

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Walter Jonat)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**ETABLIERUNG EINES KLINIKNAHEN MAUSMODELLS ZUR DETEKTION VON
KNOCHENUMBAU BEI OSTEOPOROSE UNTER BESONDERER
BERÜCKSICHTIGUNG DES FLUORESZIERENDEN BISPHOSPHONATES
OSTEOSENSE750™ ALS QUANTITATIVER MARKER**

**IM RAHMEN DES PROJEKTS „ETABLIERUNG KLINIKNAHER
BILDGEBUNGSVERFAHREN FÜR DIE MOLEKULARE, FUNKTIONALE UND
MIKROMORPHOLOGISCHE ANALYSE DES KNOCHENUMBAUS“**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität Kiel

Vorgelegt von

FRIEDERIKE-CORNELIA SEWENING GEB. GRUNDMANN

aus Tübingen

Kiel 2014

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Christian Schem, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Claus-Christian Glüer, Klinik für Diagnostische Radiologie/ MOINCC

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2014

Zum Druck genehmigt, Kiel, den _____

Gez. _____

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	S.01
2. Einleitung.....	S.02
2.1 Osteoporose.....	S.02
2.2 Knochenbestandteile.....	S.02
2.2.1 Osteoblasten.....	S.03
2.2.2 Osteoklasten.....	S.03
2.3 Molekulare Bildgebung und Osteosense750™.....	S.03
2.4 Ziele der Arbeit.....	S.04
3. Material und Methoden.....	S.05
3.1 Gegenstand der Untersuchung, Untersuchungsmaterial.....	S.05
3.1.1 Mäuse (<i>mus musculus</i>).....	S.05
3.1.2 Geräte.....	S.05
3.1.2.1 <i>In vivo</i> -Fluoreszenz-Molekular-Tomograf.....	S.05
3.1.2.2 VivaCT 40 (Mikro-Computertomograf).....	S.05
3.1.3 Substanzen.....	S.05
3.1.3.1 Narkose.....	S.05
3.1.3.2 Narkoseantagonisierung.....	S.06
3.1.3.3 Stimulanz der Knochenbildung.....	S.06
3.1.3.4 Fluoreszenzfarbstoffe.....	S.06
3.1.3.5 ELISA's (Enzyme linked Immunosorbant assay).....	S.06
3.1.3.6 Futter.....	S.06
3.1.3.7 Sonstiges.....	S.07
3.2 Methoden.....	S.07
3.2.1 Versuchsaufbau.....	S.07
3.2.2 Injektionen.....	S.08
3.2.2.1 OsteoSense750™.....	S.08
3.2.2.2 Narkose.....	S.08
3.2.2.3 Narkoseantagonisierung.....	S.08
3.2.3 Aktivitätsmessungen.....	S.09
3.2.3.1 OsteoSense750™-Totalfluoreszenz im Urin.....	S.09
3.2.3.2 Serum Osteocalcin.....	S.09
3.2.3.3 Serum Taträt-resistente saure Phosphatase (TRAP).....	S.09

3.2.3.4	Fluoreszenzmessungen mit dem FMT 2500™	S.09
3.2.4	Knochendichtemessung mit dem μ CT(Mikro-Computertomograf)	S.10
3.2.5	Auswertungsmethoden	S.11
3.2.5.1	FMT 2500™-Auswertung	S.11
3.2.5.2	μ CT-Auswertung	S.11
3.2.5.2.1	Auswertungsbereich „ganzes Knie“	S.12
3.2.5.2.2	Auswertungsbereich „Tibiascheiben“	S.13
3.2.5.2.3	Ausgewertete Knochenparameter	S.13
3.2.6	Statistische Methoden	S.14
3.2.6.1	μ CT-Datenverarbeitung	S.14
3.2.6.2	FMT-Datenverarbeitung	S.14
4.	Ergebnisse	S.15
4.1	Etablierung des Mausmodells	S.15
4.1.1	Die verschiedenen Auswertungsbereiche des μ CT	S.15
4.1.2	Etablierung des Mausmodells mit dem μ CT	S.16
4.1.2.1	Unterschiede der trabekulären Dicke der verschiedenen Gruppen in den unterschiedlichen Auswertungen	S.17
4.1.2.1.1	Auswertungsbereich „Ganzes Knie“	S.17
4.1.2.1.2	Auswertung der Tibiascheiben	S.19
4.1.2.1.2.1	Auswertungsbereich „Ganze Scheibe“	S.19
4.1.2.1.2.2	Auswertungsbereich „Trabekuläre Scheibe“	S.20
4.1.2.2	Vergleich der unterschiedlichen Grenzwerte zur Auswertung der Knochendichte	S.22
4.1.3	Etablierung des Mausmodells mit Serumparametern	S.24
4.1.3.1	Osteocalcin als Marker für die Osteoblastenaktivität	S.24
4.1.3.2	TRAP (Tartrat-resistente saure Phosphatase) als Marker für die Osteoklasten	S.25
4.2	OsteoSense 750™-Fluoreszenz	S.26
4.2.1	Entwicklung der OsteoSense 750™-Fluoreszenz der unterschiedlichen Gruppen über die Zeit des Versuches	S.27
4.2.1.1	OsteoSense 750™-Fluoreszenz der Kontrollgruppe	S.27
4.2.1.2	OsteoSense 750™-Fluoreszenz der Calciummangelgruppe	S.27

4.2.1.3	OsteoSense 750 TM -Fluoreszenz der Parathormongruppe.....	S.27
4.2.2	Vergleich der Unterschiede der OsteoSense 750 TM -Fluoreszenz zu den verschiedenen Messzeitpunkten zwischen den Gruppen.....	S.28
4.2.3	OsteoSense 750 TM -Fluoreszenz im Urin.....	S.30
5.	Diskussion.....	S.31
5.1	Mäuse.....	S.31
5.2	Methodenkritik.....	S.31
5.2.1	Mäusepositionierung im FMT2500 TM -Halter.....	S.31
5.2.2	Der Kniebereich als auszuwertende Region.....	S.32
5.2.3	Diskussion der μ CT-Auswertung.....	S.32
5.2.3.1	Auswertungsbereich „Ganzes Knie“.....	S.33
5.2.3.2	Auswertungsbereich „Tibiascheiben“.....	S.34
5.2.3.3	Kontroverse Diskussion der verschiedenen Grenzwerte.....	S.34
5.2.3.4	Auswahl der Strukturparameter.....	S.35
5.2.3.5	Große Standardabweichungen der Ergebnisse.....	S.35
5.3	Diskussion des Studiendesigns.....	S.36
5.3.1	Ovariectomie und calciumarme Diät.....	S.36
5.3.2	Parathormongabe.....	S.38
5.4	OsteoSense750 TM -Fluoreszenz.....	S.38
5.5	Ziele der Arbeit.....	S.42
5.5.1	Kann an diesem Mausmodell Osteoporose und Parathormontherapie dargestellt und analysiert werden?.....	S.42
5.5.2	Kann das fluoreszierende Bisphosphonatderivat OsteoSense750 TM als quantitativer <i>in vivo</i> Marker für Knochenumbau in Longitudinalstudien verwendet werden?.....	S.43
5.6	Ausblick.....	S.43
6.	Zusammenfassung.....	S.44
6.1	Methoden.....	S.44
6.2	Ergebnisse.....	S.44
6.3	Schlussfolgerungen.....	S.44
7.	Literaturverzeichnis.....	S.46
8.	Anhang.....	S.-1-
8.1	Tabellen.....	S.-1-
8.1.1	Tabellen der Kontrollgruppe.....	S.-1-

8.1.2 Tabellen der Calciummangelgruppe.....	S.-5-
8.1.3 Tabellen der Parathormongruppe.....	S.-8-
8.1.4 Vergleichende Tabellen der Gruppen untereinander.....	S.-12-
8.1.5 Osteosense™- Fluoreszenz.....	S.-19-
8.1.6 Zeitlicher Verlauf Osteosense™ links.....	S.-19-
8.1.7 Zeitlicher Verlauf Osteosense™ rechts.....	S.-21-
8.2 Graphen.....	S.-22-
8.2.1 Linke Seite.....	S.-22-
8.2.2 Rechte Seite.....	S.-27-
8.3 Anlage 1: Genehmigung des Tierversuches.....	S.-33-
8.4 Anlage 2: Osteocalcin ELISA.....	S.-35-
8.5 Anlage 3: TRAP ELISA.....	S.-41-
8.6 Lebenslauf.....	S.-50-
8.7 Danksagung.....	S.-54-

1. Abkürzungsverzeichnis:

Abb.: Abbildung

ad libitum: zur freien Verfügung

ANOVA: analysis of variance

BV: Bone Volume

BV/TV: Bone-Volume-Fraction

bzw.: beziehungsweise

ca.: circa

cm³: Kubikzentimeter

csv-Datei: comma-separated values

CT: Computertomograf

DA: Degree of Anisotropy

DXA: Dual energy X-ray absorptiometry

EDTA: Ethylendiamintetraacetat

ELISA: Enzyme Linked Immuno Essay

et al.: et alii/aliae/alia: und andere

FMT: Molekularer Fluoreszenz Tomograf

FOX N1: Forkhead box protein N1

HA: Hydroxylapatit h: hora

in vivo: im Lebendigen

i.p.: intraperitoneal

i.v.: intravenös

KG: Körpergewicht

kg: Kilogramm

Kontr.: Kontrollgruppe

kVp: Kilovolt peak

low Ca²⁺: Calciummangelgruppe

mg: Milligramm

ml: Milliliter ms: Millisekunde

ng: Nanogramm

nm: Nanometer

nM: Nanomolar

nmol: Nanomol

ovx: ovariectomiert

PBS: Phosphate buffered saline

PET: Positronen Emissions Tomografie

pmol: Pikomol

post injectionem: nach der Injektion

post Ovariectomie: nach der Ovariectomie

p-Wert: probability value:

Wahrscheinlichkeitswert

PTH: Parathormon/ Parathormongruppe

rpm: rounds per minute

s.c.: subkutan

SD: Standarddeviation,
Standardabweichung

s.o: siehe oben

Tab.: Tabelle Tab.n: Tabellen

Tb.Th*: Trabecular Thickness

t-Test: Hypothesentest

TRAP: Tartrat-resistente saure Phosphatase

TV: Totalvolume

U/l: Units / Liter

USA: United States of America

Voxel: Volume Pixel

WHO: World Health Organisation

z.B.: zum Beispiel

3D: dreidimensional

μA: Mikroampere

μCT: Mikro-Computertomograf

μg: Mikrogramm

μl: Mikroliter

μm: Mikrometer

↓Ca²⁺: Calciummangelgruppe

°: Grad *: signifikant ♀: weiblich

2. Einleitung

In Deutschland waren im Jahr 2003 7,8 Millionen Menschen aller über 50-Jährigen von Osteoporose betroffen, das sind 25,8 % aller Deutschen dieser Altersgruppe¹. 80 % aller Osteoporosen betreffen postmenopausale Frauen². 2003 wurden durch Osteoporose 5,4 Milliarden Euro Behandlungskosten verursacht, obwohl sich nur ein Bruchteil der Patienten in adäquater Behandlung befand. Den größten Kostenanteil verursachte die stationäre Therapie der mit Osteoporose assoziierten Frakturen. Somit gehört die Osteoporose zu den teuren Volkskrankheiten, nach Krebserkrankungen, Ischämischen Herzerkrankungen und dem Typ II Diabetes¹.

2.1 Osteoporose

Der Begriff Osteoporose (ὀστεοπόρωση) kommt aus dem Griechischen und wird von den Worten für Knochen (ὀστούν) und porös (πορώδης) gebildet³. Er ist beschreibend und verdeutlicht das histopathologische Hauptmerkmal der Osteoporose: das Poröserwerden des Knochens und die Rarefizierung der Trabekel. Dies wurde 1885 erstmals vom deutschen Pathologen Gustav Pommer so bezeichnet⁴. Albright *et al.* beschrieben in den vierziger Jahren erstmals einen Zusammenhang zwischen der Postmenopause und Osteoporose⁵. Die Definition der WHO (World Health Organisation) für Osteoporose lautet: Ein mittels Dualröntgen-Absorptiometrie (DXA, dual energy X-ray absorptiometry) bestimmter T-Wert der Knochendichte von $< -2,5$ Standardabweichungen (SD) vom Durchschnitt einer gesunden, jungen Referenzgruppe bedeutet Osteoporose. Bei einem T-Wert von -1 bis -2,5 SD spricht man von Osteopenie. Kommen zu einem T-Wert von $< -2,5$ SD Frakturen hinzu, ist die Osteoporose als schwer definiert⁶.

Osteoporose ist die häufigste Knochenerkrankung im höheren Lebensalter². Sie ist eine metabolische Osteopathie mit lokalisierter oder generalisierter Verminderung von Knochengewebe ohne Veränderung seiner Gesamtform und dadurch verminderter mechanischer Belastbarkeit des Knochens mit Neigung zu Verformungen und Frakturen^{7,8}. Im Tiermodell ist die Ovariectomie eine anerkannte Methode, um Östrogenmangel und dadurch Osteoporose herbeizuführen⁹⁻¹³.

2.2 Knochenbestandteile

Das Knochengewebe setzt sich aus Zellen (Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten) und mineralisierter Extrazellulärmatrix, bestehend aus Hydroxylapatitkristallen und Kollagenfibrillen, zusammen. Hydroxylapatit besteht aus Calcium-, Hydroxyl- und Phosphatkristallen¹⁴.

2.2.1 Osteoblasten

Osteoblasten sind die knochenbildenden Zellen. Sie bilden neue Knochenmasse, indem sie Kollagen synthetisieren und seine Mineralisation steuern. Sie sind 20 µm groß, sitzen auf der freien knöchernen Oberfläche und können nach Stimulation durch Osteozyten die Osteoklasten aktivieren. Osteocalcin wird von Osteoblasten sezerniert und ist ein Serummarker für den Knochenaufbau¹⁵. Hydroxylapatit ist das Hauptmineralprodukt der Osteoblasten und somit ein guter biologischer Marker für ihre Aktivität. Werden die Osteoblasten von nachfolgenden Generationen eingemauert, heißen sie Osteozyten¹⁴.

2.2.2 Osteoklasten

Osteoklasten bauen mineralisierte Matrix ab und sind 100 µm große mehrkernige Zellen¹⁴. Sie sezernieren Säure und Proteasen zum Knochenmatrixabbau^{16,17}. Ein weitverbreiteter Marker für Osteoklasten und somit für den Knochenabbau ist die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)¹⁸.

2.3 Molekulare Bildgebung und OsteoSense750™

Das Erforschen des Zusammenspiels der verschiedenen Zelltypen des Knochens an Gewebe *in vivo* ist aufgrund der Komplexität des Mikromilieus und der Vielzahl an interagierenden Zellen besonders interessant. Knochenauf- und -abbau findet in eng regulierter Weise statt, wie die gekoppelte Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten zeigt^{14,19}. Mehrere pathologische Zustände stören die Balance zwischen Knochenresorption und Knochensynthese, wie z.B. Osteoporose, rheumatoide Arthritis oder auch Knochenmetastasen^{20,21}. Diese Vorgänge lassen sich durch molekulare Bildgebung nicht destruiend *in vivo* auf molekularer und zellulärer Ebene visualisieren und messen²²⁻²⁴.

Kürzlich wurden einige neue Marker für die molekulare Bildgebung im Nahinfrarotbereich (700-1000 nm) eingeführt. Der Vorteil ist die geringe Autofluoreszenz des Körpers in diesem Wellenlängenbereich, die besonders durch Hämoglobin, Wasser und Fett bestimmt wird^{25,26}. Fluoreszierende Bisphosphonatderivate wie das Pamidronat lagern sich an die Oberfläche der kalzifizierten Knochenmatrix an²⁷. Fluoreszierende Tetrazyclinderivate bilden Komplexe mit dem Kalzium der neu gebildeten Knochenoberfläche. Sie stellen die knochenbildende Aktivität der Osteoblasten dar^{24,28-30}. Da die verabreichte Bisphosphonatdosis unter einem Prozent der klinischen Dosis liegt, ist es sehr unwahrscheinlich, dass sie den Knochenstoffwechsel beeinflusst.

Multimodales Herangehen an das makroskopische und mikroskopische Abbilden von Krankheiten verbessert die Quantifizierung der Intensitätslevel optischer Marker durch Anpassen an die Abschwächung von Bindegewebe und Knochen. Da bei der Fluoreszenztomografie nichtionisierende Strahlen verwendet werden, besteht im Gegensatz zur Positronen Emissions Tomografie (PET), Computer Tomografie (CT) oder Skelettszintigrafie keine Strahlenbelastung. Folglich sind längerfristige Longitudinalstudien und Mehrfachmessungen möglich, ohne Versuchstiere durch ionisierende Strahlung zu belasten. Serummarker wie Osteocalcin oder Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) sind zwar sensitiv, bieten aber keine anatomische Lokalisationsmöglichkeit wie die molekulare Fluoreszenz Tomografie (FMT). Zudem ist durch Veränderungen des Knochenmetabolismus im FMT2500™ früher ersichtlich, ob auf eine antiosteolytische Therapie angesprochen wird, als sich dies durch Veränderungen der Serumparameter erkennen lässt³¹.

In dem nachfolgend beschriebenen Versuch sollte untersucht werden, ob sich OsteoSense750™, ein mit dem molekularen Fluoreszenztomografen FMT2500™ gemessenes fluoreszierendes Bisphosphonatderivat³², als quantitativer Marker für Knochenabbau und für nachfolgenden Knochenwiederaufbau in Longitudinalstudien eignet. Wenn ja, dann wären frühzeitige Aussagen über Knochenveränderungen und deren Ausmaß ohne Strahlenbelastung für die zu beobachtenden Individuen möglich.

Im Versuch wurde der Knochenabbau durch Ovariectomie und dessen Wiederaufbau durch tägliche subkutane Gaben von Parathormon herbeigeführt. Um einen Vergleich zu haben, wurde direkt nach jedem FMT2500™-Scan eine Messung mit einem *in vivo* μ -Computertomografen gemacht und wöchentlich die Serummarker Osteocalcin und Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) bestimmt.

2.4 Ziele der Arbeit:

Ziel dieser Arbeit ist die Beantwortung folgender zwei Fragen:

- 1. Ist das verwendete Mausmodell geeignet, um Osteoporose und Parathormontherapie zu erzeugen und zu analysieren?**
- 2. Kann das fluoreszierende Bisphosphonatderivat OsteoSense750™ als quantitativer *in vivo* Marker für Knochenabbau in Longitudinalstudien verwendet werden?**

3. Material und Methoden

3.1 Gegenstand der Untersuchung, Untersuchungsmaterial

3.1.1 Mäuse (*mus musculus*)

Es wurden 23 Wochen alte, weibliche Nacktmäuse des Typs CD 1 nu/nu (Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, USA) für die Untersuchung verwendet. Die Tiere hatten *ad libitum* Zugang zum jeweiligen Futter und Wasser und wurden in einem 12 h Licht / 12 h Dunkelheit Rhythmus pathogen arm gehalten. Die CD 1 nu/nu Mäuse für die Calciummangelgruppe und die Parathormongruppe wurden von Charles River standardisiert, unter Berücksichtigung der Tierschutzrichtlinien, im Alter von drei Wochen ovariektomiert. Es sind keine Hormonmessungen erfolgt, um den Erfolg der Ovariektomie zu kontrollieren.

3.1.2 Geräte

3.1.2.1 *In vivo*-Fluoreszenz-Molekular-Tomograf

Es wurde das FMT 2500™ (*In vivo*-Fluoreszenz-Molekular-Tomograf der Firma Perkin Elmer, Massachusetts, USA) verwendet. Das molekulare *in vivo* Fluoreszenztomografie-System von Perkin Elmer ist ein Fluoreszenztomograf für präklinische Mausstudien. Es ist ein Klasse I Laser Produkt mit zwei Klasse IIIb Nah-infrarot Laserdioden, die kontinuierlich Licht mit Wellenlängen von 670 +/- 5 nm und 745 +/- 5 nm aussenden und bei 715 +/- 25 nm und 775 +/- 5 nm emittieren.

Die Mäuse wurden aus verschiedenen Winkeln mit dem ausgewählten Laser abgetastet und mit einer Nahinfrarotkamera mit Filter für langwellige Strahlung fotografiert. Die Aufnahmen wurden später mit der FMT-Software TrueQuant 3.1 (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) zu einem 3D-Bild fusioniert³³.

3.1.2.2 VivaCT 40 (Mikro-Computertomograf)

Es wurde das VivaCT 40 (Scanco Medical, Brüttisellen, Schweiz) verwendet, ein mit Röntgenstrahlung arbeitender Computertomograf (CT) mit einer Auflösung bis zu 8 µm und 2000 Projektionen pro 180°. Mit der µCT-Software Image Processing Language v 5.15 (Scanco Medical, Brüttisellen, Schweiz) wurden aus den Projektionen überlagerungsfreie Schnittbilder erzeugt.

3.1.3 Substanzen

3.1.3.1 Narkose

Dormicum (Midazolam, 1mg/ml) der Firma Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland;

Dosierung: 5,0 mg/kg KG (Körpergewicht) i.p. (intra peritoneal)

Fentanyl (0,05 mg/ml) der Firma Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland;

Dosierung: 0,05 mg/kg KG i.p.

Dormitor (Medetomidin, 1mg/ml) ein veterinärmedizinisches Präparat der Firma Pfalzer, Karlsruhe, Deutschland;

Dosierung: 0,5mg/ kg KG i.p.

3.1.3.2 Narkoseantagonisierung

Anexate (Flumazenil, 0,1 mg/ml) der Firma Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland;

Dosierung: 0,5 mg/kg KG s.c. (subkutan)

Naloxon (0,4 mg/ml) der Firma Cura Med, Karlsruhe, Deutschland;

Dosierung: 1,2 mg/kg KG s.c.

Antisedan (Atipamezol, 5 mg/ml) veterinärmedizinisches Präparat der Firma Pfalzer, Karlsruhe, Deutschland;

Dosierung: 2,5 mg/kg KG s.c.

3.1.3.3 Stimulanz der Knochenbildung

Parathormon der Firma Calbiotech, Spring Valley, USA;

Dosierung: einmal täglich 80 µg/kg KG s.c.

3.1.3.4 Fluoreszenzfarbstoff

OsteoSense750™ Fluorescent Imaging Agent der Firma Perkin Elmer, Massachusetts, USA; (Produkt-Nr. NEV 10053)

Dosierung: alle zwei Wochen 2 nmol/150 µl in 1x PBS i.v. (intravenös)
pro Maus

3.1.3.5 ELISA's (Enzyme linked Immunosorbant assay)

Mouse TRAP™ Assay Tartrat-resistente saure Phosphatase (Katalog-Nr. SB-TR103)

der Firma Immunodiagnostic Systems, Frankfurt, Deutschland;

Osteocalcin ELISA (Katalog-Nr. EIA-4010) der Firma DRG Instruments GmbH

Marburg, Deutschland;

3.1.3.6 Futter

Chlorophyllarmes Futter (Katalog-Nr. E15051) der Firma Ssniff, Soest, Deutschland;

Chlorophyll- und calciumarmes Futter (Katalog-Nr.E15051-low Ca²⁺) der Firma Ssniff, Soest, Deutschland;

Die Mäuse der Kontroll- und Parathormongruppe erhielten chlorophyllarmes Futter, da sich in Vorversuchen herausstellte, dass normales Mäusefutter im FMT Autofluoreszenz aufweist. Das chlorophyll- und calciumarme Futter wurde der Calciummangelgruppe ab Woche null verabreicht.

3.1.3.7 Sonstiges

<i>Augensalbe</i>	Bepanthen Augensalbe mit 5 % Dexpanthenol der Firma Bayer, Leverkusen, Deutschland;
<i>Blutabnahme</i>	EDTA-beschichtete Mikrovetten CB300 der Firma Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland;
<i>Serumentnahme</i>	Mikrovetten CB 300Z der Firma Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland;

3.2 Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (s. Anlage 1).

3.2.1 Versuchsaufbau

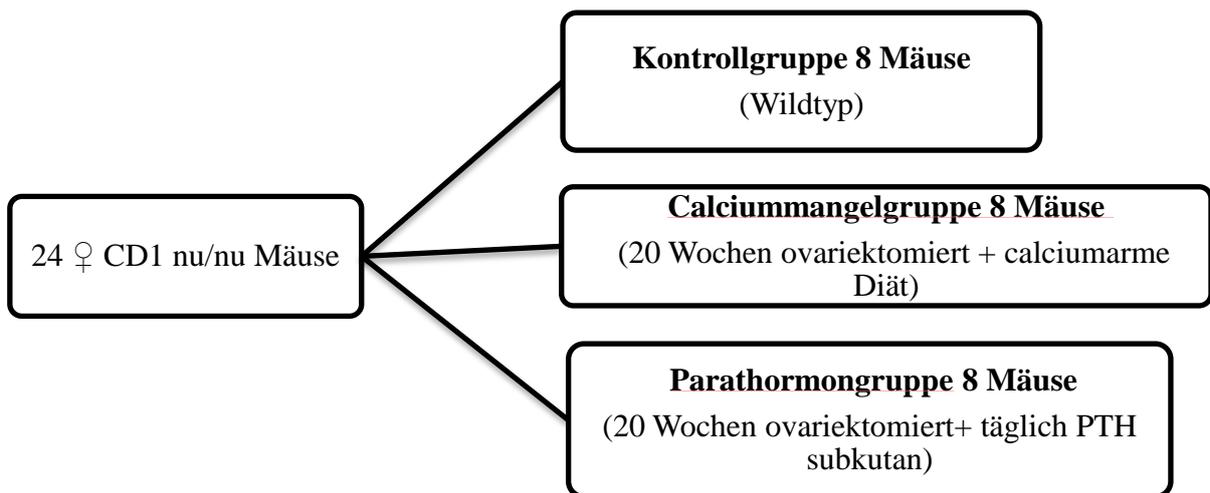


Abbildung (Abb.) I: Aufgliederung in die Mäusegruppen

Die Mäuse wurden in drei Gruppen aufgeteilt (Abb. I): Die Kontrollgruppe, bestehend aus acht Wildtyp-Mäusen, die Calciummangelgruppe, bestehend aus acht ovariektomierten Mäusen, die ab Woche null eine calciumarme Diät erhielten, und die Parathormongruppe, bestehend aus acht ovariektomierten Mäusen, die ab Woche null täglich 80 µg/kg Parathormon (PTH) subkutan erhielten.

3.2.2 Injektionen

3.2.2.1 OsteoSense750™

Der Versuch lief über fünf Wochen. Der Parathormongruppe wurde täglich Parathormon subkutan injiziert. An Tag vier bekamen die Calciummangel- und die Parathormongruppe und an Tag fünf die Kontrollgruppe in zweiwöchigem Abstand OsteoSense750™ i.v. injiziert. Wöchentlich wurde an Tag eins die Calciummangelgruppe, an Tag zwei die Parathormongruppe und an Tag drei die Kontrollgruppe im FMT und μ CT gemessen (s. (siehe) Abb. II). In Woche null und vier wurde am fünften Tag allen Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen. Die OsteoSense750™-Fluoreszenz hatte sich in Vorversuchen der Arbeitsgruppe nach vier bis fünf Tagen am stärksten gezeigt.

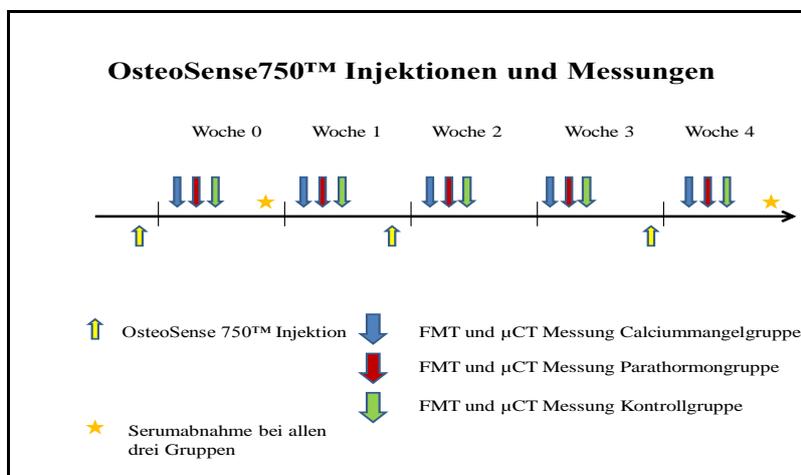


Abb. II: OsteoSense750™ Injektionen und Messungen.

Am Ende dieses Versuches wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation euthanisiert, ihre Knochen entnommen und für eventuelle Histologie in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren.

3.2.2.2 Narkose

Die Narkose wurde in Eppendorfkolben angesetzt und *intraperitoneal*, nach aktuellem Mäusegewicht dosiert, verabreicht. Den narkotisierten Mäusen wurde Augensalbe appliziert, und sie wurden zwischen den Messungen zur Aufrechterhaltung ihrer Körpertemperatur auf Wärmematten gelegt.

3.2.2.3 Narkoseantagonisierung

Nach den Messungen wurde den Mäusen die mit ihrem aktuellen Körpergewicht berechnete Antagonistendosierung subkutan injiziert. Sie wurden in einem separaten Käfig belassen, bis die Narkosewirkung vollständig antagonisiert war.

3.2.3 Aktivitätsmessungen

3.2.3.1 OsteoSense™-Totalfluoreszenz im Urin

Alle drei Gruppen wurden nach jeder i.v. OsteoSense™-Injektion für vier Stunden zur Sammlung ihres Urins in einem metabolischen Käfig gehalten. Die OsteoSense™ 750 Fluoreszenz wurde von 10µl Urin im FMT2500™ bestimmt und mit der Urinmenge multipliziert.

3.2.3.2 Serum Osteocalcin

In Woche null und vier wurde den Mäusen aller Gruppen 50 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen und zur Serumgewinnung fünf Minuten bei 2500 rpm (rounds per minute) zentrifugiert. Die Osteocalcin-Konzentration wurde mit dem Osteocalcin (mouse) ELISA von DRG nach der Anleitung des Herstellers bestimmt (s. Anlage 2).

3.2.3.3 Serum Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)

Die TRAP-Konzentration wurde mit dem Mouse TRAP™ Assay von Immunodiagnostics nach Anleitung des Herstellers bestimmt (s. Anlage 3).

3.2.3.4 Fluoreszenzmessungen mit dem FMT 2500™

Die narkotisierten Mäuse wurden in der FMT-Imagekassette (s. Abb. III), mit Hilfe von angepassten Gießharzblöcken, auf dem Bauch liegend mit möglichst gestreckten Extremitäten positioniert. Der zu messende Bereich musste in der Mitte der Längsachse platziert werden. Es wurde versucht, die Mäuseknie auf gleiche Höhe und möglichst weit an die obere Deckplatte zu bringen, um dort die Pfoten mittels Pflaster auf dem Gießharzblock zu fixieren. Der Kassettendeckel wurde dann bis in Position 15/17 festgeschraubt, ohne die Atmung der Mäuse zu behindern. Dann wurde die Kassette mit der Maus in Rückenlage und dem Kopf zuerst in das FMT geschoben.

Nach Auswahl des Lasers (750 nm für OsteoSense™) und der zu messenden Probe, für die das FMT vorher kalibriert worden war, wurde eine Übersichtsaufnahme der Maus zur Überprüfung der korrekten Positionierung und Optimierung der Scanzeit angefertigt. Bei erforderlichen Korrekturen wurde nachpositioniert, bis beide Kniebereiche mit genügend Femur und Tibia/Fibula³⁴ für den Marker OsteoSense750™ bei 750 nm in ca. sieben Minuten gescannt werden konnten.

3.2.4 Knochendichtemessung mit dem μ CT (Mikro-Computertomograf)

Es wurde ein Kontrollskript mit folgenden Einstellungen erstellt: Energie: 70 kVp, I (Stromstärke): 114 μ A; Integrationszeit: 250 ms; 0,5 mm Aluminium Filter; hohe Auflösung; Diameter: 38,9 mm; Voxelgröße: 19 μ m. Nach Präkalibrierung des Gerätes, das wöchentlich mit einem Dichtephantom rekaliert wurde, musste innerhalb von 20 Minuten mit der ersten Messung begonnen werden.

Die Mäuse wurden aus dem FMT2500™, in der Kassette ohne Veränderung ihrer Position verbleibend, in einen μ CT- Halter eingebracht und fixiert. Mit Hilfe eines Silikonabdrucks der FMT-Kassette war die Positionierung reproduzierbar (s. Abb. III).



Abb. III: Die FMT-Image Kassette (schwarz), hier im μ CT-Halter (außen, hellgrau) durch einen Silikonabdruck (gelb) fixiert.

Auch der μ CT-Halter wurde so in das μ CT geschoben, dass sich die Mäuse in Rückenlage befanden, und sie mit dem Kopf zuerst im Gerät lagen. Danach wurde eine Übersichtsaufnahme erstellt (s. Abb. IV) und kontrolliert, ob alles im scannbaren Bereich lag und die Knie auf einer Höhe waren. Der Scanbereich wurde so ausgewählt, dass sich beide Knie mit ausreichend Femur und Tibia/Fibula im scannbaren Bereich befanden und die Scan-Zeit nicht zu lang wurde. Diese betrug je nach Positionierung der Knie 20 bis 40 Minuten pro Maus.

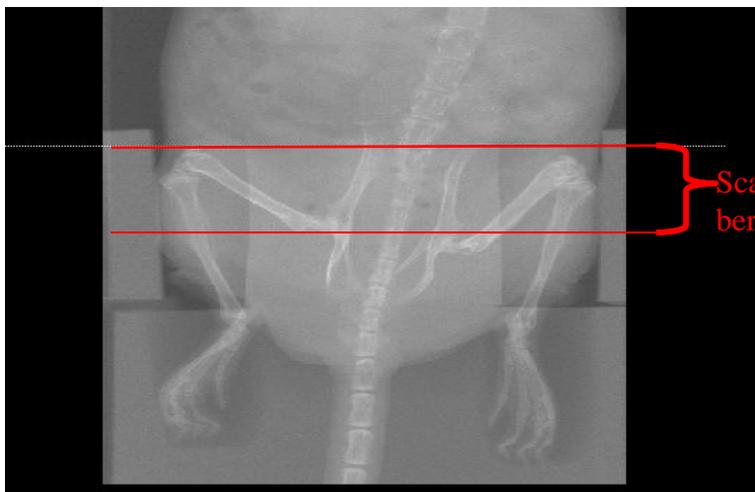


Abb. IV: Übersichtsaufnahme einer Maus im μ CT mit dem Scanbereich zwischen den beiden roten Linien.

3.2.5 Auswertungsmethoden

3.2.5.1 FMT 2500™-Auswertung

Nach der tomografischen Rekonstruktion der Scans wurde im TrueQuant 3.1 Programm (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) des FMT 2500™ jeder Scan aufgerufen, und von allen Tieren wurden fünf Volumen bestimmt: Kniebereich rechts und links, Tibiabereich rechts und links und ein Schwanzwirbelsäulenbereich (s. Abb. V). Diese Volumen wurden für alle FMT-Auswertungen aller Mäuse über die gesamte Versuchsdauer hindurch beibehalten.

