

Aus der  
Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Johannes M. Rueger  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Histologische und kontaktradiographische Untersuchungen  
zur Wirkung von intracerebroventrikulärer Leptin-Applikation  
im Schafmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Johann-Christoph Schnell

aus Hamburg

Hamburg, 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 09.11.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:	Prof. Dr. M. Amling
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:	PD Dr. H. Korbmacher
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:	PD Dr. Th. Schinke



Meinen Eltern gewidmet

---

# 1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis.....	3
2 Arbeitshypothese und Fragestellung.....	5
3 Einleitung.....	6
3.1 Knochenumbau (Remodeling).....	7
3.2 Osteoporose.....	8
3.3 Leptin.....	11
3.4 Das Schaf als Tiermodell.....	11
3.5 Zielsetzung.....	13
4 Material und Methoden.....	15
4.1 Ethische Prüfung / Tierversuchsgenehmigung.....	15
4.2 Versuchstiere, Operationen, Biochemie und kontinuierliche intracerebroventrikuläre Infusion.....	15
4.3 Histologische Aufarbeitung.....	18
4.4 Histologische Färbungen.....	21
4.4.1 Toluidinblau O-Färbung.....	21
4.4.2 Modifizierte von Kossa-/van Gieson Gegenfärbung.....	23
4.5 Histomorphometrie.....	25
4.5.1 Statische Histomorphometrie.....	26
4.6 Kontaktradiographie.....	27
4.7 Statistische Analysen.....	27
5 Ergebnisse.....	28
5.1 Intracerebroventrikuläre Langzeitinjektion, Versuchstiere.....	28
5.2 Kontaktradiographien.....	28
5.3 Histomorphometrie.....	30
6 Diskussion.....	34
7 Zusammenfassung.....	37
8 Literaturverzeichnis.....	40
9 Anhang.....	49
9.1 Abbildungsverzeichnis.....	49
9.2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	50
10 Danksagung.....	51

---

1 Inhaltsverzeichnis	4
11 Lebenslauf.....	52
12 Veröffentlichungen.....	53
13 Erklärung.....	54

---

## 2 Arbeitshypothese und Fragestellung

Durch Studien mit physiologischer und genetischer Manipulation bzw. Selektion bei Mäusen wurde Leptin als potenter Inhibitor der Knochenformation erkannt, der über das zentrale Nervensystem wirkt.

Das zentrale Wesen der Regulation der Knochenmasse und ihrer Störungen wurde aufgedeckt. Es wurde eine hypothalamische Regulation des Knochenumbaus mittels des sympathischen Nervensystems nachgewiesen.

Obwohl diese Untersuchungen das Verständnis der Skelettphysiologie wesentlich erweitert haben, blieben Zweifel bezüglich der physiologischen Relevanz dieser Beobachtungen, da der Effekt des Leptins auf den Knochen nach intracerebroventrikulärer (icv) Verabreichung nur in Mäusen gezeigt worden war.

Hieraus ergab sich die Frage nach der Übertragbarkeit der beobachteten Leptinwirkung auf andere, insbesondere größere Säugetiere.

Auf diesem Weg erscheint eine Annäherung an die Physiologie des Menschen, aber auch die Etablierung eines alternativen Großtiermodelles zur Erforschung der Osteoporose und anderer Knochenstoffwechselerkrankungen in greifbarer Nähe.

Im hier beschriebenen Experiment wurden weibliche Schafe mit intracerebroventrikulärer Leptin-Langzeitapplikation behandelt und der Knochenphänotyp nach einem Behandlungszeitraum von drei Monaten analysiert. Inhalt dieser Doktorarbeit ist die kontaktradiographische und histomorphometrische Auswertung des bioptisch und durch die Sektionen der Versuchstiere gewonnenen Knochenmaterials.

---

### 3 Einleitung

Das menschliche Skelett nimmt als Organ vielfältige Aufgaben wahr, es gewährleistet als Bestandteil des Bewegungsapparates Stabilität und Mobilität des Körpers, schützt empfindliche Organe und hat als Speicherorgan einen wesentlichen Anteil an der Homöostase des systemischen Kalziumhaushaltes.

Mit zunehmendem Alter vermehrt auftretende Störungen des Skelettsystemes scheinen multifaktoriellen Ursprunges zu sein, die Erforschung an differenzierten Tiermodellen ermöglicht sowohl die Untersuchung der einzelnen Faktoren, als auch gezielt das Zusammenspiel mehrerer Faktoren.

