Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
Der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand:
Prof. Dr. H.-J. Gabius

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. R. G. Erben

Die Rolle der α/ß-T-Lymphozyten bei der Regulation des Knochenturnovers

vorgelegt von
Katharina Mildner-Müller
aus
Dresden

München 2007

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent:	Prof. Dr. Dr. Erben
Korreferent :	PD Dr. Breuer

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 3

2 Literaturübersicht 7

2.1 Physiologie des Knochens 7

2.1.1 Der Knochenaufbau und die Zellen des Knochens 7

2.1.2 Der Knochenstoffwechsel 10

2.2 Osteoporose 15

2.2.1 Darstellung und Definition der Osteoporose 15

2.2.2 Gliederung der Osteoporoseformen: idiopathische, Typ I Osteoporose, senile Typ II Osteoporose, sekundäre Osteoporose 17

2.2.3 Die Posttransplantations-Osteoporose 22

2.2.4 Ansätze zur Prophylaxe und Therapie der Posttransplantations-Osteoporose 24

2.3 Thymus 26

2.4 T-Lymphozyten 26

2.4.1 Gliederung der T-Lymphozyten 26

2.4.2 Entwicklung und Reifung der T-Lymphozyten 28

2.4.3 T-Zell-Aktivierung 31

2.4.4 Interaktion der T-Lymphozyten mit dem Knochen 32

2.5 Cyclosporin A Cyclosporin A 34

2.5.1 Chemische Struktur 34

2.5.2 Wirkmechanismus von Cyclosporin A 35

2.5.3 Pharmakokinetik und Verteilungsmuster im Körper 35

2.5.4 Metabolismus von Cyclosporin A 36

2.5.5 Nebenwirkungen von CsA 37

2.6 Das Tiermodell Ratte 40

2.6.1 Der Knochenstoffwechsel von Mensch und Ratte im Vergleich 40

2.6.2 Alternativen zum Tiermodell 42

3 Material und Methoden 43

3.1 Tierversuche 43

3.1.1 Versuchsdurchführung 43

3.1.2 Tierhaltung 43

3.2 Versuch I: Rolle von T-Lymphozyten in der Pathogenese der Estrogen- und Androgenmangel-Osteopenie 44
3.3 Versuch II: Rolle von T-Lymphozyten für die Skelettwirkung von CsA 46
3.4 In-vitro-Versuch 48
3.4.1 Wirkung von CsA auf die Osteoklasten 48
3.4.2 Osteoklasten-Färbung 49
3.5 Etablierung des Tiermodells 51
3.5.1 Vorversuch 51
3.5.2 Thymektomie 52
3.5.3 Herstellung des monoklonalen rattenspezifischen TCR gerichteten IgG1-Antikörpers 55
3.6 Durchflusszytometrie 59
3.7 Ovariektomie der weiblichen Ratte 62
3.8 Orchiektomie der männlichen Ratte 63
3.9 Knochenmineraldichte-Messung mittels peripherer quantitativer Computertomographie 65
3.10 Histologische Aufarbeitung des Knochengewebes 67
3.10.1 Präparation, Fixierung und Entwässerung des Knochens 67
3.10.2 Infiltration und Einbettung 67
3.10.3 Herstellung von Knochenschnitten 68
3.10.4 Färbung der Knochenschnitte 70
3.10.5 Reagenzienliste 72
3.11 Histomorphometrische Messung 74
3.12 Biochemische Analysen 76
3.12.1 Serumanalyse 76
3.12.2 Vollblutanalyse 76
3.12.3 Urinanalyse 77
3.13 Statistik 78
4 Ergebnisse 79
4.1 Versuch I: Rolle von T-Lymphozyten in der Pathogenese der Estrogen- und Androgenmangel-Osteopenie 79
4.1.1 Körpergewichtsentwicklung 80

4.1.2 Knochenmineraldichte-Messung mittels peripherer quantitativer Computertomographie an der linken Tibia und dem vierten Lendenwirbel 80
4.1.3 Histomorphometrische Messungen der rechten Tibia und des ersten Lendenwirbels....82
4.1.4 Serum- und Urinparameter 84
4.2 Versuch II Rolle von T-Lymphozyten für die Skelettwirkung von CsA....88
4.2.1 Körpergewichtsentwicklung 88
4.2.2 Knochenmineraldichte-Messung mittels peripherer quantitativer Computertomographie an der linken Tibia und dem vierten Lendenwirbel 89
4.2.3 Histomorphometrische Messungen der rechten Tibia und des ersten Lendenwirbels....90
4.2.4 Serum- und Urinparameter 92
4.3 Ergebnisse des In-vitro-Versuches 95
5 Diskussion 96
5.1 FACS-Verlaufsuntersuchung von T-Zell-depletierten Tieren 96
5.2 Tiermodell der T-Zell-defizienten Ratte....97
5.3 Versuch I: Rolle von α/ß-T-Lymphozyten in der Pathogenese der Estrogen- und Androgenmangel-Osteopenie 98
5.4 Versuch II: Rolle von α/ß-T-Lymphozyten für die Skelettwirkung von CsA 100
5.5 Zusammenhang der CsA-Konzentration und der Osteoklastenanzahl unter In-vitro- Bedingungen....102
5.6 Ausblick 104
6 Zusammenfassung 105
7 Summary 107
8 Anhang 109
8.1 Abbildungsverzeichnis 135
8.2 Tabellenverzeichnis 136
9 Literaturverzeichnis....137
10 Danksagung....162
11 Curriculum Vitae 163

Abkürzungsverzeichnis

BMU	basic multicellular units
BSU	Bone structural units
CCR	CXC-chemokine receptor
CD	cluster of differentiation oder cluster of determinant
CLP	common lymphoid progenitor
CMP	common myeloid progenitor
DAG	Diacylglycerol
DANN	Desoxyribonucleic Acid
DC	dendritic cell
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s Medium
DN	doppelt negativ
DP	doppelt positiv
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence-Activated Cell sorting-Analyse
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen colony stimulating factor
GX	Gonadektomie
i.m.	intra muskulär
i.p.	intra perintoneal
IDC	immature dendritic cells
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like Growth factor
IL	Interleukin
IP3	Inositoltriphosphat
KGW	Körpergewicht
LPC	lymphoid progenitor cell
M-CSF	Macrophagen-colony stimulating factor
MHC	major histocompatibility complex
MPP	multipotential progenitor
n	Anzahl
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NFkB	nuclear factor- {kappa} B

NK	natürliche Killerzellen
ODF	osteoclast differentiation factor
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerin-Ligand
ORX	Orchiektomie
OVX	Ovariektomie
p.op.	post operationem
PBS	Phosphate Buffered Saline
PIP2	Phosphatidylinositoldiphophat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
Pqct	periphere quantitative Computertomographie
PSGL1	platelet (P) selectin glycoprotein ligand 1
PTH	Parathormon
RANK	receptor activator of nuclear factor- {kappa} B
RANKL	receptor activator of nuclear factor- {kappa} B-ligand
s.c.	subcutan
Sham	scheinoperiert
SP	single positiv
STH	somatotropes Hormon
TCR	T Cell Receptor
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRANCE	TNF-related activation-induced cytokine
TRAP	Tartrat Resistant Acid Phosphatase
TSH	Thyreotropes Hormon
TX	Thymektomie

1 Einleitung

Als Osteoporose wird eine generalisierte Skeletterkrankung bezeichnet, die durch eine gegenüber der alters- und geschlechtsspezifischen Norm verminderte Knochenmasse pro Volumeneinheit Knochengewebe, Veränderungen der Mikroarchitektur des Knochens und eine erhöhte Frakturanfälligkeit charakterisiert ist. Dabei sind Wirbelkompressions-, Radius- und proximale Femurfrakturen die am häufigsten auftretenden Osteoporose-induzierten Frakturen (CDC, 1993).
Die Osteoporose lässt sich in mehrere Formen einteilen: den Typ I – primäre, idiopathische Form, den Typ II – postmenopausale und senile Form und den Typ III – sekundäre Formen (GALLAGHER, 1990).
Die postmenopausale Osteoporose ist eine der „Volkskrankheiten“ der westlichen Industrienationen, da ungefähr ein Drittel aller Frauen aufgrund des entstehenden Östrogen-Mangels an ihr leiden. Durch die Geschlechtshormon-Mangel-induzierte Osteoporose entstehen enorme wirtschaftliche Kosten, die sich, aufgrund der demographischen Entwicklung, noch erhöhen werden.
Eine weitere wichtige Osteoporoseform ist eine sekundäre Form: die Posttransplantationsosteoporose. Diese wird durch Immunsupressiva, wie den Glukokortikoiden, medikamentell induziert (LUKERT und RAISZ, 1990). Auf der Suche nach weniger toxischen, die Lebensqualität der Patienten verbessernden Medikamenten zur Unterdrückung der Transplantatabstoßung entdeckten BOREL et al. (1976) Cyclosporin A (CsA). Doch auch CsA steht im Verdacht, zur Entstehung der Posttransplantationsosteoporose beizutragen (MOVSOWITZ et al., 1989).

Ein Meilenstein in der Knochenforschung der letzten Jahre war die Aufklärung bedeutender Teile der molekularen Mechanismen, die an der Regulation der osteoklastären Knochenresorption beteiligt sind (Suda et al., 1999). Aus einer Reihe von experimentellen Ergebnissen der letzten 20 Jahre war es bekannt, dass Stromazellen und osteoblastäre Zellen im Knochenmark über Zell-Zell-Kontakt eine entscheidende Rolle in der Steuerung der osteoklastären Knochenresorption spielen. Osteoblastäre Zellen oder Stromazellen exprimieren das membranständige Protein Osteoprotegerin ligand (OPGL), das auch als RANKL (Receptor activator of NFκB ligand) bezeichnet wird, ein Mitglied der Familie der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-

Liganden. Hämatopoetische Precursorzellen für Osteoklasten exprimieren den ebenfalls membranständigen Rezeptor RANK, ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie. Die Bindung von OPGL an RANK erfordert Zell-Zell-Kontakt und ist ein essentieller Schritt in der Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten. So zeichnen sich OPGL-Knockout-Mäuse durch ein praktisch völliges Fehlen von Osteoklasten aus und entwickeln eine schwere Osteopetrose. In-vitro-Untersuchungen haben gezeigt, dass die beiden einzigen essentiellen Faktoren für die Differenzierung von murinen hämatopoetischen Precursorzellen zu Osteoklasten M-CSF (Macrophage colony stimulating factor) und OPGL sind. Osteoprotegerin (OPG) ist eine lösliche Form des Rezeptors RANK, die von osteoblastären und Stromazellen sowie auch von anderen Zellen sezerniert wird. OPG bindet an OPGL und inhibiert dadurch die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten. OPG-Knockout-Mäuse entwickeln eine schwere Osteoporose aufgrund einer massiv gesteigerten osteoklastären Knochenresorption. OPG spielt somit auch unter physiologischen Bedingungen eine bedeutende Rolle im Knochenstoffwechsel. Das Verhältnis der Expression von OPGL und der Sekretion von OPG ist somit von zentraler Bedeutung für die Steuerung der Knochenresorption.

In den letzten Jahren ist zunehmend erkannt worden, dass es eine sehr enge Verbindung zwischen Immunsystem, Sexualhormonen und Knochenstoffwechsel gibt. Insbesondere T-Lymphozyten scheinen eine wichtige Rolle in der Steuerung des Knochenstoffwechsels zu spielen.

Durch die Entdeckung, dass aktivierte T-Lymphozyten OPGL sezernieren und so eine Stimulation der osteoklastären Knochenresorption induzieren können, haben sich ganz neue Dimensionen in der Skelettforschung eröffnet. Man geht heute davon aus, dass dieser Mechanismus entscheidend an der Knochen- und Gelenkszerstörung bei rheumatoiden und anderen entzündlichen Gelenk-Erkrankungen beteiligt ist (KONG et al., 1999). Die Erkenntnis, dass Immunzellen in der Lage sind, Substanzen zu sezernieren, die den Knochenstoffwechsel in nachhaltiger Weise beeinflussen können, hat der Verbindung zwischen Immunsystem, Sexualhormonen und Knochenstoffwechsel eine neue Bedeutung verliehen. Seit längerer Zeit wusste man, dass Östrogen- und Androgenmangel zu

einer Stimulation der B-Lymphopoese im Knochenmark bei Maus (MIYAURA et al., 1997; ONOE et al., 2000) und Ratte (ERBEN et al., 1998; ERBEN et al., 2001) führen. Interessanter Weise haben eine Reihe von Studien in jüngster Zeit zudem nahe gelegt, dass eine Stimulation von Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-α) und OPGL-Produktion von T-Lymphozyten möglicherweise einen wichtigen Faktor in der Pathogenese des durch Östrogenmangel hervorgerufenen Knochenverlustes bei der Maus darstellt (CENCI et al., 2000; ROGGIA et al., 2001; CENCI et al., 2003; ROGGIA et al., 2004). So konnte gezeigt werden, dass athymische, T-Zell-defiziente Mäuse keinen Knochenverlust nach der Ovariektomie zeigen (CENCI et al., 2000). Die bisher vorliegenden Daten unterstützen die Hypothese, dass eine Stimulation der TNF-α- und OPGL-Sekretion von T-Zellen im Östrogenmangel eine entscheidende Rolle in der Steigerung der osteoklastären Knochenresorption spielt (CENCI et al., 2000; ROGGIA et al., 2001; CENCI et al., 2003; ROGGIA et al., 2004). Diese Studien sind jedoch nicht unumstritten geblieben, denn athymische Nacktmäuse wie auch athymische Nacktratten besitzen generell einen niedrigeren Knochenturnover gegenüber Kontrolltieren (McCAULEY et al., 1989; BUCHINSKY et al., 1995).
Auch zeigen athymische, T-Zell-defiziente Nacktratten im Vergleich zu euthymischen Kontrolltieren keine Verminderung des Ovariektomie-induzierten Knochenverlustes (SASS et al. 1997). Es muss also nach wie vor als umstritten gelten, ob T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Östrogenmangel-Osteopenie spielen.

Auch aus anderen Forschungseinrichtungen haben sich Hinweise für eine Beteiligung der T-Lymphozyten an der Steuerung des Knochenturnovers ergeben. Seit ca. 15 Jahren ist bekannt, dass das Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA), das zu den Standard-Therapeutika bei schweren Autoimmunerkrankungen und nach Organtransplantation zählt, bei männlichen Ratten zu einer High-turnover-Osteopenie führt (MOVSOWITZ et al., 1989; KATZ et al., 1994; ERBEN et al., 1998; ERBEN et al., 2003). T-Lymphozyten sind die wesentlichsten Zielzellen für CsA, und interessanterweise konnte gezeigt werden, dass männliche, CsA behandelte, athymische, T-Zell-defiziente Nacktratten keine ausgeprägte High-turnover-Osteopenie entwickeln (BUCHINSKY et al., 1996).
Dieser Befund deutet daraufhin, dass T-Zellen für die Vermittlung der Skelettwirkungen von CsA essentiell sind.

Was die Erforschung der Rolle von T-Lymphozyten des Knochenturnovers in verschiedenen Stoffwechsel-Situationen entscheidend behindert hat, ist, dass es bis jetzt kein praktikables Tiermodell gab, in dem vorher normale Tiere in einen T-Zell-defizienten Zustand versetzt werden konnten. Ein solches Tiermodell ist durch die vorliegende Dissertation etabliert worden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe dieses Tiermodells, in dem adulte Ratten dauerhaft α/ß-T-Zell-depletiert werden können, die Rolle von α/ß-T-Lymphozyten für den Knochenstoffwechsel weiter zu erforschen. Dabei werden drei verschiedene etablierte Modellsituationen benutzt, von denen bekannt ist, dass sie zu ausgeprägten Veränderungen des Knochenstoffwechsels führen.

Zum einen wird das Modell der Estrogen- und Androgen-Mangel induzierten Osteopenie verwendet. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die gonadektomierte Ratte ein dafür adäquates Tiermodell darstellt. Die Gonadektomie führt zu einer Steigerung der Knochenumsatzrate, ähnlich wie beim Menschen (KALU, 1991; ERBEN et al., 1998; ERBEN et al., 2000).
Zum anderen wird das Modell der CsA induzierten High-turnover-Osteopenie verwendet, die dadurch gekennzeichnet ist, dass bei zunehmender Knochenumsatzrate die Knochenresorption mehr gesteigert wird als die Knochenformation, woraus als Nettoeffekt ein Knochenmasseverlust resultiert (MOVSOWITZ, et al., 1988; EPSTEIN et al., 1990; KATZ et al., 1994; KAWANA et al., 1996; ERBEN et al., 2003).

Folgende Fragestellungen zur Rolle von α/ß-T-Lymphozyten im Knochenturnover in einem vorher normalen Tier nach Depletion der α/ß-T-Zellen werden geklärt:

1) Hat die α/ß-T-Zell-Depletion per se einen Effekt auf den Knochenturnover?
2) Wird die durch Estrogen- oder Androgenmangel induzierte Osteopenie bei Ratten durch eine Depletion von α/ß-T-Zellen moduliert?
3) Welche Rolle spielen α/ß-T-Lymphozyten in der Vermittlung der Skeletteffekte von Cyclosporin A?

2 Literaturübersicht

2.1 Physiologie des Knochens

2.1.1 Der Knochenaufbau und die Zellen des Knochens

Die Gesamtheit des Knochengewebes (Textus osseus) bildet das Skelett, dessen Hauptfunktion vornehmlich die mechanische Stützfunktion für den aktiven Bewegungsapparat, die Schutzfunktion für das Weichteilgewebe, die Stätte der Blutbildung im Knochenmark und die Mineralspeicherfunktion bilden (RODAN, 1992).

Das Knochengewebe fügt sich aus den zellulären Bestandteilen und der extrazellulären Matrix zusammen und enthält im frischen Zustand ca. 8% Wasser und 92% Trockensubstanz. Die extrazelluläre Matrix teilt sich in einen organischen Anteil (ca. 35% der Trockensubstanz) und einen anorganischen Anteil (ca. 65% der Trockensubstanz) auf.
Die organische Komponente setzt sich zu ca. 90% aus Kollagen zusammen, wobei zum Großteil Typ-I-Kollagen vorgefunden wird. Die restlichen Bestandteile der organischen Matrix bestehen aus einer Anzahl nicht-kollagener Proteine. Diese sind zu ca. 75% Syntheseprodukte der Osteoblasten (Osteocalcin, Osteonectin, Proteoglykane, Wachstumsfaktoren) und zu ca. 25% Plasmaproteine (Albumin und α2-HS-Glykoprotein), die in der Leber produziert werden.
Das anorganische Material, die Mineralien, liegen als Hydroxylapatitkristalle vor und besteht aus Calciumphosphat (85%), Calciumcarbonat (10%), Magnesiumphosphat und Calciumfluorid und anderen Spurenelementen.(SCHULZ, 1985; VEIS und SABSAY, 1987; MARTIN et al., 1988; ROBEY et al., 1988).
Der Knochen besteht aus zwei Anteilen, dem äußeren Stratum corticale (kortikaler Knochen), der z. B. beim Säugetier ungefähr 80% der Skelettmasse ausmacht und aus 20% Stratum spongiosum (trabekulärer Knochen), welches sich im Knocheninneren befindet. Mikroskopisch besteht sowohl das Stratum corticale als auch das Stratum spongiosum aus typischen Strukturelementen, den Bone structural Units (BSU), die durch Knochenumbau erzeugt werden. In der Corticalis werden

diese BSUs als Osteone, in der Spongiosa als Hemiosteone bezeichnet. Diese Strukturelemente bestimmen ganz wesentlich die mechanische Stabilität (ERBEN, 2005).

Die Osteone im kortikalen Knochen bestehen aus geschichteten Knochensäulchen, die den Havers Kanal (Zentralkanal) umschließen. In diesem verlaufen Blutgefäße und Nerven. Osteozyten, die über Zytoplasmafortsätze, den so genannten „gap junction“, miteinander verbunden sind, umgeben den Zentralkanal. Den äußeren und inneren Schichten des Stratum corticale fehlt der Zentralkanal. In diesen Schichten verlaufen die Knochenlamellen parallel zur Knochenoberfläche. Der kortikale Knochen ist an seiner äußeren Oberfläche vom Periost bedeckt, welches eine dünne vaskularisierte, sensibel innervierte Kollagenschicht darstellt (DOTY, 1981; REVELL, 1986).

Der trabekuläre Knochen setzt sich aus miteinander verbundenen Knochenbälkchen zusammen. Die Knochenbälkchen bestehen aus lamellären Knochen, welche eine äußere Schicht aus abgeflachten Osteoblasten (lining cells) umgibt. Die Knochenbälkchen ordnen sich entsprechend der Beanspruchung des Knochens in der Richtung des größten Druckes oder Zuges. Durch diese Ausrichtung wird bei einem relativ geringen Gewicht eine hohe mechanische Stabilität sichergestellt (REVELL, 1986). Durch die große Oberflächenstruktur des Stratum spongiosum und seine enge Nachbarschaft zum hämatopoetischen Knochenmark hat es gegenüber dem Stratum corticale eine wesentlich höhere Stoffwechselaktivität. Durch diesen erhöhten Knochenumsatz steigt aber auch die Empfindlichkeit für pathologische Veränderungen, die sich hier leichter manifestieren können (RODAN, 1992).

Hinsichtlich des Aufbaus lassen sich an jedem Knochen verschiedene Oberflächen unterscheiden. Die periostale, äußere Schicht, die intrakortikale Oberfläche, die sich auf das Hohlraumsystem der Havers und Volkmann Kanäle bezieht, die kortikoendostale Oberfläche, die dem Markraum zugewandte Innenfläche der Kortikalis und die endostale Oberfläche, welche die Knochenoberfläche der Knochenbälkchen entspricht (PARFITT, 1983b).

Zu den wichtigsten Zellen des Knochenstoffwechsels gehören die Osteoklasten, Osteoblasten, Osteozyten und die endostalen Knochenbelegzellen (Erben, 2005).

Osteoklasten sind vielkernige Zellen, die nur im Knochen präsent sind. Die Progenitor-Osteoklasten-Zellen leiten sich vom hämatopoetischen Zellsystem ab und werden vom hämatopoetischen Gewebe, wie dem Knochenmark rekrutiert. Sie proliferieren und differenzieren zu mononukleären Präosteoklasten, um anschließend miteinander zu multinukleären Osteoklasten zu fusionieren (Suda et al., 1999).
Die Osteoklasten sind für den Knochenabbau verantwortlich. Es handelt sich um vielkernige, große Zellen, die bis zu 100 Kerne enthalten und einen Durchmesser bis zu 100 µm erreichen können. Ihr Zytoplasma ist reich an Mitochondrien, granulärem endoplasmatischen Retikulum und freien Ribosomen. Weiterhin sind zahlreiche Lysosomen, lysosomale Enzyme (u. a. tartratresistente sauere Phosphatase und Kathepsin B) und Carboanhydrase II vorhanden. Ein typisches, unter dem Elektronenmikroskop sichtbares Merkmal der aktiven Osteoklasten ist die „ruffled border“. Dabei handelt es sich um eine bürstensaumartige, der Knochenoberfläche zugewandte Struktur der Zytoplasmamembran (PECK und WOODS, 1988). An dieser spezialisierten Stelle der Osteoklastenmembran findet die Knochenresorption in einem zweistufigen Prozess statt. Zunächst werden H^+-Ionen aktiv über die ruffled border in die Resorptionslakune sezerniert, wodurch es zu einer pH-Erniedrigung kommt, die wiederum das Mineral auflöst. Danach wird die organische Matrix durch osteoklastäre, proteolytische Enzyme abgebaut (VÄNÄÄNEN et al., 1988; RODAN, 1992).

Die Osteoblasten sind für den Knochenaufbau verantwortlich. Es handelt sich um einkernige, asymmetrische Zellen mit einem Durchmesser von 20-30 µm. Sie haben einen ausgeprägten Proteinsyntheseapparat der sie zur Synthetisierung der Knochenmatrix befähigt (PECK und WOODS, 1988). Sie bilden das Osteoid, die organische unverkalkte Knochenmatrix, synthetisieren Typ-I-Kollagen und nichtkollagene Proteine. Diese treten zum Teil, wie das Osteocalcin, ins Blut über. Somit kann es als Indikator der Knochenformation verwendet werden. Außerdem besitzen die Osteoblasten einen hohen Gehalt an membranständiger alkalischer Phosphatase, mit der sie an der Mineralisierung der Knochensubstanz beteiligt sind (PECK und WOODS, 1988; RODAN, 1992). Osteoblasten sind weiterhin beteiligt an der Regulierung des Knochenstoffwechsels, da sie Zielzellen für verschiedene Hormone und Zytokine, wie zum Beispiel Parathormon, Glukokortikoide und

Interleukin-I sind. Sie sind in der Lage, einige dieser Faktoren eigenständig zu produzieren, so dass sie eine wichtige Rolle bei der Vermittlung und Einleitung der Knochenresorption spielen, indem sie die Osteoklasten aktivieren (MARTIN, 1993).
Die Osteoblasten leiten sich vom Stromazellsystem des Knochenmarkes ab. Das Stromazellsystem ist neben dem hämatopoetischen Zellsystem ein weiteres großes Zellsystem des Knochenmarkes. Die Gemeinsamkeit der beiden Zellsysteme liegt darin, dass sie sich von einer gemeinsamen Stammzelle Zelllinien entwickeln. Beim Stromazellsystem entwickeln sich folgende Zelllinien: Adipozyten, Fibroblasten, Chondroblasten, Osteoblasten und Myeloblasten (OWEN, 1985).
Osteoblasten können sich weiter differenzieren zu endostalen Knochenbelegzellen und Osteozyten (BARON et al., 1984a; PARFITT, 1984). Die Knochenbelegzellen liegen endothelartig auf der ruhenden Knochenoberfläche auf und können über gap junctions mit den Osteozyten, welche in der mineralisierten Knochenmatrix liegen, kommunizieren. Man bezeichnet diese funktionelle Einheit als Osteozyten-Knochenbelegzellen-Komplex, der für die Calciumhomöostase und der Adaptation an mechanischen Stimuli eine große Bedeutung hat (PECK und WOODS, 1988; MARTIN und NG, 1994).

2.1.2 Der Knochenstoffwechsel

Seit dem Jahre 1892 bestand die fundamentale Idee, dass ein mechanischer Regelkreis im Knochen wirksam ist. Mit der Unterstützung von Wilhelm Roux, hat Julius Wolff 1892 das „Gesetz der Transformation der Knochen“ formuliert. Das Gesetz besagt, dass Knochen dort lokal abgebaut wird, wo mechanische Belastung herrscht. Damit ergibt sich die Vorstellung eines Regelkreises, der auf Veränderungen in der lokalen Belastung reagiert (WOLFF, 1892).
Der Knochen wird von lebenslangen adaptiven Umbauvorgängen bestimmt. Während der Osteogenese kann die Knochenentwicklung auf zwei verschiedene Arten ablaufen, und zwar der chondralen Ossifikation und der desmalen Ossifikation. Bei der chondralen Ossifikation wird der Knochen auf indirektem Wege gebildet, indem der als primäres Stützorgan fungierende hyaline Knorpel abgebaut und allmählich durch Knochengewebe, dem Geflechtknochen, ersetzt wird. Der Geflechtknochen wird schließlich durch lamellären Knochen ersetzt. Der Vorgang

endet mit dem Schluss der Epiphysenfugen, d. h. mit dem Abschluss des Längenwachstums. Durch die chondrale Osteogenese entstehen die meisten Knochen des Rumpfskelettes und die Gliedmaßenknochen.

Bei der desmalen Osteogenese wird der Knochen auf direktem Weg gebildet, d. h. aus den osteogenen, embryonalen Mesenchymkomplexen entsteht direkt der Knochen. Durch die desmale Osteogenese entstehen die meisten Schädelknochen (SMOLLICH, 2000).
Das Wachstum des Knochens unterliegt verschiedenen Hormonen und Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel dem Somatotropen Hormon (STH), dem Thyreotropen Hormon (TSH), Östrogen und Androgen und dem Isulin-like Growth Factor-1 (IGF-1).
Der Knochenstoffwechsel dient nach dem Abschluss der Osteogenese vor allem der Reparatur von Ermüdungsschäden, der Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase und, wenn nötig, der Frakturheilung.
Die Abstimmung von Osteoklasten und Osteoblasten aufeinander, ruft zu bestimmten Lebensabschnitten drei verschiedene Situationen hervor, nämlich das Wachstum, Modeling und Remodeling.

2.1.2.1 Wachstum, Modeling, Remodeling

Wachstum, Modeling und Remodeling haben nach FROST (1983) folgende Definitionen erlangt:
Das Wachstum bezieht sich auf die Aktivitäten im Bereich einer offenen Epiphysenfuge, die zu einer Verlängerung des entsprechenden Knochens führen.
Das Modeling bezeichnet diejenigen Prozesse, die während des Wachstums den Knochen seine charakteristische Form erhalten lässt. Die Modeling-Aktivität findet weitgehend an periostalen und kortikoendostalen Knochenoberflächen statt.
Das Remodeling ist ein fortwährender, kontinuierlicher, vom Kindesalter an, lebenslanger Erneuerungsprozess des kortikalen und trabekulären Knochens. Durch diesen Mechanismus erhält der Knochen seine mechanische Integrität. Remodeling-Aktivität bestimmt den Knochenstoffwechsel des adulten Menschen, wohingegen

Wachstum und Modeling bei juvenilen, wachsenden Menschen vorrangig vorkommt (FROST, 1976a).

Modeling stellt sich dann ein, wenn der Knochen einen bestimmten mechanischen Stimulus erhält. Es ist somit ein dynamischer Adaptationsvorgang, der auf Veränderungen in der biomechanischen Belastung reagiert. Hierbei wird die Knochenstruktur innerhalb von Tagen bis wenigen Wochen an die neuen Bedingungen durch Knochenformation oder Knochenresorption angepasst (PARFITT, 1984; PARFITT, 1985). Beim Modeling erfolgen Knochenresorption und Knochenformation räumlich und zeitlich getrennt voneinander (FROST, 1976a; PARFITT, 1983b).

Remodeling ist ein zyklisch ablaufender Erneuerungsmechanismus, bei dem Osteoklasten Knochen abbauen, der dann später an gleicher Stelle durch Osteoblasten wieder aufbaut wird. Im Gegensatz zum Modeling sind die Knochenformation und Knochenresorption räumlich und zeitlich miteinander verbunden. Der Erneuerungsmechanismus beinhaltet folgendes Schema: Aktivierung → Resorption → Formation (ERBEN, 1996).
Etwa 80% des Stratum spongiosum befinden sich im Ruhezustand. Es gelangt durch verschiedene Einflüsse in die Aktivierungsphase. Zum einen exprimieren, als Antwort auf einige Knochen-resorbierende Faktoren (1,25-dihydroxyvitamin D_3, PTH), osteoblastäre Zellen /Stromazellen, primitive mesenchymale Zellen, die sich um den Knorpel befinden und hypertrophe Chondrozyten das membranständige Protein Osteoprotegerin ligand (OPGL), das auch als RANKL (Receptor activator of NFκB ligand), TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) oder ODF (osteoclast differentiation factor) bezeichnet wird (LACEY et al., 1998; YASUDA et al., 1998). RANKL ist ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Liganden. Zum anderen sezernieren Osteoblasten den Macrophagen-colony stimulating factor (M-CSF), der für die Osteoklastenreifung wichtig ist. Außerdem exprimieren aktivierte T-Lymphozyten ebenfalls RANKL und OPG. Zeitgleich exprimieren hämatopoetische Precursorzellen für Osteoklasten, mature Osteoklasten, Chondrozyten und Endothelzellen der großen Blutgefäße den ebenfalls membranständigen Rezeptor RANK, ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie. Die Bindung von RANKL an RANK

unter M-CSF Einfluss erfordert Zell-Zell-Kontakt und ist der essentielle Schritt in der Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten (ANDERSON et al., 1997; BUCAY et al., 1998; HSU et al., 1999; SUDA et al., 1999; KONG et al., 1999).

Unter dem Einfluss von Parathormon (PTH), 1,25-dihydroxyvitamin D3 und Prostaglandinen gehen die Knochenoberfläche bedeckenden lining cells auseinander und bieten so den maturen Osteoklasten die Möglichkeit sich an die Knochenoberfläche zu setzten (OTT, 2002). Weitere Osteoklasten werden chemotaktisch durch Osteocalcin, α2-HS-Glykoproteine und den Abbauprodukten von Typ-I-Kollagen angelockt (BARON et al., 1984). Durch massenhafte Fusion von sauren Vesikeln mit der Osteoklastenzellmembran im Bereich der Anheftungsstelle faltet sich diese zu einer „ruffled border“ auf. Diese Struktur besitzt eine Schlüsselfunktion für die Resorptionsphase, da sie für die Ansäuerung der entstehenden Resorptionslakune, auch als Howship-Lakune bezeichnet (nach John H. Howship, 1781-1841), verantwortlich ist. Bei einem pH-Wert von 4,5 werden die Calciumionen aus dem Hydroxylapatit des Knochens freigesetzt und das Kollagen wird durch die sauren Proteasen (vor allem Cathepsin K) aus den sauren Vesikeln abgebaut (TEITELBAUM, 2000). Die Resorptionsphase endet mit der Apoptose der Osteoklasten. Als nächstes kommt es in der Reversalphase zur Glättung der Resorptionslakune. Hinzu kommt, dass die mononukleären Zellen das Signal zum „coupling“, dem Beginn der osteoblastären Knochenformation, geben (BARON et al., 1984; OTT, 2002).

Unter dem Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie dem Transforming Growth Factor (TGF ß), der von Osteoblasten und Osteoklasten sezerniert wird und dessen Übergangsformen in der Knochenmatrix lagern, Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) und Prostaglandinen, kommt es zur Osteoblasten-Differenzierung. Die Osteoblasten synthetisieren und mineralisieren die neue Knochenmatrix, das Osteoid. Ein Teil der Osteoblasten wird in die extrazelluläre Matrix inkorporiert, wodurch die Osteozyten mit ihren Zellausläufern und den Zellausläufer-umschließenden Knochenkanälchen entstehen. Ein anderer Teil entwickelt sich wieder zu lining cells. Wenn die Formationsphase abgeschlossen ist, kehrt der Knochen wieder in seine ursprüngliche Ruhephase zurück (ERLEBACHER et al., 1998; PARFITT, 1984; PARFITT et al., 1996)

Remodeling kann zum einen als „gezieltes Remodeling“, das durch Mikroschäden in der Skelettstruktur ausgelöst wird, oder als „stochastisches Remodeling“ an einer beliebigen Stelle des Knochens von statten gehen (ERBEN, 2005).

Der Erneuerungsmechanismus bedingt, dass pro Jahr etwa zehn Prozent der gesamten Knochenmasse erneuert wird (RUSSEL et al., 2001).

Das Remodeling hinterlässt typische Struktureinheiten am Knochen, die durch so genannte basic multicellular units (BMU´s) entstehen (PARFITT, 1995; OTT, 2002). RIGGS und PARFITT (2005) schätzen, dass das menschliche Skelett ca. 1-2 x 10^6 BMU´s hat.

BMU´s sind durch länglich aneinander gereihte Osteoklasten und Osteoblasten charakterisiert. Die Osteoklasten bilden den „cutting cone“, denen die Osteoblasten folgen. Die BMU wandert beim trabekulären Knochen über die Knochenoberfläche und hinterlässt einen Graben, wohingegen die BMU sich beim kortikalen Knochen in die Knochenstruktur eingräbt und ein neues Osteon hinterlässt. Der Umfang des Remodeling durch eine BMU wird durch die Osteoklastenrekrutierung und durch die Apoptoserate der Osteoklasten bestimmt (PARFITT et al., 1996).

Die frühere Annahme, dass bei älteren Ratten lebenslang Modeling als Knochen-Turnover-Aktivität vorherrscht, musste korrigiert werden (FROST, 1976b). ERBEN (1996) hat erkannt, das bei älteren Ratten das Remodeling im Knochen vorherrscht, wie bei allen höheren Säugetieren auch.

Eine Imbalanz des Remodelings führt zum Verlust der Knochenmatrix, wie es auch bei Osteoporose, Rheumatoider Arthritis, Periodontitis, Periapikaler Osteitis, Osteomyelitis, Lockerung von Gelenksprothesen, metastasierenden Karzinomen und maligner humoraler Hypercalcämie beobachtet werden kann. Pathogenes Remodeling kann ebenso das Resultat einer Mutation auf molekularer Ebene sein, die die Osteoklasten- und Osteoblasten-Differenzierung und Funktion regelt (LERNER, 2006).

2.2 Osteoporose

2.2.1 Darstellung und Definition der Osteoporose

Die Osteoporose wurde schon seit dem 19. Jahrhundert im heutigen Sinne erkannt (KARPAS et al., 1987). 1885 wurde sie von POMMER erstmals als eigenständiges Krankheitsbild von der Osteomalazie und der physiologischen Altersosteopenie abgegrenzt.

Die Osteoporose ist eine Erkrankung, die mit einem Knochenmasseverlust und einer erhöhten Frakturgefahr einhergeht (DELLING und VOGEL, 1992; WÜSTER et al., 1998). Neben dieser klinischen Definition existiert eine densitometrische Definition, die die World Health Organization (WHO) 1994 veröffentlicht hat. Sie besagt, dass dann eine Osteoporose vorliegt, wenn der gemessene Dichtewert mehr als 2,5 Standardabweichung unterhalb des Mittelwertes junger gesunder Erwachsener liegt. Indem man diese Definition und das zunehmende Vorhandensein der densitometrischen Knochenerfassung benutzt, ist es möglich, in verschieden Bevölkerungsgruppen Osteoporose abzuschätzen. Zum Beispiel haben Asiaten und Kaukasier generell eine niedrigere Knochenmasse, als andere Bevölkerungsgruppen. Hingegen haben Afrikaner eine höhere Knochendichte (10% bei der Hüftknochendichte) als weiße Menschen mit demselben Alter und Geschlecht (LOOKER et al., 1998; MELTON, 2003). Für weiße Frauen liegt das Risiko, eine Hüft-, Handgelenk- oder Wirbelfraktur in ihrem Leben zu erleiden, bei 40%. Im Vergleich dazu liegt das Risiko für weiße Männer bei nur 13% (CHRISCHILLES et al., 1994).

Osteoporose verursacht eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochens bedingt durch eine Imbalanz zwischen Knochenresorption und –formation zugunsten der Knochenresorption (RAISZ and RODAN, 2003).

Nach RAISZ and RODAN (2003) gibt es drei Hauptgründe für eine niedrigere Knochenmasse. Dabei kann jeder Grund genetisch- oder umweltbedingt sein.

1. Zu geringe „peak bone mass“. Dies wird hauptsächlich genetisch bestimmt, kann aber durch den Lebensstil beeinflusst werden, wie durch

Calciumaufnahme und durch körperliche Aktivität während des Körperwachstums und darüber hinaus.

2. Estrogendefizienz ist der Hauptfaktor bei Frauen, speziell nach der Menopause (FALAHITI-NINI et al., 2000; KHOSLA et al., 2001). So wird auch bei den meisten Osteoporosepatienten von einer erhöhten Knochenresorption berichtet (GARNERO et al., 1996). Außerdem tragen Calcium- und Vitamin D-Defizienz und eine reduzierte Calciumabsorption bei älteren Menschen ebenso dazu bei, indem sie zu einem Parathormon (PTH)-Überschuss führen (LIPS, 2001). Weitere Einflüsse, die eine Rolle bei der Knochenmasseverminderung spielen, sind:

   - endokrine Abnormalitäten
     (primärer Hyperparathyroidismus oder Hyperthyreose),
   - Zytokine und
   - andere lokale Faktoren.

3. Inadäquate Knochenformation.
   Aufgrund einer kompletten Entfernung skeletaler Elemente durch exzessive Knochenresorption wird die Vorlage für eine Knochenneubildung genommen, so dass es zu einer inadäquaten Knochenformation kommt. Zum anderen kann eine inadäquate Knochenformation durch eine altersabhängige Beeinträchtigung der Osteoblastenfunktion hervorgerufen werden sowie durch eine Änderung der lokalen und systemischen Faktoren, die die Knochenformation regeln.

Da die Osteoporose durch verschiedene Faktoren bestimmt und ausgelöst wird, gliedert man sie in verschiedene Typen. Dabei unterscheidet man die primäre, idiopathische Osteoporose (Typ I), die senile Osteoporose (Typ II) und die sekundäre Osteoporose (Typ III) (GALLAGHER, 1990).

2.2.2 Gliederung der Osteoporoseformen: idiopathische, Typ I Osteoporose, senile Typ II Osteoporose, sekundäre Osteoporose

Die idiopathische juvenile Osteoporose tritt bei jungen Menschen beider Geschlechter auf. Die klinischen Symptome sind gekennzeichnet durch Wachstumsretardierung bzw. Frakturen der Wirbel und der langen Röhrenknochen. Hierbei kann ein Größenverlust bei jungen Männern und prämenopausalen Frauen von bis zu 15 cm entstehen (CHRISTENSON, 1997). Nach einer Dauer von zwei bis drei Jahren normalisiert sich das Knochenwachstum bei präpubertären Kindern wieder. Die Äthiopathogenese ist derzeit noch nicht geklärt, wobei aber eine Störung des Vitamin D-Metabolismus oder der Osteoblastenfunktion von HESHMATI und KHOSLA (1998) beschrieben wurde. Weitere mögliche Ursachen könnten laut ihrer Beschreibung auch Schwangerschafts- oder Laktations-bedingt sein.