Das Programm berechnet die Gesamtfluoreszenzmenge [mol] des Fluoreszenzfarbstoffes im vorgegebenen Volumen über folgende Formel:

Menge Fluoreszenzfarbstoff [mol] = Konzentration [M = mol/l] × festgelegtes Volumen [l].

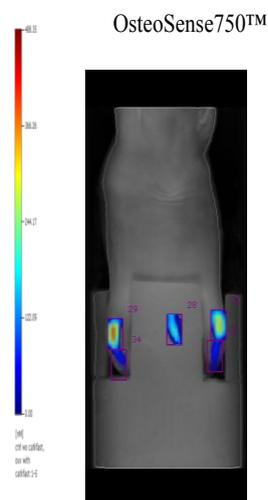


Abb.V: FMT-Auswertungsvolumen von OsteoSense750™.

Der Grenzwert wurde auf 40 nM (10^{-9} mol/l) gesetzt. Es wurden die statistischen Parameter Minimum, Maximum, Mittelwert und Standardabweichung der Fluoreszenz für alle Volumen Pixel (Voxel, ein Voxel ist ein dreidimensionaler Bildpunkt bestehend aus Höhe, Breite und Tiefe) in nM bestimmt und auf das vorgegebene Volumen bezogen³³. Die Ergebnisse werden in pmol angegeben.

3.2.5.2 μ CT-Auswertung

Nach der Rekonstruktion erfolgte die Evaluation mit der μ CT-Software Image Processing Language v 5.15 (Scanco Medical, Brüttisellen, Schweiz). Das μ CT von Scanco umfasst einen Grauwertbereich von -32768 bis 32767 (negative Werte entsprechen keinen reellen Zahlen, sondern entstehen durch Detektor-Rauschen³⁵). Die Grenzwerte werden in Prozent des maximalen Grauskala-Wertes angegeben. Folgende etablierte Volumen, die sich auch in

Vorversuchen als geeignet gezeigt hatten, wurden evaluiert: Ganzes Knie, Tibiascheibe gesamt (kortikal und trabekulär), Tibiascheibe trabekulär, Tibiascheibe kortikal.

3.2.5.2.1 Auswertungsbereich „ganzes Knie“

In diesem Auswertungsbereich galt es, das gesamte Knie mit kortikalem und trabekulärem Knochen zu erfassen. Da die Achsen der Femora nicht bei jeder Maus und in jeder Messung identisch lagen, war die Auswertung aus dem Originalscan nicht reproduzierbar. Durch das „Align principle axes and reimport“- Programm von Scanco Medical wurden die Femora aufgerichtet und als neuer Scan reimportiert. Bei jedem Scan wurde das Programm für jede Seite einer Maus einzeln durchgeführt. Es wurde ein Bereich ausgewählt, der vom Beginn der Patella (erste Schicht, in der die Patella zu sehen war) bis zur 100sten Schicht des Unterschenkels (erste Schicht des Tibiaplateaus plus 100 Schichten) reichte. Im reimportierten Scan wurden, vom Kniebeginn ausgehend, 180 Schichten des Femurs bestimmt. Die Länge des auszuwertenden Unterschenkelbereichs wurde schon vor dem Reimportieren festgelegt. Dann wurden alle Schichten mit einem Autokonturierungsprogramm mit dem unteren Grenzwert von 220 (22% des maximalen Grauskala-Wertes) und dem oberen Grenzwert von 1000 (100% des maximalen Grauskala-Wertes) konturiert (s. Abb. VI). Jede automatisch erstellte Kontur wurde überprüft und gegebenenfalls manuell korrigiert.

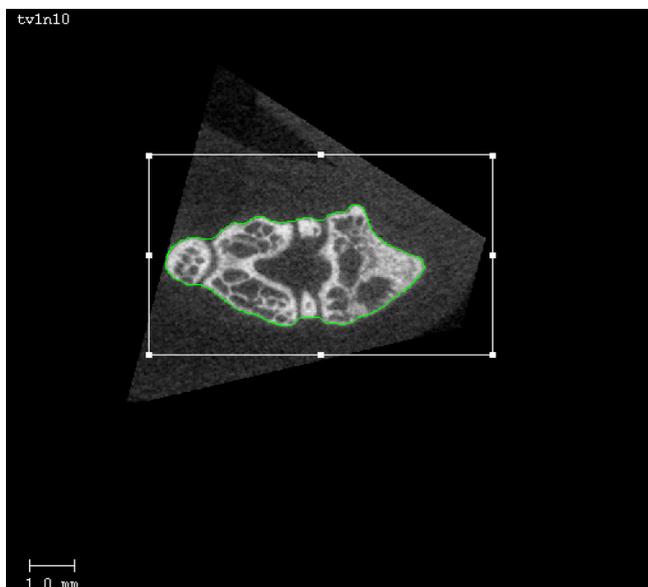


Abb. VI: μ CT-Reimport eines rechten Knies mit der Autokontur in grün. Es sind die Patella, der Femur und die Tibia zu sehen.

Nun wurde der auszuwertende Bereich so gewählt, dass alle Konturen erfasst waren, und es wurde der Bereich von Patellabeginn mit 100 Tibiaschichten und 180 Femurschichten ausgewertet. Hierfür wurden zwei verschiedene Auswertungen für Knochendichte und Knochenstrukturen einmal mit dem unteren Grenzwert von 220 und einmal mit dem unteren Grenz-

wert von 300 durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob sich in der Auswertung mit dem unteren Grenzwert von 220 früher Knochenveränderungen zeigen als mit dem unteren Grenzwert von 300.

3.2.5.2.2 Auswertungsbereich „Tibiascheiben“

Alle drei Tibiascheibenauswertungen stammen aus dem Originalscan. Der Auswertungsbereich umfasste 40 Schichten und begann 30 Schichten distal des Tibiaplateaus. In diesem Bereich lagen Teile der Epiphyse und der Metaphyse. Die Tibiascheiben wurden mit einem modifizierten Autokonturprogramm der publizierten „dual Grenzwert Methode“ von Buie und Boyd³⁶ konturiert. Das Programm trennt über verschiedene Parameter den kortikalen Knochen automatisch vom trabekulären Knochen. Diese Parameter wurden modifiziert, bis sich bei den Scans aus diesem Versuch automatisch gute Konturen ergaben:

1. maximal erwarteter kortikaler Porenradius -> 10 Voxel ;
2. Maximal erwartete trabekuläre Dicke -> 15 Voxel;
3. Minimale kortikale Dicke -> 10 Voxel.

Das Autokonturenprogramm erstellt Konturen für die gesamte Tibiascheibe, den kortikalen Ring und den trabekulären inneren Bereich (s. Abb. VII). Diese wurden dann einzeln erneut, einmal mit 220 und einmal mit 300 als unterem Grenzwert, ausgewertet.

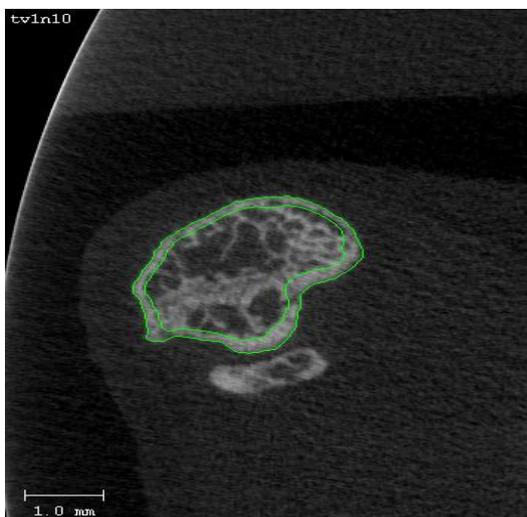


Abb. VII: Tibiascheibe rechts von Maus 10 der Calciummangelgruppe im μ CT; die grünen Konturen sind die modifizierten Autokonturen.

3.3.5.2.3 Ausgewertete Knochenparameter

Es wurde das Knochenvolumenverhältnis (BV/TV), die mittlere Dichte des Knochenvolumens in mg HA (Hydroxylapatit)/cm³ und die trabekuläre Dicke (Tb.Th*) in mm ausgewählt und statistisch weiterbearbeitet, da Knochenumbau in unabhängigen Parametern untersucht werden sollte. In das Knochenvolumenverhältnis geht sowohl die trabekuläre Anzahl als auch

die trabekuläre Form ein, die trabekuläre Dicke wird unabhängig bestimmt³⁷. Da die Parameter unabhängig voneinander bestimmt werden, wird die Aussagekraft übereinstimmender Ergebnisse verstärkt.

3.2.6 Statistische Methoden

Die Ergebnisse der Auswertungen des μ CT's wurden mit der μ CT-Software Image Processing Language v 5.15 (Scanco Medical, Brüttisellen, Schweiz) in text-Dateien und die Ergebnisse der Auswertungen des FMT's mit der FMT-Software TrueQuant 3.1 (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) in csv-Dateien exportiert. Im Rahmen der Verarbeitung wurden die Rohdaten in STATA (StataCorp. 2009. *Stata Statistical Software: Release 11*, College Station, Texas, USA: StataCorp LP) zusammengefasst und überprüft. Die zusammengefassten Daten wurden mit GraphPad InStat (Version 3.10 für Windows 95, GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) statistisch weiterverarbeitet.

3.2.6.1 μ CT-Datenverarbeitung

Die Rohdaten wurden in STATA zusammengefasst und folgendermaßen aufbereitet: Über die Mausidentität wurden die Gruppenzugehörigkeit und über die Messzeitpunkte die Wochen den Messungen zugeordnet. Die Grenzwerte wurden überprüft und doppelte Auswertungen über die Mausidentität, die Woche und die Zuordnung herausgefiltert. Nach der Aufbereitung wurde mit GraphPad InStat ein gepaarter zweiseitiger t-Test für die Entwicklung in jeder Gruppe über die Versuchsdauer und eine Varianzanalyse (ANOVA) zwischen den drei Gruppen zu jedem Messzeitpunkt durchgeführt, da von einer Normalverteilung der untersuchten Parameter ausgegangen werden konnte. Die Graphen wurden in Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) erstellt.

3.2.6.2 FMT2500™-Datenverarbeitung

Die Rohdaten wurden in STATA zusammengefasst und folgendermaßen aufbereitet: Aus dem csv-Dateinamen wurden der Messzeitpunkt und die Gruppenzugehörigkeit extrahiert und überprüft, ob alle Volumen bei allen Mäusen zu allen Zeitpunkten korrekt ausgewählt worden waren. Nach der Aufbereitung wurde mit GraphPad InStat ein gepaarter zweiseitiger t-Test in jeder Gruppe für die Entwicklung über die Versuchsdauer und eine Varianzanalyse (ANOVA) zwischen den drei Gruppen zu jedem Messzeitpunkt durchgeführt, da von einer Normalverteilung der untersuchten Parameter ausgegangen werden konnte. Die Graphen wurden in Microsoft Office Excel 2007 erstellt.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung des Mausmodells

4.1.1 Die verschiedenen Auswertungsbereiche des μ CT

Im Folgenden sind in Abbildung VIII bis XI die 3D Rekonstruktionen der verschiedenen μ CT-Auswertungsbereiche der linken Seite zu sehen. Mit dem unteren Grenzwert 220 werden alle Grauwerte zwischen 220 und 1000 (22-100% des maximalen Grauwertes) als Knochen erkannt, mit dem unteren Grenzwert 300 alle Grauwerte zwischen 300 und 1000 (30-100% des maximalen Grauwertes).

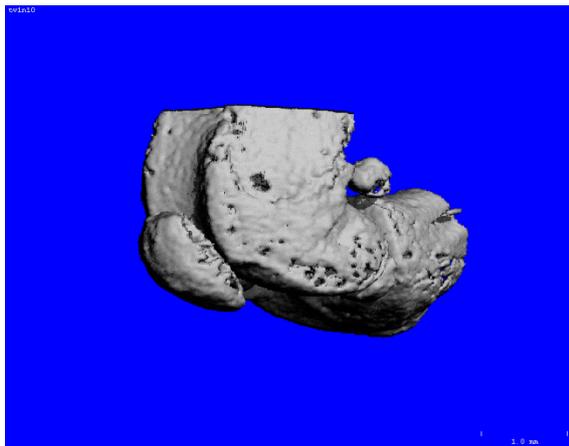
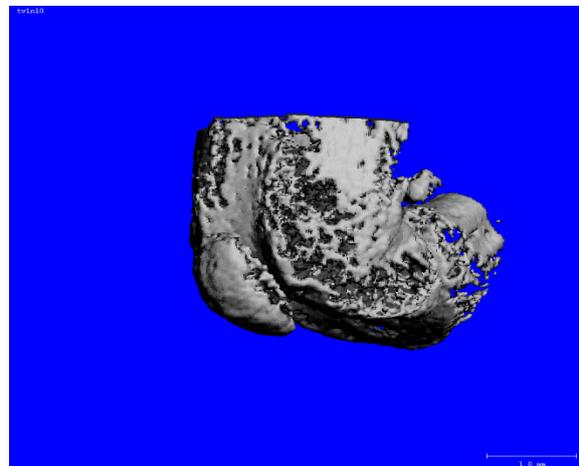


Abb. VIII: μ CT-Rekonstruktion des ganzen Knies links der Calciummangelgruppe in Woche null; Knie mit distalem Teil des Femurs, der Patella und proximalen Teilen von Tibia und Fibula, hier mit dem unteren Grenzwert 220 und dem oberen Grenzwert 1000.

Abb. IX: μ CT-Rekonstruktion des ganzen Knies links der Calciummangelgruppe in Woche null; Knie mit distalem Teil des Femurs, der Patella und proximalen Teilen der Tibia und Fibula, hier mit dem unteren Grenzwert 300 und dem oberen Grenzwert 1000.



Es wird im Vergleich der beiden Knierkonstruktionen sichtbar, dass mit dem unteren Grenzwert 300 deutlich weniger Graustufen als Knochen erkannt werden als mit dem Grenzwert 220.

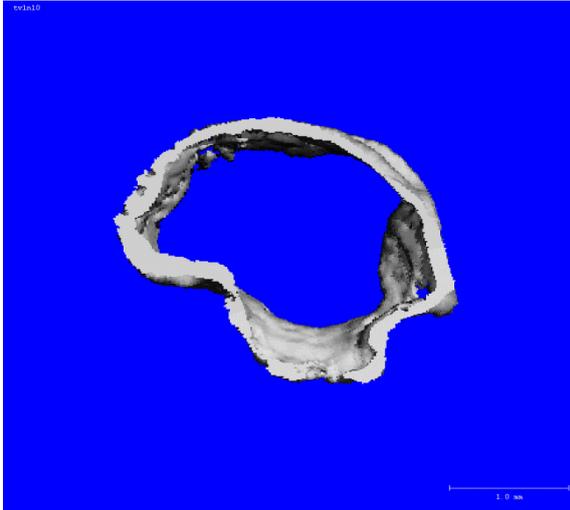


Abb. X: μ CT-Rekonstruktion des kortikalen Ringes links, über das modifizierte Autokonturprogramm (siehe oben (s.o.)) vom trabekulären Kern abgetrennt, Calciummangelgruppe in Woche eins; unterer Grenzwert 220.

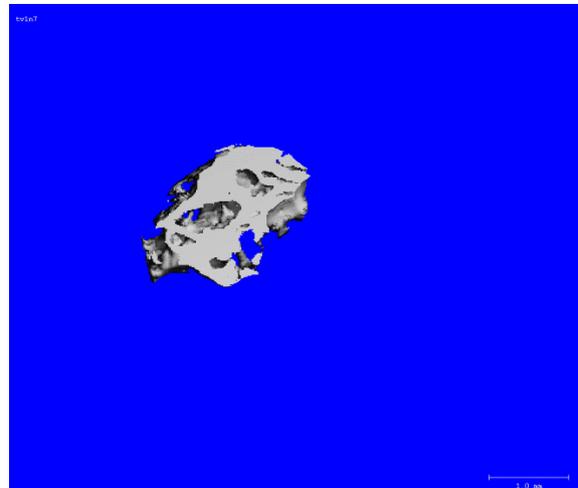


Abb. XI: μ CT-Rekonstruktion der trabekulären Scheibe rechts, ebenfalls mit dem modifizierten Autokonturprogramm, vom Kortex getrennt, Kontrollgruppe in Woche null; unterer Grenzwert 220.

4.1.2 Etablierung des Mausmodells mit dem μ CT

In den verschiedenen μ CT-Auswertungen zeigte sich, dass

1. die Kontrollgruppe über die Versuchsdauer keinen signifikanten Zugewinn oder Verlust der untersuchten Knochenparameter zeigt
2. die ovariectomierten Mäuse 20 Wochen *post Ovariectomie* zu Versuchsbeginn signifikant geringere Knochenparameter aufweisen
3. die untersuchten Knochenparameter der Calciummangelgruppe über die Versuchsdauer nicht weiter absinken, sondern tendenziell eher wieder ansteigen
4. die Parathormongruppe einen Anstieg aller Knochenparameter aufweist, und zwar bis auf das Level der Kontrollgruppe (siehe auch Graph eins bis 30 im Anhang).

Mit dem μ CT-Programm wurden aus allen vier Regionen folgende Parameter berechnet:

Die mittlere Dichte des Knochenvolumens [$\text{mg HA}/\text{cm}^3$],

das Knochen-Volumen-Verhältnis [1] (BV/TV: Bone-Volume-Fraction)

und die trabekuläre Dicke [mm] (Tb.Th*: Trabecular Thickness).

Zu den jeweiligen Parametern werden jeweils der Mittelwert +/- die Standardabweichung in Klammern und der p-Wert angegeben. Übersichtlichkeitshalber werden nur exemplarisch die wichtigsten μ CT-Auswertungsgraphen und Tabellen und nur die linke Seite in der Arbeit dargestellt (römisch nummeriert). Weitere Graphen und Tabellen, sowie Ergebnisse der rechten Seite finden sich mit arabischer Nummerierung im Anhang.

4.1.2.1 Unterschiede in der trabekulären Dicke der verschiedenen Gruppen in den unterschiedlichen Auswertungen

4.1.2.1.1 Auswertungsbereich „ganzes Knie“

Die trabekuläre Dicke, ausgewertet mit dem unteren Grenzwert 220, ist in Woche null bei den ovariectomierten Mäusen, also der Calciummangelgruppe mit 0,16 mm (+/- 0,02) und der Parathormongruppe mit 0,17 mm (+/- 0,01), signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe mit 0,19 mm (+/- 0,03) (p-Wert 0,0165). In den folgenden vier Wochen gibt es keine wesentliche Veränderung. In Woche vier beträgt die mittlere trabekuläre Dicke der Kontrollgruppe 0,20 mm (+/- 0,03) und die der Calciummangelgruppe 0,17 mm (+/- 0,02). Bei diesen beiden Gruppen zeigt sich im Auswertungsbereich „ganzes Knie“ keine deutliche Veränderung der trabekulären Dicke (s. Abb. XII u. Tab. I).

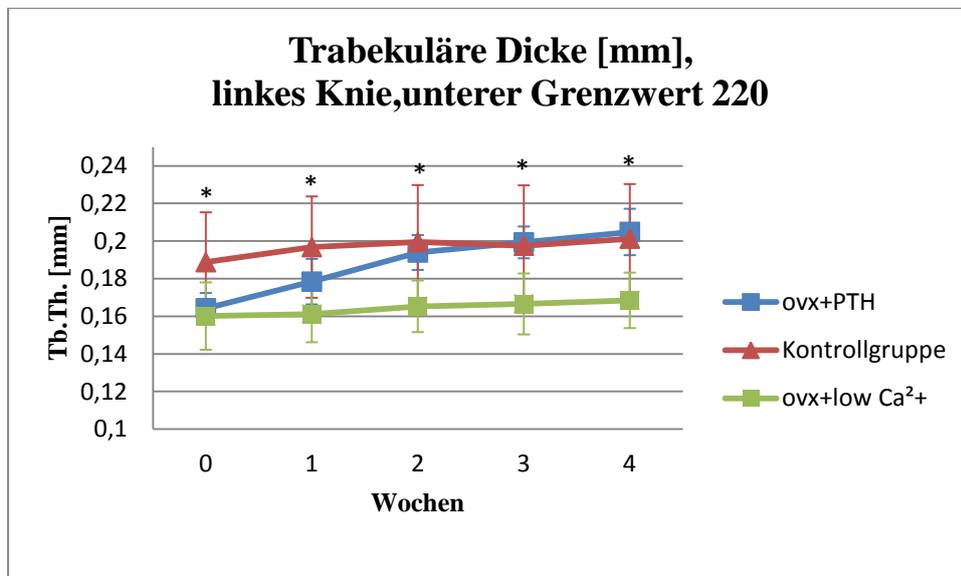


Abb. XII: Vergleich der trabekulären Dicke von Kontrollgruppe, Calciummangelgruppe und Parathormongruppe über den Verlauf der vier Versuchswochen im Auswertungsbereich „linkes Knie“ mit dem unteren Grenzwert 220. (Die Werte dazu finden sich in Tab. I); * zeigt eine statistische Signifikanz an.

Woche	0	1	2	3	4
Kontroll-	0,19	0,20	0,20	0,20	0,20
gruppe	(+/- 0,03)	(+/- 0,03)	(+/- 0,03)	(+/- 0,03)	(+/- 0,03)
Ovx+low	0,16	0,16	0,17	0,17	0,17
Ca2+	(+/- 0,02)	(+/- 0,02)	(+/- 0,01)	(+/- 0,02)	(+/- 0,02)
Ovx +	0,17	0,18	0,19	0,20	0,21
PTH	(+/- 0,01)	(+/-0,01)	(+/- 0,01)	(+/- 0,01)	(+/- 0,01)
p-Wert	0,0165*	0,0080*	0,0054*	0,0090*	0,0024*

*Tab. I: Vergleich der trabekulären Dicke von Kontrollgruppe, Calciummangelgruppe und Parathormongruppe über den Verlauf der vier Versuchswochen im Auswertungsbereich „linkes Knie“ mit dem unteren Grenzwert 220. Angegeben sind die Mittelwerte der Gruppen, +/- die Standardabweichung. Der p-Wert wurde mit ANOVA bestimmt; * zeigt eine statistische Signifikanz an.*

Wie in Abb. XII dargestellt steigt die Parathormongruppe im Verlauf der vier Wochen signifikant mit ihrer trabekulären Dicke bis auf 0,21mm (+/- 0,01) an, also über das Level der Kontrollgruppe (p-Wert < 0,001) (s. Tab. II).

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,17	0,18	0,19	0,20	0,21
Standard- abweichung	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
p-Wert		0,002*	< 0,001*	<0,001*	< 0,001*

*Tab. II: Zeitlicher Verlauf der trabekulären Dicke des linken Knies der Parathormongruppe mit dem unteren Grenzwert 220. Angegeben sind die Mittelwerte der Gruppen, +/- die Standardabweichung. Der p-Wert wurde mit einem zweiseitigen t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt, * zeigt eine statistische Signifikanz an.*

Auch im zeitlichen Verlauf der Veränderung des Knochen-Volumen-Verhältnisses im Auswertungsbereich „ganzes Knie“ mit dem unteren Grenzwert von 220 wird diese Tendenz deutlich (s. Abb. XIII).

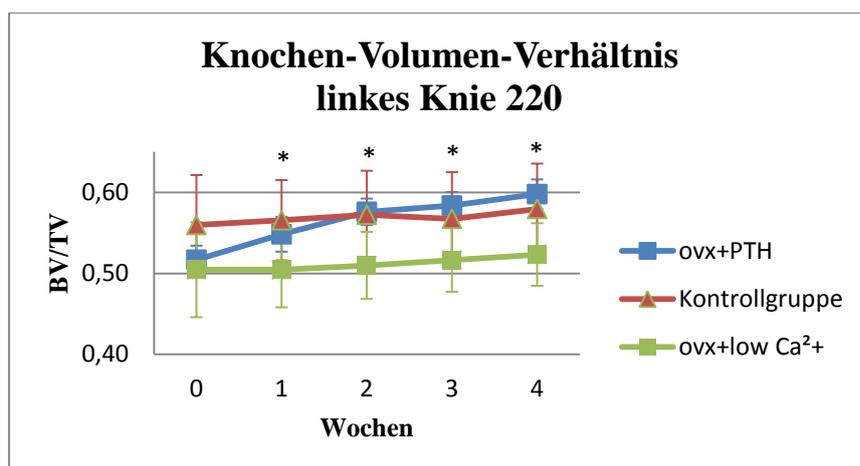


Abb. XIII: Vergleich des Knochen-Volumen-Verhältnisses von Kontrollgruppe, Calciummangelgruppe und Parathormongruppe über den Verlauf der vier Versuchswochen im Auswertungsbereich „linkes Knie“ mit dem unteren Grenzwert 220. Die Werte hierzu finden sich in Tabelle 50, * zeigt eine statistische Signifikanz an.

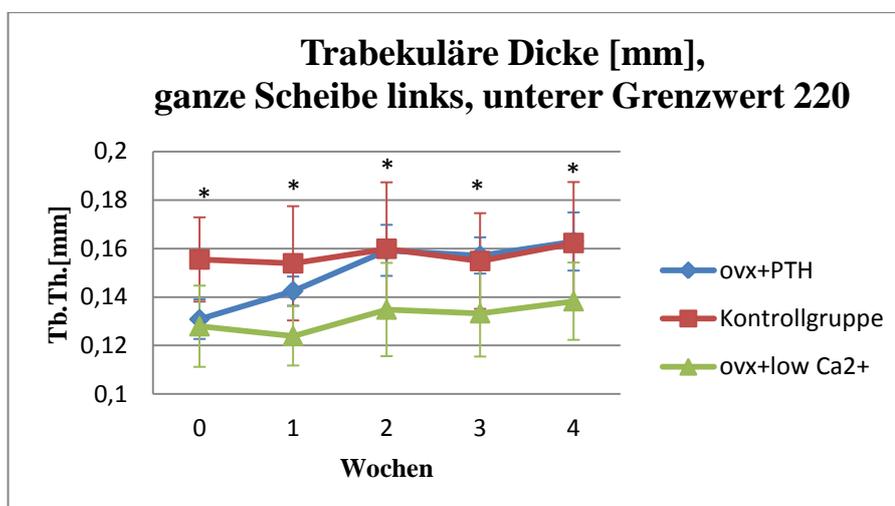
4.1.2.1.2 Auswertung der Tibiascheiben

In den verschiedenen Scheiben der linken Tibia, ausgewertet mit dem unteren Grenzwert 220, verhält sich die trabekuläre Dicke wie im Folgenden beschrieben (s. auch Tab. 48):

4.1.2.1.2.1 Auswertungsbereich „Ganze Scheibe“

In Woche null zeigen die drei Gruppen im Auswertungsbereich „ganze Scheibe“ einen signifikanten Unterschied (p-Wert 0,0023). Die Kontrollgruppe liegt bei 0,16 mm, und die ovariectomierten Mäuse zeigen eine durchschnittliche trabekuläre Dicke von 0,13 mm. Über die nächsten Messzeitpunkte bleibt die Kontrollgruppe bei 0,16 mm; die Calciummangelgruppe schwankt zwischen 0,13 mm und 0,14 mm. Die Parathormongruppe zeigt einen Zuwachs der trabekulären Dicke um 0,03 mm auf 0,16 mm in Woche vier (s. Abb. XIV und Tab. III).

Abb. XIV: Vergleich der trabekulären Dicke [mm] von Kontrollgruppe, Calciummangelgruppe und Parathormongruppe über den Verlauf der vier Versuchswochen im Auswertungsbereich „ganze Scheibe“ links mit dem unteren Grenzwert 220. Die Werte dazu finden sich in Abb. XIV B), * zeigt statistische Signifikanz.



Woche	0	1	2	3	4
Kontroll- gruppe	0,16 (+/- 0,02)	0,15 (+/- 0,02)	0,16 (+/- 0,03)	0,16 (+/- 0,02)	0,16 (+/- 0,03)
Ovx+ low Ca 2+	0,13 (+/- 0,02)	0,12 (+/- 0,01)	0,14 (+/- 0,02)	0,13 (+/- 0,02)	0,14 (+/- 0,02)
Ovx + PTH	0,13 (+/- 0,01)	0,14 (+/- 0,01)	0,16 (+/- 0,01)	0,16 (+/- 0,01)	0,16 (+/- 0,01)
p-Wert	0,0023*	0,0060*	0,0344*	0,0126*	0,0212*

Tab. III: Vergleich der trabekulären Dicke [mm] von Kontrollgruppe, Calciummangelgruppe und Parathormongruppe über den Verlauf der vier Versuchswochen im Auswertungsbereich „ganze Scheibe“ links mit dem unteren Grenzwert 220. Angegeben sind die Mittelwerte der Gruppen, +/- die Standardabweichung. Der p-Wert wurde mit ANOVA bestimmt; * zeigt statistische Signifikanz.

4.1.2.1.2.2 Auswertungsbereich „Trabekuläre Scheibe“

Bei der Auswertung des Bereichs „trabekuläre Scheibe“ zeigt sich ein ähnliches Bild auf einem niedrigeren Level. In Woche null misst die trabekuläre Dicke der Kontrollgruppe 0,13 mm (+/- 0,01), die der ovariectomierten Mäuse 0,11 mm (p-Wert 0,0068). Die Kontrollgruppe zeigt über die weiteren Messzeitpunkte keine Veränderung. In der Calciummangelgruppe beträgt die trabekuläre Dicke in Woche vier 0,12 mm (+/- 0,02). Die trabekuläre Dicke der Parathormongruppe steigt auf 0,14 mm (+/- 0,01) (p-Wert < 0,0001). Dies zeigt sich auch in Abb. XV, XVI, XVII und Tab. IV.

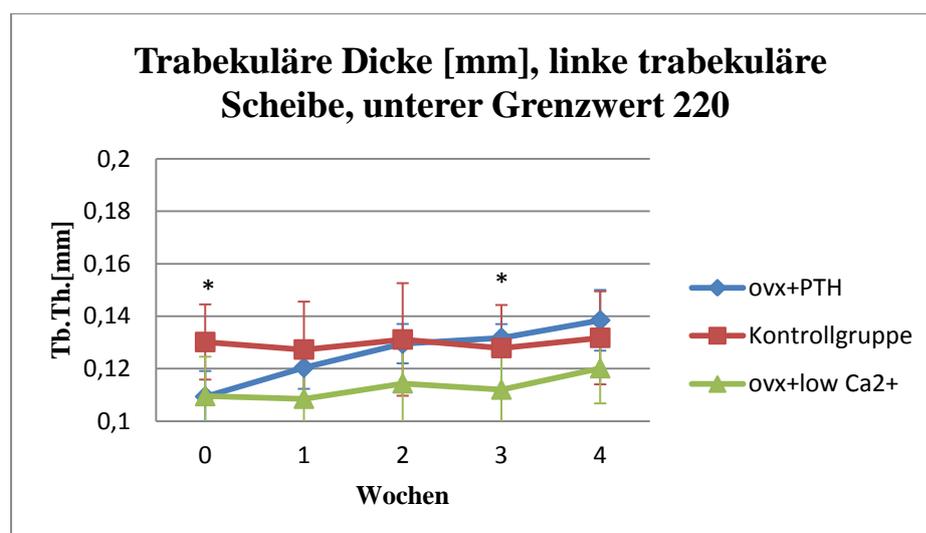


Abb. XV: Vergleich der trabekulären Dicke [mm] von Kontrollgruppe, Calciummangelgruppe und Parathormongruppe über den Verlauf der vier Versuchswochen im Auswertungsbereich „trabekuläre Scheibe“ links mit dem unteren Grenzwert 220. Die Werte dazu finden sich in Tab. IV, * zeigt statistische Signifikanz.

Woche	0	1	2	3	4
Kontroll-	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
gruppe	(+/- 0,01)	(+/- 0,02)	(+/- 0,02)	(+/- 0,02)	(+/- 0,02)
Ovx + low	0,11	0,11	0,11	0,11	0,12
Ca2+	(+/- 0,02)	(+/- 0,01)	(+/- 0,02)	(+/- 0,01)	(+/- 0,02)
Ovx + PTH	0,11	0,12	0,13	0,14	0,14
	(+/- 0,01)	(+/- 0,01)	(+/- 0,01)	(+/- 0,01)	(+/- 0,01)
p-Wert	0,0068*	0,0515	0,0919	0,0122*	0,0567

Tab. IV: Vergleich der trabekulären Dicke[mm] von Kontrollgruppe, Calciummangelgruppe und Parathormongruppe über den Verlauf der vier Versuchswochen im Auswertungsbereich „trabekuläre Scheibe“ mit dem Grenzwert 220. Angegeben sind die Mittelwerte der Gruppen, +/- die Standardabweichung. Der p-Wert wurde mit ANOVA bestimmt; * zeigt statistische Signifikanz.

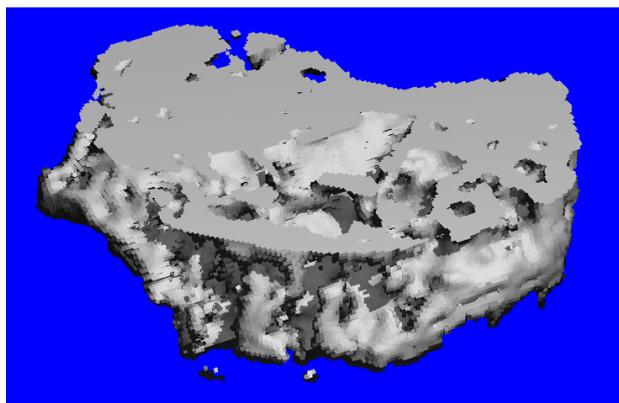


Abb. XVI: μ CT-Rekonstruktion der trabekulären Scheibe links, Parathormongruppe in Woche null; unterer Grenzwert 220.

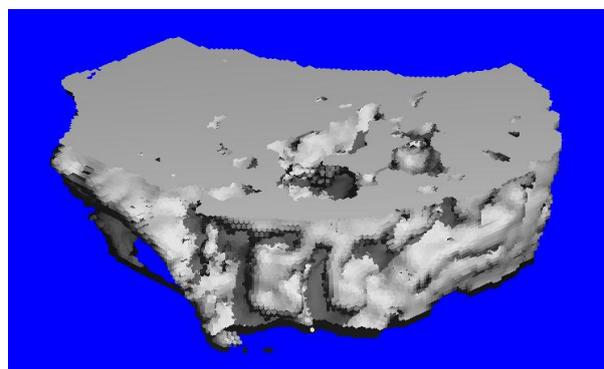


Abb. XVII: μ CT-Rekonstruktion der trabekulären Scheibe links, Parathormongruppe in Woche vier; unterer Grenzwert 220.

Ähnliches sieht man auch in allen Auswertungsbereichen der Mittleren Dichte und des Knochen-Volumen-Verhältnisses (s. Tab.n 46-47).

4.1.2.2 Vergleich der unterschiedlichen Grenzwerte zur Auswertung der Knochendichte

Mit dem unteren Grenzwert 220 werden alle Grauwerte von 22 bis 100% des maximalen Grauwertes als Knochen erkannt (s. Abb. XVIII), mit dem 300er Grenzwert alle von 30 bis 100% des maximalen Grauwertes (s. Abb. XIX).

