

**EVALUATION DER KNOCHENARCHITEKTUR IM STEROID-INDUZIERTEN
OSTEOPOROSEMODELL DER RATTE MITTELS MIKRO-CT**

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

vorgelegt von Miriam Faulenbach
geboren in Gießen

Gießen 2013

Aus dem medizinischen Zentrum für Radiologie
Abteilung für Diagnostische Radiologie
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Leitung: Prof. Dr. med. G. Krombach

Gutachter: Prof. Dr. med. A. C. Langheinrich

Gutachter: Prof. Dr. med. A. Schäffler

Tag der Disputation: 12.06.2014

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
1	KNOCHENVERLUST IM ALTER BIS HIN ZUR OSTEOPOROSE	1
1.1	DEFINITION DER OSTEOPOROSE	2
1.2	ALTERS-ASSOZIIERTE VERÄNDERUNGEN IM KNOCHEN.....	4
1.2.1	DER EINFLUSS AUF KORTIKALIS UND SPONGIOSA.....	5
1.2.2	STRUKTURELLE VERÄNDERUNGEN DER MIKROARCHITEKTUR.....	7
1.2.3	ENTWICKLUNG DES PHYSIOLOGISCHEN UND POSTMENOPAUSALEN KNOCHENVERLUSTES AUF HORMONELLER, MOLEKULARER UND ZELLULÄRER EBENE	8
1.3	PATHOPHYSIOLOGISCHE BESONDERHEITEN IM KNOCHENMETABOLISMUS DER OSTEOPOROSE	11
1.4	KLINIK DER OSTEOPOROSE.....	12
1.5	RISIKEN.....	13
1.5.1	HÄUFIGSTE RISIKOFAKTOREN OSTEOPOROTISCHER FRAKTUREN.....	13
1.5.2	GLUKOKORTIKOID-THERAPIE ALS RISIKOFAKTOR.....	15
2	TIERMODELL	16
2.1	IMITATION DER MENOPAUSE DURCH EXPERIMENTELLE OVAREKTOMIE (OVX) AM TIERMODELL DER RATTE	17
2.2	STEROID-INDUZIERTE OSTEOPOROSE	18
3	BILDGEBENDE VERFAHREN.....	19
3.1	DUALE RÖNTGEN-ABSORPTIOMETRIE (DXA)	20
3.2.1	TECHNOLOGIE DER MIKRO-CT	21
3.2.2	STRUKTURPARAMETER ZUR ANALYSE DER TRABEKULÄREN MIKROARCHITEKTUR.....	24
4	ZIEL UND FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	27
II	MATERIAL UND METHODEN	29
1	TIERMODELL	29
1.1	STUDIENDESIGN UND DURCHFÜHRUNG	29
1.2	PRÄPARATION.....	31
2	BILDGEBENDE VERFAHREN – MIKRO-CT	32
2.1	AKQUISITION DER DATEN.....	32

2.2	REKONSTRUKTION DER DATEN	33
2.3	QUANTITATIVE BILDANALYSE	34
2.3.1	DATAVIEWER®	34
2.3.2	CT-ANALYSER®	35
2.3.2.1	<i>BESTIMMUNG DES PROBENUMFANGES</i>	35
2.3.2.2	<i>BESTIMMUNG DER TRABEKULÄREN REGION OF INTEREST</i>	36
2.3.2.3	<i>BERECHNUNG DER STRUKTURPARAMETER</i>	36
2.3.2.4	<i>BESTIMMUNG DER TRABEKULÄREN AUSDEHNUNG</i>	37
3	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	37
III	ERGEBNISSE	39
1	TH10.....	39
1.1	VERÄNDERUNGEN DER MIKROARCHITEKTUR IM ZEITLICHEN VERLAUF INNERHALB EINER UNTERGRUPPE.....	39
1.1.1	SHAM (GRUPPE X1) IM ZEITLICHEN VERLAUF	39
1.1.2	OVX + STEROIDE (GRUPPE X2) IM ZEITLICHEN VERLAUF	42
1.2	VERÄNDERUNGEN DER MIKROARCHITEKTUR ZWISCHEN DEN UNTERGRUPPEN INNERHALB EINES ZEITPUNKTES.....	46
1.2.1	VERÄNDERUNGEN NACH 1 MONAT	46
1.2.2	VERÄNDERUNGEN NACH 3 MONATEN.....	46
1.2.3	VERÄNDERUNGEN NACH 12 MONATEN.....	47
1.2.4	VERÄNDERUNGEN NACH 14 MONATEN.....	48
2	TIBIAE	49
2.1	VERÄNDERUNGEN DER MIKROARCHITEKTUR IM ZEITLICHEN VERLAUF INNERHALB EINER UNTERGRUPPE.....	49
2.1.1	SHAM (GRUPPE X1) IM ZEITLICHEN VERLAUF	49
2.1.2	OVX + STEROIDE (GRUPPE X2) IM ZEITLICHEN VERLAUF	52
2.2	VERÄNDERUNGEN DER MIKROARCHITEKTUR ZWISCHEN DEN UNTERGRUPPEN INNERHALB EINES ZEITPUNKTES.....	56
2.2.1	VERÄNDERUNGEN NACH 1 MONAT	56
2.2.2	VERÄNDERUNGEN NACH 3 MONATEN.....	57
2.2.3	VERÄNDERUNGEN NACH 12 MONATEN.....	58
2.2.4	VERÄNDERUNGEN NACH 14 MONATEN.....	60
3	SPONGIOSALÄNGE	61
3.1	VERÄNDERUNGEN DER SPONGIOSALÄNGE IM ZEITLICHEN VERLAUF INNERHALB EINER UNTERGRUPPE.....	61

3.1.1	SHAM (GRUPPE X1) IM ZEITLICHEN VERLAUF	62
3.1.2	OVX + STEROIDE (GRUPPE X2) IM ZEITLICHEN VERLAUF	62
3.2	VERÄNDERUNGEN DER SPONGIOSALÄNGE ZWISCHEN DEN UNTERGRUPPEN INNERHALB EINES ZEITPUNKTES.....	63
3.2.1	VERÄNDERUNGEN NACH 1 MONAT.....	63
3.2.2	VERÄNDERUNGEN NACH 3 MONATEN.....	63
3.2.3	VERÄNDERUNGEN NACH 12 MONATEN.....	63
3.2.4	VERÄNDERUNGEN NACH 14 MONATEN.....	63
IV	DISKUSSION.....	67
1	MIKRO-COMPUTERTOMOGRAPHIE	67
2	TIERMODELL	68
3	VERÄNDERUNGEN DER STRUKTURPARAMETER UND SPONGIOSALÄNGE.....	69
3.1	BV/TV UND TRABEKULÄRE AUSDEHNUNG DER TIBIA.....	69
3.2	Tb.TH, Tb.N UND Tb.SP	73
3.3	Tb.PF UND SMI	77
3.4	I.S.....	81
4	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	82
5	LIMITATIONEN	84
V	ZUSAMMENFASSUNG.....	85
1	ENGLISCH.....	85
2	DEUTSCH	86
VI	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	87
VII	DARSTELLUNGS-, ABBILDUNGS-, TABELLENVERZEICHNIS.....	92
VIII	LITERATURVERZEICHNIS.....	97
IX	ANHANG.....	112
X	PUBLIKATIONEN.....	113

XI EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG 114

XII DANKSAGUNG 115

I EINLEITUNG

Die Weltbevölkerung altert im Rahmen des demographischen Wandels kontinuierlich.

Berechnungen des Statistischen Bundesamtes zufolge wird sich in Deutschland der prozentuale Anteil der über 65-jährigen von 20% im Jahre 2008 auf 34% im Jahre 2060 erhöhen, wobei 14% dann bereits das 80. Lebensjahr überschritten haben werden.

Je nach Annahme steigen die durchschnittlichen Lebenserwartungen bei Geburt im Jahre 2060 im Vergleich zu 2008 für Männer um 7,8 bis 10,6 Jahre, für Frauen um 6,8 bis 8,8 Jahre. 2060 geborene Jungen werden somit rein rechnerisch im Durchschnitt 85 bis 87,7 Jahre alt. Die im gleichen Jahr geborenen Mädchen werden ein Alter von 89,2 bis 91,2 Jahren erreichen.¹

Damit einhergehend werden die Prävalenz alters-assoziierter bzw. –bedingter Erkrankungen sowie daran geknüpfte Ausgaben im Gesundheitssystem in den nächsten Jahrzehnten weiter zunehmen. Muskuloskelettale Erkrankungen spielen dabei eine nicht zu vernachlässigende Rolle.²

1 KNOCHENVERLUST IM ALTER BIS HIN ZUR OSTEOPOROSE

So hat auch die Osteoporose in den letzten Jahren deutlich an Aufmerksamkeit in der Bevölkerung gewonnen.³ Sie zeichnet sich aus durch einen kontinuierlichen Rückgang der Knochenmasse sowie gleichzeitig auftretende Veränderungen der ossären (Mikro-) Architektur. Folgen sind eine erhöhte Fragilität des Skelettsystems und das Risiko bereits bei nicht adäquaten Traumen eine Fraktur zu erleiden.⁴⁻⁶ Dieser Knochenschwund betrifft organische wie anorganische Knochenmatrix zu gleichen Teilen.⁶

Lange Zeit können die Veränderungen jedoch unentdeckt bleiben und klinische Symptome, die auf eine Osteoporose hindeuten, fehlen. Daher ist es häufig schwer, die Erkrankung in einem frühen Stadium zu erkennen, um präventiv therapieren zu können.

Zahlreiche Studien und Umfragen der letzten zwei Jahrzehnte, die meist auf Eigenangaben und (telefonischen) Befragungen der Patienten beruhen, zeigen die Prävalenz der Osteoporose auf. So lag beispielsweise in England und Wales 1985 die Lebenszeitprävalenz für über 50-jährigen Männer bei 5,8%, die für Frauen jedoch bei 22,5%.⁷ Auch in Deutschland fanden sich in den letzten Jahren ähnliche Zahlen. *Hadjj et al.* (Bone Evaluation Study BEST) und das Robert-Koch-Institut (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2010) nennen für die Lebenszeitprävalenz

der Osteoporose in Deutschland für Männer im Alter von über 50 Jahren 6%⁸ bzw. 4,4%⁹. Bei Frauen ab 50 Jahren belaufen sich die Zahlen auf 24%⁸ bzw. 17,1%⁹.

Betrachtet man die Ergebnisse der Studien in einer Zusammenschau, geht hervor, dass ab ca. 50 Jahren ein signifikanter Unterschied der Lebenszeitprävalenz zwischen den Geschlechtern mit deutlich höheren Zahlen bei weiblichen Patienten vorliegt sowie zusätzlich ein ebenso deutlicher Anstieg bei Frauen im steigenden Alter zu finden ist.⁷⁻¹² Aufgrund der intensiven Forschung im Bereich der Osteoporose gibt es immer wieder neue Fakten, die z.T. in die Auswahl teilnehmender Patienten oder in die Methodik der Studien mit einfließen. Dies resultiert häufiger in kleineren Unterschieden der Prävalenzangaben der letzten Jahrzehnte. Änderungen der Diagnose- und Abrechnungskriterien sind dabei jedoch auch nicht zu vernachlässigen.^{4,8,9}

1.1 DEFINITION DER OSTEOPOROSE

Aktuell sind als Kriterien, die die Definition der Osteoporose essentiell mitbestimmen und die klinische Diagnose festlegen, die Knochendichte⁴ sowie das Vorliegen von Frakturen zu nennen.

Dazu wird die Knochendichte quantitativ meist mittels DXA (Dual-Energy X-ray Absorptiometry, Doppelröntgen-Absorptiometrie)¹³ bestimmt, da man über sie zu einem großen Teil Aussagen über die Stärke des Knochens treffen kann.¹⁴ Messungen sollen standardmäßig am Oberschenkelhals durchgeführt werden. Allerdings können auch andere Bereiche, die sich relativ zentral im Skelettsystem befinden, wie beispielsweise die Hüfte oder der lumbale Bereich der Wirbelsäule, zur Messung herangezogen werden.¹³

Der erhobene Messwert der Knochendichte (BMD, bone mineral density) kann sowohl zweidimensional als Knochenmasse pro Flächeneinheit als auch dreidimensional pro Volumeneinheit angegeben werden.¹⁴ Er wird in Relation zu einem standardisierten Mittelwert gesetzt, der sich aus Messungen von kaukasischen, gesunden jungen Frauen im Alter von 20 bis 29 Jahren aus der NHANES Referenzdatenbank errechnet.^{13,15,16} Die Abweichung der Knochendichte vom Durchschnittswert wird in Standardabweichungen (SD) angegeben und als T-Wert bezeichnet. Allerdings ist der T-Wert nur bei einem Patientengut bestehend aus Männern ab 50 Jahren und Frauen ab der Menopause anzuwenden. Liegen andere Populationen oder Messtechniken vor, sollte die Bezeichnung Z-Wert den Vorrang erhalten.¹³ Weiterhin wird in dieser Arbeit jedoch die Rede vom T-Wert sein.

Mithilfe des T-Wertes ist somit eine klare Einteilung in unterschiedliche Schweregrade möglich (siehe Tabelle 1.1).

Bis zu einer Standardabweichung von -1 wird der Zustand der Knochendichte als *normal* bezeichnet. Liegt der T-Wert hingegen zwischen den beiden Werten -1 SD und -2,5 SD, handelt es sich definitionsgemäß um eine erniedrigte Knochendichte, auch *Osteopenie* genannt. Ab einer Abweichung von der Referenzgruppe um mindestens 2,5 Standardabweichungen (T-Wert < -2,5 SD)³, liegt laut WHO eine Erkrankung an *Osteoporose* vor. Wird zusätzlich noch eine Fraktur jeglicher Art und Lokalisation diagnostiziert, wird von einer *manifesten Osteoporose* gesprochen.^{7,13,17}

T-WERT	SCHWEREGRAD
≥ -1 SD	Normale BMD
-2,5 SD < x < -1 SD	Osteopenie, reduzierte BMD
≤ -2,5 SD	Osteoporose
≤ -2,5 SD + Fraktur	Manifeste Osteoporose

Tabelle 1.1: Einteilung des Schweregrades bei Knochendichteverlust

Wenngleich die Knochendichte kontinuierlich im Alter abnimmt, kann auch im hohen Alter eine Normalverteilung ermittelt werden. Das Vorkommen eines T-Wertes von ≤ -2,5 SD ist jedoch bei älteren Patienten um ein Vielfaches höher.⁷

Der Dachverband Osteologie (DVO) benennt in seiner aktuellsten Leitlinie aus dem Jahre 2009, ausgehend von T-Werten der DXA-Messungen, einen enormen Anstieg der Osteoporoseprävalenz: Sind in den deutschsprachigen Ländern von den 55-jährigen, bereits in der postmenopausalen Phase befindlichen Patientinnen ca. 7% von einer Osteoporose laut WHO-Definition betroffen, finden sich bei den 80-jährigen rund 19% diagnostizierte Patientinnen.⁴

Die Osteoporose kann in eine primäre und sekundäre Form unterteilt werden, die weitere Untergruppen aufweisen.

Die primäre Osteoporose kommt mit bis zu 90%¹⁸ weitaus häufiger vor. Unter dieser Bezeichnung finden sich die postmenopausale, die senile und die idiopathische Osteoporose wieder. Sie unterscheiden sich in ihren Pathomechanismen, die auf verschiedenen Ebenen wirken und bis heute noch nicht vollständig verstanden sind.¹⁹

Die sekundäre Osteoporose hingegen entwickelt sich auf der Grundlage von (systemischen) Grunderkrankungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus oder anderen hormonellen Dysfunktionen. Aber auch Immobilisation und medikamentöse Therapien, v.a. mit Glukokortikoiden können eine Osteoporose hervorrufen.⁶

Mit zunehmendem Alter der Bevölkerung und der nachgewiesenen höheren Lebenszeitprävalenz beim weiblichen Geschlecht⁷⁻¹² rückt allerdings v.a. die postmenopausale Osteoporose in das Interesse der Forschung und wird in dieser Arbeit näher betrachtet.

1.2 ALTERS-ASSOZIIERTE VERÄNDERUNGEN IM KNOCHEN

Im Laufe der Kindheit und Adoleszenz befindet sich das Skelettsystem des Menschen kontinuierlich im Aufbau, wobei eine Calcium- und Vitamin D-reiche Ernährung sowie Beanspruchung des Bewegungsapparates zusätzlich positiven Einfluss darauf haben.²⁰ Eine nicht zu vernachlässigende Rolle spielen jedoch auch genetische Aspekte, die dem Individuum eine entsprechende Anreicherung an Knochenmasse vorgeben.²¹⁻²³

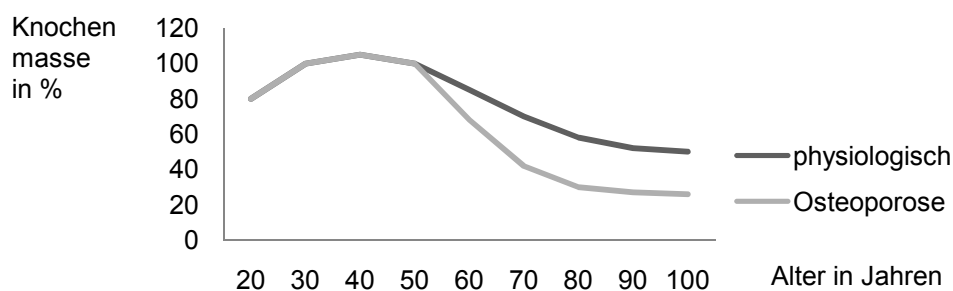


Abbildung 1.1: Vergleichende Darstellung des Verlaufes des prozentualen Knochengehaltes im Laufe des Lebens unter physiologischen bzw. postmenopausal-osteoporotischen Verhältnissen. Modifiziert nach Niethard F., Pfeil J., *Duale Reihe Orthopädie*, 5. Auflage.⁶

Mit ca. 30 bis 50 Jahren schließt der Körper die stetige Zunahme der ossären Masse ab, die in dieser Zeit eine Art Plateauphase erreicht. Der vorhandene Gehalt an Knochengewebe stellt die sogenannte „Peak Bone Mass“, die höchste Knochenmasse, die jemals im Leben erreicht werden kann, dar. Da sie von dort an Ausgangspunkt für die beim alternden Patienten physiologische Altersatrophie ossärer Strukturen ist, ist es essentiell, möglichst hohe Werte vorliegen zu haben.⁶ Dies impliziert nachweislich ein geringeres Risiko, an Osteoporose zu erkranken.²⁴

Ab einem Alter von ca. 40 bis 50 Jahren beginnt die natürliche Rückbildung des Knochengewebes, anfangs langsam (0,3 – 0,5% jährlich), dann etwas schneller und läuft zum Ende des Lebens langsam bei ungefähr 50% der „Peak Bone Mass“ aus.⁶

Diese Art von Knochenschwund – auch als Altersatrophy bezeichnet – ist in beiden Geschlechtern anzutreffen^{25–28} und zeigt keinerlei Symptomatik¹³.

1.2.1 DER EINFLUSS AUF KORTIKALIS UND SPONGIOSA

Makroskopisch ist er sowohl in den trabekulären^{27,28} als auch kortikalen Anteilen des Knochengewebes sichtbar.^{6,25,26,29} Allerdings ergeben sich Unterschiede bezüglich des zeitlichen Verlaufes und der prozentualen Abnahme von kortikalen Anteilen bzw. Spongiosa sowie auch zwischen Männern und Frauen. Als Hauptursache dafür ist die bei Frauen im Alter von ca. 50 bis 55 Jahren eintretende Menopause mit all ihren weitreichenden hormonellen Veränderungen zu nennen.

Physiologischer Weise kommt es bei weiblichen Individuen ab Erreichen des Alters der „Peak Bone Mass“ zu einer kontinuierlichen Reduktion des trabekulären Knochengewebes um 55 bis 60%. Die Abnahme der Kompakta beträgt ca. 35 bis 40%. Auch bei Männern ist ein deutlicher Verlust der Knochenmasse auszumachen, der sich jedoch auf ca. zwei Drittel des weiblichen Knochenabbaus beschränkt.⁶

In Abgrenzung zu Osteopathien, die ebenfalls eine geringere Dichte des Knochens aufweisen, wie z.B. die Osteomalazie, ist hervorzuheben, dass sich das Verhältnis zwischen organischer (hauptsächlich Kollagen Typ I, 90 – 95%) und anorganischer Matrix (Hydroxylapatit, $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$) mit ca. 35:65³⁰ nicht verändert.⁶

Bereits fünf bis zehn Jahre prämenopausal zeigen sich erste Veränderungen des trabekulären Gewebes, die auf einen Abbau hindeuten. Dieser verstärkt sich und nimmt zum Zeitpunkt der Menopause²⁵ mit 4 bis 8% jährlich eine deutlich höhere Position als der die Kortikalis betreffende Abbau ein. Dieser hingegen beginnt erst mit Eintritt der menopausalen Hormonlage und beträgt ca. 2 bis 3% jährlich. In dieser Intensität dauert er etwa acht bis zehn Jahre⁶ an, ist jedoch mit einer geringen Rate bis ans Ende des Lebens nachzuweisen.³¹

Die beschriebenen Mechanismen des altersabhängigen sowie perimenopausalen Knochenstoffwechsels kommen somit zeitgleich vor und können zu einer starken Reduktion v.a. der spongiösen Knochenmasse (Osteopenie) bis hin zur Osteoporose führen.

Auf der Grundlage von DXA-Messungen zahlreicher Studien können *Khosla und Riggs*³¹ einen deutlichen Unterschied in der Abnahme der Knochendichte bezüglich der Unterteilung in spongiösen bzw. kortikalen Anteil bei Männern und Frauen veranschaulichen (siehe Abbildung 1.2).

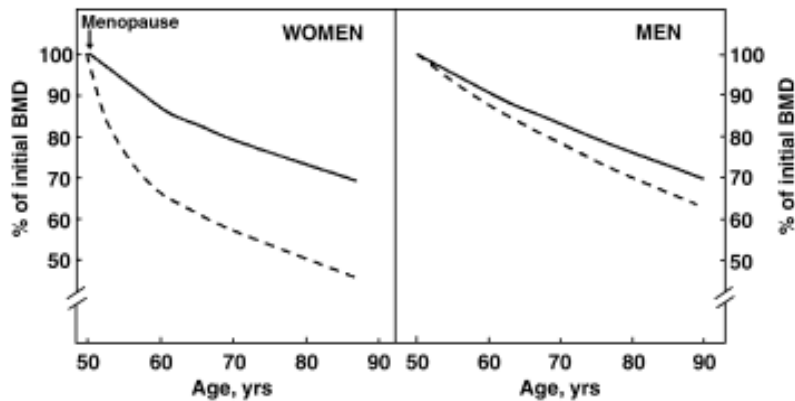


Abbildung 1.2: Geschlechtervergleichende Darstellung der alters-assoziierten Abnahme der gesamten Knochendichte, basierend auf Querschnitts- sowie Längsstudien mittels DXA-Messungen. Durchgezogene Linien zeigen den Verlauf der kortikalen Abnahme, die gestrichelten Linien demonstrieren die Veränderungen des trabekulären Gewebes. Abbildung übernommen aus *Pathophysiology of Age-Related Bone Loss and Osteoporosis*, Khosla S und Riggs B L, *Endocrinol Metab Clin N Am*, 34 (2005) 1015–1030.³¹

Darin wird sichtbar, dass eine annähernd gleiche Minderung der kompakten Knochendichte bei Männern und Frauen einem deutlich stärkeren Verlust der trabekulären Dichte auf Seiten der Frauen gegenübersteht, die sich vor allem im Bereich des Beckens, der Wirbelkörper sowie des unmittelbar am Gelenk angrenzenden distalen Radius nachweisen lässt.³¹

Der Rückgang des kortikalen Gewebes im Rahmen des Alterungsprozesses zeigt einige Besonderheiten auf. Denn vor allem die endokortikalen Anteile, die an die mit Spongiosa gefüllte Knochenhöhle angrenzen, sind davon betroffen.^{32–35} In einer Studie von *Ruff und Hayes*³⁴ kann dort ein Unterschied zwischen den Geschlechtern dargestellt werden. Die Verfolgung der morphologischen Veränderungen von Tibiae und Femora alternder Patienten zeigen bei Frauen wie Männern einen endokortikalen Abbau. Bei den weiblichen Knochenproben wird jedoch ein signifikant geringerer subperiostaler Knochenaufbau³² beschrieben, der in einer verminderten kortikalen Fläche resultiert.³⁴

Auch die nachweisliche Anreicherung von Knochengewebe vor allem im endokortikalen Bereich nach Gabe von Bisphosphonaten (Alendronat und Risedronat) lassen im umgekehrten Sinne somit Rückschlüsse auf Veränderungen im alternden Knochen zu.³⁶ Durch die Kenntnis ihrer Wirkmechanismen, wie die Hemmung der Osteoklasten, findet die Annahme von *Keshawarz et al.*³³ weitere Unterstützung. Sie besagt einen hohen vorherrschenden Abbau durch Osteoklasten bei gleichzeitig inadäquat niedriger Osteoblastenaktivität. Ein starkes Aufkommen solcher Resorptionshöhlen endokortikal einhergehend mit der Entstehung neuer, grober

trabekulärer Strukturen ist die Folge.³³ Mit zunehmendem Alter und Abnahme der Knochenmasse erfolgt zusätzlich eine Größenzunahme des mit trabekulärem Gewebe ausgekleideten Markraumes.^{33,34} Dabei konnte auch ein Anstieg des fetthaltigen Knochenmarkes nachgewiesen werden, der im Alter zusammen mit einem Rückgang des spongiösen Gewebes auffällt.³⁷

1.2.2 STRUKTURELLE VERÄNDERUNGEN DER MIKROARCHITEKTUR

Die Größenzunahme der Markhöhle impliziert jedoch nicht, dass eine Zunahme der Spongiosa zu verzeichnen ist. Wie bereits in dieser Arbeit erwähnt wurde, ist sogar ein noch deutlicherer Verlust der trabekulären Strukturen im Rahmen des Alterns vorzufinden.

Die bereits makroskopisch sichtbaren Unterschiede in der Reduktion von trabekulärem bzw. kortikalem Knochen, die zwischen Männern und Frauen im höheren Alter auftreten, sind auch in der mikroskopisch-histologischen Ebene zu finden und zeigen somit verschiedene Bilder des alters-assoziierten Knochenschwundes.²⁷

Die Anordnung der Trabekel im spongiösen Knochen kann mit bestimmten Strukturparametern genauer definiert und charakterisiert werden. Vergleiche dieser Parameter von Knochenproben verschiedener Altersklassen lassen Rückschlüsse auf etwaige Veränderungen der Mikroarchitektur zu. Bereits mit der histologischen Auswertung ossärer Schnittpräparate war dies möglich. Der enorme Fortschritt im Bereich bildgebender Verfahren der letzten Jahrzehnte hilft allerdings dabei, eine immer genauer werdende Rekonstruktion und dreidimensionale Visualisierung der Probe durchführen zu können. Wichtige Punkte in der Pathogenese von Osteopathien können somit eventuell entdeckt und leichter nachvollziehbar werden.

Essentiell im Zusammenhang mit Osteopenien, wie dem alters-assoziierten Verlust an Knochenmasse sowie der Osteoporose, sind dabei v.a. der prozentuale Gehalt von Trabekeln bzw. Knochenvolumen im gesamten Markraum (BV/TV [%]), die Anzahl der Trabekel pro Fläche (Tb.N [$1/\text{mm}^2$]) – in manchen Arbeiten auch durch die Angabe der trabekulären Dichte beschrieben⁻³⁸, die Dicke dieser Strukturen (Tb.Th [mm]) und die Entfernung zwischen ihnen (Tb.Sp [mm]). Diese Werte konnten auch bereits mittels mikroskopischer Technik bestimmt werden. Eine genauere Beschreibung der Strukturparameter erfolgt später in dieser Arbeit im Kapitel 3.2.2 der Einleitung.

So konnte bereits vor gut 30 Jahren quantitativ nachgewiesen werden, dass generell in Knochenproben älterer Individuen neben einer Abnahme des spongiösen

Knochenvolumens eine erhöhte intertrabekuläre Distanz sowie Minderung der trabekulären Dicke³⁹ und der Anzahl einzelner Trabekel vorliegen.^{38,40}

Obwohl eine Reduktion des gesamten Volumens ein Charakteristikum beider Geschlechter darstellt, weist eine genauere Betrachtung Unterschiede auf.

So kann die prozentuale Knochenvolumenabnahme zum einen durch eine Schwächung des trabekulären Gewebes an sich im Sinne einer Ausdünnung auftreten, wie es häufig signifikant in männlichen Knochenproben vorzufinden ist.^{27,28,38} Ein wesentlicher Grund dafür scheint in einer herabgesetzten Entstehung neuen Knochengewebes zu liegen.²⁷

Zum anderen führt eine Auslöschung ganzer Trabekel mit konsekutiv minimierter Trabekelanzahl zu einem Verlust an Volumen. Dies ist ein hauptsächlich bei weiblichen Individuen gefundenes Phänomen.^{27,28,39,41} Eine stärkere Resorption an der spongiösen Oberfläche und die darauf folgende punktuelle Perforation einzelner Trabekel³⁸ werden als die ursächlichen Mechanismen angenommen.²⁷ Das Wegfallen ganzer Strukturen wiederum erhöht die Entfernung noch vorhandener Trabekel voneinander.²⁸

Bemerkenswert sind in diesem Zusammenhang die Studienergebnisse an einem dem trabekulären Wirbelkörperaufbau nachvollzogenen Modell von *Silva und Gibson*⁴². Ausgehend von der prozentual gleichen Knochenvolumenreduktion durch Verringerung der Trabekeldicke bzw. der Anzahl konnte bei letzterer ein zwei- bis fünffach höherer negativer Einfluss auf die Stärke des Knochens festgestellt werden.⁴² Die Kenntnis, dass hauptsächlich Frauen eine signifikante Abnahme der Trabekelanzahl aufweisen und die Stärke des Knochens damit deutlich reduziert wird, unterstützt die Annahme über den Zusammenhang zwischen Frauen im (peri-)menopausalen Alter und erhöhter Frakturgefahr.⁴³

Da alters-assoziierter Knochenverlust und Osteoporose am häufigsten im fortgeschrittenen Alter des weiblichen Geschlechts anzutreffen sind, wird sich diese Arbeit im Folgenden auf die genauere Betrachtung der postmenopausalen Osteoporose beschränken.

1.2.3 ENTWICKLUNG DES PHYSIOLOGISCHEN UND POSTMENOPAUSALEN KNOCHENVERLUSTES AUF HORMONELLER, MOLEKULARER UND ZELLULÄRER EBENE

Immer wieder wird deutlich, dass sich mit Eintritt der Menopause und daraus folgender hormoneller Umstellungen ein enormer Verlust der Knochenmasse der physiologischen Abnahme auflagert.

Unausweichlich richtet sich dabei die Suche nach Ursachen auf die Stagnation der Östrogenproduktion durch Versiegen der Ovarialfunktion zum Zeitpunkt der Menopause. Bei weiter bestehender Stimulationsversuche durch die Gonadotropine FSH und LH sinken Östrogene und Progesteron jedoch auf niedrigste Werte. So weist Östradiol als aktivste Form der Östrogene mit einem Wert unter 20 pg/ml nur ungefähr 10 bis 15 Prozent des Hormonspiegels der prämenopausalen Phase^{31,44} jüngerer Frauen auf.⁴⁵ Aber auch bei Männern und prämenopausalen Frauen kann ein nicht ausreichendes Vorliegen von Östrogenen eine deutliche Reduktion der Knochenmasse bedingen.^{5,46}

Östrogen besitzt eine Vielzahl von Auswirkungen auf den menschlichen Körper. Sowohl molekular als auch zellulär ergeben sich somit Veränderungen bei einer vorliegenden Östrogen-Defizienz, die noch nicht endgültig geklärt sind und weitere Forschungsansätze darstellen.⁴³

Bezogen auf die knöcherne Abnahme scheint der Einfluss des Östrogenmangels nach ungefähr vier bis zehn Jahren kaum noch merklich zu sein.^{31,43} Der stattgefundenen und gravierende Um- und Abbau des Knochengewebes ist allerdings nur zu einem Teil reversibel und bleibt daher mit seinen weitreichenden Folgen bestehen.⁴⁷

Im ausgewogenen Hormonhaushalt der prämenopausalen Frau – sowie auch zu Teilen des Mannes – weist die Gruppe der Östrogene direkte und indirekte Wege zur Regulation des Kalzium- und Phosphathaushaltes und somit des Knochenmetabolismus auf.⁴⁸ Generell haben Östrogene einen anabolen Effekt auf den Knochen und unterstützen die Mineralisierung.^{48,49}

So wird beispielsweise die (Wieder-)Aufnahme von Calcium und Phosphat in Enterozyten^{48,50} sowie Tubuluszellen der Niere⁵⁰ durch Östrogen begünstigt und Synthese bzw. Sekretion von Prokollagen⁵¹, TGF- β ⁵² und Wachstumsfaktoren, wie IGF-1^{48,51} vorangetrieben.

Zellulär kommt es dabei zur Interaktion mit Osteoblasten, Osteozyten sowie Osteoklasten. Bereits in der Reihe der Vorläuferzellen kann ein Zusammenspiel nachgewiesen werden. Somit fördert Östrogen die Ausreifung der Osteoblasten entlang der einzelnen Entwicklungsstufen über Präosteoblasten bis hin zur funktionstüchtigen Zelle.⁵³ Des Weiteren sorgt es für ein Herabsetzen der Apoptoserate von Osteoblasten sowie Osteozyten.^{53–55}

Im Gegenzug dazu kann bei Östrogenspiegeln auf prämenopausalem Level eine höhere Apoptoserate von Osteoklasten, sowohl direkt⁵⁶ als auch indirekt z.B. TGF- β -vermittelt⁵⁷, nachgewiesen werden.

Die interzelluläre Verständigung mittels zahlreicher Mediatoren, wie Zytokine und Prostaglandine, kann ebenfalls erheblich durch den Östrogenspiegel beeinflusst werden. Nach bisherigen Studien bestehen Hinweise auf einen reduzierenden Effekt des Östrogens auf die Ausschüttung von $\text{TNF-}\alpha$ ^{48,58,59}, IL-1 ^{58,60,61}, IL-6 ^{62,63}, M-CSF ^{61,64} sowie PGE_1 und PGE_2 ^{48,58,60}. Die proresorptive Wirkung dieser Stoffe wird somit kontrolliert und das Gleichgewicht im Knochenstoffwechsel aufrecht erhalten.

Forschungsgruppen mit Schwerpunkten in der Genetik des Knochenstoffwechsels können in der letzten Zeit große Fortschritte erzielen und identifizieren stetig weitere Genloci, die einen wichtigen Beitrag zum gleichmäßigen Metabolismus tätigen. Dank dieser Studien konnten *Ralston und Uitterlinden*⁶⁵ 2010 bereits 24 Gene bzw. Genloci auflisten, die nachweisliche Auswirkungen auf die Entwicklung der Knochendichte haben. Am häufigsten werden in der aktuellen Literatur dabei immer wieder Genprodukte, wie RANKL (Rezeptoraktivator des nukleären Faktors NF κ B Ligand)^{66–69}, OPG (Osteoprotegerin)^{66,70,71}, LRP5 (low-density lipoprotein receptor-related protein 5)^{22,72}, SOST (Sclerostin)⁷³ und Wnt⁷⁴ genannt.⁷⁵

Der Interaktion zwischen RANKL, RANK und OPG wird dabei momentan der stärkste Einfluss zugesprochen.⁶⁶

RANKL ist u.a. ein Produkt osteoblastärer Vorläuferzellen und T-Zellen und wird zur Gruppe der TNF ⁷⁶ gezählt. Physiologischer Weise bindet es an den osteoklastär-gebundenen Rezeptor RANK und nimmt im Rahmen der Osteoklastenaktivierung eine essentielle Rolle ein. Bei Östrogen-Präsenz wird es in geringerem Maße nachgewiesen.^{48,66,68,69}

Zusätzlich kann ein positiver Einfluss des Östrogens auf die Sekretion von Osteoprotegerin (OPG) ein Binden und Neutralisieren von RANKL induzieren^{48,66,71,77} und weitere Schritte in Richtung forcierte Resorption von Knochengewebe unterbinden. Osteoprotegerin wird von Osteoblasten gebildet und reguliert im Zusammenspiel mit RANKL als RANKL/OPG-Verhältnis entscheidend Umbauvorgänge und Stärke des Knochens.^{66,78}

Es ist bekannt, dass mit dem natürlichen Prozess des Alterns eine Abnahme von Proliferation und Differenzierung der Zellen einhergeht. Dies betrifft in gleicher Weise knochenspezifische Zellen. Es lässt sich in diesem Zusammenhang eine kürzere Lebenszeit, häufigeres Vorkommen apoptotischer Osteoblasten und folglich geringere Anzahlen funktionstüchtiger Osteoblasten nachweisen.^{57,79,80}

Mit Eintritt der Menopause und sinkendem Östrogenspiegel ändert sich durch die bereits genannten hormonellen und molekularen Abläufe das Verhältnis zwischen Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität.^{67,79} Ein deutliches Überwiegen der Osteoklastenaktivität^{38,41,57} und erhöhte Raten der Knochenresorption³¹ sind die Folge.

1.3 PATHOPHYSIOLOGISCHE BESONDERHEITEN IM KNOCHENMETABOLISMUS DER OSTEOPOROSE

Während des Kindes- und Jugendalters befindet sich der Knochen in ständigem Aufbau, häufig auch als Modeling bezeichnet.

Hat der Körper das Maximum an Knochenmatrix erreicht, beginnt der Prozess des Remodelings.⁸¹ Dabei wird der mikroskopisch in beiden Teilen, sowohl in Spongiosa als auch Kortikalis, vorliegende reife Lamellenknochen stetig erneuert und kleinste Traumen beseitigt. So werden ca. 10% des menschlichen Skelettsystems pro Jahr ersetzt.⁸¹

Unter physiologischen Bedingungen finden sich ein Gleichgewicht sowie eine Abhängigkeit zwischen der Osteoblasten-assoziierten Knochenbildung und der Osteoklasten-induzierten Resorption des Knochengewebes, sodass beide Vorgänge einander bedingen (Coupling).

Östrogen trägt dazu einen entscheidenden Faktor bei, indem es zum einen für einen kontinuierlichen Aufbau von Knochengewebe verantwortlich ist und zum anderen zu starken Knochenabbau unterbindet.⁴⁹ Nichtsdestotrotz zeigt sich ab Erreichen der „Peak Bone Mass“ ein leichtes Überwiegen der Resorptionsrate von ungefähr 0,7% jährlich.⁸¹

Mit dem plötzlichen Einbrechen der Östrogenspiegel im Rahmen der Menopause verändern sich jedoch die Verhältnisse erheblich, das Gleichgewicht kann nicht mehr gewahrt werden, was sich auch auf biochemischer Ebene widerspiegelt.⁸²⁻⁸⁴

Wie bereits erwähnt, kann der inadäquate, reduzierte Aufbau neuen Knochengewebes („low turn over“)⁶ aufgrund von alters-assoziierten Veränderungen der Osteoblastenzellreihe bestehen^{57,78-80} und eine negative Bilanz im Knochenstoffwechsel bedingen. Diese ist Voraussetzung für die Entstehung der Osteoporose.⁶ Deutlich häufiger ist im Rahmen der postmenopausalen Osteoporose jedoch der ausgeprägte Knochenabbau („high turn over“)^{6,83} durch aktivierte Osteoklasten.^{54,78}

Normalerweise tragen Kortikalis und Trabekelwerk aufgrund ihrer verschiedenen Architektur in unterschiedlichen Punkten zur Stärke und Belastbarkeit des Knochens bei.⁸⁵

Die erhöhte Resorption schlägt sich in einer deutlichen Reduktion der Anzahl trabekulärer Strukturen nieder, worunter die Knochenstärke leidet⁴² und eine erhebliche Fragilität mit einhergehender Frakturgefahr bedingt.

1.4 KLINIK DER OSTEOPOROSE

Auf das Skelettsystem des Menschen wirken verschiedenste Arten von Kräften, wie z.B. Druck-, Zug- und Scherkräfte.

Der anorganische Anteil der Knochenmatrix zeigt gegenüber Druck und Kompression den stärksten Widerstand, was der spongiöse Knochen u.a. seiner (Mikro-)Architektur verdanken kann.⁸⁵ Vor allem auf das Trabekelwerk der Wirbelkörper projiziert sich ein enormer axialer Druck bedingt durch den aufrechten Gang und die Schwerkraft.

Werden im Rahmen von alters-assoziertem Knochenabbau bzw. postmenopausaler Osteoporose erhöhte Mengen an Knochen resorbiert und die Knochendichte gemindert, äußert sich dies vor allem in einer gesteigerten Anfälligkeit gegenüber Kompressionskräften.⁶ Die nachgewiesene Reduktion der Anzahl an Trabekeln ist in Wirbelkörpern besonders in der horizontalen Ebene vorhanden.^{6,86,87} Radiologisch lassen sich die Wirbelkörper als Rahmenwirbel identifizieren, da aufgrund der veränderten Morphologie die Kortikalis und senkrecht verlaufenden Trabekel im Verhältnis nun vermehrt auftreten. Kann das osteoporotische Knochengewebe dem Druck nicht mehr standhalten, sind ein Einbrechen der kortikalen Deck- und eventuell Bodenplatte die Folge. Diese Formen osteoporotischer Frakturen werden als Sinterungsfrakturen mit Keil- bzw. Fischwirbelbildung⁶ bezeichnet. Patienten mit mehreren Frakturen im Bereich der thorakalen Wirbelsäule bilden eine deutliche Kyphose aus, auch Gibbus genannt. Weitere Manifestationsformen am Rumpf sind das Tannenbaumphänomen am seitlichen Rücken (nach schräg caudal auslaufende Hautfalten) sowie das nach ventral vorgewölbte Abdomen.