Erkrankungen des Knochenstoffwechsels, die mit erhöhter Fraktur neigung und einer verzögerten oder inadäquaten Knochendefektheilung einhergehen, sind in unserer modernen postindustriellen Gesellschaft häufige Ursache für Morbidität und sekundär verminderte Lebenserwartung. Durch Frakturen oder allgemein Störungen der skelettalen Integrität kommt es für die Betroffenen zu einem erheblichen Verlust an Lebensqualität. Dieses äußert sich in Schmerzen, körperlichen Einschränkungen von akutem aber auch langfristigem Charakter bis hin zur Bettlägerigkeit. Es kommt zu einer Verminderung der Teilnahme am gesellschaftlichen Leben für den Betroffenen. Für die Gesellschaft kommt es zu einem Ausfall von Arbeitskraft, sowie zu einem erhöhten Aufwand durch Pflege und medizinische Versorgung.

Die dramatischen individuellen Folgen für den einzelnen Menschen und die wesentlichen volkswirtschaftlichen Schäden die der Gesellschaft entstehen sind drängende Argumente, die die Notwendigkeit erkennen lassen, neue Behandlungskonzepte und Medikamente zur Bekämpfung der Volkskrankheit Osteoporose zu entwickeln.

Der Schlüssel zur effektiven Prävention und Behandlung von Beschwerden, die auf Erkrankungen des Knochenstoffwechsels basieren, liegt also in einem besseren Verständnis der Pathophysiologie dieser Erkrankungen.

Die Grundlage dafür besteht in einer Erforschung der molekularen Physiologie von Knochenwachstum, Knochenstoffwechsel und Knochenumbau (Remodeling).

---

### 3.1 Knochenumbau (Remodeling)

Der Knochenumbau ist der physiologische Gewebserneuerungsprozess, durch den das empfindliche Gleichgewicht von Knochenresorption durch Osteoklasten (Baron et al. 1993, Suda et al. 1999) und Knochenaufbau durch Osteoblasten die Knochenmasse während des Erwachsenenalters annähernd konstant hält (Frost 1996). Dieser Prozess ist von herausragender Bedeutung in der Biologie der Vertebraten, da die Integrität, Stärke und Funktion unseres Skeletts davon abhängt (Rodan und Martin 2000).

Eine Störung dieses Gleichgewichtes von Knochenaufbau und -resorption, jenseits von Reparatur- und Anpassungsprozessen, führt zu einer erhöhten Knochenbrüchigkeit und Frakturneigung und ist die zelluläre Basis für die meisten Erkrankungen des knöchernen Skeletts. Die Osteoporose, als Beispiel, stellt heutzutage eine der häufigsten Erkrankungen in der westlichen Hemisphäre dar (Riggs und Melton 1986, Melton 2003).

Es wird angenommen, dass dieser Prozess im Laufe eines menschlichen Lebens an etwa zwei Millionen Mikroschauplätzen des adulten Skelettes abläuft. Hieraus erklärt sich die Notwendigkeit, zelluläre und molekulare Kommunikationswege bzw. Signalkaskaden die den Knochenumbau steuern zu verstehen (Harada und Rodan 2003).

Heutzutage sind mindestens zwei verschiedene Ebenen der Steuerung bekannt, die den Knochenumbau in parakriner und systemischer Weise beeinflussen (Rodan und Martin 1981, Amling et al. 2000, Chien und Karsenty 2005). Die parakrine Ebene der Regulation umfaßt Faktoren, wie z.B. OPG, RANKL oder IGF, die entweder von Osteoblasten oder von Osteoklasten freigesetzt werden. Die systemische Regulation des Knochenumbaus wird durch Hormone ausgeübt, wie z.B. Östrogene, Androgene, Parathormon und Leptin, sowie durch mechanische und neurale Signale.

In diesem Zusammenhang gewann Leptin, als Regulator des Knochenumbaus wesentlich an Aufmerksamkeit, da es nicht nur half, eine zentrale Steuerung des Knochenumbaus zu entdecken, durch die das ZNS mit dem Skelett verbunden wird, sondern außerdem beide Steuerungsebenen zu beeinflussen

---

scheint. Nachdem es an seine hypothalamischen Rezeptoren bindet, reguliert Leptin den Knochenumbau mittels des sympathischen Nervensystems (SNS) und der molekularen Uhr, sowie über cocain- und amphetamingesteuerte Transkription (CART). (Ducy et al 2000, Amling et al. 2000, Haberland et al. 2001, Schilling et al. 2001, Takeda et al 2002, Eleferiou et al 2005, Fu et al 2005, Pogoda et al 2005).

