Aus der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Histomorphometrische Untersuchungen der Knochenstruktur am ovarektomierten Göttinger Minischwein zur Etablierung eines Großtiermodells zur Simulation der postmenopausalen Osteoporose

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Dr. med. dent. Felix Bartels

aus

Hildesheim

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. F.-J. Kramer

II. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke

Tag der mündlichen Prüfung: 8. November 2010

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung 1

2 Literaturübersicht 3

2.1 Osteoporose 3

2.1.1 Definition 3

2.1.2 Einteilung nach der Ätiologie 4

2.1.2.1 Postmenopausale (Typ I-) Osteoporose 5

2.1.3 Epidemiologie und Bedeutung 8

2.2 Tiermodelle in der Osteoporoseforschung 9

2.2.1 Definition, Bedeutung und Anforderungen 9

2.2.2 Osteoporoseinduktion durch Ovarektomie 11

2.2.3 Kleintiermodelle 12

2.2.3.1 Ratten 12

2.2.4 Großtiermodelle 14

2.2.4.1 Primaten 14

2.2.4.2 Schafe 15

2.2.4.3 Schweine 16

3 Material und Methode 19

3.1 Versuchsplanung 19

3.2 Versuchstiere 21

3.2.1 Herkunft und Haltung 21

3.2.2 Gruppeneinteilung 22

3.2.3 Operation 22

3.2.4 Versuchsabschluss 23

3.3 Geräte und Reagenzien 24

3.3.1 Geräte und Instrumente 24

3.3.2 Chemikalien und Reagenzien 25

3.4 Aufbereitung des Knochenmaterials 25

3.4.1 Fragmentierung, Fixierung und Einbettung 25

3.4.2 Herstellung der Trenn-Dünnschliff-Präparate 26

3.4.3 Histologische Färbung der Präparate 26

3.5 Histomorphometrie 27
3.5.1 Definition der Regions-of-Interest 27
3.5.2 Technik und Prinzip der Histomorphometrie 29
3.5.3 Evaluation des Knochenvolumens 31
3.5.4 Evaluation der Trabekelzahl und -dicke sowie des Trabekelabstands 32
3.5.5 Node-Strut-Analysis 33
3.5.6 Evaluation des Trabecular-Bone-Pattern-factor 38
3.6 Statistische Auswertung 39
4 Ergebnisse 41
4.1 Histomorphometrie der Wirbel 41
4.2 Histomorphometrie der Tibiaknochen 51
4.3 Histomorphometrie der Femurknochen 60
5 Diskussion 69
5.1 Diskussion der Ergebnisse 69
5.2 Diskussion der Methode 74
5.3 Diskussion des Tiermodells 76
5.4 Ausblick in die Zukunft 78
5.5 Schlussfolgerungen 78
6 Zusammenfassung 80
7 Literaturverzeichnis 81

Abkürzungsverzeichnis

B.Ar	Bone-Area, Trabekelfläche
B.Pm	Bone-Perimeter, Trabekelumfang
BMD	Bone-Mineral-Density, Knochendichte
BMU	Basic-Multicellular-Unit
BV/TV	Bone-Volume/Tissue Volume, Trabekelvolumen
CD	Connective-Density
DXA	Dual X-Ray Absorptiometry
FE	Free-End, frei endende Trabekel
I.E.	Internationale Einheiten
IGF	Insulin-like-Growth-Factor
Il	Interleukin
i.v.	Intravenös
KG	Kontrollgruppe, Körpergewicht
Ma.Ar	Marrow-Area, Markfläche
µCT	Mikro-Computertomographie
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MTPD	Mean-Trabecular-Plate-Density, Trabekelzahl
MTPS	Mean-Trabecular-Plate-Separation, Trabekelabstand
MTPT	Mean-Trabecular-Plate-Thickness, Trabekeldicke
Nd	Node, Trabekelknotenpunkt
NIH-CDP	National Institute of Health-Consensus Development Panel
N.Nd	Numer-of-Nodes, Zahl der Trabekelknotenpunkte
No.No	Node-to-Node-Strut, Verbindungsstrecke zwischen zwei Nodes
No.Tm	Node-to-Terminus-Strut, Verbindungsstrecke zwischen Node und Terminus
No/Tm	NF-Ratio: N.No/N.Tm
N.Tm	Number-of-Termini, Zahl der frei endenden Trabekeln
OPG	Osteoprotegerin
OVX	Ovarektomie
PBM	Peak-Bone-Mass
PTH	Parathormon
R	Korrelationskoeffizient
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor κB
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor κB-Ligand
ROI	Region-of-Interest
SMI	Structure-Model-Index
T.Ar	Tissue-Area, Rahmenfläche eines Gewebes
Tb.N	Trabecular-Number, Trabekelzahl
TBPf	Trabecular-Bone-Pattern-factor
Tb.Sp	Trabecular-Separation, Trabekelabstand
Tb.Th	Trabecular-Thickness, Trabekeldicke
TGF	Transforming-Growth-Factor
Tm	Terminus, frei endende Trabekel
Tm.Tm	Terminus-to-Terminus-Strut, Verbindungsstrecke zwischen zwei Termini
TNF	Tumor-Necrosis-Factor
TSL	Total-Strut-Length
VG	Versuchsgruppe
WHO	World Health Organization

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Osteoporose ist eine Skeletterkrankung, die durch eine herabgesetzte Knochenfestigkeit charakterisiert ist und zu einem erhöhten Frakturrisiko prädisponiert (NIH-CDP 2001). Bedeutung erlangt die Osteoporose durch ihre hohe Prävalenz, die erheblichen Kosten für das Gesundheitssystem und die starke Beeinträchtigung der Lebensqualität der Betroffenen (RINGE 1995). Sie betrifft über 75 Millionen Menschen in Europa, Japan sowie den USA und verursacht allein in Europa und den USA jährlich über 2,3 Millionen Frakturen. Drei anatomische Lokalisationen sind führend hinsichtlich der Frakturhäufigkeit: Proximaler Femur, distaler Radius und Wirbelkörper (RINGE 1995). Heute wird die Osteoporose zu den 10 wichtigsten Volkskrankheiten gezählt (BARTL R 2008).

Hauptursache für Osteoporose ist der postmenopausale Östrogenmangel. Nach der WHO (1994) ist weltweit etwa ein Drittel aller postmenopausalen Frauen von Osteoporose betroffen.

Tiermodelle bieten sich zur Erforschung der postmenopausalen Osteoporose aus mehreren Gründen an. Da es sich um eine langsam fortschreitende Erkrankung handelt, dauert die Sammlung entsprechender Daten am menschlichen Objekt sehr lange und die Studienpopulation ist aufgrund von Migration oder Ableben kaum zu erhalten. Darüber hinaus bieten Tiermodelle die Möglichkeit, den Einfluss von menschlichen Lifestylefaktoren auszuschalten oder experimentelle Therapien zu untersuchen (TURNER AS 2001).

Ein optimales Tiermodell, das allen Fragestellungen gleichermaßen gerecht wird, gibt es nicht. Die ovarektomierte Ratte stellt derzeit den „Goldstandard“ in der Osteoporoseforschung dar (CASTANEDA et al. 2008). Aufgrund der limitierten Größenverhältnisse ist die Ratte für die Klärung bestimmter Fragestellungen jedoch ungeeignet. So kann eine ortstypische Insertion von dentalen oder orthopädischen Implantaten nicht erfolgen. Anstatt in den Mund werden die Implantate z. B. in den Femur eingebracht, so dass u. a. die Exposition mit der Mundflora unterbleibt und die Ergebnisse nur bedingt übertragbar sind.

Schweine erscheinen für die Erforschung der Osteoporose sehr vielversprechend. So ist z. B. der Östruszyklus der Schweine dem Menstruationszyklus der Frau sehr ähnlich, und Schweine gehören zu den wenigen Tieren, bei denen es infolge ausgeprägter Osteopenie zu Spontanfrakturen kommen kann (SPENCER 1979). Daneben gleicht die Physiologie des

Kreislauf- und Verdauungsapparates derjenigen des Menschen weitgehend (BEGLINGER et al. 1975) und die anatomischen Dimensionen erlauben die ortstypische Insertion von Implantaten (SCHLIEPHAKE et al. 1991, TURNER AS 2001, NEUGEBAUER et al. 2006).

Ziel der vorliegenden Arbeit soll es daher sein, durch Ovarektomie an Göttinger Minischweinen eine postmenopausale Osteoporose zu simulieren sowie im Anschluss die sich ergebenden Änderungen des Trabekelvolumens und der Mikrostruktur an Lendenwirbeln, Femur- und Tibiaknochen histomorphometrisch zu untersuchen.

2 Literaturübersicht

2.1 Osteoporose

2.1.1 Definition

Die Definition der Osteoporose hat im Laufe der Zeit einige Veränderungen erfahren. Die aktuelle Definition des „National Institute of Health Consensus Development Panel on Osteoporosis“ (NIH-CDP) aus dem Jahre 2001 stellt das Frakturrisiko in den Mittelpunkt. Demnach ist die Osteoporose eine Störung des Skeletts, die durch eine herabgesetzte Knochenfestigkeit charakterisiert ist und zu einem erhöhten Frakturrisiko prädisponiert. Die Knochenfestigkeit spiegelt primär die Vernetzung von Knochendichte und Knochenqualität wider. Die Knochenqualität beinhaltet die Mikroarchitektur, den Knochen-Turnover, die Akkumulation von Mikrofrakturen sowie die Mineralisation (Abbildung 1).

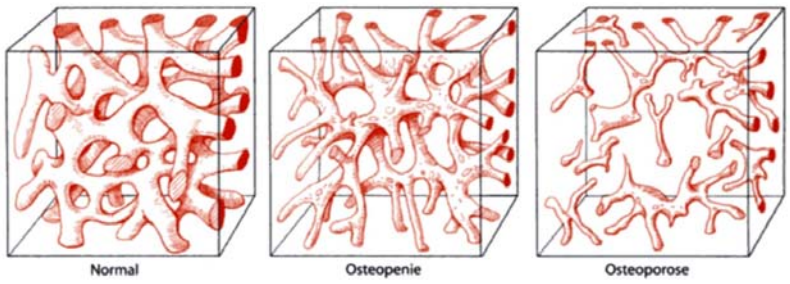

Abbildung 1: *Verlauf der architektonischen Zerstörung spongiösen Knochens. Links: Zusammenhängende, vernetzte Knochenbälkchen mit zahlreichen Knoten (normale Spongiosa). Mitte: Vermehrt osteoklastäre Resorptionslakunen mit Verschmälerung der Knochenbälkchen (Osteopenie). Rechts: Weiterer Knochenschwund mit Unterbrechung des trabekulären Netzwerkes (Vollbild der Osteoporose) (BARTL R und BARTL C 2004, S. 26).*

In dieser Definition bleibt offen, ab welchem Grad der Verminderung der Knochendichte von Osteoporose zu sprechen ist. Eine Arbeitsgruppe der WHO (1994) hat daher für die praktische Diagnostik eine Richtlinie vorgeschlagen, nach der eine Osteoporose dann vorliegt, wenn der mittels Dual X-Ray Absorptiometry (DXA) gemessene T-Wert um mehr als 2,5 Standardabweichungen erniedrigt ist. Der T-Wert gibt an, um wie viele Standardabweichungen die individuelle Knochenmineraldichte (Bone-Mineral-Density,

BMD) unterhalb des Mittelwertes der Peak-Bone-Mass (PBM) bei gesunden Menschen im Alter zwischen 25 und 40 Jahren liegt. Sind zusätzlich noch eine oder mehrere Frakturen vorhanden, so besteht eine klinisch manifeste Osteoporose (WHO 1994) (Tabelle1).
Die PBM ist die Menge an Knochenmasse, die am Ende der skelettalen Entwicklung erreicht wird (BONJOUR et al. 1994). Die Ursachen für erhöhte Frakturneigung werden also zumindest teilweise bereits in jungem Lebensalter angelegt (WANG et al. 2009). Die Höhe der PBM wird beeinflusst durch genetische Faktoren, Geschlecht, Ernährung, endokrine Faktoren, mechanische Belastung des Skeletts und das Vorliegen von Risikofaktoren (BONJOUR et al. 1994).

Klinisches Stadium	***Kriterien***
Normalbefund	T-Wert: ≥ -1,0 Standardabweichungen Keine Fraktur(en)
Osteopenie	T-Wert: < -1,0 und > -2,5 Standardabweichungen Keine Fraktur(en)
Osteoporose	T-Wert: ≤ -2,5 Standardabweichungen Keine Fraktur(en)
Schwere Osteoporose (klinisch manifeste Osteoporose)	T-Wert: ≤ -2,5 Standardabweichungen Fraktur(en)

Tabelle 1: *WHO-Definition der Osteoporose (World Health Organization 1994).*

2.1.2 Einteilung nach der Ätiologie

Die generalisierte Osteoporose kann ätiologisch in primäre und sekundäre Formen eingeteilt werden (RINGE 1995, BARTL R und BARTL C 2008).
Bei der primären Osteoporose handelt es sich um einen Knochenverlust, der nicht mit chronischen Grunderkrankungen zusammenhängt, sondern mit einem Östrogenmangel und Alterungsprozessen vergesellschaftet ist (RIGGS und MELTON 1986, GAMBACCIANI und CIAPONI 2000). Zu den primären Osteoporoseformen werden die

- idiopathische Osteoporose
- postmenopausale (Typ I-) Osteoporose
- Involutions- (senile, Alters-, Typ II-) Osteoporose

gezählt (BARTL R und BARTL C 2004).
Bei der sekundären Osteoporose kommt es im Zuge einer anderen Grunderkrankung zu einer generalisierten Störung des Knochenstoffwechsels. Nach der NIH-CDP (2001) können folgende Gruppen unterschieden werden:

- Genetische Störungen
- Hypogonadismus
- Endokrine Störungen
- Gastrointestinale Erkrankungen
- Hämatologische Störungen
- Bindegewebserkrankungen
- Fehlernährung
- Arzneimittel
- Andere chronische Erkrankungen wie kongestive Herzinsuffizienz, Nierenerkrankungen und Alkoholismus.

2.1.2.1 Postmenopausale (Typ I-) Osteoporose

Die PBM wird beim Menschen im jungen Erwachsenenalter erreicht und nimmt jenseits der 3. oder 4. Dekade in beiden Geschlechtern wieder ab (MORA und GILSANZ 2003). Der mit dem Alter zusammenhängende Knochenverlust beträgt jährlich im Durchschnitt 0,7 % und ist ein normales biologisches Phänomen. Dieser Knochenverlust wird allerdings durch postmenopausalen Östrogenmangel beschleunigt, so dass Frauen für Osteoporose und deren Komplikationen anfälliger sind (KUMAR und ROBBINS 2007).
Im Alter von 45-50 Jahren lässt bei Frauen die Ovarialfunktion nach, was mit einem absinkenden Östrogenspiegel einhergeht. Der postmenopausale Östrogenmangel bewirkt eine Reduktion der Knochenmasse von bis zu 2 % bei kortikalem und bis zu 9 % bei spongiösem Knochen pro Jahr, was sich in 30 bis 40 Jahren zu einem Gesamtknochenverlust von 35 % bei kortikalem und 50 % bei trabekulärem Knochen aufsummieren kann (ROSENBERG 2010).
Dass Knochenzellen Östrogenrezeptoren aufweisen, ist heute unumstritten. Sowohl in periostalen Zellen als auch in Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten konnten

inzwischen Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden (ERIKSEN et al. 1988, OURSLER et al. 1991b, WESTERLIND et al. 1995, HOYLAND et al. 1997, ONOE et al. 1997).

Östrogen hemmt die Differenzierung von Progenitorzellen zu Osteoklasten (SHEVDE et al. 2000, SRIVASTAVA et al. 2001, GARCIA PALACIOS et al. 2005), und in differenzierten Osteoklasten wird sowohl die Resorptionsaktivität gesenkt (OURSLER et al. 1991b, TARANTA et al. 2002) als auch die Apoptose induziert (HUGHES et al. 1996, KAMEDA et al. 1997, CHEN et al. 2005).

Weiterhin hemmt Östrogen die Bildung von Il-1 und TNF-α in Knochenmarkzellen und Monozyten (PACIFICI 1999, CENCI et al. 2000, ROGGIA et al. 2001) sowie von Il-1, Il-6 und TNF-α in Osteoblasten und Stromazellen (GIRASOLE et al. 1992, JILKA 1998, MARTIN et al. 1998, OURSLER 1998). Im Gegensatz dazu wird die Expression von TGF-β in Osteoblasten und Knochenmarkmakrophagen gesteigert (OURSLER et al. 1991a, FINKELMANN et al. 1992, GAO et al. 2004).

Pro-resorptive und kalzitrope Faktoren wie Il-1, Il-6 und TNF-α induzieren in Osteoblasten, Knochenmarkstromazellen, Fibroblasten und T-Lymphozyten die Expression des „Receptor Activator of Nuclear Factor κB-Ligand“ (RANKL) (AHLEN et al. 2002, PALMQVIST et al. 2002, BOYLE et al. 2003, KWAN TAT et al. 2004). Der RANK-Ligand bindet an den membranständigen Rezeptor RANK, was neben Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung auch zu einer Verlängerung der osteoklastären Lebensdauer führt (BOYLE et al. 2003) (Abbildung 2).

Obwohl der Großteil des Knochenverlusts infolge Östrogenmangels primär durch die verstärkte Knochenresorption zustande kommt, ist verminderte Knochenbildung ebenfalls ein mitwirkender Faktor beim Knochenverlust (CHOW et al. 1992, QU et al. 1998).

Östrogen beeinflusst an Osteoblasten die Expression zahlreicher Gene, die für Enzyme, Zytokine und Wachstumsfaktoren, Knochenmatrixproteine, Hormonrezeptoren sowie Transkriptionsfaktoren kodieren (SPELSBERG et al. 1999). Neben der bereits erwähnten Hemmung der pro-resorptiven Faktoren Il-1, Il-6 und TNF-α wird durch Östrogen z. B. die Expression von Kollagen Typ-I gesteigert (ERNST et al. 1989), so dass Östrogenmangel zur reduzierten Bildung von extrazellulärer Matrix führt (LERNER 2006).

Daneben hemmt Östrogen die Apoptose von Osteoblasten (MANOLAGAS 2000), und die bei Östrogenmangel erniedrigte Expression von TGF-β führt zu herabgesetzter Osteoblastenprolieferation und Differenzierung (OURSLER et al. 1991a).

Osteoblasten und Knochenmarkstromazellen sind wichtig für die Regulation der Osteoklastenbildung, da sie u. a. Osteoprotegerin (OPG) exprimieren (LERNER 2006).

Östrogen erhöht die OPG-Expression in Osteoblasten (HOFBAUER et al. 1999). Sezerniertes OPG bindet und neutralisiert RANKL, so dass die Osteoklastogenese gehemmt und die Lebensdauer von Osteoklasten vermindert wird (BOYLE et al. 2003) (Abbildung 2).

Zahlreiche Studien belegen die Mikrostrukturveränderungen an Knochen bei postmenopausaler Osteoporose (PARFITT et al. 1983, KIMMEL et al. 1990, SNYDER et al. 1993, RITZEL et al. 1996, SILVA und GIBSON 1997).

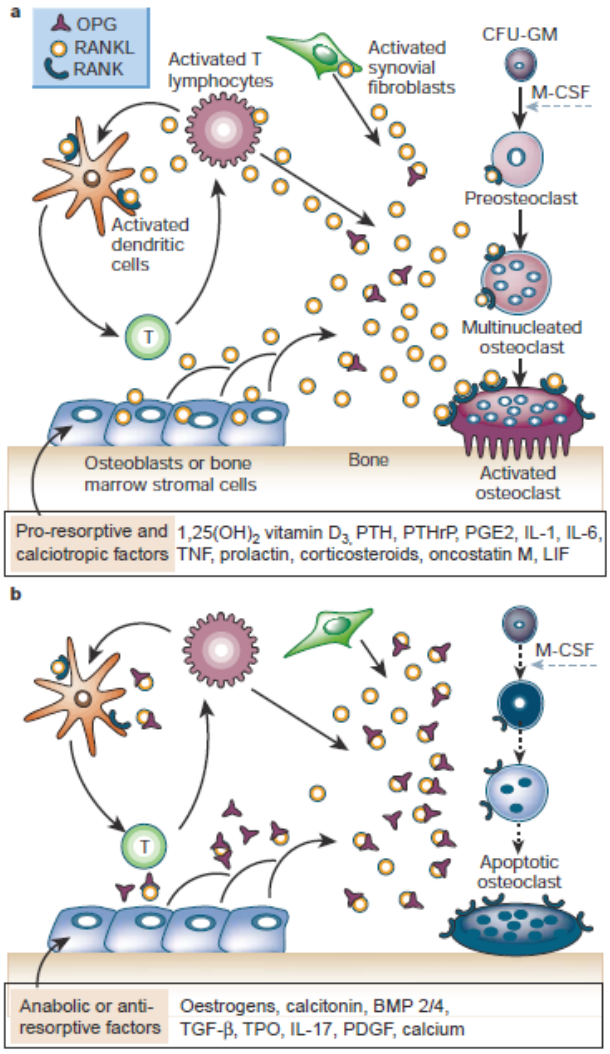

Abbildung 2: *Hormonelle Kontrolle der Knochenresorption (Einzelheiten siehe Text) (BOYLE et al. 2003, S. 341).*

Die Knochenfestigkeit wird von Materialeigenschaften wie Knochenmasse, Knochenmineralgehalt oder Größe, Form und Mikrostruktur der Knochen bestimmt

(AHLBORG et al. 2003). Zahlreiche Studien belegen den Einfluss der Mikrostruktur auf die Knochenfestigkeit (SILVA und GIBSON 1997, LEGRAND et al. 2000, THOMSEN et al. 2002, KLEEREKOPER et al. 1985, DALLE CARBONARE und GIANNINI 2004). Die mit dem Alter auftretende Knochenbrüchigkeit wird in erster Linie auf den Verlust an Knochendichte zurückgeführt, aber auch Änderungen der Knochenstruktur können die Knochenfestigkeit beeinflussen (AHLBORG et al. 2003).
So waren in Beckenkammbiopsien von Patientinnen mit osteoporotischen Wirbelfrakturen neben einer Erniedrigung der Knochenmasse auch signifikante Veränderungen der trabekulären Mikrostruktur nachweisbar (KLEEREKOPER et al. 1985, RECKER 1993). Eine Studie von GENANT et al. (2007) zeigte, dass mit abnehmendem Knochenvolumen, Trabekelzahl und Konnektivität sowie steigendem Trabekelabstand zunehmend schwerere Wirbelfrakturen auftreten.
AMLING et al. (1994) fanden bei Personen mit postmenopausaler Osteoporose eine Verminderung des Trabekelvolumens sowie der Mikrostruktur über die gesamte Wirbelsäule. Zusätzlich korrelierte das Trabekelvolumen mit Mikrostrukturparametern.

2.1.3 Epidemiologie und Bedeutung

Bedeutung erlangt die Osteoporose durch ihre hohe Prävalenz, die erheblichen Kosten für das Gesundheitssystem und die starke Beeinträchtigung der Lebensqualität der Betroffenen (RINGE 1995). Da die Lebenserwartung in den westlichen Industrienationen beständig steigt, erhöht sich auch die Zahl der Menschen, die an altersbedingten chronischen Krankheiten leiden.
Weltweit ist nach der WHO (1994) etwa ein Drittel aller postmenopausalen Frauen von Osteoporose betroffen. In Europa verursacht die Osteoporose jährlich 2,7 Mio. Frakturen mit geschätzten direkten Kosten von 36 Mrd. € (BLACK et al. 2006, KANIS et al. 2008). Etwa 1 % aller Todesfälle wird durch Hüftfrakturen verursacht, vergleichbar mit der Anzahl von Todesfällen durch das Mammakarzinom (BARTL R 2008).
In Deutschland leben heute etwa 7,8 Millionen Osteoporosekranke. Betroffen ist etwa jede dritte postmenopausale Frau (HÄUSSLER et al. 2006) und jeder fünfte Mann über 50 Jahre (RINGE 2000). Nur 20 % davon werden mit einem bei Osteoporose indizierten Arzneimittel behandelt (HÄUSSLER et al. 2006).
Von den insgesamt 5 Mio. postmenopausalen Frauen in Deutschland leiden 2 Mio. unter den Folgen von Wirbelkörperfrakturen (HÄUSSLER et al. 2006). 90 % aller

Oberschenkelhals- und Wirbelkörperfrakturen und 70 % aller distalen Radiusfrakturen sind auf Osteoporose zurückzuführen (BARTL R et al. 2003). Pro Jahr treten schätzungsweise 100.000 Schenkelhalsfrakturen bei postmenopausalen Frauen auf. Diese allein verursachen in Deutschland jährliche Folgekosten in Höhe von über 3 Mrd. € (HÄUSSLER et al. 2006). „Low-trauma-Frakturen“ sind auch verantwortlich für Schmerzen, lang andauernde Morbidität, Verlust an Mobilität bis hin zu permanenter Hospitalisierung – ein zunehmendes Problem in der Geriatrie (BARTL R 2008).
Die manifeste Osteoporose ist auch mit erhöhter Mortalität verbunden. An einer Hüftfraktur sterben immer noch 20–30 % der Patienten, bevorzugt in den ersten 3–6 Monaten nach dem Frakturereignis (KANIS et al. 2003). Die Einführung des Begriffs DALY („disability and life-year lost“) ermöglicht erstmals einen messbaren Vergleich der klinischen Relevanz der Osteoporose mit anderen chronischen Volkskrankheiten (KANIS et al. 2008). Die Osteoporose wird heute zu den 10 wichtigsten Volkskrankheiten gezählt (BARTL R 2008).

2.2 Tiermodelle in der Osteoporoseforschung

2.2.1 Definition, Bedeutung und Anforderungen

Nach KALU (1991) ist ein Tiermodell zur Untersuchung des postmenopausalen Knochenverlusts definiert als ein lebendes Tier, an dem spontaner oder induzierter Knochenverlust untersucht werden kann und an dem die Charakteristika des Knochenverlustes sowie seiner Folgezustände dem Knochenabbau bei postmenopausalen Frauen in einem oder mehreren Gesichtspunkten ähneln. Auch wenn ein Tiermodell die menschlichen Bedingungen nicht exakt nachbildet, so kann es dennoch dazu dienen, einige Aspekte des Knochenverlustes zu studieren.
Der Bedarf an Tiermodellen für die Osteoporoseforschung ist nach wie vor aus mehreren Gründen gegeben. So betrifft Osteoporose praktisch ausschließlich den Menschen, und die Erkrankung schreitet zudem nur sehr langsam voran. Eine klinische Studie bedarf somit eines enormen Zeitaufwandes, ist mit hohen Kosten verbunden und der Erhalt der Studienpopulation ist aufgrund von Migration oder Ableben problematisch (TURNER AS 2001).

Weiterhin gibt es sehr viele individuelle Einflussfaktoren, die mit einer erhöhten Inzidenz der Osteoporose vergesellschaftet sind. Dazu zählen unter anderem Ernährung, Alkohol- oder Nikotinkonsum (HEANEY 1996). Aus diesem Grund ist es schwierig, einheitliche Studiengruppen aufzustellen, so dass die zahlreichen Einflussfaktoren nicht zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Durch Verwendung eines geeigneten Tiermodells können die genannten Probleme wie lange Studiendauer, hohe Kosten oder Einfluss von Lifestylefaktoren gering gehalten werden, indem die experimentellen Bedingungen bedarfsgerecht gewählt und standardisiert werden.

Ein weiterer Grund für den Bedarf an Tiermodellen ist die Erprobung von neuen Implantaten oder experimentellen Therapien. Die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) verlangt seit 1994 für die Evaluation von neuen experimentellen Arzneimitteltherapien die präklinische Untersuchung an der Ratte sowie an einem Großtiermodell (THOMPSON et al. 1995). Darüber hinaus ist es möglich, an geeigneten Tiermodellen Knochenimplantate zu entwickeln, die zu einem verbesserten Ergebnis in osteoporotischem Knochen führen. Die biologischen und biomechanischen Eigenschaften von Implantaten können dabei ausführlich untersucht werden (NEWMAN et al. 1995).

Tiermodelle dienen dazu, in kontrollierter Art und Weise Fragestellungen zu beantworten, die aus den Beobachtungen des klinischen Alltags resultieren (CLAES und AUGAT 2000). Ein gutes Tiermodell muss hierzu verschiedene Anforderungen erfüllen: Es sollte der Fragestellung angemessen sowie für ihre Beantwortung geeignet sein und es sollte sich gut auf die humane Situation übertragen lassen (KALU 1991, RODGERS et al. 1993). Weiterhin sollten ausreichend Hintergrundinformationen über die biologischen Eigenschaften des Tiermodells vorliegen und die aufzubringenden finanziellen Aufwendungen sollten möglichst niedrig sowie die Handhabung und experimentelle Manipulationen möglichst leicht sein. Darüber hinaus sollte das Tiermodell ökologisch, ethisch sowie gesellschaftlich unbedenklich sein und die Verfügbarkeit auch von genetisch einheitlichen Tieren sollte ausreichend gegeben sein (DAVIDSON et al. 1987).

Bei der Betrachtung von Tiermodellen für Untersuchungen zur Osteoporose muss berücksichtigt werden, wann bei dem Tiermodell die PBM erreicht wird und ob es anschließend zu alters- oder östrogenabhängigem Knochenverlust kommt. Es ist wichtig zu wissen, ob der Knochenverlust kortikalen und spongiösen Knochen gleichermaßen betrifft und ob er wie beim Menschen zu erhöhter Fragilität sowie Spontanfrakturen führen kann. Auch die Frage nach Begleiteffekten der Ovarektomie wie gesteigerter Appetit, die die

Ergebnisse verfälschen könnten, sollte in die Betrachtung eingeschlossen werden (TURNER AS 2001).
Kein Tiermodell kann alle diese Anforderungen erfüllen. Vor Beginn einer Studie muss daher genau abgewägt werden, welches Tiermodell für die Beantwortung der entsprechenden Fragestellung am besten geeignet erscheint. Die Verwendung eines einzelnen Tiermodells kann in der Regel keinen zu verallgemeinernden Erkenntniszuwachs liefern (TURNER AS 2001).

2.2.2 Osteoporoseinduktion durch Ovarektomie

Im Gegensatz zum Menschen fehlt den meisten Säugetieren mit Ausnahme einiger Primaten ein physiologisches Sistieren der Ovarialfunktion, die der menschlichen Menopause entspricht. Sie weisen lebenslange Östruszyklen auf oder werden erst kurz vor dem Lebensende azyklisch (SONE et al. 2007). In einem solchen Fall kann durch Ovarektomie (OVX) ein Ende des Östruszyklus herbeigeführt werden, so dass ein Zustand erreichet wird, welcher der Postmenopause der Frau ähnelt (REINWALD und BURR 2008).
Die Postmenopause bei der Frau zeichnet sich in erster Linie durch Osteoporose und kardiovaskuläre Erkrankungen, aber auch durch „hot flashes“, urogenitale Probleme, Schlafstörungen oder Beeinträchtigung der kognitiven Funktionen aus (BELLINO 2000). Während sich die Menopause bei der Frau langsam einstellt, führt eine chirurgische OVX zu einem abrupten Abfall des Hormonspiegels.
Bei einigen Tiermodellen reicht der Effekt einer alleinigen OVX zur Induktion einer Osteoporose nicht aus, da verschiedene Tierarten unterschiedlich reagieren. So kommt es z. B. bei Primaten zu einem deutlichen Knochenverlust (MILLER et al. 1986), wohingegen sich die Knochenmasse bei Hunden nicht verändert (SHEN et al. 1992). In einem solchen Fall kann der Knochenverlust durch Kalziumrestriktion, Induktion einer metabolischen Azidose (REINWALD und BURR 2008) oder Glukokortikoidgabe verstärkt werden (EGERMANN et al. 2005).
Die FDA empfiehlt Tiermodelle mit OVX zur Untersuchung von Knochenverlust (THOMPSON et al. 1995).

2.2.3 Kleintiermodelle

In der Osteoporoseforschung finden verschiedene Kleintiermodelle wie z.B. Ratten, Mäuse oder Hasen Verwendung (BELLINO 2000).

2.2.3.1 Ratten

Das in der Osteoporoseforschung am häufigsten verwendete Tiermodell ist die Ratte (KALU et al. 1989, KALU 1991), wobei die Wistar-, Sprague-Dawley- oder Fischer-344-Ratten häufig gebrauchte Arten darstellen.
Ratten haben eine Lebenserwartung von drei bis vier Jahren. Je nach dem Lebensalter der verwendeten Tiere wird zwischen einem „aged rat model“ und einem „mature rat model“ unterschieden. Während bei ersterem ca. 12 Monate alte Ratten eingesetzt werden, finden bei dem „mature rat model“ ca. 3 Monate alte Tiere Verwendung (KALU 1991). Ratten erreichen ihre PBM bereits mit jungem Lebensalter (Tabelle 2) und zeigen im Rahmen des allgemeinen Alterungsprozesses einen Verlust von Knochenmasse (KLEIN und FOROUD 2003).
Die Verwendung von Ratten als Versuchstier bietet zahlreiche Vorteile. So sind Ratten im Erwerb und im Unterhalt kostengünstig sowie einfach zu halten. Weiterhin ist die Öffentlichkeit an die Verwendung von Ratten als Versuchstiere gewöhnt (TURNER AS 2001).
Ein weiterer Vorteil ist die gute Studienlage zum Knochenverlust an ovarektomierten Ratten (FROST und JEE 1992, BELLINO 2000). Durch Verwendung von genetisch vereinheitlichten Zuchtlinien ist es möglich, den störenden Einfluss von genetischen Variablen auf die Studienergebnisse zu reduzieren (TURNER AS 2001).
Die ovarektomierte Ratte als Tiermodell für die postmenopausale Osteoporose zeigt viele Ähnlichkeiten mit der Erkrankung beim Menschen. So ist die Turnover-Rate im Knochen erhöht, wobei die gesteigerte Resorption die ebenfalls gesteigerte Knochenbildung übertrifft (KALU et al. 1989). Der Knochenverlust ist in der Initialphase nach OVX beschleunigt (WRONSKI et al. 1988) und auch die Wirkung von Östrogenen (AITKEN et al. 1972, WRONSKI et al. 1988, KALU et al. 1991a), Calcitonin (GRUBER et al. 1984, MAC INTIRE et al. 1988, HAYASHI et al. 1989), Tamoxifen (TURNER RT et al. 1987, TURKEN et al. 1989, KALU et al. 1991b), Parathormon (REEVE et al. 1980, HEFTI et al. 1982, HORI et al. 1988, KALU et al. 1990, LIU und KALU 1990),

1, 25 $(OH)_2$-Vitamin D_3 (LINDGREN und LINDHOLM 1979, LINDGREN und DE LUCA 1982, FAUGERE et al. 1986, GALLAGHER 1990) und Bisphosphonaten (WRONSKI et al. 1989b, STORM et al. 1990) auf den Knochen ist der Wirkung beim Menschen ähnlich.

Wie beim Menschen betrifft der Knochenverlust der ovarektomierten Ratte in erster Linie die Spongiosa, während der Verlust an kortikalem Knochen sehr begrenzt ist (TURNER TT et al. 1984, JEE et al. 1990, LIU und KALU 1990).

Die Nachteile des Rattenmodells liegen zum einen darin, dass Nagetiere keine physiologische Menopause aufweisen, so dass das Östrogendefizit artifiziell herbeigeführt werden muss (WRONSKI et al. 1985, FROST und JEE 1992). Obwohl OVX zu signifikantem Knochenverlust führt, zeigen junge Ratten nur ein geringes Remodeling durch Basic-Multicellular-Units (BMU) (KALU 1991, FROST und JEE 1992, TURNER AS 2001). Die Assoziation zwischen Osteopenie und Spontanfraktur nach Bagatelltraumata wird bei Ratten nicht beobachtet (BELLINO 2000). Ein weiterer Nachteil ist, dass das kortikale Remodeling vom Lebensalter abhängig ist. So zeigen Ratten, die jünger sind als 8 Monate, kein kortikales Remodeling und ihnen fehlen die Havers-Systeme. Ältere Ratten hingegen haben sowohl kortikales Remodeling als auch einen strukturellen Aufbau, der die Charakteristika von Havers-Systemen aufweist. Aus diesem Grund sind Ratten ein nur begrenzt geeignetes Tiermodell zur Untersuchung des Einflusses des Östrogenmangels auf den kortikalen Knochen (RUTH 1953, JEE et al. 1990, WRONSKI und YEN 1991). Das Remodeling der Spongiosa hingegen zeigt große Ähnlichkeiten zu dem des Menschen (TRAN VAN et al. 1982, BARON et al. 1984).

Weitere Nachteile bei der Verwendung von Ratten als Versuchstier umfassen eine hohe Stoffwechselrate, das geringe Blutvolumen sowie ihre geringe Körpergröße (RODGERS et al. 1993). So sind der Einsatz von prothetischen Implantaten aufgrund der geringen Größe (TURNER AS 2001) und die mehrfache Bestimmung von Serumparametern wie z. B. des Knochenstoffwechsels aufgrund des geringen Blutvolumens nicht möglich. Daneben entfällt auch die Möglichkeit der Entnahme von Beckenkammbiopsien (REINWALD und BURR 2008). Zudem ist die Osteoblastenfunktion in späteren Stadien des Östrogenmangels unbeeinflusst (WRONSKI und YEN 1991), bei der Frau dagegen vermindert.

DEMPSTER et al. (1995) untersuchten die strukturellen Veränderungen der Spongiosa an ovarektomierten Ratten im zeitlichen Verlauf. Die histomorphometrische Analyse von Tibia und Femur zeigte einen rapiden Knochenverlust in den ersten 40 Tagen, der sich in

der Folgezeit jedoch verlangsamte. Die Trabekelzahl sowie einige Konnektivitätsparameter des trabekulären Netzwerkes nahmen ebenfalls ab, wohingegen die Diskonnektivitätsparameter anstiegen. Die Trabekeldicke blieb hingegen auf Höhe des Ausgangswertes.
Abschließend bleibt festzuhalten, dass Ratten unter Berücksichtigung der beschriebenen Einschränkungen ein exzellentes Tiermodell für die Forschung am Knochen sind (BELLINO 2000) und derzeit den „Goldstandard“ als Tiermodell in der Osteoporoseforschung darstellen (CASTANEDA et al. 2008).