Erst das Auftreten solcher Frakturen inklusive ihrer Folgen beeinträchtigt die Patienten und bildet die eigentliche Klinik der Osteoporose.^{4,14}

Neben der Wirbelsäule weisen drei weitere Regionen des Skelettsystems eine deutlich erhöhte Rate an osteoporotischen Frakturen auf. Auch das proximale Femur (Schenkelhals und Trochanter), der distale Radius sowie der proximale Humerus sind daher mit einem hohen Anteil an Spongiosa dafür prädisponiert.^{9,13,14,88}

Anhand von Daten aus der amerikanischen Population in Rochester, Minnesota zeigten *Cooper und Melton*⁸⁹ bereits 1988 das Vorkommen und Ansteigen dieser vier Frakturarten in Frauen und Männern. Hervorzuheben ist, dass die deutliche Zunahme von sowohl femoralen als auch Sinterungsfrakturen in beiden Geschlechtern mit

steigendem Alter anfangs annähernd gleich verläuft, jedoch das Femur im sehr hohen Alter nochmals erheblich häufiger betroffen ist. Frakturen des distalen Radius (Colles) in steigender Zahl hingegen sind hauptsächlich beim weiblichen Geschlecht ab der Menopause anzutreffen und weisen dann eine Plateauphase auf.⁸⁹

Das Auftreten dieser Frakturen stellt die häufigste Erscheinungsform der Osteoporose²⁵ dar und findet sich daher in der WHO-Definition als *manifeste Osteoporose*¹⁷ wieder. Aufgrund der genannten Lokalisationen zeigen sich mit steigender Inzidenz der Frakturen, mit Ausnahme des distalen Radius,⁹⁰ gravierend deutliche Zunahmen in Morbidität^{13,14,25} sowie Mortalität^{25,90} dieser Patienten.

Zahlreiche Studien belegen einen signifikanten Anstieg der Frakturinzidenzen vor allem im weiblichen Geschlecht ab einem Alter von ca. 50 Jahren.^{4,8,91-93} Die WHO prognostiziert sogar eine dreifache Zunahme der Inzidenzen innerhalb der nächsten 50 Jahre vor allem in Entwicklungsländern, wie Lateinamerika und Asien.¹³

Das Risiko, eine osteoporotische Fraktur zu erleiden, ist folglich besonders hoch, wenn sich die Östrogenspiegel auf einem Minimum⁹⁴ bewegen und eine geringe Knochenmasse⁹³ vorliegt. Quantitativ bedeutet dies in Zusammenschau verschiedener Studien und Metaanalysen, dass sich bei der Knochendichtemessung pro Standardabweichung das Frakturrisiko im Schnitt um das Eineinhalb- bis Dreifache steigert.^{7,14,84,95}

1.5 RISIKEN

Wie bereits erwähnt manifestiert sich die Symptomatik der Osteoporose hauptsächlich über das Auftreten von Frakturen.

Risikofaktoren, die mit der Erkrankung an Osteoporose nachweislich in Verbindung stehen, stellen somit auch gleichzeitig Risiken für Frakturen dar.⁹⁶ Im Folgenden werden daher kurz Risikofaktoren aufgelistet bzw. näher erläutert, die unabhängig von dem Gehalt an Knochenmatrix das Vorkommen (osteoporotischer) Frakturen steigern können.

1.5.1 HÄUFIGSTE RISIKOFAKTOREN OSTEOPOROTISCHER FRAKTUREN

Es gibt zahlreiche Faktoren, die sich negativ sowohl direkt als auch indirekt auf den Knochenstoffwechsel bzw. die ossäre (Mikro-)Architektur ausüben können.

Einige davon, wie beispielsweise das Alter, können nicht beeinflusst werden und nehmen demnach an Relevanz im Laufe der Zeit weiter zu. Als weitere Ursachen sind spezielle Grunderkrankungen zu nennen, die aufgrund der meist veränderten Hormonlage eine Osteoporose bedingen können. In diesem Fall ist es schwierig, die Abgrenzung zwischen eigentlichem Risikofaktor und der Bezeichnung sekundäre

Osteoporose zu treffen, da beides häufig ineinander übergeht.⁴ Ein weiterer wichtiger Punkt ist die induzierte Osteoporose durch eine Reihe von Medikamenten, wie z.B. Glukokortikoide. Auch hier sind die Frakturrisiken merklich erhöht.^{4,14}

Dem *weiblichen Geschlecht* ist laut dem Dachverband Osteologie⁴ ein doppelt so hohes Frakturrisiko zuzuschreiben wie Männern. Des Weiteren zeigt sich bei Personen beider Geschlechter im *höheren Alter* – bei Frauen v.a. ab der Menopause – ein deutliches Risiko für osteoporotische Frakturen durch bereits geringe Traumen.^{4,97} Damit einhergehend sind zudem häufig *Stürze*⁴ zu nennen, die besonders bei Frakturen im Bereich der Hüfte und des Femurs⁹⁸ ursächlich sind. Ungenügende Bewegung im Alltag mit einhergehender Abnahme der Muskulatur⁹⁹ wirken sich negativ auf die Aufrechterhaltung des physiologischen Knochenbaus aus und sorgen für erhöhte Frakturwahrscheinlichkeiten beim *immobilen* Patienten.⁴ *Untergewicht*^{4,100} mit einem BMI unter 20 kg/m² sowie zu niedrige Spiegel von *Vitamin D und Calcium*⁴ durch Unterversorgung bzw. mangelnde Sonnenexposition werden häufig in Verbindung mit einer geringen Knochendichte gesehen und stehen ebenfalls für erhöhte Risiken einer Fraktur. Der Konsum von Genussmitteln, wie *Alkohol*¹⁰¹ und *Nikotin*^{4,102}, kann ein Frakturrisiko mit sich bringen. Ein sehr wichtiger und aussagekräftiger Aspekt ist der Hinweis auf eine *stattgehabte Fraktur*, sowohl peripher als auch im Bereich der Wirbelsäule, die nicht aufgrund eines hoch energetischen Traumas entstanden ist.^{4,103} Zudem lassen *familiäre* Vorbelastungen im Sinne von *Frakturen* mütterlicher oder väterlicher Seite eine genetische Prädisposition vermuten. Wobei Frakturen im Bereich des Femurs ein höheres Risiko als die übrigen Frakturen vorlegen.^{4,104}

Zu den häufigsten Grunderkrankungen, die einen osteoporotischen Knochenmetabolismus bedingen und somit ein erhöhtes Frakturrisiko aufweisen, zählen die rheumatoide Arthritis^{4,105}, eine hyperthyreote Stoffwechsellage (sowohl latent als auch manifest)^{4,14}, ein primärer Hyperparathyreoidismus⁴ und der Diabetes mellitus Typ I^{4,14}.

Wie bereits erwähnt ist eine Therapie mit oralen Glukokortikoiden ebenfalls ein starker Risikofaktor, der eine Erkrankung an Osteoporose provozieren und Wahrscheinlichkeiten für Frakturrisiken in die Höhe treiben kann.^{4,105,106} Da eine orale Gabe von Glukokortikoiden bei vielen verschiedenen Krankheitsbildern zum essentiellen Therapieschema gehört, ist gerade die Interaktion dieser Medikamentengruppe mit dem Knochenstoffwechsel von hoher Relevanz.

1.5.2 GLUKOKORTIKOID-THERAPIE ALS RISIKOFAKTOR

Glukokortikoide gehören zu der Gruppe der Steroidhormone und werden physiologisch in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde gebildet. Die tägliche körpereigene Produktion des Hauptvertreters Hydrocortison beträgt beim Menschen ungefähr 10 bis 25 mg/d.¹⁰⁷

Bei therapeutischen Substitutionen mit Glukokortikoiden handelt es sich um synthetisch hergestellte Wirkstoffe, die sich u.a. in ihrer Potenz, der (biologischen) Halbwertszeit und den nicht zu vernachlässigenden Nebenwirkungen unterscheiden. Die meisten Wirkstoffe, wie auch Prednisolon, weisen eine ca. vier- bis fünffach höhere Wirksamkeit als Hydrocortison auf. Dexa- und Betamethason jedoch haben die stärkste Wirkung aufgrund einer 40-fach höheren Rezeptoraffinität.¹⁰⁷

Als wichtigste Nebenwirkung der Steroidtherapie wird die Osteoporose genannt.¹⁰⁷ Der damit einhergehende Verlust an Knochenmasse¹⁰⁸ sowie das Risiko, eine Fraktur zu erleiden,¹⁰⁹ steigen kontinuierlich mit Zunahme der täglichen¹⁰⁹ Dosis an Glukokortikoiden. Auf Grundlage einiger Studien sieht die WHO sogar ein größeres Frakturrisiko bei Patienten mit Steroid-induzierter Osteoporose als bei der primären Osteoporose postmenopausaler Frauen.¹⁷ Allerdings betrifft dies vor allem trabekuläres Knochengewebe¹¹⁰, wie beispielsweise Wirbelkörper¹¹¹. Bereits nach einem viertel Jahr regelmäßig täglicher Einnahme von Glukokortikoiden ($\geq 2,5$ mg/d Prednisolon-Äquivalent)^{4,107} ist das erhöhte Risiko für Frakturen nachweisbar.^{106,112,113}

Eine Abnahme an Knochenmasse wird jedoch häufig erst einige Monate später deutlich. Vor allem im ersten Jahr der Therapie ist mit einer Reduktion zu rechnen.^{110,113} Danach flacht der Verlauf des Knochenverlustes wieder ab¹¹⁰ und kann sich sogar nach Absetzen der Steroide wieder (zum Teil) normalisieren.¹¹²

Ein wichtiger Aspekt ist die Wirkung der Kortikosteroide auf die Osteozyten. Man nimmt an, sie tragen einen wichtigen Teil zur Aufrechterhaltung der Knochenstärke bei, ohne Beeinträchtigung der Knochenmasse.^{114,115} Bei Steroid-induzierter Apoptose der Osteozyten durch erhöhte Aktivität der Kinase Caspase-3¹¹⁶ zeigen sich somit veränderte Eigenschaften des Knochengewebes¹¹⁷ und die kanalikulären Verbindungen innerhalb der Knochenmatrix zwischen einzelnen Osteozyten können nicht mehr aufrecht erhalten werden. Zusätzlich konnte in diesem Zusammenhang eine sinkende Konzentration an VEGF sowie eine Abnahme an der Gefäßneubildung des Knochens nachgewiesen werden.¹¹⁴

Auch bei Osteoblasten wird eine erhöhte Apoptoserate festgestellt⁵⁵, der u.a. ein positiver Einfluss von Caspase-3¹¹⁶ sowie von Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β)¹¹⁸ zugrunde liegt. GSK-3 β hat in Form eines Proteinkomplexes eine wichtige Rolle

im Wnt-Signalweg inne, der u.a. für den Knochenstoffwechsel relevant ist.⁷⁴ Des Weiteren sind unter Glukokortikoidtherapie erhöhte Werte des Proteins Dkk-1 (dickkopf-1) vorzufinden, das im Wnt-Signalweg eine hemmende Aufgabe übernimmt. Letztlich ist die Spezialisierung, Reifung und Entwicklung der Osteoblasten gemindert¹¹⁹, was sich in einer Reduktion der Anzahl als auch in einer verkürzten Lebenszeit der Osteoblasten^{115,120} und vermehrtem Vorkommen von Adipozyten¹¹⁹ äußert. Dies resultiert wiederum in einer Stagnation bzw. Reduktion des Knochenaufbaus.^{120,121} Eine herabgesetzte (Wieder-)Aufnahme von Calcium im Magen-Darm-Trakt und Tubulussystem der Niere durch Glukokortikoide wirkt sich darauf weiter negativ aus.¹²²

Unter anderem legen *Weinstein et al.* einen Rücklauf in der Anzahl der Osteoklasten¹²⁰ dar, können jedoch in einer späteren Arbeit ebenso eine verminderter Apoptoserate¹²³ feststellen. Eine längere Lebenszeit der Osteoklasten aufgrund niedriger OPG-Spiegel bei gleichzeitiger Hochregulation von RANKL^{123–125} führt somit zu einem Gleichbleiben bzw. sogar Ansteigen der Knochenresorption.¹²⁰

Zusätzlich sorgt mit steigendem Alter ein physiologischer Anstieg des Enzyms 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1 (11 β -HSD 1), das Glukokortikoide in ihre aktive Form überführt, für einen intensiveren Einfluss der Steroide auf den Knochenstoffwechsel.¹²⁶

Aufgrund der unterschiedlichen Manifestationszeitpunkte von Frakturrisiko und Verlust an Knochenmatrix (mittels geringerer Knochendichte) wird angenommen, dass sich im Rahmen der Steroid-induzierten Osteoporose nicht nur die Knochenquantität sondern vor allem erst die Qualität im Sinne von Knochenstärke verändert, die nicht mithilfe von DXA-Techniken ermittelt werden kann.^{113,127,128} *Weinstein et al.* konnten in ihrer Studie im Vergleich zur Knochendichte eine siebenfach stärkere Abnahme in der Knochenstärke unter Glukokortikoidtherapie aufzeigen.¹¹⁴ Die Veränderungen in der (Mikro-)Architektur scheinen sich dabei von denen der postmenopausalen Osteoporose zu unterscheiden.^{129,130} Sowohl *Aaron et al.*¹³⁰ als auch *Chappard et al.*¹²⁹ zeigten in menschlichen Knochenproben nach Steroidtherapie eine deutliche Abnahme der trabekulären Dicke (Tb.Th) bei hingegen nur leicht herabgesetzter Trabekelanzahl, was einen entscheidenden Unterschied zu postmenopausalen Veränderungen darstellt.

2 TIERMODELL

Osteoporotische Veränderungen des Knochens werden nur bei menschlichen Individuen angetroffen. Ähnliche Krankheitsbilder in Tieren, die in wichtigen Aspekten,

wie Knochenstoffwechsel und (Mikro-)Architektur, anatomische Verhältnisse oder auch hormoneller Status, denen der humanen Vorgaben größtenteils entsprechen, sind nicht bekannt.¹³¹ Bereits aufgrund von Studien mit verschiedensten Pharmazeutika bzw. Knock-out-Experimenten auf genetischer Ebene ist allein aus ethischen Gesichtspunkten die Erforschung an einem Tiermodell zwingend erforderlich.

2.1 IMITATION DER MENOPAUSE DURCH EXPERIMENTELLE OVAREKTOMIE (OVX) AM TIERMODELL DER RATTE

Generelle Anforderungen an Tiermodelle lassen viele Tiere als mögliche Versuchsobjekte ausscheiden. Eine verlässliche Reproduzierbarkeit der zu erforschenden Pathologien, ständige Verfügbarkeit und Zugänglichkeit, sichere sowie kostengünstige Bereitstellung und Haltung sind dabei nur einige essentielle Punkte, die erfüllt werden müssen.¹³²

Eine Vielzahl von Groß- und Kleintieren sind bereits als Tiermodell für osteoporotische Fragestellungen herangezogen worden. Darunter sind beispielsweise Affen¹³³, Schafe^{131,134}, Hunde³⁶, Hasen¹²⁷, Mäuse^{60,135} und Ratten^{136–139} immer wieder zu finden. Bereits Ende der 1960er Jahre legte *Saville*¹⁴⁰ dar, dass die Ovariectomie der Ratte einen reduzierten Einfluss auf die Knochenmasse besitzt und mit menschlichen Verhältnissen verglichen werden kann. Viele weitere Arbeiten beschäftigten sich seitdem immer wieder mit der (Re-)Evaluation der OVX-Ratte als geeignetes Tiermodell.^{18,132,141–143}

Die am meisten verwendeten Knochenproben der Ratten sind Wirbelkörper^{136,143} sowie die proximale metaphysäre Tibia^{138,143–146}. Zum einen stellt sich die Wirbelsäule als eine der häufigsten Frakturlokalisationen osteoporotischer Patienten dar. Zum anderen besitzt die proximale Tibia kortikalen und reichlich spongiösen Knochen, der im metaphysären Bereich meist den Manifestationsort der Osteoporose darstellt.⁴⁹ Ein weiterer Punkt ist das Aufweisen unterschiedlicher Knochenarchitekturen der beiden Regionen.

Beschäftigt man sich vor allem mit dem spongiösen Anteil des Knochengewebes, sind in der Literatur folgende Aspekte häufiger erwähnt und sollten im Tiermodell Ratte und dessen Ergebnisbeurteilung Berücksichtigung finden.^{132,142}

Das Skelettsystem der Ratte benötigt zur Reife ungefähr zehn Monate und erreicht zu diesem Zeitpunkt den Stand der höchsten Knochenmasse¹³². Geht man Fragen auf hormoneller bzw. endokrinologischer Ebene nach, ist auch bereits ein Alter unter zehn Monaten adäquat.¹⁴⁷

Ein kompletter Schluss der Epiphysenfugen und somit Wachstumsstopp wird bei den Wirbelkörpern und der proximalen Tibia der Ratten erst nach Monaten erreicht. Aufgrund eines sehr geringen Wachstumnachweises im Bereich der Epiphysenfuge nach zehn Monaten, kann jedoch bereits ab diesem Zeitpunkt ein Status von fast vollständigem Erlöschen des Längenwachstums angenommen werden.¹⁴⁸

Des Weiteren konnte in jungen Ratten ein abweichender Knochenstoffwechsel zu dem des menschlichen Skelettsystems gefunden werden. Der zu Anfang fast ausschließlich anzutreffende Prozess des Modelings geht jedoch nach und nach in das dem erwachsenen Menschen entsprechenden Remodeling über. Je nach Region kann der Wechsel im Alter von bereits drei Monaten in der Wirbelsäule, nach sechs bis neun Monaten in der proximalen Tibia erfasst werden. Das vollständige Vorliegen des Remodelingprozesses wird mit dem Alter von einem Jahr benannt.¹⁴⁸

Um eventuell noch bestehendes Trabekelwerk des primären Stoffwechsels zu umgehen, wird empfohlen, einen gewissen Abstand zur deutlich sichtbaren Epiphysenfuge bzw. Boden- oder Deckplatte einzuhalten. In Wirbelkörper-Proben handelt es sich dabei um ca. einen halben, in der proximalen Tibia sogar um einen Millimeter bei einem Alter von drei Monaten. Mit steigendem Alter kann dieser Abstand jedoch verringert werden, sodass in Wirbelkörperproben ab sechs Monaten die Distanz von 250 µm genügt, in der proximalen Tibia eine Abstufung von 0,5 mm mit sechs Monaten sowie 0,25 mm ab neun Monaten von *Erben et al.* empfohlen wird.¹⁴⁸

2.2 STEROID-INDUZIERTE OSTEOPOROSE

Die Provokation der Entwicklung osteoporotischen Knochens kann durch verschiedenste Vorgehensweisen ermöglicht werden. Diätetische Maßnahmen, Immobilisation einer Extremität oder das Eingreifen auf hormoneller Ebene sind dabei nur grobe Einteilungen. Durch das chirurgisch initiierte Erlöschen der Ovarialfunktion mittels beidseitiger Ovariectomie hat sich mit der OVX-Ratte, wie bereits erwähnt, ein osteoporotisches Tiermodell etabliert.^{132,149} Kortikosteroide sind durch notwendige therapeutische Gaben oder endogene Überproduktionen, wie beispielsweise beim Cushing-Syndrom, ebenfalls in der Lage, Osteoporose zu induzieren.¹⁰⁷

Während sich Ratten als ein oft genutztes Tiermodell zur Erforschung der postmenopausalen Osteoporose durchgesetzt haben, ist ihr Einsatz in Studien über die Glukokortikoid-induzierte Osteoporose bis heute begrenzt. Sowohl *Manolagas et al.*¹⁵⁰ als auch *Weinstein et al.*¹²⁰ bedienten sich Ende der 1990er Jahre des Mausmodells zur Betrachtung zellulärer und molekularer Veränderungen.

Andere Forschungsgruppen nutzten jedoch auch für diese Fragestellung weiterhin Ratten. *Nitta et al.*¹⁵¹ behandelten beispielsweise in einer vergleichenden Studie die knöchernen Auswirkungen der Ovariectomie mit denen der Steroidtherapie bei weiblichen Ratten. Die Kombination der postmenopausalen Östrogen-Defizienz mit einer gleichzeitig vorliegenden Gabe von Glukokortikoiden (*OVX + Steroide*)^{145,152} ist allerdings nur spärlich erforscht und z.T. nicht einheitliche Resultate der Steroidgaben bei Ratten stehen sich gegenüber. Eine Induktion der Osteoporose in Form von Steroid-induziertem Knochenverlust konnte von *Nitta et al.* nachgewiesen werden.¹⁵¹ Bei *Shen et al.*¹⁴⁵ hingegen zeigte sich ein Ansteigen der Knochenmasse nach Glukokortikoidgabe bei sowohl gesunden als auch ovariectomierten Ratten.

Die immunmodulatorischen Wirkungen der Glukokortikoide macht man sich bei zahlreichen Erkrankungen in der Therapie zunutze. Häufig fallen in dieses Patientengut auch Frauen im postmenopausalen Alter, die somit ein deutlich erhöhtes Risiko aufweisen, an Osteoporose zu erkranken.

Die bisher nur ungenügenden Ergebnisse kombinierter Studien (*OVX + Steroide*) sowie die meist kurzen Studienlaufzeiten über einige Wochen^{145,151,152} fordern daher dringend weitere Evaluationen der mikroarchitektonischen Veränderungen im Steroid-induzierten Osteoporosemodell der ovariectomierten Ratte.

3 BILDGEBENDE VERFAHREN

Nach wie vor stellt die konventionelle Radiographie den ersten Schritt zur Diagnose einer Fraktur dar. Um an Osteoporose erkrankte Personen jedoch frühzeitig entdecken, sie weiterführend therapieren und vor Frakturen schützen zu können, steht der Einsatz anderer diagnostischer Hilfsmittel im Vordergrund.

Im Rahmen der Osteoporosedagnostik gibt es inzwischen mehrere nicht-invasive Verfahren zur Visualisierung von Veränderungen des Knochengewebes unterschiedlicher Lokalisationen. Diese sind u.a. die quantitative Sonographie (QUS, quantitativer Ultraschall) am Calcaneus, die quantitative Computertomographie (QCT) sowie die Doppelröntgen-Absorptiometrie (DXA/DEXA).^{4,6,153}

Eine kurze Erläuterung der Verfahren bleibt in dieser Arbeit dem DXA-Verfahren und der Mikro-Computertomographie (μ CT) aufgrund der Studienrelevanz vorbehalten.

3.1 DUALE RÖNTGEN-ABSORPTIOMETRIE (DXA)

Die Osteodensitometrie mittels DXA gilt als Empfehlung zur Bestimmung der Knochendichte an der LWS bzw. der Schenkelhalsregion.⁴

Dabei wird, genau genommen, nicht die Dichte im physikalischen Sinn ermittelt, sondern lediglich das Gewicht des mineralisierten Knochens in Gramm pro definierter Fläche in cm^2 angegeben (g/cm^2).^{14,154} Die Bestimmung des vorliegenden Knochengehaltes kann keinen direkten Hinweis über die Knochenarchitektur liefern, dient jedoch annäherungsweise der Beurteilung der Festigkeit ossärer Strukturen.¹⁵⁵

Die Technik beruht dabei, wie auch beim konventionellen Röntgen, auf der Messung der Röntgenstrahlen, die nach Durchdringen der jeweiligen Region am Detektor erfasst werden können. Unterschiedliche Materialien, wie Knochen und Weichteile (inklusive Fettgewebe), absorbieren Strahlen dabei in verschiedenem Ausmaß. Die sogenannte Schwächung erfolgt energieabhängig. So nimmt beispielsweise Gewebe mit hohem Calciumanteil, wie Knochen, auch schon bei niedriger Strahlungsenergie einen deutlichen Anteil der Strahlen auf und grenzt sich darin vom Weichteilgewebe ab. Diese Eigenschaften macht man sich bei der DXA-Messung zunutze, indem man Strahlungsenergien aus zwei unterschiedlichen Bereichen (je nach Hersteller 38 bis 140 keV)¹⁵⁶ verwendet, um das Vorliegen verschiedener Gewebe gemäß ihrer Absorptionsfähigkeit ermitteln zu können.¹⁵⁵ Die durchschnittliche Strahlendosis liegt dabei ungefähr bei 3 bis 30 μSv .¹⁵⁴

Neben den Standardregionen LWS und proximales Femur, die zur Diagnosestellung nach WHO-Definition verwendet werden dürfen, können auch Messungen am distalen Radius, Calcaneus bzw. dem gesamten Skelettsystem durchgeführt werden. Stellvertretend für die Wirbelsäule steht die Ermittlung eines Mittelwertes der Knochendichte der vier Lendenwirbelkörper L1 bis L4. Verfälschungen der Werte durch Skoliosen, degenerative Veränderungen (Spondylophyten), zusätzliche Verkalkungen vorgelagerter Strukturen (z.B. Aorta)^{7,154,155} etc. lassen Messungen im gewöhnlichen Strahlengang von posterior-anteriorer Richtung (p.-a.) zum Teil in den lateralen übergehen. Doch auch hier sind beispielsweise Überlagerungen durch Rippen und Beckenkamm möglich.¹⁵⁵ Eine Abgrenzung zwischen kortikalem Knochen und Trabekelwerk ist bei der Osteodensitometrie mittels DXA nicht möglich.^{31,154} Aufgrund der Zweidimensionalität der Messtechnik als Projektionsabbildung ist die eigentliche Tiefe der Wirbelkörper nicht berücksichtigt und schmalere Wirbel kleinerer Patienten weisen so bereits physiologisch eine geringere Masse pro Fläche auf.¹⁵⁴

3.2 MIKRO-COMPUTERTOMOGRAPHIE (μ CT)

Bei dem Verfahren der Computertomographie kommt es ebenfalls zur Emission von Röntgenstrahlen. Diese durchdringen jedoch durch Rotation der Strahlenquelle aus vielen Richtungen das Objekt und werden nach Schwächung auf der gegenüberliegenden Seite von Detektoren erfasst. Durch die spezielle Technik können nach dem Algorithmus der Rückprojektion Datensätze ermittelt und axiale Schnittbilder mittels Grauwerten in Hounsfield-Einheiten generiert werden. Jeder Grauwert entspricht dabei einem Voxel, einem Volumenelement des Objektes. Somit kann auch hier auf die Dichten unterschiedlicher Gewebe/Materialien rückgeschlossen werden.

Mit der Computertomographie ist eine dreidimensionale Ansicht aus unterschiedlichen Ebenen problemlos möglich. Dennoch erreichen moderne CTs momentan eine maximale Voxelgröße von knapp unter 1 mm^3 .¹⁵⁷ Eine aussagekräftige Darstellung der trabekulären Mikroarchitektur ist daher mit den aktuellen, kliniksüblichen Computertomographen noch nicht zu erreichen.

Die Anwendung der Mikro-Computertomographie nimmt seit ihrer Entwicklung in den frühen 1980er Jahren¹⁵⁸ und dem von *Feldkamp et al.* entwickelten Algorithmus zur Rekonstruktion der Daten¹⁵⁹ vor allem in den letzten Jahren rasant zu. Wenn auch die Benutzung momentan noch auf präklinische Studien begrenzt ist, kann die μ CT erheblich zum Verständnis der Veränderungen der trabekulären Mikroarchitektur beitragen.¹⁶⁰

3.2.1 TECHNOLOGIE DER MIKRO-CT

Wie die Computertomographie arbeitet auch die Mikro-CT mit dem Prinzip basierend auf Röntgenstrahlung Schnittbilder zu erzeugen. Mit einer isotropen Ortsauflösung von 5 bis $50 \mu\text{m}$ zeigt sich bei der dreidimensionalen Darstellung der Objekte jedoch ein deutlicher Unterschied.¹⁶⁰

Der Aufbau des Mikro-Computertomographen setzt sich prinzipiell aus einer Röntgenquelle, der Kamera bzw. dem Detektor und der unausweichlich benötigten Hard- und Software sowie dem Probeschlitten zusammen.¹⁵⁷ Letzterer positioniert die Probe in einer variablen Distanz zwischen Röhre und Detektor und rotiert sie um ihre eigene Achse in definierten Gradschritten im Verhältnis zur feststehenden Strahlungsquelle.¹⁶⁰ Abhängig von der Position zum Fokus und der Probengröße kann eine Vergrößerung erreicht werden. Um Artefaktbildungen und Unschärfen zu

vermeiden, darf die Projektion des Objektes nicht über den Matrixrand hinaus reichen bzw. ein gewisser Abstand zwischen Probe und Fokus nicht unterschritten werden.¹⁶¹

Die Erzeugung der Röntgenstrahlen erfolgt durch Mikro- oder Feinfokusröntgenröhren, deren Fokusgröße durch den Einsatz von Transmissions- oder Reflektionsanoden zusätzlich reduziert werden kann. Die Emission in Form von Kegelstrahl- bzw. Fächerstrahlgeometrie definiert dann die Art des Detektors als Flächen- bzw. Zeilendetektor. Des Weiteren können auch mithilfe der Synchrotronstrahlung und dazu benötigter Parallelstrahlgeometrie μ CT-Bilder generiert werden.¹⁶⁰

Die Ortsauflösung wird bei parallelem Strahlengang von dem Detektor bestimmt. Bei Kegel- und Fächerstrahlgeometrie ist die Größe des Fokus (5 bis 30 μ m) ausschlaggebend. Verringert sich die Fokusgröße der Strahlungsquelle, kann eine höhere Ortsauflösung erzielt werden. Um detailreichere Abbildungen erzeugen zu können, ist neben der Erhöhung der Auflösung auch ein Anstieg der Quantenzahl zwingend erforderlich. Aufgrund der durch die verringerte Fokusgröße sinkenden Röhrenleistung ist jedoch eine Steigerung der Intensität limitiert. Die Anzahl der Quanten, die pro Fläche während eines definierten Zeitraums verfügbar sein müssen, ist daher begrenzt. Diese technischen Hürden lassen sich momentan durch verlängerte Messzeiten von Minuten bis Stunden sowie geringe Probengrößen überwinden. Um diese Kompromisse so gering wie möglich zu halten, wird die technisch und mathematisch wesentlich anspruchsvollere Kegelstrahlgeometrie der Fächerstrahlvorgezogen. Aufgrund der geometrischen Form können zeitgleich zahlreiche Schichten des Objektes erfasst, die begrenzten Quanten bestmöglich ausgenutzt und demnach die Zeit der Messung deutlich reduziert werden. Grob orientierend kann man die gewünschte Auflösung mit 1000 multiplizieren, um die maximale Probengröße zu bestimmen.¹⁶⁰

Die Größe der Voxel und damit einhergehende Datenverarbeitung und –speicherung sowie Visualisierung spielen eine erhebliche Rolle der Limitationen. Der Volumendatensatz variiert zwischen 270 und 2150 MB – je nach dem ob 512^3 Grauwerte bzw. 1024^3 isotrope Voxel vorliegen.¹⁶⁰

Eine vergleichende Auflistung der Unterschiede der wichtigsten technischen Daten zwischen den klinischen Computertomographen und μ CTs zeigt Tabelle 1.2.

	MIKRO-CT	SPIRAL-CT
Probengröße (d)	<5 cm	5–50 cm
Rotation	Objekt (um axiale Achse)	Gantry (Röhre und Detektor)

	MIKRO-CT	SPIRAL-CT
Strahlungsquelle	Mikro-/Feinfokusröhre Kegel-/Fächerstrahlgeometrie	Hochleistungs-CT-Röhre Fächerstrahlgeometrie
Fokusgröße	5 – 30 μm	0,7–1,5 mm
Spannung	10 – 150 kV	80 – 140 kV
Stromstärke	40–100 μA	10–500 mA
Detektor/Kamera	Flächen-/Zeilendetektor	Zeilendetektor
Matrix	512 ³ - 1024 ³	512 ² < 200 – 300 rekonstruierte Bilder
Max. Auflösung		
In der Schicht	5–50 μm	0,25 – 1,0 mm
Pro Schichtdicke	5–50 μm	0,50 – 2,0 mm
Speicherplatz	0,5 – 2,1 MB (pro Schicht, 16 bit) 270 – 2150 MB (ges. Datensatz)	0,5 MB (pro Bild, 16 bit) 160 MB (ges. Datensatz)
Scanzeit insg.	min bis Std	20 – 40 s (Thorax)
Rekonstruktions- Zeit	10 – 30 s (Pro Schicht) 230 MHz Pentium	0,5 – 5 s (Pro Schicht) Spezialhardware

Tabelle 1.2: Vergleichende Darstellung wichtiger Unterschiede zwischen μCT und Spiral-CT. Modifiziert nach Engelke et al.¹⁶⁰

Der eigentliche Scanvorgang bis zur Visualisierung der Volumendatensätze enthält einige Schritte.

Nach Aussenden der Strahlen durch die Röntgenröhre (Spannung von 10 bis 150 kV, Stromstärke 40 bis 100 μA) und Abschwächung durch das sich um die vertikale Achse rotierende Objekt treffen die Röntgenstrahlen auf eine Szintillatorschicht. Diese konvertiert die ankommende Strahlung in Lichtimpulse, die wiederum über eine Faseroptik an den Detektor, meist eine CCD-Kamera, weitergeleitet werden. Die Kamera mit einer Matrix von maximal 1024² Pixel ist mit einem Frame-Grabber verbunden, der die analogen Signale des CCD-Detektors digitalisiert und an entsprechende Computersysteme sendet.^{160,162} Aus den digitalen Datensätzen in Form von Rohdaten können mithilfe des etablierten Feldkamp-Algorithmus¹⁵⁹ durch Rückprojektionstechnik und Konvolution Tomogramme in axialer Schnittführung generiert werden.¹⁶² Jede einzelne Schicht setzt sich aus isotropen Voxeln zusammen

und weist eine Größe von ungefähr 0,5 bis 2,1 MB auf. Nach Rekonstruktion ergeben diese Schnittbilder eine dreidimensionale Darstellung des Objektes.¹⁶⁰ Sind die Grauwerte optimiert und Schwellenwerte festgelegt worden, können verschiedenste Parameter und Darstellungen der Probe mithilfe von Analyseprogrammen erarbeitet werden.

Somit kann durch die Technologie der Mikro-Computertomographie erstmals die Mikroarchitektur des Knochengewebes nicht-destruktiv ermittelt und essentielle Beobachtungen zu Veränderung der dreidimensionalen Struktur und Ausrichtung der Trabekel geliefert werden.¹⁶⁰ Zum heutigen Zeitpunkt stehen bereits Geräte zur Verfügung, die auf Grundlage der μ CT in-vivo Untersuchungen an Versuchstieren durchführen können und somit interessante Möglichkeiten für longitudinale Studien schaffen.^{163,164}

3.2.2 STRUKTURPARAMETER ZUR ANALYSE DER TRABEKULÄREN MIKROARCHITEKTUR

Bereits vor der Einführung der Mikro-Computertomographie erfolgte die Erforschung und Charakterisierung des spongiösen Knochens über die Histomorphometrie.

Aufgrund der Zweidimensionalität dieser Technik bedurfte es jedoch der Entwicklung verschiedener Modelle, auf deren Grundlage weitere Berechnungen durchgeführt werden konnten. Zur Quantifizierung und einheitlichen Beschreibung der Mikroarchitektur entwickelte man unterschiedlichste Strukturparameter, deren Nomenklatur von der ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) anerkannt und vollständig etabliert ist.¹⁶⁵

Die Mikro-Computertomographie bietet der Wissenschaft dank der Darstellung einzelner Knochenbälkchen sowie der dreidimensionalen Visualisierung des Trabekelwerkes völlig neue Möglichkeiten zur Beurteilung von Morphologie und Konnektivität. Der Einsatz der Strukturparameter bleibt weiterhin ein essentieller Bestandteil der Vergleichbarkeit neuer Studien. Ein enormer Vorteil ist nun jedoch die Möglichkeit direkter Berechnungen von beispielsweise der Dicke oder Distanz der Trabekel, ohne sich weitere Modelle zu Hilfe nehmen zu müssen.¹⁶⁶

Folgende Strukturparameter sind in der mikro-computertomographischen Osteoporosediagnostik entscheidend und werden in dieser Arbeit vergleichbare Ergebnisse darstellen. Eine kurze Erläuterung der sieben Parameter gibt Aufschluss über ihre Bedeutung und Definition.

- **BV/TV – Relatives Knochenvolumen**

Der Volumenanteil des trabekulären Knochens (BV) wird zum Volumen des gesamten zu untersuchenden Probenumfangs (TV), das dem VOI entspricht, ins Verhältnis gesetzt. Wichtig dabei ist das Aussparen kortikaler Anteile und die Genauigkeit der Begrenzung des VOI (Volume of Interest).¹⁶⁷ Die ASBMR hat die Nomenklatur verifiziert. Die Angabe von BV/TV erfolgt in Prozent; ein Vergleich verschieden großer Proben ist somit möglich.¹⁶⁵

- **Tb.N – Trabecular Number**

Tb.N beschreibt die durchschnittliche Anzahl von Trabekeln im entsprechenden VOI auf einer definierten Strecke von einem Millimeter. Die Einheit wird somit als 1/mm angegeben.¹⁶⁷ Zum einen kann die Berechnung der Tb.N mithilfe der Formel $(BV/TV)/Tb.Th$ erfolgen.^{167,168} Eine weitere Möglichkeit erlaubt durch die modellunabhängige 3D-Analyse das Verwenden der Formel $Tb.N = 1/(Tb.Th + Tb.Sp)$.¹⁶⁷

- **Tb.Th – Trabecular Thickness**

Die lokale Dicke eines Trabekels kann mithilfe der Studienerkenntnisse von *Hildebrand und Rüegsegger*¹⁶⁶ ohne Berücksichtigung eines bestimmten Modelltypes berechnet werden. Basierend auf einer Vielzahl von Einzelmessungen ausgehend von beliebigen, willkürlichen Punkten des unregelmäßigen Trabekelwerkes erfolgt die Kalkulation für die durchschnittliche Dicke des vorliegenden Trabekelvolumens. Diese Einzelmessungen sind zunächst zweidimensional und halten daher das Risiko von Verzerrungen durch die dreidimensionale Ausrichtung der Trabekel gering.¹⁶⁹ Eine Aufrechnung der separaten Werte zur volumengewichteten Tb.Th erfolgt erst im Anschluss. Um den gewählten Punkt wird ein größtmöglicher Kreis gezogen, der den Punkt (nicht zwingend mittig) einschließen muss, das trabekuläre Gewebe jedoch nicht überschreiten darf. Der Durchmesser des Kreises stellt einen von unzähligen Werten dar.^{166,167} Mithilfe dieses Strukturparameters steht ein starker Prädiktor für die Form des komplexen Trabekelwerkes zur Verfügung. Die Angabe erfolgt standardmäßig in Millimeter.¹⁶⁷

- **Tb.Sp – Trabecular Separation**

Tb.Sp bezeichnet die intertrabekuläre Distanz, die nach dem Schritt der Schwellenwertfestlegung und Binarisierung während der Bildanalyse benannt werden kann. Ermittelt wird sie modellunabhängig durch direkte Berechnungen auf dem Prinzip der Tb.Th-Bestimmung. Somit entspricht der gemessene Wert mit der Einheit Millimeter gleichzeitig der Dicke der intertrabekulären Markräume.^{167,170}

- **SMI – Structure Model Index**

*Parfitt et al.*³⁸ entwickelten ein Plattenmodell für trabekuläres Knochengewebe. Doch bereits Ende der 1970er Jahre zeigte *Singh*¹⁷¹ das Vorliegen einer hohen Variabilität in der Knochenstruktur und Ausrichtung des Trabekelwerkes. Sowohl plattenähnliche als auch stabförmige Strukturen in verschiedensten Kombinationen konnten nachgewiesen werden.¹⁷¹ Erst mit der Einführung der Mikro-CT konnten durch Visualisierung der verschiedensten Strukturen, deren Kombinationen und analytischer Verfahren auf dreidimensionaler Grundlage diese Gegebenheiten näher beleuchtet werden. Die Berechnung der Parameter auf Grundlage von Platten- bzw. Stabmodellen führte rückblickend zu Über- bzw. Unterbewertung dieser Werte.¹⁷⁰

*Hildebrand und Rüegsegger*¹⁷² gelang erstmals die direkte Quantifizierung der Knochenstruktur mittels des Strukturparameters SMI (Structure Model Index). Die Formel basiert auf Werten von Oberflächen und Volumina der Probe und ist unabhängig von der Dicke der knöchernen Strukturen anzuwenden. Die bis dahin als unveränderliches Modell angesehene Eigenschaft des Knochens kann nun selbst als Parameter berechnet werden.¹⁷²

Der dimensionslose Parameter stellt ein Verhältnis zwischen den Strukturen von Stäben und Platten dar. Im Hinblick auf osteoporotische Strukturveränderungen ist er demnach ein essentielles Hilfsmittel zur Quantifizierung und Vergleichbarkeit. Der Wert 0 steht stellvertretend für das Vorliegen des perfekten Plattenmodells. Ausschließlich zylindrische Formen erhalten den Wert 3, sphärische den Wert 4. Das parallele Vorkommen der Geometrien resultiert in abweichenden Zwischenwerten entsprechend der vorherrschenden Architektur.^{167,172} Liegen Einbuchtungen der ossären Strukturen sowie Regionen mit von über 50 Prozent Knochen umschlossenen Aushöhlungen vor, können dementsprechend Negativwerte ermittelt werden. Verfälschungen der Ergebnisse sind jedoch durch unsauberes Arbeiten bei der Bestimmung der VOI-Grenzen zu bedenken.¹⁶⁷ Trotz einer Charakterisierung der Mikroarchitektur ist der SMI nicht in der Lage, die Konnektivität direkt zu beleuchten.¹⁷²

- **Tb.Pf – Trabecular Pattern Factor**

Ebenso wie der SMI spielt auch der Tb.Pf in der Analyse osteoporotischer Knochen eine große Rolle. Er stellt einen sehr sensitiven Strukturparameter in Hinblick auf strukturelle Veränderungen dar, die sich noch nicht in einer Reduktion von Knochengewebe bemerkbar machen. Verbindungen zwischen einzelnen Knochenbälkchen können mit ihm quantitativ wiedergegeben werden. Dabei dient das Verhältnis von Konkavität zu Konvexität der Strukturen zur Bestimmung der Vernetzung.¹⁷³

Auf Grundlage von Umfangs- und Oberflächenwerten zweidimensionaler Schnittbilder entwickelten *Hahn et al.*¹⁷³ den Trabecular Pattern Factor, der inzwischen auch direkt in dreidimensionalen Datensätzen (mittels Oberflächen und Volumina)¹⁶⁷ ermittelt werden kann.