Die primäre Osteoporose (Typ I) wird hauptsächlich bei älteren Menschen vorgefunden. Der Mechanismus, durch den ältere Menschen beiderlei Geschlechts Knochenverlust erleiden, ist noch nicht vollständig geklärt. Der Hauptfaktor in der Pathogenese ist die quantitative Erniedrigung der Sexualhormone. Obwohl die meisten Patienten, die Osteoporose erleiden, postmenopausale Frauen im Alter von 55 bis 70 Jahren mit Östrogendefizit sind, entwickeln ältere Männer ebenso eine primäre Osteoporose. Mit einer Geschlechterverteilung von 20:1 sind Männer aber deutlich seltener betroffen als Frauen (GALLAGHER, 1990).
Frauen weisen einen zweiphasischen altersabhängigen Knochenverlust auf. Die erste Phase beginnt mit der Menopause und betrifft vorrangig den trabekulären Knochen. Diese Phase wird durch die Estrogendefizienz induziert. Bei der Postmenopause entsteht ein physiologischer Abfall des 17-ß-Estradiolspiegels im Serum, als Folge abnehmender Ovarialfunktion während der Menopause und hat schwerwiegende Auswirkungen auf den weiblichen Organismus, speziell auf den Knochenstoffwechsel. So entsteht eine unverhältnismäßige Zunahme der Knochenresorption im Vergleich zur Knochenformation, welche ca. vier bis acht Jahre anhält (RIGGS et al., 2002). Der Estrogenmangel führt zu einer High-turnover-Osteopenie, d.h. die Aktivierungsfrequenz der BMU´s nimmt zu, wodurch der osteoklastäre Knochenabbau überwiegt. Daraufhin steigt die Anzahl der

Resorptionslakunen auf der Knochenoberfläche an und ihre Tiefe, sowie Ausdehnung nimmt zu. Zusätzlich entwickelt sich eine Störung im Zusammenspiel von resorptiven und formativen Remodelingphasen (coupling) dahingehend, dass der Knochenresorption nicht immer eine Knochenformation folgt (JORDAN et al., 2000). Durch die Resorption wird vermehrt Calcium aus dem Knochen freigesetzt, was wiederum eine verminderte PTH-Sekretion und 1,25 Dihydroxyvitamin D_3-Synthese verursacht. Somit folgt eine reduzierte intestinale Calciumabsorption und renale Calciumrückresorption (GALLAGHER, 1990).

Danach beginnt die zweite Phase, die durch persistierenden, langsamen Knochenverlust, sowohl vom trabekulären, als auch vom kortikalen Knochen gekennzeichnet ist.

Eine Untersuchung von PIETSCHMANN et al. (2001) zeigt das Verhältnis von Knochenstoffwechselparameter und Sexualhormone bei Männern. Dabei war der Gesamt-Testosteronspiegel definitionsgemäß bei den Osteoporosepatienten und der Vergleichsgruppe nicht unterschiedlich, jedoch fanden sich bei den Patienten signifikant erhöhte Sex hormone binding globuline (SHBG-) Spiegel und damit ein verminderter Free-Androgen-Index. Darüber hinaus waren die Estradiolspiegel und die Estradiol/SHBG-Ratio bei den Patienten signifikant vermindert. So kam man auf folgende Hypothese bei der Pathogenese der Androgen-induzierten Osteopenie bei Männern: Aufgrund von erhöhten SHBG-Spiegeln kommt es zu einer Verminderung der Bioverfügbarkeit des Testosterons und dadurch zu einer Verminderung der Konversion von Testosteron zu Estradiol. Es ist bekannt, dass Estradiol die Generierung von Osteoklasten hemmt (SCHILLER et al., 1997), so dass eine Verminderung des Estradiolspiegels zu einer Steigerung der Osteoklastenrekrutierung führen könnte und einer damit verbundenen Steigerung der Knochenresorption zur Folge haben könnte (PIETSCHMANN et al., 2004). Niedrige Estrogenspiegel und erhöhte SHBG-Spiegel wurden bei Männern mit Osteoporose Typ I auch von anderen Autoren beschrieben (GREEN et al., 2000; EVANS und DORIE, 2002). Der erniedrigte Estrogenspiegel wird für die erhöhte Knochenresorption, während der erniedrigte Testosteronspiegel für die verminderte Knochenformation verantwortlich gemacht wird (RIGGS et al., 2002).

Die senile Osteoporose (Typ II) wird mit dem normalen Alterungsprozess assoziiert. Dieser Prozess geht mit einer verminderten Osteoblastenaktivität einher, wobei die

Osteoklastenaktivität konstant bleibt. Typischerweise tritt die Typ II Osteoporose in einem Alter von > 60 Jahren auf, wobei Frauen doppelt so häufig wie Männer betroffen sind (TUCK und FRANCIS, 2002). Bei dieser Osteoporoseform ist der Knochenverlust zu gleichen Teilen auf den trabekulären und kortikalen Knochen verteilt. Demzufolge stehen Hüft- und Oberschenkelhalsfrakturen im Vordergrund, wobei gleichzeitig auch Frakturen der Wirbelkörper entstehen können. Die senile Osteoporose begründet sich durch eine Aneinanderreihung von verschiedenen Faktoren. Durch eine eingeschränkte Nierenfunktion verringert sich die renale 1α-Hydroxylase-Aktivität, die wiederum zu einem Absinken der 1,25 $(OH)_2D_3$-Serumspiegel führt, was durch eine unzureichende Sonnenexposition unterstützt wird. Daraus resultiert eine verminderte Calciumresorption aus dem Intestinaltrakt, die zu einer moderaten Hypocalcämie sowie einer dadurch bedingten vermehrten PTH-Ausschüttung führt. Infolgedessen entsteht ein milder sekundärer Hyperparathyreoidismus, der zu einer Steigerung der Knochenresorption führt (GALLAGHER, 1990). Als Hauptursache der Typ II Osteoporose ist somit der Calciummangel anzusehen. Das Frakturrisiko ist bei älteren Menschen durch Bewegungsmangel und beeinträchtigte Koordination zusätzlich erhöht (ROSS, 1996).

Die sekundäre - Typ III - Osteoporose tritt während dem normalen Alterungsprozess auf (STEIN und SHANE, 2003). Diese Osteoporoseform begründet oder verschlimmert sich durch andere Erkrankungen oder Medikamenteneinnahme (ORLIC und RAISZ, 1999; SCHNEIDER und SHANE, 2001). Männer und Frauen sind gleichermaßen betroffen. ORLIC und RAISZ (1999) hat außerdem beschrieben, dass bei 30% der postmenopausalen Frauen mit Osteoporose noch zusätzliche Faktoren wirken, die zum Knochenverlust beitragen.
Es gibt verschiedene Ursachen für eine sekundäre Osteoporose, wie die folgende Tabelle nach STEIN und SHANE (2003) zeigt.

Tab. 1 Ursachen der sekundären Osteoporose (STEIN and SHANE, 2003) Teil 1/2

Genetische Funktionsstörung	Hypogonadale Zustände	Endokrine Funktionsstörungen	Gastrointestinale Funktionsstörungen	Hämatologische Funktionsstörungen
Ehlers-Danlos-Syndrom	Androgen- Insensitivity-Syndrom	Akromegalie	Gastrektomie	Sichelzellkrankheit
Glycogen Speicherkrankheit	Anorexia nervosa/bulimia	Adrenal-Insuffizienz	Entzündliche Darmer-krankung	Thalassemie
Gaucher Krankheit	Amenorrhoe	Cushing-Syndrome	Malabsorption	Hämophilie
Hämochromatose	Hyperprolactinämie	Diabetes mellitus	Zöliakie	Multiples Myelom
Homocystinurie	Panhypopituitarismus	Hyperparathyreoidismus	Primär biliäre Zirrhose	Leukämien und Lymphome
Marfan-Syndrom	Prämature Menopause	Schilddrüsenerkrankung		Systemische Mastocytosis
Menkes-Syndrom	Turner- und Kleinfelter-Syndrom			
Osteogenesis Imperfecta				
Porphyrie				
Riley-Day-Syndrom				
Hypogonadismus				

Tab. 1 Ursachen der sekundären Osteoporose (STEIN and SHANE, 2003) Teil 2/2

Rheumatologische Erkrankungen	ernährungsbedingte Defizite	Medikamente	verschiedenes
Spondylitis ankylosans	Calcium	Antikoagulantien	Alkoholismus
Rheumatoide Arthritis	Magnesium	Antikonvulsiva	Amyloidose
	Vitamin D	Cyclosporin A und Tacrolimus	Chronisch metabolische Acidose
		Cytotoxische Medikamente	kongestive Herzerkrankungen
		Glukokortikoide	Cystische Fibrosis
		Gonadotropin-releasing Hormon Agonisten	Emphysem
		Methotrexat	Nierenerkrankung im Endzustand
		Thyroxin	Idiopathische Hypercalciurie
			Idiopathische Skoliosis
			Immobilisation
			Multiple Sklerose
			Parenterale Ernährung

2.2.3 Die Posttransplantations-Osteoporose

Die Organtransplantation ist eine zunehmend geläufig werdende Behandlung für Nieren-, Leber-, Herz- und pulmonale Erkrankungen im Endstadium (STEIN und SHANE, 2003). Die Überlebensrate nach einer Organtransplantation hat sich in den vergangenen Jahren dramatisch verbessert, so dass auch Langzeitkomplikationen wie die Osteoporose immer mehr in den Vordergrund gelangen. Die Pathogenese der Posttransplantationsosteoporose wird von vielen Faktoren bestimmt. Häufig findet man bei Kandidaten für eine Organtransplantation die anerkannten Risikofaktoren für eine Osteoporose vor wie reiferes Alter, Kaukasier, Vitamin D-Defizienz, postmenopausaler Status, Bewegungsinaktivität, exzessiver Tabak- und Alkoholkonsum. Außerdem sind diese Patienten oft Medikamenten ausgesetzt wie Glukokortikoide, Schleifendiuretika und Heparin, die Knochenverlust verursachen. Insbesondere kann ein Nieren- oder Leberversagen im Endstadium einen Einfluss auf die Mineralhomöostase haben, noch bevor es zu einer Transplantation kommt (DIAMOND et al., 1989). Die Niere ist das häufigste Organ, das transplantiert wird. Zusätzlich zu den gängigen Transplantationsrisiken findet man bei diesen Patienten oft Formen der renalen Osteodystrophie, einschließlich Hyperparathyreoidismus, Osteomalazie und Osteosklerose. Longitudinale Studien zeigen, dass es in den ersten 3 bis 18 Monaten nach der Nierentransplantation zu einem schnellen Knochenabbau im Lendenwirbelbereich kommt. Während der Hauptresorptions-phase über ca. sechs Monate entsteht ein Knochenverlust von 3 bis 9%. Mit einer überproportionalen Knochenminderung ist immer noch 8 bis 10 Jahre nach der Transplantation zu rechnen (KULAK und SHANE, 1999; STEIN und SHANE, 2003). Patienten mit Herzerkrankungen im Endstadium zeigen schon vor der Transplantation eine verminderte Knochenmassedichte auf. Außerdem neigen sie zusätzlich oft zu 1,25-Dihydroxyvitamin D_3-Defizienz und sekundären Hyperparathyreoidismus. Die Prävalenz einer Wirbelfraktur liegt bei Herztransplantat-Empfängern bei 18 bis 50%. Der schnellste Knochenabbau findet 6 bis 12 Monate nach der Herztransplantation statt mit einer Frakturinzidenz von 10 bis 30% (STEIN und SHANE, 2003). Bei einer Lebertransplantation sind der Knochenverlust und das Frakturrisiko sehr hoch mit einer Frakturinzidenz von 24 und 65% während des ersten Jahres post transplantationem. Am häufigsten treten Rippen- und

Wirbelfrakturen auf. Nach den ersten 6 bis 12 Monaten gelangt die BMD (Bone mineral density) oft zu ihrem Ausgangswert vor der Lebertransplantation zurück (SALLER, 1996; STEIN und SHANE, 2003). Patienten mit Pulmonalerkrankungen im Endstadium haben ein extrem hohes Osteoporoserisiko aufgrund chronischer Hypoxie und Hyperkapnie, Glukokortikoid-Medikation, Malnutrition, Inaktivität, 1,25-dihydroxyvitamin D_3-Defizienz und Tabakgenuss. Es wird berichtet, dass 45 bis 75% der Lungenpatienten schon vor der Transplantation eine erniedrigte BMD aufweisen. Allein im ersten Jahr nach der Lungentransplantation entstehen bei 37% der Empfänger Frakturen, obwohl sie eine anti-resorptive Therapie erhalten (DIAMOND et al., 1989; STEIN und SHANE, 2003). Der Hauptfaktor, der zum Knochenverlust und daraus resultierenden Frakturen beiträgt, ist die immunosuppressive Therapie mit Glukokortikoiden, Cyclosporin A und Tacrolimus. Der Zusammenhang zwischen Glukokortikoid-Medikation und Knochenmasseverlust ist schon seit über 50 Jahren bekannt (ADACHI und PAPAIOANNOU, 2001; CLOWES et al., 2001; KUMAR, 2001). Histologisch ist eine Verminderung der Trabekeldicke feststellbar (DALLE CARBONARE et al., 2001). Cyclosporin A und Tacrolimus verursachen bei Tiermodellen signifikanten Knochenmasseverlust. Deren Wirkung in Bezug auf den Knochenverlust wird im humanen Bereich kontrovers diskutiert, da Cyclosporin A und Tacrolimus immer in Kombination mit Glukokortikoiden gegeben werden (LINDHOLM et al., 1991).

Die Pathogenese der Glukokortikoid-induzierten Osteoporose ist multifaktoriell bedingt. Dabei gibt es zwei Signalwege, die einen abnormalen Knochenmetabolismus hervorrufen. Zum einen ist es die Reduktion der Knochenformation und zum anderen wird die Abweichung des Knochenmetabolismus durch Glukokortikoide über eine gesteigerte Knochenresorption ausgelöst. ISHIDA und HEERSCHE (1998) und MANOLAGAS und WEINSTEIN (1999) beschreiben, dass Glukokortikoide einen direkten Einfluss auf die Osteoblasten haben, indem sie diese inhibieren. Außerdem erniedrigen sie die absolute Osteoblastenzahl und lösen schon bei Prä-Osteoblasten Apoptose aus. Glukokortikoide hemmen auch Wachstumsfaktoren wie IGF-I, IGF-II, IGF-binding Proteine und Zytokine (TGF-β und platelet-derived growth factor-β) und erniedrigen

den Serum Osteocalcin-Spiegel. Die Osteoblastendysfunktion verursacht einen unvollständigen Wiederaufbau der Lakunen beim Remodeling (SAAG, 2003).
Der zweite Mechanismus erfolgt über eine verstärkte Knochenresorption, die Osteoklasten-vermittelt ist. Glukokortikoide führen zu einer signifikanten Inhibierung der Calciumabsorption aus dem Gastrointestinaltrakt, erhöhen die renale Calcium-Abgabe und können die Produktion von Sexualhormonen vermindern. Der reduzierte ionisierte Serum-Calcium-Spiegel löst einen relativen sekundären Hyperparathyreoidismus aus, steigert die Calciummobilisierung aus dem Knochen und trägt auf diese Weise zur Entstehung der Posttransplantationsosteoporose bei (LUKERT und RAISZ, 1990; SAMBROOK, 1996; SAAG, 2003). Eine weitere Wirkung der Glukokortikoide ist eine Supprimierung des Osteoprotegerins (OPG), die wiederum zu einer Stimulierung der OPG-Liganden Produktion durch osteoblastische Zellen führt, wodurch die Osteoklasten-Differenzierung vorangetrieben wird (HOFBAUER et al., 1999; SASAKI et al., 2001).

2.2.4 Ansätze zur Prophylaxe und Therapie der Posttransplantations-Osteoporose

Um eine erfolgreiche Therapie der Posttransplantationsosteoporose zu erzielen, wird noch vor der Transplantation die BMD gemessen. Sollte sich dabei herausstellen, dass ein Patient eine verminderte Knochenmasse im Sinne einer Osteopenie oder einer Osteoporose entwickelt hat, sollte er eine adäquate Calciummenge von ca. 1500 mg/d und Vitamin D-Mengen von 400 bis 1000 IU einnehmen. Außerdem sollte vor und nach der Transplantation eine anti-resorptive Therapie mit Bisphosphonaten (Etidronat, Pamidronat, Alendronat oder Risedronat) erwogen werden. Bei Patienten mit einer normalen BMD vor der Transplantation ist eine anti-resorptive Therapie erst nach der Operation initiiert und sollte wenigstens ein Jahr post transplantationem verlängert werden. Weitere Substanzen, die in der Medizin der Posttransplantation Verwendung finden, sind Sexualhormone bei Männern und Frauen mit Hypogonadismus (außer wenn es eine Kontraindikation gibt), Thiazide, Calcitonin, Fluoride, anabolische Steroide, PTH und Wachstumsfaktoren (RINGE, 1996; STEIN und SHANE, 2003). Patienten sollten nach Möglichkeit an Physiotherapien teilnehmen. Glukokortikoide sollten in der geringsten Dosierung gegeben und es

sollte nach alternativen Medikamenten gesucht werden (STEIN und SHANE, 2003). Um die BMD unter Kontrolle zu halten, wird sie alle sechs Monate des ersten Jahres, danach jährlich nach der Transplantation gemessen (LINDHOLM et al., 1991). Die Entscheidung, ob nach dem ersten Jahr der Transplantation eine Notwendigkeit zum Fortsetzen der anti-resorptiven Therapie besteht, wird in Abhängigkeit der BMD-Messung entschieden und sollte jährlich evaluiert werden (STEIN und SHANE, 2003).

2.3 Thymus

Der Thymus ist ein primäres Lymphorgan, welches eine zentrale Rolle für die zellvermittelte und eine indirekte Rolle für die humorale Immunität spielt. In ihm reifen die Thymozyten zu maturen T-Lymphozyten heran. Je nach Erstreckung des Thymus definiert man verschiedene Thymustypen. Bei der Ratte spricht man von einem cervicothorakalen Typ, da sich das drüsenartige, lappige, weiß-gelbliche Gebilde vom ventral-caudalen Halsbereich bis hin zur Herzbasis erstreckt, wenn es noch nicht involutiert ist. Die Involution beginnt mit der Geschlechtsreife.
Der noch nicht involutierte Thymus besteht aus zwei Lobi, die medial durch Bindegewebe verbunden sind. Das Organ wird von einer dünnen, kollagenfaserigen Kapsel umschlossen. Von ihr ziehen zahlreiche Septen bis in das Thymusparenchym (SINOWATZ, 1992).
Mikroskopisch lassen sich ein lymphozytenreicher kortikaler, von einem lymphozytenarmen, mit Hassall-Körperchen (besondere Differenzierungs- und Transformationsprodukte der Retikulumzellen) besetzten, medullären Bereich unterscheiden (REZZANI et al., 1995). Sowohl im Kortex, als auch in der Medulla gibt es charakteristische akzessorische Zellen. Im Kortex sind hauptsächlich Epithelzellen (EC) vorhanden, die eine starke Heterogenität aufweisen. Es werden 4 Subsets unterschieden. Die Thymusmedulla ist von Interdigitalzellen (IDC) geprägt, die sich ebenfalls in 4 Subsets gliedern. Neben den EC und IDC gehören die Makrophagen ebenso zu den akzessorischen Zellen. Sie sind im gesamten Thymusparenchym auffindbar (REZZANI, 2004).

2.4 T-Lymphozyten

2.4.1 Gliederung der T-Lymphozyten

Das Immunsystem ist in viele Untersysteme aufgegliedert, deren gemeinsame Aufgabe es ist, die Gesundheit des Organismus aufrecht zu erhalten. Es gliedert sich in zwei Systeme auf, dem humoralen und das zellvermittelten Abwehrsystem, wobei die T-Lymphozyten, sowie Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK) dem zellvermittelten Abwehrsystem angehören.

Aufgrund verschiedenen Aufbau und Aufgaben gliedern sich die T-Lymphozyten in Subpopulationen auf. Sie exprimieren charakteristische Oberflächenproteine, wobei einige bei allen T-Lymphozyten vorhanden sind und andere nur von bestimmten Subsets getragen werden (ZINKERNAGEL, 2001).

Allen T-Lymphozyten gemeinsam ist der T-Zell-Rezeptor (TCR), ein Heterodimer, das zur Immunglobulin-Superfamilie gehört. Er besteht aus zwei transmembranösen Glykoproteinketten. Entweder aus einer α- und β-Kette (α/β-T-Zell-Rezeptor mit einer 95%-igen Gesamtpopulation im peripheren Blut), oder einer γ- und δ-Kette (γ/δ-T-Zell-Rezeptor als deutliche Minderheit im peripheren Blut mit 1-10%), die über eine Disulfid-Brücke verbunden sind (BRENNER et al., 1988; RAULET, 1989). Die jeweiligen Ketten sind folgendermaßen aufgebaut: sie bestehen aus einer variablen Region (V), die N-terminal vorliegt, einer Diversity-Region und einer konstanten Region (C). Über ein Joining-Segment (J) sind die C- und V-Region miteinander verbunden (TONEGAWA, 1983; SIU et al., 1984).

Das mehrkettige CD3 Protein ist ein weiteres Oberflächenprotein, welches von allen T-Lymphozyten exprimiert wird und ist zudem eng mit dem TCR verbunden ist (CLEVERS et al., 1988; ZINKERNAGEL, 2001). Der T-Zellrezeptor ist für die Antigenspezifität der Zelle, während der CD3-Komplex für den Transport des Gesamtkomplexes an die Zelloberfläche und für die Signaltransduktion nach der Aktivierung der Zelle verantwortlich ist (KEARSE et al., 1994; KEARSE et al., 1995).

Das CD3 ist ebenso ein Corezeptor des TCR, wie das CD4 und das CD8 Oberflächenprotein. CD steht für „cluster of differentiation“ oder „cluster determinant“, dem Charakteristikum für definierbare Lymphozyten-Subpopulationen.

Reife, in der Peripherie zirkulierende α/β-T-Lymphozyten exprimieren entweder CD4 und werden daher als $CD4^+$ bezeichnet, oder CD8 und sind somit $CD8^+$-α/β-T-Lymphozyten.

Aufgrund dieser Epitope, erfüllen die T-Lymphozyten nach der Antigenerkennung über Antigen-präsentierende Zellen und dem MHC-Molekül (major histocompatibility complex) verschiedene Aufgaben. $CD8^+$ werden als zytotoxische T-Zellen bezeichnet, da sie veränderte Zellen unter MHC-I Restriktion durch Lysis eliminieren (ZINKERNAGEL, 2001).

Die MHC-Restriktion wurde erstmals 1974 von Peter Doherty und Rolf Zinkernagel dargestellt.

$CD4^+$ erkennen MHC-II und umfassen die T-Helferzellen, die sich wegen ihres Expressionsmusters an Zytokinen in 2 weitere Subpopulationen einteilen lassen (LIN et al., 1993; MOSMANN and COFFMAN, 1989). Zum einen gibt es T_H1-Zellen, die Entzündungszellen, Makrophagen, $CD8^+$ und komplementbindende, opsonisierende Antikörper aktivieren (MOSMANN and COFFMAN, 1989; ZINKERNAGEL, 2001). Sie sezernieren IL-2 (Interleukin-2), IFN-γ (Interferon-γ), TNF-β (Tumor necrosis factor-ß), IL-3, TNF-α, GM-CSF (Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor) und TGF-ß (Transforming-Growth factor) (JANEWAY et al., 2001). Unter anderem nimmt TGF-ß Einfluss auf die osteoblastäre Knochenformation.
Die T_H2-Zellen stimulieren B-Lymphozyten zur Differenzierung Antikörper-produzierender Zellen. Sie sezernieren selektiv IL-4, IL-5, IL-10 und gemeinsam mit den T_H1-Zellen IL-3, TNF-α und GM-CSF (JANEWAY et al., 2001).

2.4.2 Entwicklung und Reifung der T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten entwickeln sich aus einer vom Knochenmark hervorgebrachten hämatopoetischen Stammzelle, die sich zu einer multipotenten, sich nicht selbst erneuernden Progenitor Zelle differenziert (MPP). Diese entwickelt sich weiter, entweder zur gemeinsamen myeloiden Progenitor Zelle (CMP), oder die für die T-Zell-Entwicklung wichtigen gemeinsamen lymphoiden Progenitor Zelle (CLP) (KONDO et al., 1997). Der genaue Mechanismus wie die CLP vom Knochenmark in den Thymus gelangt, ist noch nicht ganz geklärt. Bis jetzt wurde festgestellt, dass ein Zusammenspiel folgender Komponenten notwendig ist, damit die CLP veranlasst wird, sich über den Blutweg zur weiteren Differenzierung in den Thymus zu begeben:

- lymphoid-specific recombination-activating gene 1 (RAG1) der frühen lymphoiden Progenitorzellen,
- der Lymphocyte-(L)-selectin exprimierenden Progenitorzellen,
- Vascular-cell-adhesions molecule 1(VCAM 1),
- CC-chemokine receptor 9 (CCR9) und
- IL-7Rα (BHANDOOLA and SAMBANDAM, 2006).

Die Differenzierung und Selektion der CLP zu Thymozyten und daraus folgend zu T-Lymphozyten erfolgt über mehrere Schritte. Als erstes erfolgt die Transmigration vom

Blut in das Thymusparenchym über den cortico-medullären junctions Bereich (LIND et al., 2001b). Man geht davon aus, dass adhäsive Wechselwirkungen zwischen dem PSGL1 (platelet (P)-selectin glycoprotein ligand 1), welche von den LPC (lymphoiden Progenitor Zelle) gebildet wird und dem P-Selectin, welche das Thymusepithel exprimiert, den Eintritt in den Thymus ermöglichen. Dies ist kein kontinuierlicher, sondern ein embryonalbedingter schubweiser Prozess (FOSS et al., 2001). Abhängig von den Oberflächenproteinen der Thymozyten, lassen sie sich in verschiedene Reifestadien einteilen. Die erste Stufe wird als doppelt-negativ (DN) bezeichnet, da noch keine Oberflächenproteine, die zur Unterscheidung der T-Lymphozyten benötigt werden, vorhanden sind. Aufgrund von chemotaktischen Signalen (CXC-chemokine receptor 4, CCR7 und CCR9) wandern die DN Thymozyten in den subkapsulären Raum des Thymus. Die folgenden Reifestadien werden als DN-1 ($CD4^-CD8^-CD25^-CD44^+$; haben noch multi-lineage Potential), DN-2 ($CD4^-CD8^-CD25^+CD44^+$; kein multi-lineage Potential, aber NK, dendritische Zellen (DC) und T-Zell-Potential) und DN-3 ($CD4^-CD8^-CD25^+CD44^-$) bezeichnet (BHANDOOLA and SAMBANDAM, 2006). Die weitere Entwicklung über das DN-3 Stadium hinaus ist von der erfolgreichen Umordnung der TCR ß-Kette abhängig und wird über Notch-übermittelte Signale (Notch bindet an den Delta-Liganden) und IL-7 vermittelt. Die Signale gehen vom kortikalen Thymusepithel aus. Als nächstes erfolgt die Entwicklung zu DN-4 ($CD4^-CD8^-CD25^-CD44^-$) und die Expression des prä-α/ß-TCR Komplex. Die Delta-Notch Interaktion veranlasst die Zellen von DN zu DP Thymozyten (doppelt positiven Thymozyten: $CD4^+CD8^+$) zu reifen, welche den TCRα/ß Antigen Rezeptor exprimieren (CIOFANI and ZÚÑUGA-PFLÜCKER, 2005). Die kortikalen DP Thymozyten sind eine Population von unselektierten T-Zellen, die einer positiven Selektion bedürfen (JAMESON et al., 1995). Dies geschieht über den Kontakt vom TCR mit dem Peptid-MHC-Komplex, welcher vom kortikalen Thymusepithel und dendritischen Zellen exprimiert wird (BOUSSO et al., 2002). Die Anlagerung von DP an MHC induziert ein Überlebenssignal für die Zelle und gleichzeitig eine weitere Stufe der Differenzierung zum single-positive (SP) Thymozyten (CD4 oder CD8). Dieser Prozess wird als positive Selektion bezeichnet. Die negative Selektion wird durch das fehlende Anlagern der Zelle an MHC ausgelöst, die aufgrund der darauf folgenden Apoptose dann zugrunde geht (TAKAHAMA, 2006). Nur 3-5% der herangereiften DP Thymozyten überleben diesen ersten Entwicklungskontrollpunkt,

da die Mehrheit eine Störung beim Empfang der TCR Signale hat (GOLDRATH and BEVAN, 1999).

Positiv selektierte Thymozyten exprimieren CCR7, um sich den weiteren Differenzierungsschritten zu SP Thymozyten zu unterziehen. Außerdem rekrutieren die CCR7 exprimierenden Thymozyten den CCR7 Liganden, CC-chemokine Ligand 19 (CCL19) und CCL21. Diese werden von den medullären Thymusepithelzellen produziert. Somit erfolgen eine aktive Chemotaxis und ein passiver Influx der SP vom Cortex in die Medulla des Thymus (TAKAHAMA, 2006).

Der erste Reifungsprozess in der Medulla besteht darin, dass die SP Thymozyten durch die Expression von CD62 Ligand und CD69 zu reifen, funktionierenden, Dexamethason-resistenten SP Thymozyten werden (BENDELAC, 1992). Die neu gereiften SP werden im Weiteren durch die medullären Stromazellen und den autoimmune regulator (AIRE)-exprimierenden medullären Thymusepithelzellen selektiert. So können Zellen (self-reactive T-Zellen), die gegen gewebsspezifische, körpereigene Antigene reagieren, mit Hilfe der Apoptose zerstört werden (TAKAHAMA, 2006).

Die Reifung der SP in der Medulla beinhaltet außerdem die Produktion von regulierenden T-Lymphozyten, die zur Deletion der self-reactive T-Zellen notwendig sind, sowie die Expression von sphingosine-1-phosphate receptor 1 ($S1P_1$) von maturen SP Thymozyten (T-Zellen). Ein hoher $S1P_1$-Spiegel ist für den Austritt der reifen Thymozyten aus dem Thymus notwendig (MATLOUBIAN et al., 2004; ALLENDE et al., 2004). Der Export der reifen Thymozyten aus dem Thymusparenchym erfolgt über den perivaskulären Raum, der zu Venolen, Arteriolen und zum lymphatischen Gewebe führt. Der genaue Mechanismus, wie die T-Lymphozyten über den perivaskulären Raum in das Blutgefässsystem oder bzw. und das Lymphgefässsystem gelangen, ist nicht ganz klar (TAKAHAMA, 2006).

2.4.3 T-Zell-Aktivierung

Die T-Zell-Aktivierung erfolgt über die Bindung eines Antigens an den Lymphozyten Rezeptor. Sie wird durch andere Oberflächerezeptoren co-stimuliert, wie zum Beispiel B7 über CD28. Daraufhin erfolgt die Aktivierung verschiedener Zell-Signal-Kaskaden, die wiederum die Transkription, Lymphozyten-Proliferation und Zytokin-Freisetzung aktiviert (STODDARD and FLICK, 1996).

Die Stimulation der T-Zelle durch die Interaktion einer Antigen präsentierenden Zelle und MHC-Molekül aktiviert eine Reihe von Tyrosinkinasen, welche zum einen den Tyrosinrest auf Proteinen innerhalb des CD3-Komplexes phosphorylieren und zum andere stromabwärts gelegene Signalwege initiiert (SHAW and DUSTIN, 1997). Dies löst weitere Signale aus, die Ras (Regulation des Cytoskeletts) und Phospholipase C (PLC) aktivieren (COLLINS et al., 1997).

PLC spaltet Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP_2) in Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). Die Bindung von IP_3 an seinen Rezeptor setzt Ca^2+ aus dem endoplasmatischen Retikulum frei. Zeitgleich aktiviert DAG die Proteinkinase C (PKC). Das darauf folgende Zusammenspiel von Ca^{2+} und PKC aktiviert Phosphoproteine, die im Zellkern für die IL-2-Gentranskription unerlässlich sind (ZINKERNAGEL, 2001). Außerdem stimuliert der erhöhte intrazelluläre Ca^{2+}-Spiegel die Aktivierung der Calmodulin-abhängigen Serinphosphatase Calcineurin. Aktiviertes Calcineurin dephosphoryliert eine relativ begrenzte Substratmenge, einschließlich dem cytoplasmatischen NFAT (nuclear factor of activated T cells) Protein. Dies bewirkt eine Konformationsänderung, wodurch die nukleäre Translokalisationssequenz demaskiert wird, und in weiterer Folge den Transport des Proteins in den Kern. NFAT hat eine geringe Affinität zur DNA. Dies in Kombination mit weiteren Transkriptionsfaktoren wird zur Aktivierung von Promotoren, wie dem für IL-2 benötigt, welches für die T-Zell-Aktivierung benötigt wird (REZZANI, 2004).

2.4.4 Interaktion der T-Lymphozyten mit dem Knochen

Durch die Entdeckung, dass aktivierte T-Lymphozyten OPGL sezernieren und so eine Stimulation der osteoklastären Knochenresorption induzieren können, haben sich ganz neue Dimensionen in der Skelettforschung eröffnet. Man geht heute davon aus, dass dieser Mechanismus entscheidend an der Knochen- und Gelenkszerstörung bei rheumatoiden und anderen entzündlichen Gelenk-Erkrankungen beteiligt ist (KONG et al., 1999). Die Erkenntnis, dass Immunzellen in der Lage sind, Substanzen zu sezernieren, die den Knochenstoffwechsel in nachhaltiger Weise beeinflussen können, hat der Verbindung zwischen Immunsystem, Sexualhormonen und Knochenstoffwechsel eine neue Bedeutung verliehen. Seit längerer Zeit wusste man, dass Östrogen- und Androgenmangel zu einer Stimulation der B-Lymphopoese im Knochenmark bei Maus (MIYAURA et al., 1997; ONOE et al., 2000) und Ratte (ERBEN et al., 1998; ERBEN et al., 2001) führen. Interessanterweise haben eine Reihe von Studien in jüngster Zeit zudem nahe gelegt, dass eine Stimulation von Tumor-Nekrosefactor-alpha (TNF-α) und OPGL-Produktion von T-Lymphozyten möglicherweise einen wichtigen Faktor in der Pathogenese des durch Östrogenmangel hervorgerufenen Knochenverlustes bei der Maus darstellt (CENCI et al., 2000; ROGGIA et al., 2001; CENCI et al., 2003; ROGGIA et al., 2004). So konnte gezeigt werden, dass athymische, T-Zell-defiziente Mäuse keinen Knochenverlust nach der Ovariektomie zeigen (CENCI et al., 2000). Die bisher vorliegenden Daten unterstützen die Hypothese, dass eine Stimulation der TNF-α- und OPGL-Sekretion von T-Zellen im Östrogenmangel eine entscheidende Rolle in der Steigerung der osteoklastären Knochenresorption spielt (CENCI et al., 2000; ROGGIA et al., 2001; CENCI et al., 2003; ROGGIA et al., 2004). Diese Studien sind jedoch nicht unumstritten geblieben, denn athymische Nacktmäuse wie auch athymische Nacktratten besitzen generell einen niedrigeren Knochenturnover gegenüber Kontrolltieren (McCAULEY et al., 1989; BUCHINSKY et al., 1995).
Auch zeigen athymische, T-Zell-defiziente Nacktratten im Vergleich zu euthymischen Kontrolltieren keine Verminderung des Ovariektomie-induzierten Knochenverlustes (SASS et al. 1997). Es muss also nach wie vor als umstritten gelten, ob T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Estrogenmangel-Osteopenie spielen.

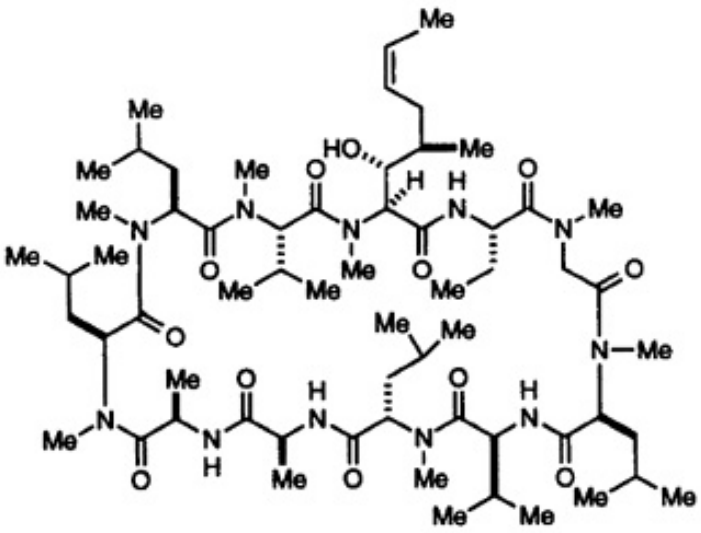
Auch aus anderen Forschungseinrichtungen haben sich Hinweise für eine Beteiligung der T-Lymphozyten an der Steuerung des Knochenturnovers ergeben. Seit ca. 15 Jahren ist bekannt, dass das Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA), das zu den Standard-Therapeutika bei schweren Autoimmunerkrankungen und nach Organtransplantation zählt, bei männlichen Ratten zu einer High-turnover-Osteopenie führt (MOVSOWITZ et al., 1989; KATZ et al., 1994; ERBEN et al., 1998; ERBEN et al., 2003). T-Lymphozyten sind die wesentlichsten Zielzellen für CsA, und interessanterweise konnte gezeigt werden, dass männliche, CsA behandelte, athymische, T-Zell-defiziente Nacktratten keine ausgeprägte High-turnover-Osteopenie entwickeln (BUCHINSKY et al., 1996).

2.5 Cyclosporin A Cyclosporin A

Die Entdeckung der immunsuppressiven Wirkung von Cyclosporinen war ein Wendepunkt in der Transplantationsmedizin, weil es die Lebensqualität und Überlebensrate verbessert (CALNE et al., 1978; CALNE et al., 1979; PARRA CID et al., 2003). Cyclosporine sind zyklische Peptide, die von den Pilzen Cylinodrocarpon lucidum Booth, Trichoderma polysporum Rifai und Tolycladium inflatum Gams erzeugt werden. Der am besten beschriebene Vertreter ist Cyclosporin A (CsA), der von Tolycladium inflatum Gams produziert wird. CsA wurde erstmals 1972 bei der Suche nach neuen Antibiotika identifiziert (BOREL et al., 1976; NUSSENBLATT und PALESTINE, 1986; STÄHELIN 1996). Dabei wurde sein großes biologisches Wirkspektrum wie antiparasitäre, fungizide, antiinflammatorische und enorm immunsuppressive Wirkung entdeckt (BOREL et al., 1976). CsA hat nicht nur die Transplantationsmedizin beeinflusst (EUROPEAN MULTICENTER TRIAL GROUP, 1983), sondern auch die Therapie der autoimmunen Erkrankungen (FREY, 1990) wie Psoriasis (EPSTEIN, 1991; MIHATSCH und WOLFF, 1992), rheumatoide Arthritis (YOSHINOYA et al., 1988; EPSTEIN, 1991), Uveitis (NUSSENBLATT, 1988; EPSTEIN, 1991) und neurologische Autoimmunerkrankungen (BELENDIUK and SOLCH, 1988; CHRISTIANS and SEWING, 1993; REYNOLDS and AL-DARAJI, 2002).

2.5.1 Chemische Struktur

CsA ist ein zyklisches, neutrales, lipophiles Undekapeptid ($C_6H_{11}N_{11}O_{12}$) mit einem Molekulargewicht von 1203,63 Da. Die chemische Struktur weist besondere Merkmale auf wie zwei außergewöhnliche Aminosäuren: die 3-hydroxy-4-methyl-2-methylamino-6-oktan Säure an Position eins und α-aminobutyl Säure an Position zwei. Weitere Merkmale sind, dass sieben der elf Aminosäuren am Amidstickstoff methyliert sind und die Aminosäure an Position acht in der seltenen D-Konfiguration vorliegt (ALTSCHUH, 2002).



Cyclosporin A [CsA]

Abb. 1 Strukturformel aus CLARDA et al. (1995)

2.5.2 Wirkmechanismus von Cyclosporin A

Studien von 1984 untersuchten den Wirkmechanismus von CsA. Es unterbricht die T-Zell-Aktivierung, die in Kapitel 2.4.3 beschrieben wurde. Dabei wurde entdeckt, dass es sich mit einem intrazellularen Protein, namens Cyclophillin verbindet, welches Calcineurin, eine Calcium abhängige Phosphatase, inhibiert (HANDSCHUMACHER et al., 1984; MATSUDA et al., 2000). Dies wiederum unterbricht die T-Zellaktivierung zwischen Antigenerkennung und IL-2 Produktion (SCHREIBER, et al., 1993), da es zu keiner Dephosphorylierung von NFAT und somit zu keiner T-Zellaktivierung kommt (REZZANI, 2004).

2.5.3 Pharmakokinetik und Verteilungsmuster im Körper

Nach oraler Aufnahme wird CsA überwiegend im Dünndarm absorbiert (DREWE et al., 1992), von wo es ins Blut übertritt und hauptsächlich an Blutzellen und Lipoproteine gebunden wird. Bei der Verteilung im Körper lässt CsA organspezifische Unterschiede erkennen aufgrund von Organdurchblutungsrate und der Membranpermeabilität. TANAKA et al., (1999) beschreiben, dass im Fettgewebe die

höchste CsA-Konzentration gefolgt von Leber, Milz, Pankreas und Nieren zu finden ist. Ebenso verläuft die Sättigung organentsprechend. So haben Muskel- und Fettgewebe einen linearen Verlauf bis zur Sättigung, Lunge, Herz und Haut eine sofortige und Niere, Leber und Milz eine langsame Sättigung (TANAKA et al., 1999). Über Leberkapillaren gelangen die Blutzellen und Lipoproteine in den Dissé Raum und erhalten Kontakt mit der Hepatozytenmembran. Diese überwindet es entweder mit Hilfe von Diffusion oder über aktive Transportmechanismen, welche durch Lipoproteinrezeptoren vermittelt sind. CsA und seine Metaboliten gelangen in die Hepatozyten und werden über das Cytochrom P450 Monooxygenase-System weiter metabolisiert. Die Metaboliten gelangen hauptsächlich in die Galle und zu einem kleinen Anteil auch ins Blut. Man betrachtet die Galle als Hauptausscheidungsweg für CsA, da gezeigt werden konnte, dass 95% über die Faeces und nur 4-6% über die Niere eliminiert wurden (REZZANI, 2004).

