

Aus der Klinik Unfallchirurgie, Plastische und Wiederherstellungschirurgie

(Prof. Dr. med. W. Lehmann)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die Auswirkung vom 5-
Lipoxygenaseinhibitor Zileuton
auf osteoporotische Wirbelkörper
im Rattenmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hoai-Huong Hennig (geb. Nguyen)

aus

Oldenburg

Göttingen 2022

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in	PD. Dr. med. D. Hoffmann
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. H. Siggelkow
Drittreferent/in:	Prof. Dr. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 31.05.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Die Auswirkung vom 5-Lipoxygenaseinhibitor Zileuton auf osteoporotische Wirbelkörper im Rattenmodell“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 01.08.2022

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1. Einleitung und Fragestellung.....	1
1.2. Grundlagen.....	2
1.2.1. Knochen.....	2
1.2.2. Osteoblasten.....	3
1.2.3. Osteoprogenitorzellen	4
1.2.4. Osteoklasten.....	4
1.2.5. Knochenbildung.....	4
1.2.6. Knochenabbau.....	5
1.3. Osteoporose.....	6
1.3.1. Definition.....	6
1.3.2. Epidemiologie.....	6
1.3.3. Einteilung.....	6
1.3.3.1. Einteilung anhand der Ausdehnung	6
1.3.3.2. Einteilung nach Knochenumsatz	7
1.3.3.3. Einteilung nach Alter und Geschlecht.....	7
1.3.3.4. Einteilung nach Ätiologie.....	7
1.3.3.5. Einteilung nach dem Schweregrad	8
1.3.4. Diagnostik.....	8
1.3.4.1. Symptome	9
1.3.4.2. Bildgebende Untersuchungen	9
1.3.5. Therapie.....	10
1.4. 5-Lipoxygenase	12
1.4.1 Zileuton (Zyflo®).....	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Versuchsablauf.....	14
2.1.1. Ovariectomie.....	15
2.1.2. Tibiaosteotomie	16
2.1.3. Präparation der Lendenwirbelkörper	16
2.2. Kompressionstest.....	18
2.2.1. Durchführung des Kompressionstests	18
2.2.2. Kraft-Weg-Diagramm.....	19
2.2.3. Messparameter	19
2.2.3.2. Streckgrenze (yield load)	19
2.2.3.2. Maximalkraft (F_{max})	19
2.2.4. Validierung des Kompressionstests.....	19
2.3. Veraschung.....	20
2.3.1. Erzeugung eines Glührückstandes.....	20

2.3.2. Bestimmung des Phosphatgehaltes	21
2.3.3. Bestimmung des Calcium- und Magnesiumgehalts.....	21
2.4. Blutserumanalyse auf Calcium, Magnesium, Phosphor, Alkalischer Phosphatase und Osteocalcin 22	
2.5. 3D-Mikro-Computertomographie-Analyse (Mikro-CT).....	23
2.5.1. 3D-Analyse, Bestimmung des Weichteil-, Kortikalis- und Trabekelanteils	23
2.5.2. Bestimmung der Bone Mineral Density (BMD).....	24
2.6. 2-D Analyse	25
2.6.1. Erstellen der Knochenschnitte.....	25
2.6.2. Kalibrierung, Einstellung der Helligkeit und des Kontrasts und Detektieren der Knochenbereiche 26	
2.6.3. Messung der Kortikalisdicke ventral und dorsal	26
2.6.4. Bestimmung der Trabekelstruktur.....	27
2.7. Statistische Auswertung.....	27
3. Ergebnisse	28
3.1. Körpergewicht, Futter- und Dosisaufnahme, Uterusgewicht und Serumwerte.....	28
3.1.1. Körpergewicht, Futter- und Dosisaufnahme und Uterusgewicht	28
3.1.2. Serumwerte	30
3.2. Kompressionstests	32
3.2.1. Elastizität.....	32
3.2.2. Streckgrenze (yield load).....	33
3.2.3. Maximalkraft	34
3.3. Veraschungstests.....	35
3.3.1. Organische und anorganische Knochenanteile	35
3.3.2. Phosphatgehalt	36
3.3.3. Calciumgehalt.....	36
3.3.4. Verhältnis von Calcium- und Phosphatgehalt	37
3.3.5. Magnesiumgehalt.....	37
3.4. 3D-Mikro-CT-Analyse.....	38
3.4.1. Weichteilvolumen.....	38
3.4.2. Trabekelvolumen.....	39
3.4.3. Bone Mineral Density vom Trabekelanteil.....	39
3.4.4. Kortikalisvolumen	40
3.4.5. Bone Mineral Density vom Kortikalisanteil.....	40
3.4.7. Knochenvolumenanteil (Bone volume fraction).....	41
3.4.8. Gesamte Bone Mineral Density	41
3.5. 2D-Analyse.....	42
3.5.1. Kortikalisfläche	42
3.5.2. Kortikalisdicke dorsal und ventral in mm	43
3.5.3. Kortikalisdichte.....	44
3.5.4. Trabekelfläche.....	44
3.5.5. Mittlere Trabekeldicke	45
3.5.6. Trabekeldichte.....	45
3.5.7. Dichte der Trabekelkreuzungen.....	46
3.5.8. Anzahl der Trabekelkreuzungen	46
4. Diskussion	47
4.1. Die ovariektomierte Ratte als Osteoporosemodell.....	47

4.2. Analyse der biomechanischen Knocheneigenschaften.....	48
4.3. Analyse der chemischen Knochenzusammensetzung und Knochenmarker im Serum	49
4.4. Analyse der Knochenstruktur.....	50
4.5. Schlussfolgerung.....	53
5. Zusammenfassung	54
6. Anhang.....	56
7. Literaturverzeichnis.....	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: chemische Formel von (\pm) -1(1-Benzo[b]thien-2-ylethyl)-1-hydroxyurea.....	13
Abbildung 2: Ligierung der Tuba uterinae	15
Abbildung 3: Veränderte Haltung des Wirbelkörpers.....	18
Abbildung 4: Zwick-Test-Maschine	18
Abbildung 5: Histogramm: a= Luft; b=Weichteil; c=Trabekel; d=Kortikalis.....	25
Abbildung 6: 3D-Wirbeldarstellung in kranial-kaudaler Position mit 5-Kammer-Phantom	26
Abbildung 7: sagitales 2D-Schnittbild eines Wirbelkörpers	26
Abbildung 8: Manuelle Markierung der dorsalen und ventralen Kortikalisfläche	27
Abbildung 9: Manuelle Markierung der Trabekelfläche.....	27
Abbildung 10: Verlauf der Futteraufnahme in g/Ratte/Tag.....	29
Abbildung 11: Abbildung 11: Alkalische Phosphatase im Serum in U/l.....	30
Abbildung 12: Osteocalcin im Serum in ng/ml	30
Abbildung 13: Ca im Serum in mmol/l.....	31
Abbildung 14: Mg im Serum in mmol/l.....	31
Abbildung 15: Phosphor im Serum in mmol/l.....	31
Abbildung 16: Elastizität in N.....	32
Abbildung 17: Ergebnisse Messparameter „Yield Load“ in N.....	33
Abbildung 18: Ergebnisse Messparameter „Fmax“ in N.....	34
Abbildung 19: Ergebnisse Messparameter „organische Substanz“ in %	35
Abbildung 20: Ergebnisse Messparameter „anorganische Substanz“ in %	35
Abbildung 21: PO ₄ -Gehalt in %	36
Abbildung 22: Ca-Gehalt in %.....	36
Abbildung 23: c(Ca)/c(PO ₄).....	37
Abbildung 24: Mg-Gehalt in %.....	37
Abbildung 25: Weichteil Volumen in mm ³	38
Abbildung 26: Trabekel Volumen in mm ³	39
Abbildung 27: Trabekel BMD in g/cm ³	39
Abbildung 28: Kortikalis Volumen in mm ³	40
Abbildung 29: Kortikalis BMD in g/cm ³	40
Abbildung 30: Knochenvolumenanteil in %	41
Abbildung 31: Kortikalisfläche in mm ²	42
Abbildung 32: Gesamt-BMD in g/cm ³	42
Abbildung 33: Kortikalisdicke dorsal in mm	43
Abbildung 34: Kortikalisdicke ventral in mm.....	44
Abbildung 35: Kortikalisdichte in %.....	44
Abbildung 36: Trabekelfläche in mm ²	45
Abbildung 37: mittlere Trabekeldicke in mm	45

Abbildung 38: Trabekeldichte	45
Abbildung 39: Dichte der Trabekelkreuzungen in n/mm^2	45
Abbildung 40: Anzahl der Trabekelkreuzungen in N.Nd.....	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppendarstellung und Behandlung der Ratten	15
Tabelle 2: durchschnittliche Schwellenwerte für Weichteilgewebe, Trabekel und Kortikalis.....	22
Tabelle 3: Körpergewicht zu Versuchsbeginn/Behandlungsbeginn/Tötung und Uterusgewicht bei Tötung in g \pm Standardfehler	27
Tabelle 4: Dosisaufnahme von Zileuton über das Futter in mg/kg KG \pm Standardabweichung	28
Tabelle A1: Ergebnisse des Kompressionstests: Mittelwert \pm Standardfehler	54
Tabelle A2: Ergebnisse der Serumanalyse: Mittelwert \pm Standardfehler	54
Tabelle A3: Ergebnisse der Veraschung: Mittelwert \pm Standardfehler	55
Tabelle A4: Ergebnisse der 3D-Analyse: Mittelwert \pm Standardfehler	55
Tabelle A5: Ergebnisse der 2D-Analyse: Mittelwert \pm Standardfehler	56

Abkürzungsverzeichnis

BMD	<i>bone mineral density</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BV/TV	<i>bone volume/ tissue volume</i>
CBFA	<i>core-binding factor alpha</i>
CSF	<i>colony-stimulating factor</i>
CT	Computertomographie
CYP1A2	Cytochrom P450 1A2
CYP2C9	Cytochrom P450 2C9
CYP3A	Cytochrom P450 3A
DVO	Dachverband Osteologie e.V.
DXA	Dual Energy X-Ray Absorptiometrie
HU	Hounsfield-Skala
i. d. R.	in der Regel
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
IOF	International Osteoporosis Foundation
KG	Körpergewicht
M.	Morbus
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
NON-OVX	<i>non-ovariectomized rats</i> , nicht ovariektomiert
OPG	Osteoprotegrin
OVX	ovariektomiert, Ovariektomie
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PTH	Parathormon
RANKL	<i>receptor activator of NF-κB ligand</i>
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i> , Wachstumsfaktor beta
TNF- α	<i>tumor necrosis factor alpha</i> , Tumornekrosefaktor alpha
u. a.	unter anderem
USA	<i>United States of America</i>
VEGF	<i>vascular endothelial factor</i> , vaskulärer endothelial Wachstumsfaktor
WHO	World Health Organization
WNT	<i>wingless type and integration 1</i>
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Einleitung und Fragestellung

Laut der Weltgesundheitsorganisation gehört die Osteoporose mit einer Prävalenz von ca. 15% bei postmenopausalen Frauen ab 50 Jahren zu den zehn häufigsten Volkserkrankungen (WHO 1994). Sie ist definiert als eine „Krankheit, die durch Verlust an Knochenmasse und Zerstörung der Mikroarchitektur der Knochen mit Folge eines Frakturrisikos charakterisiert ist“ (Minne et al. 2002).

Die klinische Manifestation der Osteoporose tritt in der Regel erst spät in Form von Frakturen auf. Damit verbunden ist eine Minderung der Lebensqualität und Mobilität. In einigen kontrollierten Studien zeigte sich ein erhöhtes Mortalitätsrisiko, das sich sowohl auf die Immobilität als auch auf die Multimorbidität begründet (Ismail et al. 1998).

In Deutschland leben mehr als 6 Mio. Patienten (>50. Lebensjahr) mit Osteoporose (Hadji et al. 2013). Spätkomplikationen, wie Wirbelkörperfrakturen, betragen bei Frauen in Deutschland bei ca. 2 Mio. und treten im Mittel gehäuft 5 – 10 Jahre nach Eintritt der Menopause ein. Patienten mit Oberschenkelhalsfrakturen sind im Mittel älter, liegen jedoch bei 180.000 Patienten jährlich. Der starke Anstieg der Oberschenkelhalsbrüche liegt bei der Frau jenseits des 70. Lebensjahres. Trotz der hohen Anzahl an betroffenen Patienten erhalten 8 von 10 Frauen im 1. Jahr nach einer osteoporotischen Fraktur keine osteoporotische Therapie (Hadji et al. 2013).

Laut der Gesellschaft für Unfallchirurgie liegt der Bedarf an Krankenhausbetten bei Patienten mit Schenkelhalsfrakturen an zweiter Stelle nach kardiovaskulärem Versagen und ist dreimal so hoch wie der Bedarf bei Myokardinfarkten (Minne et al. 2002). Es werden durchschnittlich 12 Monate nach dem Ereignis 15.000 – 20.000 € für die Akutbehandlung, Rehabilitation sowie für die Pflege berechnet. Gesundheitsökonomisch bedeutet dies bei ca. 180.000 Oberschenkelhalsfrakturen in Deutschland Kosten von ca. 2,3 Mrd. € (Minne et al. 2002). In Deutschland werden weniger als 5% des Betrages, der für die Therapie eingetretener Frakturen bereitgestellt wird für Prävention investiert (IOF 2018).

Zur Osteoporosetherapie stehen sowohl wirksame pharmakologische, wie beispielsweise Bisphosphonate, selektive Östrogen-Rezeptor- Modulatoren, Parathormon und Denosumab, als auch nichtpharmakologische Maßnahmen, wie die körperliche Aktivität, Vermeidung und Verminderung des Sturzrisikos und eine ausgewogene Ernährung, zur Verfügung (DVO 2017). Zusammen mit den schmerzlindernden Maßnahmen decken sie weitestgehend die Behandlung der Osteoporose ab. Hierbei spielen die endokrinologischen als auch die rheumatischen Aspekte eine große Rolle (DVO 2017).

Mit dem Alter nimmt die Interleukin-vermittelte adipozytäre Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen der Osteoblasten sowie die Osteoklasteninduktion zu, die zu einer Abnahme der Knochendichte führen (Danks et al. 2013). Erkrankungen, die zu einer Zunahme von Interleukinen führen, wirken sich daher negativ auf die Osteopenie aus (Fekih et al. 2013). Bei der postmenopausalen Frau kommt es durch den Hormonmangel unter anderem zu einer vermehrten Zytokinexpression. Del Fattore et al., 2013 und Park et al., 2013 konnten den negativen Einfluss

von IL-6 im Zusammenhang mit der Knochendichte zeigen, welcher durch den Einsatz von Alendronat und Calcitriol aufgehoben werden konnte. In einigen Studien wurde eine Verbesserung des Knochengewebes durch eine Lipoxigenasehemmung dargestellt, welches auf die Hemmung der Osteoklastenbildung begründet ist (Klein 2004; Kang et al. 2015). Zudem kam es zu einer beschleunigten Knochenbildung im Rattenmodell (Cottrell und O'Connor 2009). Bei Knock-Out-Mäusen zur Bildung von freier Arachidonsäure durch 5-Lipoxygenasen kam es zu einer erhöhten kortikalen Knochendicke und einem verminderten Knochenverlust nach Ovariectomie im Vergleich zur Kontrollgruppe (Bonewald et al. 1997). Darüberhinaus stimulierten 5-Lipoxygenasemetaboliten die Osteoklastenaktivität und -differenzierung (Gallwitz et al. 1993). Im Gegensatz dazu unterdrückte eine Hemmung der 5-Lipoxygenase die RANKL-induzierte Osteoklastenbildung in vitro und den Knochenverlust in vivo (Lee et al. 2012).

Zileuton ist ein selektiver 5-Lipoxygenaseinhibitor, welches zur Zeit in den USA als Therapeutikum (Zyflo®, Cornerstone Therapeutics Incorporated Cary, North Carolina, USA) bei Asthma bronchiale eingesetzt wird. Eine antiinflammatorische, neuroprotektive, sowie antikanzerogene Wirkung wurde vorbeschrieben (Berger et al. 2007). Insbesondere wurde Zileuton eine positive Rolle bei der Behandlung von entzündlichen Darmerkrankungen, rheumatoider Arthritis und Psoriasis zugesprochen (Singh et al. 2004). Beim Einsatz des Medikamentes kam es zudem zu einer verringerten Knochenresorption im Tiermodell (Moura et al. 2014).

Ziel dieser Arbeit war daher, den Effekt von Zileuton auf die osteoporotischen Knochen in einem ovariectomierten Rattenmodell zu evaluieren. Dazu wurden den Ratten oral im Futter in verschiedenen Dosierungen Zileuton appliziert und die Lendenwirbelkörper der Tiere untersucht. Die Stabilität wurde durch einen biomechanischen Kompressionstest untersucht. Außerdem sollten die anorganischen Knochenanteile sowie der Gehalt an Calcium, Phosphat und Magnesium bestimmt werden. Weiterhin wurde die Knochenstruktur anhand einer Computertomographie untersucht.

1.2. Grundlagen

1.2.1. Knochen

Knochen ist ein dynamisches Organ mit verschiedenen wichtigen Aufgaben. Er beinhaltet die Funktion des Stütz- und Fortbewegungsorgans und bildet zusammen mit den Muskeln, Gelenken und Sehnen das Gerüst des Bewegungsapparates. Im Knochenmark-System findet außerdem die Hämatopoese statt (Dörner und Deufel 2013). Der Knochen ist das größte Mineralreservoir des menschlichen Körpers. 99% des Kalziums, 85% des Phosphats und 50% des Magnesiums sind im Knochen gespeichert (Bartl et al. 2006).

Der Knochen besteht aus einer elastischen Knochenmatrix aus schichtartig angeordneten Kollagenmolekülen und einer Einlagerung von kristallinem Kalzium und Phosphat. Der Knochen besteht ca. 40 – 45% aus Mineralien, 10 – 15% sind zelluläre Knochenmarkbestandteile und Wasser sowie 40 – 45% organisches Material (Freyschmidt 2008). Die organischen Anteile setzen sich etwa 90% aus Kollagenen Typ I und 10% aus nichtkollagenen Proteinen (z.B. Fibronectin, Laminin, Osteonectin und Osteokalzin, „bone morphogenetic factor“) zusammen (Freyschmidt 2008). So

werden die zwei Aufgaben von Elastizität und Belastbarkeit erfüllt. Durch Spurenelemente, Wasser und Mucopolysaccharide werden die Kollagenketten mit den Kristallen fest verbunden. Eine Tripelhelix aus den Aminosäuren Glyzerin, Prolin und Hydroxyprolin bildet die Grundstruktur des Kollagens (Freyschmidt 2008). Zwischen jeweils 5 Tripelhelices, welches ich zusammen zu Subfibrillen lagern, entwickeln sich Mineralkeime, die sich zu Apatitkristallen (hauptsächlich Hydroxyapatit) formieren (Freyschmidt 2008).

Makroskopisch besteht der Knochen aus der Kompakta, bestehend aus der Kortikalis, und der Spongiosa, welche aus trabekulärem Knochen gebildet wird (Schiebler et al. 1996). 8 kg der Gesamtmasse des normales Skeletts besteht aus kompaktem Knochen, nur 2 kg wird aus Spongiosa gebildet, jedoch mit einer 10-fach größeren Oberfläche (Bartl et al. 2006).

1.2.2. Osteoblasten

Osteoblasten differenzieren sich aus mesenchymalen Stammzellen. Mikroskopisch können sie eine spindel- und sternförmige Morphologie sowie Kolonien vom Fibroblastentyp bilden. Charakteristisch besitzen sie die Fähigkeit zur Mineralisation von sezernierter Extrazellulärmatrix, die mittels Färbemethoden histologisch darstellbar und somit von Fibroblasten unterscheidbar gemacht wird (Bartl et al. 2014).

Während der Skelettentwicklung und des Skelettaufbaus steuern Osteoblasten das Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau durch die Bildung verschiedener Zytokine, u. a. Interleukin-1, -6, -11 (IL-1, -6, -11), Plättchenwachstumsfaktor (PDGF), Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Transforming growth factor- β (TGF- β), Insulinlike growth factor-I und -II (IGF-I und -II), Macrophage colony stimulating factor (CSF-1) und einen Osteoklastenliganden, den Osteoprotegerin-Ligand (Löffler 2007). Stimulierend auf die Proliferation der Osteoblasten und die Osteoidbildung wirken TGF- β , PDGF und IGF-I und -II. Auf den Osteoblasten sind Rezeptoren für das Parathormon (PTH), Calcitriol (1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃) und Retinsäure (Löffler 2007). Langfristig wirkt hauptsächlich PTH inhibierend auf die Osteoidsynthese, der Osteoblastendifferenzierung und -proliferation. Calcitriol stimuliert hingegen die Osteoblastenaktivität und Retinsäure die Osteoblastendifferenzierung (Drenckhahn et al. 2008).

1.2.3. Osteoprogenitorzellen

Im Knochengewebe sind multipotente Progenitorzellen enthalten, welche sich weiter zu Osteoblasten und Chondroblasten differenzieren können. Die Knochenbildung wird dann durch verschiedene Faktoren, u.a. die Bone morphogenetic proteins (BMP -2, -4, -6, -7) induziert (Löffler 2007). Diese liegen gebunden in der Knochenmatrix vor. Durch den Einfluss der BMPs können sich multipotente Stromazellen zu Progenitorzellen oder zu Präosteoblasten differenzieren, die vor allem in Knochenmark, Endost und Periost vorkommen. Für die Differenzierung der Vorgängerzellen zu Osteoblasten ist die Aktivierung vom Transkriptionsfaktor Core-Binding Factor Alpha (CBFA-1) notwendig (Drenckhahn et al. 2008).

1.2.4. Osteoklasten

Osteoklasten differenzieren sich aus den Vorläuferzellen der Makrophagen und führen durch den Abbau von Knochensubstanz zu einem Umbau des Knochens. Durch die Fusion von einkernigen makrophagen-ähnlichen Vorläuferzellen entstehen die reifen, mehrkernigen Osteoklasten (Löffler 2007).

Reguliert werden die Proliferation sowie die Differenzierung durch den Wachstumsfaktor M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), der durch Osteoblasten gebildet wird oder aus dem Blut zum Knochen gelangt. Durch den zwingend notwendigen, direkten Kontakt von Osteoblasten mit Osteoklasten ist der Knochenauf- und -abbau miteinander gekoppelt und verhindert einen überschießenden Knochenabbau (Löffler 2007). Hierbei wird durch die Bindung an den Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL), welche direkt in der Cytoplasmamembran der Osteoblasten verankert ist, die Osteoklastenprogenitoren aktiviert (Löffler 2007). Diese führen zu einer Differenzierung und somit zu einer Erhöhung der Osteoklasten (Kim et al. 2016).

Bei der Bindung vom Antagonisten Osteoprotegrin (OPG) wird RANKL inaktiviert und somit die Osteoklastenbildung gehemmt (Boyce et al. 2007). Kommt es bei der postmenopausalen Osteoporose zu einem Ungleichgewicht des OPG/RANKL-Systems, erhöht sich der Anteil an RANKL sowie an Osteoklasten (McClung 2007).

Eine Aktivierung der Osteoklasten erfolgt unter anderem auch über Interleukine sowie TNF- α (Greenfield et al. 1999).

1.2.5. Knochenbildung

Bei der Geburt sind nur wenige Knochenteile fertig mineralisiert angelegt und werden im Laufe des Lebens aus Knorpel und Bindegewebe in feste Knochenteile umgewandelt. In der Pubertät wird mit der Verknöcherung der Wachstumsfuge das Knochenwachstum, welches auch als „modelling“ bezeichnet wird, abgeschlossen (Hattner et al. 1965).