Hohe Raten an Verbindungen spiegeln sich in einem niedrigen Wert für Tb.Pf wider. Dies impliziert nach der Definition von *Hahn et al.*¹⁷³ ein deutliches Überwiegen der konkaven sowie platten-ähnlichen Strukturen. Dementsprechend deutet ein hoher Tb.Pf-Wert auf Konvexität der Strukturen und somit vereinzelt Knochentrabekel hin.^{167,173} Bei schnellem Ansteigen des Wertes lassen sich perforierte Trabekel finden, die das Verhältnis zugunsten der konvexen Strukturen verändern.¹⁷³ Anlehnend an die Werte des SMI kann auch der Tb.Pf Negativwerte aufweisen. In diesen Fällen sind hauptsächlich vollständig vom Knochen umschlossene Höhlen sowie Oberflächen von konkavem Verlauf vorzufinden.¹⁶⁷

Die Ausdehnung der Strukturen in der Größenordnung von einzelnen Voxeln nach Binarisierung der Datensätze und darauffolgende Indexbildung der jeweiligen Differenzen ist ein entscheidender Schritt in der Wertermittlung.^{167,173} Dieses Prinzip wird sowohl bei der Berechnung des Tb.Pf als auch des SMI angewandt und erklärt ihre enge Korrelation. Die Angabe erfolgt in 1/mm.¹⁶⁷

- **i.S – Intersection Surface**

Bei der Bestimmung des Probenvolumens VOI unter Aussparen der Kortikalis wird das gitterförmig angeordnete Knochengewebe in Form von einzelnen Trabekeln oder ganzen Agglomerationen dieser Strukturen angeschnitten. Diese äußere Begrenzung des VOI ist gekennzeichnet durch das unregelmäßige Vorliegen unterschiedlich großer Flächen von fester Knochensubstanz sowie leerem Markraum.

Die Summe aller Flächen der trabekulären Schnittfläche wird durch den Strukturparameter Intersection Surface in Quadratmillimetern wiedergegeben. Er kann zur Beurteilung der Entstehung neuen Knochengewebes an festgelegten Grenzflächen hinzugezogen werden.¹⁶⁷

4 ZIEL UND FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Im Rahmen des Sonderforschungsbereiches Transregio 79 (SFB/TR 79) erfolgt in dieser Arbeit die Durchführung mikro-computertomographischer Untersuchungen von Steroid-induzierten Osteoporosemodellen anhand von *Wirbelkörpern (Th10)* sowie proximalen *Tibiae* ovariectomierter Ratten. Die Erfassung der Daten erstreckt sich über einen Zeitraum von insgesamt vierzehn Monaten Studiendauer. Mittels mikro-

computertomographischer Schnittbilder und Rekonstruktionen sowie Berechnungen der Strukturparameter sollen Veränderungen der trabekulären Mikroarchitektur über einen zeitlichen Verlauf visuell qualitativ und quantitativ dargestellt werden. Des Weiteren kann mithilfe der erhobenen Daten ein Vergleich zu gesunden Tieren gleichen Alters erfolgen.

Es kann somit der Frage nach Osteoporose-spezifischen Veränderungen der Knochenarchitektur bei kombiniertem Vorliegen von postmenopausaler Stoffwechsellage und Steroidtherapie nachgegangen werden. Weiterhin kann eine Beurteilung der Relevanz des mit μ CT untersuchten Tiermodells als Ausgangspunkt in Bezug auf weitere Forschungsansätze im Bereich der Osteoporose, wie beispielsweise die Frakturversorgung, erfolgen.

II MATERIAL UND METHODEN

1 TIERMODELL

Im Rahmen des Sonderforschungsbereiches/Transregio 79 werden die Tierversuche für das Teilprojekt T1 (Projektleiter Prof. Dr. C. Heiß, Unfallchirurgie, Justus-Liebig-Universität Gießen) nach den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes (BGBl. I S. 3001, 18. Dezember 2007) durchgeführt. Die Genehmigung mit dem Geschäftszeichen V54-19c20-15(1)GI20/28 Nr.89/2009 wurde durch das Regierungspräsidium Gießen erteilt.

Für diese Studie werden ausschließlich weibliche Ratten des Typs Sprague Dawley® Crl:SD (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland) verwendet.

Nach Erhalt werden die Tiere im Alter von zehn Wochen für weitere vier Wochen im zentralen Tierstall des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen gehalten. Maximal befinden sich vier Ratten in einem Typ IV Käfig aus Makrolon (EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH und Co.KG, Emmendingen, Deutschland; EBECO E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland; *Tecniplast S.p.a., Buguggiate, Italien*). Sie sind bei einer um ca. 2°C variierenden Temperatur von 22°C einem Tag-Nacht-Rhythmus von zwölf Stunden (6.00 bis 18.00 Uhr) ausgesetzt.

1.1 STUDIENDESIGN UND DURCHFÜHRUNG

Insgesamt umfasst die Studie eine Anzahl von 64 Ratten, die mittels Losverfahren drei verschiedenen Gruppen zugeordnet werden. Die angegebenen Zahlen beschränken sich nur auf die Tiere, die keine Frakturen in den jeweiligen Knochenproben aufwiesen und deren Parameter somit in die Auswertung aufgenommen werden konnten.

- **Gruppe 0** *Kontroll-Gruppe* (n=10)
- **Gruppe 1** *Sham* (n=34)
- **Gruppe 2** *OVX+ Steroide* (n=20)

Im Rahmen des Teilprojektes T1 des Sonderforschungsbereiches/Transregio 79 (SFB/TR 79) werden die Tiere der **Gruppe 0** im Alter von vierzehn Wochen euthanasiert. Sie stehen stellvertretend für die juvenile Knochenarchitektur.

Durch die Unfallchirurgie der JLU Gießen wird an den restlichen Tieren der **Gruppen 1** und **2** ebenfalls im Alter von vierzehn Lebenswochen eine Laparotomie in Vollnarkose durchgeführt. Anschließend wird die Haltung für eine Woche auf eine Ratte pro Typ II Makrolon-Käfig umgestellt (EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH und Co.KG, Emmendingen, Deutschland; EBECO E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland; *Tecniplast S.p.a., Buguggiate, Italien*).

Ernährt werden alle Tiere sowohl vor als auch nach der Operation ausschließlich mit einer Standarddiät ad libitum, die eine Zusammensetzung u.a. aus Weizen, Mais und Soja, Mineralien, Vitaminen und Spurenelementen aufweist (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland).¹⁷⁴

Gemäß ihrer weiteren Einteilung in Untergruppen beläuft sich die Lebenszeit ab der Laparotomie auf einen Zeitraum von **einem bis zu vierzehn Monaten**.

- **Gruppe 11** *Sham* (1 Monat)
- **Gruppe 12** *OVX + Steroide* (1 Monat)
- **Gruppe 21** *Sham* (3 Monate)
- **Gruppe 22** *OVX + Steroide* (3 Monate)
- **Gruppe 31** *Sham* (12 Monate)
- **Gruppe 32** *OVX + Steroide* (12 Monate)
- **Gruppe 41** *Sham* (14 Monate)
- **Gruppe 42** *OVX + Steroide* (14 Monate)

20 Tiere bilden die **Gruppe 2**. Sie werden im Rahmen der Laparotomie beidseits ovariectomiert (OVX) und ab zwei Wochen nach der Operation für die vorgegebene Lebenszeit vierzehntägig medikamentös mit Steroiden behandelt (0,025 ml Dexamethason i.m. (Voren-Depot®, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland)). Diese Gruppe dient somit der Darstellung von Merkmalen der Steroid-induzierten Osteoporose (*OVX + Steroide*, **Gruppe 2**).

Die übrigen 34 Ratten erhalten lediglich eine Sham-Operation und werden somit nicht ovariectomiert. Sie dienen als Vergleichs-Gruppe (*Sham*, **Gruppe 1**) zu den osteoporotischen Tiermodellen mit jeweils gleichem Alter und sollen bei Analyse und Darstellung die physiologischen Verhältnisse der Knochenarchitektur widerspiegeln.

Entsprechend ihrer Gruppenzuteilung werden die 54 Tiere der **Gruppen 1** und **2** nach ein, drei, zwölf oder vierzehn Monaten mit Kohlenstoffmonoxid (CO) getötet und für die Entnahme der verschiedenen Knochenproben vorbereitet.

GRUPPEN	RATTEN	TH10	TIBIAE
Gruppe 0 (Kontrolle)	n=10	n=10	n=10
Gruppe 1 (Sham)	n=34	n=32	n=31
11 (Sham, 1 Monat)	n=2	n=2	n=2
21 (Sham, 3 Monate)	n=12	n=12	n=12
31 (Sham, 12 Monate)	n=11	n=11	n=11
41 (Sham, 14 Monate)	n=9	n=7	n=6
Gruppe 2 (OVX + Steroide)	n=20	n=13	n=20
12 (OVX + Steroide, 1 Monat)	n=3	n=3	n=3
22 (OVX + Steroide, 3 Monat)	n=12	n=5	n=12
32 (OVX + Steroide, 12 Monate)	n=3	n=3	n=3
42 (OVX + Steroide, 14 Monate)	n=2	n=2	n=2
INSGESAMT	n=64	n=55	n=61

Tabelle 2.1: Gruppenverteilung in der Übersicht

1.2 PRÄPARATION

Die einzelnen Teilprojekte erhalten verschiedenste Proben des murinen Skelettsystems.

Die für diese Arbeit relevanten Knochenproben beschränken sich auf den *Wirbelkörper Th10* sowie eine proximale *Tibia* der Ratten. Die *Wirbelkörper* und *Tibiae* werden einzeln entnommen und von Weichteilen befreit. Da mit Fortschreiten der induzierten Osteoporose die Knochenbrüchigkeit zunimmt, ist sowohl bei *Wirbelkörpern* als auch *Tibiae* mit größter Vorsicht darauf zu achten, dass es während der Präparation zu keinerlei Frakturen, Stauchungen etc. kommt, die Kortikalis intakt bleibt und die Proben im Ganzen explantiert werden. Um die Proben für weitere Untersuchungen aufbewahren zu können, werden sie sofort nach der Präparation in 4%igem Paraformaldehyd-Puffer (PFA) fixiert.

Aufgrund leicht abweichender Größen der einzelnen *Wirbelkörper* und der limitierenden technischen Parameter des Mikro-CTs, wie beispielsweise die Matrixgröße des CCD-Detektors, müssen bei einigen vor dem Scanvorgang die

Pedikel teilweise entfernt werden, um annähernd die gleiche Auflösung erreichen zu können.

2 BILDGEBENDE VERFAHREN – MIKRO-CT

Die fixierten Proben werden zur Darstellung und Analyse der Knochenstruktur und -parameter in der Abteilung Diagnostische Radiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen mithilfe der Mikro-Computertomographen (micro-CT_1072, micro-CT_1173) der Firma SkyScan® (Kontich, Belgien) untersucht.

Wesentliche Elemente des Mikro-CTs sind die Mikrofokusröhre sowie der Röntgendetektor, der aus einer gekühlten CCD-Kamera mit Fiber-Optik 3,7:1 (micro-CT_1072) bzw. einem Flat-Panel-Sensor (micro-CT_1173) besteht. Die CCD-Kamera weist eine Matrix von 1024 x 1024 Pixeln, der Flat-Panel-Detektor sogar von 2240 x 1836 Pixeln auf. Mit Kegelstrahlgeometrie, einer Fokusgröße von 8 μm und einer Röhrenspannung von je nach Gerät 80 kV (micro-CT_1072) bzw. 70 kV (micro-CT_1173) sowie maximal 100 μA (micro-CT_1072) bzw. 110 μA (micro-CT_1173) Stromstärke können Datensätze erstellt werden.^{162,163}

Die Probenbühne, die sich zwischen Mikrofokusröhre und Detektor befindet und in horizontaler Richtung verschieblich ist, dient der Befestigung des Probenhalters. Ein Aluminiumfilter (0,5 mm) vor der Kamera (micro-CT_1072) bzw. der Fokusröhre (micro-CT_1173) reduziert die Strahlenaufhärtung.

Parafilm®-Folie im Mikro-Computertomographen_1072 sowie ein mit PFA-Puffer getränktes Papier im Probenröhrchen des mikro-Computertomographen_1173 schützt das Knochenmaterial während der längeren Scandauer vor dem Austrocknen.

2.1 AKQUISITION DER DATEN

Das auf der Probenbühne befindliche Material rotiert während des Scanvorgangs für insgesamt 180° um die eigene Achse. Je nach Gerät handelt es sich dabei um 0,45°- bzw. 0,3°-Schritte (μCT_1072 bzw. μCT_1173). Pro Rotationsschritt werden vier bzw. fünf sogenannte „Frames“ durchgeführt – mehrmalige kurze Aufnahmen der Probe in der jeweiligen Stellung, die letztendlich das Signal-Rausch-Verhältnis verbessern sollen. Jede dieser Aufnahmen beansprucht eine Belichtungszeit von 2400 ms (micro-CT_1072) bzw. 900 ms (micro-CT_1173). In der Summe erhält man dann eine Aufnahmezeit pro Rotationsschritt von mindestens 9,6 s bzw. 4,5 s.

Die Scandauer der *Wirbelkörper* beträgt ca. zweieinhalb Stunden. Die der *Tibiae* nimmt aufgrund des durch die Länge des Röhrenknochens durchgeführten Oversize-Scans bis zu fünf Stunden in Anspruch.

2.2 REKONSTRUKTION DER DATEN

Die Umwandlung der Rohdaten (16-bit TIFF-Datensätze) erfolgt mithilfe der zwei Schritte Konvolution und Rückprojektion in axiale isotrope Schnittbilder.

Diese können daraufhin über den modifizierten Feldkamp-Flächenstrahl-Algorithmus zu virtuellen Schnittbildern verarbeitet und zu dreidimensionalen Datensätzen mit 8-bit Grauwertskala (256 Werte) rekonstruiert werden. Die isotrope Voxelgröße differiert innerhalb der *Wirbelkörper* aufgrund der unterschiedlichen Größe und begrenzenden Matrix der CCD-Kamera und liegt zwischen 6,104 μm und 7,876 μm . Die Auswertung der *Tibiae* erfolgt bei einer konstanten isotropen Voxelgröße von 9,042 μm im Mikro-Computertomographen_1072 sowie von 7,08 μm im Mikro-Computertomographen_1173.

	MICRO-CT_1072	MICRO-CT_1173
Art	High Resolution mikro-CT	High Energy mikro-CT
Spannung	80 kV (20 – 80 kV)	70 kV (40 – 130 kV)
Stromstärke	100 μA (\leq 100 μA)	110 μA (\leq 300 μA)
Leistung	8 W	8 W
Mikrofokusröhre	8 μm , Kegelstrahlgeometrie	8 μm , Kegelstrahlgeometrie
Detektor/Kamera	CCD, gekühlt; Fiber-Optik 3,7:1 Matrix: 1024 x 1024 Pixel	Flat-Panel-Sensor Matrix: 2240 x 1836 Pixel
Filter	Aluminium, 0,5 mm Vor Detektor	Aluminium, 0,5 mm Vor Fokusröhre
Rotationsschritte	0,45° 4 Frames/Rotation	0,3° 5 Frames/Rotation
Belichtungszeit/ Rotation	9,6 s (2400 ms/Frame)	4,5 s (900 ms/Frame)
Max. Auflösung	2 μm	4 – 5 μm

	MICRO-CT_1072	MICRO-CT_1173
Pixelgröße der Proben	6,104 - 7,876 μm (<i>Th10</i>) 9,042 μm (<i>Tibiae</i>)	7,08 μm
Probe	Parafilm	Probenröhrchen, PAF-getränktes Papier, Styropor
Oversize-Scan	Ja (<i>Tibiae</i>), aufgrund limitierender Matrix-Größe	Nein

Tabelle 2.2: Vergleichende Darstellung der für diese Studie relevanten Eckdaten der Mikro-Computertomographen *micro-CT_1072* und *micro-CT_1173*, SkyScan® (Kontich, Belgien) in der Übersicht^{162,163}

2.3 QUANTITATIVE BILDANALYSE

Aufgrund der schon erwähnten und teilweise leider nicht zu vermeidenden Frakturen entstehen bei einzelnen *Wirbelkörpern* und *Tibiae* Fragmente und Frakturen, die Messergebnisse verfälschen können. Daher werden diese Proben nur eingeschränkt mit den Analyseprogrammen bearbeitet bzw. komplett von der weiteren Bearbeitung ausgeschlossen.

Somit stehen von den insgesamt 64 Ratten 55 *Wirbelkörper* sowie 61 *Tibiae* zur Auswertung zur Verfügung.

Die dreidimensionalen Datensätze werden mithilfe der Softwareprogramme DataViewer® (Version 1.4.3.3 – 1.4.4) und CT-Analyser® (Version 1.10 – 1.13) der Firma SkyScan® (Kontich, Belgien) bearbeitet und quantifiziert.

2.3.1 DATAVIEWER®

Das Programm DataViewer® (Version 1.4.3.3 – 1.4.4) dient dazu, die eigentliche Bildbearbeitung der murinen *Wirbelkörper* und *Tibiae* zu erleichtern. Dazu wird ein sich in der Mitte der jeweiligen Ansicht (coronar (X=512), sagittal (Y=512) und transaxial (Z=variabel)) befindender Schnitt ausgewählt.

Die gedachte Achse durch Vorder- bzw. Rückseite der *Wirbelkörper* (transaxiale Ansicht) wird parallel zum horizontalen Bildrand ausgerichtet. Ebenso die Bodenplatte im coronaren bzw. sagittalen Schnitt.

Die *Tibiae* werden, um die anatomisch richtige Darstellung wiederzugeben, um 180° rotiert, sodass die proximale Metaphyse im oberen Bildabschnitt liegt. Dabei wird versucht, die mediale Kante der Tibia in der coronaren und transaxialen Ansicht parallel zum vertikalen Bildrand auszurichten. Zusätzlich kann im sagittalen Schnitt die gedachte Linie durch die Epiphysenfuge parallel zum horizontalen Bildrand angeordnet werden.

Die rotierten Datensätze werden als transaxialer Datensatz gespeichert, um für die Weiterverarbeitung im Analyseprogramm CT-Analyser® (Version 1.10 – 1.13) zur Verfügung zu stehen.

2.3.2 CT-ANALYSER®

Zur quantitativen Analyse werden die transaxialen Schnitte verwendet.

2.3.2.1 BESTIMMUNG DES PROBENUMFANGES

Der Übergang zwischen aus Kortikalis bestehender Bodenplatte und den *Wirbelkörper* ausfüllender Spongiosa wird in dem coronaren Schnitt optisch festgelegt. Von diesem Schnitt bis zum eigentlichen Probenbeginn wird eine Distanz (Δz) von ca. 350 μm bestimmt, um sicherzustellen, dass die spätere Probe rein trabekuläres Knochenmaterial enthält und sich die Kortikalis an dieser Stelle von der Spongiosa vollständig abgrenzt. Das Probenvolumen (Volume of Interest, VOI) wird individuell durch das Einsprossen der Venenplatte im oberen Drittel des *Wirbelkörpers* limitiert. Somit variieren die Probenlängen von *Th10* von 0,916 mm bis 1,953 mm auch aufgrund der unterschiedlichen Größen und beschränken sich auf die unteren Zweidrittel der *Wirbelkörper*.

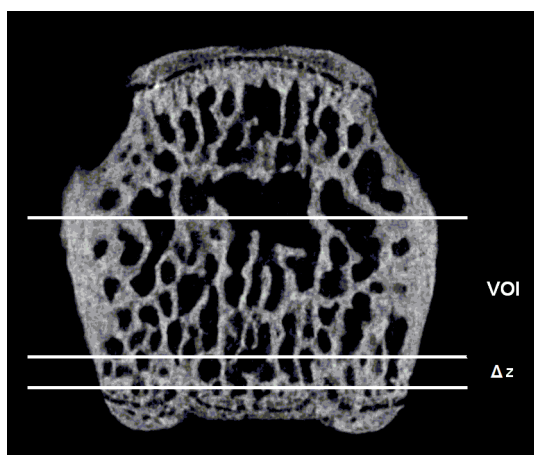


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Probeneinteilung anhand eines *Th10*-*Wirbelkörpers* im coronaren Schnittbild.

Δz entspricht der Distanz zwischen der optisch definierten Grenze von Bodenplatte und Spongiosa und dem Probenbeginn. VOI stellt das für die Messungen relevante Probenvolumen dar.

Auch bei den *Tibiae* wird das coronare Schnittbild zu Hilfe genommen, um die Epiphysenfuge optisch festzulegen. Der Beginn der Probe liegt ca. 500 μm (Δz) distal dieser definierten Fuge und beträgt bei einer Schichtdicke von 9,042 μm stets 55 Schnitte, bei 7,08 μm immer 71 Schnitte. Die eigentliche Probe (VOI) befindet sich somit in der proximalen Metaphyse der *Tibiae* und hat eine konstante Größe von ca. 3 mm und entspricht 330 bzw. 424 (bei 7,08 μm) Schnitten.

2.3.2.2 BESTIMMUNG DER TRABEKULÄREN REGION OF INTEREST

Um die für die spätere Analyse essentielle Region of Interest (ROI) zu bestimmen, werden im ersten und letzten Schnitt der Proben die trabekulären Strukturen definiert, indem die endostale Kortikalis als Begrenzung gilt. Nach Interpolation der ausgewählten Flächen innerhalb der Probe und somit vorläufigen Eingrenzung des Volumens werden die dazwischen befindlichen Schnitte in gleicher Weise bearbeitet. Die Grenzen der ROI der jeweiligen Schicht werden an den Verlauf der Kortikalis angepasst, sodass das trabekuläre Volumen möglichst genau wiedergegeben werden kann.

Dieses Vorgehen wird sowohl bei den *Wirbelkörpern* als auch bei den *Tibiae* in gleicher Weise durchgeführt.

2.3.2.3 BERECHNUNG DER STRUKTURPARAMETER

Aus dem zu messenden Volumen der *Wirbelkörper* und *Tibiae*, das sich aus den jeweiligen ROIs der transaxialen Bilder zusammensetzt, werden mithilfe der 3D-Analyse für die Osteoporose relevante Strukturparameter berechnet.

In der Bildsegmentierung wird mit dem globalen Schwellwertverfahren nach Rosenfeld¹⁷⁵ das gewünschte Objekt hervorgehoben.

In dieser Arbeit liegt eine Grauwertskala von 256 Werten (8-bit) vor, wobei die Null für Weiß, die 255 für Schwarz stehen. Um nach der Binarisierung ein detailliertes und möglichst kongruentes Bild der trabekulären Strukturen zu den vorherigen Schnittbildern mit unterschiedlichen Grauwerten zu erhalten, wird ein Schwellenwert bestimmt. Dieser Schwellenwert - in dieser Arbeit stets 75 - sorgt im binarisierten Bild für eine Auslöschung der Signale, deren Grauwert unterhalb der definierten Grenze liegt. Somit werden beispielsweise die Vortäuschung einer trabekulären Konnektivität aufgrund einer zu hohen Anzahl vieler schwacher Signale und konsekutiv die Verfälschung von Werten verhindert.

Die eigentliche Analyse der bearbeiteten Datensätze wird von dem Programm CT-Analyser® (Version 1.10 – 1.13) durchgeführt. In dieser Arbeit haben wir uns auf folgende Strukturparameter festgelegt:

- **BV/TV** *Bone Volume/Tissue Volume* (Knochen-/Gesamtvolumen in %)
- **Tb.N** *Trabecular Number* (Anzahl der Trabekel pro mm)
- **Tb.Th** *Trabecular Thickness* (Dicke eines Trabekels in mm)
- **Tb.Sp** *Trabecular Separation* (Abstand zwischen trabekulären Strukturen in mm)
- **SMI** *Structure Model Index* (Strukturelle Anordnung der Trabekel)
- **Tb.Pf** *Trabecular Pattern Factor* (Verhältnis intertrabekulärer Verknüpfungen in 1/mm)
- **i.S** *Intersection Surface* (Schnittfläche der trabekulären Strukturen an der Grenze des VOI in mm²)

2.3.2.4 BESTIMMUNG DER TRABEKULÄREN AUSDEHNUNG

Die Spongiosalänge innerhalb der *Tibiae* wird rein optisch festgelegt, indem der Probenbeginn den Start der Messung und das Vorkommen der letzten Trabekel im Markraum das Ende darstellen. Reicht der gescannte Datensatz nicht weit genug in die Diaphyse, um das Ende der trabekulären Ausdehnung sichtbar zu machen, wird der letzte Schnitt des vorhandenen Datensatzes als Ende festgelegt. Die erhobenen Werte werden in Millimeter angegeben.

3 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Sämtliche Messergebnisse der oben aufgezählten Bearbeitungen und Analysen werden mithilfe des Statistikprogramms JMP® 8.0 (SAS® Institute, Cary, NC, USA) ausgewertet.

Die statistischen Daten werden in der folgenden Arbeit mithilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (One-way ANOVA) ermittelt und stets als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben. Zum Vergleich aller Gruppen im

zeitlichen Verlauf wird zusätzlich der Tukey-Kramer Gegentest mit Fehlerkorrektur herangezogen.

Der unpaare Student t-Test bestimmt das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zwischen den einzelnen Gruppen. Alle Werte für die statistische Wahrscheinlichkeit mit $p < 0,05$ werden als signifikant angenommen.

III ERGEBNISSE

Bereits makroskopisch waren sowohl im zeitlichen Verlauf von 0 über 1, 3 und 12 bis hin zu 14 Monaten als auch im direkten Vergleich beider Gruppen (*Sham* vs. *OVX + Steroide*) Unterschiede in der Struktur des Knochengewebes sichtbar.

Eine Übersicht der Ergebnisse aus der statistischen Auswertung als Mittelwert und Standardabweichung ($MW \pm SD$) mit ausgewählten Signifikanzangaben für die in dieser Arbeit relevanten Vergleiche bieten die Tabellen 3.1 (Th10), 3.2 (Tibia) und 3.3 (Spongiosalänge) am Ende des Kapitels Ergebnisse.

1 Th10

Im Folgenden werden Vergleiche zum einen im zeitlichen Verlauf dargestellt, um die Entwicklung und Veränderungen des Trabekelwerkes innerhalb einer Studienpopulation deutlich zu machen, die mit steigendem Alter bei Vergleichs- (*Sham*) und Osteoporose-Gruppe (*OVX + Steroide*) vorkommen. Zum anderen werden direkte Unterschiede in der Mikroarchitektur zwischen der *Sham*-Gruppe und den an Osteoporose erkrankten Tieren zu den Zeitpunkten 1, 3, 12 und 14 Monaten aufgezeigt.

1.1 VERÄNDERUNGEN DER MIKROARCHITEKTUR IM ZEITLICHEN VERLAUF INNERHALB EINER UNTERGRUPPE

Eine Darstellung der Verhältnisse der Gruppen *Sham* und *OVX + Steroide* mittels Boxplots-Diagrammen erfolgt in Abbildung 3.1 am Ende des Kapitels 1.1.

1.1.1 SHAM (GRUPPE X1) IM ZEITLICHEN VERLAUF

Insgesamt zeigt das relative Knochenvolumen **BV/TV** (in Prozent) über den gesamten Beobachtungszeitraum von 14 Monaten eine hoch signifikante Abnahme (**0** vs. **41**, $p < 0,0001^*$).

Ausgehend von der Kontroll-Gruppe (Gruppe 0) mit 14 Wochen stellt sich zu den Tieren der Gruppe 11 nach einem weiteren Monat Lebenszeit eine leichte Minderung von BV/TV dar, die jedoch nicht signifikant ist ($44,445 \pm 2,233$ (**0**) vs. $38,292 \pm 1,670$ (**11**), *n.s.*). Zwischen den Gruppen 11 und 21 (1 und 3 Monate) zeigt sich eine signifikante Zunahme des trabekulären Volumens ($38,292 \pm 1,670$ (**11**) vs. $46,841 \pm 4,894$ (**21**), $p = 0,0169^*$). In den darauffolgenden neun Monaten nimmt das

Knochenvolumen wieder signifikant ab ($46,841 \pm 4,894$ (**21**) vs. $40,368 \pm 3,957$ (**31**), $p = 0,0013^*$). Der Unterschied der Sham-Tiere zwischen 1 und 12 Monaten fällt nicht signifikant aus (**11** vs. **31**, *n.s.*), der Vergleich zwischen 0 und 12 Monaten ist jedoch signifikant (**0** vs. **31**, $p = 0,0445^*$). Auch zwischen 12 und 14 Monaten Lebenszeit nach der Sham-Operation zeigt sich eine weitere signifikante Reduktion von BV/TV ($40,368 \pm 3,957$ (**31**) vs. $34,327 \pm 7,292$ (**41**), $p = 0,0081^*$), die im Vergleich zwischen 1 und 14 Monaten jedoch nicht signifikant ausfällt (**11** vs. **41**, *n.s.*).

Die Anzahl der Trabekel pro Millimeter (**Tb.N**, Trabecular Number, in 1/mm) zeigt innerhalb des Alterns von 14 Monaten einen hoch signifikanten Rückgang (**0** vs. **41**, $p < 0,0001^*$).

Zwischen der Kontroll- (mit definitionsgemäß 0 Monaten Beobachtung) und der Vergleichs-Gruppe mit 1 Monat ist eine nicht signifikante Abnahme zu verzeichnen ($4,931 \pm 0,650$ (**0**) vs. $4,563 \pm 0,069$ (**11**), *n.s.*). Nach geringer, nicht signifikanter Zunahme der Trabekel mit 3 Monaten ($4,563 \pm 0,069$ (**11**) vs. $4,784 \pm 0,423$ (**21**), *n.s.*) reduziert sich Tb.N mit 12 Monaten nicht signifikant wieder auf sehr ähnliche Werte wie zuvor ($4,784 \pm 0,423$ (**21**) vs. $4,514 \pm 0,536$ (**31**), *n.s.*). Zwischen dem Beobachtungszeitraum von 12 und 14 Monaten liegt eine signifikante Minderung der trabekulären Anzahl vor ($4,514 \pm 0,536$ (**31**) vs. $3,653 \pm 0,718$ (**41**), $p = 0,0019^*$). Ebenso zeigt sich eine signifikante Abnahme zwischen den Sham-Tieren von 1 und 14 Monaten (**11** vs. **41**, $p = 0,0410^*$).

Die Dicke der einzelnen Trabekel, **Tb.Th** (in Millimeter) zeigt über den gesamten Zeitraum von 14 Wochen einige Schwankungen, jedoch keine signifikanten Veränderungen zwischen Anfangs- und Endwert (**0** vs. **41**, *n.s.*).

So liegt zwischen der Gruppe 0 und den Tieren mit einem Alter von 1 Monat eine sehr geringe und nicht signifikante Abnahme der Dicke ($0,087 \pm 0,004$ (**0**) vs. $0,084 \pm 0,002$ (**11**), *n.s.*). Eine signifikante Zunahme der trabekulären Durchmesser wird zwischen 1 und 3 Monaten deutlich ($0,084 \pm 0,002$ (**11**) vs. $0,098 \pm 0,011$ (**21**), $p = 0,0315^*$). Dieser Wert bildet die maximal erreichte Dicke und sinkt bis zum Zeitpunkt nach einem Jahr signifikant ab ($0,098 \pm 0,011$ (**21**) vs. $0,090 \pm 0,008$ (**31**), $p = 0,0217^*$). Bei einer wiederum minimalen Zunahme der Dicke zwischen 12 und 14 Monaten zeigt sich keine Signifikanz ($0,090 \pm 0,008$ (**31**) vs. $0,094 \pm 0,011$ (**41**), *n.s.*).

Eine hoch signifikante Zunahme der Abstände zwischen einzelnen Trabekeln (**Tb.Sp**, Trabecular Separation, in Millimeter) ist nach 14 Monaten im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nachweisbar (**0** vs. **41**, $p < 0,0001^*$) sowie bereits signifikant nach 12 Monaten (**0** vs. **31**, $p = 0,0063^*$). Ebenso liegt noch ein signifikanter Unterschied zwischen den Sham-Tieren von 1 und 14 Monaten vor (**11** vs. **41**, $p = 0,0307^*$).

Im Verlauf des Beobachtungszeitraumes von 0 über 1, 3 und 12 Monaten zeigen sich minimalste Zu- bzw. Abnahmen der Distanzen, die jedoch nicht signifikant sind ($0,135 \pm 0,044$ (**0**) vs. $0,161 \pm 0,012$ (**11**), *n.s.*; $0,161 \pm 0,012$ (**11**) vs. $0,157 \pm 0,016$ (**21**), *n.s.*; $0,157 \pm 0,016$ (**21**) vs. $0,177 \pm 0,026$ (**31**), *n.s.*). Erst mit höherem Alter der Ratten kann eine signifikante Zunahme der Trabekelabstände zwischen 12 und 14 Monaten dargestellt werden ($0,177 \pm 0,026$ (**31**) vs. $0,221 \pm 0,043$ (**41**), $p = 0,0098^*$).

Der **SMI** (Structure Model Index) zeigt nach einer größeren Schwankung zu Beginn der Beobachtung innerhalb der 14 Monate keinen signifikanten Anstieg der Werte (**0** vs. **41**, *n.s.*).

Nach Durchführung der Sham-Operation stellt sich eine nicht signifikante Zunahme des SMI dar ($-0,107 \pm 0,428$ (**0**) vs. $0,363 \pm 0,159$ (**11**), *n.s.*). In dem darauffolgenden Abschnitt von 1 zu 3 Monaten ist eine signifikante Minderung des Wertes zu verzeichnen ($0,363 \pm 0,159$ (**11**) vs. $-0,306 \pm 0,326$ (**21**), $p = 0,0167^*$). Im Laufe der nächsten neun Monate erhöht sich der SMI nicht signifikant ($-0,306 \pm 0,326$ (**21**) vs. $-0,256 \pm 0,209$ (**31**), *n.s.*). Eine signifikante Zunahme erfolgt zwischen 12 und 14 Monaten, wobei dieser SMI den Absolutwert zum Zeitpunkt 1 Monat nicht erreichen kann ($-0,256 \pm 0,209$ (**31**) vs. $0,229 \pm 0,497$ (**41**), $p = 0,0067^*$).

Der Verlauf des Trabecular Pattern Factors (**Tb.Pf**) über den Beobachtungszeitraum von 14 Monaten zeigt ein dem SMI sehr ähnliches Bild und weist eine signifikante Erhöhung auf (**0** vs. **41**, $p = 0,0014^*$).

Zwischen der Kontroll-Gruppe mit 0 Monaten und den Sham-Tieren nach 1 Monat liegt eine signifikante Zunahme vor ($-5,376 \pm 2,636$ (**0**) vs. $-0,870 \pm 0,951$ (**11**), $p = 0,0420^*$). Nach einer nicht signifikanten Abnahme von 1 bis 3 Monaten ($-0,870 \pm 0,951$ (**11**) vs. $-4,969 \pm 2,169$ (**21**), *n.s.*) sind fast konstante Werte ohne signifikante Änderungen bis zu 12 Monaten feststellbar ($-4,969 \pm 2,169$ (**21**) vs. $-4,997 \pm 2,096$ (**31**), *n.s.*). Einen signifikanten Anstieg des Tb.Pf kann man im fortgeschrittenen Alter zwischen 12 und 14 Monaten beobachten ($-4,997 \pm 2,096$ (**31**) vs. $-0,698 \pm 3,753$ (**41**), $p = 0,0025^*$).

Bei Betrachtung der trabekulären Schnittfläche (**i.S.**, Intersection Surface, in Quadratmillimeter) ist nach 14 Monaten verglichen zum Ausgangswert der Kontrolle mit 0 Monaten keine Signifikanz zu ermitteln (**0** vs. **41**, *n.s.*).

Nach einer geringen, nicht signifikanten Abnahme der Fläche nach 1 Monat ($6,542 \pm 1,211$ (**0**) vs. $5,995 \pm 0,078$ (**11**), *n.s.*) zeigt sich nach 3 Monaten eine deutliche Vergrößerung der Schnittfläche ($5,995 \pm 0,078$ (**11**) vs. $8,659 \pm 2,127$ (**21**), $p = 0,0350^*$). In den folgenden neun Monaten verringert sich der Wert der i.S jedoch wieder signifikant ($8,659 \pm 2,127$ (**21**) vs. $6,657 \pm 1,030$ (**31**), $p = 0,0045^*$). Zwischen 12 und 14 Monaten kann erneut eine sehr geringe, nicht signifikante Vergrößerung festgestellt werden ($6,657 \pm 1,030$ (**31**) vs. $6,867 \pm 2,195$ (**41**), *n.s.*).

1.1.2 OVX + STEROIDE (GRUPPE X2) IM ZEITLICHEN VERLAUF

Betrachtet man den Verlauf des relativen Knochenvolumens **BV/TV** (Bone Volume/Tissue Volume, in Prozent) der Steroid-induzierten Osteoporosemodelle, ist eine hoch signifikante Reduktion sowohl nach 12 als auch nach 14 Monaten festzustellen (**0** vs. **32**, $p < 0,0001^*$; **0** vs. **42**, $p < 0,0001^*$).

Es zeigt sich von Beginn der Beobachtung an von 0 über 1 bis zu 3 Monaten eine nicht signifikante Abnahme ($44,445 \pm 2,233$ (**0**) vs. $43,405 \pm 4,310$ (**12**), *n.s.*; $43,405 \pm 4,310$ (**12**) vs. $37,116 \pm 3,892$ (**22**), *n.s.*). In den folgenden neun Monaten nimmt das BV/TV bis zum 12. Monat jedoch hoch signifikant ab ($37,116 \pm 3,892$ (**22**) vs. $18,533 \pm 3,169$ (**32**), $p < 0,0001^*$). Im letzten Abschnitt zwischen 12 und 14 Monaten ist ein weiterer Rückgang des Knochengewebes zu ermitteln, der allerdings nicht signifikant ist ($18,533 \pm 3,169$ (**32**) vs. $11,695 \pm 5,797$ (**42**), *n.s.*).

Die Anzahl der Trabekel (**Tb.N.**, in 1/mm) zeigt ein dem relativen Knochenvolumen ähnliches Bild und hat somit ebenfalls im Laufe von einem Jahr bzw. 14 Monaten einen hoch signifikanten Rückgang zu verzeichnen (**0** vs. **32**, $p < 0,0001^*$; **0** vs. **42**, $p < 0,0001^*$).

Einer sehr geringen, nicht signifikanten Zunahme der Trabekel nach 1 Monat ($4,931 \pm 0,650$ (**0**) vs. $5,065 \pm 0,221$ (**12**), *n.s.*) folgen signifikante bzw. hoch signifikante Minderungen der durchschnittlichen Trabekelanzahl nach 3 bzw. 12 Monaten ($5,065 \pm 0,221$ (**12**) vs. $3,978 \pm 0,485$ (**22**), $p = 0,0084^*$; $3,978 \pm 0,485$ (**22**) vs. $2,231 \pm 0,484$ (**32**), $p < 0,0001^*$). Eine weitere Abnahme an Trabekeln nach 14 Monaten ist jedoch nicht signifikant ($2,231 \pm 0,484$ (**32**) vs. $1,484 \pm 0,412$ (**42**), *n.s.*).

Über den gesamten Verlauf der 14 Monate können ähnlich der *Sham*-Gruppe nicht signifikante Schwankungen der trabekulären Dicke (**Tb.Th**, in mm) nachgewiesen werden (**0** vs. **32**, *n.s.*; **0** vs. **42**, *n.s.*; $0,087 \pm 0,004$ (**0**) vs. $0,086 \pm 0,006$ (**12**), *n.s.*; $0,086 \pm 0,006$ (**12**) vs. $0,094 \pm 0,006$ (**22**), *n.s.*; $0,094 \pm 0,006$ (**22**) vs. $0,084 \pm 0,007$ (**32**); *n.s.*; $0,084 \pm 0,007$ (**32**) vs. $0,076 \pm 0,018$ (**42**), *n.s.*).

Eine hoch signifikante Zunahme der Distanz zwischen den Trabekeln (**Tb.Sp**, in mm) kann über die gesamte Beobachtungsdauer nach 12 und 14 Monaten nachgewiesen werden (**0** vs. **32**, $p < 0,0001^*$; **0** vs. **42**, $p < 0,0001^*$).

Es liegt eine kontinuierliche Vergrößerung der Strecke vor, die zu Anfang zwischen 0 und 1 ($0,135 \pm 0,044$ (**0**) vs. $0,149 \pm 0,004$ (**12**), *n.s.*) sowie nach 3 Monaten ($0,149 \pm 0,004$ (**12**) vs. $0,192 \pm 0,033$ (**22**), *n.s.*) keine Signifikanz zeigt. Die darauffolgenden neun Monate lassen den intertrabekulären Abstand nach einem Jahr hoch signifikant ansteigen ($0,192 \pm 0,033$ (**22**) vs. $0,356 \pm 0,067$ (**32**), $p < 0,0001^*$). Zwischen 12 und 14 Monaten nimmt die Distanz nicht signifikant zu ($0,356 \pm 0,067$ (**32**) vs. $0,367 \pm 0,012$ (**42**), *n.s.*).

Der **SMI** zeigt einen kontinuierlichen Anstieg, der sowohl nach 12 als auch nach 14 Monaten hoch signifikant ausfällt (**0** vs. **32**, $p < 0,0001^*$; **0** vs. **42**, $p < 0,0001^*$).

In den Abständen von 0 bis 1 ($-0,107 \pm 0,428$ (**0**) vs. $-0,136 \pm 0,350$ (**12**), *n.s.*) bzw. 1 bis 3 Monaten ($-0,136 \pm 0,350$ (**12**) vs. $0,362 \pm 0,246$ (**22**), *n.s.*) sind lediglich nicht signifikante Erhöhungen des SMI festzustellen. Der große zeitliche Abstand zwischen 3 und 12 Monaten zeigt eine signifikante Zunahme des Wertes ($0,362 \pm 0,246$ (**22**) vs. $0,962 \pm 0,324$ (**32**), $p = 0,0243^*$). Das letzte Beobachtungsfenster bis 14 Monate weist ebenfalls eine Erhöhung auf, die jedoch nicht signifikant ist ($0,962 \pm 0,324$ (**32**) vs. $1,609 \pm 0,516$ (**42**), *n.s.*).

