

Aus dem  
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik (Prof. Dr. L. Claes)  
der Universität Ulm

Arbeit eingereicht über die  
II. Medizinischen Tierklinik  
(Lehrstuhl für Innere Medizin und Chirurgie der Wiederkäuer: Prof. Dr. W. Klee)  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Das ovariectomierte und glukokortikoid-behandelte Schaf  
als Großtiermodell für die Osteoporoseforschung**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Sandra Schorlemmer

aus Erlangen

München 2002

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Klee

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Wittmann

Tag der Promotion: 19. Juli 2002

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Der Krankheitskomplex Osteoporose</b> .....	<b>2</b>
1.1.1	Begriffsdefinition .....	2
1.1.2	Bedeutung der Osteoporose .....	4
1.1.3	Einteilung .....	5
1.1.4	Postmenopausale Osteoporose .....	5
1.1.5	Glukokortikoid-induzierte Osteoporose .....	6
<b>1.2</b>	<b>Tiermodelle in der Osteoporoseforschung</b> .....	<b>7</b>
1.2.1	Bedeutung von Tiermodellen .....	7
1.2.2	Ovariectomierte Ratten .....	9
1.2.3	Ovariectomierte Primaten .....	10
1.2.4	Schafe als Osteoporosemodelle .....	11
1.2.5	Weitere Tiermodelle .....	13
<b>2</b>	<b>Ziel der eigenen Studie</b> .....	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>Material &amp; Methoden</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Tiermodell</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2</b>	<b>Projektablauf</b> .....	<b>17</b>
3.2.1	Gruppeneinteilung .....	17
3.2.2	Ovariectomie .....	17
3.2.3	Glukokortikoidgabe .....	19
3.2.4	DXA-Messungen .....	20
3.2.5	Biopsie .....	21
3.2.6	Versuchsabschluss .....	23

<b>3.3 Auswertung</b> .....	<b>24</b>
3.3.1 DXA-Messungen.....	24
3.3.2 Periphere Quantitative Computertomographie (pQCT).....	25
3.3.3 Mikrocomputertomographie ( $\mu$ CT).....	27
3.3.4 Biomechanik.....	29
3.3.5 Histologie.....	30
3.3.6 Histomorphometrie.....	32
3.3.7 Statistik.....	34
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1 Klinischer Verlauf</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2 Gewichtsentwicklung</b> .....	<b>37</b>
<b>4.3 Knochendichtemessungen</b> .....	<b>38</b>
4.3.1 Ergebnisse der DXA-Messungen.....	38
4.3.2 Ergebnisse der pQCT-Untersuchung.....	42
<b>4.4 Knochenstrukturanalyse</b> .....	<b>45</b>
<b>4.5 Biomechanik</b> .....	<b>48</b>
4.5.1 Tibiabioptate.....	48
4.5.2 Lendenwirbel-Bioptate.....	48
<b>4.6 Histomorphometrie</b> .....	<b>49</b>
4.6.1 Femurkondylen.....	49
4.6.2 Knorpelschichten der Femurkondylen.....	51
<b>4.7 Korrelation der Daten</b> .....	<b>53</b>

<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>57</b>
	<b>5.1 Bedeutung der Studie .....</b>	<b>57</b>
	<b>5.2 Diskussion des Tiermodells .....</b>	<b>58</b>
	<b>5.3 Diskussion der Methodik.....</b>	<b>60</b>
	5.3.1 Knochendichte-Untersuchung in vivo.....	60
	5.3.2 Knochendichte-Untersuchung ex vivo.....	63
	5.3.3 Knochenstrukturanalyse .....	65
	5.3.4 Biomechanische Prüfungen .....	65
	5.3.5 Histomorphometrie.....	69
	<b>5.4 Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>70</b>
	5.4.1 Interne Konsistenz der Daten .....	70
	5.4.2 Beurteilung der eigenen Ergebnisse und Vergleich mit anderen Studien am Schaf.....	71
	5.4.3 Vergleich mit Studien an anderen Tierarten.....	74
	5.4.4 Übertragbarkeit auf den Menschen.....	76
	<b>5.5 Anwendung des Tiermodells.....</b>	<b>78</b>
	<b>5.6 Schlussfolgerungen .....</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>93</b>

# **1 Einleitung**

Die Osteoporose gehört zu den häufigsten Erkrankungen in den westlichen Industrienationen. Sie wird definiert als metabolische Knochenkrankung, die sich durch eine verminderte Knochenmasse und eine Verschlechterung der Knochenarchitektur auszeichnet. In der Folge kommt es durch die reduzierte Festigkeit des Knochens zu einer erhöhten Frakturneigung. Für den Patienten bedeutet die Erkrankung an Osteoporose in den meisten Fällen eine schwere Beeinträchtigung der individuellen Lebenssituation. Durch die Behandlung der häufig auftretenden Frakturen entstehen enorme Kosten für das Gesundheitswesen.

Um die zu Grunde liegenden Pathomechanismen der Krankheit zu erforschen, um neue Therapiemöglichkeiten zu erproben und um spezielle Prothesen und Implantate für den frakturierten osteoporotischen Knochen zu entwickeln, braucht man ein geeignetes Tiermodell, das den Verhältnissen beim Menschen weitestgehend entspricht. Ein optimales Tiermodell, das allen Fragestellungen gleichermaßen gerecht wird, gibt es nicht. Die ovariectomierte Ratte – das in der Osteoporoseforschung am häufigsten benutzte Tiermodell – ist auf Grund der Größenverhältnisse für orthopädische Belange ungeeignet. In jüngerer Zeit wurde versucht, das ovariectomierte Schaf als Modell für die Osteoporose zu benutzen. Allerdings ist der durch die Ovariectomie erzeugte Knochenverlust relativ gering.

Aus unzähligen klinischen Studien ist andererseits bekannt, dass eine dauerhafte Behandlung mit Glukokortikoiden zu rapidem Knochenverlust führt. Auf Grund dieser Erkenntnisse lässt sich die Hypothese aufstellen, dass der Knochenverlust durch Ovariectomie mit einer anschließenden Glukokortikoid-Gabe noch verstärkt werden kann.

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es daher, durch eine Kombination von Ovariectomie und längerfristiger Glukokortikoid-Behandlung eine Verminderung der Knochendichte beim Schaf zu erzielen und zu überprüfen, inwieweit dieses Modell für die Osteoporoseforschung – insbesondere für orthopädische Fragestellungen – geeignet ist.

## 1.1 Der Krankheitskomplex Osteoporose

### 1.1.1 Begriffsdefinition

Die Osteoporose wird heutzutage zu den bedeutenden Volkskrankheiten gezählt. Nach einer Definition der Consensus Development Conference von 1993 handelt es sich um eine „systemische Skeletterkrankung mit einer Verminderung der Knochenmasse und einer Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes mit entsprechend reduzierter Festigkeit und erhöhter Frakturneigung“ (Consensus Development Conference 1993).

Beurteilt wird der Verlust an Knochensubstanz üblicherweise mit Hilfe der Osteodensitometrie. Gemessen wird an der Wirbelsäule, der Hüfte oder dem Unterarm. Je nach Messverfahren erhält man den Knochenmineralgehalt (bone mineral content; BMC) oder die Knochendichte (bone mineral density; BMD). Den individuellen Messbefund vergleicht man dabei entweder mit der durchschnittlichen maximalen Knochendichte (peak bone mass) junger gesunder Erwachsener (T-Wert) oder mit der durchschnittlichen Knochendichte einer gleichaltrigen Vergleichspopulation (Z-Wert). Der T-Wert bezeichnet die Zahl der Standardabweichungen vom Mittelwert gesunder 25- bis 40-Jähriger und bildet die Grundlage für eine Einteilung des Krankheitsbildes in verschiedene Stadien. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) spricht man ab einem T-Wert von -2,5 Standardabweichungen von Osteoporose. Bei einer schweren oder klinisch manifesten Osteoporose müssen nach dieser Definition zusätzlich eine oder mehrere Frakturen aufgetreten sein. Dagegen wird eine Verminderung der Knochendichte zwischen -1,0 und -2,5 Standardabweichungen lediglich als Osteopenie bezeichnet (Tab. 1).

Tab. 1: Einteilung der Osteoporose in klinische Stadien nach densitometrischem Befund (T-Wert = Zahl der Standardabweichungen (SD) vom Mittelwert der Knochendichte gesunder junger Erwachsener) (Consensus Development Statement 1997).

Klinisches Stadium	Kriterien
Normalbefund	Knochenmineralgehalt normal (T-Wert: bis -1,0 SD)
Osteopenie	Knochenmineralgehalt vermindert (T-Wert: -1,0 bis -2,5 SD) keine Fraktur(en)
Osteoporose	Knochenmineralgehalt vermindert (T-Wert: > -2,5 SD) keine Fraktur(en)
Klinisch manifeste Osteoporose	Knochenmineralgehalt vermindert (T-Wert: > -2,5 SD) Fraktur(en)

Mit den heute zur Verfügung stehenden technischen Möglichkeiten kann man einen Knochenmineralverlust äußerst zuverlässig nachweisen. Offen bleibt jedoch, welche Lokalisation (Wirbelsäule, Femur, Radius), welche Messmethode (DXA, CT, Ultraschall) und welche Messgröße (BMC, BMD) am besten für eine Diagnose geeignet ist. Daher ist in Zukunft eine Vereinheitlichung der Messlokalisationen und der Messparameter anzustreben, damit die Ergebnisse besser miteinander verglichen werden können.

### 1.1.2 Bedeutung der Osteoporose

Bedeutung erlangt die Osteoporose durch ihre hohe Prävalenz, die erheblichen Kosten für das Gesundheitssystem und die starke Beeinträchtigung der Lebensqualität der Betroffenen (Ringe 1995). Da die Lebenserwartung in den westlichen Industrienationen beständig steigt, erhöht sich auch die Zahl der Menschen, die an altersbedingten chronischen Krankheiten leiden. In den USA, Europa und Japan sind etwa 75 Millionen Menschen von Osteoporose betroffen (Ringe 1997). Allein in Deutschland beläuft sich die Zahl der Osteoporosepatienten auf vier bis sechs Mio. (Götte und Dittmar 2001). Jedoch befinden sich nach neueren Schätzungen nur etwa 20 % der Betroffenen überhaupt in ärztlicher Behandlung. Die Folgekosten der Osteoporose, die durch Krankenhausaufenthalte, ambulante oder stationäre Rehabilitation und Pflegekosten entstehen, schlagen in Deutschland derzeit mit fünf Mrd. Euro pro Jahr zu Buche. Dem gegenüber stehen 15 Mio. Euro Diagnose- und 145 Mio. Euro Therapiekosten (Götte und Dittmar 2001). Diese Zahlen zeigen ein deutliches Defizit im diagnostischen und therapeutischen Bereich. In den meisten Fällen wird die Erkrankung erst dann diagnostiziert, wenn eine Fraktur auftritt. Die häufigsten Frakturlokalisationen sind das proximale Femur, der distale Radius und die Wirbelsäule, wobei Frakturen des Oberschenkelhalses am folgenschwersten sind. Von den jährlich allein in Deutschland gezählten etwa 150000 Patienten mit osteoporosebedingten Femurfrakturen werden ca. 30 % zu Pflegefällen. 10 % der Patienten sterben an den Folgen der Fraktur (Ringe 1997). Wesentlich öfter kommt es jedoch zu Frakturen der Wirbelsäule. Während die Schmerzen bei Radius- und Femurfrakturen zeitlich limitiert sind, zeichnen sich Frakturen der Wirbelsäule durch eine ausgeprägte und dauerhafte Schmerzsymptomatik aus, die sehr starke Auswirkungen auf das alltägliche Leben der Betroffenen hat. Dabei unterscheidet man zwischen akuten und chronischen Schmerzen. Akute Schmerzen entstehen in den meisten Fällen als direkte Folge von Wirbelfrakturen, weswegen der Schmerz entsprechend plötzlich und heftig auftritt. Chronische Osteoporoseschmerzen sind dagegen Weichteilschmerzen (Muskeln, Sehnen, Bänder) oder artikuläre Schmerzen (kleine Wirbelgelenke) und sind auf die veränderte Wirbelsäulenstatik zurückzuführen (Ringe 1995).

### 1.1.3 Einteilung

Betrachtet man die betroffenen Bereiche am Skelett, unterscheidet man zwischen lokalisierter und generalisierter Osteoporose. Lokale Osteoporosen entstehen beispielsweise im gelenknahen Bereich bei chronischer Arthritis oder bei länger andauernder Immobilisation einer Gliedmaße. Generalisierte Osteoporosen werden pathogenetisch unterteilt in primäre und sekundäre Formen (Ringe 1995). Unter den Begriff „primäre Osteoporosen“ fallen die idiopathische Osteoporose sowie die postmenopausale (Typ I) und die altersabhängige oder senile (Typ II) Osteoporose. Die sekundären Osteoporosen sind dagegen auf eine bestimmte Grundkrankheit zurückzuführen. Dazu gehören unter anderem endokrine, gastrointestinale oder metabolische Erkrankungen, Neoplasien, aber auch medikamentös bedingte Störungen oder Immobilisation.

Im Folgenden wird nur auf die postmenopausale und die glukokortikoid-induzierte Osteoporose eingegangen, da diese beiden Formen Grundlage für das entwickelte Tiermodell sind.

### 1.1.4 Postmenopausale Osteoporose

Die am häufigsten vorkommende Form der Erkrankung ist die postmenopausale Osteoporose, an der etwa 30 % aller Frauen leiden (Ringe 1995). Der wichtigste pathogenetische Faktor der postmenopausalen Osteoporose ist die hormonabhängige Steigerung der Knochenresorption und der daraus resultierende Knochenverlust. Bereits lange vor der Menopause kommt es zu einem kontinuierlichen Absinken der gonadalen Produktion von  $17\beta$ -Östradiol. Nach Einsetzen der Menopause stammt das Östradiol zum überwiegenden Teil aus adipösem Gewebe, wo es aus Östron und Testosteron synthetisiert wird (Pacifici 1996). Der Abfall des Östrogenspiegels nach der Menopause bedingt einen Anstieg des Knochenumbaus mit Überwiegen der Knochenresorption. Grund hierfür ist der Wegfall des hemmenden Effektes von Östrogen auf die Osteoklastogenese und die Osteoklastenaktivität. Die größere Zahl an neu entstehenden Osteoklasten und die Steigerung der Aktivität bereits bestehender Osteoklasten bedingen einen erhöhten

Knochenabbau. Gleichzeitig beeinflusst der Mangel an Östrogen auch den Knochenaufbau. Das entstehende Ungleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau führt zu einer insgesamt negativen Bilanz und damit zu Knochenverlust. Davon betroffen ist in erster Linie trabekulärer Knochen (Gallagher 1990). Die höchste Verlustrate (3–5 %) findet man in den ersten fünf Jahren nach der Menopause, danach nimmt sie wieder leicht ab (Ringe 1997). Klinisch äußert sich die postmenopausale Osteoporose in der Regel erst 5–15 Jahre nach Eintritt der Menopause durch das Auftreten von Frakturen, die typischerweise an der Wirbelsäule lokalisiert sind. Sie treten entweder als akutes Trauma oder als Summation von Mikrofrakturen auf.

### 1.1.5 Glukokortikoid-induzierte Osteoporose

Die Glukokortikoid-induzierte Osteoporose ist inzwischen die häufigste sekundäre Osteoporoseform. Glukokortikoide werden als Standardtherapie bei verschiedensten chronischen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis und Asthma, aber auch nach Organtransplantationen erfolgreich eingesetzt. Allerdings beeinflussen Glukokortikoide sowohl den Knochenaufbau als auch den Knochenabbau (Reid 1997; Eastell et al. 1998; Silvestrini et al. 2000). In der Anfangsphase der Therapie stimulieren sie die Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen zu Osteoklasten und hemmen gleichzeitig den Kontrollmechanismus, der eine überschießende Differenzierung von Osteoklasten verhindern soll. In der Folge steigt die Anzahl ausgereifter und zur Knochenresorption befähigter Osteoklasten. Dadurch kommt es zu dem frühen und sehr ausgeprägten Knochenverlust gleich zu Beginn einer Glukokortikoid-Therapie (Khosla 2001). Dieser Knochenverlust kann im ersten Jahr bis zu 12 % betragen. Auf der anderen Seite hemmen Glukokortikoide die Differenzierung von Osteoblasten aus ihren Vorläuferzellen und provozieren einen vorzeitigen Zelltod bereits bestehender Osteoblasten (Silvestrini et al. 2000). Dadurch wird sowohl die Anzahl ausgereifter Osteoblasten verringert als auch ihre Lebensspanne deutlich verkürzt. Obwohl in späteren Phasen einer Behandlung mit Glukokortikoiden die Knochenresorption wieder normal oder nur leicht erhöht ist, führt die Beeinflussung der Knochenformation zu weiterem Knochenverlust. Dieser beträgt in der Folgezeit etwa 2–5 % pro Jahr und ist auf die Entkoppelung zwischen Knochenauf- und

Knochenabbau zurückzuführen. Betroffen ist sowohl spongiöser als auch kortikaler Knochen. Die Verringerung der Knochenmasse manifestiert sich stärker im axialen Skelett als in peripheren Bereichen (Weinstein et al. 1998). Ihre enorme Bedeutung erlangt die glukokortikoid-induzierte Osteoporose durch die Tatsache, dass 30 % der über einen längeren Zeitraum behandelten Patienten als direkte Folge des Knochenverlustes Frakturen erleiden (Carbonare et al. 2001).

## 1.2 Tiermodelle in der Osteoporoseforschung

### 1.2.1 Bedeutung von Tiermodellen

In der derzeitigen Osteoporoseforschung besteht nach wie vor Bedarf für ein Tiermodell, anhand dessen die Pathogenese der Erkrankung, die Wirksamkeit möglicher Therapeutika oder auch der Einsatz orthopädischer Implantate untersucht werden kann.

Es ist sehr schwierig, die Pathogenese einer Krankheit zu erforschen, die praktisch ausschließlich den Menschen betrifft. Eine klinische Studie ist mit enormem Zeitaufwand verbunden, da die Krankheit nur sehr langsam fortschreitet. Zudem gibt es sehr viele individuelle Einflussfaktoren, die sich auf die Ergebnisse der Studie auswirken. Dazu zählen unter anderem Ernährung, Alkohol- und Nikotinkonsum oder körperliche Aktivität (Heaney 1996). Aus diesem Grund ist es kaum möglich, einheitliche Studiengruppen aufzustellen. Bei einem Tiermodell kann man dagegen die Umgebungsbedingungen so gestalten, dass die oben genannten Limitationen minimiert werden. Außerdem lässt sich die Studiendauer durch die künstliche Herstellung der Osteoporose beim Tier erheblich verkürzen. Eine kürzere Studiendauer ist auch bei der Überprüfung von neuen Medikamenten für den klinischen Einsatz von Bedeutung. Mit einem Tiermodell erzielt man nicht nur sehr viel frühere Ergebnisse, sondern wird auch den Anforderungen der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) gerecht. Diese verlangt seit 1994 für die Zulassung neuer Medikamente für die Osteoporosetherapie die

Überprüfung der Wirksamkeit sowohl an der Ratte als auch an einem zweiten Tiermodell (Thompson et al. 1995). Ein weiterer Grund für die Verwendung von Tiermodellen in der Osteoporoseforschung ist die Tatsache, dass man orthopädische Implantate nicht erst am Patienten testen kann. Die speziellen Ansprüche des osteoporotischen Knochens erfordern die Entwicklung von Implantaten, die im Knochen optimal verankert werden können. Zur Erforschung von biologischen und biomechanischen Eigenschaften ist der Test an einem Tiermodell zwingend notwendig (Turner 2001).

Tiermodelle dienen dazu, in kontrollierter Art und Weise Fragestellungen zu beantworten, die aus den Beobachtungen des klinischen Alltags resultieren (Claes et al. 1999). Ein gutes Tiermodell muss verschiedene Anforderungen erfüllen: Es sollte der Fragestellung angemessen und für ihre Beantwortung geeignet und relevant sein (Rodgers et al. 1993). Angemessen heißt in diesem Zusammenhang, dass ein Tiermodell benutzt wird, welches gut auf die humane Situation übertragen werden kann. Es muss insofern geeignet sein, dass sich die Ergebnisse der Studie generalisieren und auf den Menschen übertragen lassen. Die Organismen sollten genetisch einheitlich und ihre biologischen Eigenschaften bekannt sein, damit individuelle Unterschiede möglichst gering gehalten werden. Außerdem ist es natürlich von Vorteil, wenn man die Tiere kostengünstig und ohne Schwierigkeiten erwerben kann. Bei experimentellen Manipulationen sollten die Tiere einfach und gefahrlos zu handhaben sein. Vor der Entscheidung für ein bestimmtes Tiermodell müssen zu guter Letzt Überlegungen zur ökologischen, ethischen und sozialen Unbedenklichkeit stehen (Davidson et al. 1987). Für die Osteoporoseforschung muss darüber hinaus geklärt werden, wann bei dem entsprechenden Tiermodell die „peak bone mass“ erreicht wird und ob es anschließend zu alters- oder östrogenabhängigem Knochenverlust kommt. Es ist wichtig zu wissen, ob der Knochenverlust kortikalen und spongösen Knochen gleichermaßen betrifft und ob dieser so stark ist, dass es – wie beim Menschen – zu spontanen Frakturen kommt (Turner 2001). Kein Tiermodell kann alle diese Anforderungen erfüllen. Vor Beginn einer Studie muss man daher genau abwägen, welches Tiermodell für die Beantwortung der entsprechenden Fragestellung am besten geeignet ist. Es kann durchaus sein, dass mehrere Modelle herangezogen werden müssen, weil ein einziges Modell gar nicht ausreicht.

### 1.2.2 Ovariectomierte Ratten

Das am häufigsten verwendete Tiermodell der Osteoporoseforschung ist die ovariectomierte (OVX) Ratte (Kalu et al. 1989; Kalu 1991). Sie wird meist als erstes Modell für die Erprobung von Medikamenten herangezogen, bevor diese mit einem zweiten Tiermodell nochmals überprüft und schließlich für klinische Studien freigegeben werden (Aerssens et al. 1998). Allerdings treten bei der ovariectomierten Ratte keine Frakturen auf, wie das bei der postmenopausalen Frau der Fall ist. Jedoch entsprechen die pathophysiologischen Mechanismen des Knochenverlustes denen beim Menschen (Frost und Jee 1992). Die Ratte hat den Vorteil, dass sie kostengünstig zu beschaffen und einfach zu halten ist. Ihre kurze Lebenszeit ermöglicht Studien über den Alterungsprozess von Knochen, zumal nur alte Ratten trabekulären Knochenumbau (Remodeling) zeigen. Da Ratten keine natürliche Menopause haben, ist die Ovariectomie eine Zeit sparende Methode zur Herstellung einer künstlichen Menopause (Wronski und Yen 1991). Allerdings kommt es dadurch zu einem abrupten Abfall des Östrogenspiegels, während dieser bei der Frau kontinuierlich absinkt. Nachteile der Ratte sind ihre geringe Körpergröße, das geringe Blutvolumen und die hohe Stoffwechselrate (Rodgers et al. 1993). Dadurch sind Tests von orthopädischen Implantaten oder die mehrfache Bestimmung von Serumparametern des Knochenstoffwechsels nicht möglich. Auch bei der Untersuchung von neuen Medikamenten muss die vom Menschen abweichende Stoffwechselsituation berücksichtigt werden. Die Ratte ist kein geeignetes Modell zur Klärung, wie die Ovariectomie die Kortikalis beeinflusst, weil Ratten kein Haverssches System besitzen und daher überhaupt kein intrakortikales Remodeling aufweisen. Zudem ist die Osteoblastenfunktion in späteren Stadien des Östrogenmangels unbeeinflusst (Wronski und Yen 1991), bei der Frau dagegen vermindert. Durch die Behandlung mit Glukokortikoiden lässt sich nur dann eine Osteopenie erzeugen, wenn die Tiere gleichzeitig eine Calcium-Mangel-Diät erhalten (Jee et al. 1972).

### 1.2.3 Ovariectomierte Primaten

Mitte der 80er Jahre wurden erstmals ovariectomierte nicht-humane Primaten (Paviane, Makaken) in der Osteoporoseforschung eingesetzt. Affen besitzen erhebliche Vorteile gegenüber anderen Tiermodellen: Sie sind in ihrer Anatomie und Physiologie dem Menschen am ähnlichsten. Insbesondere der Gastrointestinaltrakt, die endokrinologischen Verhältnisse und der Knochenstoffwechsel entsprechen den Gegebenheiten beim Menschen. Zudem besitzen sie eine dem Menschen ähnliche Biomechanik des Bewegungsapparates. Ein ganz entscheidender Vorteil liegt darin, dass Paviane und Makaken im Gegensatz zu allen anderen Tiermodellen zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr eine natürliche Menopause ausbilden. Die „peak bone mass“ wird etwa im Alter von neun Jahren erreicht (Jayo et al. 1994). Affen besitzen wie der Mensch kortikale Knochenosteone und zeigen daher kortikales Remodeling. Von Miller wurde 1986 nach Ovariectomie eine signifikante Verminderung des trabekulären Knochenvolumens an der Wirbelsäule nachgewiesen (Miller et al. 1986). Zudem erhöht sich infolge der Ovariectomie die Frakturneigung. Doch haben Affen als Tiermodelle auch Nachteile. Die Zahl der erhältlichen Affen mit abgeschlossenem Knochenwachstum (>9 Jahre) ist äußerst beschränkt. Andererseits ist es aber auch zu teuer, junge Affen zu beschaffen und sie bis zu diesem Alter zu halten. Die meisten zu Versuchszwecken gehaltenen Affen sind daher zwischen vier und sieben Jahre alt (Jerome et al. 1993). Dies ist bezüglich der noch nicht erreichten „peak bone mass“ problematisch. Zu berücksichtigen ist auch, dass Affen sehr hohe Anforderungen an Haltung und Handhabung stellen. Bei Einzelhaltung kann es zu Knochenverlust kommen, der allein von der Inaktivität des Tieres herrührt. Bei der Haltung in Gruppen ist dagegen durchaus damit zu rechnen, dass Tiere nach Rangordnungskämpfen zu Tode kommen. Ein ganz großes Problem stellt das Zoonose-Risiko dar. Affen besitzen nur eine sehr geringe natürliche Resistenz gegen Tuberkulose. Daher kann der Kontakt mit dem Bakterium sehr schnell zum Tode einer ganzen Versuchspopulation führen (Brommage 2001). Umgekehrt ist auch eine Übertragung von Retro- oder Herpes B-Viren vom Affen auf den Menschen möglich (Brommage 2001; Turner 2001). Auch die Ovariectomie der Tiere ist nicht ganz unproblematisch: Bei den oft verwendeten Langschwanzmakaken laufen sogar mit nur noch 5% ihres Ovargewebes normale Zyklen ab. Die chirurgische Entfernung der Ovarien muss daher mit größter Sorgfalt geschehen und

das Gelingen der Operation anhand des Serum-Östradiol-Spiegels überprüft werden ( $< 10 \text{ pg/ml}$ ). Schließlich ist auch die ablehnende Haltung der Öffentlichkeit gegenüber Tierversuchen an Primaten zu berücksichtigen.

#### 1.2.4 Schafe als Osteoporosemodelle

Seit wenigen Jahren rückt das Schaf mehr und mehr als Versuchstier für die Osteoporoseforschung in den Vordergrund. Das Schaf ist sehr genügsam in Haltung und Pflege. Es fühlt sich dann am wohlsten, wenn es in Gruppen möglichst mit Zugang zur Weide gehalten wird. Schafe sind auch in größerer Zahl gut zu beschaffen. Auf Grund der Körpergröße ist das Schaf für die Erprobung von Prothesen sehr gut geeignet. Auch die wiederholte Gewinnung von Blut- oder Urinproben ist ebenso wie die Entnahme von Knochenbiopsaten problemlos möglich. Schafe haben einen saisonal polyöstrischen Zyklus, der abhängig von Rasse und Tageslichtlänge zwischen 14 und 21 Tage lang ist (Rodgers et al. 1993; Newman et al. 1995). Die Jahreszeit beeinflusst auch die Knochendichte: Während der anöstrischen Wintermonate ist die Knochendichte geringer (Hornby et al. 1995). Das Schaf bildet keine natürliche Menopause aus. Verschiedene Studiengruppen haben allerdings nachgewiesen, dass eine Ovariectomie zu Osteopenie führt. In einigen Studien fiel der Knochenverlust nach Ovariectomie allerdings eher moderat aus. Turner und Mitarbeiter konnten 1995 keine Unterschiede zwischen ovariectomierten Tieren und einer Kontrollgruppe in der Knochendichte des Calcaneus und des distalen Radius feststellen (Turner et al. 1995a). Die Änderung der Knochenmineraldichte an der Wirbelsäule (L4) bezogen auf den Zustand vor der Ovariectomie lag bei den operierten Tieren nach drei Monaten bei  $-2,5 \%$  und nach sechs Monaten bei  $-1 \%$  (Turner et al. 1995a). In einer weiteren Studie, bei der die Knochenmineraldichte erst zwölf Monate nach der Ovariectomie gemessen wurde, konnten keinerlei Unterschiede nachgewiesen werden (Turner et al. 1995b). Dagegen fanden Fini et al. (2000) in ihrer Studie nach 12 Monaten eine signifikante Reduktion des trabekulären Knochenvolumens und der trabekulären Dicke.