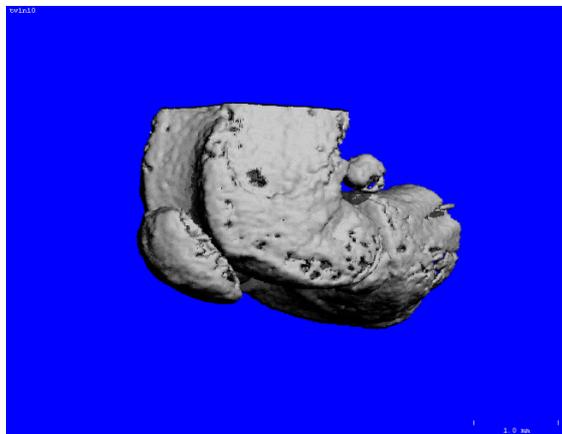


Abb. XVIII: μ CT-Rekonstruktion des linken Knies einer Maus der Calciummangelgruppe in Woche null mit dem unteren Grenzwert 220.

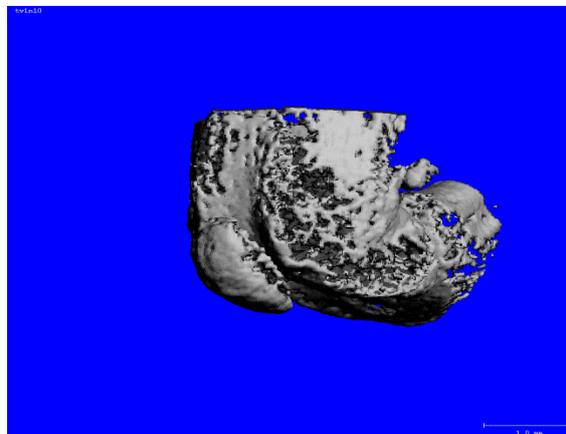


Abb. XIX: μ CT-Rekonstruktion des linken Knies einer Maus der Calciummangelgruppe in Woche null mit dem unteren Grenzwert 300.

Der 300er Grenzwert erfasst in der μ CT-Rekonstruktion zu wenige Grauwerte als Knochen; Veränderungen der Knochenparameter werden im Verlauf aber auch in den Auswertungen mit diesem Grenzwert sichtbar. Die Messungen der mittleren Dichte des Knochenvolumens aller drei Gruppen unterscheiden sich über alle Messzeitpunkte sowohl mit dem Grenzwert 220 als auch mit dem Grenzwert 300 signifikant (p-Werte $< 0,01$). Die mittlere Dichte des Knochenvolumens beim Grenzwert 220 reicht von $821,83 \text{ mg HA/cm}^3$ ($\pm 23,32$) bis $879,25 \text{ mg HA/cm}^3$ ($\pm 19,71$), beim Grenzwert 300 von $967,38 \text{ mg HA/cm}^3$ ($\pm 17,86$) bis $1006,79 \text{ mg HA/cm}^3$ ($\pm 12,19$). Die mittlere Dichte des Knochenvolumens befindet sich also beim unteren Grenzwert 300 auf einem höheren Level (exakte Werte und p-Werte in Tab. 49 und Abb. drei, sechs, 18 und 21).

Das Knochen-Volumen-Verhältnis (s. Abb. XX) zeigt ab Woche eins beim unteren Grenzwert von 220 eine signifikante Differenz, beim 300er Grenzwert bereits ab Woche null (p-Werte $< 0,05$). Beim 220er Grenzwert liegt das Knochen-Volumen-Verhältnis zwischen $0,51$ ($\pm 0,04$) und $0,6$ ($\pm 0,02$) und beim 300er Grenzwert zwischen $0,25$ ($\pm 0,05$) und $0,36$ ($\pm 0,02$). Hier zeigt sich BV/TV beim unteren Grenzwert von 300 (s. Abb. XXI) auf einem niedrigeren Level (exakte Werte und p-Werte s. Tab. 50 und Graph eins, vier, 16 und 19).

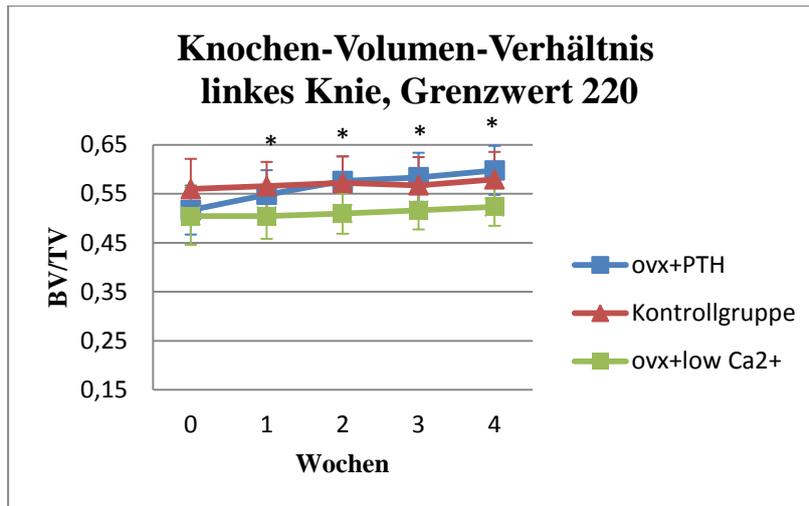
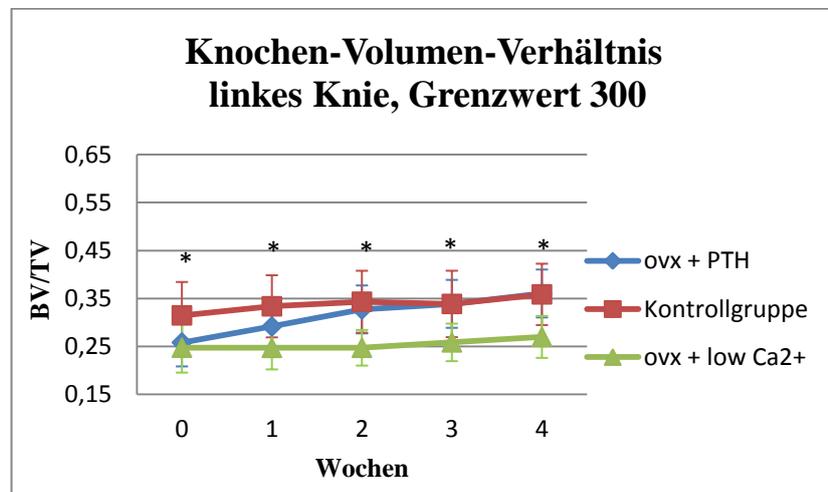


Abb. XX: Vergleich des Knochen-Volumen-Verhältnisses von Kontrollgruppe, Calciummangelgruppe und Parathormongruppe über den Verlauf der vier Wochen im Auswertungsbereich „linkes Knie“ mit dem unteren Grenzwert 220. (Werte s. Tab. 50); * zeigt statistische Signifikanz.

Abb. XXI: Vergleich des Knochen-Volumen-Verhältnisses von Kontrollgruppe, Calciummangelgruppe und Parathormongruppe über den Verlauf der vier Wochen im Auswertungsbereich „linkes Knie“ mit dem unteren Grenzwert 300. (Werte s. Tab. 50); * zeigt statistische Signifikanz.



Bei einem Vergleich der Abbildungen XX und XXI verlaufen die Kurven des Knochen-Volumen-Verhältnisses beider Grenzwerte sehr ähnlich, allerdings auf einem anderen Niveau (s. Tab. 50). Beide ovariektomierten Gruppen starten auf einem vergleichbar niedrigen Level: Mit dem Grenzwert 220 liegt die Calciummangelgruppe in Woche null bei 0,51 (+/- 0,06), die Parathormongruppe bei 0,52 (+/- 0,02). Beim Grenzwert 300 startet die Calciummangelgruppe mit 0,25 (+/- 0,05) und die Parathormongruppe mit 0,26 (+/- 0,02). Die Calciummangelgruppe steigt über die Wochen um 0,01 auf 0,52 (+/- 0,04) (Grenzwert 220) beziehungsweise um 0,02 auf 0,27 (+/- 0,04) (Grenzwert 300) an. Die Kontrollgruppe befindet sich bei beiden Grenzwerten mit ihrem BV/TV in Woche null auf einem höheren Level als beide ovariektomierten Gruppen. Beim 220er Grenzwert liegt sie bei 0,56 (+/- 0,06) und beim 300er bei 0,32 (+/- 0,07). Die Parathormongruppe zeigt die größte Veränderung: Sie steigt beim Grenzwert von 220 um 0,08 auf 0,6 (+/- 0,02) (p-Wert < 0,001) und beim Grenzwert von 300 um 0,1 auf 0,36 (+/- 0,02) an (p-Wert < 0,001). Beim 300er Grenzwert

steigt das Knochen-Volumen-Verhältnis somit auf das Level des Mittelwertes der Kontrollgruppe und beim 220er Grenzwert sogar um 0,02 über den Mittelwert der Kontrollgruppe an. Die trabekuläre Dicke ist bei allen drei Gruppen bei beiden Grenzwerten ab Woche null signifikant unterschiedlich (p-Werte < 0,02). Sie variiert beim 220er Grenzwert von 0,16 mm (+/- 0,02) bis 0,21 mm (+/- 0,01). Beim Grenzwert 300 misst sie zwischen 0,11 mm (+/- 0,01) und 0,14 mm (+/- 0,02). Bei diesem Parameter ist die beim Grenzwert von 300 bestimmte trabekuläre Dicke also geringer als beim 220er Grenzwert (exakte Werte und p-Werte s. Tab. V und Graph zwei, fünf, 17 und 20).

Woche	0	1	2	3	4
Knie 220					
Kontrollgruppe	0,19 (+/- 0,03)	0,20 (+/- 0,03)	0,20 (+/- 0,03)	0,20 (+/- 0,03)	0,20 (+/- 0,03)
Ovx+low Ca2+	0,16 (+/- 0,02)	0,16 (+/- 0,02)	0,17 (+/- 0,01)	0,17 (+/- 0,02)	0,17 (+/- 0,02)
Ovx + PTH	0,17 (+/- 0,01)	0,18 (+/- 0,01)	0,19 (+/- 0,01)	0,20 (+/- 0,01)	0,21 (+/- 0,01)
p-Wert	0,0165*	0,0080*	0,0054*	0,0090*	0,0024*
Knie 300					
Kontrollgruppe	0,13 (+/- 0,02)	0,13 (+/- 0,02)	0,14 (+/- 0,02)	0,13 (+/- 0,02)	0,14 (+/- 0,02)
Ovx+ low Ca 2+	0,11 (+/- 0,01)	0,11 (+/- 0,01)	0,12 (+/- 0,01)	0,12 (+/- 0,01)	0,12 (+/- 0,01)
Ovx + PTH	0,12 (+/- 0,004)	0,12 (+/- 0,005)	0,13 (+/- 0,005)	0,13 (+/- 0,005)	0,13 (+/- 0,005)
p-Wert	0,0094*	0,0048*	0,0151*	0,0117*	0,0031*

Tab. V: Vergleich der trabekulären Dicke [mm] des Auswertungsbereiches „linkes Knie“ zwischen der Kontrollgruppe, der Calciummangelgruppe und der Parathormongruppe mit den unterschiedlichen unteren Grenzwerten 220 und 300. Angegeben sind die Mittelwerte der Gruppen, +/- die Standardabweichung. Der p-Wert wurde mit ANOVA bestimmt, * zeigt statistische Signifikanz.

4.1.3 Etablierung des Mausmodells mit Serumparametern

4.1.3.1 Osteocalcin als Marker für die Osteoblastenaktivität

In Woche null beträgt die Serumkonzentration des Osteoblastenmarkers Osteocalcin im Serum der Kontrollmäuse 34,1 ng/ml (+/- 18,74) und im Serum der ovariectomierten Mäuse 24,6 ng/ml (+/- 3,68; p-Wert jeweils 0,44). Somit ist in Woche null keine statistisch signifikante Differenz zwischen den ovariectomierten Mäusen und den Kontrollmäusen sichtbar (s. Abb. XXII).

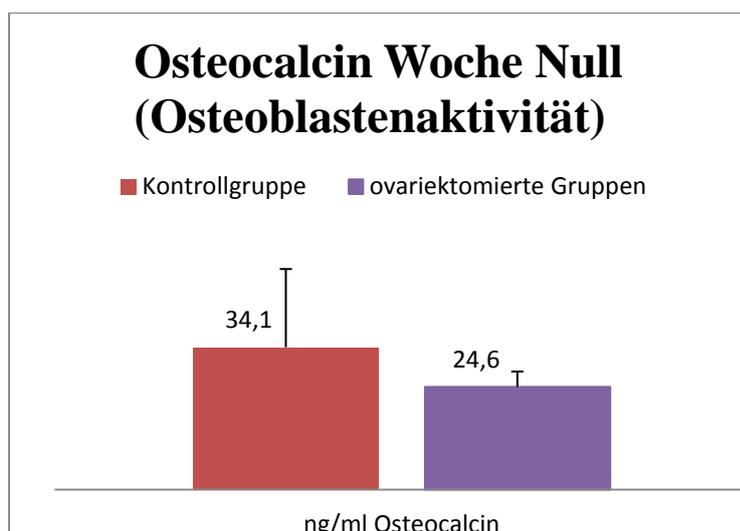


Abb. XXII: Osteocalcinkonzentration [ng/ml] im Serum der Kontrollgruppe und der ovariectomierten Mäuse in Woche null.

In Woche vier beträgt die Osteocalcinkonzentration im Serum der Mäuse der Calciummangelgruppe 34,97 ng/ml (+/- 9,78), die der Parathormongruppe 66,3 ng/ml (+/- 25,17). Die Calciummangelgruppe liegt mit ihrer Osteoblastenaktivität nahezu auf dem Level der Kontrollgruppe in Woche null. Betrachtet man die Parathormongruppe, so weist diese in Woche vier eine signifikant höhere Osteocalcinkonzentration auf als die Calciummangelgruppe (p-Wert 0,025). Außerdem ist die Konzentration in der Parathormongruppe in Woche vier signifikant höher als in allen Gruppen in Woche null (p-Wert 0,014) (s. Abb. XXIII).

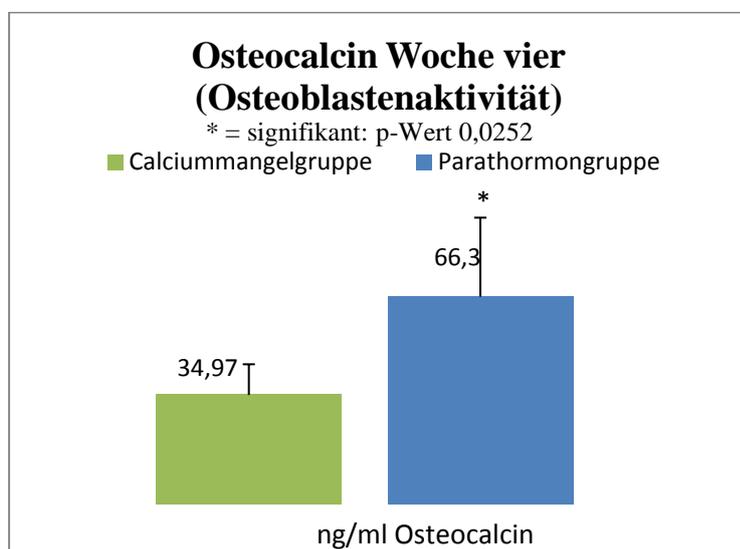


Abb. XXIII: Osteocalcinkonzentration [ng/ml] im Serum der Calciummangelgruppe und der Parathormongruppe in Woche vier; * zeigt statistische Signifikanz; p-Wert: 0,0252

4.1.3.2 TRAP (Tartrat-resistente saure Phosphatase) als Marker für die Osteoklasten

Die Konzentration der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase liegt in Woche null im Serum der Kontrollgruppe bei 2,87 U/l (+/- 2,32), bei den ovariectomierten Mäusen bei 2,32 U/l (+/- 1,13) (p-Wert 0,472). Es zeigt sich also in der Osteoklastenaktivität beider Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied (s. Abb. XXIV).

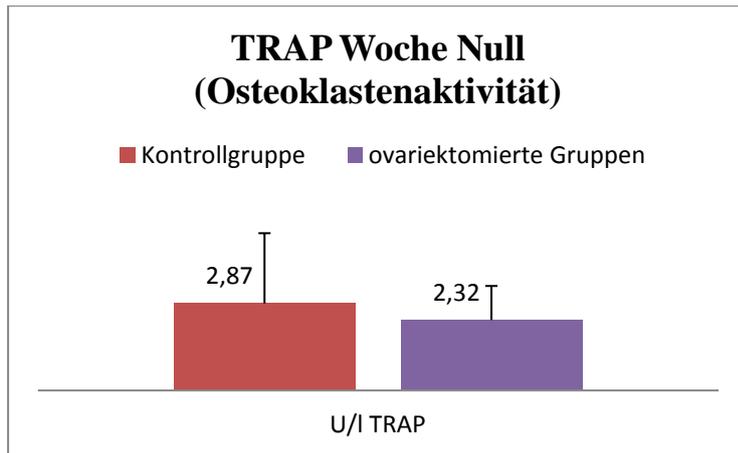


Abb. XXIV: TRAP-Konzentration [U/l] im Serum der Kontrollgruppe und der ovariectomierten Mäuse in Woche null.

In Woche vier beträgt die TRAP-Konzentration im Serum der Calciummangelgruppe 1,7 U/l (+/- 0,5) und in der Parathormongruppe 6,69 U/l (+/- 9,23) (p-Wert 0,287); somit liegt hier kein statistisch signifikanter Unterschied in der Osteoklastenaktivität vor. Auch im Vergleich zur Kontrollgruppe (p-Wert 0,22) und zu den ovariectomierten Mäusen (p-Wert 0,316) in Woche null zeigt sich keine signifikant höhere oder niedrigere Osteoklastenaktivität (s. Abb. XXV).

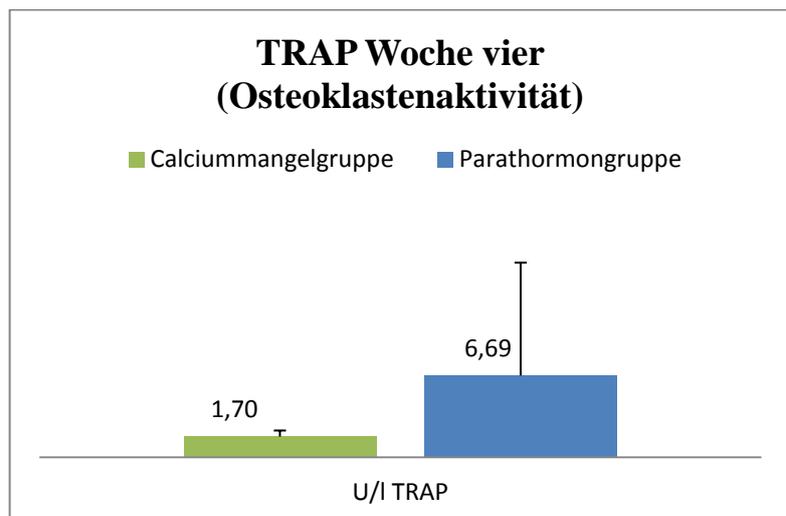


Abb. XXV: TRAP-Konzentration [U/l] im Serum der Calciummangelgruppe und der Parathormongruppe in Woche vier.

4.2 OsteoSense™-Fluoreszenz

Die OsteoSense™-Fluoreszenz (Totalfluoreszenz in pmol) des linken Kniebereichs der verschiedenen Gruppen wird ebenfalls jeweils mit Mittelwert (+/- die Standardabweichung) und dem p-Wert angegeben. Dargestellt werden nur die Messungen, die nach der OsteoSense™-Injektion durchgeführt wurden (s. auch Tab.n 52-55).

4.2.1 Entwicklung der OsteoSense™-Fluoreszenz der unterschiedlichen Gruppen über die Zeit des Versuches

4.2.1.1 OsteoSense™-Fluoreszenz der Kontrollgruppe

Die OsteoSense™-Fluoreszenz der Kontrollgruppe nimmt während der verschiedenen Messzeitpunkte zu. In Woche null beträgt die Totalfluoreszenz 16,79 pmol (+/- 2,10), in Woche zwei steigt sie auf 27,66 pmol (+/- 2,45), und die letzte Messung in Woche vier ergibt erneut einen Anstieg (39,97 pmol +/- 6,04). Alle Ergebnisse späterer Messzeitpunkte unterscheiden sich statistisch signifikant (p-Werte <0,001) (s. Tab. VI). Vergleicht man Woche null mit Woche vier, so zeigt die Kontrollgruppe im Mittel eine Fluoreszenzzunahme von 23,18 pmol.

Woche	0	2	4
Mittelwert	16,79	27,66	39,97
Standard-abweichung	2,10	2,45	6,04
p-Wert		< 0,001*	< 0,001*

Tab. VI: Verlauf der OsteoSense750™-Totalfluoreszenz im linken Knie der Kontrollgruppe. Angegeben sind die Mittelwerte der Wochen, +/- die Standardabweichung. Der p-Wert wurde mit einem zweiseitigen t-Test bestimmt; * zeigt statistische Signifikanz.

4.2.1.2 OsteoSense™-Fluoreszenz der Calciummangelgruppe

In der Calciummangelgruppe beläuft sich die Totalfluoreszenz in Woche null auf 18,50 pmol (+/- 6,23). In Woche zwei steigt die Totalfluoreszenz signifikant an auf 28,59 pmol (+/- 7,76) (p-Wert 0,017). In Woche vier zeigt sich eine nicht signifikante Fluoreszenzzunahme der Calciummangelgruppe um 8,85 pmol auf 27,35 pmol (+/- 9,50; p-Wert 0,069) (s. Tab. VII).

Woche	0	2	4
Mittelwert	18,50	28,59	27,35
Standard-abweichung	6,23	7,76	9,50
p-Wert		0,017*	0,069

Tab. VII: Verlauf der OsteoSense750™-Totalfluoreszenz im linken Knie der Calciummangelgruppe. Angegeben sind die Mittelwerte der Wochen, +/- die Standardabweichung. Der p-Wert wurde mit einem zweiseitigen t-Test bestimmt; * zeigt statistische Signifikanz.

4.2.1.3 OsteoSense™-Fluoreszenz der Parathormongruppe

Auch in der Parathormongruppe zeigt sich eine signifikante Fluoreszenzzunahme: In Woche null misst die Totalfluoreszenz 19,20 pmol (+/- 1,57). In Woche zwei steigt sie auf 31,09 pmol (+/- 3,98), in Woche vier auf 39,34 pmol (+/- 8,25) (p-Werte < 0,001). Zwischen Woche null und Woche vier zeigt sich ein Anstieg der Totalfluoreszenz um 20,14 pmol (s. Tab. VIII).

Woche	0	2	4
Mittelwert	19,20	31,09	39,34
Standardabweichung	1,57	3,98	8,25
p-Wert		< 0,001*	< 0,001*

Tab. VIII: Verlauf der OsteoSense750™-Totalfluoreszenz im linken Knie der Parathormongruppe. Angegeben sind die Mittelwerte der Wochen, +/- die Standardabweichung. Der p-Wert wurde mit einem zweiseitigen t-Test bestimmt; * zeigt statistische Signifikanz.

4.2.2 Vergleich der Unterschiede der OsteoSense750™-Totalfluoreszenz zu den verschiedenen Messzeitpunkten zwischen den Gruppen

In Woche null liegt die OsteoSense750™-Totalfluoreszenz aller drei Gruppen auf einem ähnlichen Level: Die Kontrollgruppe zeigt eine Fluoreszenz von 16,79 pmol (+/- 2,10), die Calciummangelgruppe von 18,50 pmol (+/- 6,23) und die Parathormongruppe zeigt Fluoreszenzwerte von 19,20 pmol (+/- 1,57). Sie unterscheiden sich nicht statistisch signifikant (p-Wert 0,4344). Am folgenden Messzeitpunkt in Woche zwei steigt die Totalfluoreszenz der Kontrollgruppe auf 27,66 pmol (+/- 2,45), die der Calciummangelgruppe auf 28,59 pmol (+/- 7,76) und die der Parathormongruppe auf 31,09 pmol (+/- 3,98). Auch zu diesem Zeitpunkt unterscheiden sich die Gruppen nicht statistisch signifikant (p-Wert 0,4130). In Woche vier zeigt die Totalfluoreszenz erneut einen Anstieg: In der Kontrollgruppe auf 39,97 pmol (+/- 6,04) und in der Parathormongruppe auf 39,34 pmol (+/- 8,25). In der Calciummangelgruppe hingegen sinkt die Totalfluoreszenz marginal auf 27,35 pmol (+/- 9,50). Wiederum zeigt sich keine statistische Signifikanz (p-Wert der Varianzanalyse 0,3053).

In Woche vier liegen die Mittelwerte der Kontroll- und der Parathormongruppe sehr dicht beieinander: Der Durchschnitt ihrer Mittelwerte beträgt 39,7 pmol. Die Calciummangelgruppe liegt mit ihren 27,35 pmol deutlich darunter. Da die Kontroll- und Parathormongruppe im μ CT ähnlich hohe Knochendichten und -parameter aufweisen, wurden sie zu einer Gruppe zusammengefasst. In dem anschließend durchgeführten zweiseitigen t-Test zeigt sich in Woche vier ein statistisch signifikanter Unterschied zu der Calciummangelgruppe (p-Wert 0,0267). Die OsteoSense750™-Totalfluoreszenz der Calciummangelgruppe ist im linken Knie in Woche vier signifikant geringer als in der Gruppe mit hohen Knochendichten (s. Abb. XXVI und Tab. IX).

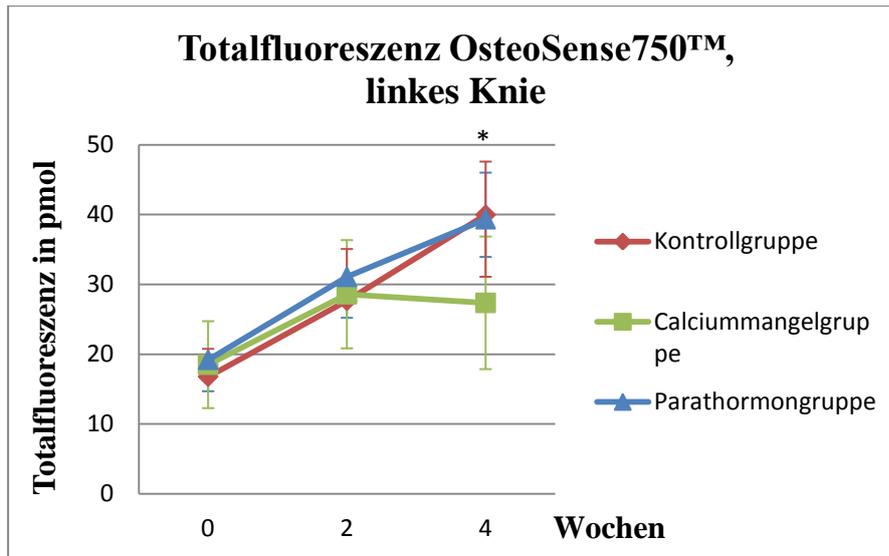


Abb. XXVI: Vergleich der OsteoSense750™-Totalfluoreszenz von Kontroll-, Calciummangel- und Parathormongruppe über den Verlauf der Versuchswochen im linken Knie. (Werte s. Tab. IX); * zeigt eine statistische Signifikanz.

Wochen	Kontrollgruppe	Calciummangelgruppe	Parathormongruppe	p-Wert
0	16,79 (+/- 2,10)	18,50 (+/-6,23)	19,20 (+/-1,57)	0,4344
2	27,66 (+/-2,45)	28,59 (+/-7,76)	31,09 (+/-3,98)	0,4130
4	39,97 (+/-6,04)	27,35 (+/-9,50)	39,34 (+/-8,25)	0,3053
4*			39,34 (+/- 8,25)	0,0267*

Tab. IX: Unterschiede der OsteoSense750™-Totalfluoreszenz im linken Knie zwischen der Kontroll-, der Calciummangel- und der Parathormongruppe. Angegeben sind die Mittelwerte der Wochen, +/- die Standardabweichung. Der p-Wert wurde mit ANOVA, in Woche 4* mit einem zweiseitigen t-Test bestimmt; * zeigt statistische Signifikanz

Diese Ergebnisse zeigen sich auch bei Untersuchungen des rechten Knies (s. Tab.n 56-59).

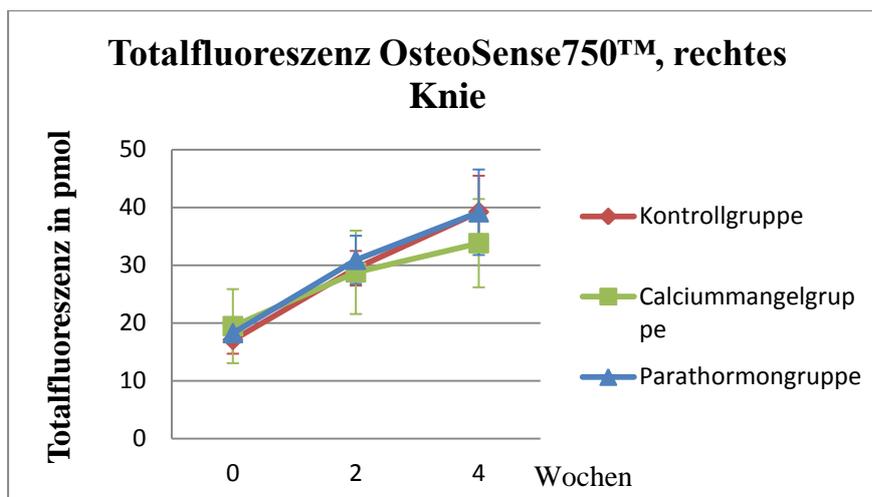


Abb. XXVII: Vergleich der OsteoSense750™-Totalfluoreszenz von Kontrollgruppe, Calciummangelgruppe und Parathormongruppe über den Verlauf der vier Versuchswochen im rechten Knie. (Werte s. Tab. 56).

4.2.3 OsteoSense™-Fluoreszenz im Urin

Die OsteoSense™-Fluoreszenz im Urin wurde bestimmt, wie in 3.2.3.1 beschrieben. Sie nimmt in der Calciummangelgruppe und der Parathormongruppe von Woche null bis Woche vier ab. In der Kontrollgruppe steigt sie über die Messzeitpunkte von 343,13 pmol (+/- 71,35) in Woche null signifikant auf 486,80 pmol (+/- 130) in Woche vier (p-Wert 0,0355) an. In Woche zwei sinkt sie zwischenzeitlich ab. Es wird in Woche zwei also weniger und in Woche vier nach der OsteoSense™-Injektion deutlich mehr OsteoSense™ ausgeschieden als in Woche null.

Bei der Calciummangelgruppe sinkt die OsteoSense™-Fluoreszenz von 475,00 pmol (+/- 62,70) in Woche null signifikant auf 275,49 pmol (+/- 58,69) in Woche vier (p-Wert 0,0349). In Woche zwei ist die Urin-Fluoreszenz nicht signifikant niedriger (p-Wert 0,5963). Von der Calciummangelgruppe wird in Woche vier signifikant weniger OsteoSense™ nach der Injektion ausgeschieden als in Woche null.

In der Parathormongruppe beträgt die Totalfluoreszenz im Urin in Woche null 332,16 pmol (+/- 68,78) und in Woche vier 80,31 pmol (+/- 53). Die Totalfluoreszenz ist ab Woche zwei statistisch signifikant niedriger als in Woche null (p-Wert Woche zwei: 0,0250, Woche vier: 0,0173). Auch in der Parathormongruppe wird in Woche vier deutlich weniger OsteoSense™ ausgeschieden als in Woche null.

Bei einer Varianzanalyse zwischen den drei Gruppen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten zeigt sich ab Woche zwei ein statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert Woche zwei: 0,0169, Woche vier: 0,0203).

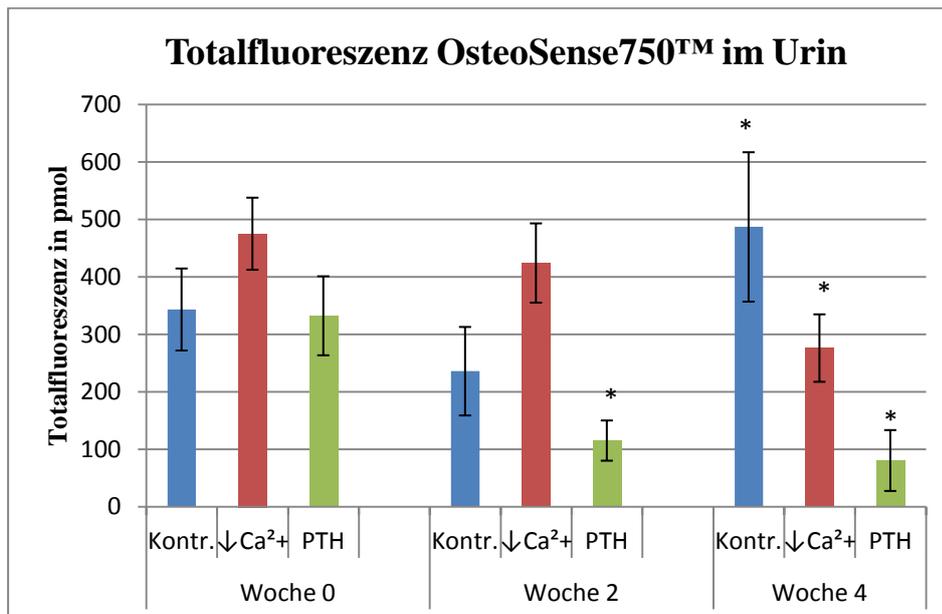


Abb. XXVIII: Totalfluoreszenz OsteoSense™ im Urin. Angegeben sind Mittelwert und Standardfehler. Die p-Werte wurden innerhalb der Gruppen mit zweiseitigem t-Test und zwischen den Gruppen mit einer Varianzanalyse bestimmt. * zeigt statistische Signifikanz.

5. Diskussion

5.1 Mäuse

Da Fell Autofluoreszenz erzeugt (Vorversuche der Arbeitsgruppe), wurden die 1961 zum ersten Mal entstandenen CD 1 nu/nu Mäuse ausgewählt. Dies sind Mäuse mit einer Mutation im CD1-FOXN1nu-Gen. Durch die Mutation entstehen für die molekulare Bildgebung mit dem FMT2500™ geeignete Nacktmäuse mit Thymusaplasie, die durch die nicht gebildeten T-Zellen immunsupprimiert sind³⁸. Lee *et al.* haben in ihrer Arbeit gezeigt, dass nu/nu Mäuse für Osteoporosemodelle geeignet sind³⁹.