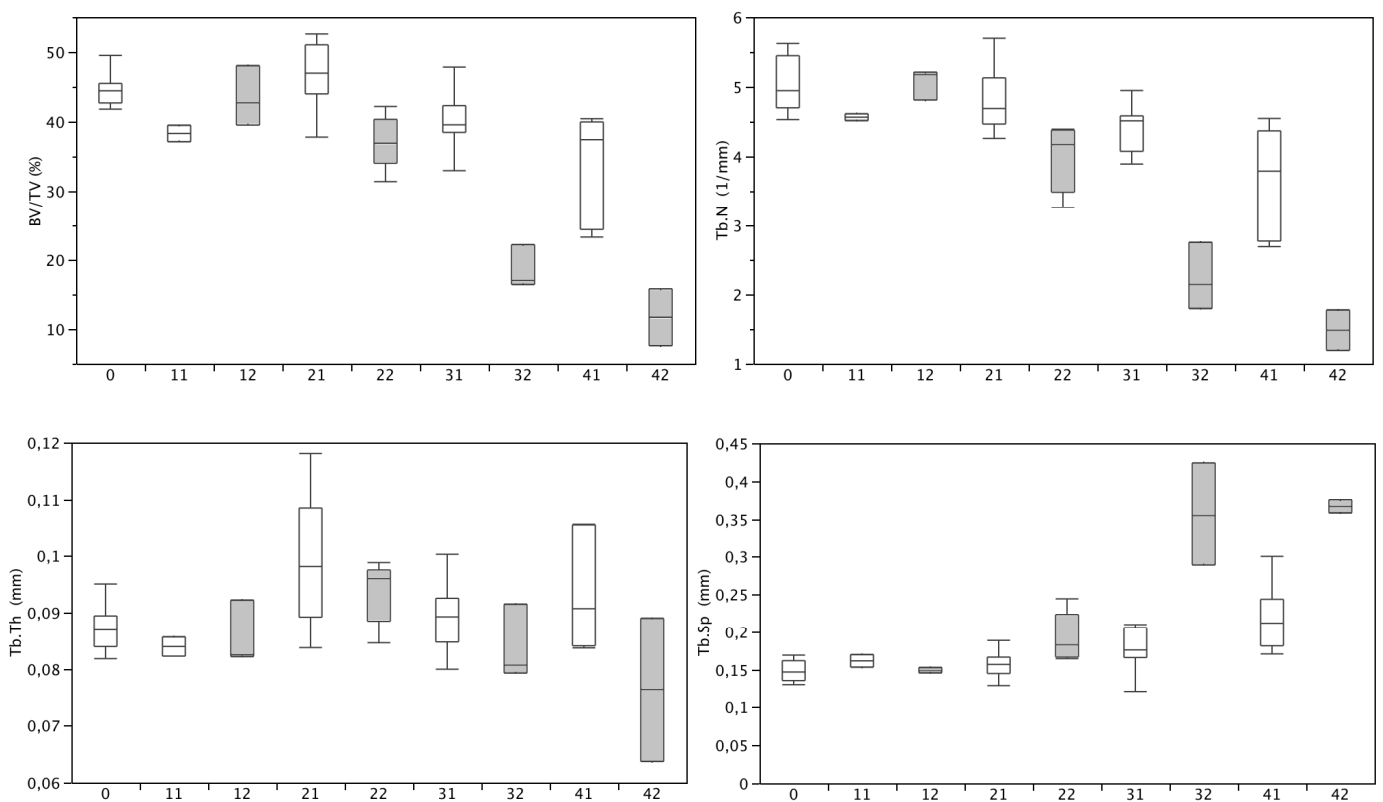
Wie bereits bei der Vergleichs-Gruppe (*Sham*) aufgefallen, zeigt auch im osteoporotischen Tiermodell der Trabecular Pattern Factor (**Tb.Pf**) ein dem SMI sehr ähnlichen Verlauf über den Zeitraum von 14 Monaten. So liegt sowohl nach 12 als auch nach 14 Monaten nach konstantem Ansteigen des Wertes eine hohe Signifikanz vor (**0** vs. **32**, $p < 0,0001^*$; **0** vs. **42**, $p < 0,0001^*$).

Lediglich der Übergang von Kontroll-Gruppe mit 0 Monaten zu den 1 Monatstieren weist keine signifikante Zunahme auf ($-5,376 \pm 2,636$ (**0**) vs. $-5,038 \pm 2,512$ (**12**), *n.s.*). Während der restlichen Studienzeit können signifikante Steigerungen des Tb.Pf

zwischen 1 und 3 Monaten ($-5,038 \pm 2,512$ (**12**) vs. $-0,472 \pm 1,778$ (**22**), $p = 0,0294^*$), 3 und 12 Monaten ($-0,472 \pm 1,778$ (**22**) vs. $3,753 \pm 2,958$ (**32**), $p = 0,0431^*$) sowie 12 und 14 Monaten ($3,753 \pm 2,958$ (**32**) vs. $12,715 \pm 8,339$ (**42**), $p = 0,0010^*$) ermittelt werden.

Während der 14 Monate weist die trabekuläre Schnittfläche (**i.S.**, in Quadratmillimeter) der osteoporotischen Studienpopulation wie auch die der *Sham*-Gruppe zu Anfang eine leichte Erhöhung auf, die jedoch am Ende wieder deutlich abnimmt. So zeigt sich zwischen 0 und 14 Monaten eine signifikante (**0** vs. **42**, $p = 0,0021^*$), zwischen 1 und 14 Monaten eine hoch signifikante (**12** vs. **42**, $p < 0,0001^*$) Reduktion der Fläche.

Nach 1 Monat Beobachtung findet sich eine signifikante Vergrößerung der Schnittfläche ($6,542 \pm 1,211$ (**0**) vs. $8,848 \pm 0,824$ (**12**), $p = 0,0342^*$). Diese nimmt nach 3 Monaten jedoch zunächst nicht signifikant wieder ab ($8,848 \pm 0,824$ (**12**) vs. $7,303 \pm 1,590$ (**22**), *n.s.*). Ein signifikanter Rückgang der i.S ist in den darauffolgenden neun Monaten zwischen 3 und 12 Monaten sichtbar ($7,303 \pm 1,590$ (**22**) vs. $3,486 \pm 0,834$ (**32**), $p = 0,0021^*$). Die Verringerung der Fläche schreitet zwischen 12 und 14 Monaten weiter fort, jedoch nicht signifikant ($3,486 \pm 0,834$ (**32**) vs. $2,484 \pm 1,775$ (**42**), *n.s.*).



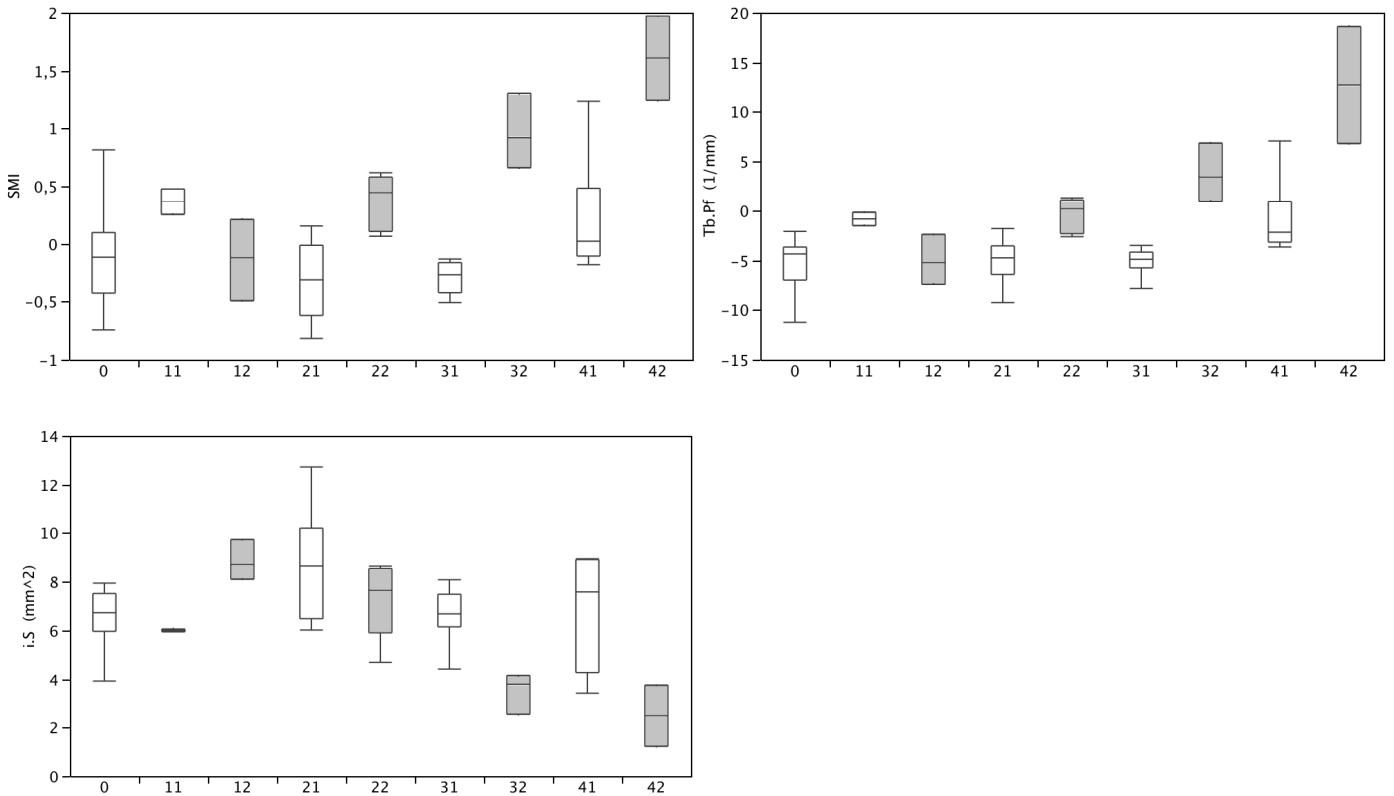


Abbildung 3.1: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Strukturparameter BV/TV (relatives Knochenvolumen), Tb.N (Trabekelanzahl), Tb.Th (Trabekeldicke), Tb.Sp (intertrabekuläre Distanz), SMI (Structure Model Index), Tb.Pf (Trabecular Pattern Factor) und i.S (trabekuläre Schnittfläche) der Wirbelkörper Th10.

Die Darstellung zeigt Boxplots-Diagramme der Gruppen Kontrolle (0), Sham (weiß) und OVX + Steroide (grau) im Verlauf über 0, 1, 3, 12 und 14 Monate Studienlaufzeit. Zur Gruppe Sham gehören die Untergruppen 11 (1 Monat), 21 (3 Monate), 31 (12 Monate) und 41 (14 Monate). Der Gruppe OVX + Steroide werden die Untergruppen 12 (1 Monat), 22 (3 Monate), 32 (12 Monate) und 42 (14 Monate) zugeteilt.

Die für diese Arbeit relevanten Signifikanzangaben wurden aus Gründen der besseren Übersicht weggelassen und sind der Tabelle 3.1 bzw. dem Kapitel 1.1 zu entnehmen.

1.2 VERÄNDERUNGEN DER MIKROARCHITEKTUR ZWISCHEN DEN UNTERGRUPPEN INNERHALB EINES ZEITPUNKTES

1.2.1 VERÄNDERUNGEN NACH 1 MONAT

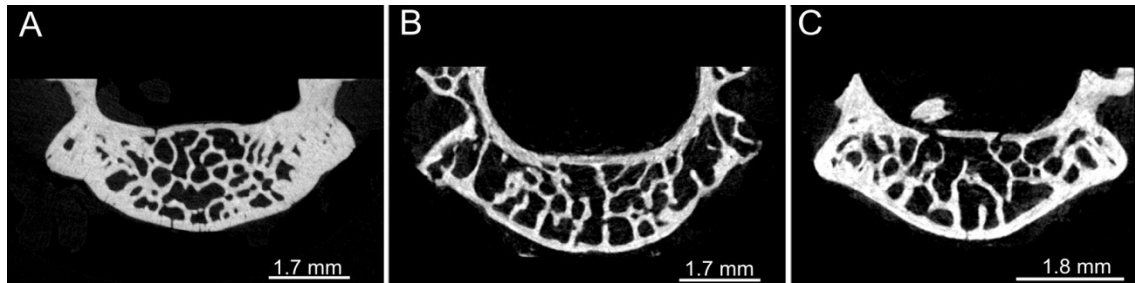


Abbildung 3.2: Vergleichende Darstellung axialer Schnittbilder der Wirbelkörper Th10. Mittels der hohen Auflösung des μ CTs kann die Mikroarchitektur der Kontroll-Gruppe mit 0 Monaten Beobachtung (A) sowie der Gruppen Sham, 11 (B) und OVX + Steroide, 12 (C) zum Zeitpunkt 1 Monat gegenübergestellt werden.

Vergleicht man sämtliche Strukturparameter der Wirbelkörper Th10 der beiden Studienpopulationen Sham und OVX + Steroide zum Zeitpunkt 1 Monat, liegen keine signifikanten Unterschiede in den Werten vor (**BV/TV**: $38,292 \pm 1,670$ (11) vs. $43,405 \pm 4,310$ (12), *n.s.*; **Tb.N**: $4,563 \pm 0,069$ (11) vs. $5,065 \pm 0,221$ (12), *n.s.*; **Tb.Th**: $0,084 \pm 0,002$ (11) vs. $0,086 \pm 0,006$ (12), *n.s.*; **Tb.Sp**: $0,161 \pm 0,012$ (11) vs. $0,149 \pm 0,004$ (12), *n.s.*; **SMI**: $0,363 \pm 0,159$ (11) vs. $-0,136 \pm 0,350$ (12), *n.s.*; **Tb.Pf**: $-0,870 \pm 0,951$ (11) vs. $-5,038 \pm 2,512$ (12), *n.s.*; **i.S**: $5,995 \pm 0,078$ (11) vs. $8,848 \pm 0,824$ (12), *n.s.*).

1.2.2 VERÄNDERUNGEN NACH 3 MONATEN

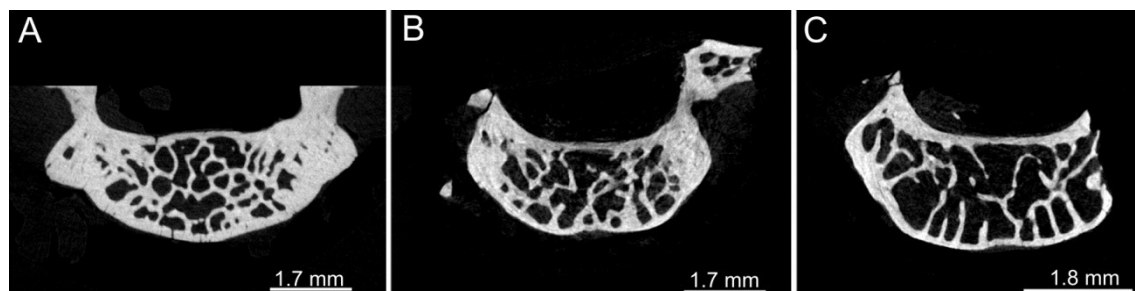


Abbildung 3.3: Vergleichende Darstellung axialer Schnittbilder der Wirbelkörper Th10. Mittels der hohen Auflösung des μ CTs kann die Mikroarchitektur der Kontroll-Gruppe mit 0 Monaten Beobachtung (A) sowie der Gruppen Sham, 11 (B) und OVX + Steroide, 12 (C) zum Zeitpunkt 3 Monate gegenübergestellt werden.

Betrachtet man die mikro-computertomographischen Schnittbilder der *Wirbelkörper* nach 3 Monaten, kann rein optisch eine leichte Rarefizierung des Knochengewebes im axialen Bild der Gruppe *OVX + Steroide*(**22**) festgestellt werden (siehe Abbildung 3.3). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der statistischen Auswertung.

Sowohl das relative Knochenvolumen (BV/TV) als auch die trabekuläre Anzahl (Tb.N) zeigen signifikante Abnahmen der Werte in der Osteoporose-induzierten Gruppe (**BV/TV**: $46,841 \pm 4,894$ (**21**) vs. $37,116 \pm 3,892$ (**22**), $p = 0,0002^*$; **Tb.N**: $4,784 \pm 0,423$ (**21**) vs. $3,978 \pm 0,485$ (**22**), $p = 0,0074^*$). Die Parameter SMI und Trabecular Pattern Factor (Tb.Pf) weisen nach 3 Monaten ebenfalls signifikante Unterschiede auf, wobei jeweils ein Anstieg der Werte in der Gruppe *OVX + Steroide* (**22**) zu verzeichnen ist (**SMI**: $-0,306 \pm 0,326$ (**21**) vs. $0,362 \pm 0,246$ (**22**), $p = 0,0009^*$; **Tb.Pf**: $-4,969 \pm 2,169$ (**21**) vs. $-0,472 \pm 1,778$ (**22**), $p = 0,0039^*$).

In den restlichen Strukturparametern finden sich keine signifikanten Änderungen zwischen *Sham*- und Osteoporose-Tieren (**Tb.Th**: $0,098 \pm 0,011$ (**21**) vs. $0,094 \pm 0,006$ (**22**), *n.s.*; **Tb.Sp**: $0,157 \pm 0,016$ (**21**) vs. $0,192 \pm 0,033$ (**22**), *n.s.*; **i.S**: $8,659 \pm 2,127$ (**21**) vs. $7,303 \pm 1,590$ (**22**), *n.s.*).

1.2.3 VERÄNDERUNGEN NACH 12 MONATEN

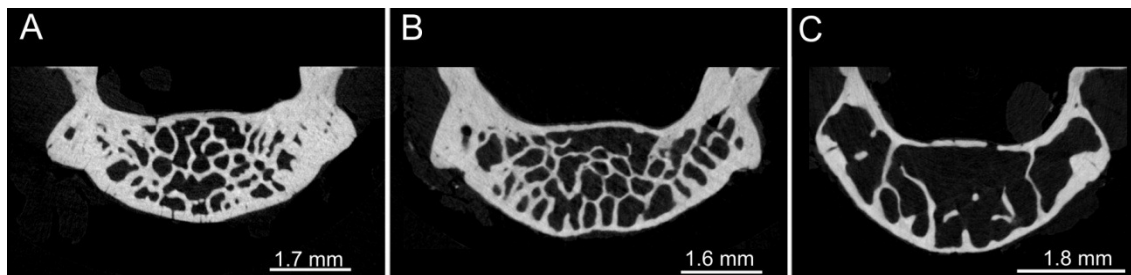


Abbildung 3.4: Vergleichende Darstellung axialer Schnittbilder der Wirbelkörper Th10. Mittels der hohen Auflösung des μ CTs kann die Mikroarchitektur der Kontroll-Gruppe mit 0 Monaten Beobachtung (A) sowie der Gruppen Sham, 11 (B) und OVX + Steroide, 12 (C) zum Zeitpunkt 12 Monate gegenübergestellt werden.

Die deutlich geringere Ausprägung des Trabekelwerkes in der Gruppe *OVX + Steroide* nach 12 Monaten ist sowohl im Vergleich zur gleichaltrigen Sham-Gruppe als auch im Vergleich zu den 12 Monate jüngeren Kontrolltieren anhand der μ CT-Bilder gut visualisierbar (siehe Abbildung 3.4).

Quantitativ bestätigt sich dieses Bild in (hoch) signifikanten Unterschieden in sechs von sieben Strukturparametern. Lediglich die Dicke der Trabekel (**Tb.Th**) weist in der Osteoporose-Gruppe eine nicht signifikante Abnahme gegenüber der *Sham*-Tiere auf ($0,090 \pm 0,008$ (**31**) vs. $0,084 \pm 0,007$ (**32**), *n.s.*). So stellt sich eine durchgehende

Verschlechterung der Parameter bei BV/TV, Tb.N, Tb.Sp, SMI und Tb.Pf durch hoch signifikante p-Werte dar (**BV/TV**: $40,368 \pm 3,957$ (31) vs. $18,533 \pm 3,169$ (32), $p < 0,0001^*$; **Tb.N**: $4,514 \pm 0,536$ (31) vs. $2,231 \pm 0,484$ (32), $p < 0,0001^*$; **Tb.Sp**: $0,177 \pm 0,026$ (31) vs. $0,356 \pm 0,067$ (32), $p < 0,0001^*$; **SMI**: $-0,256 \pm 0,209$ (31) vs. $0,962 \pm 0,324$ (32), $p < 0,0001^*$; **Tb.Pf**: $-4,997 \pm 2,096$ (31) vs. $3,753 \pm 2,958$ (32), $p < 0,0001^*$). Die **i.S** ist bei OVX + Steroide signifikant vermindert ($6,657 \pm 1,030$ (31) vs. $3,486 \pm 0,834$ (32), $p = 0,0040^*$).

1.2.4 VERÄNDERUNGEN NACH 14 MONATEN

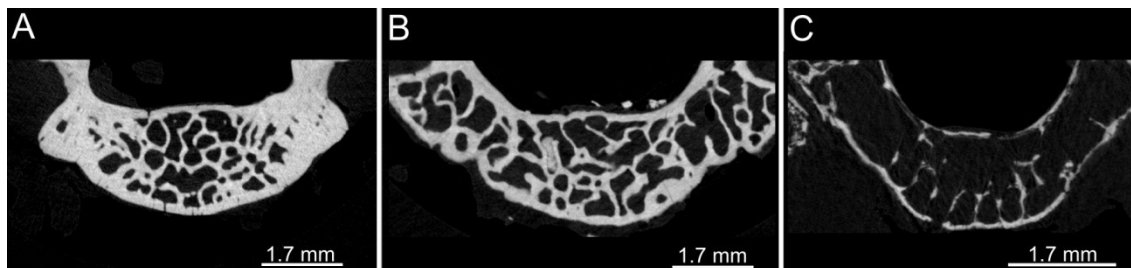


Abbildung 3.5: Vergleichende Darstellung axialer Schnittbilder der Wirbelkörper Th10. Mittels der hohen Auflösung des μ CTs kann die Mikroarchitektur der Kontroll-Gruppe mit 0 Monaten Beobachtung (A) sowie der Gruppen Sham, 11 (B) und OVX + Steroide, 12 (C) zum Zeitpunkt 14 Monate gegenübergestellt werden.

Zum Endpunkt des Beobachtungszeitraumes mit 14 Monaten sind im axialen Schnittbild die überaus deutlichen Auswirkungen der Steroid-induzierten Osteoporose (siehe Abbildung 3.5, C) sichtbar. Bereits rein qualitativ sind der gravierende Knochenschwund sowie das Verbleiben vereinzelter, dünner, stabförmiger Trabekel festzustellen. Die *Wirbelkörper* der *Sham*-Tiere des gleichen Alters hingegen weisen weiterhin eine optisch recht gut erhaltene Trabekelstruktur auf, die eventuell etwas in ihrer horizontalen Verbindung (Platten-ähnliche Ausrichtung) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe gemindert ist.

In der statistischen Auswertung äußern sich diese Auffälligkeiten mit (hoch) signifikanten Unterschieden in allen Strukturparametern zwischen *Sham* und OVX + Steroide. Die bereits hoch signifikanten Unterschiede in BV/TV, Tb.N, Tb.Sp, SMI und Tb.Pf bestehen nach wie vor (**BV/TV**: $34,327 \pm 7,292$ (41) vs. $11,695 \pm 5,797$ (42), $p < 0,0001^*$; **Tb.N**: $3,653 \pm 0,718$ (41) vs. $1,484 \pm 0,412$ (42), ; **Tb.Sp**: $0,221 \pm 0,043$ (41) vs. $0,367 \pm 0,012$ (42), $p < 0,0001^*$; **SMI**: $0,229 \pm 0,497$ (41) vs. $1,609 \pm 0,516$ (42), $p < 0,0001^*$; **Tb.Pf**: $-0,698 \pm 3,753$ (41) vs. $12,715 \pm 8,339$ (42), $p < 0,0001^*$) und auch in Tb.Th und i.S wuchsen die Differenzen an, sodass signifikante p-Werte

vorliegen (**Tb.Th**: $0,094 \pm 0,011$ (**41**) vs. $0,076 \pm 0,018$ (**42**), $p = 0,0125^*$; **i.S**: $6,867 \pm 2,195$ (**41**) vs. $2,484 \pm 1,775$ (**42**), $p = 0,0014^*$).

2 TIBIAE

Wie auch bei den Wirbelkörpern sind im folgenden Kapitel die Ergebnisse einer Untergruppe im zeitlichen Verlauf dargestellt. Dies soll die Entwicklung und Veränderungen des Trabekelwerkes deutlich machen, die mit steigendem Alter bei Vergleichs- (*Sham*) und Osteoporose-Gruppe (*OVX + Steroide*) vorkommen.

Ein direkter Vergleich der Mikroarchitektur zwischen der *Sham*-Gruppe und dem osteoporotischen Tiermodell wird zu den Zeitpunkten 1, 3, 12 und 14 Monaten angestellt.

2.1 VERÄNDERUNGEN DER MIKROARCHITEKTUR IM ZEITLICHEN VERLAUF INNERHALB EINER UNTERGRUPPE

Eine Zusammenschau der Entwicklung der *tibialen* Spongiosa anhand von Boxplots-Diagrammen erfolgt am Ende des Kapitels 2.1 mit der Abbildung 3.6.

2.1.1 SHAM (GRUPPE X1) IM ZEITLICHEN VERLAUF

Das relative Knochenvolumen (**BV/TV**, in Prozent) der *Tibiae* zeigt in der *Sham*-Gruppe insgesamt nach 12 Monaten eine hoch signifikante (**0** vs. **31**, $p < 0,0001^*$), nach 14 Monaten eine signifikante (**0** vs. **41**, $p = 0,0041^*$) Abnahme.

Die Tiere weisen nach 1 Monat gegenüber der Kontroll-Gruppe einen nicht signifikanten Rückgang im Knochengehalt auf ($33,159 \pm 3,474$ (**0**) vs. $29,437 \pm 11,606$ (**11**), *n.s.*). Daraufhin wird bis zum Erreichen der 3 Monate eine Zunahme des relativen Volumens erfasst ($29,437 \pm 11,606$ (**11**) vs. $37,449 \pm 6,952$ (**21**), *n.s.*), die ebenfalls nicht signifikant ist. In den folgenden neun Monaten kommt es zu einer hoch signifikanten Reduktion des Knochengewebes ($37,449 \pm 6,952$ (**21**) vs. $22,277 \pm 3,236$ (**31**), $p < 0,0001^*$). Zwischen 12 und 14 Monaten ist ein erneut geringer, nicht signifikanter Anstieg zu verzeichnen ($22,277 \pm 3,236$ (**31**) vs. $24,213 \pm 11,586$ (**41**), *n.s.*).

Ein fast identischer Verlauf von BV/TV ist bei dem Wirbelkörper *Th10* zu verzeichnen.

Nach 12 Monaten liegt ein signifikanter Rückgang der trabekulären Anzahl pro Millimeter (**Tb.N**, in 1/mm), nach 14 Monaten jedoch ein signifikanter Anstieg vor (**0** vs. **31**, $p = 0,0002^*$; **0** vs. **41**, $p = 0,0295^*$).

Im ersten Monat der Beobachtung zeigt sich im Vergleich der Kontroll-Gruppe zu den *Sham*-Tieren eine nicht signifikante Reduktion der Trabekel ($4,937 \pm 0,441$ (**0**) vs. $3,660 \pm 1,380$ (**11**), *n.s.*), der eine nicht signifikante Zunahme nach 3 Monaten folgt ($3,660 \pm 1,380$ (**11**) vs. $4,516 \pm 0,427$ (**21**), *n.s.*). Die Anzahl der Trabekel vermindert sich in den folgenden neun Monaten und weist somit nach 12 Monaten einen signifikanten Rückgang auf ($4,516 \pm 0,427$ (**21**) vs. $3,194 \pm 0,499$ (**31**), $p = 0,0021^*$). In den letzten zwei Monaten des Beobachtungszeitraumes erhöht sich die trabekuläre Anzahl und zeigt von 12 nach 14 Monaten einen hoch signifikanten Anstieg ($3,194 \pm 0,499$ (**31**) vs. $6,065 \pm 2,791$ (**41**), $p < 0,0001^*$).

Bei der Dicke der einzelnen Trabekel (**Tb.Th**, im Millimeter) stellt sich nach 12 Monaten im Vergleich zur Kontroll-Gruppe eine nicht signifikante minimale Zunahme dar, die jedoch nach 14 Monaten als hoch signifikante Minderung der Dicke den Beobachtungszeitraum beendet (**0** vs. **31**, *n.s.*; **0** vs. **41**, $p < 0,0001^*$).

Zwischen 0 und 1 Monat ($0,067 \pm 0,005$ (**0**) vs. $0,080 \pm 0,001$ (**11**), *n.s.*) sowie 1 und 3 Monaten ($0,080 \pm 0,001$ (**11**) vs. $0,083 \pm 0,015$ (**21**), *n.s.*) ist ein nicht signifikanter trabekulärer Dickenzuwachs in der *Sham*-Gruppe zu verzeichnen. Ab dem Zeitpunkt von 3 Monaten liegen dann zunächst bis zu 12 Monaten eine signifikante ($0,083 \pm 0,015$ (**21**) vs. $0,070 \pm 0,007$ (**31**), $p = 0,0006^*$) und nach 14 Monaten eine hoch signifikante ($0,070 \pm 0,007$ (**31**) vs. $0,040 \pm 0,001$ (**41**), $p < 0,0001^*$) Abnahme der Dicke vor.

Entlang des Beobachtungsfensters von 14 Monaten lässt sich bei der Distanz zwischen einzelnen Trabekeln (**Tb.Sp**, Trabecular Separation, in mm) außer minimaler Schwankungen kein signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe mit juveniler Knochenarchitektur feststellen (**0** vs. **31**, *n.s.*; **0** vs. **41**, *n.s.*).

Zunächst zeigt sich eine nicht signifikante Vergrößerung der Entfernung nach 1 Monat ($0,135 \pm 0,011$ (**0**) vs. $0,212 \pm 0,106$ (**11**), *n.s.*), die sich dann bis zu 3 Monaten jedoch wieder nicht signifikant reduziert ($0,212 \pm 0,106$ (**11**) vs. $0,146 \pm 0,012$ (**21**), *n.s.*). In den folgenden neun Monaten nimmt die intertrabekuläre Distanz nochmals nicht signifikant zu ($0,146 \pm 0,012$ (**21**) vs. $0,222 \pm 0,045$ (**31**), *n.s.*) und zeigt zwischen 12

und 14 Monaten sogar eine signifikante Minderung der Entfernung ($0,222 \pm 0,045$ (**31**) vs. $0,081 \pm 0,013$ (**41**), $p = 0,0181^*$).

Der **SMI** weist über den gesamten 14-monatigen Verlauf der *Sham*-Gruppe mit Schwankungen eine signifikante Zunahme auf (**0** vs. **41**, $p = 0,0028^*$).

Im Vergleich zu den *Sham*-Werten der *Wirbelkörper* zeigt sich ein ähnlicher Verlauf des SMI. Die Absolutwerte der *Tibiae* weisen jedoch größere Differenzen auf.

Nach einer nicht signifikanten Zunahme nach 1 Monat ($0,757 \pm 0,228$ (**0**) vs. $1,317 \pm 0,494$ (**11**), *n.s.*) reduziert sich der Wert des SMI zwischen 1 und 3 Monaten nochmals signifikant ($1,317 \pm 0,494$ (**11**) vs. $0,677 \pm 0,423$ (**21**), $p = 0,0267^*$). Die darauffolgenden neun Monate lassen den SMI erneut signifikant ansteigen ($0,677 \pm 0,423$ (**21**) vs. $1,112 \pm 0,245$ (**31**), $p = 0,0066^*$). Zwischen 12 und 14 Monaten kann eine weitere, jedoch nicht signifikante Zunahme verzeichnet werden ($1,112 \pm 0,245$ (**31**) vs. $1,353 \pm 0,817$ (**41**), *n.s.*).

Der Trabecular Pattern Factor (**Tb.Pf**, in 1/mm) zeigt über den gesamten Beobachtungszeitraum im Vergleich von 0 und 12 sowie 0 und 14 Monaten keine signifikanten Änderungen (**0** vs. **31**, *n.s.*; **0** vs. **41**, *n.s.*).

Zwischen 0 und 1 Monat zeigt sich ein nicht signifikanter Anstieg des Tb.Pf ($2,503 \pm 2,450$ (**0**) vs. $6,186 \pm 5,884$ (**11**), *n.s.*), der sich zwischen 1 und 3 Monaten wieder vermindert ($6,186 \pm 5,884$ (**11**) vs. $1,721 \pm 3,923$ (**21**), *n.s.*). Nach den 3 Monaten nimmt der Wert über neun Monate hin bis zum Zeitpunkt von 12 Monaten signifikant zu ($1,721 \pm 3,923$ (**21**) vs. $7,304 \pm 2,736$ (**31**), $p = 0,0193^*$). Eine weitere Zunahme des Tb.Pf zwischen 12 und 14 Monaten ist nicht signifikant ($7,304 \pm 2,736$ (**31**) vs. $7,518 \pm 15,565$ (**41**), *n.s.*).

Über 12 und 14 Monate Beobachtung stellt sich bei der trabekulären Schnittfläche (**i.S**, in Quadratmillimeter) der *Tibiae* ein, im Vergleich zum Ausgangswert der Kontrolle, signifikanter Zuwachs dar (**0** vs. **31**, $p = 0,0327^*$; **0** vs. **41**, $p = 0,0051^*$).

Von der Kontrolle bis zu 1 Monat steigt die Fläche signifikant an ($13,557 \pm 3,108$ (**0**) vs. $26,894 \pm 10,425$ (**11**), $p = 0,0029^*$) und nimmt bis zu 3 Monaten weiter an Größe, jedoch nicht signifikant, zu ($26,894 \pm 10,425$ (**11**) vs. $29,751 \pm 8,102$ (**21**), *n.s.*). Im Laufe der nächsten neun Monate stellt sich nach 12 Monaten ein hoch signifikanter Rückgang der Schnittfläche ein ($29,751 \pm 8,102$ (**21**) vs. $18,842 \pm 3,560$ (**31**),

$p < 0,0001^*$). Zwischen 12 und 14 Monaten kann sich der Wert der i.S nochmals nicht signifikant anheben ($18,842 \pm 3,560$ (**31**) vs. $21,880 \pm 8,582$ (**41**), *n.s.*).

2.1.2 OVX + STEROIDE (GRUPPE X2) IM ZEITLICHEN VERLAUF

Das relative Knochenvolumen (**BV/TV**, in Prozent) der osteoporotischen *Tibiae* zeigt im Vergleich zur juvenilen Knochensubstanz der Gruppe 0 sowohl nach 12 als auch nach 14 Monaten eine hoch signifikante Minderung (**0** vs. **32**, $p < 0,0001^*$; **0** vs. **42**, $p < 0,0001^*$).

Dabei ähnelt der Verlauf des BV/TV der *Tibiae* dem der osteoporotischen *Wirbelkörper*. Bereits 1 Monat nach Steroidtherapie zeigt sich ein signifikanter Rückgang des Knochengewebes ($33,159 \pm 3,474$ (**0**) vs. $23,504 \pm 4,528$ (**12**), $p = 0,0141^*$). Im weiteren Verlauf zwischen 1 und 3 Monaten stellt sich eine nicht signifikante Abnahme dar ($23,504 \pm 4,528$ (**12**) vs. $16,651 \pm 3,524$ (**22**), *n.s.*). Dieser folgt bis zum Zeitpunkt von 12 Monaten eine signifikante Reduktion von BV/TV ($16,651 \pm 3,524$ (**22**) vs. $3,496 \pm 0,665$ (**32**), $p = 0,0009^*$). Der letzte Beobachtungsabschnitt zwischen 12 und 14 Monaten kann einen minimalen, nicht signifikanten Anstieg des relativen Knochenvolumens aufzeigen ($3,496 \pm 0,665$ (**32**) vs. $3,723 \pm 2,134$ (**42**), *n.s.*).

Über den gesamten Verlauf von 12 und 14 Monaten zeigt sich in der Anzahl der Trabekel (**Tb.N**, in 1/mm) eine kontinuierliche und insgesamt hoch signifikante Reduktion (**0** vs. **32**, $p < 0,0001^*$; **0** vs. **42**, $p < 0,0001^*$).

Vergleicht man optisch die Abnahme der Tb.N der *Tibiae* mit der des BV/TV, finden sich sehr ähnliche Verläufe.

Bereits zu Beginn nach 1 Monat liegt ein signifikanter Abbau der trabekulären Anzahl vor ($4,937 \pm 0,441$ (**0**) vs. $2,901 \pm 0,615$ (**12**), $p = 0,0026^*$). Zwischen 1 und 3 Monaten ist ein nicht signifikanter Rückgang zu verzeichnen ($2,901 \pm 0,615$ (**12**) vs. $1,833 \pm 0,388$ (**22**), *n.s.*), der sich in den darauffolgenden neun Monaten zum Zeitpunkt von 12 Monaten Therapie weiter signifikant mindert ($1,833 \pm 0,388$ (**22**) vs. $0,407 \pm 0,091$ (**32**), $p = 0,0278^*$). Der Zeitraum zwischen 12 und 14 Monaten weist eine nicht signifikante Abnahme der Anzahl auf ($0,407 \pm 0,091$ (**32**) vs. $0,348 \pm 0,186$ (**42**), *n.s.*).

Nach 12 Monaten Steroidtherapie kann beim Parameter der durchschnittlichen Dicke eines Trabekels (**Tb.Th**, in Millimeter) eine signifikante Zunahme (**0** vs. **32**, $p = 0,0010^*$), nach 14 Monaten sogar eine hoch signifikante Steigerung (**0** vs. **42**,

$p < 0,0001^*$) ermittelt werden. Damit zeigt sich ab etwa 3 Monaten eine deutliche Differenz der Verläufe zwischen *Sham*- und *Osteoporose*-Gruppe.

Von der Kontroll-Gruppe bis zum Zeitpunkt 1 Monat nimmt die Dicke signifikant zu ($0,067 \pm 0,005$ (**0**) vs. $0,081 \pm 0,003$ (**12**), $p = 0,0141^*$). Ein weiterer, jedoch nicht signifikanter Anstieg ist zwischen 1 und 3 Monaten zu verzeichnen ($0,081 \pm 0,003$ (**12**) vs. $0,091 \pm 0,007$ (**22**), *n.s.*). In den folgenden neun Monaten zwischen 3 und 12 Monaten verringert sich die Trabekeldicke nicht signifikant ($0,091 \pm 0,007$ (**22**) vs. $0,087 \pm 0,005$ (**32**), *n.s.*). Im Beobachtungsabschnitt von 12 bis 14 Monaten weist die Tb.Th nochmals eine signifikante Erhöhung auf ($0,087 \pm 0,005$ (**32**) vs. $0,106 \pm 0,005$ (**42**), $p = 0,0171^*$).

Die Distanz zwischen einzelnen Trabekeln (**Tb.Sp**, in Millimeter) zeigt einen konstanten Anstieg und nimmt sowohl nach 12 als auch nach 14 Monaten hoch signifikant zu (**0** vs. **32**, $p < 0,0001^*$; **0** vs. **42**, $p < 0,0001^*$). Der Verlauf der osteoporotischen *Tibiae* ähnelt dem der *Wirbelkörper*. Allerdings weisen die *Tibiae* deutlichere Differenzen der Absolutwerte auf.

Nach 1 Monat ist die Distanz nicht signifikant erhöht ($0,135 \pm 0,011$ (**0**) vs. $0,230 \pm 0,058$ (**12**), *n.s.*). Zwischen 1 und 3 Monaten steigt die Entfernung signifikant an ($0,230 \pm 0,058$ (**12**) vs. $0,431 \pm 0,132$ (**22**), $p = 0,0089^*$) und kann in den darauffolgenden neun Monaten einen weiteren hoch signifikanten Zuwachs verzeichnen ($0,431 \pm 0,132$ (**22**) vs. $1,155 \pm 0,109$ (**32**), $p < 0,0001^*$). Zwischen 12 und 14 Monaten liegt eine weitere signifikante Zunahme der Tb.Sp vor ($1,155 \pm 0,109$ (**32**) vs. $1,385 \pm 0,647$ (**42**), $p = 0,0314^*$).

Sowohl nach 12 als auch nach 14 Monaten kann beim Structure Model Index (**SMI**) im zeitlichen Verlauf eine hoch signifikante Zunahme des Wertes ermittelt werden (**0** vs. **32**, $p < 0,0001^*$; **0** vs. **42**, $p < 0,0001^*$).

Direkt zu Anfang zwischen 0 und 1 Monat liegt ein signifikanter Anstieg vor ($0,757 \pm 0,228$ (**0**) vs. $1,599 \pm 0,205$ (**12**), $p = 0,0010^*$), der als nicht signifikante Zunahme über die Monate 3 und 12 anhält, jedoch stetig abflacht ($1,599 \pm 0,205$ (**12**) vs. $1,931 \pm 0,155$ (**22**), *n.s.*; $1,931 \pm 0,155$ (**22**) vs. $2,167 \pm 0,165$ (**32**), *n.s.*). Im letzten Abschnitt zwischen 12 und 14 Monaten zeigt sich eine minimale, nicht signifikante Minderung des SMI ($2,167 \pm 0,165$ (**32**) vs. $2,144 \pm 0,148$ (**42**), *n.s.*).