2.5.4 Metabolismus von Cyclosporin A

Die Metabolisierung verläuft zweiphasig. Der erste Schritt der Phase I ist ein Oxidationsprozess, der sich hauptsächlich in der Leber geschieht mit Hilfe der Cytochrom P450-Oxidase Familie. Dabei steht Cytochrom P450 3A, eine Subfamilie mit dem bedeutendsten Vertreter, dem Cytochrom P450 3A4 (BORK et al., 1989), im Vordergrund, da es über 80% der CsA-Biotransformation in der menschlichen Leber übernimmt (COMBALBERT et al., 1989).

Die Phase II des CsA Metabolismus ist eine Konjugationsreaktion, eine allgegenwärtige Reaktion bei der Eliminierung aus den Organen (wie der Niere und des Darmes) und zudem der wichtigste Teil der Biotransformation. Es entstehen Sulfatkonjugate (REZZANI, 2004).

CsA Gaben modulieren in der Leber und der Niere die Regulation der Cytochrom P450 Enzyme, indem sie ihre Aktivität um 70 bis 75% erniedrigen (MAYER et al., 1989). Wegen dieser Modulation ändert CsA ebenfalls den Prostaglandin-Metabolismus, der die toxische Wirkung von CsA mitbestimmt (REZZANI, 2004).

CsA beeinflusst auch andere Substanzen, die über das Cytochrom P450 Monooxygenase System metabolisiert werden.

2.5.5 Nebenwirkungen von CsA

Wie oben erwähnt, beeinflusst CsA auch andere Substanzen, die über das Cytochrom P450 Monooxygenase System metabolisiert werden.
So erhöhen beispielsweise Ketokonazol, Erythromycin (KAHAN, 1989) und Nifedipin, Diltiazam, Verapril und Nicardipin (TORTORICE et al. 1990) die CsA Blutkonzentration, wohingegen Rifamycin und Phenobarbital diese senken.
Die Nebenwirkungen die durch die CsA-Metabolisierung auftreten sind zahlreich. Sie können immunologische, renale, hepatische, neurologische und knochenmetabolische Komplikationen umfassen.
Da die Transplantatpatienten immunsupprimiert sind, neigen sie zu viralen Infekten (Herpes simplex und zoster, sowie dem Zytomegalievirus) und Pneumocystis carinii-Pneumonien (PENN, 1987).
Besonders hervorzuheben sind die renalen Nebenwirkungen. Viele Studien beschreiben, dass die auf CsA basierende Immunsuppression abnormale Nierenfunktion erzeugt (REZZANI, 2004). Es kommt zu einer CsA vermittelten Nierendysfunktion, der Hauptkomplikation einer CsA-Behandlung. Die Nephrotoxizität wurde erstmals 1978 von CALNE et al. beim Menschen beschrieben. CALNE (2002) teilt die CsA-Auswirkungen in akute und chronische Nebenwirkungen ein. Bei der akuten Nebenwirkung entsteht eine afferente glomeruläre Konstriktion, die hämodynamisch zu einer erniedrigten glomerulären Filtrationsrate führt. Durch die veränderte Fließgeschwindigkeit entstehen thrombotische Mikroangiopathien, die einen direkten negativen Einfluss auf das Endothel ausüben (KAHAN, 1989; GAUTHIER and HELDERMAN, 2000). Die Nierenstrukturveränderungen finden hauptsächlich in den proximalen Tubuli und den Arteriolen durch Hypertrophie der Endothelialzellen statt (REZZANI, 2004).
Bei chronischer CsA-Behandlung wird das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System inhibiert, es kommt zu einer Aktivierung der profibrotischen Gene wie TGF-β und es entsteht eine intrarenale Ischämie mit einer Hypoxie (REZZANI, 2004). Die chronische Nierentoxizität von CsA beginnt schon zwei Wochen nach Behandlungsbeginn (VERPOOTEN et al., 1986; REZZANI et al., 2001), wobei das Nierengewebe eine deutliche interstitielle Fibrose, Tubulusatrophie, arterioläre Hyalinose und gelegentlich fokale glomeruläre Vernarbung zeigt. Die Gefahr von

einer Nierentoxizität wird durch Einnahme von anderen Medikamenten wie nicht-steroidale antiinflammatorische Substanzen, Aminoglykosiden und Fungiziden zusätzlich noch erhöht (REZZANI, 2004).

Die Hepatotoxizität geht mit einer Erhöhung der Bilirubin – und Aminotransferasen Blutspiegel einher (PICKRELL et al., 1988) und tritt in den ersten neunzig Tagen post-transplantationem auf. Die Hepatozytennekrose steht dabei im Vordergrund (REZZANI, 2004).

Die Neurotoxizität ist mit einem Vorkommen von 50% bei Transplantationspatienten ein verbreiteter Nebeneffekt. Sie tritt in den ersten Tagen post-transplantationem auf, wenn die Patienten CsA hoch dosisiert erhalten. Es werden vor allem Anfälle aufgrund von Hypomagnesiämie, Tremor, Neuralgie, Paraästhesie, Verwirrung, Ataxie, Hemiplegie, vorübergehende kortikale Erblindung und okzipitale Anfälle berichtet (ATKINSON et al., 1984; VELLODI et al., 1987; RUBIN and KANG, 1987; GIJTENBEEK et al., 1999).

Eine weitere Komplikation durch die Behandlung mit CsA ist die Hypertonie, die wegen eines erhöhten systemisch-vaskulären Gefäßwiderstands ausgelöst wird (TALER et al., 1999). Diese Art der Hypertonie ist durch einen konfusen cirkardianen Rhythmus mit Umkehrung des normalen nächtlichen Blutdruckabfalls, nächtliche Kopfschmerzen und erhöhten nächtlichen Harndrang gekennzeichnet. Ferner kann es durch die nächtliche Hypertonie gelegentlich zu retinalen Hämorrhagien, ZNS-Symptomatiken (REEVES et al., 1986) linksventrikulärer Hypertrophie, Apoplexie und Mikroalbuminurie (VERDECCHIA et al., 1990; BIANCHI et al., 1994) kommen.

Bei der Pathogenese der CsA induzierten Osteopenie kommt es zu Veränderungen der Parameter von Knochenformation und –resorption und einer gleichzeitigen Erhöhung der Serumspiegel von Osteocalcin, einem Protein, das fast ausschließlich von Osteoblasten synthetisiert wird (ERBEN et al. 1998). Es stellt somit einen spezifischen Indikator der Osteoblastenaktivität dar (ERIKSEN et al. 1995). Die strukturellen Veränderungen des Knochens entstehen durch das vermehrte Auftreten von Trabekelperforationen durch exzessive Osteoklastenaktivität (PARFITT, 1983; PARFITT, 1984a, PARFITT et al., 1987). Dabei ist der Verlust der Knochenmasse anfänglich gering, führt später aber zur kompletten Entfernung von Strukturelementen. Studien über den Knochenturnover bei einer hochdosierten CsA Behandlung von Ratten haben gezeigt, dass sich in Kürze eine High-turnover-

Osteopenie gebildet hat mit Anstieg der Osteocalcin-Serumspiegel (EPSTEIN et al. 1990; MOVSOWITZ et al., 1990; KATZ et al., 1994). Es wurde auch gezeigt, dass die gleichzeitige Applikation von antiresorptiven Substanzen (Calcitriol, Calcitonin, Bisphosphonate) die Entstehung der CsA-induzierten Osteopenie verhindern kann (EPSTEIN et al., 1990; STEIN et al., 1991; SASS et al. 1997).

Bei weiblichen Ratten wurde beschrieben, dass eine gleichzeitige Gabe von Estradiol bzw. Raloxifen (Estradiol-Partialagonist) und CsA bei ovariektomierten Ratten eine Hemmung der Ausbildung der Ovariektomie- sowie auch der CsA-induzierten Osteopenie bewirkt. Die gute Wirkung von antiresorptiven Substanzen bei der Vorbeugung der CsA-induzierten Osteopenie der Ratte verdeutlicht indirekt die wesentliche Bedeutung der durch CsA bewirkten Steigerung der Osteoklastenaktivität für die Pathogenese dieser Knochenveränderung.

2.6 Das Tiermodell Ratte

2.6.1 Der Knochenstoffwechsel von Mensch und Ratte im Vergleich

Die Anforderungen an ein experimentelles Tiermodell bestehen darin, dass die gewonnenen Versuchstierergebnisse auf die Humanmedizin übertragbar sind. Das ist jedoch nur dann der Fall, wenn bei den physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen weitgehender Einklang besteht.
Kalu (1991) definiert ein Tiermodell für postmenopausalen Knochenverlust wie folgt: Ein lebendes Tier, bei dem spontan oder durch Estrogendefizienz ein Knochenverlust induziert werden kann und bei dem typische Merkmale eines postmenopausalen Knochenverlustes mit ähnlichen Folgeerscheinungen auftreten. Gemeinsamkeiten beim Knochenverlust der Ratte und der postmenopausalen Frau sind:

- die Erhöhung des Knochenturnovers mit gesteigerter Resorption,
- eine initiale schnelle Phase des Knochenverlustes, der eine langsamere Phase folgt,
- ein größerer Knochenverlust in der Spongiosa als im kortikalen Knochen,
- eine erniedrigte intestinale Calcium Absorption,
- Schutz gegen Knochenverlust durch Fettleibigkeit,
- ähnliche Reaktionen des Knochens auf die Therapie mit Östrogenen, Tamoxifen, Bisphosphonaten, PTH, Calcitonin und Bewegung.

Diese weit reichenden Ähnlichkeiten sind ein starker Hinweis darauf, dass die ovariektomierte Ratte als ein Tiermodell für das Erforschen des humanen Knochenverlust geeignet erscheint.
Mitte der siebziger Jahre wurde davon ausgegangen, dass das Tiermodell der ovariektomierten Ratte zur Erforschung von humanen Knochenerkrankungen nicht hinreichend ist, weil man der Ansicht war, dass die Ratte kein intrakortikales Remodeling hatte und der Knochenturnover von einer lebenslangen Modeling-Aktivität bestimmt wird (FROST, 1976b).
Ein weiterer Punkt, der dieses Tiermodell als nicht ganz geeignet erscheinen ließ, war, dass bis dahin die meisten Untersuchungen an heranwachsenden Ratten

vorgenommen wurden, die postmenopausale Osteoporose aber eine Erkrankung des adulten Menschens ist, dessen pathophysiologische Veränderung in der Remodeling-Aktivität besteht. Das Modeling der Ratte stand dem zu 95% vorherrschenden Remodeling beim Menschen gegenüber (FROST, 1976b). Hinzu kam noch die Annahme, dass Ratten ein lebenslanges, beständiges Skelettwachstum innehaben, da sie bei einer ad libitum Fütterung ständig an Körpergewicht zunahmen. Diese Argumente beruhten allerdings auf unvollständigen Untersuchungen des Knochenturnovers (FROST und JEE, 1992).

Anfang der 80-iger Jahre wurde aber anhand von Fischer 344-Ratten aufgedeckt, dass es sich bei der lebenslangen Körpergewichtszunahme nicht um Körperwachstum handelt, sondern um eine Vermehrung des Fettgewebes (YU et al., 1982). Diese Tatsache wurde von ERBEN et al. (1996) durch folgende Beobachtung belegt: Bei neun Monate alten Ratten ist kein Längenwachstum des Wirbelkörpers mehr messbar. Bei der proximalen Tibia einer 12 monatigen Ratte sind nur noch sehr geringe Werte zu detektieren. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Remodeling-Aktivität am gesamten Knochenmetabolismus im trabekulären Knochen des Lendenwirbelkörpers 91% und in der proximalen Tibia 66% betrug. Dem gegenüber steht die Modeling-Aktivität mit 2% bzw. 16% (ERBEN et al., 1996).

KIMMEL (1991) berichtet von einem Epiphysenschluss der proximalen Tibia bei ca. 18 Monate alten Sprague-Dawley-Ratten. Daher ist anzunehmen, dass ein Epiphysenschluss bei Fischer-344 Ratten sich schon früher vollzieht, da diese eine kleinwüchsigere Rasse verkörpern (YU et al., 1982).

Die Vorteile des Rattenmodels für die Erforschung von humanen Knochenverlusten bestehen darin, dass die nachgeahmten postmenopausalen trabekulären Knochenverluste in relativ kurzer Zeit untersucht werden können (THOMPSON et al., 1995). Im Vergleich zum Modell der Altweltaffen, bei denen als einzige Tierart Osteoporose und Spontanfrakturen natürlich vorkommen, gibt es weniger ethische Einschränkungen. Außerdem sind Ratten einfach im Handling, ihre Haltung ist kostengünstig und aufgrund ihrer Körpergröße Raum sparend im Vergleich zur Affen-, Schaf- und Hundehaltung (GIANGREGORIO und BLIMKIE, 2002; EGERMANN et al., 2005).

2.6.2 Alternativen zum Tiermodell

Tierversuche werden in der heutigen Zeit in vielen Bereichen der medizinischen Grundlagenforschung durch die Zellkultur ersetzt. Zum einen wird sie ethischen und tierschützerischen Aspekten gerecht und zum anderen ist sie kostengünstiger.
Mit Hilfe der Zellkultur und anderen In-vitro Assays könnten die Reaktionen von normalen und Osteoporose auslösenden Zellen im Anschluss an verschiedene Arten von Stimuli untersucht werden. Leider fehlt ihnen die Wirkung der zentralen Kontrolle des Knochenturnovers und der Feedback-Mechanismus, der auf die physikalische Aktivität einsetzt (HABERLAND et al., 2001). Außerdem können sie nicht, aufgrund des Fehlens von Zytokinen und Wachstumshormonen, die gleichen lokalen und systemischen Prozesse, wie sie im Knochen vorgefunden werden, darstellen (EGERMANN et al., 2005).
Dies verdeutlichen zum Beispiel die gegensätzlichen Ergebnisse, die durch In-vitro (STEWART et al., 1986; STEWART et al., 1989) und In-vivo Studien der Knochenwirkung von CsA zustande gekommen sind (MOVSOWITZ et al., 1988; MOVSOWITZ et al. 1989).
Das Tiermodell der ovariektomierten Ratte ist deshalb auch zur Evaluierung neuer Substanzen bei der Behandlung und Prävention von Osteoporose unumgänglich (FOOD and DRUG ADMINISTRATION, 1994).
Ein Lösungsvorschlag ist die integrierte Durchführung von Zellkultur und Tierversuch zur Untersuchung und weiteren Aufdeckung des Regulationsmechanismus des Knochenturnovers (PARFITT, 1995).

3 Material und Methoden

3.1 Tierversuche

3.1.1 Versuchsdurchführung

Sämtliche Tierversuche wurden vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Kultur Österreich genehmigt und unter dem Aktenzeichen 03/09/97/2005 für Versuch I und 04/02/97/2005 für Versuch II geführt.

3.1.2 Tierhaltung

Die Ratten wurden in den institutseigenen, fensterabgedunkelten, vollklimatisierten Tierhaltungsställen paarweise in Makrolon Typ IV Käfigen gehalten, die in Käfigständern von jeweils 24 Käfigen pro Ständer angeordnet waren. Die Raumtemperatur lag stets bei ca. 24°C und die relative Luftfeuchte betrug ca. 50%. Über die gesamte Versuchsdauer hinweg wurde ein konstantes Lichtprogramm mit jeweils 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit im Wechsel gehalten. Leitungswasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die Ratten aus Versuch II und alle männlichen Ratten aus Versuch I (s. u.) erhielten ein handelsübliches, pelletiertes Alleinfuttermittel (Altromin 1314 Forti; 22,50% Rohprotein, 5,00% Rohfett, 4,50% Rohfaser, 6,50% Rohasche, 0,90% Calcium, 0,70% Phosphor, 25.000 IE Vit. A, 1000 IE Vit. D3, 125 mg Vit. E, 5 mg Kupfer, Altromin GmbH, Lage) ad libitum. Die Futtermenge der ovariektomierten Tiere (OVX) aus Versuch I wurde an den Futterverbrauch der scheinoperierten weiblichen Tiere mittels Pair-feeding angeglichen.

3.2 Versuch I: Rolle von T-Lymphozyten in der Pathogenese der Estrogen- und Androgenmangel-Osteopenie

Mit den hier beschriebenen Experimenten sollte geklärt werden, ob T-Lymphozyten an der Regulation des Knochenturnovers im Estrogen- bzw. Androgenmangel beteiligt sind.

Für diese Experimente waren 32 weibliche, 6 Monate alte und 32 männliche 12 Monate alte Fischer-344-Ratten vorgesehen. Um mögliche Tierverluste bei der Thymektomie auszugleichen, waren je 6 weibliche und männliche Reserveratten vorgesehen.

Das Anfangsdurchschnittsgewicht bei den weiblichen Tieren betrug 204 g und bei den männlichen Tieren 443 g.

Nach einer Akklimatisationszeit von mehreren Monaten wurden die Tiere gemäß ihrem Geschlecht und ihrem Körpergewicht in Gruppen mit je acht Ratten eingeteilt. Wie aus dem Versuchsplan weiter unten zu ersehen ist, wurden weibliche und männliche Tiere zunächst thymektomiert (TX) oder scheinoperiert (Sham-TX) (siehe Kap. 3.5.2). Die T-Zell-Depletion erfolgte zwei Wochen nach TX. Während der T-Zell-Depletionsphase erhielten die Ratten drei intraperitoneale Injektionen eines selbst hergestellten natriumazidfreien rattenspezifiischen murinen monoklonalen IgG_1-Antikörpers gegen den Ratten-T-Zellrezeptor (TCR) (vergl. Kap.3.5.3) im Abstand von drei Tagen und in einer Dosis von 20 mg/kg KGW. Da der TCR auf allen maturen T-Zellen exprimiert wird, ist eine praktisch 100%-ige T-Zell-Depletion erreichbar. Als Kontrolle wurde ein unspezifischer muriner monoklonaler Antikörper des gleichen Isotyps Mouse IgG_1 (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) verwendet. Die T-Zell-Depletion wurde mit Hilfe von der Durchflusszytometrie (siehe Kap.3.6) im peripheren Blut bei allen anti-TCR-behandelten Ratten nach der T-Zell-Depletion und am Versuchsende überprüft.

Drei Wochen nach der T-Zell-Depletion wurden die Ratten nach Standardprotokollen (ERBEN et al., 2000 ERBEN et al., 2003) scheinovariektomiert (Sham-OVX), scheinorchiektomiert (Sham-ORX), ovariektomiert (OVX) oder orchiektomiert (ORX). Alle Ratten erhielten eine multiple Fluorochrom-Markierung. Zum einen erhielten sie direkt vor dem Depletionsbeginn Alizarin complexone (30 mg/kg KGW, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) und vor Operationsbeginn Demecloxyclin (20 mg/kg Fa. Sigma-

Aldrich, Steinheim). Zum anderen wurden die Tiere zwei Monate post operationem nach einer Fluorochrom-Doppelmarkierung mit Calcein (20 mg/kg KGW, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) getötet. Dabei wurde den Ratten das in Aqua ad injectabilia mit 1,4-prozentigem Zusatz von Natriumbikarbonat gelöste Calcein acht und drei Tage vor der Tötung subkutan injiziert.

Die Analytik zielte im Wesentlichen auf die histologische und densitometrische Erfassung der Knochenmasse sowie die Bestimmung des Knochenturnovers auf biochemischer und histologischer Ebene ab. Hierzu wurden die rechte proximale Tibia und der 1. Lendenwirbel unentkalkt in Methylmetacrylat (MMA) eingebettet und histomorphometrisch ausgewertet. Die linke Tibia und der 4. Lendenwirbel wurden für die Knochendichtemessungen mittels peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT) entnommen.

Am Versuchsende wurden die Ratten durch Blutentzug aus der Aorta abdominalis unter Ketamin/Xylazin-Narkose (Ketamin, Hostaket®, Wiesbaden, und Xylazin, Rompun® 2%, Fa. Bayer, Leverkusen) schmerzlos getötet. Das gewonnene Serum wird aliquotiert und für die weitere Diagnostik bei -80°C gelagert.

Urin wurde in Stoffwechselkäfigen von allen Tieren vor Experimentbeginn präoperativ sowie ein und zwei Monate post operationem gewonnen und nach Aufbereitung (Kap. 3.12.3.1) bei -20°C eingefroren.

Tab. 2 Versuchsplan weibliche Ratten, Versuch I

Gr.	N	OP	T-Zell-Depletion	OP		
		0	0,5	1	2	3 Monate
1	------8------	Sham-TX	Isotyp-Kontrolle	Sham-OVX	----------	----F-F-†
2	------8------	Sham-TX	Isotyp-Kontrolle	OVX	----------	----F-F-†
3	------8------	TX	Anti-TCR	Sham-OVX	----------	----F-F-†
4	------8------	TX	Anti-TCR	OVX	----------	----F-F-†

Gr. = Gruppe; N = Tierzahl; TX = Thymektomie; TCR = T-Zell-Rezeptor; F = Calcein; † = Tötung

Tab. 3 Versuchsplan männliche Ratten, Versuch I

Gr.	N	OP	T-Zell-Depletion	OP		
		0	0,75	1	2	3 Monate
1	------8------	Sham-TX	Isotyp-Kontrolle	Sham-ORX	----------	----F-F-†
2	------8------	Sham-TX	Isotyp-Kontrolle	ORX	----------	----F-F-†
3	------8------	TX	Anti-TCR	Sham-ORX	----------	----F-F-†
4	------8------	TX	Anti-TCR	ORX	----------	----F-F-†

Gr. = Gruppe; N = Tierzahl; TX = Thymektomie; TCR = T-Zell-Rezeptor; F = Calcein; † = Tötung

3.3 Versuch II: Rolle von T-Lymphozyten für die Skelettwirkung von CsA

Wie dem Versuchsplan (s. u.) entnommen werden kann, waren für diese Experimente 32 weibliche, 6 Monate alte und 32 männliche, 9 Monate alte Fischer-344-Ratten vorgesehen mit ebenfalls je sechs weiblichen und männlichen Reservetieren. Das Anfangsdurchschnittsgewicht der weiblichen Ratten betrug 201,5 g und das der männlichen Ratten 448 g.

Nach einer Akklimatisationszeit von mehren Monaten wurden die Tiere gemäß ihrem Geschlecht und ihrem Körpergewicht in Gruppen zu je acht Ratten zusammengefasst.

Analog zu dem oben beschriebenen Versuch I wurden die weiblichen und männlichen Tiere in diesem Versuch zunächst thymektomiert (TX) oder scheinoperiert (Sham). Zwei Wochen nach der Thymektomie erfolgte die T-Zell-Depletion mit dem anti-TCR-Antikörper (3-mal im Abstand von 3 Tagen mit einer Dosis von 20 mg/kg KGW). Drei Wochen nach der T-Zell-Depletion wurden die Ratten für zwei Monate dreimal wöchentlich (Montag, Mittwoch, Freitag) entweder ausschließlich mit CsA-Vehikel (Triglycerida satura media, Herba Chemos-Apotheker-AG, Wien, Österreich), oder in Vehikel gelöstes CsA (Fa. Novartis, Nürnberg) in einer Dosierung von 5 mg/kg KGW s.c. behandelt.

Alle Ratten erhielten eine multiple Fluorochrom-Markierung. Zum einen erhielten sie direkt vor dem Depletionsbeginn Alizarin complexone (30 mg/kg KGW, Fa. Sigma-

Aldrich, Steinheim) sowie vor CsA bzw. Vehikel-Behandlungsbeginn Demecloxyclin (20 mg/kg KGW, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim). Zum anderen wurden die Tiere zwei Monate post Behandlungsbeginn mit CsA bzw. Vehikel nach einer Fluorochrom-Doppelmarkierung mit Calcein (20 mg/kg KGW, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) getötet. Dabei wurde den Ratten das in Aqua ad injectabilia mit 1,4-prozentigem Zusatz von Natriumbikarbonat gelöste Calcein acht und drei Tage vor der Tötung subkutan injiziert.

Die Analytik für diese Versuche ist identisch mit der oben beschriebenen aus Versuch I, das heißt, es wurde die Knochenmasse histologisch und densitometrisch (pQCT) gemessen, der Knochenturnover auf biochemischer und histologischer Ebene bestimmt und zusätzlich die Csa Konzentration in Vollblutproben mit Radioimmunoassay bestimmt.

Tab. 4 Versuchsplan weibliche Ratten, Versuch II

Gr.	N	OP	T-Zell-Depletion	Behandlung		
		0	0,75	1	2	3 Monate
1	------8------	Sham-TX	Isotyp-Kontrolle	CsA-Vehikel	----------	----F-F-†
2	------8------	TX	Anti-TCR	CsA-Vehikel	----------	----F-F-†
3	------8------	Sham-TX	Isotyp-Kontrolle	5 mg CsA/kg KGW	----------	----F-F-†
4	------8------	TX	Anti-TCR	5 mg CsA/kg KGW	----------	----F-F-†

Gr. = Gruppe; N = Tierzahl; TX = Thymektomie; TCR = T-Zell-Rezeptor; F = Calcein; † = Tötung

Tab. 5 Versuchplan männliche Ratten, Versuch II

Gr.	N	OP	T-Zell-Depletion	Behandlung		
		0	0,75	1	2	3 Monate
1	------8------	Sham-TX	Isotyp-Kontrolle	CsA-Vehikel	----------	----F-F-†
2	------8------	TX	Anti-TCR	CsA-Vehikel	----------	----F-F-†
3	------8------	Sham-TX	Isotyp-Kontrolle	5 mg CsA/kg KGW	----------	----F-F-†
4	------8------	TX	Anti-TCR	5 mg CsA/kg KGW	----------	----F-F-†

Gr. = Gruppe; N = Tierzahl; TX = Thymektomie; TCR = T-Zell-Rezeptor; F = Calcein; † = Tötung

3.4 In-vitro-Versuch

3.4.1 Wirkung von CsA auf die Osteoklasten

Nach Tötung der Tiere wird aus den Femora, Tibien und Humeri das Knochenmark gewonnen.

Zuerst wird das Weichteilgewebe vom Knochen entfernt, danach die proximale Epiphyse mit einem Scherenschlag abgetrennt und mit einer sterilen Kanüle ein Loch hineingestochen. Die distale Epiphyse wird mit einer Tischkreisäge Minimot KS220 (Fa. Proxxon GmbH, Niersbach) abgesägt. Anschließend wird der präparierte Knochen in ein 1,5 ml steriles Reagenzgefäß in der eine sterile Pipettenspitze, deren unterer Teil auf ca. 3 mm gekürzt wurde, steckt, eingebracht. Daraufhin wird das Knochenmark durch kurzes dreimaliges Anzentrifugieren in einer Eppendorfzentrifuge Typ 5415 D (Fa. Eppendorf AG, Hamburg) bei 0,8 x g (g = Erdbeschleunigung) aus den Knochen gewonnen. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgen zur Keimminimierung unter einer sterilen Werkbank Lamina Holten Air HB 2472 (Fa. Heto-Holten A/S, AllerØd, Dänemark).

Aus dem Knochenmark wird eine Einzel-Zell-Suspension hergestellt. Aus dieser werden 7 x 10^6 Zellen pro Well einer 24-Lochplatte (Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz) hergestellt und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag werden verschiedene CsA-Mediumkonzentrationen in die Wells pipettiert, welches alle zwei Tage für acht Tage gewechselt wird.

Tab. 6 Schema der Konzentrationen der CsA-Verdünnungen in der 24-Lochplatte

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
A	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	0,01% EtOH
B	0,1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,01% EtOH
C	0,01 µg/ml	0,01 µg/ml	0,01 µg/ml	0,01 µg/ml	0,01 µg/ml	0,01% EtOH
D	0,001 µg/ml	0,001 µg/ml	0,001 µg/ml	0,001 µg/ml	0,001 µg/ml	0,01% EtOH
	CsA	CsA	CsA	CsA	CsA	

CsA = Cyclosporin A; EtOH = Ethanol

3.4.2 Osteoklasten-Färbung

Die Anfärbung der Osteoklasten geschieht über die TRAP-Färbung (Tartrate Resistant Acid Phosphatase) nach einer modifizierten Methode der konventionellen TRAP-Färbung aus ROMEIS (1989) von SINDREY et al. (2002).
Nach der Entnahme der 24-Lochplatte aus dem Inkubator wird das Nährmedium aus den Wells mit Schwung entfernt. Anschließend werden sie zweimal mit auf 37°C vorgewärmten PBS gewaschen. Die 10-minütige Fixierung der Zellen im Trockenschrank (37°C) geschieht mit 10%-igem Glutardialdehyd, welches ebenfalls auf 37°C erwärmt wurde. Danach erfolgt wiederum eine zweimalige Waschung mit vorgewärmten PBS 1x, um a posteriori 300 µl TRAP-Färbung pro Well hineinzupipettieren. Die Färbung dauert 15 min im Trockenschrank an. Schließlich wird noch einmal mit PBS gespült, um nach einer 45-minütigen Trocknung die Zellen unter einem Invers-Lichtmikroskop Axiovert 40 C (Carl Zeiss AG, Deutschland) auswerten zu können. Diese Analyse wurde an 4 männlichen und 2 weiblichen Fischer-344-Ratten vorgenommen.

Verwendete Lösungen:

Osteoklasten Medium
DMEM high glucose mit 4 mM L-Glutamin
15% FCS
1% Natrium Pyruvat
1% Penicillin/Streptomycin 100x
1% Glycerophosphat
1% Ascorbinsäure

Naphtol AS-MX Phosphate Disodium Salt
10 mg Naphtol AS-MX Phosphate Disodium Salt/ ml DMF

0,3 M Sodium Tartrate
6,9 g Sodium Tartrat pro 100 ml H_20

TRAP-Puffer pH 5,0 (37°C)

5 ml 0,1 M Acetat Puffer

1 ml 0,3 M Sodium Tartrate

0,1 ml Naphtol AS-MX Phosphate Disodium Salt

0,01 ml Triton X-100

3,89 ml Milli-Q H_2O

TRAP-Stain

0,3 mg Fast Red Violet LB/ml vorgewärmten TRAP-Puffer

PBS 20x pH 7,4

160 g NaCL

4 g KCL

28,8 g Na_2HPO_4

4,8 g KH_2PO_4 ad 1 l

0,1 M Acetat Puffer

35,2 ml 0,2 M Natrium-Acetat

14,8 ml 0,2 M Acetic Acid ad 50 ml

3.5 Etablierung des Tiermodells

In den letzten Jahren ist zunehmend erkannt worden, dass es eine sehr enge Verbindung zwischen Immunsystem, Sexualhormonen und Knochenstoffwechsel gibt (KONG et al., 1999; ERBEN et al., 2001). Insbesondere T-Lymphozyten scheinen eine wichtige Rolle bei der Steuerung des Knochenturnovers zu spielen. Was die Erforschung der Rolle von T-Lymphozyten für die Regulation des Knochenstoffwechsels in verschiedenen Stoffwechsel-Situationen entscheidend behindert hat, ist, dass es bisher kein praktikables Tiermodell gab, in dem normale Tiere in einen T-Zell-defizienten Zustand versetzt werden konnten. Ein solches Tiermodell ist im Rahmen dieser Dissertation etabliert worden. Es werden adulte Fischer-344-Ratten thymektomiert und anschließend mit Hilfe eines gegen den T-Zell-Rezeptor gerichteten Antikörpers T-Zell-depletiert.

3.5.1 Vorversuch

Zur Etablierung der Thymektomie wurde ein Vorversuch an 16 toten und 18 lebenden Ratten durchgeführt. Bei den lebenden Ratten wurden vier Lewis Ratten (Durchschnittsgewicht 712,5 g), eine Wistar Ratte (456 g), sowie 13 herkömmliche Futterratten (Durchschnittsgewicht 381 g) verwendet.
Der transsternale Zugang bei der Thymektomie verursacht starke mechanische und algetische Atembehinderungen. Deswegen wird eine Kombination von NSAID (Nichtsteroidalen Antiphlogistika), Opioiden und Metamizol als Schmerztherapie empfohlen (HENKE und ERHARDT, 2001).
Folgendes Narkoseprotokoll wurde angewandt:
Einen Tag prä operationem wird den Tieren Carprofen (Rimadyl®, Fa. Pfizer, 4,0 mg/kg KGW s.c.) injiziert um einen notwendigen Spiegel während der Operation zu garantieren, damit es in Verbindung mit einem Opioid die Freisetzung von Entzündungsmediatoren einschränkt.
Die Anästhesie wird mit Fentanyl (Fentanyl-Janssen®, Fa. Janssen-Cilag Pharma, 0,05 mg/kg KGW i.m.); Midazolam (Dormicum®, Fa. Roche 2,0 mg/kg KGW i.m.) und Medetomidin (Domitor®, Fa. Pfizer, 0,15 mg/kg KGW i.m.) sowie einer weiteren

Carprofen-Gabe durchgeführt. Die Antagonisierung erfolgte mit Atipamezol (Antisedan®, Fa. Pfizer, 0,75 mg/kg KGW s.c.), Flumazenil (Anexate®, Fa. Roche, 0,2 mg/kg KGW s.c.) und Buprenorphin (Temgesic®, Fa. Essex Pharma GmbH, München). Wobei Buprenophin, ein partieller Opiat-Agonist, gleichermaßen als Agonist-Antagonist wirkt, d. h. es antagonisiert Opioide (hier Fentanyl) und ist gleichzeitig ein langwirkendes postoperatives Analgetikum (HENKE und ERHARDT, 2001).
Post operationem erhält das Tier Metamizol (Novalgin®, Fa. Aventis Pharma GmbH, Wien, Österreich, 1 Trpf. per os).
Aufgrund dieses Narkoseprotokolles ist kein einziges von diesen Vorversuchstieren gestorben. Zwei Tiere haben die Thymektomie nicht überlebt, da intra operationem die Vena cava cranialis bei der Thymuspräparation getroffen wurde.
An weiteren vier Tieren wurde die T-Zell-Depletion ausgeführt, wobei drei Tiere eine dauerhafte Depletion zeigten.

3.5.2 Thymektomie

Die Thymektomie ist eine weit verbreitete Methode um immunologische Fragestellungen zu klären. Vor allem ist die Anästhesie und chirurgische Technik bei neonatalen Thymektomien schon seit über 25 Jahren bei Mäusen und Ratten sehr gut standardisiert (FORD, 1978).
Die Thymektomie einer adulten Ratte stellt eine Herausforderung dar, da die adulten Ratten eine hohe Mortalität aufgrund des entstehenden Pneumothorax, post thymusextripationem aufweisen. Ebenso stellen Blutungen ein hohes Risiko dar. Es wurden verschiedene mehr oder weniger stark invasive Methoden beschrieben.
BARBUL et al. (1979) beschreiben eine Methode bei 100 bis 150 g schweren Ratten, indem sie eine Tracheotomie vornehmen, retrograd einen Draht in den Oropharynx schieben, der als Mandrin für einen Venenverweilkatheter dient, der orthograd in die Trachea geschoben wird. Der Venenverweilkatheter wird mittels eines Fadens an der Trachea verknotet. Daran wird ein Blasebalg zur manuellen Beatmung angeschlossen. Danach wird der Thorax eröffnet und der Thymus entnommen. Anschließend wird das obere Abdomen mit den Fingern komprimiert, wodurch die Luft aus dem Thorax weichen soll und gleichzeitig wird der Thorax verschlossen. Der

Venenverweilkatheter wird gezogen und durch die Adaptation der Halsmuskulatur verschlossen.
KOBAYASHI et al. (1993) greifen diese Methode auf, jedoch benutzt diese Arbeitsgruppe Fibrin Kleber, um die Trachea wieder zu schließen und eventuelle Blutungen zu stillen. Sie stellten einige Probleme bei der Methode von BARBUL et al (1979) fest, die sie mit Hilfe des Klebers verbessern konnten, kritisieren aber die Verletzungen, die durch die Intubation mit Hilfe des Drahtes auftreten können. Um dieses Risiko nicht einzugehen, beschreibt DELRIVIÈRE (1998) eine Methode, bei der 250 bis 300 g schwere Ratten nicht intubiert werden, sondern nach der Organentnahme mit einer Spritze über einen abdominalen transdiaphragmentären Zugang beim Xyphoid Luft aspiriert wird, damit der Pneumothorax behoben werden kann. Die Tiere haben bei dieser Methode eine 95% -ige Überlebensrate.

Die in der vorliegenden Dissertation neu etablierte Thymektomie (TX) wird unter einer antagonisierbaren Anästhesie mit Fentanyl (Fentanyl-Janssen®, Fa. Janssen-Cilag Pharma, Wien, Österreich 0,05 mg/kg KGW i.m.); Midazolam (Dormicum®, Fa. Roche Austria GmbH, Wien, Österreich 2,0 mg/kg KGW i.m.) und Medetomidin (Domitor®, Fa. Pfizer, Österreich, 0,15 mg/kg KGW i.m.) durchgeführt. Die Ratten werden anschließend endotracheal mit einer 17G Venenkatheter (Vasodrop®, Fa. Clinico, Bad Hersfeld) intubiert und mit 100% Sauerstoff für die Dauer des Eingriffs mit einem Kleintierrespirator (Hallowell EMC, Fa. Völker GmbH, Kaltenkirchen) beatmet. Die Sauerstoffsättigung des Blutes wird mit Hilfe eines Pulsoximeters (Nonin 9700, Nonin Medical, Plymoouth, USA) während der gesamten Anästhesie kontrolliert. Um eine Auskühlung zu vermeiden, wird der Eingriff auf einer Thermoplatte (Medax Typ 13501, Nagel GmbH, Kiel) bei 37° C durchgeführt.

Die Ratten werden im Halsbereich und cranialen Thoraxbereich rasiert und mit Braunol® (Fa. Braun, Melsungen) und 70% Alkohol desinfiziert. Es folgt eine mediane Hautincision von ca. 2-3 cm Länge. Die Halsmuskulatur bestehend aus M. sternohyoideus wird in der Medianen getrennt, um anschließend die Sternotomie mittels Scherenschlag von ca. 1-1,5 cm vorzunehmen. Als nächstes werden die Thymuspedikel der zwei Thymuslobi mit einer feinen Pinzette gegriffen. Die Thymusextirpation erfolgt mit Hilfe von Wattetupfern und einem batterie- betriebenen

Kauter (Effner®, Fa. Faromed GmbH, Berlin). Nach der Thymusentfernung wird die Lunge mit einem Druck von 20 cm H_2O überbläht, um den Pneumothorax zu beheben und postoperative Atelektasen zu vermeiden. Zeitgleich wird der Thorax mit 2-3 vorgelegten Einzelknopfheften verschlossen. Muskeln und Haut werden in drei Schichten geschlossen. Direkt nach der Operation wird die Narkose mit Atipamezol (Antisedan®, Fa. Pfizer, Österreich, 0,75 mg/kg KGW s.c.), Flumazenil (Anexate®, Fa. Roche Austria GmbH, Wien, Österreich, 0,2 mg/kg KGW s.c.) und abweichend vom Vorversuch mit Naloxon (Narcanti®, Fa. Bristol-Myers Squibb, Anagni, Italien, 0,12 mg/kg KGW s.c.) antagonisiert. Es hat sich gezeigt, dass Fischer-344-Ratten stark Opioid-empfindlich sind, d.h. dass sie eine höchstgradige Atemdepression erleiden und daran zugrunde gehen. Deswegen wird bei Fischer-344-Ratten auf Buprenorphin verzichtet und stattdessen das Fentanyl zusätzlich mit Naloxon antagonisiert. Die analgetische Therapie wird mit Carprofen (Rimadyl®, Fa. Pfizer, 4,0 mg/kg KGW s.c.) und Metamizol (Novalgin®, Fa. Aventis Pharma GmbH, Wien, Österreich, 1 Trpf. per os) durchgeführt. Alle Tiere erhalten perioperativ und für drei Tage post operationem (p.op.) eine Antibiotikum-Prophylaxe mit Enrofloxacin (Baytril 2,5%®, Fa. Bayer, Leverkusen, 5 mg/kg KGW s.c.).

Die T-Zell-Depletion wird zwei Wochen nach der Thymektomie durchgeführt. Im Abstand von drei Tagen erhalten die Tiere dreimalig eine intraperitoneale Injektion eines Natrium-azidfreien rattenspezifischen monoklonalen IgG_1-Antikörpers gegen den Ratten-T Cell Receptor (TCR) in einer Dosis von 20 mg/kg.

Die Depletionskontrolle erfolgt durch die FACS-Analyse (siehe Kap. 3.6).

3.5.3 Herstellung des monoklonalen rattenspezifischen TCR gerichteten IgG1-Antikörpers

Die Celline 1000 (Fa. Integra Biosciences AG, Chur, Schweiz) dient zur Herstellung des monoklonalen rattenspezifischen TCR gerichteten IgG_1-Antikörpers (R73). Der dafür verwendete anti-TCR-Antikörper-produzierende Zellkon R73 wurde von Herrn Prof. Dr. Hünig, Universität Würzburg, überlassen. Die Celline 1000 ersetzt vollständig die Gewinnung der monoklonalen Antikörper aus Aszites von Mäusen und ist somit ein tierschutzkonformes Verfahren zur Antikörperproduktion.
Es ist ein Zwei-Kompartment-System mit einer 10 kDa semipermeablen Cellulose-Acetat Membran. Diese semipermeable Membran trennt das Mediumkompartment mit einem 1000 ml Fassungsvermögen von dem 15 ml Zellkompartment, in welches die anti TCR Antikörper (R73) produzierende Hybridoma-Zelllinie inokuliert wird. Eine hohe Zelldichte und somit eine hohe Konzentration an R73 Antikörpern wird nur durch eine optimale Sauerstoff- und Nährmediumversorgung sowie eine effiziente Entfernung der wachstumsinhibierenden metabolischen Abfallprodukte erreicht. Diese Bedingungen erfüllt die Membran, da sie eine Diffusion für kleinere Moleküle von einem zum anderen Kompartment erlaubt, wohingegen sie die großen Moleküle mit höherem Molekulargewicht, welche die proliferierenden Zellen sezernieren, im Zellkompartment hält. Dadurch entsteht ein kontinuierlicher Nährmediumfluss in das Zellkompartment und eine gleichzeitige Entfernung von verschiedenen inhibierenden Abfallprodukten aus dem Zellkompartment. Zusätzlich ist am Boden des Zellkompartments eine Silikonmembran, die eine optimale Sauerstoffzufuhr und einen CO_2-Austausch sicherstellt.
Es werden $25x10^6$ viable Zellen aus der Präkultur-log-Wachstumsphase mit 15 ml Medium inokuliert. Da es sich um eine hohe Zelldichte handelt, wird als Medium DMEM high glucose mit 4 mM L-Glutamin (Fa. PAA Laboratories GmbH, Pasching; Austria) verwendet. Zusätzlich enthält das Medium für das Zellkompartment 15% fetales Kälberserum (Fa. PAA Laboratories GmbH, Pasching; Austria) (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin 100x (Pen/Strep) (Fa. PAA Laboratories GmbH, Pasching; Austria) und 1% Natrium Pyruvat (Na/Py) (Fa. PAA Laboratories GmbH, Pasching; Austria). Im Gegensatz dazu, enthält das Mediumkompartment nur 1% FCS, 1% Pen/Strep und 1% Na/Py.