### **3.2 Osteoporose**

Definition: Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch niedrige Knochenmasse und mikroarchitektonische Verschlechterung des Knochengewebes mit einer daraus resultierenden Zunahme der Knochenbrüchigkeit und Frakturneigung charakterisiert ist (Consensus Development Conference on Osteoporosis 1993).

Pathophysiologisch betrachtet ist bei Osteoporose ein gestörtes Remodeling der zur Krankheit führende Mechanismus. Durch ein Ungleichgewicht des Knochenaufbaus durch Osteoblasten und des Knochenabbaus durch Osteoklasten kommt es zur Osteopenie, darüber hinaus findet sich eine mikroarchitektonische Verschlechterung des trabekulären Knochens.

Es resultiert ein Verlust an statischer Integrität des Skelettes, was in einer erhöhten Frakturneigung und einer verminderten körperlichen Belastbarkeit in Erscheinung tritt.

Klinisch kommt es zu Frakturen durch Minimaltraumata, die sich mit sofortigem Funktionsverlust oder subklinisch z.B. mit Schmerzen und v.a. bei Wirbelkörper-Sinterungsfrakturen mit einem Verlust an Körpergröße und Deformitäten manifestieren können.

Vielfältige Ursachen bzw. Risikofaktoren können die Entstehung einer Osteoporose begünstigen:

---

Körperliche Inaktivität, iatrogen (z.B. Langzeitmedikation mit Corticoiden), genetische Dysposition, weibliches Geschlecht, hohes Lebensalter, leptosomer Körperbau, Nulliparität, Verminderte Produktion körpereigener Hormone (z.B. Menopause), Neoplasien, Zugehörigkeit zur weißen oder asiatischen Rasse, Vitaminmangel (Vit. D), alimentäre Faktoren (z.B. Calciummangel) - um einige der gesicherten Faktoren zu nennen.

Typische Frakturlokalisationen sind proximale Femur- (Schenkelhals-) frakturen, distale Radiusfrakturen, Wirbelkörper- (sinterungs-) und Humerusfrakturen (Melton 1988).

Nach dem WHO Report (1994) wird geschätzt, dass über 30% der postmenopausalen Frauen von Osteoporose betroffen sind. Die Prävalenz liegt zwischen 13 und 23% in den USA und Großbritannien (Looker et al. 1997, Kanis et al. 2000, Ballard et al. 1998).

So wurde in den USA bei geschätzten 16,8 Millionen postmenopausalen Frauen mit Knochenmasseverlust von mindestens 10% und zusätzlich 9,4 Millionen Frauen mit Knochenmasseverlust von mindestens 25% 4,8 Millionen davon eine osteoporotische Fraktur diagnostiziert (Cooper und Melton 1996).

In Deutschland waren im Jahr 2003 mindestens 7,8 Mio. Menschen, davon 6,5 Mio. Frauen betroffen, wobei davon ausgegangen werden muss, dass die Dunkelziffer der nicht diagnostizierten Betroffenen und klinisch noch unauffällig gebliebenen Erkrankten höher ist (Häussler et al. 2007).

---



**Abbildung 1:** Pathologische Schenkelhalsfraktur bei Osteoporose, mit freundlicher Genehmigung der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

In Deutschland (2003) erlitten 4,3% der Patienten, denen klar eine Osteoporose zugeordnet werden muss eine diagnostizierte Fraktur, während nur 21,7% der Erkrankten mit antiosteoporotischen Medikamenten behandelt wurden (Häussler et al. 2007).

Das größte Risiko haben Frauen in der Menopause, von denen jede dritte im Laufe ihres Lebens eine osteoporotische Fraktur erleidet, bei den Männern über 50 Jahren ist jeder fünfte betroffen (Melton et al. 1997).

Die dramatischen Folgen für den einzelnen sind schwierig zu messen oder zu quantifizieren und wurden bereits im ersten Teil der Einleitung kurz charakterisiert. Der harte finanzielle Aspekt hingegen lässt sich in Zahlen angeben und kann somit auch dem „kühlen Rechner“ ein knallhartes wirtschaftliches Argument zur weiteren Erforschung und Behandlung der Osteoporose liefern.