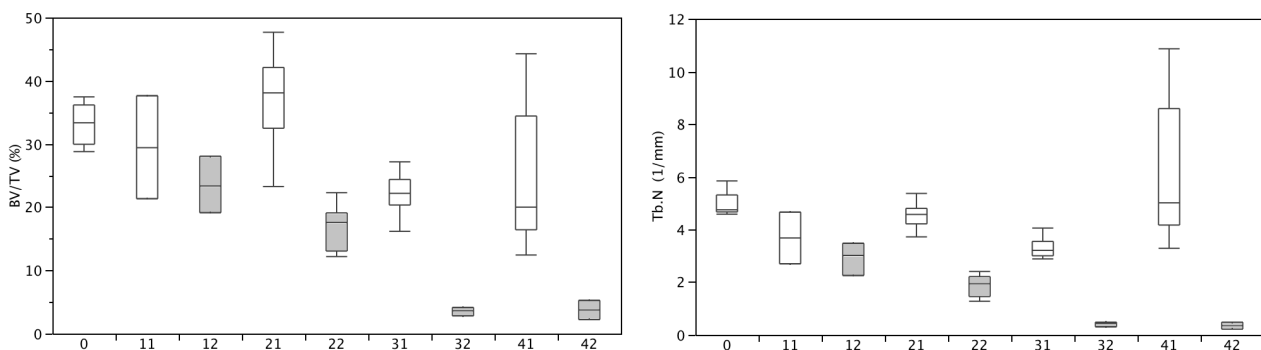
Im Verlauf des Beobachtungszeitraumes können signifikante Anstiege des **Tb.Pf** während der Therapie mit Glukokortikoiden nach 12 und 14 Monaten erfasst werden (**0** vs. **32**, $p = 0,0012^*$; **0** vs. **42**, $p = 0,0251^*$).

Der optische Verlauf ähnelt auch hier, wie schon bei den *Wirbelkörpern* auffällig, dem des SMI.

So stellt sich auch hier zwischen der Kontroll-Gruppe und den osteoporotischen Tieren nach 1 Monat eine signifikante Zunahme des Tb.Pf dar ($2,503 \pm 2,450$ (**0**) vs. $9,881 \pm 1,996$ (**12**), $p = 0,0481^*$). Danach zeigen sich zwischen 1 und 3 Monaten sowie zwischen 3 und 12 Monaten nicht signifikante Erhöhungen ($9,881 \pm 1,996$ (**12**) vs. $12,238 \pm 1,894$ (**22**), *n.s.*; $12,238 \pm 1,894$ (**22**) vs. $15,030 \pm 0,927$ (**32**), *n.s.*). Zwischen 12 und 14 Monaten liegt ein nicht signifikanter Rückgang des Tb.Pf vor ($15,030 \pm 0,927$ (**32**) vs. $12,392 \pm 0,839$ (**42**), *n.s.*).

Der Vergleich zwischen Kontrolle und 12 Monatstieren bzw. Tieren nach 14 Monaten Therapie weist eine signifikante Reduktion der trabekulären Schnittfläche (**i.S**, in Millimeter) auf (**0** vs. **32**, $p = 0,0226^*$; **0** vs. **42**, $p = 0,0331^*$).

Nach kaum merklichen, nicht signifikanten Vergrößerungen der Fläche zwischen 0 und 1 Monat ($13,557 \pm 3,108$ (**0**) vs. $14,557 \pm 2,498$ (**12**), *n.s.*) sowie 1 und 3 Monaten ($14,557 \pm 2,498$ (**12**) vs. $15,833 \pm 3,699$ (**22**), *n.s.*) verringert sich der Wert der i.S signifikant in den darauffolgenden neun Monaten ($15,833 \pm 3,699$ (**22**) vs. $5,029 \pm 1,325$ (**32**), $p = 0,0037^*$). Im letzten Abschnitt zwischen 12 und 14 Monaten zeigt sich eine weitere Abnahme der trabekulären Schnittfläche, die jedoch nicht signifikant ausfällt ($5,029 \pm 1,325$ (**32**) vs. $4,211 \pm 0,501$ (**42**), *n.s.*).



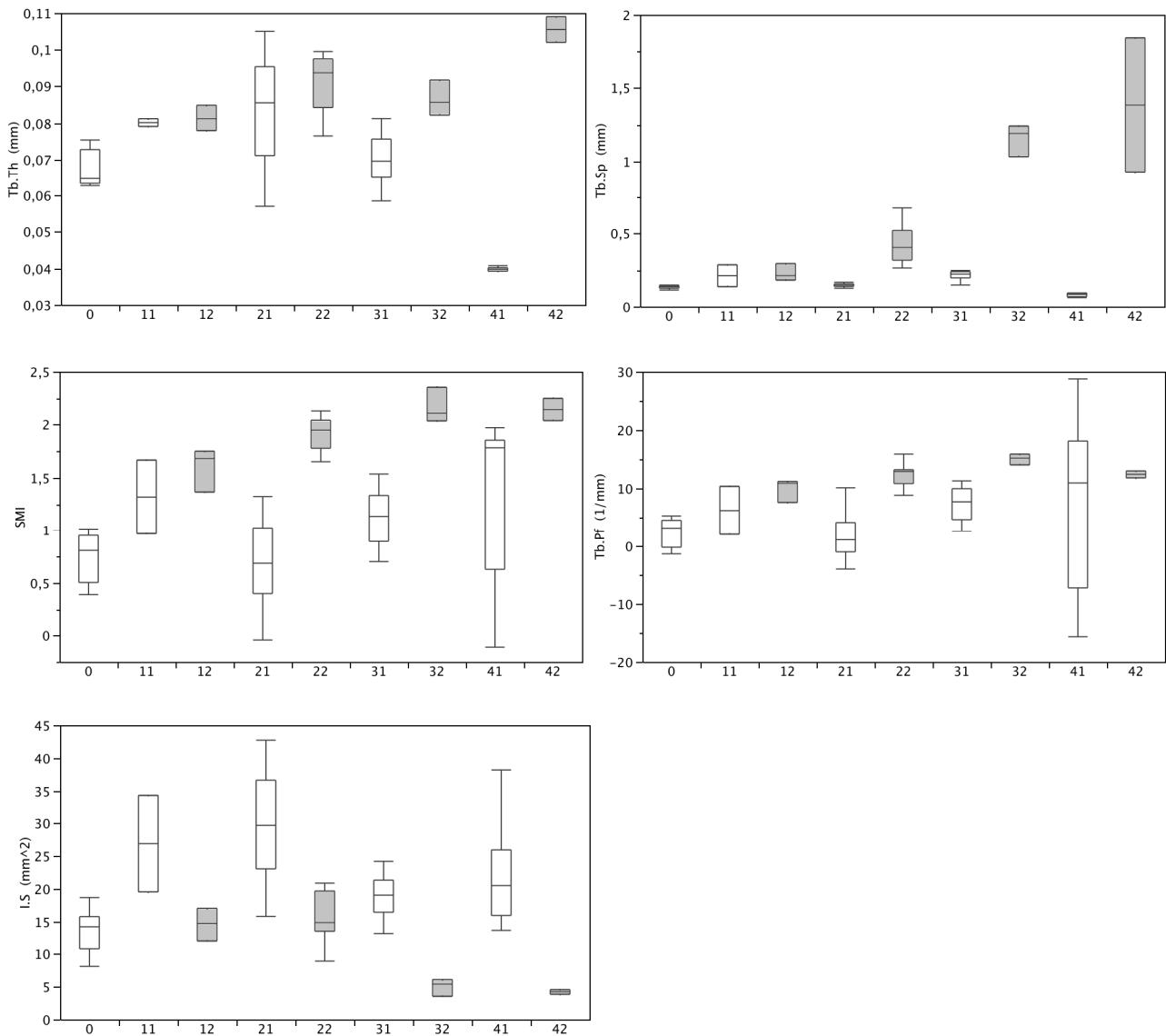


Abbildung 3.6: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Strukturparameter BV/TV (relatives Knochenvolumen), Tb.N (Trabekelanzahl), Tb.Th (Trabekeldicke), Tb.Sp (intertrabekuläre Distanz), SMI (Structural Model Index), Tb.Pf (Trabecular Pattern Factor) und i.S (trabekuläre Schnittfläche) der Tibiae.

Die Darstellung zeigt Boxplots-Diagramme der Gruppen Kontrolle (0), Sham (weiß) und OVX + Steroide (grau) im Verlauf über 0, 1, 3, 12 und 14 Monate Studienlaufzeit. Zur Gruppe Sham gehören die Untergruppen 11 (1 Monat), 21 (3 Monate), 31 (12 Monate) und 41 (14 Monate). Der Gruppe OVX + Steroide werden die Untergruppen 12 (1 Monat), 22 (3 Monate), 32 (12 Monate) und 42 (14 Monate) zugeteilt.

Die für diese Arbeit relevanten Signifikanzangaben wurden aus Gründen der besseren Übersicht weggelassen und sind der Tabelle 3.2 bzw. dem Kapitel 2.1 zu entnehmen.

2.2 VERÄNDERUNGEN DER MIKROARCHITEKTUR ZWISCHEN DEN UNTERGRUPPEN INNERHALB EINES ZEITPUNKTES

2.2.1 VERÄNDERUNGEN NACH 1 MONAT

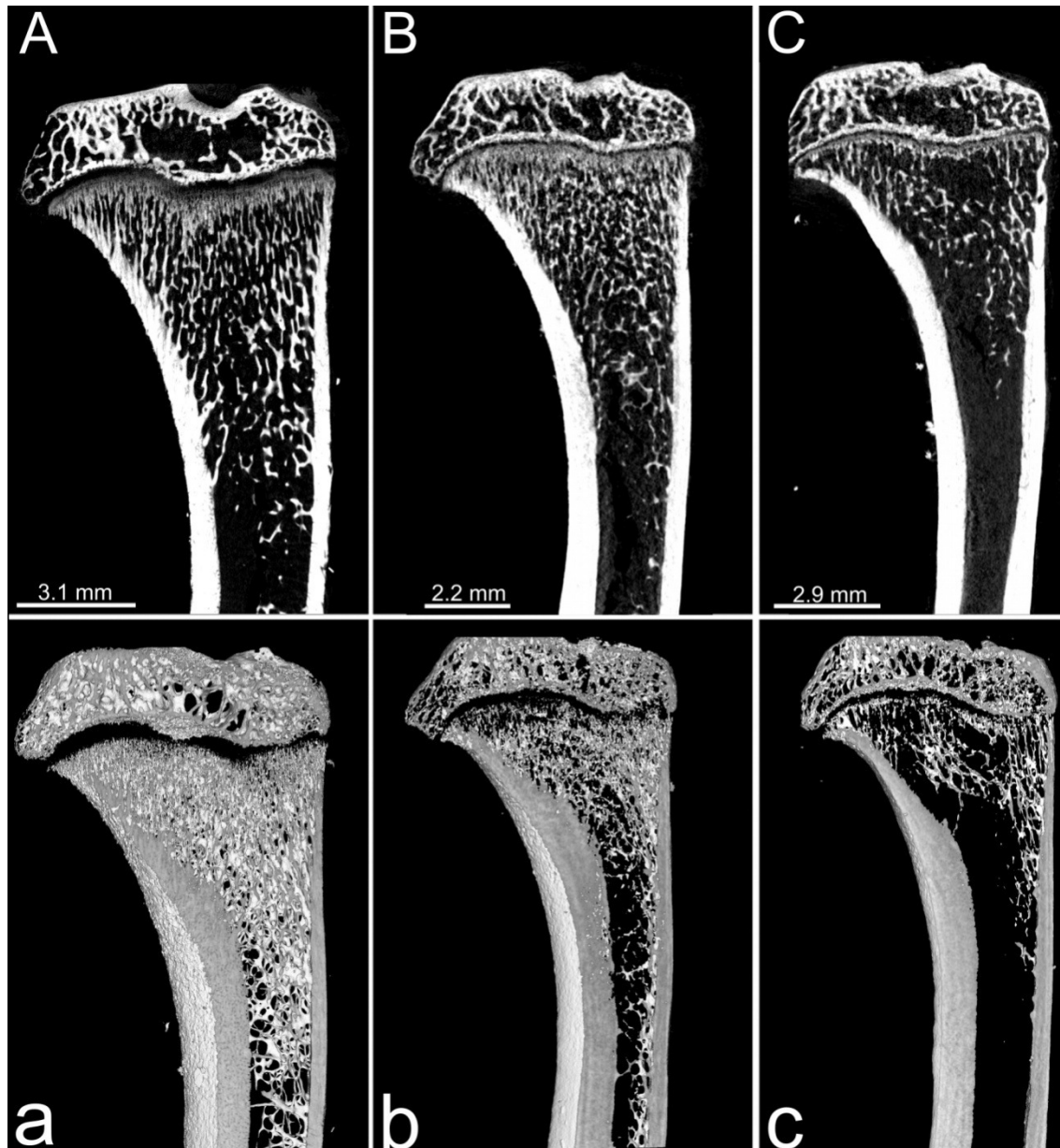


Abbildung 3.7: Vergleichende Darstellung coronarer Schnittbilder der proximalen Tibia. Die obere Reihe zeigt einzelne μ CT-Schnitte der Kontroll-Gruppe 0 (A) sowie der Gruppen Sham (B) und OVX + Steroide (C) zum Zeitpunkt von 1 Monat (11,12). In der unteren Reihe sind die Bereiche derselben Proben in einer Rekonstruktion aus ca. 50 bis 100 Schnitten dargestellt (a Kontroll-Gruppe, b Sham, c OVX + Steroide).

Die Schnittbilder der Mikro-Computertomographie stellen eindrucksvoll die Morphologie sowie das Verteilungsmuster der trabekulären Strukturen dar. Besonders die Ausdehnung der Spongiosa ist gut zu erkennen und weist bereits nach 1 Monat in der Gruppe 12 (OVX + *Steroide*) visuell eine Minderung auf.

Die statistische Auswertung zeigt jedoch in den Vergleichen zwischen *Sham* und *Osteoporose*-Gruppe in sechs von sieben Strukturparametern nicht signifikante Unterschiede (**BV/TV**: $29,437 \pm 11,606$ (11) vs. $23,504 \pm 4,528$ (12), *n.s.*; **Tb.N**: $3,660 \pm 1,380$ (11) vs. $2,901 \pm 0,615$ (12), *n.s.*; **Tb.Th**: $0,080 \pm 0,001$ (11) vs. $0,081 \pm 0,003$ (12), *n.s.*; **Tb.Sp**: $0,212 \pm 0,106$ (11) vs. $0,230 \pm 0,058$ (12), *n.s.*; **SMI**: $1,317 \pm 0,494$ (11) vs. $1,599 \pm 0,205$ (12), *n.s.*; **Tb.Pf**: $6,186 \pm 5,884$ (11) vs. $9,881 \pm 1,996$ (12), *n.s.*). Lediglich die trabekuläre Schnittfläche (**i.S**) weist einen signifikanten Unterschied zwischen *Sham*- und *OVX + Steroide*-Tieren auf ($26,894 \pm 10,425$ (11) vs. $14,557 \pm 2,498$ (12), $p = 0,0176^*$), wobei allerdings dort ein signifikantes Ansteigen der i.S im ersten Monat der *Sham*-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle zu erwähnen ist.

2.2.2 VERÄNDERUNGEN NACH 3 MONATEN

Zum Zeitpunkt 3 Monate können insgesamt die größten signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen *Sham* und *OVX + Steroide* ermittelt werden. Bis auf die Trabekeldicke (**Tb.Th**), die im osteoporotischen Tiermodell signifikant erhöht ist ($0,083 \pm 0,015$ (21) vs. $0,091 \pm 0,007$ (22), $p = 0,0234^*$), zeigen die restlichen Strukturparameter hoch signifikante Verschlechterungen nach 3 Monaten Glukokortikoidtherapie (**BV/TV**: $37,449 \pm 6,952$ (21) vs. $16,651 \pm 3,524$ (22), $p < 0,0001^*$; **Tb.N**: $4,516 \pm 0,427$ (21) vs. $1,833 \pm 0,388$ (22), $p < 0,0001^*$; **Tb.Sp**: $0,146 \pm 0,012$ (21) vs. $0,431 \pm 0,132$ (22), $p < 0,0001^*$; **SMI**: $0,677 \pm 0,423$ (21) vs. $1,931 \pm 0,155$ (22), $p < 0,0001^*$; **Tb.Pf**: $1,721 \pm 3,923$ (21) vs. $12,238 \pm 1,894$ (22), $p < 0,0001^*$; **i.S**: $29,751 \pm 8,102$ (21) vs. $15,833 \pm 3,699$ (22), $p < 0,0001^*$).

Anhand der mikro-computertomographischen Schnittbilder und Rekonstruktionen können die Unterschiede sehr gut dargestellt werden. So weisen die Osteoporose-induzierten *Tibiae* einen drastischen Verlust des Trabekelwerkes auf, das lediglich noch im direkten Anschluss an die proximale Epiphysenfuge zu finden ist und dort in der peripheren Zirkumferenz eine Verbindung zur metaphysären Kortikalis herstellt (siehe Abbildung 3.8, C). Vor allem in der dreidimensionalen Rekonstruktion ist der Unterschied der trabekulären Morphologie mit hauptsächlich stabförmiger, vertikaler Verteilung in der Gruppe *OVX + Steroide* (c) bereits im Vergleich zu den *Sham*-(b), jedoch noch etwas deutlicher zu den Kontroll-Tieren (a) zu erkennen. Eine trajektorielle Ausrichtung der Trabekel kann in (c) bereits nicht mehr nachvollzogen werden.

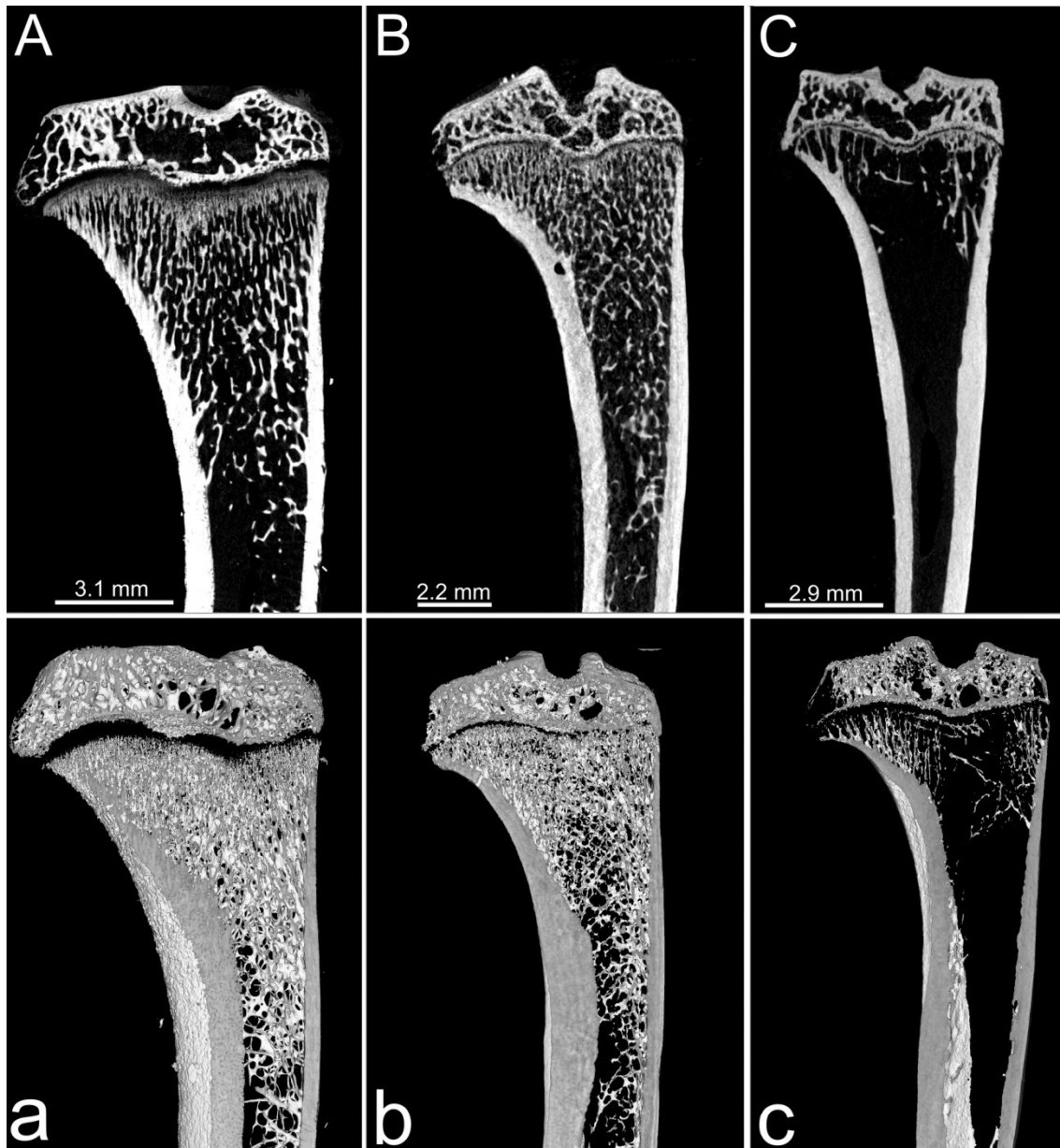


Abbildung 3.8: Vergleichende Darstellung coronarer Schnittbilder der proximalen Tibia. Die obere Reihe zeigt einzelne μ CT-Schnitte der Kontroll-Gruppe 0 (A) sowie der Gruppen Sham (B) und OVX + Steroide (C) zum Zeitpunkt von 3 Monaten (11,12). In der unteren Reihe sind die Bereiche derselben Proben in einer Rekonstruktion aus ca. 50 bis 100 Schnitten dargestellt (a Kontroll-Gruppe, b Sham, c OVX + Steroide).

2.2.3 VERÄNDERUNGEN NACH 12 MONATEN

Der Schwund der Spongiosa schreitet sehr eindrücklich weiter fort. Nach einem Jahr Steroidtherapie zeigen sich lediglich im lateralen, spitz zulaufenden Anteil der proximalen *Tibiae* vereinzelte Brückenpfeiler-artige Verbindungen zwischen Epiphysenfuge und dort schräg verlaufender Kortikalis (siehe Abbildung 3.9, C und c).

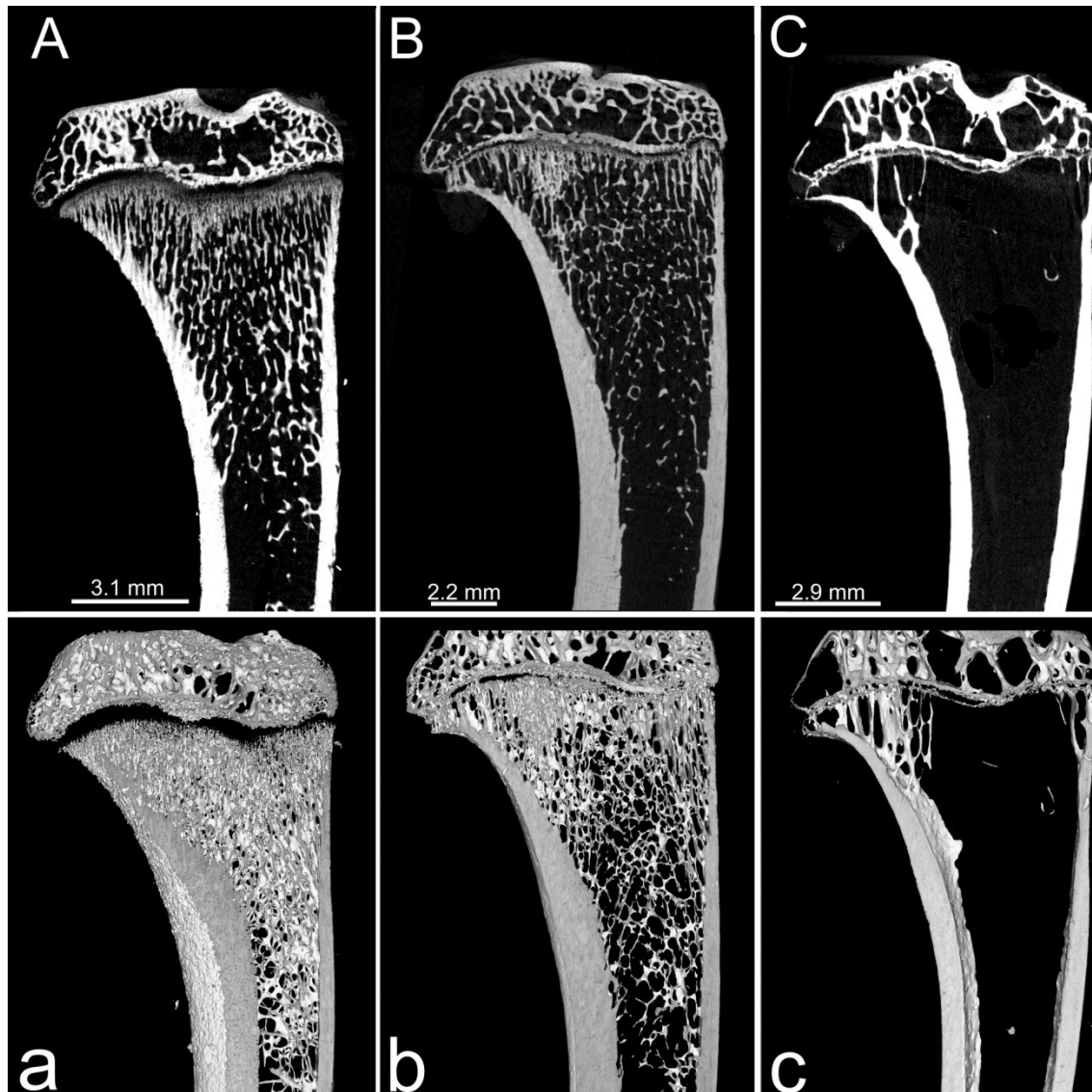


Abbildung 3.9: Vergleichende Darstellung coronarer Schnittbilder der proximalen Tibia. Die obere Reihe zeigt einzelne μ CT-Schnitte der Kontroll-Gruppe 0 (A) sowie der Gruppen Sham (B) und OVX + Steroide (C) zum Zeitpunkt von 12 Monaten (11,12). In der unteren Reihe sind die Bereiche derselben Proben in einer Rekonstruktion aus ca. 50 bis 100 Schnitten dargestellt (a Kontroll-Gruppe, b Sham, c OVX + Steroide).

Diese scheint optisch in ihrer Dicke nur minimal abgenommen zu haben und weiterhin sehr kompakt zu sein. Die verbliebenen ultra-proximalen Trabekel haben im Vergleich zur Sham-Gruppe des gleichen Alters an Dicke zugenommen.

Diese rein qualitativen Beobachtungen werden durch die statistische Auswertung bestätigt. Das relative Knochenvolumen, die Trabekelanzahl, die intertrabekuläre Distanz sowie der SMI weisen weiterhin hoch signifikante Unterschiede zwischen OVX + Steroide und Sham auf (**BV/TV**: $22,277 \pm 3,236$ (31) vs. $3,496 \pm 0,665$ (32), $p < 0,0001^*$; **Tb.N**: $3,194 \pm 0,499$ (31) vs. $0,407 \pm 0,091$ (32), $p < 0,0001^*$; **Tb.Sp**:

$0,222 \pm 0,045$ (31) vs. $1,155 \pm 0,109$ (32), $p < 0,0001^*$; **SMI**: $1,112 \pm 0,245$ (31) vs. $2,167 \pm 0,165$ (32), $p < 0,0001^*$). Die Trabekeldicke (**Tb.Th**) in der osteoporotischen Gruppe kann in ihrer signifikanten Differenz zum Wert der Sham-Tiere weiter zunehmen ($0,070 \pm 0,007$ (31) vs. $0,087 \pm 0,005$ (32), $p = 0,0045^*$). Die signifikanten Unterschiede von Tb.Pf und i.S sind allerdings leicht rückläufig (**Tb.Pf**: $7,304 \pm 2,736$ (31) vs. $15,030 \pm 0,927$ (32), $p = 0,0369^*$; **i.S**: $18,842 \pm 3,560$ (31) vs. $5,029 \pm 1,325$ (32), $p = 0,0003^*$).

2.2.4 VERÄNDERUNGEN NACH 14 MONATEN

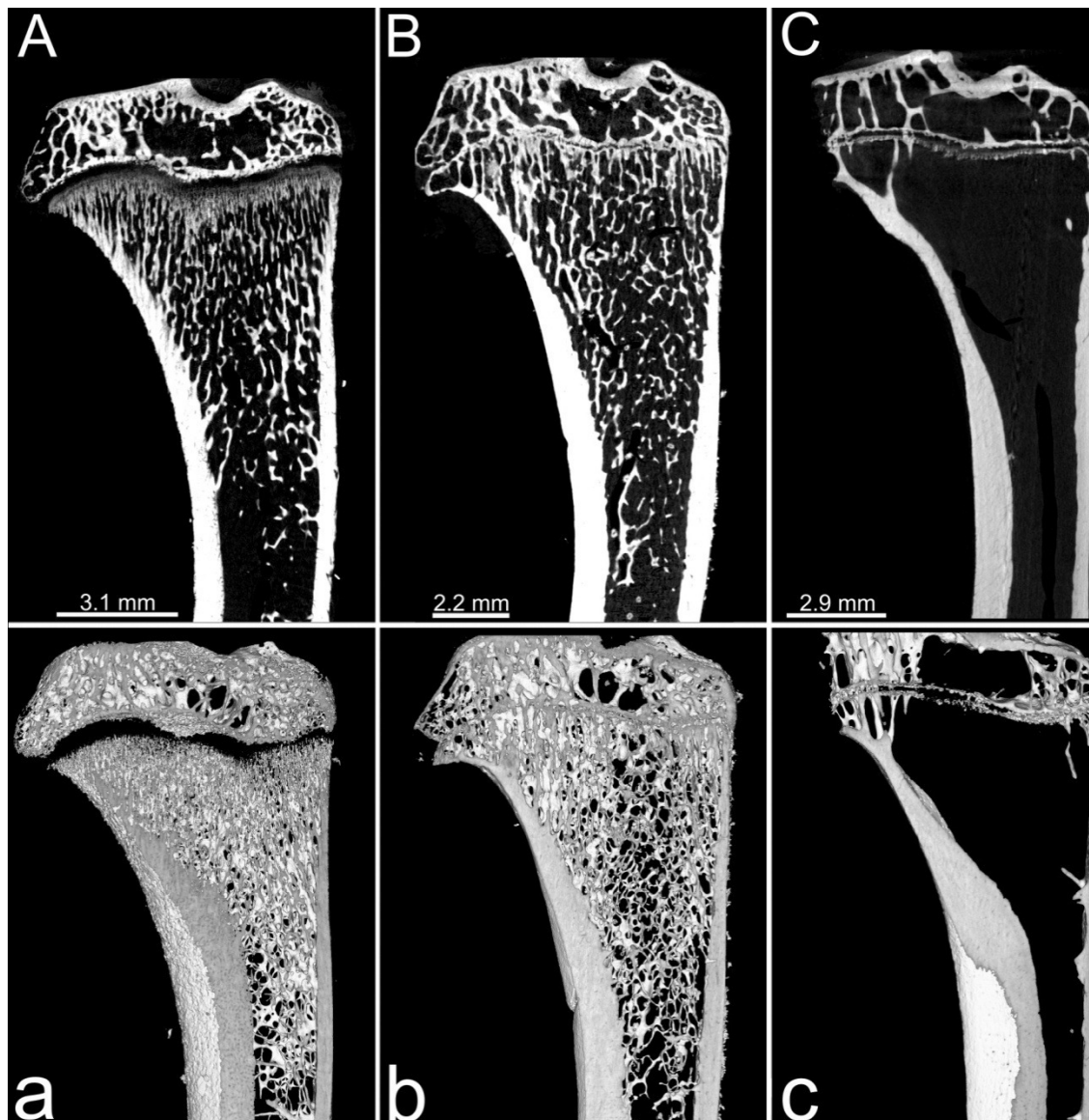


Abbildung 3.10: Vergleichende Darstellung coronarer Schnittbilder der proximalen Tibia. Die obere Reihe zeigt einzelne μ CT-Schnitte der Kontroll-Gruppe 0 (A) sowie der Gruppen Sham (B) und OVX + Steroide (C) zum Zeitpunkt von 14 Monaten (11,12). In der unteren Reihe sind die Bereiche derselben Proben in einer Rekonstruktion aus ca. 50 bis 100 Schnitten dargestellt (a Kontroll-Gruppe, b Sham, c OVX + Steroide).

Auch nach 14 Monaten Therapie mit Glukokortikoiden zeigen BV/TV, Tb.N und Tb.Sp hoch signifikante Unterschiede zur *Sham*-Gruppe auf (**BV/TV**: $24,213 \pm 11,586$ (**41**) vs. $3,723 \pm 2,134$ (**42**), $p < 0,0001^*$; **Tb.N**: $6,065 \pm 2,791$ (**41**) vs. $0,348 \pm 0,186$ (**42**), $p < 0,0001^*$; **Tb.Sp**: $0,081 \pm 0,013$ (**41**) vs. $1,385 \pm 0,647$ (**42**), $p < 0,0001^*$). Ein Ausdünnen der *Sham*-Trabekel bei einem simultanen Anstieg der Trabekeldicke in *OVX + Steroide* lässt den Unterschied in **Tb.Th** zum Ende der Beobachtung ebenfalls hoch signifikant werden ($0,040 \pm 0,001$ (**41**) vs. $0,106 \pm 0,005$ (**42**), $p < 0,0001^*$). Die Signifikanz der Schnittfläche (**i.S**) bleibt konstant im Vergleich *Sham* versus *OVX + Steroide* ($21,880 \pm 8,582$ (**41**) vs. $4,211 \pm 0,501$ (**42**), $p = 0,0003^*$). Die Werte von SMI und Tb.Pf gleichen sich zwischen *Sham*- und *Osteoporose*-Gruppe nach 14 Monaten leicht an, sodass sich die p-Werte in ihren Signifikanzen um einen Schritt mindern (**SMI**: $1,353 \pm 0,817$ (**41**) vs. $2,144 \pm 0,148$ (**42**), $p = 0,0111^*$; **Tb.Pf**: $7,518 \pm 15,565$ (**41**) vs. $12,392 \pm 0,839$ (**42**), *n.s.*). Die Bildgebung stellt die Veränderungen klar dar und lässt deutlich werden, dass nach 14 Monaten Steroidtherapie die *Tibiae* der ovariectomierten Ratten als quasi leerer Röhrenknochen vorliegen. Nur in der proximalsten Spitze des lateralen metaphysären Ausläufers, der eine Verbindung zwischen Tibia und Fibula herstellt, können einzelne, verdickte Trabekel in der Probe gefunden werden (siehe Abbildung 3.10, C). Die Epiphysenfugen scheinen nun vor allem bei den *Sham*-Tieren vollständig geschlossen und eine annähernd regelmäßige Verteilung der Spongiosa ist metaphysär auch im Vergleich zur Kontroll-Gruppe immer noch festzustellen.

3 SPONGIOSALÄNGE

Die Veränderungen der trabekulären Ausdehnung werden zum einen innerhalb einer Untergruppe zur besseren Darstellung des zeitlichen Verlaufes verglichen.

Die Vergleiche zu den Zeitpunkten 1, 3, 12 und 14 Monate zwischen *Sham*- und *Osteoporose*-Gruppe folgen darauf.

3.1 VERÄNDERUNGEN DER SPONGIOSALÄNGE IM ZEITLICHEN VERLAUF INNERHALB EINER UNTERGRUPPE

Eine graphische Darstellung mittels Boxplots-Diagrammen erfolgt am Ende des Kapitels 3.1 mit Abbildung 3.11.

3.1.1 SHAM (GRUPPE X1) IM ZEITLICHEN VERLAUF

Die Spongiosalänge der Vergleichstiere nimmt über den gesamten Beobachtungszeitraum von 14 Monaten mit einigen Schwankungen insgesamt signifikant ab (**0** vs. **41**, $p = 0,0195^*$).

Es zeigt sich zunächst zwischen 0 und 1 Monat eine nicht signifikante Abnahme der Länge ($10,656 \pm 0,374$ (**0**) vs. $8,780 \pm 4,386$ (**11**), *n.s.*), die sich zwischen 1 und 3 Monaten wieder nicht signifikant vergrößert ($8,780 \pm 4,386$ (**11**) vs. $11,204 \pm 1,120$ (**21**), *n.s.*). Die darauffolgenden neun Monate lassen eine nur leichte, nicht signifikante Minderung der trabekulären Ausdehnung zu ($11,204 \pm 1,120$ (**21**) vs. $10,355 \pm 1,155$ (**31**), *n.s.*). Zwischen 12 und 14 Monaten kann letztendlich ein signifikanter Rückgang ermittelt werden ($10,355 \pm 1,155$ (**31**) vs. $8,496 \pm 3,369$ (**41**), $p = 0,0396^*$).

3.1.2 OVX + STEROIDE (GRUPPE X2) IM ZEITLICHEN VERLAUF

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Spongiosalänge der *osteoporotischen* Gruppe, wird sowohl zwischen 0 und 12 als auch zwischen 0 und 14 Monaten eine hoch signifikante Reduktion sichtbar (**0** vs. **32**, $p < 0,0001^*$; **0** vs. **42**, $p < 0,0001^*$).

Vom Ausgangswert der Kontroll-Gruppe mit 0 Monaten Therapie zeigt sich ein geringer, nicht signifikanter Rückgang des Trabekelwerkes nach 1 Monat ($10,656 \pm 0,374$ (**0**) vs. $9,745 \pm 2,488$ (**12**), *n.s.*). Im nächsten Abschnitt zwischen 1 und 3 Monaten liegt dann jedoch eine signifikante Minderung vor ($9,745 \pm 2,488$ (**12**) vs. $6,141 \pm 1,796$ (**22**), $p = 0,0022^*$). Sowohl zwischen 3 und 12 Monaten ($6,141 \pm 1,796$ (**22**) vs. $4,597 \pm 1,328$ (**32**), *n.s.*) als auch zwischen 12 und 14 Monaten ($4,597 \pm 1,328$ (**32**) vs. $2,556 \pm 0,831$ (**42**), *n.s.*) ist die Abnahme der Spongiosalänge nicht signifikant.

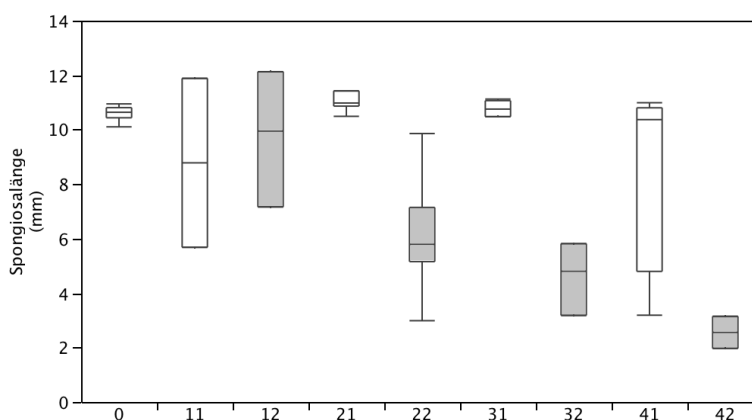


Abbildung 3.11: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Spongiosalänge. Das Boxplots-Diagramm zeigt Kontrolle (0), Sham (weiß) und OVX + Steroide (grau) im Verlauf über 0, 1 (11, 12), 3 (21, 22), 12 (31, 32) und 14 (41, 42) Monate.

3.2 VERÄNDERUNGEN DER SPONGIOSALÄNGE ZWISCHEN DEN UNTERGRUPPEN INNERHALB EINES ZEITPUNKTES

3.2.1 VERÄNDERUNGEN NACH 1 MONAT

Bereits nach 1 Monat ist in der *Sham*-Gruppe, vor allem aber bei den *Osteoporose-induzierten* Ratten ein Rückgang der Spongiosalänge in den mikro-computertomographischen Bildern auffällig (siehe Abbildung 3.7). Statistisch sind diese Unterschiede jedoch nicht signifikant ($8,780 \pm 4,386$ (**11**) vs. $9,745 \pm 2,488$ (**12**), *n.s.*).

3.2.2 VERÄNDERUNGEN NACH 3 MONATEN

Nach 3 Monaten ist die trabekuläre Ausdehnung in *Sham* weiter angewachsen, das Trabekelwerk unter der Steroidtherapie jedoch enorm zurückgegangen, was sich in hoch signifikanten Unterschieden darstellt (siehe Abbildung 3.8) ($11,204 \pm 1,120$ (**21**) vs. $6,141 \pm 1,796$ (**22**), $p < 0,0001^*$).

3.2.3 VERÄNDERUNGEN NACH 12 MONATEN

Der hoch signifikante Längenunterschied zwischen *Sham* und *OVX + Steroide* bleibt weiterhin bestehen ($10,355 \pm 1,155$ (**31**) vs. $4,597 \pm 1,328$ (**32**), $p < 0,0001^*$). Zwischen der Kontroll-Gruppe und *Sham* zeigen sich keine signifikanten Differenzen ($10,656 \pm 0,374$ (**0**) vs. $10,355 \pm 1,155$ (**31**), *n.s.*). Abbildung 3.9 demonstriert dies deutlich.

3.2.4 VERÄNDERUNGEN NACH 14 MONATEN

Eine Verringerung der Absolutwerte in beiden Gruppen lässt den hoch signifikanten Unterschied der Spongiosalänge fortbestehen ($8,496 \pm 3,369$ (**41**) vs. $2,556 \pm 0,831$ (**42**), $p = 0,0001^*$). Nun liegt jedoch auch ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren und *Sham*-Gruppe vor ($10,656 \pm 0,374$ (**0**) vs. $8,496 \pm 3,369$ (**41**); $p = 0,0195^*$).