Mit der Zeit verliert der Knochen durch vermehrtem Mineralienverlust und Matrixalterung an Elastizität und Festigkeit und wird vermehrt brüchig. Durch die Fähigkeit des Materialaustausches

und des Knochenumbaus kommt es sowohl zu einer Anpassung an die Alterung und einem Gesamtaustausch als auch zur Revision von kleinen Mikrofrakturen. Dies wird als „remodelling“ bezeichnet (Langdahl et al. 2016).

Im Wachstum, nach Frakturen und bei pathologischer Verknöcherung gibt es zwei Arten der Knochenbildung, die enchondrale und desmale Ossifikation.

Bei der desmalen Ossifikation differenzieren sich direkt aus mesenchymalen Zellen Osteoblasten, die zunächst Osteoid bilden, welches danach verkalkt. Die Osteoblasten werden von der verkalkten Substanz ummauert und bleiben durch Fortsätze miteinander verbunden. Die desmale Ossifikation kommt in den flachen Schädel- und Gesichtsknochen, sowie im mittleren Teil der Clavicula vor. Physiologisch findet sie bei schnellen Knochenbildungen, wie z. B. in Knochengeschwülsten, tumorähnlichen Läsionen, Frakturheilungen oder Hyperparathyreodismus, statt (Schiebler et al. 1996).

Häufiger ist die enchondrale Ossifikation. Dabei differenzieren sich aus Mesenchymalzellen direkt Osteoblasten am Perichondrium als auch Chondroblasten. Diese Knorpelanlagen vergrößern sich zunächst durch Zellteilung und perichondralem Knorpelanbau (Löffler 2007). Durch die Hypertrophierung wechselt die Synthese von Kollagen Typ II in Kollagen Typ X. Über die Ausschüttung vom vascular endothelial growth factor (VEGF) folgt eine Vaskularisierung der Matrix und ein Eindringen von Osteoblasten-Progenitorzellen, die eine Ossifikation einleiten (Schiebler et al. 1996).

Die Regulierung der Osteogenese erfolgt über zwei Gruppen. Zum einen über „Schlüsseltranskriptionsfaktoren“, die eine Differenzierung zu Osteoblasten bewirken, und zum anderen parakrine Wachstumsfaktoren und Hormone (Löffler 2007).

1.2.6. Knochenabbau

Im ersten Schritt des Knochenabbaus binden Osteoklasten an der Knochenoberfläche und führen dadurch zu einer Polarisierung der Zelle (Löffler 2007). Die resorbierende Oberfläche wird durch eine bestimmte Faltung der Plasmamembran vergrößert und bildet so ein isoliertes extrazelluläres Kompartiment. Durch eine pH-Erniedrigung findet zunächst der Abbau anorganischer Substanzen statt. Danach erfolgt der Abbau der entmineralisierten Knochenmatrix durch lysosomale Proteasen.

Gleichzeitig sezernieren Osteoblasten in der entmineralisierten Knochenmatrix im Rahmen des Remodellings kollagenes Osteoid ab. Neu- und Abbau des Knochens verlaufen meist zusammen ab (Löffler 2007).

1.3. Osteoporose

1.3.1. Definition

„Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine mikroarchitektonische Verschlechterung des Knochengewebes charakterisiert ist, mit einem konsekutiven Anstieg der Knochenfragilität und der Neigung zu Frakturen. Sind bereits Frakturen als Folge der Osteoporose aufgetreten, liegt eine manifeste Osteoporose vor.“ (DVO 2014)

1.3.2. Epidemiologie

Laut einigen umfangreichen epidemiologischen Untersuchungen lebten in Deutschland mehr als 6,3 Mio. von Osteoporose betroffene Frauen und Männer nach dem 50. Lebensjahr im Jahr 2009 (Hadji et al. 2013).

Wirbelkörperfrakturen, eine Form der Spätkomplikation, sind bei ca. 2 Mio. Frauen und ca. 800.000 Männern in Deutschland aufgetreten, wobei jährlich ca. 200.000 Fälle hinzukommen (Minne et al. 2002). Diese treten 5 – 10 Jahre nach Eintritt der Menopause auf. Oberschenkelhalsfrakturen liegen bei ca. 130.000 Patienten pro Jahr, die deutlich älter sind als Patienten mit Wirbelkörperfrakturen (Wildner und Clark 2001). Da der starke Anstieg des Risikos für eine Oberschenkelhalsfraktur bei Frauen ab dem 70. Lebensjahr liegt, werden in Ländern, in denen die mittlere Lebenserwartung bei ca. 70 Jahren liegt, intensiv Programme zur Frühdiagnostik und Prävention entwickelt (Minne et al. 2002).

1.3.3. Einteilung

Die Einteilung der Osteoporose kann anhand verschiedener Gesichtspunkte erfolgen:

1.3.3.1. Einteilung anhand der Ausdehnung

Dabei unterscheidet man die Osteoporose-Formen nach dem Befallsmuster des Skelettsystems zwischen lokalisiert und generalisiert.

Die lokalisierte Form, meist asymmetrisch, tritt seltener als die generalisierte Form auf. Dazu gehört u. a. der Morbus Sudeck, die gelenknahe Osteoporose bei chronischer Polyarthritits und Periarteritis nodosa und die lokale Inaktivitätsosteoporose bei Immobilität an den Extremitäten (Ringe et al. 1991).

Die generalisierte Form zeigt stets ein symmetrisches Muster, aber betrifft nur selten das homogene Gesamtskelett. Die Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie (1988) unterteilt diese Form weiter in eine Typ I- und eine Typ II- generalisierte Osteoporose (Freyschmidt et al. 2008).

Typ I zeigt sich in einem spongiosabetonten Knochenmassenverlust mit einer Manifestation am Skelettstamm durch eine Wirbelkörperfraktur (z.B. bei der postmenopausalen Osteoporose).

Typ II betrifft sowohl die Spongiosa als auch die Kompakta, manifestiert sich aber eher in den langen Röhrenknochen durch Schenkelhalsfrakturen und Radiusfrakturen (z. B. senile Osteoporose).

1.3.3.2. Einteilung nach Knochenumsatz

Hierbei unterscheidet man zwischen einem low-turnover, niedriger Knochenumsatz, und der high-turnover Osteoporose, hoher Knochenumsatz. Zur Unterscheidung dienen die biochemischen „Knochenmarker“ sowie in einigen ausgesuchten Fällen eine Knochenbiopsie (Bartl et al. 2006).

Bei einem besonders ausgeprägten Knochenabbau im Rahmen einer Osteoporose wird diese als „very high turnover“ oder „fast looser“ bezeichnet.

1.3.3.3. Einteilung nach Alter und Geschlecht

Man unterscheidet hier zwischen der juvenilen, postmenopausalen oder senilen Form sowie einer idiopathischen Osteoporose bei jungen Erwachsenen.

Die idiopathische juvenile Osteoporose ist eine selbstlimitierende Erkrankung in der Präpubertät, die sich zwischen dem 8. – 14. Lebensjahr manifestiert. Sie tritt häufig in Form von Kompressionsfrakturen der Wirbelsäule oder sehr ausgeprägten Rückenschmerzen auf (Dent und Friedman 1965).

Die idiopathische Osteoporose bei jungen Erwachsenen tritt meist bei jungen Männern zwischen 30 und 50 Jahren auf. Laborchemisch und in der Knochenbiopsie zeigen sich Anzeichen auf einen erhöhten Knochenabbau. Klinisch treten im Achsenskelett Wirbelkörperfrakturen auf (Yoshikawa 1994).

Die häufigste Form ist die postmenopausale Osteoporose (Typ I), die jedoch schon vor dem kompletten Funktionsverlust der Ovarien eintritt. Sie tritt zwischen dem 51. – 75. Lebensjahr auf und wird durch die verminderte Hormonproduktion verstärkt.

Die postmenopausale Form geht meist stufenlos in die senile Form über und ist mit dem normalen Alterungsprozess und der erhöhten Osteoklastenfunktion verbunden. Sie tritt ab dem 70. Lebensjahr auf und tritt klinisch auch in kortikalen Knochen in Form von Schenkelhals-, Radius- und Beckenfrakturen auf (Bartl et al. 2004).

1.3.3.4. Einteilung nach Ätiologie

Diese Einteilung unterscheidet zwischen den primären und den sekundären Formen. Dabei werden zu der primären Form die postmenopausale (Typ I) sowie die senile (Typ II) Osteoporose gezählt.

Die postmenopausale Form entsteht durch den Östrogenmangel in der Menopause und betrifft nur Frauen, während die senile Form Männer und Frauen gleich aufgrund der Abnahme der Knochendichte mit zunehmenden Alter betreffen (Glaser und Kaplan 1997).

Die sekundäre Osteoporose hängt mit multiplen Faktoren und Grunderkrankungen zusammen und macht ca. 5% aller Osteoporoseerkrankungen aus, verursacht jedoch 20% aller osteoporosebedingten Frakturen (Bartl et al. 2006). Sie tritt häufiger bei Männern auf. Bei der sekundären Form unterscheidet man zwischen der endokrinen, hämatologischen, myogenen, onkologischen, hepatischen, gastroenterologischen, nephrologischen, immunologischen, kardiopulmonologischen, medikamentös-toxischen und genetischen Form (Bartl et al. 2006).

1.3.3.5. Einteilung nach dem Schweregrad

Die Einteilung nach dem Schweregrad hat vor allem im klinischen Alltag eine große Relevanz. Sie dient der Einschätzung der Dringlichkeit eines Therapiebeginns, hilft bei der Entscheidung für eine Behandlungsstrategie und dem darauffolgendem Therapieerfolg. Die Beurteilung der Knochenqualität erfolgt anhand der Knochendichtemessung und dem Vorliegen von Frakturen.

Die WHO hat 1997 sich für die Auswertung auf die Abweichung der Knochendichte um die jeweilige Standardabweichung (SD) vom Bezugswert, dem Mittelwert der maximalen Knochendichte (T-Score) bezogen (Kanis 1994). Als maximale Knochendichte wird die Knochendichte einer 30-jährigen prämenopausalen, knochengesunden Frau festgelegt.

Der Z-Score gibt Anhalt, ob eine Osteoporose therapiert werden muss und wird aus der Standardabweichung vom Mittelwert gemessener Knochendichte einer Altersgruppe berechnet (Eastell 1998).

Nach der WHO-Einteilung ergibt sich daraus, dass ein Normalbefund bei $SD \geq -1$, eine Osteopenie (Grad 0) bei $SD = -1$ bis -2.5 und eine Osteoporose (Grad 1) bei $SD < -2.5$ vorliegt. Eine manifeste Osteoporose (Grad 2) liegt vor, wenn die Standardabweichung im osteoporotischen Bereich liegt und 1 bis 3 Wirbelkörperfrakturen radiologisch festgestellt wurden. Bei einer fortgeschrittenen Osteoporose (Grad 3) ist der $SD < -2.5$ und es sind zusätzlich multiple Wirbelkörperfrakturen mit oftmals extraspinalen Frakturen vorhanden. Die Einteilung gilt auch für Frakturen im proximalen Femur (WHO 1994).

1.3.4. Diagnostik

Zur Diagnosenstellung einer Osteoporose spielt neben dem Vorliegen von Risikofaktoren die Knochendichtemessung eine wichtige Rolle. Dabei ist auch wichtig zu klären, wie viel Knochenmasse aktuell vorliegt, wie hoch der Knochenverlust ist, ob reversible oder irreversible körperliche Schäden oder Grunderkrankungen vorliegen (DVO 2017).

1.3.4.1. Symptome

Die Osteoporose beginnt häufig still und symptomlos. Oft wird sie erst nach Auftreten von starken Rückenschmerzen aufgrund einer Wirbelkörperfraktur diagnostiziert. Dabei ist zu beachten, dass Rückenschmerzen als eine der häufigsten Erkrankungen des Bewegungsapparates beschrieben werden und die dritthäufigste Diagnose in der allgemeinmedizinischen Praxis darstellt (von der Lippe et al. 2021). Entscheidende Hinweise geben anamnestisch die Angaben nach Lokalisation, Beginn, Dauer, Charakter, Intensität sowie Beeinflussbarkeit des Schmerzes. Auch Risikofaktoren wie Familienanamnese, Vorerkrankungen/-operationen, Lebensstil und Dauermedikationen können hier richtungsweisend sein.

Differenzialdiagnostisch müssen viele andere Krankheiten, die mit Rückenschmerzen zusammenhängen könnten wie z.B. Muskelverspannungen, Bandscheibenvorfälle, Knochenmetastasen etc., ausgeschlossen werden (DVO 2017).

Durch die konsekutiven Wirbelkörperfrakturen kommt es zu einem Verlust der Körperhöhe (>4cm) und zu einer vermehrten Brustsäulenkyphose sowie einer verstärkten Hals- und Lendenwirbelsäulenlordose, sodass die Patienten eine gekrümmte Körperhaltung einnehmen. Dabei zeichnen sich charakterischerweise Hautfalten am Rücken bis zu den Flanken („Tannenbaumphänomen“) und ein Vorwölben des Bauches („Osteoporose-Bäuchlein“) aus. Durch den Höhenverlust kommt es zu einem sogenannten „Baastrup-Zeichen“, die eine schmerzhaft Berührung der Wirbeldornfortsätze beschreibt. Bei langer Fehlbelastung kann sich zusätzlich eine Gonarthrose beider Knie entwickeln (Baum und Peters 2009).

1.3.4.2. Bildgebende Untersuchungen

Die konventionelle Röntgenaufnahme kann eine Osteopenie erst bei einem Substanzverlust von 30 – 40% sicher nachweisen, weswegen diese Untersuchung für eine Früherkennung der Osteoporose ungeeignet ist (Bartl und Bartl 2021). Dennoch kann sie bei einigen Kriterien für eine Osteoporose sprechen. Bei abgelaufenen Frakturen sowie zur Abklärung von sekundären Osteoporosen kann sie sinnvoll sein. Röntgenologische Kriterien, die das Vorliegen einer Osteoporose wahrscheinlich machen, sind eine erhöhte Strahlendurchlässigkeit, die Betonung vertikaler Knochenbälkchen, der Einbruch und die Verdünnung der vertebralen Endplatten sowie der Nachweis von Kompressionsfrakturen (Bartl et al. 2006). Durch die Röntgenaufnahmen kann zusätzlich eine Morphometrie, auch morphometric X-ray absorptiometry genannt, angefertigt werden. Dabei werden die Größe und Konturen der Brust- und Lendenwirbelkörper analysiert und vermessen, um das Ausmaß eines Wirbelkörperbruchs bzw. einer Kompressionsfraktur darzustellen (Felsenberg et al. 1998).

Durch eine Skelettszintigraphie können Knochenläsionen und Frakturen mithilfe von ^{99m}Tc -markierten Bisphosphonaten dargestellt werden (DGN 2013). Hier stellen sich Frakturen, aber auch degenerative, entzündliche oder neoplastische Läsionen durch eine Mehranreicherung dar.

Die Magnetresonanztomographie ist die Methode der Wahl zur Darstellung von tumorösen,

malignen oder ödematös entzündlichen Knochenmarkprozessen. Durch die Applikation von Kontrastmittel können sich Darstellungsqualität sowie diagnostische Aussagekraft zusätzlich verbessern. Da sie frei von Strahlenbelastung durchgeführt wird, kann sie eine gute Alternative zur Computertomographie sein (Bartl et al. 2006).

Die beste Methode zur Früherkennung des trabekulären Knochenverlustes an der Wirbelsäule ist zurzeit die quantitative Computertomographie. Da sie eine getrennte Messung von spongiösem und kortikalem Knochen erlaubt, ist sie vor allem bei ausgeprägten degenerativen Veränderungen der Wirbelsäule sinnvoll – ist jedoch durch die hohe Strahlenbelastung für häufige Kontrollmessungen ungeeignet (DVO 2017).

Eine international etablierte und weltweit als Goldstandard angesehene Methode stellt die DXA-Methode, auch dual energy X-ray absorptiometry genannt, dar. Dabei wird der Körper mit zwei Energiestrahlen unterschiedlicher Spannungen bestrahlt und anhand einer Messung der verschiedenen Strahlen kann der Absorptionsanteil der Weichteile sowie die Knochendichte errechnet werden (Blake und Fogelman 2007). Die Messung wird an der Lendenwirbelsäule sowie beidseitig an der Hüfte durchgeführt. Diese Methode ist aufgrund der guten Messgenauigkeit, der geringen Strahlenbelastung und des geringen Preises, die schnellste und in großen Therapiestudien häufigste angewandte Methode. Sie wird von der WHO sowie der DVO anerkannt und zur Diagnosestellung empfohlen (Baum und Peters 2009; DVO 2017).

1.3.5. Therapie

Laut der DVO-Leitlinie werden körperliche Aktivität, Vermeidung sowie Verringern des Sturzrisikos, ausgewogene Ernährung mit zusätzlich 1000 mg Kalzium täglich, 800 – 1000 IE Vitamin D3 täglich, Vitamin B12 und Folsäure, eine Lebensstiländerung mit absoluter Nikotinkarenz sowie einer regelmäßigen Überprüfung mit ggf. Umstellung der täglichen Medikation zur allgemeinen Prophylaxe empfohlen (DVO 2017).

Eine Indikation zur medikamentösen Therapie stellt sich bei Patienten mit niedrigtraumatischen Wirbelkörperfrakturen bei DXA T-Score < -2.0 , wenn andere Ursachen unwahrscheinlicher sind, oder bei bestehender oder geplanter oraler Glukokortikoidtherapie $\geq 7,5$ mg Prednisolonäquivalent täglich für > 3 Monate und zusätzlich niedrigtraumatischen Wirbelkörperfrakturen oder multiplen peripheren Frakturen oder bei Patienten mit einem hohen 10-Jahresfrakturrisiko (DVO 2017).

Die besten Therapiemöglichkeiten sind für postmenopausale Frauen mit Bisphosphonate, z. B. Alendronat, Ibandronat, Zoledronat oder Risedronat, selektive Östrogenrezeptor- Modulatoren (SERM) wie Bazedoxifen oder Raloxifen, monoklonalen Antikörpern wie Denosumab, Östrogene oder Parathormon in Form von Teriparatid beschrieben (DVO 2017). Alle Substanzen wiesen eine Frakturreduktion von 3-5 Jahren nach. Für Östrogene sowie Teriparatid bestehen Zulassungsbeschränkungen. Eine Behandlung mit Östrogenen ist nur bei postmenopausalen Frauen zugelassen, die für die anderen übrigen Substanzen eine Kontraindikation oder Unverträglichkeit aufweisen. Bei nicht hysterektomierten Frauen ist eine zusätzliche Behandlung mit Gestagenen zusammen mit Östrogen obligatorisch. Die Therapiedauer mit Teriparatid ist auf

24 Monate beschränkt (DVO 2017).

Aktuell befinden sich u. a. Kathepsin-K-Inhibitoren in Phase III der klinischen Prüfung. Der Kathepsin-K-Inhibitor Odanacatib hemmt das Enzym Kathepsin K, welches von Osteoklasten zum Abbau der Knochenmatrix exprimiert wird. Odanacatib erhöht die Knochendichte kontinuierlich über 5 Jahre und verbessert dadurch die Knochenstärke (Charpulat et al. 2015).

Seit 2019 ist ein Sklerostin-Antikörper, Romosozumab (Evenity®), für die Therapie der manifesten postmenopausalen Osteoporose zugelassen. Dieser hemmt Sklerostin, ein Inhibitor der Osteoblastendifferenzierung und blockiert den „Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 1“-Signalweg (WNT-Signalweg). Bei der Hemmung des WNT-Signalweges kommt es zu einer gesteigerten Knochenmasse und -dichte (Ominsky et al. 2016). Seit dem 15. März 2020 ist er für diese Indikation auch auf dem deutschen Markt verfügbar.

1.4. 5-Lipoxygenase

Die 5-Lipoxygenase ist ein eisenhaltiges Enzym, welches aus 673 Aminosäuren aufgebaut ist und seine Aktivität durch die intrazelluläre Calcium- sowie Adenosintriphosphatkonzentration reguliert wird (Brash 1999).

Durch die 5-Lipoxygenase entsteht aus der Arachidonsäure eine 5-Hydroperoxy-Eicosatetraensäure, die weiter zu 5-Hydroxy-Eicosatetraensäure oder Leukotrien A₄ umgewandelt wird (Funk 2006).

Leukotriene sind eine Gruppe biologisch aktiver Stoffwechselprodukte der Arachidonsäure, die bei entzündlichen Erkrankungen gebildet werden. Die Arachidonsäure ist in der Zellmembran verestert. Im Rahmen der Zellaktivierung wird diese aus den Membranphospholipiden abgespalten. Die freie Arachidonsäure kann nun über zwei Wege umgebaut werden. Entweder durch die Cyclooxygenase zu Prostaglandine, Thromboxan und Prostacyclin oder durch die 5-Lipoxygenase zu Leukotriene (Chen 2011).

Leukotriene bewirken vor allem bei Asthmatikern eine Bronchokonstriktion der kleinen und großen Bronchien. Die Reaktion ist im Vergleich zu Histamin um das 1000-fache stärker und 4-fache länger. Außerdem bewirkt es eine Hyperreagibilität der Bronchien sowie eine Stimulation der Mukussekretion. Sie steigern die vaskuläre Permeabilität und Plasmaexsudation und führen so zu einer vermehrten Ausbildung von Gewebeödemen. Zusätzlich stimulieren sie die Infiltration der Schleimhaut mit neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (Kroegel et al. 1997).

Darüber hinaus werden weitere entzündliche Reaktionen durch den 5-Lipoxygenase-Stoffwechselweg, wie Rheumatoide Arthritis beschrieben. Bei einem Genverlust der 5-Lipoxygenase kommt es zu einer Veränderung der Knochenmorphologie und zu einer Zunahme der Knochendicke. Dabei stimulieren Leukotriene die Bildung und Aktivität von Osteoklasten. In einigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich bei Mäusen mit ausgeschalteter 5-Lipoxygenase-Aktivität die Anzahl sowie die Aktivität der Osteoklasten verringern (Kang et al. 2015).

1.4.1 Zileuton (Zyflo®)

Zileuton (Zyflo®, Cornerstone Therapeutics Incorporated, Cary, North Carolina, USA) ist ein selektiver 5-Lipoxygenasehemmer und wird bei entzündlichen Erkrankungen eingesetzt. Er hemmt die 5-Lipoxygenase reversibel und verändert das Eisenmolekül des Enzyms an der aktiven

Seite. Es wird jedoch nicht die Freisetzung der Arachidonsäure, der Cyclooxygenase oder der Phospholipase A2, sondern die Produktion von Leukotrien B4 inhibiert (Löffler et al. 2007). Chemisch ist Zileuton Benzothiophen N-hydroxyurea (Abb. 1).

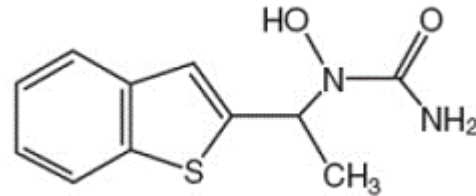


Abbildung 1: chemische Formel von (±)-1-(1-(Benzo[b]thien-2-ylethyl)-1-hydroxyurea

Es ist sowohl als R(+) als auch als S(-)-Enantiomere pharmakologisch aktiv.