In der vorliegenden Untersuchung zeigt sich, dass sich CD1 nu/nu Mäuse sowohl für Osteoporosemodelle als auch für Modelle mit Parathormongabe eignen. Außerdem wird deutlich, dass sich 20 Wochen *post Ovariectomie* durch calciumarme Diät kein weiterer Knochenverlust induzieren lässt.

5.2 Methodenkritik

5.2.1 Mäusepositionierung im FMT2500™-Halter

Die Mäuse wurden mit Hilfe von Gießharzblöcken im FMT-Halter positioniert (s. 3.2.3.4). Es war darauf zu achten, die Knie exakt auf der gleichen Höhe zu fixieren und zwischen Knie und Gießharzblock keine Zwischenräume entstehen zu lassen, um Blendung der Kamera durch den Laser zu vermeiden. Für weitere Versuche dieser Art sollte vorab ein Abdruck einer Maus hergestellt werden, um das Positionieren zu erleichtern und diese Fehlerquelle zu vermeiden.

In den meisten veröffentlichten Longitudinalstudien, in denen das μ CT benutzt wurde, wurde ein Tibia-Halter verwendet⁴⁰⁻⁴⁴. Mit diesem ist die Positionierung der Beine zwar erleichtert und reproduzierbarer, aber auch hier lagen die Beine nicht immer in der exakt gleichen Achse, was nachträgliche Korrekturen am Computer erforderte - wie von Brouwers *et al.* (2008) beschrieben. In deren Arbeitsgruppe wurde mit 30 Wochen alten Ratten gearbeitet und für die μ CT-Scans ein Tibia-Halter für Ratten verwendet. Es musste auch dort ein Registrierungsprogramm verwendet werden, um über mehrere Messzeitpunkte hinweg den gleichen Bereich der proximalen Tibia vergleichen zu können⁴¹. Zudem gibt es derzeit noch keinen Tibia-Halter von Scanco Medical, der sowohl in das VivaCT 40 als auch in das FMT 2500™ der Firma VisEnMedical eingesetzt werden kann. Auch für das Einbringen der FMT-Imagekassette in das μ CT gab es keinen vorgefertigten Halter. Um dieses Problem zu umgehen, wurden Silikonabdrücke der Imagekassette hergestellt (s. 3.2.4), damit diese fest und reproduzierbar im μ CT-Halter eingebracht werden konnte.

Viele Arbeitsgruppen scanneten die nach der Euthanisierung entnommenen und zum Teil eingebetteten Knochen⁴⁵⁻⁵¹. Hier musste zwar nicht auf die Scanzeit und die Strahlendosis geachtet werden, aber man konnte auch keine einzelnen Tiere longitudinal beobachten und individuelle Veränderungen abgrenzen, was sich auch in der Anzahl der benötigten Tiere widerspiegelte^{52,53}. Außerdem wurden in keinem der hier zitierten Untersuchungsberichte beide Knie gleichzeitig gescannt.

Die von uns verwendete Technik und Positionierung ermöglicht es dagegen, beide Knie mit nur einer Narkose und einem FMT 2500™ - bzw. VivaCT40-Scan zu erfassen. Dies könnte für weitere Versuche von Nutzen sein. Außerdem befindet sich bei dieser Methode auch ein Teil der Wirbelsäule mit im Scanbereich, der zusätzlich ausgewertet werden kann.

5.2.2 Der Kniebereich als auszuwertende Region

Die am meisten analysierten Körperregionen bei Osteoporosemodellen sind die proximale Tibia, der distale und proximale Femur und die Wirbelkörper^{13,34,41,45,54,55}. Bei Mäusemodellen werden allerdings meist die proximale Tibia und der distale Femur untersucht. Im FMT 2500™ fluoreszierte die Knieregion in Vorversuchen sehr deutlich, wie auch schon Kozloff *et al.* beschrieben haben²⁴. Um mit anderen Veröffentlichungen vergleichbar zu sein und aufgrund der Vorversuche wurde für diesen Versuch die Knieregion ausgewählt. Eine Schwierigkeit bei der Untersuchung dieser Region bestand in der oben beschriebenen Problematik, die Knie immer in der gleichen Position und Höhe in der Imagekassette zu platzieren. Durch ein „Mäusenegativ“ in Gießharz wäre dies zukünftig erleichtert.

Ein weiteres Problem entstand dadurch, dass nicht immer beide Mäusepatellae im scannbaren Bereich des μ CTs lagen, wenn die Imagekassette nicht exakt in den Silikonabdruck im μ CT-Halter eingerastet war. Leider war dies in den Übersichtsaufnahmen nicht zu erkennen und fiel erst bei der Auswertung auf. Auch hier besteht Optimierungsbedarf.

5.2.3 Diskussion der μ CT-Auswertung

Arbeitsgruppen wie z.B. Kapadia *et al.* haben gezeigt, dass eine hohe Korrelation zwischen den Ergebnissen der Histologie und des μ CTs besteht^{13,46,56-59} und dass das μ CT für Longitudinalbeobachtungen von Knochenveränderungen genutzt werden kann. Ida-Klein *et al.* haben 2007 bei 20 Wochen alten ♀ C57BL/J6 Mäusen mit belassenen Ovarien durch subkutane Parathormongabe (in verschiedenen Protokollen) Knochenaufbau induziert und unter anderem im distalen Femur Knochenparameter histologisch bestimmt. Ein signifikanter Zuegewinn an BV/TV und trabekulärer Dicke, durch tägliche subkutane Parathormongabe hervor-

gerufen, wurde von ihnen in der Histologie dargestellt⁶⁰ und auch bei den CD1 nu/nu Mäusen dieses Versuches im μ CT beobachtet.

Durch die Art und Weise der Positionierung der Mäuse war es in diesem Versuch nicht möglich, in der Auswertung immer exakt die gleiche Schicht zu treffen. Es kam von Woche zu Woche zu Verschiebungen um einige Schichten. In den Ergebnissen dürfte diese Tatsache die Standardabweichungen vergrößert und erst später zu statistisch signifikanten Ergebnissen geführt haben, gerade auch wegen der relativ kleinen Stichprobe. Mit größeren Tierzahlen sollte sich der Einfluss dieser Fehlerquelle verringern. Außerdem war durch die Positionierung nicht immer sichergestellt, dass die Patellae beider Knie im scannbaren Bereich lagen. Es gibt Programme, mit denen die exakt gleichen trabekulären Bereiche über mehrere Messzeitpunkte verglichen werden können^{41,61}. Aber auch ohne diese Programme konnten statistisch signifikante Ergebnisse erzielt werden.

5.2.3.1 Der Auswertungsbereich „ganzes Knie“

Die μ CT-Auswertung des Bereiches „ganzes Knie“ sollte sowohl die proximale Tibia als auch den distalen Femur und den kortikalen sowie den trabekulären Knochen einschließen. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob auch in der Kombination all dieser Bestandteile eine Veränderung sichtbar wird oder ausschließlich in kleinen, genau festgelegten Bereichen des trabekulären Knochens.

Die Ergebnisse der Knieauswertungen stimmen mit den Scheibenergebnissen überein. Alle untersuchten μ CT-Parameter sind bei der Knieauswertung mit dem unteren Grenzwert von 220 ab spätestens Woche eins statistisch signifikant verschieden. Die mittlere Dichte der Parathormon-Gruppe ist ab Woche zwei signifikant erhöht, das Knochen-Volumen-Verhältnis und die trabekuläre Dicke bereits ab Woche eins. Da zu dieser Art der Auswertung bisher keine Veröffentlichungen zu finden sind, wird mit dieser Studie gezeigt, dass osteoporotischer Knochenabbau und Wiederaufbau durch Parathormongabe auch in Auswertungsbereichen beobachtet und dargestellt werden kann, in denen trabekulärer und kortikaler Knochen gelenkübergreifend enthalten sind. Beim unteren Grenzwert von 300 stellt es sich ähnlich dar. Die Veränderungen sind hier jedoch bei der mittleren Dichte und der trabekulären Dicke jeweils erst eine Woche später signifikant erhöht.

Gegen diese Methode spricht der extreme Auswertungsaufwand. Es musste für jedes Knie eine Reimportierung des Scans durchgeführt werden, um den Femur auszurichten und sowohl Femur als auch Tibia und Fibula gerade abzutrennen. Jeder Reimport wird als eigener Scan

behandelt und benötigte viel Zeit für die Rekonstruktion. So ist dies nicht nur sehr zeitaufwändig; es erschwerte auch die Übersichtlichkeit, weil zu jedem einzelnen Scan noch zwei weitere Reimport-Scans für die Knie hinzukommen.

Ein Zugewinn an Informationen durch die Knieauswertungen im Vergleich zu den einfacher auszuwertenden Tibiascheiben kann, soweit es die hier untersuchten Parameter mittlere Dichte, Knochen-Volumen-Verhältnis und trabekuläre Dichte betrifft, nicht nachgewiesen werden. Allerdings wird deutlich, dass sich alle Veränderungen nicht nur im trabekulären Knochen, sondern auch in gelenkübergreifenden Bereichen mit trabekulären und kortikalen Anteilen zeigen.

5.2.3.2 Der Auswertungsbereich „Tibiascheiben“

Ein Vorteil dieser Methode ist die einfachere Handhabung. Die Tibiascheiben können aus dem Originalscan mit der in 3.2.5.2.2 beschriebenen Konturierungsmethode konturiert und ausgewertet werden. Außerdem lässt sich hier kortikaler und trabekulärer Knochen sowohl getrennt als auch kombiniert betrachten.

In den gesichteten Veröffentlichungen, in denen die proximale Tibia oder auch der distale Femur im μ CT gescannt und ausgewertet wurden, wurde ein Volumen distal der Epiphysenfuge ausgewählt und auf diese Weise ein rein diaphysärer Bereich selektiert^{40,54,61,62}. Von Stechow untersuchte ganze Femora mit dem μ CT⁵⁵. Aufgrund des vorhandenen trabekulären Knochens in den Tibiae der 20 Wochen ovariektomierten Mäuse in diesem Versuch war es nicht möglich, ein ausreichend großes Volumen unterhalb der Epiphysenfuge auszuwählen. Daher wurde ein Bereich mit Epiphyse und Diaphyse bestimmt. In der Auswertung dieses Bereichs waren sowohl der Knochenverlust durch Ovariektomie als auch der Wiederaufbau durch tägliche subkutane Parathormongabe zu sehen.

5.2.3.3 Kontroverse Diskussion der verschiedenen Grenzwerte

Es wurden zwei verschiedene Grenzwerte in der μ CT-Auswertung verwendet um zu sehen, ob mit dem niedrigeren Grenzwert von 220 der Knochenzuwachs durch die tägliche subkutane Parathormongabe deutlicher sichtbar wird als mit dem 300er Grenzwert, bei dem erst höhere Dichtewerte als Knochen erkannt werden. In der Literatur sind verschiedenste Grenzwerte für Knochenauswertungen zu finden, meistens im Bereich von 180 bis 270 (18-27% des maximalen Grauskala-Wertes)^{37,40,57,61,63,64}.

Die Arbeitsgruppe von Hara *et al.* hat gezeigt, dass die optimale Grenzwerteinstellung einen Einfluss auf das entstehende Knochenvolumen hat, dass allerdings die nach optischen Krite-

rien ausgewählten Grenzwerte keine große prozentuale Veränderung der verschiedenen Parameter hervorrufen⁶⁵. Um Vergleiche zwischen den unterschiedlichen Auswertungen anstellen zu können, muss der einmal ausgewählte Grenzwert über alle Auswertungen konstant gehalten werden. Im Vergleich der Auswertungen mit beiden Grenzwerten wird deutlich, dass die Veränderungen durch die Ovariectomie und die tägliche subkutane Parathormongabe mit beiden Grenzwerten dargestellt werden können und sich die statistische Signifikanz bei beiden ähnlich verhält. Nur die Level, auf denen die verschiedenen Parameter bei beiden Grenzwerten liegen, unterscheiden sich. Dies ist nicht überraschend. Die mittlere Dichte ist beim unteren Grenzwert von 300 höher, BV/TV und die trabekuläre Dicke sind hier geringer. Am stärksten dürfte sich die trabekuläre Anzahl unterscheiden, da mit dem Grenzwert von 300 weniger Trabekel erkannt werden. Dieser Parameter wurde hier allerdings nicht untersucht.

In der Knieauswertung mit dem Grenzwert von 220 sind alle Parameter ab spätestens Woche eins statistisch signifikant unterschiedlich, beim Grenzwert von 300 sind die Veränderungen jedoch bei der mittleren Dichte und bei der trabekulären Dicke jeweils erst eine Woche später signifikant erhöht. Somit zeigt der Grenzwert 220 Veränderungen zeitlich *vor* dem Grenzwert 300 und ist daher trotz vermehrter Störfaktoren für zukünftige Studien zu empfehlen.

5.2.3.4 Auswahl der Strukturparameter

In das Knochen-Volumen-Verhältnis gehen sowohl die trabekuläre Anzahl als auch die Trabekelform ein. Die trabekuläre Dicke hingegen wird unabhängig davon berechnet³⁷. Da überprüft werden sollte, ob der Knochenab- und -wiederaufbau in mehreren unabhängigen Parametern nachzuweisen ist, wurden die mittlere Dichte [mgHA/cm³], BV/TV [1] und die trabekuläre Dicke [mm] als zu untersuchende Parameter ausgewählt. Die Veränderungen im Knochen durch Ovariectomie und tägliche subkutane Parathormoninjektion werden in allen drei Parametern in allen Auswertungsbereichen sichtbar. Da die Parameter unabhängig voneinander bestimmt werden, verstärkt dies die Aussagekraft der Resultate durch übereinstimmende Ergebnisse.

5.2.3.5 Große Standardabweichungen der Ergebnisse

Im Ergebnisteil fallen die großen Standardabweichungen auf. Diese kommen durch relativ große interindividuelle Knochenparametervariationen zustande (s. Abb. XXIX). Obwohl alle Tiere die gleiche standardisierte Behandlung, das gleiche Futter und die gleichen Bedingungen hatten, unterschieden sich die Level deutlich, auf denen sich die unterschiedlichen Mäuse

befanden. Dies zeigte sich in allen Gruppen und bei allen Parametern. Aufgrund dieser inter-individuellen Knochenparametervariation sollten in zukünftigen Versuchen die Gruppengrößen erhöht werden, um eine größere Aussagekraft der Ergebnisse zu erhalten.

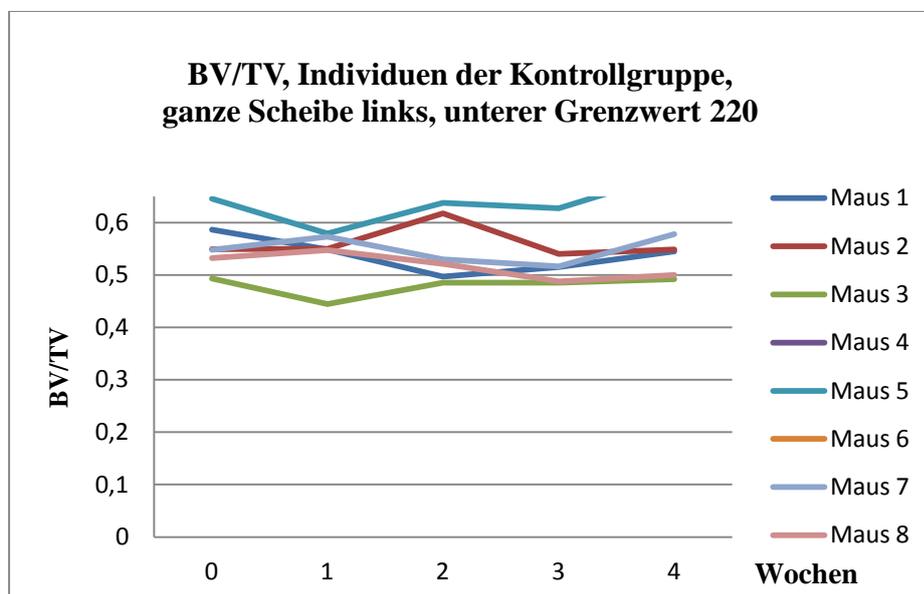


Abb. XXIX: Individuen der Kontrollgruppe, Knochen-Volumen-Verhältnis im Untersuchungsbereich „ganze Scheibe“ links, unterer Grenzwert 220

5.3 Diskussion des Studiendesigns

5.3.1 Ovariectomie und calciumarme Diät

Bereits 1941 hat Fuller Albright den Zusammenhang zwischen postmenopausalem oder durch Ovariectomie herbeigeführtem Östrogenmangel und Osteoporose hergestellt⁶⁶. Inzwischen ist die Ovariectomie eine anerkannte Technik um Osteoporose zu induzieren^{9-13,54,67}. Brouwers *et al.* haben nach der Ovariectomie eine Erfolgskontrolle durchgeführt und festgestellt, dass die Ovariectomie bei einigen Tieren erfolglos war. Die erfolglos ovariectomierten Tiere wurden daraufhin von den Versuchen ausgeschlossen^{41,43}. Bei dem vorliegenden Versuch ist keine Ovariectomiekontrolle erfolgt. Die Ergebnisse lassen zwar darauf schließen, dass die Ovariectomie erfolgreich war, allerdings kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass wirklich alle Tiere in den ovariectomierten Gruppen auch erfolgreich operiert worden sind. In zukünftigen Versuchen sollte trotzdem eine Hormonmessung erfolgen, gerade bei kleinen Gruppengrößen.

Dennoch wird in allen untersuchten Parametern in allen Auswertungsbereichen im μ CT sichtbar, dass die ovariectomierten Gruppen zu Versuchsbeginn eine deutlich geringere mittlere Dichte, ein geringeres Knochen-Volumen-Verhältnis und eine geringere trabekuläre

Dicke als die Tiere der Kontrollgruppe aufweisen. Die Ovariectomie hat bei den CD1 nu/nu Mäusen in 12 von 15 verschiedenen Auswertungen zu signifikantem Knochenverlust geführt. Die Kombination von Ovariectomie und calciumarmer Diät ist häufig in der Literatur beschrieben worden. Die Diät soll die osteoporotische Wirkung der Ovariectomie verstärken⁶⁸. Kalu *et al.* konnten zeigen, dass bei Ratten die Diät den Effekt der Ovariectomie verstärkt und zu weiterem Knochenverlust führt⁶⁹. Jakubas-Przewlocka *et al.* haben gezeigt, dass der durch eine Kombination von Ovariectomie und calciumarmer Diät bei Mäusen herbeigeführte Knochenverlust größer ist als der durch Ovariectomie allein⁷⁰. Allerdings wurde in allen Fällen mit der calciumarmen Diät direkt nach der Ovariectomie begonnen^{52,53,69,71}, im vorliegenden Versuch dagegen erst 20 Wochen nach der Ovariectomie. Es zeigte sich kein weiterer Abbau der mittleren Knochendichte, des Knochen-Volumen-Verhältnisses und der trabekulären Dicke; tendenziell stiegen alle μ CT-Parameter sogar wieder an.

Warum bei den Mäusen dieses Versuches 20 Wochen nach der Ovariectomie durch eine calciumarme Diät kein weiterer Knochenverlust hervorzurufen war, lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass sich nach einer kurzen, schnellen Phase des Knochenabbaus durch Östrogenmangel der osteoporotische Abbau nach 100 Tagen stabilisiert und sich der Knochenstoffwechsel auf einem niedrigeren Level eingependelt hatte^{34,53}. Wronski *et al.* beobachteten dies bereits 1989 bei Ratten^{10,11}. In diesem Versuch wurde erst 140 Tage nach Ovariectomie mit den Messungen begonnen. Der Knochenstoffwechsel der Mäuse könnte sich zu dem Zeitpunkt bereits auf diesem niedrigeren Level eingependelt haben. Wronski *et al.* beschreiben auch, dass nach 240 Tagen ein erneuter, langsamerer Abbau beginnt¹¹. Möglicherweise war der Beobachtungszeitraum im hier beschriebenen Versuch zu kurz, um einen weiteren Knochenabbau, verstärkt durch die calciumarme Diät, zeigen zu können. Im Serum der ovariectomierten Mäuse zeigten sich die Serumparameter (die TRAP als Osteoklastenmarker und das Osteocalcin als Osteoblastenmarker) verringert, allerdings zum Entnahmezeitpunkt nicht statistisch signifikant. Dieses Ergebnis würde ebenfalls dafür sprechen, dass sich der Knochenstoffwechsel zur Zeit des Versuches auf dem niedrigen Level eingependelt hatte^{10,11}.

Es ist bekannt, dass mechanische Knochenbelastung und Bewegung osteoporotischem Knochenabbau entgegen wirken⁷²⁻⁷⁵. Vielleicht befanden sich die Mäuse auf dem erwähnten niedrigen Dichteniveau, und der weitere Abbau durch calciumarme Diät wurde durch Bewegung und Knochenbelastung verlangsamt bzw. verhindert. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, warum einige Knochenparameter wieder anstiegen. Die meisten Arbeitsgruppen

haben wenige Wochen alte Ratten und Mäuse untersucht^{67,9,24,47,54,55,58}, während andere allerdings auch deutlich ältere Tiere analysierten^{42,45,59,61,76,77}. Dies lässt vermuten, dass das Alter der Tiere keinen, oder nur einen sehr geringen Einfluss nimmt.

Bezüglich des Alters der Mäuse unseres Versuches ist allerdings anzufügen, dass der ausgewertete Bereich aufgrund des fortgeschrittenen Mäusealters sowohl Epiphyse als auch Diaphyse umfassen musste. Durch den Alterungsprozess hatten die Mäuse nicht mehr ausreichend trabekulären Knochen unterhalb der Epiphysenfuge, um dort einen 30 Schichten umfassenden Auswertungsbereich zu erhalten. Dies könnte die Ergebnisse beeinflusst haben.

5.3.2 Parathormongabe

1929 wurde erstmals die anabole Wirkung von Parathormon auf den trabekulären Knochen von Ratten von Fuller Albright beschrieben⁷⁸.

In unserem Versuch sind alle μ CT Parameter/Auswertungsbereich-Kombinationen der Parathormongruppe deutlich von ihrem niedrigen *post* Ovariectomie-Niveau innerhalb der fünf Wochen der täglichen subkutanen Gabe von Parathormon wieder angestiegen. In 13 von 15 Kombinationen zeigt sich eine statistisch signifikante Zunahme, was mit der in der Literatur beschriebenen Knochen wiederaufbauenden Wirkung von Parathormon bei osteoporotischen Mäusen übereinstimmt^{13,54,55,60,79,80}.

Auch beide Serummarker, Osteocalcin und TRAP, sind im Vergleich zur Calciummangelgruppe in Woche vier in der Parathormongruppe deutlich erhöht. Osteocalcin zeigt sich statistisch signifikant erhöht (p-Wert 0,0252).

5.4 OsteoSense750™-Fluoreszenz

Fluoreszierende Pamidronatderivate binden an Hydroxylapatit, das Hauptmineralprodukt der Osteoblasten⁸¹⁻⁸³, und eignen sich somit gut als Marker für die Aktivität der Osteoblasten.

Auch das in diesem Versuch benutzte OsteoSense™ ist ein fluoreszierendes Pamidronatderivat. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass die OsteoSense™-Fluoreszenz vier bis fünf Tage nach der i.v. Injektion im Kniebereich am stärksten ist. Deshalb wurde die OsteoSense™-Totalfluoreszenz nach vier, beziehungsweise nach fünf Tagen im Kniebereich gemessen. Außerdem wurde die Fluoreszenz in den Wochen zwischen den Injektionen gemessen. Hoggarth *et al.* haben gezeigt, dass Pamidronat über Wochen im Knochen eingelagert bleibt⁸⁴.

Um festzustellen, wie viel OsteoSense™ nach der Injektion im Körper verblieben war und gebunden hatte, wurde die OsteoSense™-Fluoreszenz im Urin bestimmt, da Pamidronat (von

dem OsteoSense™ abgeleitet ist) fast ausschließlich renal eliminiert wird^{27,84}. Kozloff *et al.* haben 2010 beschrieben, dass Mäuse, die OsteoSense™ 750 injiziert bekommen hatten, bis zu mehreren Wochen Fluoreszenzretention zeigten. Mäuse, die zusätzlich Bisphosphonate erhielten, bewahrten die volle Fluoreszenz über zwei Wochen. Bei nicht behandelten Mäusen sank dagegen die Fluoreszenz signifikant⁸⁵.

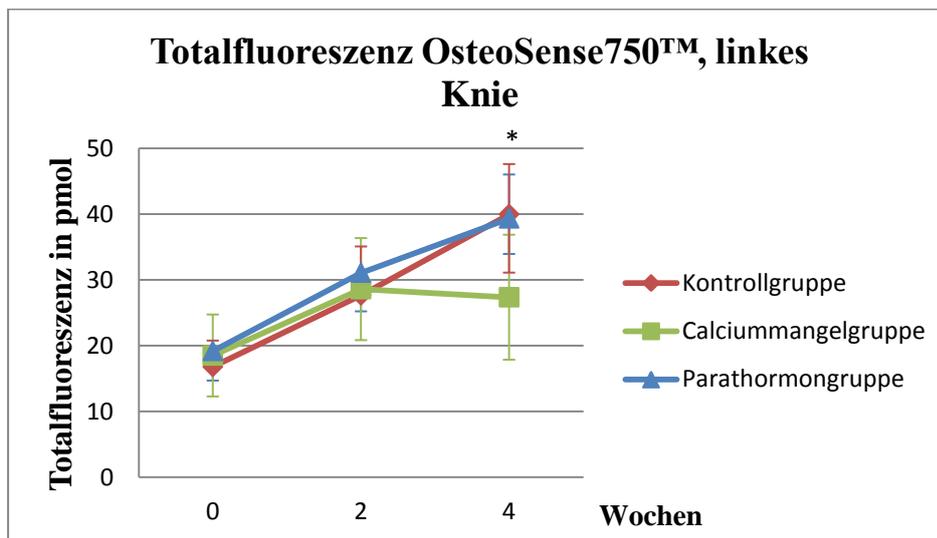


Abb. XXX:
Vergleich der
OsteoSense750™
Totalfluoreszenz der
Kontroll-, Calcium-
mangel- und Parathormongruppe über
den Verlauf der Ver-
suchswochen im
linken Knie, (Werte
s. o. Tab. IX);
* zeigt statistische
Signifikanz.

In Woche null und Woche zwei liegen alle drei Gruppen dieses Versuches mit ihrer OsteoSense750™-Totalfluoreszenz dicht beieinander. Nur in der letzten Woche (Woche vier) liegen die Kontrollgruppe und die Parathormongruppe mit ihren Werten deutlich über den Mäusen mit calciumarmer Diät, auch wenn die Varianzanalyse keine statistische Signifikanz ergab. Der t-Test zwischen der Calciummangelgruppe und der Gruppe mit hohen Knochendichten (Kontroll- und Parathormongruppe zu einer Gruppe zusammengefasst aufgrund ihrer gleich hohen Knochenparameter im μ CT) belegt, dass sich die OsteoSense750™-Totalfluoreszenz der Calciummangelgruppe im linken Knie in Woche vier signifikant von der Gruppe mit hohen Knochendichten unterscheidet (p-Wert von 0,0267). Im μ CT lässt sich kein Korrelat für die kongruente Entwicklung der Kontroll- und Parathormongruppe entdecken, also kann sie nicht durch Knochenneubildung hervorgerufen worden sein, die bei der Kontrollgruppe aber auch nicht zu erwarten war.

Die Arbeitsgruppe von Kozloff *et al.* zeigte, dass osteopenische Mäuse nur eine marginal geringere OsteoSense™-Fluoreszenz aufwiesen als Kontrollmäuse (die Totalfluoreszenz der Mäuse wurde, anders als beim vorliegenden Versuch, 24 Stunden nach Injektion von OsteoSense™ gemessen)⁸⁵. In dem hier beschriebenen Versuch liegen beide ovariektomierten und wie im μ CT deutlich zu sehenden osteopenischen Gruppen mit ihrer OsteoSense™-

Totalfluoreszenz in Woche null sogar leicht über der Kontrollgruppe. Betrachtet man Woche null und Woche vier isoliert für sich, so steigt die OsteoSense™-Fluoreszenz aller Gruppen an, die der Kontroll- und Parathormongruppe deutlicher als die der Calciummangelgruppe. Die OsteoSense™-Ausscheidung sinkt in der Calciummangel- und noch deutlicher in der Parathormongruppe ab; also verbleibt mehr OsteoSense™ im Körper und hat an irgendeiner Stelle gebunden. In der Kontrollgruppe steigt die OsteoSense™ - Ausscheidung an, also bindet weniger OsteoSense™. Da die OsteoSense™-Totalfluoreszenz in der Kontrollgruppe aber trotzdem weiter ansteigt, müsste OsteoSense™ aus anderen Regionen, in denen es vorher gebunden hat, wieder in Lösung gegangen sein und sich im Zuge einer Umverteilung dann erneut im Kniebereich angelagert haben. Hoggarth *et al.* haben für das Bisphosphonat Pamidronat gezeigt, dass es aus anderen Geweben wie der Leber und der Lunge wieder in Lösung geht und sich im Zuge einer Umverteilung zwischen Injektionen weiter im Knochen anlagert⁸⁴.

In den Wochen zwischen den Injektionen sinkt die OsteoSense™-Fluoreszenz bei allen Gruppen ab. Nur bei der Kontrollgruppe steigt sie in Woche eins signifikant an. Dies müsste durch Umverteilung aus anderen Geweben erfolgt sein, da keine weitere Injektion durchgeführt wurde. Auffällig ist, dass sich dies nur in der Kontrollgruppe und nur an einem Messzeitpunkt zeigt, hier allerdings bei allen acht Mäusen auf der rechten und linken Knie-Seite gleichermaßen. Es kann vermutet werden, dass die von den Ergebnissen des μ CT abweichende Entwicklung der Totalfluoreszenz mit unterschiedlicher Rückverteilung aus den Weichteilen bei verschiedenen Ernährungsbedingungen zusammenhängt⁸⁴. Dies ist weiter zu erforschen.

Bezüglich des nicht zu detektierenden Fluoreszenzunterschiedes zwischen der Kontroll- und der Parathormongruppe stellt sich die Frage, ob ausreichend OsteoSense™ injiziert wurde, um die unterschiedliche Knochendichteentwicklung und die damit zusammenhängende Osteoblastenaktivität sichtbar machen zu können. Eine Sättigung im Knochen mit Bisphosphonaten ist allerdings selbst in den in der Osteoporose-Therapie üblichen Dosen unmöglich^{86,87}. Außerdem wurde die vom Hersteller empfohlene Dosis dreimal injiziert. Andere Arbeitsgruppen haben bereits bei einmaliger OsteoSense™-Injektion mit derselben Dosierung signifikante Fluoreszenzunterschiede bei Knochenneubildung⁸³ oder Frakturheilung gesehen²⁴. Auch die hohe OsteoSense™-Fluoreszenz im Mäuseurin spricht gegen eine zu geringe Dosierung. Vielleicht sollten trotzdem ähnliche Longitudinalstudien mit unterschiedlichen Dosierungen durchgeführt werden.

Kozloff *et al.* haben gezeigt, dass eine hohe Fluoreszenz in Gebieten mit hoher osteoblastischer Aktivität auftritt⁸⁵. Das lässt sich hier im Verlauf der OsteoSense™-Fluoreszenz jedoch nicht erkennen: Die Parathormongruppe hat eine im μ CT und auch durch die hohe Osteocalcinkonzentration im Serum deutlich zu erkennende erhöhte Osteoblastenaktivität, zeigt aber keine erhöhte OsteoSense™-Fluoreszenz gegenüber der Kontrollgruppe. Andere Versuche zeigten, dass OsteoSense™ bei neugeborenen Mäusen 24 Stunden *post injectionem* in allen Wachstumszonen fluoreszierte, bei neun Wochen alten Mäusen besonders im Bereich des Femurs, der Tibia und der Wirbelsäule. Auch bei pathologischen Veränderungen wurde eine erhöhte OsteoSense™-Fluoreszenz gezeigt: Bei Tibiafrakturen fluoreszierte OsteoSense™ verstärkt im Frakturbereich und bei Prostatakarzinomzellen, die in die Tibia injiziert wurden, im Bereich der injizierten Zellen²⁴. In diesen Versuchen wurden allerdings keine Longitudinalbeobachtungen angestellt, sondern es wurde nur einmalig gemessen.

Zilbermann *et al.* haben Mäusen zur Knochenbildung modifizierte mesenchymale Stammzellen in den Oberschenkel implantiert und mit OsteoSense™ die Knochenneubildung über drei Wochen verfolgt. Es wurde eine signifikante Fluoreszenzzunahme gesehen. Allerdings hat auch der Kniebereich, der zufällig mit in der auszuwertenden Region lag, bei allen drei Messungen stark fluoresziert⁸³.

Vielleicht lässt sich im vorliegenden Versuch kein signifikanter Fluoreszenzanstieg nachweisen, weil in der Knieregion schon unter physiologischen Bedingungen so viel Umbau stattfindet, dass der durch Osteoporose hervorgerufene erniedrigte Umbau und der durch Parathormongabe hervorgerufene Wiederaufbau in diesem Bereich mit OsteoSense™ nicht gut zu detektieren sind. OsteoSense™ scheint sich also mehr für die Detektion von lokalisierten Veränderungen wie Frakturen oder Metastasen als für generalisierte Veränderungen wie Osteoporose zu eignen.

Die OsteoSense™-Urin-Fluoreszenz zeigt, dass diese in der Parathormongruppe am deutlichsten abnimmt, es verbleibt also mehr OsteoSense™ im Körper und müsste an anderen Stellen messbar sein. In der Calciummangelgruppe und der Kontrollgruppe lässt sich die OsteoSense™-Urin-Fluoreszenz nicht einfach deuten. Auch die Calciummangelgruppe scheidet im Verlauf weniger OsteoSense™ aus. Die Kontrollgruppe scheidet mehr OsteoSense™ aus, behält also weniger im Körper, zeigt allerdings im Kniebereich genauso wie die Parathormongruppe eine ansteigende Totalfluoreszenz. Nach der μ CT-Analyse wurde erwartet, dass die Parathormongruppe mit ansteigenden radiologischen Knochenparametern eine zunehmende OsteoSense™-Totalfluoreszenz im Kniebereich und die Kontroll- und die Calciummangel-

gruppe eine konstante OsteoSense™-Totalfluoreszenz im Kniebereich auf unterschiedlichen Leveln zeigen würden.