Strukturparameter Th10		GRUPPEN (MW ± SD)									
		0 (0 M)		11 (1 M)		21 (3 M)		31 (12 M)		41 (14 M)	
BV/TV [%]	Sham		← n.s. →	38,292 ± 1,670	← p = 0,0169* →	46,841 ± 4,894	← p = 0,0013* →	40,368 ± 3,957	← p = 0,0081* →	34,327 ± 7,292	
	OVX + Steroide	44,445 ± 2,233	← n.s. →	43,405 ± 4,310	← n.s. →	37,116 ± 3,892	← p < 0,0001* →	18,533 ± 3,169	← n.s. →	11,695 ± 5,797	
Tb.N [1/mm]	Sham		← n.s. →	4,563 ± 0,069	← n.s. →	4,784 ± 0,423	← n.s. →	4,514 ± 0,536	← p = 0,0019* →	3,653 ± 0,718	
	OVX + Steroide	4,931 ± 0,650	← n.s. →	5,065 ± 0,221	← p = 0,0064* →	3,978 ± 0,485	← p < 0,0001* →	2,231 ± 0,484	← n.s. →	1,484 ± 0,412	
Tb.Th [mm]	Sham		← n.s. →	0,084 ± 0,002	← p = 0,0315* →	0,098 ± 0,011	← p = 0,0217* →	0,090 ± 0,008	← n.s. →	0,094 ± 0,011	
	OVX + Steroide	0,087 ± 0,004	← n.s. →	0,086 ± 0,006	← n.s. →	0,094 ± 0,006	← n.s. →	0,084 ± 0,007	← n.s. →	0,076 ± 0,018	
Tb.Sp [mm]	Sham		← n.s. →	0,161 ± 0,012	← n.s. →	0,157 ± 0,016	← n.s. →	0,177 ± 0,026	← p = 0,0098* →	0,221 ± 0,043	
	OVX + Steroide	0,135 ± 0,044	← n.s. →	0,149 ± 0,004	← n.s. →	0,192 ± 0,033	← p < 0,0001* →	0,356 ± 0,067	← n.s. →	0,367 ± 0,012	
SMI	Sham		← n.s. →	0,363 ± 0,159	← p = 0,0167* →	-0,306 ± 0,326	← n.s. →	-0,256 ± 0,209	← p = 0,0067* →	0,229 ± 0,497	
	OVX + Steroide	-0,107 ± 0,423	← n.s. →	-0,136 ± 0,350	← n.s. →	0,362 ± 0,246	← p = 0,0243* →	0,962 ± 0,324	← n.s. →	1,609 ± 0,516	
Tb.Pf [1/mm]	Sham		← p = 0,0420* →	0,870 ± 0,951	← n.s. →	4,969 ± 2,169	← n.s. →	4,997 ± 2,096	← p = 0,0025* →	0,898 ± 3,753	
	OVX + Steroide	-5,376 ± 2,636	← n.s. →	-5,038 ± 2,512	← p = 0,0254* →	-0,472 ± 1,778	← p = 0,0431* →	3,753 ± 2,958	← p = 0,0010* →	12,715 ± 8,339	
i.S [mm ²]	Sham		← n.s. →	5,995 ± 0,078	← p = 0,0350* →	8,659 ± 2,127	← p = 0,0045* →	6,657 ± 1,030	← n.s. →	6,867 ± 2,195	
	OVX + Steroide	6,542 ± 1,211	← p = 0,0342* →	8,848 ± 0,824	← n.s. →	7,303 ± 1,590	← p = 0,0021* →	3,486 ± 0,834	← n.s. →	2,484 ± 1,775	

Tabelle 3.1: Zusammenstellung der Ergebnisse aus der statistischen Auswertung für die Wirbelkörper Th10.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (MW ± SD) für den jeweiligen Strukturparameter. Die Einteilung erfolgte nach Monaten (0, 1, 3, 12 und 14 Monate) und Untergruppen in Sham bzw. OVX + Steroide: 0 Monate (0); 1 Monat Sham (11), 1 Monat OVX + Steroide (12); 3 Monate Sham (21), 3 Monate OVX + Steroide (22); 12 Monate Sham (31), 12 Monate OVX + Steroide (32); 14 Monate Sham (41), 14 Monate OVX + Steroide (42). Signifikanzangaben zum zeitlichen Verlauf zwischen aufeinanderfolgenden Untergruppen sind kursiv gedruckt. Vergleiche innerhalb der Monate zwischen den Untergruppen und Angaben der Signifikanzen haben die Markierung "j". Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

Strukturparameter TIBIA		GRUPPEN (MW ± SD)							
		0 (0 M)	11 (1 M)	21 (3 M)	31 (12 M)	41 (14 M)			
			12	22	32	42			
BV/TV [%]	Sham		<i>n.s.</i> → 29,437 ± 11,606	<i>n.s.</i> → 37,449 ± 6,957	<i>p</i> < 0,0001* → 27,277 ± 3,236	<i>n.s.</i> → 24,213 ± 11,586			
	OVX + Steroide	33,158 ± 3,474	<i>p</i> = 0,0141* → 23,504 ± 4,528	<i>p</i> < 0,0001* → 16,651 ± 3,524	<i>p</i> = 0,0009* → 3,496 ± 0,665	<i>p</i> < 0,0001* → 3,723 ± 2,134			
Tb.N [1/mm]	Sham		<i>n.s.</i> → 3,660 ± 1,380	<i>n.s.</i> → 4,516 ± 0,421	<i>p</i> = 0,0021* → 3,194 ± 0,499	<i>p</i> < 0,0001* → 6,065 ± 2,191			
	OVX + Steroide	4,937 ± 0,441	<i>p</i> = 0,0026* → 2,901 ± 0,615	<i>p</i> < 0,0001* → 1,833 ± 0,388	<i>p</i> = 0,0275* → 0,407 ± 0,091	<i>n.s.</i> → 0,348 ± 0,185			
Tb.Th [mm]	Sham		<i>n.s.</i> → 0,080 ± 0,001	<i>n.s.</i> → 0,083 ± 0,015	<i>p</i> = 0,0006* → 0,070 ± 0,007	<i>p</i> < 0,0001* → 0,040 ± 0,001			
	OVX + Steroide	0,067 ± 0,005	<i>p</i> = 0,0141* → 0,001 ± 0,003	<i>n.s.</i> → 0,091 ± 0,007	<i>n.s.</i> → 0,067 ± 0,005	<i>p</i> = 0,0445* → 0,106 ± 0,005	<i>p</i> = 0,0171* → 0,106 ± 0,005		
Tb.Sp [mm]	Sham		<i>n.s.</i> → 0,212 ± 0,106	<i>n.s.</i> → 0,146 ± 0,012	<i>n.s.</i> → 0,222 ± 0,045	<i>p</i> = 0,0181* → 0,081 ± 0,013			
	OVX + Steroide	0,135 ± 0,011	<i>n.s.</i> → 0,230 ± 0,058	<i>p</i> = 0,0089* → 0,431 ± 0,132	<i>p</i> < 0,0001* → 1,155 ± 0,109	<i>p</i> = 0,0314* → 1,385 ± 0,647			
SMI	Sham		<i>n.s.</i> → 1,317 ± 0,494	<i>p</i> = 0,0267* → 0,677 ± 0,423	<i>p</i> = 0,0066* → 1,112 ± 0,245	<i>n.s.</i> → 1,353 ± 0,817			
	OVX + Steroide	0,757 ± 0,228	<i>p</i> = 0,0010* → 1,599 ± 0,205	<i>n.s.</i> → 1,931 ± 0,155	<i>n.s.</i> → 2,161 ± 0,165	<i>n.s.</i> → 2,144 ± 0,148			
Tb.Pf [1/mm]	Sham		<i>n.s.</i> → 6,185 ± 5,884	<i>n.s.</i> → 1,721 ± 3,923	<i>p</i> = 0,0193* → 7,304 ± 2,736	<i>n.s.</i> → 7,518 ± 15,565			
	OVX + Steroide	2,503 ± 2,450	<i>p</i> = 0,0481* → 9,881 ± 1,996	<i>n.s.</i> → 12,238 ± 1,894	<i>n.s.</i> → 15,030 ± 0,927	<i>n.s.</i> → 12,392 ± 0,839			
i.S [mm²]	Sham		<i>p</i> = 0,0020* → 26,894 ± 10,425	<i>n.s.</i> → 29,751 ± 8,102	<i>p</i> < 0,0001* → 18,842 ± 3,560	<i>n.s.</i> → 21,880 ± 8,582			
	OVX + Steroide	13,551 ± 3,108	<i>n.s.</i> → 14,557 ± 2,198	<i>p</i> < 0,0001* → 15,833 ± 3,699	<i>p</i> = 0,0037* → 5,029 ± 1,325	<i>p</i> = 0,0003* → 4,211 ± 0,501			

Tabelle 3.2: Zusammenstellung der Ergebnisse aus der statistischen Auswertung für die Tibiae.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (MW ± SD) für den jeweiligen Strukturparameter. Die Einteilung erfolgte nach Monaten (0, 1, 3, 12 und 14 Monate) und Untergruppen in Sham bzw. OVX + Steroide: 0 Monate (0); 1 Monat Sham (11), 1 Monat OVX + Steroide (12); 3 Monate Sham (21), 3 Monate OVX + Steroide (22); 12 Monate Sham (31), 12 Monate OVX + Steroide (32); 14 Monate Sham (41), 14 Monate OVX + Steroide (42). Signifikanzangaben zum zeitlichen Verlauf zwischen aufeinanderfolgenden Untergruppen sind kursiv gedruckt. Vergleiche innerhalb der Monate zwischen den Untergruppen und Angaben der Signifikanzen haben die Markierung "j". Nicht signifikante Unterschiede sind mit *n.s.* gekennzeichnet.

SPONGIOSALÄNGE		GRUPPEN (MW ± SD)									
		0 (0 M)		11 (1 M)		21 (3 M)		31 (12 M)		41 (14 M)	
Länge [mm]	<i>Sham</i>	10,656 ± 0,374	← n.s. →	8,780 ± 4,386	← n.s. →	11,204 ± 1,120	← n.s. →	10,355 ± 1,155	← p = 0,0396* →	8,496 ± 3,369	
	<i>OVX + Steroide</i>		← n.s. →		9,745 ± 2,488		← p = 0,0022* →		6,141 ± 1,796		← n.s. →

Tabelle 3.3: Zusammenstellung der Ergebnisse aus der statistischen Auswertung für die Spongiosalänge.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (MW ± SD) für die trabekuläre Ausdehnung in mm. Die Einteilung erfolgte nach Monaten (0, 1, 3, 12 und 14 Monate) und Untergruppen in Sham bzw. OVX + Steroide: 0 Monate (0); 1 Monat Sham (11), 1 Monat OVX + Steroide (12); 3 Monate Sham (21), 3 Monate OVX + Steroide (22); 12 Monate Sham (31), 12 Monate OVX + Steroide (32); 14 Monate Sham (41), 14 Monate OVX + Steroide (42). Signifikanzangaben zum zeitlichen Verlauf zwischen aufeinanderfolgenden Untergruppen sind kursiv gedruckt. Vergleiche innerhalb der Monate zwischen den Untergruppen und Angaben der Signifikanzen haben die Markierung "j". Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

IV DISKUSSION

Die adäquate und frühzeitige Diagnostik der Osteoporose stellt sich in der Medizin immer noch als ein nur notdürftig gelöstes Problem dar.

Aufgrund der bis heute noch nicht vollständig verstandenen Veränderungen auf hormoneller und molekularer Ebene gestaltet sich auch die Therapie der Osteoporose selbst als auch ihrer Folgeerscheinungen, wie beispielsweise die Frakturheilung und -versorgung, schwierig.¹³¹

Meist beschränken sich Osteoporosemodelle der Ratte auf die Induktion der postmenopausalen Osteoporose mittels Ovariectomie (OVX). Die Etablierung dieses Modells kann aufgrund der großen Datenlage inzwischen als gesichert bezeichnet werden^{18,132,142} und die Verwendung zu weiteren Fragestellungen, wie z.B. das Einwachsverhalten von Biomaterialien im osteoporotischen Knochen¹³⁷, herangezogen werden.

Auch diese Arbeit befasst sich mit der präklinischen Grundlagenforschung. Zur Analyse der mikroarchitektonischen Strukturparameter wird die mikro-computertomographische Technologie eingesetzt. Ergebnisse auf der Grundlage eines Tiermodells, das Ovariectomie und Steroidtherapie vereint, gibt es jedoch nur wenige, sich zum Teil widersprechende. Daher sollen die Erkenntnisse dieser Arbeit eine Datengrundlage für weitere in diese Richtung ausgelegte Studien sowie einen Ausgangspunkt für Beobachtungen mit ähnlich langer Laufzeit darstellen.

1 MIKRO-COMPUTERTOMOGRAPHIE

Eine Vielzahl von Studien beschäftigt sich seit geraumer Zeit im Rahmen der Grundlagenforschung mit der Veränderung der knöchernen Mikrostruktur. Durch stetige Fortschritte in der Technik können immer wieder neue Erkenntnisse gewonnen werden, die bei der Etablierung neuer Diagnose- und Behandlungsstrategien einen großen Stellenwert besitzen. Anfangs nur durch zweidimensionale Schnitttechniken wie die Histomorphometrie zu erreichende Auflösungen und Darstellungen des Trabekelwerkes können seit den frühen 1980er Jahren mithilfe der Mikro-Computertomographie ersetzt und durch das Vorhandensein dreidimensionaler Volumendatensätze verbessert werden.¹⁶⁰

Lange Zeit bot die Histomorphometrie mittels histologischer Untersuchungen als einzige Technik, die eine Auflösung unter 200 µm gewährleistet, die Möglichkeit kleinste Strukturen qualitativ und quantitativ zu erfassen. Gerade zur Bestimmung und

Etablierung einer immer größer werdenden Anzahl an Strukturparametern des spongiösen Knochens und Erfassung kleinster Trabekel leistete die Histomorphometrie einen enormen Beitrag. Bis heute gilt sie daher als Goldstandard in der Grundlagenforschung. Ihre doch bedeutenden Nachteile, wie z.B. das invasive und die Probe zerstörende Vorgehen, die eher zufällige Auswahl und das geringe zu quantifizierende Volumen wurden akzeptiert aufgrund einer deutlich schlechteren Auflösung von z.T. weit über 0,5 mm mittels klinischer Untersuchungsmethoden, wie QUS, QCT, Spiral-CT. Einen jedoch wichtigen Aspekt stellt v.a. in der Osteoporose-Forschung die Konnektivität einzelner Strukturen und Vernetzung in unterschiedlichen Ebenen dar. Interpolierende Verfahren ermitteln aus der Zweidimensionalität der histomorphometrisch ermittelten Daten ein dreidimensionales Bild, das allerdings nur annäherungsweise der Originalstruktur gleicht.

Die Mikro-Computertomographie kann seit nun ca. 30 Jahren in der Grundlagenforschung einen erheblichen Beitrag zur Osteoporose-Forschung leisten¹⁷⁶, indem sie v.a. die aufgezählten Nachteile der Histomorphometrie überwinden und durch sich stetig verbessernde Techniken immer neue Errungenschaften darbieten kann.¹⁶⁰ Eine feinere Auflösung, genauere und verschiedenste dreidimensionale Darstellungen der Strukturen sowie inzwischen bereits in-vivo Messungen kleiner Labortiere sind dabei wichtige Meilensteine in der Historie der μ CT, die diese Technik zu einem mittlerweile nicht mehr wegzudenkenden Hilfsmittel werden lassen.^{163,164,177}

Aufgrund limitierender technischer Parameter sind der Mikro-Computertomographie aktuell noch Grenzen gesetzt, die daher zu erwähnende Nachteile darstellen. Denn zum einen ist durch die meist vorhandene CCD-Kamera mit 1024^2 Pixeln eine natürliche Begrenzung der Probengröße gegeben, so dass momentan maximal Probenvolumina im Bereich zwischen mm^3 und cm^3 untersucht werden können. Des Weiteren ergeben sich deutlich längere Scanzeiten als bei klinisch eingesetzten Computertomographen, was einen Einsatz im Klinikalltag momentan noch unmöglich werden lässt.

Nichtsdestotrotz stellt die μ CT eine faszinierende Technik zur weiteren Erforschung ossärer Strukturen sowie deren Verbindungen und eventueller Erkrankungen dar, die mithilfe der Untersuchung kleiner Tiermodelle stetig Fortschritte aufweisen kann.

2 TIERMODELL

Knochenaktivitäten und Umbauvorgänge im Skelettsystem der Ratte werden inzwischen dem des Menschen als gleichgesetzt angesehen, solange einige wesentliche Punkte berücksichtigt werden.

Junge Ratten mit einem Alter von nur einigen Wochen zeigen anfangs einen Stoffwechsel auf, der sich von dem humanen Remodeling mit der klassischen und aneinander gebundenen Abfolge von Aktivierung – Abbau – Aufbau unterscheidet. Neben der Tatsache, dass der Knochen in verschiedenen Regionen unterschiedliche Raten der beiden Aktivitäten vorzuweisen hat, ist ein Wechsel zum Remodeling nicht im gesamten Skelettsystem zum gleichen Alter anzutreffen. In einer Arbeit zu den häufig zur Osteoporoseforschung herangezogenen Regionen von *Erben et al.*¹⁴⁸ lag in der Lendenwirbelsäule im Alter von drei Monaten der prozentuale Anteil des Remodelings schon bei 70%. In der proximalen Tibia konnten zum gleichen Zeitpunkt lediglich 20% der humanen Stoffwechselaktivität, nach neun Monaten über 50% und nach einem Jahr über Zweidrittel nachgewiesen werden.¹⁴⁸ Auch das Längenwachstum sowie die physiologische Zunahme des Knochengehaltes bis zum Erreichen der „Peak Bone Mass“ zeigt eine Regionen-spezifische Dauer. Um Knochenproben zu erhalten, die möglichst genau den menschlichen Knochenstoffwechsel wiedergeben, ist es daher ratsam bestimmte Bereiche, wie die an die Epiphysenfuge oder direkt endokortikal anschließende Spongiosa auszuschließen.^{33,148} Während *Erben et al.*¹⁴⁸ in drei Monate alten Wirbelkörpern einen Abstand des VOIs von je Boden- und Deckplatte von 500 µm gewählt und ab sechs Monaten auf 0,25 mm reduziert haben, ist in der vorliegenden Arbeit eine konstante Distanz zwischen Probenstart und Bodenplatte von 350 µm in allen Altersklassen festgelegt worden. In der Metaphyse der proximalen Tibia sind die Verhältnisse der Stoffwechselaktivitäten etwas anders und *Erben et al.*¹⁴⁸ entschieden sich für eine schrittweise Reduktion der Distanz von 1mm bei drei Monaten über 0,5 mm nach einem halben Jahr bis zu 250 µm ab einem Alter von neun Monaten. Um einheitliche Proben von genau gleicher Stelle vorliegen zu haben, ist in dieser Arbeit der Abstand von 500 µm (Tangente der Epiphysenfuge zu Probenbeginn) stets ausgemessen worden. Ab der Gruppe **2x** mit 3 Monaten Beobachtungszeitraum und einem Alter von gut sechs Monaten stimmen die Distanzen sogar größtenteils überein.

3 VERÄNDERUNGEN DER STRUKTURPARAMETER UND SPONGIOSALÄNGE

3.1 BV/TV UND TRABEKULÄRE AUSDEHNUNG DER TIBIA

Der Osteoporose liegt ein Verlust an Knochenmasse zugrunde, der in Studien zu humanen^{38,39} wie tierischen¹³⁸ Knochenproben als eine Abnahme in BV/TV sowie in der Knochendichtebestimmung mittels DXA³¹ mehrfach bewiesen werden konnte.

Die bisher vorliegenden Daten beschränken sich jedoch meist auf eine durch Ovariectomie induzierte Osteoporose bei Ratten und anderen Tiermodellen, die die postmenopausalen Knochenstoffwechsel widerspiegeln.

Wronski et al. untersuchten bereits Mitte der 1980er Jahre in histologischen Schnitten von Lendenwirbelkörpern¹⁷⁸ und metaphysärer Spongiosa proximaler Tibiae^{138,179} Veränderungen nach OVX auf mikroarchitektonischer sowie zellulärer Ebene. Dabei zeigten sich zeitliche Unterschiede im Auftreten erster Reduktionen des Gewebes und Zeitpunkt des Erreichens eines etwa gleichbleibenden Niveaus. Während das Knochenvolumen der Vergleichs-Gruppen in etwa konstant blieb und keine signifikanten Zu- bzw. Abnahmen verzeichnete, ließ sich in LWK und Tibia eine schnelle Phase im Verlust des Trabekelwerkes zusammen mit einem erhöhten Knochenum- und -abbau darstellen. Die metaphysären Trabekel der Tibiae reagierten auf die veränderte Hormonlage früh und bereits nach vierzehn Tagen konnte eine signifikante Abnahme in BV/TV ermittelt werden, die nach ca. 100 Tagen in konstant bleibende Werte des Volumens überging.¹⁷⁹ Im LWK zeigte sich eine Reduktion erst nach ungefähr zwei Monaten. Der weitere Knochenverlust gestaltete sich langsam im Bereich von ca. 10% und sank erst zwischen 180 und 270 Tagen Beobachtungsphase nochmals merklich, so dass letztendlich das Knochenvolumen von anfänglich ca. 35 % auf ungefähr 20% abfiel.¹⁷⁸

Diese Beobachtungen stimmen tendenziell mit den dieser Arbeit zugrundeliegenden Ergebnissen überein. Aufgrund etwas zeitversetzt gewählter Messpunkte ist eine nicht genau deckungsgleiche Gegenüberstellung möglich. Der Trend über die lange Studiendauer ist jedoch identisch. Ebenso wie bei *Wronski et al.*^{178,179} zeigen sich auch in der *Sham*-Gruppe dieser Arbeit (Gruppe **x1**) Schwankungen der Knochenvolumina. Ein Ansteigen des BV/TV in *WK* und *Tibiae* bis zur Gruppe **21** (Alter ca. sieben Monate) sowie ein darauffolgend bestimmter Abfall nach neun Monaten in Gruppe **31** kann auf ein zwischenzeitliches Erreichen der „Peak Bone Mass“ mit ca. zehn Monaten¹³² hinweisen. Die Zeitpunkte des sichtbaren Abfallens von BV/TV sowie das Erreichen eines gewissen Plateaus sind bei *WK* und *Tibiae* in beiden Studien ähnlich. Somit zeigen sich auch in dieser Arbeit deutlich frühere Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel in der proximalen *Tibia* als in den *vertebralen* Knochenproben. Tendenziell nehmen die *tibialen* Volumina deutlicher ab als die *Wirbelkörper*. Allerdings sind in den ovariectomierten Tieren mit Steroidtherapie (*OVX + Steroide*, **x2**) in beiden Regionen stärkere BV/TV-Abnahmen zu verzeichnen.

Die Forschungsgruppe um *Shen*¹⁴⁵ untersuchte ebenfalls strukturelle Veränderungen der metaphysären *Tibia* von weiblichen, zum Teil ovariectomierten Sprague-Dawley

Ratten unter dem Einfluss des Glukokortikoids Prednisolon. Nach einer vier-wöchigen Studienlaufzeit lag das BV/TV der OVX-Ratten bereits signifikant unter dem der Sham-Tiere. Ein ganz anderes Bild konnte jedoch unter Steroidtherapie dargestellt werden. Eine reine Gabe von Prednisolon erhöhte das relative Knochenvolumen im Vergleich zur Sham-Gruppe und die Kombination von OVX und Prednisolon (Pred+OVX) ließ den Wert des BV/TV unverändert zur Vergleichs-Gruppe bestehen. Aufgrund dieser Ergebnisse schrieben *Shen et al.* Glukokortikoiden eine Knochen erhaltende Funktion zu, die der Reduktion des Knochenvolumens durch Ovariectomie entgegenwirkt.¹⁴⁵ Diese Ergebnisse gleichen den Werten der *Tibiae* in den Gruppen **11** und **12** (Beobachtungszeitraum 1 Monat) dieser Arbeit. Denn beide kombinierten Osteoporose-Gruppen zeigen zu den jeweiligen Sham-Werten nach vier Wochen Steroidgabe keine signifikanten Unterschiede im BV/TV.

In der Arbeit von *Fukushima et al.*¹⁵² wurde bei OVX-Ratten mit Methylprednisolongabe (MPA) ein Beobachtungszeitraum über fünf Monate festgelegt. Anzumerken ist, dass die MPA-Gabe erst vier Wochen nach Ovariectomie erfolgte, sodass die postmenopausale Hormonlage bereits einen Monat bestand bevor die kombinierte Osteoporose induziert wurde. Es ist daher zu überlegen, ob das Ansteigen des BV/TV in der OVX-MPA-Gruppe zwischen acht und zwölf Wochen auf eine, wie *Shen et al.*¹⁴⁵ diskutierten, osteoprotektive Wirkung der Steroide zu Beginn der Therapie gegenüber der Ovariectomie zurückzuführen ist. Im weiteren Verlauf nach acht-wöchiger Steroidgabe bzw. zwölf-wöchiger Beobachtung lag dann ein signifikant niedrigeres Knochenvolumen zu gleichaltrigen Sham-Ratten vor.¹⁵²

Auch die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Werte zeigen zwischen den Gruppen **21** (*Sham*) und **22** (*OVX + Steroide*) nach 3 Monaten einen deutlichen Rückgang von BV/TV, was jedoch auch auf das erneute Ansteigen des Knochenvolumens der Vergleichstiere zurückgeführt werden kann.

Bei der sehr langen Studiendauer über insgesamt 14 Monate stellt diese Arbeit einen weiteren Verlust in BV/TV unter der Kombination von OVX und Gabe von Dexamethason, eines hoch wirksamen Glukokortikoids, dar. Dieser Verlust hält um ein Vielfaches länger an und überdauert das von *Wronski et al.*¹⁷⁹ beschriebene Erreichen eines gleichbleibenden Niveaus des BV/TV-Wertes nach ca. 100 Tagen durch Ovariectomie. Die Art der Verläufe ähnelt sich jedoch trotzdem.

*LoCasio et al.*¹⁸⁰ sprechen von einem negativ exponentiellen Verlauf des durch Steroidtherapie bedingten Verlustes des Knochenvolumens im menschlichen Beckenkamm. Er durchläuft zwei Stadien. Deutlich stärkere Abnahmen können in den Anfangsmonaten der Therapie nachgewiesen werden, die danach einen eher schleichenden Verlauf annehmen.^{150,180}

Vor allem axiale Regionen des Skelettsystems sind von der Steroid-induzierten Osteoporose betroffen, sodass besondere Aufmerksamkeit den Wirbelkörpern gewidmet werden sollte.¹⁵⁰

In der vorliegenden Arbeit stellt der hochsignifikante Rückgang des Knochenvolumens BV/TV des Wirbelkörpers *Th10* eine sichere Erkenntnis dar, der erst zwischen drei und zwölf Monaten post Ovariectomie signifikant nachweisbar ist und sich über die gesamte Beobachtungsdauer von vierzehn Monaten hinzieht. Im letzten Abschnitt der Studienlaufzeit flacht die Reduktion jedoch deutlich ab.

Die Beobachtungen von *Wronski et al.*^{178,179}, *LoCascio et al.*¹⁸⁰, *Manolagas* und *Weinstein*¹⁵⁰ sowie von dieser Arbeit beschreiben demnach alle in Proben unterschiedlicher Regionen und Osteoporosearten – alleinige Steroidtherapie, postmenopausale Hormonlage oder kombiniert – keinen kontinuierlichen sondern einen zu Beginn rasanten Knochenverlust, der nach und nach abebbt.

Mithilfe der mikro-computertomographischen Schnittbilder und Rekonstruktionen kann dieser negative Einfluss eindrucksvoll dargestellt und die Reduktion von BV/TV visualisiert werden. Der drastische Rückgang der trabekulären Ausdehnung der *Tibiae* wird anhand der Bilder besonders deutlich und entspricht der Abnahme des Knochenvolumens, sodass man von einem Abbau des Trabekelwerkes beginnend in der Diaphyse ausgehen kann, der sich bis zur Epiphysenfuge ausbreitet und zuletzt Bereiche betrifft, an denen kortikale Strukturen einen schmaleren Spongiosaraum zulassen, wie die proximale laterale Spitze der Metaphyse. Eine mögliche Erklärung dieser Abfolge wäre die Druckbelastung und trajektorielle Ausrichtung der Trabekel, die in der zuletzt betroffenen Region der Metaphyse die geringste Strecke vorzuweisen hat und dort somit aufgrund der Druckverhältnisse am ehesten dazu angehalten werden kann, das Trabekelwerk aufrecht zu erhalten.

Eine entsprechende Untersuchung über diese Art der Spongiosalängenmessung konnte in der Literatur bei *Fukushima et al.*¹⁵² gefunden werden. Auch hier konnte ein signifikanter Rückgang der trabekulären Ausdehnung in der Kombinations-Gruppe (OVX-MPA) sowohl im Vergleich zur Sham- als auch zur Kontroll-Gruppe nach 20 Wochen detektiert werden. Dies entspricht den Resultaten der vorliegenden Arbeit. Bei allerdings nicht standardisierten Messvorgaben erscheinen weitere Vergleiche der Absolutwerte nicht sinnvoll.

Aufgrund der Regionen-spezifischen Mikroarchitekturen¹⁷¹ und unterschiedlichen Manifestationspunkte der induzierten Osteoporose^{178,179} können Ergebnisse zwischen *Tibiae* und *Wirbelkörpern* nur schwer miteinander verglichen werden. Die wenigen zur Verfügung stehenden Studien über Steroidgaben oder/und deren Kombination mit

einer Ovariectomie bei Ratten beschränken sich zudem in der histomorphometrischen Bestimmung der Knochenprobe meist auf die proximale Tibia.^{145,151,152,181}

3.2 Tb.Th, Tb.N UND Tb.Sp

Eine Abnahme der Knochenmasse im Alter ist physiologisch und in beiden Geschlechtern nachzuweisen.²⁵⁻²⁸ Diese kann zum einen durch eine Abnahme der trabekulären Anzahl sowie zum anderen durch ein Ausdünnen der einzelnen Knochenbälkchen bedingt sein. Bei weiblichen Patientinnen ist vor allem ein Rückgang in Tb.N festzustellen, wohingegen bei Männern hauptsächlich ein Dünnerwerden der trabekulären Strukturen ermittelt werden kann.²⁸ Das in jungen Jahren dichte Netz aus Spongiosa verändert seine Morphologie somit zusehends zu zum Teil weiter voneinander entfernten, vereinzelt bzw. dünneren Trabekeln.³⁹

Auch bei an Osteoporose erkrankten Patienten zeigt sich eine deutliche Reduktion des BV/TV. Betrachtet man jedoch die strukturellen Veränderungen der Mikroarchitektur, die der Abnahme zugrunde liegen, sind bei verschiedener Ätiologie der Osteoporose – postmenopausal bzw. Steroid-induziert – markante Unterschiede auszumachen. Während, wie bereits im Rahmen des Alters-assoziierten Knochenschwundes bei Frauen auftretend, ein deutlicher Rückgang in der Trabekelzahl in postmenopausalen Osteoporoseproben vorliegt, ist ein Charakteristikum der Steroid-induzierten Osteoporose die Abnahme der Trabekeldicke.^{129,130,150}

In den Studien zu beiden genannten Osteoporosearten am Tiermodell der Ratte liegen jedoch nicht ganz einheitliche Ergebnisse besonders bezüglich der Tb.Th vor.

*Nitta et al.*¹⁵¹ beschrieben nach einer achtwöchigen Studienlaufzeit eine markante Abnahme der Trabekeldicke und konsekutiv des BV/TV bei den mit Methylprednisolonacetat (MPA) behandelten Tieren im Vergleich zu ovariectomierten Ratten bzw. der Kontroll-Gruppe. Histomorphologisch ließen sich nach dieser Zeit noch keine Unterbrechungen des Trabekelnetzwerkes der proximalen Tibia feststellen.

Auch *Iwamoto et al.*¹⁸¹ konnten einen Einfluss nach ein-monatiger Gabe von Methylprednisolon auf Tb.Th und relatives Knochenvolumen in Form von signifikanten Rückgängen im Vergleich zur Sham-Gruppe nachweisen.

In einer Studie, die über 20 Wochen Resultate aus Ovariectomie und Steroidtherapie (OVX-MPA) denen von OVX-Ratten sowie einer Sham-Gruppe gegenüberstellt, ermittelten *Fukushima et al.*¹⁵² eine signifikante Abnahme der trabekulären Dicke zwischen OVX-MPA- und Sham-Gruppe nach zwölf Wochen. Zu einer früheren sowie späteren Messung wiesen die Werte für Tb.Th zwischen den OVX-MPA- und Sham-

Tieren sowie zwischen der OVX- und Sham-Gruppe leicht erniedrigte jedoch keine signifikanten Unterschiede auf. Die trabekuläre Dicke aller drei Gruppen konnte ungefähr das Niveau der Kontrolltiere zu Studienbeginn halten. Das erwartete Ausdünnen der Knochenbälkchen durch die Gabe von Glukokortikoiden blieb bei den OVX-Ratten aus. Die Tb.Th nahm im gesamten Verlauf sogar minimal zu und nur ein nicht signifikant stärkerer negativer Einfluss auf die Entwicklung der Dicke bei Kombination (OVX-MPA) im Vergleich zu alleiniger Ovariectomie konnte ermittelt werden.

Auch *Shen et al.*¹⁴⁵ untersuchten Veränderungen der Strukturparameter Tb.Th und Tb.N bei OVX-Ratten unter Prednisolongabe, Tieren mit alleiniger Ovariectomie bzw. Steroidtherapie sowie je einer Sham- und Kontroll-Gruppe. Es erfolgte nur eine Messung der tibialen Spongiosa nach vier-wöchiger Laufzeit. Sämtliche Werte der Tb.Th zeigten keine signifikanten Unterschiede. Beide Gruppen mit zusätzlicher Prednisolontherapie konnten sogar das Niveau der Sham-Ratten halten (Pred+OVX) bzw. dickere Trabekel (Pred) vorweisen. Lediglich die reine Ovariectomie ließ ein leichtes Ausdünnen der Knochenbälkchen zu. Ebenso deutlich bezüglich der Prednisolonwirkung waren die Veränderungen in der trabekulären Anzahl. Wie bereits häufig in der Literatur nachgewiesen^{28,41} waren auch in dieser Studie die Trabekel nach Ovariectomie signifikant zu gleichaltrigen Ratten in ihrer Anzahl reduziert. Die Gabe des Glukokortikoids hob diese Wirkung nach vier Wochen scheinbar auf und ließ die Tb.N zwischen Sham und Pred+OVX unverändert. Ohne Ovariectomie erreichte die Gruppe mit Prednisolon noch höhere Trabekelanzahlen als die Kontroll- bzw. Sham-Gruppe. *Shen et al.* schrieben dem Steroid eine gewisse Schutzfunktion zu, die die Aufrechterhaltung der Trabekelanzahl und Abschwächung anderer Risikofaktoren zum Zeitpunkt von vier Wochen begünstigt.¹⁴⁵ Generell ist eine Erhöhung des Tb.N-Wertes nicht mehr möglich, sobald die skelettale Reife und somit maximale Knochenmasse erreicht ist.³⁸ Bei dem ermittelten Anstieg und noch geringem Alter der Ratten von einem halben Jahr bei Studienbeginn könnte es sich demnach zusätzlich um ein noch physiologisches Anreichern trabekulären Gewebes gehandelt haben. Durch die Ovariectomie wurde dieser Vorgang unterbunden, konnte sich hingegen unter Prednisolongabe durch bisher nicht vollständig bekannte zelluläre und molekulare Interaktionen fortsetzen.

Die wenigen zur Verfügung stehenden Studien, die sich mit der Steroid-induzierten Osteoporose im Tiermodell der Ratte beschäftigen, zeigen somit bezüglich der alleinigen Glukokortikoidwirkung auf Tb.Th und Tb.N nicht ganz einheitliche Ergebnisse.^{145,151,181} Betrachtet man die Tendenzen bei Kombination von OVX und

Steroidgabe, fällt bei den relativ kurzen Studienlaufzeiten jedoch ein markanter Unterschied im Sinne eines Aufrechterhaltens der trabekulären Dicke auf.^{145,152}

Die Resultate der vorliegenden Arbeit knüpfen zum Teil an die bereits genannten Beobachtungen an.

Die Trabekeldicke der *Tibiae* weist somit nach 1 Monat Zunahmen in der *Sham*- und *OVX + Steroide*-Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Wie auch mithilfe der ein-monatigen Beobachtung von *Shen et al.*¹⁴⁵ dargestellt, sind in der Kombinations-Gruppe (*Pred+OVX* bzw. *OVX + Steroide*) minimale, nicht signifikant dickere Trabekel im Verhältnis zur *Sham*-Gruppe nachzuweisen. Auch nach 3 Monaten ist ein weiteres leichtes Dickenzuwachs zu vermerken, das sich mit den Ergebnissen der Gruppe um *Fukushima*¹⁵² nach 20 Wochen *OVX* bzw. 16 Wochen Kombination *OVX-MPA* deckt. Dieser Trend kann über die Messzeitpunkte 12 und 14 Monate verifiziert und deutlich dargestellt werden. Die starke Zunahme der Dicke ist in den mikro-computertomographischen Bildern ebenfalls gut visualisierbar (siehe Abbildungen 3.9, 3.10).

In der Entwicklung der Trabekeldicke des Wirbelkörpers *Th10* kann ebenfalls keine signifikante Abnahme ermittelt werden. Die Werte bleiben über die gesamte Studienlaufzeit ungefähr konstant auf einem Niveau und ähneln dem Wert der Kontroll-Gruppe. Ein leichter Dickenzuwachs nach 3 Monaten könnte auch hier einer physiologischen Anreicherung der Knochenmasse bis zum Erreichen der Skelettreife entsprechen, die im Verlauf bis zur nächsten Messung nach 12 Monaten Beobachtung wieder abgenommen hat. Ein deutlicher Anstieg in *Tb.Th*, wie in den *Tibiae* ermittelt, ist bei den *Wirbelkörpern* dieser Arbeit jedoch nicht zu finden.

Durch alleinige Glukokortikoidgabe konnten *Iwamoto et al.*¹⁸¹ darstellen, dass bereits nach vier Wochen eine signifikante Abnahme der Trabekelanzahl in der proximalen *Tibia* der Ratte nachweisbar ist. Lediglich die Gruppe um *Shen*¹⁴⁵ befasste sich bei ihren Beobachtungen der ovariectomierten Ratten unter Steroidtherapie mit Veränderungen in *Tb.N*. Die bereits erwähnten Resultate zeigten nach vier Wochen ein ungefähr gleiches Vorkommen von trabekulären Strukturen zwischen der *Pred+OVX*- und gleichaltrigen *Sham*-Gruppe.

In der vorliegenden Arbeit ist zum Zeitpunkt 1 Monat zwar eine etwas kleinere Anzahl an Trabekeln in den *Tibiae* der *OVX + Steroide*-Gruppe (**12**) nachzuweisen, jedoch kein signifikanter Unterschied zu den *Sham*-Tieren (**11**) auszumachen. Nach 14 Monaten weist die Anzahl an Trabekeln der *Tibiae* in der Gruppe *OVX + Steroide* (**42**) dann einen hoch signifikanten Rückgang auf. Auch in den Knochenproben der *Th10er* kann diese Entwicklung ermittelt werden, die Reduktion der Absolutwerte ist dort

jedoch etwas geringer. Der zeitliche Verlauf zeigt bei beiden Regionen deutliche Parallelen zur Abnahme des BV/TV.

Bei der sehr kurzen Studienlaufzeit der Gruppe um *Shen*¹⁴⁵ werden Daten akquiriert, die eventuell zu verfälschenden, frühzeitigen Interpretationen der Wirkung von Glukokortikoiden auf die Mikroarchitektur des postmenopausalen Knochens führen. Denn aufgrund des in der vorliegenden Arbeit sichtbar ähnlichen Verlaufes von Tb.N und BV/TV in *Tibiae* und *Wirbelkörpern* kommt es möglicherweise erst verzögert zu einer Abnahme von Trabekelzahlen, die nach beispielsweise einmonatigen Beobachtungszeiträumen noch nicht erfasst werden kann.

Die in dieser Arbeit ebenfalls ermittelte intertrabekuläre Distanz der *Tibiae* zeigt in ihrem Verlauf eine leicht zeitverzögerte, negative Korrelation zur Trabekelanzahl sowohl in der *Sham*- als auch der *OVX + Steroide*-Gruppe. Bei einer Abnahme in Tb.N erfolgt nach Datenlage ein Ansteigen der Tb.Sp. Das reziproke Verhalten kann ebenso nachgewiesen werden.

Dieser Zusammenhang ist auch in den *Wirbelkörpern* zu erkennen. Während beispielsweise in der Kombinationsgruppe *OVX + Steroide* die trabekuläre Anzahl bereits nach einem Monat beginnt, signifikant zu sinken, nimmt die Entfernung zwischen einzelnen Trabekeln etwas versetzt zum nächsten Messpunkt zwischen 3 und 12 Monaten hoch signifikant zu.

Ein direktes Zusammenspiel der Tb.Sp mit einer Änderung in Tb.Th wird in der vorliegenden Arbeit nicht gesehen.

*Dalle Carbonare et al.*¹⁸² untersuchten humane Knochenproben des Beckens postmenopausaler Patientinnen mit manifester Osteoporose (PMOP) und z.T. zusätzlich einer Steroidtherapie von mindestens 7,5 mg Prednisolon täglich über mehr als ein halbes Jahr. Zudem wurde eine Einteilung in niedrig- (LGC) bzw. hoch-dosierte (HGC) Glukokortikoidtherapie vorgenommen, die interessante Ergebnisse zeigte. Die Höhe der Dosis hatte demnach entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung sämtlicher Strukturparameter. Die Trabekelanzahl war in der HGC-Gruppe signifikant gegenüber der PMOP-Gruppe reduziert, was sich mit Beobachtungen der vorliegenden Arbeit deckt. Bei einer nur geringen Dosierung des Glukokortikoids ließ sich allerdings eine zwar nicht signifikante, jedoch höhere Zahl an Knochenbälkchen als in reinen PMOP-Knochenproben finden. Die intertrabekuläre Distanz Tb.Sp war, entsprechend des Tb.N-Verlaufes der HGC-Gruppe, signifikant größer als bei reinen postmenopausalen Osteoporose-Patientinnen. Ein deutlicher Unterschied zur vorliegenden Arbeit sowie den Studien von *Shen et al.*¹⁴⁵ und *Fukushima et al.*¹⁵² lag in der trabekulären Dicke. Wie auch bei einer alleinigen Steroid-induzierten Osteoporose beim Menschen^{129,130}

konnte in osteoporotisch veränderten Knochenproben postmenopausaler Frauen unter Steroidtherapie ein signifikanter Rückgang in Tb.Th zwischen der HGC- und PMOP-Gruppe sowie zwischen der HGC- und LGC-Gruppe nachgewiesen werden. Die Trabekeldicke der postmenopausalen Osteoporose-Patientinnen mit niedrig-dosiertem Glukokortikoid unterschied sich jedoch in der leichten Abnahme nicht signifikant von dem Wert der PMOP-Gruppe.¹⁸²

Diese Differenz der Resultate in einem für die Steroid-induzierte Osteoporose charakteristischen Strukturparameter wirft daher Fragen auf, ob dies ein einmaliges Geschehen war bzw. ob sich die Kombination von postmenopausaler Hormonlage und Glukokortikoidgabe auf einige Strukturparameter im menschlichen Knochengewebe anders auswirkt als auf die Proben des Tiermodells der Ratte. Um dies zu klären bedarf es allerdings weiterer Studien mit gleichem Aufbau und identischer Bestimmung der Parameter in Mensch und Ratte.