---

Im Jahr 2003 entstanden in Deutschland den gesetzlichen und privaten Krankenkassen direkte Kosten (z.B. stationäre Versorgung, Medikation, Rehabilitation) von € 5,4 Milliarden. Weiterführende Kosten wie z.B. Verlust von Produktivität und verminderte Kaufkraft sind bei dieser Berechnung noch nicht berücksichtigt, so dass man davon ausgehen muss, dass der volkswirtschaftliche Schaden der der Gesellschaft tatsächlich entsteht wesentlich höher ist.

### **3.3 Leptin**

Griechisch: leptos = dünn

Es handelt sich um ein 16kDa großes Proteohormon, das eine wichtige Schlüsselrolle bei der Steuerung von Energieaufnahme und -aufwendung des Körpers spielt.

Leptin wurde 1994 von Jeffrey Friedmann an der Rockefeller University identifiziert und ist kodiert durch das obese-Gen ob(Lep): Chr. 7 (Zhang et al.1994).

Für das von Adipozyten gebildete Hormon wurden Auswirkungen auf Körpergewicht, Fertilität und Remodeling nachgewiesen. (Halaas et al. 1995)

Es sind sechs Rezeptoren (LepRa-LepRf) bekannt von denen nur LepRb aktive intrazelluläre Domänen hat und im Hypothalamus vorkommt.

Die bisher eindeutig zugeordnete Funktion ist die Unterdrückung von appetitstimulierenden hypothalamischen Kernen. Des weiteren ist bekannt, dass es im Rahmen der circadianen Rhythmik nachts zu einer Downregulation durch den Gegenspieler Melatonin kommt.

### **3.4 Das Schaf als Tiermodell**

Da die makroskopische Erforschung der Frakturheilung, sowie Verfahren der Osteosynthese und Protetik an Nagetieren nur sehr eingeschränkt untersucht

---

werden können, wird ein Großtiermodell benötigt.

Das weibliche Schaf erscheint hierfür besonders geeignet, da es eine günstige Kombination unterschiedlicher Vorteile in sich vereint.

Es handelt sich um ein großes Tier mit der Eigenschaft des Knochenumbaus, das die Möglichkeit zur weiteren makroskopischen Erforschung von Frakturheilung, Osteosynthese und (Endo-)Protetik bietet (Thorndike und Turner 1998, Turner 2002).

Die knöchernen Mikroarchitektur des Schafes weist in Analogie zur menschlichen Anatomie Haversche Systeme auf, die Beschaffenheit des Beckenkammes des Schafes ist der des menschlichen Beckenkammes ähnlich (Turner, Villanueva 1993). Bei allen Einschränkungen, wie z.B. dem Fehlen einer klar abgegrenzten Menopause zu mittlerem Lebensalter und dem unterschiedlichen gastrointestinalen System (O'Connell 1999), hat das weibliche Schaf trotzdem einige Vorteile als Modell der Knochenbiologie wie z.B. zeitliche und quantitative Gemeinsamkeiten mit dem Hormonhaushalt der Frau (Goodman 1994), sowie der Tatsache, dass die Knochenstoffwechselfparameter zumindest teilweise mit den menschlichen übereinstimmen (Newman et al. 1995).

Schafe sind daher in der Erforschung von Remodeling und Osteoporose als Tiermodell bereits etabliert (Lill et al. 2000, Lill et al. 2002, Schorlemmer et al. 2005, Egermann et al. 2005, Turner 2001, Kalu 1999).

Des Weiteren hat sich das Schaf als hervorragendes Modell zur Erforschung der leptinabhängigen neuroendokrinen Regulation des Energiehaushaltes (Henry et al. 1999, Clarke et al. 2001) bewährt. Außerdem wurde die zentrale Applikation von Leptin bei weiblichen Schafen bereits erfolgreich genutzt um Hinweise für eine Zuordnung der Effekte des Leptins auf Appetit und neuroendokrine Funktion zu gewinnen (Henry et al. 1999).

Wenn sich die an Nagetieren gewonnenen Erkenntnisse ganz oder teilweise auf Schafe übertragen lassen, so ist das zumindest ein Schritt auf dem Weg zu Ergebnissen, die sich auf die menschliche Physiologie übertragen lassen.