Nach einer einwöchigen Wachstumsphase bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchte im Inkubator wird das komplette Zellkompartment geerntet und bei 320xg zentrifugiert. Der Überstand wird zur Antikörperaufbereitung verwendet. Die Zellen werden gesplittet und in einer Dichte von mindestens $2x10^6$ Zellen mit frischem Medium reinokuliert. Ab diesem Zeitpunkt wird alle 3-4 Tage geerntet und jeweils das Nährmedium komplett ausgetauscht.
Durch diese Zwei-Kompartment-Bioreaktor-Technologie lassen sich 1-3 mg Antikörper pro ml gewinnen.

3.5.3.1 Antikörperaufreinigung mit Hilfe einer C10 Chromatographiesäule

Die Gewinnung des R73-Antikörpers erfolgt aus dem gewonnenen Zellkulturüberstand mit Hilfe der Standardchromatographie. Dazu wird eine C10 10/20 Chromatographiesäule (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) benutzt, welche mit 14 ml Protein G-Sepharose 4Fast Flow (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) gepackt wird. Protein G bindet die Fc Region von IgG.
Die Säule wird folgendermaßen vorbereitet. Die Protein G-Sepharose wird in 20% Ethanol bei 4° C aufbewahrt. Zur Säulenbefüllung wird sie auf Raumtemperatur äquilibriert und anschließend mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast. Um Luft aus dem Säulentotraum zu entfernen, wird die Säule mit ca. 1 ml Bindungspuffer befüllt. Erst wenn sichergestellt ist, dass keine Luft mehr vorhanden ist, wird die entgaste Protein G-Sepharose in einer fließenden Bewegung an einem Glasstab, der an der inneren Säulenwand anliegt, in die Säule gelassen. Nun wird die Säule mit der Pumpe (Pump-1 Pharmacia Biotech, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) verbunden. Damit die Säule richtig gepackt und der Ethanol gleichzeitig ausgewaschen wird, verwendet man Bindungspuffer. Bis zum Setzen des Gels beträgt die Fließgeschwindigkeit 1 ml/min. Um die Säule endgültig zu packen, wird eine Fließgeschwindigkeit von 400 ml/h empfohlen, wobei ein Druck von 1 Bar nicht überschritten werden sollte.
Bevor der Zellkulturüberstand aufgereinigt werden kann, wird er zuerst durch ein 45 µm Spritzenfilter (Fa. Peske, Aindling) filtriert. Der nächste Schritt besteht darin, den Bindungspuffer gegen Zellkulturüberstand auszutauschen, damit sich der Antikörper an das Gel binden kann. Nachdem der Zellkulturüberstand gänzlich durch die Säule

gepumpt wurde, wird noch einmal mit Bindungspuffer solange gewaschen, bis keine Fremdproteine mehr in der Säule enthalten sind. Dieser Vorgang wird mittels photometrischer Messung, bei der die Proteinkonzentration den Wert 0 ergeben muss, überprüft.

Nach dieser Prozedur kann eluiert werden. Um das IgG von der Protein G-Sepharose zu eluieren, ist es notwendig, den pH auf 3,0 in der Probe zu erniedrigen. Die allgemein empfohlene Methode ist 0,1 M Glycin Puffer, pH 3,0. Da die IgG säurelabil sind, ist es notwendig, jede Eluatfraktion mit 100 µl Tris-HCl, pH 9,0 zu versetzten. Somit werden die säurelabile IgGs neutralisiert.

Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Eluatfraktionen werden durch photometrische Messung (DU®530 Life Science UV/VIS Spectrophotometer, Beckmann) ermittelt. Die Proben mit den höchsten Konzentrationen werden in die Dialyse gegeben, wobei 5 ml Probe in ein Dialyseschlauch Visking Typ 27/32 (Fa. Roth, Karlsruhe) pipettiert werden. Die in dem Dialyseschlauch enthaltene 5 ml Probe wird in 5 l Dialysepuffer für 24 h bei 4° C aufbewahrt. Nach der Dialyse wird erneut die Antikörperkonzentration bestimmt. Anschließend wird die Probe in 1 ml Proben aliquotiert und bei -20 bis -80° C bis zum Gebrauch gelagert.

Verwendete Puffer:

Bindungspuffer

20 mM Natrium-Phophat

2,17 g $Na_2HPO4x2H_2O$

1,08 g NaH_2xH_2O

Ad 1 l, pH 7,0

Elutionspuffer

100 mM Glycin

11,1 g Glycin-HCl

Ad 1 l, pH 3,0

Tris-HCl

1 M Tris-HCl

Ad 1 l, pH 9,0

Dialysepuffer 20x, wird auf 1x verdünnt

160 g NaCl

4 g KCl

28,8 g Na_2HPO_4

4,8 g KH_2PO_4

Ad 1 l, pH 7,4

3.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse (Fluorescence-Activated Cell Sorting-Analyse) dient der Ermittlung von T-Zell-Depletion. Dieses Messsystem besteht aus drei kombinierten Komponenten. Einem Flüssigkeitssystem, das für den Transport und die Fokussierung der Zellen im Messpunkt verantwortlich ist, einem Optikteil, in welchem die Partikel angeregt und detektiert werden, sowie der Elektronik, die die optischen Signale in elektronische umwandelt und für die Computeranalyse digitalisiert.

Bei dem Verfahren werden suspendierte Einzelzellen durch einen Laser geführt. Die Zellen senden in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Probenvorbereitung charakteristische Lichtsignale aus, die mittels geeigneter Detektoren nachgewiesen werden. Die Durchflusszytometrie quantifiziert simultan mehrere optische Parameter, wie die relative Zellgröße, ihre relative Granularität oder ihre interne Komplexität und ihre spezifische Fluoreszenz mit ihrer entsprechenden relativen Fluoreszenzintensität bei Zellen mit einer hohen Durchsatzrate.

Die Durchflusszytometrie funktioniert über eine Trägerflüssigkeit, die eine laminare Strömung erzeugt, den so genannten Hüllstrom. Durch eine konisch geformte Meßküvette erfolgt eine Querschnittsverringerung, in der sowohl der laminare Probenstrom, als auch der Hüllstrom beschleunigt und dadurch verjüngt werden. Es entsteht eine hydrodynamische Fokussierung, durch die die Zellen präzise durch den Laserfokus geführt werden. Der Abstand zwischen direkt aufeinander folgenden Zellen wird vergrößert, so dass die Zellen jeweils einzeln den Laserstrahl passieren und damit als einzelne Zelle erfasst werden können. Die relative Größe wird im Vorwärtsstreulicht – FSC als Lichtbeugung gemessen. Das Vorwärtsstreulicht ist proportional zur Zelloberfläche und wird entlang der einfallenden Lichtachse gemessen. Die relative Granularität wird im Seitwärtsstreulicht – SSC als Lichtbrechung und Reflexion gemessen. Sie ist proportional zur Zellkomplexität oder Zellgranularität und wird im 90° Winkel zum einfallenden Licht bestimmt. Die spezifische Fluoreszenz (FL1) und die entsprechende relative Fluoreszenzintensität werden ebenfalls im 90° Winkel zum einfallenden Licht bei einer zum Fluorochrom passenden Wellenlänge gemessen. Das Fluorochrom absorbiert die Energie des Laserlichtes und gibt die absorbierte Energie wieder frei. Es entstehen

Schwingungsenergie und Wärme, gefolgt von der Emission eines Photons mit einer größeren Wellenlänge. Die Wellenlängendifferenz zwischen Absorption und Emission wird als Stoke´s-Shift bezeichnet. Die relative Fluoreszenzintensität wird über das emittierte Fluoreszenzlicht ermittelt, welches proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle ist.
Zur Anregung im Optikteil dient ein luftgekühlter Argon-Laser (488 nm) mit Prismen zum Formen und Fokussieren des Laserstrahls. Durch diese Anregung werden die Zellen ausgeleuchtet. Die Detektionsoptik besteht aus einer Sammellinse, die das emittierte Licht im 90° Winkel sammelt. Es handelt sich um ein System aus optischen Teiler-Spiegeln und Filtern, welches die spezifischen Wellenlängen der emittierten Lichtsignale zu den entsprechenden optischen Detektoren lenkt.
Die Elektronik wandelt die optischen Signale (Photonen) in elektronische Signale (Spannungsimpulse) um und analysiert zugleich die Höhe, Fläche oder Weite des Spannungspulses. Die gewonnenen Mess-Signale werden für eine computergestützte Analyse digitalisiert.

Die Durchflusszytometrie wurde zur T-Zell-Depletionskontrolle und zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit des selbst hergestellten monoklonalen rattenspezifischen TCR gerichteten IgG1-Antikörpers R73 verwendet.
Für die T-Zell-Depletionsanalyse werden pro Probe 50 µl Vollblut benötigt. Dieses Blut wird an der Vena coccygica sinistra oder dextra, die zuvor mittels 40° C warmem Wasser und 70% Alkohol hyperämisiert wurde, mit einer einer 23 G x 1 ¼ "; 0,6 x 30 mm entnommen und in ein EDTA Probengefäß (S-Monovette 2,7 ml, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) überführt.
Für die T-Zell-Depletionskontrolle werden pro untersuchten Tier zwei Proben angefertigt. Die erste gibt Aufschluss über die T-Lymphozyten-Anzahl (1 µl pro Ansatz, R73, Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-Conjugated Mouse anti Rat αβ T-Cell Receptor Monoclonal Antibody, BD Pharmingen), die zweite bildet die entsprechende Isotyp-Kontrolle (1 µl pro Ansatz, MOPC-31C, Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-Conjugated IgG_1, κ Monoclonal Immunoglobulin Isotype Control, BD Pharmingen). Nach der Zugabe der Antikörper werden die Proben für 30 min auf Eis im Dunklen inkubiert. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, werden die Ansätze nach der Inkubation zweimal gewaschen (je 1 ml PBS mit 2% FCS und

0,02% Natriumacid; 350xg, 3 min). Anschließend werden die Erythrozyten unter Verwendung von FACS Lysing Solution (Becton Dickinson, Heidelberg) lysiert. Dazu werden die Ansätze nach dem Waschen gründlich gevortext. Danach werden alle Proben mit 1 ml der FACS Lysing Solution versetzt, noch einmal sehr gründlich gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Ansätze einmal zentrifugiert (350xg, 3 min). Der durch die Erythrozyten-Hämolyse rotgefärbte Überstand wird abgeschüttet und es erfolgt eine weitere, wie oben beschriebene zweimalige Waschung. Der letzte Schritt vor der Messung an einem FACScan Durchflusszytometer unter Zuhilfenahme von CellQuest Pro Software (Becton Dickinson, Heidelberg) ist die Fixierung der Zellen in 200 µl PFA-Lösung (1% in PBS) je Ansatz.

Für die Überprüfung der Funktionstüchtigkeit des selbst hergestellten monoklonalen rattenspezifischen TCR gerichteten IgG1-Antikörpers R73 wird eine Verdünnungsreihe mit 1:50; 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600 in PBS hergestellt. Hierfür besteht jeder Ansatz aus 50 µl Blut und aus jeweils 1 µl verdünnten Antikörper aus der Verdünnungsreihe. Dem schließt sich die gleiche Prozedur, wie oben bei der Untersuchung zur T-Zell-Depletionskontrolle beschrieben an.

3.7 Ovariektomie der weiblichen Ratte

Die Ovariektomie wird unter einer dreifach Anästhesie Fentanyl (Fentanyl-Janssen®, Fa. Janssen-Cilag Pharma, Wien, Österreich 0,05 mg/kg KGW i.m.); Midazolam (Dormicum®, Fa. Roche Austria GmbH, Wien, Österreich 2,0 mg/kg KGW i.m.) und Medetomidin (Domitor®, Fa. Pfizer, Österreich, 0,15 mg/kg KGW i.m.), zur Antagonisierung: Atipamezol (Antisedan®, Fa. Pfizer, Österreich, 0,75 mg/kg KGW s.c.), Flumazenil (Anexate®, Fa. Roche Austria GmbH, Wien, Österreich, 0,2 mg/kg KGW s.c.) und Naloxon (Narcanti®, Fa. Bristol-Myers Squibb, Anagni, Italien) wie folgt durchgeführt:

Nach Abscheren der Lumbalregion und sorgfältiger Hautdesinfektion mit Braunol® (Fa. Braun, Melsungen) und 70% Alkohol wird die Ratte in Bauchlage auf eine Thermoplatte (Medax Typ 13501, Nagel GmbH, Kiel) gelegt.

Es erfolgt ein ca. 1,5 cm langer Hautschnitt in der Medianen über dem Lendenwirbelbereich. Danach wird stumpf im subkutanen Gewebe beidseits nach latero-distal präpariert, die Bauchmuskulatur, bestehend aus den Mm. obliquii abdominis externus et internus, M. transversus abdominis, beidseits paramedian ebenfalls stumpf auf ca. 1 cm Länge getrennt und das Peritonaeum auf gleicher Länge eröffnet. Danach wird das jeweilige Ovar und Uterushorn mit einem Kastrierhaken vorverlagert. Beidseits neben dem Ovar wird jeweils eine Arterienklemme angelegt. Danach wird das Ovar mit einem Scherenschlag abgesetzt. Etwaige Sickerblutungen werden mit einem batteriebetriebenen Kauter (Effner®, Fa. Faromed GmbH, Berlin) unterbunden. Nach Zurückverlagerung der Uterushörner wird die Hautincision mit zwei Hautklammern (Wundklammern nach Michel, Fa. Heiland; Stuttgart) verschlossen und mit einem antiseptischen Wundspray (Aluminiumspray®, Fa. Albrecht Aulendorf) abgedeckt, während für die Muskelwunden kein gesonderter Verschluss nötig ist, da sich diese durch Verklebung mit dem Unterhautfettgewebe von selbst schließen.

Die Dauer dieser Operation beträgt 5-10 min pro Ratte.

Alle Tiere erhalten eine perioperative Antibiotikum-Prophylaxe mit Enrofloxacin (Baytril 2,5%®, Fa. Bayer, Leverkusen, 5 mg/kg KGW s.c.). Postoperativ erhalten alle Tiere einmalig Carprofen (Rimadyl®, Fa. Pfizer, 4,0 mg/kg KGW s.c.) und Metamizol (Novalgin®, Fa. Aventis Pharma GmbH, Wien, 1 Trpf. per os).

Die Hautklammern werden 10 Tage post operationem entfernt.

Mit den Kontrolltieren der Sham-Gruppen (scheinoperierte Tiere) wird analog verfahren. Nur das Absetzten der Ovarien unterbleibt. Auf diese Weise werden für die SHAM und OVX-Tiere gleiche Ausgangsbedingungen zu Versuchsbeginn geschaffen. Eine durch Narkose und Wundschmerz hervorgerufene Stresssituation kann unter anderem zu vorübergehender Nahrungskarenz und somit zu Gewichtsverlust führen. Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass infolge Immunsuppression durch die Allgemeinnarkose sowie post operativer Immunstimulation durch die Wundheilung Einfluss auf das Knochengewebe ausgeübt wird, da Immunsystem und Knochengewebe in engem Bezug zueinander stehen (BARON et al., 1984).

3.8 Orchiektomie der männlichen Ratte

Die Orchiektomie wird ebenfalls unter einer antagonisierbaren Anästhesie mit Fentanyl (Fentanyl-Janssen®, Fa. Janssen-Cilag Pharma, Wien, Österreich 0,05 mg/kg KGW i.m.); Midazolam (Dormicum®, Fa. Roche Austria GmbH, Wien, Österreich 2,0 mg/kg KGW i.m.) und Medetomidin (Domitor®, Fa. Pfizer, Österreich, 0,15 mg/kg KGW i.m.), zur Antagonisierung: Atipamezol (Antisedan®, Fa. Pfizer, Österreich, 0,75 mg/kg KGW s.c.), Flumazenil (Anexate®, Fa. Roche Austria GmbH, Wien, Österreich, 0,2 mg/kg KGW s.c.) und Naloxon (Narcanti®, Fa. Bristol-Myers Squibb, Anagni, Italien) wie folgt durchgeführt:
Die Ratte wird in Rückenlage auf eine Thermoplatte (Medax Typ 13501, Nagel GmbH, Kiel) gelegt. Nach Abscheren der Skrotalbehaarung erfolgt eine sorgfältige Hautdesinfektion mit Braunol® (Firma Braun, Melsungen) und 70% Alkohol.
Die nebeneinander liegenden Hoden werden so fixiert, dass am kausalen Ende des Skrotums in der Medianen die Skrotalhaut und Processus vaginalis mit einem ca. 1 cm langen Schnitt gespalten werden können, sodass die Hoden hervorschnellen. Nach Durchtrennen des Ligamentum caudae epididymidis mit der Schere wird die eröffnete Wandung des Processus vaginalis proximalwärts geschoben. Es wird eine Arterienklemme auf den Samenstrang angelegt. Proximal der Arterienklemme wird eine zweifache Samenstrangligatur mit einem 4-0 resorbierbaren Nahtmaterial (Vicryl

4-0, RB-1 plus, 70 cm, Fa. Johnson&Johnson, Wien, Österreich) gesetzt. Nach dem Absetzten der Hoden caudal der Arterienklemmen, wird die Skrotalhaut etwas angehoben, damit sich die Samenstrangstümpfe in die Tiefe zurückziehen können.
Der Wundverschluss erfolgt schichtweise durch eine fortlaufende Naht des Processus vaginalis und zwei einzelnen Knopfheften bei der Skrotalhaut mit einem ebenfalls 4-0 resorbierbaren Nahtmaterial. Eine Wundabdeckung erfolgt mit einem antiseptischen Wundspray (Aluminiumspray®, Fa. Albrecht Aulendorf).
Die Dauer der Operation beträgt ca. 10 min pro Ratte. Die Scheinoperation wird analog durchgeführt, jedoch werden die Hoden weder ligiert noch abgesetzt.
Alle Tiere erhalten eine perioperative Antibiotikum-Prophylaxe mit Enrofloxacin (Baytril 2,5%®, Fa. Bayer, Leverkusen, 5 mg/kg KGW s.c.). Postoperativ erhalten alle Tiere einmalig Carprofen (Rimadyl®, Fa. Pfizer, 4,0 mg/kg KGW s.c.) und Metamizol (Novalgin®, Fa. Aventis Pharma GmbH, Wien, 1 Trpf. per os).

3.9 Knochenmineraldichte-Messung mittels peripherer quantitativer Computertomographie

Die periphere quantitative Computertomographie (pQCT) ist eine nicht invasive, röntgendiagnostische Methode, die aufgrund ihrer Empfindlichkeit geeignet ist, auch bei kleinen Tieren wie Ratten und Mäusen Veränderungen der Knochenmineraldichte und der geometrischen Eigenschaften reproduzierbar zu analysieren und dreidimensional darzustellen (GASSER, 1995; LIND et al. 2001a).

Das verwendete vollautomatische Messgerät zur Bestimmung der Knochendichte ist ein XCT Research (Fa. Stratec Medizintechnik, Pforzheim), mit einer speziell entwickelten Röntgenröhre und extra kleinem Fokus (Handbuch XCT2000, Stratec Medizintechnik Pforzheim).

Die aus der Röntgenröhre emittierten Photonen werden nach Transmission von zwölf gegenüberliegenden Detektoreinheiten registriert. Durch die Absorption von Röntgenstrahlen durch ein Objekt entsteht ein Absorptionsprofil. Durch mathematische Faltung von möglichst vielen Absorptionsprofilen aus verschiedenen Winkelstellungen lassen sich Querschnittsbilder berechnen, die dem ursprünglichen Objekt weitgehend entsprechen. Bei diesem Verfahren ist jedem Bildpunkt ein entsprechender Schwächungskoeffizient zugeordnet, der in 1/cm angegeben wird. Durch Kalibrierung mit Phantomen bekannter Hydroxyapatit-Mengen lassen sich die Schwächungskoeffizienten in Dichtewerte (mg/cm^3) umrechnen. Durch diese Kalibrierung wird nur der Mineralanteil des Knochens berücksichtigt.

Die pQCT Messung der zuvor zum Entwässern 3-4 Tage in 70%-igem Ethanol gelagerten Knochen erfolgt in zwei Schritten. Als erstes wird ein Übersichtsscan (Scout-View) erstellt, indem der Knochen planar in 1 mm-Abständen der Länge nach mäanderförmig abgetastet wird. Dabei wird der Messstrahl quer durch den Knochen geführt. Dadurch entsteht ein farblich codiertes digitales Rasterbild, ähnlich einem Röntgenbild, mit hellen knochendichten Bereichen und dunklen Weichteilbereichen. Auf diesem Bild lassen sich die gewünschten Messorte für die eigentliche Messung (CT-Scan) bestimmen.

Bei allen Versuchen werden die linke Tibia und der 4. Lendenwirbel (L4) mittels pQCT analysiert. Dazu werden die Knochen in mit 70%-igen Ethanol vorbereiteten Kunststoff-Reagenzgefäßen mit Hilfe einer kleinen Feder mittig positioniert und im

Röntgenröhrenfocus fixiert. Die Messorte für den CT-Scan sind bei der Tibia zum einen 2 mm distal der proximalen Epiphysenfuge, 2 mm proximal der Verwachsung der Fibula mit dem Tibiaschaft, sowie 2 mm proximal der distalen Tibiaoberfläche. Am L4 werden am SV-Scan Bild die Längsmitte am Wirbelkörper bestimmt und dort, sowie jeweils 2 mm cranial und caudal der Mitte die Markierungen für den CT-Scan gelegt.
Nach abgeschlossenen CT-Scan erfolgt die Festlegung der für die Berechnung relevanten Knochenareale, den „Region Of Interest“ (ROI).
Am Tibiaschaft werden Fibulaanteile und beim L4 werden bis auf den Wirbelkörper alle Anteile von der Auswertung ausgeschlossen.
Nach der Definierung der ROI überprüft das Programm alle Bildpunkte innerhalb der ROI auf ihre Dichte und entfernt alle Bildpunkte, die eine geringere Dichte als der Schwellenwert haben. Diese können als Weichteilgewebe betrachtet werden. Als Schwellenwert für die Detektion von kortikalem Knochen wurde 710 mg/cm^3 verwendet. Die Schichtdicke aller Messungen ist 0,2 mm und die Voxelgröße 100 µm. Kortikalis und Spongiosa werden ebenfalls entsprechend ihrer Dichte unterschieden.

Folgende Parameter der pQCT-Analyse werden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Gesamte Knochenmineraldichte	Total Bone Mineral Density [mg/cm^3]
Kortikale und Subkortikale Knochenmineraldichte	Cortical and Subcortical Bone Mineral Density [mg/cm^3]
Spongiosadichte	Trabecular Bone Mineral Density [mg/cm^3]
Gesamtquerschnittsfläche	Total Area [mm2]
Querschnittsfläche der Kortikalis und Subkortikalis	Cortical and Subcortical Area [mm2]
Querschnittsfläche der Spongiosa	Trabecular area [mm2]
Periostaler Umfang	Periostal Perimeter [mm]
Endokortikaler Umfang	Endokortikal Perimeter [mm]
Kortikalisdicke	Cortical Thickness [mm]

3.10 Histologische Aufarbeitung des Knochengewebes

3.10.1 Präparation, Fixierung und Entwässerung des Knochens

Nach der Tötung der Ratten durch Blutentzug werden für die Histologie die linke Tibia und der erste Lendenwirbel herauspräpariert und anhaftende Gewebsreste vom Knochen entfernt. Dabei wird, nach schonender Abtrennung der Fibula, der proximale Anteil der Tibia durch einen Querschnitt im Tibiaschaftbereich mit einer Tischkreisäge Minimot KS220 (Fa. Proxxon GmbH, Niersbach) auf eine Länge von 10 mm gekürzt. Der Lendenwirbel wird in toto belassen. Anschließend werden die Knochen in gekennzeichnete Histologiekörbchen Histosette II (Fa. Simport, Bernard-Pilon, Canada) für 48 Stunden bei 4°C in 40%-igem Ethanol fixiert. Um eine optimale Fixation zu erreichen, wird – wie für alle nachfolgenden Schritte auch – ein Magnetrührer verwendet. Die Entwässerung der Knochen erfolgt über eine aufsteigende Alkoholreiche (SCHENK et al., 1984):

70% Ethanol	4 Tage
95% Ethanol	4 Tage
100% Isopropanol	2 Tage
100% Isopropanol	2 Tage
Xylol	4 Tage
Xylol	4 Tage

3.10.2 Infiltration und Einbettung

Die Knochen werden in drei Schritten nach der Methode von BARON et al. (1983), modifiziert nach Erben et al. (1990), in drei Schritten mit Methylmethacrylat (MMA) infiltriert. Für die Herstellung der entsprechenden MMA-Lösungen wird folgendes Schema verwendet:

MMA-Lösung 1:	80 ml Methylmethacrylat
	20 ml Dibuthylphtalat

MMA-Lösung 2: 80 ml Methylmethacrylat
20 ml Dibuthylphtalat
1 g Benzoylperoxid

MMA-Lösung 3: 80 ml Methylmethacrylat
20 ml Dibuthylphtalat
3 g Benzoylperoxid

Dabei werden die Knochen jeweils vier Tage in der jeweiligen MMA-Lösung belassen.
Die Knochen werden in Rollrandgläser (Fa. VWR, Darmstadt) eingebettet, in denen zuvor ein MMA-Boden angefertigt wurde. Für die Böden wird ca. 5 ml frisch angesetzte MMA-Lösung 3 in jedes Glas gegeben und bei ca. 40°C im Wasserbad polymerisiert. Nach abgeschlossener Polymerisation kühlen die Gläser langsam im Wasserbad ab, um ein Zerspringen der Gläser zu vermeiden.
Die infiltrierten Knochen werden für die Polymerisation in den Rollrandgläsern auf die MMA-Böden platziert und mit frisch angesetzter MMA-Lösung 3 aufgefüllt und verschlossen. Daraufhin werden sie über Nacht bei 26°C im Wasserbad belassen. An den darauf folgenden drei Tagen wird das Wasserbad von 28°C bis auf 31°C erhöht (dabei wird die Temperatur schrittweise um 1°C pro Tag erhöht).

3.10.3 Herstellung von Knochenschnitten

Nach der vollständigen Polymerisation der Knochen werden die Kunststoffblöcke aus den Glasgefäßen befreit. Dazu werden sie für wenige Minuten unterkühlt (z. B. im Gefrierfach eines Kühlschrankes) und anschließend mit einem leichten Hammerschlag zertrümmert.
Zur Schonung der Mikrotommesser werden die zylinderförmigen Kunststoffblöcke getrimmt. Das heißt, dass sie mit Hilfe einer Metallsäge, deren Sägeblatt mit Wasser befeuchtet wird, und einer Feile zu einer Tropfenform ausgearbeitet werden, wobei ein ca. 5 mm breiter Kunststoffrand belassen wird.

Sämtliche Schnitte werden mit einem Schlittenmikrotom SM 2500 S (Fa. Leica, Bensheim) und Hartmetallmesser (Wolframcarbid-Schneide) hergestellt. Der Freiwinkel beträgt stets 5°. Die Kunststoffblöcke werden zunächst mit einem Hartmetallmesser (Facettenwinkel von 50°; Fa. Leica, Bensheim) und einer Schnittdicke von 35 µm trocken geschnitten. Etwa 100 µm vor Erreichung der eigentlichen Schnittebene wird das Anschnittmmesser durch ein 40°-Hartmetallmesser VHM 16 cm (Fa. Leica, Bensheim) ersetzt, mit dem dann Semidünnschnitte von 5 µm Dicke hergestellt werden.

Die Schnittebene ist bei der Tibia als Sagittalebene definiert, die durch die Eminentia intercondylaris, durch die Tuberositas tibiae und durch die Stelle des weitesten Lumens der Tibiadiaphyse verläuft. Beim Lendenwirbel ist die Schnittebene in der Medianebene festgelegt.

Bei der Anfertigung der Knochenschnitte wird folgendermaßen vorgegangen (BARON et al., 1983; SCHENK et al., 1984; MALLUCHE und FAUGERE, 1986): Kunststoffblock und Mikrotommesser werden mit Schneideflüssigkeit bedeckt, so dass auf beiden ein geschlossener Flüssigkeitsfilm vorhanden ist. So können die Schnitte auf das Messer gleiten. Die Schneidegeschwindigkeit wird mit 2 mm/s niedrig gewählt. Pro Tier werden 16 Schnitte angefertigt, wobei nach acht Schnitten 100 µm vom Block weggeschnitten wird, bevor die letzten acht Schnitte genommen werden. Die Schnitte werden mit Hilfe einer Stachelschweinborste während des Schneidens vorsichtig auf das Mikrotommesser geleitet, ohne dass Zug auf die Schnitte ausgeübt wird. Als nächstes werden die Schnitte mit Hilfe der Schneideflüssigkeit 0,1% Tween (Tween®20, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) und der Borste auf Gelatine-Chromalaun-beschichtete Objektträger platziert, die restliche Schneideflüssigkeit abgekippt und mit 96%-igem Ethanol beschichtet. Der 96%-ige Alkohol bewirkt eine Glättung des Schnittes, die durch Zuhilfenahme eines feinen Pinsels noch unterstützt wird. Danach werden die Schnitte mit einer Polyethylenfolie (Fa. Heraeus Kulzer GmbH, Hanau) bedeckt und mit einem Hartgummiroller auf den Objektträger gedrückt. Anschließend werden sie in einer Objektträgerpresse bei 42°C im Wärmeschrank für zwei Tage getrocknet.

3.10.3.1 Beschichtung der Objektträger mit Gelatine

Die Objektträger werden wie folgt mit Gelatine beschichtet (BARON et al., 1983; modifiziert nach ERBEN et al., 1990):
Die Objektträger werden in einer zuvor hergestellten Chromalaun-Gelatine-Lösung bei ca. 50°C zwei Minuten beschichtet und danach bei 40°C für ca. eine Stunde getrocknet. Dazu werden folgende Lösungen benötigt:

Gelatine-Lösung:
10 g gepulverte Gelatine ad 1000 ml Aqua dest.
1 Thymolkristall (zur antimikrobiellen Wirkung)
Dieses wird langsam bis ca. 120°C auf einem Magnetrührer erhitzt, bis sich die Gelatine vollständig gelöst hat.

Chromalaun-Lösung
4 g Chromalaun ad 100 ml Aqua dest.

Chromalaun-Gelatine-Lösung

1000 ml Gelatine-Lösung
40 ml Chromalaun-Lösung
Mittels Magnetrührer werden diese Komponenten durchmischt und im Wasserbad auf ca. 50°C erwärmen. Bei 4°C ist diese Lösung zur Wiederverwendung eine Woche lang haltbar.

3.10.4 Färbung der Knochenschnitte

Die Schnitte werden nach Qualität, hinsichtlich der Schnittebene und dem Auftreten von Artefakten, sortiert.
Die besten Schnitte werden für die „von Kossa-Färbung“ (SCHENK et al., 1984), welche kalzifizierten Knochen intensiv schwarz darstellt, und somit für die vollautomatische Bildanalyse verwendet.

Zuvor müssen die Schnitte, nach dem Abziehen der Polyäthylenfolie, durch dreimaliges 20-minütiges Inkubieren in Methoxyethylacetat entplastet und danach durch jeweils 5-minütiges Verbringen nacheinander in 70%-igen Ethanol, 40%-igen Ethanol und Aqua dest. für die anschließend angewandten hydrophilen Färbelösungen vorbereitet werden (Methode nach BARON et al., 1983; modifiziert nach ERBEN et al., 1990).
Im Anschluss durchlaufen die Schnitte folgende Färbeschritte:

5% Silbernitrat (im Dunkeln)	10 min
Abspülen in Aqua dest.	3 mal
Natriumcarbonat/Formaldehydlsg.	2 min
(150 ml 6,7%-ige Natriumcarbonatlsg. + 50 ml 38%-ige Formaldehydlsg.)	
Abspülen in Leitungswasser	einmal
Farmer´s Reducer	30 sec
(200 ml 10%-ige Natriumthiosulfatlsg. + 10%-ige Kaliumferricyanidlsg.)	
Fließendes Leitungswasser	20 min
Abspülen in Aqua dest.	einmal

Zuletzt erfolgt das Eindecken der Präparate mit Kaisers Glycerogelatine (Fa. Merck, Darmstadt).

Um die in vivo durch zweimalige Calciumapplikation markierten, aktiv in Mineralisation befindlichen Knochenoberflächen mittels Fluoreszenzmikroskopie messen zu können, werden die Schnitte ohne Herauslösen des Plastiks mit Fluoromount (Fa. Serva, Heidelberg) eingedeckt und bis zur Auswertung lichtgeschützt aufbewahrt.

3.10.5 Reagenzienliste

Acetic Acid	Fa. Merck, Darmstadt
Ascorbinsäure	Fa. Merck, Darmstadt
Benzoylperoxid	Fa. Merck, Darmstadt
Chromalaun Chrom(III)-Kaliumsulfat	Fa. Merck, Darmstadt
Dibuthylphtalat	Fa. Merck, Darmstadt
DMEM high glucose mit 4 mM L-Glutamin	Fa. PAA Laboratories GmbH, Pasching
40% Ethanol	Hauapotheke der VU Wien, Österreich
70% Ethanol	Hauapotheke der VU Wien, Österreich
95% Ethanol	Hauapotheke der VU Wien, Österreich
Fast Red Violet LB	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
fötales Kälberserum (FCS)	Fa. PAA Laboratories GmbH, Pasching
Fluoromount	Fa. Serva, Heidelberg
Formaldehyd	Fa. Merck, Darmstadt
Gelatine	Fa. AppliChem, Darmstadt
Glutardialdehyd	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerogelatine	Fa. Merck, Darmstadt
Glycerophosphat	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin-HCL	Fa. Merck, Darmstadt
100% Isopropanol	Hauapotheke der VU Wien, Österreich
Kaliumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Fa. Merck, Darmstadt
Methoxyethylacetat	Fa. Merck, Darmstadt
Methylmethacrylat	Fa. Merck, Darmstadt
Naphtol AS-MX Phosphate Disodium Salt	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-Acetat	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Fa. Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Fa. Merck, Darmstadt
Natrium Pyruvat	Fa. PAA Laboratories GmbH, Pasching

Penicillin/Streptomycin 100x	Fa. PAA Laboratories GmbH, Pasching
Silbernitrat	Fa. Merck, Darmstadt
Sodium Tartrate	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Thymolkristall	
Tris-HCl	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween®20	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylol	Fa. Herba Chemosan, Wien, Österreich

3.11 Histomorphometrische Messung

In dieser Arbeit werden die von PARFITT et al. (1987) in der American Society of Bone and Mineral Research verankerten vereinheitlichten und international gültigen Termini technici verwendet.

Aufgrund der anisotropen Anordnung der Knochentrabekel (keine räumliche Vorzugsrichtung der Strukturelemente) im Lendenwirbel und im proximalen Tibiabereich der Ratte ist eine Umrechnung der Werte in die dritte Dimension, wie in der Humanmedizin üblich, für die Quantifizierung der Knochenmorphologie nicht zulässig. Deswegen werden zweidimensionale Parameter benutzt (PARFITT et al., 1983a).

Zur Analyse der statischen histomorphometrischen Parameter im trabekulären Knochen sowohl des ersten Lendenwirbels (L1) wie auch in der rechten proximalen Tibia wird ein vollautomatisches Bildanalysesystem Spot insight V3,5, (Fa. Diagnostic Instruments; Inc mA, Burroughs, USA) zur Bildaufnahme und Axio Vision4 (Fa. Zeiss Vision GmbH; Carl Zeiss Deutschland) zur Bildanalyse verwendet, welches über eine Messkamera (Spot insight Que, 3-Shot, Fa. Visitron System GmbH) an ein Stereomikroskop Stemi SV 11 (Fa. Zeiss, Oberkochen) angeschlossen ist.

Dabei werden die Knochenschnitte nach der „von Kossa“ Methode analysiert, wobei ein 500 µm breiter Rand von der jeweiligen Epiphysenfuge des Knochens ausgespart wird, damit nur sekundäre Spongiosa und kein endokortikaler Knochen gemessen wird.

Das Bildanalysesystem bestimmt vollautomatisch die Zahl (Number of trabeculae, N.Tb), die Summe der Flächen (Total bone area, Tt.B.Ar) und die Summe der Umfänge (total bone perimeter, Tt.B.Pm) der innerhalb der Messfläche (Tissue area, T.AR) gelegenen Knochentrabekel.

Daraus werden folgende Parameter errechnet:

(siehe nächste Seite)

1) Bone area = Total bone area/Tissue area x 100 [%]
2) Trabecular number per tissue area = Number of trabeculae/ Tissue area [no./mm^2]
3) Trabecular area = Total bone area/ Number of trabeculae [mm^2]
4) Trabecular number per bone area = Number of trabeculae/ Total bone area [no./mm^2]
5) Bone perimeter = total bone perimeter/Tissue area [mm/ mm^2]
6) Trabecular width = Total bone area/ total bone perimeter x 2000 [µm]
7) Trabecular number = 4/3,14 x 0,5 x total bone perimeter/ Tissue area [no./mm]
8) Trabecular separation = 1/Tb.N x 100 – Tb.Th [µm]

Begriffsdefinitionen:

ad 1) gibt den Prozentsatz des kalzifizierten Knochen und Knorpel bezogen auf die gesamte Messfläche an
ad 2) gibt die Anzahl der Trabekelanschnitte pro mm^2 Gewebefläche an
ad 3) gibt die durchschnittliche Fläche eines Trabekelprofilschnittes an
ad 4) gibt die Anzahl der Trabekelanschnitte pro mm^2 an
ad 5) gibt die Gesamtlänge aller in 1 mm^2 Gewebefläche vorhandenen Knochenumfänge an
ad 6) gibt die mittlere Trabekelbreite an
ad 7) gibt die Gesamtzahl voneinander abgegrenzter Trabekel an
ad 8) gibt den durchschnittlichen Abstand zweier benachbarter Trabekel an

3.12 Biochemische Analysen

3.12.1 Serumanalyse

Aus dem bei der Tötung der Tiere gewonnenen Blut (Kap. 3.1.1) wird Serum hergestellt. Dieses wird aliquotiert und bei -80°C zur weiteren Verwendung gelagert. Ein Aliquot wird nach Auftauen bei Raumtemperatur zur Bestimmung folgender Serumparameter verwendet:

AST	Aspartat-Amino-Transferase
ALP	Alkalische Phosphatase
T-Bili	Total Bilirubin
CK	Kreatininkinase
Alb	Albumin
Urea	Harnstoff
Crea	Kreatinin
P	Phosphor

Zur Bestimmung dieser Parameter wird ein Hitachi 717 Auto-Analyzer (Fa. Boehringer, Mannheim) verwendet.

Na	Natrium
K	Kalium
Ca	Calcium

Zur Bestimmung der Elektrolyte dient ein Flammenphotometer (Modell EFOX 5053, Fa. Eppendorf, Hamburg).

3.12.2 Vollblutanalyse

Nach Extraktion der Vollblutproben mit Methanol wird der CsA-Spiegel mit einem Radioimmunoassay mit einem CsA-spezifischen monoklonalen Antikörper (Fa. INCSTAR, Stillwater, MN, USA) bestimmt.

3.12.3 Urinanalyse

3.12.3.1 Elektrolyte, Kreatinin und Phosphor

Von jedem Tier wird zuerst die gewonnene Urinmenge gemessen. Danach wird für die Natrium-, Kalium- und Calciumbestimmung mittels Flammenphotometer (Modell EFOX 5053, Fa. Eppendorf, Hamburg) von jeder Probe 125 µl Urin mit 125 µl 2 N HCL, in ein Reagenzgefäß pipettiert.
Aus dieser 1:2 Verdünnung werden anschließend 20 µl des verdünnten Urins in ein mit 500 µl Aqua dest. vorgelegtes Reagenzgefäß pipettiert (1:26), so dass eine insgesamt 1:52 Endverdünnung für die Bestimmung von Kreatinin und Phosphor am Hitachi 717 Auto-Analyzer zur Verfügung steht.

3.12.3.2 Deoxypyridinolin

Aus einem weiteren Aliquot mit Nativ-Urin wird Deoxypyridinolin (DPD) mit einem kompetitiven Enzym Immunoassay (Metra® DPD EIA kit, Quidel Corporation, San Diego, USA) bestimmt.
Die Aggregation von Kollagenmolekülen zu Kollagenfibrillen wird durch hydrophobe und elektrostatische Kräfte induziert mit anschließender Quervernetzung durch Aufbau kovalenter Bindungen. Diese Quervernetzung wird als „cross-linking“ bezeichnet und weist gewebespezifische Merkmale auf. Die entscheidenden Moleküle, die für die Typ-I Kollagen-Verkettung verantwortlich sind, heißen DPD, welches in den Knochen und Zähnen vorkommt und Pyridinolin (PYR), welches im Knochen und Knorpel dominiert. Das Verhältnis von PYR zu DPD liegt bei 3,5:1. Im Rahmen des Kollagenabbaus werden die Crosslinks freigesetzt und ohne Metabolisierung im Urin ausgeschieden. Die im Urin nachweisbaren Crosslinks stammen fast ausschließlich aus dem Knochen, da der Turnover anderer Crosslinks-haltiger Gewebe unwesentlich ist. Im Urin findet sich daher das gleiche PYR/DPD-Verhältnis von 3,5:1 wie im Knochen selbst (RESCH und BERNECKER, 2006).