3.3 TB.PF UND SMI

Bereits in den frühen 1980er Jahren beschäftigten sich *Parfitt et al.*³⁸ mit den Veränderungen trabekulärer Strukturen, der Abnahme in Anzahl und Dicke der Knochenbälkchen bis hin zu Perforationen dieser.

Mit der Entwicklung des Strukturparameters Trabecular Pattern Factor Tb.Pf durch *Hahn et al.*¹⁷³ ist inzwischen eine frühe quantitative Detektion solcher Perforationen durch ein rasches Ansteigen des Wertes möglich. Die Konnektivität der Trabekel nimmt durch zahlreiche Perforationen erheblich ab, die mikroarchitektonische Ausrichtung wird grundlegend verändert und der vor allem gegenüber Kompressionskräften bestehende Widerstand des netzförmig angeordneten Trabekelwerkes im Wirbelkörper⁸⁵ ist nicht mehr im gleichen Maße vorhanden.^{6,172,173}

Die Forschungsgruppen um *Parfitt*³⁸ und *Hahn*¹⁷³ verbinden beim Alters-assozierten Knochenverlust sowie bei der postmenopausalen Osteoporose in erster Linie den Rückgang der Trabekelanzahl mit der Ausbildung von Perforationen und somit dem Anstieg in Tb.Pf. In der vertebrealen Spongiosa zeigt sich in diesem Zusammenhang eine deutliche Reduktion der Trabekel vor allem in der horizontalen Ebene^{6,87}, was sich negativ auf die statischen Verhältnisse auswirkt.^{6,42,86} Die Abnahme der Trabekeldicke, die ebenfalls zur Verringerung des Knochenvolumens führt, lässt bei männlichen Patienten im höheren Alter nach *Hahn et al.*¹⁷³ jedoch kaum Änderungen des Trabecular Pattern Factors detektieren.

Das Charakteristikum der reinen Steroid-induzierten Osteoporose, sind besonders deutliche Abfälle in den Werten von Tb.Th. Ein gravierendes Dünnerwerden der trabekulären Strukturen kann letztendlich auch in Perforationen münden. Auch hier steht der Beurteilung des Tb.Pf-Verlaufes somit eine besondere Beachtung zu.

Beobachtungen von *Aaron et al.*¹³⁰ und *Chappard et al.*¹²⁹ unterstützen dies. Sie gehen in ihren Studien unter anderem auch auf histomorphometrisch ermittelte Perforationen des Trabekelwerkes ein. In Knochenproben der Beckenregion von mit Glukokortikoiden behandelte Patienten konnten *Aaron et al.*¹³⁰ ab einer Tb.Th unter 0,1 mm zu ca. fünfzehn Prozent zahlreiche Perforationen nachweisen. Die Gruppe um *Chappard*¹²⁹ untersuchte ebenfalls Spongiosa aus dem Bereich des Beckens, die sich jedoch ausschließlich auf männliche Probanden unter Steroidtherapie bzw. Kontrollen beschränkte. Die signifikante Reduktion in BV/TV stand in deutlichem Zusammenhang mit hochsignifikanten Abnahmen der Trabekeldicke. Eine weitere Unterteilung in Proben unter (A) bzw. über (B) 11% BV/TV wurde vorgenommen. Während in den deutlich reduzierten Knochenvolumina (A) in Tb.Pf, Tb.Th, Tb.Sp und Tb.N signifikante Unterschiede zur Kontroll-Gruppe ermittelt werden konnten, bestand in den Proben über elf Prozent BV/TV lediglich eine signifikante Verschlechterung der Werte von Tb.Th sowie Tb.Pf. Trotz des erhöhten Tb.Pf zeigte sich dort das Netzwerk weiterhin intakt. In Gruppe A hingegen fielen sichtbare Perforationen ab einer Trabekeldicke unter 70 Mikrometer auf, die zu einem erheblichen Verlust im Trabekelverbund führten.¹²⁹

Perforationen sind somit sowohl mit der Abnahme der Trabekelanzahl assoziiert als auch durch einen Rückgang in der trabekulären Dicke begründet. Das Ansteigen des Trabecular Pattern Factor weist jedoch schon in sehr frühem Stadium auf mikrostrukturelle Veränderungen hin bevor sie visuell deutlich in Form von Perforationen oder gar ganzer Strukturänderungen festzustellen sind.¹⁷³

Erweitern sich diese Perforationen verschiebt sich das Verhältnis zwischen konkaven und konvexen Oberflächen zugunsten der Konvexität vereinzelter Knochenbälkchen, was den Anstieg in Tb.Pf erklärt. In dreidimensionalen Strukturen und Rekonstruktionen schlägt sich dies in einem Überwiegen der stabförmigen Strukturen nieder, die aus den anfangs vorherrschenden plattenähnlich angeordneten Trabekeln hervorgegangen sind.^{38,173} Dieses Verhältnis lässt sich wiederum durch die Zunahme des Structure Model Index SMI darstellen.^{167,172}

Die Veränderungen der beiden Strukturparameter können auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Sowohl in den Knochenproben von *Tibiae* als auch *Wirbelkörpern* verlaufen Änderungen in den Werten von SMI und Tb.Pf simultan ab.

Aufgrund der bereits Ende der 1970er Jahre von Singh¹⁷¹ beschriebenen Unterschiede in Anordnung und Ausrichtung ossärer Strukturen sind nicht identische Ausgangswerte des SMI in der Spongiosa der *Tibiae* und *Wirbelkörper* nur logische Folgen.

Während die *Th10er* der *Sham*-Tiere bis kurz vor Schluss der Studienlaufzeit meist negative Werte des SMI um Null und somit hauptsächlich platten-förmig angeordnete Trabekelaufweisen, deutet sich in der *OVX + Steroide*-Gruppe durch höhere Werte ein Umbau zu stab-förmigen Strukturen an.^{167,172} Die konstant negativen Werte des Trabecular Pattern Factors der *vertebralen* Knochenproben sprechen für über lange Zeit bestehende konkave Oberflächen und somit gute Vernetzungen der Trabekel in den *Sham*-Ratten. Die rasanten Zunahmen der *Osteoporose*-Gruppe ab 3 Monaten und vor allem auch zwischen 12 und 14 Monaten bieten einen quantitativen Nachweis in der Umverteilung konkaver zu konvexen Strukturen mit deutlichem Überwiegen letztgenannter. Eine hoch signifikant schlechtere Konnektivität ist die Folge.

Der Ausgangswert des Structure Model Index der *Tibiae* weist ein noch deutliches Vorherrschen der platten-ähnlichen Trabekel auf, das im physiologischen Alterungsprozess der *Sham*-Tiere einer leichten Vermehrung stabförmiger Strukturen weichen muss. Diese architektonische Umwandlung wird quantitativ in den osteoporotischen Proben (*OVX+Steroide*) noch deutlicher sichtbar. Bereits zeigen die Absolutwerte des Tb.Pf der Gruppe *Sham* ein deutlich stärkeres Vorkommen einzelner, konvexer, nicht vernetzter Trabekel als dies in den *WK* der Fall ist. In den *Tibiae* der ovariectomierten Ratten unter Steroidtherapie erhöht sich dieses Charakteristikum nochmals und erreicht rein quantitativ ähnliche mikrostrukturelle Vernetzungen konvexer Trabekel wie in den *Wirbelkörpern*.

Die Detektion früher mikrostruktureller Änderungen durch ein Ansteigen des Tb.Pf erfolgt nach Hahn *et al.*¹⁷³ vor einem Wechsel des Tb.N-Wertes. Da die Zeitpunkte der Messungen jedoch relativ große Abstände aufweisen, ist dies in dieser Arbeit nicht darzustellen, sondern lediglich eine gleichzeitige Zu- bzw. Abnahme zu ermitteln. Auch die von Wronski *et al.* geschilderten Unterschiede des zeitlichen Verlaufes des relativen Knochenvolumens zwischen *Tibiae* und *Wirbelkörpern* nach Ovariectomie der Ratten^{178,179} finden sich im Verlauf der Strukturparameter Tb.Pf und SMI wieder. Demnach sind im *tibialen* Trabekelwerk der Gruppe *OVX + Steroide* bereits zum Zeitpunkt 1 Monat (**12**) signifikante Anstiege in SMI und Tb.Pf darzustellen. Der Rückgang der Tb.N und konsekutiv der des relativen Knochenvolumens des *Wirbelkörpers Th10* folgt den Änderungen in der *Tibia*. Ein signifikanter Anstieg des Tb.Pf in der Gruppe *OVX + Steroide* des *WK* liegt zum Zeitpunkt 3 Monate (**22**) vor, die signifikante Zunahme des SMI folgt zur nächsten Messung nach 12 Monaten (**32**).

Anhand der hoch signifikanten Resultate der Strukturparameter SMI und Tb.Pf dieser Arbeit, die wichtige Aspekte in der Morphologie des osteoporotischen Knochens behandeln, wird eine Induktion der Osteoporose durch OVX und Glukokortikoidgabe im Tiermodell der Ratte bestätigt.

Die Differenzen der Absolutwerte (**0** bis **41** bzw. **0** bis **42**) von Tb.Pf und SMI sind in den *Sham*-Gruppen im Rahmen des physiologischen Alterns deutlicher in den Knochenproben der *tibialen* Spongiosa ausgeprägt. Betrachtet man jedoch die Kombinations-Gruppe *OVX + Steroide* in *Tibiae* und *WK*, stellt man eine deutlichere Zunahme von Tb.Pf und SMI im Wirbelkörper *Th10* fest.

Schlussfolgernd lautet eine mögliche Annahme, dass eine postmenopausale Hormonlage mit gleichzeitiger Glukokortikoidgabe im Tiermodell der Ratte einen gravierenderen Einfluss auf die Mikrostruktur der *Wirbelkörper* in Hinblick auf Konnektivität und das Verhältnis von platten- zu stab-ähnlich angeordneten Knochenbälkchen aufweist. Diese Beobachtung deckt sich mit pathologischen DXA-Messwerten sowie Frakturprävalenzen von Patienten mit Steroid-induzierter Osteoporose.¹⁵⁰

Weitere Arbeiten, die sich mit der Bestimmung des Tb.Pf befassen, greifen auf humane Beckenspongiosa zurück. Beispielsweise verglichen *Dalle Carbonare et al.*¹⁸² Spongiosa des weiblichen Beckenkamms nach Therapie mit niedrig-(LGC) bzw. hoch-dosierten (HGC) Glukokortikoiden mit osteoporotisch veränderten Proben postmenopausaler Frauen (PMOP). Die HGC-Gruppe wies dabei einen hoch signifikant größeren Tb.Pf auf als die PMOP-Gruppe. Bei Patientinnen mit geringer Dosierung der Steroide konnte ein niedrigerer Absolutwert für den Tb.Pf als in den nur durch die postmenopausale Osteoporose veränderten Proben erfasst werden. Dies deutet auf eine bessere Vernetzung der Trabekel hin. Mit einem Mittelwert von $2,26 \pm 1,62SD$ zeigte die PMOP-Gruppe somit Werte, die denen von *Hahn et al.*¹⁷³ erstmals ermittelten Ergebnissen für Tb.Pf des Beckens postmenopausaler Frauen ähneln. Mit einem Mittelwert des Trabecular Pattern Factors um ca. 5/mm lag die HGC-Gruppe deutlich höher. Der zusätzlich ossäre Einfluss des hoch-dosierten Glukokortikoids bei gleichzeitig bestehender manifester postmenopausaler Osteoporose auf die Mikroarchitektur wird anhand dieses Wertes im direkten Vergleich deutlich.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Tb.Pf-Resultate durch Ovariectomie und Gabe des hochpotenten Glukokortikoids Dexamethason fallen noch gravierender aus. Nach 14 Monaten Studienlaufzeit stehen Mittelwerte in *Wirbelkörpern* und *Tibiae* für einen drastischen Umbau des Trabekelwerkes mit vereinzelt, nicht vernetzten Strukturen mit hauptsächlich konvexer Oberfläche. Mögliche Gründe für den im

Vergleich enorm hohen Wert des Tb.Pf können zum einen die hochpotente Wirkung oder auch lange Gabe des Dexamethasons sein. Zum anderen liegen mit Mensch und Ratte Proben unterschiedlicher Spezies sowie mit Trabekelwerk aus der Beckenregion bzw. *Tibia* und *Wirbelsäule* Proben unterschiedlicher Regionen und Mikroarchitekturen vor.

3.4 i.S

Die Änderung des i.S-Wertes spiegelt das Hinzukommen bzw. Verschwinden trabekulärer Strukturen an den zuvor definierten Begrenzungen des jeweiligen Knochenvolumens VOI wider. Die trabekuläre Schnittfläche ist demnach besonders hilfreich bei der Detektion von neu gebildetem Knochengewebe. Da sich dieser Parameter spezifisch auf eine bestimmte Fläche beschränkt, kann er bei Osteosyntheseverfahren oder dem Einwachsverhalten von Implantaten interessante Resultate liefern.¹⁶⁷ Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse spielen daher in Bezug auf die Fragestellung eine eher untergeordnete Rolle in der Darstellung der mikroarchitektonischen Veränderungen bei ovariectomierten Ratten unter Steroidtherapie. Als Datengrundlage für Studien, die sich mit Prothesenimplantation oder der Versorgung von Frakturen mittels Osteosynthesematerial in osteoporotisch verändertem Knochen auseinandersetzen, sind diese Daten allerdings ein wichtiger Baustein zum Vergleich der ermittelten Resultate.

Während sich in den *Tibiae* der Gruppe *Sham* eine signifikante Vergrößerung der Schnittfläche des VOI zeigt, liegt über die gesamte Studienlaufzeit bei ovariectomierten Ratten mit Steroidtherapie eine signifikante Reduktion vor. Dies macht sich nach 14 Monaten in einem deutlichen Unterschied beider Gruppen bemerkbar. Die Werte der beiden Gruppen in den *Wirbelkörpern* zeigen zu Anfang einen ähnlichen Verlauf und unterscheiden sich erstmals nach einem Jahr signifikant. Nach 14 Monaten sorgt eine weitere Zu- bzw. Abnahme der i.S in der *Sham*- bzw. der *OVX + Steroide*-Gruppe für eine signifikante Differenz. Die Auswirkungen der Kombination von Ovariectomie und Glukokortikoidgabe in Form von Reduktion der durch VOI-Begrenzung anzuschneidenden Trabekel können somit auch in diesem Parameter deutlich gemacht werden.

Die bei Implantaten definierten Schnittflächen liegen innerhalb des Trabekelwerkes und haben keine nähere Verbindung zur Kortikalis. Bei den in dieser Arbeit ausgewählten Volumina befinden sich die trabekulären Schnittflächen der VOI immer in der Zirkumferenz des kompakten Knochengewebes. Bereits *Keshawarz et al.*³³ wiesen auf

eine endokortikale Strukturveränderung bei postmenopausaler Hormonlage hin, die neue, nicht der üblichen Spongiosa entsprechende Trabekel entstehen lässt. Bei eventueller Fehleinschätzung der rein visuell bestimmten ROI-Grenzen muss bei diesem Parameter somit berücksichtigt werden, dass eine eventuelle Verfälschung der Werte die Folge sein kann. Die möglicherweise auch in diesen Knochenproben neu entstanden Trabekel durch Aushöhlung der Kortikalis könnten bei Aufnahme in das jeweilige VOI ein noch drastischeres Absinken der Schnittfläche in der OVX + Steroide-Gruppe verhindert haben.

4 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Zweifellos werfen weiterhin sowohl postmenopausale als auch Steroid-induzierte Osteoporose jeweils per se noch viele Fragen auf, die in neuen Tiermodell-Studien Aufklärung suchen.

Die Kombination dieser beiden ist aufgrund der hochkomplexen pathophysiologischen Vorgänge und unterschiedlichen Angriffspunkte in Mikroarchitektur und Knochenstoffwechsel ein weites noch unerforschtes Feld, das durch demographischen Wandel und häufiges Vorkommen in der Gesellschaft zunehmend an Brisanz gewinnt. Die vorliegende Arbeit soll eine Datengrundlage zum Steroid-induzierten Osteoporosemodell der ovariectomierten Ratte liefern, die dank einer Studienlaufzeit von vierzehn Monaten einen guten Überblick über den Verlauf mikroarchitektonischer Veränderungen in Wirbelkörpern und proximalen Tibiae und somit Vergleichsmöglichkeiten für weitere Studien bietet.

Mit zum Teil drastischen Veränderungen in sechs der sieben in dieser Arbeit ermittelten Strukturparametern sowie in mikro-computertomographischen Bildern und Rekonstruktionen kann ein Wechsel zu osteoporotischen Knochenverhältnissen durch die Kombination OVX + Steroide im Tiermodell Ratte deutlich aufgezeigt werden. Die nicht-destruierende dreidimensionale Erfassung der Daten mittels Mikro-CT stellt einen enormen Vorteil dar, der das Frakturieren der Proben reduziert, eine direkte Berechnung der Werte ermöglicht und somit weitere Fehlerquellen ausschalten kann.

Über die insgesamt 14 Monate sind ein deutlicher Rückgang der **Tb.N**, gefolgt von einer Abnahme in **BV/TV**, **i.S** und einem steigenden Wert der **Tb.Sp** zu verzeichnen. Die Proben der beiden Regionen *Th10* sowie *Tibia* zeigen dabei einen leichten zeitversetzten Beginn dieser Verläufe. Des Weiteren sind osteoporotische Auswirkungen auf das Trabekelwerk teilweise Regionen-spezifisch stärker ausgeprägt, was jedoch nicht immer einfach zu ermitteln ist. Das relative Knochenvolumen BV/TV

scheint jedoch in der proximalen Tibia prozentual deutlicher abzunehmen. Die Strukturparameter **SMI** und **Tb.Pf** zur quantitativen Bestimmung der Mikrostruktur hingegen weisen im *Wirbelkörper* etwas stärkere Unterschiede auf.

Lediglich der Verlauf der **Tb.Th** kann nicht vollständig erklärt werden. Während sich die Werte des *WK* nach 14 Monaten praktisch unverändert auf einem Niveau präsentieren, stellt sich in der metaphysären Spongiosa der *Tibia* ein hoch signifikanter Dickenzuwachs der Trabekel ein - eine Beobachtung, die den ossären Veränderungen der reinen Steroid-induzierten Osteoporose gegenübersteht. Vorzustellen wäre ein Mechanismus, der kompensatorisch durch Erhöhung der Trabekeldicke die sinkende Trabekelzahl abfangen soll. Denn, während die Anzahl an Trabekeln nach Epiphysenfugenschluss nicht mehr ansteigen kann, ist ein Ausdünnen bzw. Dickenzuwachs der Knochenbälkchen weiterhin jeder Zeit möglich.³⁸ Trotz verdickter Trabekel sind die Distanzen zwischen diesen erhöht und netzartige Verbindungen kaum vorhanden. Dies führt zu Instabilität des gesamten Knochens¹⁸³, was sich in der relativ geringen Probenanzahl durch Ausschluss aufgrund zahlreicher Frakturen zum Ende der Studienlaufzeit widerspiegelt.

In der Literatur finden sich Hinweise auf eine gewisse Reversibilität der ossären Auswirkungen der Steroidtherapie.^{109,112} Limitationen stellen diesbezüglich z.B. Perforationen im Trabekelwerk bzw. eine bestimmte Dosierung der Glukokortikoide und deren Potenz dar.¹⁸²

In diesem Zusammenhang zeigten *LoCascio et al.*¹⁸⁰ in einer Studie bereits Ende der 1980er Jahre, dass der Einfluss, den eine Steroidtherapie auf den menschlichen Knochen auswirkt, auf dem zu Beginn vorliegenden BV/TV beruht. Interessant ist dabei, dass bei hohem prozentualen Anteil an Spongiosa die Abbaurate unter Therapie entsprechend größer ist als bei sehr geringen Ausgangswerten des BV/TV. Auch die Forschungsgruppe um *Als et al.*¹⁸⁴ erbrachte ähnliche Beobachtungen an Patienten mit rheumatoider Arthritis unter Glukokortikoidgabe. Bei Patientinnen mit prämenopausaler Hormonlage und somit nachweislich höherem Anteil an spongiösem Gewebe konnte ein signifikanter Rückgang im Mineralgehalt des Knochens nach Steroidgabe ermittelt werden. Dies war bei bereits osteopenischen postmenopausalen Frauen nicht der Fall. Ein interessanter Aspekt könnte daher beispielsweise das Zusammenspiel und die zeitliche Kombination von postmenopausaler Hormonlage und Glukokortikoidgabe sein. Wie verändert sich der Verlauf des Knochenverlustes bei bereits osteopenischen Patientinnen, wenn zu unterschiedlichen Zeitpunkten und somit unterschiedlichen Knochenvolumina mit der Steroidtherapie begonnen wird? Wie und wann verändern sich die entsprechenden Strukturparameter nach Beginn bzw. Absetzen der

Steroidtherapie postmenopausaler Patientinnen? Warum zeigt ein bereits vermindertes ossäres Volumen nicht identische Abbauraten? In welcher Weise verändern dann Glukokortikoide die Struktur?

5 LIMITATIONEN

Bekanntlich sind Forschungsarbeiten an Tiermodellen nie in vollem Maße auf die Verhältnisse im menschlichen Körper zu übertragen und stellen in gewisser Weise einen Kompromiss dar.

So ist beispielsweise die Bauweise des Skelettsystems zwischen Ratte und Mensch nicht identisch. Tibia und Fibula verschmelzen distal im murinen Skelett, durch den Vierbeinerstand wirkt sich die Schwerkraft anders auf die Wirbelsäule aus und verteilt sich gleichmäßiger zwischen oberer und unterer Extremität.

Des Weiteren sind die vorgenommenen Messungen nicht völlig standardisiert und von der jeweiligen Person, die die Grenzen des VOI visuell bestimmt, abhängig.

Die schon erwähnte endokortikale Aushöhlung der Kompakta und eventuelle Neubildung von Trabekel-ähnlichen Strukturen^{33,185} kann zum einen die eigentliche durch OVX und Steroide bedingte Abnahme der trabekulären Schnittfläche etwas verringern. Zum anderen kann die Datenerfassung der Tb.Th durch die dickere Bauweise der kortikalen Trabekel verfälscht werden. In diesem Zusammenhang spiegeln eventuelle noch bestehende Unterschiede im Knochenstoffwechsel sehr junger Ratten¹⁴⁸ zu Beginn der Studienlaufzeit den menschlichen Metabolismus in manchen Regionen nicht adäquat wider.

Aufgrund der langen Studienlaufzeit und enormen Belastung der Versuchstiere durch die erhöhte Knochenbrüchigkeit wird die Anzahl der zur Verfügung stehenden Proben limitiert. Zudem begrenzt trotz des nicht-invasiven Verfahrens der aktuelle Stand der Technik der Mikro-Computertomographie die Probengröße auf ein Maximum von wenigen cm³.

V ZUSAMMENFASSUNG

1 ENGLISCH

Structural changes in the micro-architecture of bone display a basic segment of the pathogenesis of osteoporosis. Visualization and quantification of these changes are achieved by a high resolution of micro-computertomography and a non-destructive gathering of a three-dimensional volumetric dataset. In case of a simultaneous combination of postmenopausal hormone-deficiency and steroid therapy only a few studies can be found that show the effects of these (risk) factors. Therefore, further investigation by using animal models has to be done. In order to compare the structure of an osteoporotic bone with healthy rats quantitatively a micro-CT calculation of specific parameters is helpful.

Vertebral and tibial samples of ovariectomized rats with steroid therapy were compared to sham groups as well as to one control group. Measurements took place after one, three, twelve and fourteen month/s of the duration of this study. The length of spongiosa was defined by the last trabeculae in the axial slices and showed a marked decline over fourteen months. The analysis of the morphometric parameters BV/TV, Tb.N, Tb.Th, Tb.Sp, SMI, Tb.Pf and i.S was done after the reconstruction of 3D-pictures by using an isotropic voxel size of approximately 7 (*Th10*) or 8 (*tibia*) micrometer. In both regions the time course of the osteoporosis group (*OVX +Steroide*) showed (highly) significant reductions in the percent bone volume BV/TV, the intersection surface i.S and the trabecular number Tb.N. Inversely, the trabecular separation Tb.Sp extended highly significant. Drastic shifts in surface morphology like a changing from concavity to convexity and thus a following decrease in trabecular connectivity could be detected with a highly significant growth in the trabecular pattern factor Tb.Pf. Also, the SMI increased significantly and demonstrated a conversion from plate- to strut-like objects. All of these results, but especially their combination, established the induction of osteoporosis in animal models of ovariectomized rats with steroid therapy. However, the development of the trabecular thickness Tb.Th shows stable values in vertebral bodies and even an obvious rise in tibial trabecular bones. These findings highlight that many questions have not been solved yet and demonstrate the importance of further studies dealing with this kind of risk factor combination.

2 DEUTSCH

Strukturelle Veränderungen der ossären Mikroarchitektur stellen beim Krankheitsbild der Osteoporose einen grundlegenden Abschnitt der Pathogenese dar. Die hohe Auflösung der Mikro-Computertomographie sowie das nicht-destruktive Ermitteln dreidimensionaler Volumendatensätze machen eine Visualisierung und Quantifizierung der Veränderungen möglich. Im Falle eines simultanen Vorliegens der (Risiko-) Faktoren postmenopausaler Hormonlage und Steroidtherapie zeigt sich jedoch ein noch recht unerforschtes Gebiet, das dringend weitere Aufklärung mithilfe von Tiermodellen sucht. Mittels μ CT kann die Bestimmung spezifischer Parameter beim quantitativen Vergleich der Struktur des osteoporotischen Knochens zu gleichaltrigen gesunden Ratten erfolgen.

Über eine Studienlaufzeit von insgesamt vierzehn Monaten wurden Spongiosaproben aus dem Wirbelkörper *Th10* sowie der proximalen *Tibia* von ovariectomierten Ratten unter Steroidtherapie mit Sham-Tieren sowie einer Kontroll-Gruppe verglichen. Messungen der Strukturparameter und die mikro-computertomographische Darstellungen des dreidimensionalen Trabekelwerkes erfolgten einen, drei, zwölf und vierzehn Monat/e postoperativ. Um eine Analyse der Strukturparameter BV/TV, Tb.N, Tb.Th, Tb.Sp, SMI, Tb.Pf und i.S durchführen zu können, wurden die Daten bei einer isotropen Voxelgröße von ca. 7 μ m (*Th10*) bzw. 8 μ m (*Tibia*) detailgetreu rekonstruiert. Die Bestimmung der Spongiosalänge erfolgte anhand axialer Tomogramme. Der zeitliche Verlauf der Osteoporose-Gruppe (*OVX + Steroide*) zeigte (hoch) signifikante Reduktionen des relativen Knochenvolumens BV/TV, der trabekulären Schnittfläche i.S sowie der Trabekelanzahl Tb.N in beiden Regionen. Dementsprechend vergrößerte sich die intertrabekuläre Distanz Tb.Sp hoch signifikant und ein drastischer Rückgang der trabekulären Ausdehnung in der *Tibia* war zu sehen. Deutliche Wechsel in der Oberflächenmorphologie von Konkavität zu Konvexität mit konsekutiver Abnahme der Vernetzung sowie Änderungen von platten- zu stab-ähnlichen Strukturen konnten durch (hoch) signifikante Wertanstiege in Tb.Pf bzw. SMI nachgewiesen werden. Bereits Einzelergebnisse, jedoch v.a. die Kombination der deutlichen Resultate bewiesen die Induktion osteoporotischer Verhältnisse im Tiermodell der ovariectomierten Ratte unter Steroidtherapie. Allerdings lässt die Entwicklung der Trabekeldicke Tb.Th mit einem gleichbleibenden Wert der *Wirbelkörper* bzw. einer Zunahme in den *Tibiae* noch einige Fragen offen und demonstriert die Wichtigkeit weiterer vergleichender Studien in diesem Gebiet.

VI ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3D	dreidimensional
Δ	Delta; Differenz
α	Signifikanzniveau
ASBMR	American Society for Bone and Mineral Research
BGB	Bundesgesetzbuch
BMD	bone mineral density
BMI	Body Mass Index
BV/TV	Bone Volume/Tissue Volume
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCD	charge-coupled device (ladungsträgergekoppelte Schaltung)
CrI:SD	Charles River Laboratories, Sprague Dawley®
CT	Computertomographie
d	Durchmesser
Div.	diverse
Dkk-1	dickkopf-1
DVO	Dachverband Osteologie
DXA/DEXA	Dual-Energy X-ray Absorptiometry, Doppelröntgen-Absorptiometrie
etc.	et cetera

FSH	Follikel stimulierendes Hormon
ges.	gesamt
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
11 β -HSD	11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase
HGC	high cumulative dose glucocorticoid (hoch-dosiertes Glukokortikoid)
IGF-1/2	Insuline-like Growth Factor 1/2
IL-1/-6	Interleukin 1/6
i.m.	intramuskulär
insg.	Insgesamt
i.S	Intersection Surface
JLU Gießen	Justus-Liebig-Universität Gießen
keV	Kiloelektronenvolt
kV	Kilovolt
L1/4	Lendenwirbelkörper 1/4
LGC	low cumulative dose glucocorticoid (niedrig-dosiertes Glukokortikoid)
LH	luteinisierendes Hormon
LPR5	Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 5
LWS	Lendenwirbelsäule
max.	maximal
MB	Megabyte

M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MHz	Megahertz
Mikro-CT/ μ CT	Mikro-Computertomograph
μ A	Mikroampere
μ m	Mikrometer
μ Sv	Mikrosievert
mA	Milliampere
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MPA	Methylprednisolonacetat
ms	Millisekunden
MW	Mittelwert
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
n.s.	nicht signifikant
OPG	Osteoprotegerin
OVX	Ovarektomie
p	Wahrscheinlichkeit
p.-a.	posterior-anterior
PFA	Paraformaldehyd
pg	Picogramm
PGE _{1/2}	Prostaglandin $\frac{1}{2}$
PMOP	postmenopausale Osteoporose
Pred	Prednisolon

QCT	quantitative Computertomographie
QUS	quantitativer Ultraschall
RANKL	Rezeptoraktivator des nukleären Faktors NF κ B Ligand
ROI	Region of Interest
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
SFB/TR 79	Sonderforschungsbereich/Transregio 79
SMI	Structure Model Index
SOST	Sclerostin
Std	Stunden
Tb.N	Trabecular Number
Tb.Pf	Trabecular Pattern Factor
Tb.Sp	Trabecular Separation
Tb.Th	Trabecular Thickness
TGF- β	Transforming Growth Factor
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VOI	Volume of Interest
vs.	versus
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
Wnt	Zusammensetzung aus Wg (=Wingless) und Int (Gen)

z.B. zum Beispiel

z.T. zum Teil

VII DARSTELLUNGS-, ABBILDUNGS-, TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Vergleichende Darstellung des Verlaufes des prozentualen Knochengehaltes im Laufe des Lebens unter physiologischen bzw. postmenopausal-osteoporotischen Verhältnissen.

Modifiziert nach Niethard F., Pfeil J., Duale Reihe Orthopädie, 5. Auflage.⁶

Abbildung 1.2: Geschlechtervergleichende Darstellung der alters-assoziierten Abnahme der gesamten Knochendichte, basierend auf Querschnitts- sowie Längsstudien mittels DXA-Messungen. Durchgezogene Linien zeigen den Verlauf der kortikalen Abnahme, die gestrichelten Linien demonstrieren die Veränderungen des trabekulären Gewebes.

Abbildung übernommen aus Pathophysiology of Age-Related Bone Loss and Osteoporosis, Khosla S und Riggs B L, Endocrinol Metab Clin N Am, 34 (2005) 1015–1030.³¹

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Probeneinteilung anhand eines Th10-Wirbelkörpers im coronaren Schnittbild.

Δz entspricht der Distanz zwischen der optisch definierten Grenze von Bodenplatte und Spongiosa und dem Probenbeginn. **VOI** stellt das für die Messungen relevante Probenvolumen dar.

Abbildung 3.1: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Strukturparameter BV/TV (relatives Knochenvolumen), Tb.N (Trabekelanzahl), Tb.Th (Trabekeldicke), Tb.Sp (intertrabekuläre Distanz), SMI (Structure Model Index), Tb.Pf (Trabecular Pattern Factor) und i.S (trabekuläre Schnittfläche) der Wirbelkörper Th10.

Die Darstellung zeigt Boxplots-Diagramme der Gruppen Kontrolle (0), *Sham* (weiß) und *OVX + Steroide* (grau) im Verlauf über 0, 1, 3, 12 und 14 Monate Studienlaufzeit. Zur Gruppe *Sham* gehören die Untergruppen 11 (1 Monat), 21 (3 Monate), 31 (12 Monate) und 41 (14 Monate). Der Gruppe *OVX + Steroide* werden die Untergruppen 12 (1 Monat), 22 (3 Monate), 32 (12 Monate) und 42 (14 Monate) zugeteilt.

Die für diese Arbeit relevanten Signifikanzangaben wurden aus Gründen der besseren Übersicht weggelassen und sind der Tabelle 3.1 bzw. dem Kapitel 1.1 zu entnehmen.

Abbildung 3.2: Vergleichende Darstellung axialer Schnittbilder der Wirbelkörper Th10. Mittels der hohen Auflösung des μ CTs kann die Mikroarchitektur der Kontroll-Gruppe mit 0 Monaten Beobachtung (A) sowie der Gruppen *Sham*, 11 (B) und *OVX + Steroide*, 12 (C) zum Zeitpunkt 1 Monat gegenübergestellt werden.

Abbildung 3.3: Vergleichende Darstellung axialer Schnittbilder der Wirbelkörper Th10. Mittels der hohen Auflösung des μ CTs kann die Mikroarchitektur der Kontroll-Gruppe mit 0 Monaten Beobachtung (A) sowie der Gruppen *Sham*, 11 (B) und *OVX + Steroide*, 12 (C) zum Zeitpunkt 3 Monate gegenübergestellt werden.

Abbildung 3.4: Vergleichende Darstellung axialer Schnittbilder der Wirbelkörper Th10. Mittels der hohen Auflösung des μ CTs kann die Mikroarchitektur der Kontroll-Gruppe mit 0 Monaten Beobachtung (A) sowie der Gruppen *Sham*, 11 (B) und *OVX + Steroide*, 12 (C) zum Zeitpunkt 12 Monate gegenübergestellt werden.

Abbildung 3.5: Vergleichende Darstellung axialer Schnittbilder der Wirbelkörper Th10. Mittels der hohen Auflösung des μ CTs kann die Mikroarchitektur der Kontroll-Gruppe mit 0 Monaten Beobachtung (A) sowie der Gruppen *Sham*, 11 (B) und *OVX + Steroide*, 12 (C) zum Zeitpunkt 14 Monate gegenübergestellt werden.

Abbildung 3.6: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Strukturparameter BV/TV (relatives Knochenvolumen), Tb.N (Trabekelanzahl), Tb.Th (Trabekeldicke), Tb.Sp (intertrabekuläre Distanz), SMI (Structural Model Index), Tb.Pf (Trabecular Pattern Factor) und i.S (trabekuläre Schnittfläche) der Tibiae.

Die Darstellung zeigt Boxplots-Diagramme der Gruppen Kontrolle (0), Sham (weiß) und OVX + Steroide (grau) im Verlauf über 0, 1, 3, 12 und 14 Monate Studienlaufzeit. Zur Gruppe *Sham* gehören die Untergruppen 11 (1 Monat), 21 (3 Monate), 31 (12 Monate) und 41 (14 Monate). Der Gruppe *OVX + Steroide* werden die Untergruppen 12 (1 Monat), 22 (3 Monate), 32 (12 Monate) und 42 (14 Monate) zugeteilt.

Die für diese Arbeit relevanten Signifikanzangaben wurden aus Gründen der besseren Übersicht weggelassen und sind der Tabelle 3.2 bzw. dem Kapitel 2.1 zu entnehmen.

Abbildung 3.7: Vergleichende Darstellung coronarer Schnittbilder der proximalen Tibia.

Die obere Reihe zeigt einzelne μ CT-Schnitte der Kontroll-Gruppe 0 (A) sowie der Gruppen *Sham* (B) und *OVX + Steroide* (C) zum Zeitpunkt von 1 Monat (11,12). In der unteren Reihe sind die Bereiche derselben Proben in einer Rekonstruktion aus ca. 50 bis 100 Schnitten dargestellt (a Kontroll-Gruppe, b *Sham*, c *OVX + Steroide*).

Abbildung 3.8: Vergleichende Darstellung coronarer Schnittbilder der proximalen Tibia.

Die obere Reihe zeigt einzelne μ CT-Schnitte der Kontroll-Gruppe 0 (A) sowie der Gruppen *Sham* (B) und *OVX + Steroide* (C) zum Zeitpunkt von 3 Monaten (11,12). In der unteren Reihe sind die Bereiche derselben Proben in einer Rekonstruktion aus ca. 50 bis 100 Schnitten dargestellt (a Kontroll-Gruppe, b *Sham*, c *OVX + Steroide*).

Abbildung 3.9: Vergleichende Darstellung coronarer Schnittbilder der proximalen Tibia.

Die obere Reihe zeigt einzelne μ CT-Schnitte der Kontroll-Gruppe 0 (A) sowie der Gruppen *Sham* (B) und *OVX + Steroide* (C) zum Zeitpunkt von 12 Monaten (11,12). In der unteren Reihe sind die Bereiche derselben Proben in einer Rekonstruktion aus ca. 50 bis 100 Schnitten dargestellt (a Kontroll-Gruppe, b *Sham*, c *OVX + Steroide*).

Abbildung 3.10: Vergleichende Darstellung coronarer Schnittbilder der proximalen Tibia.

Die obere Reihe zeigt einzelne μ CT-Schnitte der Kontroll-Gruppe 0 (A) sowie der Gruppen *Sham* (B) und *OVX + Steroide* (C) zum Zeitpunkt von 14 Monaten (11,12). In der unteren Reihe sind die Bereiche derselben Proben in einer Rekonstruktion aus ca. 50 bis 100 Schnitten dargestellt (a Kontroll-Gruppe, b *Sham*, c *OVX + Steroide*).

Abbildung 3.11: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Spongiosalänge.

Das Boxplots-Diagramm zeigt Kontrolle (0), *Sham* (weiß) und *OVX + Steroide* (grau) im Verlauf über 0, 1 (11, 12), 3 (21, 22), 12 (31, 32) und 14 (41, 42) Monate.