Nach der oralen Einnahme wird Zileuton rasch in einer Zeit von $1,7 \pm 0,9$ h und einer maximalen Konzentration von $5,0 \pm 2,0$ µg/ml absorbiert. Im Körper liegt es dann 93% an Proteine, vor allem an Albumin, gebunden vor.

Die Halbwertszeit beträgt 2,5h. Einige Studien mit radioaktiv markierten Substanzen zeigten, dass 94,5% im Urin und 2,2% im Stuhl ausgeschieden werden, davon hauptsächlich in Form von Glucuronid-Konjugate und ein minimaler Teil als N-dehydroxylierter Metabolit oder in unveränderter Form (Berger et al. 2007). In vitro Studien zeigten zusätzlich eine Metabolisierung durch die oxidativen Cytochrom-P45-Isoenzyme CYP1A2, CYP3A und CYP2C9 (Mayer et al. 1996). Vergleiche zwischen nierengesunden und -kranken Patienten ergaben keine wesentlichen Veränderungen der Hämodialyse, sodass eine Dosisanpassung bei Niereninsuffizienz nicht notwendig ist. Es wurden jedoch erhöhte Lebertransaminasen gefunden, sodass Zileuton bei Patienten mit einer aktiven Lebererkrankung oder mit 3-fach erhöhten Lebertransaminasenwerten über der Norm kontraindiziert ist (Cingi et al. 2015).

Interaktionen mit anderen Medikamenten wie Theophyllin sowie Propranolol und Warfarin sind beschrieben. So müssen Theophyllin-Dosen bis zu 50% reduziert und Propranolol sowie Warfarin regelmäßig überprüft und ggf. angepasst werden. Eine signifikante Interaktion mit Prednison, orale Kontrazeptiva, Digoxin, Phenytoin, Sulfasalazin und Naproxen konnte nicht gezeigt werden. Auch bei gleichzeitiger Einnahme mit anderen Asthmamedikamenten kam es bislang zu keinen Komplikationen (Berger et al. 2007).

Gallwitz et al. konnte zeigen, dass 5-Lipoxygenase-Metaboliten die Osteoklasten stimulieren, die in vitro an der Resorption des Knochens beteiligt sind. Durch eine Hemmung der 5-Lipoxygenase wird angenommen, dass der Knochenabbau gehemmt wird, da die Stimulation der Osteoklastenaktivität reduziert wird (Gallwitz et al. 1993).

2. Material und Methoden

2.1. Versuchsablauf

Die Versuchsdauer betrug insgesamt 13 Wochen. Dabei wurden insgesamt 69 weibliche Sprague Dawley Ratten von der Firma Winkelmann Charles River aus Deutschland verwendet. Der Versuch wurde am 30.07.2014 durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit mit dem Aktenzeichen 33.9-42502-04-14/1530 genehmigt.

Unter fachgerechter Pflege und regelmäßigen Kontrollen von Tierpflegern und -ärzten fand die Haltung der Tiere in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) des Universitätsklinikums Göttingen in einem Makrolon IV® Käfig bei 20°C Raumtemperatur und 55% Luftfeuchtigkeit statt.

Bei Versuchsbeginn waren die Tiere 3 Monate alt. Eine Woche nach Ankunft und Gewöhnung wurden die Versuchstiere ovariektomiert bzw. nicht-ovariektomiert belassen.

Nicht ovariektomiert wurden 13 Versuchstiere (Gruppe 1, NON-OVX) und 56 Ratten wurden ovariektomiert. Die ovariektomierten Ratten wurden unterteilt in 13 Tiere ohne Behandlung mit Zileuton (Gruppe 2, OVX), in 14 Tiere in der Gruppe 3, die 1 mg Zileuton pro kg Körpergewicht (1 mg Zileuton/kg KG) erhielten, in 14 Tiere in Gruppe 4, die 10 mg Zileuton pro kg Körpergewicht (10 mg Zileuton/kg KG) erhielten, und in 15 Versuchstiere, die in der Gruppe 5 aufgenommen und 100 mg Zileuton pro kg Körpergewicht erhielten (Tabelle 3). Das Zileuton wurde jeweils über das Futter verabreicht. Die Dosierung von Zileuton ist anhand der Studien von Xu et al. 1993 und Vaananen et al. 1992 ausgesucht worden.

Alle Versuchstiere wurden mit sojafreiem Futter (Ssniff® special diet; GmbH, Soest, Deutschland) gefüttert und haben Wasser erhalten. Zusätzlich wurden die Tiere wöchentlich gewogen.

Die Tibiaosteotomie fand bei allen Tieren in der 9. Versuchswoche statt. Nach der Osteotomie fand die Applikation von Zileuton (Zyflo CR®; Cornerstone Therapeutics Inc., Cary, NC, USA) entsprechend der Gruppenverteilung über das Futter statt. Das Futter wurde wöchentlich gewogen und die einzunehmende Dosierung an Zileuton anhand dessen errechnet.

Nach insgesamt 13 Wochen nach der Ovariektomie wurden die Tiere getötet. Entnommen wurden neben der Lendenwirbelsäule, der Femora und der Tibiae mit ortsständiger Muskulatur. Die Lendenwirbelkörper wurden bis zur Analyse bei -20°C in sauberen Kunststoffgefäßen mit wenigen NaCl-Tropfen gelagert.

Tabelle 1: Gruppendarstellung und Behandlung der Ratten

Gruppennummer	Gruppenbezeichnung	Behandlung
1	NON-OVX	Osteotomie
2	OVX	Ovariectomie + Osteotomie
3	Zileuton 1mg/kg KG	Ovariectomie + Osteotomie + Zileutongabe 1 mg/kg KG ab der Osteotomie bis zur Tötung
4	Zileuton 10 mg/kg KG	Ovariectomie + Osteotomie + Zileutongabe 10 mg/kg KG ab der Osteotomie bis zur Tötung
5	Zileuton 100mg/kg KG	Ovariectomie + Osteotomie + Zileutongabe 100 mg/kg KG ab der Osteotomie bis zur Tötung

2.1.1. Ovariectomie

Die Vollnarkose erfolgte durch eine Kombination Ketamin 62,5 mg/kg KG (Hostaket®; Hoechst, Bad Soden, Deutschland) und Xylazin 7,5 mg/kg KG (Rompun®; Bayer, Leverkusen, Deutschland), welches mit einem Volumen von 0,1 ml/100 g KG intraperitoneal appliziert wurde. Zusätzlich wurde mit Dexpanthenol 50 mg/1g (Corneregel®, Bausch&Lomb, Berlin, Deutschland) ein Austrocknen der Augen vorgebeugt. Nach der Rasur und einer Hautdesinfektion fand die Operation unter sterilen Verhältnissen statt. Dabei wurden die Haut sowie das Peritoneum mittels einer Schere zwischen dem Rippenbogen und Hinterbeinen stumpf präpariert. Nachdem das Ovar dargestellt wurde, wurde die Tuba uterina mit einem Overholdt abgeklemmt und mit einem 5-0 Vicryl-Faden (Eticon Norderstedt, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) ligiert. Dann erfolgte die scharfe Abtrennung des Ovars mittels eines Skalpells. (Abb. 2) Die Tuba uterina wurde wieder in den Bauchraum verlagert und das Peritoneum sowie die Muskeln mit einem 4-0 Vicryl- Faden (Eticon Norderstedt, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Die Haut wurde manuell mit Hautklammern (Michel wound brackets 7,5 × 3 mm, Gebrueder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) verschlossen und zuletzt mit Braunoderm® (Bayer, Leverkusen, Deutschland) desinfiziert.



Abbildung 2: Ligierung der Tuba uterinae

Dies wurde auf der Gegenseite wiederholt. Anschließend wurden die Versuchstiere in einem Käfig, der auf einer Wärmeplatte stand, abgedunkelt bis zum Erwachen überwacht. Postoperativ

erhielten die Tiere zur Aufrechterhaltung des Flüssigkeitshaushaltes 3 ml NaCl subkutan gespritzt. Die Operationstechnik gleicht denen, wie unter anderem in den Dissertationen von Fürst 2014, Weßling 2012 oder Döll 2010 beschrieben.

2.1.2. Tibiaosteotomie

8 Wochen nach Ovariectomie erfolgte die beidseitige Tibiaosteotomie auf der Grundlage von Stürmer et al. 2010 und Komrakova et al. 2018.

Dabei wurden die Versuchstiere wie unter Kapitel 2.1.1 beschrieben mit einem Ketamin- Xylazin-Gemisch vollnarkotisiert und die Haut an der Innenseite der Hinterbeine nach der Desinfektion des Operationsgebietes inzidiert. Anschließend erfolgte unter Schonung der Extensoren und Flexoren eine transversale Tibiaosteotomie auf 0,5 mm mit beidseitiger Plattenosteosynthese. Hierbei wurde die 5-Loch-Leibinger-Titanplatte (57- 05140 XS-Titan-Fixationsplatte T-Form 90°, Stryker Trauma, Selzach, Schweiz) durch 2 proximale und 2 distale Osteotomieschrauben anterior-medial an der Tibia fixiert.

Nach der Osteotomie wurden die Tiere analog zur Ovariectomie bis zum Erwachen auf einer Wärmeplatte abgedunkelt überwacht und erhielten zur Aufrechterhaltung des Flüssigkeitshaushaltes 3 ml NaCl subkutan als Injektion.

Die Versuchstiere erhielten am Operationstag und an den 2 darauffolgenden postoperativen Tagen 1 Mal täglich eine Kombination aus 5 mg/kg KG Rimadyl und 0,075 mg/kg KG Temgesic sowie zusätzlich abends 1 Mal täglich 0,075 mg/kg KG Temgesic als Schmerzprophylaxe.

Die Tibiaosteotomie wird als Mittel für die Untersuchung der Knochenheilung genutzt. Dieses wird im Rahmen einer anderen Arbeit untersucht und ist nur zur Vollständigkeit der Versuchsreihe an dieser Stelle erwähnt (Saul et al. 2017).

2.1.3. Präparation der Lendenwirbelkörper

13 Wochen nach der Ovariectomie erfolgte die Tötung der Tiere durch eine Dekapitation nach einer vollständigen Betäubung durch eine CO₂-Narkose.

Zunächst wurde die Haut über der Wirbelsäule mit einer Schere eröffnet und entfernt. Anschließend wurde die Lendenwirbelsäule durch die Entfernung des Brustkorbes und der sakralen Anteile der Wirbelsäule durch die Entfernung des *Os coxae* separiert.

Da die weiteren Analysen nur anhand der Lendenwirbel erfolgten, wurden die 1. Lendenwirbelkörper thorakal orientierend an der letzten Rippe am Discus intervertebralis und die 6. Lendenwirbelkörper sakral ebenfalls am Discus intervertebralis separiert. Alles erfolgte durch einen transversalen Schnitt mittels eines 15er-Skalpells.

Für die folgenden Untersuchungen wurden die 2. Lendenwirbelkörper zur Volumenmessung und

Veraschung, die 3. Lendenwirbelkörper für den Kompressionstest, die 4. Lendenwirbelkörper für die Mikro-Computertomographie und die 1. und 5. Lendenwirbelkörper als Reserve von Muskeln und Bindegewebe gesäubert und separiert, durchnummeriert einzeln mit einigen NaCl-Tropfen bei -20°C in Kunststoffbehältern gelagert.

2.2. Kompressionstest

2.2.1. Durchführung des Kompressionstests

Gestützt auf die Arbeiten von Schmisch et al. 2009 und die Dissertation von Fürst 2014 wurde die Zwick-Test-Maschine (type 145660 Z020/TND, Zwick/ Roell, Ulm, Deutschland) für den Kompressionstest genutzt. Die Auflage wurde geändert, um ein Abrutschen des Kompressionsbolzens sowie eine instabile Fixierung des Wirbelkörpers als Ganzes zu vermeiden (Abb. 3 und 4).

Dabei wurden zunächst die Disci intervertebralis entfernt und die 3. Lendenwirbelkörper lateral durch zwei verstellbare Schrauben auf der Aluminiumplatte fixiert. Kaudal wurden die Wirbelkörper auf der Aluminiumplatte anliegend fixiert, sodass die Kompressionskräfte zwischen dem Bolzen und der Auflageplatte wirken konnten. Abhängig vom Steigungswinkel der oberen Gelenkfläche wurde ein passender Bolzen ausgesucht und so ausgerichtet, dass bei der Kompression die Kraft longitudinal gleichmäßig verteilt auf dem Wirbelkörper wirken konnte.

Nach der korrekten Ausrichtung der Wirbelkörper wurde die „testXpert“-Software (Zwick/Roell) gestartet. Dabei senkte sich der Stempel auf die Grundplatte des Wirbelkörpers und wirkte mit einer Vorkraft bis zu 1N darauf. Nach der endgültigen Untersuchung der korrekten Position mit ggf. Korrektur komprimierte der Stempel mit einer Geschwindigkeit von 50 mm/min in vertikaler Richtung den Wirbelkörper. Der Messbereich reichte von 2 N bis 500 N bei einer Genauigkeit von 0,2 - 0,4%. Die Software speicherte die Kraft für jede 0,1 mm Absenkung. Nach einer Kraftabsenkung von mehr als 10 N oder einer Kompression von 3 mm wurde der Test automatisch beendet.

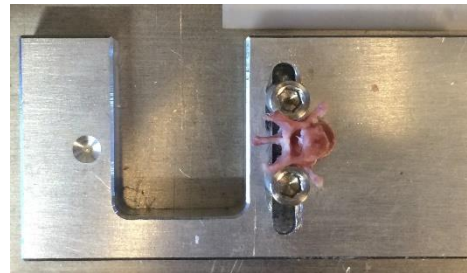


Abbildung 3: Veränderte Haltung des Wirbelkörpers

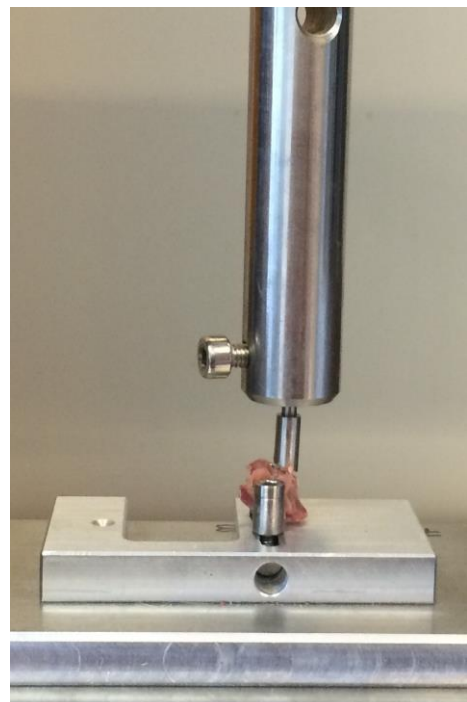


Abbildung 4: Zwick-Test-Maschine

2.2.2. Kraft-Weg-Diagramm

Die Testwerte wurden in einem Kraft-Weg-Diagramm aufgetragen. Dabei wurden drei Phasen in der Kurve definiert. In der ersten Phase kam es zu einem linearen Anstieg, der die Dehnung der Kollagenfasern darstellte (elastische Verformung). Die zweite Phase begann mit dem Wendepunkt, der die Streckgrenze darstellte, und endete mit der Maximalkraft, an dem die irreversible plastische Deformation begann. In der dritten Phase der plastischen Verformung fiel die Kurve ab. Hier endete der Test automatisch (Fürst 2014).

2.2.3. Messparameter

2.2.3.1. Elastizität

Die Elastizität des Wirbelkörpers ist definiert als die Steigung im Kraft-Weg-Diagramm mit der Einheit N/mm. Berechnet wurde die Steigung aus dem Quotienten der Differenz von zwei Kraftpunkten und der Differenz zweier Wegpunkte im linearen Bereich der Kraft- Weg-Kurve (Döll 2010; Wessling 2012).

2.2.3.2. Streckgrenze (yield load)

Die Streckgrenze ist definiert als Wendepunkt im Kraft-Weg-Diagramm und erhält die Einheit N. Sie beschreibt den Punkt, an dem die lineare Steigung mehr als das doppelte an der Standardabweichung abnimmt und ist äquivalent zur maximalen Dehnung der Kollagenfasern im Knochen. Sie stellt den Übergangspunkt der elastischen zur plastischen Verformung dar und wird in der Einheit N angegeben (Schmisch et al. 2010).

2.2.3.2. Maximalkraft (F_{max})

Die Maximalkraft ist die höchste Kraft, die der Wirbelkörper aushalten kann, bevor es zum Abfall der Kraft-Weg-Kurve oder zu Frakturen kommt. Sie wird in der Einheit N angegeben (Schmisch et al. 2010).

2.2.4. Validierung des Kompressionstests

Damit sichergestellt werden konnte, dass der Untersucher keinen Einfluss auf die Testung hat, erfolgte vorher eine Validierung. Hierbei wurden 20 Testwirbel von ausgewachsenen Ratten (4. und 5. Lendenwirbelkörper) genutzt und die Parameter Elastizität, Maximalkraft und Streckgrenze mit der Zwick-Test-Maschine bestimmt. Erst ab einer Abweichung der Ergebnisse unter 10% durfte der Test vom Untersucher an den Versuchsknochen durchgeführt werden (Zimmermann 2018).

2.3. Veraschung

2.3.1. Erzeugung eines Glührückstandes

Die Veraschung fand im Institut für allgemeine Hygiene und Umweltmedizin der Universität Göttingen statt. Wie in vorherigen Dissertationen bereits beschrieben (Galal 2020, Weßling 2012, Döll 2010) wurde zunächst ein Glührückstand erzeugt. Dabei wurden die gesäuberten LWK II aufgetaut und getrocknet. Das Gewicht des Wirbelkörpers wurde aus der Differenz der Gesamtmasse von Wirbelkörper und Porzellantiegel und dem leeren Tiegel bestimmt. Anschließend wurde der bestückte Tiegel nach einer Aufheizphase von 1 Stunde für 2 Stunden bei 750°C mit 11 weiteren bestückten Tiegeln im Muffelofen (20 Volt, 900 Watt, Klees, Ausrüster für Laboratorien) verascht. Nach der Abkühlung des Glührückstandes auf Raumtemperatur in einem Exsikkator über Kieselgel wurde erneut die Gesamtmasse nach der Veraschung bestimmt. Hierbei wurde die Differenz aus dem bestückten Tiegel und dem Leertiegel nach Veraschung gebildet.

1. Berechnung der organischen und anorganischen Anteile

Die Berechnung des Anteils organischer und anorganischer Substanz erfolgte wie folgt (Weßling 2012):

Berechnung des Anteils organischer Substanz:

$$\% \text{ organische Substanzen} = \frac{(\text{Masse vor Veraschung} - \text{Masse nach Veraschung}) \times 100}{\text{Masse vor Veraschung}}$$

Berechnung des Anteils anorganischer Substanz:

$$\% \text{ anorganischer Substanz} = 100 - \% \text{ organischer Substanz}$$

2.3.2. Bestimmung des Phosphatgehaltes

Für die Bestimmung des Phosphatgehaltes wurde zunächst der Glührückstand in einem Mörser mit einem Pistill fein homogenisiert. Anschließend wurde 50 mg unter Protokollierung abgewogen und in einen 250 ml Rundkolben überführt und mit 200 ml 10%-iger Salpetersäure versetzt. Mit einem Rückflusskühler wurde die Lösung im Kolben auf max. 300°C für 45 Minuten zum Sieden gebracht. Nachdem die Lösung nach dem Säureaufschluss klar wurde, wurde die Lösung in einen 1000 ml Messkolben überführt und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Vor der Bestimmung wurde die Lösung um den Faktor 1:20 verdünnt. Hierzu wurde 5 ml der Aufschlusslösung in einen 100 ml Messkolben überführt und auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt.

Die Phosphatbestimmung erfolgte durch die Photometrie des Phosphat-Molybdänblau-Komplexes (DIN EN ISO 6878:2004). Hierbei wurde 20 ml der 1:20 verdünnten Probe in einen 25 ml Messkolben pipettiert und 4 ml Citronensäure-Monohydrat zugesetzt. Anschließend wurde der Messkolben auf 25 ml aufgefüllt und nach 10 Minuten Reaktionszeit einer photometrischen Messung zugezogen. Die Messung der Extinktion erfolgte in einer Küvette der Schichtdicke von 10 mm gegen eine Blindprobe bei Messwellenlänge von 690 nm. Um eine Abgleichgerade erstellen zu können, wurde die Extinktion einer Verdünnungsreihe von 0.1 mg/l bis 3.0 mg/l unter Bezug einer Standardlösung untersucht. Die Messwerte wurden mittels ExtinktionsLineal umgerechnet und in mol/mg angegeben (Hofmann 2017; Genotte 2017).

2.3.3. Bestimmung des Calcium- und Magnesiumgehalts

Die Bestimmung von Calcium und Magnesium erfolgte durch die Atomabsorptionsspektroskopie (DIN EN ISO 7980:2000). Hierfür wurde Lanthanchlorid für die Calcium- und Magnesiumbestimmung in die 1:20 verdünnte Probe zugegeben und in einer Luft-Acetylen-Flamme flammatomabsorptionsspektroskopiert. Die Extinktionsbestimmung erfolgte an einer Calcium-Emissionsbande von 422,8 nm und an einer Magnesium-Emissionsbande von 285,2 nm. Die Kalibrierung wurde gegen eine Verdünnungsreihe im Intervall von 0.1 bis 2 mg/l für die Calciumbestimmung und im Intervall von 0.05 bis 1.5 mg/l für die Magnesiumbestimmung durchgeführt (Hofmann 2017).

2.4. Blutserumanalyse auf Calcium, Magnesium, Phosphor, Alkalischer Phosphatase und Osteocalcin

Die Serumanalyse wurde am Institut für Klinische Chemie der Universität Göttingen durchgeführt. Hierfür wurde mit einem Architect-c16000-Analysegerät (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) die Aktivität der alkalischen Phosphatase über die Paranitrophenylphosphat-Methode bei 404 nm gemessen.

Für die Bestimmung von Calcium wurde der Farbstoff Arsenazo III verwendet, womit Calcium angefärbt und optisch gemessen wurde (Kling 2016).

Zur Bestimmung von Magnesium erfolgte ebenfalls die Färbung mittels Arsenazo III. Um eine Verfälschung durch Calcium zu verhindern, wurde dieses vorher mit einem Chelatbildner gebunden. Der Arsenazo-Magnesium-Komplex wurde bei einer Wellenlänge von 572 nm gemessen (Kling 2016).

Für die Bestimmung von Phosphor wurde anorganisches Phosphat mit Ammoniummolybdat unter Bildung eines Heteropolysäurekomplexes versetzt. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen, welche proportional dem Phosphorgehalt der Probe entsprach.

Die Osteocalcinbestimmung im Serum erfolgte über einen N-MID® Osteocalcin ELISA- Test von Immunodiagnosticssystem mit der Bestellnummer AC-12F1. Hierfür wurde die Probe zunächst mit einem monoklonalem Antikörper versetzt, welcher die mittlere Region der Aminosäuren erkennt und als Einfangantikörper dient. Anschließend wurde ein Peroxidase-konjugierter Antikörper verwendet, der die N-terminale Region erkennt, und dieser Komplex gemessen. Dadurch konnten neben intaktem Osteocalcin auch terminale Mittelfragmente nachgewiesen werden.