Ein weiterer Ansatz zur Erzeugung einer Osteopenie beim Schaf war die Behandlung der Tiere mit Glukokortikoiden. In einer Untersuchung an 16 Schafen hatte eine viermonatige Gabe von Methylprednisolon (15 mg/Tag) keinerlei Effekte auf die Knochendichte am Femur und an der Wirbelsäule. Auch die biomechanischen Tests zeigten keine Unterschiede zur aus elf Tieren bestehenden Kontrollgruppe (Deloffre et al. 1995). Eine andere Arbeitsgruppe (Chavassieux et al. 1993) injizierte den Tieren über drei Monate hinweg Methylprednisolon (zwei Monate: 30 mg/Tag; einen Monat: 15 mg/Tag) und untersuchte die Einflüsse auf den Knochenaufbau anhand von Blutparametern und histomorphometrischen Parametern. Die Werte wurden verglichen mit denen der Kontrollgruppe (sieben Schafe). Der Serumspiegel von Osteocalcin, einem potenten Marker des Knochenaufbaus, lag signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Andere Blutparameter wie Serumcalcium und -phosphor, alkalische Phosphatase und Parathormon waren nicht verändert. In der histomorphometrischen Untersuchung fanden sich ebenfalls keinerlei Unterschiede bei den statischen Parametern des Knochenauf- und -abbaus, wohl aber bei den dynamischen. So waren beispielsweise Knochenbildungs- und Knochenmineralisierungsrate bei der mit Methylprednisolon behandelten Gruppe signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe. In einer weiteren Studie mit insgesamt 32 Schafen (16 Schafe: je 16 mg Methylprednisolon pro Tag über drei Monate hinweg) war die Knochenformation auf der Gewebeebene reduziert, nicht dagegen auf der zellulären Ebene (Chavassieux et al. 1997). Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass dieses Tiermodell sehr gut geeignet ist für die Erforschung eines glukokortikoidbedingten Defizits im Knochenaufbau.

Eine Arbeitsgruppe in Davos versuchte ein osteoporotisches Großtiermodell für die Frakturheilung zu etablieren und kombinierte eine Ovariectomie der Schafe mit Glukokortikoid-Gaben und calcium-/Vitamin D-reduzierter Diät (Lill et al. 2000). Die Schafe verloren in sechs Monaten mehr als die Hälfte ihrer Knochendichte im spongiosen Knochen, die Trabekelzahl und -dicke wurde um rund 20 % reduziert und das Knochenvolumen sogar um fast 40 %. In einem biomechanischen Test zeigten Tibiabioplate eine um 50 % geringere Torsionsstärke und -steifigkeit gegenüber der Kontrollgruppe. Allerdings waren die Tiergruppen mit nur jeweils zwei Schafen sehr klein, so dass die Aussagekraft der Ergebnisse fraglich ist.

### 1.2.5 Weitere Tiermodelle

Gelegentlich werden Hunde in der Osteoporoseforschung als Versuchstiere eingesetzt. Hunde sind in Beschaffung und Haltung wesentlich billiger als Primaten. Auch ihre Handhabung bereitet weniger Schwierigkeiten. Jedoch ist die öffentliche Akzeptanz von Versuchen am Hund sehr schlecht. Der Hund ist wie der Mensch Monogastrier und daher für Untersuchungen von oral verabreichten Medikamenten besser geeignet als Wiederkäuer. Auch zeigen Hunde ein ausgeprägtes Knochenremodeling. Allerdings hält sich der Knochenverlust nach Ovariectomie in Grenzen und es treten auch keine Spontanfrakturen auf. Eine Erklärung für das geringe Ansprechen auf den Östrogenmangel liegt wohl darin, dass Hunde diöstrisch sind und nur zweimal im Jahr zur Ovulation kommen (Yamaura et al. 1993). Während des Anöstrus ist der Östrogenspiegel extrem niedrig. Daher sind Hunde für Studien der postmenopausalen Osteoporose weniger geeignet. Jedoch kann man Hunde bei allgemeinen Fragestellungen, die das Skelett betreffen, wie zum Beispiel Frakturheilung, Effekte von Immobilisation oder von Medikamenten auf den Knochen als Tiermodell durchaus in Betracht ziehen, da der Knochenaufbau des Hundes am besten mit den Verhältnissen am menschlichen Skelett übereinstimmt (Aerssens et al. 1998).

Bei wachsenden Katzen kann eine Osteopenie durch Immobilisation oder durch die Fütterung von calciumreduzierter oder phosphatreicher Diät erzeugt werden. Jedoch ist die Osteoporose in der Regel kein Problem des heranwachsenden Knochens. Trotz der recht einfachen Haltung und Handhabung ergibt sich auch bei der Katze das Problem der schlechten öffentlichen Akzeptanz. Zudem kommt es ebenso wie beim Hund nach einer Ovariectomie nicht zu ausgeprägtem Knochenverlust, so dass daraus auch keine Spontanfrakturen resultieren (Turner 2001).

Auch Schweine wurden schon als Versuchstiere für die Osteoporoseforschung eingesetzt. Meistens handelte es sich um Minipigs, da diese weniger Platz in Anspruch nehmen und etwas leichter zu handhaben sind. Minipigs haben mit der Frau vergleichbare Zyklen, die kontinuierlich über das ganze Jahr ablaufen. Ihr Gastrointestinaltrakt ist dem Menschen ähnlich. Bei Schweinen wird der Knochen

ebenso wie beim Menschen durch Remodeling erneuert. Die „peak bone mass“ wird etwa mit 2,5 bis drei Jahren erreicht. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass beim Schwein Spontanfrakturen an der Wirbelsäule beschrieben sind (Spencer 1979). Die Tiere sind außerdem groß genug für das Testen von Implantaten oder für die Entnahme von Knochenbiopsaten oder größerer Blutmengen. Beim Schwein lässt sich durch Ovariectomie verbunden mit calciumarmer Fütterung eine ausgeprägte Osteopenie herstellen. Dabei kommt es zu signifikanten Änderungen bei den Remodeling-Parametern und in der Knochenstruktur. Der trabekuläre Knochen der Wirbelsäule verliert signifikant an Knochenmasse und biomechanischer Kompetenz (Mosekilde et al. 1993a; Mosekilde et al. 1993b; Boyce et al. 1995). Allerdings liegt die Knochenmasse und die trabekuläre Knochendichte von Grund auf höher als beim Menschen. Weitere Nachteile der Minipigs sind die hohen Kosten und die schlechte Verfügbarkeit in manchen Gegenden. Da Schweine sehr laut und auch aggressiv reagieren können, sind sie als Versuchstier schlecht geeignet, wenn auf Grund des Versuchsdesigns viele Manipulationen vorgesehen sind.

## **2 Ziel der eigenen Studie**

Es gibt derzeit noch kein geeignetes Großtiermodell für die Osteoporoseforschung. Auf Grund seiner Körpergröße, der guten Handhabung und der mit dem Menschen vergleichbaren Remodeling-Prozesse scheint das Schaf die Anforderungen an solch ein Modell vor allem hinsichtlich orthopädischer Fragestellungen am ehesten erfüllen zu können. In verschiedenen Studien, in denen das Schaf schon Verwendung fand, wurde nachgewiesen, dass Ovariectomie zu moderatem Knochenverlust führt und das Schaf daher als Modell für die postmenopausale Osteoporose dienen kann (Turner et al. 1995b; Fini et al. 2000). Jedoch sind in diesen Studien immer nur einige wenige Parameter bestimmt worden. Ein Ziel unserer Studie war es, durch eine Kombination von Ovariectomie und einer längerfristigen Glukokortikoid-Gabe einen starken Knochenverlust beim Schaf zu erzeugen und die Auswirkungen dieser Behandlung auf Knochendichte, Knochenstruktur und mechanische Eigenschaften umfassend zu untersuchen. Die Knochendichte sollte mit Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA) und peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT) – zwei in der Praxis üblichen Verfahren der Osteodensitometrie – überprüft werden. Für die Untersuchung der Knochenstruktur kamen neben dem Mikrocomputertomograph ( $\mu$ CT) auch histomorphometrische Methoden zum Einsatz. Die mechanischen Eigenschaften wurden mit Drucktests analysiert. Verglichen wurden die Ergebnisse mit einer Kontrollgruppe und einer nur ovariectomierten Gruppe ohne Glukokortikoid-Behandlung. Besonderes Augenmerk lag auf den Veränderungen der Spongiosa, da sowohl Östrogenmangel als auch Glukokortikoide hauptsächlich auf trabekulären Knochen wirken.

Letztendlich war das Ziel der hier vorgelegten Arbeit, das ovariectomierte und glukokortikoid-behandelte Schaf als Großtiermodell für die Osteoporoseforschung zu evaluieren und zu etablieren.

## **3 Material & Methoden**

### **3.1 Tiermodell**

Für die Studie verwendeten wir 25 weibliche württembergische Merinolandschafe. Die Schafe waren zu Beginn des Versuchs vier bis sieben Jahre alt (Zahnalter nach Nickel et al. 1987) und hatten ein Gewicht von  $88,7 \pm 8,8$  kg. Die Tiere stammten aus der Schäferei Feinauer in Breitingen. Die Schafe waren im Zentralen Tierforschungszentrum der Universität Ulm am Oberberghof untergebracht. Sie wurden in einem Laufstall mit Stroheinstreu und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von zwölf Stunden (Licht: 6 Uhr bis 18 Uhr) gehalten. Zwischen April und Oktober durften sie tagsüber für mehrere Stunden auf die Weide. Die Fütterung bestand aus Heu ad libitum, 750 g/Tier Grascobs und 350 g/Tier pelletiertes Zucht- und Haltungsfutter für kleine Klautiere (altromin 0133; Calcium 0,90 %, Phosphor 0,60 %, Vitamin D3 600 IE; Fa. Altromin, Lage), das ihnen einmal täglich zugeteilt wurde. Die Tiere hatten Wasser ad libitum zur Verfügung.

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere mit inaktiviertem Tollwutimpfstoff (Rabisin<sup>®</sup>; Fa. Merial, Hallbergmoos) und mit inaktiviertem Pasteurellen- und Clostridienimpfstoff (Heptavac<sup>®</sup> P plus; Fa. Intervet, Unterschleißheim) geimpft. Zudem wurden über den gesamten Versuchszeitraum hinweg in regelmäßigen Abständen Kotproben auf Parasiten untersucht. Bei Bedarf bekamen die Schafe das Breitspektrum-Parasitizid Moxidectin (Cydectin<sup>®</sup> 0,1 %; Fa. Fort Dodge Veterinär GmbH, Würselen). Zur Prophylaxe und Behandlung des Befalls mit Weide- und Schaflausfliegen sowie Läusen und Haarlingen wurde Deltamethrin (Butox<sup>®</sup> 7,5; Fa. Hoechst, Wiesbaden) verwendet.

Die Durchführung des Versuchs wurde am 03.03.1999 gemäß Tierschutzgesetz in der Neufassung vom 25.05.1998 vom Regierungspräsidium Tübingen unter der Nummer 656 genehmigt.

## 3.2 Projektablauf

### 3.2.1 Gruppeneinteilung

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere nach dem Zufallsprinzip in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe (acht Tiere) stellte die Kontrollgruppe dar. Die zweite Gruppe (acht Tiere) wurde nur ovariektomiert (OVX-Gruppe), während die Tiere der dritten Gruppe (acht Tiere) ovariektomiert und zusätzlich über sechs Monate hinweg mit Glukokortikoiden behandelt wurden (OVX+GLU-Gruppe). Zwischen den Gruppen bestanden weder Alters- noch Gewichts- oder Haltungsunterschiede. Gleich zu Beginn des Versuchs wurde zusätzlich ein Ersatzschaf der Kontrollgruppe zugeteilt, weil bei einem der Kontrolltiere ein Othämatom festgestellt wurde und es daher nicht sicher war, ob dieses Tier bis zum Ende des Versuchs zur Verfügung stehen würde. Da das Ohr aber nach chirurgischer Behandlung problemlos abheilte, verblieb das Tier im Versuch, so dass die Kontrollgruppe aus insgesamt neun Tieren bestand. In der OVX+GLU-Gruppe mussten wir dagegen ein Tier auf Grund klinischer Probleme vorzeitig töten (Näheres siehe Kapitel 4.1). Die Daten dieses Tieres wurden aus den Ergebnissen komplett herausgenommen. Die ovariektomierte und mit Glukokortikoiden behandelte Gruppe bestand somit nur aus sieben Tieren.

### 3.2.2 Ovariektomie

Zu Beginn der Studie wurden die Tiere der Gruppen OVX und OVX+GLU ovariektomiert. Präoperativ mussten die Tiere bei erhaltener Flüssigkeitszufuhr 48 Stunden fasten. Die linke Flankengegend wurde großzügig geschoren. Die Prämedikation erfolgte mit 1,2 mg/kg Körpergewicht Xylazin (Rompun<sup>®</sup> 2%ig; Fa. Bayer, Leverkusen) subkutan und 0,04 mg/kg Körpergewicht Atropin (Atropinsulfat 0,5 mg; Fa. Braun, Melsungen) subkutan. Nach einer Wartezeit von zehn Minuten wurden die Tiere in den Vorbereitungsraum gebracht, wo sie in rechter Seitenlage auf einem Tisch gelagert wurden. Die Außenfläche der rechten Ohrmuschel wurde rasiert und desinfiziert und anschließend ein Venenverweilkatheter (Venflon<sup>™</sup> 1,0 x 32 mm) in die Vena auricularis intermedia (ersatzweise in die Vena auricularis lateralis) gelegt. Durch diesen Zugang erhielten die Schafe Thiopental-Natrium (Trapanal<sup>®</sup> 2,5 g; Fa. Byk Gulden, Konstanz) in einer

Dosis von 10–20 mg/kg nach Wirkung. Die Tiere wurden intubiert (Tubus Nr. 9) und an das Narkosegerät angeschlossen. Die Inhalationsnarkose wurde mit 4 % Halothan eingeleitet und mit 1–1,2 % Halothan in der Atemluft bei Spontanatmung aufrechterhalten. Eine Pansenschlundsonde verhinderte das Aufgasen des Pansens. Während der gesamten Operationsdauer erhielten die Tiere physiologische Kochsalzlösung als Dauertropfinfusion. Die Operationsfläche in der linken Flankengegend wurde mit Wundbenzin entfettet, rasiert, mit Seifenwasser gewaschen und abgetrocknet. Anschließend erfolgte die erste und zweite Desinfektion mit 70 % Alkohol. Im Operationsraum wurden die Schafe ebenfalls in rechter Seitenlage auf dem Tisch gelagert und die Gliedmaßen ausgebunden. Das Operationsfeld wurde ein drittes Mal mit 70 % Alkohol desinfiziert. Die Abdeckung der Tiere erfolgte großzügig mit sterilen Tüchern, das Operationsfeld selbst wurde mit Opsitefolie<sup>®</sup> (Fa. B. Braun-Dexon, Spangenberg) zugeklebt. Der Hautschnitt lag in der linken Flanke in der Mitte zwischen letzter Rippe und Tuber coxae, etwa eine Handbreit unterhalb der Querfortsätze der Lendenwirbel. Der Schnitt war 10–15 cm lang. Die Schnittführung verlief dorsoventral. Anschließend wurde in die Tiefe präpariert, wobei die Bauchmuskeln jeweils in Faserverlauf durchtrennt wurden. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurden die Ovarien aufgesucht und vorverlagert (Abb. 1). Mit drei doppelten Ligaturen (Mersilene<sup>®</sup> 2-0; Fa. Ethicon, Norderstedt) wurden die zuführenden Gefäße und Eileiter abgebunden und die Ovarien entnommen. Anschließend wurde der Sitz der Ligaturen sorgfältig überprüft. Das Peritoneum wurde fortlaufend mit Mersilene<sup>®</sup> 2-0 (Fa. Ethicon, Norderstedt), die Muskulatur mit Einzelknopfheften (Vicryl<sup>®</sup> 2-0; Fa. Ethicon, Norderstedt) genäht. Das Subkutangewebe wurde mit Vicryl<sup>®</sup> 4-0 (Fa. Ethicon, Norderstedt) und die Haut mit Resolon<sup>®</sup> 3-0 (Fa. Resorba, Nürnberg) ebenfalls mit Einzelknopfheften verschlossen. Im Anschluss an die Operation erhielten die Tiere zur Infektionsprophylaxe 12,5 mg/kg Ampicillin (Ampi-Sleecol<sup>®</sup> 100 mg; Fa. Albrecht, Aulendorf) s.c. und zur Linderung von postoperativem Wundschmerz 50 mg/kg Metamizol i.v. (Novalgin<sup>®</sup> 500 mg; Fa. Hoechst, Unterschleißheim). Bis zum Entfernen der Hautnaht nach zehn Tagen wurden die Tiere in Dreiergruppen in Strohboxen (2 x 2 m) gehalten, wo sie sich sofort nach der Operation frei bewegen konnten (Abb. 1). Sie wurden täglich tiermedizinisch kontrolliert.



Abb. 1: Bilder einer Ovariectomie. Vorverlagerung und Abklemmen eines Ovars (links), ektomierte Ovarien (rechts oben), Schaf nach der OP (rechts unten).

### 3.2.3 Glukokortikoid-Gabe

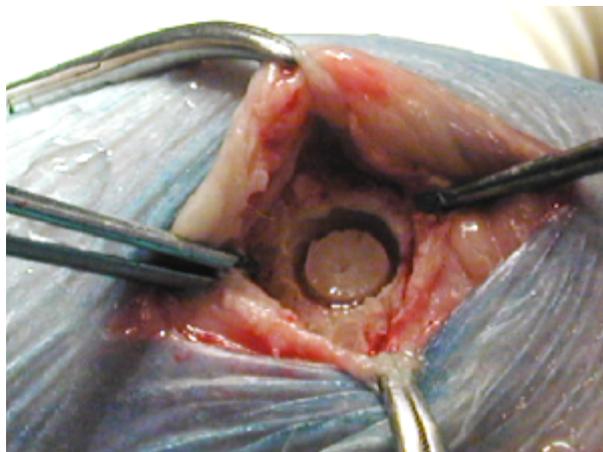
Ab der dritten Woche nach der Ovariectomie bekamen die Tiere der OVX+GLU-Gruppe täglich morgens um acht Uhr Glukokortikoide subkutan an der seitlichen Brustwand injiziert. Bei dem verwendeten Präparat handelte es sich um Methylprednisolon-21-hydrogen-succinat (Medrate<sup>®</sup>Solubile 40; Fa. Pharmacia & Upjohn, Erlangen). In den ersten zehn Wochen betrug die Dosis 0,30 mg/kg Körpergewicht. Danach wurde die Dosis auf 0,45 mg/kg Körpergewicht erhöht und zwölf Wochen beibehalten. Anschließend reduzierten wir die Dosis über sechs Wochen schrittweise auf 75 %, 50 %, 25 % und 12,5 % („Ausschleichen“ der Behandlung).

### 3.2.4 DXA-Messungen

Zu Beginn des Versuchs und anschließend alle drei Monate bis zum Versuchsende wurde bei allen Tieren eine Knochendichtemessung an der Wirbelsäule, dem Calcaneus und der distalen Tibia durchgeführt. Dafür wurde die Methode der Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA) angewendet, bei der die quantitative Bestimmung der Knochenmasse durch die lineare Schwächung von Röntgenstrahlen beim Durchgang durch die Materie erfolgt. Man erhält die Knochenmineraldichte (BMD), das heißt den Mineralgehalt (BMC) pro Flächeneinheit in  $\text{g}/\text{cm}^2$ . Bei dem verwendeten Gerät handelte es sich um ein XR-26 X-ray Bone Densitometer der Firma Norland (Fort Atkinson, Wisconsin, USA) mit der dazugehörigen Messsoftware (Version 2.5.2). Die korrekte Funktion des Gerätes und die Strahlstabilität der Röntgenröhre wurden jedes Mal vor Inbetriebnahme durch Messung eines speziellen Absorptionsphantoms überprüft. Zur Kontrolle der Langzeitstabilität wurde zusätzlich ein Lendenwirbel-Phantom aus Hydroxylapatit verwendet. Vor Beginn der eigentlichen Knochendichtemessung wurden die Schafe leicht sediert. Dazu bekamen sie 0,5–0,8 ml Xylazin (Rompun<sup>®</sup> 2%ig; Fa. Bayer, Leverkusen) subkutan an der seitlichen Brustwand injiziert. Die Tiere wurden in linker Seitenlage von drei Personen auf dem Messtisch fixiert. Zur Bestimmung der Knochendichte an der Wirbelsäule wurden drei Landmarken festgelegt: am Übergang der Brust- in die Lendenwirbelsäule distal der letzten Rippe, an der Lendenwirbelsäule auf Höhe des Tuber coxae und im Abdomen (Weichteilpunkt). Anschließend wurde ein grober Vorscan zur Orientierung aufgenommen, anhand dessen man den eigentlichen Scanbereich zwischen den Lendenwirbeln 2 und 4 genau festlegen konnte. Nach Beendigung der Wirbelsäulenmessung wurden drei Landmarken an der linken Hintergliedmaße festgelegt: am Tarsus, am Tibiaschaft in Höhe des proximalen Endes des Calcaneus und im Bereich der Achillessehne (Weichteilpunkt). Dieser Bereich wurde ohne Orientierungsscan direkt gemessen.

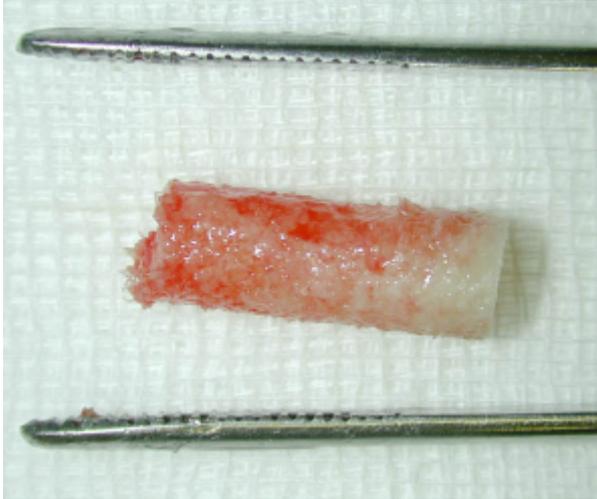
### 3.2.5 Biopsie

Sechs Monate nach den Ovariectomien wurde bei jedem Schaf ein Biopat aus der Spongiosa der Epiphyse der rechten Tibia entnommen. Die Operationsvorbereitungen entsprachen exakt der Vorgehensweise bei den Ovariectomien (siehe Kapitel 3.2.2). Allerdings wurden die Tiere in Rückenlage gelagert. Der Hautschnitt wurde an der medialen Seite der rechten Hintergliedmaße über der proximalen Tibia direkt unterhalb des Kniegelenks auf einer Länge von 4–6 cm von proximal nach distal geführt. Das darunter liegende Bindegewebe wurde präpariert, bis das Periost freigelegt war. Die Knochenhaut wurde durchtrennt und mittels Raspatorium vom Knochen abgelöst. Die Entnahmestelle lag zentral auf der Facies medialis etwa 5 mm distal des Gelenkspaltes. Da eine Biopsie des trabekulären Knochens genommen werden sollte, wurde die Kortikalis in einer Tiefe von 1 mm vorgebohrt. Anschließend wurde ein Hohlbohrer mit einem Innendurchmesser von 6 mm angesetzt und 10 mm tief gebohrt (Abb. 2).



*Abb. 2: Entnahmestelle des Biopats an der Facies medialis der rechten Tibiaepiphyse*

Der Bohrer wurde vorsichtig entfernt und das Extraktionswerkzeug eingeschlagen. Durch leichtes Drehen konnte das Biopat abgebrochen und extrahiert werden (Abb. 3). Es wurde sofort nach der Entnahme in ein Gefäß mit Kochsalzlösung gegeben. So wurde das Austrocknen des Knochens verhindert.



*Abb. 3: Biopsat nach der Extraktion*

Der gesetzte Defekt wurde mit Calciumphosphatzement (Biozement D<sup>®</sup>; Fa. Merck, Darmstadt) aufgefüllt. Das Periost und die Unterhaut wurden jeweils mit Einzelknopfheften (Vicryl<sup>®</sup> 2-0; Fa. Ethicon, Norderstedt) verschlossen. Die Haut wurde mit Resolon<sup>®</sup> 3-0 (Fa. Resorba, Nürnberg) ebenfalls mit Einzelknopfheften genäht. Zum Schutz der Operationsfläche wurde ein Pflasterverband angelegt. Die Tiere erhielten wiederum 12,5 mg/kg Ampicillin (Ampi-Sleecol<sup>®</sup> 100 mg; Fa. Albrecht, Aulendorf) s.c. zur Infektionsprophylaxe und 50 mg/kg Metamizol (Novalgin<sup>®</sup> 500 mg; Fa. Hoechst, Unterschleißheim) i.v. zur Linderung postoperativer Schmerzen. Die Unterbringung und die tierärztliche Nachsorge entsprach der nach den Ovariectomien (siehe Kapitel 3.2.2). Die zylindrischen Biopsate wurden mit einer Diamant-Säge (EXACT; Fa. PSI-Grünwald-Exakt, Laudenbach) so bearbeitet, dass zwei parallele, glatte und kreisförmige Endflächen entstanden und alle kortikalen Anteile entfernt waren. Anschließend wurden die Proben bei -20 °C tiefgefroren.

### 3.2.6 Versuchsabschluss

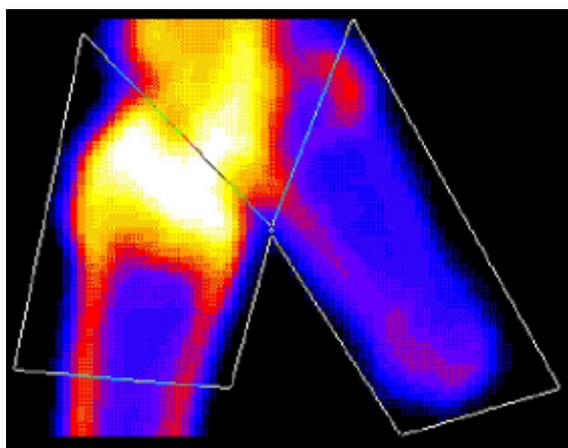
Zwölf Monate nach Versuchsbeginn erfolgte die Tötung der Tiere durch Betäubung mittels Bolzenschussapparat und anschließendem Entbluten. Den Tieren wurden beide Hintergliedmaßen und die Lendenwirbelsäule entnommen. Alle Knochen wurden explantiert und das Weichgewebe einschließlich Periost sorgfältig abpräpariert. Es wurde darauf geachtet, die Knochen während der folgenden Untersuchungen stets mit physiologischer Kochsalzlösung feucht zu halten.

Es wurde wiederum eine Biopsie an der Tibia vorgenommen. Entnahmestelle war diesmal die Facies medialis der linken Tibiaepiphyse. Das Periost wurde sauber abgelöst und die Kortikalis auf 1 mm Tiefe vorgebohrt. Anschließend wurde der Hohlbohrer angesetzt und mit einem Durchmesser von 6 mm und einer Tiefe von 10 mm gebohrt. Mit Hilfe des Extraktionswerkzeugs wurde das Bioptat herausgelöst. Auch an der Wirbelsäule wurden Biopsien vorgenommen. Dazu wurde am Körper des 4. Lendenwirbels die Extremitas cranialis und die Extremitas caudalis von den Resten der Zwischenwirbelscheiben vollständig befreit. Mit dem Hohlbohrer wurde zentral an jeder der beiden Flächen je ein Bioptat entnommen. Die Vorgehensweise entsprach der an der Tibia. Alle Bioptate wurden sofort nach der Extraktion in physiologischer Kochsalzlösung feucht gehalten. Außerdem wurden Calcaneus und 1. Lendenwirbel extrahiert und von allem Weichgewebe befreit. Die Fortsätze des Wirbels wurden abgesetzt. Für die histomorphometrische Untersuchung wurden die Femurkondylen am Übergang zur Diaphyse abgesetzt und feucht gehalten.

### 3.3 Auswertung

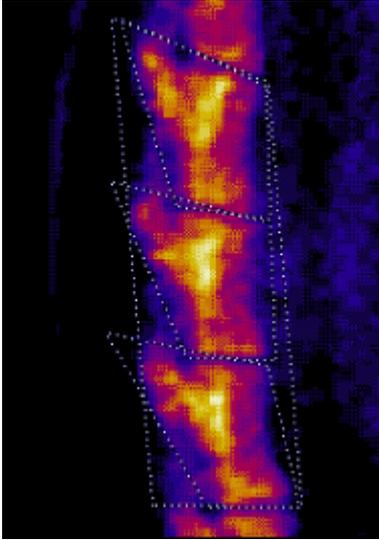
#### 3.3.1 DXA-Messungen

Die Auswertung der DXA-Scans erfolgte mit einer speziellen Auswertesoftware (XR-26 Software Version 3.9.4). Die sogenannte „region of interest“ (ROI) wurde manuell mit Hilfe von an den Ecken beweglichen Vierecken festgelegt. Durch diese Formvorgabe konnte allerdings dem Knochenverlauf nicht exakt gefolgt werden. Am Calcaneus umfasste die ROI nur den Proximalteil des Knochens, da distal der Gelenkspalt zum Talus nicht genau dargestellt werden konnte und damit eine eindeutige Begrenzung nicht möglich war. Die ROI an der Tibia umfasste deren distales Endstück und den Übergang in die Diaphyse (Abb. 4). Für eine bessere Vergleichbarkeit der Dichtewerte wurden die ausgewerteten Flächen an Calcaneus und Tibia für jedes Tier so gewählt, dass sie zu allen Messzeitpunkten gleich groß waren.