Betrachtet man Woche vier isoliert, so haben sich die beschriebenen Erwartungen bestätigt. Dies gilt allerdings nicht mit Blick auf den untersuchten Zeitraum.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass, wenn man die OsteoSense750™-Totalfluoreszenz im Kniebereich in der Versuchskonstellation dieses Versuches betrachtet, keine Aussage über abgelaufenen Knochenverlust durch Ovariectomie und auch keine Aussage über Knochenwiederaufbau durch tägliche subkutane Parathormongabe getroffen werden kann. Beides wird jedoch in allen μ CT-Auswertungen sichtbar. Entweder gibt es ein Verteilungsproblem des OsteoSense750™ oder ein Problem mit der untersuchten Region. Dass sich die Knieregion bei Ratten und Mäusen für Untersuchungen zum Knochenstoffwechsel eignet, ist von vielen Arbeitsgruppen gezeigt worden^{40,54,59-61,88,89}. Allerdings wurde dort keine molekulare Bildgebung verwendet, sondern μ CT, Histologie, konventionelles Röntgen oder DXA. Die Knieregion könnte also entweder für die molekulare Bildgebung nicht geeignet sein, da sie zu sensitiv auf physiologische Umbauprozesse reagiert, oder aber die Region ist aufgrund laufender hoher physiologischer Umbauprozesse zu wenig sensitiv. Weil die Knieregion bei der Darstellung von Frakturen²⁴ und von in den Oberschenkel injizierten osteoblastischen Stammzellen⁸³ deutlich mitfluoresziert hat, sollte die OsteoSense750™-Totalfluoreszenz in einem Wirbelkörper longitudinal beobachtet werden, um diese Fehlerquelle auszuschließen. Für ein Verteilungsproblem spricht, dass der Wert der Parathormongruppe nicht deutlicher als der der Kontrollgruppe ansteigt; denn Knochenneubildung bei der Parathormongruppe hat nachweislich (μ CT) stattgefunden. Jedoch bildete OsteoSense750™ dieses im Kniebereich nicht ab. Es wäre einen Versuch wert, OsteoSense750™ über einen längeren Zeitraum vor dem Beginn der täglichen Gabe von Parathormon zu injizieren, um zu sehen, ob sich dann signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen detektieren lassen. Eine andere Möglichkeit wäre, das Volumen, in dem die OsteoSense750™-Fluoreszenz bestimmt wird, vom Knie weiter entfernt in die Tibia zu verlagern.

5.5 Ziele der Arbeit:

5.5.1 Kann an diesem Mausmodell Osteoporose und Parathormontherapie dargestellt und analysiert werden?

Der Knochenverlust und -wiederaufbau durch tägliche subkutane Parathormongabe wird in allen μ CT-Auswertungen sichtbar, auch in den Auswertungsbereichen im μ CT, in denen trabekulärer und kortikaler Knochen gelenkübergreifend enthalten sind. Somit ist das

entwickelte Parathormonmodell geeignet, um entsprechende Veränderungen zu erforschen. Auch wird deutlich, dass sich nu/nu Mäuse für Osteoporose-Modelle und Modelle mit Parathormontherapie eignen. Als Nebenergebnis hat dieser Versuch gezeigt, dass sich 20 Wochen *post* Ovariectomie kein additiver Knochenverlust durch calciumarme Diät induzieren lässt. Ferner wird klar, dass man in der μ CT-Auswertung mit dem unteren Grenzwert von 220 Knochenzuwachs früher sieht als mit dem unteren Grenzwert von 300.

5.5.2 Kann das fluoreszierende Bisphosphonatderivat OsteoSense750™ als quantitativer *in vivo* Marker für Knochenumbau in Longitudinalstudien verwendet werden?

Bei CD1 nu/nu Mäusen im Kniebereich in der Konstellation dieses Versuches kann aufgrund der OsteoSense™-Fluoreszenz **keine** Aussage über stattgefundenen Knochenverlust durch Ovariectomie und auch keine Aussage über nachfolgenden Knochenwiederaufbau durch tägliche subkutane Parathormongabe getroffen werden. In Woche vier zeigt die Calciummangelgruppe allerdings eine signifikant erniedrigte Fluoreszenz im Vergleich zur Gruppe mit hohen Knochendichten (p-Wert von 0,0267).

5.6 Ausblick

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Ergebnisse aus Versuchen mit einmaliger OsteoSense750™-Injektion auf Longitudinalbeobachtungen übertragbar sind, sollten in folgenden Analysen andere Regionen auf ihr Fluoreszenzverhalten untersucht werden. Es gilt zu ermitteln, ob OsteoSense™ in anderen Bereichen vermehrt gebunden hat. Auszuwählen wären Regionen, die bei Kontrollmäusen nicht so intensiv fluoreszieren, damit ein Fluoreszenzunterschied detektierbar wird. Außerdem sollte das Fluoreszenzverhalten nach frisch durchgeführter Ovariectomie untersucht und geprüft werden, ob sich der dadurch herbeigeführte Knochenverlust mit dem μ CT abbilden lässt. Zusätzlich sollten Messungen mit unterschiedlich höheren OsteoSense™ 750-Dosierungen erfolgen, um die Frage der zu geringen Sättigung zu klären. Ebenfalls sollte eine pathologische Knochenbeeinflussung, zum Beispiel durch Metastaseninduktion, im zeitlichen Verlauf beobachtet werden um zu sehen, ob sich solche lokalisierten Veränderungen, die bei einmaliger Gabe von OsteoSense™ 750 detektierbar waren²⁴, auch über mehrere Messzeitpunkte abbilden lassen. Zudem sollte die Rückverteilung von Bisphosphonaten aus den Weichteilen in den Knochen bei unterschiedlicher Stoffwechsellage untersucht werden.

In dem hier beschriebenen Versuch konnte OsteoSense™ 750 nicht als quantitativer *in vivo* Marker für Knochenumbau bei generalisierten Knochenveränderungen verifiziert werden.

6.Zusammenfassung

Osteoporose ist die häufigste Knochenerkrankung im höheren Lebensalter, und 80 % der Betroffenen sind postmenopausale Frauen. Bisher gibt es hierzu kaum *in vivo* Untersuchungen ohne Strahlenbelastung. Mit der Fluoreszenztomografie eröffnen sich neue Möglichkeiten, Knochenveränderungen *in vivo* ohne Strahlenbelastung zu untersuchen. In dieser Studie wurde an 23 Wochen alten ♀CD1 nu/nu Mäusen untersucht, ob sich Osteoporose und Parathormontherapie longitudinal ohne Strahlenbelastung mit dem fluoreszierenden Bisphosphonatderivat OsteoSense750™ darstellen und analysieren lassen.

6.1 Methoden

Osteoporose wurde durch Ovariectomie 20 Wochen vor Versuchsbeginn induziert, und ein Teil der Tiere erhielt zur Osteoporoseverstärkung eine calciumarme Diät. Die Parathormontherapie erfolgte bei einem Teil der Tiere durch tägliche subkutane Gabe von 80 µg/kg Parathormon. Über fünf Wochen wurden im Kniebereich aller Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten die Fluoreszenzsignale (FMT2500™) und die radiologischen Veränderungen (VivaCT40) erfasst - laborchemisch erfolgte die Analyse von Osteocalcin und der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase.

6.2 Ergebnisse

Zu Versuchsbeginn zeigten alle ovariectomierten Mäuse computertomografisch statistisch signifikant niedrigere Knochenparameter als die Kontrolltiere (p-Werte < 0,01). Die calciumarme Diät zeigte bei den ovariectomierten Mäusen keinen additiven Effekt (einige p-Werte: 0,119, 0,378, 0,764). Die Parathormontherapie zeigte hingegen deutliche Ergebnisse: Alle Knochenparameter erholten sich computertomografisch und laborchemisch und stiegen wieder auf das Level der Kontrolltiere (p-Werte: µCT < 0,001; Osteocalcin 0,014). Die Befunde der durchgeführten Serumanalysen bestätigen die µCT-Ergebnisse. In den FMT2500™-Analysen konnten diese Veränderungen im Verlauf nicht abgebildet werden. Betrachtet man jedoch Woche vier isoliert, zeigten sich übereinstimmende Ergebnisse.

6.3 Schlussfolgerungen

Das entwickelte Osteoporose-Parathormon-Modell mit CD1 nu/nu Mäusen ist geeignet, um Veränderungen der Knochenparameter longitudinal zu simulieren. Dies zeigen sowohl das µCT als auch die Serumparameter. Auch konnte dieser Versuch demonstrieren, dass sich

20 Wochen *post* Ovariectomie kein additiver Knochenverlust durch calciumarme Diät induzieren lässt. Die Analyse des OsteoSense™ 750 als quantitativer *in vivo*-Marker für den Knochenumbau konnte in diesem Modell den radiologischen Verlauf bei generalisierten Knochenveränderungen nicht verifizieren. Allerdings zeigte die Calciummangelgruppe in Woche vier eine signifikant geringere Fluoreszenz. Gründe für dieses negative Ergebnis können Verteilungsprobleme des OsteoSense750™ oder die betrachtete Region sein.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Haussler, B. *et al.* Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* **18**, 77-84, doi:10.1007/s00198-006-0206-y (2007).
- 2 Herold, G. *Innere Medizin*. 735 (Herold, Gerd, 2012).
- 3 in *PONS Großwörterbuch Griechisch-Deutsch. Deutsch-Griechisch: Rund 160.000 Stichwörter und Wendungen* (ed PONS GmbH) 1500 (Januar 2008).
- 4 Pommer, G. *Untersuchungen über Osteomalazie und Rachitis*. (Vogel, 1885).
- 5 Albright, F., Reifstein, E. C., Jr. & Forbes, A. P. Effect of stilbestrol in post-menopausal osteoporosis. *Transactions. Conference on Metabolic Aspects of Convalescence*, 99-101 (1946).
- 6 Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organization technical report series* **843**, 1-129 (1994).
- 7 *Salutas Lexikon Gynäkologie*. 239 (Urban & Schwarzenberg, 1993).
- 8 Nih Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, D. & Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **285**, 785-795 (2001).
- 9 Kozloff, K. M., Quinti, L., Tung, C., Weissleder, R. & Mahmood, U. Non-invasive imaging of osteoclast activity via near-infrared cathepsin-K activatable optical probe. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* **6**, 353 (2006).
- 10 Wronski, T. J., Cintron, M. & Dann, L. M. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcified tissue international* **43**, 179-183 (1988).
- 11 Wronski, T. J., Dann, L. M., Scott, K. S. & Cintron, M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcified tissue international* **45**, 360-366 (1989).
- 12 Waarsing, J. H., Day, J. S., Verhaar, J. A., Ederveen, A. G. & Weinans, H. Bone loss dynamics result in trabecular alignment in aging and ovariectomized rats. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **24**, 926-935, doi:10.1002/jor.20063 (2006).
- 13 Alexander, J. M. *et al.* Human parathyroid hormone 1-34 reverses bone loss in ovariectomized mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **16**, 1665-1673, doi:10.1359/jbmr.2001.16.9.1665 (2001).
- 14 Lüllmann-Rauch, R. *Taschenlehrbuch Histologie*. Vol. 2 142-162 (2006).
- 15 Stracke, H., Schatz, C., Pralle, H., Ullmann, J. & Schatz, H. [Osteocalcin, a marker in diseases with elevated bone metabolism]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* **110**, 1442-1446, doi:10.1055/s-2008-1069025 (1985).
- 16 Baron, R. *et al.* Polarized secretion of lysosomal enzymes: co-distribution of cation-independent mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzymes along the osteoclast exocytic pathway. *The Journal of cell biology* **106**, 1863-1872 (1988).
- 17 Vaananen, H. K. *et al.* Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H(+)-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *The Journal of cell biology* **111**, 1305-1311 (1990).
- 18 Minkin, C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcified tissue international* **34**, 285-290 (1982).
- 19 Nakahama, K. Cellular communications in bone homeostasis and repair. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **67**, 4001-4009, doi:10.1007/s00018-010-0479-3 (2010).

- 20 Komatsu, N. & Takayanagi, H. Autoimmune arthritis: the interface between the immune system and joints. *Advances in immunology* **115**, 45-71, doi:10.1016/b978-0-12-394299-9.00002-3 (2012).
- 21 Hojjat, S. P., Foltz, W., Wise-Milestone, L. & Whyne, C. M. Multimodal muCT/muMR based semiautomated segmentation of rat vertebrae affected by mixed osteolytic/osteoblastic metastases. *Medical physics* **39**, 2848-2853, doi:10.1118/1.3703590 (2012).
- 22 Kotani, M., Kikuta, J. & Ishii, M. [Bone and calcium update; bone research update. Trafficking of osteoclast precursors visualized by intravital imaging technology]. *Clinical calcium* **21**, 85-91, doi:10.1007/s12019-011-0184-1 (2011).
- 23 Kowada, T. *et al.* In vivo fluorescence imaging of bone-resorbing osteoclasts. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 17772-17776, doi:10.1021/ja2064582 (2011).
- 24 Kozloff, K. M., Weissleder, R. & Mahmood, U. Noninvasive optical detection of bone mineral. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **22**, 1208-1216, doi:10.1359/jbmr.070504 (2007).
- 25 Lim, Y. T. *et al.* Selection of quantum dot wavelengths for biomedical assays and imaging. *Molecular imaging* **2**, 50-64 (2003).
- 26 Chance, B. Near-infrared images using continuous, phase-modulated, and pulsed light with quantitation of blood and blood oxygenation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **838**, 29-45 (1998).
- 27 Herdegen, T. *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. 254 (Thieme, 2008).
- 28 Kovar, J. L. *et al.* Near-infrared-labeled tetracycline derivative is an effective marker of bone deposition in mice. *Analytical biochemistry* **416**, 167-173, doi:10.1016/j.ab.2011.05.011 (2011).
- 29 Mizrahi, D. M., Ziv-Polat, O., Perlstein, B., Gluz, E. & Margel, S. Synthesis, fluorescence and biodistribution of a bone-targeted near-infrared conjugate. *European journal of medicinal chemistry* **46**, 5175-5183, doi:10.1016/j.ejmech.2011.08.040 (2011).
- 30 Zaheer, A. *et al.* In vivo near-infrared fluorescence imaging of osteoblastic activity. *Nature biotechnology* **19**, 1148-1154, doi:10.1038/nbt1201-1148 (2001).
- 31 Korde, L. A. & Gralow, J. R. Can we predict who's at risk for developing bone metastases in breast cancer? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 3600-3604, doi:10.1200/jco.2011.35.7038 (2011).
- 32 Perkin Elmer, I. (2010).
- 33 VISEN medical Inc., B. *FMT Quantitative tomography in vivo imaging system, Operator manual 1.3*.
- 34 Thompson, D. D., Simmons, H. A., Pirie, C. M. & Ke, H. Z. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* **17**, 125S-133S (1995).
- 35 AG, S. M. http://www.scanco.ch/index.php?id=search_results_general&no_cache=1.
- 36 H. Bui, G. C., R. Klinck, J. MacNeil, S. Boyd. Automatic segmentation of cortical and trabecular compartments based on a dual threshold technique for in vivo micro-CT bone analysis. *Bone* **41**, 505-515 (October 2007).
- 37 Hildebrand, T., Laib, A., Muller, R., Dequeker, J. & Rueggsegger, P. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **14**, 1167-1174, doi:10.1359/jbmr.1999.14.7.1167 (1999).
- 38 Fortmeyer, H. P. in *Schriftenreihe Versuchstierkunde* Vol. 8 (Verlag P. Parey, 1981).
- 39 Lee, S. K. *et al.* T lymphocyte-deficient mice lose trabecular bone mass with ovariectomy. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **21**, 1704-1712, doi:10.1359/jbmr.060726 (2006).
- 40 Klinck, R. J., Campbell, G. M. & Boyd, S. K. Radiation effects on bone architecture in mice and rats resulting from in vivo micro-computed tomography scanning. *Medical engineering & physics* **30**, 888-895, doi:10.1016/j.medengphy.2007.11.004 (2008).

- 41 Brouwers, J. E., Lambers, F. M., Gasser, J. A., van Rietbergen, B. & Huiskes, R. Bone degeneration and recovery after early and late bisphosphonate treatment of ovariectomized wistar rats assessed by in vivo micro-computed tomography. *Calcified tissue international* **82**, 202-211, doi:10.1007/s00223-007-9084-3 (2008).
- 42 Boyd, S. K., Davison, P., Muller, R. & Gasser, J. A. Monitoring individual morphological changes over time in ovariectomized rats by in vivo micro-computed tomography. *Bone* **39**, 854-862, doi:10.1016/j.bone.2006.04.017 (2006).
- 43 Brouwers, J. E. M., van Rietbergen, B., Huiskes, R. & Ito, K. Effects of PTH treatment on tibial bone of ovariectomized rats assessed by in vivo micro-CT. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* **20**, 1823-1835, doi:10.1007/s00198-009-0882-5 (2009).
- 44 Ravoori, M. *et al.* Quantification of Mineralized Bone Response to Prostate Cancer by Noninvasive In Vivo μ CT and Non-Destructive Ex Vivo μ CT and DXA in a Mouse Model. *PLoS one* **5**, doi:10.1371/journal.pone.0009854 (2010).
- 45 Aggarwal, R. *et al.* Human Umbilical Cord Blood-Derived CD34(+) Cells Reverse Osteoporosis in NOD/SCID Mice by Altering Osteoblastic and Osteoclastic Activities. *PLoS one* **7**, e39365, doi:10.1371/journal.pone.0039365 (2012).
- 46 Balto, K., Müller, R., Carrington, D. C., Dobeck, J. & Stashenko, P. Quantification of periapical bone destruction in mice by micro-computed tomography. *Journal of dental research* **79**, 35-40 (2000).
- 47 Kozloff, K. M. *et al.* Non-invasive optical detection of cathepsin K-mediated fluorescence reveals osteoclast activity in vitro and in vivo. *Bone* **44**, 190-198, doi:10.1016/j.bone.2008.10.036 (2009).
- 48 Martin, A. *et al.* Bone proteins PHEX and DMP1 regulate fibroblastic growth factor Fgf23 expression in osteocytes through a common pathway involving FGF receptor (FGFR) signaling. *FASEB J* **25**, 2551-2562, doi:10.1096/fj.10-177816 (2011).
- 49 Frizziero, A. *et al.* Effect of training and sudden detraining on the patellar tendon and its enthesis in rats. *BMC Musculoskelet Disord* **12**, 20, doi:10.1186/1471-2474-12-20 (2011).
- 50 Sabsovich, I. *et al.* TNF signaling contributes to the development of nociceptive sensitization in a tibia fracture model of complex regional pain syndrome type I. *Pain* **137**, 507-519, doi:10.1016/j.pain.2007.10.013 (2008).
- 51 Kazakia, G. J., Burghardt, A. J., Cheung, S. & Majumdar, S. Assessment of bone tissue mineralization by conventional x-ray microcomputed tomography: Comparison with synchrotron radiation microcomputed tomography and ash measurements. *Medical physics* **35**, 3170-3179, doi:10.1118/1.2924210 (2008).
- 52 Jiang, G. *et al.* Prevention of trabecular bone loss in the mandible of ovariectomized rats. *Journal of oral science* **46**, 75-85 (2004).
- 53 Shirai, H., Sato, T., Oka, M., Hara, T. & Mori, S. Effect of calcium supplementation on bone dynamics of the maxilla, mandible and proximal tibia in experimental osteoporosis. *Journal of oral rehabilitation* **29**, 287-294 (2002).
- 54 Zhou, H. *et al.* Anabolic action of parathyroid hormone on cortical and cancellous bone differs between axial and appendicular skeletal sites in mice. *Bone* **32**, 513-520 (2003).
- 55 von Stechow, D. *et al.* Differential transcriptional effects of PTH and estrogen during anabolic bone formation. *Journal of cellular biochemistry* **93**, 476-490, doi:10.1002/jcb.20174 (2004).
- 56 Kapadia, R. D. *et al.* Applications of micro-CT and MR microscopy to study pre-clinical models of osteoporosis and osteoarthritis. *Technology and health care : official journal of the European Society for Engineering and Medicine* **6**, 361-372 (1998).
- 57 Müller, R. *et al.* Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* **23**, 59-66 (1998).
- 58 Johnson, L. C. *et al.* Longitudinal live animal micro-CT allows for quantitative analysis of tumor-induced bone destruction. *Bone* **48**, 141-151, doi:10.1016/j.bone.2010.05.033 (2011).

- 59 Sampath, T. K. *et al.* Thyroid-stimulating hormone restores bone volume, microarchitecture, and strength in aged ovariectomized rats. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **22**, 849-859, doi:10.1359/jbmr.070302 (2007).
- 60 Iida-Klein, A. *et al.* Effects of cyclic versus daily hPTH(1-34) regimens on bone strength in association with BMD, biochemical markers, and bone structure in mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **21**, 274-282, doi:10.1359/jbmr.051017 (2006).
- 61 Campbell, G. M., Bernhardt, R., Scharnweber, D. & Boyd, S. K. The bone architecture is enhanced with combined PTH and alendronate treatment compared to monotherapy while maintaining the state of surface mineralization in the OVX rat. *Bone* **49**, 225-232, doi:10.1016/j.bone.2011.04.008 (2011).
- 62 Iida-Klein, A. *et al.* Short-term continuous infusion of human parathyroid hormone 1-34 fragment is catabolic with decreased trabecular connectivity density accompanied by hypercalcemia in C57BL/J6 mice. *The Journal of endocrinology* **186**, 549-557, doi:10.1677/joe.1.06270 (2005).
- 63 Ito, M., Nakamura, T., Matsumoto, T., Tsurusaki, K. & Hayashi, K. Analysis of trabecular microarchitecture of human iliac bone using microcomputed tomography in patients with hip arthrosis with or without vertebral fracture. *Bone* **23**, 163-169 (1998).
- 64 Ito, M. *et al.* Contribution of trabecular and cortical components to the mechanical properties of bone and their regulating parameters. *Bone* **31**, 351-358 (2002).
- 65 Hara, T., Tanck, E., Homminga, J. & Huiskes, R. The influence of microcomputed tomography threshold variations on the assessment of structural and mechanical trabecular bone properties. *Bone* **31**, 107-109 (2002).
- 66 Albright, F., Smith, P. & Richardson, A. Postmenopausal Osteoporosis
It's clinical features. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **116**, 2465-2474 (1941).
- 67 Uchida, R. *et al.* Combined effects of soy isoflavone and fish oil on ovariectomy-induced bone loss in mice. *Journal of bone and mineral metabolism* **29**, 404-413, doi:10.1007/s00774-010-0234-8 (2011).
- 68 Zheng, Y. *et al.* Accelerated bone resorption, due to dietary calcium deficiency, promotes breast cancer tumor growth in bone. *Cancer research* **67**, 9542-9548, doi:10.1158/0008-5472.can-07-1046 (2007).
- 69 Kalu, D. N. & Orhii, P. B. Calcium absorption and bone loss in ovariectomized rats fed varying levels of dietary calcium. *Calcified tissue international* **65**, 73-77 (1999).
- 70 Jakubas-Przewlocka, J., Przewlocki, P. & Sawicki, A. Assessment of changes due to the long-term effect of estrogen and calcium deficiency in the trabecular bone structure in rats. *Clinical and experimental rheumatology* **23**, 385-388 (2005).
- 71 Prado, R. F., Silveira, V. A., Rocha, R. F., Vasconcellos, L. M. & Carvalho, Y. R. Effects of experimental osteoporosis and low calcium intake on postextraction sockets of rats. *International journal of experimental pathology* **93**, 139-147, doi:10.1111/j.1365-2613.2012.00809.x (2012).
- 72 Baur, A. *et al.* Effect of exercise on bone and articular cartilage in heterozygous manganese superoxide dismutase (SOD2) deficient mice. *Free radical research* **45**, 550-558, doi:10.3109/10715762.2011.555483 (2011).
- 73 Briazgounov, I. P. The role of physical activity in the prevention and treatment of noncommunicable diseases. *World health statistics quarterly. Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales* **41**, 242-250 (1988).
- 74 Exercise can be a powerful weapon against osteoporosis. *Disease management advisor* **7**, 28-31, 17 (2001).
- 75 O'Brien, M. Exercise and osteoporosis. *Irish journal of medical science* **170**, 58-62 (2001).

- 76 Qi, H., Li, M. & Wronski, T. J. A comparison of the anabolic effects of parathyroid hormone at skeletal sites with moderate and severe osteopenia in aged ovariectomized rats. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **10**, 948-955, doi:10.1002/jbmr.5650100616 (1995).
- 77 Bar-Shira-Maymon, B., Coleman, R., Cohen, A., Steinhagen-Thiessen, E. & Silbermann, M. Age-related bone loss in lumbar vertebrae of CW-1 female mice: a histomorphometric study. *Calcified tissue international* **44**, 36-45 (1989).
- 78 Bauer, W., Aub, J. C. & Albright, F. Studies of Calcium and phosphorus metabolism: A study of the bone trabeculae as a readily available reserve supply of calcium *The Journal of experimental medicine* **49**, 145-162 (1929).
- 79 Shen, V. *et al.* Effects of combined and separate intermittent administration of low-dose human parathyroid hormone fragment (1-34) and 17 beta-estradiol on bone histomorphometry in ovariectomized rats with established osteopenia. *Calcified tissue international* **50**, 214-220 (1992).
- 80 Yamane, H. *et al.* The anabolic action of intermittent PTH in combination with cathepsin K inhibitor or alendronate differs depending on the remodeling status in bone in ovariectomized mice. *Bone* **44**, 1055-1062, doi:10.1016/j.bone.2008.05.010 (2009).
- 81 Lenkinski, R. E., Ahmed, M., Zaheer, A., Frangioni, J. V. & Goldberg, S. N. Near-infrared fluorescence imaging of microcalcification in an animal model of breast cancer. *Academic radiology* **10**, 1159-1164 (2003).
- 82 Zaheer, A. *et al.* Optical imaging of hydroxyapatite in the calcified vasculature of transgenic animals. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **26**, 1132-1136, doi:10.1161/01.ATV.0000210016.89991.2a (2006).
- 83 Zilberman, Y. *et al.* Fluorescence molecular tomography enables in vivo visualization and quantification of nonunion fracture repair induced by genetically engineered mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **26**, 522-530, doi:10.1002/jor.20518 (2008).
- 84 Hoggarth, C. R., Bennett, R. & Daley-Yates, P. T. The pharmacokinetics and distribution of pamidronate for a range of doses in the mouse. *Calcified tissue international* **49**, 416-420 (1991).
- 85 Kozloff, K. M., Volakis, L. I., Marini, J. C. & Caird, M. S. Near-infrared fluorescent probe traces bisphosphonate delivery and retention in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **25**, 1748-1758, doi:10.1002/jbmr.66 (2010).
- 86 Cremers, S. C. *et al.* Skeletal retention of bisphosphonate (pamidronate) and its relation to the rate of bone resorption in patients with breast cancer and bone metastases. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **20**, 1543-1547, doi:10.1359/jbmr.050522 (2005).
- 87 Masarachia, P., Weinreb, M., Balena, R. & Rodan, G. A. Comparison of the distribution of 3H-alendronate and 3H-etidronate in rat and mouse bones. *Bone* **19**, 281-290 (1996).
- 88 Loutit, J. F., Corp, M. J. & Ardran, G. M. Radiographic features of bone in several strains of laboratory mice and of their tumours induced by bone-seeking radionuclides. *Journal of anatomy* **122**, 357-375 (1976).
- 89 Caverzasio, J., Higgins, L. & Ammann, P. Prevention of trabecular bone loss induced by estrogen deficiency by a selective p38alpha inhibitor. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **23**, 1389-1397, doi:10.1359/jbmr.080410 (2008).

8. Anhang

8.1 Tabellen

220 und 300 geben die jeweiligen unteren Grenzwerte an

8.1.1 Tabellen Kontrollgruppe

1) Knie links, 220, Mittlere Dichte (mg HA/cm³) der Kontrollgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	852,66	861,79	870,06	870,61	879,25
Standard-abweichung	22,24	24,25	21,89	23,11	19,71
p-Wert		0,198	0,002*	0,002*	0,002*

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

2) Knie links, 220, BV/TV der Kontrollgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,56	0,57	0,57	0,57	0,58
Standard-abweichung	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06
p-Wert		0,829	0,037*	0,117	0,163

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

3) Knie links, 220, Trabekuläre Dicke (mm) der Kontrollgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,19	0,20	0,20	0,20	0,20
Standard-abweichung	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
p-Wert		0,002*	0,003*	0,019*	0,035*

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

4) *Knie links, 300, Mittlere Dichte (mg HA/cm³) der Kontrollgruppe*

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	993,49	994,90	1000,60	1002,02	1006,79
Standard-abweichung	12,00	14,00	12,87	13,23	12,19
p-Wert		0,837	0,272	0,198	0,053

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

5) *Knie links, 300, BV/TV der Kontrollgruppe*

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,32	0,33	0,34	0,34	0,36
Standard-abweichung	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06
p-Wert		0,597	0,410	0,503	0,230

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

6) *Knie links, 300, Trabekuläre Dicke (mm) der Kontrollgruppe*

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,13	0,13	0,14	0,13	0,14
Standard-abweichung	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
p-Wert		0,650	0,512	0,570	0,348

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

7) *Tibiascheibe ganz, links, 220, Mittlere Dichte (mg HA/cm³) der Kontrollgruppe*

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	830,40	841,92	837,7	836,16	848,77
Standard-abweichung	27,44	23,52	23,85	29,56	28,23
p-Wert		0,690	0,413	0,349	0,277

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

8) Tibiascheibe ganz, links, 220, BV/TV der Kontrollgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,60	0,58	0,59	0,56	0,61
Standard-abweichung	0,07	0,08	0,10	0,08	0,08
p-Wert		0,615	0,896	0,016*	0,569

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

9) Tibiascheibe ganz, links, 220, Trabekuläre Dicke (mm) der Kontrollgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,16	0,15	0,16	0,16	0,16
Standard-abweichung	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03
p-Wert		0,612	0,517	0,850	0,438

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

10) Tibiascheibe kortikal, links, 220, Mittlere Dichte (mg HA/cm³) der Kontrollgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	891,90	907,60	899,30	902,16	912,17
Standard-abweichung	33,25	33,64	23,81	31,80	33,05
p-Wert		0,558	0,294	0,019*	0,062

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

11) Tibiascheibe kortikal, links, 220, BV/TV der Kontrollgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,14	0,14	0,15	0,14	0,15
Standard-abweichung	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
p-Wert		0,906	0,025*	0,006*	0,017*

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

12) Tibiascheibe kortikal, links, 220, Trabekuläre Dicke (mm) der Kontrollgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,14	0,14	0,15	0,14	0,15
Standard-abweichung	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
p-Wert		0,841	0,144	0,271	0,130

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

13) Tibiascheibe trabekulär, links, 220, Mittlere Dichte (mg HA/cm³) der Kontrollgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	778,63	784,30	781,46	778,65	790,12
Standard-abweichung	32,12	26,79	30,48	31,46	26,67
p-Wert		0,893	0,859	0,999	0,624

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

14) Tibiascheibe trabekulär, links, 220, BV/TV der Kontrollgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,47	0,45	0,46	0,42	0,42
Standard-abweichung	0,08	0,09	0,12	0,08	0,08
p-Wert		0,580	0,705	0,005*	0,640

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

15) Tibiascheibe trabekulär, links, 220, Trabekuläre Dicke (mm) der Kontrollgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
Standard-abweichung	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02
p-Wert		0,526	0,891	0,485	0,962

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

8.1.2 Tabellen der Calciummangelgruppe

16) Knie links, 220, Mittlere Dichte (mg HA/cm³) der Calciummangelgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	824,09	821,83	829,06	827,54	832,04
Standard-abweichung	17,98	23,32	16,39	19,01	19,23
p-Wert		0,282	0,086	0,705	0,048*

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

17) Knie links, 220, BV/TV der Calciummangelgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,51	0,51	0,51	0,52	0,52
Standard-abweichung	0,06	0,05	0,04	0,04	0,04
p-Wert		0,419	0,453	0,125	0,119

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

18) Knie links, 220, Trabekuläre Dicke (mm) der Calciummangelgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,16	0,16	0,17	0,17	0,17
Standard-abweichung	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
p-Wert		0,260	0,143	0,008*	0,014*

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

19) Knie links, 300, Mittlere Dichte (mg HA/cm³) der Calciummangelgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	969,81	967,38	974,15	972,51	976,74
Standard-abweichung	16,11	17,86	11,33	15,51	13,36
p-Wert		0,794	0,570	0,746	0,378

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

20) Knie links, 300, BV/TV der Calciummangelgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,25	0,25	0,26	0,26	0,27
Standard-abweichung	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04
p-Wert		0,988	0,596	0,647	0,382

p-Wert mit zweiseitigem *t*-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

21) Knie links, 300, Trabekuläre Dicke (mm) der Calciummangelgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,11	0,11	0,12	0,12	0,12
Standard-abweichung	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
p-Wert		0,928	0,218	0,326	0,213

p-Wert mit zweiseitigem *t*-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

22) Scheibe ganz, links, 220, Mittlere Dichte (mgHA/cm³) der Calciummangelgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	789,11	788,37	797,35	791,94	797,92
Standard-abweichung	19,42	24,60	22,83	27,14	29,77
p-Wert		0,870	0,472	0,942	0,764

p-Wert mit zweiseitigem *t*-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

23) Scheibe ganz, links, 220, BV/TV der Calciummangelgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,48	0,48	0,51	0,51	0,53
Standard-abweichung	0,07	0,06	0,07	0,07	0,05
p-Wert		0,942	0,102	0,078	0,015*

p-Wert mit zweiseitigem *t*-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

24) Scheibe ganz, links, 220, Trabekuläre Dicke (mm) der Calciummangelgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,13	0,12	0,14	0,13	0,14
Standard-abweichung	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02
p-Wert		0,260	0,143	0,008*	0,014*

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

25) Scheibe kortikal, links, 220, Mittlere Dichte (mg HA/cm³) der Calciummangelgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	850,93	848,76	851,34	848,51	851,49
Standard-abweichung	27,55	25,75	18,09	20,08	23,46
p-Wert		0,748	0,782	0,867	0,771

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

26) Scheibe kortikal, links, 220, BV/TV der Calciummangelgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,78	0,78	0,79	0,79	0,78
Standard-abweichung	0,09	0,08	0,06	0,07	0,05
p-Wert		0,953	0,770	0,729	0,861

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

27) Scheibe kortikal, links, 220, Trabekuläre Dicke (mm) der Calciummangelgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,12	0,11	0,12	0,12	0,12
Standard-abweichung	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
p-Wert		0,299	0,239	0,182	0,175

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

28) Scheibe trabekulär, links, 220, Mittlere Dichte (mgHA/cm³) der Calciummangelgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	735,58	738,57	752,38	744,52	755,91
Standard-abweichung	20,72	26,99	29,54	31,79	33,02
p-Wert		0,637	0,305	0,354	0,195

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

29) Scheibe trabekulär, links, 220, BV/TV der Calciummangelgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,36	0,36	0,40	0,39	0,42
Standard-abweichung	0,07	0,06	0,08	0,06	0,05
p-Wert		0,989	0,123	0,016*	0,004*

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

30) Scheibe trabekulär, links, 220, Trabekuläre Dicke (mm) der Calciummangelgruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
Standard-abweichung	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02
p-Wert		0,880	0,558	0,377	0,016*

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

8.1.3 Tabellen der Parathormongruppe

31) Knie links, 220, Mittlere Dichte (mg HA/cm³) der Parathormongruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	830,15	835,06	846,22	852,54	859,00
Standard-abweichung	8,72	6,81	9,01	10,65	7,34
p-Wert		0,059	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