2.5. 3D-Mikro-Computertomographie-Analyse (Mikro-CT)

Für die Mikro-CT-Analyse wurde der LWK IV im Quantum-FX-Mikro-CT (Caliper Sciences, Hopkinton, MA, USA) bei 70 kV und 200 μ A gescannt. Dies führte zu einer Voxelgröße von $40 \times 40 \times 40 \mu\text{m}^3$. In einem Block wurden 2 Wirbelkörper mit einem Phantom, das aus 5 Hydroxyapatitblöcken verschiedener Dichte besteht, gleichzeitig gescannt. Zur Analyse wurde das Programm 3D-OsteoAnalyse, das von der Radiologie der Universitätsmedizin Göttingen entwickelt wurde, verwendet. Hier konnten die Wirbelkörper als 3D-Modell sowie 2D-Schnitte dargestellt werden (Saul et. al 2017).

Für die virtuelle Auswertung wurde nur der Corpus vertebrae genutzt und virtuell zugeschnitten, da dieser bei einer Osteoporose die meisten Änderungen aufweist.

2.5.1. 3D-Analyse, Bestimmung des Weichteil-, Kortikalis- und Trabekelanteils

Für die Bestimmung der Anteile musste zunächst ein Grauerthistogramm erstellt werden. Dabei wurden auf der x-Achse die Röntgenschwächerungswerte und auf der y-Achse die Anzahl aller im Graubereich einfallenden Bildpunkte aufgetragen.

Im Histogramm stellten sich nun Luft, Weichteil, Trabekel und Kortikalis dar (Abb. 5). Für die ausschließliche Analyse des Knochens wurde zunächst die Luft ausgeblendet, anschließend wurde den gewünschten Bereichen (Weichteil, Kortikalis und Trabekel) des Knochens ein oberer und unterer Grenzwert zugeordnet.

Für die standardisierte Auswertung der Weichteil-, Kortikalis- sowie Trabekelanteile am Wirbelkörper wurden die unteren und oberen Schwellenwerte für die jeweiligen Anteile definiert (Weidemann 2013). Dabei färbte sich in der 2D-Darstellung der eingrenzende Bereich grün an. Für den jeweiligen Bereich errechnete das Programm die mittlere Dichte und das Volumen. Es wurden für jeweils 3 Wirbelkörper aus der nicht-ovarietomierten Gruppe (NON-OVX) und 3 aus der ovariectomierten Gruppe (OVX) im Grauerthistogramm die Schwellenwerte visuell bestimmt. Aus den insgesamt 6 Werten für je einen Schwellenwert und Gewebeart wurde ein Mittelwert errechnet und für weitere Auswertungen übernommen (Tab. 2).

Tabelle 2: durchschnittliche Schwellenwerte für Weichteilgewebe, Trabekel und Kortikalis

	$\bar{\emptyset}$ Schwellenwerte für Weichteilgewebe in g/cm ³	$\bar{\emptyset}$ Schwellenwerte für Trabekel in g/cm ³	$\bar{\emptyset}$ Schwellenwerte für Kortikalis in g/cm ³
oberer Grenzwert	-0,150	0,4133	0,871
unterer Grenzwert	0,4133	0,871	1,53

2.5.2. Bestimmung der Bone Mineral Density (BMD)

Für die Bestimmung der Knochenmineraldichte (BMD) mussten zunächst die vom CT vorgegebenen gray values in der Hounsfield-Skala (HU) umgerechnet werden. Mithilfe eines Fünf-Kammer-Phantoms aus fünf unterschiedlich bekannten Dichten aus Hydroxylapatit konnte eine Dichtekalibrierung errechnet werden. Aus den gray values der Phantome, die als peak-Werte im Histogramm definiert waren, errechnete sich die BMD in mg/cm^3 nach folgender Formel:

$$\text{BMD} = m \times \text{grey values}(x,y,z) + b$$

Die Kalibrierung mit dem jeweiligen Phantom wurde ausschließlich zur BMD-Berechnung der Wirbelkörper genutzt, die zusammen mit dem Phantom gescannt wurden, d.h. pro Phantom max. zwei dazugehörige Wirbelkörper (Abb. 6).

Anhand des Histogramms errechnete das Programm das Volumen in mm^3 sowie die Bone Mineral Density in mg/cm^3 vom Trabekel-, Kortikalis- und Weichteilanteil sowie vom gesamten Wirbelkörper und isoliert nur den Knochenanteil (Abb. 5) (Weidemann 2013).

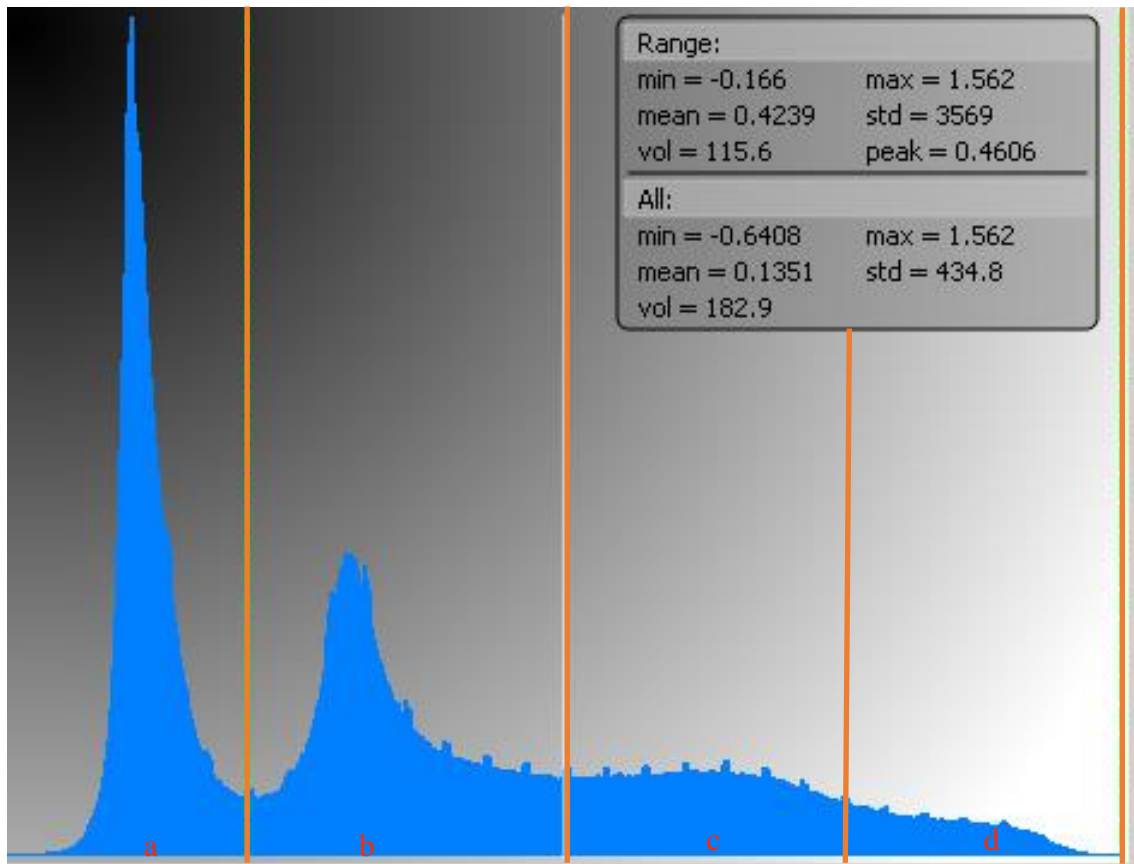


Abbildung 5: Histogramm: a= Luft; b=Weichteil; c=Trabekel; d=Kortikalis

2.6. 2-D Analyse

2.6.1. Erstellen der Knochenschnitte

Für die 2D-Analyse wurde die MetaMorph Basic Acquisition Software (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) angewendet.

Dabei wurde im 3D-OsteoAnalyse-Programm der Wirbel in kranial-kaudaler Position eingestellt und zentriert (Abb. 6). Im 2D-Anschnitt wurde diese Zentrierung ebenfalls dargestellt. (Abb. 7) Anschließend wurden insgesamt 10 sagitale Schnitte („create image stack“) mit einer Dicke (thickness) von 100 μm und einem Abstand (spacing) von 0,1 gesetzt. Die Matrix betrug 1024 pixel und die FOV 20.48 (Saul et al. 2017).

Als Definitionsbereich wurde für die Bestimmung der komplette Bereich des Röntgenschwächerungswertes genutzt, welches sich im Histogramm abgebildet hatte.

In der MetaMorph Basic Acquisition Software wurden anhand von 3 sagitalen Schnittbildern eines Wirbelkörpers die Kortikalisdicke, -dichte und -fläche sowie die Trabekeldicke, -fläche, -dichte, Anzahl und Dichte der Trabekelkreuzungen bestimmt.

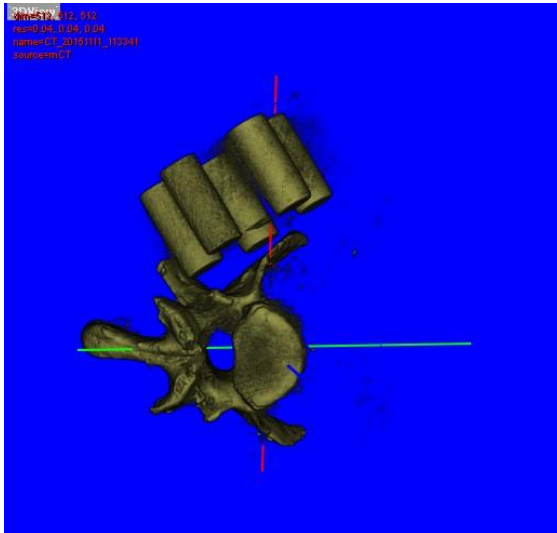


Abbildung 6: 3D-Wirbeldarstellung in kranial-kaudaler Position mit 5-Kammer-Phantom

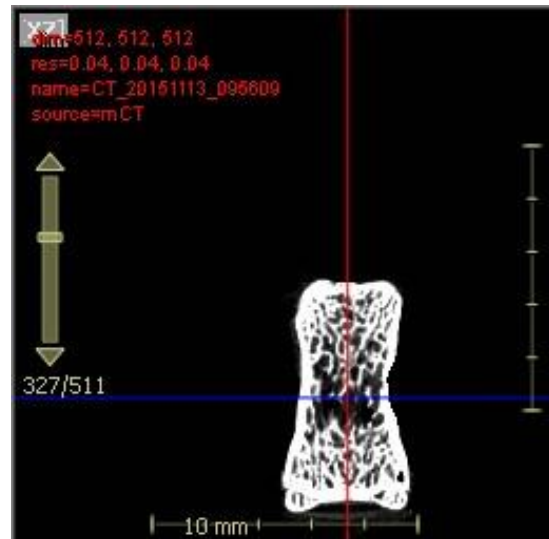


Abbildung 7: sagittales 2D-Schnittbild eines Wirbelkörpers

2.6.2. Kalibrierung, Einstellung der Helligkeit und des Kontrasts und Detektieren der Knochenbereiche

Für die Analyse wurden 3 von 10 Bildern ausgewählt. Zur Kalibrierung wurde dabei 1 Pix als 20 μm definiert und die Helligkeit bei 0 und der Kontrast bei 50 in der „adjust digital contrast“-Einstellung eingestellt.

Zu Beginn der Analyse wurden alle Knochenanteile mit einer Autofunktion detektiert und als visuell leuchtende Anteile im 2D-Bild erkannt und in die Berechnung einbezogen.

Um ausschließlich die Trabekel- und Kortikalisstrukturen des Wirbelkörpers zu analysieren, wurden unter Aussparung der Knochenepiphyse diese Anteile manuell umfahren (Abb. 8 und 9).

2.6.3. Messung der Kortikalisdicke ventral und dorsal

Zur Messung der Kortikalisdicke wurde zunächst die Trabekel- von der Kortikalisfläche durch manuelles Umfahren an der Trabekel-Kortikalis-Grenze getrennt. Die Kortikalisfläche wurde in mm^2 gemessen. Danach konnte anhand von jeweils 3 Messlinien die durchschnittliche Dicke in mm von ventraler und dorsaler Kortikalis gemessen werden (Abb. 8). Zudem wurde die Kortikalisdichte und der Kortikalisknochenanteil in Prozent im Vergleich zum Gesamtknochen mithilfe von MetaMorph Basic Acquisition Software gemessen (Saul et al. 2017).

2.6.4. Bestimmung der Trabekelstruktur

Für die Bestimmung der Trabekelfläche in mm^2 wurde die Kortikalis von den Trabekelanteilen getrennt und gemessen. Anschließend wurden durch die Software die Dichte der Trabekelknoten in $\text{N.Nd}/\text{mm}^2$ und die absolute Anzahl der Trabekelknoten in N.Nd. sowie die mittlere Trabekeldicke in mm und die Dichte in % berechnet und gezählt (Saul et al. 2017).



Abbildung 8: Manuelle Markierung der dorsalen und ventralen Kortikalisfläche



Abbildung 9: Manuelle Markierung der Trabekelfläche

2.7. Statistische Auswertung

In der Auswertung erfolgte der Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen. Die numerischen Werte aus den Messungen wurden mithilfe der Software GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) graphisch dargestellt und verglichen sowie tabellarisch aufgeführt. Anhand dessen konnten Standardfehler und Mittelwerte ermittelt werden. Für die Überprüfung statistischer Unterschiede wurde die One-way-analysis-of-variance-Methode (ANOVA) und der Turkey-Post-hoc-Test mit einem definiertem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ angewandt.

Signifikante Unterschiede wurden wie folgt markiert:

- * signifikant im Vergleich zur NON-OVX-Gruppe
- # signifikant im Vergleich zur OVX-Gruppe
- + signifikant im Vergleich zur 1 mg-Zileuton-Gruppe
- x signifikant im Vergleich zur 10 mg-Zileuton-Gruppe

3. Ergebnisse

Nachfolgend konnten insgesamt 13 Tiere in der NON-OVX-Gruppe, 13 in der OVX- Gruppe, 14 in der 1 mg Zileuton-Gruppe, 14 Tiere in der 10 mg-Zileuton-Gruppe und 15 in der 100 mg-Zileuton-Gruppe ausgewertet werden. Während der Ovariectomie sind 2 Tiere in der OVX-Gruppe sowie während der Osteotomie 6 Tiere aufgrund der Narkosetiefe verstorben (2 Tiere aus der NON-OVX-, 2 Tiere aus 1 mg- sowie je 1 Tier aus der 10 mg- und 100 mg-Zileuton-Gruppe).

3.1. Körpergewicht, Futter- und Dosisaufnahme, Uterusgewicht und Serumwerte

3.1.1. Körpergewicht, Futter- und Dosisaufnahme und Uterusgewicht

Zu Beginn des Versuches hatte sich das Körpergewicht innerhalb der Gruppen nicht signifikant unterschieden. Ab dem Zeitpunkt der Ovariectomie zeigte sich eine deutliche signifikante Gewichtszunahme aller ovariectomierten Gruppen im Vergleich zur NON- OVX-Gruppe. Am Ende der Versuchsreihe stellte sich die NON-OVX-Gruppe als leichteste Gruppe dar. Zwischen den ovariectomierten Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied. Das Uterusgewicht war in der NON-OVX-Gruppe signifikant höher im Vergleich zu den restlichen Gruppen. Zwischen der OVX- und den Zileuton- Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede (Tab. 3).

Tabelle 3: Körpergewicht zu Versuchsbeginn/Ovariectomie/Tötung und Uterusgewicht bei Tötung in g \pm Standardfehler

	NON-OVX	OVX	Zileuton 1 mg	Zileuton 10 mg	Zileuton 100 mg
Körpergewicht Versuchsbeginn (g)	254,7 \pm 3	259,8 \pm 2,8	262,5 \pm 4,5	262,3 \pm 4,1	260,1 \pm 4,4
Körpergewicht Ovariectomie (g)	291,6 \pm 10,9	350 \pm 8,5*	346 \pm 5,8*	343,4 \pm 8,8*	340,3 \pm 8,7*
Körpergewicht Versuchsende (g)	319,8 \pm 9.3	379,1 \pm 10.1*	380,7 \pm 7.5*	382,2 \pm 7.7*	366,1 \pm 9.5*
Uterusgewicht Versuchende (g)	0,56 \pm 0,03	0,14 \pm 0.01*	0,15 \pm 0.01*	0,16 \pm 0.01*	0,14 \pm 0.01*

Die Futteraufnahme zeigte sich in der NON-OVX-Gruppe in Woche 2 und 3 signifikant niedriger als bei den anderen Gruppen (Abb. 10). Anschließend glich sich diese an. In Woche 8 kam es zu einer verminderten Futteraufnahme in allen Gruppen, welche eine Woche später erneut anstieg.

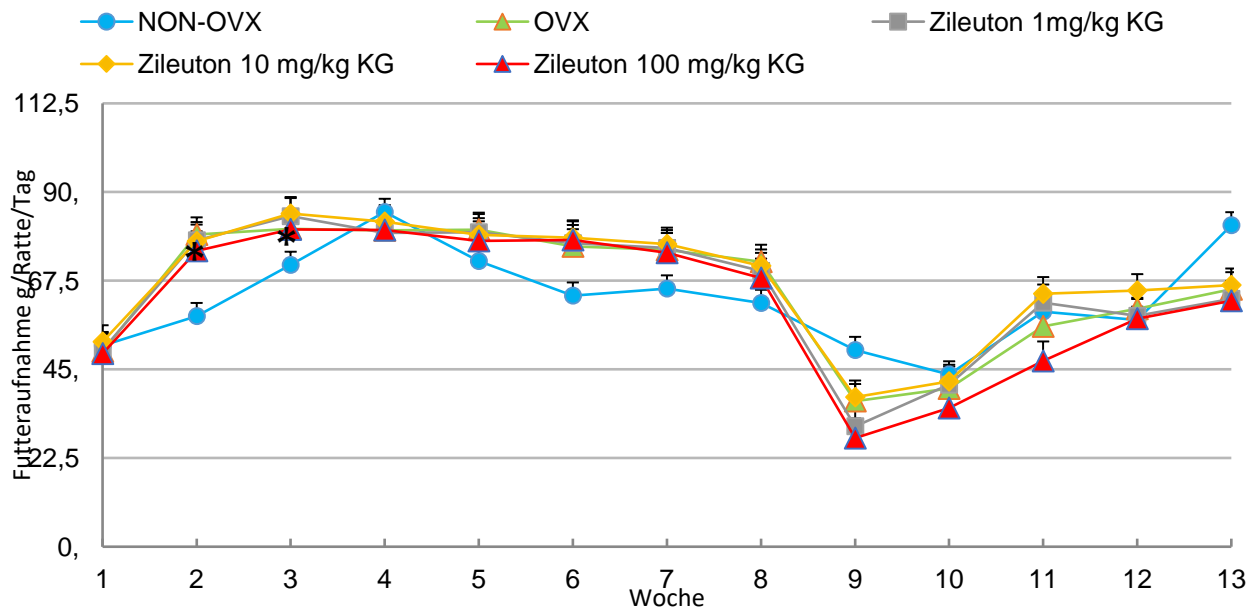


Abbildung 10: Verlauf der Futteraufnahme in g/Ratte/Tag

* signifikant im Vergleich zu NON-OVX

Ab Woche 8 wurde nach der Osteotomie Zileuton über das Futter in drei verschiedenen Dosierungen appliziert (Tab. 4). In der 1 mg-Zileuton-Gruppe wurden durchschnittlich 0,71 mg/kg KG ab Woche 8 aufgenommen, in der 10 mg Zileuton-Gruppe das 10-fache sowie in der 100 mg Zileuton-Gruppe durchschnittlich das 64,44 mg/kg KG.

Tabelle 4: Dosisaufnahme von Zileuton über das Futter in mg/kg KG \pm Standardabweichung

Versuchswoche	9	10	11	12	13	Mittelwert
Aufnahme von Zileuton 1 mg/kg KG in mg	0,43 \pm 0,02	0,57 \pm 0,01	0,86 \pm 0,11	0,83 \pm 0,02	0,89 \pm 0,02	0,71 \pm 0,07
Aufnahme von Zileuton 10 mg/kgKG in mg	5,31 \pm 0,88	5,89 \pm 0,14	9 \pm 0,56	9,09 \pm 0,41	9,29 \pm 0,43	7,71 \pm 1,21
Aufnahme von Zileuton 100 mg/kg KG in mg	38,60 \pm 2,1	49,23 \pm 1,6	65,94 \pm 1,8	81,06 \pm 2,6	87,37 \pm 2,2	64,44 \pm 5,5

3.1.2 Serumwerte

Die alkalische Phosphatase zeigte sich im Serum signifikant in der Zileuton-10 mg-Gruppe gegenüber der NON-OVX-Kontrollgruppe erhöht. Die Messung von Osteocalcin ergab signifikant höhere Werte in der Zileuton-100 mg-Gruppe gegenüber der NON-OVX-

Kontrollgruppe. Die Calcium-, Magnesium- und Phosphorwerte im Serum stellten keine Unterschiede in den Gruppen dar (Abb. 11-15).

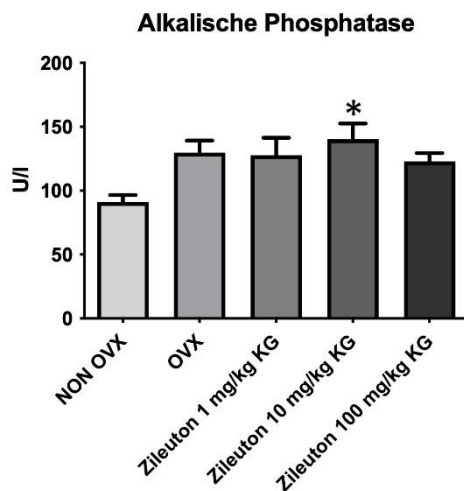


Abbildung 11: Alkalische Phosphatase im Serum in U/l

* signifikant im Vergleich zu NON-OVX

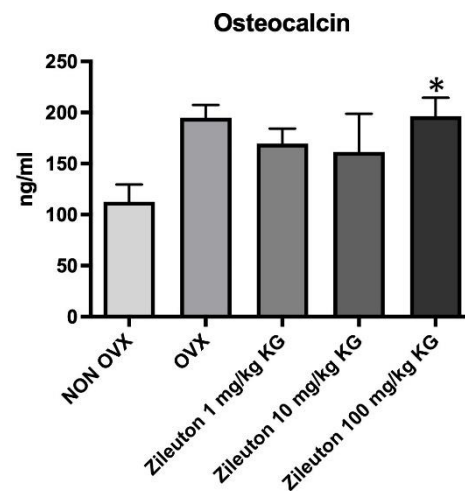


Abbildung 12: Osteocalcin im Serum in ng/ml

* signifikant im Vergleich zu NON-OVX

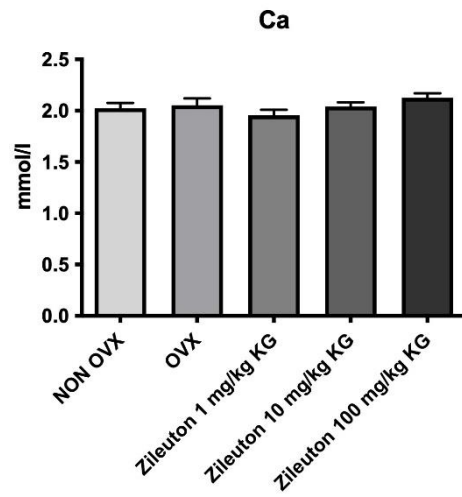


Abbildung 13: Ca im Serum in mmol/l

Zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

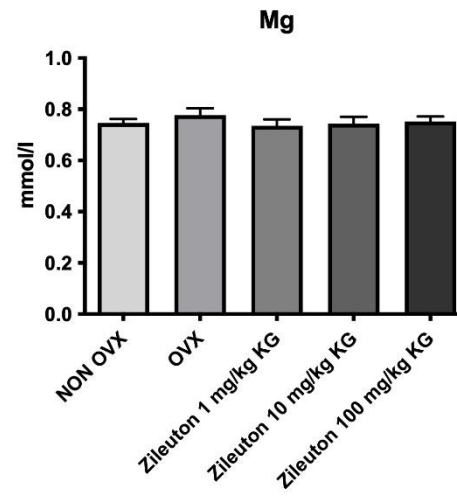


Abbildung 14: Mg im Serum in mmol/l

Zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

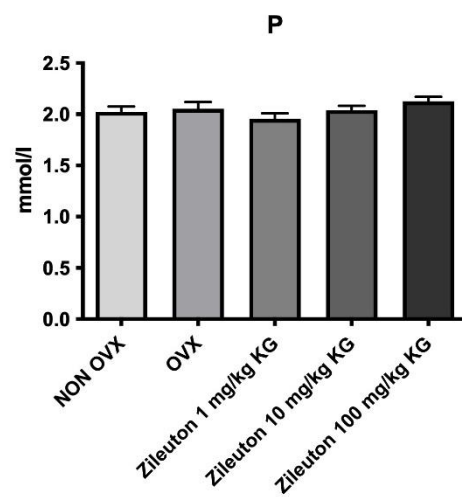


Abbildung 15: Phosphor im Serum in mmol/l

Zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

3.2. Kompressionstests

3.2.1. Elastizität

Bei der Elastizität zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei leicht höheren Werten in der Gruppe NON-OVX (Abb. 16).