3.13 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgt mit SPSS für Windows 11.5 oder höher (SPSS, Chicago, USA). Für alle Versuche wird eine univariate Varianzanalyse (2-way Anova) durchgeführt, wobei ein Faktor stets die T-Zell-Depletion darstellt. Der andere Faktor ist je nach Experiment Ovariektomie, Orchiektomie oder CsA.
Dabei bezeichnen p-Werte $\leq 0{,}05$ einen signifikanten Unterschied.

4 Ergebnisse

Um den Abfall der T-Lymphozyten zu dokumentieren, wurde eine FACS-Verlaufsuntersuchung von T-Zell-depletierten Tieren für die Dauer des Versuches angefertigt. Anders als bei den Vorversuchen, trat der erwartete Abfall der T-Lymphozytenzahl erst ca. 3 Wochen nach der ersten Antikörpergabe ein. Den Verlauf der FACS-Untersuchung verdeutlicht die Abbildung 2.

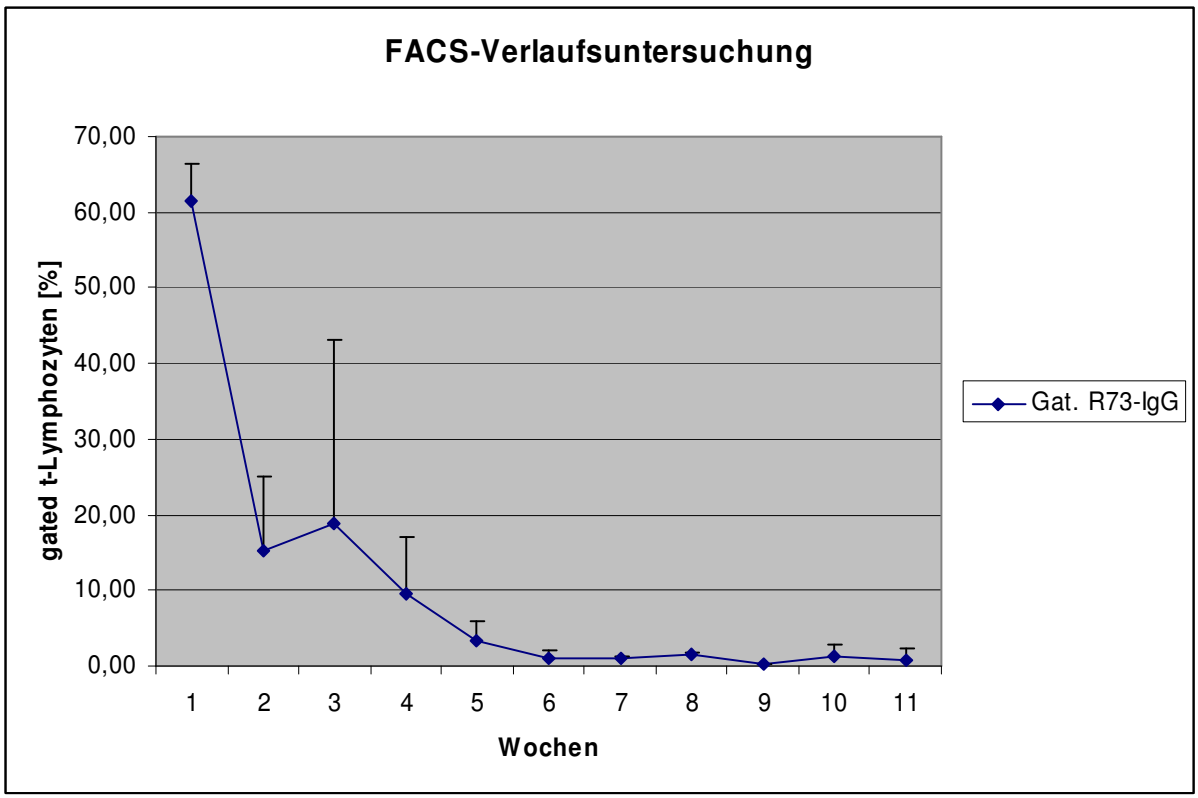


Abb.:2 FACS-Verlaufsuntersuchung von T-Zell-depletierten Tieren

4.1 Versuch I: Rolle von T-Lymphozyten in der Pathogenese der Estrogen- und Androgenmangel-Osteopenie

Bei den folgenden Auswertungen werden nur Tiere gewertet, deren T-Lymphozytenzahl 0-5% der gegateten Zellen bei der FACS-Analyse beträgt. Diese Tiere werden als T-Zell-depletiert angesehen. Daher ergeben sich für die einzelnen Gruppen folgende Tierzahlgrößen:

Tab.: 7 absolute Tierzahlen Versuch I

weibliche Ratten			männliche Ratten	
Gruppe	**Tierzahl (n)**		**Gruppe**	**Tierzahl (n)**
TX/OVX	6		TX/ORX	5
TX/S-OVX	5		TX/S-ORX	5
S-TX/OVX	8		S-TX/ORX	8
S-TX/S-OVX	8		S-TX/S-ORX	8

TX=Thymektomie; S-TX=Sham-Thymektomie; OVX=Ovariektomie; ORX=Orchiektomie; S-OVX bzw. S-ORX= Sham-Gonadektomie

4.1.1 Körpergewichtsentwicklung

Die Thymektomie zeigt weder bei den weiblichen, noch bei den männlichen Tieren einen Einfluss auf das Körpergewicht. Demgegenüber sind zu Versuchende unterschiedliche Körpergewichtsdurchschnitte der Sham-Gruppen gegenüber den gonadektomierten Gruppen zu verzeichnen. So liegen die Gewichte der ovariektomierten weiblichen Ratten trotz Pair-feeding signifikant (p=0,004) über dem der scheinoperierten Tiere, während bei den männlichen Ratten umgekehrt die scheinoperierten Tiere tendenziell (p=0,078) höhere Körpergewichte aufweisen als die orchiektomierten Ratten.
Die Thymektomie zeigte keinen Einfluss auf das Körpergewicht der Tiere (Tab. 12).

4.1.2 Knochenmineraldichte-Messung mittels peripherer quantitativer Computertomographie an der linken Tibia und dem vierten Lendenwirbel

Die pQCT-Messung des ersten Versuches der 6 Monate alten weiblichen und 12 Monate alten männlichen Fischer-344-Ratten lässt eine deutliche Abnahme der Knochenmasse infolge der Gonadektomie erkennen. Die Gesamt-Knochenmineraldichte (Total Bone Mineral Density), Trabecular Bone Mineral Density und Cortical and Subcortical Density sind bei der TX und Sham-TX/gonadektomierten Gruppe im Vergleich zu der TX und Sham-TX/scheingonadektomierten Gruppe signifikant reduziert. In der distalen Tibia

thymektomierter weiblicher Tiere sind die die Total Bone Mineral Density (p=0,042) und die Trabecular Bone Mineral Density (p=0,009) signifikant niedriger.
Eine Interaktion OVX*TX ist beim kortikalen Knochen des Tibiaschaftes feststellbar.
Die Abbildung 3 der Total Bone Mineral Density des vierten Lendenwirbels der weiblichen Tier zeigt exemplarisch für den gesamten Versuch das Verhältnis der einzelnen Gruppen zueinander.
Die einzelnen Werte sind den Tabellen 10 (Teil 1-3) Knochenmineraldichte-Messung Versuch I zu entnehmen.

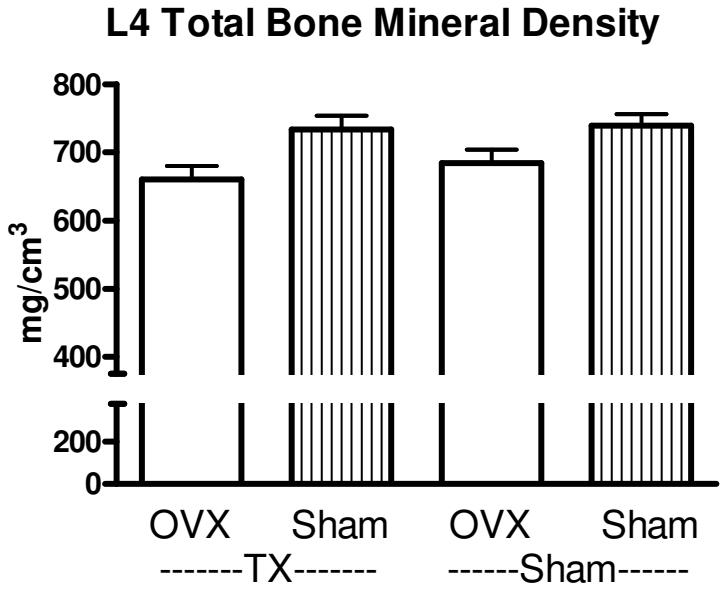


Abb. 3 Gesamt-Knochenmineraldichte des vierten Lendenwirbels weiblicher Tiere
Faktor OVX p<0,001; Faktor TX n.s; Faktor OVX*TX n.s.

4.1.3 Histomorphometrische Messungen der rechten Tibia und des ersten Lendenwirbels

4.1.3.1 Statische histomorphometrische Messungen der sekundären Spongiosa der rechten proximalen Tibia

Die Ovariektomie der weiblichen Ratten führt zu einer signifikanten Verschlechterung der Knochenstruktur, so dass die Parameter der proximalen Tibia (Tab. 11) eine niedrigere trabekuläre Knochenmasse (Bone area, $p=0,044$), mittlere Trabekelbreite (Trabecular width, $p<0,001$), mittlere Trabekelanzahl (Trabecular number, $p<0,001$), durchschnittliche Fläche eines Trabekelanschnittes (Trabecular area, $p<0,001$) und einer hochsignifikant erniedrigten Gesamtlänge aller in 1 mm² Gewebefläche vorhandenen Knochenumfänge (Bone perimeter, $p<0,001$) zeigen. Die hochsignifikant erhöhten Werte der Anzahl der Trabekelanschnitte pro mm² Gewebefläche (Trabecular number per tissue area, $p<0,001$), der Anzahl der Trabekelanschnitte pro mm² Knochenfläche (Trabecular number per bone area, $p<0,001$) und der Aufteilung der Trabekel (Trabecular separation, $p<0,001$) verdeutlichen ebenfalls die verschlechterte Knochenstruktur.
Die Thymektomie der weiblichen Tiere führt zu signifikant höheren Werten bei der mittleren Trabekelbreite ($p=0,044$) und der durchschnittlichen Fläche eines Trabekelanschnittes ($p<0,001$) und zu signifikant niedrigeren Werten bei der Anzahl der Trabekelanschnitte pro mm² Gewebefläche und der Anzahl der Trabekelanschnitte pro mm² Knochenfläche ($p=0,024$).
Im Vergleich dazu zeigen die männlichen Tiere keine signifikanten Veränderungen bei der Auswertung der Tibia.
Die oben erwähnte signifikant niedrigere Knochenmasse der weiblich ovariektomierten Tiere, gleich ob thymektomiert oder Sham-thymektomiert, ist in Abb. 4 ablesbar.

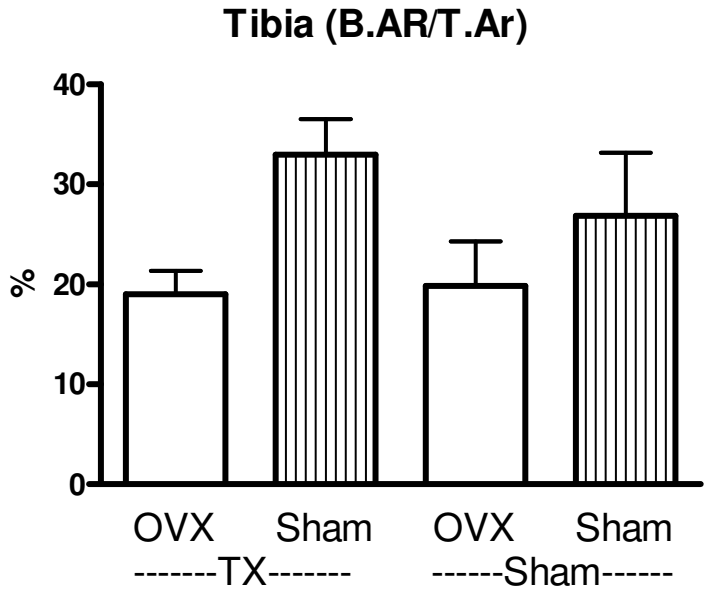
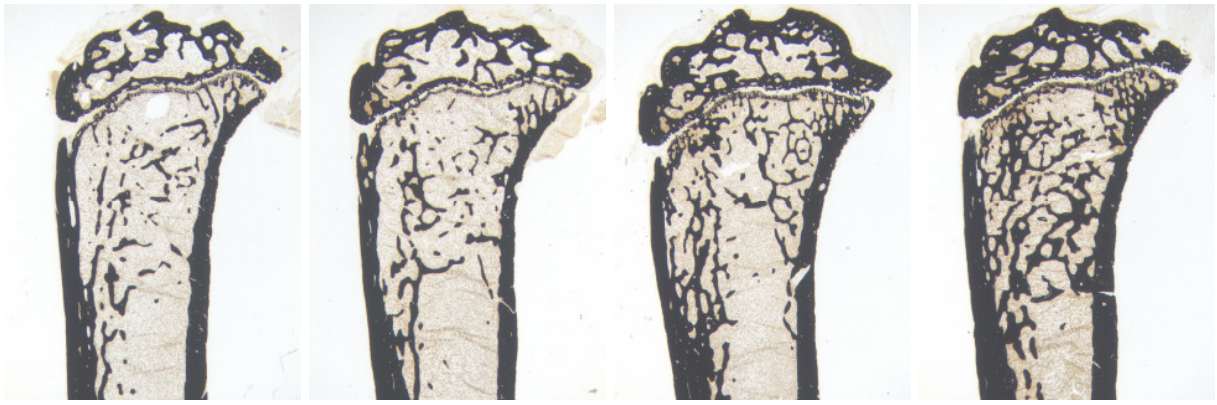


Abb.: 4 trabekuläre Knochenmasse (Bone area) der Tibia weiblicher Tiere;
Faktor OVX p<0,001; Faktor TX n.s; Faktor OVX*TX n.s.
Aus den folgenden Abbildungen der proximalen Tibien weiblicher Ratten ist ersichtlich, dass die OVX im Vergleich zu den Sham-OVX Tieren erheblich weniger Knochenstruktur aufweisen, wohingegen die Thymektomie nur eine untergeordnete Rolle spielt.



1) STX/OVX 2) TX/OVX 3) TX/SOVX 4) STX/SOVX

Abb.: 5 proximale Tibia von 1) Sham-thymektomierte/ovariektomierte; 2) thymektomierte/ovariektomierte; 3) thymektomierte/Sham-ovariektomierte; 4) Sham-thymektomierte/Sham-ovariektomierte Ratten
Von-Kossa-Färbung, 20-fache Vergrößerung

4.1.3.2 Statische histomorphometrische Messungen der sekundären Spongiosa des ersten Lendenwirbels

Im ersten Lendenwirbel zeigen sowohl die weiblichen (p=0,044) als auch die männlichen (p=0,038) gonadektomierten Tiere eine signifikante Abnahme bei der trabekulären Knochenmasse. Bei den weiblichen thymektomierten Tieren gibt es zusätzlich verminderte Werte bei der trabekulären Knochenmasse (p=0,042).
Die einzelnen Werte sind den Tabellen 11 (Teil 1-4) Statische histomorphometrische Parameter Versuch I zu entnehmen.

4.1.4 Serum- und Urinparameter

4.1.4.1 Serumparameter des ersten Versuches

Die Ovariektomie hat auf die Aktivität der Aspartat-Amino-Transferase (AST, p=0,009) und alkalischen Phosphatase (ALP, p<0,001) einen signifikant erhöhenden Einfluss, wo hingegen sie auf die Serumspiegel von Albumin (ALB, p=0,002), Kreatinin (Crea, p=0,01) und Calcium (Ca, p=0,047) einen signifikant erniedrigenden Einfluss hat.
Bei den männlich orchiektomierten Tieren ist das Kreatinin hingegen signifikant erhöht (p=0,05).
Bis auf eine Interaktion beim Natrium (ORX*TX, p=0,015) bleiben alle anderen Werte bei den männlichen Tieren unbeeinflusst.
Die Thymektomie kommt nur beim AST Wert (p=0,018) der weiblichen Ratten mit einem niedrigeren Wert zu den S-TX Tieren zur Geltung. Ansonsten nimmt sie auf keinen der untersuchten Parameter Einfluss.
Die folgenden Abbildungen zeigen zum einen den ALP-Wert der weiblichen Tiere, der bei den ovariektomierten Gruppen als Zeichen einer gesteigerten Osteoblastentätigkeit erhöht ist. Der erhöhte ALP-Wert ist somit ein Ausdruck einer gesteigerten Knochenstoffwechselaktivität. Zum anderen ist aus den Kreatinin-Werten der männlichen und weiblichen Ratten ein gegensätzliches Verhalten zu erkennen.

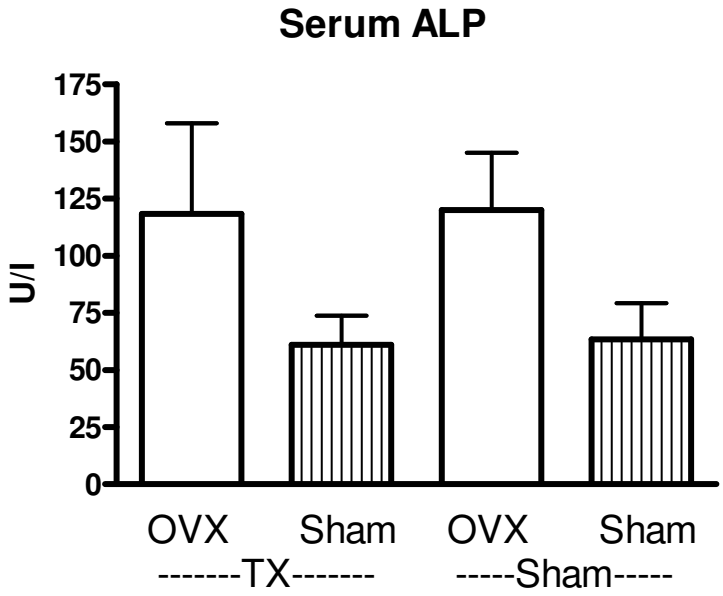


Abb. 6 Serum Alkalische Phosphatase weiblicher Ratten;
Faktor OVX p<0,001; Faktor TX n.s; Faktor OVX*TX n.s.

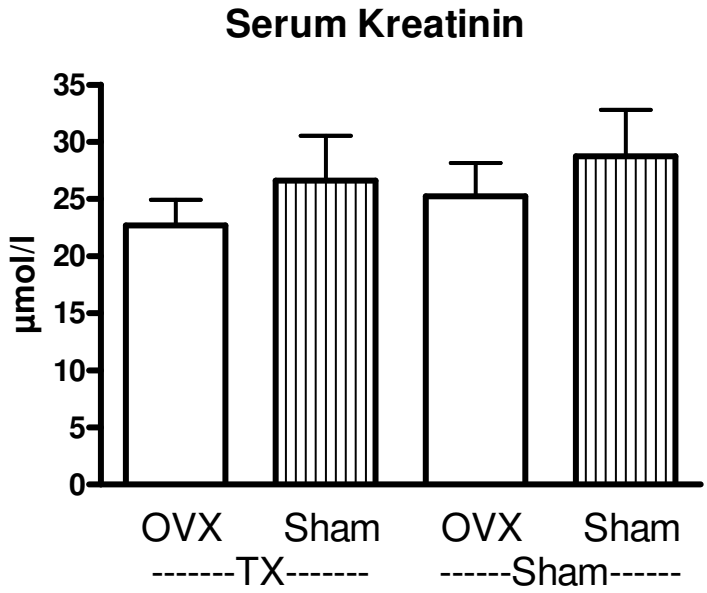


Abb. 7 Serum Kreatinin weiblicher Ratten;
Faktor OVX p=0,01; Faktor TX n.s; Faktor OVX*TX n.s.

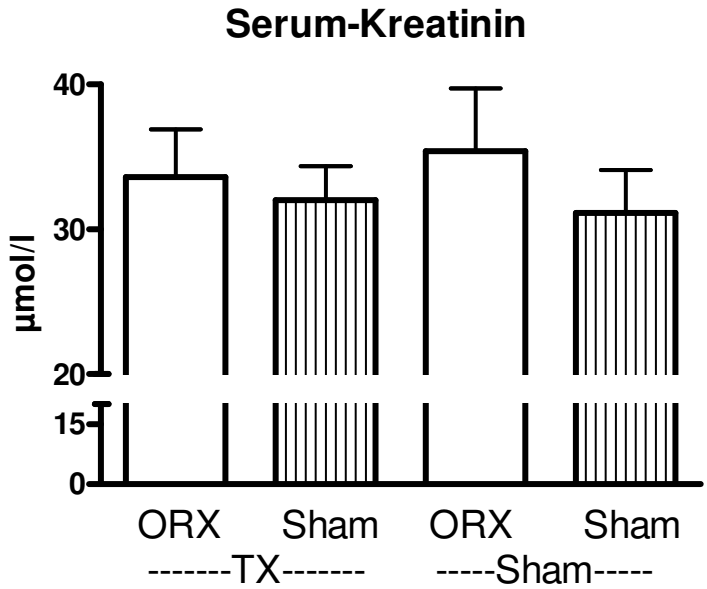


Abb. 8 Serum Kreatinin männlicher Ratten;
Faktor ORX p=0,046; Faktor TX n.s; Faktor ORX*TX n.s.

Die einzelnen Werte sind den Tabellen 12 (Teil 1 und 2) Biochemische Parameter des Serum Versuch I und Körpergewicht zu entnehmen.

4.1.4.2 Urinparameter des ersten Versuches

Bei der viermaligen Urinprobennahme, welche zu Beginn des Versuches, vor der Gonadektomie, einen Monat nach der Gonadektomie und zum Versuchende erfolgte, sind bei den weiblichen und männlichen Fischer-344-Ratten mit anhaltender Versuchsdauer Veränderungen zu verzeichnen. So hat die Thymektomie auf den Natrium-Wert (p=0,022) bei der zweiten Urinuntersuchung (Urin prä Gonadektomie) bei den weiblichen Tieren und auf den Kalium- (p=0,029) und Calcium-Ausscheidung (p=0,048) der männlichen Tiere einen signifikant steigernden Einfluss.

Dieses Bild wird bei der Auswertung des Urins nach einem Monat post operationem modifiziert. Bei den weiblichen ovariektomierten Tieren kommt es zu einer vermehrten signifikanten Ausscheidung von Phosphor, Natrium, Kalium und Calcium (p<0,001), wobei die Thymektomie ebenfalls einen signifikanten Einfluss (p=0,003)

auf Calcium ausübt und es zu einer Interaktion OVX*TX bei Phosphor (p=0,047) und Calcium (p=0,044) kommt.
Bei den männlichen orchiektomierten Tieren ist nur eine hochsignifikant gesteigerte Natrium- (p=0,002) und Calciumausscheidung (p<0,001) ablesbar.
Die Thymektomie manifestiert sich durch höhere Werte bei Phosphor (p=0,042) und Kalium (p=0,0016).

Bei der finalen Urinsammlung tritt wiederum eine signifikante Steigerung der Urinkonzentrationen von Phosphor (p=0,027; weiblich), Natrium (p=0,022 weiblich; p<0,001 männlich), Calcium (p=0,017 weiblich; p=0,007 männlich) bei den gonadektomierten Gruppen auf. Die erhöhte Calciumausscheidung ist exemplarisch aus der Abbildung 9 abzulesen. Die Ovariektomie induziert bei den weiblichen Ratten signifikant niedrigere Kreatinin-Werte (p=0,064).

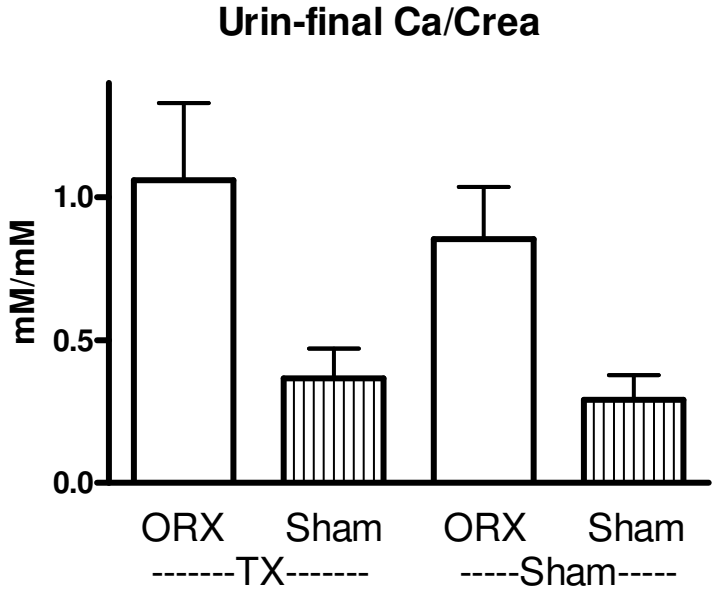


Abb. 9 finaler Calcium/Kreatinin Urinwert männlicher Ratten;
Faktor ORX p<0,001; Faktor TX p=0,05; Faktor ORX*TX n.s

Die Deoxypyridinolinausscheidung (Kollagen-Crosslinks-Ausscheidung) ist bei den gonadektomierten weiblichen (p=0,017) und männlichen (p=0,007) Gruppen erhöht.
Die Thymektomie verursacht signifikant niedrigere Kreatinin-Werte im finalen Urin der weiblichen (p=0,005) und erhöhte Werte bei den männlichen (p=0,044) Ratten. Die

Phosphorausscheidung der weibliche Ratten ist erniedrigt (p=0,044;). Bei den männlichen Ratten entsteht eine vermehrte Calcium-Ausscheidung (p=0,05).
Eine Interaktion ist bei den weiblichen Tieren bei Kreatinin (OVX*TX p=0,002) und den männlichen Tieren bei Kalium (ORX*TX p=0,023) zu verzeichnen.

Die einzelnen Werte sind aus den Tabellen 13 (Teil 1-4) Biochemische Parameter des Urins Versuch I ersichtlich.

4.2 Versuch II Rolle von T-Lymphozyten für die Skelettwirkung von CsA

Analog zu Versuch I werden auch bei Versuch II nur Tiere als T-Zell-depletiert angesehen, deren T-Lymphozytenzahl 0-5% der Gesamtpopulation beträgt. Dadurch entstehen gemäß Tabelle 8 für Versuch II folgende Tierzahlen:

Tab.:8 absolute Tierzahlen Versuch II

weibliche Ratten			männliche Ratten	
Gruppe	**Tierzahl (n)**		**Gruppe**	**Tierzahl (n)**
TX/CsA	7		TX/CsA	5
TX/Vehikel-CsA	5		TX/Vehikel-CsA	5
S-TX/CsA	8		S-TX/CsA	8
S-TX/ Vehikel-CsA	8		S-TX/ Vehikel-CsA	8

TX=Thymektomie; S-TX=Sham-Thymektomie; CsA= Cyclosporin A-behandelt; Vehikel-CsA=Vehikel-Cyclosporin A-behandelt

4.2.1 Körpergewichtsentwicklung

Die zweimonatige subkutane CsA-Applikation führte weder bei den 6 Monate alten weiblichen noch bei den 9 Monate alten männlichen Fischer-344-Ratten zu größeren Körpergewichtsunterschieden. Die Thymektomie zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf das Körpergewicht (Tab. 16).

4.2.2 Knochenmineraldichte-Messung mittels peripherer quantitativer Computertomographie an der linken Tibia und dem vierten Lendenwirbel

Bei den weiblichen Tieren bewirkt die CsA-Behandlung eine signifikante Abnahme der Gesamt-Knochenmineraldichte (Total Bone Mineral Density) des vierten Lendenwirbels (p=0,031) und der proximalen Tibia (p=0,002), der trabekulären Knochenmineraldichte (Trabecular Bone Mineral Density) im vierten Lendenwirbel (p=0,05) und in der proximalen Tibia, sowie der cortikalen und subcortikalen Knochenmineraldichte (Cortical and Subcortical Mineral Density) der proximalen Tibia (p=0,001).

Die Thymektomie zeigte weder bei den weiblichen noch bei den männlichen Tieren einen Einfluss.

Die Abbildung 10 zeigt exemplarisch die Gesamt-Knochenmineraldichte der proximalen Tibia der weiblichen Tiere. Der Unterschied zwischen CsA- und Sham-CsA-Gruppen ist bei T-Zell-depletierten und nicht T-Zell-depletierten Ratten gleich groß.

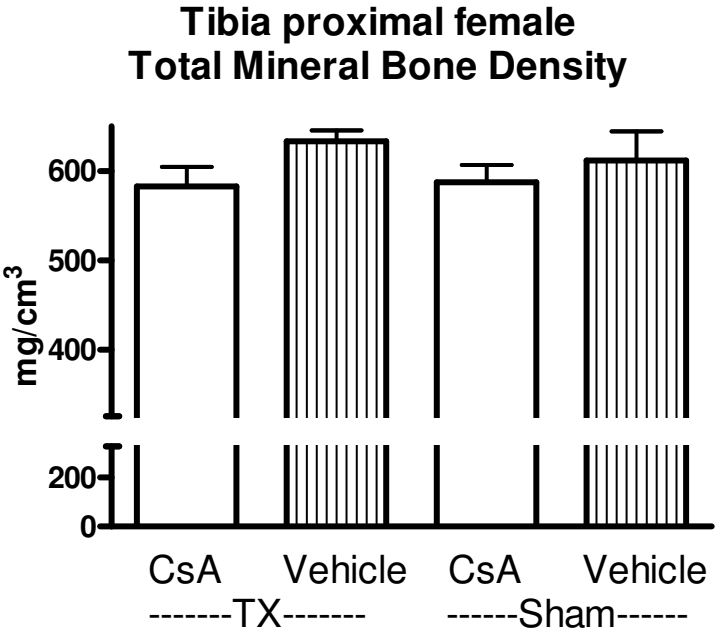


Abb. 10 Gesamt-Knochenmineraldichte der proximalen Tibia weiblicher Ratten; Faktor CsA p=0,001; Faktor TX n.s; Faktor CsA*TX n.s.

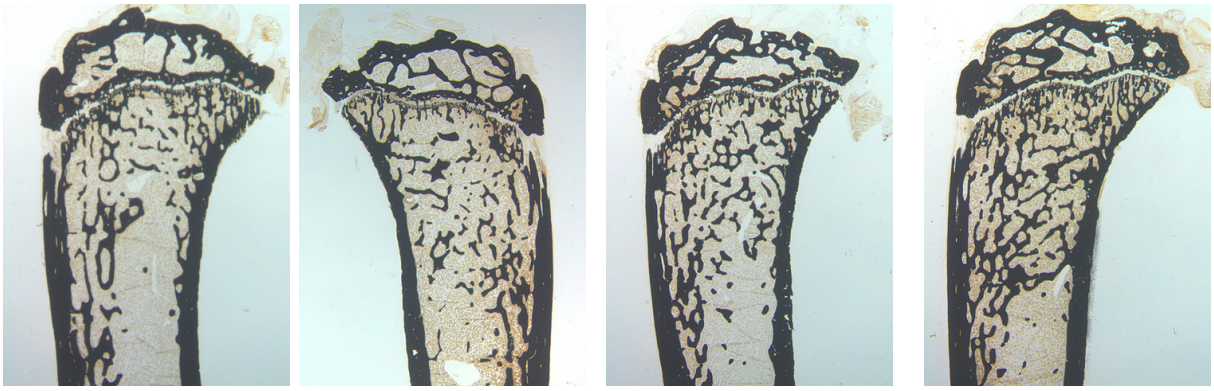
Eine Interaktion zwischen CsA*TX lässt sich nur an der distalen Tibia bei den weiblichen Ratten bei der Total Bone Mineral Density (p=0,013) und bei der Trabecular Bone Mineral Density (p=0,003) beobachten.
Die pQCT Werte der männlichen CsA-behandelten Tiere zeigen bei der Total Bone Mineral Density Messung der proximalen Tibia signifikant niedrigere Werte (p=0,001) gegenüber den Vehikel-behandelten Gruppen. Ebenso verhält es sich bei der Cortical and Subcortical Bone Mineral Density des vierten Lendenwirbels (p=0,007) und der proximalen Tibia (p=0,001).
Die Werte sind den Tabellen 14 (Teil 1-3) Knochenmineraldichte-Messung Versuch II zu entnehmen.

4.2.3 Histomorphometrische Messungen der rechten Tibia und des ersten Lendenwirbels

4.2.3.1 Statische histomorphometrische Messungen der sekundären Spongiosa der rechten proximalen Tibia

Die Behandlung der Ratten mit CsA führte bei den weiblichen Tieren zu einer Verschlechterung der Knochenstruktur. Dafür sprechen die signifikant erniedrigten Werte der trabekulären Knochenmasse (Bone area, p=0,036), der durchschnittlichen Fläche eines Trabekelprofilanschnittes (Trabecular area, p=0,037) und der mittleren Trabekelbreite (Trabecular width, p=0,003) an der Tibia der CsA behandelten Ratten.
Die Thymektomie zeigte nur bei der Anzahl der Trabekelanschnitte pro mm² Gewebefläche (Trabecular number per tissue area) der weiblichen Ratten einen signifikanten Einfluss (p=0,026) mit niedrigeren Werten gegenüber den S-TX Gruppen.
Die männlichen Gruppen zeigen keinerlei Signifikanzen.

Abbildung 11 zeigt die Verschlechterung der Knochenstruktur der CsA-behandelten weiblichen Ratten im Gegensatz zu den Vehikel-behandelten Tieren. Es ist ersichtlich, dass die Thymektomie keinen Effekt auf die Knochenstruktur ausübt.



1) TX/CsA 2) STX/CsA 3) TX/V-CsA 4) STX/V-CsA

Abb.: 11 proximale Tibia von 1) thymektomierter/CsA; 2); Sham-thymektomierter/CsA; 3) thymektomierter/Vehikel-CsA; 4) Sham-thymektomierter/Vehikel-CsA-behandelten weibliche Ratten
Von-Kossa-Färbung, 20- fache Vergrößerung

4.2.3.2 Statische histomorphometrische Messungen der sekundären Spongiosa des ersten Lendenwirbels

Die Werte des ersten Lendenwirbel der CsA-behandelten weiblichen Ratten sprechen auch für eine verschlechterte Struktur, wie die erhöhten Werte der Anzahl der Trabekelanschnitte pro mm² Gewebefläche (Trabecular number per tissue area, p=0,004) und der Anzahl der Trabekelanschnitte pro mm² Knochenfläche (p=0,006). Demgegenüber stehen signifikant erhöhte Werte der durchschnittlichen Fläche eines Trabekelprofilanschnittes (Trabecular area, p=0,004).
Wie anhand der Werte aus Tabelle 15 entnommen werden kann, zeigt die Thymektomie weder bei den männlichen noch bei den weiblichen Tieren einen Einfluss auf die Knochenstruktur.
Bei den männlichen Tieren der einzelnen Gruppen sind keine Veränderungen zu verzeichnen.
Die folgende Abbildung veranschaulicht die Anzahl der Trabekelanschnitte pro mm² Gewebefläche, welche bei CsA-behandelten weiblichen Ratten erhöht ist. Anhand dieser Abbildung ist ersichtlich, dass die T-Zell-Depletion keine Rolle spielt, da der

Unterschied zwischen CsA- und Vehikel-behandelten Gruppen bei T-Zell-depletierten und nicht T-Zell-depletierten Ratten gleich groß ist.

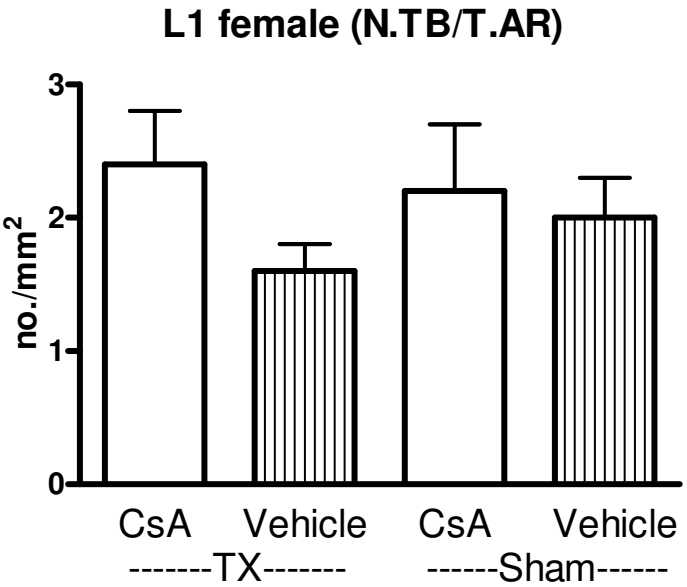


Abb. 12 Anzahl der Trabekelanschnitte pro mm² Gewebefläche des ersten Lendenwirbels weiblicher Ratten;
Faktor CsA p=0,004; Faktor TX n.s; Faktor CsA*TX n.s.

Die Werte aus dieser Untersuchung sind den Tabellen 15 (Teil 1-4) Statische histomorphometrische Parameter Versuch II entnehmbar.

4.2.4 Serum- und Urinparameter

4.2.4.1 Serumparameter des zweiten Versuches

Bei der Serumanalyse zeigte sich, wie sich aus der Tabelle 16 Biochemische Parameter des Serum Versuch II und Körpergewicht erkennen lässt, dass die CsA-Behandlung der weiblichen Tiere eine signifikante Erhöhung des Aspartat-Amino-Transferase- (AST, p=0,006) und des Kreatininkinase- (CK, p=0,007) Aktivität bewirkt.
Die Thymektomie hat lediglich bei der Alkalische Phosphatase Aktivität (ALP, p=0,042) einen signifikant erniedrigenden Einfluss im Gegensatz zu den Sham-TX Tieren. Außerdem sind nur bei den weiblichen Tieren zwei Interaktionen zu

verzeichnen, zum einen bei ALP (CsA*TX, p=0,009) und zum anderen beim P (CsA*TX, p=0,023).
Die CsA-Behandlung der männlichen Tiere bewirkt im Vergleich zu den weiblichen Tieren eine signifikante Erhöhung des Harnstoffspiegels (Urea, p=0,002). Alle anderen Parameter der männlichen CsA-behandelten Tiere bleiben unbeeinflusst.
Die Thymektomie übt einen signifikant erhöhenden Einfluss auf Bilirubin (BILI, p=0,002), Kreatinin (CREA, p=0,022) und Natrium (Na, p=0,035) Werte der männlichen Tieren aus.

4.2.4.2 CsA-Vollblutparameter

Wie zu erwarten ist, sind die CsA-Konzentration der CsA-behandelten im Gegensatz zu den Vehikel behandelten Tieren signifikant erhöht (p<0,001).
Auffällig ist, dass die CsA-Gabe der männlichen Tiere deutlich höhere Werte hervorruft als bei den weiblichen Tieren.
Eine Zusammenstellung der ermittelten Werte zeigt Tabelle 6.

Tab.: 6 CsA-Vollblutanalyse mit Hilfe eines RIA

weibliche Ratten	
Gruppe	**CsA-Konzentration [ng/ml]**
TX/CsA	178,0 ± 31,2
TX/V-CsA	22,7 ± 10,0
S-TX/ CsA	198,4 ± 22,2
S-TX/V-CsA	15,9 ±11,2
Faktor CsA	p<0,001
Fakor TX	n.s.
Interaktion	n.s.

männliche Ratten	
Gruppe	**CsA-Konzentration [ng/ml]**
TX/CsA	484,1 ± 75,9
TX/V-CsA	20,4 ± 9,2
S-TX/ CsA	423,3 ± 72,2
S-TX/V-CsA	12,7 ± 5,0
Faktor CsA	p<0,001
Fakor TX	n.s.
Interaktion	n.s.

TX=Thymektomie; S-TX=Sham-Thymektomie; CsA= Cyclosporin A-behandelt; Vehikel-CsA= Vehikel Cyclosporin A-behandelt

4.2.4.3 Urinparameter des zweiten Versuches

Bei der viermaligen Urinprobennahme, welche zu Beginn des Versuches, vor der CsA-Behandlung, einem Monat nach der CsA-Behandlung und zum Versuchende erfolgte, sind weder bei den weiblichen noch bei den männlichen Fischer-344-Ratten größere Veränderungen zu verzeichnen. Lediglich ist bei den männlichen Tieren nach einem Monat CsA-Behandlung eine signifikant erhöhte Natrium- ($p=0,042$) und Calciumausscheidung ($p=0,001$) im Vergleich zu den Kontrollgruppen festzustellen. Bei den Calciumwerten ist die Interaktion CsA*TX mit $p=0,01$ feststellbar.
Die analysierten Werte sind den Tabellen 17 (Teil 1-4) Biochemische Parameter des Urins Versuch II zu entnehmen.

4.3 Ergebnisse des In-vitro-Versuches

Die Zugabe der verschiedenen CsA-Konzentrationen zu Osteoklasten bzw. zu dem Knochenmark und sich daraus differenzierenden Osteoklasten unter In-vitro-Bedingungen zeigt, dass die Anzahl der Osteoklasten von männlichen Fischer-344-Ratten sich dosisabhängig verändern. So ist bei der niedrigsten CsA-Konzentration von 0,001 µg/ml die größte Osteoklastenzahl zu finden.