Tabelle 1.1: Einteilung des Schweregrades bei Knochendichteverlust

Tabelle 1.2: Vergleichende Darstellung wichtiger Unterschiede zwischen μ CT und Spiral-CT. Modifiziert nach Engelke et al.¹⁶⁰

Tabelle 2.1: Gruppenverteilung in der Übersicht

Tabelle 2.2: Vergleichende Darstellung der für diese Studie relevanten Eckdaten der Mikro-Computertomographen micro-CT_1072 und micro-CT_1173, SkyScan® (Kontich, Belgien) in der Übersicht^{162,163}

Tabelle 3.1: Zusammenstellung der Ergebnisse aus der statistischen Auswertung für die Wirbelkörper Th10.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (MW \pm SD) für den jeweiligen Strukturparameter. Die Einteilung erfolgte nach Monaten (0, 1, 3, 12 und 14 Monate) und Untergruppen in *Sham* bzw. *OVX + Steroide*: 0 Monate (0); 1 Monat *Sham* (11), 1 Monat *OVX + Steroide* (12); 3 Monate *Sham* (21), 3 Monate *OVX + Steroide* (22); 12 Monate *Sham* (31), 12 Monate *OVX + Steroide* (32); 14 Monate *Sham* (41), 14 Monate *OVX + Steroide* (42). Signifikanzangaben zum zeitlichen Verlauf zwischen aufeinanderfolgenden Untergruppen sind kursiv gedruckt. Vergleiche innerhalb der Monate zwischen den Untergruppen und Angaben der Signifikanzen haben die Markierung “]”. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

Tabelle 3.2: Zusammenstellung der Ergebnisse aus der statistischen Auswertung für die Tibiae.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (MW \pm SD) für den jeweiligen Strukturparameter. Die Einteilung erfolgte nach Monaten (0, 1, 3, 12 und 14 Monate) und Untergruppen in *Sham* bzw. *OVX + Steroide*: 0 Monate (0); 1 Monat *Sham* (11), 1 Monat *OVX + Steroide* (12); 3 Monate *Sham* (21), 3 Monate *OVX + Steroide* (22); 12 Monate *Sham* (31), 12 Monate *OVX + Steroide* (32); 14 Monate *Sham* (41), 14 Monate *OVX + Steroide* (42). Signifikanzangaben zum zeitlichen Verlauf zwischen aufeinanderfolgenden Untergruppen sind kursiv gedruckt. Vergleiche innerhalb der Monate zwischen den Untergruppen und Angaben der Signifikanzen haben die Markierung “]”. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

Tabelle 3.3: Zusammenstellung der Ergebnisse aus der statistischen Auswertung für die Spongiosalänge.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (MW \pm SD) für die trabekuläre Ausdehnung in mm. Die Einteilung erfolgte nach Monaten (0, 1, 3, 12 und 14 Monate) und Untergruppen in *Sham* bzw. *OVX + Steroide*: 0 Monate (0); 1 Monat *Sham* (11), 1 Monat *OVX + Steroide* (12); 3 Monate *Sham* (21), 3 Monate *OVX + Steroide* (22); 12 Monate *Sham* (31), 12 Monate *OVX + Steroide* (32); 14 Monate *Sham* (41), 14 Monate *OVX + Steroide* (42). Signifikanzangaben zum zeitlichen Verlauf zwischen aufeinanderfolgenden Untergruppen sind kursiv gedruckt. Vergleiche innerhalb der Monate zwischen den Untergruppen und Angaben der Signifikanzen haben die Markierung “j”. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

1. Statistisches Bundesamt Wiesbaden, Gruppe ID Pressestelle, Gruppe VIA „Demografische Modellrechnungen“. Bevölkerung Deutschlands bis 2060, 12. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung, Begleitmaterial zur Pressekonferenz am 18. November 2009 in Berlin. 2009.
2. Nöthen M, Böhm K. *Krankheitskosten. Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. Berlin: Robert-Koch-Institut in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt; 2009:34. Available at: http://www.rki.de/EN/Content/Health_Monitoring/Health_Reporting/GBEDownloadsT/Krankheitskosten.pdf?__blob=publicationFile.
3. John A. Kanis and the WHO Study Group. Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis: Synopsis of a WHO Report. *Osteoporosis International*. 1994;4:368–381. Available at: <http://www.springerlink.com/content/u238j53112145627/fulltext.pdf?MUD=MP>.
4. Dachverband Osteologie e.V. DVO Leitlinie Osteoporose 2009. 2009. Available at: http://www.dv-osteologie.org/dvo_leitlinien/dvo-leitlinie-2009.
5. Consensus development conference: prophylaxis and treatment of osteoporosis. *The American Journal of Medicine*. 1991;90:107–110. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000293439190512V>. Accessed February 27, 2013.
6. Fritz U, Niethard, Joachim Pfeil. Osteopathien mit verminderter Knochendichte (Osteopenien). In: *Duale Reihe Orthopädie*. 5. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2005:156–165.
7. Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltav N. The diagnosis of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1994;9(8):1137–1141. doi:10.1002/jbmr.5650090802.
8. Hadji P, Klein S, Gothe H, et al. The Epidemiology of Osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST). *Dtsch Arztebl Int*. 2013;110(4):52–57. doi:10.3238/arztebl.2013.0052.
9. Robert Koch-Institut. *Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie "Gesundheit in Deutschland aktuell 2010". Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. Berlin: Robert Koch-Institut; 2012:188. Available at: http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/GEDA2010.pdf?__blob=publicationFile.
10. Kanis J., Johnell O, Oden A, Jonsson B, De Laet C, Dawson A. Risk of hip fracture according to the World Health Organization criteria for osteopenia and osteoporosis. *Bone*. 2000;27(5):585–590. doi:10.1016/S8756-3282(00)00381-1.
11. Meisinger C, Wildner M, Stieber J, Heier M, Sangha O, Döring A. Epidemiologie der Extremitätenfrakturen. *Orthopäde*. 2002;31(1):92–99. doi:10.1007/s132-002-8281-x.
12. Scheidt-Nave DC, Starker A. Osteoporoseprävalenz und assoziierte Versorgungsmuster bei Frauen im Alter ab 45 Jahren in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl* -

- Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*. 2005;48(12):1338–1347. doi:10.1007/s00103-005-1166-7.
13. World Health Organization. *WHO scientific group on the assessment of osteoporosis at primary health care level: summary meeting report*. Brüssel, Belgien; 2007:1–17. Available at: <http://www.who.int/chp/topics/Osteoporosis.pdf>.
 14. Kanis JA, Burlet N, Cooper C, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2008;19(4):399–428. doi:10.1007/s00198-008-0560-z.
 15. Looker AC, Orwoll ES, Johnston CC, et al. Prevalence of Low Femoral Bone Density in Older U.S. Adults from NHANES III. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1997;12(11):1761–1768. doi:10.1359/jbmr.1997.12.11.1761.
 16. Kanis JA, Glüer C-C. An Update on the Diagnosis and Assessment of Osteoporosis with Densitometry. *Osteoporos Int*. 2000;11(3):192–202. doi:10.1007/s001980050281.
 17. John A Kanis, World Health Organization Scientific Group. *Assessment of osteoporosis at the primary health-care level, Technical Report*. World Health Organization Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases, University of Sheffield, UK; 2007:339. Available at: http://www.shef.ac.uk/FRAX/pdfs/WHO_Technical_Report.pdf. Accessed February 17, 2013.
 18. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral*. 1991;15(3):175–191. doi:10.1016/0169-6009(91)90124-I.
 19. Raisz LG. . Overview of Pathogenesis. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 2009:203–206. doi:10.1002/9780470623992.ch39.
 20. Heaney RP, Abrams S, Dawson-Hughes B, et al. Peak bone mass. *Osteoporos Int*. 2000;11(12):985–1009.
 21. Ralston SH. Genetics of osteoporosis. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2007;66(02):158–165. doi:10.1017/S002966510700540X.
 22. Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, et al. A Mutation in the LDL Receptor-Related Protein 5 Gene Results in the Autosomal Dominant High-Bone-Mass Trait. *Am J Hum Genet*. 2002;70(1):11–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC419982/>. Accessed March 18, 2013.
 23. Richards JB, Kavvoura FK, Rivadeneira F, et al. Collaborative Meta-analysis: Associations of 150 Candidate Genes With Osteoporosis and Osteoporotic Fracture. *Ann Intern Med*. 2009;151(8):528–537. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2842981/>. Accessed March 18, 2013.
 24. Seeman E. From Density to Structure: Growing Up and Growing Old on the Surfaces of Bone. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1997;12(4):509–521. doi:10.1359/jbmr.1997.12.4.509.
 25. Kiel DP, Rosen CJ, Dempster D. .Age-Related Bone Loss. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 2009:98–102.

26. Melsen F, Melsen B, Mosekilde L, Bergmann S. Histomorphometric Analysis of Normal Bone From the Iliac Crest. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section A Pathology*. 1978;86A(1-6):70–81. doi:10.1111/j.1699-0463.1978.tb02014.x.
27. Aaron JE, Makins NB, Sagreiya K. The microanatomy of trabecular bone loss in normal aging men and women. *Clin Orthop Relat Res*. 1987;(215):260–271.
28. Khosla S, Riggs BL, Atkinson EJ, et al. Effects of Sex and Age on Bone Microstructure at the Ultradistal Radius: A Population-Based Noninvasive In Vivo Assessment. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2006;21(1):124–131. doi:10.1359/JBMR.050916.
29. McCalden RW, McGeough JA, Barker MB, Court-Brown CM. Age-related changes in the tensile properties of cortical bone. The relative importance of changes in porosity, mineralization, and microstructure. *J Bone Joint Surg Am*. 1993;75(8):1193–1205.
30. Welsch U. *Sobotta Lehrbuch Histologie*. 2nd ed. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2005.
31. Khosla S, Riggs BL. Pathophysiology of Age-Related Bone Loss and Osteoporosis. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2005;34(4):1015–1030. doi:10.1016/j.ecl.2005.07.009.
32. Tsuboyama T, Takahashi K, Matsushita M, et al. Decreased endosteal formation during cortical bone modelling in SAM-P/6 mice with a low peak bone mass. *Bone Miner*. 1989;7(1):1–12.
33. Keshawarz NM, Recker RR. Expansion of the medullary cavity at the expense of cortex in postmenopausal osteoporosis. *Metabolic Bone Disease and Related Research*. 1984;5(5):223–228. doi:10.1016/0221-8747(84)90063-8.
34. Ruff CB, Hayes WC. Sex differences in age-related remodeling of the femur and tibia. *J Orthop Res*. 1988;6(6):886–896. doi:10.1002/jor.1100060613.
35. Frost HM. On the Estrogen–Bone Relationship and Postmenopausal Bone Loss: A New Model. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1999;14(9):1473–1477. doi:10.1359/jbmr.1999.14.9.1473.
36. Gourion-Arsiquaud S, Allen MR, Burr DB, Vashishth D, Tang SY, Boskey AL. Bisphosphonate Treatment Modifies Canine Bone Mineral and Matrix Properties and their Heterogeneity. *Bone*. 2010;46(3):666–672. doi:10.1016/j.bone.2009.11.011.
37. Rozman C, Feliu E, Berga L, Reverter JC, Climent C, Ferrán MJ. Age-related variations of fat tissue fraction in normal human bone marrow depend both on size and number of adipocytes: a stereological study. *Exp Hematol*. 1989;17(1):34–37.
38. Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J Clin Invest*. 1983;72(4):1396–1409. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC370424/>. Accessed March 16, 2013.
39. Weinstein RS, Hutson MS. Decreased trabecular width and increased trabecular spacing contribute to bone loss with aging. *Bone*. 1987;8(3):137–142.

40. Bergot C, Laval-Jeantet AM, Prêteux F, Meunier A. Measurement of anisotropic vertebral trabecular bone loss during aging by quantitative image analysis. *Calcif Tissue Int.* 1988;43(3):143–149.
41. Eriksen EF, Langdahl B, Vesterby A, Rungby J, Kassem M. Hormone Replacement Therapy Prevents Osteoclastic Hyperactivity: A Histomorphometric Study in Early Postmenopausal Women. *Journal of Bone and Mineral Research.* 1999;14(7):1217–1221. doi:10.1359/jbmr.1999.14.7.1217.
42. Silva MJ, Gibson LJ. Modeling the mechanical behavior of vertebral trabecular bone: Effects of age-related changes in microstructure. *Bone.* 1997;21(2):191–199. doi:10.1016/S8756-3282(97)00100-2.
43. Drake MT, Khosla S. Role of Sex Steroids in the Pathogenesis of Osteoporosis. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* 2009:208–213. doi:10.1002/9780470623992.ch41.
44. Khosla S, Atkinson EJ, Melton LJ, Riggs BL. Effects of Age and Estrogen Status on Serum Parathyroid Hormone Levels and Biochemical Markers of Bone Turnover in Women: A Population-Based Study. *JCEM.* 1997;82(5):1522–1527. doi:10.1210/jc.82.5.1522.
45. Sarah Gruber. *Gynäkologie und Geburtshilfe.* 2. ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2007.
46. Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ, O’Fallon WM, Eastell R, Khosla S. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *J Clin Invest.* 2000;106(12):1553–1560. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC381474/>. Accessed March 17, 2013.
47. Wolfgang Wuttke. Reproduktion. In: *Physiologie des Menschen.* Vol 22. 30. ed. Heidelberg: Springer; 2007:503–520.
48. Lang F, Murer H. Kalzium- und Phosphathaushalt. In: *Physiologie des Menschen.* Vol 31. 30. ed. Heidelberg: Springer; 2007:740–752.
49. Chow J, Tobias JH, Colston KW, Chambers TJ. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *J Clin Invest.* 1992;89(1):74–78. doi:10.1172/JCI115588.
50. McKane WR, Khosla S, Burritt MF, et al. Mechanism of renal calcium conservation with estrogen replacement therapy in women in early postmenopause—a clinical research center study. *JCEM.* 1995;80(12):3458–3464. doi:10.1210/jc.80.12.3458.
51. Ernst M, Heath JK, Rodan GA. Estradiol Effects on Proliferation, Messenger Ribonucleic Acid for Collagen and Insulin-like Growth Factor-I, and Parathyroid Hormone-Stimulated Adenylate Cyclase Activity in Osteoblastic Cells from Calvariae and Long Bones. *Endocrinology.* 1989;125(2):825–833. doi:10.1210/endo-125-2-825.
52. Oursler MJ, Cortese C, Keeting P, et al. Modulation of Transforming Growth Factor- β Production in Normal Human Osteoblast-Like Cells by 17 β -Estradiol and Parathyroid Hormone. *Endocrinology.* 1991;129(6):3313–3320. doi:10.1210/endo-129-6-3313.

53. Qu Q, Perälä-Heape M, Kapanen A, et al. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone*. 1998;22(3):201–209. doi:10.1016/S8756-3282(97)00276-7.
54. Manolagas SC. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocrine Reviews*. 2000;21(2):115–137. doi:10.1210/er.21.2.115.
55. Gohel A, McCarthy M-B, Gronowicz G. Estrogen Prevents Glucocorticoid-Induced Apoptosis in Osteoblasts in Vivo and in Vitro. *Endocrinology*. 1999;140(11):5339–5347. doi:10.1210/en.140.11.5339.
56. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, et al. Estrogen Prevents Bone Loss via Estrogen Receptor α and Induction of Fas Ligand in Osteoclasts. *Cell*. 2007;130(5):811–823. doi:10.1016/j.cell.2007.07.025.
57. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med*. 1996;2(10):1132–1136.
58. Pacifici R, Brown C, Puscheck E, et al. Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(12):5134–5138. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC51826/>. Accessed March 22, 2013.
59. Ralston SH, Russell RG, Gowen M. Estrogen inhibits release of tumor necrosis factor from peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 1990;5(9):983–988. doi:10.1002/jbmr.5650050912.
60. Kawaguchi H, Pilbeam CC, Vargas SJ, Morse EE, Lorenzo JA, Raisz LG. Ovariectomy enhances and estrogen replacement inhibits the activity of bone marrow factors that stimulate prostaglandin production in cultured mouse calvariae. *J Clin Invest*. 1995;96(1):539–548. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC185228/>. Accessed March 22, 2013.
61. Kimble RB, Srivastava S, Ross FP, Matayoshi A, Pacifici R. Estrogen Deficiency Increases the Ability of Stromal Cells to Support Murine Osteoclastogenesis via an Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor-mediated Stimulation of Macrophage Colony-stimulating Factor Production. *J Biol Chem*. 1996;271(46):28890–28897. doi:10.1074/jbc.271.46.28890.
62. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, et al. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*. 1992;257(5066):88–91.
63. Girasole G, Jilka RL, Passeri G, et al. 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest*. 1992;89(3):883–891. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC442934/>. Accessed March 22, 2013.
64. Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, et al. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest*. 1993;91(1):257–263. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC330022/>. Accessed March 22, 2013.

65. Ralston SH, Uitterlinden AG. Genetics of Osteoporosis. *Endocrine Reviews*. 2010;31(5):629–662. doi:10.1210/er.2009-0044.
66. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(Suppl 1):S1. doi:10.1186/ar2165.
67. Taxel P, Kaneko H, Lee S-K, Aguila HL, Raisz LG, Lorenzo JA. Estradiol rapidly inhibits osteoclastogenesis and RANKL expression in bone marrow cultures in postmenopausal women: a pilot study. *Osteoporos Int*. 2008;19(2):193–199. doi:10.1007/s00198-007-0452-7.
68. Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Pacifici R. Estrogen Decreases Osteoclast Formation by Down-regulating Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL)-induced JNK Activation. *J Biol Chem*. 2001;276(12):8836–8840. doi:10.1074/jbc.M010764200.
69. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest*. 2003;111(8):1221–1230. doi:10.1172/JCI200317215.
70. Khosla S, Atkinson EJ, Dunstan CR, O’Fallon WM. Effect of Estrogen versus Testosterone on Circulating Osteoprotegerin and Other Cytokine Levels in Normal Elderly Men. *JCEM*. 2002;87(4):1550–1554. doi:10.1210/jc.87.4.1550.
71. Simonet W., Lacey D., Dunstan C., et al. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell*. 1997;89(2):309–319. doi:10.1016/S0092-8674(00)80209-3.
72. Glass II DA, Bialek P, Ahn JD, et al. Canonical Wnt Signaling in Differentiated Osteoblasts Controls Osteoclast Differentiation. *Developmental Cell*. 2005;8(5):751–764. doi:10.1016/j.devcel.2005.02.017.
73. 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):5866–5875. doi:10.1074/jbc.M705092200.
74. Kim JH, Liu X, Wang J, et al. Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2013;5(1):13–31. doi:10.1177/1759720X12466608.
75. Stykarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, et al. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat Genet*. 2009;41(1):15–17. doi:10.1038/ng.284.
76. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997;390(6656):175–179. doi:10.1038/36593.
77. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen Stimulates Gene Expression and Protein Production of Osteoprotegerin in Human Osteoblastic Cells*. *Endocrinology*. 1999;140(9):4367–4370. doi:10.1210/en.140.9.4367.

78. Sandhu SK, Hampson G. The pathogenesis, diagnosis, investigation and management of osteoporosis. *J Clin Pathol*. 2011;64(12):1042–1050. doi:10.1136/jcp.2010.077842.
79. Chan GK, Duque G. Age-related bone loss: old bone, new facts. *Gerontology*. 2002;48(2):62–71. doi:48929.
80. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *Journal of Clinical Investigation*. 1999;104(4):439–446. doi:10.1172/JCI6610.
81. Frost HM. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res*. 1969;3(3):211–237.
82. Štěpán JJ, Pospíchal J, Presl J, Pacovský V. Bone loss and biochemical indices of bone remodeling in surgically induced postmenopausal women. *Bone*. 1987;8(5):279–284. doi:10.1016/8756-3282(87)90002-0.
83. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy M-C, Delmas PD. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1996;11(3):337–349. doi:10.1002/jbmr.5650110307.
84. Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J. The Use of Biochemical Markers of Bone Turnover in Osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2000;11(6):S2–S17. doi:10.1007/s001980070002.
85. Bono CM, Einhorn TA. Overview of osteoporosis: pathophysiology and determinants of bone strength. *Eur Spine J*. 2003;12(Suppl 2):S90–S96. doi:10.1007/s00586-003-0603-2.
86. Mosekilde L. Age-related changes in vertebral trabecular bone architecture--assessed by a new method. *Bone*. 1988;9(4):247–250.
87. M.d TAE. Bone strength: The bottom line. *Calcif Tissue Int*. 1992;51(5):333–339. doi:10.1007/BF00316875.
88. Kanis JA, Johnell O, Oden A, et al. Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmö. *Osteoporos Int*. 2000;11(8):669–674.
89. Cooper C, Melton III LJ. Epidemiology of osteoporosis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 1992;3(6):224–229. doi:10.1016/1043-2760(92)90032-V.
90. Cooper C, Atkinson EJ, Jacobsen SJ, O’Fallon WM, Melton LJ. Population-Based Study of Survival after Osteoporotic Fractures. *Am J Epidemiol*. 1993;137(9):1001–1005. Available at: <http://aje.oxfordjournals.org/content/137/9/1001>. Accessed February 28, 2013.
91. Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet*. 2002;359(9319):1761–1767. doi:10.1016/S0140-6736(02)08657-9.
92. Baron JA, Karagas M, Barrett J, et al. Basic epidemiology of fractures of the upper and lower limb among Americans over 65 years of age. *Epidemiology*. 1996;7(6):612–618.

93. Seeley DG, Browner WS, Nevitt MC, Genant HK, Scott JC, Cummings SR. Which Fractures Are Associated with Low Appendicular Bone Mass in Elderly Women? *Ann Intern Med.* 1991;115(11):837–842. doi:10.7326/0003-4819-115-11-837.
94. Cummings SR, Browner WS, Bauer D, et al. Endogenous hormones and the risk of hip and vertebral fractures among older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med.* 1998;339(11):733–738. doi:10.1056/NEJM199809103391104.
95. Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ.* 1996;312(7041):1254–1259. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2351094/>. Accessed March 1, 2013.
96. Kanis JA, Black D, Cooper C, et al. A new approach to the development of assessment guidelines for osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2002;13(7):527–536. doi:10.1007/s001980200069.
97. Hui SL, Slemenda CW, Johnston CC. Age and bone mass as predictors of fracture in a prospective study. *J Clin Invest.* 1988;81(6):1804–1809. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC442628/>. Accessed April 1, 2013.
98. Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, et al. Risk Factors for Hip Fracture in White Women. *New England Journal of Medicine.* 1995;332(12):767–774. doi:10.1056/NEJM199503233321202.
99. Frost HM. On Our Age-Related Bone Loss: Insights from a New Paradigm. *Journal of Bone and Mineral Research.* 1997;12(10):1539–1546. doi:10.1359/jbmr.1997.12.10.1539.
100. De Laet C, Kanis JA, Odén A, et al. Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2005;16(11):1330–1338. doi:10.1007/s00198-005-1863-y.
101. Kanis JA, Johansson H, Johnell O, et al. Alcohol intake as a risk factor for fracture. *Osteoporos Int.* 2005;16(7):737–742. doi:10.1007/s00198-004-1734-y.
102. Kanis JA, Johnell O, Oden A, et al. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2005;16(2):155–162. doi:10.1007/s00198-004-1640-3.
103. Klotzbuecher CM, Ross PD, Landsman PB, Abbott TA 3rd, Berger M. Patients with prior fractures have an increased risk of future fractures: a summary of the literature and statistical synthesis. *J Bone Miner Res.* 2000;15(4):721–739. doi:10.1359/jbmr.2000.15.4.721.
104. Kanis JA, Johansson H, Oden A, et al. A family history of fracture and fracture risk: a meta-analysis. *Bone.* 2004;35(5):1029–1037. doi:10.1016/j.bone.2004.06.017.
105. Kanis JA, Johansson H, Oden A, et al. A Meta-Analysis of Prior Corticosteroid Use and Fracture Risk. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2004;19(6):893–899. doi:10.1359/JBMR.040134.

106. Staa TP van, Staa TP van, Staa TP van, Leufkens HGM, Cooper C. The Epidemiology of Corticosteroid-Induced Osteoporosis: a Meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2002;13(10):777–787. doi:10.1007/s001980200108.
107. Thomas Herdegen. *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. Stu: Georg Thieme Verlag; 2008.
108. Adinoff AD, Hollister JR. Steroid-induced fractures and bone loss in patients with asthma. *N Engl J Med.* 1983;309(5):265–268. doi:10.1056/NEJM198308043090502.
109. Staa TP van, Leufkens HGM, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C. Oral corticosteroids and fracture risk: relationship to daily and cumulative doses. *Rheumatology.* 2000;39(12):1383–1389. doi:10.1093/rheumatology/39.12.1383.
110. LoCascio V, Bonucci E, Imbimbo B, et al. Bone loss in response to long-term glucocorticoid therapy. *Bone Miner.* 1990;8(1):39–51.
111. Grossman JM, Gordon R, Ranganath VK, et al. American College of Rheumatology 2010 recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Arthritis Care & Research.* 2010;62(11):1515–1526. doi:10.1002/acr.20295.
112. Laan RFJM, van Riel PLCM, van de Putte LBA, van Erning LJTO, van't Hof MA, Lemmens JAM. Low-Dose Prednisone Induces Rapid Reversible Axial Bone Loss in Patients with Rheumatoid Arthritis A Randomized, Controlled Study. *Ann Intern Med.* 1993;119(10):963–968. doi:10.7326/0003-4819-119-10-199311150-00001.
113. Van Staa TP, Laan RF, Barton IP, Cohen S, Reid DM, Cooper C. Bone density threshold and other predictors of vertebral fracture in patients receiving oral glucocorticoid therapy. *Arthritis & Rheumatism.* 2003;48(11):3224–3229. doi:10.1002/art.11283.
114. Weinstein RS, Wan C, Liu Q, et al. Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis, vascularity, hydration, and strength in 21-month-old mice. *Aging Cell.* 2010;9(2):147–161. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00545.x.
115. O'Brien CA, Jia D, Plotkin LI, et al. Glucocorticoids Act Directly on Osteoblasts and Osteocytes to Induce Their Apoptosis and Reduce Bone Formation and Strength. *Endocrinology.* 2004;145(4):1835–1841. doi:10.1210/en.2003-0990.
116. Liu Y, Porta A, Peng X, et al. Prevention of Glucocorticoid-Induced Apoptosis in Osteocytes and Osteoblasts by Calbindin-D28k. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2004;19(3):479–490. doi:10.1359/JBMR.0301242.
117. Manolagas SC. Corticosteroids and Fractures: A Close Encounter of the Third Cell Kind. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2000;15(6):1001–1005. doi:10.1359/jbmr.2000.15.6.1001.
118. Yun S-I, Yoon H-Y, Jeong S-Y, Chung Y-S. Glucocorticoid induces apoptosis of osteoblast cells through the activation of glycogen synthase kinase 3beta. *J Bone Miner Metab.* 2009;27(2):140–148. doi:10.1007/s00774-008-0019-5.

119. Pereira RC, Delany AM, Canalis E. Effects of cortisol and bone morphogenetic protein-2 on stromal cell differentiation: correlation with CCAAT-enhancer binding protein expression. *Bone*. 2002;30(5):685–691. doi:10.1016/S8756-3282(02)00687-7.
120. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest*. 1998;102(2):274–282. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC508885/>. Accessed March 26, 2013.
121. Jia D, O'Brien CA, Stewart SA, Manolagas SC, Weinstein RS. Glucocorticoids Act Directly on Osteoclasts to Increase Their Life Span and Reduce Bone Density. *Endocrinology*. 2006;147(12):5592–5599. doi:10.1210/en.2006-0459.
122. Canalis E, Bilezikian JP, Angeli A, Giustina A. Perspectives on glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone*. 2004;34(4):593–598. doi:10.1016/j.bone.2003.11.026.
123. Weinstein RS, Chen J-R, Powers CC, et al. Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest*. 2002;109(8):1041–1048. doi:10.1172/JCI0214538.
124. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, et al. Stimulation of Osteoprotegerin Ligand and Inhibition of Osteoprotegerin Production by Glucocorticoids in Human Osteoblastic Lineage Cells: Potential Paracrine Mechanisms of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *Endocrinology*. 1999;140(10):4382–4389. doi:10.1210/en.140.10.4382.
125. Kim H-J, Zhao H, Kitaura H, et al. Dexamethasone suppresses bone formation via the osteoclast. *Adv Exp Med Biol*. 2007;602:43–46.
126. Cooper MS, Rabbitt EH, Goddard PE, Bartlett WA, Hewison M, Stewart PM. Osteoblastic 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Activity Increases With Age and Glucocorticoid Exposure. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2002;17(6):979–986. doi:10.1359/jbmr.2002.17.6.979.
127. Liu X, Lei W, Wu Z, et al. Effects of glucocorticoid on BMD, micro-architecture and biomechanics of cancellous and cortical bone mass in OVX rabbits. *Medical Engineering & Physics*. 2012;34(1):2–8. doi:10.1016/j.medengphy.2011.06.010.
128. Angeli A, Guglielmi G, Dovio A, et al. High prevalence of asymptomatic vertebral fractures in post-menopausal women receiving chronic glucocorticoid therapy: A cross-sectional outpatient study. *Bone*. 2006;39(2):253–259. doi:10.1016/j.bone.2006.02.005.
129. Chappard D, Legrand E, Basle MF, et al. Altered trabecular architecture induced by corticosteroids: a bone histomorphometric study. *J Bone Miner Res*. 1996;11(5):676–685. doi:10.1002/jbmr.5650110516.
130. Aaron JE, Francis RM, Peacock M, Makins NB. Contrasting microanatomy of idiopathic and corticosteroid-induced osteoporosis. *Clin Orthop Relat Res*. 1989;(243):294–305.
131. Lill CA, 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):407–414. doi:10.1007/s001980200047.

132. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. *Comp Med*. 2008;58(5):424–430. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2707131/>. Accessed February 18, 2013.
133. Gadeleta S., Boskey A., Paschalis E, et al. A physical, chemical, and mechanical study of lumbar vertebrae from normal, ovariectomized, and nandrolone decanoate-treated cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*). *Bone*. 2000;27(4):541–550. doi:10.1016/S8756-3282(00)00362-8.
134. Turner AS. The Sheep as a Model for Osteoporosis in Humans. *The Veterinary Journal*. 2002;163(3):232–239. doi:10.1053/tvj.2001.0642.
135. Ammann P, Rizzoli R, Bonjour JP, et al. Transgenic mice expressing soluble tumor necrosis factor-receptor are protected against bone loss caused by estrogen deficiency. *J Clin Invest*. 1997;99(7):1699–1703. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC507990/>. Accessed March 22, 2013.
136. Kinney JH, Haupt DL, Balooch M, Ladd AJC, Ryaby JT, Lane NE. Three-Dimensional Morphometry of the L6 Vertebra in the Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis: Biomechanical Implications. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2000;15(10):1981–1991. doi:10.1359/jbmr.2000.15.10.1981.
137. Alt V, Thormann U, Ray S, et al. A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures. *Acta Biomaterialia*. doi:10.1016/j.actbio.2013.02.002.
138. Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA. Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 1985;37(3):324–328. doi:10.1007/BF02554882.
139. Wronski TJ, Cintron M, Doherty AL, Dann LM. Estrogen Treatment Prevents Osteopenia and Depresses Bone Turnover in Ovariectomized Rats. *Endocrinology*. 1988;123(2):681–686. doi:10.1210/endo-123-2-681.
140. Saville PD. Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rat; a model of osteoporosis. *J Am Geriatr Soc*. 1969;17(2):155–166.
141. Frost HM, Jee WSS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone and Mineral*. 1992;18(3):227–236. doi:10.1016/0169-6009(92)90809-R.
142. Jee WS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2001;1(3):193–207.
143. Francisco JI, Yu Y, Oliver RA, Walsh WR. Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. *Journal of Orthopaedic Research*. 2011;29(2):189–196. doi:10.1002/jor.21217.
144. Bourrin S, Ammann P, Bonjour J., Rizzoli R. Recovery of proximal tibia bone mineral density and strength, but not cancellous bone architecture, after long-term bisphosphonate or selective estrogen receptor modulator therapy in aged rats. *Bone*. 2002;30(1):195–200. doi:10.1016/S8756-3282(01)00661-5.
145. Shen V, Birchman R, Liang XG, Wu DD, Lindsay R, Dempster DW. Prednisolone alone, or in combination with estrogen or dietary calcium deficiency or immobilization, inhibits

- bone formation but does not induce bone loss in mature rats. *Bone*. 1997;21(4):345–351. doi:10.1016/S8756-3282(97)00153-1.
146. Stuermer EK, Sehmisch S, Rack T, et al. Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in the early phase of osteoporosis. A new fracture-healing model at the tibia in rat. *Langenbecks Arch Surg*. 2010;395(2):163–172. doi:10.1007/s00423-008-0436-x.
147. Turner RT, Maran A, Lotinun S, et al. Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001;2(1):117–127.
148. Erben RG. Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: Modeling or remodeling? *The Anatomical Record*. 1996;246(1):39–46. doi:10.1002/(SICI)1097-0185(199609)246:1<39::AID-AR5>3.0.CO;2-A.
149. Inada M, Matsumoto C, Miyaura C. [Animal models for bone and joint disease. Ovariectomized and orchidectomized animals]. *Clin Calcium*. 2011;21(2):164–170. doi:CliCa1102164170.
150. Manolagas SC, Weinstein RS. New Developments in the Pathogenesis and Treatment of Steroid-Induced Osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1999;14(7):1061–1066. doi:10.1359/jbmr.1999.14.7.1061.
151. Nitta T, Fukushima T, Nakamuta H, Koida M. Glucocorticoid-Induced Secondary Osteopenia in Female Rats: A Time Course Study as Compared With Ovariectomy-Induced Osteopenia and Response to Salmon Calcitonin. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 1999;79(3):379–386.
152. Fukushima T, Nitta T, Furuichi H, et al. Bone Anabolic Effects of PTH(1-34) and Salmon Calcitonin in Ovariectomy- and Ovariectomy-Steroid-Induced Osteopenic Rats: A Histomorphometric and Biomechanical Study. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 2000;82(3):240–246. doi:10887955.
153. Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *The Lancet*. 2002;359(9321):1929–1936. doi:10.1016/S0140-6736(02)08761-5.
154. Felsenberg D, Glüer C. Bildgebende Verfahren, Knochendichtemessung und quantitativer Ultraschall. *Aktuelle Rheumatologie*. 2001;26(3):106–114. doi:10.1055/s-2001-16299.
155. Felsenberg D, Gowin W. Knochendichtemessung mit Zwei-Spektren-Methoden. *Radiologe*. 1999;39(3):186–193. doi:10.1007/s001170050495.
156. ACSM. *ACSM's Resource Manual for Guidelines for Exercise Testing and Prescription*. Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
157. Ritman EL. Micro-Computed Tomography—Current Status and Developments. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2004;6(1):185–208. doi:10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140130.
158. Sato T, Ikeda O, Yamakoshi Y, Tsubouchi M. X-ray tomography for microstructural objects. *Appl Opt*. 1981;20(22):3880–3883. doi:10.1364/AO.20.003880.

159. Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW. Practical cone-beam algorithm. *J Opt Soc Am A*. 1984;1(6):612–619. doi:10.1364/JOSAA.1.000612.
160. Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W. Mikro-CT Technologie und Applikationen zur Erfassung von Knochenarchitektur. *Der Radiologe*. 1999;39(3):203–212.
161. Langheinrich AC, Bohle RM, Breithecker A, Lommel D, Rau WS. Mikro-Computertomographie von Blutgefäßen parenchymatöser Organe und von Lungenalveolen. *RöFo - Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren*. 2004;176(09):1219–1225. doi:10.1055/s-2004-813403.
162. Instruction Manual, SkyScan 1072, Desktop X-ray Microtomograph, Ver. 3 for 1072-scanners 4NT and 5NT. 1998.
163. SkyScan n.v. Belgium. SkyScan Brochure, X-Ray Microtomography, X-Ray Nanotomography, In-Vivo Small Animal Imaging, 2D / 3D Image Analysis. Available at: www.skyscan.be/products/downloads.htm.
164. Kohlbrenner A, Koller B, Hämmerle S, Rüeegsegger P. In Vivo Micro Tomography. In: Majumdar S, Bay BK, eds. *Noninvasive Assessment of Trabecular Bone Architecture and the Competence of Bone*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer US; 2001:213–224. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-0651-5_20. Accessed April 20, 2013.
165. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 1987;2(6):595–610. doi:10.1002/jbmr.5650020617.
166. Hildebrand T, Rüeegsegger P. A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *Journal of Microscopy*. 1997;185(1):67–75. doi:10.1046/j.1365-2818.1997.1340694.x.
167. Phil Salmon. Bruker microCT, Morphometric parameters measured by Skyscan™ CT-analyser software. 2010. Available at: <http://www.skyscan.be/next/CTAn03.pdf>.
168. Tamada T, Sone T, Jo Y, Imai S, Kajihara Y, Fukunaga M. Three-dimensional trabecular bone architecture of the lumbar spine in bone metastasis from prostate cancer: comparison with degenerative sclerosis. *Skeletal Radiol*. 2005;34(3):149–155. doi:10.1007/s00256-004-0855-x.
169. Ulrich D, van Rietbergen B, Laib A, Rüeegsegger P. The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. *Bone*. 1999;25(1):55–60. doi:10.1016/S8756-3282(99)00098-8.
170. Hildebrand T, Laib A, Müller R, Dequeker J, Rüeegsegger P. Direct Three-Dimensional Morphometric Analysis of Human Cancellous Bone: Microstructural Data from Spine, Femur, Iliac Crest, and Calcaneus. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1999;14(7):1167–1174. doi:10.1359/jbmr.1999.14.7.1167.
171. Singh I. The architecture of cancellous bone. *J Anat*. 1978;127(Pt 2):305–310. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1235771/>. Accessed April 17, 2013.

172. Hildebrand T, RüEgsegger P. Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*. 1997;1(1):15–23. doi:10.1080/01495739708936692.
173. Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, Delling G. Trabecular bone pattern factor--a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone*. 1992;13(4):327–330.
174. KG ASG& C. Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG. *Altromin Spezialfutter GmbH & Co KG*. 2009. Available at: http://www.altromin.de/de/public_html/leistungen/standard.html. Accessed February 20, 2013.
175. Rosenfeld A, Kak AC. Digital picture processing. Volumes 1 & 2//(Book). *New York, Academic Press, 1982*,. 1982. Available at: <http://www.csa.com/partners/viewrecord.php?requester=gs&collection=TRD&recid=A8337167AH>. Accessed March 15, 2013.
176. 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. doi:10.1002/jbmr.5650040103.
177. Lukas C, Ruffoni D, Lambers FM, et al. Mineralization kinetics in murine trabecular bone quantified by time-lapsed in vivo micro-computed tomography. *Bone*. 2013;56(1):55–60. doi:10.1016/j.bone.2013.05.005.
178. Wronski TJ, Dann LM, Horner SL. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone*. 1989;10(4):295–301. doi:10.1016/8756-3282(89)90067-7.
179. Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 1988;43(3):179–183. doi:10.1007/BF02571317.
180. LoCascio V, Bonucci E, Imbimbo B, et al. Bone loss in response to long-term glucocorticoid therapy. *Bone and Mineral*. 1990;8(1):39–51. doi:10.1016/0169-6009(91)90139-Q.
181. Iwamoto J, Seki A, Takeda T, et al. Preventive Effects of Risedronate and Calcitriol on Cancellous Osteopenia in Rats Treated with High-Dose Glucocorticoid. *Experimental Animals*. 2006;55(4):349–355.
182. Carbonare LD, Arlot ME, Chavassieux PM, Roux JP, Portero NR, Meunier PJ. Comparison of Trabecular Bone Microarchitecture and Remodeling in Glucocorticoid-Induced and Postmenopausal Osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2001;16(1):97–103. doi:10.1359/jbmr.2001.16.1.97.
183. M. Kleerekoper M. B. BS, 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):594–597. doi:10.1007/BF02554913.
184. Als OS, Gotfredsen A, Christiansen C. The effect of glucocorticoids on bone mass in rheumatoid arthritis patients. Influence of menopausal state. *Arthritis & Rheumatism*. 1985;28(4):369–375. doi:10.1002/art.1780280403.

185. Parfitt AM. Age-related structural changes in trabecular and cortical bone: Cellular mechanisms and biomechanical consequences. *Calcif Tissue Int.* 1984;36(1):S123–S128. doi:10.1007/BF02406145.

IX ANHANG

MATERIAL

Bildanalyseprogramme:	DataViewer [®] (Version 1.4.3.3 – 1.4.4), SkyScan [®] , Kontich, Belgien
	CT-Analyser [®] (Version 1.10 – 1.13), SkyScan [®] , Kontich, Belgien
Glukokortikoid	Dexamethason (Voren-Depot [®]), Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland
Puffer:	Paraformaldehyd(PFA)-Puffer, 4%
μCT-Scanner:	SkyScan_1072 X-Ray Microscope-Microtomograph, SkyScan [®] Kontich, Belgien
	SkyScan_1173 X-Ray Microscope-Microtomograph, SkyScan [®] Kontich, Belgien
μCT-Computersystem:	Intel [®] Xeon [™] Prozessor (2x 1800 MHz, 1024 MB RAM)
Parafilm:	Parafilm [®] Laboratory Film, Menasha, WI, USA
Statistikprogramm:	JMP [®] 8.0, SAS [®] Institute, Cary, NC, USA

X PUBLIKATIONEN

ABSTRACTS

Kampschulte M, Faulenbach M, Möllmann H, Schlewitz G, Schnettler R, Dürselen L, Ignatius A, Heiss C, Krombach GA, Langheinrich AC. Quantitative Micro-CT der forcierten Osteoporose durch Ovariectomie und multidefiziente Diät. Deutscher Röntgenkongress Hamburg 2013, Poster (Nr.: WI-PO 5)

ORIGINALARBEITEN

Govindarajan P, Khassawna T, Kampschulte M, Böcker W, Hürter B, Dürselen L, **Faulenbach M**, Heiss C. Implications of combined ovariectomy and glucocorticoid (dexamethasone) treatment on mineral, microarchitectural, biomechanical and matrix properties of rat bone. *Int J Exp Pathol.* 2013 Dec; 94(6):387-98. doi: 10.1111/iep.12038. Epub 2013 Sep 2.

El Khassawna T, Böcker W, Govindarajan P, Schliepke N, Hürter B, Kampschulte M, Schlewitz G, Alt V, Lips KS, **Faulenbach M**, Möllmann H, Zahner D, Dürselen L, Ignatius A, Bauer N, Wenisch S, Langheinrich AC, Schnettler R, Heiss C. Effects of multi-deficiencies-diet on bone parameters of peripheral bone in ovariectomized mature rat. *PLoS One.* 2013 Aug 16; 8(8):e71665. doi: 10.1371/journal.pone.0071665. eCollection 2013.

XI EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert.

Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

XII DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die auf den unterschiedlichsten Wegen zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die stetig gute Betreuung und Unterstützung sowie äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre nach Überlassen des interessanten Themas spreche ich Herrn Prof. Dr. med. A. C. Langheinrich meinen besonderen Dank aus. Das Arbeiten machte somit großen Spaß.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. med. M. Kampschulte für das unkomplizierte und wirklich angenehme Zusammenarbeiten und die zahlreichen schnellen Antworten auf meine Fragen bedanken. Dies erleichterte mir oft das Auswerten und Bearbeiten der Daten.

Auch Frau G. Martels gilt ein besonderer Dank für den reibungslosen Ablauf im Mikro-CT-Labor und die tatkräftigen und netten Hilfestellungen.

Bei Herrn Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. R. Schnettler als Sprecher des SFB/Transregio 79 bedanke ich mich für die Bereitstellung des interessanten Forschungsthemas.

Auch bei Herrn Prof. Dr. med. Ch. Heiß als Teilprojektleiter von T1 möchte ich mich für die häufige und gute Zusammenarbeit bedanken.

Dem Personal des Zentralen Tierstalls der JLU Gießen danke ich für die gute Betreuung der Ratten während der Studienlaufzeit.

Desweiteren möchte ich mich bei meinen Doktorandenkollegen bedanken, die immer ein offenes Ohr und einen Tipp für mich hatten und meine Doktorandenzeit durch Kongressbesuche und Treffen zu einer wirklich angenehmen Zeit gemacht haben.

Auch Julia Weimer danke ich für das aufmerksame Korrekturlesen, viele Anregungen und das gemeinsame Tüfteln an der Technik.

Abschließend erhalten meine Familie und Freunde einen besonderen Dank für die immer währende Unterstützung, das Vertrauen und den Rückhalt. Es ist schön zu wissen, dass immer jemand da ist – vielen Dank für alles!