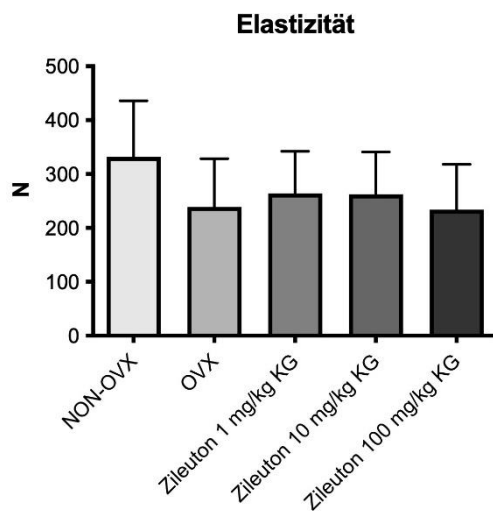


Abbildung 16: Elastizität in N

Zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

3.2.2. Streckgrenze (yield load)

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen trotz leicht erhöhten Werten in der NON-OVX-Gruppe (Abb. 17).

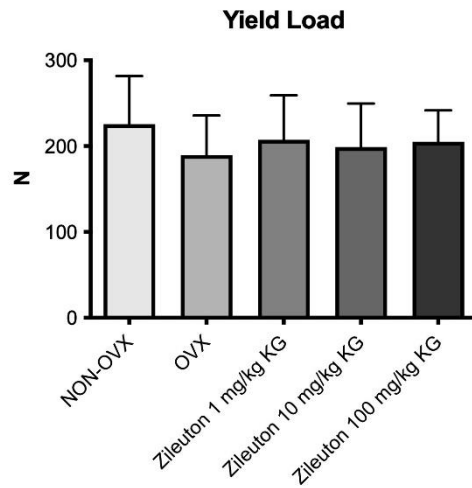


Abbildung 17: Ergebnisse Messparameter „Yield Load“ in N

Zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

3.2.3. Maximalkraft

Die Maximalkraft war in der NON-OVX-Gruppe im Vergleich zur OVX-Gruppe signifikant höher. Zwischen NON-OVX- und den Zileuton-Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen (Abb.18).

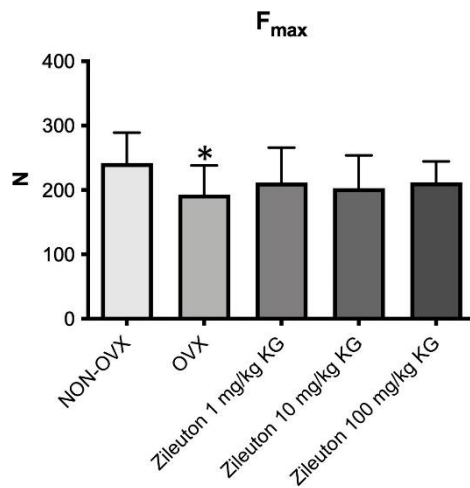


Abbildung 18: Ergebnisse Messparameter „Fmax“ in N

* signifikant im Vergleich zu NON-OVX

3.3. Veraschungstests

3.3.1. Organische und anorganische Knochenanteile

Der Anteil organischer Substanzen in der nicht-ovariectomierten Kontrollgruppe war im Vergleich zu allen übrigen Gruppen signifikant geringer und der Anteil der anorganischen Substanzen erhöht. Zudem zeigte sich ein signifikanter Unterschied der organischen und anorganischen Substanz in der Zileuton-100 mg-Gruppe im Vergleich zur OVX-Gruppe (Abb. 19 und 20).

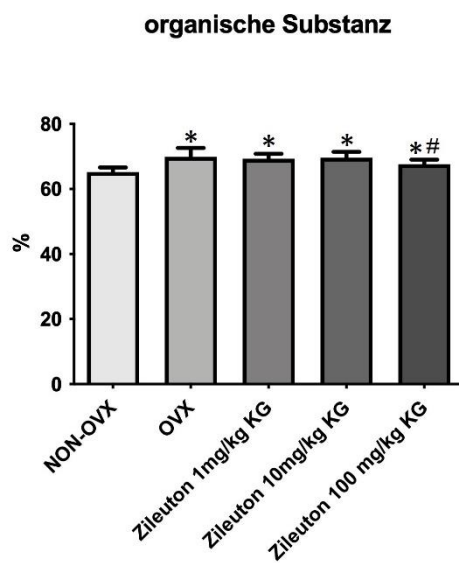


Abbildung 19: Ergebnisse Messparameter "organische Substanz" in %

*signifikant im Vergleich mit NON-OVX
signifikant im Vergleich mit OVX

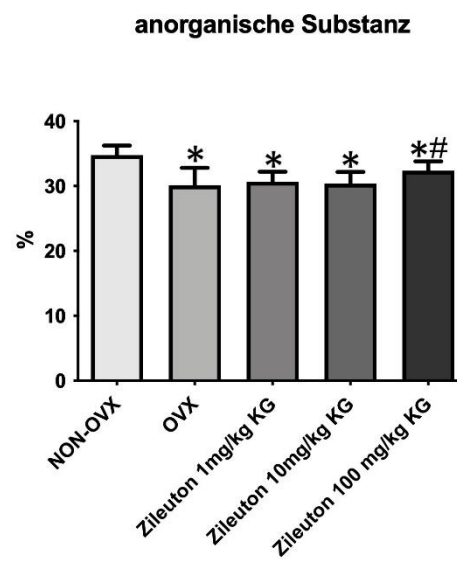
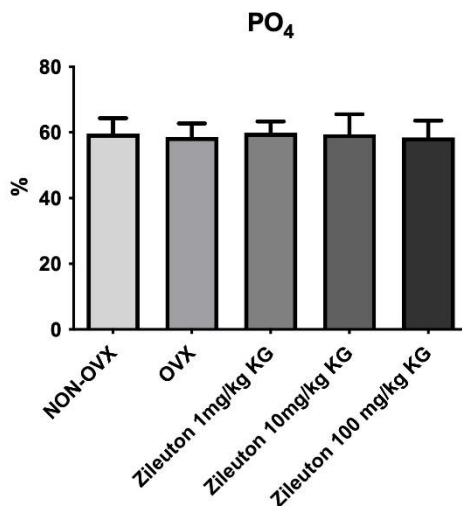


Abbildung 20: Ergebnisse Messparameter "anorganische Substanz" in %

* signifikant im Vergleich mit NON-OVX
signifikant im Vergleich mit OVX

3.3.2. Phosphatgehalt

Hinsichtlich des Phosphatgehaltes konnte weder zwischen NON-OVX-Gruppe und OVX-Gruppe noch zwischen NON-OVX-Gruppe und den Zileuton-Gruppen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 21).



Zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

Abbildung 21: PO₄-Gehalt in %

3.3.3. Calciumgehalt

Der Vergleich des Calciumgehalt im Knochen zeigte keine signifikante Unterschiede in den Gruppen (Abb. 22).

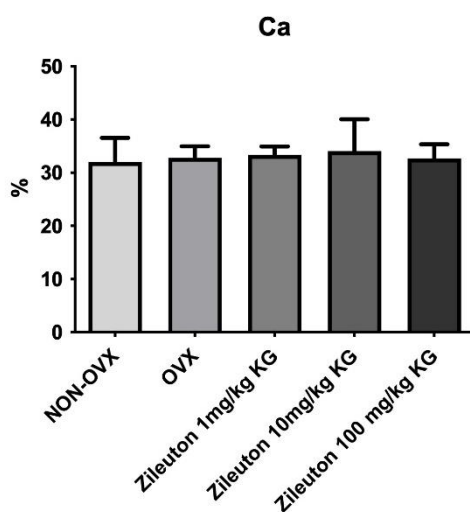


Abbildung 22: Ca-Gehalt in %

Zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

3.3.4 Verhältnis von Calcium- und Phosphatgehalt

Der Vergleich der Calcium/Phosphat-Verhältnisse zeigte innerhalb der Gruppen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 23).

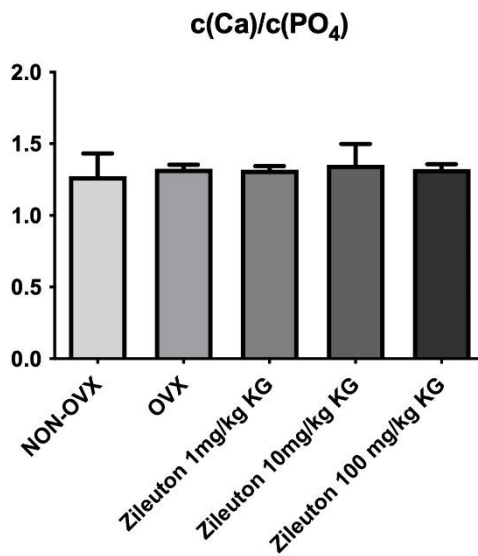


Abbildung 23: $c(\text{Ca})/c(\text{PO}_4)$

Zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

3.3.5 Magnesiumgehalt

Die Messung des Magnesiumgehaltes konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen der NON-OVX-, der OVX und den Zileuton-Gruppen zeigen (Abb. 24).

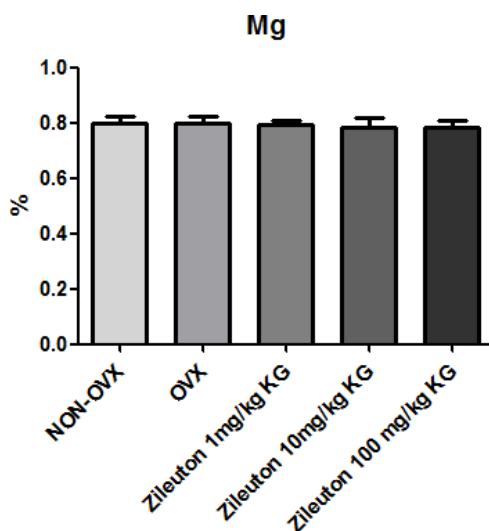


Abbildung 24: Mg-Gehalt in %

Zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

3.4. 3D-Mikro-CT-Analyse

3.4.1. Weichteilvolumen

Der Vergleich des Weichteilvolumens in Abbildung 25 zeigte in der NON-OVX-Gruppe eine signifikante Minderung verglichen mit der OVX-Gruppe und allen Zileuton-Gruppen. Zwischen der OVX-Gruppe und den Zileuton-Gruppen waren lediglich nur im Vergleich mit der Zileuton-10 mg-Gruppe signifikant höhere Werte in der OVX-Gruppe festzustellen.

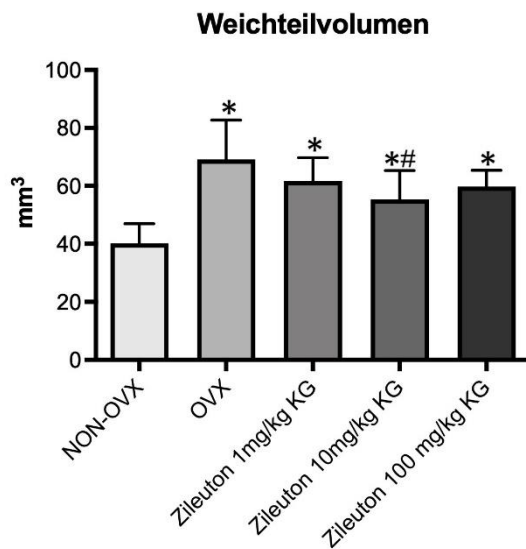


Abbildung 25: Weichteil Volumen in mm³

* signifikant im Vergleich zu NON-OVX

signifikant im Vergleich zu OVX

3.4.2. Trabekelvolumen

Der Vergleich der Gruppen bezüglich des Trabekelvolumens wies keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 26).

3.4.3. Bone Mineral Density vom Trabekelanteil

In der BMD-Auswertung vom Trabekelanteil zeigten sich in der NON-OVX-Gruppe verglichen mit der OVX-Gruppe und den Zileuton-Gruppen signifikant erhöhte Werte (Abb. 27).

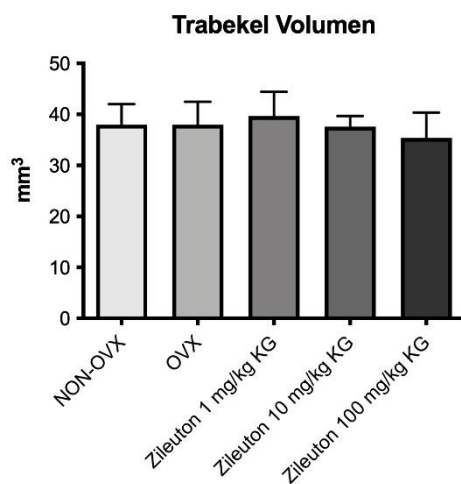


Abbildung 26: Trabekel Volumen in mm³

Zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

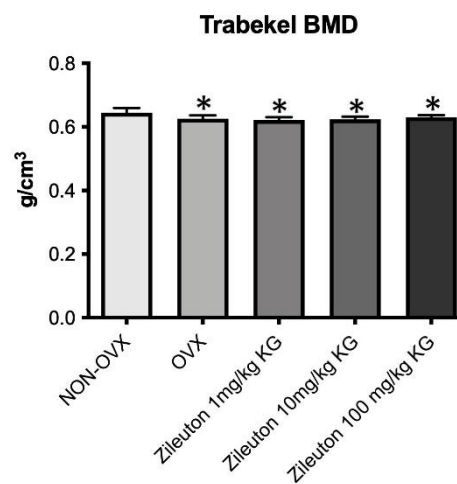


Abbildung 27: Trabekel BMD in g/cm³

* signifikant im Vergleich zu NON-OVX

3.4.4. Kortikalisvolumen

Im Vergleich der NON-OVX-Gruppe mit den Zileuton-Gruppen zeigte sich eine Minderung der Werte bei Zileuton-Gabe, die nur in der Zileuton-1 mg- und Zileuton-10 mg-Gruppe signifikant war. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Zileuton-Gruppen und der OVX-Gruppe stellte sich nicht dar (Abb. 28).

3.4.5. Bone Mineral Density vom Kortikalisanteil

Hinsichtlich der kortikalen BMD-Auswertung wiesen die Werte der Zileuton-1 mg-Gruppe signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur NON-OVX-Gruppe und den Zileuton-10 mg- und Zileuton-100 mg-Gruppen auf. Im Vergleich mit der OVX-Gruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 29).

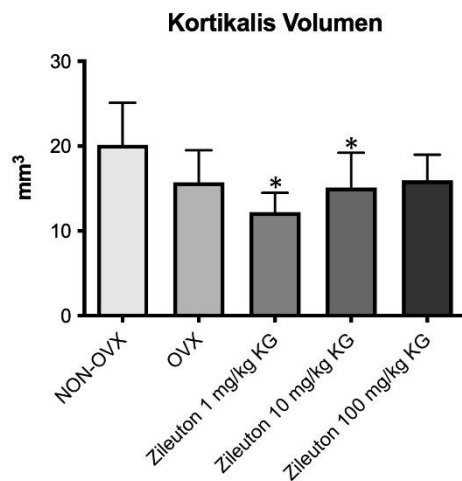


Abbildung 28: Kortikalis Volumen in mm³

* signifikant im Vergleich zu NON-OVX

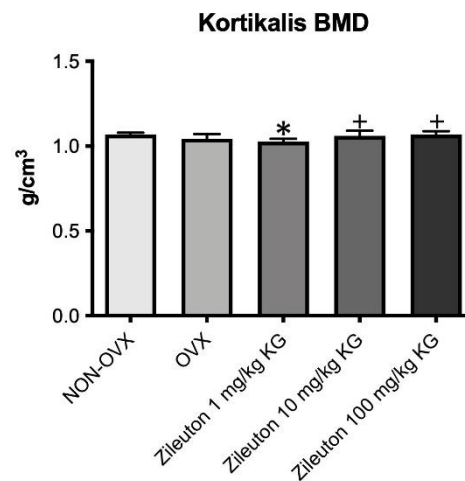


Abbildung 29: Kortikalis BMD in g/cm³

* signifikant im Vergleich zu NON-OVX

+ signifikant im Vergleich zu Zileuton-1 mg- Gruppe

3.4.7. Knochenvolumenanteil (Bone volume fraction)

Der Knochenvolumenanteil (BV/TV) beschreibt das Verhältnis vom Knochenvolumen zum Gewebevolumen und wird in % angegeben. Hier wurden signifikant niedrige Werte in allen ovariektomierten Gruppen im Vergleich zur NON-OVX-Kontrollgruppe gemessen (Abb. 30).

3.4.8. Gesamte Bone Mineral Density

Bei der Messung der gesamten BMD zeigte sich signifikant niedrige Werte in allen ovariektomierten Gruppen im Vergleich zur NON-OVX-Kontrollgruppe. Zudem waren die Werte in der Zileuton 10 mg/kg KG Gruppe signifikant höher im Vergleich zur OVX-Gruppe (Abb. 31).

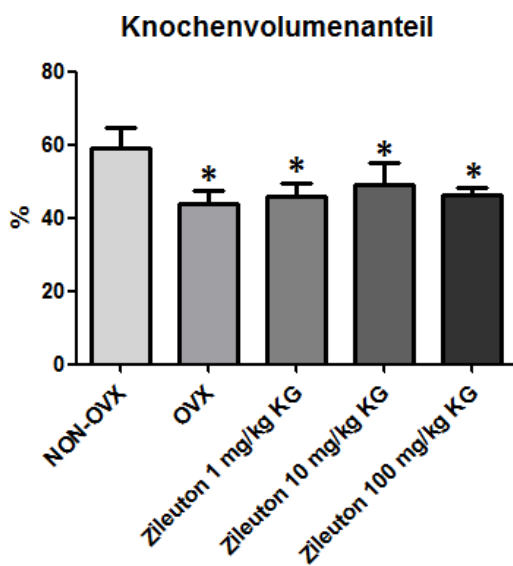


Abbildung 30: Knochenvolumenanteil in %

* signifikant im Vergleich zu NON-OVX

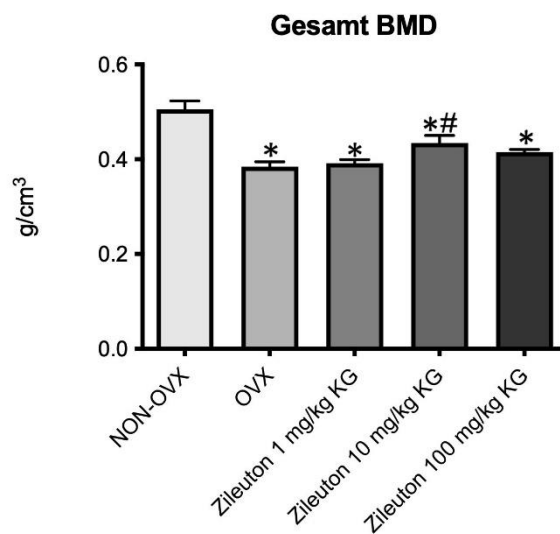


Abbildung 31: Gesamt-BMD in g/cm³

* signifikant im Vergleich zu NON-OVX
signifikant im Vergleich zu OVX

3.5. 2D-Analyse

3.5.1. Kortikalisfläche

Bei der Messung der Kortikalisfläche zeigte sich bei der NON-OVX-Gruppe eine signifikant größere Fläche als in den OVX-, Zileuton-1 mg- und Zileuton-100 mg- Gruppen. Zudem wies die Zileuton-1 mg-Gruppe signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur OVX-, Zileuton-10 mg- und Zileuton-100 mg-Gruppe auf. Der Vergleich zwischen der OVX-, Zileuton-10 mg- und Zileuton-100 mg-Gruppe zeigte ähnliche Messwerte und daher keine signifikanten Unterschiede (Abb. 32).

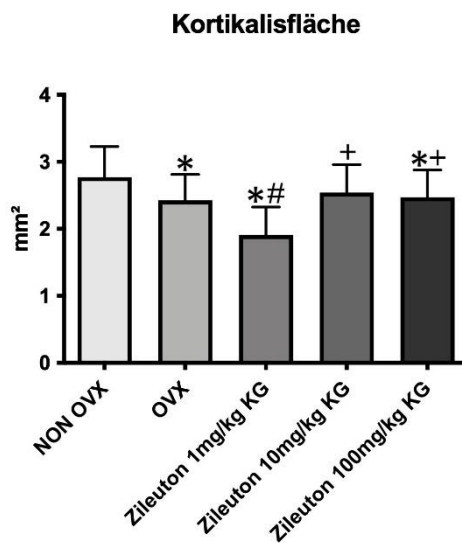


Abbildung 32: Kortikalisfläche in mm²

* signifikant im Vergleich mit NON-OVX

signifikant im Vergleich mit OVX

+ signifikant im Vergleich mit Zileuton-1 mg-Gruppe

3.5.2. Kortikalisdicke dorsal und ventral in mm

Die Werte der dorsalen Kortikalisdicke der Zileuton-1 mg-Gruppe waren signifikant niedriger im Vergleich zur NON-OVX-Kontrollgruppe. Die Werte der Zileuton-1 mg- Gruppe zeigten sich im Vergleich zur OVX-, Zileuton-10 mg- und Zileuton-100 mg- Gruppe signifikant vermindert. Zwischen der OVX-, Zileuton-10 mg- und Zileuton-100 mg-Gruppe waren keine Unterschiede in der dorsalen Kortikalisdicke (Abb. 33).

Der Vergleich der ventralen Kortikalisdicke stellte signifikante Unterschiede zwischen der NON-OVX-Gruppe und den übrigen Gruppen dar. Hier wurden bei der NON-OVX- Gruppe deutlich höhere Werte als in den ovariektomierten Gruppen gemessen.

Unterschiede innerhalb der OVX- und den Zileutongruppen gab es nicht (Abb. 34).

