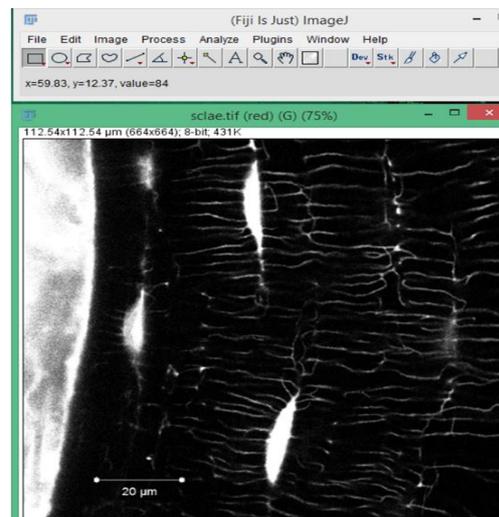


Abbildung 59: Arbeiten mit ImageJ, Mikropartikelanalyse, Nach Kanaltrennung.

Bildartefakte, die das Ergebnis verfälschen könnten, wurden zuvor manuell umrandet, ausgefüllt und der Berechnung entzogen (Abb. 60f).

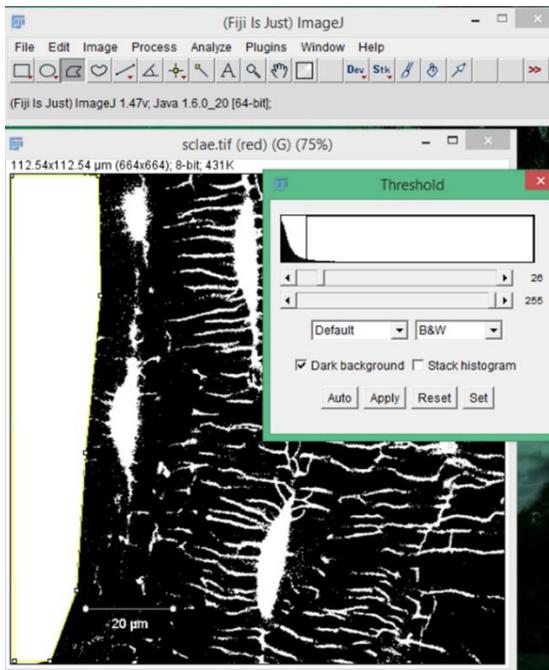


Abbildung 60: Arbeiten mit ImageJ, Mikropartikelanalyse, Einstellung des Threshold.

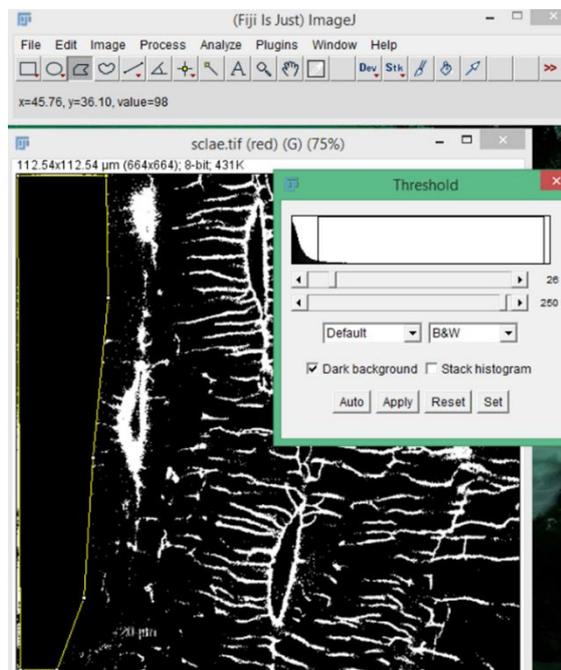


Abbildung 61: Arbeiten mit ImageJ, Mikropartikelanalyse Artefakts. Entfernung des Artefakts

Danach können die Partikel über: „Analyze“ > „Particles“ berechnet und als „Outline“ angezeigt werden (Abb. 62). Über die Analyse Funktion werden die Umrissse jedes Partikels mit definierbarer Größe berechnet und zum Roi-Manager hinzugefügt. Alle Bildpartikel können in eine Exeldatei übertragen, aufaddiert und zur Gesamtbildfläche in Verhältnis gesetzt werden.