*Abb. 4: Regions of interest (ROI) am Calcaneus (rechts im Bild) und an der distalen Tibia (links im Bild). Die hellen Bereiche entsprachen einer hohen Knochendichte, die dunklen Bereiche einer niedrigen Knochendichte.*

An der Wirbelsäule wurde für jeden der gemessenen Wirbel (2. bis 4. Lendenwirbel) eine eigene ROI festgelegt, die den Wirbelkörper und den Processus spinosus einschloss. Die Processus transversi wurden durch die zweidimensionale Darstellung vom Wirbelkörper überlagert. Zusätzlich zu den Analysebereichen der einzelnen Wirbelkörper wurde noch eine ROI über den Gesamtbereich L2–4 gelegt (Abb. 5). Die Berechnung des Knochenmineralgehaltes (BMC) und der Knochenmineraldichte (BMD) erfolgte automatisch.



*Abb. 5: Regions of interest (ROI) an der Wirbelsäule. Die hellen Bereiche besonders hoher Knochendichte entstanden durch die Überlagerung von Wirbelkörper und Processus transversi.*

### 3.3.2 Periphere Quantitative Computertomographie (pQCT)

Für Messungen am pQCT kamen folgende Proben zum Einsatz: Biopate der Tibia zu den Zeitpunkten 6. und 12. Monat, Biopate von L4 (12. Monat), Wirbelkörper von L1 sowie Calcaneus. Bei dem verwendeten Gerät handelte es sich um einen CT-Bone-Scanner XCT 960 der Firma Stratec (Pforzheim) mit der dazugehörigen Mess- und Auswertesoftware (Version 5.20). Vor Beginn der Analysen wurde ein Standardphantom aus Hydroxylapatit (Phantom 0.495, Nr. 91068) gemessen.

Die Biopate wurden in ein mit physiologischer Kochsalzlösung gefülltes Pipettiergefäß ( $\varnothing$  8 mm) gegeben. Das Röhrchen wurde ohne Luftblasen verschlossen und an ein passendes Plexiglasröhrchen (CT-Zubehör) angesteckt. Es wurde mittig im pQCT platziert. Zur Definition der exakten Messpositionen wurde ein 30 mm langer „Scoutview“ aufgenommen, aus dem ein farblich codiertes Rasterbild ähnlich einer Röntgenaufnahme entstand. Anhand dieser Aufnahme wurden die Messorte manuell festgelegt, indem eine Referenzlinie mittig zwischen die beiden Endflächen des Biopats gelegt wurde. Bei den Tibiabiopaten wurden fünf Querschnittscans im Abstand von 0,75 mm, bei den L4-Biopaten dagegen nur drei Aufnahmen im Abstand von 2 mm gefertigt. Die ROI wurde mit Hilfe eines Rechtecks, das den Knochenquerschnitt einschloss, festgelegt. Die Querschnitte

wurden automatisch nach Gesamtdichte, Gesamtfläche, trabekulärer Dichte und trabekulärer Fläche ausgewertet. Da es sich um rein trabekuläre Proben handelte, ist auch die Gesamtdichte eine trabekuläre Dichte, beinhaltete jedoch auch durch das Bohren entstandene Artefakte am Rand des Zylinders. Zur Herausrechnung dieser Artefakte wurde eine separate trabekuläre Dichte bestimmt, bei der durch einen vorher definierten Abschälmodus 50 % der Fläche konzentrisch vom Rand entfernt und somit nur das Querschnittszentrum berücksichtigt wurde (Abb. 6).

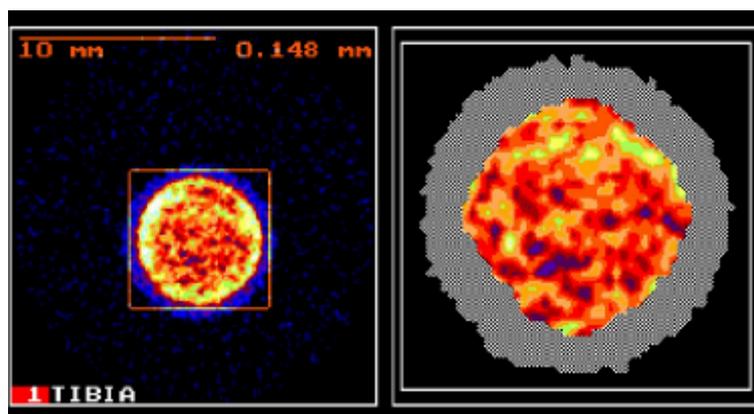


Abb. 6: Mit pQCT gescannter Querschnitt eines Tibia-bioptats und festgelegte ROI (links). Konzentrisches Abschälen der äußeren Anteile zur Bestimmung der trabekulären Dichte (rechts).

Der Calcaneus wurde auf einer Plexiglasschiene im pQCT platziert. Mit Hilfe eines Scoutviews wurde der Messbereich in der Mitte des Knochens festgelegt und ein Querschnittscan aufgenommen. Der Computer errechnete Gesamtdichte und -fläche. Die trabekuläre Dichte und Fläche des Knochens wurden durch das konzentrische Abschälen von 5 % der äußeren Anteile ermittelt (Abb. 7).

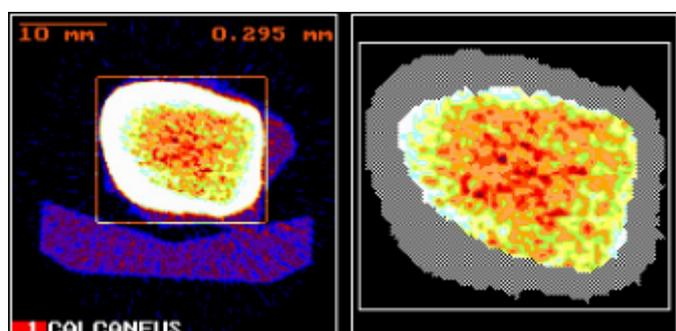


Abb. 7: pQCT-Querschnittscan des Calcaneus (links) und trabekulärer Anteil (rechts)

Auch der Wirbelkörper von L1 wurde auf der Plexiglasschiene fixiert. Der zu messende Bereich wurde ohne Übersichtsscan manuell mit einem Laserpunkt markiert. Der Messort befand sich auf Höhe der abgesetzten Fortsätze zentral am Wirbelkörper. Analysiert wurde der ventrale Teil des Querschnitts ohne den Wirbelkanal (Abb. 8). Davon ausgehend wurde die gesamte Dichte und Fläche bestimmt sowie die trabekuläre Dichte nach Abschälen von 40 % der Gesamtfläche.

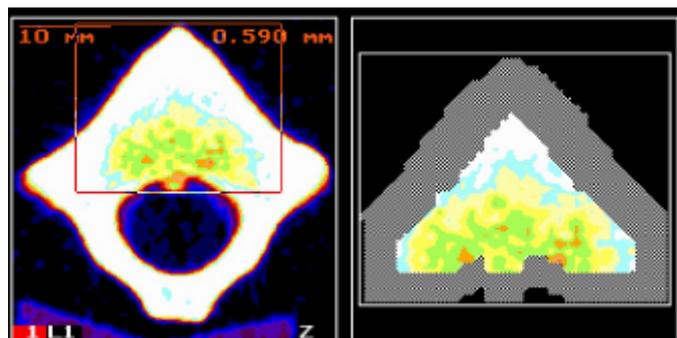
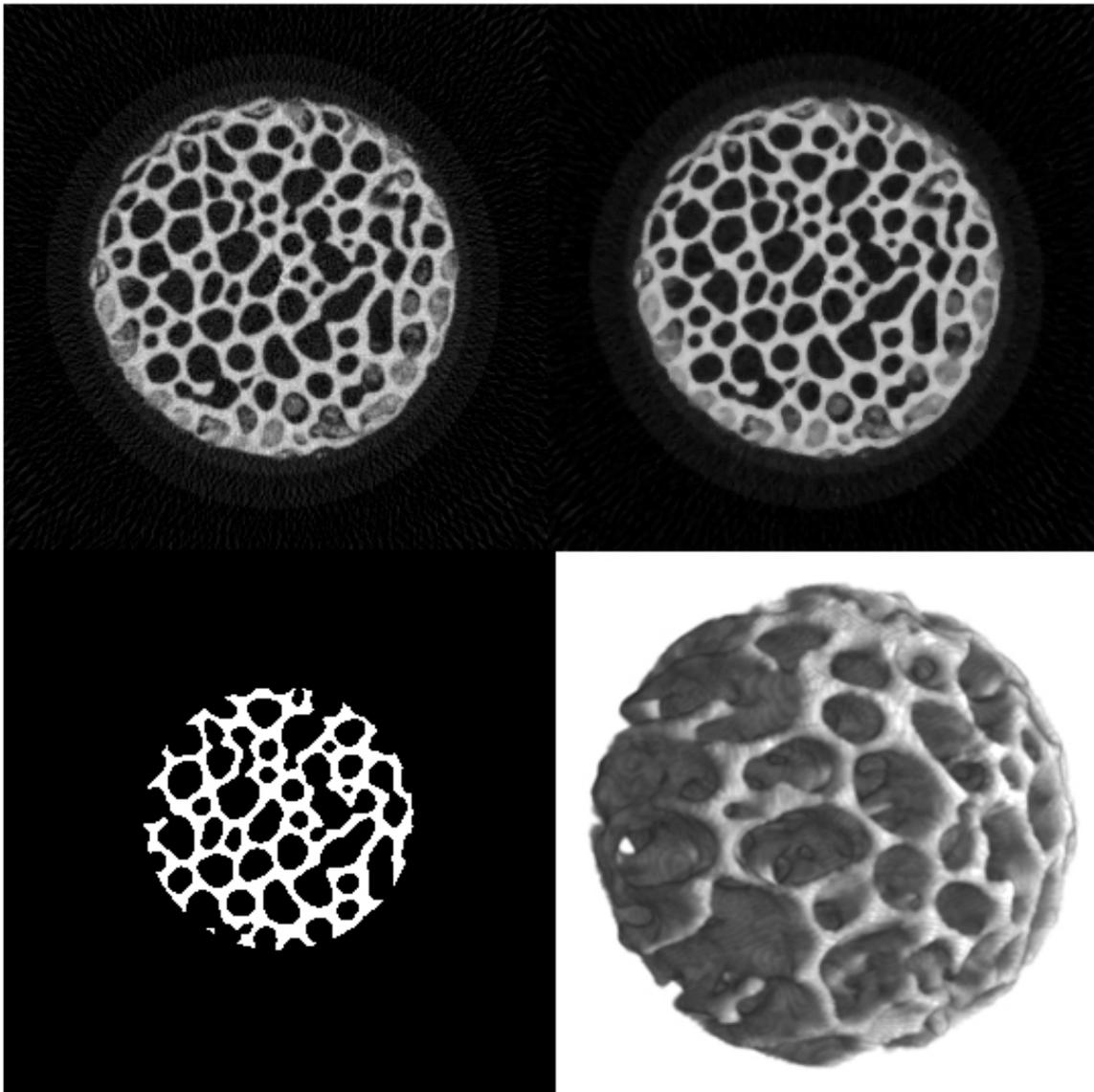


Abb. 8: pQCT-Querschnittscan des Wirbelkörpers von L1: die ROI umfasste nur den ventralen Anteil ohne den Wirbelkanal (links). Trabekulärer Anteil (rechts).

### 3.3.3 Mikrocomputertomographie ( $\mu$ CT)

Für die  $\mu$ CT-Analyse der Tibia- und Lendenwirbel-Bioptate stand ein Fan Beam  $\mu$ -Scope der Firma Stratec, Pforzheim, mit der dazugehörigen Software zur Verfügung. Von allen Biopaten wurde ein Übersichtsscan mit einer Auflösung von 30  $\mu$ m aufgenommen. Diese Übersichtsaufnahme umfasste das komplette Biopat. Anhand der Aufnahme wurde manuell das Zentrum des Biopats bestimmt und 150 Schnitte jeweils im Abstand von 30  $\mu$ m angefertigt. Das entstandene Bild wurde mit dem Bildverarbeitungsprogramm *analySIS*<sup>®</sup> (Fa. Soft Imaging Systems, Münster) aufgearbeitet. Zunächst wurde das Bild innerhalb jeder Ebene und zwischen den Ebenen mit einem Medianfilter geglättet. Dadurch entstanden sanftere Übergänge und das „Rauschen“ des Bildes wurde minimiert. Mit Hilfe eines Schwellenwertes (60 % des maximalen Dichtewertes) wurde das Bild binarisiert. Alle Strukturen oberhalb des Schwellenwertes wurden als Knochen definiert. Schließlich wurden noch Artefakte durch isolierte Partikel beseitigt. Dazu wurden alle isolierten Partikel, deren Fläche weniger als 50 Pixel (entsprechend 0,045 mm<sup>2</sup>) betrug, identifiziert und entfernt. Die aufgearbeiteten Bilder wurden mit einer speziellen Software ausgewertet. Dieses Programm wurde nach einer Vorlage von John A. Hipp

(Simmons und Hipp 1997) eigens für diese Analyse erstellt. Die 150 Schnitte wurden zu einem Zylinder zusammengesetzt, aus dessen Zentrum eine Kugel mit einem Durchmesser von 120 Pixeln definiert wurde (Abb. 9).



*Abb. 9: Aufarbeitung eines  $\mu$ CT-Bildes. Der Originalscan (oben links) wurde mit einem Medianfilter geglättet (oben rechts) und dann binarisiert (unten links). Ausgewertet wurde schließlich eine Kugel (unten rechts).*

Innerhalb des Gesamtvolumens der Kugel (Tissue Volume; TV) wurde das Volumen der Knochenmatrix (Bone Volume; BV) sowie deren Oberfläche (Bone Surface; BS) bestimmt. Daraus konnte direkt der Anteil des Knochenvolumens

(BV/TV) und die Knochenoberfläche (BS/BV) berechnet werden. Auf der Grundlage des „parallel plate model“ (Parfitt et al. 1983) ließen sich aus diesen Parametern die Trabekeldicke (Trabecular Thickness; Tb.Th.) und die Trabekelanzahl (Trabecular Number; Tb.N.) wie folgt berechnen:

$$\text{Tb.Th.} = \frac{\text{BV}}{\text{TV}} \times \frac{1}{\text{Tb.N.}}$$

$$\text{Tb.N.} = \frac{1}{2} \times \frac{\text{BS}}{\text{TV}}$$

### 3.3.4 Biomechanik

Die Tibiabiopate wurden einer uniaxialen nicht-zerstörenden Druckprüfung unterzogen (Abb. 10). Dabei wurden die Biopate so belastet, dass sie sich lediglich im elastischen Bereich verformten, das heißt die Verformung war nach Beendigung der Prüfung voll reversibel. Durch die Belastung der Biopate erzielte man eine Verkürzung des Probekörpers. Aus den Werten der aufgebrachten Druckkraft und der erreichten Verkürzung des Zylinders ließ sich eine Aussage über seine mechanischen Materialeigenschaften ableiten. Es wurde eine Materialprüfmaschine Typ 1445 der Firma Zwick (Ulm) mit dem dazugehörigen Prüfprogramm für Zug-, Druck- und Biegeprüfungen (Version 5.50A) benutzt. Die Kraftmessdose U2A (Fa. Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt) hatte einen Messbereich von = 500 N. Die Materialprüfmaschine sowie alle verwendeten Längenänderungsaufnehmer (MT 25; Fa. Heidenhain, Traunreuth) und Kraftmessdosen wurden einmal jährlich von der Firma Zwick kalibriert. Die Biopate wurden so auf der unteren Druckplatte positioniert, dass die Kraftwirkungslinie während des Druckversuchs genau mittig durch den Probekörper verlief. Die Proben wurden mit einer Vorkraft von 5N und einer Geschwindigkeit von 0,5 mm/min vorbelastet. Die Prüfgeschwindigkeit betrug 1 mm/min. Die Bruchabschaltschwelle wurde auf 10 % der Maximalkraft und die Längenänderungsbegrenzung auf maximal 5 % der Vorgabe festgelegt. Nach Ende der Messung erhielt man eine Messkurve. Die beiden E-Modul-Ermittlungspunkte kamen im linearen Bereich der Kurve zu liegen. Die Berechnung des Elastizitätsmoduls [MPa] erfolgte automatisch. Anschließend wurden die

Tibiabiotate um 180 Grad gedreht und der Versuch erneut durchgeführt. Aus den beiden E-Modul-Werten wurde der Mittelwert gebildet.

Die Biotate der Lendenwirbelsäule wurden dagegen bis zum Bruch belastet (zerstörende Druckprüfung). Die zerstörende Druckprüfung erfolgte mit einer Vorkraft von 5N und einer Geschwindigkeit von 1 mm/min. Alle anderen Parameter blieben gleich. Aus der Messkurve konnte wiederum das Elastizitätsmodul [MPa] im linearen Bereich der Kurve und zusätzlich die Druckfestigkeit [MPa] bis zum Zerstören der Probe ermittelt werden.



*Abb. 10: Uniaxiale Druckprüfung eines Tibiabiotats.*

### 3.3.5 Histologie

Für die nachfolgenden histomorphometrischen Analysen wurden aus den medialen und lateralen Femurkondylen der linken Hintergliedmaße histologische Präparate hergestellt. Dies erfolgte mittels Trenn-Dünnschliff-Technik nach Prof. Donath am unentkalkten Knochen. Die Präparate wurden in unfixiertem Zustand gleich nach der Entnahme zugesägt (Diamant-Säge EXAKT; Fa. PSI-Grünwald-Exakt, Laudenbach) und mit abgepufferter neutraler 4 %-Formalinlösung fixiert.

Durch Verwendung einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate entwässert. Die Femurkondylen wurden mit einem Methylmethacrylat-Monomer (MMC; Fa. Polyscience, Eppelheim) infiltriert und ausgehärtet. Nach Aushärten der Präparate wurden diese planparallel zugeschleift (Tischschleifmaschine T6250/1; Fa. Jean Wirtz Hahn & Kolb, Stuttgart). Mit einem Mikroschleifsystem (Fa. PSI-Grünwald-Exakt, Laudenbach) wurde der Block so lange mit immer feinerem Schleifpapier angeschliffen, bis das Gewebe gut sichtbar war. Nachdem die Oberfläche gereinigt und mit Wundbenzin entfettet worden war, konnte ein zweiter Objektträger aufgeklebt werden. Mit einem Trennsystem (Fa. PSI-Grünwald-Exakt, Laudenbach) wurde die Probe durchtrennt. Zur Herstellung des Dünnschliffs wurde ein Mikroschleifsystem (Fa. PSI-Grünwald-Exakt, Laudenbach) benutzt, mit dem die Präparate bis zur gewünschten Schichtdicke von ca. 80 µm abgeschliffen werden konnten. Das Dünnschliffpräparat wurde abschließend noch in mehreren Stufen poliert, bis alle Unebenheiten ausgeglichen waren.

Die Präparate wurden mit Paragon gefärbt. Da der Paragon-Farbstoff beim ursprünglichen Hersteller (Fa. Paragon C & C, New York, USA) nicht mehr erhältlich ist, wurde eine ähnliche Farbstoffmischung benutzt (Tab. 2). Bei pH = 10 wurden Zellkerne und basophiles Zytoplasma blau angefärbt, Osteoidsäume und Weichgewebe ebenfalls, mineralisierte Matrix blieb jedoch ungefärbt.

*Tab. 2: Aufstellung der für die Paragon-Färbung verwendeten Reagenzien*

<b>Verwendete Reagenzien</b>	<b>Firma</b>
Ethanol, absolut p.a.	Fa. Merck, Darmstadt
Ameisensäure p.a.	Fa. Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt 99,8%	Hausapotheke Universitätsklinikum Ulm
Toluidinblau O	Fa. Chroma-Schmid, Münster
Basisches Fuchsin	Fa. Chroma-Schmid, Münster
VLC 7200	PSI-Grünwald-Exakt, Laudenbach

### 3.3.6 Histomorphometrie

Die Histomorphometrie umfasste einerseits die Untersuchung der trabekulären Strukturen der Femurkondylen und andererseits die quantitative Untersuchung und qualitative Beschreibung der Knorpelstrukturen an der Kondylenoberfläche. Zur Analyse der Knochen trabekel wurde auf dem Deckgläschen über dem histologischen Präparat jeweils ein Auswertefenster für den lateralen und den medialen Kondylus definiert. Dieses Fenster lag mittig im Kondylus 7 mm unterhalb der Knorpeloberfläche und hatte eine Breite von 10 mm und eine Höhe von 6 mm. Die Präparate wurden im Durchlicht-Photomikroskop (Axiophot; Fa. Zeiss, Oberkochen) bei 25facher Vergrößerung ausgewertet. Innerhalb des Auswertefensters wurden 4 x 3 Bilder mäanderförmig abfotografiert und in das Bildverarbeitungsprogramm *analySIS*<sup>®</sup> (Fa. Soft Imaging Systems, Münster) übertragen. Mit Hilfe eines extra für diese Auswertung erstellten Programms wurden die zwölf kleinen Bilder zu einem großen Bild zusammengefügt und das „Rauschen“ des Bildes mit einem Medianfilter beseitigt. In der Mitte dieses Bildes wurde eine „region of interest“ (ROI) in einer Größe von 4740 x 3160  $\mu\text{m}$  definiert (Abb. 11). Durch Schwellwertsetzung wurde das Bild binarisiert und die Knochenareale festgelegt. Anschließend wurden Einzelpartikel beseitigt. Anhand des fertigen Schwarzweißbildes wurden automatisch Fläche und Umfang der Knochen trabekel berechnet und in eine Excel-Tabelle übertragen. Anschließend wurde neu gebildeter Knochen und Osteoid farblich umfahren (manuell) und so gekennzeichnet, dass ebenfalls Fläche und Umfang des Osteoids bestimmt werden konnten (Abb. 12).

Für die quantitative Auswertung des Knorpels wurden zwei Bilder in 12,5facher Vergrößerung abfotografiert und in das Bildverarbeitungsprogramm übertragen. In jedem dieser beiden Bilder wurde an fünf gleichmäßig verteilten Stellen der Abstand zwischen der Knorpel-Oberfläche und dem Übergang zum Knochen gemessen und die mittlere Knorpeldicke bestimmt. Zusätzlich zur quantitativen Analyse wurde eine qualitative Beschreibung des Knorpels durchgeführt. Dabei wurde die Knorpeloberfläche beurteilt. Bewertet wurde, ob die Oberfläche glatt und eben oder eher fransig oder gar zerklüftet war und ob Defekte zu sehen waren, die nicht von der Bearbeitung der histologischen Präparate stammen konnten.

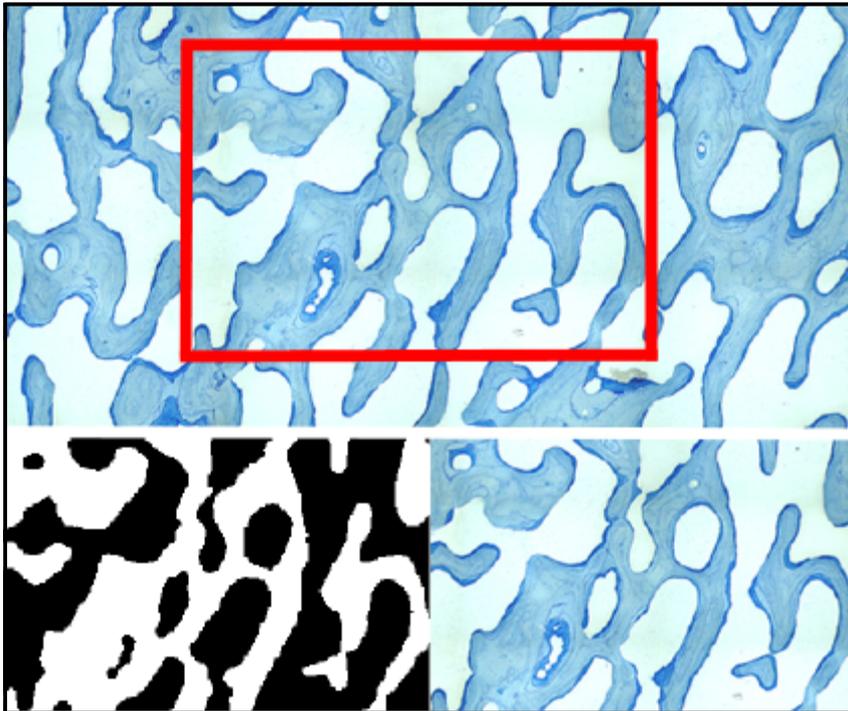


Abb. 11: Aufarbeitung eines Femurkondylen-Bildes. Im Originalbild (oben) wurde eine region of interest (ROI) definiert (unten rechts) und binarisiert (unten links).

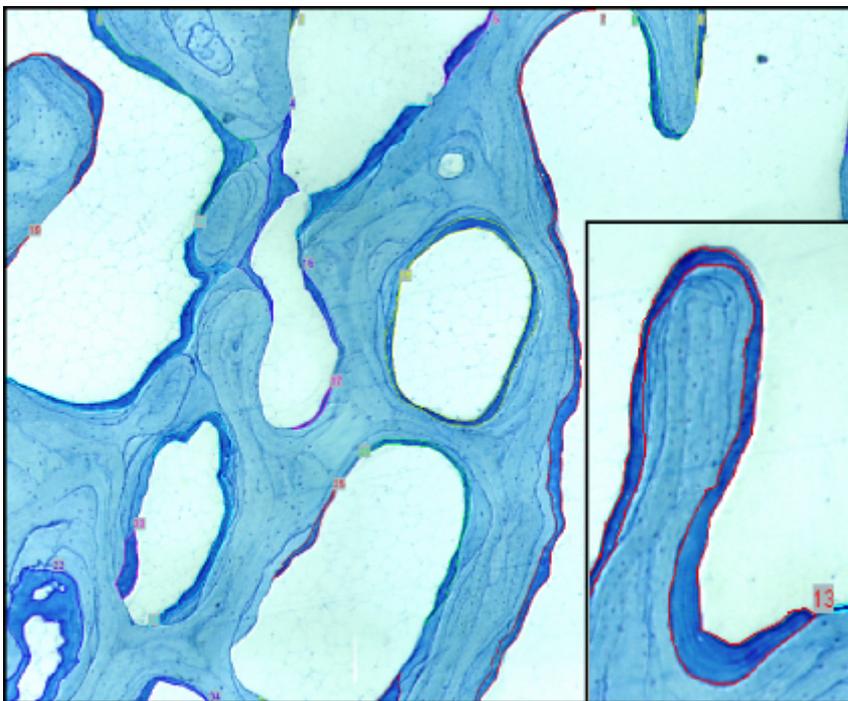


Abb. 12: Histomorphometrische Untersuchung der trabekulären Strukturen in den Femurkondylen. Neu gebildetes Osteoid wurde durch die Paragon-Färbung dunkelblau dargestellt, ältere Strukturen hellblau. Das Osteoid wurde markiert und Fläche und Umfang berechnet.

### 3.3.7 Statistik

Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgte mit Microsoft<sup>®</sup> Excel 98. Als Statistikprogramm zur Berechnung signifikanter Unterschiede wurde JMP<sup>®</sup> (Version 3.2) der Fa. SAS Institute (JMP, SAS Institute, Cary, N.C., U.S.A) verwendet. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mit dem Wilcoxon-Test. Dieses parameterfreie Testverfahren wurde angewendet, da auf Grund der geringen Tierzahl ( $n = 24$ ) nicht von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen werden konnte. Zur Untersuchung, welchen Einfluss der Faktor Zeit auf die Ergebnisse der DXA-Messungen hatte, wurde der Wilcoxon-Test durchgeführt. Dabei wurde die Änderung der Knochendichte bezüglich der Knochendichte zu Versuchsbeginn untersucht. Die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Glukokortikoidgruppe zum selben Messzeitpunkt wurden ebenfalls mit diesem Test berechnet. Auch bei den CT-,  $\mu$ CT- und Biomechanik-Untersuchungen wurde die OVX+GLU-Gruppe mittels Wilcoxon-Test mit der Kontrollgruppe verglichen.