---

Genetische Manipulationen am Großtier wie Schaf, Rind und Schwein sind heute noch kein Standardverfahren, da sie mit wesentlichen technischen Schwierigkeiten, wie der Unkenntnis des vollständigen genetischen Codes dieser Tiere einhergehen (Hofmann et al. 2003, Klose et al. 2005).

Veränderungen durch Inzuchtkreuzung herbeizuführen wäre aufgrund der, im Vergleich zur Maus wesentlich längeren Generationsdauer extrem Zeit und Kosten aufwändig.

Deshalb wird ein anderes, realisierbares Verfahren benötigt, das geeignet ist in ethisch vertretbarer Weise beim Schaf eine Osteopenie zu verursachen.

### **3.5 Zielsetzung**

Es ist zu beachten, dass alle bisherigen Studien an Mäusen durchgeführt wurden und dass widersprüchliche Ergebnisse in nicht-genetischen Maus-Studien sowie in Studien an Leptin-signaling-defizienten Zucker-Ratten die Frage aufbrachten ob Leptin für die Regulation des Knochenumbaus jenseits der Nagetiere von Bedeutung ist (Thomas 2003, Tamasi et al 2003, Folder et al. 1992, Mathey et al. 2002, Martin et al. 2005).

Es existieren indirekte Hinweise von zwei klinischen Untersuchungen an Patienten, daß eine zentrale Steuerung der Knochenformation existiert:

(I) Patienten mit sympathischer Reflexdystrophie oder Kausalgie einer Erkrankung, die zuerst von dem hamburgischen Chirurgen Paul Sudeck beschrieben wurde, leiden an einer lokalen Osteoporose infolge verminderter Knochenformation bei gesteigertem Sympathikustonus (Sudeck 1900, Schwartzmann 2009).

(II) Aus der Geelong Osteoporosestudie geht hervor, dass Patienten die unter einer Betablockermedikation stehen ein vermindertes Frakturrisiko zu haben scheinen, welches mit einer erhöhten Knochenmineralisierungsdichte assoziiert ist. (Pasco et al. 2004).

Dies sind alles indirekte und abgeleitete Hinweise. Der direkte Beweis, dass

---

---

Leptin auch in anderen Species (als Nagetieren) einen zentralen Effekt auf die Knochenformation hat, steht jedoch noch aus.

Das weibliche Schaf erscheint als ein geeignetes Modell zur Bearbeitung dieser Frage.

Deshalb wurde beschlossen ein Modell zu entwickeln, das die Langzeitbehandlung von Schafen mit intrazerebroventrikulärer Leptinapplikation ermöglicht.

Im folgenden soll untersucht werden, ob icv Leptinapplikation zu einer Verminderung der Knochenformation beim Schaf führt. Diese soll mit Histomorphometrie, Kontaktradiographie und der Serumanalyse von Knochenabbaumarkern gemessen werden.

Eine induzierbare Osteopenie würde den direkten Hinweis für die Existenz einer zentralen Komponente der Wirkung des Leptins auf den Knochenumbau liefern und eine Übertragbarkeit der in Nagetierstudien gewonnenen Erkenntnisse nahelegen.

Praktische Anwendung dieser Erkenntnisse erscheint mit der Etablierung eines ethisch vertretbaren Osteoporose-Großtiermodells in greifbarer Nähe.

---

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Ethische Prüfung / Tierversuchsgenehmigung**

Alle Tierversuche wurden nach den Richtlinien für "Care and Maintenance of Experimental Animals" durchgeführt und zuvor vom "Monash Animal Ethics Committee" und dem "Animal Ethics Committee of The Victorian Institute of Animal Science" genehmigt.