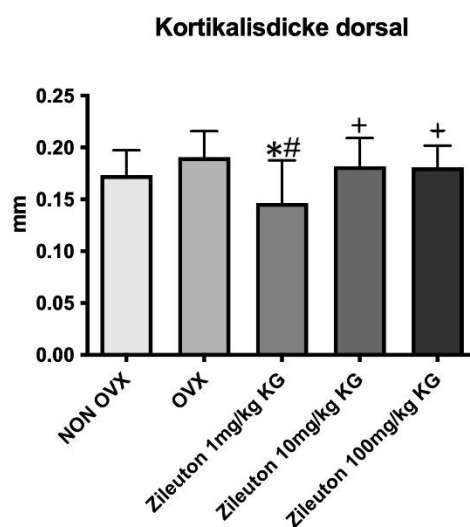


Abbildung 33: Kortikalisdicke dorsal in mm

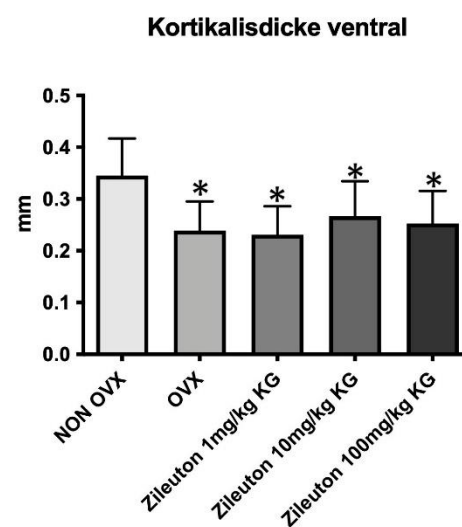


Abbildung 34: Kortikalisdicke ventral in mm

*signifikant im Vergleich zu NON-OVX
 # signifikant im Vergleich zu OVX
 + signifikant im Vergleich zu 1 mg Zileuton

* signifikant im Vergleich zu NON-OVX

3.5.3. Kortikalisdichte

Bei der Messung der Kortikalisdichte waren die Werte in der Zileuton-1 mg-Gruppe im Vergleich zu den übrigen Gruppen signifikant kleiner. Der Vergleich zwischen den übrigen Gruppen wies keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 35).

3.5.4. Trabekelfläche

Die signifikant größte Fläche zeigte sich in der NON-OVX-Gruppe verglichen mit allen übrigen Gruppen. Die Trabekelfläche der Zileuton-100 mg-Gruppe war im Vergleich zur OVX- und Zileuton-1 mg-Gruppe signifikant erhöht (Abb. 36).

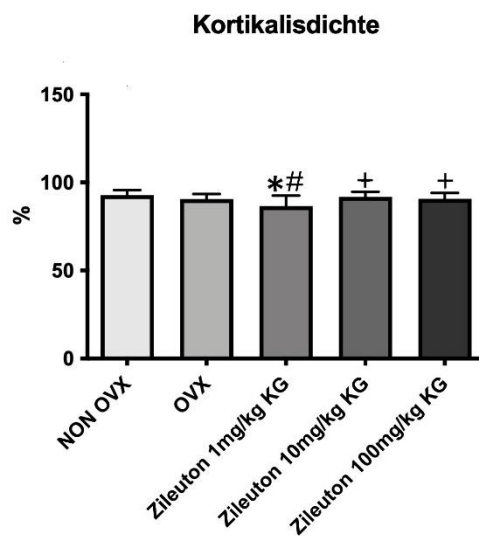


Abbildung 35: Kortikalisdichte in %

*signifikant im Vergleich zu NON-OVX
 # signifikant im Vergleich zu OVX
 + signifikant im Vergleich mit 1 mg Zileuton

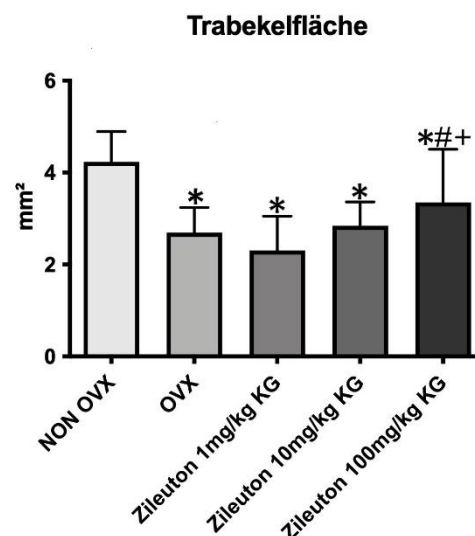


Abbildung 36: Trabekelfläche in mm²

*signifikant im Vergleich mit NON-OVX
 # signifikant im Vergleich mit OVX
 + signifikant im Vergleich mit 1 mg Zileuton

3.5.5. Mittlere Trabekeldicke

Die größte mittlere Trabekeldicke zeigte sich in der Gruppe der NON-OVX-Ratten. Dabei stellte sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den anderen Gruppen dar. Im Vergleich zur Zileuton-10 mg-Gruppe wies die Zileuton-100 mg-Gruppe signifikant höhere Werte auf. Die übrigen Zileuton-Gruppen haben verglichen mit der OVX-Gruppe keine Unterschiede aufgewiesen (Abb. 37).

3.5.6. Trabekeldichte

Die Dichte an Trabekeln war in den ovariectomierten Gruppen signifikant niedriger im Vergleich zur NON-OVX-Gruppe. Zusätzlich zeigte sich eine signifikant höhere Trabekeldichte der Zileuton-100mg-Gruppe im Vergleich zur Zileuton-1mg-Gruppe. (Abb. 38)

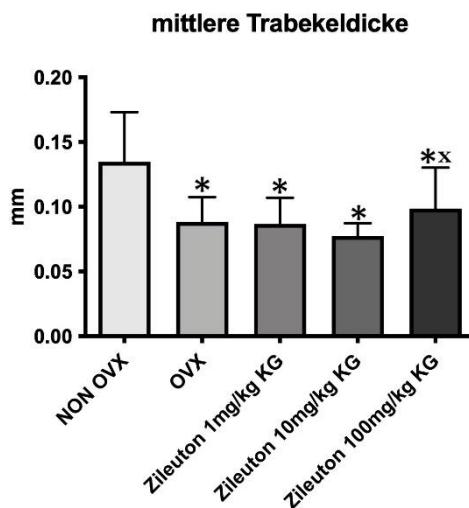


Abbildung 37: mittlere Trabekeldicke in mm

*signifikant im Vergleich mit NON-OVX
x signifikant im Vergleich mit Zileuton 10 mg/kg

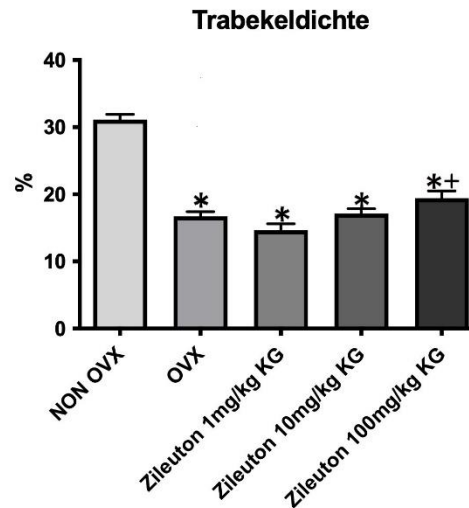


Abbildung 38: Trabekeldichte

* signifikant im Vergleich mit NON-OVX
+ signifikant im Vergleich mit Zileuton-1mg-Gruppe

3.5.7. Dichte der Trabekelkreuzungen

Ein signifikanter Unterschied der Trabekelkreuzungsdichte stellte sich nur im Vergleich von der NON-OVX- und der Zileuton-1 mg-Gruppe dar. Die übrigen Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abb. 39).

3.5.8. Anzahl der Trabekelkreuzungen

Die Werte der Trabekelkreuzungenanzahl der NON-OVX-Gruppe waren verglichen mit den OVX- und Zileuton-Gruppen signifikant höher. Dabei waren die Werte in der Zileuton-100 mg-Gruppe signifikant höher im Vergleich zur Zileuton-1 mg-Gruppe (Abb. 40).

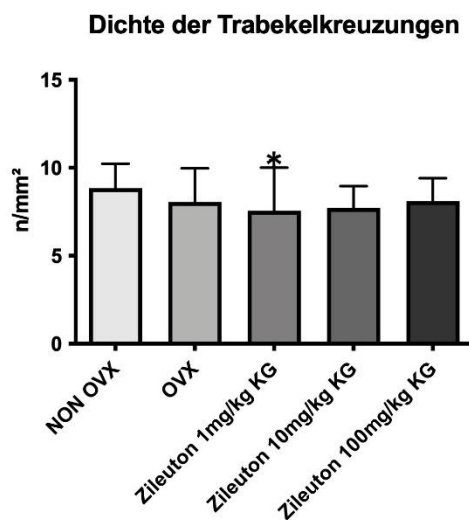


Abbildung 39: Dichte der Trabekelkreuzungen in n/mm²

* signifikant im Vergleich mit NON-OVX

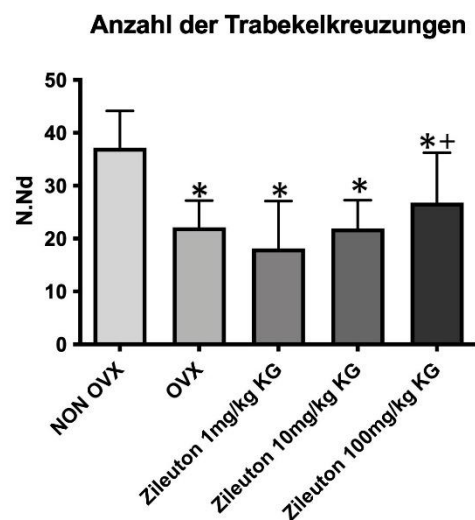


Abbildung 40: Anzahl der Trabekelkreuzungen in N.Nd

*signifikant im Vergleich mit NON-OVX
+ signifikant im Vergleich zur Zileuton-1 mg-Gruppe

4. Diskussion

Die Osteoporose ist einer der Hauptursachen für Mortalität und Morbidität bei älteren Menschen, besonders bei postmenopausalen Frauen (IOF 2018). Dabei spielen bei der Entstehung der Erkrankung neben dem Östrogenmangel in der Postmenopause auch die Beeinflussung des Immunsystems insbesondere der Interleukin-vermittelten Immunreaktion eine entscheidende Rolle (Pacifci et al. 1990). Dabei moduliert der Östrogenmangel direkt die Immunreaktion (Faenza et al. 2013). Einer dieser wichtigen Interleukine stellt die 5-Lipoxygenase dar, welches die Osteoklastenaktivität aktiviert (Lee et al. 2012).

Zileuton ist ein 5-Lipoxygenasehemmer, welches in der USA seit 1997 in der Asthmatherapie zugelassen ist (Wood et al. 1999). In früheren Studien wurde gezeigt, dass eine vermehrte Expression der Lipoxygenasen zu einer erhöhten Osteoklastenzahl führt. Zudem führte es *in vitro* zu einer Hemmung der Knochenbildung sowie einer erhöhten Rekrutierung und Aktivierung der Osteoklasten (Garcia et al. 1996, Traianedes et al. 1998).

In diesem Versuch wurde der Einfluss von Zileuton auf Wirbelkörper im ovariectomiertem Rattenmodell der postmenopausalen Osteoporose untersucht. Dabei wurden die biomechanischen, strukturellen und biochemischen Eigenschaften von osteoporotischen Wirbelkörpern unter Zileutongabe in verschiedenen Dosierungen analysiert und verglichen. Die Wirbelkörper wurden für die Analysen genommen, weil sie häufig von Osteoporose betroffen sind (Muller et al. 2014).

4.1. Die ovariectomierte Ratte als Osteoporosemodell

Die ovariectomierte Ratte als Osteoporosemodell ist ein etabliertes Tiermodell, welches die menschliche postmenopausale Osteoporoseentwicklung aufgrund des Östrogenmangels am nächsten widerspiegelt (Kalu et al. 1991). Acht bis zehn Wochen nach der Ovariectomie entwickeln die Tiere eine erhöhte Knochenumsatzrate mit Verlust von spongiosem und kortikalem Knochengewebe, zudem eine verringerte Kalziumresorption im Darm und erhöhte Fettleibigkeit (Omi und Ewaza 1995).

Am häufigsten ist der trabekuläre Bereich des Knochens von Osteoporose betroffen, welches sich im Rattenmodell in den Wirbelkörpern zeigt (Muller et al. 2014). Beim Menschen weisen Wirbelkörperfrakturen häufig auf Osteoporose hin, weswegen sich dadurch das Modell als geeignet zur therapeutischen Osteoporoseuntersuchung auszeichnet (Bartl et al. 2011).

Um eine erfolgreiche Ovariectomie belegen zu können, wurde das Uterusgewicht bestimmt. Das Uterusgewicht zeigte deutlich signifikant niedrigere Werte in den ovariectomierten Gruppen im Vergleich zur NON-OVX Gruppe, da es aufgrund der Ovariectomie zu einer Uterusatrophie kam (Hao et al. 2016, Komrakova et al. 2010).

Darüberhinaus zeigte sich in diesem Versuch eine schnellere Gewichtszunahme der

ovarietomierten Tiere im Vergleich zur NON-OVX-Gruppe innerhalb ersten zwei Wochen. Die Gewichtszunahme lässt sich durch die Erhöhung des Körperfettanteil und durch die Verminderung der körperlichen Aktivität erklären und auf die signifikant deutlich höhere Nahrungsaufnahme in den ovariectomierten Gruppen in den ersten drei postoperativen Wochen zurückführen, welche sich mit den vergangenen Untersuchungen decken (Komrakova 2010 et al.; Kolios 2009 et al.). Der kontinuierlicher Anstieg des Körpergewichtes in allen Versuchsgruppen ist durch das physiologische Wachstum bedingt (Berg und Harmison 1957). Die Gabe von Zileuton in verschiedenen Dosierungen beeinflusste das Körpergewicht nicht. Hieraus kann geschlossen werden, dass Zileuton sich weder auf die Körperfettanteilszunahme noch auf die ovariectomiebedingte Uterusatrophie auswirkt.

In der 9. Versuchswoche kam es zu einer deutlichen Gewichtsabnahme und Rückgang der Nahrungsaufnahme ähnlich wie in einigen vergangen Versuchen (Komrakova et al. 2015, 2016). Eine mögliche Erklärung sind die postoperativen Schmerzen nach der Tibiaosteotomie. Innerhalb der ersten 2 Wochen nach der Osteotomie kam es zur Erholung der Aktivität auf ein Niveau wie vor der Osteotomie, sodass ab der 10. Versuchswoche ein Anstieg des Körpergewichtes sowie der Futtermittelaufnahme gemessen wurde (Saul et al. 2019).

Die Dosisaufnahme von Zileuton verlief wie erwartet, ähnlich wie die Futtermittelaufnahme. Die durchschnittliche Dosis lag bei 0,71, 7,72 und 64,44 mg/kg KG in den Gruppen 1 mg, 10 mg und 100 mg Zileuton pro kg Körpergewicht. Die mittlere Dosis wurde anhand der Verschreibung von Zylflo CR® bei Menschen gewählt basierend auf den Daten von Rubin et al. (1991).

4.2. Analyse der biomechanischen Knocheneigenschaften

Da die Osteoporose häufig erst nach dem Auftreten von Frakturen und insbesondere nach pathologischen Wirbelkörperfrakturen auffällig wird (DVO 2009), wurde durch den Kompressionstest die biomechanischen Eigenschaften des Wirbelkörpers untersucht. Um die Kraft ausschließlich auf den Wirbelkörper ausrichten zu können, wurden der Discus vertebralis entfernt und eine veränderte Fixierung gewählt. Anders als in den vergangenen Arbeiten (Wessling und Grüger) in Anlehnung an die Arbeit von Sehmisch et al. 2009 wurde der Wirbelkörper nicht mit seiner kaudoventralen Seite gegen eine gegenüberliegende Kante eingesetzt, sondern an den Wirbelbögen auf einer Platte durch zwei Kolben fixiert. Anschließend wurde die neue Fixierung validiert.

Im Kompressionstest wurden 3 verschiedenen Parameter gemessen: Die Elastizität, die Streckgrenze und die Maximalkraft.

Die Elastizität beschreibt wiederum die Fähigkeit die durch äußere Einwirkung hervorgerufene Formänderung aus eigener Kraft wieder rückgängig zu machen (Bartl und Bartl 2011). Zudem war in der Untersuchung zwar kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen in der Elastizität sichtbar, jedoch in der Tendenz erhöhte Werte in der NON-OVX- gegenüber der OVX-Gruppe. Die Therapie mit Zileuton zeigte vergleichbare Werte wie die OVX-Gruppe.

Die Streckgrenze beschreibt den Punkt, an dem die lineare Kraft mehr als das Doppelte von der Standardabweichung abweicht. Sie zeigt damit makroskopisch das irreversible Eintreten der Sinterungsfraktur am Wirbelkörper an. Die postmenopausale Wirbelkörperfrakturen entstehen aufgrund des Verlustes an Knochenmasse, sodass der Wirbel ohne große Krafteinwirkungen in sich zusammenbricht. Obwohl eine in-vivo-Studie von Moura et al. 2014 die Modulation der Zytokinfreisetzung und Reduktion der Osteoklastendifferenzierung durch Zileuton gezeigt hatte, konnte in diesem Versuch kein signifikanter Einfluss von Zileuton auf die Streckgrenze bestätigt werden (Moura et al. 2014).

Die Maximalkraft zeigt die Kraft an, die der Knochen aushält, bevor es zum Abfall der linearen Kraft-Weg-Kurve kommt. Es konnten in der Untersuchung signifikant höhere Werte in der NON-OVX-Vergleichsgruppe im Vergleich zu der OVX-Gruppe gezeigt werden. Die verschiedenen Dosierungen an Zileuton zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den OVX-Ratten, sodass diese Gaben zu keiner Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften führten. Allerdings war die Maximalkraft in den Zileuton behandelten Gruppen gegenüber der NON-OVX-Gruppe nicht mehr signifikant verringert.

Insgesamt waren die biomechanischen Paramtern des Wirbelkörpers durch die Zileutonbehandlung nicht wesentlich verändert. Dies steht im Einklang mit anderen Lipoxygenasehemmern wie Balcalein oder der Kombination von Balcalein und Zileuton, die weder einen biomechanischen Einfluss auf die Lendenwirbelknochen noch auf die Tibia zeigten (Saul et al. 2019 und 2021). Eine längere Behandlungsdauer über 13 Wochen mit Zileuton beeinflusste die biomechanischen Eigenschaften der Lendenwirbelknochen ebenfalls nicht (Saul et al. 2021).

4.3. Analyse der chemischen Knochenzusammensetzung und Knochenmarker im Serum

Bei ovariectomierten Tieren führt der Östrogenmangel zu einer Erhöhung der organischen und Abnahme der anorganischen Masse im Knochen (Svanberg und Knuutila 1994). In der Veraschungsanalyse wurden signifikant höhere Werte an organischem Knochenanteil und ein niedriger Anteil an anorganischen Substanzen bei ovariectomierten Tieren im Vergleich zur nicht-ovariectomierten Gruppe gemessen. Dieses wurde schon in einigen vorherigen Studien wie Komrakova et al. (2017), Simon (2017) oder Zimmermann (2018) berichtet und bestätigt in diesem Versuch die Entwicklung einer Osteoporose bei den ovariectomierten Gruppen.

Die organischen Substanzen, die meist aus Kollagenen gebildet werden, nehmen mit der Zunahme von der Mineralstoffkonzentration während des Wachstums ab (Vuong und Hellmich 2011). Andersherum nimmt mit Bildung der Osteoporose der Anteil an organischen Substanzen zu, zum einen durch die hohe Knochenumbaurate und zum anderen durch eine zunehmende Verfettung des Knochenmarkraumes (Yeung et al. 2005). Zusätzlich nimmt die anorganische Masse bei einer Osteoporose ab (Faibish et al. 2006). Durch die hohe Knochenumbaurate kommt es zu einer verkürzten Mineralisationsphase des Knochens (Boivin und Meunier 2003).

In diesem Versuch unterschied sich die anorganische Masse bei der Gabe der höchsten Zileutondosis von den OVX-Tieren signifikant und zeigte eine deutliche Verbesserung durch die Gabe der 100-fachen Dosis von Zileuton. Dadurch konnte Zileuton eine bessere Knochenmineralisierung erreicht werden, da durch Zileuton eine Hemmung der Osteoklasten hervorgerufen wurde (Moura et al. 2014).

Der Phosphat-, Calcium- und Magnesiumgehalt wurde weder durch die Ovariectomie noch durch die Zileutonbehandlung geändert. Es konnte keine Unterschiede in den Versuchsgruppen dargestellt werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch schon in der vorherigen Studie mit Baicalein, ein anderer 5-Lipoxygenashemmer, die den ausbleibenden Einfluss bei Inhibition von Lipoxygenasen auf den Phosphat-, Calcium- und Magnesiumgehalt zeigten (Zimmermann 2018).

Um die Knochenbildung und -mineralisierung besser zu eruieren, wurde die alkalische Phosphatase im Serum gemessen. Die alkalische Phosphatase ist ein Enzym, welches an verschiedenen Stoffwechselprozessen beteiligt ist, u. a. im Knochen. Bei Erkrankungen mit hohem Knochenumsatz kommt es zu einer Erhöhung der alkalischen Phosphatase. In dieser Untersuchung zeigten sich in der Zileuton-10 mg-Gruppe höhere Werte und wiesen auf eine erhöhte Knochenbildungsrate hin (Fernandez et al. 2014).

Da Osteocalcin beim Knochenaufbau von Osteoblasten sowohl in die Knochenmatrix eingebaut als auch teilweise ins Blut sezerniert wird, kann der Osteocalcinspiegel die Geschwindigkeit der Knochenbildung und eine Störung des Knochenstoffwechsels widerspiegeln (Civitelli et al. 2009). Bei unserer Osteocalcinbestimmung zeigten sich signifikant höhere Werte in der Zileuton-100 mg-Gruppe im Vergleich zur NON-OVX-Kontrollgruppe. Dies könnte auf einen erhöhten Knochenaufbau hindeuten.

4.4. Analyse der Knochenstruktur

Im Alter erhöht sich der Anteil an Fett im Muskel und Knochen und führt zu deren Atrophie (Lecka-Czernik et al. 2010; Sions et al. 2011). Bei der altersbedingten Osteoporose wurde ebenfalls ein erhöhter Fettanteil im Knochen und dem daraus resultierendem Knochenverlust gesehen. Insbesondere zeigte sich eine vermehrte Fettansammlung im Knochenmark (Meunier et al. 1971). In diesem Versuch wurde durch die Ovariectomie ebenfalls eine Erhöhung des Weichteilvolumens, insbesondere des Fettgewebes, hervorgerufen. Die Zileuton-10 mg-Behandlung verhindert diese Erhöhung und zeigte verglichen mit der OVX-Gruppe eine signifikante Verringerung des Weichteilvolumens. Dies könnte eine Verschiebung des Kollagenfettverhältnisses durch 10 mg Zileuton erklärt werden, indem es zu einer Zunahme des Kollagens führt, welches eine höhere Dichte als Fett hat. Durch die Gabe von Kollagenen und damit Erhöhung des Kollagenverhältnisses wurden die organischen Knochenanteile (Watanabe et al. 2010), den Knochenstoffwechsel und Knochenmikroarchitektur verbessert (Guillerminet et al. 2012; Han et al. 2009). Zudem zeigte sich in einer kontrollierten randomisierten Studie von König et al. 2018, dass die Einnahme von spezifischer Kollagenpeptide die BMD bei postmenopausalen Frauen erhöhte.