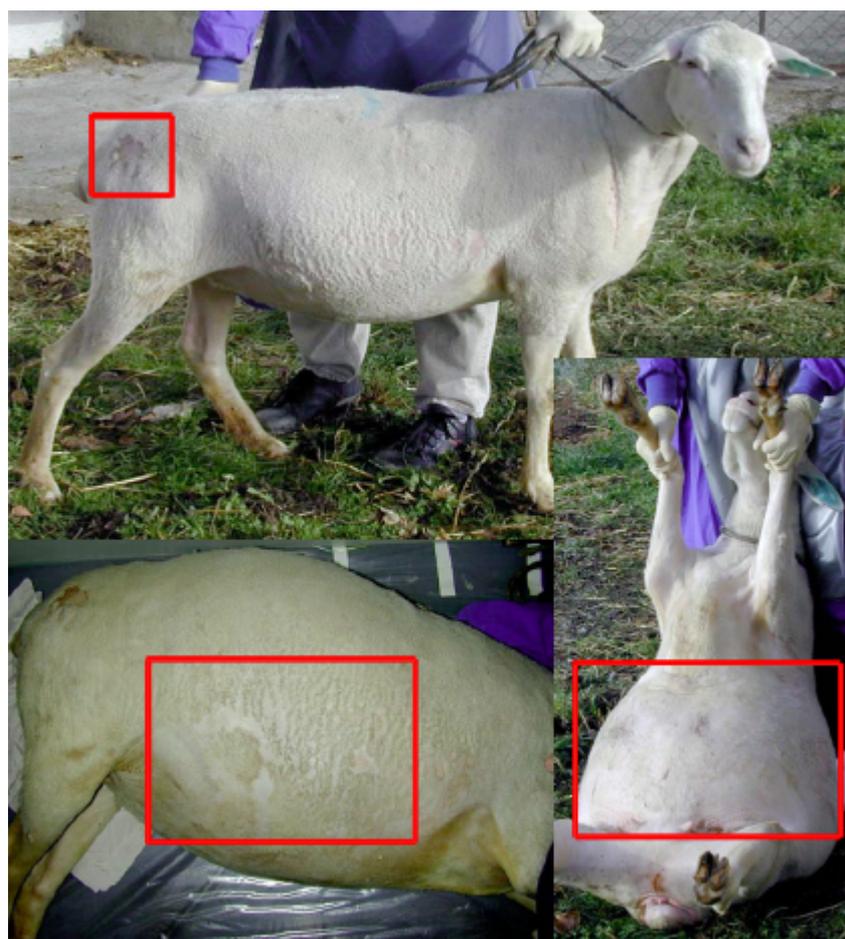
## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Klinischer Verlauf**

Die Operationen verliefen ohne schwerwiegende Zwischenfälle. Ein einziges Mal musste die Narkose vor einer Ovariectomie abgebrochen werden, da die Intubation auf Grund starken Erbrechens des Tieres unmöglich war und es bereits zur Aspiration von Panseninhalt gekommen war. Das Tier bekam über sechs Tage täglich 12,5 mg/kg Ampicillin (Ampi-Sleecol<sup>®</sup> 100 mg; Fa. Albrecht, Aulendorf) s.c. an der seitlichen Brustwand injiziert und wurde zu einem späteren Zeitpunkt problemlos nachoperiert. Bei sechs Tieren kam es während der Ovariectomie zu Blutungen, die aber problemlos gestillt werden konnten. Bei der Biopsie nach sechs Monaten Versuchsdauer gab es bei allen mit Glukokortikoiden behandelten Schafen Probleme. Die Tiere erholten sich nur schlecht von der Operation, hatten über ein bis zwei Wochen ein gestörtes Allgemeinbefinden und wurden vorsorglich mit Ampicillin (täglich 12,5 mg/kg Ampicillin s.c.; Ampi-Sleecol<sup>®</sup> 100 mg; Fa. Albrecht, Aulendorf) behandelt. Bei einem Tier der Kontrollgruppe musste eine zweite Biopsie vorgenommen werden, weil man bei der Extraktion des ersten Biopats in den Markraum durchgebrochen war. Die zweite Entnahmestelle lag deshalb weiter medial direkt vor dem Ligamentum collaterale mediale.

Ein Tier der Gruppe OVX+GLU musste auf Grund einer starken Polyarthritits sieben Monate nach Versuchsbeginn vorzeitig getötet werden. Das Tier ging nach Absetzen der Glukokortikoide hochgradig lahm. Es waren wechselweise alle vier Gliedmaßen betroffen. Die Gelenke, vor allem Karpal- und Tarsalgelenke waren verdickt, schmerzhaft und warm. Das Schaf lag sehr viel, stand ungern auf und verlagerte im Stehen ständig das Gewicht von einem Bein auf das andere. Weder die lokale Einreibung mit einer Diclofenac-haltigen Salbe (Voltaren Emulgel<sup>®</sup>; Fa. Novartis, Nürnberg) noch die systemische Behandlung mit 4 mg/kg Carprofen (Rimadyl<sup>®</sup>; Fa. Pfizer, Karlsruhe) s.c. führten zu einer Verbesserung des Zustandes, so dass dieses Tier aus dem Versuch genommen werden musste.

Bei drei weiteren Tieren dieser Gruppe entwickelte sich ein bis zwei Wochen nach Absetzen der Glukokortikoide ebenfalls eine Polyarthrit. Das äußerte sich ebenfalls darin, dass die Tiere lahnten, wobei wiederum wechselweise alle vier Gliedmaßen betroffen waren. Die Schafe hatten leicht verdickte Karpal- und Tarsalgelenke, die zudem warm und druckempfindlich waren. Auch diese Tiere wurden lokal mit Voltaren Emulgel<sup>®</sup> (Voltaren Emulgel<sup>®</sup>; Fa. Novartis, Nürnberg) behandelt. Zwei der Tiere bekamen jeweils drei Tage lang 4 mg/kg Carprofen s.c. (Rimadyl<sup>®</sup>; Fa. Pfizer, Karlsruhe) injiziert. Der Zustand der Tiere besserte sich und sie wurden im Versuch behalten. Bei einem Tier kam es während der Glukokortikoid-Gabe zu Alopezie und Stammfettsucht im Sinne eines Cushing-Syndroms (Abb. 13). Nach Absetzen der Glukokortikoide gingen die Symptome zurück.



*Abb. 13: Schaf der Gruppe OVX+GLU mit Alopezie (oben; unten links) und Stammfettsucht (unten rechts).*

## 4.2 Gewichtsentwicklung

Im Abstand von vier Wochen wurde das Körpergewicht der Tiere gemessen. Zu Beginn des Versuchs betrug es im Mittel  $88,7 \pm 8,8$  kg. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen. Während des Versuchszeitraumes wurde in allen drei Gruppen eine kontinuierliche Gewichtszunahme beobachtet. Die Tiere der OVX-Gruppe nahmen mit 7,4 kg am deutlichsten zu, die anderen Gruppen lagen mit +5,4 kg (Kontrolle) und +2,7 kg (OVX+GLU) etwas darunter. Im Mittel wogen die Tiere nach Beendigung des Versuchs  $94,6 \pm 7,6$  kg. Die Gewichtsentwicklung der einzelnen Gruppen kann man Tab. 3 entnehmen.

*Tab. 3: Körpergewicht [kg] der einzelnen Gruppen zu Versuchsbeginn, nach sechs Monaten Versuchsdauer und zum Versuchsende. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung (obere Werte), sowie Median, Minimum und Maximum (untere Werte).*

<b>Gruppe</b>	<b>Versuchsbeginn</b>	<b>6. Monat</b>	<b>Versuchsende</b>
<b>Kontrolle</b>	$93,2 \pm 8,1$ 91 (79...108)	$93,0 \pm 5,9$ 93 (83...105)	$98,6 \pm 5,2$ 98 (89...108)
<b>OVX</b>	$87,4 \pm 5,6$ 88 (79...96)	$85,8 \pm 3,9$ 87 (81...91)	$94,8 \pm 4,6$ 96 (87...100)
<b>OVX+GLU</b>	$86,7 \pm 10,2$ 84 (74...102)	$87,4 \pm 7,7$ 88 (77...100)	$89,4 \pm 10,2$ 93 (78...103)

## 4.3 Knochendichtemessungen

### 4.3.1 Ergebnisse der DXA-Messungen

Die Knochenmineraldichte (BMD) am Calcaneus stieg in der Kontrollgruppe kontinuierlich über das ganze Jahr hinweg von 0,86 auf 0,92 g/cm<sup>2</sup> an. Das entsprach einem Zuwachs von 6,9 %. Dagegen sank die BMD der Glukokortikoid-Gruppe während der Behandlung im Durchschnitt um 4,3 %, stieg nach Beendigung der Behandlung wieder an und erreichte nach zwölf Monaten mit 0,88 g/cm<sup>2</sup> fast den Ausgangswert. Die OVX-Gruppe hatte über den gesamten Versuchszeitraum hinweg einen leichten Anstieg von 3,5 % zu verzeichnen. Vergleicht man die absoluten BMD-Werte, ergaben sich zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen den Gruppen (Tab. 4). Betrachtet man hingegen die prozentuale Änderung der Knochendichten bezogen auf die Ausgangswerte zu Versuchsbeginn, lassen sich Unterschiede feststellen (Abb. 14). Bei der prozentualen Änderung der Knochendichte bezogen auf den Ausgangswert unterschieden sich OVX+GLU-Gruppe und Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ) zu den Zeitpunkten 6., 9. und 12. Monat.

*Tab. 4: Gemessene BMD am Calcaneus in g/cm<sup>2</sup> zu den verschiedenen Zeitpunkten. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung (obere Werte) sowie Median, Minimum und Maximum (untere Werte).*

Monat	Kontrolle	OVX	OVX+GLU
0	0,86 ± 0,04	0,89 ± 0,08	0,89 ± 0,05
	0,86 (0,82...0,93)	0,86 (0,81...1,02)	0,88 (0,84...0,98)
3	0,88 ± 0,04	0,89 ± 0,08	0,89 ± 0,05
	0,89 (0,83...0,96)	0,85 (0,81...1,03)	0,88 (0,84...0,98)
6	0,89 ± 0,04	0,90 ± 0,07	0,85 ± 0,05
	0,89 (0,82...0,95)	0,87 (0,83...1,02)	0,85 (0,78...0,90)
9	0,91 ± 0,05	0,92 ± 0,07	0,87 ± 0,06
	0,91 (0,84...1,01)	0,89 (0,85...1,02)	0,88 (0,79...0,96)
12	0,92 ± 0,06	0,92 ± 0,07	0,88 ± 0,06
	0,94 (0,84...1,01)	0,89 (0,86...1,04)	0,89 (0,80...0,97)

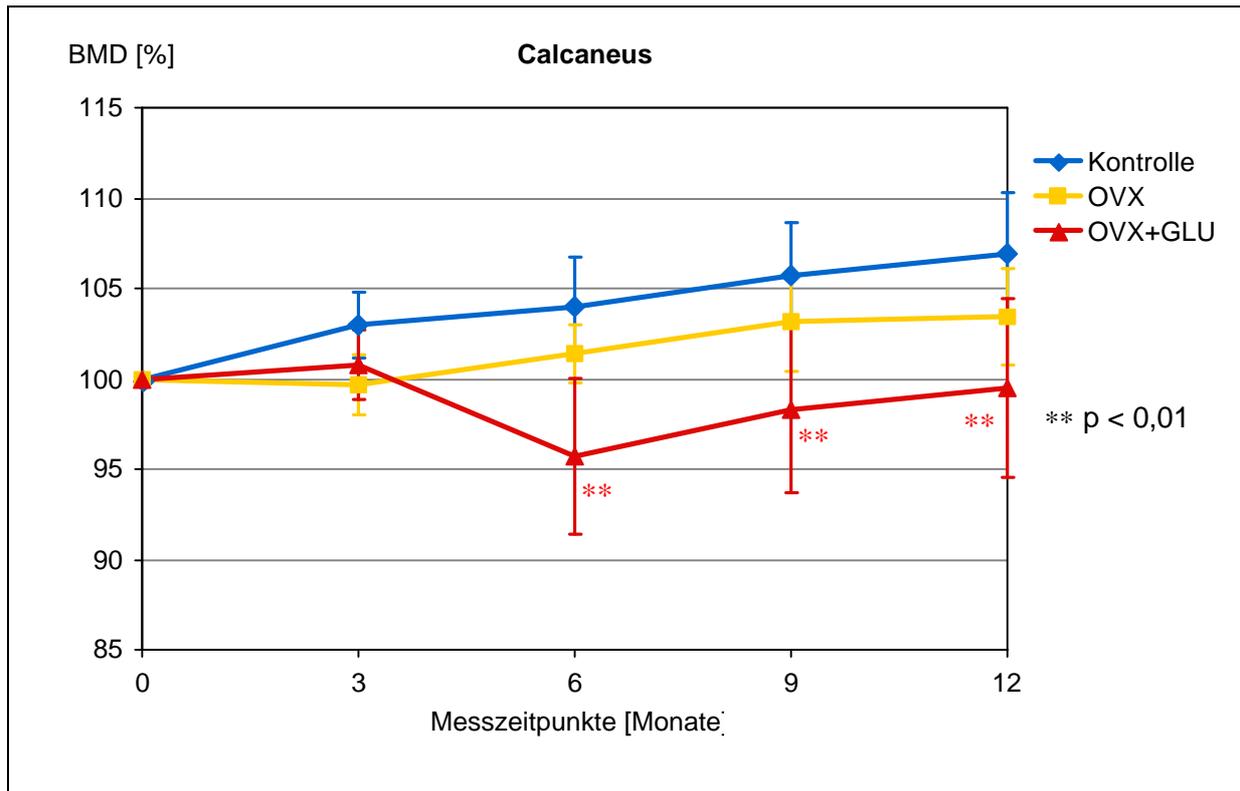


Abb. 14: Prozentuale Änderung der Knochenmineraldichte im Versuchszeitraum bezogen auf die Ausgangswerte zu Versuchsbeginn. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen sowie die p-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe.

An der Tibia blieb die BMD der Kontrollgruppe konstant bei 1,54 g/cm<sup>2</sup> (Tab. 5). Die Knochenmineraldichten der anderen beiden Gruppen fielen dagegen über den Versuchszeitraum ab. Die Werte der ovariectomierten Tiere sanken um 3,9 %. Bei den mit Glukokortikoiden behandelten Tieren fiel der Verlust mit 4,5 % ein wenig stärker aus. Jedoch war die prozentuale Änderung zum Anfangswert nur am 6. Monat unterschiedlich ( $p < 0,05$ ) zur Kontrolle (Abb. 15).

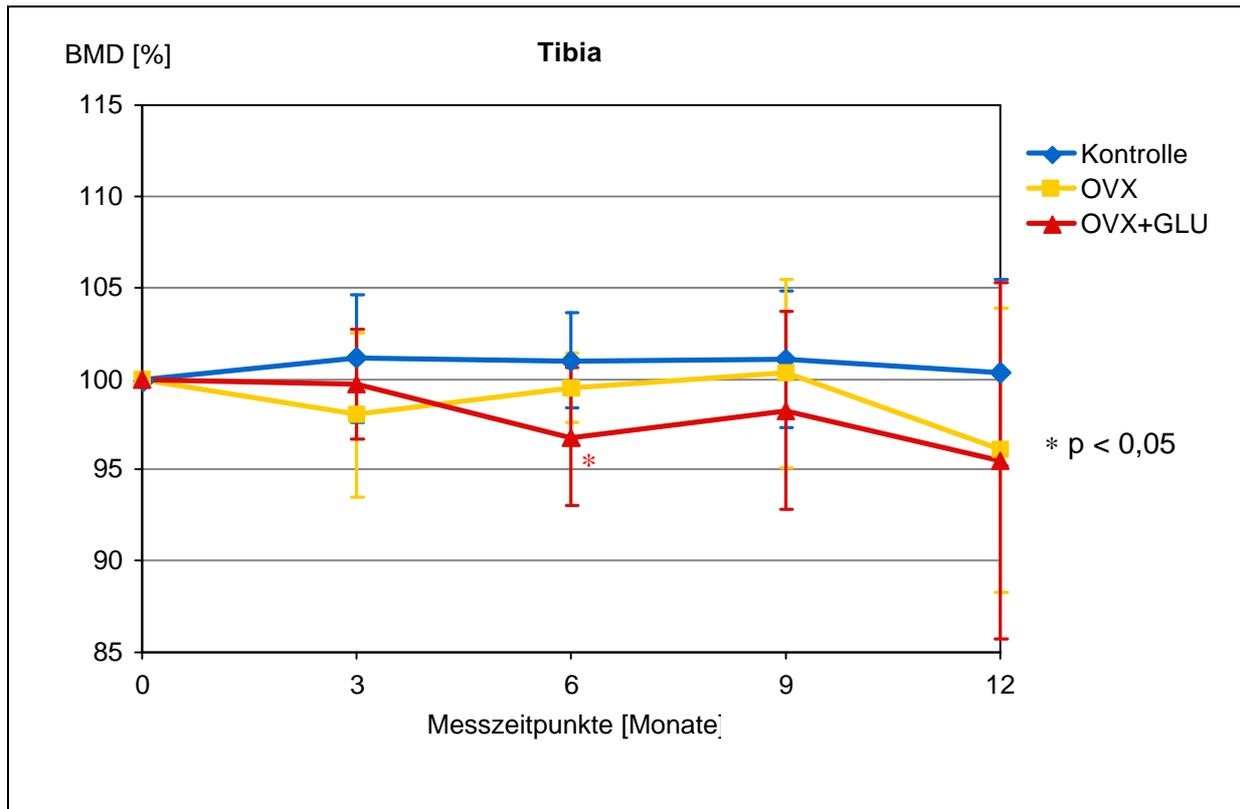


Abb. 15: Prozentuale Änderung der Knochenmineraldichte im Versuchszeitraum bezogen auf die Ausgangswerte zu Versuchsbeginn. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen sowie die p-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Tab. 5: Gemessene BMD an der Tibia in  $g/cm^2$  zu den verschiedenen Zeitpunkten. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung (obere Werte) sowie Median, Minimum und Maximum (untere Werte).

Monat	Kontrolle	OVX	OVX+GLU
0	1,54 ± 0,11 1,52 (1,39...1,76)	1,61 ± 0,12 1,58 (1,47...1,79)	1,58 ± 0,08 1,60 (1,48...1,71)
3	1,56 ± 0,13 1,53 (1,44...1,82)	1,58 ± 0,13 1,58 (1,35...1,75)	1,58 ± 0,06 1,56 (1,51...1,71)
6	1,56 ± 0,11 1,53 (1,43...1,74)	1,60 ± 0,11 1,56 (1,45...1,76)	1,53 ± 0,08 1,52 (1,40...1,66)
9	1,56 ± 0,13 1,50 (1,41...1,78)	1,61 ± 0,09 1,58 (1,53...1,78)	1,56 ± 0,11 1,54 (1,43...1,77)
12	1,55 ± 0,11 1,51 (1,43...1,74)	1,55 ± 0,15 1,57 (1,32...1,72)	1,51 ± 0,16 1,57 (1,21...1,70)

An der Wirbelsäule hatte die Kontrollgruppe einen kontinuierlichen Zuwachs an Knochenmineraldichte von 16,5 % zu verzeichnen. Die Werte stiegen von 1,32 g/cm<sup>2</sup> zu Versuchsbeginn auf 1,52 g/cm<sup>2</sup> zu Versuchsende (Tab. 6). Bei der ovariectomierten Gruppe betrug der Anstieg über den gesamten Versuchszeitraum dagegen nur 6,3 %. Allerdings fiel die Dichte bis zum 6. Monat leicht ab (-5,3 %) und stieg erst im 2. Halbjahr wieder an. Ein noch viel stärkerer Einbruch wurde bei der Glukokortikoid-Gruppe beobachtet. Der Ausgangswert von 1,36 g/cm<sup>2</sup> fiel innerhalb von sechs Monaten auf 1,10 g/cm<sup>2</sup>. Das entspricht einem Verlust von 14,7 %. In der Folge stieg die Knochenmineraldichte über den Anfangswert hinaus auf 1,41 g/cm<sup>2</sup>. Über den gesamten Zeitraum betrachtet, nahm die Knochenmineraldichte an der Wirbelsäule auch bei dieser Gruppe leicht zu (4,5 %). Wie sich die Knochenmineraldichte bei den verschiedenen Gruppen im Einzelnen entwickelte, kann man Abb. 16 entnehmen. Zum Zeitpunkt 6. Monat ist bei der Glukokortikoid-Gruppe die prozentuale Änderung bezogen auf den Ausgangswert unterschiedlich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ).

*Tab. 6: Gemessene BMD an der Wirbelsäule (L2–4) in g/cm<sup>2</sup> zu den verschiedenen Zeitpunkten. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung (obere Werte) sowie Median, Minimum und Maximum (untere Werte).*

Monat	Kontrolle	OVX	OVX+GLU
0	1,32 ± 0,16	1,42 ± 0,13	1,36 ± 0,30
	1,28 (1,08...1,57)	1,41 (1,25...1,58)	1,30 (1,03...1,94)
3	1,36 ± 0,12	1,39 ± 0,15	1,32 ± 0,23
	1,33 (1,19...1,56)	1,38 (1,24...1,61)	1,43 (1,10...1,55)
6	1,38 ± 0,16	1,31 ± 0,15	1,10 ± 0,21
	1,39 (1,14...1,60)	1,19 (0,76...1,52)	1,09 (0,89...1,48)
9	1,47 ± 0,17	1,42 ± 0,12	1,30 ± 0,19
	1,38 (1,28...1,74)	1,38 (1,29...1,62)	1,31 (1,01...1,54)
12	1,52 ± 0,13	1,51 ± 0,15	1,41 ± 0,15
	1,50 (1,32...1,75)	1,47 (1,33...1,76)	1,39 (1,19...1,64)

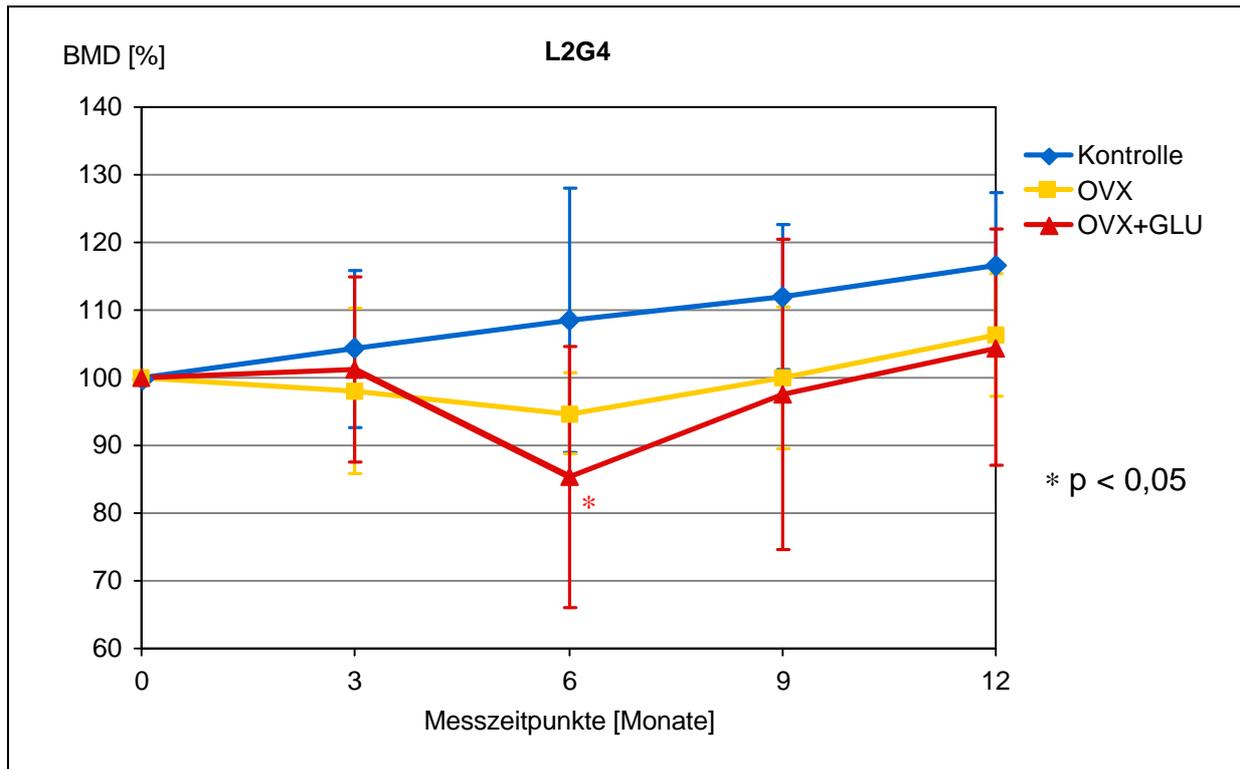


Abb. 16: Prozentuale Änderung der Knochenmineraldichte im Versuchszeitraum bezogen auf die Ausgangswerte zu Versuchsbeginn. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen sowie die p-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe.

#### 4.3.2 Ergebnisse der pQCT-Untersuchung

Die Unterschiede in der Knochenmineraldichte zwischen den Gruppen waren am Ende des Versuchszeitraumes am Calcaneus sowohl bei der Gesamtdichte als auch bei der trabekulären Dichte relativ gering. Die Gesamtdichte am Calcaneus betrug bei der Kontrollgruppe  $867 \text{ mg/cm}^3$ , die trabekuläre Dichte  $604 \text{ mg/cm}^3$  (Tab. 7). Die Werte der OVX-Gruppe lagen um 2,8 % bei der Gesamtdichte, bzw. um 0,5 % bei der trabekulären Dichte unter denen der Kontrollgruppe. Bei der Glukokortikoid-Gruppe betrug der Unterschied zur Kontrollgruppe in der Gesamtdichte -6,4 % und in der trabekulären Dichte -9,1 %.

Tab. 7: Mit pQCT gemessene Knochendichte am Calcaneus in  $\text{mg}/\text{cm}^3$ . Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung (obere Werte) sowie Median, Minimum und Maximum (untere Werte).

Gruppe	Gesamtdichte	trabekuläre Dichte
Kontrolle	867 ± 61	604 ± 69
	885 (752...970)	574 (513...743)
OVX	842 ± 74	601 ± 98
	844 (756...950)	596 (487...748)
OVX+GLU	811 ± 54	548 ± 50
	800 (736...908)	545 (467...616)

Deutlichere Unterschiede in der trabekulären Dichte zeigten sich dagegen bei den Tibiabiopaten. Die Dichte der Tibiabiopate, die nach sechs Monaten entnommen worden waren, lag bei der Kontrollgruppe bei  $462 \text{ mg}/\text{cm}^3$  (Tab. 8). Der Unterschied zur Kontrolle betrug bei der Gruppe OVX -11,2 % und bei der Gruppe OVX+GLU -27,7 % ( $p < 0,01$ ). Die Knochendichte stieg nach zwölf Monaten sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei der OVX-Gruppe an. Dagegen blieben die Werte der OVX+GLU-Tiere mit  $328 \text{ mg}/\text{cm}^3$  auch nach zwölf Monaten auf dem Niveau des ersten Halbjahres. Damit lag die Glukokortikoid-Gruppe 33,1 % niedriger als die Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ).

Tab. 8: Mit pQCT gemessene Knochendichte ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) an den Tibiabiopaten, die nach sechs und zwölf Monaten entnommen wurden. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung (obere Werte) sowie Median, Minimum und Maximum (untere Werte). Unterschiede zur Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ) sind mit \*\* gekennzeichnet.

Gruppe	trab. Dichte 6. Monat	trab. Dichte 12. Monat
Kontrolle	462 ± 89	490 ± 127
	448 (386...674)	412 (366...704)
OVX	411 ± 86	491 ± 202
	408 (317...591)	409 (279...921)
OVX+GLU	334 ± 56 **	328 ± 56 **
	331 (259...398)	323 (271...404)

Die Messung des L1-Wirbelkörpers erbrachte kaum Unterschiede in der Gesamt- wie auch in der trabekulären Dichte zwischen den Gruppen. Die Kontrollgruppe hatte eine Gesamtdichte von  $623 \text{ mg/cm}^3$  und eine trabekuläre Dichte von  $484 \text{ mg/cm}^3$  (Tab. 9). Die Gesamtdichte der OVX-Tiere lag 3,8 %, die trabekuläre Dichte 4,3 % niedriger als bei der Kontrollgruppe. Die bei der Glukokortikoid-Gruppe gemessene Gesamt- und trabekuläre Dichte unterschied sich um -9,5 % von der Kontrollgruppe. Die trabekuläre Dichte der L4-Bioptate betrug bei der Kontrollgruppe  $581 \text{ mg/cm}^3$  (Tab. 10). Bei der OVX-Gruppe lag sie um 7,4 % darüber. Die Glukokortikoid-Gruppe war um 4,4 % niedriger als die Kontrollgruppe.

Tab. 9: Mit pQCT gemessene Knochendichte am Wirbelkörper von L1 in  $\text{mg/cm}^3$ . Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung (obere Werte) sowie Median, Minimum und Maximum (untere Werte).

Gruppe	Gesamtdichte	trabekuläre Dichte
Kontrolle	$623 \pm 71$	$484 \pm 77$
	639 (508...726)	494 (382...612)
OVX	$600 \pm 50$	$464 \pm 71$
	603 (525...674)	447 (375...577)
OVX+GLU	$565 \pm 24$	$438 \pm 39$
	565 (530...605)	433 (388...489)

Tab. 10: Mit pQCT gemessene Knochendichte der L4-Bioptate in  $\text{mg/cm}^3$ . Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung (obere Werte) sowie Median, Minimum und Maximum (untere Werte).

Gruppe	trabekuläre Dichte
Kontrolle	$581 \pm 82$
	563 (457...713)
OVX	$624 \pm 65$
	613 (530...726)
OVX+GLU	$556 \pm 79$
	561 (479...705)

## 4.4 Knochenstrukturanalyse

Bei der  $\mu$ CT-Untersuchung der Tibiabioptate fanden sich bei der mit Glukokortikoiden behandelten Gruppe deutliche Unterschiede im Knochenvolumen. Das Verhältnis von Knochenvolumen zum Gesamtvolumen (BV/TV) lag in der Kontrollgruppe nach sechs Monaten Versuchsdauer bei 25,8 % und nach zwölf Monaten bei 31,0 % (Tab. 11). Die Werte der OVX-Gruppe waren nach sechs Monaten um 8,7 % und nach zwölf Monaten um 12,7 % niedriger als die Werte der Kontrollgruppe. Bei der Glukokortikoid-Gruppe zeigte sich bereits nach sechs Monaten ein deutlicher Unterschied von -22,8 % zur Kontrolle ( $p < 0,01$ ). Dieser verstärkte sich bis zum Versuchsende auf -30 % zur Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ).