2.2.4 Großtiermodelle

2.2.4.1 Primaten

In der Knochenforschung häufig verwendete Primaten sind Altweltaffen wie Paviane, Javaner- oder Rhesusaffen (TURNER AS 2001, JEROME und PETERSON 2001, BELLINO und WISE 2003). Im Vergleich zu anderen Versuchstieren in der Osteoporoseforschung zeigen Primaten einige wichtige Vorteile.
So sind einige Organsysteme wie der Knochenstoffwechsel, das endokrine System oder der Gastrointestinaltrakt denen des Menschen sehr ähnlich (BALENA et al. 1993, KASRA und GRYNPAS 1994, JEROME et al. 1997). Beispielsweise ovulieren weibliche Makakenaffen monatlich und die hormonalen Muster entsprechen in großen Teilen denen des Menschen (HODGEN et al. 1977, MILLER et al. 1986). Darüber hinaus haben einige Primaten eine natürliche Menopause (WALKER und HERNDON 2008).
Je nach Art erreichen die Altweltaffen zwischen 9 Jahren (Makaka fascicularis) und 11 Jahren (Rhesusaffen) die PBM (POPE et al. 1989, JAYO et al. 1991, JAYO et al. 1994, BELLINO 2000) und besitzen wie der Mensch kortikale Osteone sowie Havers-Remodeling (JEROME und PETERSON 2001).
Viele der Nachteile, die sich bei Verwendung von Primaten als Versuchstiere ergeben, liegen darin begründet, dass sie in der Regel nicht aus Züchtungen stammen, sondern zu Versuchszwecken in freier Wildbahn eingefangen wurden. So sind die Tiere meist ausgesprochen aggressiv, was den Umgang mit ihnen deutlich erschwert. Weiterhin ist das genaue Alter der Tiere dann nicht bekannt und kann unter Zuhilfenahme des Zahnstatus etc. nur geschätzt werden (MILLER et al. 1986). Ein erhebliches Gefahrenpotential liegt in

der Möglichkeit, Zoonosen zwischen Versuchstier und Mensch zu übertragen (BROMMAGE 2001, TURNER AS 2001).
Die Erwerbs- und Haltungskosten sind im Vergleich zu anderen Versuchstieren sehr hoch, und die Verfügbarkeit von geeigneten Tieren ist vergleichsweise gering (BELLINO 2000) (Tabelle 2). Zusätzlich steht die Bevölkerung Tierversuchen an Primaten mit besonderer Ablehnung gegenüber (TURNER AS 2001).
MILLER et al. (1986) untersuchten die Änderungen des Knochenvolumens der Lendenwirbel an ovarektomierten Javaneraffen histomorphometrisch. Das Knochenvolumen war 22 Monate nach OVX im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt.
Insgesamt hält TURNER AS (2001) Primaten als Primärmodell zur Untersuchung von neuen Therapien ungeeignet. Allerdings sind Primaten von hohem Wert für den letzter Schritt vor der klinischen Erprobung von neuen Verfahren zur Osteoporosetherapie.

2.2.4.2 Schafe

Schafe erreichen ihre PBM mit ca. 3,5 Jahren (BELLINO 2000) und bieten einige Vorteile bei der Verwendung als Tiermodell für die postmenopausale Osteoporose. So sind Schafe ausgesprochen genügsam und können in Herden unter minimaler Betreuung auf Weiden gehalten werden. Dadurch wird die Haltung wesentlich vereinfacht und auch die Haltungskosten sind somit gering (TURNER AS 2001). Ein weiterer Vorteil ist die Größe der Tiere, welche die Implantation von Prothesen, die Entnahme von Beckenkammbiopsien oder umfangreicher Blutvolumina sowie das Sammeln von Urinproben erlaubt (TURNER AS 2001, TURNER AS 2002).
Ältere Schafe (über 3,5 Jahre) zeigen Havers-Remodeling (BELLINO 2000, PEARCE et al. 2007). Wie beim Menschen schützt Östrogenzufuhr auch das ovarektomierte Schaf vor Knochenverlust (HORNBY et al. 1995, TURNER AS et al. 1995b). Die protektive Wirkung von Calcitonin (GEUSENS et al. 1996) oder Raloxifen (SELZMAN et al. 2002) gegen Knochenverlust am ovarektomierten Schaf wurde ebenfalls nachgewiesen. Ein weiterer Vorteil ist, dass das Hormonprofil von Schafzibben und Frauen zeitliche und quantitative Ähnlichkeiten aufweist (GOODMAN 1994). Schafe haben einen saisonal polyöstrischen Zyklus, der abhängig von Rasse und Tageslichtlänge zwischen 14 und 21 Tage lang ist (RODGERS et al. 1993, NEWMAN et al. 1995). Die Jahreszeit beeinflusst

auch die Knochendichte. Während der anöstrischen Wintermonate ist die Knochendichte geringer (CHAVASSIEUX et al. 1991, HORNBY et al. 1995, TURNER AS et al. 1995b).
Schafe bilden keine natürliche Menopause aus (NEWMAN 1995, TURNER AS 2001) und auch Spontanfrakturen, die mit Osteopenie vergesellschaftet sind, fehlen (BELLINO 2000). Zum Knochenverlust nach OVX bei Schafen gibt es widersprüchliche Ergebnisse. So konnten TURNER AS et al. (1995a) 6 Monate nach OVX zwar einen signifikanten Knochenverlust in der Wirbelsäule feststellen, während die Änderungen im distalen Radius und Calcaneus nicht signifikant waren. TURNER AS et al. (1995b) hingegen konnten 12 Monate nach OVX keinen signifikanten Knochenverlust in Femur, Tibia und Humerus feststellen.
CHAVASSIEUX et al. (2001) fanden 6 Monate nach OVX keine signifikanten Veränderungen an Knochenvolumen und Mikrostruktur in Beckenkammbiopsien, wohingegen GIAVARESI et al. (2001) nach 24 Monaten in Wirbelkörpern eine signifikante Reduktion des Knochenvolumens und der Mikrostruktur fanden. HORNBY et al. (1995) wiederum konnten einen signifikanten Knochenverlust nach OVX über einen Zeitraum von 75 Wochen nachweisen, während SIGRIST et al. (2007) nach OVX einen initialen Knochenverlust beobachteten, der sich nach 18 Monaten als teilweise reversibel erwies.

2.2.4.3 Schweine

Das Schwein als Versuchstier gewinnt in der biomedizinischen Forschung wegen der anatomischen und physiologischen Ähnlichkeiten zum Menschen immer mehr an Bedeutung (BRANDT et al. 1998). Die Physiologie des Kreislauf- und Verdauungsapparates ist derjenigen des Menschen ähnlicher als z. B. von Hund, Katze oder Nagetieren. Nachteile des Hausschweins, die seine Haltung in Laboratorien als vielseitig verwendbares Versuchstier erschweren, sind seine Größe sowie der große Futter- und Platzbedarf. Diese Nachteile können durch die Verwendung von Miniaturschweinen, die aus zwergwüchsigen Rassen auf geringe Körpergröße gezüchtet wurden, vermieden werden. Das Minipig ist ein Tier mit genetisch fixiertem Zwergwuchs (BEGLINGER et al. 1975).
Die in der medizinischen Forschung am weitesten verbreiteten Minipig-Züchtungen sind das Yucatan-Mini- und Micropig, das Göttinger-, Sinclair- (Hormel) und das Hanford-Minipig (REINWALD und BURR 2008). Das von HARING et al. (1963) entwickelte

Göttinger Minischwein spielt unter den Minischweinen die größte Rolle in der Forschung. Es kombiniert das geringe Gewicht und die schlanke Körperform des Minnesota-Minipig, die ausgeprägte Fruchtbarkeit des Vietnamesischen Hängebauchschweines und die weiße Haut des veredelten Landschweines miteinander (BEGLINGER et al. 1975).

Schweine erreichen ihre PBM mit 2,5-3 Jahren (BOUCHARD et al. 1995) (Tabelle 2) und zeigen ein Knochenremodeling durch BMU in der Spongiosa und der Kortikalis (MOSEKILDE et al. 1993a). Schweine gehören zu den wenigen Tieren, bei denen es infolge ausgeprägter Osteopenie zu Spontanfrakturen kommen kann (SPENCER 1979). Weil Schweine Vierfüßer sind und daher ein anderes Belastungsmuster auf den Knochen aufweisen, verfügen sie über eine höhere Knochenmasse und ein dichteres Trabekelwerk als der Mensch (MOSEKILDE et al. 1993a, MOSEKILDE et al. 1993b).

Weiterhin sind Schweine groß genug, um orthopädische und dentale Implantate ortstypisch zu inserieren (SCHLIEPHAKE et al. 1991, TURNER AS 2001, NEUGEBAUER et al. 2006), wiederholte Knochenbiopsien zu tolerieren oder große Blutentnahmen (TURNER AS 2001). Der Östruszyklus des Schweins ist kontinuierlich und beträgt ca. 21 Tage, so dass er dem menschlichen Menstruationszyklus sehr ähnlich ist (MOSEKILDE et al. 1993a, BELLINO 2000).

Wie beim Menschen so spricht auch bei Schweinen OVX-abhängiger Knochenverlust auf Therapiemaßnahmen wie z. B. mit Bisphosphonaten an (BELLINO 2000, BORAH et al. 2002).

Die Nachteile bei der Verwendung von Minipigs als Tiermodelle sind die hohen Kosten und die in manchen Gebieten geringe Verfügbarkeit (BELLINO 2000, TURNER AS 2001). Bei Verwendung der größeren Hausschweine sind die Haltung und die Unterbringung nachteilig. Außerdem können Schweine laut und aggressiv sein (TURNER AS 2001).

Mehrere Studien zeigten, dass eine OVX an Sinclair-Minipigs zu einer signifikanten Abnahme der Knochendichte, des trabekulären Knochenvolumens und der Trabekelzahl sowie einem Anstieg des mittleren Trabekelabstandes führt. Die Knochenveränderungen wurden durch eine milde Kalzium-Restriktion (0,75 %) noch verstärkt (MOSEKILDE et al. 1993a, MOSEKILDE et al. 1993b). Aus diesem Grund scheinen ovarektomierte Sinclair-Minipigs in Kombination mit milder Kalzium-Restriktion ein viel versprechendes Modell für die Osteoporoseforschung zu sein.

	Maus	***Ratte***	***Kaninchen***	***Hund***	***Schwein***	***Schaf***	***Primat***
Alter bei „Peak-Bone-Mass“	4-6 Mo.	8-10 Mo.	8-10 Mo.	2-3 J.	2,5-3 J.	3,5 J.	9-11 J.
Verfügbarkeit geeigneter Tiere	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Kaufpreis	$8	$12-$14	$80	$250	$200-$500	$165	$3500
Haltungskosten pro Tag	$0,35	$0,30-$0,50	$1	$4	$4	$4	$5,50

Tabelle 2: *Vergleich forschungsassoziierter Eigenschaften bei verschiedenen Labortierarten (BELLINO 2000, S. 21).*

3 Material und Methode

3.1 Versuchsplanung

Ziel dieser Untersuchung war es, die Veränderungen der Knochenstruktur, die sich an Göttinger Minischweinen aufgrund von Ovarektomie ergeben, histomorphometrisch zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden 10 Göttinger Minischweine in zwei experimentelle Gruppen eingeteilt. Um eine osteoporotische Stoffwechsellage zu erzeugen, wurden die Tiere der Versuchsgruppe (n=5) zu Studienbeginn ovarektomiert sowie einer kalzium- und phosphatarmen Diät ausgesetzt. Die Kontrollgruppe (n=5) hingegen wurde einer ovarerhaltenden Sham-Operation unterzogen sowie mit Normdiät ernährt. Schließlich wurden die Minipigs nach acht Monaten euthanasiert, und es erfolgte die Entnahme der 5. Lendenwirbel sowie der rechten Tibia- und Femurknochen (Abbildung 3).

Nachdem von Fragmenten der entnommenen Knochen Dünnschliffpräparate (DONATH und BREUNER 1982) hergestellt worden waren, schloss sich die Färbung der histologischen Präparate nach der von SMITH und KARAGIANES (1974) beschriebenen Methode an. Auf diese Art konnten die verschiedenen Gewebearten farblich unterschieden werden: Knochengewebe stellte sich orange-rot und Kollagen dunkelblau dar, andere Weichgewebe bildeten sich hellblau ab.

Im nächsten Schritt wurde an definierten Stellen der Präparate unter 5facher Vergrößerung eine histomorphometrische Auswertung vorgenommen. Neben der Rahmenfläche als Gesamtfläche des untersuchten Abschnitts wurden auch die Fläche und der Umfang des orange-rot gefärbten Knochengewebes sowie die Markraumfläche mit einer Histomorphometrie-Software erfasst. Auf der Grundlage des „Parallel-Plate-Model“ ließen sich aus diesen Parametern das Trabekelvolumen, die Trabekeldicke, die Trabekelzahl und der Trabekelabstand berechnen (PARFITT et al. 1983). Zur weiteren Untersuchung des trabekulären Netzwerkes wurde die von SHEN et al. (1993) modifizierte Node-Strut-Analysis (GARRAHAN et al. 1986) durchgeführt sowie der Trabecular-Bone-Pattern-factor (HAHN et al. 1992) bestimmt. Die gewonnenen Daten wurden statistisch ausgewertet.

Auf diese Weise war eine vergleichende Aussage über die Knochenqualität der einzelnen Versuchstiere der Versuchs- und der Kontrollgruppe möglich.

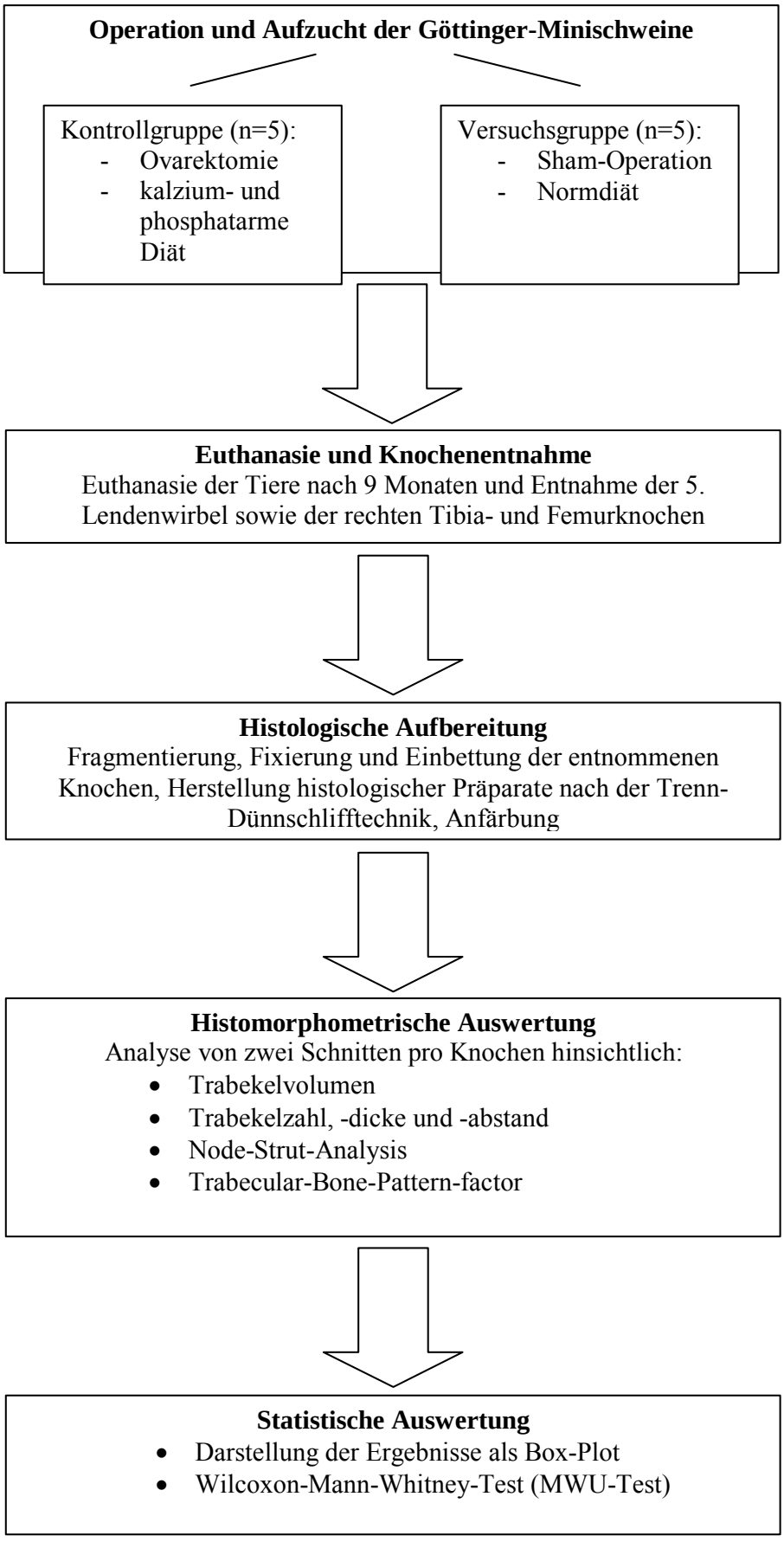

***Abbildung 3*:** *Abfolge der Arbeitsschritte in der vorliegenden Studie.*

3.2 Versuchstiere

3.2.1 Herkunft und Haltung

Für die Studie wurden 10 weibliche Göttinger Minipigs verwendet, die aus dem zur Universität Göttingen gehörenden Versuchsgut Relliehausen in Dassel stammten. Die Tiere waren im ebenfalls der Universität Göttingen angeschlossenen Versuchsgut Holtensen untergebracht. Dort wurden sie einzeln in Laufställen gehalten.

Wasser stand für die Tiere zur freien Verfügung, wohingegen die Futtermenge auf 500 g täglich begrenzt war. Da Soja eine östrogenartige Wirkung besitzt (MESSINA 2002, SONG et al. 2007), wurde Futtermittel ohne Sojazusatz verwendet (Fa. Altromin, Lage). Die genaue Zusammensetzung des Futtermittels hing von der Gruppenzuteilung ab und ist Tabelle 3 zu entnehmen.

Der Versuchszeitraum erstreckte sich von Juli 2007 bis März 2008.

Die Genehmigung für die Tierversuche wurde vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit gegeben (Az 33.42502-04-041/07).

	Kontrollgruppe	***Versuchsgruppe***
Rohprotein	17,54 %	17,68 %
Rohfett	4,01 %	4,01 %
- Vitamin D3	1000 I.E./kg	1000 I.E./kg
Rohfaser	10,04 %	10,12 %
Rohasche	7,21 %	4,87 %
Feuchtigkeit	8,93 %	9,27 %
Disaccharide	3,3 %	3,38 %
Polysaccharide	31,51 %	32,94 %
Kalzium	0,96 %	0,16 %
Phosphat	0,71 %	0,59 %
Umsetzbare Energie	2383,16 kcal/kg	2452,26 kcal/kg

Tabelle 3: *Auszug aus der Futtermittelanalyse.*

3.2.2 Gruppeneinteilung

Vor Versuchsbeginn wurden die 10 weiblichen Göttinger Minischweine nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe stellte die Versuchsgruppe dar, die andere Gruppe diente der Kontrolle.
Bei den Tieren der Versuchsgruppe wurde eine bilaterale Ovarektomie (OVX) durchgeführt und sie wurden mit einer kalzium- und phosphatarmen Diät ernährt (Tabelle 3). Bei der Diät wurde darauf geachtet, dass das Kalzium- und Phosphatverhältnis bestehen blieb und eine zu niedrige Konzentration, die zu ernsthaften Erkrankungen führen könnte, vermieden wurde. Die Kontrollgruppe hingegen wurde einer ovarerhaltenden Sham-Operation unterzogen sowie mit Futtermittel, das einen normalen Kalzium- und Phosphatgehalt aufwies, verpflegt.
Das Durchschnittsalter der Versuchsgruppe betrug zu Beginn der Studie 4,06 ± 0,72 Jahre gegenüber 3,25 ± 0,86 Jahre in der Kontrollgruppe. Das Durchschnittsgewicht der Versuchsgruppe lag bei 67,8 ± 6,76 kg, während die Kontrollgruppe ein mittleres Gewicht von 63,0 ± 11,6 kg aufwies.

3.2.3 Operation

Die Narkose für die Operationen wurde durch einen Tierarzt mit Erfahrungen auf dem Gebiet der Großtieranästhesie durchgeführt und überwacht. Nach Narkoseeinleitung durch intramuskuläre Injektion von 300-320 mg Azaperon (Stresnil, Janssen, Beerse/Belgien) im Stall wurde den Tieren ein Ohrvenen-Katheter gelegt. Im OP erhielten sie über den Katheter 230-375 mg Thiopental-Natrium (Trapanal, Altana Pharma, Konstanz), wurden intubiert und mit einem Gemisch aus Sauerstoff und Lachgas im Verhältnis von 1:4 beatmet. Die Narkose wurde zum einen durch eine kontinuierliche Ketamininfusion i.v. (2,5-5 mg/kg/KG/h; Ketamin 10 % verdünnt mit physiologischer Kochsalzlösung ad 50 ml) und zum anderen durch Piritramid (75-100 µg/kg/KG/h; 1 Ampulle = 15 mg Piritramid) (Dipidolor, Janssen-Cilag, Wien/Österreich), welches mit Sterofundin B/G5 (B. Braun, Melsungen) ad 50 ml verdünnt wurde, aufrecht erhalten. Wenn während der Operation am Ovar Schwierigkeiten durch hohen Muskeltonus entstanden, wurde bei Bedarf zusätzlich das Muskelrelaxans Diazepam i.v. infundiert.
Die OVX der Versuchsgruppe erfolgte mittels medianer Laparotomie in der Linea alba zwischen dem 4. und 5. Mammakomplex. Nach chirurgischer Absetzung des Uterus

wurden die Ovarien auf beiden Seiten mittels Thermokoagulation entfernt (Abbildung 4). Nach sorgfältiger Blutstillung erfolgte ein mehrschichtiger Wundverschluss des Bauchfells, der Muskelschichten und der Haut.

Nach Beendigung der Eingriffe wurden die Tiere bei sicherer Spontanatmung extubiert und unter einer Wärmelampe bis zum völligen Erwachen beobachtet. Anschließend erfolgte die Verlegung in die Stallanlagen. Postoperative Kontrollen wurden täglich durch das Tierpflegepersonal durchgeführt.

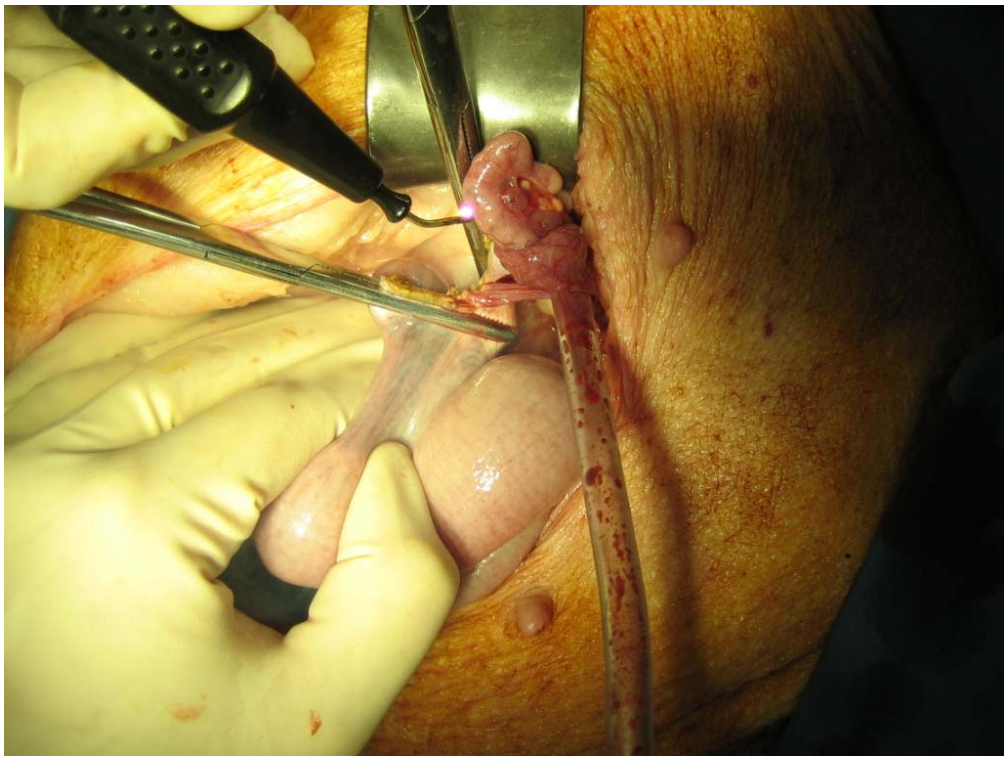

Abbildung 4: *Entfernung der Ovarien mittels Thermokoagulation.*

3.2.4 Versuchsabschluss

Nach 8 Monaten Studiendauer wurden die Tiere durch eine Überdosis an Narkosemittel (Stresnil, Janssen, Beerse/Belgien) euthanasiert. Den Tieren wurden die 5. Lendenwirbel sowie die rechten Tibia- und Femurknochen entnommen und sorgfältig von Weichgewebe einschließlich dem Periost freipräpariert. Während der Präparation wurden die Knochen mit physiologischer Kochsalzlösung (B.Braun, Melsungen) feucht gehalten.

3.3 Geräte und Reagenzien

3.3.1 Geräte und Instrumente

Für die histologische Aufbereitung:

- Bandsäge „Exakt-Trennsystem“ (Exakt-Apparatebau, Norderstedt)
- Tellerschleifgerät „Exakt-Schleifsystem“ (Exakt-Apparatebau, Norderstedt)
- Kleingefrierschrank „GS801“ mit NTC-Temperaturregler (Elektronik-Bau, Groß Lüdershagen)
- Schleif- und Poliermaschine „Struers RotoPol-35“ (Struers GmbH, Willich)
- Schleifscheiben bis P1200 (Struers GmbH, Willich)
- Siliziumcarbid-Schleifscheibe „WS Flex 18C“, Körnungen zwischen P80 und P1200 (Hermes Abrasives LTD, Virginia Beach, USA)
- Siliziumcarbid-Schleifscheibe P4000 (Struers GmbH, Willich)
- Plexiglas-Objektträger 45 x 55 x 2 mm (Patho-Service GmbH, Hamburg)
- Wärmeschrank (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach)

Für die Histomorphometrie:

- Fotomikroskop „Axioskop 2 plus“ (Carl Zeiss AG, Göttingen)
- Digitalkamera „Axiocam MRc 5“ (Carl Zeiss AG, Göttingen)
- Histomorphometrie-Software „Axiovision Release 4.6.3 Sp1“ (Carl Zeiss AG, Göttingen)

3.3.2 Chemikalien und Reagenzien

Für die histologische Aufbereitung:

- Alizarinrot S (Merck, Darmstadt)
- Ethanol (Merck, Darmstadt)
- Aqua dest. (Centramed, Koblenz)
- Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck, Darmstadt)
- Formaldehyd 37 %/ca. 1 % Methanol (CMV Chemie-Vertrieb, Hannover)
- Löfflers Methylenblaulösung 1.01287.0500 (Merck, Darmstadt)
- Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck, Darmstadt)
- Salzsäure (Merck, Darmstadt)
- Sofortklebstoff „Loctite 420“ (Henkel Loctite, München)
- Kunststoff „Technovit 9100 NEU“ (Heraeus Kulzer, Wehrheim)

Herstellung der Alizarinrot-Färbelösung:

- 0,5 g Alizarinrot S
- 45 ml aqua bidest.
- Ggf. mit 0,1 % HCl auf Sollwert-pH von 6-6,3 titrieren

3.4 Aufbereitung des Knochenmaterials

3.4.1 Fragmentierung, Fixierung und Einbettung

Unmittelbar nach der Entnahme aus dem Versuchstier wurden die Lendenwirbel sowie die rechten Tibia- und Femurknochen in handlichere Fragmente zerlegt. So wurden bei den Wirbeln die Dorn- und Querfortsätze entfernt und bei den langen Röhrenknochen wurden nur jeweils die proximalen Drittel weiterverarbeitet.
Im direkten Anschluss wurden die zugesägten Knochenfragmente zur Gewebefixierung für ca. 10 Wochen in phosphatgepufferter neutraler 4 %iger Formalinlösung gelagert. Es folgte die Wässerung der Knochenstücke mit aqua dest., um das überschüssige Formalin auszuwaschen.
Vor dem Einbettvorgang wurden die Präparate zur Dehydration in eine aufsteigende Alkoholreihe eingebracht (50 %-, 70 %-, 90 %-, 96 %- und 2 x 100 %iger Alkohol für je

zwei Tage). Für die Einbettung wurden die Präparate in geeignete Gießformen gegeben, welche im Anschluss mit selbsthärtendem Kunststoff aufgefüllt wurden. Die Verarbeitung des Kunststoffs geschah analog zur Gebrauchsanweisung des Herstellers. Die Polymerisation erfolgte für sieben Tage bei -8,5°C im Gefrierschrank.

3.4.2 Herstellung der Trenn-Dünnschliff-Präparate

Nach der Auspolymerisation des Kunststoffs wurden die eingebetteten Knochenpräparate anfänglich von groben Überschüssen freigetrimmt, so dass sie lediglich noch von einer dünnen Kunststoffschicht umgeben waren.
Es folgte das Trennen der Knochenpräparate in der Mitte der Knochen, so dass zwei Hälften entstanden. Je nach Knochen wurden verschiedene Schnittebenen verwendet. Während die Lendenwirbelkörper in der Frontalebene geschnitten wurden, kam bei den Schienbeinknochen die Sagittalebene zur Anwendung. Die Femurknochen wiederum wurden in der Frontalebene des Schenkelhalses zerteilt.
Es folgte das Planschleifen der Schnittflächen aller Knochenhälften in mehreren Stufen bis zu einer abschließenden Körnung von 1200. Anschließend wurde auf die nun planen Knochenoberflächen ein Objektträger geklebt und in 300 µm Entfernung mittels einer Bandsäge wieder vom Knochenfragment abgetrennt. Dadurch resultiert eine ca. 300 µm messende Knochenschicht, die fest mit dem Objektträger verbunden ist. Es folgte nun das Dünnschleifen dieser Knochenschicht von 300 µm auf ca. 20 µm in mehreren Schritten, das von einem Polierschritt mit der Körnung 4000 abgeschlossen wurde.
Pro Knochenhälfte wurde ein Trenn-Dünnschliff-Präparat hergestellt und wie nachfolgend beschrieben histologisch angefärbt.

3.4.3 Histologische Färbung der Präparate

Die Färbung erfolgte nach der von SMITH und KARAGIANES (1974) beschriebenen Methode. Dem Vorgehen von DAHL (1952) entsprechend wurden die polierten Schliffe erst mit Methylenblau und anschließend mit Alizarinrot S behandelt.
Für den Färbevorgang wurde das Methylenblau im Wärmeschrank auf 80°C erhitzt. Die Schnitte wurden nun für ca. 30 Sekunden in das Methylenblau getaucht und anschließend mit aqua dest. gründlich abgespült. Es folgte die Trocknung der Präparate bei

Raumtemperatur für 3-4 Stunden.
Als nächstes wurden die nun trockenen Dünnschliffe für ca. 40 Sekunden in Alizarinrot-Lösung eingelegt. Nach ebenfalls gründlichem Abwaschen mit aqua dest. wurden die Präparate für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

3.5 Histomorphometrie

3.5.1 Definition der Regions-of-Interest

Pro Knochen wurden zwei Dünnschliffpräparate histomorphometrisch ausgewertet. An den Präparaten der verschiedenen Knochen wurden mehrere Regions-of-Interest (ROI) definiert, die stets die Maße 5 x 5 mm aufwiesen (Abbildungen 5 bis 7).
Die in der Frontalebene geschnittenen Wirbelpräparate wurden anhand der Bodenplatte ausgerichtet, indem zwischen den beiden kaudalsten Abschnitten der konkaven Bodenplatte eine Verbindungslinie gezogen wurde. Eine dazu parallele Linie wurde nun auch am höchsten Punkt der Konvexität der Deckplatte konstruiert. Zu diesen beiden Linien wurden jeweils Parallelen in 5 und 10 mm Abstand gezeichnet, so dass insgesamt sechs parallele Linien resultierten. Es folgte nun das Konstruieren einer hierzu senkrechten Linie, die in diesem Fall die Mediansagittallinie repräsentierte. Auch hier wurden in 5 und 10 mm Abstand zu beiden Seiten zwei weitere Parallellinien eingezeichnet. Auf diese Weise entstanden acht ROI-Felder, von denen vier 5 mm unterhalb der Deckplatte und vier 5 mm oberhalb der Bodenplatte lagen (Abbildung 5).

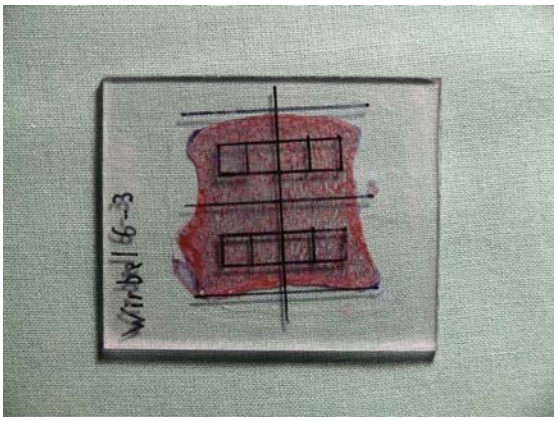

Abbildung 5: *Die acht ROI-Felder an den gefärbten Trenn-Dünnschliff-Präparaten der Wirbel.*

Bei den in der Frontalebene des Schenkelhalses geschnittenen Femurpräparaten war das Vorgehen ähnlich. Die Ausrichtung erfolgte in diesem Fall an einer Verbindungslinie, die konstruiert wurde, indem vom höchsten Punkt des Trochanter major eine Tangente an den Femurkopf gezogen wurde. Vier weitere parallele Linien wurden in 5 mm Abstand konstruiert. Eine Senkrechte zu diesen Linien wurde nun an dem Berührungspunkt der vom Trochanter ausgehenden Tangente am Femurkopf gezeichnet. Durch Konstruieren weiterer Parallellinien zu dieser Tangente im Abstand von 5 mm wurden insgesamt neun ROI-Fenster konstruiert, wobei vier im Femurkopf, vier in der Schenkelhalsregion und eines im Trochanter major lagen (Abbildung 6).

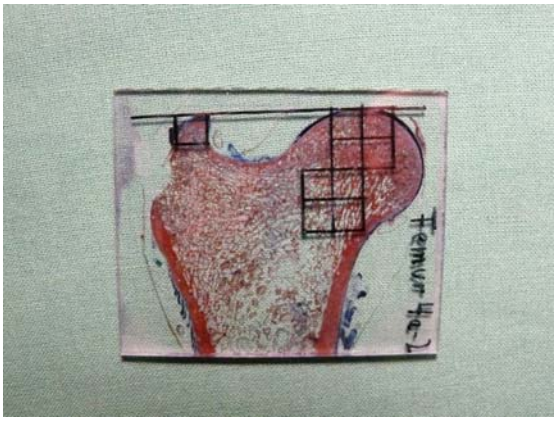

Abbildung 6: *Die neun ROI-Felder an den gefärbten Trenn-Dünnschliff-Präparaten der Femurknochen.*

Der in der Sagittalebene geschnittene Tibiaknochen wurde an einer Linie ausgerichtet, die vom höchsten Punkt der Area intercondylaris anterior zum höchsten Punkt der Eminentia intercondylaris posterior verlief. Vier dazu parallele Linien wurden nun in 5, 10, 15 und 20 mm Abstand gezeichnet, so dass insgesamt fünf parallele Linien resultierten. Es folgte nun die Konstruktion einer hierzu senkrechten Linie, welche der Area intercondylaris anterior ventral anlag. Nun wurden in 5, 10 und 15 mm Abstand weitere Parallellinien nach dorsal eingezeichnet, so dass insgesamt zehn ROI-Felder entstanden (Abbildung 7).

Abbildung 7: *Die zehn ROI-Felder an den gefärbten Trenn-Dünnschliff-Präparaten der Tibiaknochen.*

3.5.2 Technik und Prinzip der Histomorphometrie

Die Auswertung der Dünnschliffpräparate erfolgte mittels Histomorphometrie. Das Prinzip der Histomorphometrie liegt darin, dass ein vom Mikroskop vergrößertes Bild von einer Digitalkamera erfasst und an einen Personalcomputer weitergegeben wird. Mit einer Histomorphometrie-Software können anschließend verschiedenartige Messungen an den Bildern vorgenommen werden.

Zur computergestützten Quantifizierung von Bildinhalten wurde im Rahmen dieser Untersuchung eine 5fache Vergrößerung gewählt. In der Mitte jeder ROI wurde je ein digitales Farbbild (Farbtiefe 48 Bit RGB) aufgenommen (Abbildung 8). Die Digitalbilder hatten eine Auflösung zwischen 2572 x 1924 Pixel und 2586 x 1936 Pixel, was bei einer Pixelgröße von ca. 1,08 x 1,08 µm zu einer Rahmenfläche zwischen ca. 5739527 μm^2 und 5834127 μm^2 führte.

Die unterschiedlichen Gewebearten der Bilder konnten anhand ihres unterschiedlichen Färbeverhaltens differenziert und mit Hilfe des Histomorphometrie-Programms selektiv im Bild markiert werden. In den nach SMITH und KARAGIANES (1974) gefärbten Präparaten stellte sich Knochengewebe orange-rot dar. Mit Hilfe des Histomorphometrie-Programms wurde aus dem Farbbild ein Binärbild erstellt, in dem Knochen weiß und Nichtknochengewebe schwarz erschienen (Abbildung 9).

Das Binärbild war die Grundlage für alle nachfolgenden Bearbeitungsoperationen. Durch das Binärbild war die Software u. a. in der Lage, Knochenfläche und –umfang oder die Gesamtfläche des Bildausschnitts zu bestimmen, so dass weiterführende Berechnungen angestellt werden konnten (siehe Abschnitt 3.5.3 und 3.5.4).

Spongiöser Knochen ist gekennzeichnet durch ein räumlich komplex aufgebautes Trabekelwerk. Unter Stereologie wird die Ableitung einer dreidimensionalen Struktur aus einer zweidimensionalen Beobachtung verstanden (CARPENTER 1979). Wie in den folgenden Abschnitten beschrieben wird, ist es unter Annahme von Isotropie und bestimmter Strukturmodelle möglich, aus zweidimensionalen Messinformationen Rückschlüsse auf dreidimensionale Parameter wie das Knochenvolumen zu ziehen.