Für die Analyse wurden 3 repräsentative Tiere ausgewählt und von den Femora 4 Bilder pro Tier und von den Beckenkämmen 3 Bilder aufgenommen.

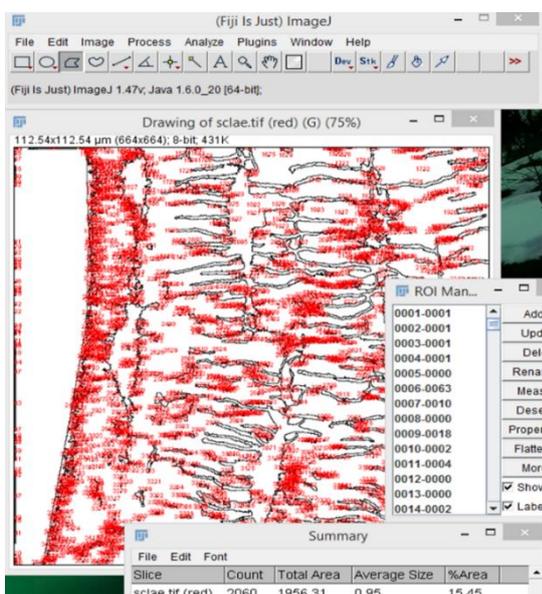


Abbildung 62: Arbeiten mit ImageJ, Mikropartikelanalyse, Analyse und Summation der einzelnen Partikel.

Erklärung zur Dissertation

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

Ort, Datum

Unterschrift

10 Publikationen und Veröffentlichungen

Artikel

Osteocytes regulation of Receptor Activator of NF- κ B Ligand/Osteoprotegerin in a Sheep Model of Osteoporosis

El Khassawna T, Merboth F, Bocker W, Malhan D, Daghma DS, Stözel S, Kern S, Hassan F, Rosenbaum D, Langenstein J, Bauer N, Schlagenhauf A, Rösen-wolff A, Schulze F, Rupp M, Hose D, Secklinger A, Ignatius A, Wilke HJ, S. LK, Heiss C..

Am J Pathol. 2017.

Poster

Osteocytes alterations affect bone microstructure in a sheep model of osteoporosis

D. Rosenbaum, W. Böcker, A. Schlagenhauf, Widmann, D. Weisweiler, M. Kampschulte, C. Heiss

Euro BioMAT 2015 : European Symposium on Biomaterials and Related Areas, Weimar 2015

Changes in osteocyte morphology and networking in an osteoporotic sheep model

D. Rosenbaum, T. El Khassawna, W. Böcker, Schlagenhauf, Widmann, D. Weisweiler, M. Kampschulte, C. Heiss,

Nachwuchswissenschaftlerkongress, Rauschholzhausen 2015

11 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mich aufrichtig und ernsthaft durch meine Promotion begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Heiß für die Möglichkeit zur Promotion und Mitarbeit in einem solch interessanten und transregionalen Projekt sowie der Betreuung während der gesamten Zeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. med. Markus Rupp bedanken, der mich intensiv und konstruktiv unterstützt hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie in Gießen für die freundliche Aufnahme in das Team und die Hilfsbereitschaft bei aufkommenden Fragen. Mein Dank gilt insbesondere Annette Stengel sowie dem gesamten Team für die gute Zusammenarbeit, die Einarbeitung sowie den Erkenntnisaustausch.

Insbesondere möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während meiner Promotion bedanken. Vielen Dank für die Geduld, die Motivation und Zuversicht. An dieser Stelle möchte ich Eva Fleischmann und Vivian Bunte nennen.

Und zu guter Letzt AnnenMayKantereit für den musikalischen Ausgleich.

12 Tabellarischer Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