Auch das Verhältnis Knochenoberfläche zu Knochenvolumen konnte die großen Unterschiede zwischen der Kontroll- und der OVX+GLU-Gruppe bestätigen. BS/BV betrug bei den Kontrolltieren nach sechs Monaten Versuchsdauer  $18,1 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  und nach zwölf Monaten  $15,1 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  (Tab. 11). Die ovariectomierten Tiere lagen im 6. Monat 12,5 % und im 12. Monat 12,3 % über der Kontrollgruppe. Der Unterschied der Glukokortikoid-Gruppe zur Kontrollgruppe betrug nach sechs Monaten bereits deutliche 27,8 % ( $p < 0,01$ ). Nach Beendigung des Versuchs war der Unterschied mit +33,8 % sogar noch ein wenig größer ( $p < 0,01$ ).

Die Knochen trabekel der Glukokortikoid-Gruppe waren deutlich schmaler als die der Kontrolltiere. Die Dicke der Trabekel (Tb.Th.) lag mit 0,11 mm (6. Monat) und mit 0,14 mm (12. Monat) bei der Kontrollgruppe zu beiden Messzeitpunkten etwa gleich (Tab. 11). Die Werte der OVX-Gruppe lagen im 6. Monat 9,1 % und im 12. Monat 14,3 % unterhalb der Kontrolle. Die Glukokortikoid-Gruppe wies nach sechs Monaten eine um 18,2 % geringere ( $p < 0,01$ ) und nach zwölf Monaten sogar um 28,6 % geringere ( $p < 0,01$ ) Trabekeldicke auf als die Kontrollgruppe. Die Anzahl der Trabekel war in allen Gruppen zu beiden Messzeitpunkten gleich.

Tab. 11: Ergebnisse der  $\mu$ CT-Untersuchung an den Tibiabioptaten. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung (obere Werte) sowie Median, Minimum und Maximum (untere Werte). Unterschiede zur Kontrollgruppe sind gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

6. Monat	BV/TV [%]	BS/BV [ $\text{mm}^2/\text{mm}^3$ ]	Tb.Th. [mm]	Tb.N. [1/mm]
<b>Kontrolle</b>	25,8 $\pm$ 4,1	18,1 $\pm$ 1,6	0,11 $\pm$ 0,01	2,3 $\pm$ 0,3
	24,5 (22,1...35,6)	18,5 (14,9...20,1)	0,11 (0,10...0,13)	2,3 (1,9...2,7)
<b>OVX</b>	23,5 $\pm$ 4,8	20,3 $\pm$ 2,9	0,10 $\pm$ 0,01	2,3 $\pm$ 0,2
	23,8 (17,7...33,0)	19,9 (16,3...25,5)	0,10 (0,08...0,12)	2,3 (1,9...2,7)
<b>OVX+GLU</b>	19,9 $\pm$ 3,3 **	23,1 $\pm$ 2,3 **	0,09 $\pm$ 0,01 **	2,3 $\pm$ 0,2
	18,9 (11,9...24,8)	23,6 (20,2...27,0)	0,09 (0,07...0,10)	2,3 (1,5...2,5)
12. Monat	BV/TV [%]	BS/BV [ $\text{mm}^2/\text{mm}^3$ ]	Tb.Th. [mm]	Tb.N. [1/mm]
<b>Kontrolle</b>	31,0 $\pm$ 9,3	15,1 $\pm$ 4,1	0,14 $\pm$ 0,04	2,2 $\pm$ 0,3
	25,9 (20,0...46,4)	16,3 (9,2...21,2)	0,12 (0,10...0,22)	2,1 (1,7...2,5)
<b>OVX</b>	27,1 $\pm$ 8,3	16,9 $\pm$ 3,5	0,12 $\pm$ 0,03	2,2 $\pm$ 0,2
	24,2 (18,2...39,4)	18,6 (10,9...19,8)	0,11 (0,10...0,18)	2,1 (1,8...2,5)
<b>OVX+GLU</b>	21,7 $\pm$ 3,3 *	20,2 $\pm$ 1,8 **	0,10 $\pm$ 0,01 **	2,2 $\pm$ 0,2
	22,5 (15,4...25,6)	19,7 (18,5...23,9)	0,10 (0,08...0,11)	2,2 (1,8...2,5)

An der Wirbelsäule waren die Unterschiede zwischen den Gruppen in allen gemessenen Parametern deutlich geringer (Tab. 12). BV/TV lag in der Kontrollgruppe bei 38,9 %. Bei der OVX-Gruppe lag das Verhältnis von Knochenvolumen zum Gesamtvolumen 9,3 % über der Kontrollgruppe, bei der Glukokortikoid-Gruppe dagegen 5,8 % darunter. BS/BV betrug in der Kontrollgruppe 11,9  $\text{mm}^2/\text{mm}^3$ . In der ovariektomierten Gruppe lagen die Werte um 3,4 % darunter, während sie in der Glukokortikoid-Gruppe 10,3 % über der Kontrollgruppe lagen. In Dicke und Zahl der Trabekel unterschieden sich die Gruppen nicht voneinander.

Tab. 12: Ergebnisse der  $\mu$ CT-Untersuchung an den Lendenwirbel-Bioptaten. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung (obere Werte) sowie Median, Minimum und Maximum (untere Werte).

L4	BV/TV [%]	BS/BV [ $\text{mm}^2/\text{mm}^3$ ]	Tb.Th. [mm]	Tb.N.
<b>Kontrolle</b>	$38,9 \pm 6,5$	$11,9 \pm 1,9$	$0,17 \pm 0,03$	$2,3 \pm 0,1$
	37,3 (27,9...51,0)	12,2 (9,3...15,5)	0,16 (0,13...0,22)	2,3 (2,0...2,5)
<b>OVX</b>	$42,5 \pm 4,4$	$11,5 \pm 1,9$	$0,18 \pm 0,03$	$2,4 \pm 0,2$
	43,0 (36,1...48,3)	10,9 (9,4...14,4)	0,18 (0,14...0,21)	2,4 (2,1...2,6)
<b>OVX+GLU</b>	$36,6 \pm 5,9$	$13,1 \pm 1,8$	$0,16 \pm 0,02$	$2,4 \pm 0,2$
	36,8 (30,2...47,4)	13,8 (10,4...14,5)	0,15 (0,14...0,19)	2,3 (2,2...2,7)

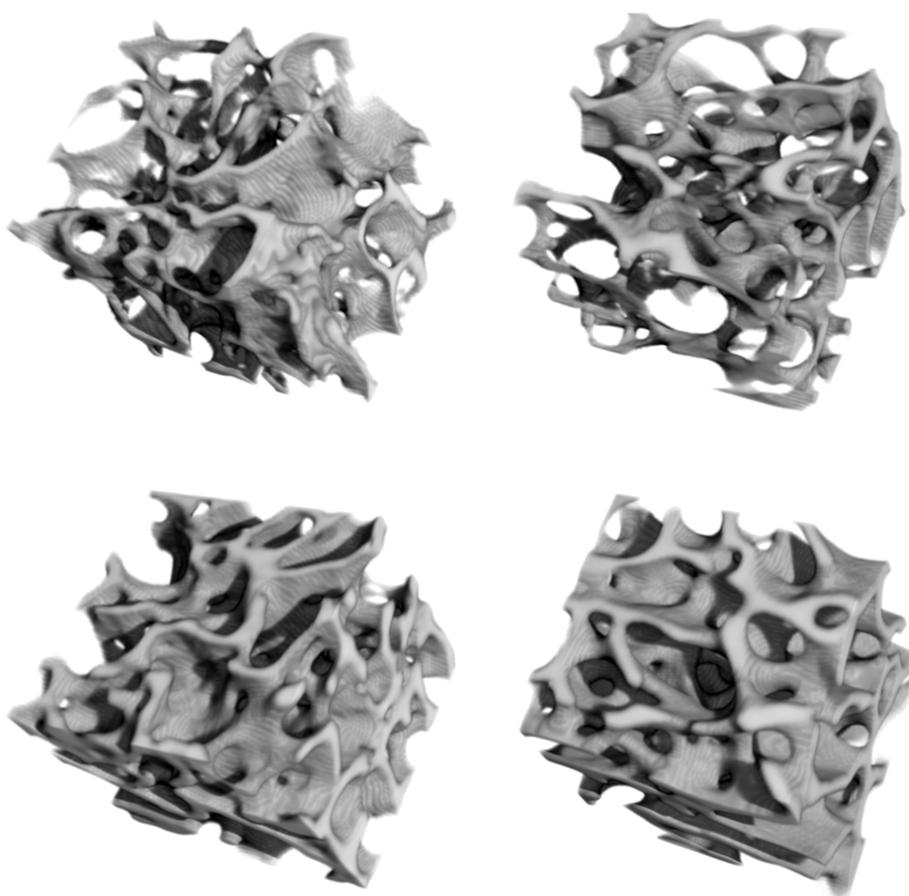


Abb. 17:  $\mu$ CT-Aufnahmen von Knochenbiopaten aus der Tibia (oben: OVX+GLU-Proben, unten: Kontroll-Proben).

## 4.5 Biomechanik

### 4.5.1 Tibiabioptate

Bei der Messung des Elastizitätsmoduls fielen sehr hohe individuelle Unterschiede innerhalb der Gruppen auf. Obwohl sich der Mittelwert der Glukokortikoid-Gruppe doch erheblich von dem der Kontrollgruppe unterschied, führte die hohe Varianz innerhalb jeder Gruppe dazu, dass die Unterschiede nicht signifikant waren. Das Elastizitätsmodul der Tibiabioptate der Kontrollgruppe lag nach sechs Monaten bei 337 MPa und nach zwölf Monaten bei 415 MPa (Tab. 13). Die OVX-Gruppe lag nach sechs Monaten 43,9 % über der Kontrolle und nach zwölf Monaten 15,9 % unter der Kontrolle. Die Werte der OVX+GLU-Gruppe waren nach sechs Monaten 20,5 % und nach zwölf Monaten sogar 62,2 % niedriger als die der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ).

*Tab. 13: Elastizitätsmodul [MPa] der Tibiabioptate nach sechs bzw. zwölf Monaten Versuchsdauer. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung (obere Werte) sowie Median, Minimum und Maximum (untere Werte). Unterschiede zur Kontrollgruppe (\*  $p < 0,05$ ) sind ebenfalls dargestellt.*

Messzeitpunkt	Kontrolle	OVX	OVX+GLU
6. Monat	337 ± 190	485 ± 262	268 ± 117
	351 (105...618)	432 (197...959)	294 (71...385)
12. Monat	415 ± 264	349 ± 222	157 ± 99 *
	354 (134...921)	325 (71...730)	148 (52...351)

### 4.5.2 Lendenwirbel-Bioptate

Bei der Biomechanik der Lendenwirbel-Bioptate zeigte sich ein Unterschied zwischen Kontrolle und OVX+GLU-Gruppe. Jedoch gab es auch hier keine Signifikanz, weil die individuellen Unterschiede die Unterschiede zwischen den

Gruppen überlagerten. Die Biopate der Lendenwirbel erreichten bei der Druckprüfung im elastischen Bereich bei der Kontrollgruppe 1996 MPa. Das Elastizitätsmodul der Biopate aus der OVX-Gruppe war bezogen auf die Kontrollgruppe um 10,5 % verringert. Das E-Modul der OVX+GLU-Gruppe war um 23,3 % geringer als das E-Modul der Kontrolltiere. Die Druckfestigkeit der Kontrollbiopate betrug 29,7 MPa. Die Druckfestigkeit der OVX-Biopate war 13,1 % höher als die der Kontrollgruppe. Die OVX+GLU-Biopate wiesen dagegen bezüglich der Kontrollgruppe eine um 11,8 % verminderte Druckfestigkeit auf (Tab. 14).

*Tab. 14: Elastizitätsmodul und Druckfestigkeit der Lendenwirbel-Biopate nach zwölf Monaten Versuchsdauer. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung (obere Werte) sowie Median, Minimum und Maximum (untere Werte).*

Parameter	Kontrolle	OVX	OVX+GLU
Elastizitätsmodul [MPa]	1996 ± 399 1988 (1483...2606)	1786 ± 352 1837 (1253...2155)	1531 ± 645 1536 (661...2293)
Druckfestigkeit [MPa]	29,7 ± 6,7 29,9 (19,3...40,1)	33,6 ± 5,9 33,9 (24,9...44,9)	26,2 ± 11,1 28,3 (9,6...42,4)

## 4.6 Histomorphometrie

### 4.6.1 Femurkondylen

Bei der histomorphometrischen Untersuchung der Femurkondylen zeigte sich, dass Knochenvolumen und Volumen des neu gebildeten Osteoids durch Ovariectomie und Glukokortikoid-Behandlung beeinflusst wurden. Die Knochenoberfläche der OVX+GLU-Gruppe war signifikant höher als bei der Kontrolle, während die Oberfläche des Osteoids deutlich geringer war. Das Verhältnis von Knochenvolumen zum Gesamtvolumen (BV/TV) betrug in der Kontrollgruppe 45,2 %. Die nur ovariectomierte Gruppe lag 9,7 % darüber, während die mit Glukokortikoiden behandelte Gruppe um 15,4 % darunter blieb. Der Anteil von

Osteoidvolumen am Knochenvolumen (OV/BV) war bei den Kontrolltieren 8,3 %. Die Werte der OVX-Tiere lagen um 24,4 %, die der OVX+GLU-Tiere um 53,3 % niedriger als die der Kontrollgruppe. Aufgrund der hohen individuellen Schwankungen innerhalb der Gruppen waren die doch beträchtlichen Unterschiede weder beim Knochenvolumen noch beim Osteoidvolumen signifikant. Das Verhältnis von Knochenoberfläche zu Knochenvolumen (BS/BV) erreichte bei der Kontrollgruppe 7,8 mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>. Die OVX-Gruppe lag 2,6 % niedriger, die OVX+GLU-Gruppe 21,4 % höher ( $p < 0,05$ ) als die Kontrollgruppe. Das Verhältnis von Osteoid-Oberfläche zur Knochenoberfläche (OS/BS) betrug in der Kontrollgruppe 42,2 %. Der Unterschied zu dieser Gruppe lag in der OVX-Gruppe bei -19,5 % und in der OVX+GLU-Gruppe bei -70,4 % ( $p < 0,05$ ).

*Tab. 15: Mit Hilfe der Histomorphometrie bestimmte Parameter der Knochentrabekel der Femurkondylen. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung (obere Werte) sowie Median, Minimum und Maximum (untere Werte). Die Unterschiede zur Kontrollgruppe sind ebenfalls dargestellt ( $p < 0,05$ ).*

Parameter	Kontrolle	OVX	OVX+GLU
BV/TV [%]	45,2 ± 8,6 44,0 (32,7...60,2)	49,6 ± 11,1 46,7 (33,3...65,4)	38,2 ± 2,9 37,3 (34,9...43,5)
OV/BV [%]	8,3 ± 5,3 8,4 (1,4...16,3)	6,3 ± 3,6 5,9 (0,7...13,0)	3,9 ± 3,3 2,0 (1,7...10,3)
BS/BV [mm <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup> ]	7,8 ± 1,8 7,5 (5,2...10,8)	7,6 ± 2,0 7,5 (5,4...11,1)	9,4 ± 0,9 * 9,5 (8,0...10,8)
OS/BS [%]	42,2 ± 29,9 69,2 (15,2...164,7)	33,9 ± 25,9 53,2 (10,3...144,9)	12,5 ± 10,0 * 16,0 (12,5...68,3)

#### 4.6.2 Knorpelschichten der Femurkondylen

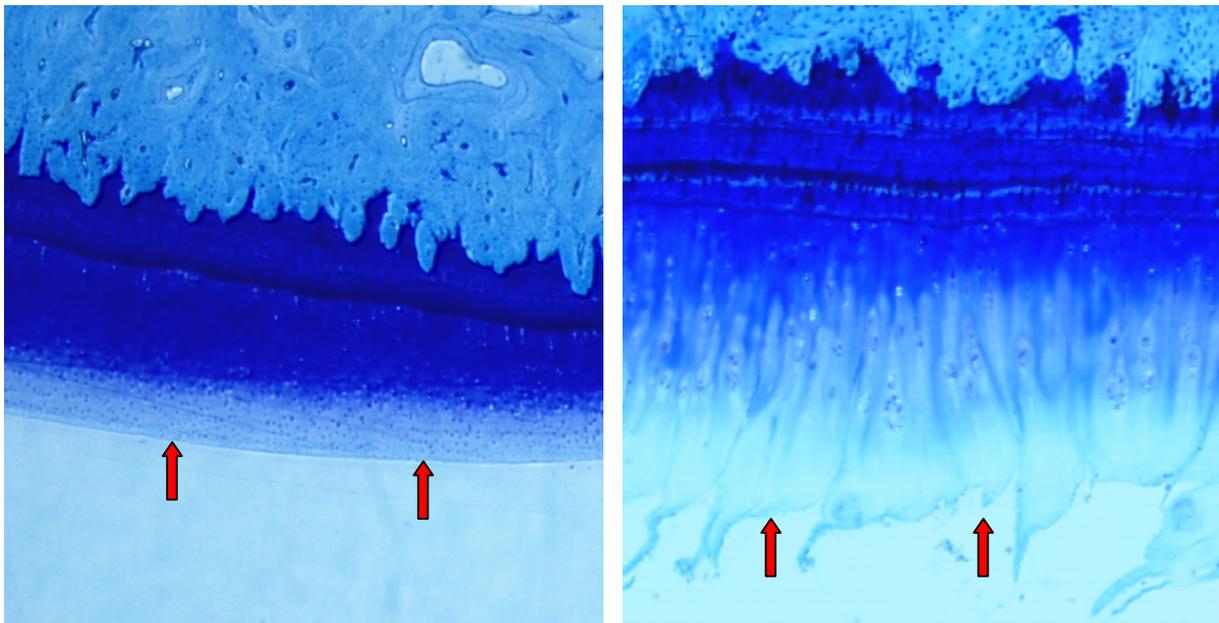
Während sich die Höhe der Knorpelschicht des medialen und des lateralen Kondylus bei der mit Glukokortikoiden behandelten Gruppe nicht unterschied, war bei den anderen beiden Gruppen die mittlere Höhe der medialen Knorpelschicht durchgehend größer als die der lateralen Knorpelschicht. Bei der Kontrollgruppe betrug die mittlere Höhe des Knorpels am medialen Femurkondylus 1556  $\mu\text{m}$ . Bei der ovariectomierten Gruppe lag sie 6 % und bei der Glukokortikoid-Gruppe 13 % niedriger als bei der Kontrollgruppe. Am lateralen Kondylus lag die mittlere Knorpeldicke in der Kontrollgruppe bei 1014  $\mu\text{m}$ . Der Wert der OVX-Gruppe war 5,9 % geringer, während der Wert der OVX+GLU-Gruppe 29,3 % größer war als der Wert der Kontrollgruppe.

*Tab. 16: Knorpeldicke an den medialen und lateralen Femurkondylen in  $\mu\text{m}$ . Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung (obere Werte) sowie Median, Minimum und Maximum (untere Werte).*

<b>Gruppe</b>	<b>medial</b>	<b>lateral</b>
Kontrolle	1556 $\pm$ 198 1570 (1375...1935)	1014 $\pm$ 325 1107 (562...1458)
OVX	1462 $\pm$ 247 1529 (917...1717)	954 $\pm$ 385 1089 (342...1342)
OVX+GLU	1354 $\pm$ 314 1669 (1143...1798)	1311 $\pm$ 349 1244 (605...1757)

Im Gegensatz zu den eher geringfügigen Unterschieden bei der quantitativen Untersuchung zeigten sich bei der qualitativen Beschreibung des Knorpels doch deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. Bis auf ein Tier wiesen alle Kontrollschafe eine glatte und ebene Knorpeloberfläche auf (Abb. 18). Ein Tier dieser Gruppe fiel jedoch durch stark zerklüftete Oberflächen mit vielen Defekten auf. Dies betraf sowohl den medialen als auch den lateralen Gelenkknorpel. Bei der

OVX-Gruppe fanden sich 2 Tiere, bei denen der Knorpel am medialen Kondylus uneben und fransig war. Die Knorpeloberflächen des lateralen Kondylus waren dagegen unauffällig. Von den 7 Glukokortikoid-Tieren hatten 4 Tiere sehr unebene und fransige, teilweise sogar stark zerklüftete Knorpeloberflächen am medialen Kondylus (Abb. 18). Zwei dieser Tiere waren auch am lateralen Kondylus stark betroffen. Auffallend war, dass bei den Tieren, bei denen klinische Probleme auftraten, die Knorpelqualität am stärksten beeinträchtigt war.



*Abb. 18: Bewertung der Knorpeloberfläche (siehe Pfeile). Links eine glatte und ebene Knorpeloberfläche (Tier der Kontrollgruppe) und rechts eine stark zerklüftete Oberfläche (Tier der Glukokortikoid-Gruppe). Vergrößerung: 12,5fach.*

## 4.7 Korrelation der Daten

Am Calcaneus wurde die Gesamtdichte des Knochens sowohl mit DXA wie auch mit pQCT untersucht. Somit kann man an diesem Messort beide Methoden miteinander vergleichen (Abb. 19). Die Korrelation zwischen DXA-BMD und pQCT-BMD war nur mäßig ( $R^2 = 0,45$ ).

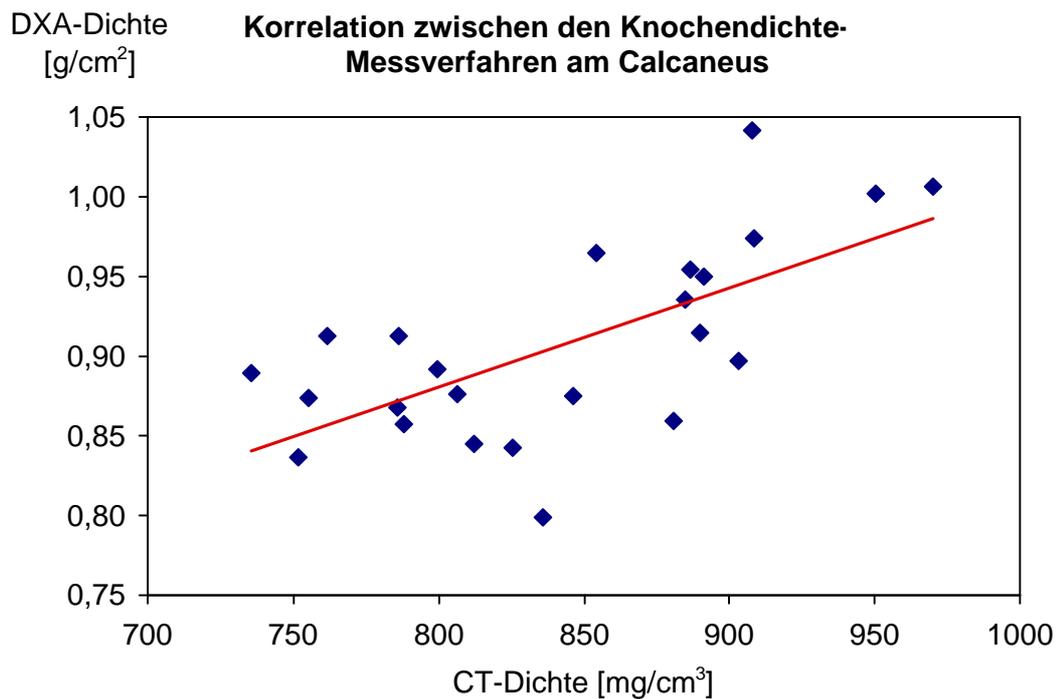


Abb. 19: Korrelation ( $R^2 = 0,45$ ) zwischen den verschiedenen Messverfahren für die Knochendichte am Calcaneus

Dichte und biomechanische Eigenschaften korrelieren gut miteinander. Dies wurde in unzähligen Studien an verschiedenen Knochen nachgewiesen (Ebbesen et al. 1997; Alho et al. 1988). In unserer Studie wurden an zwei unterschiedlichen Messorten Dichte und mechanische Eigenschaften untersucht. An der Tibia korreliert die pQCT-Dichte und das Elastizitätsmodul gut ( $R^2 = 0,56$ ; Abb. 20). Die pQCT-Dichte der Bioplate aus dem 4. Lendenwirbel korreliert sogar sehr gut mit der Druckfestigkeit ( $R^2 = 0,71$ ; Abb. 21).

Nicht nur die Dichte, auch die Mikrostruktur des Knochens beeinflusst seine biomechanischen Eigenschaften. Das mit der  $\mu$ CT gemessene Knochenvolumen (BV/TV) korreliert bei den L4-Bioplasten gut mit der Festigkeit der Knochenproben ( $R^2 = 0,64$ ; Abb. 22).

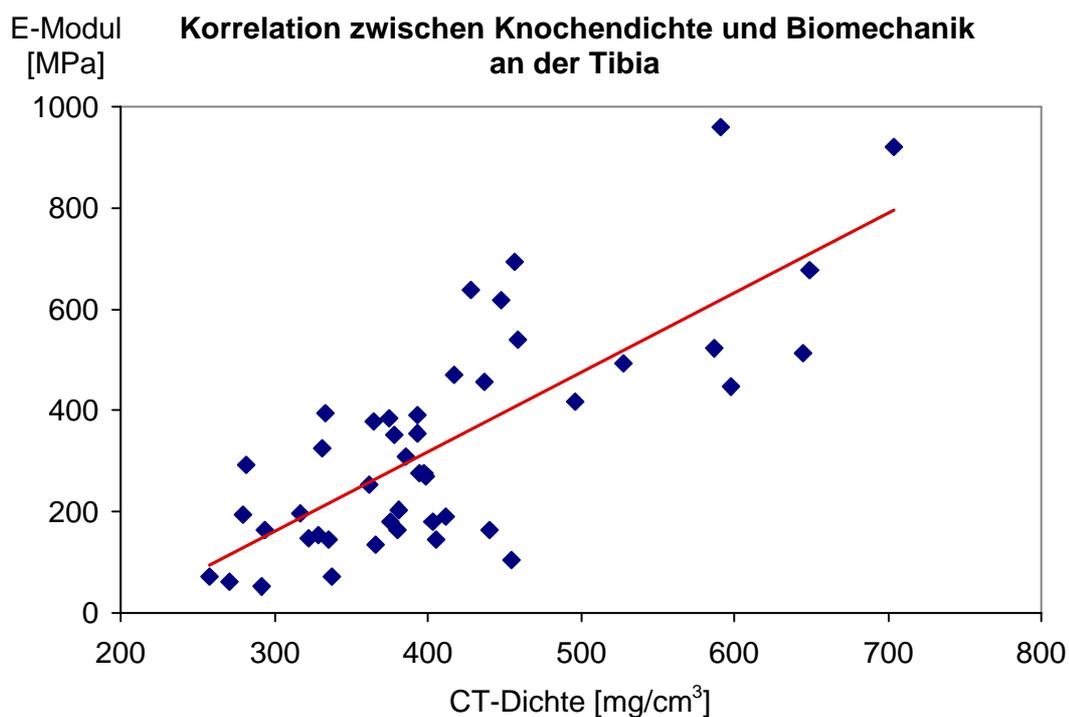


Abb. 20: Korrelation ( $R^2 = 0,56$ ) zwischen Knochendichte und Biomechanik der Tibiabioplaste. Angegeben sind sowohl die Werte nach sechs Monaten als auch die Werte nach zwölf Monaten Versuchsdauer.