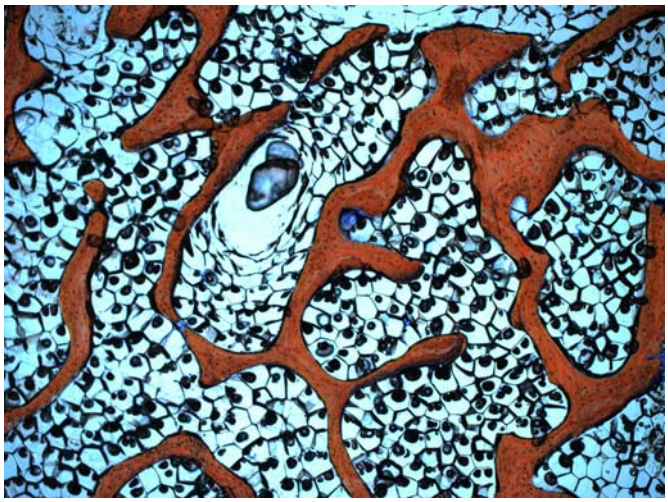

Abbildung 8: *Digitales Farbbild einer ROI als Eingabebild für das in Abbildung 9 dargestellte Binärbild. Färbung nach SMITH und KARAGIANES (1974) (Originalvergrößerung 5X).*

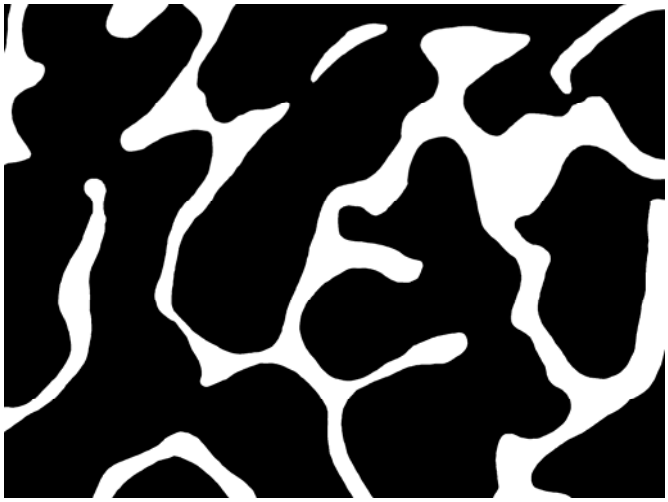

Abbildung 9: *Binärbild des Farbbildes aus Abbildung 8. Knochengewebe stellt sich weiß und Nichtknochengewebe schwarz dar.*

3.5.3 Evaluation des Knochenvolumens

In jeder ROI wurde ein Digitalbild erstellt und mit der Histomorphometrie-Software anschließend in ein Binärbild umgewandelt. An diesem Binärbild wurde die weiße Fläche (Knochen) gemessen.

Das (1) Trabekelvolumen (Total-Bone-Volume, TBV, BV/TV) wurde berechnet, indem die Gesamtfläche aller weißen Pixel (Knochenfläche, Bone Area, B.Ar) bestimmt und

durch die Rahmenfläche (Tissue-Area, T.Ar) dividiert wurde. Wenn die zweidimensionale Knochenfläche in Prozent der Rahmenfläche angegeben wird, dann ist der entsprechende Prozentwert gleich dem Wert, der sich bei Betrachtung im dreidimensionalen Raum ergibt (PARFITT 1983).
Es gilt also:

$$(1)\ \frac{BV}{TV} = 100 \times \frac{B.Ar}{T.Ar}$$ (DALLE CARBONARE et al. 2005).

3.5.4 Evaluation der Trabekelzahl und -dicke sowie des Trabekelabstands

Zur Berechnung der (2) Trabekeldicke (Trabecular-Thickness, Tb.Th, Mean-Trabecular-Plate-Thickness, MTPT), (3) der Trabekelzahl (Trabecular-Number, Tb.N, Mean-Trabecular-Plate-Density, MTPD) und (4) des Trabekelabstandes (Trabecular-Separation, Tb.Sp, Mean-Trabecular-Plate-Separation, MTPS) wurde mit der Histomorphometrie-Software an den Binärbildern die Gesamtfläche aller weißen Pixel (Knochenfläche, Bone-Area, B.Ar), die Gesamtfläche aller schwarzen Pixel (Markfläche, Marrow-Area, M.Ar), die Rahmenfläche (Tissue-Area, T.Ar) und der Umfang der Trabekeln (Bone-Perimeter, B.Pm) gemessen.
Die Berechnung dieser Parameter erfolgte nach den von PARFITT et al. (1983) angegebenen Formeln:

$$(2)\ Tb.Th = \frac{2000}{1{,}199} \times \frac{B.Ar}{B.Pm}$$

$$(3)\ Tb.N = \frac{1{,}199}{2} \times \frac{B.Pm}{T.Ar}$$

$$(4)\ Tb.Sp = \frac{2000}{1{,}199} \times \frac{Ma.Ar}{B.Pm}.$$

Die Berechnung von Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N basiert auf dem Parallel-Plate-Model, das auf der Annahme beruht, dass trabekulärer Knochen hauptsächlich aus verbundenen Platten besteht (Abbildung 10). Tb.Th ist ein Maß für die mittlere Trabekeldicke und Tb.N gibt die durchschnittliche Häufigkeit an, mit der eine zufällig über ein Präparat gezeichnete Linie

pro Längeneinheit von Trabekelelementen geschnitten wird. Tb.Sp beschreibt den Abstand zwischen den Knochenelementen im Parallel-Plate-Model (PARFITT et al. 1983, RECKER 1993).

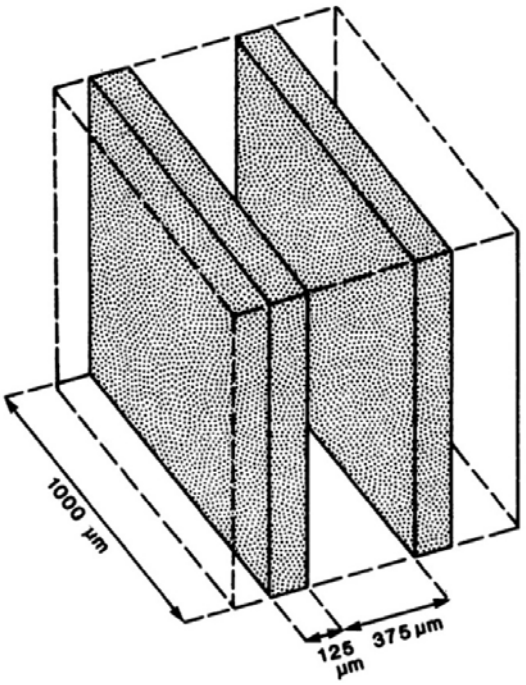

Abbildung 10: *Parallel-Plate-Model. Bei einem Würfel aus Knochengewebe mit 1000 µm Kantenlänge, der zwei parallele Knochenplatten enthält, ergeben sich folgende Werte: BV/TV 25 %, Tb.Th 125 µm, Tb.N 2/mm, Tb.Sp 375 µm (PARFITT et al. 1983, S. 1398).*

3.5.5 Node-Strut-Analysis

Zur Durchführung der Node-Strut-Analysis wurde aus dem ursprünglichen Binärbild ein verdünntes Binärbild erstellt. Dazu entfernte die Histomorphometrie-Software die randständigen Pixel des sich weiß darstellenden Knochengewebes so lange, bis eine nur ein Pixel breite Linie übrig blieb (Abbildung 11). Diese Linie spiegelte die Symmetrieachse des zugrundeliegenden Knochenprofils wider. Grundlage dieses Vorgangs war der Algorithmus nach ARCELLI. Anhand der Symmetrieachse erfolgte eine weitere Quantifizierung des Knochenprofils durch Bestimmung der Node-to-Free-End-Ratio (N/F-Ratio, No/Tm) und der Verbindungsanalyse (Strut-Analysis). Um die Auswertung zu erleichtern, wurden das ursprüngliche Binärbild und das verdünnte Binärbild addiert (Abbildung 12).

Die Bestimmung der Node-to-Free-End-Ratio wurde nach der von GARRAHAN et al. (1986) beschriebenen Methode ausgeführt. Diesem Verfahren liegt die Überlegung zugrunde, dass jedes Bildpixel (Zentralpixel) acht Nachbarpixel aufweist (Abbildung 13).

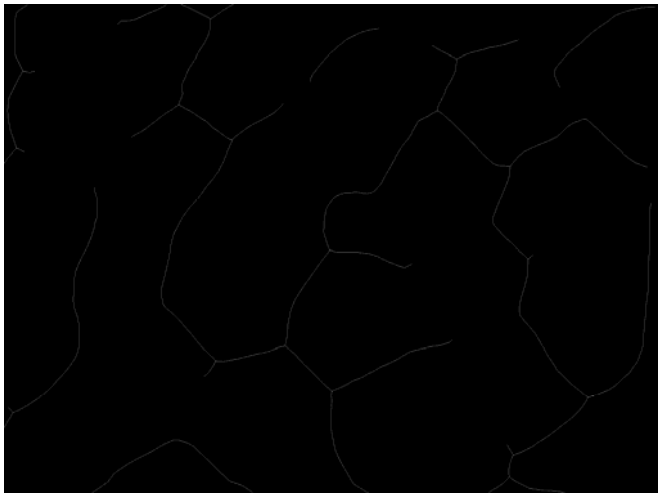

Abbildung 11: *Verdünntes Binärbild. Bei dem Binärbild aus Abbildung 9 wurden die randständigen Pixel so lange entfernt, bis eine nur ein Pixel breite Linie resultierte.*

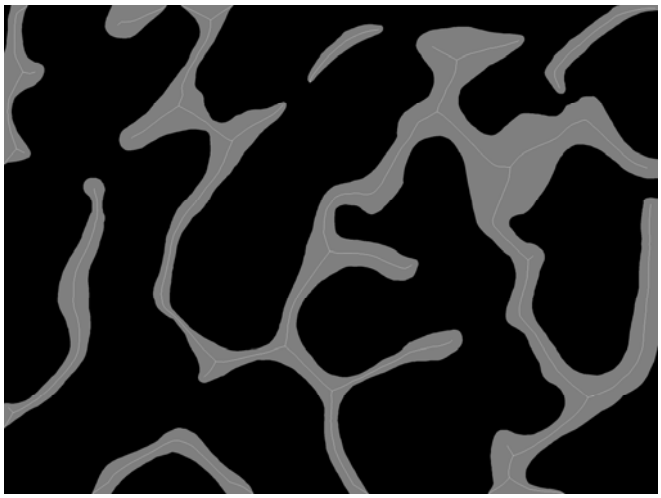

Abbildung 12: *Ergebnisbild der Addition des Binärbildes aus Abbildung 9 und des verdünnten Binärbildes aus Abbildung 11.*

Abbildung 13: *Schematische Darstellung eines Zentralpixels (Z) mit seinen acht Nachbarpixeln (1-8). Da sich im Binärbild Knochenpixel weiß und Nichtknochenpixel schwarz darstellen, handelt sich in diesem Fall um eine vierfache Trabekelkreuzung. Obwohl der Zentralpixel ein Knochenpixel ist, wurde er in dieser Abbildung zur besonderen Kennzeichnung rot dargestellt.*

Auf Pixelebene ergeben sich daher folgende mögliche Konstellationen. Eine Trabekelkreuzung (Node, No) hat mindestens drei Knochenpixel (weiß) unter den acht Nachbarpixeln (Abbildungen 14 und 15). Bei einem weißen Knochenpixel als Zentralpixel mit zwei weißen Pixeln in der Nachbarschaft handelt es sich um einen Verbindungs-Pixel (Strut-Pixel). Eine frei endende Trabekel (Free-End, FE) ist definiert als ein weißer Knochenpixel, bei welchem sieben der acht Nachbarpixel schwarz sind und damit Nichtknochengewebe widerspiegeln (Abbildung 18). Free-Ends, die durch ein Abschneiden der Trabekel durch die Bildbegrenzung entstehen, werden in der Node-Strut-Analysis nicht berücksichtigt. Die Bezeichnung „Free-End“ wird in der Literatur weitgehend synonym zu dem Begriff „Terminus“ (Tm) verwendet.

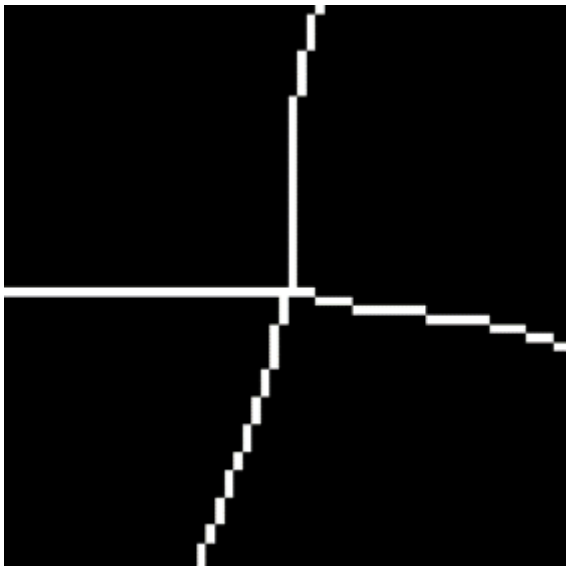

Abbildung 14: *Beispiel einer vierfachen Trabekelkreuzung (Node). Der Zentralpixel ist von vier weißen Knochenpixeln umgeben.*

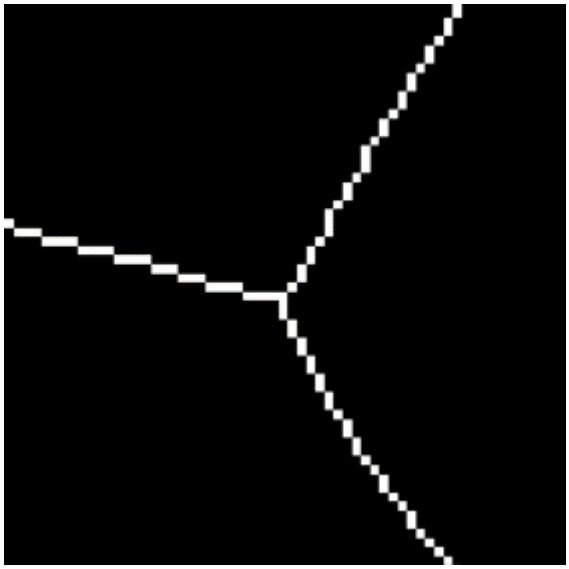

Abbildung 15: *Beispiel einer dreifachen Trabekelkreuzung (Node). Der Zentralpixel ist von drei weißen Knochenpixeln umgeben.*

Die absolute Anzahl an Nodes und Termini in einem Präparat wird im Allgemeinen auf die zugrunde liegende Rahmenfläche (T.Ar) bezogen und als Number-of-Nodes (N.No) bzw. Number-of-Termini (N.Tm) bezeichnet. Der Quotient aus N.No und N.Tm wird als Node-to-Free-End-Ratio (N/F-Ratio, No/Tm) bezeichnet. Die N/F-Ratio ist eine Möglichkeit, den Vernetzungsgrad des trabekulären Netzwerkes auszudrücken: Je höher die N/F-Ratio desto größer die Konnektivität (COMPSTON et al. 1995).

Die Strut-Analysis beruht auf den Arbeiten von GARRAHAN et al. (1986) und MELLISH et al. (1991), wurde jedoch in der vorliegenden Studie in einer modifizierten Form angewendet (SHEN et al. 1993, DEMPSTER et al. 1995). Bestimmt wurden die Gesamtlängen der Verbindungen (Struts) zwischen zwei Knotenpunkten (Node-to-Node-Strut-Length, No.No) (Abbildung 16), zwischen Knotenpunkt und Terminus (Node-to-Terminus-Strut-Length, No.Tm) (Abbildung 17) sowie zwischen zwei Termini (Terminus-to-Terminus-Strut-Length, Tm.Tm) (Abbildung 18). Die Ergebnisse wurden sowohl als Verbindungslänge pro Flächeneinheit Rahmenfläche als auch in Prozent der Gesamtverbindungslänge (Total-Strut-Length, TSL) angegeben.
Eine hohe No.Tm und Tm.Tm sprechen für einen niedrigen trabekulären Vernetzungsgrad (COMPSTON et al. 1995).

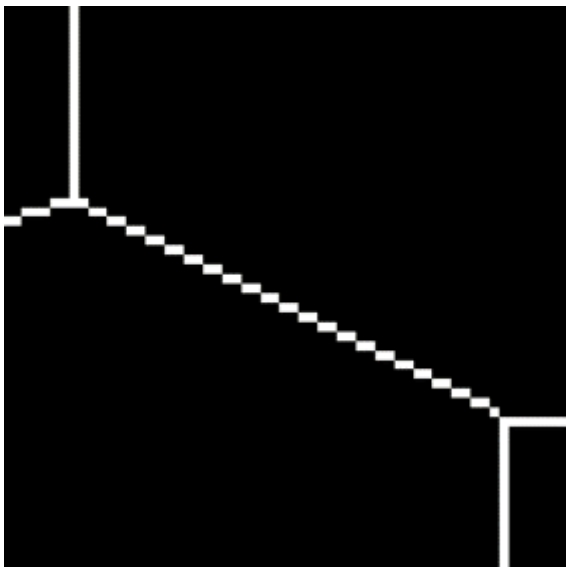

Abbildung 16: *Beispiel einer Node-to-Node-Verbindung. Zwei Trabekelkreuzungen (Nodes) werden durch eine Linie miteinander verbunden.*

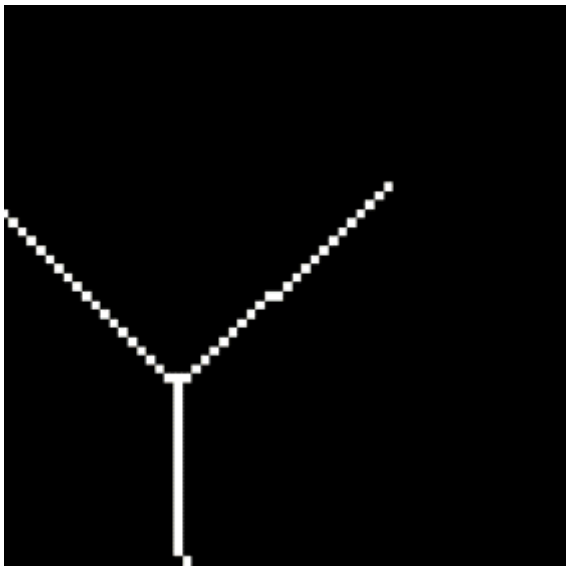

Abbildung 17: *Beispiel einer Node-to-Terminus-Verbindung. Eine Trabekelkreuzung (Node) wird durch eine Linie mit einem Terminus verbunden.*

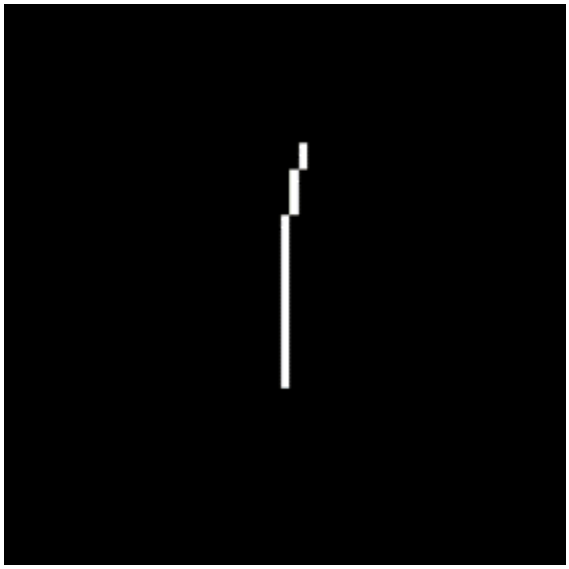

Abbildung 18: *Beispiel einer Terminus-to-Terminus-Verbindung. Die beiden endständigen Pixel weisen jeweils nur einen weißen Knochenpixel als Nachbarpixel auf und sind daher per definitionem Termini.*

3.5.6 Evaluation des Trabecular-Bone-Pattern-factor

Der Trabecular-Bone-Pattern-factor (TBPf) wurde von HAHN et al. (1992) beschrieben. Der TBPf ist ein Index, der die Konnektivität von Trabekeln in einem zweidimensionalen Schnitt beschreibt. Er beruht auf der Annahme, dass Trabekelnetzwerke anhand ihres

Verhältnisses zwischen konkaven und konvexen Oberflächen beschrieben werden können. Viele konvexe Strukturen zeigen ein schlecht vernetztes Netzwerk und viele konkave Strukturen sind das Ergebnis eines gut vernetzten Knochennetzwerks (VOGEL et al. 1990, HAHN et al. 1992, CHAPPARD et al. 1999).

Es ist möglich, das Verhältnis zwischen konkaven und konvexen Elementen einer Struktur durch die Messung von Knochenumfang vor und nach Dilatation zu berechnen und so das Trabekelwerk zu beschreiben. Wenn hauptsächlich konvexe Teile vorliegen, dann wird der Knochenumfang P nach Dilatation proportional zu der Anzahl an konvexen Elementen größer (ΔP positiv). Liegen dagegen in erster Linie konkave Anteile vor, so wird der Knochenumfang nach Dilatation kleiner (ΔP negativ). Aus diesem Grund hängt die Änderung des Umfangs vom Verhältnis zwischen konkaven und konvexen Strukturelementen ab (Abbildung 19). Im Gegensatz zum Knochenumfang steigt die Knochenfläche A nach Dilatation immer an (ΔA positiv). Die Berücksichtigung von ΔA und ΔP in der Berechnung des TBPf führt zu einer mäßigen Betonung von konvexen Teilen in der Struktur (HAHN et al. 1992). Der (5) TBPf ist definiert als:

$$(5)\ TBPf = \frac{(P1 - P2)}{(A1 - A2)}$$

$P1$ stellt den Umfang vor und $P2$ den Umfang nach der Dilatation dar. Entsprechend ist $A1$ die Knochenfläche vor und $A2$ die Fläche nach durchgeführter Dilatation (HAHN et al. 1992).

Bei gut vernetztem Knochen nimmt der TBPf kleine Werte an, wohingegen ein wenig vernetzter Knochen mit vielen isolierten Trabekeln einen großen TBPf aufweist (HAHN et al. 1992, CHAPPARD et al. 1999).

3.6 Statistische Auswertung

Pro Versuchstier wurden zwei Schliffpräparate ausgewertet, wobei - wie oben beschrieben - an jedem Präparat mehrere ROI untersucht wurden. Die Messwerte der ROI wurden addiert und anschließend für die Berechung der verschiedenen Parameter verwendet. Die dabei entstehenden Messwerte wurden anschließend der statistischen Auswertung zugeführt.

Das 1., 2. und 3. Quartil wurde nach den Angaben von SACHS und HEDDERICH (2009) ermittelt. Die Ergebnisse wurden in Form von Box Plot-Diagrammen dargestellt.

Da die Daten nicht normal verteilt waren, wurde die Signifikanz gefundener Unterschiede im paarweisen Vergleich mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (MWU-Test) durchgeführt. Die dabei zu vergleichenden Gruppen wurden als unverbunden angesehen. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0{,}05$ festgelegt.

Die statitische Auswertung erfolgte mit der Statistik-Software „Statistika“ (Software Package 9, StatSoft, Tulsa, USA).

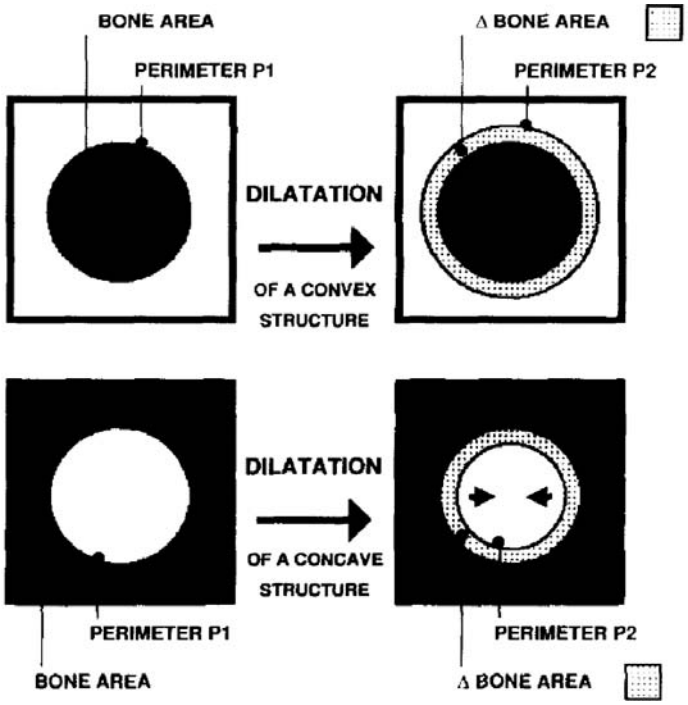

Abbildung 19: *Einfluss der Dilatation auf konvexe (oben) und konkave (unten) Strukturen. Bei konvexer Oberfläche steigt der Umfang nach der Dilatation an, während er bei konkaven Strukturen abnimmt. Die Knochenfläche hingegen steigt nach Dilatation immer an, d. h. sie nimmt sowohl bei konvexen als auch konkaven Strukturen zu (Knochengewebe weiß, Markraum schwarz) (HAHN et al. 1992, S. 328).*

4 Ergebnisse

4.1 Histomorphometrie der Wirbel

Die Ergebnisse der untersuchten Parameter sind in den Abbildungen 20 bis 35 dargestellt. Das Trabekelvolumen (BV/TV) in den 5. Lendenwirbelkörpern war nach 8 Monaten Studiendauer in der Kontrollgruppe (KG) (Abbildung 20) signifikant größer als in der Versuchsgruppe (VG) (p=0,012) (Abbildung 21). Der Medianwert bei ovarektomierten Minischweinen betrug 26,78 % gegenüber 34,04 % in der scheinoperierten Kontrollgruppe. In der Versuchsgruppe beliefen sich der Maximal- und Minimalwert auf 28,06 % und 25,81 %, in der Kontrollgruppe hingegen auf 38,08 % und 32,8 % (Abbildung 22).

Bei der Trabekeldicke (Tb.Th) war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ebenfalls signifikant (p=0,012). Während der Median in der Kontrollgruppe bei 129,04 µm lag, erreichte er in der Versuchsgruppe 94,66 µm. Der Maximal- und der Minimalwert betrugen in der Versuchsgruppe 113,08 µm bzw. 83,54 µm, während sie in der Kontrollgruppe bei 134 µm bzw. 123,29 µm lagen (Abbildung 23).

Beim Trabekelabstand (Tb.Sp) ergab sich nach OVX ein Medianwert von 268,04 µm gegenüber 244,96 µm in der Kontrollgruppe (p=0,095). In der Versuchsgruppe beliefen sich der Maximal- und der Minimalwert auf 292,44 µm und 240,94 µm, in der Kontrollgruppe hingegen auf 264,94 µm und 210,69 µm (Abbildung 24).

Bei der Trabekelzahl (Tb.N) stand ein Medianwert von 2,76/mm in der Versuchsgruppe einem Medianwert von 2,69/mm in der Kontrollgruppe gegenüber (p=1). Der Maximal- und Minimalwert betrugen in der Versuchsgruppe 3,08/mm bzw. 2,48/mm, während sie in der Kontrollgruppe bei 2,95/mm bzw. 2,54/mm lagen (Abbildung 25).

Die Bestimmung des Trabecular-Bone-Pattern-factor (TBPf) offenbarte einen Medianwert von -0,33/mm nach OVX, während er sich in der Kontrollgruppe auf -0,81/mm belief (p=0,095). Die Maximalwerte betrugen -0,5/mm (KG) bzw. 0,14/mm (VG), die Minimalwerte lagen bei -0,92/mm (VG) bzw. -1,31/mm (KG) (Abbildung 26).

Der Median der N/F-Ratio (No/Tm) sank von 3,64 bei intakten Schweinen auf 2,95 bei OVX-Tieren (p=0,144). In der Versuchsgruppe beliefen sich der Maximal- und der Minimalwert auf 3,81 und 1,67, in der Kontrollgruppe hingegen auf 5,45 und 2,93 (Abbildung 27).

Während der Median der Trabekelknotenpunkte (Number-of-Nodes, N.No) in der Versuchsgruppe bei 2,2/mm^2 lag, ergab sich in der Kontrollgruppe ein Wert von 2,59/mm^2

(p=0,403). Der Maximal- und der Minimalwert beliefen sich in der Versuchsgruppe auf 3,52/mm^2 bzw. 1,77/mm^2, in der Kontrollgruppe dagegen auf 3,35/mm^2 bzw. 2,12/mm^2 (Abbildung 28).

Bei der Anzahl an frei endenden Trabekeln (Number-of-Termini, N.Tm) betrug der Median in der Versuchsgruppe 0,94/mm^2 und in der Kontrollgruppe 0,78/mm^2 (p=0,296). Als Maximal- bzw. Minimalwert wurden in der Versuchsgruppe 1,35/mm^2 bzw. 0,52/mm^2 und in der Kontrollgruppe 0,88/mm^2 bzw. 0,43/mm^2 erreicht (Abbildung 29).

Die Analyse der Node-to-Node-Struts (No.No) zeigte in der Versuchsgruppe einen Medianwert von 1043,12 µm/mm^2 und 1243,81 µm/mm^2 in der Kontrollgruppe (Abbildung 30), was einen Anteil von 85,69 % (VG) bzw. 92,48 % (KG) an der Total-Strut-Length (TSL) ausmachte (Abbildung 31). Die Unterschiede waren mit p=0,144 und p=0,095 in beiden Fällen nicht signifikant. Die Maximalwerte in der Versuchsgruppe lagen bei 1477,36 µm/mm^2 und 90,34 %, während sie sich in der Kontrollgruppe auf 1619 µm/mm^2 und 94,93 % beliefen. Die Minimalwerte betrugen in der Versuchsgruppe 887,12 µm/mm^2 und 76,01 %, wohingegen sie in der Kontrollgruppe bei 1078,68 µm/mm^2 und 87,23 % lagen.

In der Versuchsgruppe betrug der Medianwert der Node-to-Terminus-Struts (No.Tm) 182,95 µm/mm^2 gegenüber 98,58 µm/mm^2 in der Kontrollgruppe (Abbildung 32). Der Anteil von No.Tm an der TSL wies Medianwerte von 13,65 % (VG) und 7,52 % (KG) auf (Abbildung 33). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren sowohl bei No.Tm [µm/mm^2] (p=0,144) als auch bei No.Tm [%] (p=0,095) nicht signifikant. Die Maximalwerte in der Versuchsgruppe erreichten 305,17 µm/mm^2 und 22,12 %, während sie sich in der Kontrollgruppe auf 192,15 µm/mm^2 und 12,65 % beliefen. Die Minimalwerte betrugen in der Versuchsgruppe 100,75 µm/mm^2 und 9,03 %, bei den intakten Schweinen hingegen 72,45 µm/mm^2 und 4,78 %.

Bei den Terminus-to-Terminus-Struts (Tm.Tm) wurde in der Versuchsgruppe mit 8,12 µm/mm^2 ein signifikant größerer Medianwert erreicht als in der Kontrollgruppe mit 1,93 µm/mm^2 (p=0,037) (Abbildung 34), was einen Anteil 0,66 % bzw. 0,12 % an der TSL ausmachte (p=0,037) (Abbildung 35). Die Versuchsgruppe wies Maximalwerte von 25,79 µm/mm^2 und 1,87 % auf, während in der Kontrollgruppe maximale Werte von 4,42 µm/mm^2 und 0,29 % erreicht wurden. Die Minimalwerte lagen in der Versuchsgruppe bei 1,98 µm/mm^2 und 0,2 % auf. Ein Tier aus der Kontrollgruppe verfügte über keinerlei Tm.Tm-Struts.

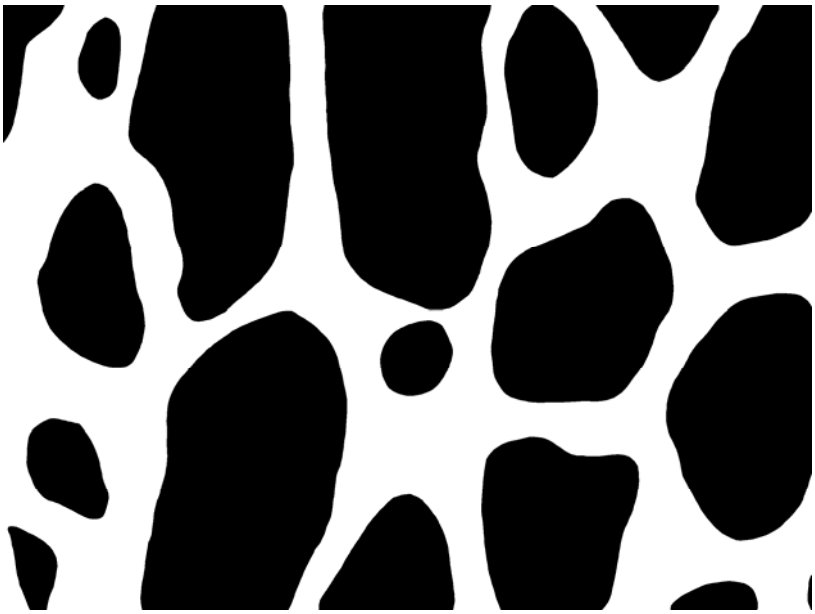

Abbildung 20: *Binärbild aus der ROI eines Schweinewirbels der Kontrollgruppe. Knochen ist weiß, Markraum hingegen schwarz dargestellt (BV/TV 39,99 %, Tb.Th 136,24 µm, Tb.Sp 204,42 µm, Tb.N 2,93/mm, N/F-Ratio 21) (Originalvergrößerung 5X).*

Abbildung 21: *Binärbild aus der ROI eines Schweinewirbels der Versuchsgruppe (BV/TV 15,72 %, Tb.Th 72,74 µm, Tb.Sp 389,83 µm, Tb.N 2,16/mm, N/F-Ratio 0,89) (Originalvergrößerung 5X).*

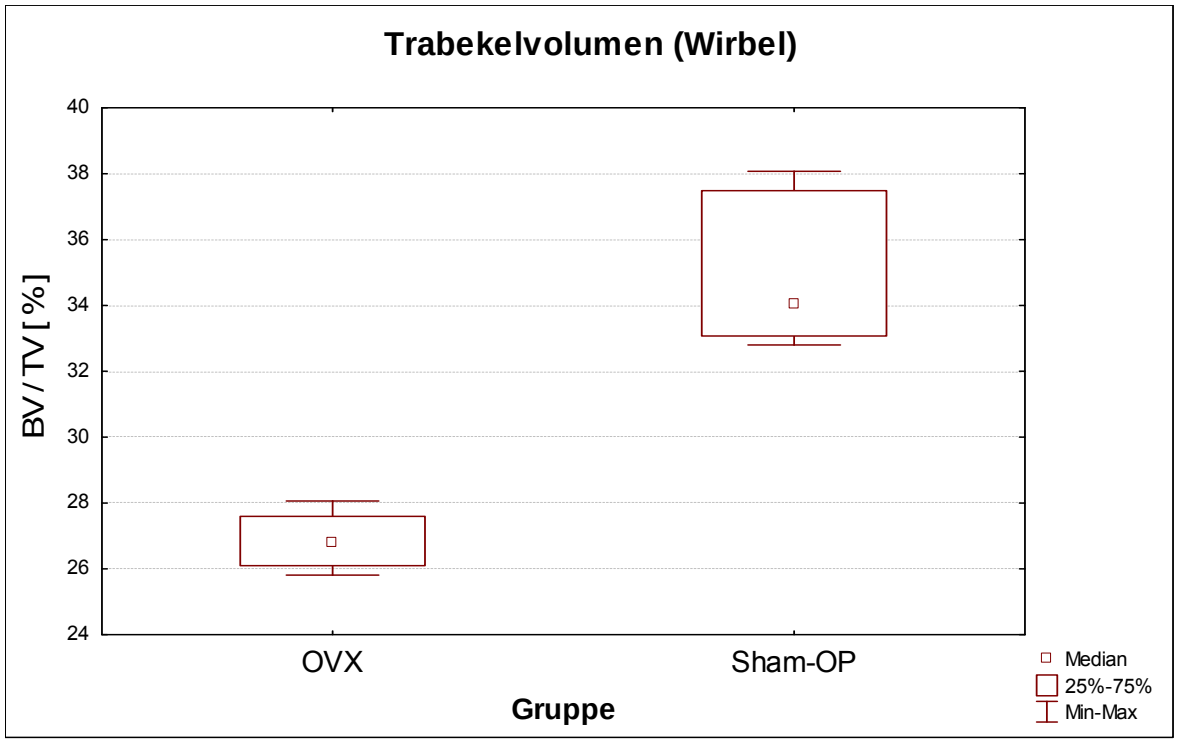

Abbildung 22: *Box-Plot für das Trabekelvolumen (BV/TV) der Wirbel in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,012).*