Bei den Osteoklasten von männlichen Ratten verläuft das Verhältnis CsA-Konzentration zu Osteoklastenanzahl strikt umgekehrt proportional. Bei den weiblichen Tieren ist dieser Effekt kaum erkennbar. Die nachfolgende Abbildung 13 veranschaulicht diesen Zusammenhang zwischen CsA-Konzentrationen und Osteoklastenanzahl unter In-vitro Bedingungen.

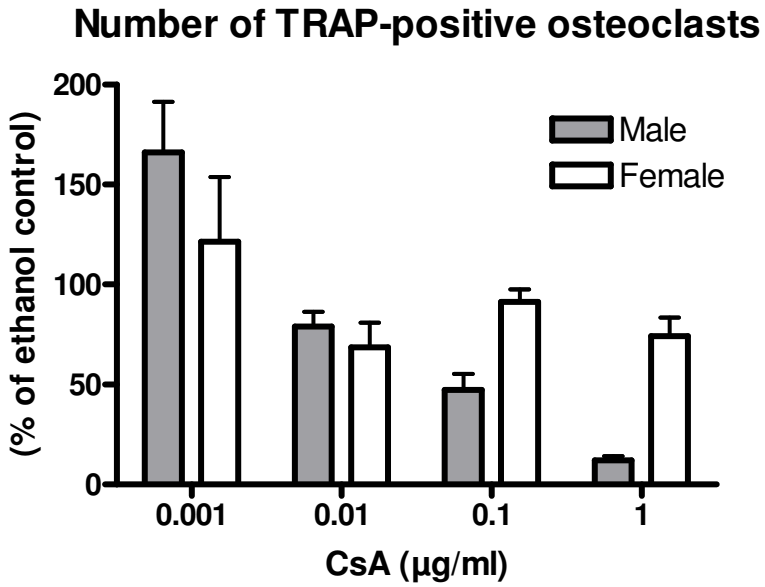


Abb.: Zahl von TRAP (tartrat resistant acid phosphatase) -positive Osteoklasten nach 10tägiger Kultur von Knochenmarkzellen unter den Bedingungen für osteoklastäre Differenzierung

5 Diskussion

5.1 FACS-Verlaufsuntersuchung von T-Zell-depletierten Tieren

Bei der FACS-Verlaufsuntersuchung zeigte sich erstaunlicherweise kein direktes Absinken der α/ß-T-Lymphozytenzahl nach der ersten Antikörpergabe.
Eine Erklärung dafür, dass die Tiere nicht prompt nach der ersten Antikörpergabe α/ß-T-Zell-depletiert sind, wie es bei den Vorversuchstieren der Fall war, bleibt offen.
Der erste Verdacht, dass der selbst hergestellte monoklonale rattenspezifischen α/ß-TCR gerichtete IgG_1-Antikörper (R73) wegen einer Mutation der Zelllinie nicht mehr funktioniere, konnte durch die Antikörperverdünnungsreihen ausgeschlossen werden.
Ebenso kann man die verzögerte α/ß-T-Zell-Depletion auch nicht dadurch erklären, dass es sich bei den Vorversuchstieren um andere Rattenstämme als Fischer-344-Ratten handelt, da der Antikörper in unserer Arbeitsgruppe auch schon vor diesem Vorversuch bei Fischer-344-Ratten erfolgreich getestet wurde.

Eine andere Frage, die es im Zusammenhang der α/ß-T-Zell-Depletion zu beantworten gilt ist, warum bei einigen thymektomierten Gruppen nur rund 63% der Tiere α/ß-T-Zell-depletiert sind.
Eine Erklärung wäre ein zweiter cervicaler Thymus, wie er von TERSZOWSKI et al. (2006) bei Mäusen beschrieben wurde. Dieser Thymus besitzt die gleiche Medulla-Cortex-Struktur und unterstützt die T-Zellentwicklung. Man fand heraus, dass neunzig Prozent der BALB/c-Mäuse und etwa die Hälfte der C57BL/6-Mäuse einen oder mehrere cervicale Thymi haben. Es handelt sich somit um keinen regulären zweiten Thymus.
Es besteht der Verdacht, dass es auch bei Ratten einen zweiten cervicalen Thymus geben könnte, der nicht bei allen Tieren vorhanden ist und somit eine chirurgisch unvollständige Thymektomie möglich wäre.

5.2 Tiermodell der T-Zell-defizienten Ratte

Die Studie hat gezeigt, dass eine dauerhafte α/ß-T-Zell-Depletion bei normalen adulten Ratten mit Hilfe einer Thymektomie und anschließender Gabe eines monoklonalen rattenspezifischen α/ß-TCR gerichteten IgG_1-Antikörpers (R73) erreicht werden kann.
Deshalb ist dieses Modell ebenfalls gut geeignet für weitere osteoimmunologische Studien.
Es muss jedoch in weiteren Studien geklärt werden, ob die geringe Anzahl von 1-10% im Körper vorhandenen γ/δ-T-Lymphozyten einen Einfluss auf den Knochenturnover haben könnte. Davon ist aber eher nicht auszugehen, da die γ/δ-T-Lymphozyten im peripheren Blut und Lymphgewebe selten vorkommen. Sie sind allerdings zahlreich in der Mukosa und Submukosa anzutreffen. Ihnen wird die frühe, wenig spezifische Abwehr der Haut und Schleimhaut zugesprochen, wobei ihre Spezifität und Effektorfunktion noch weitgehend ungeklärt ist (ZINKERNAGEL, 2001).
Eine Veränderung der γ/δ-T-Lymphozyten Anzahl im peripheren Blut bei thymektomierten Ratten würde einen Hinweis auf ihre Aktivität im Bezug auf den Knochenturnover geben.
Eine solche Studie wird in unserer Arbeitsgruppe gerade angefertigt und wird in Kürze fertig sein. Bis zum jetzigen Zeitpunkt verändert sich die γ/δ-T-Lymphozyten Anzahl nicht, so dass vermutet werden kann, dass die vorhandene geringe Anzahl an γ/δ-T-Lymphozyten keinen Einfluss auf den Knochenturnover hat.

5.3 Versuch I: Rolle von α/ß-T-Lymphozyten in der Pathogenese der Estrogen- und Androgenmangel-Osteopenie

In der hier beschriebenen Studie wird die Auswirkung von α/ß-T-Lymphozyten in der Pathogenese der Estrogen- und Androgenmangel-Osteopenie mit Knochenmineraldichtemessung (pQCT), histomorphometrischen Messungen und biochemischen Parametern untersucht.

Es wurde bis jetzt durch andere Studien nahe gelegt, dass eine Stimulation der Tumor-Nekrosefactor-alpha (TNF-α) und OPGL (Osteoprotegerin) -Produktion von T-Lymphozyten möglicherweise einen wichtigen Faktor in der Pathogenese des durch Estrogenmangel hervorgerufenen Knochenverlusts bei der Maus darstellt (CENCI et al., 2000; ROGGIA et al., 2001; CENCI et al., 2003; ROGGIA et al., 2004). So konnte gezeigt werden, dass athymische, T-Zell-defiziente Mäuse keinen Knochenverlust nach der Ovariektomie zeigen (CENCI et al., 2000). Die bisher vorgelegten Daten unterstützten die Hypothese, dass eine Stimulation der TNF-α und OPGL-Produktion von T-Zellen im Estrogenmangel eine entscheidende Rolle in der Steigerung der osteoklastären Knochenresorption spielt (CENCI et al., 2000; ROGGIA et al., 2001; CENCI et al., 2003; ROGGIA et al., 2004). Diese Studien sind jedoch nicht unumstritten geblieben, denn athymische Nacktmäuse wie auch athymische Nacktratten besitzen generell einen niedrigeren Knochenturnover gegenüber Kontrolltieren (McCAULEY et al. 1989; BUCHINSKY et al., 1995). Auch zeigen athymische, T-Zell-defiziente Nacktratten im Vergleich zu euthymischen Kontrolltieren keine Verminderung des Ovariektomie-induzierten Knochenverlusts (SASS et al.1997).

Mit Hilfe der Etablierung des Tiermodells, in dem vorher normale Tiere in einen α/ß-T-Zell-defizienten Zustand versetzt werden, konnte in dieser Dissertation die Rolle der α/ß-T-Lymphozyten beim Knochenturnover erforscht werden. Dabei stellt sich heraus, dass die Unterschiede im Knochenturnover zwischen Gonadektomie- und Sham-Gonadektomie-Gruppen bei α/ß-T-Zell-depletierten und nicht α/ß-T-Zell-depletierten Ratten gleich groß ist.

Im Gegensatz zu den oben genannten Studien ergibt sich, dass die Depletion von α/ß-T-Lymphozyten auf die durch Estrogen- oder Androgenmangel induzierte Osteopenie bei den Fischer-344-Ratten keinen Einfluss nimmt.
ERBEN et al. (1998) untersuchten den Einfluss der Ovariektomie auf die im peripheren Blut vorhandenen $CD4^+/CD8^+$-T-Lymphozyten an ovariektomierten Fischer-344-Ratten mit dem Resultat, dass die peripheren $CD4^+/CD8^+$-T-Lymphozyten keine Rolle bei der Pathogenese des Estrogenmangel induzierten Knochenverlusts spielen.

Die Ergebnisse des ersten Versuches unterstreichen, dass der Mangel an Geschlechtshormonen infolge der Gonadektomie der einzige Faktor ist, der einen Einfluss auf den Knochenturnover ausübt. So verursacht er sowohl bei den weiblichen als auch bei männlichen Ratten einen Knochenstrukturverlust, der computertomographisch sowie histomorphometrisch (excl. ORX-Gruppen) dargestellt werden konnte. Dieses stimmt mit den Ergebnissen früherer Knochenstudien am Femur von Ratten überein. Bagi et al. (1997) zeigten, dass ovariektomierte adulte Sprague-Dawley-Ratten eine signifikant niedrigere Knochenmineraldichte, histomorphometrisch eine signifikant erniedrigte Trabekelanzahl und eine erhöhte Trabekelseparation, sowie ungeachtet des Pair-feedings höhere Körpergewichte aufwiesen im Vergleich zu Sham-ovariektomierten Tieren. Ebenso gehen die Ergebnisse mit denen von JIANG et al. (1997) konform, die eine Schwächung der Knochenqualität von Femura und Lendenwirbeln ovariektomierter Ratten beschreiben.
ERBEN et al. (2000) beschreiben bei männlichen orchiektomierten Fischer-344-Ratten einen Androgenmangel bedingten Knochenverlust mit einem erhöhten Knochenturnover am trabekulären Knochen der Tibia.
Die erhöhte Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Serum, ein Zeichen der Enzym-gesteigerten Osteoblastentätigkeit, sowie die erhöhten Werte von Kreatinin und Calcium bei den weiblichen Tieren verdeutlichen den vermehrten Knochenabbau und zeugen von der vorherrschenden Osteopenie. Diese Daten sind deckungsgleich mit denen von ERBEN et al. (1992).
Die Erhöhung der biochemischen Parameter der Knochenresorption, wie zum Beispiel die renale Ausscheidung des Deoxypyridinolin (DPD) das im Rahmen des

Kollagenabbaus freigesetzt und im Urin ausgeschieden wird, entsprechen den Daten von ERBEN et al. (2000) und HORNBY et al. (2003).
Die signifikant erhöhten Urinparameter Phosphor und Calcium zeigen deutlich die gesteigerte Ausscheidung beider Elektrolyte bei den ovariektomierten Gruppen, die den Abbau von Knochensubstanz widerspiegeln.

Die Fragestellung: „Wird die durch Estrogen- oder Androgenmangel induzierte Osteopenie bei Ratten durch eine Depletion von α/ß-T-Zellen moduliert?“ kann durch diesen Versuch eindeutig beantwortet werden. Durch die erhobenen Daten wird gezeigt, dass die α/ß-T-Zell-Depletion die Estrogen- und Androgenmangel-Osteopenie bei Ratten nicht beeinflusst.

5.4 Versuch II: Rolle von α/ß-T-Lymphozyten für die Skelettwirkung von CsA

In der hier beschriebenen Studie wird die Auswirkung von α/ß-T-Lymphozyten für die Skelettentwicklung von CsA untersucht. Die Auswertung erfolgte anhand Knochenminereraldichtemessung mittels pQCT, histomorphometrischen Messungen und biochemischen Parametern.

Dabei stellt sich heraus, dass der Unterschied beim Knochenabbau zwischen CsA- und Vehikel-CsA-Gruppen bei α/ß-T-Zell-depletierten und nicht α/ß-T-Zell-depletierten Ratten gleich groß ist und somit die Depletion von α/ß-T-Lymphozyten für die Skelettwirkung von CsA keine Rolle spielt.

Die verfügbaren Literaturdaten zeigen bis jetzt, dass T-Lymphozyten essentiell sind für die Vermittlung der CsA-induzierten Skelettentwicklung (BUCHINSKY et al., 1996). So wurde gezeigt, dass über 28 Tage oral appliziertes CsA in einer Dosis von 15 mg CsA/kg KGW bei normalen männlichen Sprague-Dawley-Ratten eine typische High-turnover-Osteopenie in der proximalen Tibia induziert, während sich bei männlichen athymischen, T-Zell-defizienten Rowett-Nacktratten *(rnu/rnu)* nur tendenzielle, aber keine signifikanten Wirkungen einstellten. Die Autoren schlossen daraus, dass T-Lymphozyten für die Ausbildung der CsA-induzierten Osteopenie notwendig sind. Ein gravierendes Problem bei derartigen Untersuchungen ist

allerdings, dass hier Vergleiche zwischen genetisch nicht einheitlichen Stämmen angestellt werden, und dass die T-Zell-Defizienz bei den Nacktratten lebenslang bestanden hat. Athymische Nacktratten und auch athymische Nacktmäuse besitzen aus ungeklärten Gründen generell einen niedrigeren Knochenturnover gegenüber Kontrolltieren (McCAULEY et al. 1989; BUCHINSKY et al., 1995). Deshalb ist es möglich, dass sich bei Nacktratten die CsA-induzierten Skeletteffekte einfach nur langsamer entwickeln und nur eine längere Behandlung mit CsA notwendig wäre, bis sich eindeutige Knochen Veränderungen nachweisen lassen.
Die vorliegenden Ergebnisse der densitometrischen Untersuchung mit einer signifikant verminderten Knochenmasse der Tibia von männlichen CsA behandelten Ratten stimmen mit der Literatur überein (MOVSOWITZ et al., 1988; WADA et al., 2006). Ebenso der resorptionsfördernde Effekt von CsA bei männlichen Ratten wie er auch von EPSTEIN et al. (2001) und ERBEN et al. (2003) beschrieben wird.

Die weiblichen CsA behandelten Ratten weisen bei der densitometrischen und der histomorphometrischen Untersuchung einen Knochenmasseverlust auf. Die von ERBEN et al. (2003) beschriebene protektive Wirkung von CsA auf den weiblichen Knochenturnover kann somit nicht bestätigt werden.
Dass der Grund für den Knochenabbau eine eventuelle toxische Nebenwirkung zu hoher CsA-Gaben ist, wie es möglicherweise bei der Studie von KAWANA et al. (1996) der Fall ist, kann ausgeschlossen werden. KAWANA et al. (1996) gaben weiblichen Ratten über 28 Tage täglich eine orale CsA-Gabe von 15 mg/kg KGW. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren zeigten die CsA behandelten Ratten eine erhöhte Kochenresorption, so dass CsA einen Knochenverlust bei weiblichen Ratten induziert.
MOVSOWITZ et al. (1989) zeigten ebenfalls bei 10 Wochen alten Sprague-Dawley-Ratten, dass die Behandlung mit 15 mg/kg CsA über 4 Wochen die östrogenmangelbedingte Osteopenie durch eine gesteigerte Knochenresorption verstärkte.
Durch die Überprüfung des CsA-Spiegels im Vollblut sowie des unveränderten Harnstoff- und Kreatininwertes im Serum kann bestätigt werden, dass es sich bei meiner Dissertation um nicht toxische, jedoch klinisch relevante Konzentrationen handelt. Die verwendete Dosis von 5 mg/kg KGW wurde schon früher in unserer

Arbeitsgruppe angewandt und als nicht toxisch bewertet (ERBEN et al., 1998; ERBEN et al., 2003). Ebenso erzielt diese Dosierung den angestrebten entsprechenden Wirkspiegel in Posttransplantations-Patienten, um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden (EPSTEIN et al., 1996). Die weiblichen Tiere dieses Versuches liegen mit einem Gesamtmittelwert von 189,7 ± 28,5 leicht unterhalb der erwünschten 200-500 ng/ml, was aber nicht die Auslösung einer Osteopenie verhindert.
Der in dieser Arbeit beschriebene Knochenverlust bei weiblichen CsA-behandelten Ratten lässt sich nicht durch das Fehlen der α/ß-T-Lymphozyten erklären, da die Thymektomie keinen Einfluss auf den Knochenturnover hat.
Eine Erklärung dieses Phänomens sollte durch weiterführende Untersuchungen gefunden werden.

Die Fragestellungen: „Beeinflusst die α/ß-T-Zell-Depletion die Skelettwirkung von CsA?“ und „Verschwindet die Geschlechtsspezifität der Skelettwirkung von CsA nach der α/ß-T-Zell-Depletion“ kann durch diesen Versuch klar beantwortet werden. Durch die erhobenen Daten wird gezeigt, dass die α/ß-T-Zell-Depletion die Skelettwirkung von CsA bei Ratten nicht beeinflusst. Eine geschlechtsspezifische Skelettwirkung von CsA war in dieser Studie nicht nachweisbar.

5.5 Zusammenhang der CsA-Konzentration und der Osteoklastenanzahl unter In-vitro- Bedingungen

Die Ergebnisse der In-vitro-Untersuchung zeigen deutlich, dass es einen geschlechtsspezifischen Unterschied bei dem Verhältnis CsA-Konzentration zu Osteoklastenanzahl von weiblichen und männlichen Tieren gibt. Bei den Osteoklasten von männlichen Ratten verläuft das Verhältnis CsA-Konzentration zu Osteoklastenanzahl strikt umgekehrt proportional, wohingegen bei den weiblichen Tieren kaum ein Effekt sichtbar ist.
FERRON et al. (1998a, b) beschreibt ebenfalls eine geschlechtsspezifische CsA-Wirkung bei diesen In-vitro- Studien.
Mit dieser Studie kann ein weiteres Mal gezeigt werden, dass es zu gegensätzlichen Ergebnissen von In-vitro- (STEWART et al., 1986, STEWART et al. 1989) und In-

vivo-Studien (MOVSOWITZ et al., 1988; MOVSOWITZ et al. 1989) bei der Knochenwirkung von CsA kommen kann.

Es wird somit verdeutlicht, dass die Grundlagenforschung nicht ohne In-vivo Studien auskommt. Daher sollte eine integrierte Durchführung von Zellkultur und Tierversuch zur Untersuchung und weiteren Aufdeckung von Regulationsmechanismen angestrebt werden (PARFITT, 1995).

5.6 Ausblick

Die vorliegende Studie hat ein hervorragendes Tiermodell für weitere osteoimmunologische Fragestellungen hervorgebracht.
Sie konnte ebenfalls eine klare Antwort auf die Fragestellung, ob die α/ß-T-Zell-Depletion per se einen Effekt auf den Knochenturnover hat, geben. Dabei wurde klar ausgearbeitet, dass lediglich ein Mangel an Geschlechtshormonen bzw. die CsA-Einwirkung eine knochenresorptionsfördernde Wirkung hat. Der bisherig beschriebene geschlechtsspezifische Unterschied in der CsA-Wirkung konnte bei dieser Studie nicht bestätigt werden, wobei die Ursache derzeit unbekannt ist.
Inwieweit die Erkenntnis, dass α/ß-T-Lymphozyten keine Rolle bei beim Knochenturnover spielen, die Transplanatationsmedizin beeinflusst, bleibt es abzuwarten.

6 Zusammenfassung

Die Rolle der α/ß-T-Lymphozyten in der Regulation des Knochenstoffwechsels

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle von α/ß-T-Lymphozyten in der Regulation des Knochenturnovers anhand biochemischer, densitometrischer und histomorphometrischer Parameter zu untersuchen, um weitere Einblicke in die Verbindung zwischen Immunzellen und Knochenstoffwechsel zu erlangen.

In Versuch I wurde die Rolle der α/ß-T-Lymphozyten in der Pathogenese der Östrogen- und Androgenmangel-Osteopenie untersucht. Dazu waren 32 weibliche, 6 Monate alte und 32 männliche, 12 Monate alte Fischer-344-Ratten vorgesehen. Jeweils die Hälfte der Tiere wurde entweder mit einer neu etablierten Methode thymektomiert (TX) bzw. scheinoperiert (Sham-TX). Zwei Wochen nach der Operation erhielten die thymektomierten Ratten eine dreimalige intraperitoneale (i.p.) Injektion im Abstand von drei Tagen eines monoklonalen rattenspezifischen α/ß-TCR (T-Zell-Rezeptor) gerichteten IgG_1-Antikörpers (R73) (20 mg/kg Körpergewicht (KGW)). Die Sham-TX Tiere erhielten 20 mg/kg KGW eines unspezifischen murinen monoklonalen Antikörpers des gleichen Isotyps (Maus IgG_1). Die α/ß-T-Zell-Depletion wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse im peripheren Blut überprüft, wobei nur Tiere mit 0-5% „gegateter“ (für R73 positiv) Zellen als α/ß-T-Zell-depletiert angesehen wurden, alle anderen Tiere wurden von der Analyse ausgeschlossen. Drei Wochen nach der T-Zell-Depletion wurden die Tiere entweder gonadektomiert (GX) bzw. scheinoperiert (Sham-GX), wobei alle Tiere zwei Monate post-GX acht und drei Tage vor der Tötung eine Fluorochrom-Doppelmarkierung (20 mg/kg KGW Calcein; s.c.;) erhielten.

In Versuch II wurde die Rolle von α/ß-T-Lymphozyten für die Skelettwirkung von CsA, im Hinblick auf die klinische Anwendung von Cyclosporin A (CsA) bei Posttransplantations-Patienten untersucht. Dazu wurden 32 weibliche, 6 Monate alte und 32 männliche, 9 Monate alte Fischer-344-Ratten vorgesehen. Analog zu Versuch I wurde die Hälfte der Tiere entweder TX oder Sham-TX. Zwei Wochen nach der Operation erhielten die TX Ratten eine dreimalige R73 Gabe (20 mg/kg KGW; i.p.) im Abstand von drei Tagen. Die Sham-TX Tiere erhielten 20 mg/kg KGW eines

unspezifischen murinen monoklonalen Antikörpers des gleichen Isotyps (Maus IgG_1). Drei Wochen nach der T-Zell-Depletion wurden die Tiere für zwei Monate mit CsA (5 mg/kg KGW; s.c.) oder Vehikel (mittelkettige Triglyceride; s.c.) dreimal pro Woche behandelt. Alle Tiere wurden zwei Monate nach Beginn der CsA-Therapie nach einer Fluorochrom-Doppelmarkierung (s.o.) getötet.

Mit Hilfe des Tiermodells konnte klar erarbeitet werden, dass die α/ß-T-Zell-Depletion per se keinen Effekt auf den Knochenturnover hat. Die Estrogen- oder Androgenmangel induzierte Osteopenie der Ratten wurde nicht durch eine Depletion von α/ß-T-Zellen moduliert. Ebenso bleibt die Skelettwirkung von CsA durch die α/ß-T-Zell-Depletion unbeeinflusst. Die, in der Literatur beschriebene, Geschlechts-spezifität der Skelettwirkung von CsA ist konsistent mit unserer In-vitro Untersuchung, konnten jedoch nicht bei unserer In-vivo Untersuchung gezeigt werden.

Das neu etablierte Tiermodell, mit dem eine dauerhafte T-Zell-Depletion bei normalen adulten Ratten durch eine Kombination aus TX und T-Zell-Depletion mit Hilfe des R73 Antikörpers erreicht werden kann, ist auch für weitere osteoimmunologische Fragestellungen interessant.

7 Summary

The role of α/ß T lymphocytes in the regulation of bone turnover

T lymphocytes are thought to play an important role in the regulation of bone turnover. The aim of this study was to investigate the role of α/ß T lymphocytes in the regulation of bone turnover analyzed by the investigation of biochemical parameters, as well as bone histomorphometry and bone densitometry.

In the first experiment 32 six-month-old female and 32 twelf-month-old male Fisher 344 rats were either thymectomized (TX) or sham-thymectomized (Sham-TX). Beginning 2 weeks post-surgery, TX rats received 3 intraperitoneal injections (every 3 days) of 20 mg/kg per bodyweight (BW) of a monoclonal mouse anti-rat antibody directed against the rat α/ß-T cell receptor (R73). Sham-TX animals received 20 mg/kg BW of non-specific mouse IgG_1. T cell depletion was monitored by FACS analysis of peripheral blood. Rats are considered as T cell depleted with 0-5% gated cells. Non-complying animals were excluded from all subsequent analyses.

Three weeks after T cell depletion, TX and Sham-TX rats were gonadectomized (GX) or Sham-GX. Subsequently, the treated animals were sacrifized 2 months post-GX after fluorochrome double labeling (20 mg/kg BW Calcein s.c.).

In the second experiment, we examined the role of α/β T lymphocytes regarding to the skeletal effects of CsA and in regard to clinical application on posttransplantational patients. Therefore 32 six-month-old female and 32 nine-month-old male Fisher 344 rats were either TX or Sham-TX and the TX animals received R73 and Sham-TX received the non-specific mouse IgG1, similarly to the first part in experiment I.

Three weeks after T cell depletion TX and Sham-TX rats were injected subcutaneously with either vehicle or 5 mg/kg CsA three times per week. After 2 month of treatment, all rats were killed after in vivo fluorochrome labeling (20 mg/kg BW Calcein s.c.).

On basis of the new established animal model the current study has shown, that α/β T lymphocyte depletion has no effect on bone turnover. Furthermore, it provides evidence that circulating α/β T lymphocytes are not essential for the up-regulation of bone turnover and that α/β T lymphocytes do not modulate estrogen- and androgen

deficiency-induced bone loss in rats. Similarly, the skeletal effects of CsA are unaffected by α/β T lymphocyte depletion. Our in vitro findings of gender-specific effects of CsA are consistent to the existing literature while they are contrasting our in vivo result.

The newly established model has shown that a lasting T cell depletion can be achieved in normal aged rats by a combination of thymectomy and T cell depletion with a monoclonal anti TCR antibody. Therefore, this model may be of interest for further osteoimmunological studies.

8 Anhang

Tab.: 10 Knochenmineraldichte-Messung Versuch I, Teil 1/3

Total Bone Mineral Density [mg/cm³]

weibliche Ratten				
Gruppe	**L4**	**Tibia proximal**	**Tibia shaft**	**Tibia distal**
TX/OVX	660,1 ± 20,2	679,1 ± 37,9	1052,3 ± 32,6	821,4 ± 23,6
TX/Sham-OVX	733,4 ± 20,4	761,0 ± 21,4	1091,2 ± 28.0	816,8 ± 32,7
Sham-TX/OVX	683,9 ± 20,2	686,0 ± 43,7	1072,1 ± 18,6	847,6 ± 38,3
Sham-TX/Sham-OVX	739,3 ± 16,6	745,3 ± 58,8	1071,5 ± 32,6	853,0 ± 43,1
Faktor OVX	p<0,001	p=0,001	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,042
Interaktion OVX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
männliche Ratten				
Gruppe	**L4**	**Tibia proximal**	**Tibia shaft**	**Tibia distal**
TX/ORX	587,5 ± 18,2	560,0 ± 15,0	1042,3 ± 23,7	846,3 ± 54,8
TX/Sham-ORX	628,0 ± 34,6	612,0 ± 45,8	1070.6 ± 25,8	873,1 ± 37,6
Sham-TX/ORX	571,1 ± 20,1	570,0 ± 47,4	1026,7 ± 38,0	855,1 ± 62,1
Sham-TX/Sham-ORX	647,3 ± 18,2	639,4 ± 25,1	1080,8 ± 34,0	906,2 ± 34,0
Faktor ORX	p<0,001	p<0,001	p=0,005	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion OVX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 10 Knochenmineraldichte-Messung Versuch I, Teil 2/3

Trabecular Bone Mineral Density [mg/cm^3]

weibliche Ratten				
Gruppe	**L4**	**Tibia proximal**	**Tibia shaft**	**Tibia distal**
TX/OVX	483,3 ± 33,8	323,9 ± 42,3	122,7 ± 12,9	149,7 ± 42,8
TX/Sham-OVX	570,0 ± 22,9	473,5 ± 32,2	168,1 ± 45,9	167,0 ± 42,9
Sham-TX/OVX	507,4 ± 24,9	341,5 ± 59,5	134,3 ± 12,9	213,3 ± 45,0
Sham-TX/Sham-OVX	585,2 ± 24,5	472,8 ± 67,1	182,0 ± 55,7	216,7 ± 55,1
Faktor OVX	p<0,001	p<0,001	p=0,004	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,009
Interaktion OVX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

männliche Ratten				
Gruppe	**L4**	**Tibia proximal**	**Tibia shaft**	**Tibia distal**
TX/ORX	352,7 ± 23,9	186,5 ± 25,7	161,2 ± 9,1	336,7 ± 97,4
TX/Sham-ORX	395,1 ± 53,3	242,1 ± 44,5	167,0 ± 39,0	336,1 ± 97,7
Sham-TX/ORX	327,3 ± 29,8	192,7 ± 46,6	138,5 ± 31,4	279,6 ± 71,8
Sham-TX/Sham-ORX	416,1 ± 26,2	266,1 ± 24,8	187,7 ± 29,0	356,0 ± 48,0
Faktor ORX	p<0,001	p<0,001	p=0,031	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion OVX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 10 Knochenmineraldichte-Messung Versuch I, Teil 3/3

Cortical and Subcortical Bone Mineral Density [mg/cm³]

weibliche Ratten				
Gruppe	**L4**	**Tibia proximal**	**Tibia shaft**	**Tibia distal**
TX/OVX	925,3 ± 17,4	1034,2 ± 41,5	1234,0 ± 17,0	1109,8 ± 18,0
TX/Sham-OVX	978,8 ± 21,4	1048,1 ± 12,6	1248,6 ± 18,6	1094,2 ± 35,7
Sham-TX/OVX	950,1 ± 22,1	1031,2 ± 37,4	1246,0 ± 16,3	1120,3 ± 37,9
Sham-TX/Sham-OVX	971,5 ± 32,5	1018,1 ± 99,3	1233,7 ± 10,1	1125,7 ± 41,4
OVX	p=0,001	n.s.	n.s.	n.s.
TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion OVX*TX	n.s.	n.s.	p=0,035	n.s.
männliche Ratten				
Gruppe	**L4**	**Tibia proximal**	**Tibia shaft**	**Tibia distal**
TX/ORX	940,6 ± 15,8	932,9 ± 29,9	1265,9 ± 4,1	1065,0 ± 43,9
TX/Sham-ORX	977,5 ± 9,5	982,0 ± 52,2	1280,2 ± 11,3	1104,0 ± 22,7
Sham-TX/ORX	937,7 ± 11,6	947,1 ± 82,8	1267,1 ± 19,3	1102,3 ± 61,1
Sham-TX/Sham-ORX	995,5 ± 8,5	1012,4 ± 31,7	1275,7 ± 9,7	1142,4 ± 36,8
ORX	p<0,001	p=0,019	p=0,043	p=0,042
TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion ORX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 11 Statische histomorphometrische Parameter Versuch I, Teil 1/4

1. Lendenwirbel

weibliche Ratten				
Gruppe	**Bone area**	**Trabecular width**	**Trabecular number**	**Trabecular number/tissue area**
	B.AR/T.Ar [%]	**Tb.Wi [µm]**	**N.Tb/B.Ar. [no./mm²]**	**N.TB./T.AR. [no./mm²]**
TX/OVX	32,6 ± 2,0	85,6 ± 7,9	4,9 ± 0,4	2,4 ± 0,5
TX/Sham-OVX	34,9 ± 2,2	84,4 ± 6,8	5,3 ± 0,2	2,3 ± 0,6
Sham-TX/OVX	34,9 ± 2,8	83,9 ± 6,0	5,3 ± 0,4	2,1 ± 0,4
Sham-TX/Sham-OVX	36,8 ± 2,6	92,9 ± 6,8	5,1 ± 0,5	2,1 ± 0,4
Faktor OVX	p=0,044	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	p=0,042	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion OVX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

weibliche Ratten				
Gruppe	**Trabecular area**	**Trabecular number/bone area**	**Bone perimeter total**	**Trabecular separation**
	B.Ar/N.Tb [mm²]	**N.TB./B.Ar.[no./mm²]**	**Tot.Perim/T.AR [mm/mm²]**	**[µm]**
TX/OVX	0,1 ± 0,0	7,3 ± 1,5	7,7 ± 0,7	139,1 ± 14,1
TX/Sham-OVX	0,2 ± 0,1	6,6 ± 2,0	8,2 ± 0,3	123,6 ± 5,8
Sham-TX/OVX	0,2 ± 0,0	6,2 ± 2,1	8,4 ±0,7	123,7 ± 12,3
Sham-TX/Sham-OVX	0,2 ± 0,0	5,6 ± 1,1	8,0 ± 0,7	126,0 ± 15,2
Faktor OVX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion OVX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 11 Statische histomorphometrische Parameter Versuch I, Teil 2/4

1. Lendenwirbel

männliche Ratten				
Gruppe	**Bone area**	**Trabecular width**	**Trabecular number**	**Trabecular number/tissue area**
	B.AR/T.Ar [%]	**Tb.Wi [µm]**	**N.Tb/B.Ar. [no./mm²]**	**N.TB./T.AR. [no./mm²]**
TX/ORX	27,8 ± 1,4	84,0 ± 7,4	4,3 ± 0,4	1,9 ± 0,4
TX/Sham-ORX	30,6 ± 2,9	90,3 ± 3,7	4,3 ± 0,3	2,3 ± 0,3
Sham-TX/ORX	29,0 ± 4,0	90,9 ± 9,2	4,1 ± 0,3	1,9 ± 0,5
Sham-TX/Sham-ORX	32,1 ± 3,4	95,4 ± 6,0	4,3 ± 0,4	1,6 ± 0,4
Faktor ORX	p=0,038	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	p=0,046	n.s.	n.s.
Interaktion ORX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,034

männliche Ratten				
Gruppe	**Trabecular area**	**Trabecular number/bone area**	**Bone perimeter total**	**Trabecular separation**
	B.Ar/N.Tb [mm²]	**N.TB./B.Ar.[no./mm²]**	**Tot.Perim/T.AR [mm/mm²]**	**[µm]**
TX/ORX	0,15 ± 0,04	6,8 ± 1,5	6,7 ± 0,6	171,0 ± 17,8
TX/Sham-ORX	0,14 ± 0,03	7,5 ± 1,1	6,8 ± 0,5	162,0 ± 20,3
Sham-TX/ORX	0,16 ± 0,06	6,9 ± 2,2	6,4 ± 0,5	176,1 ± 21,6
Sham-TX/Sham-ORX	0,24 ± 0,08	5,0 ± 1,4	6,7 ± 0,6	160,4 ± 20,6
Faktor ORX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	p=0,039	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion ORX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 11 Statische histomorphometrische Parameter Versuch I, Teil 3/4

Tibia

weibliche Ratten				
Gruppe	**Bone area**	**Trabecular width**	**Trabecular number**	**Trabecular number/tissue area**
	B.AR/T.Ar [%]	**Tb.Wi [µm]**	**N.Tb/B.Ar. [no./mm²]**	**N.TB./T.AR. [no./mm²]**
TX/OVX	19,0 ± 2,3	78,8 ± 4,9	3,1 ± 0,4	3,7 ± 0,3
TX/Sham-OVX	33,0 ± 3,5	93,1 ± 6,3	4,5 ± 0,2	2,8 ± 0,4
Sham-TX/OVX	19,8 ± 4,6	75,9 ± 6,4	3,3 ± 0,6	4,2 ± 0,7
Sham-TX/Sham-OVX	26,8 ± 6,3	84,6 ± 8,4	4,0 ± 0,6	3,7 ± 0,7
Faktor OVX	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p=0,009
Faktor TX	n.s.	p=0,044	n.s.	p=0,009
Interaktion OVX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

weibliche Ratten				
Gruppe	**Trabecular area**	**Trabecular number/bone area**	**Bone perimeter total**	**Trabecular separation**
	B.Ar/N.Tb [mm²]	**N.TB./B.Ar. [no./mm²]**	**Tot.Perim/T.AR [mm/mm²]**	**[µm]**
TX/OVX	0,05 ± 0,00	19,5 ± 1,9	4,8 ± 0,7	267,7 ± 40,8
TX/Sham-OVX	0,12 ± 0,02	8,8 ± 1,8	7,1 ± 0,3	150,1 ± 15,0
Sham-TX/OVX	0,05 ± 0,02	22,3 ± 5,9	5,2 ± 0,9	251,9 ± 62,6
Sham-TX/Sham-OVX	0,08 ± 0,03	15,0 ± 5,7	6,3 ± 1,0	189,4 ± 46,2
Faktor OVX	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Faktor TX	p=0,039	p=0,024	n.s.	n.s.
Interaktion OVX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 11 Statische histomorphometrische Parameter Versuch I, Teil 4/4

Tibia

männliche Ratten				
Gruppe	**Bone area**	**Trabecular width**	**Trabecular number**	**Trabecular number/tissue area**
	B.AR/T.Ar [%]	**Tb.Wi [µm]**	**N.Tb/B.Ar. [no./mm²]**	**N.TB./T.AR. [no./mm²]**
TX/ORX	11,8 ± 3,8	78,9 ± 4,2	1,9 ± 0,6	2,4 ± 0,4
TX/Sham-ORX	10,3 ± 3,6	79,3 ± 12,2	1,6 ± 0,5	2,3 ± 0,8
Sham-TX/ORX	11,3 ± 2,7	82,4 ± 8,9	1,9 ± 0,4	2,5 ± 0,6
Sham-TX/Sham-ORX	11,7 ± 4,7	74,7 ± 9,7	2,0 ± 0,7	2,6 ± 0,5
Faktor ORX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion ORX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

männliche Ratten				
Gruppe	**Trabecular area**	**Trabecular number/bone area**	**Bone perimeter total**	**Trabecular separation**
	B.Ar/N.Tb [mm²]	**N.TB./B.Ar.[no./mm²]**	**Tot.Perim/T.AR [mm/mm²]**	**[µm]**
TX/ORX	0,05 ± 0,01	21,5 ± 5,5	3,0 ± 1,0	517,8 ± 221,5
TX/Sham-ORX	0,05 ± 0,01	24,1 ± 9,4	2,6 ± 0,8	624,8 ± 299,9
Sham-TX/ORX	0,05 ± 0,01	22,7 ± 5,4	2,8 ± 0,7	551,3 ± 208,8
Sham-TX/Sham-ORX	0,04 ± 0,02	25,5 ± 9,0	3,1 ± 1,1	509,1 ± 207,2
Faktor ORX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion ORX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 12 Biochemische Parameter des Serum Versuch I und Körpergewicht, Teil 1/2

weibliche Ratten						
Gruppe	**AST [U/l]**	**ALP [U/l]**	**Bili [µmol/l]**	**CK [U/l]**	**ALB [g/l]**	**KGW [g]**
TX/OVX	102,1 ± 13,4	118,3 ± 39,7	1,4 ± 0,8	317,3 ± 101,3	36,4 ± 0,9	220,5 ± 11,6
TX/Sham-OVX	89,8 ± 10,9	61,0 ± 12,7	1,5 ± 0,6	471,0 ± 191,7	41,3 ± 3,6	202,6 ± 12,0
Sham-TX/OVX	133,0 ± 33,0	120,0 ± 25,0	1,4 ± 0,4	389,7 ± 83,4	37,4 ± 1,5	221,9 ± 15,4
Sham-TX/Sham-OVX	99,6 ± 9,0	63,4 ± 15,9	1,3 ± 0,5	419,4 ± 116,2	41,2 ± 4,8	210,4 ± 5,1
Faktor OVX	p=0,09	p<0,001	n.s.	n.s.	p=0,002	p=0,004
Faktor TX	p=0,018	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion OVX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

weibliche Ratten						
Gruppe	**Urea [mmol/l]**	**Crea [µmol/l]**	**P [mmol/l]**	**Na [mmol/l]**	**K [mmol/l]**	**Ca [mmol/l]**
TX/OVX	9,3 ± 1,5	22,7 ± 2,3	1,4 ± 0,1	143,4 ± 2,8	4,2 ± 0,3	2,37 ± 0,06
TX/Sham-OVX	8,2 ± 0,7	26,6 ± 3,9	1,5 ± 0,3	142,0 ± 2,0	4,0 ± 0,3	2,44 ± 0,04
Sham-TX/OVX	8,4 ± 0,9	25,3 ± 2,9	1,5 ± 0,2	143,7 ± 2,3	4,6 ± 0,7	2,39 ± 0,06
Sham-TX/Sham-OVX	8,3 ± 1,1	28,8 ± 4,1	1,5 ± 0,3	143,0 ± 6,7	4,3 ±0,4	2,46 ± 0,13
Faktor OVX	n.s.	p=0,01	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,047
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion OVX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 12 Biochemische Parameter des Serum Versuch I und Körpergewicht, Teil 2/2

männliche Ratten						
Gruppe	**AST [U/l]**	**ALP [U/l]**	**Bili [µmol/l]**	**CK [u/l]**	**ALB [g/l]**	**KGW [g]**
TX/ORX	116,8 ± 16,3	104,0 ± 21,5	1,6 ± 0,3	490,8 ± 163,8	40,7 ± 1,4	450,0 ± 26,0
TX/Sham-ORX	132,6 ± 37,2	94,6 ± 19,2	1,2 ± 0,3	535,6 ± 209,1	39,0 ± 4,5	435,6 ± 16,1
Sham-TX/ORX	138,2 ± 30,2	109,0 ± 14,6	1,8 ± 0,8	412,6 ± 189,7	40,6 ± 4,4	450,8 ± 29,2
Sham-TX/Sham-ORX	125,6 ± 29,7	105,3 ± 23,3	1,6 ± 0,4	412,1 ± 113,6	40,4 ± 2,0	428,5 ±22,7
Faktor ORX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion ORX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

männliche Ratten						
Gruppe	**Urea [mmol/l]**	**Crea [µmol/l]**	**P [mmol/l]**	**Na [mmol/l]**	**K [mmol/l]**	**Ca [mmol/l]**
TX/ORX	7,6 ± 0,7	33,6 ± 3,2	1,7 ± 0,2	139,3 ± 2,0	4,5 ± 0,4	2,5 ± 0,1
TX/Sham-ORX	7,6 ± 0,9	32,0 ± 2,3	1,6 ± 0,2	141,5 ± 1,8	4,6 ± 0,6	2,5 ± 0,0
Sham-TX/ORX	8,0 ± 0,7	35,4 ± 4,3	1,7 ± 0,2	141,3 ± 1,4	4,6 ± 0,6	2,5 ± 0,1
Sham-TX/Sham-ORX	6,8 ± 0,7	31,1 ± 2,9	1,6 ± 0,2	138,7 ± 3,1	4,2 ± 0,5	2,4 ± 0,1
Faktor ORX	n.s.	p=0,046	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion ORX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,015	n.s.	n.s.