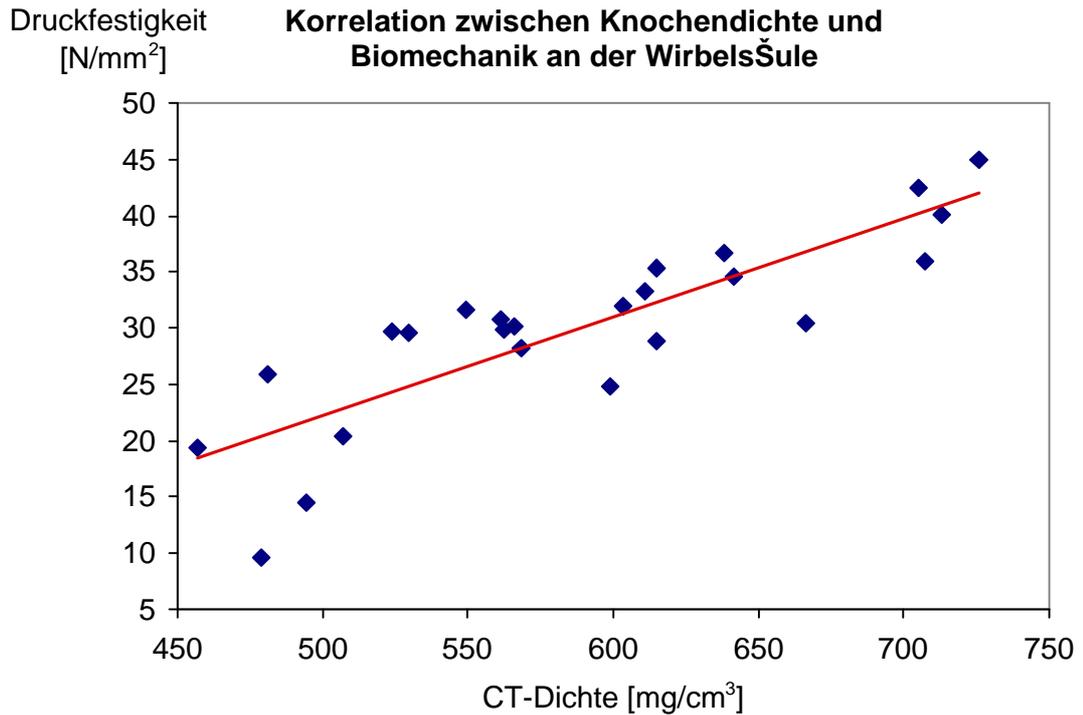


Abb. 21: Korrelation ( $R^2 = 0,71$ ) zwischen Knochendichte und Biomechanik an den L4-Bioptaten

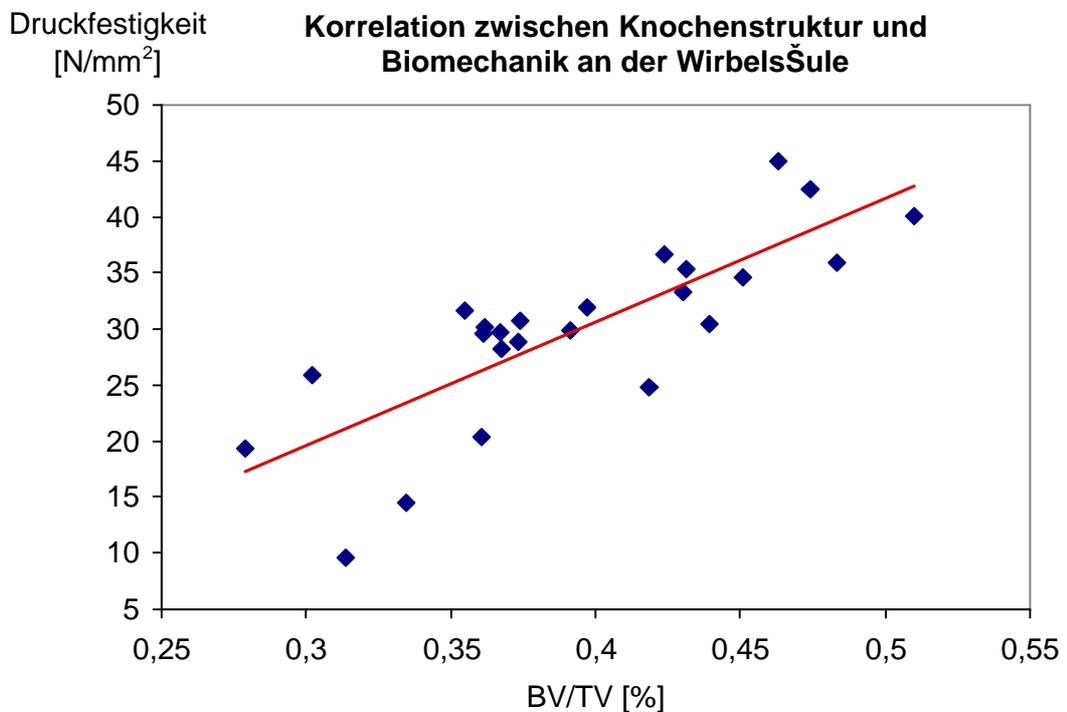


Abb. 22: Korrelation ( $R^2 = 0,64$ ) zwischen Knochenstruktur und Biomechanik an den L4-Bioptaten

Vergleicht man die mit pQCT gemessene Dichte der Knochenbioptate mit dem am  $\mu$ CT gemessenen Knochenvolumen, ist die Korrelation beider Methoden exzellent ( $R^2 = 0,93$ ). Diese Korrelation ist zudem völlig unabhängig von der Messlokalisation und vom Zeitpunkt der Messung, da in diesem Vergleich sowohl die Daten der Tibiabioptate zum Zeitpunkt 6. Monat und 12. Monat, als auch die Werte der L4-Bioptate vom 12. Monat berücksichtigt sind (Abb. 23).

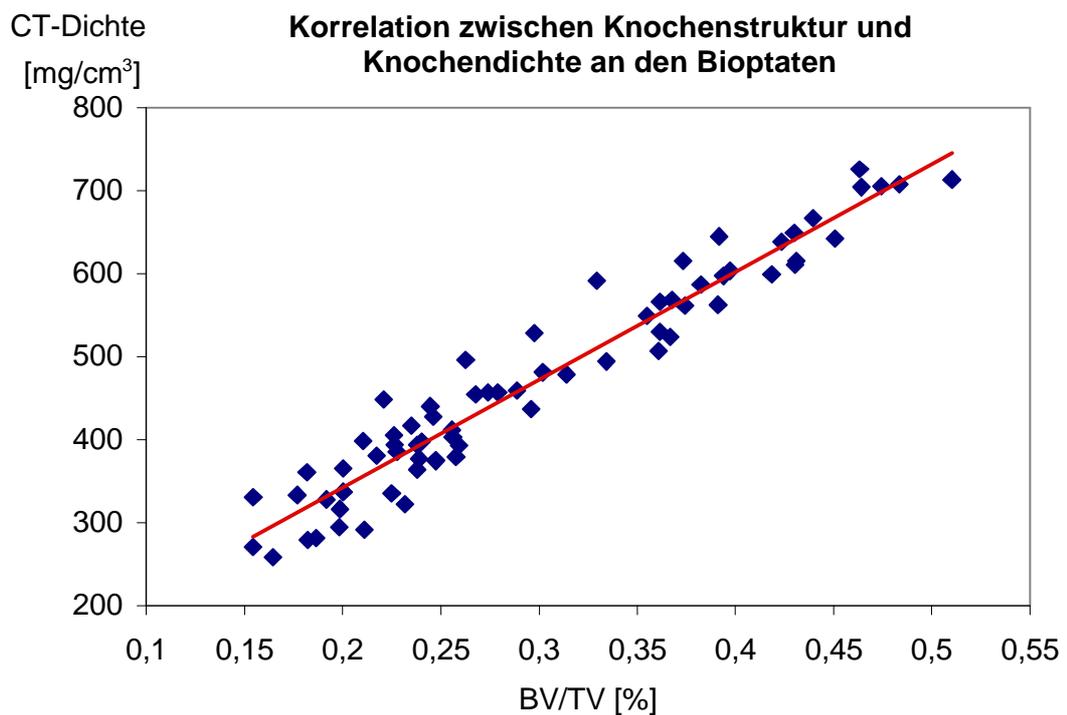


Abb. 23: Korrelation ( $R^2 = 0,93$ ) zwischen Knochenstruktur und Knochendichte an den Biopaten der Tibia und der Lendenwirbelsäule. Angegeben sind sowohl die Werte nach sechs Monaten als auch nach zwölf Monaten Versuchsdauer.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Bedeutung der Studie**

Mit dieser Arbeit ist es gelungen, das ovariectomierte und glukokortikoid-behandelte Schaf als Großtiermodell für die Osteoporoseforschung zu evaluieren. Änderungen in der Knochendichte, der Knochenstruktur und den biomechanischen Eigenschaften konnten dank umfassender Analysen quantifiziert werden. Mit Hilfe der DXA wurde schon in vivo eine Verlaufskontrolle über die Entwicklung der Knochendichte durchgeführt, die pQCT gab im Besonderen Aufschluss über die Reaktionen des trabekulären Knochens. Während die Knochendichte des gesamten Knochens nach Beendigung der Glukokortikoid-Behandlung wieder anstieg, blieben die Änderungen im trabekulären Knochen bis zum Versuchsende bestehen. Das  $\mu$ CT ermöglichte Einblicke in die Mikrostruktur des Knochens. Mit Hilfe dieser Methode konnten detailgetreu die Änderungen im Volumen, der Oberfläche und der Trabekeldicke dargestellt werden. Auch hier wurden trabekuläre Knochenproben untersucht, bei denen die Unterschiede zur Kontrollgruppe auch nach zwölf Monaten nachgewiesen werden konnten. Durch die Histomorphometrie konnten zusätzlich Aussagen über neu gebildetes Osteoid getroffen werden. In der Glukokortikoid-Gruppe war eine deutliche Hemmung der Neubildung zu erkennen. Auch die biomechanischen Eigenschaften, die durch Drucktests überprüft wurden, waren deutlich verändert. Somit konnte gezeigt werden, dass die Kombination von Ovariectomie und Glukokortikoid-Therapie die Knochendichte, die Knochenstruktur und die mechanischen Fähigkeiten des Knochens negativ beeinflusst. Dieses Großtiermodell ist demnach geeignet für die Erprobung neuer orthopädischer Techniken zur chirurgischen Versorgung osteoporotischer Frakturen. Auch das Testen spezieller Verankerungsmechanismen oder Implantate für den porösen Knochen ist am ovariectomierten und glukokortikoidbehandelten Schaf möglich.

## 5.2 Diskussion des Tiermodells

Die für diese Studie verwendeten Tiere hatten alle die gleiche Herkunft. Bei anderen Versuchstieren wie Maus oder Ratte ist es möglich, Tiere aus der gleichen Zuchtlinie oder sogar genetisch einheitliche Organismen zu beziehen. Dies ist beim Schaf nicht möglich. Alle Schafe wurden jedoch vom gleichen Betrieb gekauft, so dass der Einfluss der „Vorgeschichte“ unserer Tiere relativ gering war. Die Tiere waren mit vier bis sieben Jahren nicht nur ungefähr gleich alt, sondern auch ausgewachsen, so dass man davon ausgehen konnte, dass ihr Knochenwachstum abgeschlossen war. Zudem hatten sie zu Beginn der Studie ein vergleichbares Körpergewicht. Die Zuteilung zu den drei Gruppen erfolgte randomisiert, so dass sich die Gruppen nicht voneinander unterschieden. Unterbringung, Haltung und Fütterung der Gruppen waren ebenfalls identisch.

Die Ovariectomien wurden alle innerhalb eines Zeitraumes von zwölf Tagen vom gleichen OP-Personal in gleicher Art und Weise durchgeführt. Da die Tiere im Mai ovariectomiert wurden, lag die Operation in der Phase hoher Sexualaktivität. Diese reicht beim Merinolandschaf von Februar bis Juni (Bostedt und Dedié 1996). Ovarien und Uterus waren besonders stark durchblutet. Die aufgetretenen Blutungen konnten jedoch problemlos gestillt werden. Bei der Entnahme der Ovarien könnte es jedoch möglicherweise zu Zellversprengungen gekommen sein. Diese Zellen sind auch weiterhin in der Lage, Östrogene zu produzieren. Um den Erfolg der Ovariectomien zu überprüfen, versuchten wir in verschiedenen Labors den Östrogenstatus der Tiere feststellen zu lassen. Dies gestaltete sich schwieriger als erwartet, da es für das Schaf keine standardisierte Methode zur Bestimmung des Östrogen-Serumlevels gibt. Die Ergebnisse aus den Labors erwiesen sich als widersprüchlich und nicht zufrieden stellend und wurden nicht verwendet.

Es gab vor Beginn der Studie Überlegungen, ob die Kontrolltiere schein-operiert werden sollten, um eventuelle Einflüsse der Operation auf den Versuchsverlauf auszuschließen. Wir entschieden uns aber dagegen, weil uns die Standzeit von zwölf Monaten lang genug erschien, so dass die Operation keinen Einfluss auf das Ergebnis der Untersuchungen am Knochen haben dürfte.

Im Gegensatz zu aus der Literatur bekannten Studien, bei denen die tägliche Glukokortikoid-Dosis gewichtsunabhängig festgelegt war, wurde sie in unserer Studie anhand des Körpergewichts für jedes Tier separat berechnet und monatlich an Gewichtsveränderungen angepasst. Da jedoch die Dosis für einen optimalen Knochenverlust nicht bekannt ist, orientierten wir uns an den Angaben aus der Literatur (Deloffre et al. 1995; Chavassieux et al. 1993 und 1997; Lill et al. 2000) und legten eine Dosis von 0,30 mg/kg Körpergewicht fest. Als nach drei Monaten kein Effekt auf die Knochenmineraldichte nachgewiesen werden konnte, wurde die Dosis auf 0,45 mg/kg erhöht. Auch in diesem Fall wurde darüber nachgedacht, den Tieren der anderen beiden Gruppen ebenfalls etwas zu injizieren (z. B. physiologische Kochsalzlösung). Jedoch war wiederum die Versuchsdauer nach Beendigung der Behandlung noch so lang, dass eventuelle Einflüsse von den Injektionen eher unbedeutend erschienen. Die Injektion der Glukokortikoide erfolgte täglich immer morgens zur gleichen Zeit. Allerdings ist im Gegensatz zu anderen Tieren wie Hund oder Katze für das Schaf kein optimaler Tageszeitpunkt für eine Kortison-Gabe bekannt. Obwohl beim erwachsenen Schaf stündliche Schwankungen im Plasmacortisolspiegel zu beobachten sind, existiert kein tageszeitlicher Rhythmus mit einem deutlichen Peak (McMillen et al. 1987).

Vier der OVX+GLU-Tiere bekamen nach Absetzen der Glukokortikoide Gelenkprobleme. Denkbar wäre, dass die betroffenen Tiere ein so genanntes Kortikoid-Entzugssyndrom entwickelt haben (Neumann et al. 1996). Nach dem Absetzen einer hochdosierten längerdauernden Glukokortikoid-Therapie kann es dabei zu Fieber, Gelenk- und Muskelschmerzen und allgemeinem Krankheitsgefühl kommen. Differentialdiagnostisch ist das Krankheitsbild nur schwer von einer rheumatischen Erkrankung abzugrenzen.

## 5.3 Diskussion der Methodik

### 5.3.1 Knochendichte-Untersuchung in vivo

Die Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA) ist die am besten etablierte nicht-invasive Messmethode zur Bestimmung der Knochenmineraldichte beim Menschen (Pouilles et al. 2000). Vorteile dieser Methode sind die relativ kurze Scanzeit, hoch auflösende Bilder und die Möglichkeit, Knochen in allen Regionen des Körpers messen zu können. Als Nachteile der DXA-Methode sind die Strahlenbelastung und die Beschränkung auf Projektionsbilder zu nennen. Allerdings ist die durch die Röntgentechnik auftretende Strahlenbelastung deutlich geringer als bei einer konventionellen Röntgenaufnahme. Durch die Beschränkung auf Projektionsbilder ist es nicht möglich, zwischen kortikalem und trabekulärem Knochen zu unterscheiden (Rosen et al. 1995). Weiterhin wird bedingt durch die Projektionstechnik nur eine Flächendichte in  $\text{g}/\text{cm}^2$  und nicht eine echte Volumendichte bestimmt (Kanis et al. 1996). Zur Diagnose eines Knochenverlustes oder als Verlaufskontrolle bei therapeutischen Maßnahmen werden in der Humanmedizin üblicherweise Bereiche der Lendenwirbelsäule (L1/2–L4/5), der Unterarm oder des proximalen Femur gemessen (Hassager und Christiansen 1995). Beim Schaf ist eine In-vivo-Messung des Femurs auf Grund der anatomischen Gegebenheiten nicht möglich. Eine gute Alternative stellt die Messung am Calcaneus dar, der zu 95 % aus trabekulärem Knochen besteht (Yamada et al. 1993) und sich daher für den Nachweis osteoporotischer Veränderungen, die ja vor allem trabekulären Knochen betreffen, besonders gut eignet. Zudem besitzt er eine regelmäßige Gestalt und kann reproduzierbar positioniert werden (Turner et al. 1995c). Beim Menschen korreliert die Knochendichte am Calcaneus gut mit der an der Wirbelsäule (Turner et al. 1995c). Aus diesen Gründen wurde auch in unserer Studie der Calcaneus als einer der Messorte für die In-vivo-Bestimmung der Knochendichte festgelegt. Die distale Tibia wurde ausgewertet, weil sie bei der Aufnahme des Calcaneus automatisch mit gescannt wurde und sich daher eine zusätzliche Analyse dieses Bereiches anbot. Bei der Messung der Lendenwirbelsäule wurden L1 sowie L5/6 nicht berücksichtigt. So wurden Überlagerungen von den Rippen bzw. vom Becken ausgeschlossen (Pouilles et al. 2000; Hassager und Christiansen 1995).

Entscheidend für die Qualität der Knochendichteuntersuchung ist die Richtigkeit und Präzision der Methode. Die Richtigkeit sagt etwas darüber aus, wie gut der gemessene BMD-Wert auch die tatsächliche Knochendichte wiedergibt. Die Präzision beschreibt die Streuung der Werte.

Die Richtigkeit bei der DXA wird wesentlich von der Größe des gescannten Knochens beeinflusst. Grund dafür ist, dass lediglich ein Projektionsbild analysiert wird. Dadurch erhält man eine zweidimensionale Flächendichte und keine echte Volumendichte. Diese Flächendichte ist bei unveränderter Volumendichte bei größeren Knochen grundsätzlich größer. Ein weiterer Faktor, der die Richtigkeit des Verfahrens negativ beeinflusst, ist die Schichtdicke des umgebenden Weichgewebes und dessen variierender Fettanteil. Eine Änderung des Fettanteils von 10 % bewirkt eine Veränderung der gemessenen Knochendichte um 1 % (Hansen et al. 1990). An Calcaneus und distaler Tibia ist dieser Fehler relativ gering, da der Knochen nur von wenig Weichgewebe umschlossen wird. Problematisch ist jedoch die Messung an der Wirbelsäule. Die Analyse wird bei Schafen, die schwerer sind als 50 kg, immer ungenauer (Pouilles et al. 2000). Unsere Tiere wogen alle über 73 kg, einige wenige sogar mehr als 100 kg. Damit dürfte der Einfluss auf die Richtigkeit der Wirbelsäulenmessung ganz erheblich sein. In der Literatur wird der Fehler in der Richtigkeit bei Messungen am Menschen für eine Aufnahme in Rückenlage mit 5–8 % (Hassager und Christiansen 1995; Miller 2000; Svendsen et al. 1995) und für eine seitliche Aufnahme mit 10–12 % angegeben (Hassager und Christiansen 1995, Svendsen et al. 1995).

Die Präzision des Verfahrens wird beeinflusst durch die Strahlstabilität der Röntgenröhre, die Durchführung der Messung, die Lagerung des Tieres, Bewegungsartefakte und durch die Festlegung der Region of interest (ROI) bei der Auswertung. Die Strahlstabilität der Röntgenröhre wurde jedes Mal vor Beginn der Untersuchungen durch Messung eines Lendenwirbel-Phantoms überprüft. Durch Erstellung einer genauen Arbeitsanweisung zur Knochendichtemessung wurde sichergestellt, dass die Messprozedur immer in der gleichen Art und Weise durchgeführt wurde. Die Lagerung des Beines war sehr gut reproduzierbar und konnte durch manuelle Fixierung des Metatarsus auf dem Messtisch standardisiert durchgeführt werden. Der durch Wiederholungsmessungen ermittelte

Präzisionsfehler betrug an der Tibia bei der Kontroll- und der OVX-Gruppe 0,7 % und bei der OVX+GLU-Gruppe 4,4 %. Am Calcaneus entsprachen die Werte der Wiederholungsmessungen exakt denen der ersten Messung. Schwieriger war die immer gleiche Lagerung des Tieres bei der Wirbelsäulenmessung. Eine posteroantere Messung ist beim Schaf wie auch beim Menschen einfacher zu reproduzieren als eine laterale Aufnahme (Turner et al. 1995c; Guglielmi et al. 1994). Jedoch muss man für eine Messung in Rückenlage die Tiere in Vollnarkose legen. In unserer Studie wurden die Tiere leicht sediert und von mehreren Personen in Seitenlage auf dem Messtisch fixiert. In den meisten Fällen wurde dies von den Schafen einwandfrei toleriert. Allerdings ist diese Lagerung wesentlich schlechter standardisierbar, da die Tiere bedingt durch die Aufregung unterschiedlich angespannt und daher auch unterschiedlich gekrümmt auf dem Tisch lagen. Die Reproduzierbarkeit der Lagerung war dadurch eingeschränkt. Zudem ist bei einer posteroanteren Aufnahme die Identifizierung der einzelnen Wirbelkörper leichter möglich als bei einer lateralen Aufnahme, weil man sich am Lumbosakralgelenk orientieren kann (Turner et al. 1995c). Die mögliche Fehlidentifizierung der Wirbel wurde in unserer Studie dadurch vermieden, dass erst ein Übersichtsscan bis zum Beckenkamm aufgenommen wurde. Anhand dieses Orientierungspunktes konnte man die Wirbel gut identifizieren und den Bereich für die eigentliche Messung eingrenzen. Der Präzisionsfehler der Wirbelsäulenscans betrug bei der Kontroll- und der OVX-Gruppe 2,4 %. Bei der Glukokortikoid-Gruppe war der Präzisionsfehler mit 18 % deutlich größer.

Ein weiterer Faktor mit Einfluss auf die Präzision der Messung sind Bewegungsartefakte. Dieses Problem umgingen wir, indem wir bei einer Bewegung des Tieres die Messung abbrachen und wiederholten. Zu guter Letzt spielt auch die Festlegung der ROIs bei der Auswertung der Knochendichtemessungen für die Präzision des Verfahrens eine Rolle. Am Calcaneus entstanden sehr gut vergleichbare Aufnahmen, so dass immer die gleiche Fläche standardisiert festgelegt und ausgewertet werden konnte. Bei der Analyse der Wirbelsäule war die Festlegung der ROIs ungleich schwieriger. Durch die Probleme bei der Lagerung der Schafe entstanden unterschiedlichere Aufnahmen als am Calcaneus. Zudem ist die Gestalt der Wirbel viel unregelmäßiger und damit schlechter vergleichbar. In der verwendeten Auswertesoftware stand nur eine viereckige Auswertefläche zur

Verfügung, so dass es manchmal problematisch war, die Fläche so zu positionieren, dass der komplette Wirbel eingeschlossen war.

### 5.3.2 Knochendichte-Untersuchung ex vivo

Bei den Untersuchungen mit dem pQCT erhält man statt einer zweidimensionalen Flächendichte eine dreidimensionale Volumendichte, die von der Größe des gescannten Knochens unabhängig ist. Ein weiterer Vorteil dieses densitometrischen Verfahrens ist die Möglichkeit, die Knochenmineraldichte von kortikalem und trabekulärem Knochen getrennt zu bestimmen. Da bei Osteoporose hauptsächlich trabekulärer Knochen betroffen ist, ist die separate Analyse dieses Knochenanteils überaus wichtig. Aus diesem Grund wurden in unserer Studie Knochenproben analysiert, die zum größten Teil oder – wie im Fall der Bioptate – sogar ausschließlich aus trabekulärem Knochen bestanden.

Die Richtigkeit der pQCT-Messung wird vornehmlich durch den variierenden Fettanteil im Knochenmark beeinflusst (Hassager und Christiansen 1995; Takada et al. 1996). Auf Grund der geringen Dichte von Fett täuscht ein hoher Fettanteil im Knochenmark eine geringere Knochendichte bzw. einen höheren Knochendichteverlust vor als tatsächlich vorhanden ist. Hinzu kommt, dass Osteoporose-Patienten vorwiegend in einem Alter sind, in dem der Anteil an Fettmark bereits sehr hoch ist. Beispielsweise im Femurhals beträgt dieser Anteil bei 20-Jährigen 65 % und bei 90-Jährigen sogar 80 %. Ähnlich verhält es sich auch im distalen Radius und im Calcaneus (Cann 1988). Da die individuellen Schwankungen jedoch sehr groß sind, ist eine systematische Korrektur nicht möglich (Fischer 1993). Der Fehler in der Richtigkeit wird in der Literatur mit 6–9 % bei jüngeren Menschen (Cann 1988) und mit 10–20 % bei alten Menschen angegeben (Cann 1988; Takada et al. 1996; Genant et al. 1996).

Die Präzision der Methode wird beeinflusst durch die Strahlstabilität der Röntgenröhre (Genant et al. 1996). Die Strahlstabilität wurde vor Beginn der Untersuchungen jeweils mit der Messung eines Standardphantoms überprüft. Ein weiterer Einflussfaktor bei der pQCT-Untersuchung der Bioptate ist die

Entnahmestelle. Es stellt sich die Frage, ob die Biopate immer an der exakt gleichen Lokalisation entnommen werden konnten und ob die Biopate aus dem rechten Bein (6. Monat) mit denen aus dem linken Bein (12. Monat) vergleichbar sind. Die Bemühungen, die Biopate standardisiert an der gleichen Stelle zu entnehmen, wurden dadurch erschwert, dass sich die Verhältnisse während einer Operation (6. Monat) immer ein wenig anders darstellen als am explantierten Knochen (12. Monat), an dem eine Probenentnahme ungleich einfacher ist. Zudem liegt im Bereich der Entnahmestelle auch die Epiphysenfuge, die nach Verknöcherung dichter ist als das umgebende Knochengewebe. Dadurch kann sich aus einer Verschiebung der Biopsieentnahmestelle um wenige Millimeter eine Änderung der Knochenmineraldichte ergeben. Die Vergleichbarkeit von linker und rechter Tibia nahmen wir als gegeben an, da aus der Literatur bekannt ist, dass sich beide Seiten nur unwesentlich voneinander unterscheiden (Lill et al. 2000).

Ebenfalls ein wichtiger Faktor mit Einfluss auf die Präzision der Methode ist die Positionierung des CT-Schnittes. Auch hier gilt: Bereits eine Verschiebung um wenige Millimeter verändert den gemessenen Knochenmineralgehalt. Der resultierende Fehler wird mit 0,7–4 % angegeben (Takada et al. 1996; Hassager und Christiansen 1995; Genant et al. 1996). Der Grund für diesen Fehler liegt in der inhomogenen Verteilung der Knochendichte gerade beim Osteoporose-Patienten (Dambacher und Ruegsegger 1985). Minimiert werden kann dieser Fehler durch Mehrfachscans (Takada et al. 1996), wie es auch in unserer Studie bei den Biopaten praktiziert wurde. Takada und Mitarbeiter untersuchten das auch von uns verwendete pQCT-Gerät von Stratec auf Richtigkeit und Präzision. Sie bezeichnen das Gerät als mäßig richtig, aber hoch präzise (Takada et al. 1996). In einer Studie von Augat und Mitarbeitern wird die Abweichung des Geräts mit 1,9 % für trabekulären und 14 % für kortikalen Knochen angegeben (Augat et al. 1998a). Der Präzisionsfehler liegt bei 0,3–2,2 % (Augat et al. 1998b).

### 5.3.3 Knochenstrukturanalyse

Die Osteoporose ist nicht nur mit Veränderungen in der Knochendichte, sondern auch in der Knochenstruktur und in den biomechanischen Eigenschaften verbunden (Consensus Development Conference 1993). Gerade zwischen der Knochenstruktur und der Knochenfestigkeit besteht eine enge Korrelation (Alho et al. 1988; Ebbesen et al. 1997). Um die Veränderungen in den mechanischen Eigenschaften besser erklären zu können, braucht man Informationen über die dreidimensionale Architektur des Knochens. Das  $\mu$ CT ist sehr gut dafür geeignet, mit äußerst hoher Auflösung den Knochen graphisch darzustellen. Diese Methode ist durch die hohe Auflösung sehr präzise und liefert detailgetreue Informationen, ohne den Knochen dabei zu zerstören. Dadurch standen unsere Knochenbiopate nach der  $\mu$ CT-Analyse noch für biomechanische Tests zur Verfügung. Durch die große Anzahl von Schnittbildern, die von jedem Biopat aufgenommen wurden, ist dieses Verfahren auch sehr genau und Einflüsse durch die Messung der Wachstumsfuge oder Fehler durch Bohrartefakte spielen eine eher untergeordnete Rolle.

### 5.3.4 Biomechanische Prüfungen

Trabekulärer Knochen ist viskoelastisch (Linde et al. 1992). Die elastische Komponente äußert sich darin, dass der Knochen nach axialer Belastung wieder seine ursprüngliche Länge erreicht, solange die elastische Grenze nicht überschritten wird. Der Koeffizient von Belastung zu Verformung bezeichnet die Steifigkeit des Materials. Zur Untersuchung dieser Materialeigenschaft wird häufig eine uniaxiale Druckprüfung durchgeführt. Dabei wird zwischen zwei parallelen Ebenen Druck auf die Probe aufgebracht und gleichzeitig Kraft und Probenverformung gemessen. Man erhält eine Kraft-Verformungskurve, wie sie in Abb. 24 dargestellt ist. Die Kurve ist charakterisiert durch einen nicht-linear ansteigenden Anfangsabschnitt (I), einen linearen Mittelabschnitt (II) und einen nicht-linear abfallenden Endabschnitt (III). Die Gerade durch den linearen Teil bezeichnet die Steigung der Kurve, aus der dann das Elastizitätsmodul berechnet werden kann. In diesem linearen Abschnitt ist die Verformung des Knochens reversibel. An dem Punkt jedoch, an dem die Kurve

beginnt abzuflachen, gibt die Probe nach. Dies ist mit strukturellen Änderungen im Knochen verbunden. Allerdings kann dieser Punkt der Kurve nicht genau definiert werden. Anders dagegen kann das erste Maximum der Kurve genau bestimmt werden. Dieser Punkt wird als Bruchgrenze bezeichnet (Abb. 24).