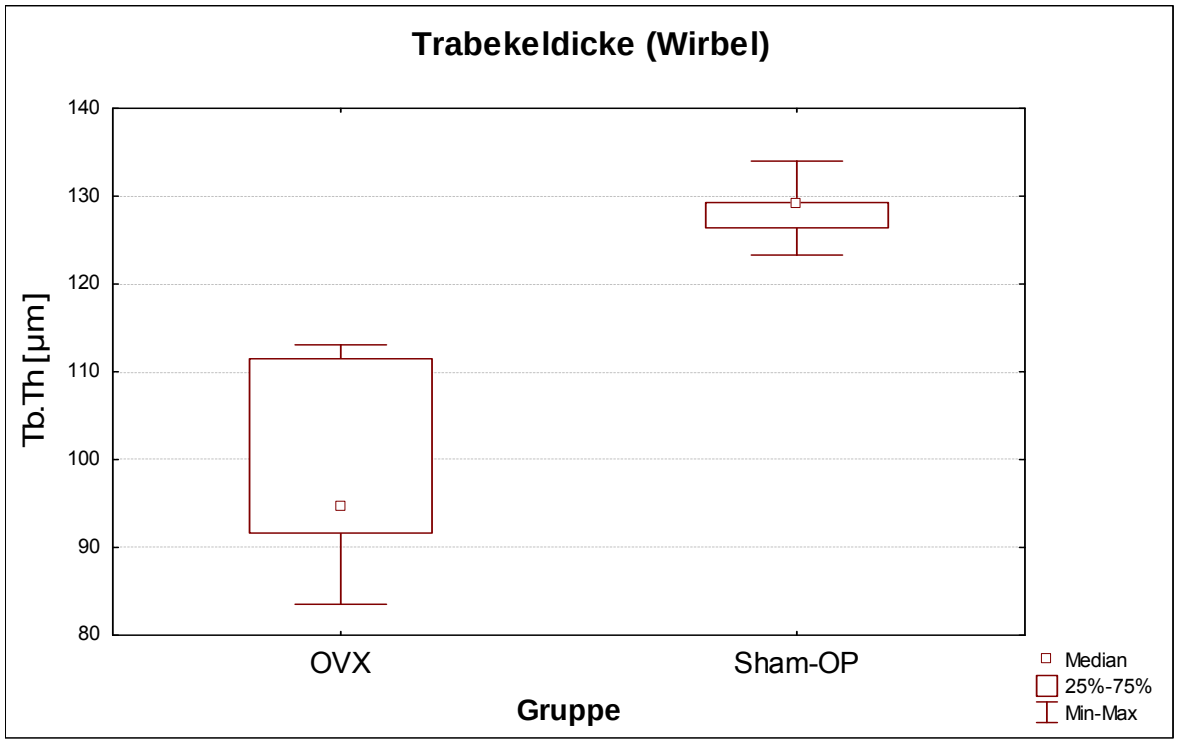

Abbildung 23: *Box-Plot für die Trabekeldicke (Tb.Th) der Wirbel in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,012).*

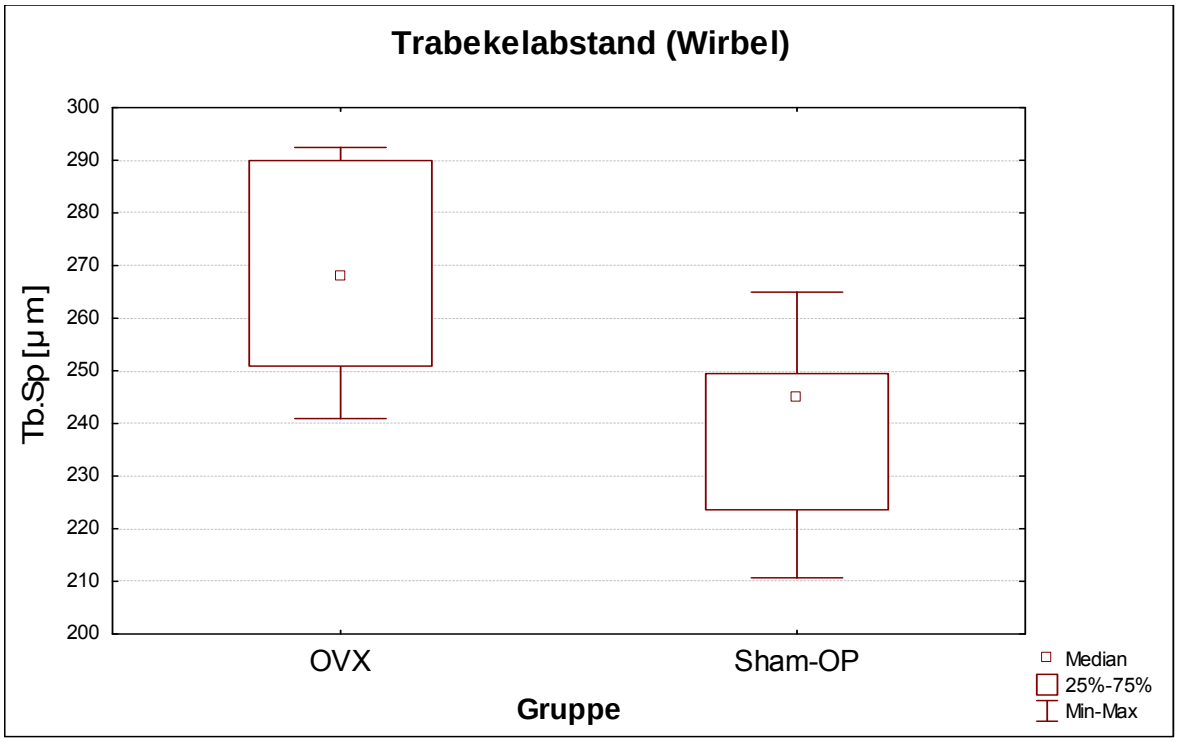

Abbildung 24: *Box-Plot für den Trabekelabstand (Tb.Sp) der Wirbel in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,095).*

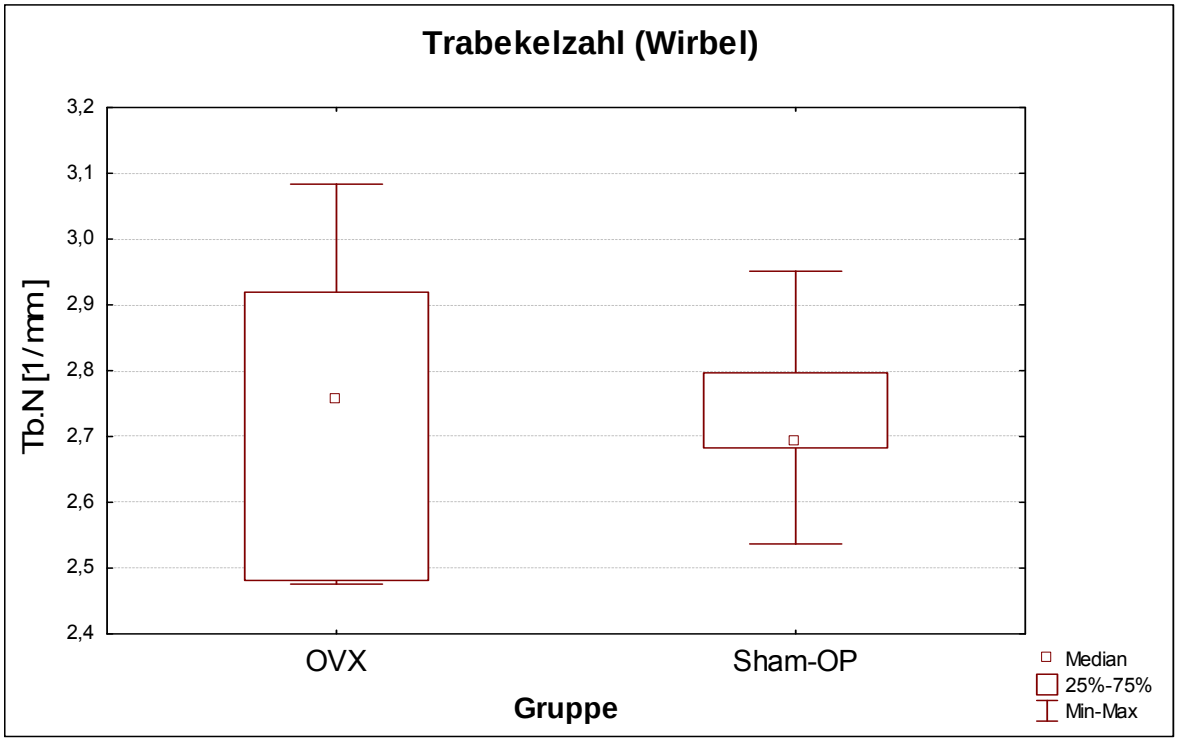

Abbildung 25: *Box-Plot für die Trabekelzahl (Tb.N) der Wirbel in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=1).*

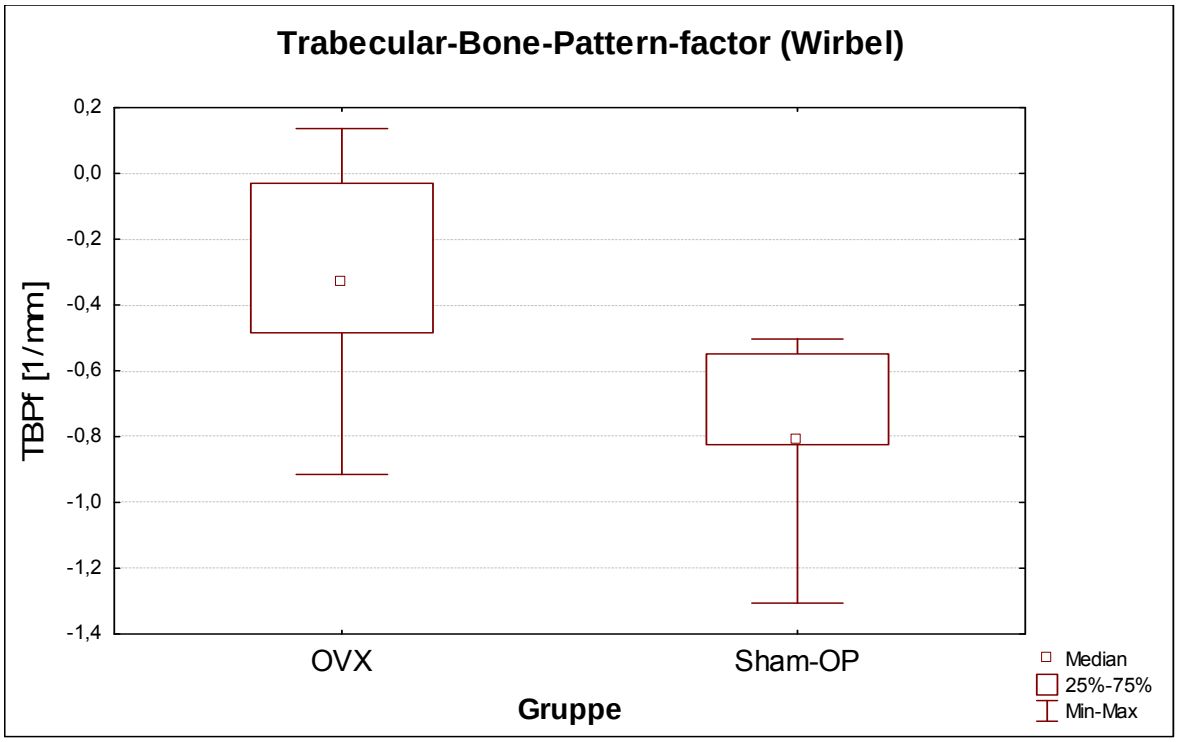

Abbildung 26: *Box-Plot für den Trabecular-Bone-Pattern-factor (TBPf) der Wirbel in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,095).*

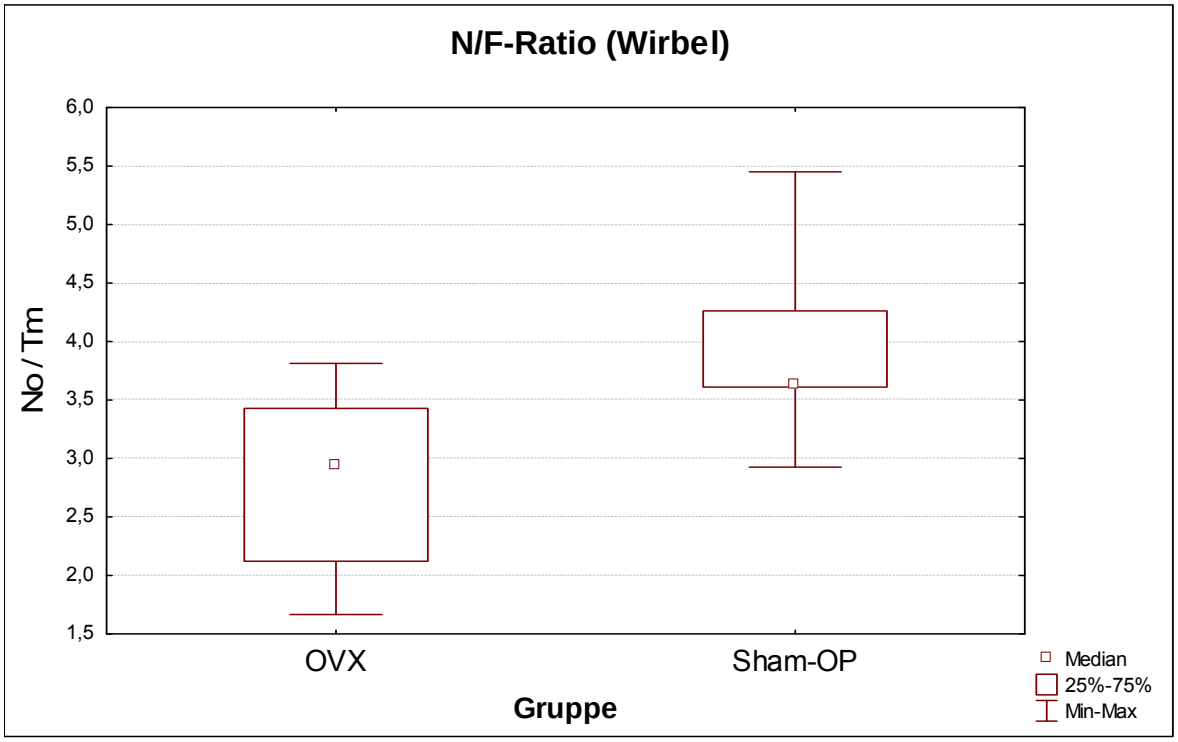

Abbildung 27: *Box-Plot für die N/F-Ratio (No/Tm) der Wirbel in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,144).*

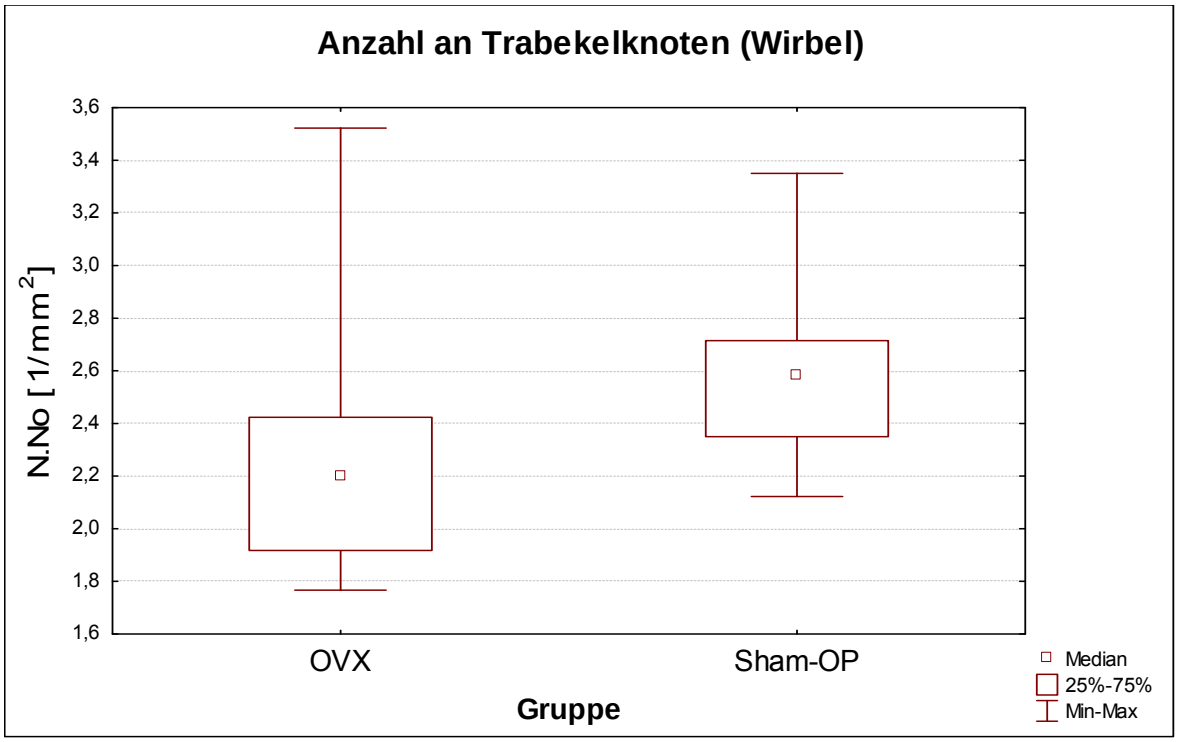

Abbildung 28: *Box-Plot für die Anzahl an Trabekelknotenpunkten (N.No) der Wirbel in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,403).*

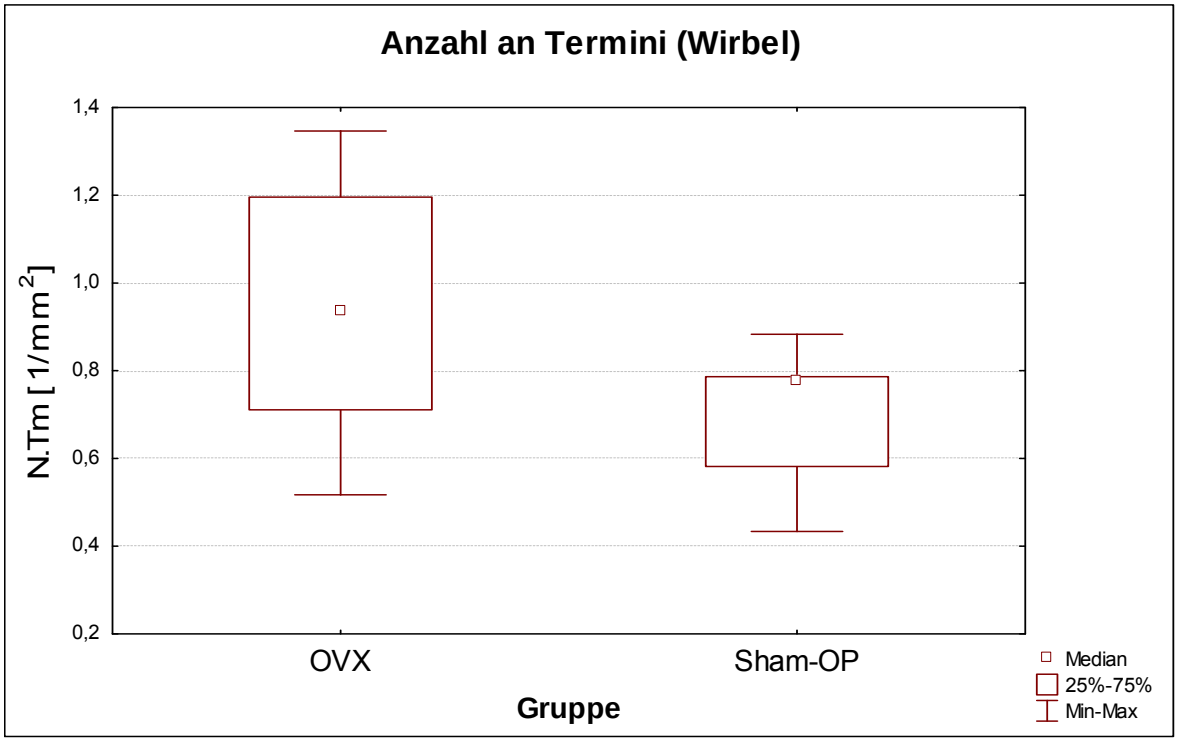

Abbildung 29: *Box-Plot für die Anzahl an frei endenden Trabekeln (N.Tm) der Wirbel in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,296).*

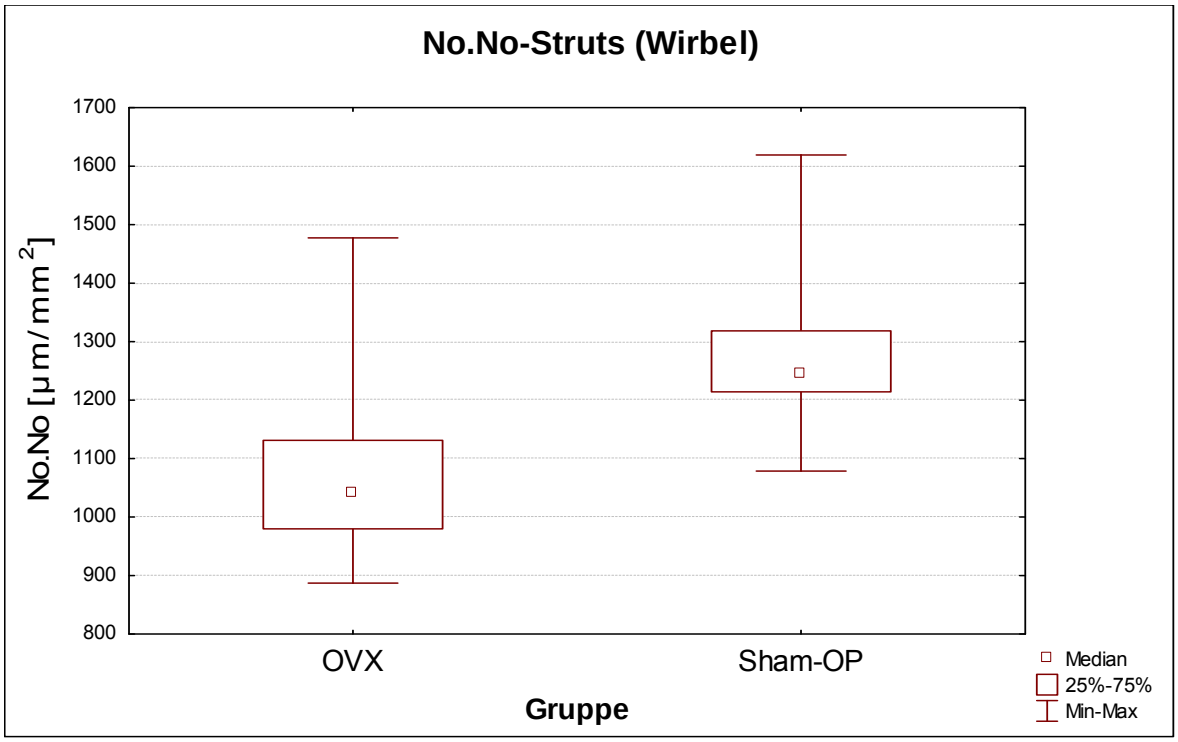

Abbildung 30: *Box-Plot für die Länge der Node-to-Node-Verbindungen (No.No [µm/mm²]) der Wirbel in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,144).*

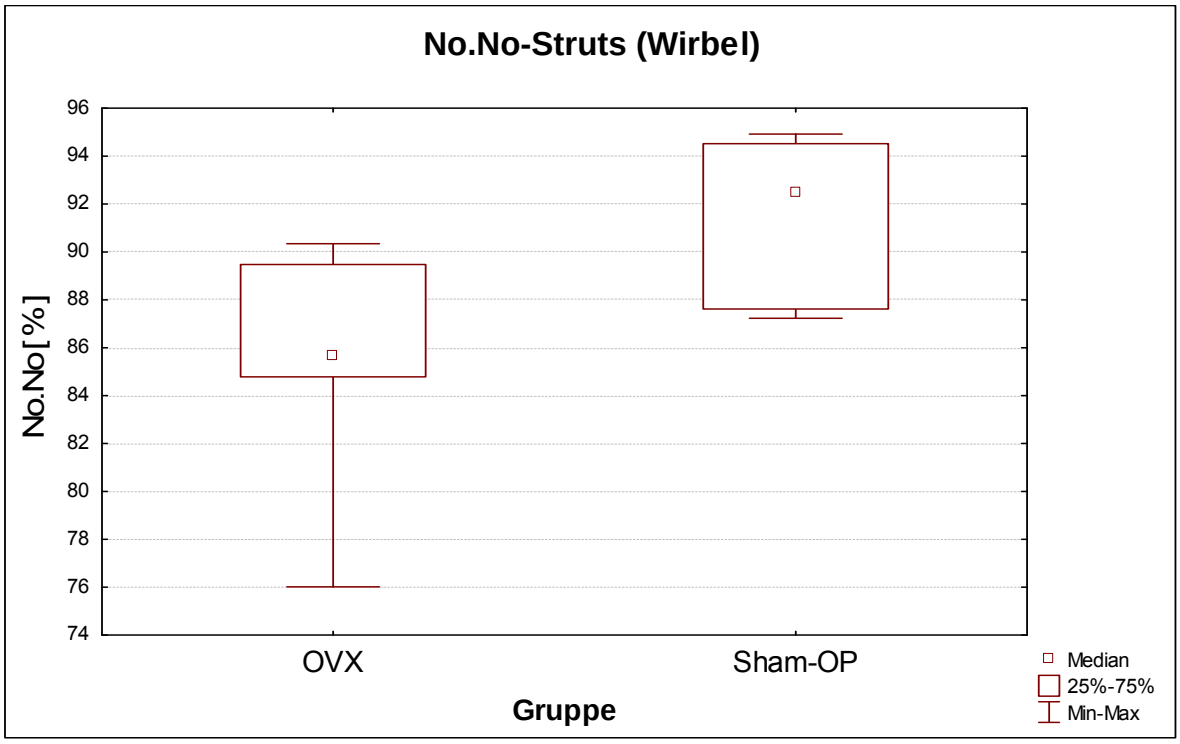

Abbildung 31: *Box-Plot für die Node-to-Node-Verbindungen (No.No [%]) der Wirbel in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,095).*

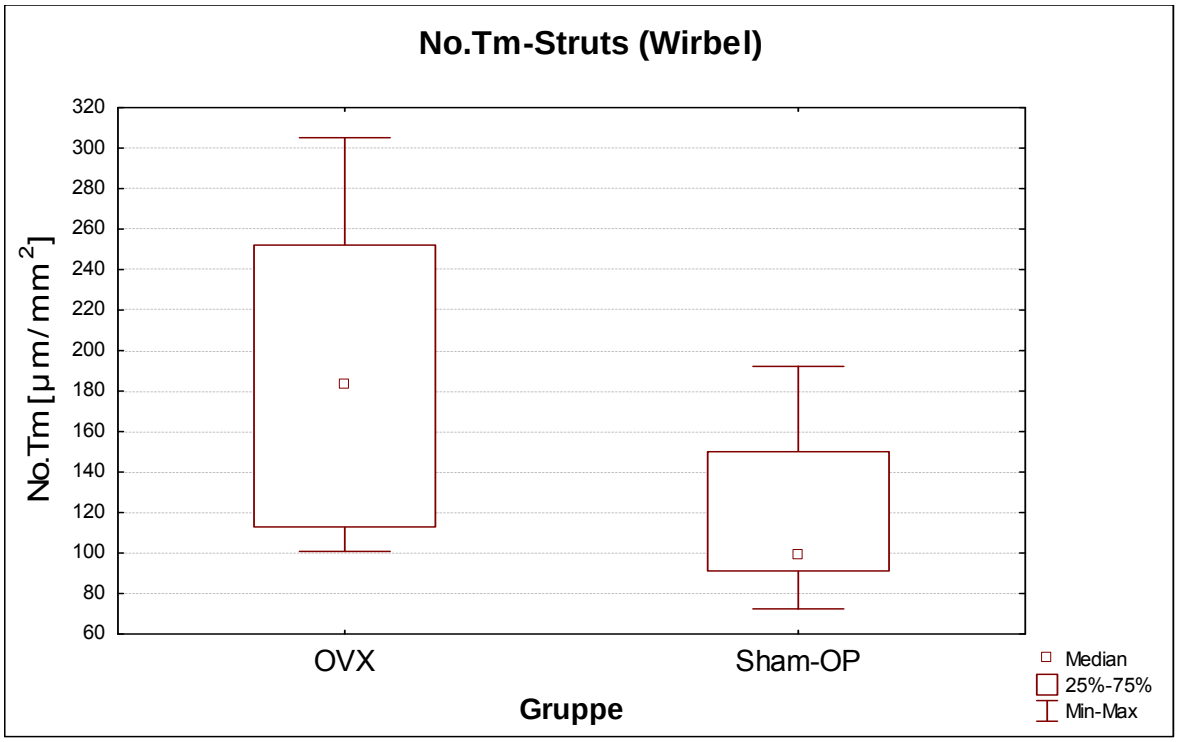

Abbildung 32: *Box-Plot für die Länge der Node-to-Terminus-Verbindungen (No.Tm [µm/mm²]) der Wirbel in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,144).*

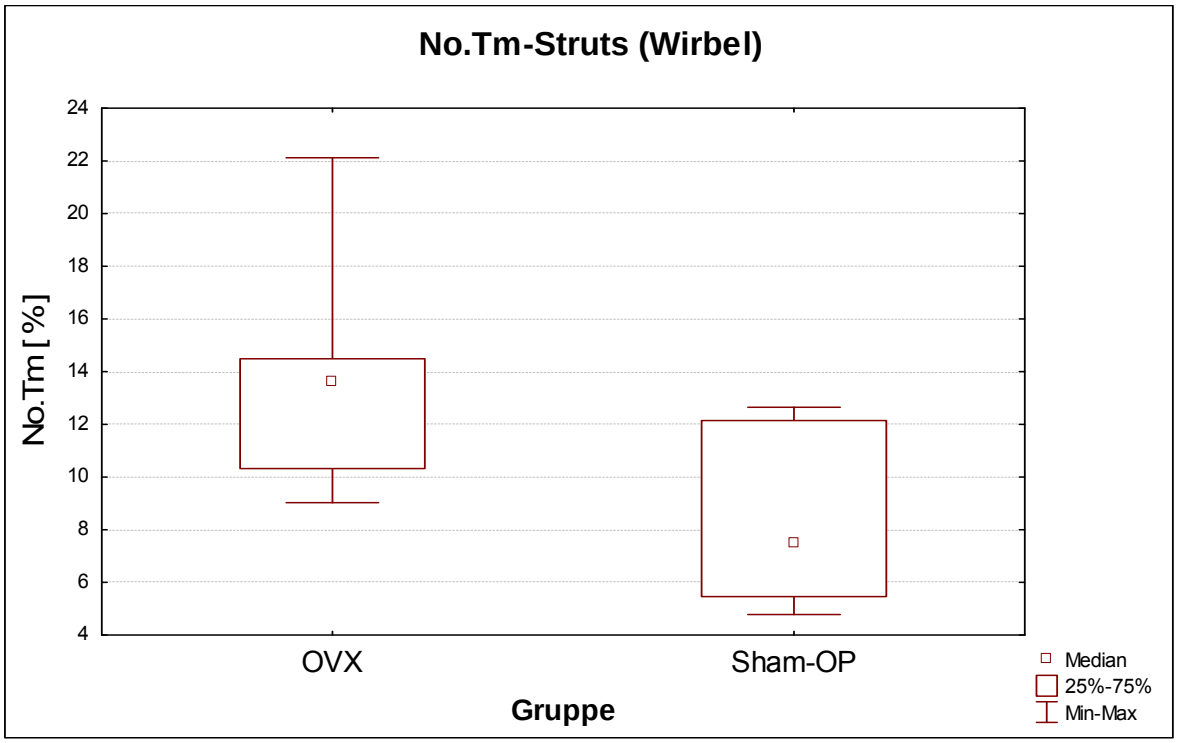

Abbildung 33: *Box-Plot für die Länge der Node-to-Terminus-Verbindungen (No.Tm [%]) der Wirbel in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,095).*

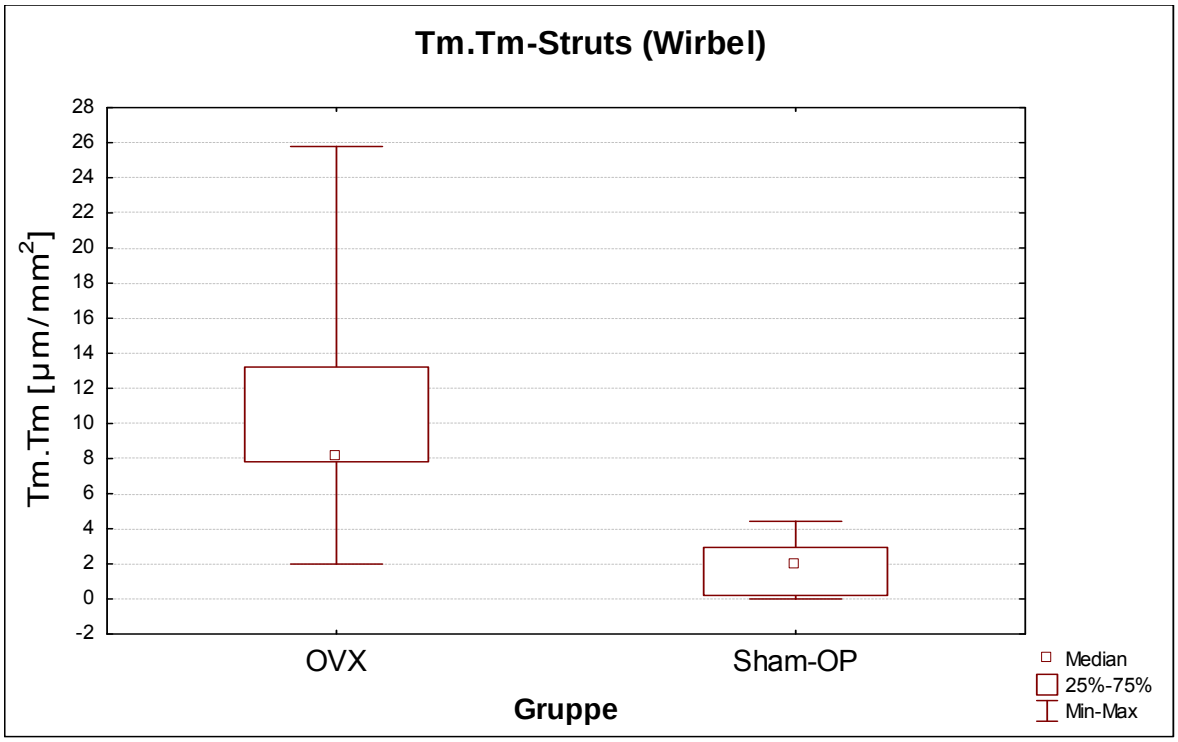

Abbildung 34: *Box-Plot für die Länge der Terminus-to-Terminus-Verbindungen (Tm.Tm [µm/mm²]) der Wirbel in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,037).*

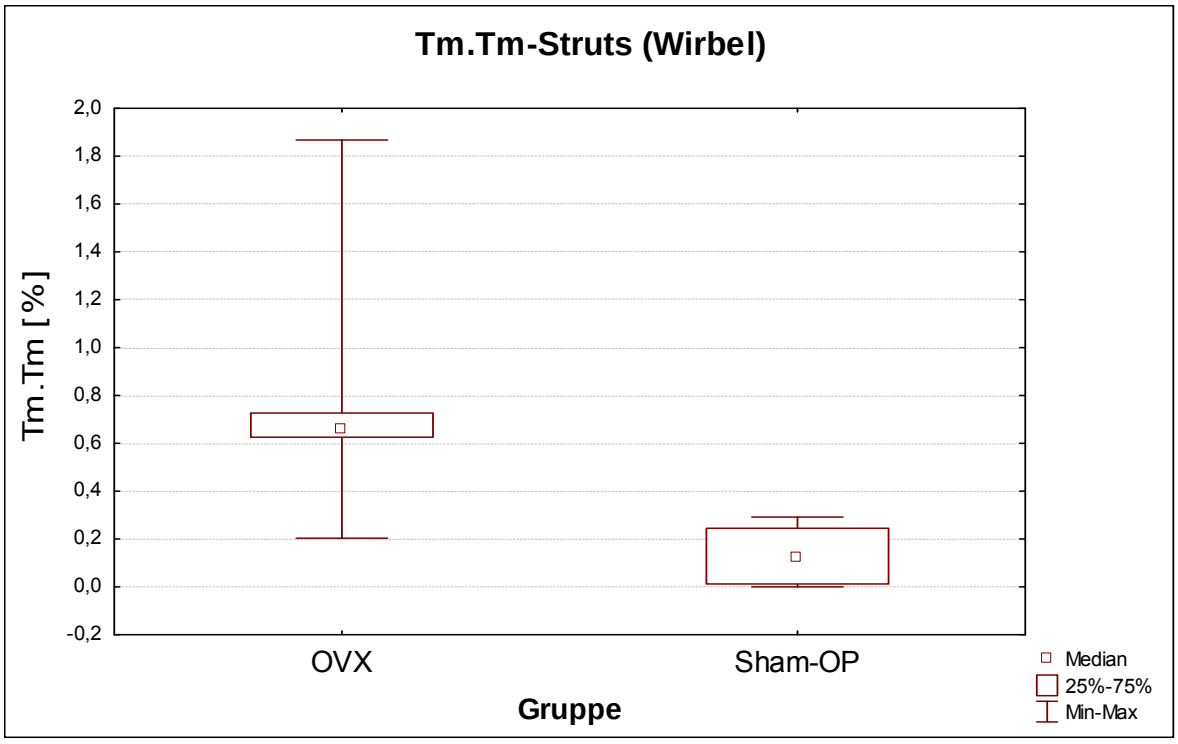

Abbildung 35: *Box-Plot für die Länge der Terminus-to-Terminus-Verbindungen (Tm.Tm [%]) der Wirbel in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,037).*

4.2 Histomorphometrie der Tibiaknochen

Die Auswertungsergebnisse der Tibiaknochen sind den Abbildungen 36 bis 49 zu entnehmen. Mit Ausnahme des Trabekelvolumens bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe.

Der Medianwert des BV/TV erreichte in der Versuchsgruppe 28,24 % und in der Kontrollgruppe 32,13 %, wobei der Unterschied signifikant war (p=0,037). Der Maximal- und der Minimalwert betrugen in der Versuchsgruppe 30,55 % bzw. 22,22 %, wohingegen in der Kontrollgruppe 38,6 % bzw. 28,73 % erreicht wurden (Abbildung 36).

Bei der Tb.Th belief sich der Medianwert in der Kontrollgruppe auf 112,63 µm und auf 106,21 µm in der Versuchsgruppe (p=0,296). Der Maximal- und der Minimalwert betrugen in der Versuchsgruppe 125,4 µm bzw. 79,24 µm, in der Kontrollgruppe hingegen 128,74 µm bzw. 105,92 µm (Abbildung 37).

Bei der Tb.Sp ergab sich nach OVX ein Medianwert von 277,73 µm gegenüber 241,77 µm in der Kontrollgruppe (p=0,144). Der Maximal- und der Minimalwert lagen in der Versuchsgruppe bei 293,19 µm und 255,93 µm, in der Kontrollgruppe hingegen bei 300,43 µm bzw. 204,47 µm (Abbildung 38).