### **4.2 Versuchstiere, Operationen, Biochemie und kontinuierliche intracerebroventrikuläre Infusion**

Es wurden weibliche Corriedale-Schafe mit einem Körpergewicht von  $51,6 \pm 1,8$  kg im Alter von sechs bis sieben Jahren benutzt. Die Tiere wurden mindestens eine Woche vor der Operation ovariectomiert (ovx) und es wurden Kunststoffschläuche in den lateralen Ventrikel eingebracht, wie es bereits von Barker-Gibb et al beschrieben wurde (Barker-Gibb et al. 1995). Die Tiere wurden an die Versuchsanlage gewöhnt und gruppenweise in den Stallungen mit Zugang zum Freilaufgehege untergebracht. Die Tiere wurden mit einem Geschirr ausgestattet, in dem die Infusions Pumpe untergebracht wurde, die den Tieren so auf dem Rücken befestigt wurde, dass freie Beweglichkeit gewährleistet war. Für die Infusion des Leptins bzw. der künstlichen cerebrospinalen Flüssigkeit (csf) wurden Graseby M16A Infusionspumpen (Graseby Medical Ltd., Gold Coast, Australia) benutzt. Polyethylenschläuche wurden mit einer 2,5ml Kunststoffspritze verbunden und die Dichtigkeit des Systems wurde durch Ejektion von cerebrospinaler Flüssigkeit geprüft. Gruppen von vier Schafen wurden randomisiert den drei Versuchsgruppen zugeordnet (entire, ovx plus csf, ovx plus leptin), so dass je eine ohne Behandlung, eine mit Infusion von künstlichem Liquor und eine Gruppe mit Infusion von Leptin in den lateralen Ventrikel bei einer Rate von  $110\mu\text{l/h}$  ( $8\mu\text{g/h}$ ) für drei Monate an dem Experiment teilnahmen.

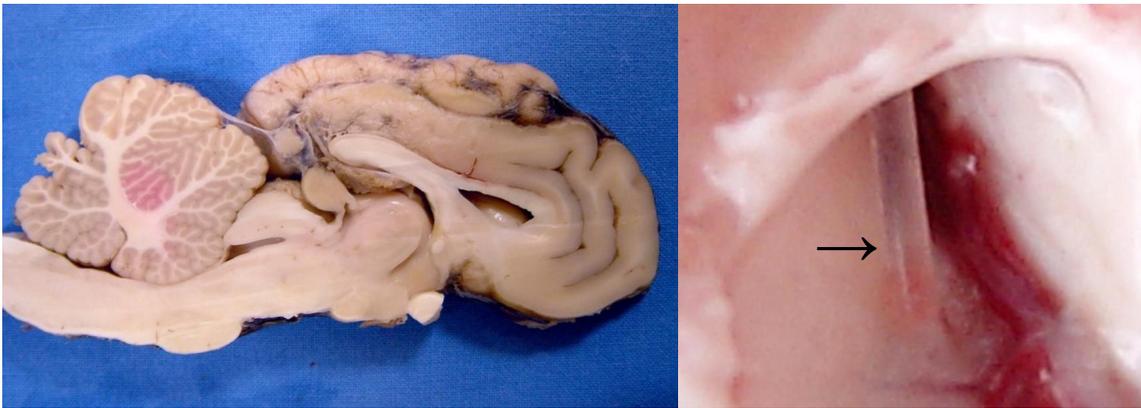
---



**Abbildung 2:** Schaf im Freilaufgehege mit dem Geschirr für die Injektionspumpe, die Tiere werden in ihrer artgerechten Bewegung nicht eingeschränkt (aus: Pogoda et al. 2006, mit freundlicher Genehmigung)

Die Infusionsspritzen wurden täglich unter Verwendung eines Seitenanschlusses nachgefüllt. Das rekombinante menschliche Leptin, dessen biologische Wirksamkeit in Schafen in vorherigen Arbeiten gezeigt werden konnte (Henry et al. 1999, Clarke et al. 2001), wurde wie zuvor beschrieben hergestellt (Henry et al. 1999). Blutproben (8ml) wurden aus der V. jugularis entnommen, in heparinisierten Tubes gesammelt und bei 4°C zentrifugiert um Plasma zu gewinnen, daß bis zur Analyse bei -80°C gelagert wurde. Urinproben zur Bestimmung der Crosslap-Ausscheidung als ein Maß der Osteoklastenaktivität wurden ebenso bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Urin-Dpd-Crosslaps, Kreatiningehalt des Urins, Alkalische Phosphatase (Knochen) und Osteokalzin - Serumspiegel wurden unter Verwendung im Handel erhältlicher Kits gemessen. Um dynamische histomorphometrische Marker zu setzen, wurden den Schafen zwei Calceininjektionen (C-0875, Sigma-Aldrich

Chemie GmbH, Steinheim, Germany) mit einer Dosis von 10mg/kg-Körpergewicht neun und zwei Tage vor der Tötung verabreicht. Am Ende des dreimonatigen Behandlungszeitraumes wurde den Tieren intravenös eine Überdosis Phenobarbital verabreicht (Lethabarb, May and Baker Pty. Ltd., Australien). Beckenkammbiopsien wurden unter Verwendung eines elektrischen Trepans (Acculan, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) entnommen, Lendenwirbelsäule und Femora wurden unmittelbar nach der Tötung entnommen.