32) Knie links, 300, Mittlere Dichte (mg HA/cm³) der Parathormongruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	976,21	977,65	982,58	988,55	990,28
Standard-abweichung	10,08	7,14	10,20	12,34	10,19
p-Wert		0,747	0,230	0,046*	0,015*

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

33) Knie links, 220, BV/TV der Parathormongruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,52	0,55	0,58	0,584	0,60
Standard-abweichung	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
p-Wert		0,002*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

34) Knie links, 300, BV/TV der Parathormongruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,26	0,29	0,33	0,34	0,36
Standard-abweichung	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02
p-Wert		0,007*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

35) Knie links, 220, Trabekuläre Dicke (mm) der Parathormongruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,17	0,18	0,19	0,20	0,21
Standard-abweichung	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
p-Wert		0,002*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

36) Knie links, 300, Trabekuläre Dicke (mm) der Parathormongruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,12	0,12	0,13	0,13	0,13
Standard-abweichung	0,004	0,005	0,005	0,005	0,005
p-Wert		0,073	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*

p-Wert mit zweiseitigem *t*-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

37) Scheibe ganz, links, 220, Mittlere Dichte (mg HA/cm³) der Parathormongruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	803,50	807,42	816,04	830,79	816,54
Standard-abweichung	8,27	7,90	6,97	11,02	17,17
p-Wert		0,266	< 0,005*	0,002*	0,144

p-Wert mit zweiseitigem *t*-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

38) Scheibe ganz, links, 220, BV/TV der Parathormongruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,53	0,56	0,60	0,62	0,65
Standard-abweichung	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03
p-Wert		0,096	0,016*	0,002*	< 0,001*

p-Wert mit zweiseitigem *t*-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

39) Scheibe ganz, links, 220, Trabekuläre Dicke (mm) der Parathormongruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,13	0,14	0,16	0,16	0,16
Standard-abweichung	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
p-Wert		0,015*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*

p-Wert mit zweiseitigem *t*-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

40) Scheibe kortikal, links, 220, Mittlere Dichte (mg HA/cm³) der Parathormongruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	862,35	875,54	877,93	888,04	875,51
Standard-abweichung	11,26	16,82	12,20	12,65	13,05
p-Wert		0,008*	0,008*	0,001*	0,044*

p-Wert mit zweiseitigem *t*-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

41) Scheibe kortikal, links, 220, BV/TV der Parathormongruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,12	0,13	0,14	0,14	0,14
Standard-abweichung	0,01	0,004	0,01	0,01	0,01
p-Wert		0,001*	<0,001*	0,003*	0,026*

p-Wert mit zweiseitigem *t*-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

42) Scheibe kortikal, links, 220, Trabekuläre Dicke (mm) der Parathormongruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,12	0,13	0,14	0,14	0,14
Standard-abweichung	0,01	0,004	0,01	0,01	0,01
p-Wert		0,841	0,144	0,271	0,130

p-Wert mit zweiseitigem *t*-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

43) Scheibe trabekulär, links, 220, Mittlere Dichte (mg HA/cm³) der Parathormongruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	749,42	750,91	762,61	784,18	773,78
Standard-abweichung	18,69	5,73	11,65	21,05	20,03
p-Wert		0,812	0,114	0,003*	0,060

p-Wert mit zweiseitigem *t*-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

44) Scheibe trabekulär, links, 220, BV/TV der Parathormongruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,41	0,44	0,46	0,51	0,54
Standard-abweichung	0,06	0,05	0,05	0,05	0,04
p-Wert		0,194	0,105	0,011*	0,002*

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

45) Scheibe trabekulär, links, 220, Trabekuläre Dicke (mm) der Parathormongruppe

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	0,11	0,12	0,13	0,13	0,14
Standard-abweichung	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
p-Wert		0,021*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

**= signifikant*

8.1.4 Vergleichende Tabellen der Gruppen untereinander

46) Linke Seite, 220, Mittlere Dichte (mg HA/cm³) aller Gruppen, Vergleich von Knie, ganzer, kortikaler und trabekulärer Scheibe

Woche	0	1	2	3	4
Knie					
Kontroll-gruppe	852,66 (+/- 22,24)	861,79 (+/- 24,25)	870,06 (+/- 21,89)	870,61 (+/- 23,11)	879,25 (+/- 19,71)
Ovx+low Ca2+	824,09 (+/- 17,98)	821,83 (+/- 23,32)	829,06 (+/- 16,39)	827,54 (+/- 19,01)	832,04 (+/- 19,23)
Ovx + PTH	830,15 (+/- 8,72)	835,06 (+/- 6,81)	846,22 (+/- 9,01)	852,54 (+/- 10,65)	859,00 (+/- 7,34)
p-Wert	0,0099*	0,0034*	0,0003*	0,0005*	< 0,0001*

Scheibe ganz					
Kontrollgruppe	830,40 (+/- 27,44)	841,92 (+/- 23,52)	837,72 (+/- 23,85)	838,16 (+/- 29,56)	848,77 (+/-28,23)
Ovx+ low Ca 2+	789,11 (+/- 19,42)	788,37 (+/- 24,60)	797,35 (+/- 22,83)	791,94 (+/- 27,14)	797,92 (+/-29,77)
Ovx + PTH	803,50 (+/- 8,27)	807,42 (+/- 7,90)	816,04 (+/- 6,97)	830,79 (+/- 11,02)	816,54 (+/-17,17)
p-Wert	0,0023*	0,0002*	0,0019*	0,0019*	0,0037*
Scheibe kortikal					
Kontrollgruppe	891,90 (+/- 33,25)	907,60 (+/- 33,64)	899,30 (+/- 23,81)	902,16 (+/- 31,80)	912,17 (+/- 33,05)
Ovx + low Ca2+	850,93 (+/- 27,55)	848,76 (+/- 25,75)	851,34 (+/- 18,09)	848,51 (+/- 20,08)	851,49 (+/- 23,46)
Ovx + PTH	862,35 (+/- 11,26)	875,54 (+/- 16,82)	877,93 (+/- 12,20)	888,04 (+/- 12,65)	875,51 (+/- 13,05)
p-Wert	0,0153*	0,0017*	0,0002*	0,0004*	0,0004*
Scheibe trabekulär					
Kontrollgruppe	778,63 (+/- 32,12)	784,30 (+/- 26,79)	781,46 (+/- 30,48)	778,65 (+/- 31,46)	790,12 (+/- 26,67)
Ovx + low Ca2+	735,58 (+/- 20,72)	738,57 (+/- 26,99)	752,38 (+/- 29,54)	744,52 (+/- 31,79)	755,91 (+/- 33,02)
Ovx + PTH	749,42 (+/- 18,69)	750,91 (+/- 5,73)	762,61 (+/- 11,65)	784,18 (+/- 21,05)	773,78 (+/- 20,03)
p-Wert	0,0090*	0,0024*	0,0906	0,0231*	0,0735

Mittelwert der Gruppen +/- Standardabweichung, p-Wert mit ANOVA bestimmt, *=signifikant

47) Linke Seite, 220, BV/TV aller Gruppen, Vergleich von Knie, ganzer, kortikaler und trabekulärer Scheibe

Woche	0	1	2	3	4
Knie					
Kontrollgruppe	0,56 (+/- 0,06)	0,57 (+/- 0,05)	0,57 (+/-0,05)	0,57 (+/-0,06)	0,58 (+/- 0,06)
Ovx+low Ca2+	0,51 (+/- 0,06)	0,51 (+/- 0,05)	0,51 (+/- 0,04)	0,52 (+/-0,04)	0,52 (+/-0,04)
Ovx + PTH	0,52 (+/- 0,02)	0,55 (+/- 0,02)	0,58 (+/- 0,02)	0,584 (+/- 0,02)	0,60 (+/- 0,02)
p-Wert	0,0983	0,0291*	0,0055*	0,0103*	0,0035*
Scheibe ganz					
Kontrollgruppe	0,60 (+/- 0,07)	0,58 (+/- 0,08)	0,59 (+/- 0,10)	0,56 (+/- 0,08)	0,61 (+/- 0,08)
Ovx+ low Ca 2+	0,48 (+/- 0,07)	0,48 (+/- 0,06)	0,51 (+/- 0,07)	0,51 (+/- 0,07)	0,53 (+/- 0,05)
Ovx + PTH	0,53 (+/- 0,04)	0,56 (+/- 0,04)	0,60 (+/- 0,04)	0,62 (+/- 0,03)	0,65 (+/- 0,03)
p-Wert	0,0118*	0,0140*	0,0703	0,0048*	0,0019*
Scheibe kortikal					
Kontrollgruppe	0,14 (+/- 0,02)	0,14 (+/- 0,02)	0,15 (+/- 0,02)	0,14 (+/- 0,02)	0,15 (+/- 0,02)
Ovx + low Ca2+	0,78 (+/- 0,09)	0,78 (+/- 0,08)	0,79 (+/- 0,06)	0,79 (+/- 0,07)	0,78 (+/- 0,05)
Ovx + PTH	0,12 (+/- 0,01)	0,13 (+/- 0,004)	0,14 (+/- 0,01)	0,14 (+/- 0,01)	0,14 (+/- 0,01)
p-Wert	0,0656	0,0077*	0,0001*	0,0025*	0,0006*

Scheibe trabekulär					
Kontrollgruppe	0,47 (+/- 0,08)	0,45 (+/- 0,09)	0,46 (+/- 0,12)	0,42 (+/- 0,08)	0,47 (+/- 0,09)
Ovx + low Ca2+	0,36 (+/- 0,07)	0,36 (+/- 0,06)	0,40 (+/- 0,08)	0,39 (+/- 0,06)	0,42 (+/- 0,05)
Ovx + PTH	0,41 (+/- 0,06)	0,44 (+/- 0,05)	0,46 (+/- 0,05)	0,51 (+/- 0,05)	0,54 (+/- 0,04)
p-Wert	0,0191*	0,0436*	0,3381	0,0051*	0,0028*

Mittelwert der Gruppen +/- Standardabweichung

p-Wert mit ANOVA bestimmt, *=signifikant

48) Linke Seite, 220, Trabekuläre Dicke (mm) aller Gruppen, Vergleich von Knie, ganzer, kortikaler und trabekulärer Scheibe

Woche	0	1	2	3	4
Knie					
Kontrollgruppe	0,19 (+/- 0,03)	0,20 (+/- 0,03)	0,20 (+/- 0,03)	0,20 (+/- 0,03)	0,20 (+/- 0,03)
Ovx+low Ca2+	0,16 (+/- 0,02)	0,16 (+/- 0,02)	0,17 (+/- 0,01)	0,17 (+/- 0,02)	0,17 (+/- 0,02)
Ovx + PTH	0,17 (+/- 0,01)	0,18 (+/- 0,01)	0,19 (+/- 0,01)	0,20 (+/- 0,01)	0,21 (+/- 0,01)
p-Wert	0,0165*	0,0080*	0,0054*	0,0090*	0,0024*
Scheibe ganz					
Kontrollgruppe	0,16 (+/- 0,02)	0,15 (+/- 0,02)	0,16 (+/- 0,03)	0,16 (+/- 0,02)	0,16 (+/- 0,03)
Ovx+ low Ca 2+	0,13 (+/- 0,02)	0,12 (+/- 0,01)	0,14 (+/- 0,02)	0,13 (+/- 0,02)	0,14 (+/- 0,02)
Ovx + PTH	0,13 (+/- 0,01)	0,14 (+/- 0,01)	0,16 (+/- 0,01)	0,16 (+/- 0,01)	0,16 (+/- 0,01)
p-Wert	0,0023*	0,0060*	0,0344*	0,0126*	0,0212*

Scheibe kortikal					
Kontrollgruppe	0,14 (+/- 0,02)	0,14 (+/- 0,02)	0,15 (+/- 0,02)	0,14 (+/- 0,02)	0,15 (+/- 0,02)
Ovx + low Ca2+	0,12 (+/- 0,01)	0,11 (+/- 0,01)	0,12 (+/- 0,01)	0,12 (+/- 0,01)	0,12 (+/- 0,01)
Ovx + PTH	0,12 (+/- 0,01)	0,13 (+/- 0,004)	0,14 (+/- 0,01)	0,14 (+/- 0,01)	0,14 (+/- 0,01)
p-Wert	0,0038*	0,0015*	0,0233*	0,0121*	0,0094*
Scheibe trabekulär					
Kontrollgruppe	0,13 (+/- 0,01)	0,13 (+/- 0,02)	0,13 (+/- 0,02)	0,13 (+/- 0,02)	0,13 (+/- 0,02)
Ovx + low Ca2+	0,11 (+/- 0,02)	0,11 (+/- 0,01)	0,11 (+/- 0,02)	0,11 (+/- 0,01)	0,12 (+/- 0,02)
Ovx + PTH	0,11 (+/- 0,01)	0,12 (+/- 0,01)	0,13 (+/- 0,01)	0,14 (+/- 0,01)	0,14 (+/- 0,01)
p-Wert	0,0068*	0,0515	0,0919	0,0122*	0,0567

*Mittelwert der Gruppen +/- Standardabweichung
p-Wert mit ANOVA bestimmt, *=signifikant*

49) Knie links, 220 vs. 300, Mittlere Dichte (mg HA/cm³) aller Gruppen

Woche	0	1	2	3	4
Knie 220					
Kontrollgruppe	852,66 (+/- 22,24)	861,79 (+/- 24,25)	870,06 (+/- 21,89)	870,61 (+/- 23,11)	879,25 (+/- 19,71)
Ovx+low Ca2+	824,09 (+/- 17,98)	821,83 (+/- 23,32)	829,06 (+/- 16,39)	827,54 (+/- 19,01)	832,04 (+/- 19,23)
Ovx + PTH	830,15 (+/- 8,72)	835,06 (+/- 6,81)	846,22 (+/- 9,01)	852,54 (+/- 10,65)	859,00 (+/- 7,34)
p-Wert	0,0099*	0,0034*	0,0003*	0,0005*	< 0,0001*

Knie 300					
Kontroll- gruppe	993,49 (+/- 12,00)	994,90 (+/- 14,00)	1000,60 (+/- 12,87)	1002,02 (+/-13,23)	1006,79 (+/-12,19)
Ovx+ low Ca 2+	969,81 (+/- 16,11)	967,38 (+/- 17,86)	974,15 (+/- 11,33)	972,51 (+/- 15,51)	976,74 (+/-13,36)
Ovx + PTH	976,21 (+/- 10,08)	977,65 (+/- 7,14)	982,58 (+/- 10,20)	988,55 (+/- 12,34)	990,28 (+/-10,19)
p-Wert	0,0049*	0,0040*	0,0008*	0,0013*	0,0004*

Mittelwert der Gruppen +/- Standardabweichung

*p-Wert mit ANOVA bestimmt, *=signifikant*

50) Knie links, 220 vs. 300, BV/TV aller Gruppen

Woche	0	1	2	3	4
Knie 220					
Kontroll- gruppe	0,56 (+/- 0,06)	0,57 (+/- 0,05)	0,57 (+/-0,05)	0,57 (+/-0,06)	0,58 (+/- 0,06)
Ovx+low Ca2+	0,51 (+/- 0,06)	0,51 (+/- 0,05)	0,51 (+/- 0,04)	0,52 (+/-0,04)	0,52 (+/-0,04)
Ovx + PTH	0,52 (+/- 0,02)	0,55 (+/- 0,02)	0,58 (+/- 0,02)	0,584 (+/- 0,02)	0,60 (+/- 0,02)
p-Wert	0,0983	0,0291*	0,0055*	0,0103*	0,0035*

Knie 300					
Kontroll- gruppe	0,32 (+/- 0,07)	0,33 (+/- 0,07)	0,34 (+/- 0,07)	0,34 (+/- 0,07)	0,36 (+/- 0,06)
Ovx+ low Ca 2+	0,25 (+/- 0,05)	0,25 (+/- 0,05)	0,26 (+/- 0,04)	0,26 (+/- 0,04)	0,27 (+/- 0,04)
Ovx + PTH	0,26 (+/- 0,02)	0,29 (+/- 0,03)	0,33 (+/- 0,02)	0,34 (+/- 0,02)	0,36 (+/- 0,02)
p-Wert	0,0377	0,0096*	0,0048*	0,0031*	0,0010*

Mittelwert der Gruppen +/- Standardabweichung

*p-Wert mit ANOVA bestimmt, *=signifikant*

51) Knie links, 220 vs. 300, Trabekuläre Dicke (mm) aller Gruppen

Woche	0	1	2	3	4
Knie 220					
Kontroll- gruppe	0,19 (+/- 0,03)	0,20 (+/- 0,03)	0,20 (+/- 0,03)	0,20 (+/- 0,03)	0,20 (+/- 0,03)
Ovx+low Ca2+	0,16 (+/- 0,02)	0,16 (+/- 0,02)	0,17 (+/- 0,01)	0,17 (+/- 0,02)	0,17 (+/- 0,02)
Ovx + PTH	0,17 (+/- 0,01)	0,18 (+/- 0,01)	0,19 (+/- 0,01)	0,20 (+/- 0,01)	0,21 (+/- 0,01)
p-Wert	0,0165*	0,0080*	0,0054*	0,0090*	0,0024*
Knie 300					
Kontroll- gruppe	0,13 (+/- 0,02)	0,13 (+/- 0,02)	0,14 (+/- 0,02)	0,13 (+/- 0,02)	0,14 (+/- 0,02)
Ovx+ low Ca 2+	0,11 (+/- 0,01)	0,11 (+/- 0,01)	0,12 (+/- 0,01)	0,12 (+/- 0,01)	0,12 (+/- 0,01)
Ovx + PTH	0,12 (+/- 0,004)	0,12 (+/- 0,005)	0,13 (+/- 0,005)	0,13 (+/- 0,005)	0,13 (+/- 0,005)
p-Wert	0,0094*	0,0048*	0,0151*	0,0117*	0,0031*

*Mittelwert der Gruppen +/- Standardabweichung
p-Wert mit ANOVA bestimmt, *=signifikant*

8.1.5 OsteoSense™-Fluoreszenz

52) OsteoSense750™ links (Mittelwert der Totalfluoreszenz in pmol)

	Kontroll- gruppe	Ovx + low Ca2+	Ovx+ täglich PTH	p-Wert
Woche				
0	16,79+/- 2,10	18,50 +/- 6,23	19,20 +/- 1,57	0,4344
1	35,02+/- 1,77	12,77 +/- 4,67	14,88 +/- 1,60	<0,0001*
2	27,66 +/- 2,45	28,59 +/- 7,76	31,09 +/- 3,98	0,4130
3	22,59 +/- 3,03	23,18 +/- 6,48	27,26 +/- 3,22	0,0976
4	39,97 +/- 6,04	27,35 +/- 9,50	39,34 +/- 8,25	0,3053

Mittelwert der Gruppen +/- Standardabweichung
p-Wert mit ANOVA bestimmt, *=signifikant

8.1.6 Zeitlicher Verlauf OsteoSense750™, links (Mittelwert der Totalfluoreszenz in pmol)

53) Kontrollgruppe, OsteoSense750™, links

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	16,79	35,02	27,66	22,59	39,97
Standard- abweichung	2,10	1,77	2,45	3,03	6,04
p-Wert		< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*

p-Wert mit zweiseitigem t-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt
*= signifikant

54) Calciummangelgruppe, OsteoSense750™, links

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	18,50	13,27	28,59	23,18	27,35
Standard-abweichung	6,23	4,67	7,76	6,48	9,50
p-Wert		0,063	0,017*	0,193	0,069

p-Wert mit zweiseitigem *t*-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

55) Parathormongruppe, OsteoSense750™, links

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	19,20	14,88	31,09	27,26	39,34
Standard-abweichung	1,57	1,60	3,98	3,22	8,25
p-Wert		< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*

p-Wert mit zweiseitigem *t*-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

56) OsteoSense750™-Fluoreszenz, rechts (Mittelwert der Totaflluoreszenz in pmol)

	Kontroll- gruppe	Ovx + low Ca2+	Ovx+ täglich PTH	p-Wert
Woche				
0	17,10 +/- 2,41	19,46 +/- 6,41	18,27 +/- 1,20	0,5077
1	34,46 +/- 4,80	13,27 +/- 4,00	14,54 +/- 1,49	<0,0001*
2	29,48 +/- 3,00	28,77 +/- 7,22	30,95 +/- 4,16	0,6900
3	23,72 +/- 4,51	23,47 +/- 6,60	26,20 +/- 1,93	0,4533
4	39,22 +/- 6,26	33,82 +/- 7,65	39,17 +/- 7,39	0,9985

Mittelwert der Gruppen +/- Standardabweichung

p-Wert mit ANOVA bestimmt, *=signifikant

8.1.7 Zeitlicher Verlauf OsteoSense750™, rechts (Mittelwert der Totalfluoreszenz in pmol)

57) Kontrollgruppe, OsteoSense750™, rechts

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	17,10	34,46	29,48	23,72	39,22
Standard-abweichung	2,41	4,80	3,00	4,51	6,26
p-Wert		< 0,001*	< 0,001*	0,003*	< 0,001*

p-Wert mit zweiseitigem *t*-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

58) Calciummangelgruppe, OsteoSense750™, rechts

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	19,46	13,27	28,77	23,47	33,82
Standard-abweichung	6,41	4,00	7,22	6,60	7,65
p-Wert		0,040*	0,021*	0,272	0,004*

p-Wert mit zweiseitigem *t*-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

59) Parathormongruppe, OsteoSense750™, rechts

Woche	0	1	2	3	4
Mittelwert	18,27	14,54	30,95	26,20	39,17
Standard-abweichung	1,20	1,49	4,16	1,93	7,39
p-Wert		< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*

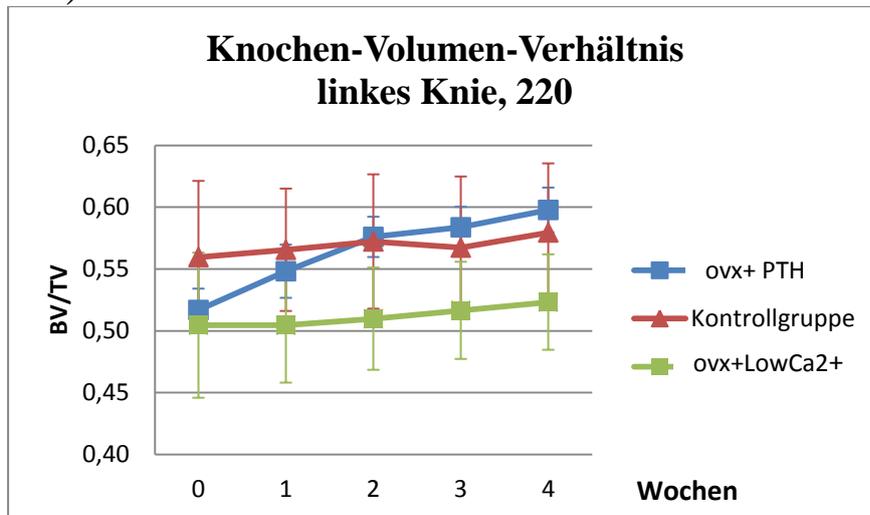
p-Wert mit zweiseitigem *t*-Test im Vergleich zur Woche 0 bestimmt

*= signifikant

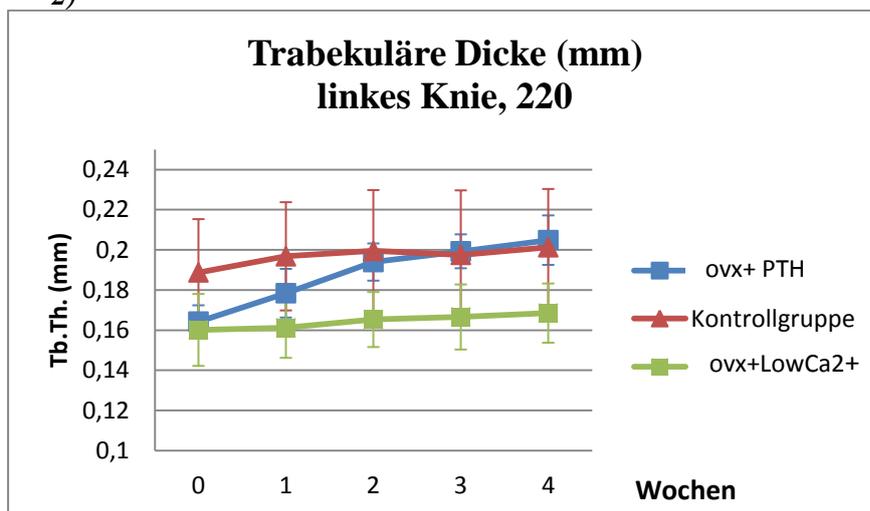
8.2 Graphen

8.2.1 Linke Seite

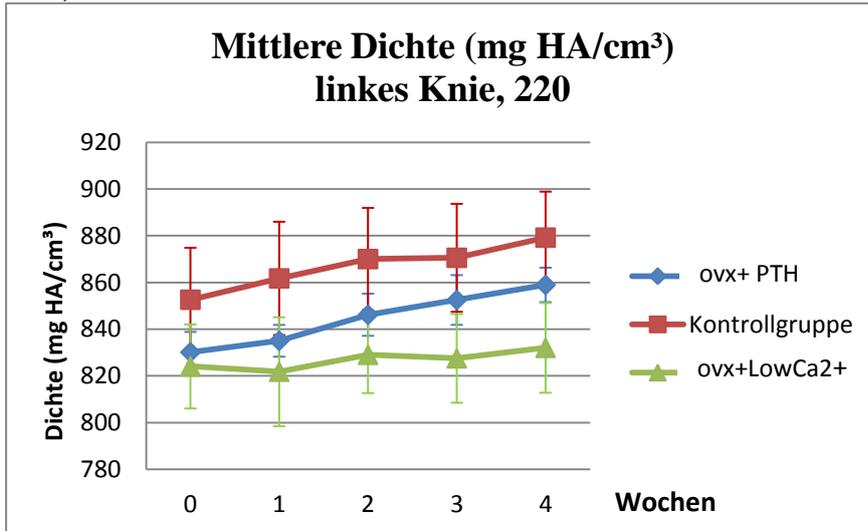
1)



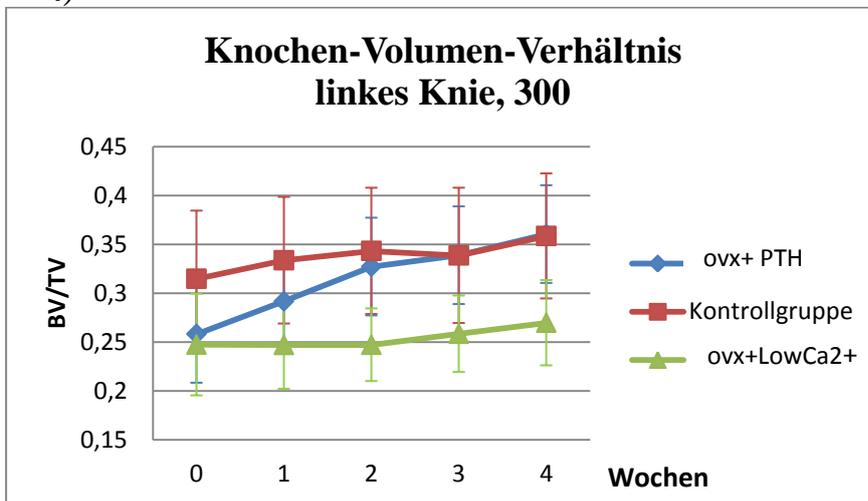
2)



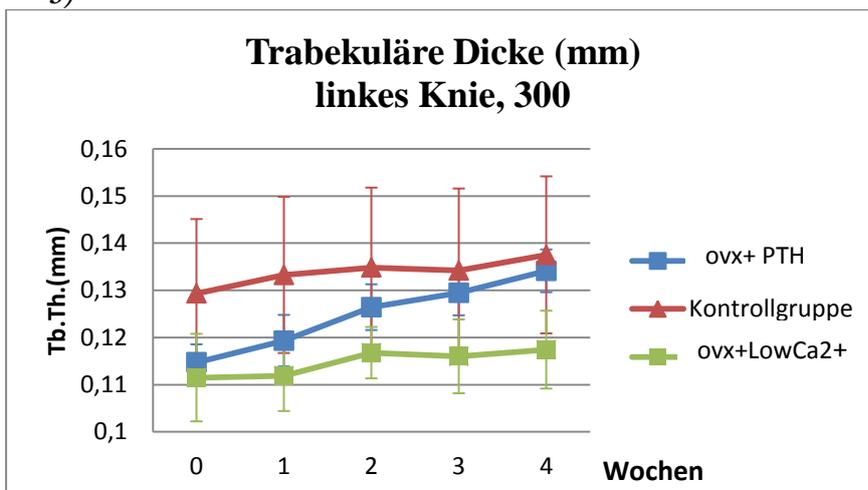
3)



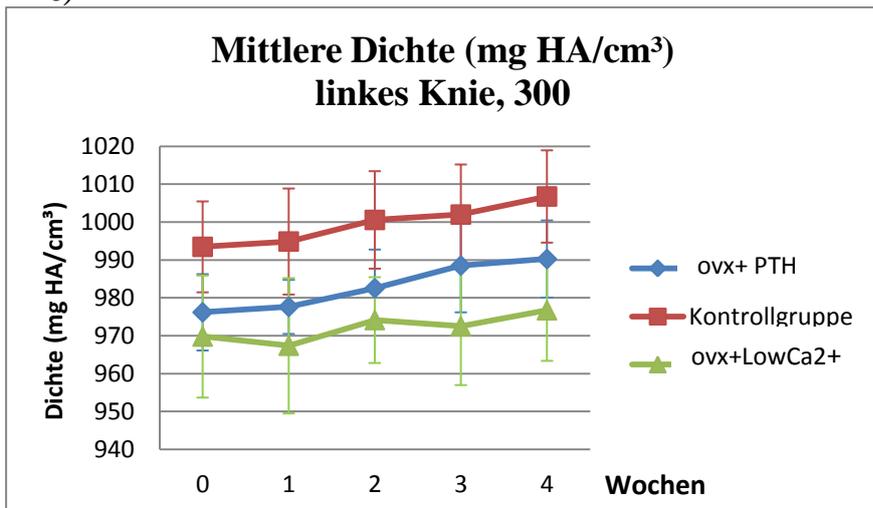
4)



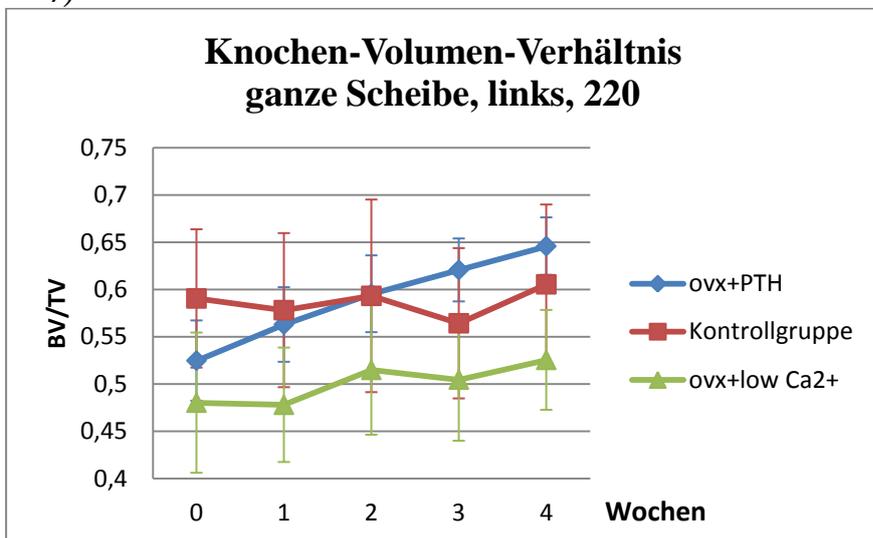
5)



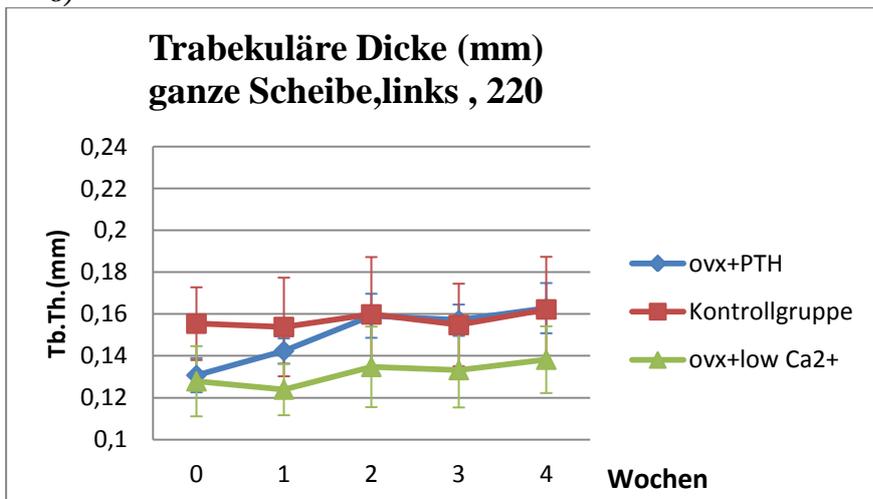
6)



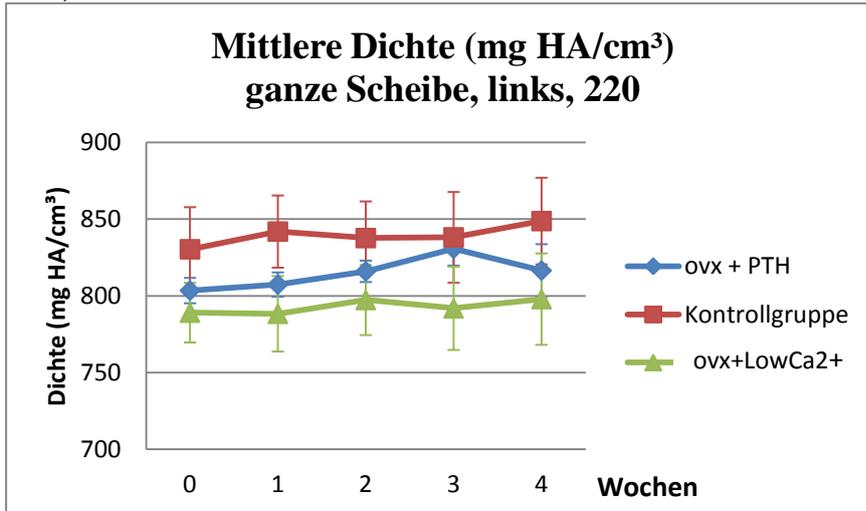
7)