Während der Median der Tb.N in der Kontrollgruppe bei 2,86/mm lag, betrug er in der Versuchsgruppe 2,79/mm (p=0,144). Der Maximal- und der Minimalwert beliefen sich in der Versuchsgruppe auf 2,8/mm bzw. 2,44/mm und in der Kontrollgruppe auf 3,12/mm bzw. 2,39/mm (Abbildung 39).

Nach OVX wies der TBPf einen Medianwert von 0,28/mm auf, während er in der Kontrollgruppe bei -0,44/mm lag (p=0,095). Der Maximal- und der Minimalwert betrugen in der Versuchsgruppe 0,57/mm bzw. -0,34/mm und in der Kontrollgruppe 0,04/mm bzw. -1,24/mm (Abbildung 40).

Der Median der N/F-Ratio sank von 2,45 bei intakten Schweinen auf 1,46 bei OVX-Tieren (p=0,095). In der Versuchsgruppe lagen der Maximal- und der Minimalwert bei 2,58 bzw. 1,31, während in der Kontrollgruppe Werte von 3,44 bzw. 2,11 erreicht wurden (Abbildung 41).

Bei der N.No belief sich der Medianwert in der Versuchsgruppe auf 2,47/mm^2 und auf 3,09/mm^2 in der Kontrollgruppe (p=0,296). Der Maximal- und der Minimalwert betrugen in der Versuchsgruppe 3,17/mm^2 bzw. 1,98/mm^2 und in der Kontrollgruppe 4,12/mm^2 bzw. 1,84/mm^2 (Abbildung 42).

Bei der N.Tm betrug der Median in der Versuchsgruppe 1,67/mm^2 und in der Kontrollgruppe 1,26/mm^2 (p=0,144). Als Maximal- bzw. Minimalwert wurden in der Versuchsgruppe 2,07/mm^2 bzw. 0,81/mm^2 und in der Kontrollgruppe 1,39/mm^2 bzw. 0,96/mm^2 erreicht (Abbildung 43).

Die No.No zeigte in der Versuchsgruppe einen Medianwert von 1001,75 µm/mm^2 und 1355,82 µm/mm^2 in der Kontrollgruppe (p=0,144) (Abbildung 44), was einen Anteil von 72,04 % (VG) bzw. 82,42 % (KG) an der Total-Strut-Length (TSL) ausmachte (p=0,095) (Abbildung 45). Die Maximalwerte in der Versuchsgruppe lagen bei 1347,49 µm/mm^2 und 84,71 %, während sie sich in der Kontrollgruppe auf 1735,64 µm/mm^2 und 86,66 % beliefen. Die Minimalwerte betrugen in der Versuchsgruppe 746,62 µm/mm^2 und 65,91 %, wohingegen sie in der Kontrollgruppe bei 832,97 µm/mm^2 und 75,41 % lagen.

In der Versuchsgruppe betrug der Medianwert der No.Tm 308,86 µm/mm^2 gegenüber 253,18 µm/mm^2 in der Kontrollgruppe (p=0,296) (Abbildung 46). Der Anteil von No.Tm an der TSL wies einen Median von 21,68 % (VG) und 17,1 % (KG) auf (p=0,144) (Abbildung 47). Als Maximalwerte wurden in der Versuchsgruppe 333,47 µm/mm^2 und 29,82 % erreicht, während sie sich in der Kontrollgruppe auf 309,14 µm/mm^2 und 21,25 % beliefen. Die Minimalwerte betrugen in der Versuchsgruppe 170,59 µm/mm^2 und 14,43 %, bei den intakten Schweinen hingegen 227,25 µm/mm^2 und 12,64 %.

Bei der Tm.Tm wurde in der Versuchsgruppe mit 31,41 µm/mm^2 ein größerer Medianwert erreicht als in der Kontrollgruppe mit 22,02 µm/mm^2 (p=0,210) (Abbildung 48), was einen Anteil von 2,49 % bzw. 1,16 % an der TSL ausmachte (p=0,144) (Abbildung 49). Die Versuchsgruppe wies Maximalwerte von 105,36 µm/mm^2 und 7,36 % auf, während in der Kontrollgruppe maximale Werte von 31,52 µm/mm^2 und 3,34 % erreicht wurden. Die Minimalwerte lagen in der Versuchsgruppe bei 10,11 µm/mm^2 und 0,85 % auf, während sie sich in der Kontrollgruppe auf 7,91 µm/mm^2 bzw. 0,48 % beliefen.

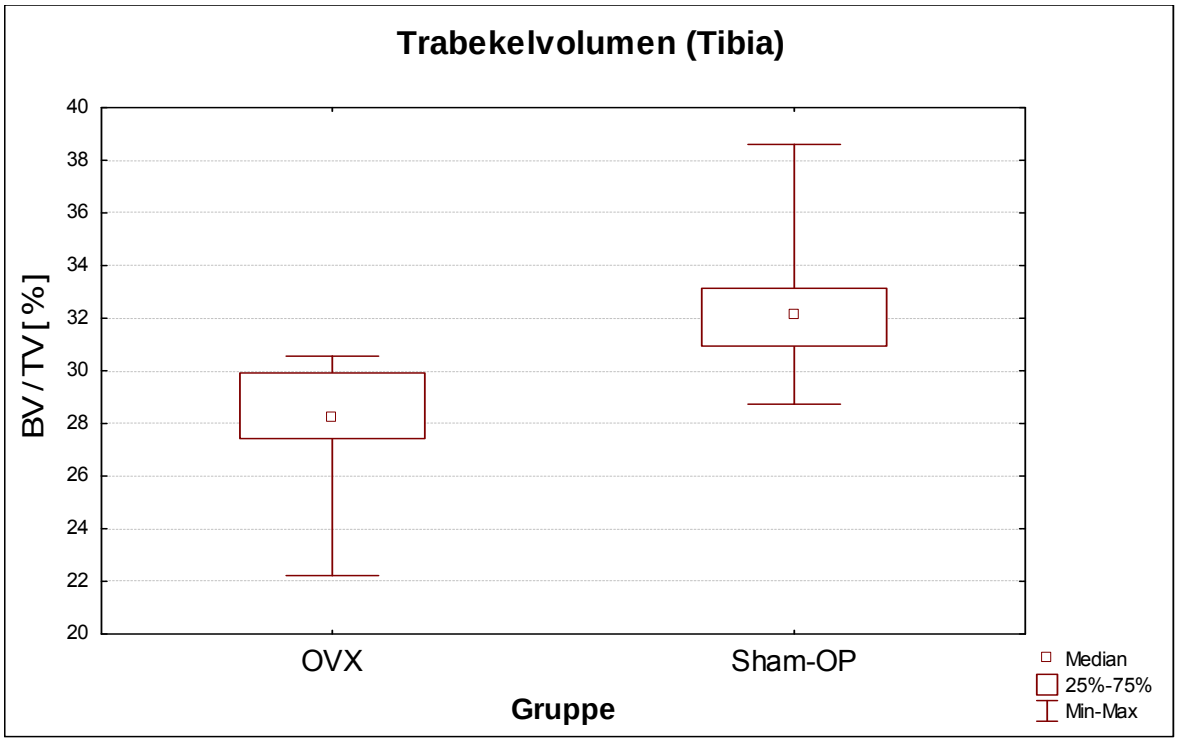

Abbildung 36: *Box-Plot für das Trabekelvolumen (BV/TV) der Tibiaknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,037).*

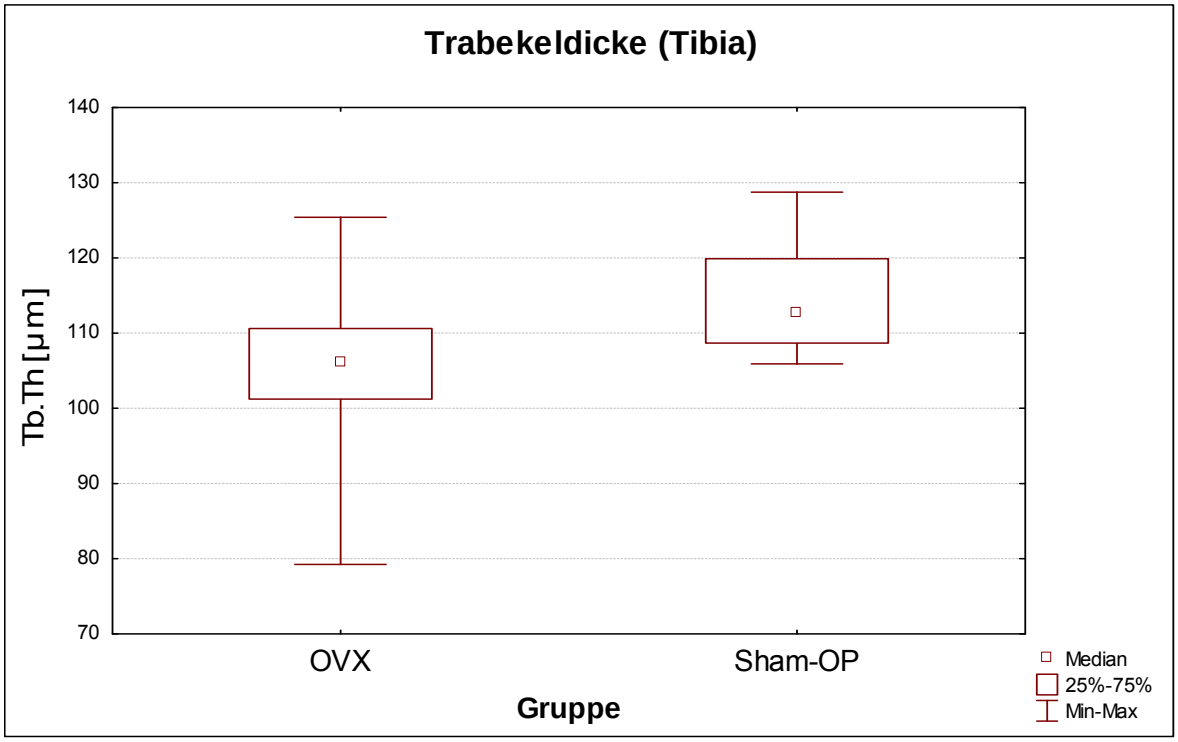

Abbildung 37: *Box-Plot für die Trabekeldicke (Tb.Th) der Tibiaknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,296).*

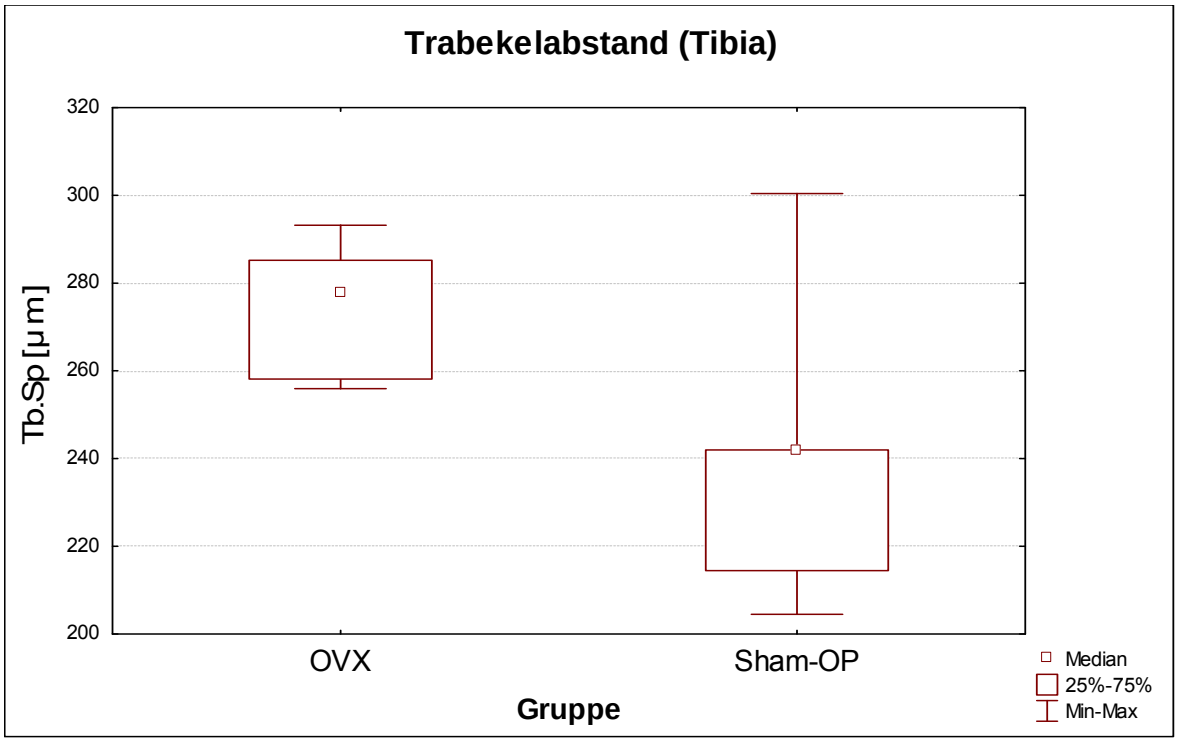

Abbildung 38: *Box-Plot für den Trabekelabstand (Tb.Sp) der Tibiaknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,144).*

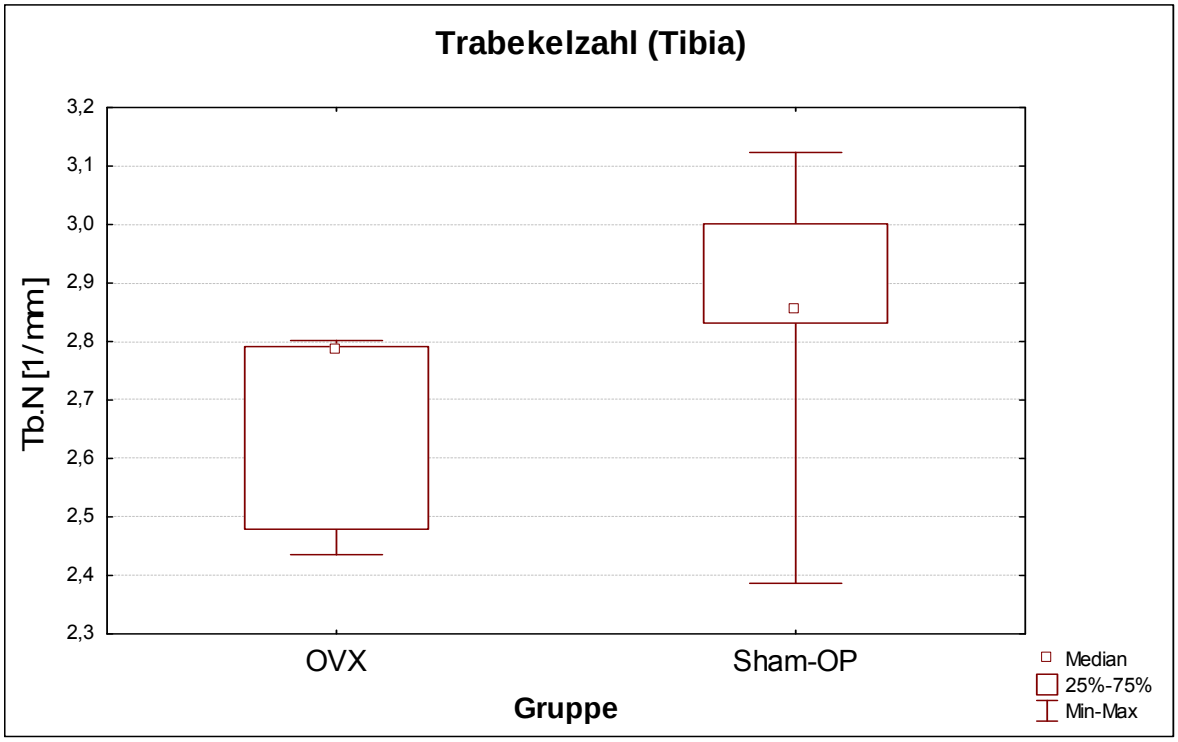

Abbildung 39: *Box-Plot für die Trabekelzahl (Tb.N) der Tibiaknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,144).*

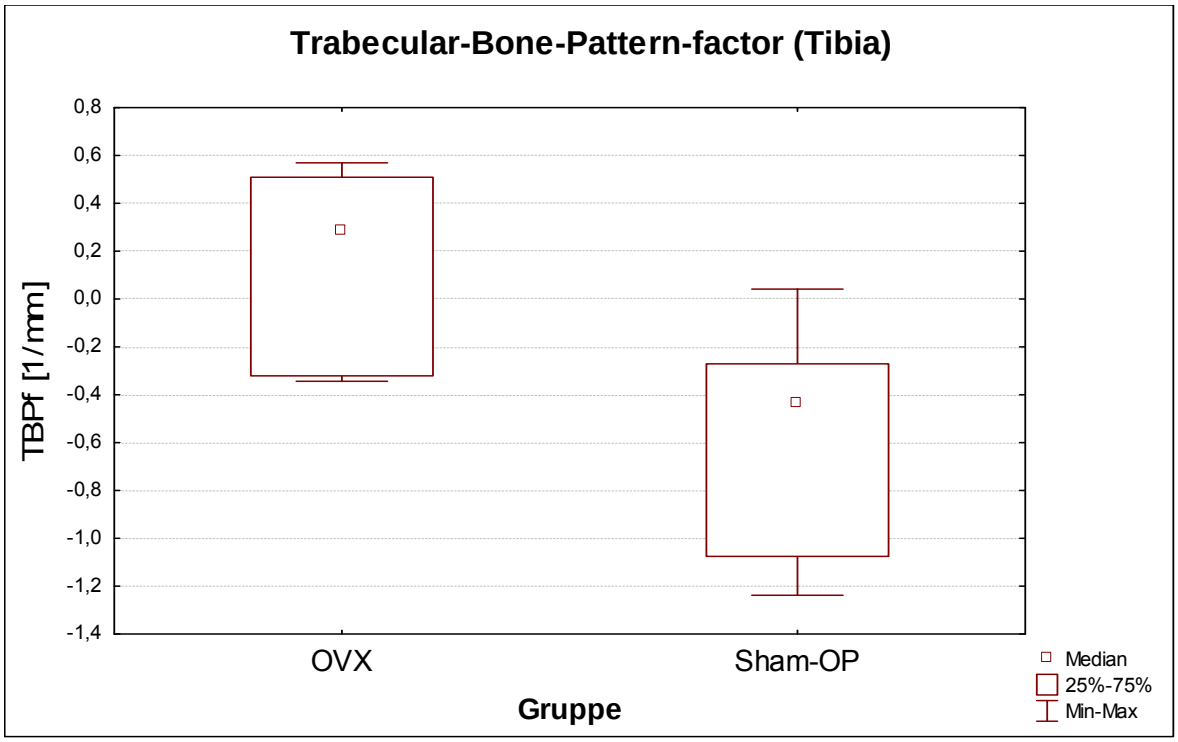

Abbildung 40: *Box-Plot für den Trabecular-Bone-Pattern-factor (TBPf) der Tibiaknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,095).*

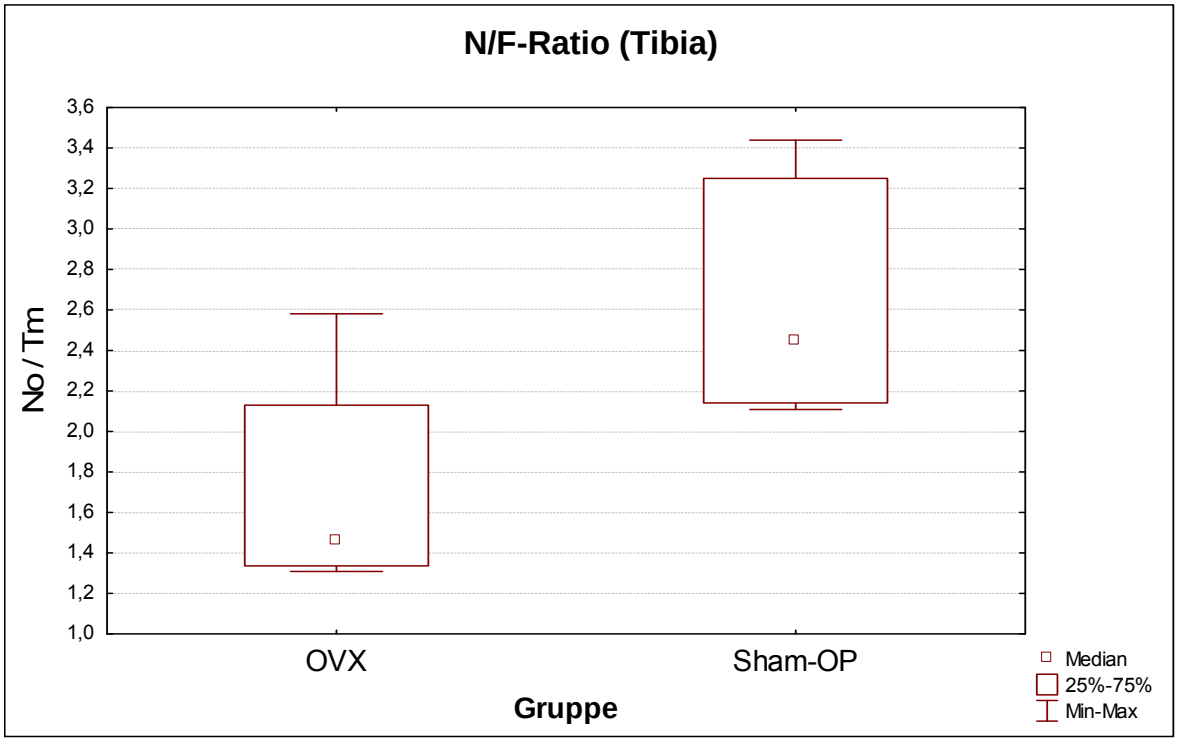

Abbildung 41: *Box-Plot für die N/F-Ratio (No/Tm) der Tibiaknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,095).*

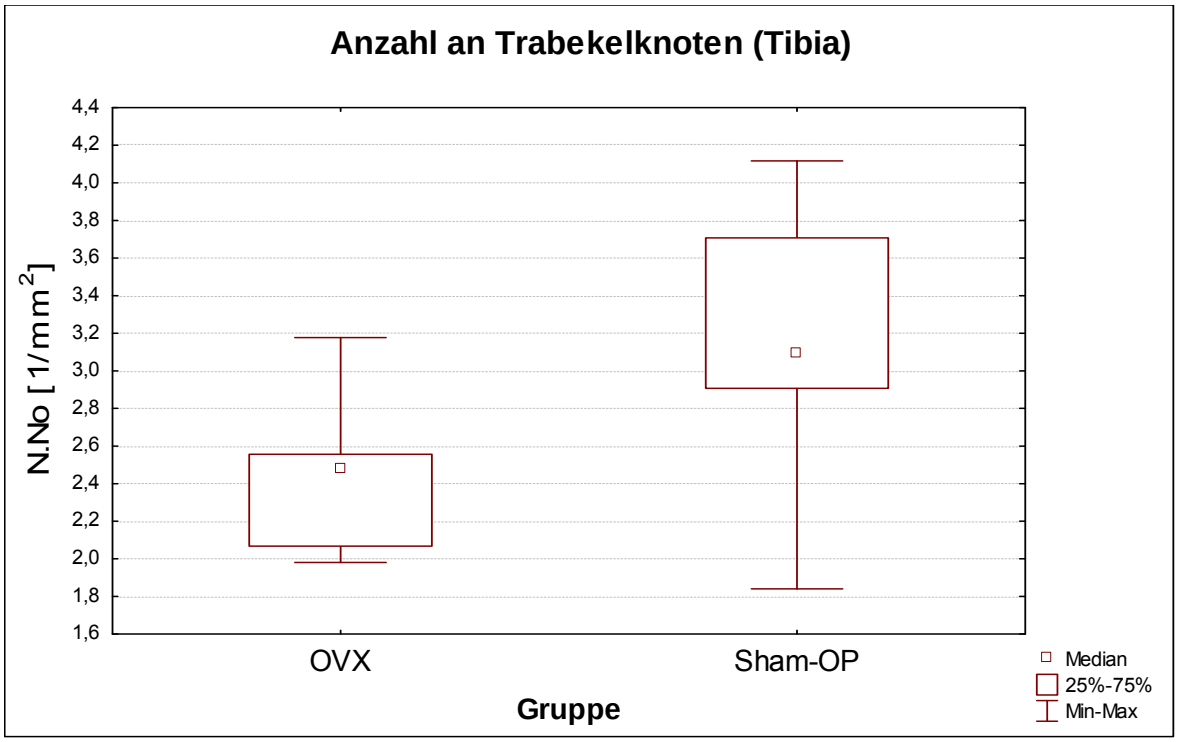

Abbildung 42: *Box-Plot für die Anzahl an Trabekelknotenpunkten (N.No) der Tibiaknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,296).*

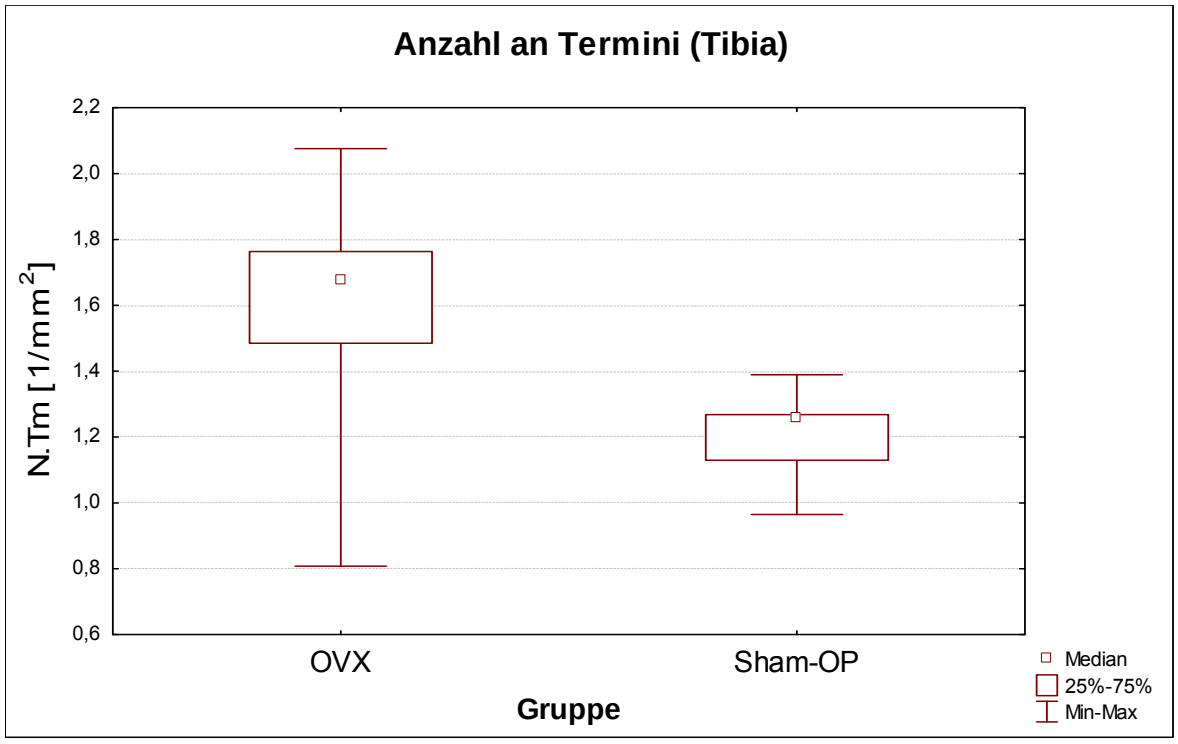

Abbildung 43: *Box-Plot für die Anzahl an frei endenden Trabekeln (N.Tm) der Tibiaknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,144).*

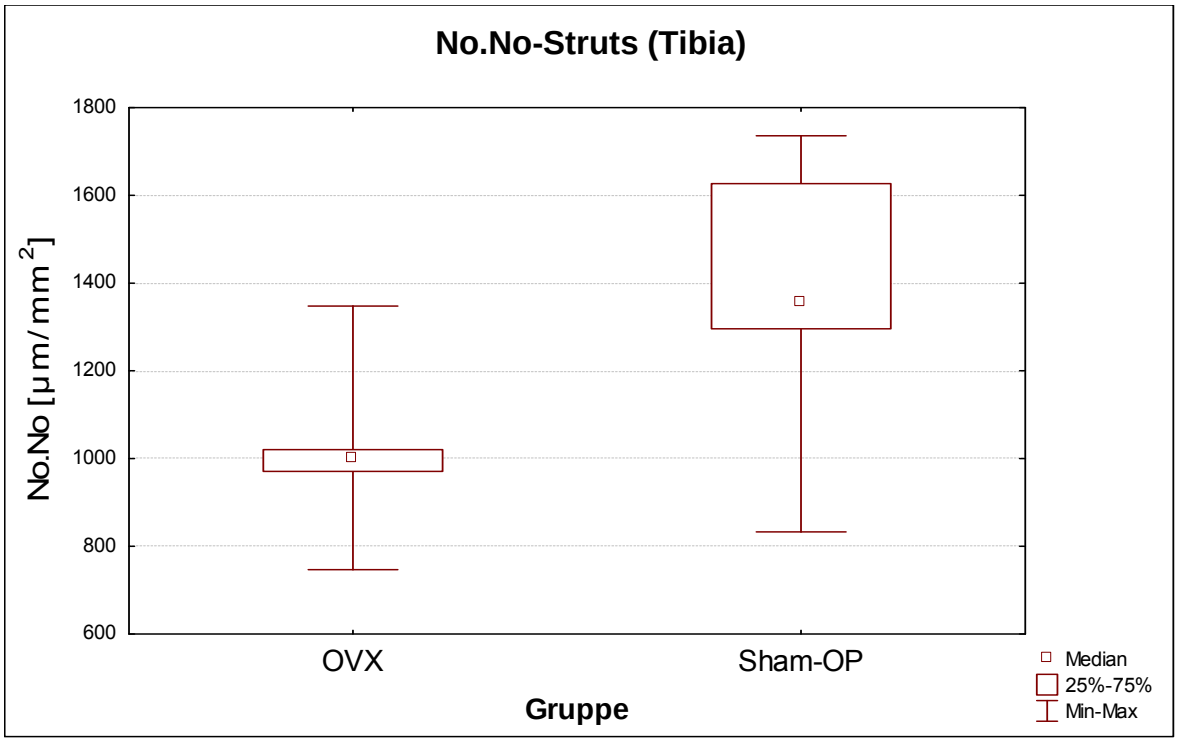

Abbildung 44: *Box-Plot für die Länge der Node-to-Node-Verbindungen (No.No [µm/mm^2]) der Tibiaknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,144).*

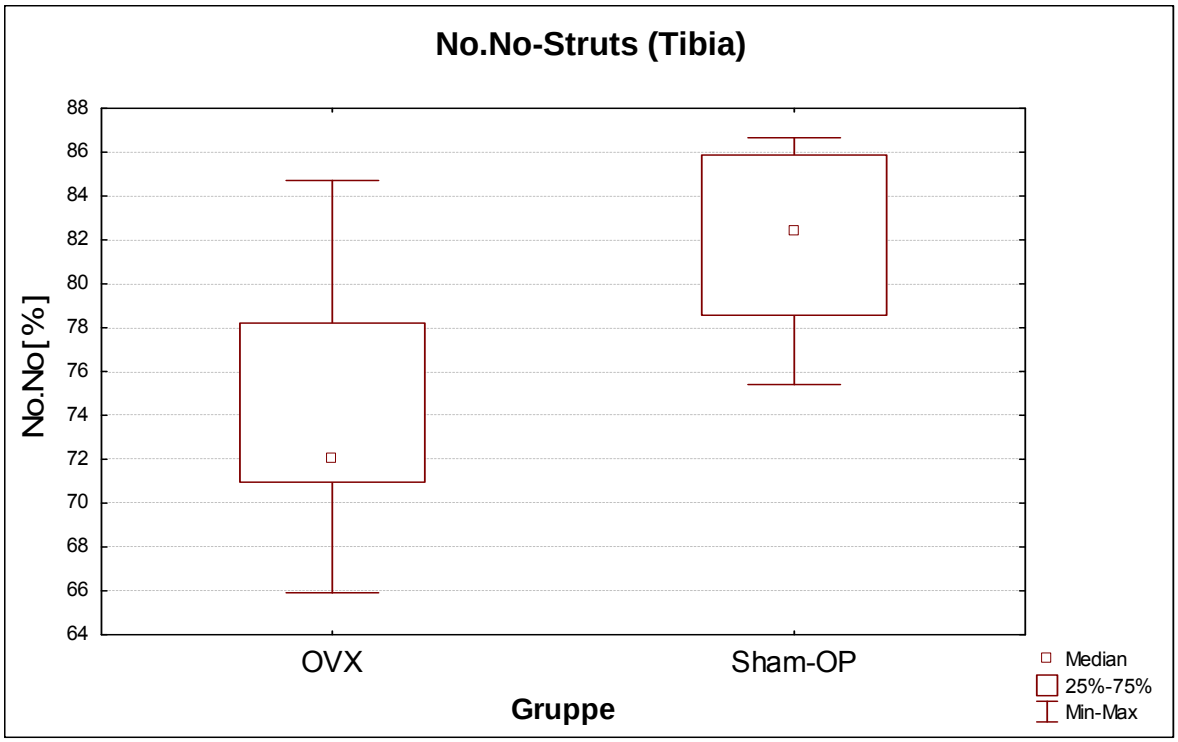

Abbildung 45: *Box-Plot für die Länge Node-to-Node-Verbindungen (No.No [%]) der Tibiaknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,095).*

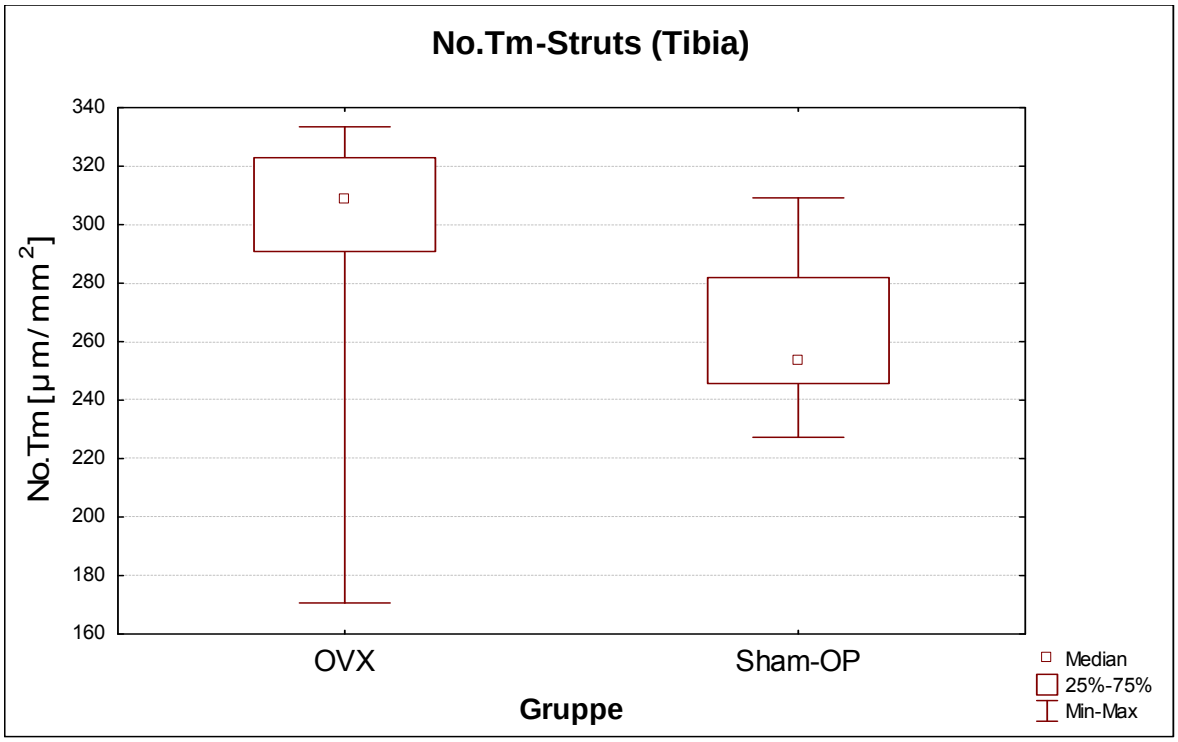

Abbildung 46: *Box-Plot für die Länge der Node-to-Terminus-Verbindungen (No.Tm [µm/mm²]) der Tibiaknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,296).*

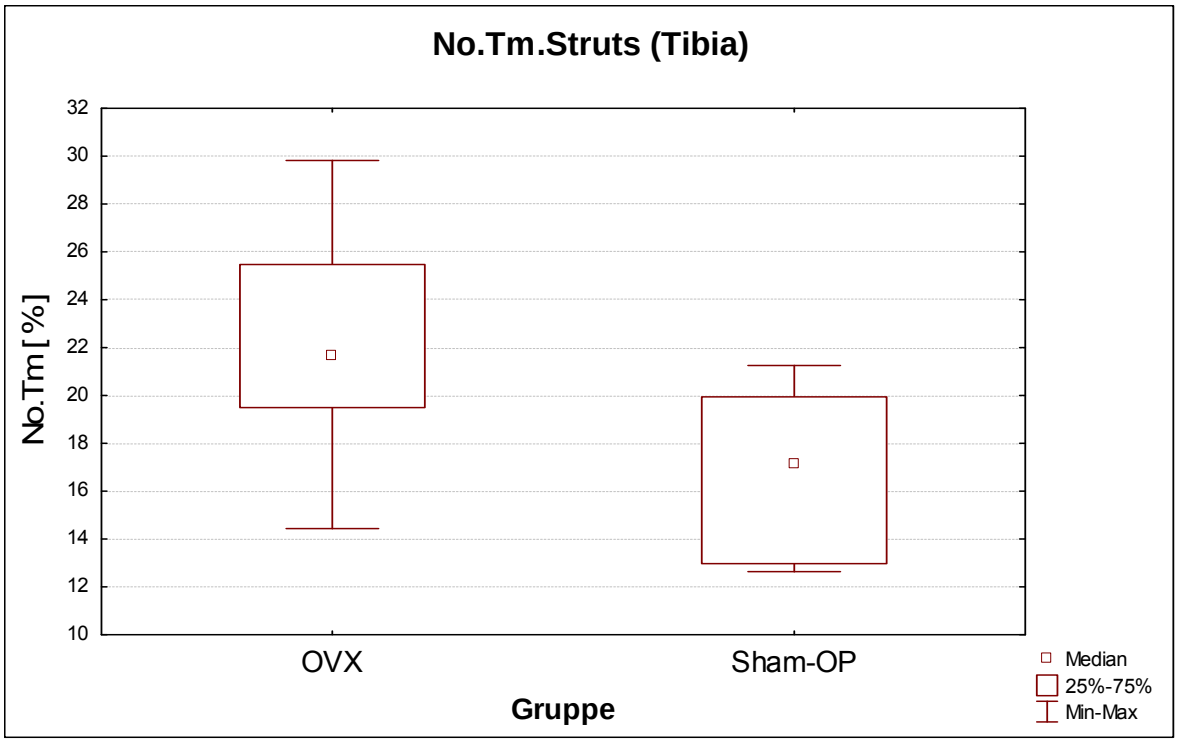

Abbildung 47: *Box-Plot für die Länge der Node-to-Terminus-Verbindungen (N.Tm [%]) der Tibiaknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,144).*