Der Wirbelkörper besteht zu 75% aus trabekulärem Knochen. Dieser ist wie ein Schwamm feingliedrig angeordnet, besitzt eine größere Oberfläche und ist einem hohen Umbauumsatz ausgesetzt. Die Knochenbälkchen sind über Knochenpunkte miteinander verknüpft und stabilisiert. Je mehr Trabekelknoten und Bälkchen ausgebildet sind, desto stabiler ist der Knochen. Kortikaler Knochen ist dicht, bis zu 90% kalzifiziert und unterliegt einem sehr langsamen Umbau. So kommt es im Laufe der Zeit zu einem höheren Knochenverlust an spongiösem Knochen (Bartl und Bartl 2011).

Innerhalb weniger Wochen entwickeln ovariektomierte Ratten eine schwere Osteopenie mit signifikantem Verlust von trabekulärem und kortikalem Knochen (Wronski et al. 1985). Dieses bestätigte sich auch in dieser Untersuchung durch eine verminderte Trabekel- und Knochendichte sowie BV/TV in der ovariektomierten Ratte. Die Änderungen der Kortikalisparametern haben nicht das Signifikanzniveau erreicht, da osteoporotische Veränderungen im Spongiosaknochen schneller auftreten (Bartl und Bartl 2011). Die Gesamt-BMD wurde durch die Ovariektomie signifikant im Vergleich zur NON-OVX-Gruppe erniedrigt, welche durch die Gabe von Zileuton nicht geändert werden konnte. Lediglich in der Zileuton 10 mg/kg KG Gruppe war die Gesamt-BMD im Vergleich zur ovariektomierten Gruppe signifikant erhöht. Die Metabolite der 5-Lipoxygenase wurden bei Bonewald et al. 1997 und Traianedes et al. 1998 als negative Regulatoren der Knochenbildung beschrieben (Bonewald et al. 1997; Traianedes et al. 1998). In den Untersuchungen von Cottrell et al. 2013 konnte jedoch keine Unterschiede der BMD bei der Hemmung von 5-Lipoxygenase gesehen werden (Cottrell et al. 2013)

Zileuton führte in keiner Dosierung zu einer Verbesserung der Knochenparameter und zeigte eine Reduktion des Kortikalisvolumens sowie der Kortikalisdichte in der niedrigsten Dosis (1 mg/kg KG) im Vergleich zur NON-OVX-Gruppe.

Dies deckt sich mit den Ergebnissen der weiterführenden Untersuchungen von Saul et al. 2021. Hier konnten weder kortikale Veränderungen durch die Gabe von Zileuton noch durch die Kombinationstherapie von Zileuton und Balcalein gezeigt werden. Auch die längere Behandlungsdauer von 13 Wochen ergaben keine Auswirkung auf die Kortikalis der Wirbelkörper.

Im Gegensatz dazu wurde ein positiver Effekt auf die Knochenheilung im Femur nach Hemmung der 5-Lipoxygenase aufgewiesen (Cottrell und O'Connor 2009). In einer in-vivo Studie von Wixted et al. 2009 wurde ebenfalls gezeigt, dass durch den Einsatz von Zileuton als 5-Lipoxygenasehemmer zu einer Förderung der Frakturheilung durch eine verstärkte chondroide Phase und schnellerer Knochenbildung führte.

In den 2D-Scans zeigte die OVX-Gruppe kleinere Kortikalisflächen als die NON-OVX- Gruppe, während die Zileutonbehandlung in der Dosierung von 1 mg zur weiteren Reduktion der Fläche führte. Die Tiere mit einer Behandlung von 10 mg Zileuton wiesen eine vergleichsweise gleich große Gesamt-Kortikalisfläche wie die NON-OVX-Tiere auf.

Entsprechend der Fläche war auch die ventrale Kortikalisdicke der OVX-Gruppe kleiner als in der NON-OVX-Gruppe. Bei der dorsalen Kortikalisdicke und Kortikalisdichte wurden niedrige Werte in der 1 mg-Zileuton-Gruppe gemessen. Dieses lässt vermuten, dass Zileuton in der niedrigen

Dosierung zu einer Abnahme von kortikalem Knochen führt. Höhere Dosierungen haben weniger Wirkung auf den kortikalen Knochen gezeigt. In einer Studie von Lee et al. (2012) wurden Mäuse untersucht, bei denen das Gen herunterreguliert wurde, welches die 5-Lipoxygenase kodiert. Hier zeigte sich in den genveränderten Mäusen keine Änderung der kortikalen Knochen. Im Gegensatz wurde bei Bonewald et al. (1997) bei Mäusen mit fehlendem 5-Lipoxygenase-Gen erhöhter kortikaler Knochen gemessen.

Bei der Trabekelanalyse zeigte die Ovariectomie einen negativen Effekt. Auch die Gabe von Zileuton (1 mg und 10 mg) konnte im Vergleich zu NON-OVX-Gruppe die Trabekeln nicht positiv beeinflussen. Dennoch fiel auf, dass bei der Gabe von 100 mg Zileuton/kg KG die Anzahl der Trabekelkreuzungen, die -dichte und die -fläche signifikant höher als bei 1 mg Zileuton/kg KG waren. Insbesondere war die Trabekelfläche der 100 mg Zileutongruppe signifikant größer als die OVX-Gruppe.

Sowohl die vergangene als auch die aktuelle Studie von Saul et al. (2018 und 2021) bestätigen den positiven Einfluss von Zileuton als Lipoxygenasehemmer auf den trabekulären Knochen im Femur und Wirbel. In der aktuellen Studie von Saul et al. (2021) bei einer Gabe von 10 mg Zileuton/kg KG wurde eine Verbesserung der Trabekeldichte, der Anzahl an Trabekelkreuzungen und der Trabekeldicke im Wirbel in der OVX-Gruppe beobachtet. Dies kann jedoch auch an der Dauer der Behandlung von 13 Wochen liegen. Weiter zeigte Saul et al. 2021, dass die positiven kortikalen Effekte am Femur und der Knochenheilung an der Tibia aus früheren Versuchen (Saul et al. 2018) sich nicht bestätigen ließen. Die Studie von Lee et al. (2012) beschrieb, dass im in-vivo Mäuseexperiment 5-Lipoxygenasehemmer die RANKL-induzierte Osteoklastenbildung inhibiert. Auf die genaue Auswirkung auf die Trabekel- oder Kortikalisstruktur wird jedoch nicht eingegangen (Lee et al. 2012).

4.5. Schlussfolgerung

In unserem Versuch konnte eine positive Wirkung bei der Gabe von 100 mg/kg KG Zileuton auf die Trabekelfläche nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu verschlechtert eine niedrige Dosierung von 1 mg/kg KG die Trabekel- und Kortikalisparametern.

Durch die Ovariectomie kam es zu einer Erhöhung des Weichteilvolumens. Zileuton 10 mg wirkte entgegen.

Aufgrund des Östrogenmangels nimmt der organische Knochenanteil zu und der anorganische Knochenanteil bei einer Osteoporose typischerweise ab (Svanberg et al. 1994). Bei der Behandlung mit hochdosiertem Zileuton (100 mg/kg KG) kommt es zu einer Erhöhung des anorganischen Knochengewichtes.

Bei der Messung der alkalischen Phosphatase im Serum zeigten sich erhöhte Werte in der Zileuton-10 mg-Gruppe. Dies und die erhöhten Osteocalcinwerte in der Zileuton-100 mg-Gruppe weisen auf eine erhöhte Knochenbildungsrate hin (Fernandez et al. 2014).

Durch den Kompressionstest wurden die biomechanischen Eigenschaften des Wirbelkörpers untersucht, woraus hervorging, dass durch die Ovariectomie ohne Zugabe von Zileuton zu einer Verminderung der Maximalkraft in der OVX-Gruppe im Vergleich zur NON-OVX-Gruppe kam. Zusammenfassend zeigte sich beim Einsatz von 100 mg/kg KG Zileuton letztlich ein nur milder positiver Effekt auf den osteoporotischen Knochen. Die Dosis von 10 mg Zileuton pro kg KG zeigte keinen Einfluss auf die Knochenparametern, während der Einsatz von 1 mg Zileuton pro kg KG nicht zu empfehlen ist, da diese einen negative Effekt im Bezug auf die Osteoporose ausübt.

5. Zusammenfassung

Die Osteoporose gehört laut Weltgesundheitsorganisation zu den zehn häufigsten Erkrankungen bei postmenopausalen Frauen über 50 Jahren. Dabei spielen bei der Entstehung der Erkrankung neben dem Östrogenmangel in der Postmenopause auch die Beeinflussung des Immunsystems insbesondere der Interleukin- vermittelten Immunreaktion eine entscheidende Rolle. Einer dieser wichtigen Interleukine stellt die 5-Lipoxygenase dar, welches die Osteoklastenaktivität aktiviert.

Zileuton ist ein 5-Lipoxygenasehemmer, welches in der USA seit den 1997 in der Asthmatherapie zugelassen. Durch eine Hemmung der 5-Lipoxygenase wird angenommen, dass gleichzeitig der Knochenabbau gehemmt wird, da die Stimulation der Osteoklastenaktivität reduziert wird.

In diesem Versuch wurde der Einfluss von Zileuton in verschiedenen Dosierungen auf Wirbelkörper im ovariectomiertem Rattenmodell für postmenopausale Osteoporose untersucht. Die Wirbelkörper wurden für die Analysen genommen, weil sie am häufigsten von der Osteoporose betroffen sind.

Hierfür wurden insgesamt 69 weibliche, 3 Monate alte Sprague Dawley Ratten für insgesamt 13 Wochen beobachtet und in 5 Gruppen eingeteilt.

Nach 1 Woche Eingewöhnungszeit erfolgte die bilaterale Ovariectomie zum Auslösen der Osteoporose. 13 Tiere dienten als Kontrollgruppe und wurden nicht ovariectomiert (NON-OVX).

Hiernach wurden 13 Tiere in die OVX-Gruppe, 14 OVX Tiere in die Gruppe mit 1mg/kg KG Zileuton, 14 OVX Tiere in die Gruppe mit 10 mg/kg KG Zileuton und 15 OVX Tiere in die Gruppe mit 100 mg/kg KG Zileuton eingeteilt.

8 Wochen nach der Ovariectomie wurde Zileuton in den jeweiligen Konzentrationen über das sojafreie Futter über 5 Wochen verabreicht.

Anschließend wurden die Wirbelkörper entnommen und gesäubert. Der 2. Lendenwirbelkörper wurde zur Veraschung, der 3. für den Kompressionstest und der 4. Lendenwirbelkörper zur 2D- und 3D-CT-Analyse gesammelt.

In der Veraschungsanalyse wurden sowohl die organischen und anorganischen Anteile als auch Phosphat, Calcium und Magnesium gemessen. Es wurden signifikant höhere anorganische Anteile in der Gruppe mit 100mg/kg KG Zileuton gegenüber der ovariectomierten Gruppe gesehen. Auch zwischen der OVX- und der NON-OVX-Gruppe zeigten sich signifikante Unterschiede der anorganischen und organischen Anteile. So war die organische Substanz in der OVX-Gruppe deutlich höher und die anorganische signifikant niedriger als in der NON-OVX-Kontrollgruppe. Die Anteile an Phosphat, Calcium und Magnesium unterschieden sich innerhalb der Gruppen nicht. Die erhöhten Serumwerte an alkalischer Phosphatase in der 10 mg Zileutongruppe weisen auf eine höhere Knochenbildungsrate im Vergleich zu den übrigen Gruppen hin. Auch bei der Messung des Osteocalcins, welches ein Parameter für den Knochenaufbau ist, zeigte sich bei der Gabe von hochdosiertem Zileuton (100 mg) eine positive Wirkung mit erhöhten Osteocalcinwerten.

Zuletzt erfolgte durch eine 3D-, dann durch eine 2D-CT-Analyse die Untersuchung des Einflusses von Zileuton auf die Knochenstrukturen. Es zeigten sich Unterschiede innerhalb der Zileutongruppen. Nach der Gabe von hochdosiertem Zileuton mit 100 mg konnte eine höhere Trabekeldichte gemessen werden. Außerdem bestätigte die Untersuchung die Zunahme an Weichteilvolumen bei allen ovariectomierten Tieren im Vergleich zur NON-OVX-Gruppe, die durch den Hormonmangel entsteht. Durch die Gabe von 10 mg/kg KG Zileuton reduzierte sich das Weichteilvolumen im Vergleich zur OVX-Gruppe zwar signifikant, dennoch kann die Gabe von Zileuton die Knochenparametern nicht eindeutig verbessern.

Der kortikale Volumenanteil und der gesamte Knochenvolumenanteil konnte durch die Gabe von Zileuton (10 und 100 mg/kg KG) bei den OVX Ratten nicht verändert werden, während die Gabe von 1mg Zileuton zu einer Reduktion des Kortikalisvolumens im Vergleich zu den übrigen Gruppen führte.

Zusammenfassend konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass Zileuton als 5- Lipoxygenase-Inhibitor einen milden Effekt auf die osteoporotischen Trabekelstrukturen bei der Gabe von 100 mg/kg KG hat, was zusammen mit der Erhöhung des anorganischen Gewichtes und Osteocalcin auf eine gesteigerte Knochenbildungsrate hindeutet. Zileuton 10 mg änderte die Knochenparametern kaum und verbesserte lediglich nur die Weichteilparameter und die Alkalische Phosphatase. Die Zileutongabe von 1 mg/kg KG ist nicht zu empfehlen, da diese eher einen negativen Effekt auf osteoporotische Knochen ausübt.

Da sich die Auswirkung von Zileuton auf osteoporotische Knochen als marginal erwiesen hat, sollte die Sinnhaftigkeit der weiteren Forschung diesbezüglich kritisch hinterfragt werden.

6. Anhang

Tabelle A1: Ergebnisse des Kompressionstests: Mittelwert \pm Standardfehler

	NON-OVX	OVX	Zileuton 1 mg/kg KG	Zileuton 10 mg/kg KG	Zileuton 100 mg/kg KG
Elastizität (N)	317,5 \pm 33,1	246,8 \pm 26,3	264,1 \pm 23,6	254,1 \pm 23,9	229,4 \pm 22,8
Streckgrenze (N)	231,3 \pm 16,9	185,2 \pm 12,0	207,3 \pm 15,6	193,2 \pm 15,6	203,1 \pm 9,9
Maximalkraft (N)	246,3 \pm 14,2	187,8 \pm 12,0*	211,6 \pm 16,4	196,6 \pm 15,9	209,9 \pm 8,8

* signifikant im Vergleich zu NON-OVX

Tabelle A2: Ergebnisse der Serumanalyse: Mittelwert \pm Standardfehler

	NON-OVX	OVX	Zileuton 1 mg/kg KG	Zileuton 10 mg/kg KG	Zileuton 100 mg/kg KG
Alkalische Phosphatase (mmol/l)	91,1 \pm 5,5	129,8 \pm 9,6	127,7 \pm 13,7	140,3 \pm 12,4*	122,8 \pm 6,6
Osteocalcin (ng/ml)	112,5 \pm 16,9	194,9 \pm 12,6	169,5 \pm 14,7	161,4 \pm 37,4	196,3 \pm 18,3*
Ca (mmol/l)	2,02 \pm 0,05	2,05 \pm 0,07	2 \pm 0,05	2,04 \pm 0,04	2,13 \pm 0,04
Mg (mmol/l)	0,7 \pm 0,02	0,8 \pm 0,03	0,7 \pm 0,03	0,7 \pm 0,03	0,8 \pm 0,02
P (mmol/l)	1,6 \pm 0,06	1,8 \pm 0,1	1,7 \pm 0,08	1,6 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1

* signifikant im Vergleich zu NON-OVX

Tabelle A3: Ergebnisse der Veraschung: Mittelwert \pm Standardfehler

	NON-OVX	OVX	Zileuton 1 mg/kg KG	Zileuton 10 mg/kg KG	Zileuton 100 mg/kg KG
organischer Anteil (%)	65,2 \pm 0,43	69,90 \pm 0,79*	69,31 \pm 0,46*	69,63 \pm 0,55*	67,62 \pm 0,41**
anorganischer Anteil (%)	34,80 \pm 0,43	30,10 \pm 0,79*	30,69 \pm 0,46*	30,37 \pm 0,55*	32,38 \pm 0,41**
PO ₄ (%)	59,6 \pm 1,4	58,7 \pm 1,2	59,9 \pm 1,03	59,5 \pm 1,8	58,5 \pm 1,5
Ca (%)	32 \pm 1,4	32,8 \pm 0,6	33,3 \pm 0,5	34,1 \pm 1,8	32,7 \pm 0,8
Ca/PO ₄	1.285 \pm 0,05	1.33 \pm 0,01	1.32 \pm 0,01	1.35 \pm 0,04	1.33 \pm 0,01
Mg (%)	0,8 \pm 0,008	0,8 \pm 0,008	0,79 \pm 0,006	0,78 \pm 0,01	0,79 \pm 0,007

* signifikant im Vergleich zu NON-OVX; # signifikant im Vergleich zu OVX

Tabelle A4: Ergebnisse der 3D-Analyse: Mittelwert \pm Standardfehler

	NON-OVX	OVX	Zileuton 1 mg/kg KG	Zileuton 10 mg/kg KG	Zileuton 100 mg/kg KG
Weichteilvolumen (mm ³)	40,2 \pm 2,2	69,1 \pm 4,1*	61,8 \pm 2,4*	55,4 \pm 3,1**	59,8 \pm 1,6*
Weichteil BMD (g/cm ³)	0,09 \pm 0,005	0,1 \pm 0,006	0,12 \pm 0,006*	0,13 \pm 0,005**	0,11 \pm 0,002*
Trabekelvolumen (mm ³)	38 \pm 1,3	38 \pm 1,4	39,7 \pm 1,4	37,6 \pm 0,7	28,4 \pm 1,4
Trabekel BMD (g/cm ³)	0,644 \pm 0,005	0,626 \pm 0,003*	0,622 \pm 0,003*	0,624 \pm 0,003*	0,631 \pm 0,002*
Kortikalisvolumen (mm ³)	20,2 \pm 1,6	15,7 \pm 1,1	12,2 \pm 0,7*	15,1 \pm 1,3*	16 \pm 0,9
Kortikalis BMD (g/cm ³)	1.069 \pm 0,003	1.043 \pm 0,008	1.027 \pm 0,005*	1.061 \pm 0,009*	1.068 \pm 0,006*
BV/TV (%)	59,24 \pm 1,7	43,87 \pm 1,1*	45,83 \pm 1,0*	49,01 \pm 1,9*	46,11 \pm 0,6*

*signifikant im Vergleich zu NON-OVX; # signifikant im Vergleich zu OVX; + signifikant im Vergleich zu Zileuton 1 mg/kg KG

Tabelle A5: Ergebnisse der 2D-Analyse: Mittelwert \pm Standardfehler

	NON-OVX	OVX	Zileuton 1 mg/kg KG	Zileuton 10 mg/kg KG	Zileuton 100 mg/kg KG
Kortikalisflä- che (mm ²)	2,77 \pm 0,08	2,43 \pm 0,07	1,91 \pm 0,07	2,54 \pm 0,09	2,47 \pm 0,07
Kortikalisdic-ke dorsal (mm)	0,17 \pm 0,004	0,19 \pm 0,004	0,15 \pm 0,007*#	0,18 \pm 0,006 ⁺	0,18 \pm 0,003 ⁺
Kortikalisdic-ke ventral (mm)	0,35 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01*	0,23 \pm 0,01*	0,27 \pm 0,01*	0,25 \pm 0,01*
Kortikalisdich- te (%)	92,8 \pm 0,5	90,6 \pm 0,5	86,6 \pm 1*#	91,8 \pm 0,6 ⁺	90,7 \pm 0,6 ⁺
Trabekelflä- che (mm ²)	3,517 \pm 0,1092	1,669 \pm 0,2218*	1,740 \pm 0,2165*	2,025 \pm 0,07803*	1,713 \pm 0,08897*
Dichte der Trabekelkno- ten (N.Nd/mm ²)	9,378 \pm 0,3365	7,690 \pm 0,6344*	6,731 \pm 0,7060*	7,397 \pm 0,2811*	5,812 \pm 0,3268* ^{#‡}
Anzahl der Trabekelkno- ten (N.Nd)	33,10 \pm 1,671	14,00 \pm 2,633*	12,75 \pm 2,049*	15,04 \pm 0,9098*	10,23 \pm 0,9465*
mittlere Trabekeldic-ke (mm)	0,13 \pm 0,007	0,09 \pm 0,003*	0,09 \pm 0,004*	0,08 \pm 0,002*	0,1 \pm 0,005* ^x

* signifikant im Vergleich zu NON-OVX; # signifikant im Vergleich zu OVX; + signifikant im Vergleich zu Zileuton 1 mg/kg KG, x signifikant im Vergleich zu Zileuton 10 mg/kg KG

7. Literaturverzeichnis

Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group (1994) World Health Organ Tech Rep Ser 843, 1–129

Bartl R, Bartl C: Osteoporose: Prävention - Diagnostik - Therapie ; 12 Tabellen. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl; Thieme, Stuttgart New York 2011: 4-26

Bartl R, Bartl C (Hrsg.): Klinische Osteologie: Entstehung, Diagnostik, Prävention und Therapie aller Knochenerkrankungen. Thieme, Stuttgart New York 2014: 23

Bartl R, Bartl C: Das Osteoporose Manual: Biologie, Diagnostik, Prävention und Therapie. Springer, Berlin [Heidelberg] 2021: 33, 49-55, 61-66

Bartl R, Tresckow E von, Bartl C: Bisphosphonat-Manual: Wirkungen - Indikationen - Strategien; Springer, Berlin Heidelberg 2006: 6, 98

Baum E, Peters K (2009): Primäre Osteoporose – leitliniengerechte Diagnostik und Therapie. Dtsch Arztebl 105, 573-82

Benninghoff A, Drenckhahn D: Anatomie Band 1. 15., korr. Auflage; Elsevier Verlag, München u.a. 1994: 133,143, 266

Berg BN, Harmison CR (1957): Growth, disease, and aging in the rat. J Gerontol 12, 370–377

Berger W, Chandt MTMD, Cairns CB (2007): Zileuton: clinical implications of 5-Lipoxygenase inhibition in severe airway disease. Int J Clin Pract 61, 663–676

Blake GM, Fogelman I (2007): The role of DXA bone density scans in the diagnosis and treatment of osteoporosis. Postgrad Med J 83, 509–517

Boivin G, Meunier PJ (2003): The mineralization of bone tissue: a forgotten dimension in osteoporosis research. Osteoporos Int 14 Suppl 3, 19-24

Bonewald LF, Flynn M, Qiao M, Dallas MR, Mundy GR, Boyce BF (1997): Mice lacking 5-lipoxygenase have increased cortical bone thickness. Adv Exp Med Biol 433, 299–302

Boyce BF, Xing L (2007): The RANKL/RANK/OPG pathway. Curr Osteoporos Rep 5, 98– 104

Brash AR (1999): Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. J Biol Chem 274, 23679–23682

Chapurlat RD (2015): Odanacatib: a review of its potential in the management of osteoporosis in postmenopausal women. Ther Adv Musculoskelet Dis 7, 103–109

Chen S (2011): Natural Products Triggering Biological Targets- A Review of the Anti Inflammatory Phytochemicals Targeting the Arachidonic Acid Pathway in Allergy Asthma and Rheumatoid Arthritis. CDT 12, 288–301

Christ B (Hrsg.): Anatomie. 1: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem / [unter Mitarb. von B. Christ]. 17., durchges. Aufl; Elsevier, Urban & Fischer, München Jena 2008