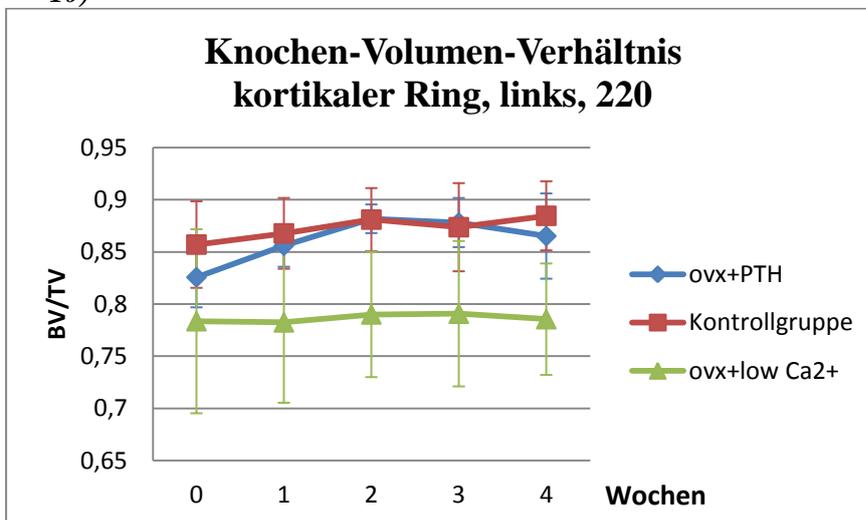
8)



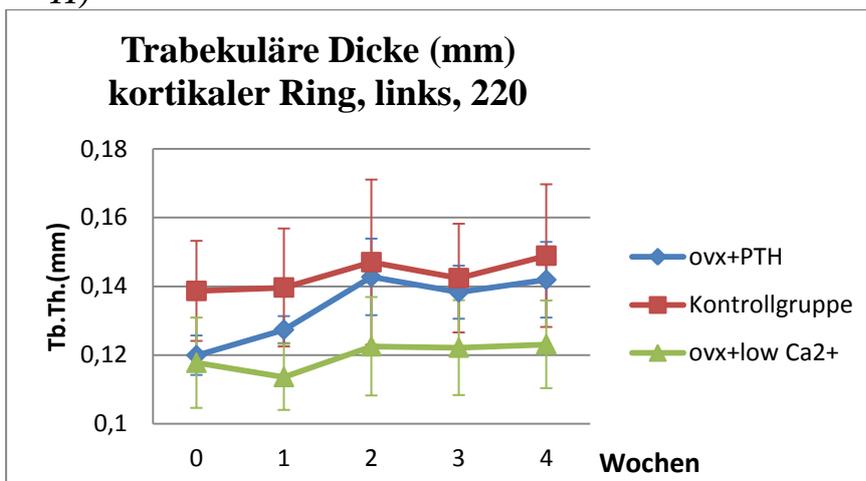
9)



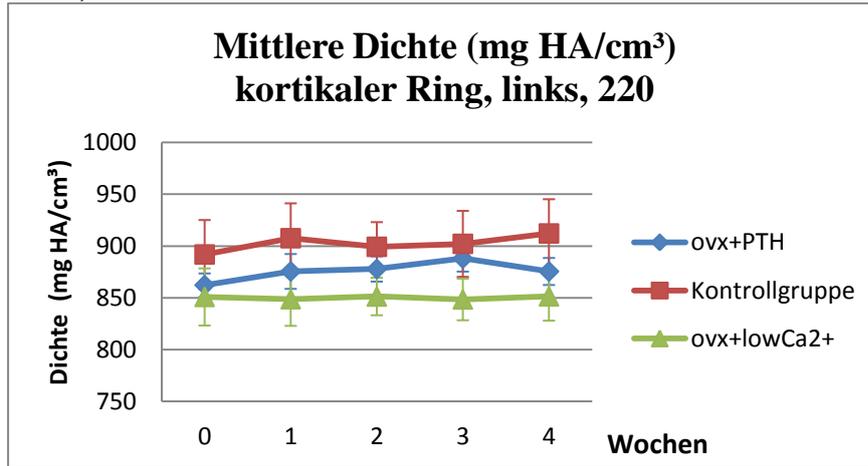
10)



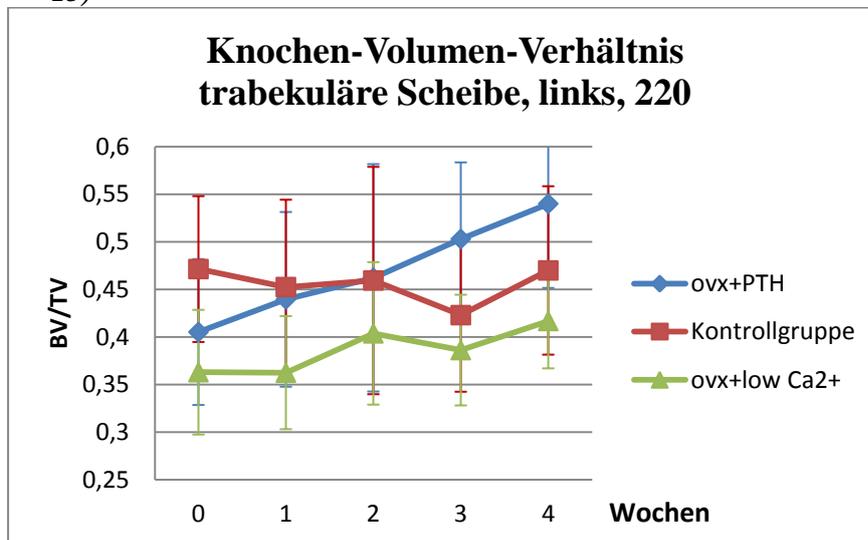
11)



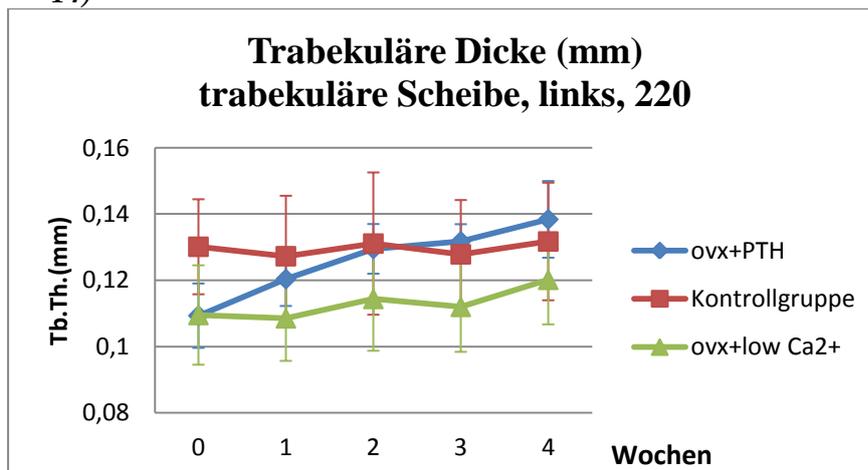
12)



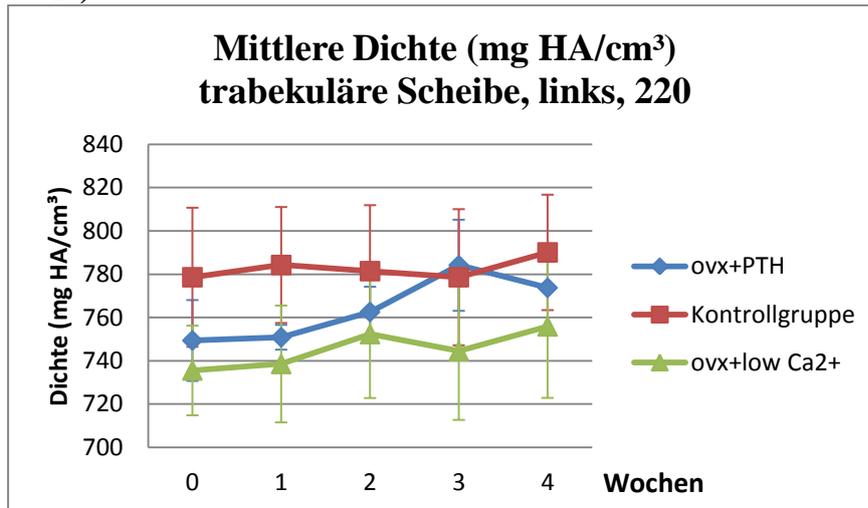
13)



14)

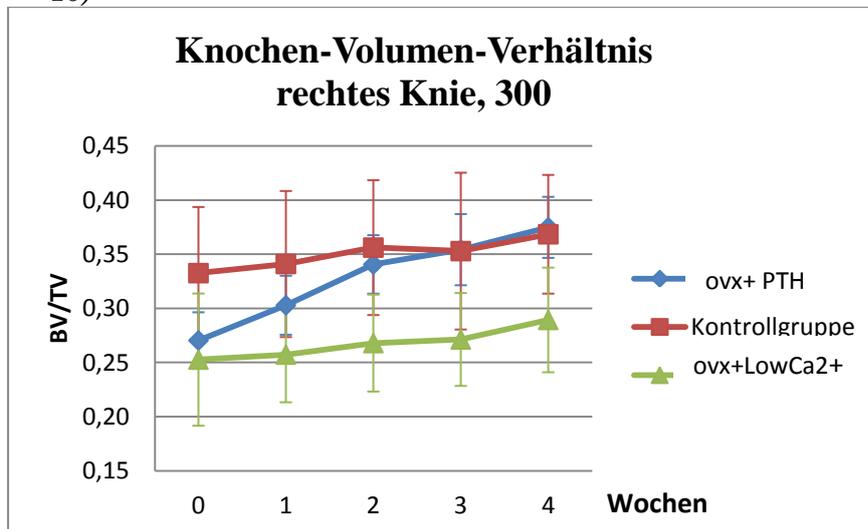


15)

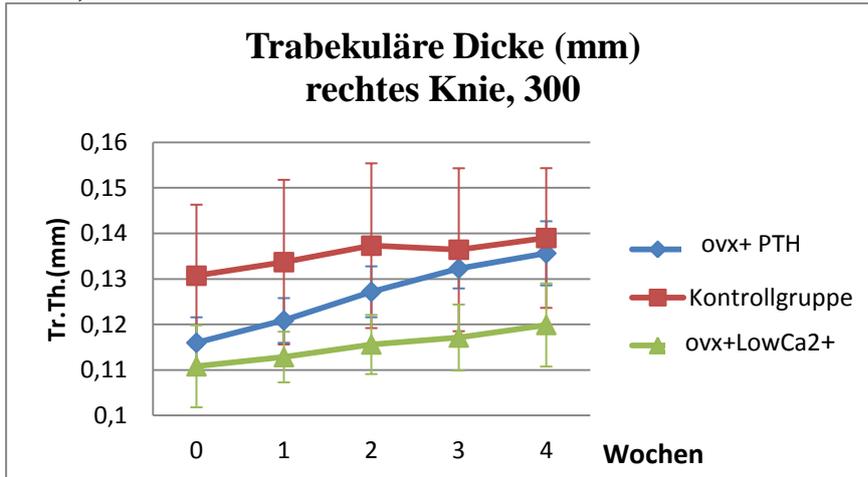


8.2.2 Rechte Seite:

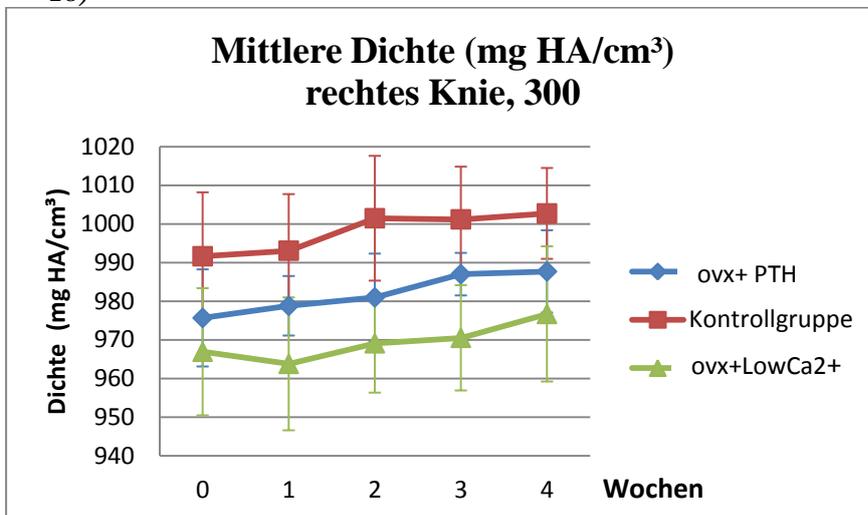
16)



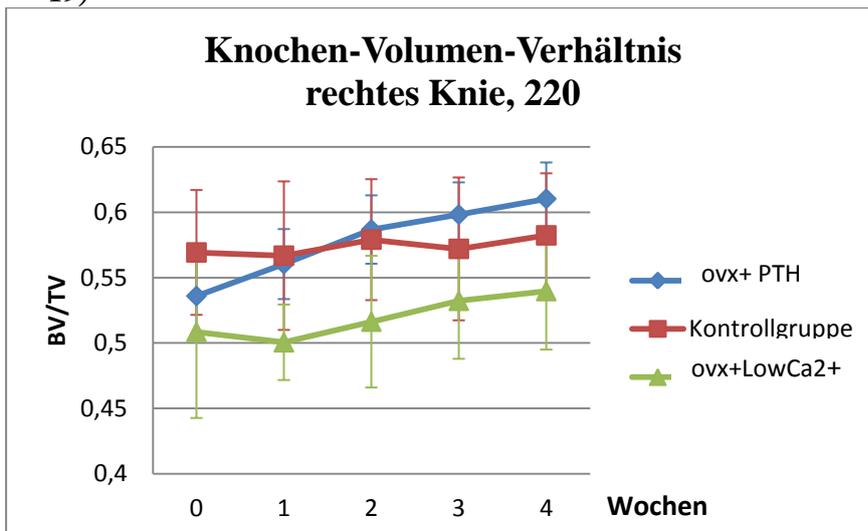
17)



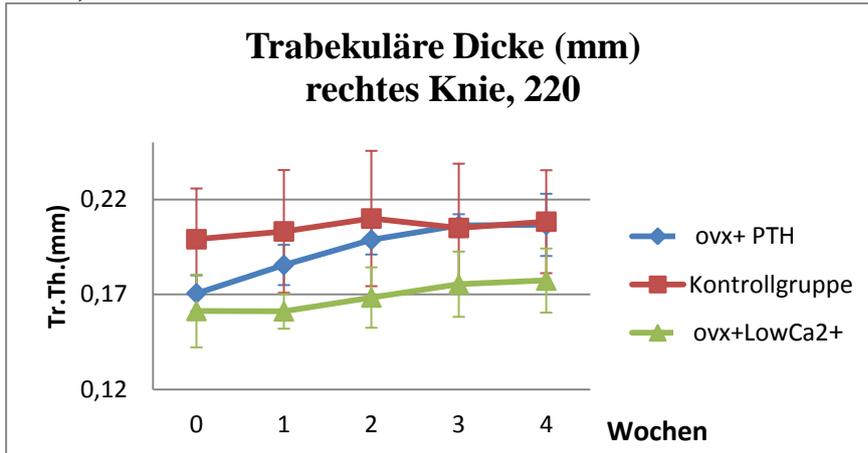
18)



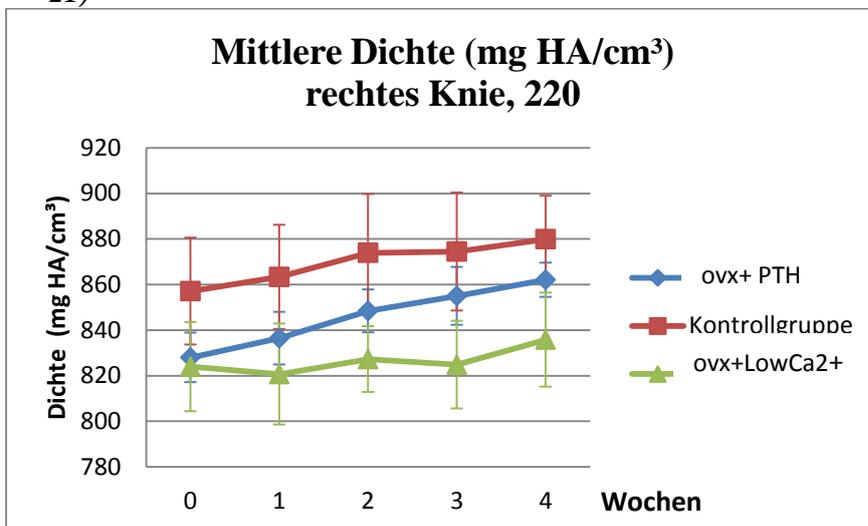
19)



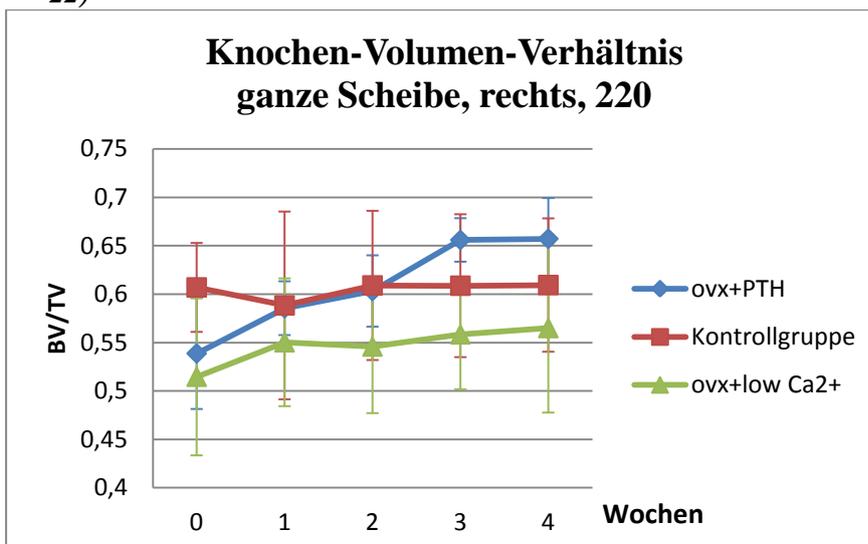
20)



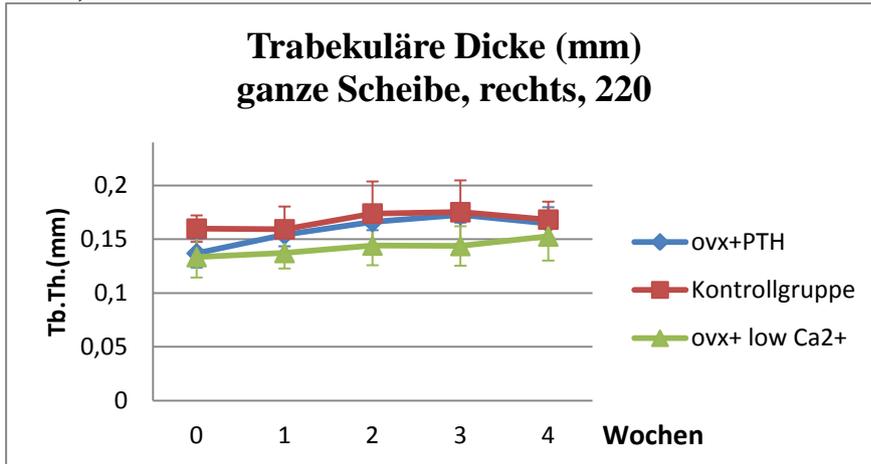
21)



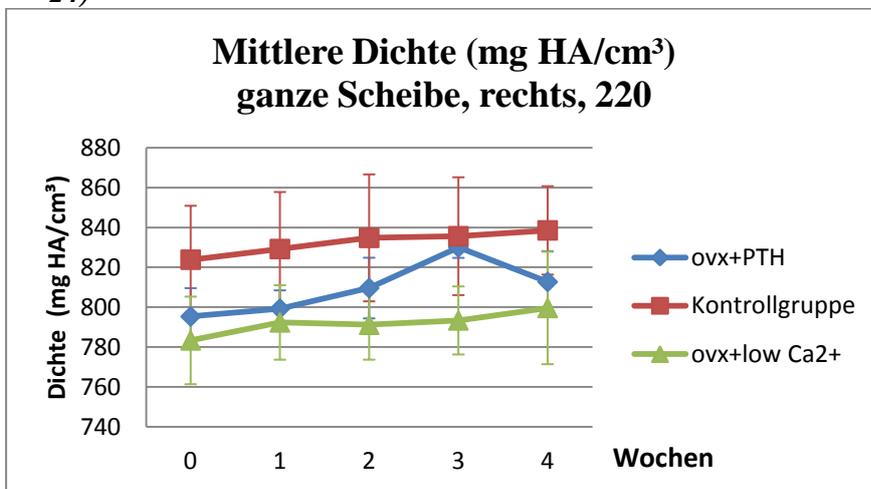
22)



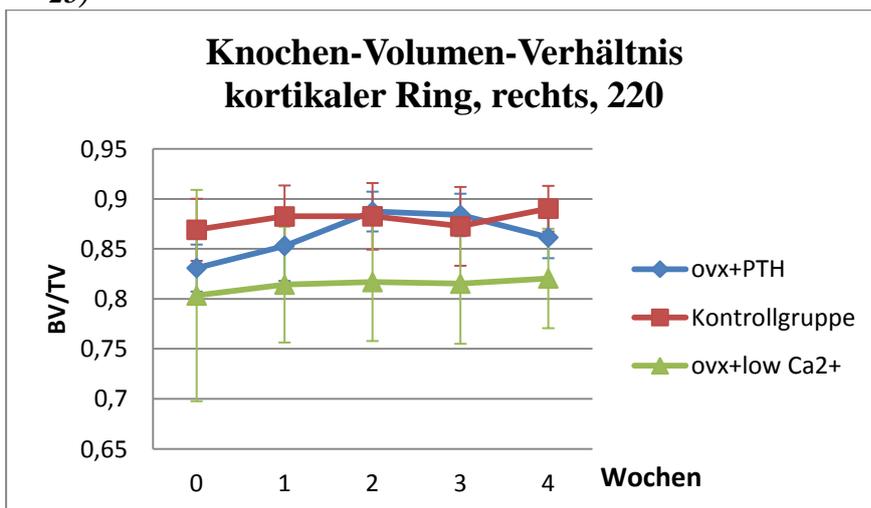
23)



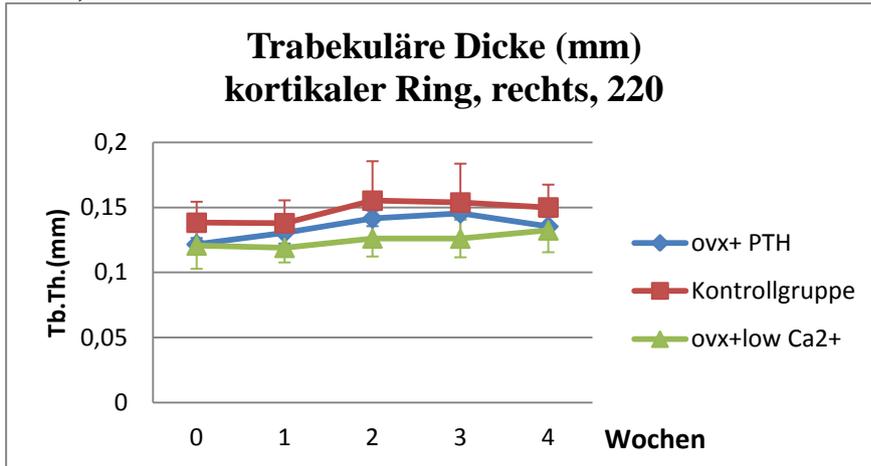
24)



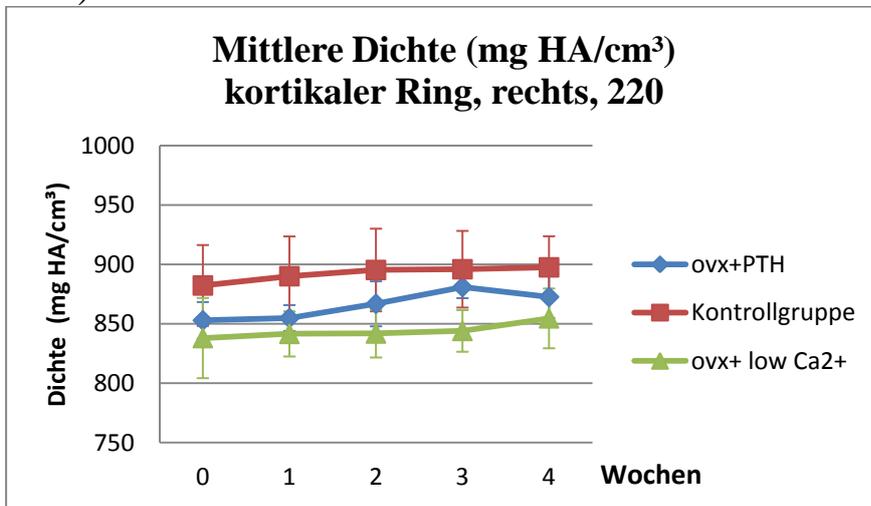
25)



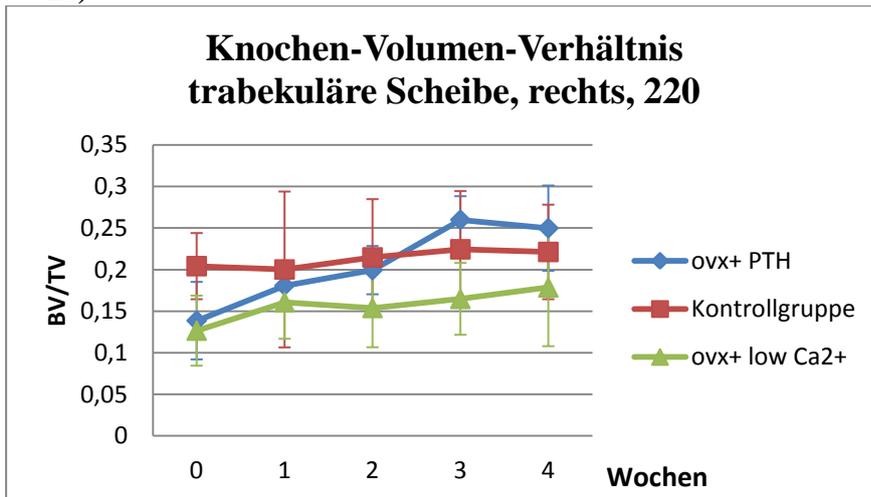
26)



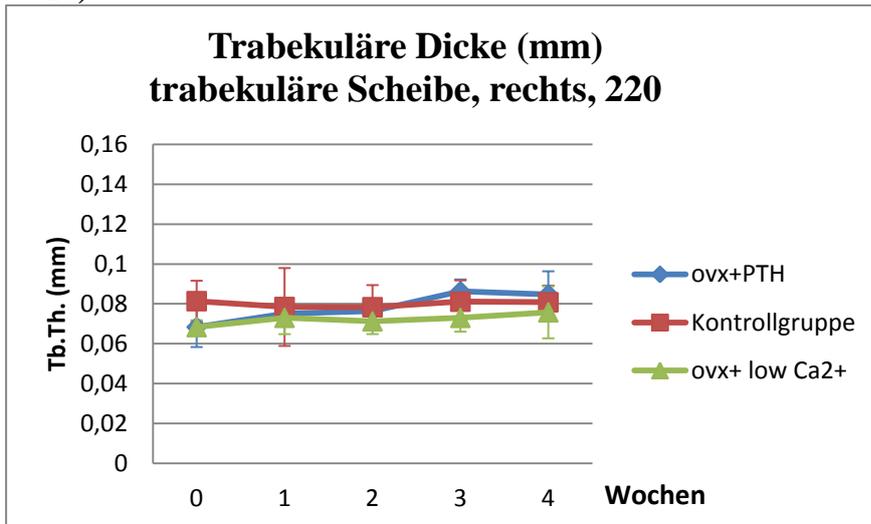
27)



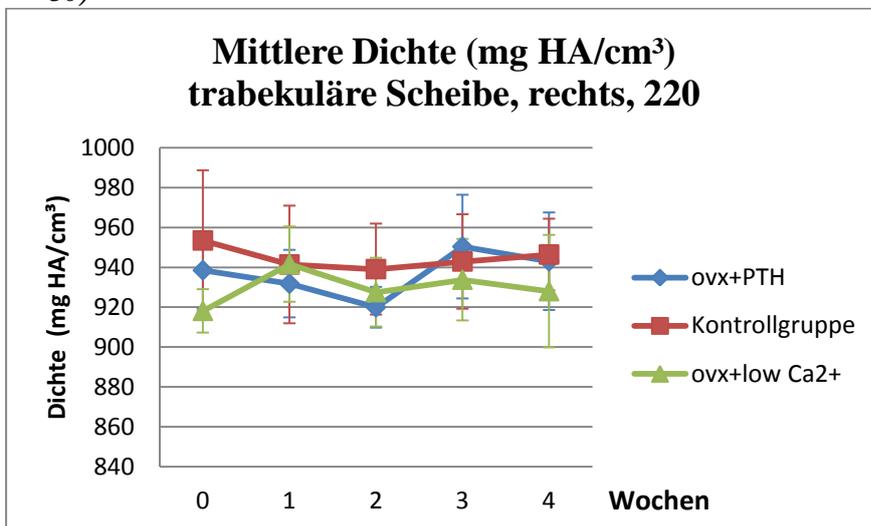
28)



29)



30)



8.3 Anlage 1: Genehmigung des Tierversuches

Ministerium für Landwirtschaft,
Umwelt und ländliche Räume
des Landes Schleswig-Holstein

Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |
Postfach 7151 | 24171 Kiel

Herrn
Sanjay Tiwari, Ph.D.
Klinik für Diagnostische Radiologie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Kiel
Arnold-Heller-Str. 3, Haus 13
24105 Kiel

Ihr Antrag vom: 27.08.2009
Mein Zeichen: V 312-72241.121-33

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:

Herrn Prof. Dr. Gerhard Schultheiß
Tierschutzbeauftragter der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Olshausenstraße 40
24098 Kiel

16. Oktober 2009

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrter Herr Dr. Tiwari,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch Gesetz vom 15. Juli 2009 (BGBl. I S. 1950), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

Etablierung klinischer Bildgebungsverfahren für die molekulare,
funktionale und mikromorphologische Analyse des Knochenumbaus

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 72 Mäuse verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Oktober 2011 befristet.
Sie kann auf formlosen, hinreichend begründeten Antrag um ein Jahr verlängert werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen eingetreten sind.
3. Leiter des Versuchsvorhabens:
Herr Sanjay Tiwari, Ph.D

4. Sein Stellvertreter:
Herr Dr. Christian Schem
5. Wechselt der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
6. Verantwortlicher Tierarzt nach § 9 Abs. 2 Nr. 8 Tierschutzgesetz:
Herr Prof. Dr. Gerhard Schultheiß
7. Weitere Nebenbestimmungen:
Keine.

Die Bestimmungen der §§ 8, 9 und 9a Tierschutzgesetz sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVOBl. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten.

Ich weise insbesondere darauf hin, dass Tierversuche nur durch den in § 9 Abs. 1 Tierschutzgesetz genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Zustellung schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle Klage beim Verwaltungsgericht Schleswig-Holstein in 24837 Schleswig, Brockdorff-Rantzau-Straße 13, erhoben werden.

Mit freundlichen Grüßen


Buttchereit

8.4 Anlage 2: Osteocalcin ELISA

DRG



DRG[®] Mouse Osteocalcin ELISA (EIA-4010)

REVISED 22 July 2010 rm (Vers. 1.1)

For Veterinary Use Only

This kit is intended for Research Use Only.

Not for use in diagnostic procedures.

For the Measurement of Mouse Osteocalcin in Serum or Heparinized Plasma, cell culture supernates and bone extracts.

Introduction

Osteocalcin, the vitamin K-dependent protein of bone, is a specific product of the osteoblast. It is distinguished by its small size (5800 daltons) and the presence of gamma-carboxy-glutamic acid (Gla). In the presence of ionic calcium, the Gla residues allow a specific conformational change in the protein, which in turn promotes osteocalcin binding to bone mineral and subsequent accumulation in bone matrix. While osteocalcin is primarily deposited into the extracellular matrix of bone, a small amount can be detected in the blood. Circulating osteocalcin is thought to reflect that portion of newly synthesized protein that does not bind to bone but is released directly into the circulation.

Principle of the Assay

This sandwich ELISA Kit is specific for mouse osteocalcin only. Both carboxylated and decarboxylated mouse osteocalcin are recognized. Mouse osteocalcin can be measured directly from serum, heparinized plasma, bone extracts and cell culture supernates. A polyclonal antibody directed against the N-terminus is bound to the polystyrene wells. An overnight incubation is done with sample and biotinylated antibody specific for the C-terminus. Detection is achieved after washing and a short incubation with Peroxidase-Streptavidin Conjugate. Standards of highly purified Mouse Osteocalcin are used to generate a standard curve.

References

1. Hauschka, P.V., Lian, J.B., Cole, D.E.C. and Gundberg, C.M.. Osteocalcin and Matrix Gla Protein : Vitamin K-Dependent Proteins in Bone. *Physiological Reviews*, 69: 990-1047 (1989).
2. Gundberg, C.M., Clough, M.E., Carpenter T.O. Development and validation of a radioimmunoassay for mouse osteocalcin: paradoxical response in the *Hyp* mouse. *Endocrinology* 130: 1909-1915 (1992).
3. Lewis, D.B., et al. *PNAS, Medical Sciences (USA)*. 90, 11618-11622 (1993).
4. Tsuji, H., Cawthorn, C., and B. Ecarot. Abnormal Modulation of Serum Osteocalcin by Dietary Phosphate and 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in the Hypophosphatemic Mouse. *Journal of Bone and Mineral Research* 11: 1234-1240 (1996).
5. Wenstrup, R.J., Fowlkes, J.L., Witte, D.P. and J.B. Florer. Discordant Expression of Osteoblast Markers in MC3T3-E1 Cells that Synthesize a High Turnover Matrix. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 10271-10276 (1996).

Fax: (908) 233-0758

DRG International, Inc., USA
www.drg-international.com

Web: www.drg-international.com



DRG[®] Mouse Osteocalcin ELISA (EIA-4010)

REVISED 22 July 2010 rm (Vers. 1.1)

For Veterinary Use Only

6. Kousteni, S, et al. Reversal of Bone Loss in Mice by Nongenotropic Signaling of Sex Steroids. *Science*. 289: 843-846 (2002)
7. Nakamura, M, et al. Osteoprotegerin Regulates Bone Formation through a Coupling Mechanism with Bone Resorption. *Endocrinology*. 144: 5441-9 (2003).
8. Kong, H.J. et al. Fret measurements of cell-traction forces and nano-scale clustering of adhesion ligands varied by substrate stiffness. *PNAS*. 102: 4300-4305 (2005).

FOR RESEARCH USE ONLY

Reagents: Description and Preparation

Store all reagents at 4°C up to 3 months except as noted.

CAUTION: DO NOT USE AZIDE.