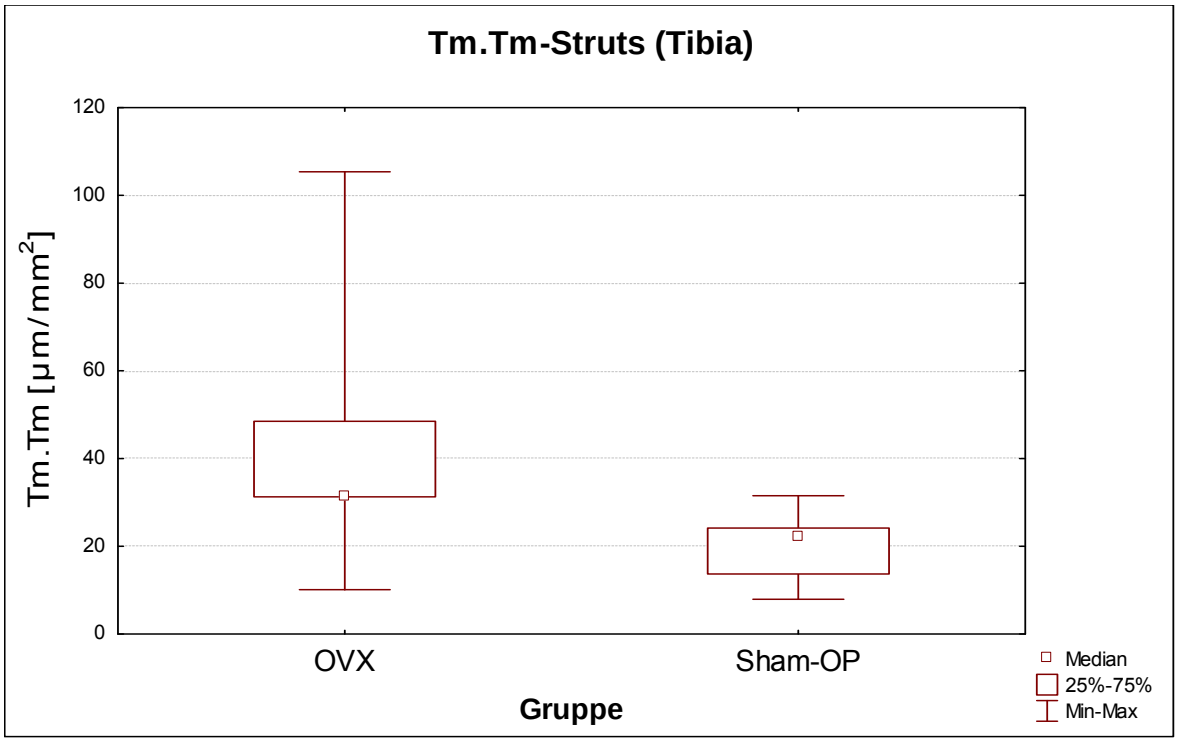

Abbildung 48: *Box-Plot für die Länge der Terminus-to-Terminus-Verbindungen (Tm.Tm [µm/mm²]) der Tibiaknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,210).*

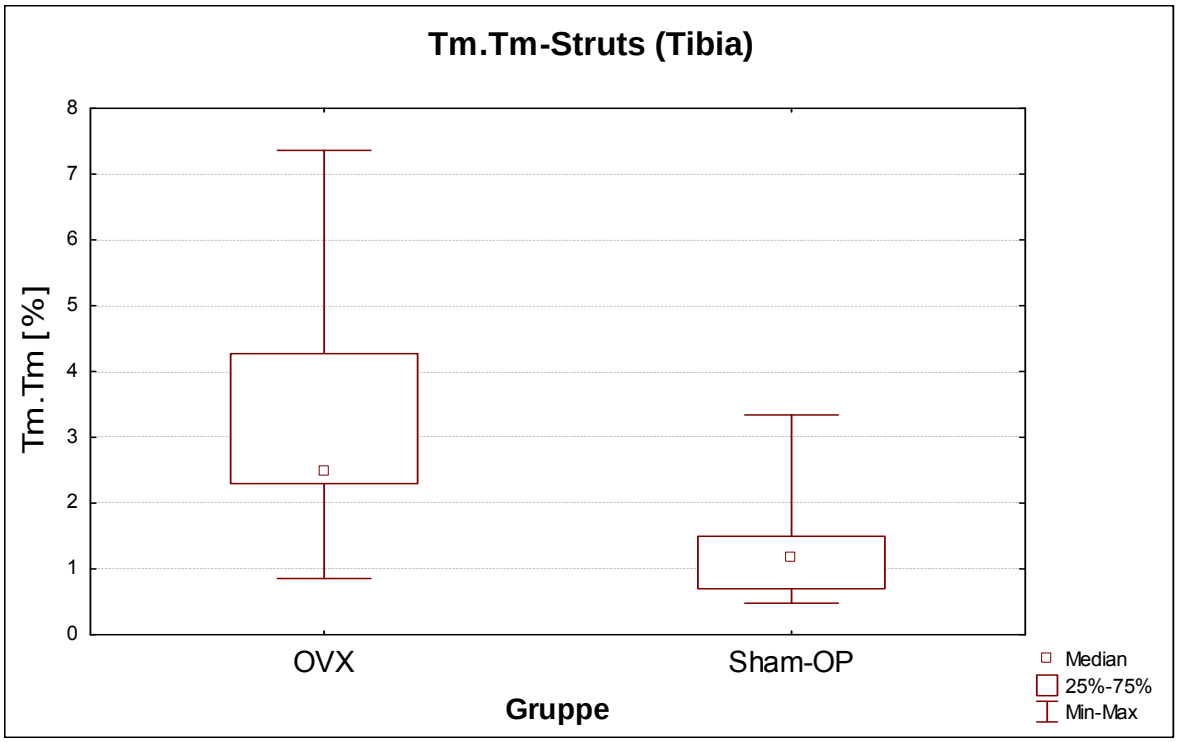

Abbildung 49: *Box-Plot für die Länge der Terminus-to-Terminus-Verbindungen (Tm.Tm [%]) der Tibiaknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,144).*

4.3 Histomorphometrie der Femurknochen

In den Abbildungen 50 bis 63 sind die Ergebnisse der untersuchten Parameter dargestellt. Das BV/TV der Femurknochen war in der Versuchsgruppe signifikant geringer als in der Kontrollgruppe (p=0,032). Der Medianwert bei ovarektomierten Minischweinen betrug 36,21 % gegenüber 41,29 % in der Kontrollgruppe. In der Versuchsgruppe beliefen sich der Maximal- und der Minimalwert auf 40,59 % bzw. 34,67 %, in der Kontrollgruppe hingegen auf 45,85 % bzw. 38,1 % (Abbildung 50).

Während der Median der Tb.Th in der Kontrollgruppe bei 156,27 µm lag, erreichte er in der Versuchsgruppe lediglich 130,93 µm (p=0,310). Der Maximal- und Minimalwert betrugen in der Versuchsgruppe 165,36 µm bzw. 112,7 µm, wohingegen die Werte in der Kontrollgruppe bei 165,28 µm bzw. 129,68 µm lagen (Abbildung 51).

Bei der Tb.Sp ergab sich nach OVX ein Medianwert von 229,18 µm gegenüber 196,48 µm in der Kontrollgruppe, wobei der Unterschied signifikant war (p=0,032). Der Maximal- bzw. der Minimalwert erreichten in der Versuchsgruppe 249,15 µm bzw. 212,35 µm und in der Kontrollgruppe 225,55 µm bzw. 194,64 µm (Abbildung 52).

Bei der Tb.N stand ein Medianwert von 2,78/mm in der Versuchsgruppe einem Medianwert von 2,79/mm in der Kontrollgruppe gegenüber (p=0,690). In der Versuchsgruppe beliefen sich der Maximal- und Minimalwert auf 3,08/mm und 2,46/mm, in der Kontrollgruppe hingegen auf 3,07/mm und 2,64/mm (Abbildung 53).

Der TBPf war nach OVX mit einem Medianwert von -0,96/mm signifikant größer als in der Kontrollgruppe (p=0,032), wo er bei -1,35/mm lag. Der Maximal- und der Minimalwert betrugen in der Versuchsgruppe -0,46/mm bzw. -1,17/mm und -1/mm bzw. -1,58/mm in der Kontrollgruppe (Abbildung 54).

Der Median der N/F-Ratio sank von 4,58 bei intakten Schweinen auf 3,97 bei OVX-Tieren (p=0,095). Der Maximal- und der Minimalwert betrugen in der Versuchsgruppe 4,44 bzw. 2,36, wohingegen die Werte in der Kontrollgruppe bei 5,13 bzw. 4,11 lagen (Abbildung 55).

Bei der N.No stand ein Medianwert von 3,25/mm^2 in der Versuchsgruppe einem Medianwert von 3,44/mm^2 in der Kontrollgruppe gegenüber (p=0,310). In der Versuchsgruppe beliefen sich der Maximal- bzw. der Minimalwert auf 3,46/mm^2 bzw. 2,44/mm^2, in der Kontrollgruppe hingegen auf 3,97/mm^2 bzw. 3,02/mm^2 (Abbildung 56).

Bei der N.Tm betrug der Median in der Versuchsgruppe 0,95/mm^2 und in der Kontrollgruppe 0,75/mm^2 (p=0,151). In der Versuchsgruppe betrugen der Maximal- und

Minimalwert 1,23/mm^2 bzw. 0,57/mm^2, in der Kontrollgruppe hingegen 0,83/mm^2 bzw. 0,68/mm^2 (Abbildung 57).

Die Analyse der No.No zeigte in der Versuchsgruppe einen Medianwert von 1518,72 µm/mm^2 und 1642,3 µm/mm^2 in der Kontrollgruppe (Abbildung 58), was einen Anteil von 88,25 % (VG) bzw. 90,63 % (KG) an der Total-Strut-Length (TSL) ausmachte (Abbildung 59). Während sich bei No.No [%] signifikante Unterschiede ergaben (p=0,016), waren die Ergebnisse bei No.No [µm/mm^2] nicht signifikant (p=0,222). Als Maximalwerte wurden in der Versuchsgruppe 1585,73 µm/mm^2 bzw. 89,02 % und in der Kontrollgruppe 3084,08 µm/mm^2 bzw. 93,61 % erreicht. Die Minimalwerte betrugen in der Versuchsgruppe 1091,46 µm/mm^2 bzw. 78,36 % sowie 1453,52 µm/mm^2 bzw. 88,99 % in der Kontrollgruppe.

In der Versuchsgruppe betrug der Medianwert der No.Tm 198,38 µm/mm^2 gegenüber 164,65 µm/mm^2 in der Kontrollgruppe (Abbildung 60). Der Anteil von No.Tm an der TSL wies Werte von 11,13 % (VG) und 9,02 % (KG) auf (Abbildung 61). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren bei No.Tm [%] signifikant (p=0,008), bei No.Tm [µm/mm^2] hingegen nicht (p=0,151). Die Maximalwerte in der Versuchsgruppe lagen bei 301,67 µm/mm^2 und 21,64 %, während sie sich in der Kontrollgruppe auf 190,76 µm/mm^2 bzw. 10,01 % beliefen. Die Minimalwerte betrugen in der Versuchsgruppe 155,16 µm/mm^2 bzw. 10,21 % und bei den intakten Schweinen 139,57 µm/mm^2 bzw. 6,29 %.

Bei der Tm.Tm wurde in der Versuchsgruppe mit 11,98 µm/mm^2 ein größerer Medianwert erreicht als in der Kontrollgruppe mit 4,79 µm/mm^2 (p=0,548) (Abbildung 62), was einen Anteil 0,77 % bzw. 0,1 % an der TSL ausmachte (p=0,421) (Abbildung 63). Die Maximalwerte beliefen sich in der Versuchsgruppe auf 24,64 µm/mm^2 bzw. 1,36 % und in der Kontrollgruppe auf 15,63 µm/mm^2 bzw. 1 %. Sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe gab es Tiere, die keine Tm.Tm-Struts aufwiesen.

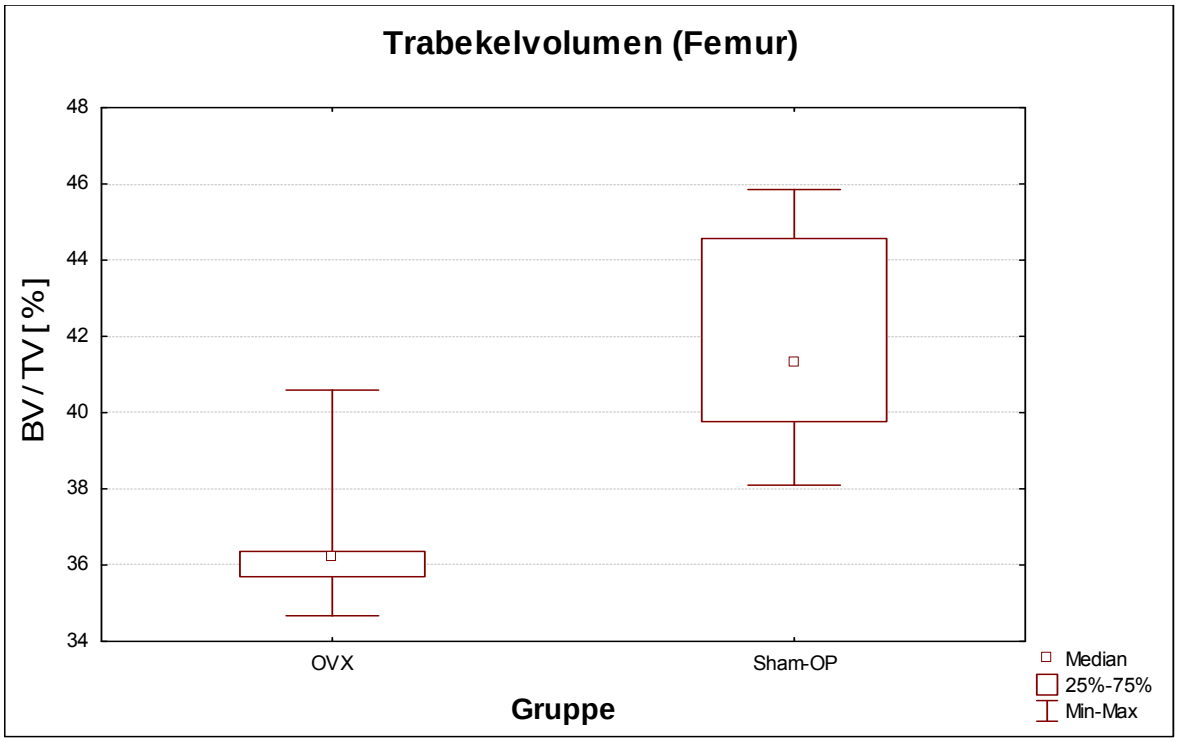

Abbildung 50: *Box-Plot für das Trabekelvolumen (BV/TV) der Femurknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,032).*

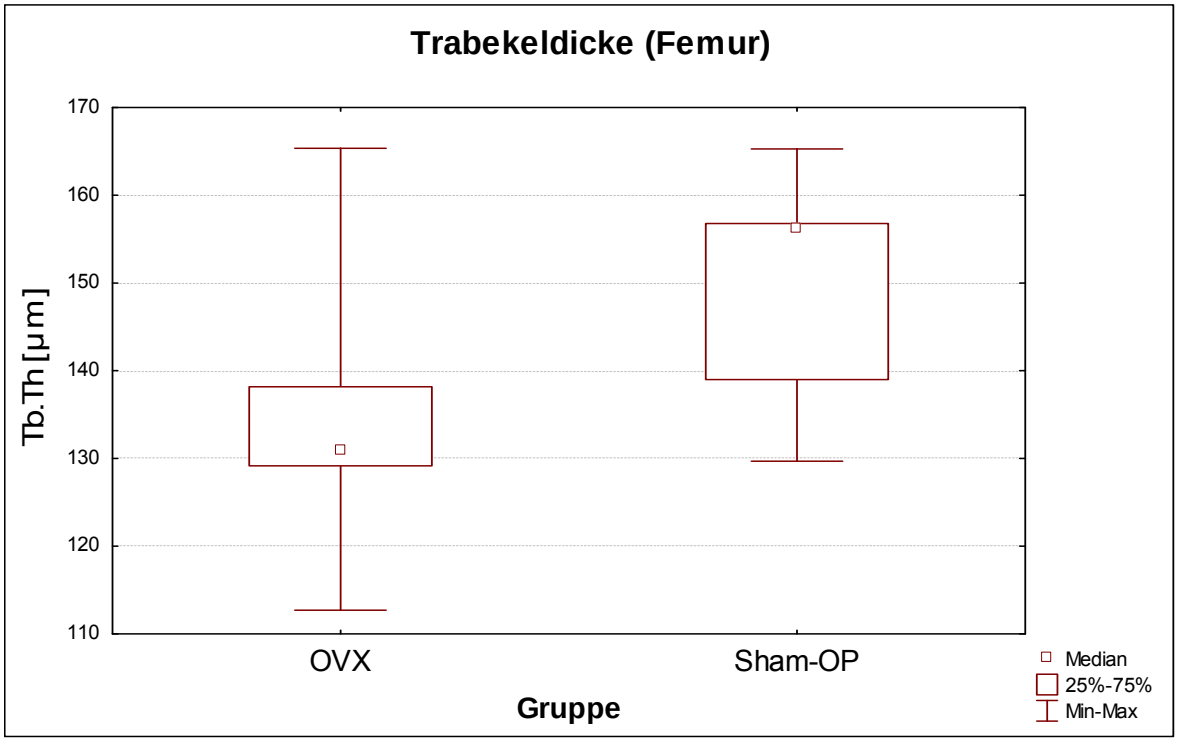

Abbildung 51: *Box-Plot für die Trabekeldicke (Tb.Th) der Femurknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,310).*

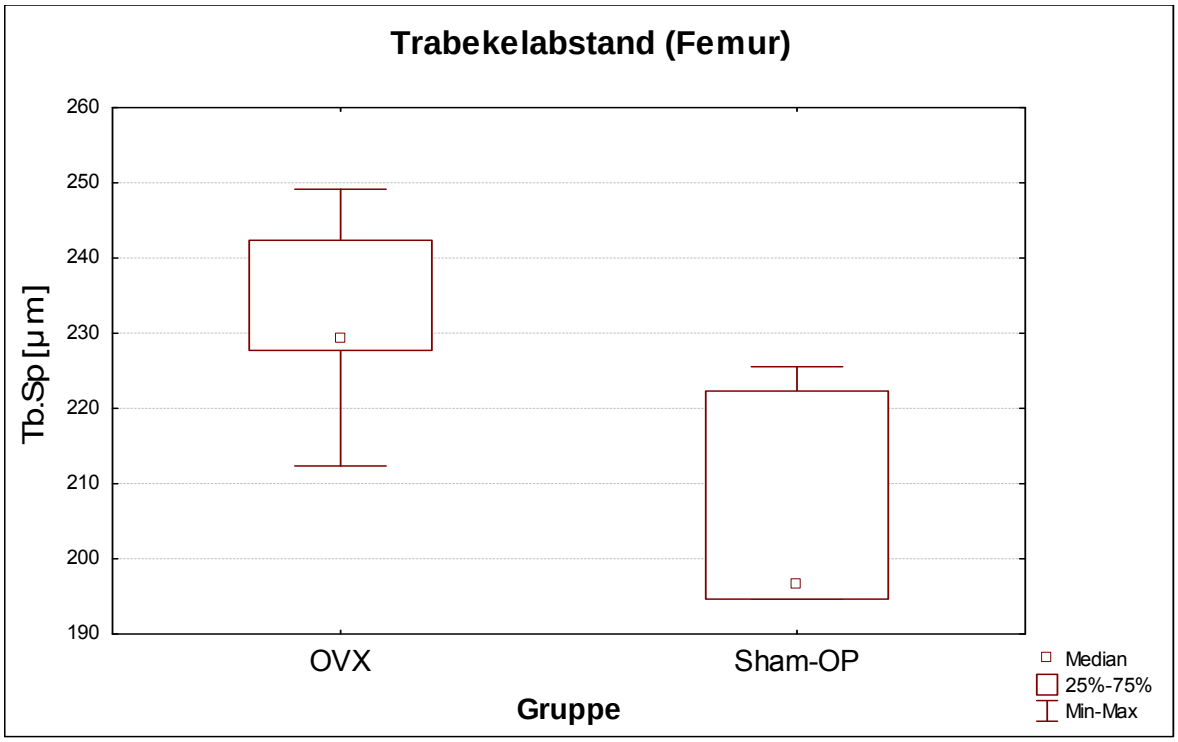

Abbildung 52: *Box-Plot für den Trabekelabstand (Tb.Sp) der Femurknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,032).*

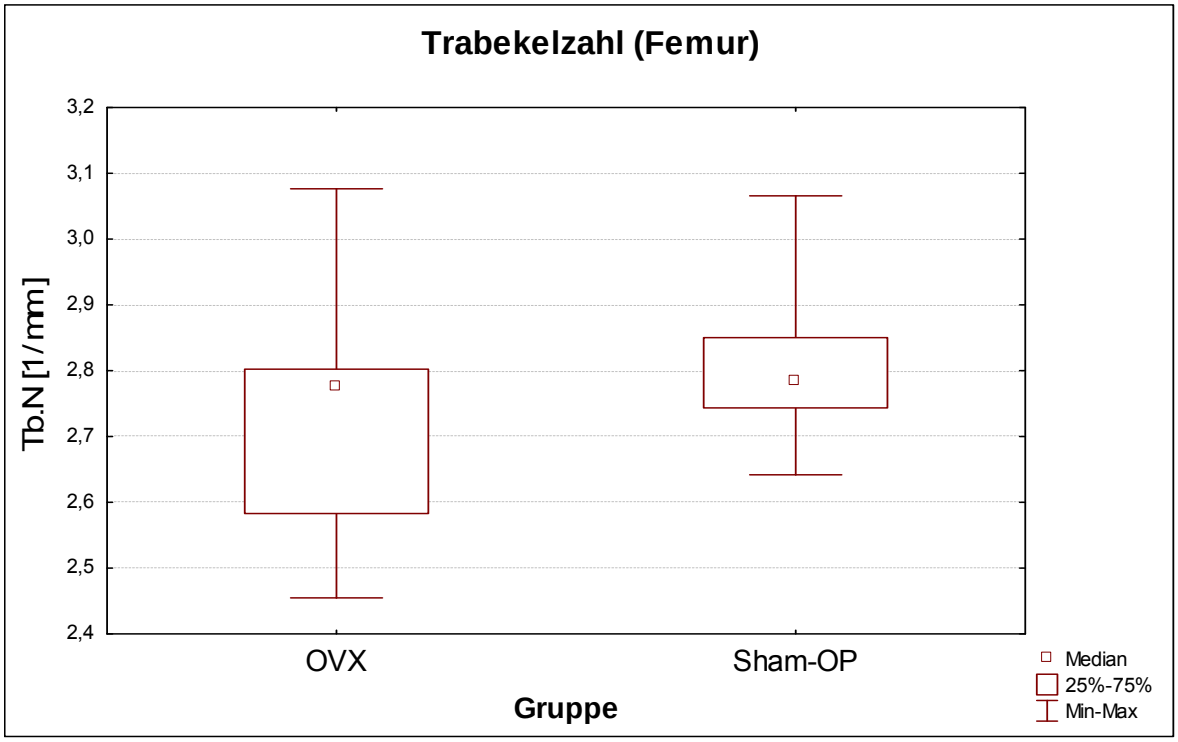

Abbildung 53: *Box-Plot für die Trabekelzahl (Tb.N) der Femurknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,690).*

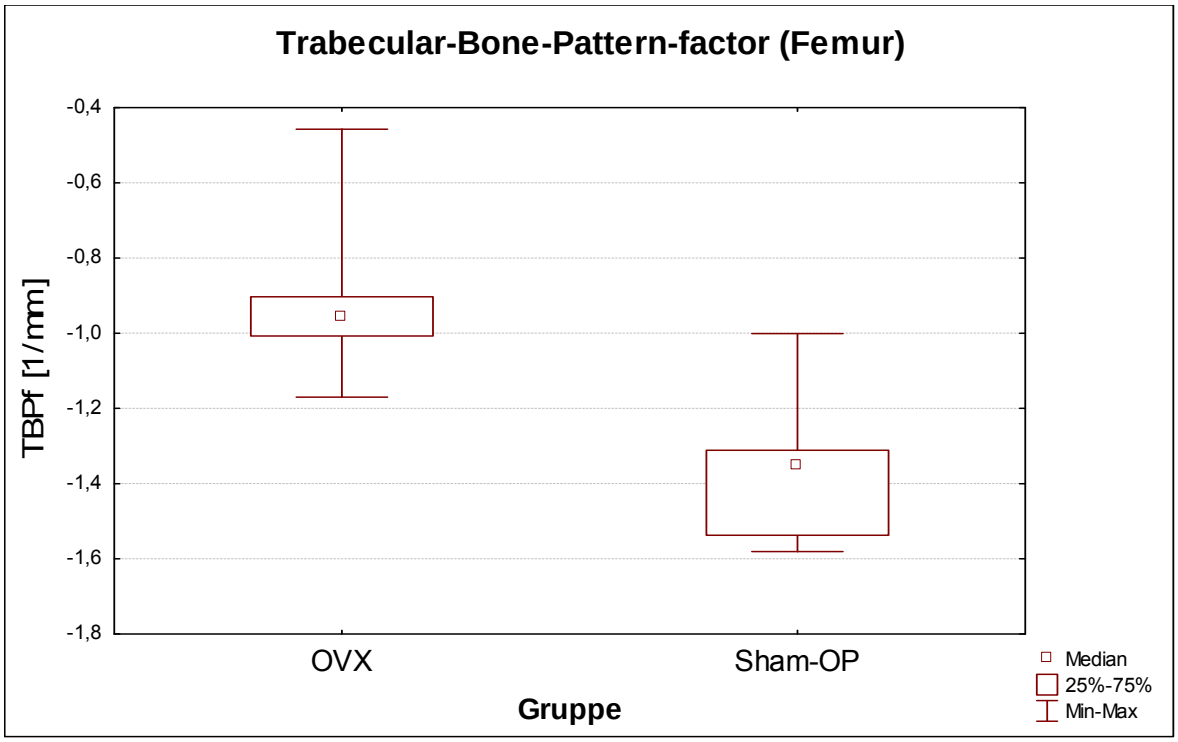

Abbildung 54: *Box-Plot für den Trabecular-Bone-Pattern-factor (TBPf) der Femurknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,032).*

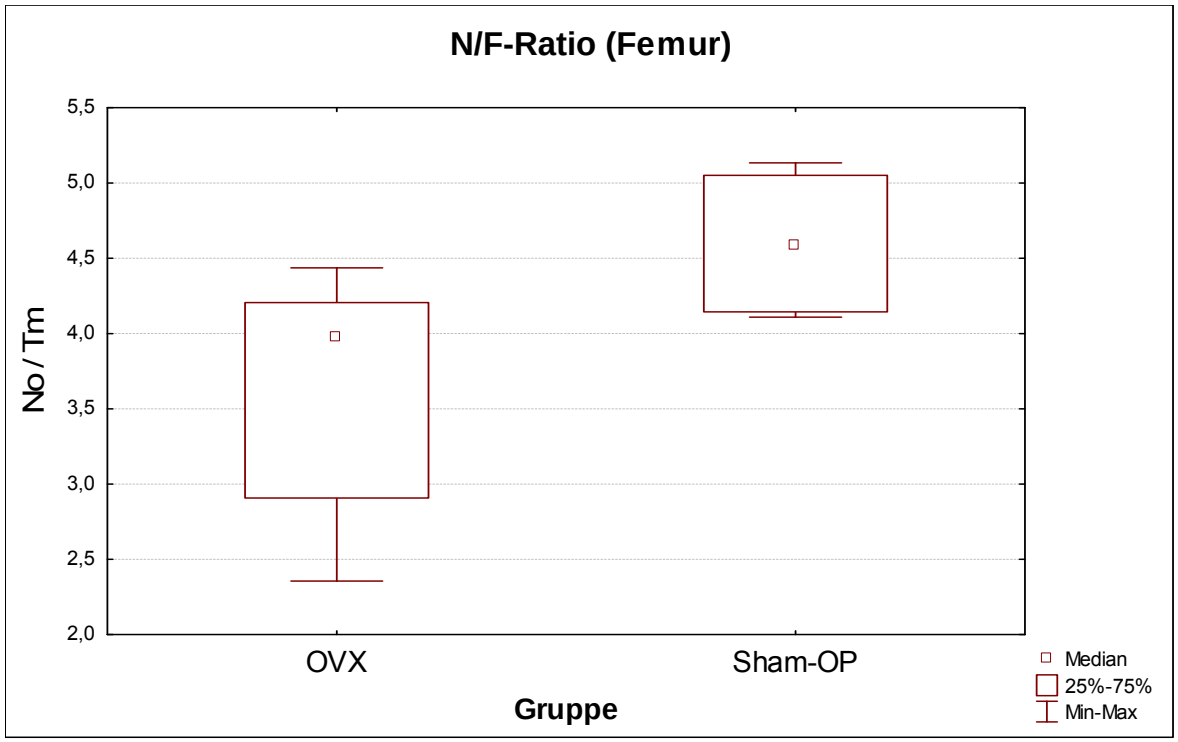

Abbildung 55: *Box-Plot für die N/F-Ratio (No/Tm) der Femurknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,095).*

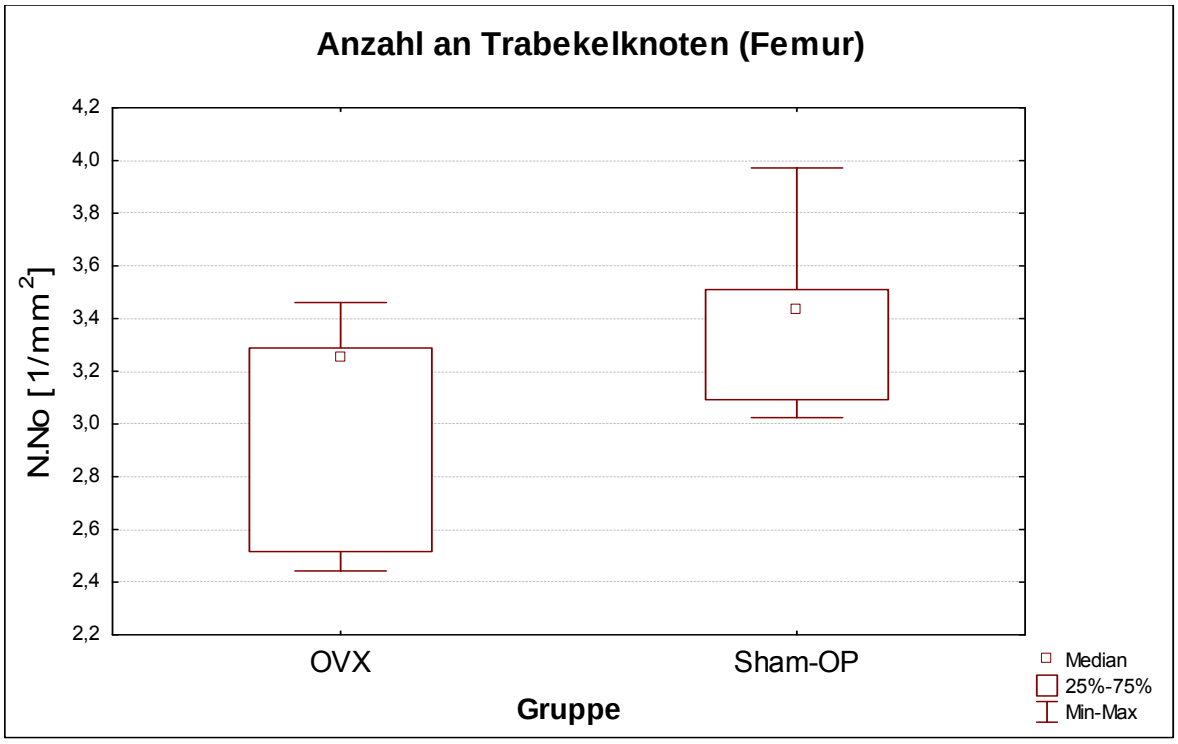

Abbildung 56: *Box-Plot für die Anzahl an Trabekelknotenpunkten (N.No) der Femurknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,310).*

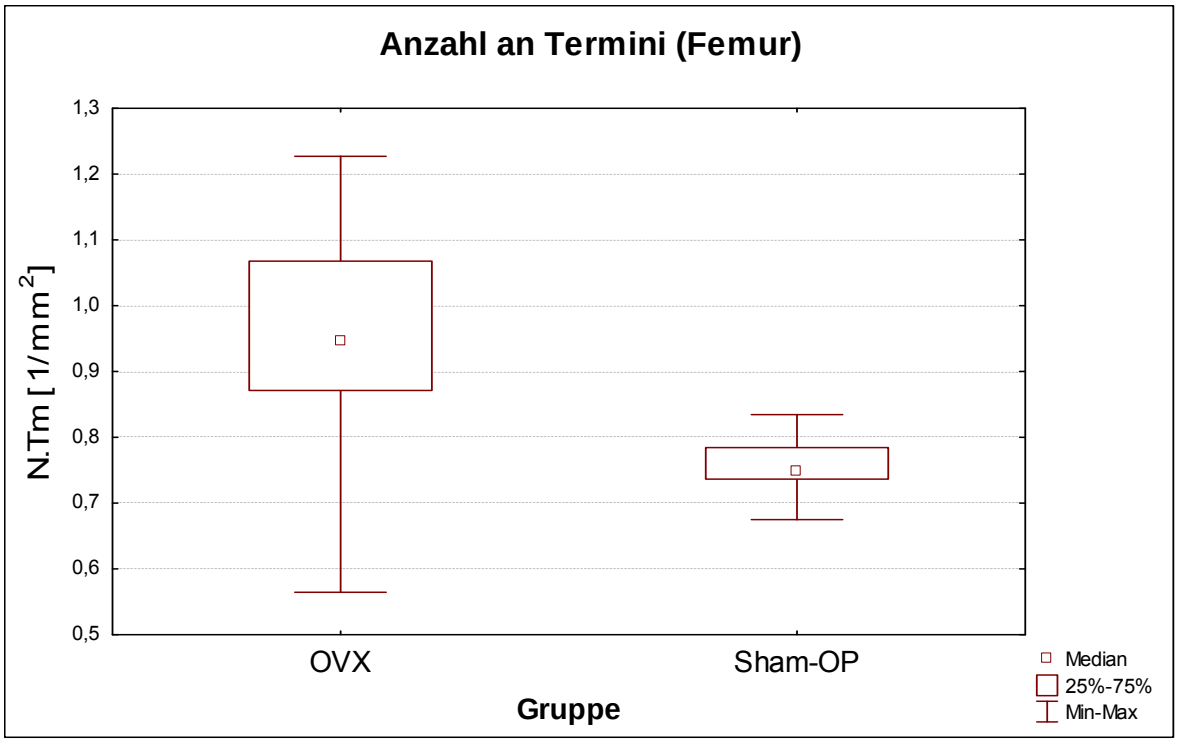

Abbildung 57: *Box-Plot für die Anzahl an frei endenden Trabekeln (N.Tm) der Femurknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,151).*

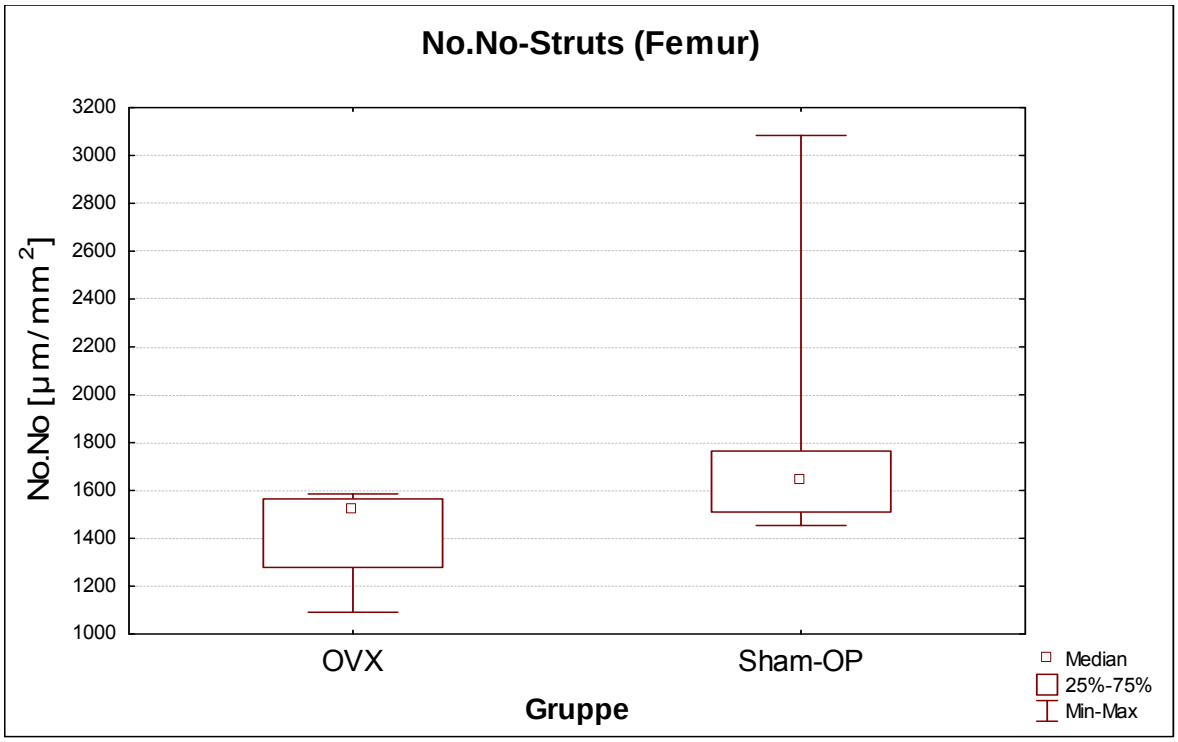

Abbildung 58: *Box-Plot für die Länge der Node-to-Node-Verbindungen (No.No [µm/mm²]) der Femurknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,222).*