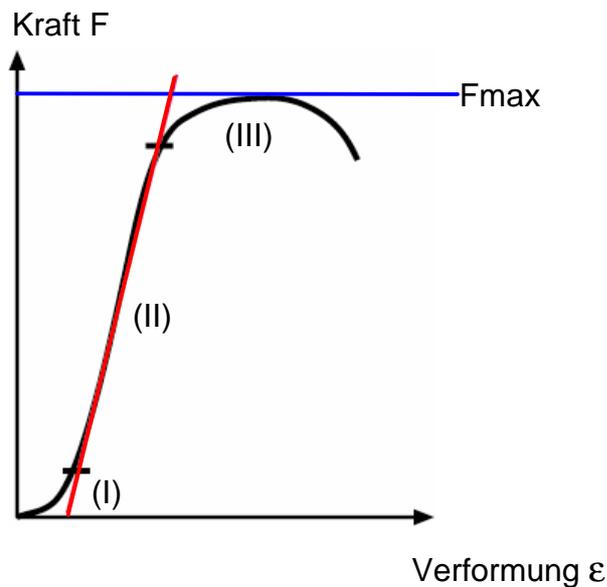


Abb. 24: Kraft-Verformungskurve bei einer uniaxialen Druckprüfung

In unserer Studie wurden unterschiedliche Druckprüfungen durchgeführt. Die Bioplate aus der Lendenwirbelsäule wurden zerstörend geprüft, weil die Genauigkeit bei dieser Messung größer ist. Die Tibiabioplate wurden dagegen nicht-zerstörend geprüft, wodurch wir in der Lage waren, verschiedene Richtungen zu testen. Daher wurden die Tests nur bis zur optisch erkennbaren Abflachung der Kurve durchgeführt und dann gestoppt. Allerdings ist das Risiko, dass man zu spät stoppt und die Probe bereits nachgegeben hat, relativ groß, so dass man beim ersten Test strukturelle Änderungen im Knochen herbeigeführt haben könnte, die dann die Ergebnisse der zweiten Messung beeinflussen.

Die Richtigkeit des Testverfahrens wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. Schon bei der Biopsie können strukturelle Schäden auftreten. Anders als bei der  $\mu$ CT-Analyse fließen bei der biomechanischen Prüfung die Bohrartefakte in der Peripherie mit in das Ergebnis ein. Zudem verlieren die abgesägten Trabekel an der Ober- und Unterseite des Zylinders ihre Stabilität, weil ihnen durch den Sägevorgang

die Verbindungen zueinander fehlen. In der Folge sind diese Trabekel in der Lage, sich stärker zu biegen und auseinander zu weichen als dies im intakten Zustand möglich wäre. Dieses Phänomen führt zu einer signifikant größeren axialen Verformung nahe der Oberfläche (Linde et al. 1992). Als Konsequenz werden axiale Deformationen überbewertet. Wie stark diese Überschätzung ausfällt, hängt von der Probenlänge ab.

Auch die Probengeometrie hat einen Einfluss auf die Richtigkeit. Am besten geeignet sind Würfel mit einer Kantenlänge von 6,5 mm oder Zylinder mit einem Längen-Durchmesser-Verhältnis von 1–1,5 und einem Durchmesser von 6–8 mm (Linde et al. 1992). Unsere Biotat-Zylinder hatten ein L/D-Verhältnis von 1,5–1,6 und einen Durchmesser von 6 mm. Auch hier gilt, dass die Steifigkeit bei kürzeren Proben überbewertet wird. Beim Sägen der Proben ist zudem darauf zu achten, dass planparallele Endflächen entstehen. Je weniger parallel die Probe zugeschnitten wird, desto ungenauer wird die Messung.

Da sich schon in den ersten 24 Stunden post mortem die mechanischen Eigenschaften des Knochens ändern (Fitzgerald 1975 und 1977), muss darauf geachtet werden, die Druckprüfung nicht zu lange hinauszuzögern. In unserer Studie sind von der Tötung des Tieres bis zur mechanischen Testung des entnommenen Biotats nicht mehr als maximal sieben Stunden vergangen. Die Proben wurden nach der Entnahme in physiologischer Kochsalzlösung feucht gehalten. Außerdem wurde darauf geachtet, die Umgebungsbedingungen während der Prüfung konstant zu halten. Unsere Proben wurden bei Raumtemperatur (20–22 °C) getestet. Dabei ist zu bedenken, dass das Elastizitätsmodul bei Raumtemperatur 7 % und die Druckfestigkeit 5 % höher liegt als bei Körpertemperatur (Brear et al. 1988). Die Luftfeuchtigkeit lag während der Prüfung zwischen 35 % und 39 %.

Ein weiterer Einflussfaktor ist die Testrichtung. Da trabekulärer Knochen anisotrop ist (Katz und Meunier 1987), liefern Drucktests in verschiedenen Richtungen auch unterschiedliche Ergebnisse. Üblicherweise werden Knochenbiotate in physiologischer Belastungsrichtung getestet. Bei den Biotaten aus der Lendenwirbelsäule war dies der Fall. Die Tibiabiotope wurden jedoch in mediolateraler Richtung aus dem Tibiaplateau gewonnen, weil es rein

operationstechnisch nicht anders möglich war. Die physiologische Lastrichtung steht dazu jedoch in einem 90°-Winkel. Neben der Richtung hat auch das Testverfahren an sich einen Einfluss auf die Richtigkeit. Wie schon eingangs erwähnt, ist die Richtigkeit bei zerstörenden Druckprüfungen besser als bei nicht-zerstörenden (Linde et al. 1992). Das liegt daran, dass bei der zerstörenden Druckprüfung die Bruchgrenze genau definiert und die Druckfestigkeit der Probe daher ein exakter Wert ist. Dagegen ist der Beginn der Kurvenabflachung nicht genau definierbar, sondern nur subjektiv beurteilbar. Somit ist die Ermittlung des Elastizitätsmoduls bei einer nicht-zerstörenden Druckprüfung in aller Regel ungenauer.

Auch die Materialtestmaschine selbst kann durch auftretende Deformationen während einer Prüfung zur Ungenauigkeit beitragen. Die Steifigkeit der Maschine ist zwar grundsätzlich größer als die von trabekulärem Knochen, aber trotzdem kommt es auch in den Einspannvorrichtungen und vor allem in der Kraftmessdose zu geringfügigen Verformungen. Die durch diese Verformungen entstehenden Fehler wurden durch die Messung der Dehnungen mit einem separaten Längenmessaufnehmer weitestgehend vermieden (Abb. 10).

Ein wichtiger Einflussfaktor ist zu guter Letzt die entstehende Reibung zwischen der Probe und der Maschine. Bei Druck werden die zentralen Bereiche des Knochenzylinders weniger belastet als die peripheren (Cook und Larke 1945). Diese Inhomogenität der axialen Belastung führt zu einer Überbewertung des Elastizitätsmoduls. Bei steigender Belastung kommt es zu immer besserem Kontakt der Platten zur Knochenoberfläche. So erklärt man sich auch den anfänglichen nicht-linearen Teil der Kraft-Dehnungskurve beim Testen trabekulären Knochens.

Die Präzision der mechanischen Prüfung kann durch Wiederholungsmessungen ohne Neupositionierung der Probe verbessert werden. Bei den Lendenwirbel-Bioptaten konnten durch die Zerstörung der Probekörper keine Wiederholungsmessung durchgeführt werden. Die Tibiabioptate wurden nach der ersten Messung umgedreht und nochmals geprüft. Unter der Repositionierung der Probe leidet – wie oben erwähnt – die Präzision. Grundsätzlich sollte der Knochenzylinder so positioniert werden, dass die Kraftwirkungslinie zentral durch den Probekörper verläuft. Auch das Aufbringen einer Vorkraft vor Beginn des Tests

(Probenkonditionierung) trägt zu einer größeren Präzision bei. Durch das Aufbringen der Vorkraft wird der Kontakt zwischen Maschine und Knochenendflächen schon vor Prüfungsbeginn optimiert.

### 5.3.5 Histomorphometrie

Mit Hilfe der Histomorphometrie ist man in der Lage, morphologische Eigenschaften des Knochens zu bestimmen. Mit dieser Methode kann man ferner den Knochenumbau quantitativ erfassen. Ähnlich wie beim  $\mu$ CT erhält man Informationen über die Struktur des Knochens. Diese Informationen kommen allerdings nur aus einer Schnittebene und sind daher zweidimensional. Zusätzlich konnten wir mit der Histomorphometrie im Gegensatz zum  $\mu$ CT auch Daten über neu gebildetes Osteoid sammeln, weil dieses in der Paragon-Färbung stärker angefärbt ist als alter Knochen und eine Unterscheidung daher möglich ist. Problematisch bei der Histomorphometrie ist die Übertragbarkeit der zweidimensionalen Struktur des histologischen Schnittbildes in dreidimensionale Informationen über die Knochenstruktur (Parfitt et al. 1987). Es gibt vier Arten von direkten zweidimensionalen Messungen am histologischen Schnittbild: Fläche, Länge, Abstand und Anzahl. Aber der Knochen kann nicht vollständig verstanden werden, wenn man ihn nicht dreidimensional beschreibt. Es wird daher versucht, über die Betrachtung der zweidimensionalen Gegebenheiten Rückschlüsse auf die dreidimensionale Wirklichkeit zu ziehen. Jedoch müsste die Knochenprobe isotrop, das heißt in alle Raumrichtungen gleich sein, damit man bei diesen Berechnungen keine zu großen Fehler macht. Jedoch ist diese Isotropie nicht an allen Lokalisationen gegeben. Gerade im Wirbelkörper und an der proximalen Tibia ist das trabekuläre Netzwerk stark anisotrop. In unserer Studie kamen für die histomorphometrischen Untersuchungen die Femurkondylen zum Einsatz. Hier ist die Anisotropie weniger stark ausgeprägt als an der Tibia. Es wurde daher davon ausgegangen, dass der Fehler bei der Übertragung in dreidimensionale Analysewerte nicht allzu groß war. Statt Knochen- und Osteoidfläche wurden deshalb Knochen- und Osteoidvolumen angegeben. Der Knochen- und Osteoidumfang wurde dreidimensional als Knochen- und Osteoidoberfläche und die trabekuläre Breite wurde als trabekuläre Dicke angegeben. Einzig die Anzahl der Trabekel, die ja

zweidimensional bestimmt wurde, wurde auch in dieser Weise angegeben, weil zur Anzahl kein dreidimensionales Pendant existiert.

## 5.4 Diskussion der Ergebnisse

### 5.4.1 Interne Konsistenz der Daten

Am Calcaneus wurde die Gesamtdichte des Knochens sowohl mit DXA wie auch mit pQCT untersucht. Somit kann man an diesem Messort beide Methoden miteinander vergleichen. Die Korrelation zwischen DXA-BMD und pQCT-BMD war nur mäßig ( $R^2 = 0,45$ ). Das könnte zum einen daran liegen, dass mit DXA der gesamte Calcaneus gescannt und auch ausgewertet wurde, während mit der pQCT ein einziger Querschnitt aus dem Zentrum des Knochens analysiert wurde. Zudem wurde bei der pQCT-Untersuchung der bereits explantierte Knochen ohne umgebendes Weichgewebe gescannt. Die DXA-Untersuchung wurde dagegen in vivo durchgeführt, so dass ein – wenn auch geringer Fehler – durch das umgebende Weichgewebe in die Messung mit einfließt.

Dichte und biomechanische Eigenschaften des Knochens korrelieren gut miteinander. Dies wurde in unzähligen Studien an verschiedenen Knochen nachgewiesen. In unserer Studie wurden an zwei unterschiedlichen Messorten Dichte und mechanische Eigenschaften untersucht. An der Tibia korreliert die pQCT-Dichte und das Elastizitätsmodul gut ( $R^2 = 0,56$ ). Die pQCT-Dichte der Biopate aus dem 4. Lendenwirbel korreliert sogar sehr gut mit der Druckfestigkeit ( $R^2 = 0,71$ ). Die etwas schlechtere Korrelation der BMD mit dem Elastizitätsmodul erklärt sich mit der Ungenauigkeit bei der Bestimmung des Elastizitätsmoduls. Während die Druckfestigkeit ein exakt messbarer Parameter ist, kann man die Abweichung der Kraft-Verformungs-Kurve vom linearen Teil und damit das Elastizitätsmodul weniger genau definieren.

Nicht nur die Dichte, auch die Mikrostruktur des Knochens beeinflusst seine biomechanischen Eigenschaften. Das mit der  $\mu$ CT gemessene Knochenvolumen (BV/TV) korreliert bei den L4-Biopataten gut mit der Festigkeit der Knochenproben

( $R^2 = 0,64$ ). Da sich die Anzahl der Trabekel nachgewiesenermaßen nicht ändert, ist ein höheres Knochenvolumen daher mit dickeren Trabekeln verbunden. Diese sind in der Lage, höhere mechanische Lasten zu tragen als dünnere Trabekel.

Der Vergleich zwischen mit pQCT gemessener Dichte der Knochenbioptate und mit  $\mu$ CT gemessenem Knochenvolumen zeigt eine hervorragende Korrelation ( $R^2 = 0,93$ ). Diese Korrelation ist völlig unabhängig von der Messlokalisation und dem Zeitpunkt der Messung, denn sie gilt sowohl für die Daten der Tibiabioptate zum Zeitpunkt 6. Und 12. Monat, als auch für die Werte der L4-Bioptate vom 12. Monat. Beide Methoden liefern demnach für unterschiedliche Knochen zu unterschiedlichen Zeitpunkten sehr gut vergleichbare Ergebnisse.

#### 5.4.2 Beurteilung der eigenen Ergebnisse und Vergleich mit anderen Studien am Schaf

In der vorliegenden Studie konnten deutliche Veränderungen in der Knochendichte der Schafe nachgewiesen werden. Bei den Kontrolltieren war ein Anstieg in der Knochenmineraldichte über den gesamten Versuchszeitraum von 7 % am Calcaneus und von 16,5 % an der Wirbelsäule zu verzeichnen. Diese Tatsache erschien zunächst verwunderlich, da das Knochenwachstum der vier bis sieben Jahre alten Tiere längst abgeschlossen sein musste. Der Zuwachs an Knochendichte erklärt sich jedoch mit der veränderten Lebens- und Haltungssituation der Tiere nach ihrem Wechsel von der Schäferei in das Versuchsgut der Universität Ulm. Da es sich um Mutterschafe handelte, hatten die Tiere vor Versuchsbeginn schon mehrere Lämmer. Der bei der Gravidität und der anschließenden Laktation erhöhte Calciumbedarf geht auf Kosten des mütterlichen Skeletts (Ringe 1995). Auch beim Menschen ist diese sogenannte postpartale Osteoporose beschrieben (Ringe 1995). Nachdem die Tiere in das Versuchsgut gewechselt waren, fielen diese beiden das Skelett belastenden Faktoren gänzlich weg. Die „Erholung“ des Knochens spiegelte sich in der Zunahme der Knochendichte bei den Kontrolltieren wider. Auch die Gruppe der nur ovariektomierten Tiere hatte einen Zuwachs an Knochenmineraldichte zu verzeichnen. Dieser fiel allerdings geringer aus als bei den Kontrolltieren. Dies lässt sich damit erklären, dass der „Erholungseffekt“ der Knochen

bei diesen Tieren durch die gesteigerte Knochenresorption infolge der Ovariectomie und durch die Hemmung des Knochenaufbaus unter Östrogenmangel verlangsamt wurde. In der dritten Gruppe wurde der „Erholungseffekt“ von den Effekten der Glukokortikoid-Behandlung gänzlich überlagert. Während des Behandlungszeitraumes sank die Knochenmineraldichte peripher um etwa 4,5 % und an der Wirbelsäule um 15 %. Nach Beendigung der Behandlung stieg sie jedoch im gleichen Maße wie bei der Kontrollgruppe an und erreichte zum Versuchsende wieder den Ausgangswert. In der Studie von Lill und Mitarbeitern (2000) verloren die OVX+GLU-Tiere in sechs Monaten 40 % ihrer Knochenmineraldichte an der distalen Tibia. Allerdings sind das die Ergebnisse von nur zwei Tieren. In unserer Studie betrug der Verlust der mit pQCT gemessenen Knochendichte der trabekulären Tibiabiopate 30 %. Dagegen lagen die Werte der ebenfalls spongiösen Wirbelbiopate beim pQCT nur 4,4 % niedriger als die Werte der Kontrollgruppe. Bei Turner et al. (1995b) kam es bei den OVX-Tieren zu einem leichten Absinken der Knochenmineraldichte am Calcaneus, dem distalen Radius und an der Wirbelsäule. Der Verlust bewegte sich an allen Lokalisationen in einem Rahmen von 1–4 %. Am Femur, der proximalen Tibia und dem proximalen Humerus waren dagegen auch nach zwölf Monaten keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Deloffre und Mitarbeiter fanden 1995 keine Unterschiede in der Knochenmineraldichte von glukokortikoid-behandelten Schafen. Die Werte lagen sowohl am Femur als auch an der Wirbelsäule 1–2 % über der Kontrolle.

Auch die Knochenstruktur wurde in unserer Studie nachhaltig beeinflusst. Die Veränderungen betrafen an der Tibia das Knochenvolumen, die Knochenoberfläche und die trabekuläre Dicke und lagen bei den ovariectomierten und glukokortikoidbehandelten Schafen um etwa 30 % niedriger als bei der Kontrollgruppe. Nur die Anzahl der Trabekel änderte sich nicht. Auch hier fielen die Veränderungen in der Spongiosa der Wirbelsäule wesentlich geringer aus. Lill et al. (2000) untersuchten ebenfalls die Knochenstruktur mittels  $\mu$ CT. Auch bei deren Schafen lagen die Veränderungen in einer Größenordnung von 20–30 %. Allerdings reduzierte sich auch die Anzahl der Trabekel. Das in unserer Studie mit Histomorphometrie gemessene Knochenvolumen der Femurkondylen war ebenso wie die Knochenoberfläche deutlich verändert. Die Größenordnung lag zwischen 15 und 20 %. Bei den OVX-Tieren waren dagegen die Unterschiede zur

Kontrollgruppe nicht so stark ausgeprägt. Turner untersuchte 1995 das Knochenvolumen bezogen auf das gesamte Gewebevolumen von Beckenkammbiopsaten mit histomorphometrischen Methoden und fand bei OVX-Tieren nach sechs Monaten eine Erhöhung um 1,4 % (Turner et al. 1995a). Bei Fini et al. (2000) lagen die Werte der OVX-Tiere für BV/TV sowie für die trabekuläre Dicke 25 % und die Anzahl der Trabekel 2 % niedriger als bei den Kontrolltieren. Auch hier wurden Beckenkammbiopsate histomorphometrisch ausgewertet. Chavassieux untersuchte das Verhalten von Osteoid bei glukokortikoid-behandelten Schafen. Das Osteoidvolumen lag am Beckenkamm 40 % unter dem Osteoidvolumen der Kontrolltiere (Chavassieux et al. 1993). In unserer Studie war das Osteoidvolumen und die Osteoidoberfläche sogar noch stärker reduziert. Die Unterschiede zur Kontrollgruppe betragen 50-70 %. Beiden Studien gemeinsam war die große Streuung der Werte, so dass die Unterschiede nicht signifikant waren. Der Grund für die verringerte Osteoidbildung liegt einerseits in der Hemmung des Knochenaufbaus unter Östrogenmangel und andererseits in der Verminderung der Osteoblastendifferenzierung sowie der Induktion eines vorzeitigen Zelltodes bereits bestehender Osteoblasten unter Glukokortikoideinfluss (Manolagas und Weinstein 1999). Durch diese Mechanismen wird ein Knochenaufbau weitestgehend unterdrückt und es ist weniger neu gebildetes Osteoid nachweisbar.

Die biomechanischen Eigenschaften des Knochens unserer OVX+GLU-Schafe waren deutlich verändert. An der Tibia nahm das E-Modul schon nach sechs Monaten gegenüber der Kontrollgruppe um 20 % ab und war nach zwölf Monaten sogar um mehr als die Hälfte (-62 %) geringer als die Kontrollgruppe. Auch an der Wirbelsäule konnte man große Unterschiede zur Kontrollgruppe feststellen. Davon war sowohl die Steifigkeit als auch die Druckfestigkeit der Proben betroffen. Knochen von ovariectomierten und glukokortikoidbehandelten Tieren hatten ein um 23 % vermindertes Elastizitätsmodul. Die Druckfestigkeit war um 12 % reduziert. Nur Deloffre untersuchte bisher die Steifigkeit von Lendenwirbelsäule-Biopsien aus Glukokortikoid-Schafen und fand keinen Unterschied zur Kontrollgruppe (Deloffre et al. 1995).

### 5.4.3 Vergleich mit Studien an anderen Tierarten

Bei der Ratte führt eine Ovariectomie zu einem gesteigerten Knochenumbau (Wronski et al. 1988). Dabei wird der höhere Knochenabbau nicht mehr komplett kompensiert durch einen ebenfalls erhöhten Knochenaufbau, so dass eine Dysbalance entsteht (Kalu 1991; Glatt 2001). Von diesen Veränderungen ist – wie beim Menschen – der trabekuläre Knochen und das axiale Skelett stärker betroffen als der kortikale Knochen und das periphere Skelett. Die Ratte reagiert wesentlich stärker auf eine durch Ovariectomie hervorgerufene Östrogenmangelsituation als das Schaf. Dies könnte daran liegen, dass bei der Ratte über das ganze Jahr kontinuierlich Zyklen ablaufen und daher keine längeren Phasen mit niedrigem Östradiolspiegel entstehen. Ein längerfristiger Östrogenmangel nach der Ovariectomie bedeutet für die Ratte demnach eine einschneidende Veränderung der Stoffwechselsituation des Knochens. Beim Schaf dagegen gibt es nur zweimal jährlich Zeiten hoher Sexualaktivität, in denen Zyklen ablaufen. In den Zeiträumen geringer Sexualaktivität kommt es trotz des niedrigen Östradiolspiegels nicht zu einer Osteopenie, weil dies eine natürliche Stoffwechselsituation für das Schaf darstellt. Daher ist es durchaus denkbar, dass auch eine längerfristige Östrogenmangelsituation nach erfolgter Ovariectomie nur zu geringfügigen Veränderungen des Knochens führt.

Bei Hunden führt eine Ovariectomie nur zu einer leichten und vorübergehenden Osteopenie im Sinne eines verstärkten Knochenumbaus (Boyce et al. 1990), der sich nach etwa sechs Monaten wieder egalisiert. Der Grund für diese zum Menschen unterschiedliche Reaktion des Knochens auf Östrogenmangel liegt in den Unterschieden im Zyklus und im hormonellen Profil. Die Frau hat einen 5-6fach höheren Östradiolspiegel, der 6-7fach häufiger auftritt als bei der Hündin (Martini et al. 2001). In einer Studie von Martini wurde bei Hunden die Ovariectomie mit einer Glukokortikoid-Behandlung (1mg Prednisolon pro kg) kombiniert und mit drei anderen Versuchsgruppen (Kontrolle, nur OVX, nur GLU) verglichen (Martini et al. 2001). Jede Gruppe bestand aus 4 Schäferhunden. Die Knochendichte der Kontrollgruppe stieg im dreimonatigen Versuchszeitraum an der Lendenwirbelsäule um 3,7 % an, während sie sich am distalen Femur nicht veränderte. Der leichte Anstieg in der Knochenmineraldichte könnte im Zusammenhang mit der Fütterung

kalziumhaltigen Futters stehen. Bei den anderen drei Gruppen sank die BMD an der Wirbelsäule um 3,3-5,3 % und am Femur um 4,3-6,1 %. Die Unterschiede waren nicht signifikant. Auch die Histomorphometrie erbrachte keine Unterschiede im Knochenvolumen, Osteoidvolumen, in der Osteoidoberfläche sowie der Dicke und Anzahl der Trabekel. Bei der Ermittlung der Druckfestigkeit und des E-Moduls ergaben sich allenfalls Tendenzen einer Osteopenie. Lediglich in der nur mit Glukokortikoid-behandelten Gruppe zeigte sich eine deutlich geringere Druckfestigkeit. Jedoch gab es bei den Ergebnissen der Histomorphometrie und der Biomechanik große Variationen innerhalb der Gruppen. Als Fazit lässt sich daher die Aussage treffen, dass bei einer Kombination von Ovariectomie und Glukokortikoid-Behandlung beim Hund – im Gegensatz zum hier vorgestellten Schafsmodell – kein additiver Effekt der beiden Methoden auf den Knochen festzustellen ist. Jedoch haben die Autoren keinerlei Erklärung, warum Hunde nicht auf die Glukokortikoid-Behandlung ansprechen.

Beim Primaten führt ein durch Ovariectomie herbeigeführter Östrogenmangel zu den gleichen Knochenveränderungen wie der postmenopausale Östrogenmangel der Frau. Jerome untersuchte Serummarker und histomorphometrische Parameter bei ovariectomierten Affen und fand eine Steigerung des Knochenumbaus (Jerome et al. 1993). Zudem konnte im zweijährigen Versuchszeitraum ein Verlust an Knochenmineraldichte von 10 % beobachtet werden. Die Größenordnung des Verlustes entsprach ebenfalls exakt den Verhältnissen bei der postmenopausalen Frau. Dass mit ovariectomierten Primaten die Situation der postmenopausalen Osteoporose besser simuliert werden kann als mit dem nur ovariectomierten Schaf, liegt an den Unterschieden im Zyklus beider Tierarten. Das hier vorgestellte ovariectomierte und glukokortikoid-behandelte Schaf kann und soll jedoch gar nicht als Modell für die postmenopausale Osteoporose der Frau dienen. Vielmehr ist es ein Modell für osteopenischen Knochen, anhand dessen neue orthopädische und chirurgische Maßnahmen auf ihre Erfolgsaussichten in der Behandlung osteoporotischer Frakturen überprüft werden können. Dabei spielt es nur eine untergeordnete Rolle, ob der osteopenische Knochen eher den Verhältnissen der postmenopausalen oder denen der glukokortikoid-induzierten Osteoporose entspricht.

#### 5.4.4 Übertragbarkeit auf den Menschen

Der Knochenverlust bei der postmenopausalen Osteoporose des Menschen liegt etwa zwischen 3–5 % pro Jahr und betrifft in erster Linie trabekulären Knochen. In unserer Studie nahm die Knochendichte der OVX-Schafe bezogen auf den Ausgangswert zu Versuchsbeginn zwar zu, lag jedoch in der Peripherie 1,5–4 % niedriger als bei der Kontrollgruppe. An der Wirbelsäule war die Knochendichte 9–13 % geringer als bei den Kontrolltieren. Bei glukokortikoidinduzierter Osteoporose des Menschen beträgt der Verlust an Knochenmineraldichte im ersten Jahr bis zu 12 %. Mit der vorliegenden Arbeit konnte beim OVX+GLU-Schaf eine Reduzierung der BMD während des Behandlungszeitraumes um 4,5 % an den lasttragenden, peripheren Messorten und um 15 % an der Wirbelsäule nachgewiesen werden. Nach Beendigung der Behandlung stieg die Knochenmineraldichte jedoch wieder an und erreichte zum Versuchsende den Ausgangswert. Auch beim Menschen ist beschrieben, dass die glukokortikoidbedingten osteoporotischen Veränderungen nach Absetzen der Medikamente teilweise oder gar vollständig reversibel sind (Reid 1997; van Staa et al. 2000).

In unserer Studie sind die Änderungen der in-vivo-Knochendichte der OVX+GLU-Tiere am axialen Skelett stärker ausgeprägt als in der Peripherie. Dies ist auch für den Menschen beschrieben, bei dem sich die Reduktion der Knochenmineraldichte sowohl bei postmenopausaler als auch bei glukokortikoidinduzierter Osteoporose am deutlichsten an der Wirbelsäule zeigt (Ringe 1995; Weinstein et al. 1998).

Beide Formen der Erkrankung betreffen beim Menschen den trabekulären Knochen (Gallagher 1990). Daher wurden auch in der vorliegenden Arbeit insbesondere die Reaktionen der trabekulären Strukturen umfassend untersucht. Bei den ovariectomierten und glukokortikoidbehandelten Schafen war die Knochenmineraldichte von trabekulärem Knochen aus verschiedenen Lokalisationen deutlich reduziert. Auch strukturelle Änderungen konnten nachgewiesen werden. Unter Östrogenmangel und Glukokortikoideinfluss nahm das Knochenvolumen und die Dicke der Trabekel ab und die Knochenoberfläche im selben Maße zu. Die

daraus resultierende strukturelle Schwäche der Spongiosa zeigte sich auch bei den biomechanischen Tests: Elastizitätsmodul und Druckfestigkeit waren verringert.

Jedoch weist das vorgestellte Tiermodell auch Mängel auf, welche die Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen erschweren. Bei der Frau sinkt der Östrogenspiegel vor der Menopause langsam und kontinuierlich ab, bis die Östrogenproduktion der Ovarien schließlich völlig zum Erliegen kommt. Nach der Menopause stammt das Östrogen nur noch aus adipösem Gewebe, wo es aus Östron und Testosteron synthetisiert wird (Pacifci 1996). Schafe haben keine natürliche Menopause. Durch Ovariectomie kann allerdings eine künstliche Menopause geschaffen werden. Jedoch kommt es durch die Ovariectomie zu einem plötzlichen Abfall des Östrogenspiegels, was der Situation beim Menschen nicht entspricht.

Ein wichtiges Kriterium einer klinisch manifesten Osteoporose ist das Auftreten von Frakturen (Consensus Development Statement 1997). Diese Frakturen entstehen bereits bei geringfügiger Krafteinwirkung (Spontanfrakturen) und zeigen sich insbesondere an der Wirbelsäule. Beim Schaf treten auch bei ausgeprägter Osteopenie keine Spontanfrakturen auf. Dies liegt zum einen daran, dass die Knochenmineraldichte beim Schaf wesentlich höher ist als beim Menschen. Während die Werte beim Menschen etwa  $200 \text{ mg/cm}^3$  erreichen (Aerssens et al. 1998), haben die Schafe aus unserer Studie Knochendichten in einer Größenordnung von  $600 \text{ mg/cm}^3$ . Zum anderen ist die Druckfestigkeit von spongiösen Zylindern aus der menschlichen Wirbelsäule mit  $1,2 \text{ MPa}$  (Aerssens et al. 1998) sehr viel geringer als die Druckfestigkeit von Zylindern aus der Schafswirbelsäule ( $13,2 \text{ MPa}$ ).