1. Sample buffer. One 60ml bottle.
2. Wash Buffer, Phosphate-Saline Concentrate. One 100ml bottle.
Transfer contents to a graduated cylinder, and bring volume up to 500ml with deionized water.
3. Mouse Osteocalcin Standard. One vial 50ng lyophilized.
Reconstitute standard with exactly 1.0ml of sample buffer (yields a solution @ 50ng/ml). Use for making working standards. Store reconstituted standard at -20°C.
4. Mouse Osteocalcin Antiserum Concentrate It is now provided as a concentrate that needs to be diluted 1:20 with sample buffer.
5. Streptavidin Horseradish Peroxidase One 11ml vial.
6. Peroxidase Substrate TMB (3,3¹,5,5¹-tetramethyl benzidine) One 6ml vial.
7. Hydrogen Peroxide Solution . One 6ml vial.
8. Stop Solution. One 12ml vial.
9. One 96 well plate (8 well removable strips) coated with osteocalcin antibody. Extra sealing tape provided.



DRG[®] Mouse Osteocalcin ELISA (EIA-4010)

REVISED 22 July 2010 rm (Vers. 1.1)

For Veterinary Use Only

Other Supplies Required

1. ELISA Plate Reader which can measure absorbance at 450nm.
2. Pipettes: micropipettes 5-1000ul.
3. A plate washer is recommended for washing.
4. A Refrigerator.
5. Deionized water.

Precautions

Some components of this kit contain isothiazolones (5ppm) as preservative. Stop solution contains hydrochloric and phosphoric acids. Keep all materials away from the skin and eyes.

Sample Preparation

Aliquot and freeze immediately all samples for future analysis. Samples containing azide cannot be assayed.

Mouse Serum

Mouse serum must be diluted at least 5 fold with sample buffer. We recommend a 1/10 to 1/20 dilution with sample buffer. Thus it is possible to quantitate osteocalcin in 5ul of mouse serum (10ul in duplicate). Serum samples can conveniently be aliquoted in 25-50ul amounts and stored at -70° C.

The design of the animal experiment is most important. Many variables effect serum osteocalcin levels: age, growth rate, hormonal status, vitamin D intake, stress, circadian rhythm, etc. It is desirable to take blood samples under the same conditions: time of day, without stress, etc. and process the serum (or plasma) the same way for each sampling. We have found a range of 40-150 ng/ml in mouse serum that we evaluated. Young mice (<60 days) can have levels of 500ng/ml or more.

Mouse Bone

Typical levels are 1.0-2.0ng osteocalcin/ug dry bone powder. EDTA extracts of bone powder can be assayed after appropriate dilution.

Mouse Osteoblast Culture Medium

Concentrations of osteocalcin in conditioned media range from <1ng/ml to 400ng/ml depending on the cell type and culture conditions. Full dilution series should be done to establish linearity of dilution. Medium and serum interference should be assessed by appropriate blanks and internal standards of medium with added mouse osteocalcin.

Fetal Bovine Serum shows little interference. Other species of sera should be tested. Culture media can generally be assayed directly.

Fax: (908) 233-0758

DRG International, Inc., USA
www.drg-international.com

Web: www.drg-international.com

DRG



DRG[®] Mouse Osteocalcin ELISA (EIA-4010)

REVISED 22 July 2010 rm (Vers. 1.1)

For Veterinary Use Only

Assay Procedure

CAUTION: KEEP AZIDES AWAY FROM ALL SOLUTIONS AND SAMPLES

All Reagents must be at room temperature prior to use.

1. Please refer to page 2 for preparation of reagents and page 3 for sample preparation.
2. Remove microtiter plate from resealable bag. Strips not used should be removed from the frame and resealed in the bag for future use.
3. Dilute the stock standard (50ng/ml) in polypropylene tubes with sample buffer to give six standards: 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 and 50ng/ml results in a good curve.
4. Pipet 25ul of sample buffer (Blank), Standards, Controls and Unknowns into designated duplicate wells followed by 100ul of osteocalcin antiserum in each well. Cover tightly with plastic seal provided, incubate at **2-8°C, 18-24 hours**.
5. Aspirate wells completely and wash the plate with 0.3ml/well Phosphate-Saline wash buffer. Wash plate 3 times with automatic plate washer or 5 times manually. (Complete removal of wash buffer after each wash is important for good reproducibility).
6. Add 100ul Streptavidin-Horseradish Peroxidase reagent to all wells. Swirl and then incubate at **room temperature for 30 minutes**.
7. Mix one volume of TMB solution with one volume of Hydrogen Peroxide solution and put aside. (Only mix an amount sufficient for the number of wells in use) Wash the plate as in step 5. Immediately add 100ul of substrate mix to all wells and incubate at **room temperature, in the dark for 15 minutes**.
8. Add 100ul of Stop Solution to all wells, swirl and measure absorbance at 450nm immediately.
***NOTE:** Read absorbance values **Immediately** . Exposure to light, even for a few minutes will result in increased absorbances.



DRG[®] Mouse Osteocalcin ELISA (EIA-4010)

REVISED 22 July 2010 rm (Vers. 1.1)

For Veterinary Use Only

Calculation of Results

Average duplicates for all determinations. Subtract the (Blank) from all average readings. Plot net optical density of the standards vs. log of the concentration of each, and draw the best curve. Obtain concentration of each unknown from this standard curve. Always generate a standard curve for each new assay.

Specifications

Sample size: 25ul
Assay time: Overnight
Sensitivity: 1ng/ml
Working range: 1-50ng/ml
Intraassay variation: 6% (95% limits)
Interassay variation: 8% (95% limits)

Typical Data (Do Not Use for determination of Unknowns)

ID	A ₄₅₀	Average – Blank
0ng/ml(Blank)	.120	
0ng/ml(Blank)	.104	(.112)
1.56ng/ml	.165	
1.56ng/ml	.180	.06
3.12ng/ml	.247	
3.12ng/ml	.254	.13
6.25ng/ml	.303	
6.25ng/ml	.345	.20
12.5ng/ml	.437	
12.5ng/ml	.523	.36
25ng/ml	.667	
25ng/ml	.779	.61
50ng/ml	1.030	
50ng/ml	1.271	1.03

Fax: (908) 233-0758

DRG International, Inc., USA
www.drg-international.com

Web: www.drg-international.com

DRG

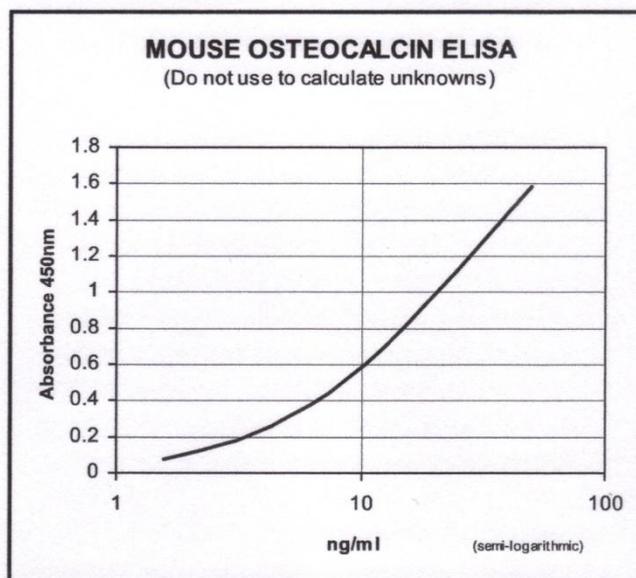


DRG[®] Mouse Osteocalcin ELISA (EIA-4010)

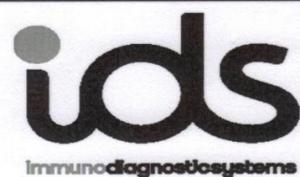
REVISED 22 July 2010 rm (Vers. 1.1)

For Veterinary Use Only

Typical Standard Curve



8.4 Anlage 3: TRAP ELISA



MouseTRAP™ Assay

Solid phase immunofixed enzyme activity assay for the determination of osteoclast-derived tartrate-resistant acid phosphatase form 5b (TRACP 5b) in mouse serum

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

REF

SB-TR103



96

Intended Use

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

The MouseTRAP™ test is a solid phase immunofixed enzyme activity assay for the determination of mouse tartrate-resistant acid phosphatase form 5b (TRACP 5b).

Summary and Explanation

High amount of tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) is expressed by bone-resorbing osteoclasts and activated macrophages (1). Two forms of TRACP circulate in blood, known as TRACP 5a and TRACP 5b (2). TRACP 5b is derived from osteoclasts and TRACP 5a from inflammatory macrophages (3,4). Osteoclasts secrete TRACP 5b into the blood circulation as an active enzyme that is inactivated and degraded to fragments before it is removed from the circulation. Thus, TRACP 5b activity does not accumulate into the circulation in renal or hepatic failure (5,6). Diurnal variability of serum TRACP 5b is low and the levels are not affected by feeding, allowing sample collection at any time of day (6). Recent studies have shown that secreted TRACP 5b indicates the number of osteoclasts rather than their activity (7-10).

The MouseTRAP™ assay is a specific method for the determination of TRACP 5b activity in mouse serum samples. Because the strain, sex and age of the animals used influences the values obtained, each laboratory should determine a reference range for the animals that are used. The MouseTRAP™ assay can also be used in *in vitro* mouse osteoclast cultures to measure TRACP 5b activity from cell lysates or culture medium. Because secreted TRACP 5b indicates the number of osteoclasts, TRACP 5b values determined from mouse osteoclast culture medium can be used to replace microscopic counting of the number of osteoclasts (7), and serum TRACP 5b values can be used to replace histological determination of osteoclast number in mouse bone.

Method Description

The MouseTRAP™ Assay uses a polyclonal antibody (7) prepared using recombinant mouse TRACP (11) as antigen. In the test, the antibody is incubated in anti-rabbit IgG-coated microtiter wells. After washing, standard, control, and samples are incubated in the wells, and bound TRACP 5b activity is determined with a chromogenic substrate to develop color. The reaction is stopped, and the absorbance of the reaction mixture is read in a microtiter plate reader, color intensity being directly proportional to the amount and activity of TRACP 5b present in the sample.

Warnings and Precautions

The MouseTRAP™ Assay is *for research use only* and is not for internal use in humans or animals. This product must be used strictly in accordance with the instructions set out in the Package Insert. IDS Limited will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) howsoever caused, arising out of non-compliance with the instructions provided.

CAUTION: this kit contains material of animal origin. Handle kit reagents as if capable of transmitting an infectious agent.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. Disposal of kit reagents should be in accordance with local regulations.

Sodium Azide

Some reagents in this kit contain sodium azide as a preservative, which may react with lead, copper or brass plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with large volumes of water to prevent azide build up.

0.32M sodium hydroxide

Stop Solution [NaOH] contains 0.32M sodium hydroxide.

R36/38 Irritating to eyes and skin.

S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.

S37/39 Wear suitable gloves and eye/face protection.

Preparation of Reagents

Calibrators [CAL] and Control [CTRL]: Calibrators [CAL] and Control [CTRL] are supplied lyophilised. Reconstitute with 0.5 mL of distilled or deionised water, replace stopper and stand for 10-15 minutes at room temperature. Invert several times to ensure complete reconstitution.

If Calibrators and Control are to be used more than once, they must be frozen (-70°C recommended for a period longer than one week).

Anti-MouseTRAP Antibody [Ab]: Anti-MouseTRAP Antibody [Ab] is supplied lyophilised. Reconstitute with 10.5 mL of distilled or deionised water, replace stopper and stand for 15 minutes at room temperature. Invert several times to ensure complete reconstitution.

Substrate Solution: Prepare just before use. Dissolve two Substrate Tablets [SUBS pNPP] in 10 mL of Substrate Buffer [SUBSBUF] (one tablet in 5 mL for half of the plate). If the substrate solution is to be used more than once, it must be stored frozen and protected from light.

Wash Buffer: Add the contents of each bottle of Wash Buffer Concentrate [WASHBUF 25x] to 960 mL of distilled or deionised water and mix.

All other reagents are supplied ready for use.

Allow all reagents to come to room temperature before use. Reagents should be mixed by repeated inversion before use in the assay.

Shelf Life and Storage of Reagents

This kit is stable until the stated expiry date if stored as specified. Upon receipt, store all reagents at 2-8°C.

Specimen Collection and Storage

The assay should be performed using serum specimens. Specimens should be separated as soon as possible after collection. For long term storage, store at -80°C. Avoid repeated freeze/thaw of samples.

Procedure

Materials Provided

1. **CAL 0-4** - Calibrators (REF SB-TR103 01A - SB-TR103 01E):

Lyophilised Tris-buffered saline containing recombinant MouseTRAP and protein with 0.09% sodium azide. The exact value of each calibrator is printed on the bottle label. 0.5 mL per bottle, 5 bottles per kit.

2. **Ab** - Anti-MouseTRAP Antibody (REF SB-TR103 02):

Lyophilised Tris-buffered saline containing anti-MouseTRAP antibody, protein, stabilisers and 0.05% sodium azide.

3. **MICROPLAT** - Antibody Coated Plate (REF SB-TR103 02W):

Microplate with polyclonal anti-rabbit IgG linked to the inner surface of the polystyrene wells, 8 x 12-well strips in a pack with desiccant.

4. **CTRL** - Control (REF SB-TR103 05):

Lyophilised Tris-buffered saline containing recombinant MouseTRAP and protein with 0.09% sodium azide. The exact value of each control is printed on the bottle label. 0.5 mL per bottle.

5. **NaOH** - Stop Solution (REF SB-TR000 06):

0.32 M Sodium Hydroxide, 6 mL per bottle.

6. **RELEASEAG** - Releasing Reagent (REF SB-TR103 07):

Proprietary reagent for dissociating TRAP from binding proteins. 4 mL per bottle.

7. **SUBS** **pNPP** - Substrate Tablets (REF SB-TR000 08):

pNPP. 2 tablets.

8. **SUBSBUF** - Substrate Buffer (REF SB-TR000 08B):

Sodium Acetate buffer, 10 mL per bottle.

9. **WASHBUF** **25x** - Wash Buffer Concentrate (REF SB-TR000 09):

Tris-buffered saline containing Tween-20, 40 mL per bottle.

10. Adhesive Plate Sealer.

Materials Required but not Provided

1. 0.9% NaCl.
2. Precision pipetting devices to deliver 20 µL, 25 µL, 50 µL, 100 µL, 500 µL and 5 mL.
3. Precision multi-channel pipettes to deliver 25 µL, 50 µL and 100 µL.
4. Automatic microplate washer (optional).
5. Photometric microplate reader and data analysis equipment.

Assay Procedure

Bring all reagents to room temperature. Prepare the reagents as described in Preparation of Reagents.

Transfer the required number of microtitre strips to a strip frame. Duplicate determinations are recommended. Return the remaining strips to the plastic tray pack and reseal. Do not take more strips than can easily be handled within 30 minutes. Note! Make sure that the plastic tray pack with desiccant remains sealed during storage.

1. Add **100 µL** of Anti-MouseTRAP Antibody [Ab] to the appropriate wells of the Antibody Coated Plate [MICROPLAT].
2. Incubate the plate at room temperature (20-24°C) for 60 minutes with shaking (approximately 950rpm).
3. Wash all wells four times with Wash Buffer:
 - a) Automatic plate wash: Set plate washer to dispense at least 300 µL of Wash buffer per well. Fill and aspirate for 4 cycles.
 - b) Manual wash: Decant the contents of the wells by inverting sharply. Dispense 250 µL of Wash Buffer to all wells. Decant and repeat three times.

Tap the inverted plate firmly on absorbent tissue to remove excess Wash Buffer before proceeding to the next step.

4. Add **100 µL** of each Calibrator [CAL] or Control [CTRL] to the appropriate wells of the Antibody Coated Plate [MICROPLAT] in duplicate.
5. Add **75 µL** of 0.9% NaCl followed by **25 µL** of sample to the appropriate wells of the Antibody Coated Plate [MICROPLAT] in duplicate.
6. Add **25 µL** of Releasing Reagent [RELEASREAG] to all wells using a multichannel pipette.
7. Incubate the plate at room temperature (20-24°C) for 60 minutes with shaking (approximately 950rpm).
8. Repeat Wash Step 3.
9. Add **100 µL** of freshly prepared Substrate solution to all wells using a multichannel pipette.
10. Cover the plate with an adhesive plate sealer. Incubate at 37°C for 2 hours.
11. Add **25 µL** of Stop Solution [NaOH] to all wells using a multichannel pipette. Mix the contents of the wells thoroughly.
12. Measure the absorbance of each well at 405 nm using a microplate reader within 30 minutes of adding the Stop Solution.

Quality Control

The regular use of control samples at several analyte levels is advised to ensure day-to-day validity of results. One kit control is provided. The control should be tested as an unknown. Quality Control charts should be maintained to follow the assay performance.

Calculation of Results

Plot the mean absorbance for each calibrator on the ordinate against concentration on the abscissa on log-lin graph. Read values for each control and unknown sample from the calibration curve in U/L. Multiply the results of the samples with dilution factor.

To obtain the concentration of MouseTRAP in each sample, multiply the value read from the curve by the dilution factor used (1:4).

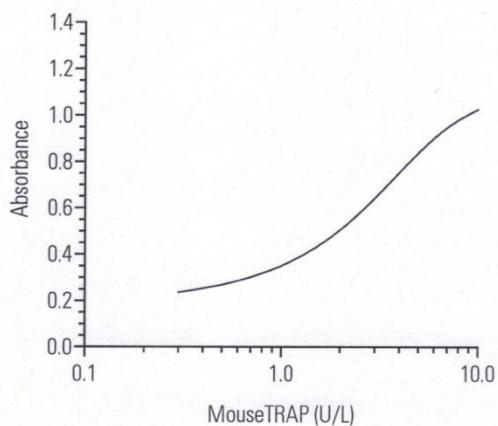
Sample Assay Data

This data is for illustration only and must not be used for the calculation of any sample result. The exact value of each calibrator is printed on the bottle label.

Well	Description	Abs.	Mean. Abs.	Result U/L
A1, A2	Calibrator 0 0 U/L	0.180 0.174	0.177	
A3, A4	Calibrator 1 0.3 U/L	0.240 0.234	0.237	
A5, A6	Calibrator 2 1.0 U/L	0.351 0.351	0.351	
A7, A8	Calibrator 3 3.0 U/L	0.649 0.640	0.645	
A9, A10	Calibrator 4 10.0 U/L	1.032 1.021	1.026	
A11, A12	Sample	0.424 0.436	0.430	1.5

Typical Calibration Curve

This sample calibration curve is for illustration only.



Performance Data

Sensitivity

The sensitivity is 0.1 U/L.

Precision

Intra-assay variation of the assay is <6.5%, and interassay variation is <8%.

References

- 1 Yaziji H, Janckila AJ, Lear SC, Martin AW, Yam LT 1995 Immunohistochemical detection of tartrate-resistant acid phosphatase in non-hematopoietic human tissues. *Am J Clin Pathol* 104:397-402.
- 2 Lam KW, Li CY, Yam LT, Desnick RJ 1981 Comparison of the tartrate-resistant acid phosphatase in Gaucher's disease and leukemic reticuloendotheliosis. *Clin Biochem* 14:177-181.
- 3 Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Väänänen HK 2000 Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15:1337-1345.
- 4 Janckila AJ, Neustadt DH, Nakasato YR, Halleen JM, Hentunen T, Yam LT 2002 Serum tartrate-resistant acid phosphatase isoforms in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta.* 320:49-58.
- 5 Halleen JM, Alatalo SL, Janckila AJ, Woitge HW, Seibel MJ, Väänänen HK 2001 Serum Tartrate-resistant acid phosphatase is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Clin Chem* 47:597-600.
- 6 Hannon RA, Clowes JA, Eagleton AC, Al Hadari AA, Eastell R, Blumsohn A 2004 Clinical performance of immunoreactive tartrate resistant acid phosphatase isoform 5b as a marker of bone resorption. *Bone* 34:187-194.
- 7 Alatalo SL, Halleen JM, Hentunen TA, Mönkkönen J, Väänänen HK 2000 Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. *Clin Chem* 46:1751-1754.
- 8 Alatalo SL, Penq Z, Janckila AJ, Kaija H, Vihko P, Väänänen HK, Halleen JM 2003 A novel immunoassay for the determination of tartrate-resistant acid phosphatase 5b from rat serum. *J Bone Miner Res* 18:134-139.
- 9 Chu P, Chao TY, Lin YF, Janckila AJ, Yam LT 2003 Correlation between histomorphometric parameters of bone resorption and serum type 5b tartrate-resistant acid phosphatase in uremic patients on maintenance hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 41:1052-1059.
- 10 Alatalo SL, Ivaska KK, Waguespack SG, Econs MJ, Väänänen HK, Halleen JM 2004 Osteoclast-derived serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b in Albers-Schonberg disease (type II autosomal dominant osteopetrosis). *Clin Chem* 50:883-890.
- 11 Marshall K, Nash K, Haussman G, Cassady I, Hume D, de Jersey J, Hamilton S (1997). Recombinant human and mouse purple acid phosphatases: expression and characterization. *Arch Biochem Biophys* 15:230-236.

	<p>GB <i>Use By</i> DE <i>Verwendbar bis</i> ES <i>Fecha de caducidad</i> IT <i>Utilizzare entro</i> FR <i>Utiliser jusque</i> NL <i>Houdbaar tot</i> DK <i>Holdbar til</i> CZ <i>Použitelné do</i> SK <i>Použitelné do</i> GR <i>Ημερομηνία λήξης</i> PT <i>Prazo de validade</i> HU <i>Felhasználható</i> SE <i>Använd före</i> PL <i>Użyć przed</i></p>		<p>GB <i>Batch code</i> DE <i>Chargenbezeichnung</i> ES <i>Código de lote</i> IT <i>Codice del lotto</i> FR <i>Code du lot</i> NL <i>Lot nummer</i> DK <i>Lotnummer</i> CZ <i>Číslo šarže</i> SK <i>Číslo šarže</i> GR <i>Αριθμός Παρτίδας</i> PT <i>Código do lote</i> HU <i>Sarzszzám</i> SE <i>Lot nummer</i> PL <i>Kod partii</i></p>
	<p>GB <i>Catalogue number</i> DE <i>Bestellnummer</i> ES <i>Número de catálogo</i> IT <i>Numero di catalogo</i> FR <i>Référence du catalogue</i> NL <i>Catalogus nummer</i> DK <i>Katalognummer</i> CZ <i>Katalogové číslo</i> SK <i>Katologové číslo</i> GR <i>Αριθμός καταλόγου</i> PT <i>Referência de catálogo</i> HU <i>Katalógusszám</i> SE <i>Katalognummer</i> PL <i>Numer katalogowy</i></p>		<p>GB <i>Manufacturer</i> DE <i>Hersteller</i> ES <i>Fabricante</i> IT <i>Fabbricante</i> FR <i>Fabricant</i> NL <i>Fabrikant</i> DK <i>Producent</i> CZ <i>Výrobce</i> SK <i>Výrobca</i> GR <i>Κατασκευαστής</i> PT <i>Fabricante</i> HU <i>Gyártó</i> SE <i>Tillverkare</i> PL <i>Producent</i></p>
	<p>GB <i>Contains sufficient for <n> tests</i> DE <i>Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen</i> ES <i>Contenido suficiente para <n> ensayos</i> IT <i>Contenuto sufficiente per "n" saggi</i> FR <i>Contenu suffisant pour "n" tests</i> NL <i>Inhoud voldoende voor "n" testen</i> DK <i>Indeholder tilstrækkeligt til "n" test</i> CZ <i>Lze použít pro <n> testů</i> SK <i>Obsah postačuje na <n> stanovení</i> GR <i>Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις</i> PT <i>Conteúdo suficiente para "n" ensaios</i> HU <i>A doboz tartalma <n> vizsgálat</i> SE <i>Räcker till "n" antal tester</i> PL <i>Wystarczy na wykonanie <n> testów</i></p>		<p>GB <i>In Vitro Diagnostic Medical Device</i> DE <i>In-Vitro-Diagnostikum</i> ES <i>Producto sanitario para diagnóstico in vitro</i> IT <i>Dispositivo medico-diagnostico in vitro</i> FR <i>Dispositif médical de diagnostic in vitro</i> NL <i>Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek</i> DK <i>Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik</i> CZ <i>In Vitro diagnostický zdravotnický prostředek</i> SK <i>Zdravotnícka pomocka in vitro</i> GR <i>Ιn Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν</i> PT <i>Dispositivo médico para diagnóstico in vitro</i> HU <i>In vitro diagnosztikum</i> SE <i>Medicintekniska produkter för in vitro diagnostik</i> PL <i>Wyrób do diagnostyki In Vitro</i></p>
	<p>GB <i>Temperature limitation</i> DE <i>Temperaturbegrenzung</i> ES <i>Límite de temperatura</i> IT <i>Limiti di temperatura</i> FR <i>Limites de température</i> NL <i>Temperatuurlimiet</i> DK <i>Temperaturbegrænsning</i> CZ <i>Teplotní rozmezí od do</i> SK <i>Teplotné rozmedzie od do</i> GR <i>Περιορισμοί θερμοκρασίας</i> PT <i>Limites de temperatura</i> HU <i>Hőmérséklettartomány</i> SE <i>Temperaturbegränsning</i> PL <i>Przestrzegać zakresu temperatury</i></p>		<p>GB <i>Consult Instructions for Use</i> DE <i>Gebrauchsanweisung beachten</i> ES <i>Consulte las instrucciones de uso</i> IT <i>Consultare le istruzioni per l'uso</i> FR <i>Consulter les instructions d'utilisation</i> NL <i>Raadpleeg de gebruiksaanwijzing</i> DK <i>Se brugsanvisning</i> CZ <i>Viz návod k použití</i> SK <i>Vid' návod na použitie</i> GR <i>Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης</i> PT <i>Consulte as instruções de utilização</i> HU <i>Nézze meg a Használati utasítást</i> SE <i>Se handhavandebeskrivningen</i> PL <i>Sprawdź w instrukcji obsługi</i></p>

Procedure Summary

ASSAY

Add 100 μ L Anti-Mouse TRAP Antibody **Ab** to Antibody Coated Plate **MICROPLAT**.



Incubate: 60 minutes @ 20-24°C with shaking.



Wash plate.



Add 100 μ L Calibrator **CAL** or Control **CTRL** to Antibody Coated Plate **MICROPLAT**.
Add 75 μ L 0.9% NaCl followed by 25 μ L sample to Antibody Coated Plate **MICROPLAT**.

Add 25 μ L Releasing Reagent **RELEASREAG**



Incubate: 60 minutes @ 20-24°C with shaking.



Wash plate.



Add 100 μ L Substrate solution.



Incubate: 2 hours @ 37°C.



Add 25 μ L Stop Solution **NaOH**.



Read plate @ 405nm.



Immunodiagnostic Systems Ltd (IDS Ltd).

UK Immunodiagnostic Systems Ltd (IDS Ltd), 10 Didcot Way, Boldon Business Park, Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD

Tel: +44 (0) 191 519 0660 • Fax: +44 (0) 191 519 0760 • e-mail: info.uk@idsplc.com • www.idsplc.com

USA Immunodiagnostic Systems Inc (IDS Inc.), P.O. Box 17063, Fountain Hills, AZ 85269-7063

Tel: 480-836-7435 • Fax: 480-836-7437 • e-mail: info.us@idsplc.com • www.idsplc.com

Germany Immunodiagnostic Systems GmbH (IDS GmbH), Mainzer Landstrasse 49, 60329 Frankfurt am Main

Tel: +49 (0) 69 3085-5025 • Fax: +49 (0) 69 3085-5125 • e-mail: info.de@idsplc.com • www.idsplc.com

France Immunodiagnostic Systems EURL (IDS EURL), 55 rue Sainte Anne, 75002 PARIS

Tel: +33 (0)1 42 44 12 63 • Fax: +33 (0)1 42 44 40 76 • e-mail: info.fr@idsplc.com • www.idsplc.com

Scandinavia Immunodiagnostic Systems Nordic a/s (IDS Nordic a/s), Marielundvej 30, 2. Sal, 2730 Herlev, Denmark

Tel: +45 44 84 0091 • Fax: +45 44 84 0092 • email: info.nordic@idsplc.com • www.idsplc.com

8.5 Lebenslauf

Persönliche Daten: Friederike-Cornelia Sewening geb. Grundmann

geboren am 17.09.1987 in Tübingen

12.07.2014 Hochzeit mit Christian Ferdinand Sewening

Ausbildung:

Schule: 1991-1998 Grundschule Winkelwiese/ Tübingen (1.-4.Klasse)
1998-2000 Uhland Gymnasium/ Tübingen (5.- 1/2 6.Klasse)
2001 OS Lührstraße/ Hannover (2/2 6.Klasse)
2001-2004 Sophienschule/ Hannover (7.-10.Klasse)
2004-2005 Valparaiso High School (VHS)/ Indiana, USA
2005-2007 Sophienschule/ Hannover (12.-13. Klasse)
Leistungskurse Biologie und Politik
2007 Abitur

Studium: 2007-2009 Vorklinik Humanmedizin, Universität Kiel
August 2009 Physikum/ 1. Staatsexamen der Humanmedizin
2009-2013 Klinik am UKSH, Universität Kiel

Praktisches Jahr : 1.Tertial Chirurgie, UKSH- Campus Kiel
2.Tertial Gynäkologie, Inland Klinik Rendsburg
3.Tertial Innere Medizin, Bad Segberg

November 2013 Ärztliche Prüfung und Approbation

Berufliche Stationen: Mai- Juli 2014 Assistenzärztin in der Gynäkologie und Geburtshilfe
Klinikum Uelzen GmbH

Ab 1.August 2014 Assistenzärztin in der Gynäkologie und Geburtshilfe

Städtisches Klinikum Lüneburg

Seit 2009 Arbeit an meiner Dissertation im MOIN CC (Molekular Imaging North Competence Centre, Direktor: Prof. Dr. Claus-C. Glüer) unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Christian Schem aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. hc. Walter Jonat) der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Veröffentlichungen

- 1) Campbell, G.M., Tiwari, S., Grundmann, F., Purcz, N., Schem, C., Glüer, C.C.; (2013). *Three-dimensional Image Registration Improves the Long-term Precision of In Vivo Micro-Computed Tomographic Measurements in Anabolic and Catabolic Mouse Models*. *Calcif Tissue Int.* (elektronische Veröffentlichung vor gedruckter Veröffentlichung) [30.10.2013]
- 2) Tiwari, S., Tower, R., Campbell, G. M., Grundmann, F., Purcz, N., Gavrilova, O., Müller, M., Schem, C., Glueer, C.C.; (2012). *Quantitative differences in binding of a fluorescent bisphosphonate to bone minerals are observed in mouse models of bone turnover: potential for application as an imaging probe for bone metabolism*. *RöFo* **184**(12): A1.
- 3) Tiwari S., Grundmann F., Purcz N., Böttcher M., Gavrilova O., Schem C., Glüer C.C.; (2012). *In vivo detection of bone turnover reveal limited utility of a fluorescent bisphosphonate as a marker of bone remodeling*. (Poster präsentiert auf dem Osteoonkologie Kongresses im März 2012), Tübingen, Deutschland.
Abstract verfügbar unter:
http://osteoonkologie-kongress.de/media/downloads/Osteo12_Abstracts_Posterbegehung2.pdf [22.03.2013]
- 4) Tiwari S., Tower R., Campbell G., Grundmann F., Purcz N., Gavrilova O., Müller M., Schem C., Glüer C.C.; (2012). *Quantitative differences in binding of a fluorescent bisphosphonate to bone minerals are observed in mouse models of bone turnover: potential for application as an imaging probe for bone metabolism*. (Poster präsentiert auf dem Treffen des Interdisziplinären Netzwerkes Molekulare Bildgebung, des „MoBi 2012“ im September 2012), Erlangen, Deutschland.
Abstract verfügbar unter:
http://www.mobi2012.de/images/program_final.pdf [22.03.2013]
- 5) Campbell G., Grundmann F., Purcz N., Böttcher M., Schem C., Tiwari S., Glüer C.C.; (2012). *Three-dimensional image registration enhances the ability to detect in vivo changes in bone architecture and mineralization at the proximal tibial metaphysis in mice with micro-CT*. (Poster präsentiert auf dem Osteoonkologie Kongress im März 2012), Tübingen, Deutschland.
Abstract verfügbar unter:
http://osteoonkologie-kongress.de/media/downloads/Osteo12_Abstracts_Posterbegehung2.pdf [22.03.2013]

6) Tower R., Campbell G., Muller M., Will O., Grundmann F., Schem C., Glüer C., Tiwari S.; (2013). *Binding kinetics of fluorescent bisphosphonates as a tool for monitoring bone dynamics in vivo*. (Poster präsentiert auf der European Calcified Tissue Society Conference ECTS 2013), Lissabon, Portugal. *Bone Abstracts* Vol 1, PP318

Abstract verfügbar unter:

<http://www.bone-abstracts.org/ba/0001/ba0001PP318.htm> [12.07.2013]

8.7 Danksagung

Zum Ende dieser Arbeit möchte ich allen danken die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben:

Bei Herrn PD Dr. Christian Schem bedanke ich mich für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Möglichkeit des selbstständigen und unabhängigen Arbeitens.

Herrn Professor Dr. Dr. Walter Jonat danke ich für die Möglichkeit die Arbeit in seiner Klinik anzufertigen.

Dr. Sanjay Tiwari möchte ich ganz besonders danken: Für die Unterstützung und Betreuung auch am Wochenende und zu nächtlichen Zeiten, für die unkomplizierte Atmosphäre und für unzählige anregende Diskussionen.

Prof. Dr. rer. nat. Claus-Christian Glüer danke ich für die Möglichkeit die Messungen und Auswertungen im MOIN CC durchzuführen, für methodische Anregungen und reichlich Hilfestellungen bei Fragen der Durchführung.

Dr. Markus Böttcher danke ich für die Hilfe bei der Handhabung und Weiterverarbeitung der Datenmengen. Danke für die schnellen Antworten auf Friederike-Post!

Dr. Graeme Campbell ist für die Durchführung meiner Arbeit leider zu spät zur Arbeitsgruppe hinzugestoßen, stand mir aber mit seiner μ CT-Erfahrung bei der Evaluation zur Seite und hat mich in meinen Auswertungsmethoden bestätigt.

Jaime Andrés Peña hat die Einarbeitung in das μ CT erleichtert und war bei technischen Fragen und Problemen immer parat.

Dem ganzen Team danke ich für die tolle Zusammenarbeit bei diesem Versuch, den vielen Messungen und den vielen Stunden im Labor:

Frank Rösel, der mir alles über die Mäusehandhabung beigebracht hat; Dr. Dr. Nicolai Purcz, gemeinsam hatten wir so einige Erleuchtungen, Danke für das unermüdliche Mit- und nochmal Durchdenken und neue Wege finden! Lennart Bittermann, Gabi Trompke, Lena Korniyenko und Dr. Olga Gavrilowa und alle noch nicht namentlich genannten. Danke!

Zuletzt möchte ich Christian Sewening für seine Unterstützung und sein Verständnis, meinem Vater und besonders meiner Mutter für ihr unermüdliches Korrekturlesen, ihre stilistischen Rettungsaktionen und ihre vollständige Unterstützung danken.

Ohne Sie/euch alle wäre diese Arbeit niemals fertiggestellt worden. Vielen Dank!