Tab.: 13 Biochemische Parameter des Urins Versuch I, Teil 1/4

Urin Baseline

weibliche Ratten					
Gruppe	**Crea [mmol/l]**	**P/Crea [mmol/mmol]**	**Na/Crea [mmol/mmol]**	**K/Crea [mmol/mmol]**	**Ca/Crea [mmol/mmol]**
TX/OVX	4,0 ± 1,9	4,5 ± 2,3	4,0 ± 3,2	22,5 ± 5,6	1,1 ± 0,8
TX/Sham-OVX	5,2 ± 1,9	4,2 ± 0,6	3,0 ± 1,5	26,6 ± 6,5	1,1 ± 0,2
Sham-TX/OVX	3,7 ± 1,9	4,4 ± 1,4	1,8 ± 1,0	20,3 ± 2,9	0,9 ± 0,4
Sham-TX/Sham-OVX	4,2 ± 3,2	4,5 ± 0,8	2,8 ± 2,1	21,6 ± 5,5	0,8 ± 0,4
Faktor OVX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion OVX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

männliche Ratten					
Gruppe	**Crea [mmol/l]**	**P/Crea [mmol/mmol]**	**Na/Crea [mmol/mmol]**	**K/Crea [mmol/mmol]**	**Ca/Crea [mmol/mmol]**
TX/ORX	8,7 ± 1,9	2,7 ± 1,0	2,6 ± 2,0	14,8 ± 3,5	0,3 ± 0,2
TX/Sham-ORX	11,1 ± 4,2	3,3 ± 0,6	2,2 ± 1,6	14,9 ± 2,7	0,3 ± 0,1
Sham-TX/ORX	7,4 ± 3,0	2,3 ± 0,9	3,5 ± 2,0	18,0 ± 3,0	0,3 ± 0,1
Sham-TX/Sham-ORX	11,7 ± 3,3	2,7 ± 0,9	2,8 ± 2,0	15,4 ± 2,9	0,2 ± 0,1
Faktor ORX	p=0,016	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion OVX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 13 Biochemische Parameter des Urins Versuch I, Teil 2/4

Urin prä Gonadektomie

weibliche Ratten					
Gruppe	**Crea [mmol/l]**	**P/Crea [mmol/mmol]**	**Na/Crea [mmol/mmol]**	**K/Crea [mmol/mmol]**	**Ca/Crea [mmol/mmol]**
TX/OVX	2,6 ± 1,1	2,7 ± 1,3	4,1 ± 2,3	27,5 ± 17,2	2,0 ± 1,8
TX/Sham-OVX	4,8 ± 1,7	2,9 ± 1,6	5,0 ± 1,7	18,3 ± 1,7	0,6 ± 0,3
Sham-TX/OVX	4,1 ± 1,6	3,5 ± 1,9	2,6 ± 1,5	20,4 ± 6,2	0,8 ± 0,3
Sham-TX/Sham-OVX	4,4 ± 2,8	4,7 ± 1,6	3,0 ± 1,8	17,8 ± 3,7	0,9 ± 0,3
Faktor TX	n.s.	n.s.	p=0,022	n.s.	n.s.

männliche Ratten					
Gruppe	**Crea [mmol/l]**	**P/Crea [mmol/mmol]**	**Na/Crea [mmol/mmol]**	**K/Crea [mmol/mmol]**	**Ca/Crea [mmol/mmol]**
TX/ORX	7,8 ± 4,3	2,3 ± 0,5	5,0 ± 3,1	18,3 ± 3,5	0,6 ± 0,3
TX/Sham-ORX	7,0 ± 3,0	2,5 ± 0,7	4,1 ± 2,3	18,4 ± 3,2	0,7 ± 0,2
Sham-TX/ORX	6,5 ± 2,4	2,5 ± 2,3	3,5 ± 2,0	16,2 ± 2,0	0,4 ± 0,3
Sham-TX/Sham-ORX	12,1 ± 2,6	1,9 ± 0,8	2,7 ± 0,8	15,6 ± 2,4	0,4 ± 0,2
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,029	p=0,048

Tab.: 13 Biochemische Parameter des Urins Versuch I, Teil 3/4

Urin 1 Monat post OP

weibliche Ratten					
Gruppe	**Crea [mmol/l]**	**P/Crea [mmol/mmol]**	**Na/Crea [mmol/mmol]**	**K/Crea [mmol/mmol]**	**Ca/Crea [mmol/mmol]**
TX/OVX	4,9 ± 1,4	0,5 ± 0,3	25,1 ± 7,0	43,4 ± 9,1	1,8 ± 0,6
TX/Sham-OVX	5,7 ± 2,2	4,1 ± 1,0	2,7 ± 1,0	22,8 ± 3,0	0,8 ± 0,2
Sham-TX/OVX	4,6 ± 0,6	1,4 ± 1,3	25,0 ± 11,2	51,6 ± 13,3	2,8 ± 0,6
Sham-TX/Sham-OVX	4,6 ± 2,6	3,1 ± 1,5	2,6 ± 1,1	25,6 ± 6,0	1,0 ± 0,2
Faktor OVX	n.s.	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,003
Interaktion OVX*TX	n.s.	p=0,047	n.s.	n.s.	p=0,044

männliche Ratten					
Gruppe	**Crea [mmol/l]**	**P/Crea [mmol/mmol]**	**Na/Crea [mmol/mmol]**	**K/Crea [mmol/mmol]**	**Ca/Crea [mmol/mmol]**
TX/ORX	8,6 ± 3,6	4,2 ± 1,4	4,2 ± 1,6	17,6 ± 2,4	1,0 ± 0,3
TX/Sham-ORX	8,3 ± 2,3	4,2 ± 0,7	2,3 ± 0,9	16,8 ± 2,7	0,4 ± 0,2
Sham-TX/ORX	8,5 ± 1,6	3,3 ± 1,1	3,9 ± 1,5	15,5 ± 1,6	0,7 ± 0,3
Sham-TX/Sham-ORX	12,2 ± 6,3	3,3 ± 0,9	2,1 ± 1,1	13,3 ± 3,5	0,3 ± 0,1
Faktor ORX	n.s.	n.s.	p=0,002	n.s.	p<0,001
Faktor TX	n.s.	p=0,042	n.s.	p=0,016	n.s.
Interaktion OVX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 13 Biochemische Parameter des Urins Versuch I, Teil 4/4

Urin Final

weibliche Ratten						
Gruppe	**Crea [mmol/l]**	**P/Crea [mmol/mmol]**	**Na/Crea [mmol/mmol]**	**K/Crea [mmol/mmol]**	**Ca/Crea [mmol/mmol]**	**DPD [nmol/mmol]**
TX/OVX	5,9 ± 1,8	2,1 ± 1,2	10,0 ±8,8	30,1 ± 21,1	2,2 ± 1,3	56,8 ± 20,4
TX/Sham-OVX	13,8 ± 7,7	2,6 ± 1,7	3,5 ± 3,0	21,6 ± 10,1	1,2 ± 0,6	45,1 ± 26,8
Sham-TX/OVX	6,4 ± 2,6	2,5 ± 1,4	10,1 ± 5,8	28,4 ± 8,6	2,5 ± 1,1	52,6 ± 30,6
Sham-TX/Sham-OVX	4,1 ± 1,3	4,6 ± 1,2	4,6 ± 5,7	23,9 ± 11,8	1,6 ± 0,6	16,8 ± 7,1
Faktor OVX	p=0,064	p=0,027	p=0,022	n.s.	p=0,016	p=0,017
Faktor TX	p=0,005	p=0,044	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion OVX*TX	p=0,002	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

männliche Ratten						
Gruppe	**Crea [mmol/l]**	**P/Crea [mmol/mmol]**	**Na/Crea [mmol/mmol]**	**K/Crea [mmol/mmol]**	**Ca/Crea [mmol/mmol]**	**DPD [nmol/mmol]**
TX/ORX	5,6 ± 0,7	2,7 ± 0,9	4,5 ± 2,0	16,9 ± 3,0	1,1 ± 0,3	61,0 ± 5,2
TX/Sham-ORX	6,6 ± 2,5	2,9 ± 0,8	2,6 ± 1,2	17,5 ± 2,1	0,4 ± 0,1	40,0 ± 24,0
Sham-TX/ORX	7,3 ± 2,0	2,8 ± 0,6	4,1 ± 0,9	18,4 ± 2,3	0,9 ± 0,2	69,2 ± 17,7
Sham-TX/Sham-ORX	9,2 ± 3,5	2,1 ± 1,0	1,5 ± 0,9	14,3 ± 2,3	0,3 ± 0,1	46,2 ± 19,7
Faktor ORX	n.s.	n.s.	p≤0,001	n.s.	p<0,001	p=0,007
Faktor TX	p=0,044	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,05	n.s.
Interaktion OVX*TX	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,023	n.s.	n.s.

Tab.: 14 Knochenmineraldichte-Messung Versuch II, Teil 1/3

Total Bone Mineral Density [mg/cm³]

weibliche Ratten				
Gruppe	**L4**	**Tibia proximal**	**Tibia shaft**	**Tibia distal**
TX/CsA	745,4 ± 22,1	777,0 ± 34,5	1098,7 ± 25,2	858,5 ± 40,0
TX/Vehikel-CsA	760,3 ± 13,1	813,5 ± 33,1	1099,8 ± 18,1	837,3 ± 44,2
Sham-TX/CsA	739,0 ± 25,7	759,0 ± 30,6	1083,7 ± 29,2	821,5 ± 30,7
Sham-TX/Vehikel-CsA	760,4 ± 16,5	800,6 ± 16,1	1094,1 ± 19,4	872,6 ± 29,2
Faktor CsA	p=0,031	p=0,002.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s	n.s.	n.s.
Interaktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,013

männliche Ratten				
Gruppe	**L4**	**Tibia proximal**	**Tibia shaft**	**Tibia distal**
TX/CsA	633,1 ± 20,6	582,8 ± 21,7	1058,6 ± 56,8	867,0 ± 37,8
TX/Vehikel-CsA	636,5 ± 36,6	633,5 ± 12,3	1073,1 ± 20,0	839,7 ± 54,8
Sham-TX/CsA	622,9 ± 27,6	587,4 ± 19,4	1069,2 ± 33,8	856,7 ± 30,6
Sham-TX/Vehikel-CsA	637,5 ± 21,0	611,6 ± 32,8	1077,0 ± 22,1	862,7 ± 28,7
Faktor CsA	n.s.	p=0,001	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 14 Knochenmineraldichte-Messung Versuch II, Teil 2/3

Trabecular Bone Mineral Density [mg/cm^3]

weibliche Ratten				
Gruppe	**L4**	**Tibia proximal**	**Tibia shaft**	**Tibia distal**
TX/CsA	579,3 ± 26,3	504,6 ± 47,3	174,7 ± 31,6	221,3 ± 51,2
TX/Vehikel-CsA	599,2 ± 20,7	548,7 ± 41,7	154,4 ± 31,8	182,9 ± 70,6
Sham-TX/CsA	572,9 ± 41,6	478,4 ± 48,9	177,2 ± 35,2	155,8 ± 30,7
Sham-TX/Vehikel-CsA	605,1 ± 17,9	523,9 ± 26,1	191,4 ± 27,3	239,3 ± 44,0
Faktor CsA	p=0,05	p=0,01	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,003

männliche Ratten				
Gruppe	**L4**	**Tibia proximal**	**Tibia shaft**	**Tibia distal**
TX/CsA	405,8 ± 25,5	252,1 ± 27,9	136,0 ± 30,4	332,6 ± 33,9
TX/Vehikel-CsA	399,0 ± 39,8	274,0 ± 34,6	177,1 ± 21,2	324,0 ± 88,3
Sham-TX/CsA	403,7 ± 49,5	268,1 ± 43,1	184,7 ± 58,7	334,4 ± 44,4
Sham-TX/Vehikel-CsA	403,0 ± 27,9	266,2 ± 35,4	179,8 ± 26,0	321,3 ± 73,9
Faktor CsA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 14 Knochenmineraldichte-Messung Versuch II, Teil 3/3

Cortical and Subcortical Bone Mineral Density [mg/cm³]

weibliche Ratten				
Gruppe	**L4**	**Tibia proximal**	**Tibia shaft**	**Tibia distal**
TX/CsA	994,4 ± 24,8	1049,2 ± 24,8	1249,0 ± 14,9	1131,5 ± 36,8
TX/Vehikel-CsA	1003,2 ± 21,5	1078,6 ± 26,2	1254,6 ± 13,3	1118,0 ± 35,3
Sham-TX/CsA	988,2 ± 20,5	1039,5 ± 21,1	1247,8 ± 8,4	1107,8 ± 35,5
Sham-TX/ Vehikel-CsA	994,0 ± 17,7	1077,4 ± 16,5	1247,6 ± 6,1	1144,7 ± 27,3
Faktor CsA	n.s.	p=0,001	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

männliche Ratten				
Gruppe	**L4**	**Tibia proximal**	**Tibia shaft**	
TX/CsA	974,3 ±24,5	913,7 ± 20,7	1273,2 ± 19,3	1096,7 ± 59,2
TX/Vehikel-CsA	994,5 ± 32,8	993,4 ± 19,8	1263,0 ± 7,8	1061,1 ± 42,2
Sham-TX/CsA	952,9 ± 24,6	906,5 ± 49,7	1271,0 ± 8,6	1080,3 ± 38,8
Sham-TX/ Vehikel-CsA	989,7 ± 14,8	956,9 ± 47,6	1272,2 ± 13,9	1095,9 ± 22,0
Faktor CsA	p=0,007	p=0,001	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 15 Statische histomorphometrische Parameter Versuch II, Teil 1/4

1. Lendenwirbel

weibliche Ratten				
Gruppe	**Bone area**	**Trabecular width**	**Trabecular number**	**Trabecular number/tissue area**
	B.AR/T.Ar [%]	**Tb.Wi [µm]**	**N.Tb/B.Ar. [no./mm²]**	**N.TB./T.AR. [no./mm²]**
TX/CsA	36,4 ± 3,7	85,4 ± 8,1	5,4 ± 0,3	2,4 ± 0,4
TX/Vehikel-CsA	38,1 ± 2,1	92,9 ± 7,3	5,3 ± 0,5	1,6 ± 0,2
Sham-TX/CsA	36,8 ± 1,9	110,6 ± 69,8	5,0 ± 1,4	2,2 ± 0,5
Sham-TX/Vehikel-CsA	37,1 ± 2,5	89,3 ± 3.0	5,3 ± 0,2	2,0 ± 0,3
Faktor Csa	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,004
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ineraktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

weibliche Ratten				
Gruppe	**Trabecular area**	**Trabecular number/bone area**	**Bone perimeter total**	**Trabecular separation**
	B.Ar/N.Tb [mm²]	**N.TB./B.Ar.[no./mm²]**	**Tot.Perim/T.AR [mm/mm²]**	**[µm]**
TX/CsA	0,20 ± 0,04	6,6 ± 1,7	8,5 ± 0,5	117,6 ± 10,7
TX/Vehikel-CsA	0,17 ± 0,05	4,2 ± 0,3	8,3 ± 0,7	118,6 ± 12,0
Sham-TX/CsA	0,24 ± 0,01	6,1 ± 1,4	7,9 ± 2,2	153,6 ± 111,6
Sham-TX/Vehikel-CsA	0,16 ± 0,05	5,4 ± 1,1	8,3 ± 0,4	119,1 ± 10,1
Faktor Csa	p=0,004	p=0,006	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ineraktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 15 Statische histomorphometrische Parameter Versuch II, Teil 2/4

1. Lendenwirbel

männliche Ratten				
Gruppe	**Bone area**	**Trabecular width**	**Trabecular number**	**Trabecular number/tissue area**
	B.AR/T.Ar [%]	**Tb.Wi [µm]**	**N.Tb/B.Ar. [no./mm²]**	**N.TB./T.AR. [no./mm²]**
TX/CsA	28,3 ± 1,5	86,7 ± 4,5	4,2 ± 0,3	1,7 ± 0,1
TX/Vehikel-CsA	32,0 ± 3,8	92,9 ± 6,7	4,4 ± 0,4	2,0 ± 0,3
Sham-TX/CsA	30,9 ± 2,1	92,7 ± 5,3	4,2 ± 0,2	1,8 ± 0,4
Sham-TX/Vehikel-CsA	31,8 ± 3,6	93,9 ± 7,3	4,3 ± 0,2	1,7 ± 0,4
Faktor Csa	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ineraktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

männliche Ratten				
Gruppe	**Trabecular area**	**Trabecular number/bone area**	**Bone perimeter total**	**Trabecular separation**
	B.Ar/N.Tb [mm²]	**N.TB./B.Ar.[no./mm²]**	**Tot.Perim/T.AR [mm/mm²]**	**[µm]**
TX/CsA	0,2 ± 0,0	5,9 ± 0,7	6,5 ± 0,4	173,5 ± 13,6
TX/Vehikel-CsA	0,2 ± 0,0	6,5 ± 1,6	6,9 ± 0,6	156,8 ± 22,3
Sham-TX/CsA	0,2 ± 0,0	6,0 ± 1,5	6,7 ± 0,4	163,6 ± 11,7
Sham-TX/Vehikel-CsA	0,2 ± 0,1	5,4 ± 1,6	6,8 ± 0,4	158,9 ± 15,9
Faktor Csa	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ineraktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 15 Statische histomorphometrische Parameter Versuch II, Teil 3/4

Tibia

weibliche Ratten				
Gruppe	**Bone area**	**Trabecular width**	**Trabecular number**	**Trabecular number/tissue area**
	B.AR/T.Ar [%]	**Tb.Wi [µm]**	**N.Tb/B.Ar. [no./mm²]**	**N.TB./T.AR. [no./mm²]**
TX/CsA	29,8 ± 5,6	80,6 ± 4,1	4,7 ± 0,8	3,3 ± 0,5
TX/Vehikel-CsA	34,4 ± 3,8	93,1 ± 9,8	4,7 ± 0,1	3,0 ± 1,1
Sham-TX/CsA	28,6 ± 3,1	78,7 ± 5,8	4,6 ± 0,4	4,2 ± 0,6
Sham-TX/Vehikel-CsA	31,5 ± 4,6	84,7 ± 9,1	4,7 ± 0,4	3,5 ± 0,9
Faktor Csa	p=0,036	p=0,003	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,026
Ineraktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

weibliche Ratten				
Gruppe	**Trabecular area**	**Trabecular number/bone area**	**Bone perimeter total**	**Trabecular separation**
	B.Ar/N.Tb [mm²]	**N.TB./B.Ar.[no./mm²]**	**Tot.Perim/T.AR [mm/mm²]**	**[µm]**
TX/CsA	0,09 ± 0,02	11,5 ± 3,4	7,4 ± 1,2	155,4 ± 40,3
TX/Vehikel-CsA	0,13 ± 0,08	9,2 ± 4,4	7,4 ± 0,1	139,5 ± 9,1
Sham-TX/CsA	0,07 ± 0,02	14,8 ± 3,2	7,3 ± 0,7	155,7 ± 20,5
Sham-TX/Vehikel-CsA	0,09 ± 0,04	11,9 ± 4,7	7,4 ± 0,7	146,8 ± 22,0
Faktor Csa	p=0,037	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ineraktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 15 Statische histomorphometrische Parameter Versuch II, Teil 4/4

Tibia

männliche Ratten				
Gruppe	**Bone area**	**Trabecular width**	**Trabecular number**	**Trabecular number/tissue area**
	B.AR/T.Ar [%]	**Tb.Wi [µm]**	**N.Tb/B.Ar. [no./mm²]**	**N.TB./T.AR. [no./mm²]**
TX/CsA	10,9 ± 1,2	69,5 ± 7,8	2,0 ± 0,3	3,2 ± 0,4
TX/Vehikel-CsA	11,2 ± 3,0	79,3 ± 8,9	1,8 ± 0,6	2,8 ± 1,0
Sham-TX/CsA	12,3 ± 4,5	70,8 ± 7,9	2,2 ± 0,7	3,3 ± 0,7
Sham-TX/Vehikel-CsA	11,6 ± 2,1	72,3 ± 7,5	2,0 ± 0,2	3,4 ± 0,4
Faktor Csa	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ineraktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

männliche Ratten				
Gruppe	**Trabecular area**	**Trabecular number/bone area**	**Bone perimeter total**	**Trabecular separation**
	B.Ar/N.Tb [mm²]	**N.TB./B.Ar.[no./mm²]**	**Tot.Perim/T.AR [mm/mm²]**	**[µm]**
TX/CsA	0,03 ± 0,01	29,6 ± 4,4	3,2 ± 0,5	451,1 ± 72,8
TX/Vehikel-CsA	0,04 ± 0,01	25,1 ± 5,4	2,9 ± 0,9	533,5 ± 207,4
Sham-TX/CsA	0,03 ± 0,03	29,1 ± 8,2	3,5 ± 1,1	439,1 ± 144,4
Sham-TX/Vehikel-CsA	0,03 ± 0,01	30,0 ± 5,3	3,2 ± 0,4	441,9 ± 65,3
Faktor Csa	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ineraktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 16 Biochemische Parameter des Serum Versuch II und Körpergewicht, Teil 1/2

weibliche Ratten						
Gruppe	**AST [U/l]**	**ALP [U/l]**	**Bili [µmol/l]**	**CK [U/l]**	**ALB [g/l]**	**KGW [g]**
TX/CsA	114,1 ± 44,2	61,4 ± 5,2	1,6 ± 0,3	504,6 ± 53,5	40,2 ± 2,9	210,3 ± 8,8
TX/Vehikel-CsA	92,6 ± 12,6	52,8 ± 6,4	1,5 ± 0,5	399,4 ± 77,0	41,6 ± 1,4	208,6 ± 8,1
Sham-TX/CsA	159,8 ±47,2	59,1 ± 8,4	1,9 ± 0,7	466,5 ± 56,5	41,3 ± 2,0	207,0 ± 8,3
Sham-TX/Vehikel-CsA	101,3 ± 6,4	69,38 ± 11,7	1,2 ± 0,4	423,0 ± 76,9	42,0 ± 1,7	204,9 ± 13,5
Faktor Csa	p=0,006	n.s.	n.s.	p=0,007	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	p=0,042	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ineraktion CsA*TX	n.s.	p=0,009	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

weibliche Ratten						
Gruppe	**Urea [mmol/l]**	**Crea [µmol/l]**	**P [mmol/l]**	**Na [mmol/l]**	**K [mmol/l]**	**Ca [mmol/l]**
TX/CsA	8,0 ± 1,1	27,6 ± 2,7	1,6 ± 0,2	144,9 ± 3,5	3,9 ±0,3	2,5 ± 0,1
TX/Vehikel-CsA	8,1 ± 1,2	27,6 ± 1,1	1,4 ± 0,1	144,6 ± 1,8	3,9 ± 0,1	2,5 ± 0,0
Sham-TX/CsA	8,2 ± 1,1	27,2 ± 2,5	1,5 ± 0,1	145,2 ± 2,0	3,9 ± 0,1	2,5 ± 0,1
Sham-TX/Vehikel-CsA	7,8 ± 1,2	26,9 ± 1,2	1,7 ± 0,3	145,1 ± 2,1	3,9 ± 0,3	2,5 ± 0,1
Faktor Csa	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ineraktion CsA*TX	n.s.	n.s.	p=0,023	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 16 Biochemische Parameter des Serum Versuch II und Körpergewicht, Teil 2/2

männliche Ratten						
Gruppe	**AST [U/l]**	**ALP [U/l]**	**Bili [µmol/l]**	**CK [U/l]**	**ALB [g/l]**	**KGW [g]**
TX/CsA	186,8 ± 60,9	94,2 ± 15,0	2,1 ± 0,5	603,4 ± 153,0	40,7 ± 0,8	442,0 ± 9,2
TX/Vehikel-CsA	182,4 ± 44,2	95,6 ± 12,1	2,1 ± 0,4	453,4 ± 58,1	41,7 ± 2,4	431,4 ± 24,3
Sham-TX/CsA	189,2 ± 38,4	105,2 ± 8,0	1,7 ± 0,4	593,1 ± 146,7	40,0 ± 1,8	434,3 ± 27,4
Sham-TX/Vehikel-CsA	130,5 ± 13,6	105,8 ± 18,4	1,2 ± 0,5	552,3 ± 109,0	40,9 ± 1,2	434,4 ± 23,3
Faktor Csa	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	p=0,002	n.s.	n.s.	n.s.
Ineraktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

männliche Ratten						
Gruppe	**Urea [mmol/l]**	**Crea [µmol/l]**	**P [mmol/l]**	**Na [mmol/l]**	**K [mmol/l]**	**Ca [mmol/l]**
TX/CsA	7,9 ± 0,6	32,0 ± 3,5	1,7 ± 0,1	139,5 ± 0,7	4,2 ± 0,1	2,4 ± 0,2
TX/Vehikel-CsA	7,0 ± 0,6	34,2 ± 2,2	1,8 ± 0,3	141,3 ± 1,4	4,1 ± 0,2	2,5 ± 0,0
Sham-TX/CsA	8,0 ± 0,9	30,5 ± 3,4	1,8 ± 0,0	138,6 ± 4,6	4,6 ± 0,7	2,4 ± 0,1
Sham-TX/Vehikel-CsA	7,0 ± 0,7	30,1 ± 2,0	1,8 ± 0,2	137,2 ± 1,3	4,4 ± 0,4	2,4 ± 0,0
Faktor Csa	p=0,002	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	p=0,022	n.s.	p=0,035	n.s.	n.s.
Ineraktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 17 Biochemische Parameter des Urins Versuch II, Teil 1/4

Urin Baseline

weibliche Ratten					
Gruppe	**Crea [mmol]**	**P/Crea [mmol/mmol]**	**Na/Crea [mmol/mmol]**	**K/Crea [mmol/mmol]**	**Ca/Crea [mmol/mmol]**
TX/CsA	5,4 ± 2,8	3,6 ± 1,9	4,1 ± 3,4	23,6 ± 4,7	0,8 ± 0,3
TX/Vehikel-CsA	4,5 ± 2,3	4,4 ± 1,1	3,0 ± 2,2	24,0 ± 4,0	0,9 ± 0,3
Sham-TX/CsA	4,4 ± 2,9	4,8 ± 1,4	3,8 ± 1,3	23,2 ± 8,4	0,9 ± 0,6
Sham-TX/Vehikel-CsA	3,4 ± 1,6	4,6 ± 1,0	2,7 ± 1,0	20,3 ± 3,8	0,7 ± 0,2
Faktor Csa	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

männliche Ratten					
Gruppe	**Crea [mmol]**	**P/Crea [mmol/mmol]**	**Na/Crea [mmol/mmol]**	**K/Crea [mmol/mmol]**	**Ca/Crea [mmol/mmol]**
TX/CsA	10,3 ± 4,1	2,7 ± 0,8	2,3 ± 1,3	17,9 ± 3,7	0,2 ± 0,1
TX/Vehikel-CsA	8,2 ± 0,6	3,1 ± 0,7	2,9 ± 1,6	16,2 ± 3,0	0,2 ± 0,1
Sham-TX/CsA	9,6 ± 3,7	2,8 ± 0,8	3,2 ± 1,5	15,8 ± 2,1	0,2 ± 0,1
Sham-TX/Vehikel-CsA	10,9 ± 1,9	3,1 ± 0,7	4,5 ± 5,6	15,5 ± 2,5	0,2 ± 0,1
Faktor Csa	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 17 Biochemische Parameter des Urins Versuch II, Teil 2/4

Urin prä CsA-Behandlung

weibliche Ratten					
Gruppe	**Crea [mmol/l]**	**P/Crea [mmol/mmol]**	**Na/Crea [mmol/mmol]**	**K/Crea [mmol/mmol]**	**Ca/Crea [mmol/mmol]**
TX/CsA	5,9 ± 6,4	3,2 ± 1,2	7,7 ± 8,7	27,6 ± 13,6	1,2 ± 0,7
TX/Vehikel-CsA	4,3 ± 0,9	2,1 ± 0,9	6,9 ± 3,1	28,4 ± 4,1	1,2 ± 0,4
Sham-TX/CsA	4,4 ± 1,5	3,6 ± 1,4	2,9 ± 2,7	23,4 ± 5,8	1,1 ± 0,6
Sham-TX/Vehikel-CsA	2,8 ± 0,8	4,0 ± 1,7	5,4 ± 2,5	26,3 ± 5,5	1,3 ± 0,3
Faktor TX	n.s.	p=0,037	n.s.	n.s.	n.s.

männliche Ratten					
Gruppe	**Crea [mmol/l]**	**P/Crea [mmol/mmol]**	**Na/Crea [mmol/mmol]**	**K/Crea [mmol/mmol]**	**Ca/Crea [mmol/mmol]**
TX/CsA	6,4 ± 0,6	2,5 ± 0,8	3,6 ± 2,2	21,0 ± 3,0	0,8 ± 0,4
TX/Vehikel-CsA	6,5 ± 3,2	2,7 ± 0,7	5,6 ± 2,5	21,3 ± 3,4	0,6 ± 0,2
Sham-TX/CsA	9,6 ± 4,2	2,6 ± 0,6	3,1 ± 1,3	42,7 ± 64,8	0,6 ± 0,2
Sham-TX/Vehikel-CsA	6,3 ± 3,3	3,1 ± 0,7	3,2 ± 1,2	18,8 ± 2,4	0,6 ± 0,3
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 17 Biochemische Parameter des Urins Versuch II, Teil 3/4

Urin 1 Monat post Behandlungsbeginn mit CsA

weibliche Ratten					
Gruppe	**Crea [mmol/l]**	**P/Crea [mmol/mmol]**	**Na/Crea [mmol/mmol]**	**K/Crea [mmol/mmol]**	**Ca/Crea [mmol/mmol]**
TX/CsA	6,5 ± 3,1	3,9 ± 1,0	2,2 ± 1,2	20,8 ± 2,2	0,9 ± 0,2
TX/Vehikel-CsA	7,9 ± 3,3	2,6 ± 0,7	1,9 ± 1,1	16,4 ± 4,6	0,8 ± 0,3
Sham-TX/CsA	5,3 ± 3,1	3,8 ± 1,0	2,2 ± 1,2	18,8 ± 2,2	0,9 ± 0,3
Sham-TX/Vehikel-CsA	5,2 ± 2,9	3,9 ± 1,1	6,8 ± 8,3	25,0 ± 18,0	1,1 ± 0,5
Faktor Csa	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

männliche Ratten					
Gruppe	**Crea [mmol/l]**	**P/Crea [mmol/mmol]**	**Na/Crea [mmol/mmol]**	**K/Crea [mmol/mmol]**	**Ca/Crea [mmol/mmol]**
TX/CsA	10,8 ± 2,2	3,2 ± 0,8	1,5 ± 0,4	16,4 ± 1,3	0,53 ± 0,12
TX/Vehikel-CsA	8,8 ± 3,8	4,0 ± 0,7	2,9 ± 1,5	17,9 ± 2,9	0,25 ± 0,07
Sham-TX/CsA	9,2 ± 1,8	3,4 ± 0,7	1,8 ± 1,6	16,0 ± 2,1	0,43 ± 0,07
Sham-TX/Vehikel-CsA	9,0 ± 1,6	3,2 ± 0,4	2,7 ± 1,4	16,6 ± 2,0	0,38 ± 0,12
Faktor Csa	n.s.	n.s.	p=0,042	n.s.	p=0,001
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,01

Tab.: 17 Biochemische Parameter des Urins Versuch II, Teil 4/4

Urin Final

weibliche Ratten						
Gruppe	**Crea [mmol/l]**	**P/Crea [mmol/mmol]**	**Na/Crea [mmol/mmol]**	**K/Crea [mmol/mmol]**	**Ca/Crea [mmol/mmol]**	**DPD/Crea [mmol/mmol]**
TX/CsA	7,9 ± 3,8	3,4 ± 1,1	2,2 ± 1,0	18,2 ± 4,3	1,0 ± 0,3	32,7 ± 3,4
TX/Vehikel-CsA	12,8 ± 12,3	2,1 ± 1,3	1,2 ± 1,1	13,6 ± 5,3	0,8 ± 0,3	23,0 ± 7,0
Sham-TX/CsA	6,6 ± 3,4	3,0 ± 0,6	12,7 ± 32,0	13,3 ± 5,1	0,9 ± 0,2	29,8 ± 8,8
Sham-TX/Vehikel-CsA	6,8 ± 6,1	2,7 ± 1,3	1,2 ± 0,8	15,4 ± 5,8	0,7 ± 0,3	20,2 ± 6,9
Faktor Csa	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,004
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

männliche Ratten						
Gruppe	**Crea [mmol/l]**	**P/Crea [mmol/mmol]**	**Na/Crea [mmol/mmol]**	**K/Crea [mmol/mmol]**	**Ca/Crea [mmol/mmol]**	**DPD/Crea [mmol/mmol]**
TX/CsA	8,6 ± 2,2	3,6 ± 0,5	2,6 ± 1,8	17,8 ± 3,2	0,6 ± 0,1	72,6 ± 9,1
TX/Vehikel-CsA	7,2 ± 1,6	3,7 ± 0,5	3,0 ± 1,2	17,3 ± 1,6	0,4 ± 0,2	62,1 ± 19,8
Sham-TX/CsA	7,1 ± 2,3	3,2 ± 0,8	2,2 ± 1,5	16,5 ± 1,9	0,6 ± 0,1	84,8 ± 17,6
Sham-TX/Vehikel-CsA	7,1 ± 2,0	3,2 ± 0,6	4,2 ± 1,8	19,0 ± 3,4	0,5 ± 0,2	63,1 ± 13,7
Faktor Csa	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,029	p=0,019
Faktor TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion CsA*TX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel von CsA

Abb. 2: FACS-Verlaufsuntersuchung

Abb. 3: Gesamt-Knochenmineraldichte des 4. LW weiblicher Tiere, Versuch I

Abb. 4: trabekuläre Knochenmasse der Tibia weiblicher Tiere, Versuch I

Abb. 5: proximale Tibia von weiblichen Tieren, Versuch I

Abb. 6: Serum Alkalische Phosphatase weiblicher Tiere, Versuch I

Abb. 7: Serum Kreatinin weiblicher Tiere, Versuch I

Abb. 8: Serum Kreatinin männlicher Tiere, Versuch I

Abb. 9: finaler Ca/Crea Urinwert, männlicher Tiere, Versuch I

Abb. 10: Gesamt-Knochenmineraldichte der proximalen Tibia weiblicher Tiere, Versuch II

Abb. 11: proximale Tibia weiblicher Tiere, Versuch II

Abb. 12: Anzahl der Trabekelanschnitte pro mm² des ersten LW weiblicher Ratten, Versuch II

Abb. 13: Anzahl von TRAP-positiven Osteoklasten

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Ursachen der sekundären Osteoporose, Teil 1 und 2 (Stein and Shane, 2003)

Tab. 2: Versuchsplan weibliche Ratten, Versuch I

Tab. 3: Versuchplan männliche Ratten, Versuch I

Tab. 4: Versuchsplan weibliche Ratten, Versuch II

Tab. 5: Versuchsplan männliche Ratten, Versuch II

Tab. 6: Schema der Konzentrationen der CsA-Verdünnungen in der 24-Lochplatte

Tab. 7: absolute Tierzahlen Versuch I

Tab. 8: absolute Tierzahlen Versuch II

Tab. 9: CsA-Vollblutanalyse mit Hilfe eines RIA

Tab. 10: Knochenmineraldichte-Messung Versuch I, Teil 1-3

Tab. 11: Statische histomophometrische Parameter Versuch I, Teil 1-4

Tab. 12: Biochemische Parameter des Serum und KGW Versuch I, Teil 1 und 2

Tab. 13: Biochemische Parameter des Urins Versuch I, Teil 1-4

Tab. 14: Knochenmineraldichte-Messung Versuch II, Teil 1-3

Tab. 15: Statische histomorphometrische Parameter Versuch II, Teil 1-4

Tab. 16: Biochemische Parameter des Serum und KGW Versuch II, Teil 1 und 2

Tab. 17: Biochemische Parameter des Urins Versuch II, Teil 1-4

9 Literaturverzeichnis

Adachi, J. D. and A. Papaioannou (2001). "Corticosteroid-Induced osteoporosis: detection and management." Drug Saf **24**: 607 – 24

Anderson, D.M., E. Maraskovsky, W.L. Billingsley, W.C. Dougall, M.E. Tometsko, E.R. Roux, M.C. Teepe, R.F. DuBose, D. Cosman and L. Galibert (1997). “A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function.” Nature **390**: 175 – 9

Allende, M.L., J.L. Dreier, S. Mandala, R.L. Proia (2004). „Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration.” J Biol Chem **279**: 15396 – 401

Altschuh, D. (2002). “Cyclosporin A as a model antigen: immunochemical and structural studies.” J Mol Recognit **15**: 277 – 85

Atkinson, K., J. Biggs, P. Darveniza, J. Boland, A. Concannon, and A. Dodds (1984). "Cyclosporine-associated central-nervous-system toxicity after allogeneic bone-marrow transplantation." N Engl J Med **310**: 527

Bagi, C. M., P. Ammann, R. Rizzoli, S.C. Miller (1997). “Effect of estrogen deficiency on cancellous and cortical bone structure and strength of the femoral neck in rats.” Calcif Tissue Int **61**: 336 – 44

Barbul, A., D.A. Sisto, G. Efron (1979). “A safe method of thymectomy in adult rats.” Transplantation **28**: 427 – 8

Baron, R., A. Vignery, L. Silvergate and A. Santa Maria (1983). “Processing of undecalcified bone specimens for bone histomorphometry.” In: Bone histomorphometry: Techniques and interpretation. (Ed.: R. R. Recker)
CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 13 – 35

Baron, R., A. Vignery and M. Horowitz (1984). “Lymphocytes, macrophages and the regulation of bone remodeling.” In: Bone and mineral research. Annual 2 (Ed.: W.A. Peck)Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam – New York – Oxford, pp. 175 – 243

Baron, R., R. Tross and A. Vignery (1984b). "Evidence of sequential remodeling in rat trabecular bone: morphology, dynamic histomorphometry, and changes during skeletal maturation." Anat Rec **208**: 137 – 45

Belendiuk, G. and S. Solch (1988). „Cyclosporin in neurological autoimmune disease.” Clin Neuropharmacol **11**: 291 – 302

Bendelac, A. (1992). “Intrathymic activation events and the generation of IL-4 producer CD4+8- thymocytes.” Semin Immunol **4**: 187 – 93

Bhandoola, A. and A. Sambandam (2006). “From stem cell to T cell: one route or many?” Nat Rev Immunol **6**: 117 – 26

Bianchi, S., R. Bigazzi, G. Baldari, G. Sgherri and V.M. Campese (1994). „Diurnal variations of blood pressure and microalbinuria in essential hypertension.” Am J Hypertens **7**: 23 – 9

Borel, J. F., C. Feurer, H.U. Gubler and H. Stähelin (1976). “Biological effects of cyclosporin A: A new antilymphocytic agent.” Agents Actions **43**: 179 – 86

Bork, R., T. Muto, P.H. Beaune, P.K. Srivastava, R.S. Lloyd and F.P. Guengerich (1989). “Charactarization of mRNA species related to human liver cytochrome P-450 nifedipine oxidase and the regulation of catalytic activity.” J Biol Chem **264**: 910 – 9

Bousso, P., N.R. Bhakta, R.S. Lewis and E. Robey (2002). “Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy.” Science **296**: 1876 – 80

Brenner, M.B., J.L. Strominger and M.S. Krangel (1988). „The gamma delta T cell receptor." Adv Immunol **43**: 133 – 92

Bucay, N., I. Sarosi, C.R. Dunstan, S. Morony, J. Tarpley, C. Capparelli, S. Scully, H.L. Tan, W. Xu, D.L. Lacey, W.J. Boyle and W.S. Simonet (1998). "Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification." Genes Dev **12**: 1260 – 8

Buchinsky, F.J., Y.F. Ma, G.N. Mann, B. Rucinski, H.P. Bryer, B.V Paynton, W.S.S. Jee, G.N. Hendy and S. Epstein (1995). "Bone mineral metabolism in T lymphocyte-deficient and -replete strains of rat." J Bone Miner Res **10**: 1556 – 65

Buchinsky, F.J., Y.F. Ma, G.N. Mann, B. Rucinski, H.P. Bryer, D.F. Romero, W.S.S. Jee and S. Epstein (1996). "T lymphocytes play a critical role in the development of cyclosporin A-induced osteopenia." Endocrinology **137**: 2278 – 85

Calne, R.Y. (2002). "Immunological tolerance: the liver effect." J Gastroenterol Hepatol Rev **17**: 488 – 490

Calne, R.Y., D.J. White, S. Thiru, D.B. Evans, P. McMaster, D.C. Dunn, G.N. Craddock, B.D. Pentlow and K. Rolles (1978). "Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors." Lancet **2**: 1323 – 7

Calne, R.Y., K. Rolles and D.J. White (1979). "Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases and 2 livers." Lancet **2**: 1033 – 6