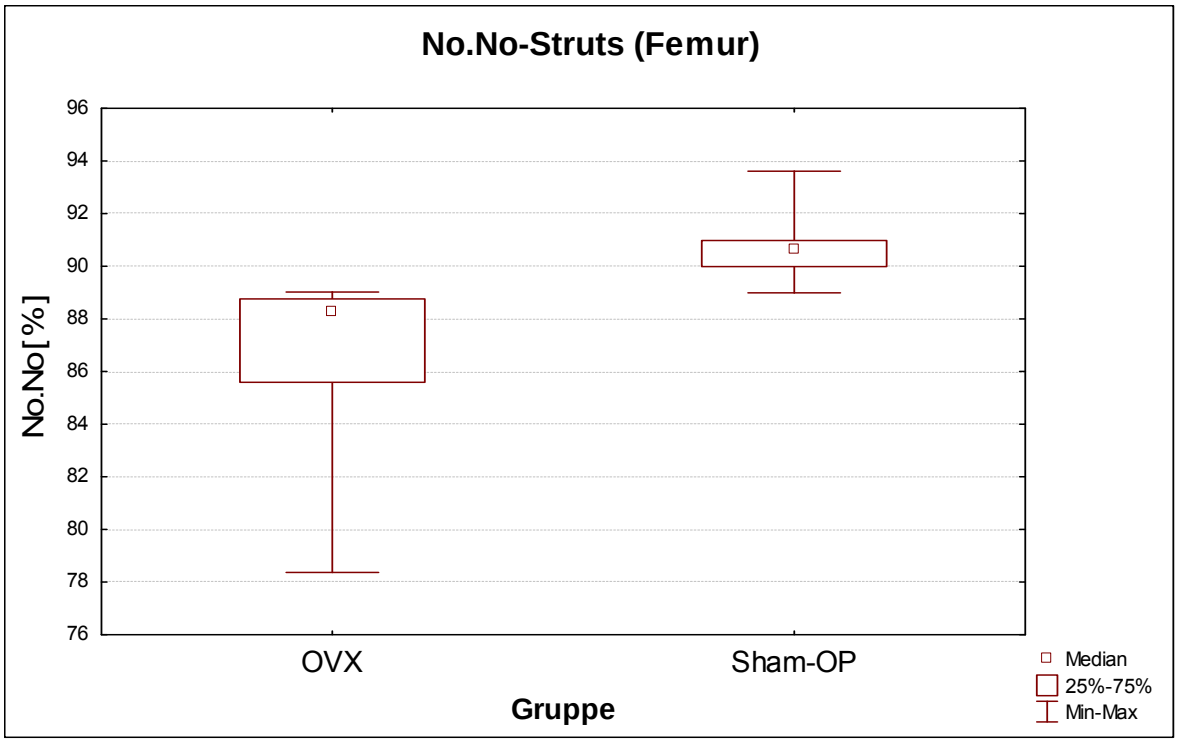

Abbildung 59: *Box-Plot für die Länge der Node-to-Terminus-Verbindungen (No.No [%]) der Femurknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,016).*

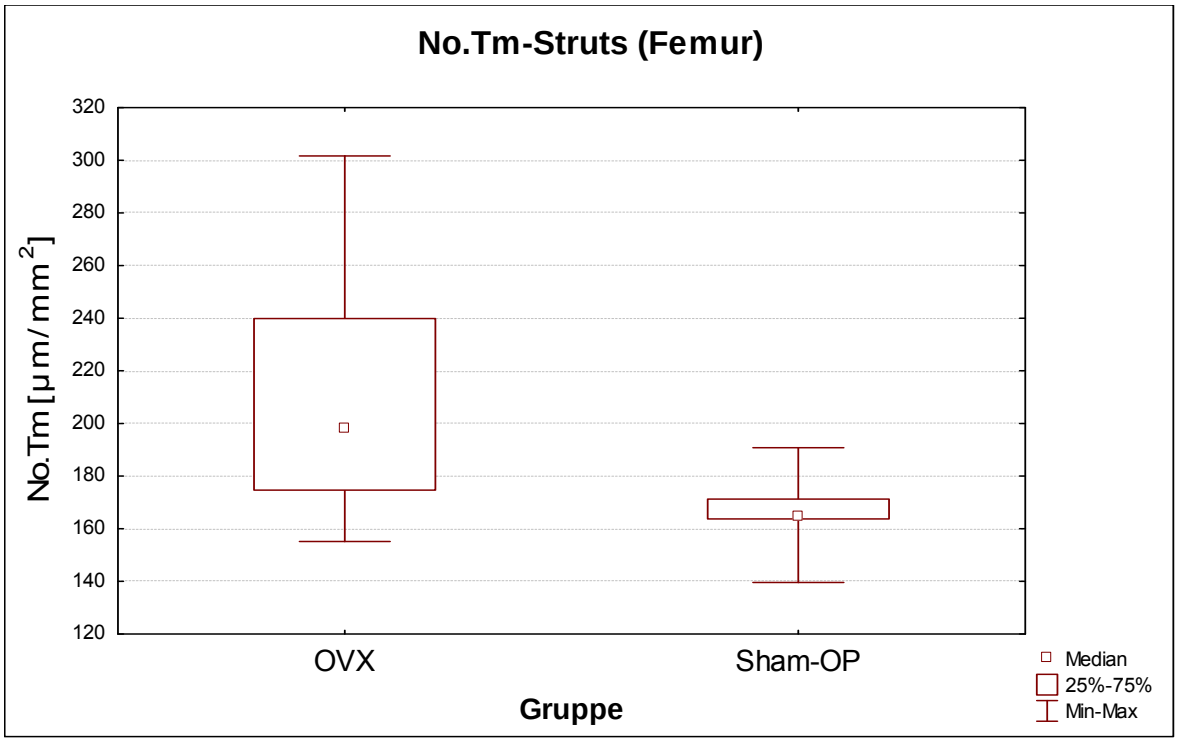

Abbildung 60: *Box-Plot für die Länge der Node-to-Terminus-Verbindungen (No.Tm [µm/mm²]) der Femurknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,151).*

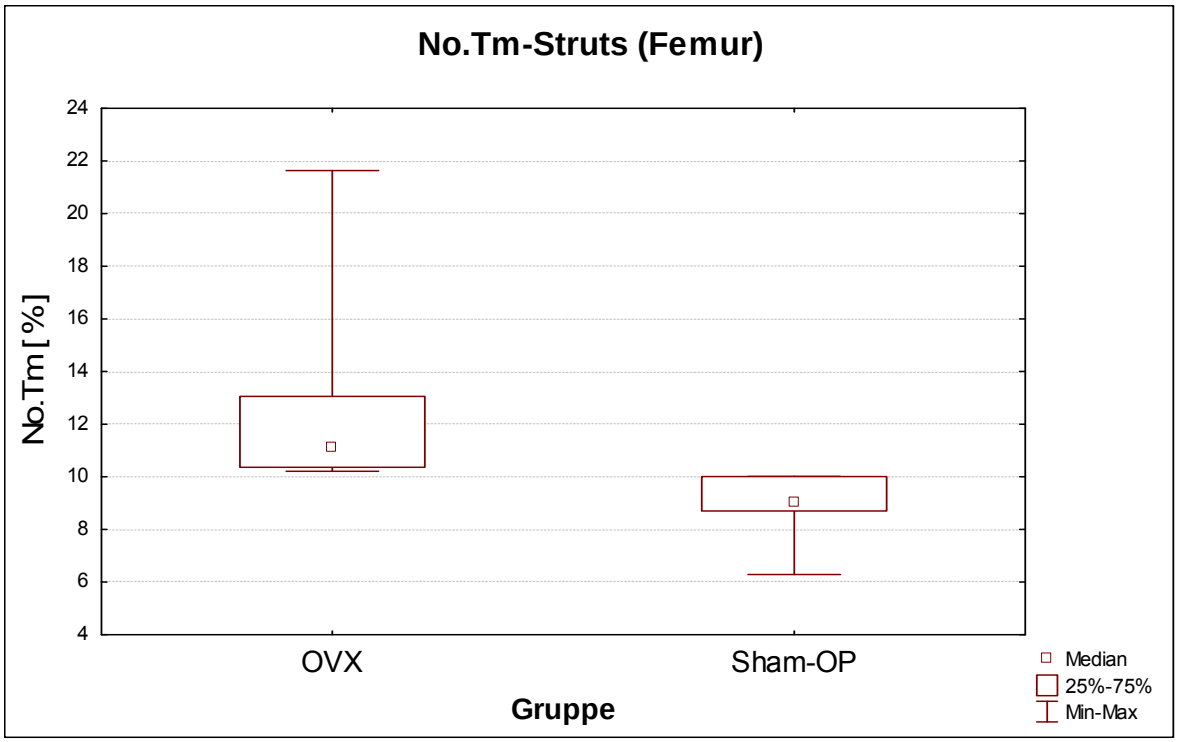

Abbildung 61: *Box-Plot für die Länge der Node-to-Terminus-Verbindungen (No.Tm [%]) der Femurknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,008).*

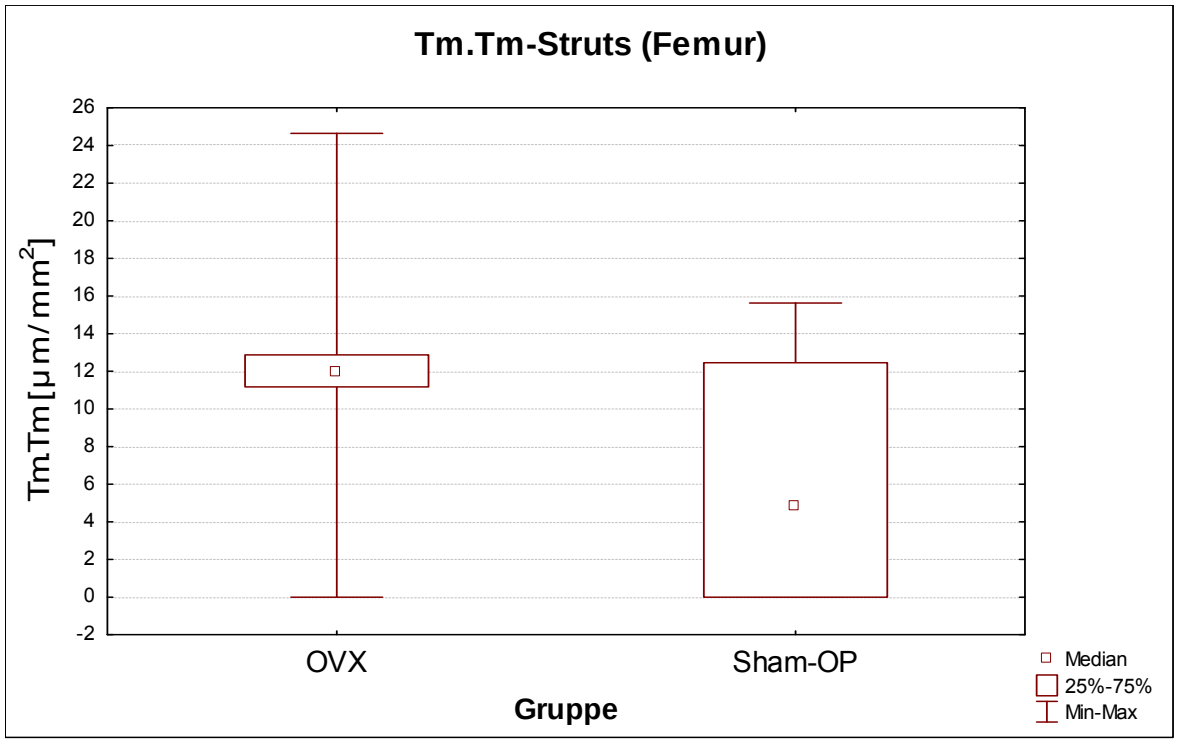

Abbildung 62: *Box-Plot für die Länge der Terminus-to-Terminus-Verbindungen (Tm.Tm [µm/mm²]) der Femurknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,548).*

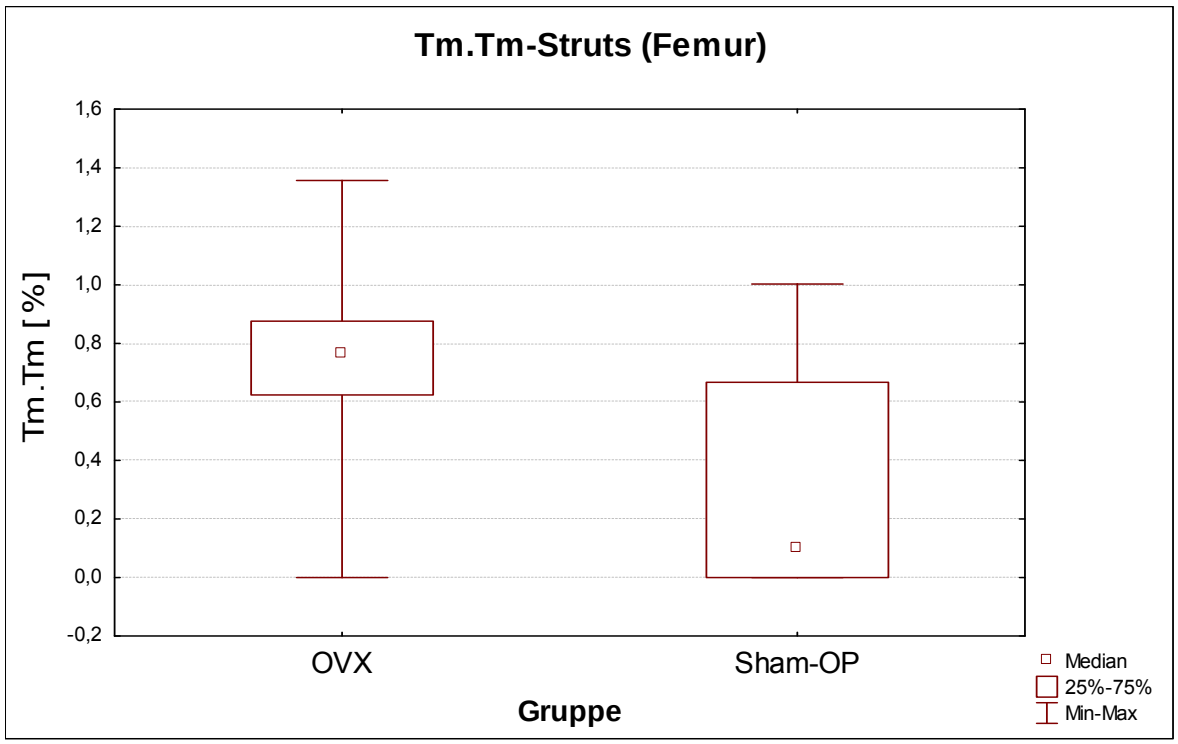

Abbildung 63: *Box-Plot für die Länge der Terminus-to-Terminus-Verbindungen (Tm.Tm [%]) der Femurknochen in der OVX- (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) (p=0,421).*

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Ergebnisse

Aufgrund der zahlreichen Vorteile wie z. B. dem Vorkommen osteoporotischer Spontanfrakturen (SPENCER 1979), der Ähnlichkeit des Östruszyklus zum menschlichen Menstruationszyklus (MOSEKILDE et al. 1993a, BELLINO 2000) und der Möglichkeit, orthotop Implantate inserieren zu können (SCHLIEPHAKE et al. 1991, TURNER AS 2001, NEUGEBAUER et al. 2006), scheint das Minischwein als Großtiermodell für die Osteoporoseforschung gut geeignet zu sein. Doch trotz dieser Vorteile ist das ovarektomierte Minischwein als Tiermodell zur Simulation der postmenopausalen Osteoporose kaum charakterisiert worden.

Ziel dieser Untersuchung war es daher, den Einfluss des postmenopausalen Östrogenmangels auf das Trabekelvolumen und die Mikrostruktur spongiösen Knochens am Göttinger Minischwein histomorphometrisch zu untersuchen.

Die Untersuchungen wurden an den 5. Lendenwirbeln sowie den rechten Tibia- und Femurknochen vorgenommen. Als histomorphometrische Parameter wurden das Trabekelvolumen (BV/TV), die Trabekeldicke (Tb.Th), die Trabekelzahl (Tb.N) und der Trabekelabstand (Tb.Sp) evaluiert (PARFITT et al. 1983). Außerdem wurde die von SHEN et al. (1993) modifizierte Node-Strut-Analysis (GARRAHAN et al. 1986) durchgeführt sowie der Trabecular-Bone-Pattern-factor (TBPf) (HAHN et al. 1992) bestimmt.

Trabekelvolumen (BV/TV): Das Trabekelvolumen (BV/TV) in den 5. Lendenwirbelkörpern sowie in den Tibia- und Femurknochen war nach 8 Monaten Studiendauer in der ovarektomierten Versuchsgruppe signifikant geringer ($p<0,05$) als in der scheinoperierten Kontrollgruppe. Die Ergebnisse stehen damit im Einklang zu den Untersuchungen von MOSEKILDE et al. (1993a), die zeigten, dass eine Ovarektomie (OVX) an Sinclair-Minipigs zu einer signifikanten Abnahme des trabekulären Knochenvolumens führt, wobei die Ergebnisse bei kalziumarmer Diät (0,75 %) am deutlichsten ausgeprägt waren. SCHOLZ-AHRENS et al. (1996) hingegen konnten nach OVX von nulli- und multiparen Sauen keine signifikanten Unterschiede im Knochenvolumen an Lendenwirbeln, Becken- und Tibiaknochen feststellen. Sie führten das Ausbleiben der Osteoporose auf den mit 1,5 % hohen Kalziumgehalt der Nahrung

zurück, zumal MOSEKILDE et al. (1993b) die Abhängigkeit der Osteoporosemanifestation vom Kalziumgehalt der Nahrung zeigen konnten.

An Tibiaknochen von ovarektomierten Ratten konnten DEMPSTER et al. (1995) ebenfalls einen Verlust an Trabekelvolumen feststellen. Dieser Knochenverlust war in den ersten 40 Tagen nach OVX besonders ausgeprägt, verlangsamte sich allerdings anschließend wieder. Knochenverlust nach OVX von Ratten ist auch am Oberschenkelhals (LI et al. 1997) oder Wirbel (WRONSKI et al. 1989a) nachgewiesen.

An Primaten bewirkt OVX ebenfalls einen Verlust an Knochenmasse. Eine Studie von MILLER et al. (1986) wies nach OVX eine signifikante Abnahme des BV/TV in Lendenwirbeln nach.

Bei Schafen hingegen sind die Ergebnisse widersprüchlich. CHAVASSIEUX et al. (2001) fanden 6 Monate nach OVX keine signifikanten Veränderungen an Knochenvolumen in Beckenkammbiopsien, wohingegen GIAVARESI et al. (2001) nach 24 Monaten in Wirbelkörpern eine signifikante Reduktion des Knochenvolumens beschrieben. HORNBY et al. (1995) wiederum konnten einen signifikanten Verlust an Knochendichte nach OVX nachweisen, während SIGRIST et al. (2007) nach OVX einen initialen Knochenverlust beobachteten, der sich nach 18 Monaten als teilweise reversibel erwies.

AMLING et al. (1994) fanden bei Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose eine signifikante Verminderung des Trabekelvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe und auch RECKER (1993) wies bei postmenopausalen Frauen mit osteoporotischen Wirbelfrakturen ein signifikant geringeres trabekuläres Knochenvolumen nach.

Tb.Sp, Tb.Th, Tb.N: Der Verlust an Knochenvolumen geht mit Änderungen in der Mikrostruktur einher. Nach dem Parallel-Plate-Model besteht trabekulärer Knochen hauptsächlich aus miteinander verbundenen Platten (PARFITT et al. 1983, RECKER 1993). Bei Osteoporose werden diese trabekulären Platten durch Vertiefung der osteoklastären Resorptionslakunen ausgedünnt und schließlich perforiert, zudem verlieren die Platten ihre gemeinsamen Verbindungen (PARFITT et al. 1983, DEMPSTER et al. 1995, ROSENBERG 2010). Die Perforationen werden anschließend stetig vergrößert, so dass die ehemaligen Trabekelplatten zu Trabekelstäben umgewandelt und gegebenenfalls auch ganz resorbiert werden. Die Folgen dieser Umbaumaßnahmen sind eine Zunahme des Trabekelabstandes sowie eine Abnahme der Trabekelzahl. Auch die Trabekeldicke nimmt in der Regel ab, allerdings ist eine kompensatorische Zunahme der Trabekeldicke ebenfalls möglich (PARFITT et al. 1983).

Die Veränderungen der Mikrostrukturparameter zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe waren in dieser Studie nur teilweise signifikant. Zwar war die Trabekeldicke in den Femur-, Tibia- und Wirbelknochen der Kontrollgruppe größer als nach OVX, trotzdem aber war der Unterschied nur bei den Lendenwirbeln signifikant ($p<0,05$). Ähnlich verhielt es sich mit dem Trabekelabstand, der in der Versuchsgruppe stets größer war, aber nur im Femur einen signifikanten Unterschied ($p<0,05$) offerierte. Die Trabekelzahl zeigte in keinem Fall signifikante Differenzen zwischen den beiden Gruppen.

MOSEKILDE et al. (1993a) fanden an Minipigs nach OVX und kalziumarmer Diät eine signifikante Abnahme der Trabekelzahl sowie einen Anstieg des mittleren Trabekelabstandes an Lendenwirbelkörpern.

DEMSTER et al. (1995) konnten an ovarektomierten Ratten ebenfalls eine deutliche Abnahme der Trabekelzahl sowie eine Zunahme des Trabekelabstandes nachweisen, wohingegen sich die Trabekeldicke nicht änderte. In einer Studie von ABE et al. (1999) nahm die Trabekeldicke und die Trabekelzahl an Ratten 8 Wochen nach OVX im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ab.

CHAVASSIEUX et al. (2001) fanden an Beckenkammbiopsien von Schafzibben 6 Monate nach OVX eine Abnahme der Trabekeldicke und der Trabekelzahl sowie eine Zunahme des Trabekelabstandes im Vergleich zu intakten Tieren, wobei diese Änderungen nicht signifikant waren. GIAVARESI et al. (2001) konnten nach 24 Monaten in Wirbelkörpern eine signifikante Reduktion der Trabekeldicke und der Trabekelzahl nachweisen. SIGRIST et al. (2007) beobachteten bei Schafen 3 Monate nach OVX eine signifikante Abnahme der Trabekeldicke, die allerdings nach 9 Monaten reversibel war. Der Trabekelabstand nahm nach OVX zwar zu, allerdings war der Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant.

RECKER (1993) fand bei postmenopausalen Frauen mit osteoporotischen Wirbelfrakturen eine signifikante Verringerung der Trabekelbreite und -zahl, während der Trabekelabstand signifikant vergrößert war. Während sich Trabekelabstand und -zahl in einer Studie von KLEEREKOPER et al. (1985) bei postmenopausalen Frauen mit osteoporotischen Frakturen in gleicher Weise veränderten, nahm die Trabekeldicke zu. GENANT et al. (2007) beschrieben, dass bei postmenopausalen Frauen zunehmend schwerere Wirbelfrakturen auftreten, wenn in Beckenkammbiopsien Knochenvolumen und Trabekelzahl abnehmen sowie der Trabekelabstand zunimmt.

Node-Strut-Analysis: Die N/F-Ratio (No/Tm) ist der Quotient aus N.Nd und N.Tm. Sie bietet die Möglichkeit, den Vernetzungsgrad des trabekulären Netzwerkes auszudrücken: Je höher die N/F-Ratio desto größer die Konnektivität. Eine hohe No.No spricht ebenfalls für einen hohen trabekulären Vernetzungsgrad, wohingegen hohe No.Tm und Tm.Tm einen niedrigen trabekulären Vernetzungsgrad anzeigen (COMPSTON et al. 1995).

In der vorliegenden Studie war die N/F-Ratio der intakten Tiere an den drei untersuchten Knochenlokalisationen größer als bei den ovarektomierten Minischweinen, allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant. Die N.No war in der Kontrollgruppe größer, während die N.Tm in der Versuchsgruppe die höheren Werte erreichte. Signifikante Unterschiede waren allerdings auch hier nicht nachzuweisen.

Sowohl in den Lendenwirbeln als auch in den Femur- und Tibiaknochen überstiegen die Werte der No.No in der Kontrollgruppe die Werte der Versuchsgruppe, während an den ovarektomierten Tieren die No.Tm und die Tm.Tm größer waren als bei intakten Minipigs. Mit Ausnahme der Tm.Tm in den Wirbeln sowie die No.No [%] und die No.Tm in den Femurknochen waren die Unterschiede zwischen beiden Gruppen nicht signifikant.

DEMPSTER et al. (1995) bestimmte No/Tm, N.No, N.Tm, No.No, No.Tm, Tm.Tm an den rechten Tibiaknochen von ovarektomierten und intakten Ratten. Sie fanden eine signifikante Abnahme der N.No sowie der No.No in der ovarektomierten Versuchsgruppe.

In einer Studie von ABE et al. (1999) nahm die No/Tm, N.No, No.No an Rattentibiae 4 Wochen nach OVX im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ab, während sich die N.Tm, Tm.Tm signifikant vergrößerten.

CHAVASSIEUX et al. (2001) beobachteten 6 Monate nach OVX keine signifikante Veränderung von No/Tm, N.Nd, N. Tm, No.No, No.Tm, Tm.Tm in Beckenkammbiopsien von Schafen.

OLEKSIK et al. (2000) fanden in Beckenkammbiopsien von Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose und Wirbelfrakturen einen signifikanten Anstieg von No.Tm und eine signifikante Abnahme der N/F-Ratio im Vergleich zu osteoporotischen Frauen ohne Frakturen. Die Werte für N.No, No.No und Tm.Tm verringerten sich ebenfalls, während N.Tm und No.Tm zunahmen. Diese Änderungen waren allerdings nicht signifikant.

GARRAHAN et al. (1986) beschrieben signifikante Mikrostrukturveränderungen bei der Node-Strut-Analysis von Beckenkammbiopsien bei Patienten mit Osteoporose. Ein Vergleich mit den Werten von gesunden Patienten offenbarte eine signifikante Erhöhung der N/F-Ratio und der Tm.Tm sowie ein Absinken der No.No bei Osteoporose. Auch die

No.Tm war bei Osteoporose erhöht, allerdings war der Unterschied zur Kontrollgruppe nicht signifikant.

TBPf: In gut vernetztem Knochen nimmt der TBPf kleine Werte an, wohingegen ein wenig vernetzter Knochen mit vielen isolierten Trabekeln einen großen TBPf aufweist (HAHN et al. 1992, CHAPPARD et al. 1999). In der vorliegenden Untersuchung war der TBPf nach OVX in den Femurknochen signifikant ($p<0,05$) erhöht. Obwohl der TBPf in den Wirbel- und Tibiaknochen nach OVX ebenfalls erhöhte Werte aufwies, war der Unterschied hier nicht signifikant.

SCHOLZ-AHRENS et al. (1996) konnten an ovarektomierten Sauen keinen Unterschied des TBPf im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen.

Bei Frauen nimmt der TBPf nach der Menopause signifikant zu (HAHN et al. 1992). AMLING et al. (1994) fanden bei Frauen mit postmenopausaler Osteoporose eine Erhöhung des TBPf über die gesamte Wirbelsäule. Zusätzlich korrelierte das Trabekelvolumen in der Versuchs- ($r=0,81$) und Kontrollgruppe ($r=0,76$) signifikant mit dem TBPf ($p<0,001$).

Osteoporose ist eine Skeletterkrankung, die durch eine herabgesetzte Knochenfestigkeit charakterisiert ist und zu einem erhöhten Frakturrisiko prädisponiert (NIH-CDP 2001). Die Knochenfestigkeit wird von der Knochenmasse und -mikrostruktur mitbestimmt (AHLBORG et al. 2003, DALLE CARBONARE und GIANNINI 2004, SEEMAN und DELMAS 2006), welche bei Osteoporose verändert sind (PARFITT et al. 1983, KIMMEL et al. 1990, SNYDER et al. 1993, RITZEL et al. 1996, SILVA und GIBSON 1997). Der Grund für diese Veränderungen, die nach OVX auch in vielen Tiermodellen auftreten, ist noch nicht restlos aufgeklärt. In zahlreichen Zellen des Knochengewebes wie periostalen Zellen, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten wurden inzwischen Östrogenrezeptoren nachgewiesen (ERIKSEN et al. 1988, OURSLER et al. 1991b, WESTERLIND et al. 1995, HOYLAND et al. 1997, ONOE et al. 1997). Dementsprechend vielfältig und komplex sind auch die Effekte, die Östrogen auf Knochengewebe ausübt und daher am Verlust von Trabekelvolumen und an Mikrostrukturveränderungen beteiligt sein können.

So hemmt Östrogen die Osteoklastogenese (SHEVDE et al. 2000, SRIVASTAVA et al. 2001, GARCIA PALACIOS et al. 2005) und in differenzierten Osteoklasten wird sowohl die Resorptionsaktivität gesenkt (OURSLER et al. 1991b, TARANTA et al. 2002) als auch die Apoptose induziert (HUGHES et al. 1996, KAMEDA et al. 1997, CHEN et al. 2005).

Obwohl der Großteil des Knochenverlusts infolge Östrogenmangels primär durch die verstärkte Knochenresorption zustande kommt, ist verminderte Knochenbildung ebenfalls

ein mitwirkender Faktor beim Knochenverlust (CHOW et al. 1992, QU et al. 1998). Östrogen beeinflusst an Osteoblasten die Expression zahlreicher Gene, die für Enzyme, Zytokine und Wachstumsfaktoren, Knochenmatrixproteine, Hormonrezeptoren sowie Transkriptionsfaktoren kodieren (SPELSBERG et al. 1999). Neben der Hemmung von pro-resorptiven Zytokinen wird durch Östrogen beispielsweise auch die Expression von Kollagen Typ-I gesteigert (ERNST et al. 1989), so dass Östrogenmangel zur reduzierten Bildung von extrazellulärer Matrix führt (LERNER 2006). Zusätzlich hemmt Östrogen die Apoptose von Osteoblasten (MANOLAGAS 2000) und steigert die Osteoblastenprolieferation sowie -differenzierung (OURSLER et al. 1991a).

5.2 Diskussion der Methode

Durch Verwendung verschiedener Techniken zur histologischen Aufbereitung und Färbung ist es heute möglich, nahezu jede Gewebestruktur sichtbar zu machen. Die Herstellung von Dünnschliffpräparaten nach DONATH und BREUNER (1982) ermöglicht z. B. die Darstellung von nicht dekalzifiziertem Knochen in optisch guter Qualität. Durch die Färbung nach SMITH und KARAGIANES (1974) können verschiedene Gewebestrukturen differenziert werden.

Zur quantitativen Analyse von Gewebehistologien dient die Histomorphometrie. Das Prinzip der Histomorphometrie liegt darin, dass ein vom Mikroskop vergrößertes Bild von einer Digitalkamera erfasst und an einen Personalcomputer weitergegeben wird. Mit einer Histomorphometrie-Software können anschließend quantitative Messungen an den Bildern vorgenommen werden.

Die Histomorphometrie stellt derzeit den Goldstandard der Knochengewebsuntersuchung dar (CARLSON et al. 2009). Ein Vorteil der digitalisierten Histomorphometrie liegt darin, dass die Kamera bereits das durch das Mikroskop vergrößerte Bild aufnimmt und somit im Rahmen der Bildübertragung zum Monitor nur noch die letzte Stufe der Vergrößerung leisten muss. Dadurch können auch kleine Strukturen stark vergrößert dargestellt und präzise ausgewertet werden. Die Auflösung der Histomorphometrie ist deutlich größer als die von Densitometrie, Magnetresonanztomographie (MRT) oder Röntgentechniken wie z. B. die Mikro-Computertomographie (μCT) (CARLSON et al. 2009).

Durch Histomorphometrie werden statische Informationen über die Knochenstruktur gewonnen, die von zweidimensionalen Gewebepräparaten stammen. Durch stereologische

Verfahren können aus zweidimensionalen Bildern dreidimensionale Parameter errechnet werden. Es ist also möglich, durch Postulierung eines festen Strukturmodells dreidimensionale Parameter wie z. B. Tb.Th, Tb.N oder Tb.Sp indirekt zu bestimmen. Normalerweise werden idealisierte Platten- oder Stabmodelle vorausgesetzt (PARFITT et al. 1983, HILDEBRAND et al. 1999). In der vorliegenden Studie beruht die Berechnung von Tb.Th, Tb.Sp. und Tb.N auf Annahme des Parallel-Plate-Models (PARFITT et al. 1983). Die Postulierung eines festen Strukturmodells ist allerdings nicht unproblematisch, da die reale Knochenstruktur von den idealisierten Modellvorstellungen abweichen kann. Eine Abweichung würde dann zu Fehlern in den indirekt bestimmten Parametern führen (HILDEBRAND et al. 1999).

Die zweidimensionale Darstellung eines dreidimensionalen Gewebes birgt noch ein weiteres Problem. Um bei zweidimensionaler Betrachtung Rückschlüsse auf die dreidimensionale Realität ziehen zu können, müsste die Knochenprobe isotrop, das heißt in alle Raumrichtungen gleich sein, damit keine Fehler entstehen. Allerdings ist diese Isotropie nicht an allen Skelettlokalisationen gegeben (WILLIAMS und LEWIS 1982, TURNER CH 1992, MÜLLER und RÜEGSEGGER 1996). In dieser Studie wird davon ausgegangen, dass die untersuchten Knochenregionen isotrop sind.

Ein neuartiges Verfahren, das die genannten Probleme umgeht und eine dreidimensionale Darstellung von Geweben ermöglicht, ist die µCT. Bei der µCT handelt es sich um ein hochauflösendes, auf Röntgenstrahlung basierendes Bildgebungsverfahren, das eine schnelle Strukturanalyse ermöglicht, ohne das Knochenpräparat durch histologische Aufbereitung zu zerstören (MÜLLER et al. 1998).

Es gibt mehrere Studien, die die Korrelation zwischen Histomorphometrie und µCT untersucht haben. THOMSEN et al. (2005) verglichen die Ergebnisse von Knochenstrukturanalysen miteinander, die mit konventioneller Histomorphometrie und µCT an Tibiaknochen durchgeführt wurden. Sie fanden hochsignifikante Korrelationen ($p<0,01$) für das Knochenvolumen ($r=0,95$) und die „Connective-Density“ (CD) ($r=0,95$), einen Parameter, der den Vernetzungsgrad des Trabekelwerks anzeigt. Weiterhin ergab sich eine hochsignifikante Korrelation ($r=0,95$) zwischen dem „Structure-Model-Index“ (SMI) des µCT und dem histomorphometrisch ermittelten TBPf ($r=0,95$). Der SMI zeigt an, ob das Trabekelwerk eher plattenartig oder eher stabartig aufgebaut ist (HILDEBRAND und RÜEGSEGGER 1997).

Im Rahmen der BIOMED I-Studie haben MÜLLER et al. (1998) die Korrelationen von Histomorphometrie und µCT bei der Knochenstrukturanalyse von Beckenkammbiopsien

untersucht. Es zeigten sich hochsignifikante Korrelationen ($p<0,0001$) zwischen den beiden Methoden für das Knochenvolumen ($r=0,93$), die Trabekeldicke ($r=0,84$) und den Trabekelabstand ($r=0,91$). Die arithmetischen Mittelwerte der Knochenstrukturparameter wurden bei Verwendung des µCT allerdings größer gemessen als bei Bestimmung durch Histomorphometrie, wobei die durchschnittliche prozentuale Differenz bei 2,5 % (BV/TV), 6,8 % (Tb.Th) und 2,2 % (Tb.Sp) lag. Diese Tendenz wird durch eine Untersuchung von CHAPPARD et al. (2005) bestätigt, in welcher die Trabekeldicke bei Bestimmung mit µCT um fast 50 % größer war, als wenn sie konventionell mit Histomorphometrie erfasst wurde.

Am µCT ist weiterhin problematisch, dass die Messergebnisse von Aufnahmeparametern wie der Auflösung (MÜLLER et al. 1996, KIM et al. 2004) oder auch dem Osteoidgehalt des Knochens abhängen (CHAPPARD et al. 2005). Da es sich um ein relativ neues Verfahren handelt, sind Ablauf und Anwendung von Knochenstrukturuntersuchungen mit µCT bisher nicht ausreichend standardisiert (MÜLLER et al. 1998).

Aufgrund der Vor- und Nachteile der beiden Verfahren sollten Histomorphometrie und µCT als sich ergänzende Techniken angesehen werden. Da mit Histomorphometrie nahezu jede Gewebestruktur darstell- und quantifizierbar ist, kann die µCT die Histologie nicht ersetzen, andererseits ist eine dreidimensionale Darstellung mit histologischen Methoden nicht möglich.

5.3 Diskussion des Tiermodells

In der vorliegenden Studie wurden 10 weibliche Göttinger Minischweine verwendet. Diese vergleichsweise geringe Anzahl an Versuchstieren erklärt sich aus der Tatsache, dass es sich um eine Pilotstudie handelt. Um Selektionsbias zu vermeiden, wurden die Tiere durch Randomisierung auf die Versuchs- und die Kontrollgruppe verteilt.

Das Durchschnittsgewicht der Versuchsgruppe lag bei 67,8 ± 6,76 kg, während die Kontrollgruppe ein mittleres Gewicht von 63,0 ± 11,6 kg aufwies. Das Durchschnittsalter der Versuchsgruppe betrug zu Beginn der Studie 4,06 ± 0,72 Jahre gegenüber 3,25 ± 0,86 Jahre in der Kontrollgruppe. Da Schweine ihre PBM mit 2,5-3 Jahren erreichen (BOUCHARD et al. 1995), ist davon auszugehen, dass alle Tiere zu Studienbeginn ihre PBM bereits erreicht hatten und das Knochenwachstum abgeschlossen war. Die Verwendung von ausgewachsenen Tieren ist in der Osteoporoseforschung obligat, um

Fehler durch Wachstumsprozesse und Knochenbildung zu vermeiden (REINWALD und BURR 2008).