- Cingi C, Muluk NB, Ipci K, Şahin E (2015): Antileukotrienes in upper airway inflammatory diseases. *Curr Allergy Asthma Rep* 15, 64
- Civitelli R, Armamento-Villareal R, Napoli N (2009): Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice. *Osteoporos Int* 20, 843–851
- Cottrell JA, O'Connor JP (2009): Pharmacological inhibition of 5-lipoxygenase accelerates and enhances fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 91, 2653–2665
- Cottrell JA, Keshav V, Mitchell A, O'Connor JP (2013): Local inhibition of 5-lipoxygenase enhances bone formation in a rat model. *Bone Joint Res* 2, 41–50
- Danks L, Takayanagi H (2013): Immunology and bone. *J Biochem* 154, 29–39
- Del Fattore A, Cappariello A, Capulli M, Rucci N, Muraca M, De Benedetti F, Teti A (2014): An experimental therapy to improve skeletal growth and prevent bone loss in a mouse model overexpressing IL-6. *Osteoporos Int* 25, 681–692
- Dent CE, Friedman M (1965): Idiopathic juvenile osteoporosis. *Q J Med.* 34, 177-210
- DGN (2013): Skelettszintigraphie. S1-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin e.V.:https://www.nuklearmedizin.de/leistungen/leitlinien/docs/031-0221_S1_Skelettszintigraphie_04-2013.pdf?navId=53; abgerufen am 07.04.2022
- Döll CJ: Einfluss der vertikalen Ganzkörpervibration unterschiedlicher Frequenz auf den osteoporotischen Lendenwirbelkörper der Ratte. Med. Diss. Göttingen 2010
- Dörner K, Deufel T: *Klinische Chemie und Hämatologie: 73 Tabellen.* 8., überarb. Aufl; Thieme, Stuttgart 2013
- Drazen JM, Israel E, O'Byrne PM (1999): Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *N Engl J Med* 340, 197–206
- DVO (2017): Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen. S3-Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V.:https://www.dv-osteologie.org/dvo_leitlinien/dvo-leitlinie-2017; abgerufen am 15.08.2020
- Eastell R (1998): Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. *N Engl J Med* 338, 736–746
- Faibish D, Ott SM, Boskey AL (2006): Mineral changes in osteoporosis: a review. *Clin Orthop Relat Res* 443, 28–38
- Faienza MF, Ventura A, Marzano F, Cavallo L (2013): Postmenopausal Osteoporosis: The Role of Immune System Cells. *Clin Dev Immunol* 2013, 1–6
- Fekih Monia, Sahli H, Ben Mustapha N, Mestiri I, Fekih Moncef, Boubaker J, Kaabachi N, Sellami M, Kallel L, Filali A (2013): Bone metabolism, biochemical markers of bone resorption and formation processes and interleukine 6 cytokin level during coeliac disease. *Tunis Med* 91, 59–65

- Felsenberg D, Wieland E, Gowin W, Armbrecht G, Bolze X, Khorassani A, Weingarten U (1998): Morphometric analysis of roentgen images of the spine for diagnosis of osteoporosis-induced fracture. *Med Klin (Munich)* 93 Suppl 2, 26–30
- Fernández JM, Molinuevo MS, McCarthy AD, Cortizo AM (2014): Strontium ranelate stimulates the activity of bone-specific alkaline phosphatase: interaction with Zn(2+) and Mg (2+). *Biometals* 27, 601–607
- Freyschmidt J: *Skeletterkrankungen: klinisch-radiologische Diagnose und Differenzialdiagnose*. 4., vollständig überarbeitete Auflage; Springer, Berlin Heidelberg 2016: 2, 213
- Funk CD (2006): Lipoxygenase Pathways as Mediators of Early Inflammatory Events in Atherosclerosis. *ATVB* 26, 1204–1206
- Fürst B: Einfluss der vertikalen und horizontalen Ganzkörpervibration mit verschiedenen Frequenzen auf die Lendenwirbelsäule im Rattentiermodell. *Med. Diss. Göttingen* 2014
- Galal RA: Der Effekt von niedrigamplitudiger, hochfrequenter mechanischer Stimulation im Osteoporose-Rattenmodell. *Med. Diss. Göttingen* 2020
- Gallwitz WE, Mundy GR, Lee CH, Qiao M, Roodman GD, Raftery M, Gaskell SJ, Bonewald LF (1993): 5-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid stimulate isolated osteoclasts to resorb calcified matrices. *J Biol Chem* 268, 10087–10094
- Garcia C, Boyce BF, Gilles J, Dallas M, Qiao M, Mundy GR, Bonewald LF (1996): Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 11, 1619–1627
- Genotte T: Einfluss der horizontalen Ganzkörpervibration unterschiedlicher Frequenz auf den Lendenwirbelkörper der Ratte. *Med. Diss Göttingen* 2017
- Glaser DL, Kaplan FS (1997): Osteoporosis. Definition and clinical presentation. *Spine (Phila Pa 1976)* 22, 12S-16S
- Greenfield EM, Bi Y, Miyauchi A (1999): Regulation of osteoclast activity. *Life Sci* 65, 1087–1102
- Grüger T: In-vivo-Monitoring der Effekte von Östrogen, Daidzein und 4-MBC mittels Flächendetektor-Volumen-CT am Modell der ovariectomierten Ratte. *Med. Diss. Göttingen* 2014
- Guillerminet F, Fabien-Soulé V, Even PC, Tomé D, Benhamou C-L, Roux C, Blais A (2012): Hydrolyzed collagen improves bone status and prevents bone loss in ovariectomized C3H/HeN mice. *Osteoporos Int* 23, 1909–1919
- Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, Steinle T, Verheyen F, Linder R (2013): The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. *Dtsch Arztebl Int* 110, 52–57
- Han XL, Xu YJ, Wang JB, Pei XR, Yang RY, Li N, Li Y (2009): Effects of cod bone gelatin on bone metabolism and bone microarchitecture in ovariectomized rats. *Bone* 44, 942-7
- Hao F, Gu Y, Tan X, Deng Y, Wu Z-T, Xu M-J, Wang W-Z (2016): Estrogen Replacement Reduces Oxidative Stress in the Rostral Ventrolateral Medulla of Ovariectomized Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 2158971

Hattner R, Epker BN, Frost HM (1965): Suggested sequential mode of control of changes in cell behaviour in adult bone remodelling. *Nature* 206, 489–490

Hofmann AM: Der Einfluss von Parathormon, Strontiumranelat und Ganzkörpervibration auf den osteoporotischen Lendenwirbelkörper der ovariectomierten Ratte. Med. Diss. Göttingen 2017

International Osteoporosis Foundation (2018): Broken bones, broken lives – the fragility fracture crisis in six European countries. http://share.iofbonehealth.org/EU-6-Material/Reports/IOF%20Report_GERMAN_DIGITAL_DE.pdf; aufgerufen am 14.08.2020

Ismail AA, O’Neill TW, Cooper C, Finn JD, Bhalla AK, Cannata JB, Delmas P, Falch JA, Felsch B, Hoszowski K, et al. (1998): Mortality associated with vertebral deformity in men and women: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). *Osteoporos Int* 8, 291–297

Jagtap VR, Ganu JV, Nagane NS (2011): BMD and Serum Intact Osteocalcin in Postmenopausal Osteoporosis Women. *Indian J Clin Biochem* 26, 70–73

Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15, 175–191

Kang JH, Ting Z, Moon M, Sim J-S, Lee J-M, Doh K-E, Hong S, Cui M, Choi S, Chang HW, et al. (2015): 5-Lipoxygenase inhibitors suppress RANKL-induced osteoclast formation via NFATc1 expression. *Bioorg Med Chem* 23, 7069–7078

Kanis JA, Kanis JA (1994): Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: Synopsis of a WHO report. *Osteoporosis Int* 4, 368–381

Kim JH, Kim N (2016): Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. *Chonnam Med J* 52, 12–17

Klein RF, Allard J, Avnur Z, Nikolcheva T, Rotstein D, Carlos AS, Shea M, Waters RV, Belknap JK, Peltz G, Orwoll ES (2004): Regulation of bone mass in mice by the lipoxygenase gene *Alox15*. *Science* 303, 229–232

Kling JH: Einfluss des Lipoxygenaseinhibitors Baicalein in unterschiedlicher Dosierung auf den Skelettmuskel der ovariectomierten Ratte. Med. Diss. Göttingen 2016

Kolios L, Sehmisch S, Daub F, Rack T, Tezval M, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Equol but not genistein improves early metaphyseal fracture healing in osteoporotic rats. *Planta Med* 75, 459–465

Komrakova M, Stuermer EK, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, Tezval M, Daub F, Martens T, Witzhausen P, et al. (2010): Effect of human parathyroid hormone hPTH (1-34) applied at different regimes on fracture healing and muscle in ovariectomized and healthy rats. *Bone* 47, 480–492

Komrakova M, Weidemann A, Dullin C, Ebert J, Tezval M, Stuermer KM, Sehmisch S (2015): The Impact of Strontium Ranelate on Metaphyseal Bone Healing in Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int* 97, 391–401

Komrakova M, Hoffmann DB, Nuehnen V, Stueber H, Wassmann M, Wicke M, Tezval M, Stuermer KM, Sehmisch S (2016): The Effect of Vibration Treatments Combined with

- Teriparatide or Strontium Ranelate on Bone Healing and Muscle in Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int* 99, 408–422
- Komrakova M, Stuermer EK, Tezval M, Stuermer KM, Dullin C, Schmelz U, Doell C, Durkaya-Burchhardt N, Fuerst B, Genotte T, Schmisch S (2017): Evaluation of twelve vibration regimes applied to improve spine properties in ovariectomized rats. *Bone Reports* 7, 172–180
- König D, Oesser S, Scharla S, Zdzieblik D, Gollhofer A (2018): Specific Collagen Peptides Improve Bone Mineral Density and Bone Markers in Postmenopausal Women-A Randomized Controlled Study. *Nutrients* 10, E97
- Kroegel C, König W, Jäger L (1997): Erweiterte Therapie des Asthma bronchiale. *Dtsch Arztebl* 94, A-1802; B-1523; C-1421
- Krönke G, Uderhardt S, Katzenbeisser J, Schett G (2009): The 12/15-lipoxygenase pathway promotes osteoclast development and differentiation. *Autoimmunity* 42, 383–385
- Langdahl B, Ferrari S, Dempster DW (2016): Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 8, 225–235
- Le P, Kawai M, Bornstein S, DeMambro VE, Horowitz MC, Rosen CJ (2012): A high-fat diet induces bone loss in mice lacking the Alox5 gene. *Endocrinology* 153, 6–16
- Lecka-Czernik B, Rosen CJ, Kawai M (2010): Skeletal aging and the adipocyte program: New insights from an „old“ molecule. *Cell Cycle* 9, 3648–3654
- Lee JM, Park H, Noh ALSM, Kang J-H, Chen L, Zheng T, Lee J, Ji S-Y, Jang C-Y, Shin CS, et al. (2012): 5-Lipoxygenase mediates RANKL-induced osteoclast formation via the cysteinyl leukotriene receptor 1. *J Immunol* 189, 5284–5292
- Lewiecki EM (2010): Bisphosphonates for the treatment of osteoporosis: insights for clinicians. *Ther Adv Chronic Dis* 1, 115–128
- Löffler G (Hrsg.): *Biochemie und Pathobiochemie: 8., völlig neu bearb. Aufl*; Springer-Medizin-Verl, Heidelberg 2007: 739, 743
- Lorenc RS (2002): Idiopathic juvenile osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 70, 395–397
- Love RR, Mazess RB, Barden HS, Epstein S, Newcomb PA, Jordan VC, Carbone PP, DeMets DL (1992): Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *N Engl J Med* 326, 852–856
- Mayer MD, Kukulka MJ, Amann MT, Machinist JM (1996): Human in vivo and in vitro metabolism of zileuton (abstr). *Proceedings of the 7th North American ISSX Meeting* 10, 315
- McClung M (2007): Role of RANKL inhibition in osteoporosis. *Arthritis Res Ther* 9, S3
- McGill KA, Busse WW (1996): Zileuton. *Lancet* 348, 519–524
- Meunier P, Aaron J, Edouard C, Vignon G (1971): Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clin Orthop Relat Res* 80, 147–154

- Minne HW, Pfeifer M, Begerow B, Pollähne W (2002): Osteoporose. *Orthopäde* 31, 681–699
- Moura AP, Taddei SRA, Queiroz-Junior CM, Madeira MFM, Rodrigues LFD, Garlet GP, Souza DG, Machado FS, Andrade I, Teixeira MM, Silva TA (2014): The relevance of leukotrienes for bone resorption induced by mechanical loading. *Bone* 69, 133–138
- Muller R, Kampschulte M, Khassawna TE, Schlewitz G, Hürter B, Böcker W, Bobeth M, Langheinrich AC, Heiss C, Deutsch A, Cuniberti G (2014): Change of mechanical vertebrae properties due to progressive osteoporosis: combined biomechanical and finite-element analysis within a rat model. *Med Biol Eng Comput* 52, 405–414
- Muñoz-Torres M, Alonso G, Raya MP (2004): Calcitonin therapy in osteoporosis. *Treat Endocrinol* 3, 117–132
- Omi N, Ezawa I (1995): The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. *Bone* 17, 163S–168S
- Ominsky MS, Boyce RW, Li X, Ke HZ (2017): Effects of sclerostin antibodies in animal models of osteoporosis. *Bone* 96, 63–75
- Pacifici R, Rifas L, McCracken R, Avioli LV (1990): The role of interleukin-1 in postmenopausal bone loss. *Exp Gerontol* 25, 309–316
- Park JH, Park KH, Cho S, Choi YS, Seo SK, Lee BS, Park HS (2013): Concomitant increase in muscle strength and bone mineral density with decreasing IL-6 levels after combination therapy with alendronate and calcitriol in postmenopausal women. *Menopause* 20, 747–753
- Ponnapakkam T, Katikaneni R, Sakon J, Stratford R, Gensure RC (2014): Treating osteoporosis by targeting parathyroid hormone to bone. *Drug Discov Today* 19, 204–208
- Riggs BL (2000): The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest* 106, 1203–1204
- Ringe JD, Bühring M (Hrsg.): *Osteoporose: Pathogenese, Diagnostik und Therapiemöglichkeiten*. de Gruyter, Berlin New York 1991: 7
- Ringe JD: *Osteoporose: postmenopausale Osteoporose, senile Osteoporose, sekundäre Osteoporose, Osteoporose des Mannes ; 70 Tabellen*. Thieme, Stuttgart New York 1995: 412
- Rubin P, Dubé L, Braeckman R, Swanson L, Hansen R, Albert D, Carter G (1991): Pharmacokinetics, safety, and ability to diminish leukotriene synthesis by zileuton, an inhibitor of 5-lipoxygenase. *Agents Actions Suppl* 35, 103–116
- Saul D, Gleitz S, Nguyen HH, Kosinsky RL, Schmisch S, Hoffmann DB, Wassmann M, Menger B, Komrakova M (2017): Effect of the lipoxygenase-inhibitors baicalein and zileuton on the vertebra in ovariectomized rats. *Bone* 101, 134–144
- Saul D, Ninkovic M, Komrakova M, Wolff L, Simka P, Gasimov T, Menger B, Hoffmann DB, Rohde V, Schmisch S (2018): Effect of zileuton on osteoporotic bone and its healing, expression of bone, and brain genes in rats. *J Appl Physiol* (1985) 124, 118–130

Saul D, Weber M, Zimmermann MH, Kosinsky RL, Hoffmann DB, Menger B, Taudien S, Lehmann W, Komrakova M, Sehmisch S (2019): Effect of the lipoxygenase inhibitor baicalein on bone tissue and bone healing in ovariectomized rats. *Nutr Metab (Lond)* 16, 4

Saul D, Hohl FE, Franz MK, Meyer I, Taudien S, Roch PJ, Sehmisch S, Komrakova M (2021): Inhibition of Lipoxygenases Showed No Benefit for the Musculoskeletal System in Estrogen Deficient Rats. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12, 706504

Schiebler TH, Junqueira LCU, Carneiro J, Schiebler TH, Schiebler TH: *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen; unter Berücksichtigung der Histophysiologie ; mit 21 Tabellen (Springer-Lehrbuch). 4., korr.aktualisierte Aufl; Springer, Berlin Heidelberg 1996: 202-208*

Sehmisch S, Erren M, Rack T, Tezval M, Seidlova-Wuttke D, Richter J, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Short-term effects of parathyroid hormone on rat lumbar vertebrae. *Spine (Phila Pa 1976)* 34, 2014–2021

Sehmisch S, Erren M, Kolios L, Tezval M, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2010): Effects of isoflavones equol and genistein on bone quality in a rat osteopenia model. *Phytother Res* 24 Suppl 2, S168-174

Simon B: *Intermittierende PTH-Applikation zur Osteopenie-Therapie im weiblichen Rattentiermodell. Med Diss. Göttingen 2017*

Singh VP, Patil CS, Kulkarni SK (2004): Effect of 5-lipoxygenase inhibition on events associated with inflammatory bowel disease in rats. *Indian J Exp Biol* 42, 667–673

Sions JM, Tyrell CM, Knarr BA, Jancosko A, Binder-Macleod SA (2012): Age- and stroke-related skeletal muscle changes: a review for the geriatric clinician. *J Geriatr Phys Ther* 35, 155–161

Stuermer EK, Komrakova M, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, Tezval M, Utesch C, Mangal O, Zimmer S, et al. (2010): Musculoskeletal response to whole-body vibration during fracture healing in intact and ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 87, 168–180

Svanberg M, Knuutila M (1994): Dietary xylitol prevents ovariectomy induced changes of bone inorganic fraction in rats. *Bone Miner* 26, 81–88

Traianedes K, Dallas MR, Garrett IR, Mundy GR, Bonewald LF (1998): 5-Lipoxygenase metabolites inhibit bone formation in vitro. *Endocrinology* 139, 3178–3184

Vaananen PM, Keenan CM, Grisham MB, Wallace JL (1992): Pharmacological investigation of the role of leukotrienes in the pathogenesis of experimental NSAID gastropathy. *Inflammation* 16, 227–240

Von Der Lippe E, Krause L, Prost M, Wengler A, Leddin J, Müller A, Zeisler M-L, Anton A, Rommel A, BURDEN 2020 Study Group (2021): Prävalenz von Rücken- und Nackenschmerzen in Deutschland. *Ergebnisse der Krankheitslast-Studie BURDEN 2020*

Vuong J, Hellmich C (2011): Bone fibrillogenesis and mineralization: quantitative analysis and implications for tissue elasticity. *J Theor Biol* 287, 115–130

- Watanabe-Kamiyama M, Shimizu M, Kamiyama S, Taguchi Y, Sone H, Morimatsu F, Shirakawa H, Furukawa Y, Komai M (2010): Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. *J Agric Food Chem* 58, 835–841
- Weber M: Der Einfluss von Baicalein auf die metaphysäre Frakturheilung im Osteoporosemodell der Ratte. Med. Diss. Göttingen 2019
- Weidemann A: Der Einfluss von Strontiumranelat auf die metaphysäre Frakturheilung osteopener Ratten. Med. Diss. Göttingen 2013
- Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC (1998): Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 102, 274–282
- Weßling T: Der Einfluss von Daidzein und 4-Methylbenzylidene Camphor auf die Lendenwirbelsäule ovariectomierter Sprague-Dawley-Ratten. Med. Diss. Göttingen 2012
- Wildner M, Clark DE (2001): Hip Fracture Incidence in East and West Germany: Reassessment Ten Years after Unification. *Osteoporos Int* 12, 136–139
- Wixted JJ, Fanning PJ, Gaur T, O’Connell SL, Silva J, Mason-Savas A, Ayers DC, Stein GS, Lian JB (2009): Enhanced fracture repair by leukotriene antagonism is characterized by increased chondrocyte proliferation and early bone formation: a novel role of the cysteinyl LT-1 receptor. *J Cell Physiol* 221, 31–39
- Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA (1985): Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 37, 324–328
- Xu W, Perera S, Medich D, Fiorito G, Wagner J, Berger LK, Greenspan SL (2011): Height loss, vertebral fractures, and the misclassification of osteoporosis. *Bone* 48, 307–311
- Yeung DKW, Griffith JF, Antonio GE, Lee FKH, Woo J, Leung PC (2005): Osteoporosis is associated with increased marrow fat content and decreased marrow fat unsaturation: a proton MR spectroscopy study. *J Magn Reson Imaging* 22, 279–285
- Yoshikawa S (1994): Idiopathic osteoporosis. *Nihon Rinsho* 52, 2400–2404
- Zimmermann MH: Einfluss der selektiven Inhibition proinflammatorischer Lipoxygenase auf den osteoporotischen Knochen im Ovariectomiemodell der Ratte. Med. Diss. Göttingen 2017
- Zingarelli B, Squadrito F, Graziani P, Camerini R, Caputi AP (1993): Effects of zileuton, a new 5-lipoxygenase inhibitor, in experimentally induced colitis in rats. *Agents Actions* 39, 150–156

Danksagung

Zunächst möchte mich ich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Sehmisch bedanken, der mir die Möglichkeit gab in seiner Arbeitsgruppe eine spannende, umfangreiche und lehrreiche experimentelle Doktorarbeit durchzuführen und bei Herrn Dr. Daniel Hofmann, der die Betreuung weiter übernommen hat.

Ein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Marina Komrakova für jegliche fachlich kompetente Unterstützung. Durch sie konnten Fragen schnell beantwortet und Probleme geklärt werden. Mit viel Geduld und Präzision hat sie zudem die Arbeit korrigiert.

Zudem bedanke ich mich bei Ramona Castro-Machguth für die Hilfe bei der Erstellung der 2D-Analyse und der Bilder und Anette Witt für die Ansprechbarkeit bei Formalitäten. Beide haben mir den Umgang mit den Tieren während des Experiments und die Methodik gelehrt und dadurch die Durchführung sehr erleichtert hat.

Zuletzt bedanke ich mich bei der Elisabeth Bonhoff Stiftung für die finanzielle Förderung des Projektes. Hierdurch konnte das Projekt erst realisiert werden.

Lebenslauf

Mein Name ist Hoai-Huong Hennig, geb. Nguyen, und wurde am 02.03.1991 als 3. Tochter von Cong-Tru Nguyen und Thi-Lan Tran-Nguyen, geb. Nguyen, im niedersächsischen Oldenburg geboren. Neben meinen älteren Brüdern Dai-Tri Nguyen, geb. 04.11.1988, und Huu-Tri Nguyen, geb. 04.03.1990, wurde meine kleine Schwester am 23.01.1996 geboren.

In Oldenburg nicht nur geboren, sondern auch aufgewachsen habe ich von 1997 bis 2001 zunächst die katholische Grundschule Harlingerstraße besucht und anschließend von 2001 bis 2003 die Orientierungsstufe Paulusschule. Von 2003 bis 2010 besuchte ich das katholische Gymnasium Liebfrauenschule Oldenburg, wo ich im Sommer 2010 die allgemeine Hochschulreife absolvierte.

Nach einem halbjährlichen ärztlichen Praktikum in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie im Pius Hospital Oldenburg habe ich im April 2011 mein Studium für Humanmedizin an der Georg-August Universität begonnen und im November 2017 das Staatsexamen absolviert. 2014 habe ich die praktischen Arbeiten der Dissertationen begonnen und 2015 abgeschlossen.

Seit dem 02.01.2018 arbeite ich, mit einer einjährigen Elternzeitunterbrechung nach der Geburt meines Sohnes, als Assistenzärztin in der Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie im Robert-Koch-Klinikum Gehrden.