CDC (Consensus Development Conference (1993). "Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis." Am J Med **94**: 646 – 650

Cenci, S., M.N. Weitzmann, C. Roggia, N. Namba, D. Novack, J. Woodring and R. Pacifici (2000). "Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha." J Clin Invest **106**: 1229 – 1237

Cenci, S., G. Toraldo, M.N. Weitzmann, C. Roggia, Y. Gao, W.P. Quian, O. Sierra and R. Pacifici (2003). “Estrogen deficiency induces bone loss by increasing T cell proliferation and lifespan through IFN-gamma-induced class II transactivator.” Proc Natl Acad Sci USA **100**: 10405 – 104010

Chrischilles, E., T. Shireman and R. Wallace (1994). “Costs and health effects of osteoporotic fractures.” Bone **15**: 377 – 386

Christenson, R.H. (1997). “Biochemical markers of bone metabolism: An overview.” Clin Biochem **30**: 573 – 593

Christians, U. and K.F. Sewing (1993). “Cyclosporin metabolism in transplant patients.” Pharmacol Ther **57**: 291 – 345

Ciofani, M. and J.C. ZÚÑUGA-PFLÜCKER (2005). “Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism.” Nat Immunol **6**(9): 881 – 8

Clarda, Jon (1995). “The chemistry of signal transduction” Proc Natl Acad Sci USA **92**, pp 56-61

Clevers, H., B. Alarcon, T. Wileman and C. Terhorst (1988). “The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble.” Annu Rev Immunol **6**: 629 – 62

Clowes, J.A., N. Peel and R. Eastell (2001). “Glucocorticoid-induced osteoporosis.” Curr Opin Rheumatol **13**: 326 – 32

Collins, T.L., M. Deckert and A. Altman (1997). “Views on Vav.“ Immunol Todayn **18**: 221 – 5

Combalbert, J., I. Fabre, G. Fabre, I. Dalet, J. Derancourt, J.P. Cano and P. Maurel (1989). “Metabolism of cyclosporin A: IV. Purification and identification of the rifampicin inducible human liver cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) as a product of P450IIIA gene subfamily.” Drug Metab Dispos **17**: 197 – 207

Dalle Carbonare, L., M.E. Arlot, P.M. Chavassieux, J.P. Toux, N.R. Portero and P.J. Meunier (2001). “Comparison of trabecular bone micorarchitecture and remodeling in glucocorticoid-induced and postmenopausal osteoporosis.” J Bone Miner Res **16**: 97 – 103

Delling, G. and M. Vogel (1992). “Pharmakologie der Osteoporose.” In: Schild H.H. and M. Heller (Hrsg.) Osteoporose, Thieme, Stuttgart New York, pp. 7-23

Delriviere, L., P. Gibbs, E. Kobayashi, N. Kamada and P. Gianello (1998). „New technique of complete thymectomy in adult rats without tracheal intubation.” Microsurgery **18**: 6 – 8

Diamond, T., D. Stiel, M. Lunzer, M. Wilkinson and S. Posen (1989). „Ethanol reduces bone formation and may cause osteoporosis.” Am J Med **86**: 282 – 288

Doty, S.B. (1981). “Morphological evidence of gap junctions between bone cells.” Calcif Tissue Int **33**: 509 – 512

Drewe, J., C. Beglinger and T. Kissel (1992). „The absorption of cyclosporin in the human gastrointestinal tract.” Br J Clin Pharmacol **33**: 39 – 43

Egermann, M., J. Goldhahn and E. Schneider (2005). „Animal models for fracture treatment in osteoporose.” Osteoporos Int **16**: 129 – 138

Epstein, S., M. Schlosberg, M. Fallon, S. Thomas, C. Movsowitz and F. Ismail (1990). „1,25 Dihydroxyvitamin D3 modifies cyclosporin-induced bone loss.” Calcif Tissue Int **47**: 152 – 157

Epstein, S. (1991). “Cyclosporin A: friend or foe?” Calcif Tissue Int **49**: 232 – 234

Epstein, S. (1996). “Post-transplantation bone disease: the role of immunosuppressive agents and the skeleton.” J Bone Miner Res **11**: 1 – 7

Epstein, S., I.R. Sissanayake, G.R. Goodman, A.R. Bowman, H. Zhou, Y. Ma, W.S. Jee (2001). “Effect of the interaction of parathyroid hormone and cyclosporin a on bone mineral metabolism in the rat.” Calcif Tissue Int **68**: 240 – 7

Erben, R.G., B. Kohn, W.A. Rambeck and H. Zucker (1990). „Histomorphometric analysis of the rat proximal tibial metaphysic by “linear scanning”.” Scanning Microsc **4**: 625 – 640

Erben, R.G., B. Kohn, H. Weiser and W.A. Rambeck (1992). „The ovariectomized Rat: A model for postmenopausal Osteoporosis?” In: Aktuelle Aspekte der Osteologie (Ed.: T.H. Ittel, H.-G. Siebert, H.H. Matthiaß), Springer-Verlag Berlin-Heidelberg,

Erben, R.G. (1996). „Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: modelling or remodeling?” Anat Rec **246**: 39 – 46

Erben, R.G., M. Stangassinger and R. Gärtner (1998). „Skeletal effects of low-dose cyclosporin A in aged male rats: Lack of relationship to serum testosterone levels. J Bone Miner Res **13**: 79 – 87

Erben, R.G., J. Eberle, K. Stahr and M. Goldberg (2000). „Androgen deficiency induced high turnover osteopenia in aged male rats: a sequential histomorphometric study.” J Bone Miner Res **15**: 1085 – 1098

Erben, R.G., K.S. Brunner, B. Breig, J. Eberle, M. Goldberg and L.C. Hofbauer (2003). „Skeletal effects of cyclosporin A are gender related in rats.” Endocrinology **144**: 40 – 49

Erben, R.G., J. Eberle and M. Stangassinger (2001). „B lymphopoiesis is upregulated after orchiectomy and is correlated with estradiol but not testosterone serum levels in aged male rats." Horm Metab Res **33**: 491 – 498

Erben, R.G. (2005). „Knochen und Calciumhomöostase" In: Physiologie der Haustiere (Ed.: W. Engelhardt und G. Breves) Enke Verlag, ISBN 3830420395, pp. 580 – 587

Eriksen, E.F., K. Brixen and P. Charles (1995). „New markers of bone metabolism: clinical use in metabolic bone disease." Eur J Endocrinol **132**: 251 – 63

Erlebacher, A., E.H. Filvaroff, Q.E. Ye, R. Derynck (1998). „Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling." Mol Biol Cell **9**: 1903 – 18

European Multicenter Trial Group (1983). „Cyclosporin in cadaveric renal transplantation: one-year follow-up of a multicenter trail." Lancet 986 – 989

Evans, S.F. and M.W. Davie (2002). "Low body size and elevated sex-hormone binding globulin distinguish men with idiopathic vertebral fracture." Calcif Tissue Int **70**: 9 – 15

Falahiti-Nini A., B.L. Riggs, E.J. Atkinson, W.M. O´Fallon, R. Eastell and S. Khosla. (2000). "Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men." J Clin Invest **106**: 1553 – 1560

Ferron, G.M., N.A. Pyszczynski and W.J. Jusko (1998a). "Gender-related assessment of cyclosporine/prednisolone/sirolimus interactions in three human lymphocyte proliferation assays." Transplantation **65**: 1203 – 1209

Ferron, G.M., W.J. Jusko (1998b). "Species- and gender-related differences in cyclosporine/prednisolone/sirolimus interactions in whole blood lymphocyte proliferation assays." J Pharmacol Exp Ther **286**: 191 – 200

Food and Drug Administration (1994). “Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis.” FDA Division of Metabolism and Endocrine Drug Products, Washington, DC

Ford, W.L. (1978). “Handbook of Experimental Immunology” (Ed.: D.M. Weie) Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 231

Foss, D.L., E. Donskoy and I. Goldschneider (2001). „The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice.” J Exp Med **193**: 365 – 74

Frey, F.J. (1990). “Cyclosporin bei Autoimmunerkrankungen.“ Schweiz Med Wochenschr **120**: 772 – 786

Frost, H.M. (1976a). „Supracellular organization of bone turnover (remodeling) in larger mammals and its parameters.” In: Proceedings of the First Workshop on Bone Morphometry. (Ed.: Z.F.G. Jaworski) University of Ottawa Press, Ottawa, pp. 8 – 15

Frost, H.M. (1976b). “Some concepts crucial to the effective study of bone turnover and bone balance in human skeletal disease and in experimental models of skeletal physiology and pathophysiology.” In: Proceeding of First Workshop on Bone Morphometry. (Ed.: Z.F.G. Jaworski) University of Ottawa Press, Ottawa, pp. 219 – 223

Frost, H.M. (1983). “Bone histomorphometry: choice of marking agent and labelling schedule.” In: Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation. (Ed.: R.R. Recker) CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 37 – 52

Frost, H.M. and W.S.S. Jee (1992). “On the rat model of human osteopenias and osteoporoses.” Bone Miner **18**: 227 – 236

Gallagher, J.C. (1990). “The pathogenesis of osteoporosis.” Bone Miner **9**: 215 – 227

Garnero, P., E. Hausherr, M.C. Chapuy, C. Marcelli, H. Grandjean, C. Muller, C. Cormier, G. Breart, P.J. Meunier and P.D. Delmas (1996). “Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS prospective study.” J Bone Miner Res **11**: 1531 – 1538

Gasser, J.A. (1995). “Assessing bone quantity by pQCT.” Bone **17**: 145S – 154S

Gauthier, P. and H. Helderman (2000). “Cyclosporine avoidance.” J Am Soc Nephrol **11**: 1933 – 1936

Giangregorio, L. and C.J. Blimkie (2002). “Skeletal adaptations to alterations in weight-bearing activity: a comparison of models of disuse osteoporosis.” Sports Med **32**(7): 459 – 76

Gijtenbeek, J.M.M, M.J. Van De Bent and C.J. Vecht (1999). “Cyclosporin neurotoxicity: a review.” Rev J Neurol **246**: 339 – 346

Goldrath, A.W. and M.J. Bevan (1999). “Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire.” Nature **402**: 255 – 62

Green, C.C., T. Hoeg Soerensen and E. Fink Eriksen (2000). “Prevalence of low serum estradiol levels in male osteoporosis.” Osteoporos Int **11**: 697 – 701

Grigoridiadis A.E., J.N.M Heersche and J.E. Aubin (1988). “Differentiation of muscle, fat, cartilage and bone from progenitor cells present in a bone derived clonal cell population: effect of dexamethasone.” J Cell Bio **106**: 2139 – 2151

Haberland, M., A.F. Schilling, J.M Rueger and M. Ameling (2001). „Brain and bone: central regulation of bone mass. A new paradigm in skeletal biology.” J Bone Joint Surg Am **83**: 1871 – 1876

Handschumacher, R.E., M.W. Harding, J. Rice, R.J. Drugge and D.W. Speicher (1984). “Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporine A.” Science **226**: 544 – 547

Heinegaard, D. and A. Oldenburg (1989). “Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollageneous macromolecules.” FASEB J **3**:2042 – 2051

Henke, J. und W. Erhard (2001). „Perioperative und akut-traumatische Schmerztherapie.“ In: Schmerzmanagement (Ed.: J. Henke und W. Erhard), Enke Verlag, Stuttgart, pp. 104 – 105

Heshmati, H.M. and S. Khosla (1998). “Idiopathic osteoporosis: a heterogeneous entity.” Ann Med Interne **149**: 77 – 81

Hofbauer, L.C., F. Gori, B.L. Riggs, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, T.C. Spelsberg and S. Khosla (1999). “Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis.” Endocrinology **140**: 4382 – 9

Hornby, S.B., G.P. Evans, S.L. Hornby, A. Pataki, M. Glatt and J.R. Green (2003). “Long-term zoledronic acid treatment increases bone structure and mechanical strength of long bones of ovariectomized adult rats.” Calcif Tissue Int **72**: 519 – 27

Hsu, H., D.L. Lacey, C.R. Dunstan, I. Solovyev, A. Colombero, E. Timms, H.L. Tan, G. Elliott, M.J. Kelley, I. Sarosi, L. Wang, X.Z. Xia, R. Elliott, L. Chiu, T. Black, S. Scully, C. Capparelli, S. Morony, G. Shimamoto, M.B. Bass and W.J. Boyle (1999). “Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand.” Proc Natl Acad Sci USA **96**: 3540 – 5

Ishida, Y. and J.N.M. Heersche (1998). „Glucocorticoid- induced osteoporosis: both in vivo and in vitro concentration of glucocorticoids higher than physiological levels attenuate osteoblast differentiation.“ J Bone Miner Res **13**: 1822 – 1826

Jameson, S.C., K.A. Hogquist and M.J. Bevan (1995). „Positive selection of thymocytes.“ Annu Rev Immunol **13**: 93 – 126

Janeway, C.A., P. Travers, M. Walport and M. Shlomchik (2001). “T Cell-Mediated Immunity”, In: Immunobiology, Part IV “the Adaptive Immune Response, Chap.8.”, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=imm.biblist1100 (Datum des Zugriffs: 08.09.2006)

Jiang, Y., J. Zhao, H.K. Genant, J. Dequeker and P. Geusens (1997). „Long-term changes in bone mineral and biomechanical properties of vertebrae and femur in aging, dietary calcium restricted, and/or estrogen-deprived/-replaced rats.“ J Bone Miner Res **12**: 820 – 831

Jilka, R.L. (1986). “Parathyroid hormone-stimulated development of osteoclasts in cultures of cells from neonatal murine calvaria.” Bone **7**: 29 – 40

Jordan, G.R., N. Loveridge, K.L. Bell, J. Power, N. Rushton.and J. Reeve (2000). “Spatial clustering of remodeling osteons in the femoral neck cortex: a cause of weakness in hip fracture?” Bone **26**: 305 – 13

Kahan, B. (1989). “Cyclosporine.” New Engl J Med **321**: 1725 – 1738

Kalu, D.N. (1991). “The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss.” Bone Miner **15**: 175 – 91

Karpas, A., A. Teran, K. Fischer and R.B. Greenblatt (1987). „Osteoporosis – 47 years after Albright.“ In: Osteoporosis 1987. (Eds.: C. Christiansen, J.S. Johansen, B.J. Riis), Osteopress ApS, Copenhagen, pp. 477 – 483

Katz, I., M. Li, I. Joffe, B. Stein, T. Jacobs, X.G. Liang, H.Z. Ke, W. Jee and S. Epstein (1994). „Influence of age on cyclosporin A-induced alterations in bone mineral metabolism in the rat in vivo.“ J Bone Miner Res **9**: 59 – 67

Kawana, K., M. Takahashi, K. Kushida, H. Hoshino, S. Sakata and T. Inoue (1996). “The effect of cyclosporin A administration on bone metabolism in the rat evaluated by biochemical markers.” J Endocrinol Invest **19**: 499 – 504

Kearse, K.P., J.L. Roberts, T.I. Munitz, D.L. Wiest, T. Nakayama and A. Singer (1994). “Developmental regulation of alpha beta T cell antigen receptor expression results from differential stability of nascent TCR alpha proteins within the endoplasmic reticulum of immature and mature T cells.” EMBO J **13**: 4504 – 14

Kearse, K.P., J.L. Roberts and A.Singer (1995). “TCR alpha-CD3 delta epsilon association is the initial step in alpha beta dimer formation in murine T cells and is limiting in immature CD4+ CD8+ thymocytes.” Immunity **2**: 391 – 9

Khosla, S., L.J. Melton III, E.J Atkins and W.M. O'Fallon (2001). “Relationship of serum sex steroid levels to longitudinal changes in bone density in young versus elderly men.” J Clin Endocrinol Metab **86**: 3555 – 61

Kimmel, D.B. (1991). “Quantitative histologic changes in the proximal tibial growth cartilage of aged female rats.” Cell Mater Suppl **1**: 11 – 18

Kobayashi, E., N. Kamada, S. Enosawa, N. Toyama, L. Delriviere, S. Goto, R. Lord, S. Stamatiou and M. Miyata (1993). “A technique for complete thymectomy in adult rats.” J Immunol Methods **171**: 33 – 6

Kondo, M., I.L. Weissman and K. Akashi (1997). „Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow.” Cell **91**: 661 – 72

Kong, Y.Y., U. Feige, I. Sarosi, B. Bolon, A. Tafuri, S. Morony, C. Capparelli, J. Li, R. Elliott, S. McCabe, T. Wong, G. Campagnuolo, E. Moran, E.R. Bogoch, G. Van, L.T. Nguyen, P.S. Ohashi, D.L. Lacey, E. Fish, W.J. Boyle, J.M. Penninger (1999). "Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand." Nature 402: 304 – 9

Kulak, C.A.M. and E. Shane (1999). "Transplantation osteoporosis." In: Dynamics of bone and cartilage metabolism 1999 (Eds.: M.J. Seibel, S.P. Robins, J.P. Bilezikian), San Diego: Academic Press, pp. 515 – 526

Kumar, R. (2001). "Glucocorticoid-induced osteoporosis." Curr Opin Nephrol Hypertens **10**: 589 – 95

Lacey, D.L., E. Timms, H.L. Tan, M.J. Kelley, C.R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y.X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney and W.J. Boyle (1998). "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation." Cell **93**: 165 – 76

Lerner, U.H. (2006). "Bone remodeling in post-menopausal Osteoporosis." J Dent Res **850**: 584 – 595

Lin, H., T.R. Mosmann, L. Guilbert, S. Tuntipopipat and T.G. Wegmann (1993). "Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface." J Immunol **151**(9): 4562 – 73

Lind, P.M., L. Lind, S. Larsson and J. Orberg (2001a). "Torsional testing and peripheral quantitative computed tomography in rat humerus." Bone **29**: 265 – 70

Lind, E.F., S.E. Prockop, H.E. Porritt and H.T..Petrie (2001b). "Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development." J Exp Med **194**: 127 – 34

Lindholm, J., T. Steiniche, E. Rasmussen, G. Thamsborg, I.O. Nielsen H. Brockstedt-Rasmussen, T. Storm, L. Hyldstrup and C. Schou (1991). „Bone disorder in men with chronic alcoholism: A reversible disease?“ J Clin Endocrinol Metabol **73**: 118 – 124

Lips, P. (2001). “Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences of bone loss and fractures and therapeutic implications.” Endocr Rev **22**: 477 – 501

Looker, A.C., H.W. Wahner, W.L. Dunn, M.S. Calvo, T.B. Harris, S.P. Heyse, C.C. Johnston Jr., R. Lindsay (1998). “Updated data on proximal femur bone mineral levels of US adults.” Osteoporos Int **8**: 468 – 89

Lukert, B.P. and L.G. Raisz (1990). “Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management.” Ann Intern Med **112**: 352 – 364

Malluche, H.H. and M.-C. Faugere (1986). “Atlas of Mineralized Bone Histology.” Karger, Basel – New York

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

Martin, T.J., K.W. NG and G.C. Nicholson (1988). “Cell biology in bone.” In: Bailière´s Clinical Endocrinology and Metabolism – Vol. 2, No. 1: Metabolic Bone Disease. (Ed.: T.J. Martin) Bailière Tindall, London – Philadelphia – Sydney, pp. 1 – 29

Martin, T.J. (1993). “Hormones in the coupling of bone resorption and formation.” Osteoporosis Int Suppl **1**: 121 – 125

Martin, T.J. and K.W. NG (1994). “Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity.” Endocrinology **126**: 1569 – 75

Matloubian, M., C.G. Lo, G. Cinamon, M.J. Lesneski, Y. Xu, V. Brinkmann, M.L. Allende, R.L. Proia and J.G. Cyster (2004). “Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1.” Nature **427**: 355 – 60

Matsuda, S., F. Shibasaki, K. Takehana, H. Mori, E. Nishida and K. Koyasus (2000). “Two distinct action mechanisms of immunophilin-ligand complexes for the blockade of T-cell activation.” EMBO Rep **1**: 428 – 34

Mayer, R.D., S. Berman, A.T.K. Cockett and M.D. Maines (1989). “Differential effects of cyclosporin on hepatic and renal heme, cytochrome P-450 and drug metabolism. Possible role in nephrotoxicity of the drug.“ Biochem Pharmacol **38**: 1001 – 7

McCauley, L.K., T.J. Rosol, C.C. Capen and J.E. Horton (1989). “A comparison of bone turnover in athymic (nude) and euthymic mice: biochemical, histomorphometric, bone ash and in vitro studies.” Bone **10**: 29 – 34

Melton, L.J (2003). “Epidemiology worldwide.” Endocrinol Metab Clin North Am (1):1-13

Mihatsch, M.J. and K. Wolff (1992). “Consensus conference on cyclosporin A for psoriasis.” Br J Dermatol **126**: 621 – 3

Miyaura, C., Y. Onoe, M. Inada, K. Maki, K. Ikuta, M. Ito and T. Suda (1997). “Increased B-lymphopoiesis by interleukin 7 induces bone loss in mice with intact ovarian function: similarity to estrogen deficiency.” Proc Natl Acad Sci USA **94**: 9360 – 5

Mosmann, T.R. and R.L. Coffman (1989). “Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells.” Adv Immunol **46**: 111 – 47

Movsowitz, C., S. Epstein, M. Fallon, F. Ismail and S. Thomas (1988). “Cyclosporin-A in vivo produces severe osteopenia in the rat: effect of dose and duration of administration.” Endocrinology **123**: 2571 – 7

Movsowitz, C., S. Epstein, M. Fallon, F. Ismail and S. Thomas (1989). “Cyclosporin A in the oophorectomized rat: unexpected severe bone resorption.” J Bone Miner Res **4**: 393 – 8

Movsowitz, C., S. Epstein, M. Fallon, F. Ismail and S. Thomas (1990). “The bis-phosphonate 2-PEBP inhibits cyclosporin A induced high-turnover osteopenia in the rat.” J Lab Clin Med **115**: 62 – 8

Mundy, G.R. and G.D. Roodman (1987). “Osteoclast ontogeny and function.” In: Bone mineral research/5. (Ed.: W.A. Peck) Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam – New York – Oxford, pp. 209 – 279

Nussenblatt, R.B. and A.G. Palestine (1986). “Cyclosporine: immunology, pharmacology and therapeutic uses.” Surv Ophthalmol **31**: 159 – 69

Nussenblatt, R.B. (1988). “The use of cyclosporine in ocular inflammatory disorders.” Transplant Proc **20**: 114 – 21

Onoe, Y., C. Miyaura, M. Ito, H. Ohta and T. Suda (2000). “Comparative effects of estrogen and raloxifene on B lymphopoiesis and bone loss induced by sex steroid deficiency in mice.” J Bone Miner Res **15**: 541 – 9

Orlic, Z.C. and L.G. Raisz (1999). “Causes of secondary osteoporosis.” J Clin Densitom **2**: 79 – 92

Ott, S.M. (2002). “Histomorphometric Analysis of Bone Remodeling.” In: Principles of Bone Biology, Second Edition, (Ed.: J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, and G.A. Rodan), pp. **19**: 303 - 16

Owen, M. (1985). “Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system.” In: Bone and mineral research/3. (Ed. W.A. Peck) Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam – New York – Oxford, pp. 1 – 25

Parfitt, A.M. (1983a). “Stereologic basis of bone histomorphometry: theory of quantitative microscopy and reconstruction of the third dimension.” In: Bone histomorphometry: Techniques and interpretation (Ed.: R.R. Recker) CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 53 – 87

Parfitt, A.M. (1983b). “The physiological and clinical significance of bone histomorphometric data.” In: Bone histomorphometry: Techniques and interpretation (Ed.: R.R. Recker) CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 143 – 223

Parfitt, A.M. (1984). “The cellular basis of bone remodeling: the quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone.” Calcif Tissue **36**: 37 – 45

Parfitt, A.M., M.K. Drezner, F.H. Glorieux, J.A. Kanis, H. Malluche, P.J. Meunier, S.M. Ott and R.R. Recker (1987). “Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units.” Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee.J Bone Miner Res **2**: 595 – 610

Parfitt, A.M., (1995). “Problems in the application of in vitro systems to the study of human bone remodeling.” Calcif Tissue Int **56**: 5-7

Parfitt, A.M., G.R. Mundy, G.D. Roodman, D.E. Hughes and B.F. Boyce (1996). “A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates.” J Bone Miner Res **11**: 150 – 9

Parra Cid, T., J.R. Conejo Garcia, F. Carballo Alvarez amd G. De Arriba (2003). “Antioxidant nutrients protect against cyclosporine A nephrotoxicity.“ Toxicology **189**: 99 – 111

Peck, W.A. and W.L. Woods (1988). “The cells of bone.” In: Osteoporosis: Ethiology, Diagnosis and Management.” (Eds.: B.L. Riggs, L.J. Melton III) Raven Press, New York, pp. 1 – 44

Penn, I. (1987). “Cancers following cyclosporine therapy.” Transplant Proc **19**: 2211 – 3

Pickrell, M.D., R. Sawers and J. Michael (1988). “Pregnancy after renal transplantation: severe intrauterine growth retardation during treatment with cyclosporin A.” Br Med J (Clin Res Ed) **296**: 825

Pietschmann, P., S. Kudlacek, J. Grisar, S. Spitzauer, W. Woloszczuk, R. Willvonseder and M. Peterlik (2001). „Bone turnover markers and sex hormones in men with idiopathic osteoporosis.” Eur J Clin Invest **31**: 444 – 51

Pietschmann, P., S. Kudlacek und M. Peterlik (2004). „Pathogenese und Therapie der Osteoporose beim Mann.“ J Miner Stoffwechsel **11**: 12 – 14

Pommer, G. (1885). „Untersuchungen über Osteomalazie und Rachitis.“ F.C.W. Vogel, Leipzig

Raisz, L.G. and G.A. Rodan (2003). “Pathogenesis of osteoporosis.” Endocrinol Metab Clin North Am **32**: 15 – 24

Raulet, D.H. (1989). „The structure, function, and molecular genetics of the gamma/delta T cell receptor.” Annu Rev Immunol **7**: 175 – 207

Reeves, R.A., A.P. Shapiro, M.E. Thompson and A.M. Johnsen (1986). “Loss of nocturnal decline in blood pressure after cardiac transplantation.” Circulation **73**: 401 – 8

Resch, H. und P. Bernecker (2006). „Parameter für Knochenneubildung und Knochenabbau.“ In: Ärzte Woche Wien, http://www.aerztewoche.at/viewArticleDetails (Datum des Zugriffs: 08.09.2006)

Revell, P.A. (1986). “Normal bone.“ In: Pathology of bone, Springer, Berlin-Heidelberg, New York, pp. 1 – 32

Reynolds, N.J. and W.I. Al-Daraji (2002). “Calcineurin inhibitors and sirolimus: mechanisms of action and applications in dermatology.” Clin Exp Dermatol **27**: 555 – 61

Rezzani, R., L. Rodella, G. Corsetti, R.G. Ventura (1995). “Effects of cyclosporin A on some accessory cells of rat thymus.” Int J Exp Pathol **76**: 247 – 54

Rezzani, R., L. Rodella, G. Corsetti and R. Bianchi (2001). “Does methylene blue protect the kidney tissues from damage induced by ciclosporin A treatment?” Nephron **89**: 329 – 36

Rezzani, R. (2004). “Cyclosporine A and adverse effects on organs: histochemical studies.” Prog Histochem Cytochem **39**: 85 – 128

Riggs, B.L., S. Khosla and L.J. Melton III (2002). “Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton.” Endocr Rev **23**: 279-302

Riggs, B.L. and A.M. Parfitt (2005). “Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling.” J Bone Miner Res **20**: 177 – 84

Ringe, J.D. (1996). „Aktuelle Therapiekonzepte der Posttransplantationsosteoporose.“ Osteologie Forum **2**: 214 – 216

Robey, P.G., L.W. Fisher, M.F. Young and J.D. Termine (1988). “The biochemistry of bone.” In: Osteoporosis: Etiologie, Diagnosis and Management (Eds.: B.L. Riggs, L.J. Melton III) Raven Press, New York, pp. 95 – 109

Rodan, G.A. (1992). “Introduction to bone biology.” Bone **13**: 3 – 6

Roggia, C., Y. Gao, S. Cenci, M.N. Weitzmann, G. Toraldo, G. Isaia and R. Pacifici (2001). “Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo.” Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 13960 – 5

Roggia, C., C. Tamone, S. Cenci, R. Pacifici and G.C. Isaia (2004). “Role of TNF-alpha producing T-cells in bone loss induced by estrogen deficiency.” Minerva Med **95**: 125 – 32

Romeis, B. (1989). “Färben der Schnitte” In: Mikroskopische Technik (Ed.: P. Böck), Urban und Schwarzenberg, München – Wien – Baltimore, pp. 181 – 249

Roodman, G.D. (1996). “Advances in bone biology: the osteoclast.” Endocr Rev **17**: 308 – 32

Ross, P.D. (1996). “Osteoporosis.” Arch Intern Med **156**: 1399 – 1411

Rubin, A.M. and H. Kang (1987). “Cerebral blindness and encephalopathy with cyclosporin A toxicity.” Neurology **37**: 1072 – 1076

Russel, G., G. Mueller, C. Shipman, P. Croucher (2001). „Clinical disorders of bone resorption.“ Novartis Found Symp **232**: 251 – 267

Saag, K.G. (2003). “Glucocorticoid-induced osteoporosis.” Endocrinol Metab Clin North Am **32**: 135 – 57

Saller, B. (1996). “Osteoporose nach Lebertransplantation.” Osteologie Forum **2**: 210 – 213

Sambrook, P.N. (1996). “Corticosteroid induced osteoporosis.” J Rheumatol **23**: 19 – 22

Sasaki, N., E. Kusano, Y. Ando, K. Yano, E. Tsuda and Y. Asano (2001). “Glucocorticoid decreases circulating osteoprotegerin (OPG): possible mechanism for glucocorticoid induced osteoporosis.” Nephrol Dial Transplant **16**: 479 – 82

Sass, D.A., T. Liss, A.R. Bowman, B. Rucinski, S.N. Popoff, Z. Pan, Y.F. Ma and S. Epstein (1997). “The role of the T-lymphocyte in estrogen deficiency osteopenia.” J Bone Miner Res **12**: 479 – 86

Schenk, R.K., A.J. Olah and W. Herrmann (1984). “Preparation of calcified tissues for light microscopy.” In: Methods of Calcified Tissues Preparation. (Ed.: G.R. Dickenson) Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam – New York – Oxford, pp. 1 – 56

Schiller, C., R. Gruber, K. Redlich, G.M. Ho, F. Katzgraber, M. Willheim, P. Pietschmann and M.Peterlik (1997). „17Beta-estradiol antagonizes effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on interleukin-6 production and osteoclast-like cell formation in mouse bone marrow primary cultures.” Endocrinology **138**: 4567 – 71

Schneider, A. and E. Shane (2001). “Osteoporosis secondary to illnesses and medications.” In: Osteoporosis (Ed.: R. Marcus, D. Feldman, J. Kelsey) San Diego, Academic Press, pp. 303 – 327

Schreiber, S.L., G. Baumann und G. Zenke (1993). “Inhibition of T-cell signaling pathways by immunophilin drug complexes: are side effects inherent to immunosuppressive properties?” Transplant Proc.**25**: 502 - 7

Schulz, A. (1985). „Morphologische Grundlagen generalisierter Osteopathien.“ Akt Endokr Stoffw **6**: 164 – 168

Shaw, A.S. and M.L. Dustin (1997). “Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation.” Immunity **6**: 361 – 9

Sindrey, D., E. Plawinski, J. Auluck (2002). “Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP) Staining of osteoclasts on BD Bio Coat osteologic Disc and Multi Test Slide.” In: BD Biosciences Discovery Labware, http://www.bdbiosciences.com (Datum des Zugriffs: 01.07.2004)

Sinowatz, F. (1992). “Thymus” In: Histologie (Ed.: H. Hees und F. Sinowatz) Deutscher Ärzte-Verlag GmbH Köln, pp. 199 – 202

Siu, G., S.P. Clark, Y. Yoshikai, M. Malissen, Y. Yanagi, E. Strauss, T.W. Mak and L. Hood (1984). “The human T cell antigen receptor is encoded by variable, diversity, and joining gene segments that rearrange to generate a complete V gene.” Cell **37**: 393 – 401

Smollich, A. (2000). “Osteogenese”. In: Lexicon der Veterinärmedizin (Ed.: E. Wiesner, R. Ribbeck) Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart, p. 1066

Stähelin, H.F. (1996). „The history of cyclosporin A (Sandimmune) revisited: another point of view.” Experientia **52**: 5 – 13

Stein, B., M. Takizawa, I. Katz, I. Joffe, J. Berlin, M. Fallon and S. Epstein (1991). „Salmon calcitonin prevents cyclosporin-A-induced high turnover bone loss.” Endocrinology **129**: 92 – 8

Stein, E. and E. Shane (2003). “Secondary Osteoporosis” Endocrinol Metab Clin North Am **32**: 115 – 34

Stewart, P.J., O.C. Green and P.H. Stern (1986). “Cyclosporine A inhibits calcemic hormone-induced bone resorption in vitro.” J Bone Miner Res **1**: 285 – 91

Stewart, P.J. and P.H. Stern (1989). “Cyclosporines: correlation of immuno-suppressive activity and inhibition of bone resorption.” Calcif Tissue Int **45**: 222 – 6

Stoddard, B.L., K.E. Flick (1996). “Calcineurin-immunosuppressor complexes.” Curr Opin Struct Biol **6**: 770 – 5

Suda, T., E. Miyaura, E. Abe and T. Kuroki (1986). “Modulation of cell differentiation, immune responses and tumor promotion by vitamin D compounds.” In: Bone and mineral research/4. (Ed.: W.A. Peck) Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam – New York – Oxford, pp. 1 – 48

Suda, T., N. Takahashi, N. Udagawa, E. Jimi, M.T. Gillespie and T.J. Martin (1999). “Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families.” Endocr Rev **20**: 345 – 57

Takahashi, N., H. Yamana, S. Yoshiki, G.D. Roodman, G.R. Mundy, S.J. Jones, A. Boyde and T. Suda (1988). “Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures.” Endocrinology **122**: 1373 – 82

Takahama, Y. (2006). „Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection.” Nat Rev Immunol **6**: 127 – 35

Taler, S.J., S.C. Textor, V.J. Canzanello and L. Schwartz (1999). “Cyclosporin-induced hypertension: incidence, pathogenesis and management.” Drug Saf **20**: 437 – 49

Tanaka, C., R. Kawai and M. Rowland (1999). “Physiologically based pharmacokinetics of cyclosporine A: reevaluation of dose-nonlinear kinetics in rats.” J Pharmacokinet Biopharm **27**: 597 – 623

Teitelbaum, S.L. (2000). “Bone resorption by osteoclasts.“ Science **289**: 1504 – 8

Terszowski, G., S.M. Muller, C.C. Bleul, C. Blum, R. Schirmbeck, J. Reimann, L.D. Pasquier, T. Amagai, T. Boehm and H.R. Rodewald (2006). “Evidence for a functional second thymus in mice.“ Science **312**: 284 – 7

Thompson, D.D., H.A. Simmons, C.M. Pirie and H.Z. Ke (1995): “FDA Guidelines and animal models for osteoporosis.” Bone **17**: 125S – 133S

Tonegawa, S. (1983). „Somatic generation of antibody diversity.” Nature **302**: 575 – 81

Tortorice, K.L., K.L. Heim-Duthoy, W.M. Awni, K.V. Rao and B.L. Kasiske (1990). “The effects of calcium channel blockers on cyclosporine and its metabolites in renal transplant recipients.” Ther Drug Monit **12**: 321 – 8

Tuck, S.P. and R.M. Francis (2002). “Osteoporosis.“ Postgrad Med J **78**: 526 – 32

Väänänen, H.K., T. Hentunen, P. Lakkakorpi, E.K. Parvinen, K. Sundqvist and J. Tuukkanen (1988). “Mechanism of osteoclast mediated bone resorption.“ Ann Chir Gynaecol **77**: 193 – 6

Veis, A. and B. Sabsay (1987). “The collagen of mineralized matrices.” In: Bone and mineral research/5. (Ed.: W.A. Peck) Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam – New York – Oxford, pp. 1 – 63

Vellodi, A., R. Jayatunga and K. Hugh-Jones (1987). “Hemiplegia and focal convulsions as a manifestation of cyclosporine A toxicity.” J Clin Pharmacol **27**: 914 – 5

Verdecchia, P., G. Schillaci, M. Guerrieri, C. Gatteschi, G. Benemio, F. Boldrini and C. Porcellati (1990). “Circadian blood pressure changes and left ventricular hypertrophy in essential hypertension.” Circulation **81**: 528 – 36

Verpooten, G.A., I. Wybo, V.M. Pattyn, P.G. Hendrix, R.A. Giuliano, E.J. Nouwen, F. Roels and M.E. De Broe (1986). „Cyclosporine nephrotoxicity: comparative cytochemical study of rat kidney and human allograft biopsies” Clin Nephrol **25** Suppl 1: S18 – 22

Wada, C., M. Kataoka, et al. (2006). "High-turnover osteoporosis is induced by cyclosporin A in rats." J Bone Miner Metab **24**: 199-205

Wolff, J. (1892). “Gesetz der Transformation der Knochen.” Verlag August Hirschfeld, Berlin, pp. 1 – 150

World Health Organization (WHO) (1994). „Assesment of fracture ristk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of an WHO study Group.” World Health Organ Tech Rep Ser **843**: 1 – 129

Wüster, C., K. Engels, E. Renner, R.D. Hesch, P. Hadaji und J.Y. Pourfard (1998). „Messwertinterpretation in der Osteodensitometrie.“ Dtsch Ärztebl **41**: 1990 – 1994

Yasuda, H., N. Shima, N. Nakagawa, K. Yamaguchi, M. Kinosaki, S. Mochizuki, A. Tomoyasu, K. Yano, M. Goto, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, N. Udagawa, N. Takahashi and T. Suda (1998). „Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL.” Proc Natl Acad Sci USA **95**: 3597 – 602

Yoshinoya, S., K. Yamamoto, T. Mitamura, T. Aikawa, A. Takeuchi, K. Takahashi and T. Miyamoto (1988). “Successful treatment of rheumatoid arthritis with low-dose cyclosporine A.” Transplant Proc **20**: 243 – 7

Yu, B.P., E.J. Masoro, I. Murata, H.A. Bertrand and F.T. Lynd (1982). “Life span study of SPF Fischer 344 male rats fed ad libitum or restricted diets: longevity, growth, lean body mass and disease.” J Gerontol **37**: 130 – 41

Zinkernagel, R.M. (2001). „Grundlagen der Immunologie.“ In: Medizinische Mikrobiologie“ (Ed.: F.H. Kayser, K.A. Bienz, J. Eckert, R.M. Zinkernagel), Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, pp. 47 – 147

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. R. G. Erben danke ich recht herzlich für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung bei der Erstellung sowie der Durchsicht der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. W. Erhardt möchte ich mich für seine freundliche Unterstützung und zur Etablierung des Tiermodelles und seine Aufmunterung bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. vet. M. Stangassinger danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes in München.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. K. Weber für ihre Hilfe und Einführung in die wissenschaftliche Laborarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gebührt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Erben, die durch ihre gelungene Zusammenarbeit ein herzliches Arbeitsklima geschaffen haben. Vor allem die stete Unterstützung von Frau Claudia Bergow und Frau Sieglinde Hirmer sind bemerkenswert. Bei Frau Dr. tech. M. Skalicky bedanke ich mich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Meinen Mitdoktoranden Susanna Harabasz, Martina Lehnert, Bernhard Ludwig und Kathrin Odörfer, möchte ich ganz herzlich danken, dass sie immer ein offenes Ohr, wir gegenseitige Unterstützung und lustige Wiener Abende hatten.

Meinen Dank möchte ich auch dem Tierpflegerpersonal, Frau M. Langert und Herrn R. Kogler für die Pflege meiner Ratten aussprechen.

Ganz besonders herzlich danke ich meinem Mann Marcus für seine Gelassenheit und liebevolle Motivation bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ebenso ein ganz großes Dankeschön für meine Eltern, die mich moralisch liebevoll unterstützt haben, wobei meinem Vater ein extra Dank für seine ausgezeichneten und schnellen Korrekturvorschläge gebührt.

Bei der Bayer Vital GmbH möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Doktoranden-Förderpreises recht herzlich bedanken.

11 Curriculum Vitae

Angaben zur Person

Name:		Katharina Mildner-Müller, geb. Mildner
Geburtsdatum:		05. Februar 1977
Geburtsort:		Dresden
Staatsangehörigkeit:		deutsch
Familienstand:		verheiratet

Angehörige

Ehemann:		Marcus Müller, Tierarzt
Eltern:	Vater:	Dr. Johannes Peter Mildner; Dipl.-Ing.
	Mutter:	Gabriele Margarete Mildner, geborene Marmetschke, Erzieherin
Schwester:		Therese Jeitner, geborene Mildner, Erzieherin

Schulausbildung

1983 – 1991:	Allgemeine Polytechnische Oberschule Johannes R. Becher, Dresden
1991 – 1996:	Friedrich-Spee-Gymnasium, Geldern Abschluss mit Abitur

Ausbildung

1996 – 1998:	Ausbildung als Tierarzthelferin in der Praxis Dr. med. vet. G. und B. Küsters, Alpen

Hochschule

Nov. 1998 – Feb. 2004:	Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München mit Abschluss Staatsexamen
März 2004:	Approbation als Tierärztin

seit Apr. 2004:	Anfertigung der Promotion „Die Rolle von α/ß-T-Lymphozyten in der Regulation des Knochenturnovers.“

Anstellungen

Mai – September 1998:	Tierarzthelferin in der Pferdeklinik Kerken (Drs. Böckenhoff, Becker, Mettenleiter)
Nov. 2000 – Okt. 2002:	Studentische Hilfskraft an der Chirurgischen Tierklinik der LMU München
Aug. – Dez. 2004:	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der LMU München

Stipendium

Jan. 2005 – Dez. 2006:	Doktorandenförderung 2004 des Geschäftsbereichs Tiergesundheit der Bayer Health Care, Bayer Vital GmBH