In unserer Studie konnten anhand der bisherigen Untersuchungen zwar detaillierte Erkenntnisse über das Verhalten des gesamten und des trabekulären Knochens unter Östrogenmangel und Glukokortikoideinfluss gewonnen werden, jedoch sind Rückschlüsse auf die Reaktion der Kortikalis ohne weitergehende Analysen nicht möglich.

## 5.5 Anwendung des Tiermodells

Die Osteoporose des Menschen zeichnet sich aus durch die reduzierte Festigkeit des Knochens auf Grund verminderter Knochenmasse und verschlechterter Knochenarchitektur. In der Folge ist das Frakturrisiko für den Patienten stark erhöht. Die chirurgische Versorgung dieser Frakturen gestaltet sich oft als schwierig, weil eine sichere Verankerung von Implantaten im porösen Knochen nicht gewährleistet werden kann. Ein wichtiges Ziel der derzeitigen Osteoporoseforschung ist es daher, adäquate Behandlungsmöglichkeiten für osteoporotische Frakturen zu entwickeln. Vorstellbar ist dabei die Entwicklung eines neuen Materials zur Schraubenaugmentation. Für die Fixierung von Schrauben im osteoporotischen Knochen wird bisher Knochenzement aus Polymethylmethacrylat (PMMA) benutzt. Die Augmentation der Schrauben mit diesem Material verbessert ganz erheblich die mechanische Stabilität des umgebenden trabekulären Knochens und vermindert deutlich die Häufigkeit des Versagens der Osteosynthese. Jedoch hat diese Methode nicht nur Vorteile. PMMA härtet nur unter starker lokaler Wärmeentwicklung aus. Zudem werden im Laufe der Zeit toxische Substanzen aus dem Material freigesetzt. Ein großer Nachteil ist, dass PMMA nicht abgebaut werden kann und somit die umgebenden Knochen trabekel entlastet, worauf sich diese auf Grund des fehlenden mechanischen Reizes zurückbilden. Nicht zu vergessen ist, dass eventuell notwendige erneute Eingriffe durch den Knochenzement behindert werden. Ein neu entwickeltes Material, das die gleiche mechanische Stabilität wie PMMA bietet, nicht jedoch seine Nachteile aufweist, könnte mit dem hier vorgestellten Tiermodell sehr gut getestet werden. Ein weiterer Anwendungsbereich für das Modell ist das Testen neuartiger Knochenimplantate. Vorstellbar wäre die Entwicklung eines neuen Schraubendesigns für eine verbesserte Haltefestigkeit im Knochen (Augat et al. 2002). Das osteoporotische Schaf könnte dazu dienen, Stabilitätsverbesserungen durch neuartige Schrauben zu überprüfen.

Nicht geeignet ist das Tiermodell dagegen für Studien über die Vorhersagbarkeit eines Frakturrisikos, da das osteoporotische Schaf keine Spontanfrakturen erleidet. Auch die Erprobung therapeutischer Wirkstoffe – wie von der FDA zusätzlich zum Rattenmodell gefordert – ist nicht ganz unproblematisch. Es liegen keinerlei Daten vor, wie die Kombination aus Ovariectomie und längerfristiger

Glukokortikoid-Behandlung den Stoffwechsel beeinflusst. Man kann daher nicht generell davon ausgehen, dass der Wirkstoffmetabolismus des zu testenden Medikaments im Tiermodell mit dem im Menschen vergleichbar wäre.

## 5.6 Schlussfolgerungen

Schafe rücken für die Osteoporoseforschung mehr und mehr in den Vordergrund des Interesses. Der Grund dafür ist die Körpergröße, die einfache Handhabung und das mit dem Menschen vergleichbare Knochenremodeling. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Ovariectomie der Tiere zu leichten Veränderungen des Knochens führt. Jedoch sind diese Veränderungen zu gering, als dass sie die Situation beim Menschen korrekt wiedergeben könnten. Andererseits hat eine Glukokortikoid-Behandlung erhebliche Auswirkungen auf den Knochen, was den Schluss nahe legt, dass eine Kombination von Ovariectomie und eben dieser Glukokortikoid-Behandlung den Knochen des Schafes so verändert, dass die Situation des osteoporotischen Menschen simuliert werden kann. Mit der vorliegenden Studie ist es gelungen, diese Auswirkungen auf den Knochen zu quantifizieren. Dabei wurden die Knochendichte, Knochenstruktur und biomechanische Eigenschaften umfassend untersucht.

DXA und pQCT sind in der Praxis gängige Verfahren zur Messung der Knochendichte. Mit DXA ist eine Verlaufskontrolle möglich, die Methode kann aber nur eingeschränkt als Detektor für trabekuläre Veränderungen dienen. Das pQCT ist in dieser Hinsicht besser geeignet, weil man mit diesem Verfahren zwischen kortikalem und trabekulärem Knochen unterscheiden kann. In der vorliegenden Studie ist es gelungen, die Knochendichte durch die Kombination von Ovariectomie und Glukokortikoid-Behandlung in dem Maße zu verringern, wie dies auch beim osteoporotischen Menschen der Fall ist. Von dieser Reduktion war der trabekuläre Knochen stärker betroffen als der Gesamtknochen.

Zur Darstellung von Veränderungen in der Knochenarchitektur ist das  $\mu$ CT die optimale Methode. Mit diesem Verfahren können durch die hohe Auflösung kleinste Veränderungen präzise dargestellt werden, ohne dass die Probe dabei zerstört werden müsste. Durch die Vielzahl der Schnitte ist das  $\mu$ CT das genaueste der angewendeten Verfahren. Mit der Histomorphometrie ist es uns zwar – im Gegensatz zum  $\mu$ CT – gelungen, auch Aussagen über neu gebildetes Osteoid zu treffen, jedoch ist die Histomorphometrie in der Analyse der übrigen Knochenstruktur-Parameter dem  $\mu$ CT eindeutig unterlegen. In der vorliegenden Arbeit waren die Knochenstruktur-Parameter der Knochenproben aus den peripheren Messorten der OVX+GLU-Gruppe gegenüber denen der Kontrollgruppe deutlich vermindert. Die Werte der Wirbelsäule waren dagegen weniger stark verändert.

Die Biomechanik wurde in bisherigen Studien kaum untersucht. In unserer Studie sind die mechanischen Eigenschaften ein wichtiges Untersuchungskriterium. Es stellte sich heraus, dass die Prüfung der Druckfestigkeit genauer war als die Prüfung der Steifigkeit, jedoch geht sie immer mit einer Zerstörung der Probe einher, so dass diese nicht mehr für weiter gehende Untersuchungen zur Verfügung steht. Druckfestigkeit und Steifigkeit der Knochenproben von OVX+GLU-Schafen waren deutlich niedriger als bei der Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen den Schluss nahe, dass dieses Tiermodell dafür geeignet ist, neue orthopädische Behandlungsmethoden, spezielle Prothesen und Implantate auf ihre Wirksamkeit bzw. Funktionalität hin zu überprüfen. So könnte das ovariektomierte und glukokortikoid-behandelte Schaf dazu beitragen, dass in Zukunft die chirurgische Versorgung osteoporotischer Frakturen größere Heilungsaussichten hat und sich damit die Lebenssituation der betroffenen Patienten verbessert.

## **6 Zusammenfassung**

Ziel der Studie war die Evaluierung und Etablierung eines Großtiermodells für die Osteoporoseforschung. Der Knochenverlust sollte bei 8 Merinolandschafen durch eine Kombination von Ovariectomie zu Beginn der Studie und einer anschließenden 6-monatigen Glukokortikoid-Behandlung hervorgerufen werden. Die Tiere wurden mit einer nur ovariectomierten Gruppe (n=8) und einer unbehandelten Kontrollgruppe (n=9) verglichen.

Zur Quantifizierung der Veränderungen des Schafsknochens unter Östrogenmangel und Glukokortikoid-Behandlung wurde eine Vielzahl densitometrischer, morphometrischer und biomechanischer Methoden eingesetzt. Mit der Dual-energy X-ray Absorptiometry konnte eine In-vivo-Verlaufskontrolle über die Entwicklung der Knochenmineraldichte im Gesamtknochen während des Versuchszeitraums gemacht werden. Die quantitative Computertomographie-Analyse gab dagegen Aufschluss über unterschiedliche Reaktionen des trabekulären und des Gesamtknochens. Mit Hilfe von hoch auflösenden Mikrocomputertomographie-Schnitten konnten detaillierte Erkenntnisse über Veränderungen in der Knochenarchitektur gewonnen werden. Die Histomorphometrie lieferte Informationen über neu gebildetes Osteoid. Die biomechanischen Eigenschaften der Schafsknochen wurden mit Drucktests überprüft. Dabei konnte die Steifigkeit und die Druckfestigkeit der Proben ermittelt werden. Für diese umfassende Untersuchung der verschiedenen Parameter wurde sowohl Gesamt- als auch trabekulärer Knochen aus den unterschiedlichsten Körperregionen der Schafe verwendet.

Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass eine Kombination von Ovariectomie und Glukokortikoid-Therapie eine Osteoporose beim Schaf erzeugt. Dabei kommt es zu einer Verringerung der Knochendichte am Gesamtknochen um 5–15 % und am trabekulären Knochen sogar um bis zu 30 %. Diese Veränderungen sind am Gesamtknochen reversibel, am trabekulären Knochen bleiben sie jedoch bis zum Versuchsende bestehen. Beeinflusst wird auch die Knochenarchitektur: Knochenvolumen, Knochenoberfläche und die Dicke der Trabekel sind stark verändert (bis 30 %). Die Anzahl der Trabekel bleibt dagegen gleich. Knochen von behandelten Tieren sind weniger steif (20–60 %) und brechen schon unter geringerer

Belastung als Knochen von Kontrolltieren. Die Neubildungsrate von Osteoid ist unter Östrogenmangel und Glukokortikoideinfluss merklich reduziert (50-70 %).

Somit stellt das ovariectomierte und glukokortikoid-behandelte Schaf ein gutes Modell für osteopenischen Knochen dar. Anhand dieses Tiermodells wird es möglich sein, besondere Verankerungsmechanismen oder speziell für den Osteoporosepatienten entwickelte Implantate direkt am porösen Knochen zu testen. Für die Erprobung neuer orthopädischer Techniken zur chirurgischen Versorgung osteoporotischer Frakturen ist dieses Modell ebenfalls gut geeignet.

## **7 Summary**

Sandra Schorlemmer

### **A large animal model of osteoporosis: The ovariectomized and glucocorticoid treated sheep**

The aim of this study was to evaluate and establish a large animal model of osteoporosis by a combination of ovariectomy and steroid treatment. A variety of densitometric, morphometric and biomechanical methods were used to quantify changes in ovine bone under estrogen-deficiency and glucocorticoid treatment. With DXA we monitored the progression of the loss of bone mineral density of integral bone at the central and the load-bearing skeleton. Peripheral QCT was employed to determine the different responses of trabecular and integral bone. High-resolution  $\mu$ CT-images allowed the evaluation of precise morphometrical parameters. Histomorphometric analyses provided information about newly formed osteoid. Stiffness and strength of trabecular bone were assessed by uniaxial compression tests. For all these examinations we utilized integral or trabecular bone from various skeletal locations.

The results of this study showed that a combination of ovariectomy and glucocorticoid treatment leads to osteopenia in sheep. Bone mineral density of integral bone was reduced during glucocorticoid treatment and returned to normal values thereafter. However, loss of bone mineral at trabecular sites was not reversible. Corticoid treatment also affected the microarchitecture of trabecular bone: bone volume, bone surface and trabecular thickness differed from the control group. However, trabecular number did not change under steroid treatment. Bone stiffness and strength of trabecular bone of corticoid treated animals were markedly reduced.

These results showed the suitability of the ovariectomized and glucocorticoid treated sheep as an animal model in osteoporosis research. It could be used to develop new orthopaedic techniques or to test prosthetic designs or implants for the treatment of osteoporotic fractures.

## **8 Literaturverzeichnis**

Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J: Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 139: 663-670 (1998)

Alho A, Husby T, Hoiseth A: Bone mineral content and mechanical strength. An ex vivo study on human femora at autopsy. *Clin Orthop* 227: 292-297 (1988)

Anonymous: Consensus Development Statement. *Osteoporosis International* 7: 1-6 (1997)

Augat P, Gordon CL, Lang TF, Iida H, Genant HK: Accuracy of cortical and trabecular bone measurements with peripheral quantitative computed tomography (pQCT). *Phys. Med. Biol.* 43: 2873-2883 (1998a)

Augat P, Fuerst T, Genant HK: Quantitative bone mineral assessment at the forearm: a review. *Osteoporos Int* 8: 299-310 (1998b)

Augat P, Rapp S, Claes L: A modified hip screw incorporating injected cement for the fixation of osteoporotic trochanteric fractures. *J Orthop Trauma*: in press (2002)

Bostedt H, Dedié K: *Schaf- und Ziegenkrankheiten*. 2. Aufl. Ulmer, Stuttgart (1996)

Boyce RW, Franks AF, Jankowsky ML, Orcutt CM, Piacquadio AM, White JM, Bevan JA: Sequential histomorphometric changes in cancellous bone from ovariectomized dogs. *J Bone Miner Res* 5: 947-953 (1990)

Boyce RW, Ebert DC, Youngs TA, Paddock CL, Mosekilde L, Stevens ML, Gundersen HJ: Unbiased estimation of vertebral trabecular connectivity in calcium-restricted ovariectomized minipigs. *Bone* 16: 637-642 (1995)

Brear K, Currey JD, Raines S, Smith KJ: Density and temperature effects on some mechanical properties of cancellous bone. *Engng Med* 17: 163-167 (1988)

Brommage R: Perspectives on using nonhuman primates to understand the etiology and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Musculoskel Neuron Interact* 1: 307-325 (2001)

Cann C: Quantative CT for determination of bone mineral density. A review. *Radiology* 166: 509-522 (1988)

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. *J Bone Miner Res* 16: 97-103 (2001)

Chavassieux P, Pastoureau P, Chapuy MC, Delmas PD, Meunier PJ: Glucocorticoid-induced inhibition of osteoblastic bone formation in ewes: a biochemical and histomorphometric study. *Osteoporos Int* 3: 97-102 (1993)

Chavassieux P, Buffet A, Vergnaud P, Garnero P, Meunier PJ: Short-term effects of corticosteroids on trabecular bone remodeling in old ewes. *Bone* 20: 451-455 (1997)

Claes L, Augat P: Models in fracture healing; report from the Reimsburg workshop September 1999 (1999)

Conference Report: Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 94: 646-650 (1993)

Cook M, Larke EC: Resistance of copper and copper alloys to homogeneous deformation in compression. *J Inst Metal* 71: 371-390 (1945)

Dambacher MA, Ruegsegger P: Nichtinvasive Untersuchungsmethoden bei Osteoporosen. *Ther Umsch* 42: 339-350 (1985)

Davidson MK, Lindsey JR, Davis JK: Requirements and selection of an animal model. *Isr J Med Sci* 23: 551-555 (1987)

Deloffre P, Hans D, Rumelhart C, Mitton D, Tsouderos Y, Meunier PJ: Comparison between bone density and bone strength in glucocorticoid-treated aged ewes. *Bone* 17: 409S-414S (1995)

Eastell R, Reid DM, Compston J, Cooper C, Fogelman I, Francis RM, Hosking DJ, Purdie DW, Ralston SH, Reeve J, Russell RG, Stevenson JC, Torgerson DJ: A UK consensus group on management of glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *J Intern Med* 244: 271-292 (1998)

Ebbesen EN, Thomsen JS, Mosekilde L: Nondestructive determination of iliac crest cancellous bone strength by pQCT. *Bone* 21: 535-540 (1997)

Fini M, Pierini G, Giavaresi G, Biagini G, Mattioli Belmonte MM, Nicoli Aldini N, Rocca M, Martini L, Giardino R: The ovariectomised sheep as a model for testing biomaterials and prosthetic devices in osteopenic bone: a preliminary study on iliac crest biopsies. *Int J Artif Organs* 23: 275-281 (2000)

Fischer M, Felsenberg D, Kempers B: Methoden der Knochendichtemessung: Heutiger Stand. *Kliniker* 1: 15-23 (1993)

Fitzgerald ER: Dynamic mechanical measurements during life to death transition in animal tissues. *Biorheology* 12: 397-408 (1975)

Fitzgerald ER: Postmortem transition in the dynamic mechanical properties of bone. *Med. Physics* 4: 49-53 (1977)

Neumann F, Schenk B, Schleusener H, Schweikert HU: Endokrinpharmakologie In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker. 7. Aufl. Spektrum; Akad. Verlag, Heidelberg; Berlin; Oxford (1996)

Frost HM, Jee WSS: On the rat model of human osteopenias and osteoporosis. *Bone Miner* 18: 227-236 (1992)

Gallagher JC: The pathogenesis of osteoporosis. *Bone Miner* 9: 215-227 (1990)

Genant HK, Engelke K, Fuerst T, Gluer CC, Grampp S, Harris ST, Jergas M, Lang T, Lu Y, Majumdar S, Mathur A, Takada M: Noninvasive assessment of bone mineral and structure - state of the art. *J Bone Mineral Res* 11: 707-730 (1996)

Glatt M: The bisphosphonate zoledronate prevents vertebral bone loss in mature estrogen-deficient rats assessed by micro-computed tomography. *European Cells and Materials* 1: 18-26 (2001)

Götte S, Dittmar K: Epidemiologie und Kosten der Osteoporose. *Der Orthopäde* 30: 402-404 (2001)

Guglielmi G, Grimston SK, Fischer KC, Pacifici R: Osteoporosis: diagnosis with lateral and posteroanterior dual x-ray absorptiometry compared with quantitative CT. *Radiology* 192: 845-850 (1994)

Hansen MA, Hassager C, Overgaard K, Marslew U, Riis BJ, Christiansen C: Dual-energy x-ray absorptiometry: a precise method of measuring bone mineral density in the lumbar spine. *J Nucl Med* 31: 1156-1162 (1990)

Hassager C, Christiansen C: Measurement of bone mineral density [editorial]. *Calcif Tissue Int* 57: 1-5 (1995)

Heaney RP: Bone mass, nutrition, and other lifestyle factors. *Nutr Rev* 54: S3-10 (1996)

Hornby SB, Ford SL, Mase CA, Evans GP: Skeletal changes in the ovariectomised ewe and subsequent response to treatment with 17 beta oestradiol. *Bone* 17: 389S-394S (1995)

Jayo MJ, Jerome CP, Lees CJ, Rankin SE, Weaver DS: Bone mass in female cynomolgus macaques: a cross-sectional and longitudinal study by age. *Calcif Tissue Int* 54: 231-236 (1994)

Jee WSS, Roberts WE, Park HZ, Julian G, Kramer M: Interrelated effects of glucocorticoid and parathyroid hormone upon bone remodeling. In: Talmage RV, Munson PL (Hrsg) *Calcium, Parathyroid hormone and the Calcitonins*, Excerpta medica, Amsterdam, S. 430 (1972)

Jerome CP, Carlson CS, Register TC, Bain FT, Jayo MJ, Weaver DS, Adams MR: Bone functional changes in intact, ovariectomized, and ovariectomized, hormone-supplemented adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) evaluated by serum markers and dynamic histomorphometry. *J Bone Miner Res* 9: 527-540 (1993)

Kalu D: The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral* 15: 175-192 (1991)

Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW: The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology* 124: 7-16 (1989)

Kanis JA, Devogelaer JP, Gennari C: Practical guide for the use of bone mineral measurements in the assessment of treatment of osteoporosis: a position paper of the European foundation for osteoporosis and bone disease. The Scientific Advisory Board and the Board of National Societies. *Osteoporos Int* 6: 256-261 (1996)

Katz JL, Meunier A: The elastic anisotropy of bone. *J Biomech* 20: 1063-1070 (1987)

Khosla S: Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142: 5050-5055 (2001)

Lill CA, Fluegel AK, Schneider E: Sheep model for fracture treatment in osteoporotic bone: a pilot study about different induction regimens. *J Orthop Trauma* 14: 559-565 (2000)

Linde F, Hvid I, Madsen F: The effect of specimen geometry on the mechanical behaviour of trabecular bone specimens. *J Biomech* 25: 359-368 (1992)

Manolagas SC, Weinstein RS: New developments in the pathogenesis and treatment of steroid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res* 14: 1061-1066 (1999)

Martini F, Lipovac SR, Delling G, Eberle K, Nestle B, Trnovec T: Einfluss einer Ovariectomie, Kortikosteroidtherapie und kombinierten Therapie auf den Knochen von Hunden. *Osteologie* 10: 88-94 (2001)

McMillen IC, Thorburn GD, Walker DW: Diurnal variations in plasma concentrations of cortisol, prolactin, growth hormone and glucose in the fetal sheep and pregnant ewe during late gestation. *J Endocrinol* 114(1): 65-72 (1987)

Miller LC, Weaver DS, McAlister JA, Koritnik DR: Effects of ovariectomy on vertebral trabecular bone in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Calcif Tissue Int* 38: 62-65 (1986)

Miller PD: Controversies in bone mineral density diagnostic classifications. *Calcified Tissue International* 66: 317-319 (2000)

Mosekilde L, Weisbrode SE, Safron JA, Stills HF, Jankowsky ML, Ebert DC, Danielsen CC, Sogaard CH, Franks AF, Stevens ML, et al.: Evaluation of the skeletal effects of combined mild dietary calcium restriction and ovariectomy in Sinclair S-1 minipigs: a pilot study. *J Bone Miner Res* 8: 1311-1321 (1993a)

Mosekilde L, Weisbrode SE, Safron JA, Stills HF, Jankowsky ML, Ebert DC, Danielsen CC, Sogaard CH, Franks AF, Stevens ML, et al.: Calcium-restricted ovariectomized Sinclair S-1 minipigs: an animal model of osteopenia and trabecular plate perforation. *Bone* 14: 379-382 (1993b)

Newman E, Turner AS, Wark JD: The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 16: 277S-284S (1995)

Nickel R, Schummer A, Seiferle E: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere; Band II. 6. Aufl. Parey, Berlin; Hamburg (1987)

Pacifici R: Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 11: 1043-1051 (1996)

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* 72: 1396-1409 (1983)

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR: Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Journal of Bone and Mineral Research* 2: 595-610 (1987)

Pouilles JM, Collard P, Tremollieres F, Frayssinet P, Railhac JJ, Cahuzac JP, Autefage A, Ribot C: Accuracy and precision of in vivo bone mineral measurements in sheep using dual-energy X-ray absorptiometry. *Calcified Tissue International* 66: 70-73 (2000)

Reid IR: Glucocorticoid osteoporosis-mechanisms and management. *Eur J Endocrinol* 137: 209-217 (1997)

Ringe JD: Osteoporose: postmenopausale Osteoporose, senile Osteoporose, sekundäre Osteoporose, Osteoporose des Mannes. Thieme, Stuttgart; New York (1995)

Ringe JD: Osteoporose: Differentialdiagnostik und Differentialtherapie; Praxiskompodium mit 34 ausgewählten Kasuistiken. Thieme, Stuttgart; New York (1997)

Rodgers JB, Monier-Faugere MC, Malluche H: Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function. *Bone* 14: 369-377 (1993)

Rosen HN, Tollin S, Balena R, Middlebrooks VL, Beamer WG, Donohue LR, Rosen C, Turner A, Holick M, Greenspan SL: Differentiating between orchietomized rats and controls using measurements of trabecular bone density: a comparison among DXA, histomorphometry, and peripheral quantitative computerized tomography. *Calcif Tissue Int* 57: 35-39 (1995)

Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli FR, Mocetti P, Di Grezia R, Wedard BM, Angelucci L, Bonucci E: Evaluation of apoptosis and the glucocorticoid receptor in the cartilage growth plate and metaphyseal bone cells of rats after high-dose treatment with corticosterone. *Bone* 26: 33-42 (2000)

Simmons CA, Hipp JA: Method-based differences in the automated analysis of the three dimensional morphology of trabecular bone. *J Bone Miner Res* 12: 942-947 (1997)

Spencer GR: Pregnancy and lactational osteoporosis. Animal model: porcine lactational osteoporosis. *Am J Pathol* 95: 277-280 (1979)

Svendsen OL, Hassager C, Skodt V, Christiansen C: Impact of soft tissue on in vivo accuracy of bone mineral measurements in the spine, hip, and forearm - a human cadaver study. *J Bone Min* 10: 868-873 (1995)

Takada M, Engelke K, Hagiwara S, Grampp S, Genant HK: Accuracy and precision study in vitro for peripheral quantitative computed tomography. *Osteoporosis Int* 6: 207-212 (1996)

Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ: FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 17: 125S-133S (1995)

Turner AS, Alvis M, Myers W, Stevens ML, Lundy MW: Changes in bone mineral density and bone-specific alkaline phosphatase in ovariectomized ewes. *Bone* 17: 395S-402S (1995a)

Turner AS, Mallinckrodt CH, Alvis MR, Bryant HU: Dose-response effects of estradiol implants on bone mineral density in ovariectomized ewes. *Bone* 17: 421S-427S (1995b)

Turner AS, Mallinckrodt CH, Alvis MR, Bryant HU: Dual-energy X-ray absorptiometry in sheep: experiences with in vivo and ex vivo studies. *Bone* 17: 381S-387S (1995c)

Turner AS: Animal Models of osteoporosis - necessity and limitations. *European Cells and Materials* 1: 66-81 (2001)

Van Staa TP, Leufkens HG, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C: Use of oral corticosteroids and risk of fractures. *J Bone Miner Res* 15: 993-1000 (2000)

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* 102: 274-282 (1998)

Wronski TJ, Cintron M, Dann LM: Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 43: 179-183 (1988)

Wronski TJ, Yen C-F: The ovariectomized rat as an animal model for postmenopausal bone loss. *Cells and Materials Suppl* 1: 69-74 (1991)

Yamada M, Ito M, Hayashi K, et al: Calcaneus as a site for assessment of bone mineral density: evaluation in cadavers and healthy volunteers. *AJR* 161: 621-627 (1993)

Yamaura M, Nakamura T, Nagai Y, Yoshihara A, Suzuki K: Reduced mechanical competence of bone by ovariectomy and its preservation with 24R, 25-dihydroxyvitamin D3 administration in beagles. *Calcif Tissue Int* 52: 49-56 (1993)

## **9 Danksagung**

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lutz Claes, der mir diese überaus interessante Forschungsarbeit ermöglicht hat und mich darüber hinaus auch an verschiedenen anderen Projekten des Instituts mitwirken ließ, so dass meine Zeit in Ulm äußerst abwechslungs- und lehrreich war.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Klee für die Übernahme meiner Dissertation.

Ganz besonderer Dank gilt Dr. Peter Augat, der mir unermüdlich mit Rat und Tat zur Seite stand und mich mit viel Geduld und Begeisterungsfähigkeit in die Geheimnisse wissenschaftlichen Arbeitens einweihte. Seine Unterstützung und Hilfsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Für die Hilfe bei der Aufarbeitung der Knochenproben sowie für die Herstellung der histologischen Präparate möchte ich mich ganz herzlich bei Liselotte Müller-Molenar, Marion Tomo und Regina Kloos bedanken. Mein Dank gilt auch Patrizia Horny für die Durchführung der biomechanischen Tests.

Dr. Christine Gohl und Dr. Shohei Iwabu danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Operationen. Bei Dr. Christine Gohl möchte ich mich ganz besonders für ihre Hilfsbereitschaft bedanken. Sie machte mir die Eingewöhnung am Institut sehr leicht.

Ganz herzlicher Dank gilt Albert Aigner und Wilhelm Gebel für die vorbildliche Betreuung der Tiere. Die Zusammenarbeit funktionierte hervorragend und hat mir sehr viel Freude bereitet. Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Burkhard Gilge und Dr. Barbara Kuhnt, die mir am Tierforschungszentrum mit Rat und Tat zur Seite standen.

Dr. Anita Ignatius und meinem Bruder Ingo Schorlemmer danke ich ganz herzlich für die Korrektur dieser Arbeit und die wertvollen Kommentare dazu.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Es hat mir sehr viel Spaß gemacht, an diesem Institut zu arbeiten. Durch den kollegialen Umgangston und die nie endende Unterstützung von allen Seiten wurde für mich die Zeit in Ulm zu etwas ganz Besonderem.

## **Sandra Schorlemmer**

29.12.1971 geboren in Erlangen als Tochter von Sabine Schorlemmer, geb. Kokott und Uwe Schorlemmer

### *Schulbildung:*

1978 – 1982 Besuch der Grundschule Ludwigschorgast

1982 – 1992 Besuch des Caspar-Vischer-Gymnasiums Kulmbach

08.07.1992 Allgemeine Hochschulreife

### *Studium:*

1992 – 1999 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

19.10.1999 Staatsexamen Tiermedizin

03.01.2000 Approbation als Tierärztin

### *Beruf:*

16.01.2000 Beginn der Arbeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm

2002 Abschluss der Promotion mit dem Thema „Das ovariektomierte und glukokortikoid-behandelte Schaf als Großtiermodell für die Osteoporoseforschung“