Um ein Bias durch Confounder zu verhindern, wurden die Tiere beider Versuchsgruppen mit Ausnahme der Operationstechnik und der Futtermittelzusammensetzung exakt gleich behandelt. Die Schweine stammten alle vom gleichen Zuchtbetrieb, so dass der Einfluss, den eine unterschiedliche Herkunft auf die Versuchsergebnisse bewirken kann, gering gehalten wurde. Durch Verwendung von genetisch einheitlichen Zuchtlinien ist es z. B. bei Ratten und Mäusen möglich, den störenden Einfluss von genetischen Variablen auf die Studienergebnisse zu reduzieren (TURNER AS 2001). Diese Möglichkeit ist bei Minischweinen derzeit nicht gegeben.

Da ovarektomierte Tiere einen Zustand erreichen, welcher der Postmenopause der Frau ähnelt (REINWALD und BURR 2008), wurde bei den Tieren der Versuchsgruppe eine bilaterale OVX durchgeführt. Um den Einfluss des Operationsablaufs auf die Versuchsergebnisse auszuschließen, wurden die Tiere der Kontrollgruppe einer Sham-OP unterzogen. Die Operationen wurden stets vom gleichen OP-Personal vorgenommen.

Eine Studie von SCHOLZ-AHRENS et al. (1996) zeigt, dass eine alleinige OVX nicht zu Veränderungen in der Mikrostruktur von Knochen führt. Daher wurde die Versuchsgruppe zusätzlich zur OVX einer Diät mit reduziertem Kalzium- (0,16 %) und Phosphatgehalt (0,59 %) ausgesetzt, während das Futtermittel der Kontrollgruppe normale Mengen an Kalzium (0,96 %) und Phosphat (0,71 %) aufwies. In einer Studie von MOSEKILDE et al. (1993b) trat bei ovarektomierten Schweinen eine Osteopenie ein, wenn eine Diät mit geringem Kalziumgehalt (0,75 % gegenüber 0,9 %) verabreicht wurde. Da Soja eine östrogenartige Wirkung besitzt (MESSINA 2002, SONG et al. 2007), wurde beim Futtermittel auf einen Sojazusatz verzichtet.

Die Versuchsdauer betrug ab OVX der Tiere 234 bis 238 Tage. Eine vergleichbare Studie an Sinclair S-1 Minipigs dauerte ab dem Zeitpunkt der OVX 6 Monate an, wobei der OVX eine 6-monatige Diät mit reduziertem Kalziumgehalt vorausging (MOSEKILDE et al. 1993b). SCHOLZ-AHRENS et al. (1996) untersuchten die Knochenstrukturänderungen an Sauen 12 und 20 Monate nach OVX.

5.4 Ausblick in die Zukunft

Zur Evaluation von dentalen oder orthopädischen Implantaten sind Großtiermodelle unumgänglich. Aufgrund der zahlreichen Vorteile wie z. B. dem Vorkommen osteoporotischer Spontanfrakturen (SPENCER 1979) oder der Ähnlichkeit des Östruszyklus zum menschlichen Menstruationszyklus (MOSEKILDE et al. 1993a, BELLINO 2000) ist davon auszugehen, dass das Göttinger Minischwein als Großtiermodell in der Osteoporoseforschung zukünftig größere Bedeutung erlangen wird. Die prinzipielle Eignung wird auch von den Ergebnissen dieser Studie unterstrichen. Da es allerdings nur sehr wenig weitere Untersuchungen zu Knochenstrukturänderungen nach OVX und kalziumarmer Diät an Minischweinen gibt, sollte die Evidenz zur Eignung des Göttinger Minischweins als Modell für die postmenopausale Osteoporose durch weitere Studien noch verbessert werden.

Weil es sich bei der vorliegenden Untersuchung um eine Pilotstudie handelt, wurde nur eine geringe Anzahl von Tieren untersucht. Es war daher sehr schwierig, signifikante Daten zu erzeugen. In der Zukunft sollte daher ein größeres Kollektiv zur Verfügung stehen.

Das µCT ist ein neuartiges Verfahren, das die Möglichkeit bietet, Knochengewebe dreidimensional darzustellen. In nachfolgenden Untersuchungen sollte dieses Verfahren ergänzend zur Histomorphometrie angewendet werden, wobei die tomographische Untersuchung der Histomorphometrie vorangestellt sein muss, da es sich bei der Histomorphometrie um ein destruktives Verfahren handelt.

5.5 Schlussfolgerungen

Ziel dieser Untersuchung sollte es sein, den Einfluss des postmenopausalen Östrogenmangels auf die trabekuläre Mikrostruktur an Göttinger Minischweinen histomorphometrisch zu untersuchen. Unter den Rahmenbedingungen der vorliegenden Studie konnten folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

1. Ovarektomie führt an Göttinger Minischweinen zu einer signifikanten Reduktion des Trabekelvolumens an Lendenwirbelkörpern sowie an Tibia- und Femurknochen.

2. Ovarektomie führt an Göttinger Minischweinen zu teilweise signifikanten Änderungen der Konnektivitäts- und Diskonnektivitätsparameter des trabekulären Netzwerkes an Lendenwirbelkörpern sowie an Tibia- und Femurknochen. Es lässt sich deutlich die Tendenz erkennen, dass OVX die Konnektivitätsparameter erniedrigt und die Diskonnektivitätsparameter erhöht:
    a. Verringerung der Trabekelbreite (Tb.Th) und der Trabekelanzahl (Tb.N), Erhöhung des Trabekelabstands (Tb.Sp) nach OVX.
    b. Verringerung der Anzahl an Trabekelkreuzungen (N.No) sowie Erhöhung der Anzahl an frei endenden Trabekeln (N.Tm) nach OVX, woraus ein Absinken der N/F-Ratio resultiert.
    c. Verkürzung der Node-to-Node-Strut-Länge (No.No), Erhöhung der Node-to-Terminus-Strut-Länge (No.Tm) sowie der Terminus-to-Terminus-Strut-Länge (Tm.Tm) nach OVX.
    d. Erhöhung des Trabecular-Bone-Pattern-factor (TBPf) nach OVX.

Somit führt Ovarektomie von Göttinger Minischweinen zu Knochenveränderungen, die denen der postmenopausalen Osteoporose beim Menschen sehr ähnlich sind.

6 Zusammenfassung

Fragestellung: Göttinger Minischweine scheinen aufgrund zahlreicher Vorteile wie z. B. dem Vorkommen von osteoporotischen Frakturen, der Ähnlichkeit des Östruszyklus zum menschlichen Menstruationszyklus oder der Möglichkeit der orthotopen Implantatinsertion als Großtiermodell für die postmenopausale Osteoporose gut geeignet zu sein. Ziel dieser Untersuchung war es, die Knochenstrukturveränderungen, die sich an Göttinger Minischweinen aufgrund von Ovarektomie ergeben, histomorphometrisch zu untersuchen, um die grundsätzliche Eignung als Großtiermodell zur Simulation der postmenopausalen Osteoporose festzustellen.

Methode: 10 Göttinger Minischweine wurden randomisiert auf zwei Gruppen verteilt. Um eine osteoporotische Stoffwechsellage zu erzeugen, wurden die Tiere der Versuchsgruppe (n=5) ovarektomiert und kalziumarm ernährt, während die Kontrollgruppe (n=5) scheinoperiert und mit Standarddiät ernährt wurde. Nach 8 Monaten erfolgte die Euthanasie der Tiere und die Entnahme der 5. Lendenwirbelkörper sowie der proximalen Anteile der rechten Tibia- und Femurknochen. Nach Herstellung von Dünnschliffpräparaten und Färbung nach SMITH und KARAGIANES (1974) erfolgte die histomorphometrische Untersuchung anhand folgender Parameter: Trabekelvolumen (BV/TV), Trabekeldicke (Tb.Th), Trabekelzahl (Tb.N), Trabekelabstand (Tb.Sp), Trabecular-Bone-Pattern-factor (TBPf), Anzahl an Trabekelknotenpunkten (N.Nd), Anzahl an frei endenden Trabekeln (N.Tm) und N/F-Ratio (No/Tm). Zusätzlich wurde die Gesamtverbindungslänge zwischen Knotenpunkten (No.No), zwischen Knotenpunkt und frei endenden Trabekeln (No.Tm) sowie zwischen frei endenden Trabekeln (Tm.Tm) bestimmt.

Ergebnisse: An allen drei Knochenlokalisationen kam es nach Ovarektomie (OVX) zu einer signifikanten Reduktion des Trabekelvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe, während die Konnektivitäts- und Diskonnektivitätsparameter des trabekulären Netzwerkes nur vereinzelt signifikante Unterschiede zeigten. Dennoch ließ sich nach OVX deutlich die Tendenz der Zunahme von Diskonnektivitätsparametern und der Abnahme von Konnektivitätsparametern erkennen.

Schlussfolgerung: OVX führt an Göttinger Minischweinen zu Knochenveränderungen, die denen der postmenopausalen Osteoporose beim Menschen sehr ähnlich sind.

.

7 Literaturverzeichnis

Abe T, Sato K, Miyakoshi N, Kudo T, Tamura Y, Tsuchida T, Kasukawa Y (1999): Trabecular remodeling processes in the ovariectomized rat: modified node-strut analysis. Bone 24, 591-596

Ahlborg HG, Johnell OJ, Turner CH, Rannevik G, Karlsson MK (2003): Bone loss and bone size after menopause. N Eng J Med 349, 327-34

Ahlen J, Andersson S, Mukohyama H, Roth C, Bäckman A, Conaway HH, Lerner UH (2002): Characterization of the bone-resorptive effect of interleukin-11 in cultured mouse calvarial bones. Bone 31, 242-251

Aitken JM, Armstrong E, Anderson JB (1972): Osteoporosis after oophorectomy in the mature female rat and the effect of estrogen and /or progesterone replacement therapy in ist prevention. J Endocrinol 55, 79-81

Amling M, Grote HJ, Pösl M, Hahn M, Delling G (1994): Polyostotic heterogeneity of the spine in osteoporosis. Quantitative analysis and threedimensional morphology. Bone Miner 27, 193-208

Balena R, Toolan BC, Shea M, Markatos A, Myers ER, Lee SC, Opas EE, Seedor JG, Klein H, Frankenfeld D (1993): The effects of 2-year treatment with the aminobisphosphonate alendronate on bone metabolism, bone histomorphometry, and bone strength in ovarectomized nonhuman primates. J Clin Invest 92, 2577-2586

Baron R, Tross R, Vignery A (1984): Evidence of sequential remodeling in rat trabcular bone: mophology, dynamic histomorphometry, and changes during skeletal maturation. Anat Rec 208, 137- 145

Bartl R (2008): Therapie der Osteoporose nach der European Guidance 2008. Internist 49, 1126–1136

Bartl R, Bartl C: Osteoporose-Manual. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 2004

Bartl R, Bartl C: Osteoporose: Prävention, Diagnostik, Therapie. 3.Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2008

Bartl R, Bartl C, Mutschler W (2003): Diagnostik und Therapie der Osteoporose: Strategie für eine effiziente Prävention von Folgefrakturen. Unfallchirurg 106, 526–541

Beglinger R, Becker M, Eggenberger E, Lombard C (1975): Das Göttinger Miniaturschwein als Versuchtier; 1. Mitteilung: Literaturübersicht, Zucht, Haltung, Kreislaufparameter. Res Exp Med 165, 251-263

Bellino F (2000): Nonprimate animal models of menopause: Workshop report. Menopause 7, 14-24

Bellino F, Wise P (2003): Nonhuman primate models of menopause workshop. Biol Reprod 68,10-18

Black DM, Schwartz AV, Ensrud KE, Cauley JA, Levis S, Quandt SA, Satterfield S, Wallace RB, Bauer DC, Palermo L, Wehren LE, Lombardi A, Santora AC, Cummings SR (2006): Effects of continuing or stopping alendronate after 5 years of treatment: The Fracture Intervention Trial Long-term Extension (FLEX): A randomized trial. JAMA 296, 2927–2936

Bonjour JP, Theintz G, Law F, Slosman D, Rizzoli R (1994): Peak bone mass. Osteoporos Int (Suppl. 1), S7-13

Borah B, Dufresne TE, Chmielewski PA, Gross GJ, Prenger MC, Phipps RJ (2002): Risendronate preserves trabecular architecture and increases bone strength in vertebra of ovariectomized minipigs as measured by three-dimensional microcomputed tomography. J Bone Miner Res 17, 1139-1147

Bouchard GF, Durham HE, McOsker JE, Krause GF, Ellersieck MR, Reddy CS (1995): Determination of the peak bone mass and whole body composition in Sinclair miniatur swine. J Bone Miner Res 10 (Suppl.), S476

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003): Osteoclast differentiation and activation. Nature 423, 337-342

Brandt H, Möllers B, Glodek P (1998): Prospects for a genetically very small minipig. Scand J Lab Anim Sci 25 (Suppl. 1), 93-96

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

Carlson CS, Iwaniec UT, Gronowicz G (2009): The art of bone and cartilage histology and histomorphometry. Vortrag gehalten auf: 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 22.-25.2.2009, Las Vegas

Carpenter AM (1979): Stereology. Definition and historic background. J Histochem Cytochem 27, 1535

Castaneda S, Calvo E, Largo R, Gonzalez-Gonzalez R, de la Piedra C, Diaz-Curiel M, Herrero-Beaumont G (2008): Charaterization of a new experimental model of osteoporosis in rabbits. J Bone Miner Metab 26, 53-9

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

Chappard D, Legrand E, Pascaretti C, Basle MF, Audran M (1999): Comparison of eight histomorphometric methods for measuring trabecular bone architecture by image analysis on histological sections. Microsc Res Tech 45, 303-312

Chappard D, Retailleau-Gaborit N, Legrand E, Basle MF, Audran M (2005): Comparison insight bone measurements by histomorphometry and μCT. J Bone Miner Res 20, 1177-1184

Chavassieux P, Pastoureau P, Boivin G, Chapuy MC, Delmas PD, Meunier PJ (1991): Dose effects on ewe bone remodeling of short-term sodium fluoride administration – a histomorphometric and biochemical study. Bone 12, 421-7

Chavassieux P, Garnero P, Duboeuf F, Vergnaud P, Brunner-Ferber F, Delmas PD, Meunier PJ (2001): Effects of a new selective estrogen receptor modulator (MDL 103, 323) on cancellous and cortical bone in ovariectomized ewes: a biochemical, histomorphometric, and desitometric study. J Bone Miner Res 16, 89-96

Chen JR, Plotkin LI, Aguirre JI, Han L, Jilka RL, Kousteni S, Bellido T, Manolagas SC (2005): Transient versus sustained phosphorylation and nuclear accumulation of ERKs underlie anti- versus pro-apoptotic effects of estrogens. J Biol Chem 280, 4632-4638

Chow J, Tobias JH, Colston KW, Chambers TJ (1992): Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. J Clin Invest 89, 74-78

Claes L, Augat P (2000): Models in fracture healing: Report from the Reisensburg Workshop September 1999. J Orthop Trauma 14, 440-441

Compston JE, Yamaguchi K, Croucher PI, Garrahan NJ, Lindsay PC, Shaw RW (1995): The effect of Gonadotropin-releasing hormone agonists on iliac crest cancellous bone structure in women with endometriosis. Bone 16, 261-267

Dahl, LK (1952): A simple and sensitive histochemical method for calcium. Proc Soc Exp Biol 80, 474-479

Dalle Carbonare L, Giannini S (2004): Bone microarchitecture as an important determinant of bone strength. J Endocrinol Invest 27, 99-105

Dalle Carbonare L, Valenti MT, Bertoldo F, Zanatta M, Zenari S, Realdi G, Lo Cascio V, Giannini S (2005): Bone Microarchitecture evaluated by histomorphometry. Micron 36, 609-616

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

Dempster DW, Birchman R, Xu R, Lindsay R, Shen V (1995): Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. Bone 16, 157-161

Donath K, Breuner G (1982): A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. J Oral Pathol 11, 318-326

Egermann M, Goldhahn J, Schneider E (2005): Animal models for fracture treatment in osteoporosis. Osteoporos Int 16, S129-S138

Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL (1988): Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. Science 241, 84–86

Ernst M, Heath JK, Rodan GA (1989): Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor- I, and parathyroid hormone stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. Endocrinology 125, 825-833

Faugere MC, Okomoto S, Detuca HF, Mailuche HH (1986): Calcitriol corrects bone loss induced by oophorectomy in rats. Am J Physiol (Endocrinol Metab 13), E35-E38

Finkelmann RD, Bell NH, Strong DD, Demers LM, Baylink DJ (1992): Ovariectomy selectively reduces the concentration of transforming growth factor beta in rat bone: implications for estrogen deficiencyassociated bone loss. Proc Natl Acad Sci USA 89, 12190-12193

Frost HM, Jee WS (1992): On the rat modell of human osteopenia and osteoporoses. Bone Miner 18, 227-236

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

Gambacciani M, Ciaponi M (2000): Postmeopausal osteoporosis management. Curr Opin Obstet Gynecol 12, 189-97

Gao Y, Qian WP, Dark K, Toraldo G, Lin AS, Guldberg RE, Flavell RA, Weitzman MN, Pacifici R (2004): Estrogen prevents bone loss through transforming growth factor beta signalling in T cells. Proc Natl Acad Sci USA 101, 16618-16623

Garcia Palacios V, Robinson LJ, Borysenko CW, Lehmann T, Kalla SE, Blair HC (2005): Negative regulation of RANKL-induced osteoclastic differentiation in RAW264.7 cells by estrogen and phytoestrogens. J Biol Chem 280,13720-13727

Garrahan NJ, Mellish RWE, Compston JE (1986): A new method fort he two-dimensional analysis of bone structure in human iliac crest biopsies. J Microsc 142, 341-349

Genant HK, Delmas PD, Chen P, Jiang Y, Eriksen EF, Dalsky GP, Marcus R, San Martin J (2007): Severity of vertebral fracture reflects deterioration of bone microarchitekture. Osteoporos Int 18, 69-76

Geusens P, Boonen S, Nijs J, Jiang Y, Lowet G, Van Auderkercke R, Huyghe C, Caulin F, Very JM, Dequeker J, Van der Perre G (1996): Effect of salmon calcitonin on femoral bone quality in adult ovariectomized ewes. Calcif Tissue Int 59, 315-20

Giavaresi G, Fini M, Torricelli P, Martini L, Giardino R (2001): The ovariectomized ewe model in the evaluation of biomaterials for prosthetic devices in spinal fixation. Int J Artif Organs 24, 814-820

Girasole G, Jilka RL, Passeri G, Boswell S, Boder G, Williams DC, Manolagas (1992): 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. J Clin Invest 89, 883-891

Goodman RL: Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle; in: Physiology of reproduction, 2. Auflage; hrsg. v. Knobil E, Neill J; Raven Press, New York 1994, 659-709

Gruber HE, Ivey JL, Baylink DJ, Mathews M, Nelp WB, Sisom K, Chesnut CH (1984): Longterm calcitonin therapy in postmenopausal osteoporosis. Metabolism 33, 285-303

Häussler B, Gothe H, Mangiapane S, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D (2006): Versorgung von Osteoporose-Patienten in Deutschland: Ergebnisse der BoneEVA-Studie. Dtsch Arztebl 103, 2542-8

Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, Delling G (1992): Trabecular bone pattern factor – a new parameter für simple quantification of bone microarchitecture. Bone 13, 327-330

Haring F, Gruhn R, Smidt D, Scheven B (1963): Züchtung eines Miniaturschweines als Versuchs- und Laboratoriumstier. Hygiene 189, 521-537

Hayashi T, Yamamuro T, Okumurah H, Kasai R, Tada K (1989): Effect of (Asu1, 7)-eel calcitonin on the prevention of osteoporosis induced by combination of immobilization and ovariectomy in the rat. Bone 10, 25-8

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

Hefti E, Trechsel I.J, Bonjour J-P, Fleisch H, Schenk R (1982): Increase of whole body calcium and skeletal mass in normal and osteoporotic adult rats treated with parathyroid hormone. Clin Sci 62, 389-396

Hildebrand T, Rüegsegger P (1997): Quantification of bone microarchitecture with the structure model index. Comput Methods Biomech Biomed Engin 1, 15-23

Hildebrand T, Laib A, Müller R, Dequeker J, Rüegsegger P (1999): Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest and calcaneus. J Bone Miner Res 14, 1167-74

Hodgen GD, Goodman AL, O´Connor A, Johnson DK (1977): Menopause in rhesus monkeys: model for study of disorders in the human climacteric. Am J Obstet Gynecol 127, 581-4

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL (1999): Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin gerin in human osteoblastic cells. Endocrinology 140, 4367-4370

Hori M, Uzawa T, Morita K, Noda T, Takahashi H, Inoue J (1988): Effect of human parathyroid hormone (PTH 1-34) on experimental osteopenia of rats induced by ovariectomy. J Bone Miner Res 3, 193-199

Hornby SB, Ford SL, Mase CA, Evans GP (1995): Skeletal changes in the ovariectomized ewe and subsequent response to treatment with 17 beta oestradiol. Bone 17 (4. Suppl.), 389S-394S

Hoyland JA, Mee AP, Baird P, Braidman IP, Mawer EB, Freemont AJ (1997): Demonstration of estrogen receptor mRNA in bone using in situ reverse-transcriptase polymerase chain reaction. Bone 20, 87–92

Hughes DE, Dai A, Tiffee JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF (1996): Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-β. Nat Med 2, 1132-6

Jayo M, Rankin S, Weaver D, Carlson C, Clarkson T (1991): Accuracy and precision of lumbar bone mineral content by DXA in live female monkeys. Calcif Tissue Int 49, 438-440

Jayo M, Jerome C, Lees C, Rankin S, Weaver D (1994): Bone mass in female cynomolgus macaques: a cross-sectional and longitudinal study by age. Calcif Tissue Int 54, 231-236

Jee WSS, Mori S, Li XJ, Chan S (1990): Prostaglandin E2 enhances cortical bone mass and activates intracortical bone remodeling in intact and ovariectomized female rats. Bone 11, 253-266

Jerome CP, Peterson PE (2001): Nonhuman primate models in skeletal research. Bone 29, 1-6

Jerome CP, Turner CH, Lees CJ (1997): Decreased bone mass and strength in ovariectomized cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis). Calcif Tissue Int 60, 265-270

Jilka RL (1998): Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. Bone 23, 75-81

Kalu DN (1991): The ovarectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner 15, 175-91

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

Kalu DN, Echon RM, Hollis BW (1990): Modulation of ovariectomy-related bone loss by parathyroid hormone in rats. Mech Aging Devt 56, 49-62

Kalu DN, Liu CC, Salerno E, Hollis BW, Echo RN, Ray M (1991a): Skeletal response of ovariectomized rats to low and high doses of 17β-Estradiol. Bone Miner 14, 175-188

Kalu DN, Salerno E, Liu CC, Echon R, Ray M, Garza-Zapata M, Hollis BW (1991b): A comparative study of the actions of tamoxifen, estrogen and progesterone in the ovariectomized rat. Bone Miner 15, 109-114

Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, Nakamaru Y, Hiroi E, Hiura K, Kameda A, Yang NN, Hakeda Y, Kumegawa M (1997): Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone resorbing osteoclasts. J Exp Med 186, 489-495

Kanis JA, Oden A, Johnell O, De Laet C, Jonsson B, Oglesby AK (2003): The components of excess mortality after hip fracture. Bone 32, 468–473

Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster JY, Borgstrom F, Rizzoli R (2008): European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. Osteoporos Int 19, 399–428

Kasra M, Grynpas MD (1994): Effect of long-term ovariectomy on bone mechanical properties in young female cynomolgus monkeys. Bone 15, 557-561

Kimmel DB, Recker RR, Gallagher JC Vaswani AS, Aloia JF (1990): A comparison of illiac bone histomorphometric data in post-menopausal osteoporotic and normal subjects. Bone Miner 11, 217-235

Kleerekoper M, Villanueva AR, Stanciu J, Sudhaker R, Parfitt AM (1985): The role of three-dimensional trabecular microstructure in the pathogenesis of vertebral compression fractures. Calcif Tissue Int 37, 594-597

Klein RF, Foroud T: Human animal studies of the genetics of osteoporosis; in: Osteoporosis – pathophysiology and clinical management; hrsg. v. Orwoll ES, Bliziotes M; Humana Press, Totowa 2003, 1-31

Kumar V, Robbins S: The Musculoskeletal System; in: Robbins Basic Pathology; hrsg. v. Kumar V, Robbins S; Saunders/Elsevier, Philadelphia 2007, 801-836

Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y (2004): IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rev 15, 49-60

Legrand E, Chappard D, Pascaretti C, Duquenne M, Krebs S, Rohmer V, Basle MF, Audran M (2000): Trabecular bone microarchitecture, bone mineral density, and vertebral fractures in male osteoporosis. J Bone Miner Res 15, 13-19

Lerner UH (2006): Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. J Dent Res 85, 584-595

Li M, Shen Y, Wronski TJ (1997): Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. Bone 20, 55-61

Lindgren JU, Lindholm TS (1979): Effect of 1-alpha-hydroxyvitamin D3 on osteoporosis in rats induced by oophorectomy. Calcif Tissue Int 27, 161-164

Lindgren U, De Luca HF (1982): Role of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the development of osteopenia in oophorectomized rats. Calcif Tissue Int 34, 510-514

Liu CC, Kalu DN (1990): Human parathyroid hormone-(l-34) prevents bone loss and augments bone formation in sexually mature ovariectomized rats. J Bone Miner Res 5, 973-982

Mac Intire I, Stevenson JC, Whitehead MI, Wimalawansa SJ, Banks LN, Healy MJR (1988): Calcitonin for prevention of postmenopausal bone loss. Lancet 1988, 1, 900-2

Manolagas SC (2000): Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocr Rev 21, 115-137

Martin TJ, Romas E, Gillespie MT (1998): Interleukines in the control of osteoclast differentiation. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 8, 107-123

Mellish RW, Ferguson-Pell MW, Cochran GV, Lindsay R, Dempster DW (1991): A new manual method for assessing two-dimensional cancellous bone structure: comparison between iliac crest and lumbar vertebra. J Bone Miner Res 6, 689-96

Messina MJ (2002): Soy foods and soybean isoflavones and menopausal health. Nutr Clin Care 5, 272-82

Miller L, Weaver D, McAlister J, Koritnik D (1986): Effects of ovariectomy on vertebral trabecular bone in the cynomolgus monkey (Macaca fascisularis). Calcif Tissue Int 38, 62-65

Mora S, Gilsanz V (2003): Establishment of peak bone mass. Endocrinol Metab Clin N Am 32, 39-63

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

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

Müller R, Rüegsegger P (1996): Analysis of mechanical properties of cancellous bone under conditions of simulated bone atrophy. J Biomech 29, 1053-1060

Müller R, Koller B, Hildebrand T, Laib A, Gianolini S, Rüegsegger P (1996): Resolution dependency of microstructural properties of cancellous bone based on threedimensional mu-tomography. Technol Health Care 4, 113-9

Müller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, Rüegsegger P (1998): Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. Bone 23, 59-66

NIH-CDP (National Institute of Health Consensus Development Panel on Osteoporosis, Prevention, Diagnosis, and Therapy) (2001): Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. JAMA 285, 785–95

Neugebauer J, Traini T, Thams U, Piattelli A, Zoller JE (2006): Peri-implant bone organization under immediate loading state. Circularly polarized light analyses: a minipig study. J Periodontol 77, 152-60

Newman E, Turner AS, Wark JD (1995): The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. Bone 16 (4. Suppl.), 277S-284S

Oleksik A, Ott SM, Vedi S, Bravenboer N, Compston J, Lips P (2000): Bone structure in patients with low bone mineral density with or without vertebral fractures. J Bone Miner Res 15, 1368-75

Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, Nozawa S, Suda T (1997): Expression of estrogen receptor beta in rat bone. Endocrinology 138, 4509-4512

Oursler MJ (1998): Estrogen regulation of gene expression in osteoblasts and osteoclasts. Clin Rev Eukaryot Gene Expr 8, 125-140

Oursler MJ, Cortese C, Keeting P, Anderson MA, Bonde SK, Riggs BL (1991a): Modulation of transforming growth factor-beta production in normal human osteoblast-like cells by 17 beta-estradiol and parathyroid hormone. Endocrinology 129, 3313-3320

Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC (1991b): Avian osteoclasts as estrogen target cells. Proc Natl Acad Sci 88, 6613–6617

Pacifici R (1999): Aging and cytokine production. Calcif Tissue Int 65, 345- 351

Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH (2002): IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. J Immunol 169, 3353-3362

Parfitt AM: The stereologic basis of bone histomorphometry. Theory of quantitative microscopy and reconstruction of the 3rd dimension; in: Bone Histomorphometry. Techniques and Interpretations; hrsg. v. Recker R; CRC Press, Boca Raton 1983, 53-88

Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS (1983): Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications fort he microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. J Clin Invest 72, 1396-409

Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG (2007): Animal models for implantat biomaterial research in bone: a review. Eur Cell Mater 13, 1-10

Pope N, Gould K, Anderson D, Mann D (1989): Effects on age and sex on bone density in the rhesus monkey. Bone 10, 109-112

Qu Q, Perala-Heape M, Kapanen A, Dahllund J, Salo J, Väänanen HK, Harkönen P (1998): Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. Bone 22, 201-209.

Recker RR (1993): Architecture and vertebral fracture. Calcif Tissue Int 53 (Suppl. 1), S139-S142

Reeve J, Meunier PJ, Parsons JA, Bernat M, Bijvoet OLM, Courpron P, Edouard C, Klenerman L, Neer RM, Renier JC, Slovik D, Vismans FJFE, Potts JT (1980): Anabolic effect of human parathyroid fragment on trabecular bone in involutional osteoporosis: a multicentre trial. Br Med J 280, 1340-1344

Reinwald S, Burr D (2008): Review of nonprimate, large animal models for osteoporosis research. J Bone Miner Res 23, 1353-68

Riggs BL, Melton LJ (1986): Involutional osteoporosis. N Engl J Med 314, 1676-86

Ringe JD: Osteoporose: Postmenopausale Osteoporose, senile Osteoporose, sekundäre Osteoporose, Osteoporose des Mannes. Thieme Verlag, Stuttgart 1995

Ringe JD: Osteoporose Dialog. Thieme Verlag, Stuttgart 2000

Ritzel H, Amling M, Vogel M, Pösl M, Hahn M, Werner M, Delling G (1996): Spongiosastruktur und polyostotische Heterogenität bei Osteoporose. Pathologe 17, 68-77

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

Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, Isaia G, Pacifici R (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 USA 98, 13960-13965

Rosenberg AE: Bones, Joints, and Soft tissue Tumors; in: Pathologic Basis of Disease; hrsg. v. Robbins S, Cotran R, Kumar V; Saunders/Elsevier, Philadelphia 2010; 1205-1256

Ruth EB (1953): Bone studies II. An experimental study of the Haversian-type vascular channels. Am J Anat 93, 429-455

Sachs L, Hedderich J: Angewandte Statistik: Methodensammlung mit R. 13. Auflage; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 2009

Schliephake H, van den Berghe P, Neukam FW (1991): Osseointegration of titanium fixtures in onlay grafting procedures with autogenous bone and hydroxylapatite. An experimental histometric study. Clin Oral Implants Res 2, 56-61

Scholz-Ahrens KE, Delling G, Jungblut PW, Kallweit E, Barth CA (1996): Effect of ovariectomy on bone histology and plasma parameters of bone metabolism in nulliparous and multiparous sows. Z Ernährungswiss 35, 13-21

Seeman E, Delmas PD (2006): Bone quality – the material and structural basis of bone strength and fragility. N Engl J Med 354, 2250-61

Selzman CH, Turner AS, Gaynor JS, Miller SA, Monnet E, Harken AH (2002): Inhibition of intimal hyperplasia using the selective estrogen receptor modulator raloxifene. Arch Surg 137, 333-6

Shen V, Dempster DW, Birchman R, Mellish RW, Church E, Kohn D, Lindsay R (1992): Lack of changes in histomorphometric, bone mass, and biochemical parameters in ovariohysterectomized dogs. Bone 13, 311-6

Shen V, Dempster DW, Birchman R, Xu R, Lindsay R (1993): Loss of cancellous bone mass and connectivity in ovariectomized rats can be restored by combined treatment with PTH and estradiol. J Clin Invest 91, 2479-2487

Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW (2000): Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. Proc Natl Acad Sci USA 97, 7829-7834

Sigrist IM, Gerhardt C, Alini M, Schneider E, Egermann M (2007): The long-term effects of ovariectomy on bone metabolism in sheep. J Bone Miner Metab 25, 28-35

Silva MJ, Gibson LJ (1997): Modeling the mechanical behavior of vertebral trabecular bone: effects of age-related changes in microstructure. Bone 21, 191-9

Smith LG, Karagianes MT (1974): Histological preparation of bone to study ingrowth into implanted materials. Calcif Tissue Res 14, 333-7

Snyder BD, Piazza S, Edwards WT, Hayes WC (1993): Role of trabecular morphology in the etiology of age-related vertebral fractures. Calcif Tissue Int 53 (Suppl. 1), S14-S22

Sone K, Yamamoto-Sawamura T, Kuwahara S, Nishijima K, Ohno T, Aoyama H, Tanaka S (2007): Changes of estrous cycles with aging in female F344/n rats. Exp Anim 56, 139-148

Song WO, Chun OK, Hwang I, Shin HS, Kim BG, Kim KS, Lee SY, Shin D, Lee SG (2007): Soy isoflavones as save functional ingredients. J Med Food 10, 571-80

Spelsberg TC, Subramaniam M, Riggs BL, Khosla S (1999): The actions and interactions of sex steroides and growth factors/cytokines on the skeleton. Mol Endocrinol 13, 819-28

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

Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Pacifici R (2001): Estrogen decreases oseoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. J Biol Chem 276, 8836-8840

Storm T, Thamsborg G, Steiniche T, Genant HK, Sorensen OH (1990): Effect of intermittent cyclic etidronate therapy on bone mass and fracture rate in women with postmenopausal osteoporosis. N Eng J Med 322,1265-1271

Taranta A, Brama M, Teti A, De Luca V, Scandurra R, Spera G, Agnusdei D, Termine JD (2002): The selective estrogen receptor modulator raloxifene regulates osteoclast and osteoblast activity in vitro. Bone 30, 368-376

Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ (1995): FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. Bone 17 (Suppl. 4), 125S-133S

Thomsen JS, Ebbesen EN, Mosekilde L (2002): Predicting human vertebral bone strength by vertebral static histomorphometry. Bone 30, 502-508

Thomsen JS, Laib A, Koller B, Prohaska S, Mosekilde L, Gowin W (2005): Stereological measures of trabecular bone structure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies. J Microsc 218, 171-9

Tran Van P, Vignery A, Baron R (1982): Cellular kinetics of the bone remodeling sequence in the rat. Anat Rec 202, 445-451

Turken S, Siris E, Seldin D, Flaster E, Hyman G, Lindsay R (1989): Effects of tamoxifen on spinal bone density in women with breast cancer. J Natl Cancer Inst 81, 1086-1088

Turner AS (2001): Animal models of osteoporosis – necessity and limitations. Eur Cell Mater 1, 66-81

Turner AS (2002): The sheep as a model for osteoporosis in humans. Vet J 163, 232-239

Turner AS, Alvis M, Myers W, Stevens ML, Lundy MW (1995a): Changes in bone mineral density and bone-specific alkaline phosphatase in ovariectomized ewes. Bone 17 (4. Suppl.), 395S-402S

Turner AS, Alvis MR, Mallinckrodt CH, Bryant HU (1995b): Dose-response effects of estradiol on bone mineral density in ovariectomized ewes. Bone 17 (4. Suppl.), 421S-427S

Turner CH (1992): On Wolff´s law of trabecular architecture. J Biomech 25, 1-9

Turner RT, Wakley GK, Hannon KS, Bell NB (1987): Tamoxifen prevents the skeletal effects of ovarian hormone deficiency in rats. J Bone Miner Res 2, 449-456

Turner TT, Vandersteenhoven JJ, Bell NH (1984): The effects of ovariectomy and 17β-estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. J Bone Miner Res 2, 115-122

Vogel M, Hahn M, Caselitz P, Woggan J, Pompesius-Kempa M, Delling G: Comparison of trabecular bone structure in man today and an ancient population in Western Germany; in: Bone histomorphometry; hrsg. v. Takahashi HE; Nishimura Co. Ltd., Niigata/Japan 1990, 220-223

Walker ML, Herndon JG (2008): Menopause in nonhuman primates? Biol Reprod 79, 398-406

Wang Q, Cheng S, Alen M, Seeman E (2009): Bone´s structural diversity in adult females is established before puberty. J Clin Endocrinol Metab 94, 1555-61

Westerlind KC, Sarker G, Bolander ME, Turner RT (1995): Estrogen receptor mRNA is expressed in vivo in rat calvarial periosteum. Steroids 60, 484–487

Williams JL, Lewis JL (1982): Properties and an anisotropic model of cancellous bone from the proximal tibial epiphysis. J Biomech Eng 104, 50-56

WHO (World Health Organization) (1994): Assessment of fracture risk and ist application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO technical report series 843

Wronski TJ, Yen CF (1991): The ovariectomized rat as animal model for postmenopausal bone loss. Cells Mater Suppl 1, 69-74

Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA (1985): Skeletal alteration in ovariectomized rats. Calcif Tissue Int 37, 324-328

Wronski TJ, Cintron M, Doherty AL, Dann LM (1988): Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. Endocrinology 123, 681-686

Wronski TJ, Dann LM, Horner SL (1989a): Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. Bone 10, 295-301

Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Crooke LR (1989b): Endocrine and pharmacological suppressors of bone turnover protect against osteopenia in ovarectomized rats. Endocrinology 125, 810-816

Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Dabei richtet sich mein besonderer Dank an:

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Franz-Josef Kramer für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und die gute Betreuung.

Frau Vera Stock für die gute Zusammenarbeit und die fachkundige Unterstützung.

Herrn Dr. rer. nat. Hans Joachim Rolf, Frau Antje Ahrbecker und Frau Christina Schäfer für die praktische Unterstützung.

Herrn Dr. rer. nat. Frank Konietschke aus der Abteilung für Medizinische Statistik für die kompetente Beratung.