**Abbildung 3:** linker Teil: Makroanatomisches Längsschnittpräparat eines Schafgehirnes mit Blick auf den angeschnittenen Seitenventrikel; rechter Teil: angeschnittener lateraler Ventrikel mit Injektionsschlauch (Pfeil) (aus: Pogoda et al. 2006, mit freundlicher Genehmigung)

### 4.3 Histologische Aufarbeitung

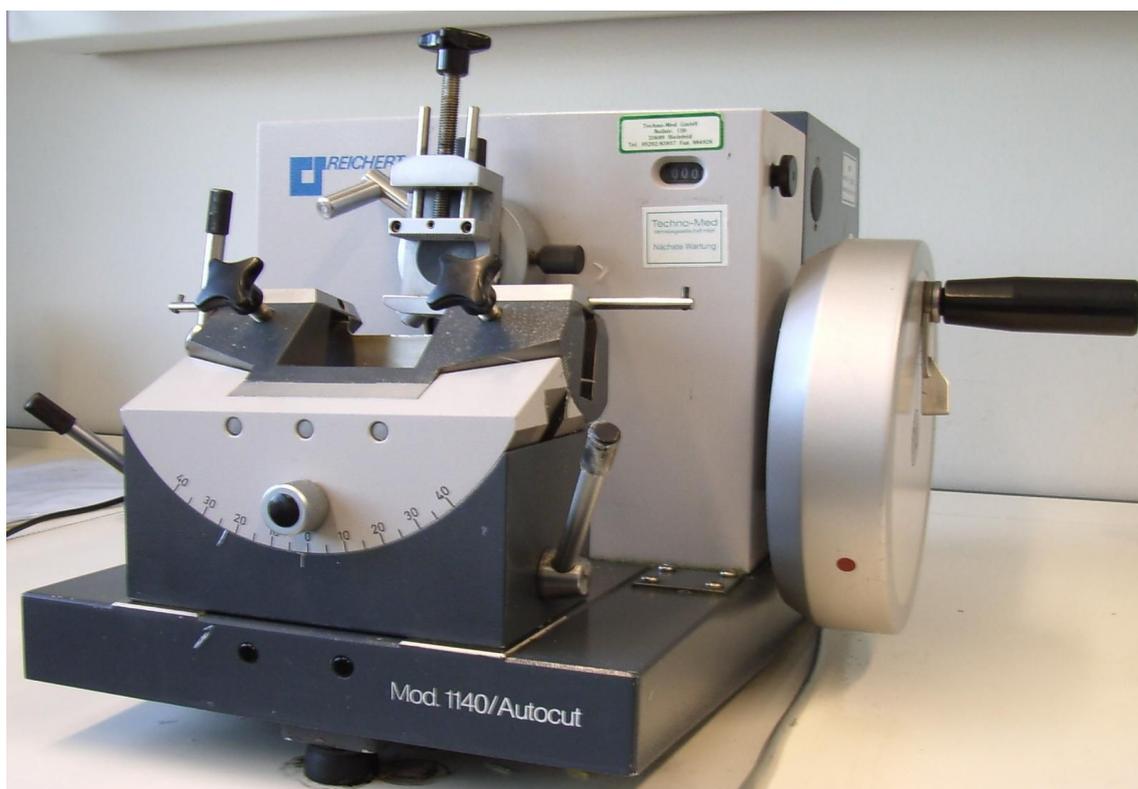


**Abbildung 4:** Fixiertes Präparat eines Wirbelkörpers vor der weiteren histologischen Aufarbeitung



**Abbildung 5:** Längsschnittpräparat aus dem distalen Femur in der Frontalebene vor der weiteren histologischen Aufarbeitung

Die Knochen wurden vier Tage lang in 10%igem Formaldehyd bei 4°C fixiert und dann in 70%iges Ethanol überführt. Beckenkammbiopsien Lendenwirbelkörper (L3-L5) und ein distaler Femur von jedem Schaf wurden bei ansteigender Alkoholkonzentration dehydriert und dann wie zuvor beschrieben in Methylmetacrylat eingebettet (Mathey et al. 2002). Schnitte von 5µm wurden von den Wirbelkörpern in der Saggitalebene und von den Femora in der Frontalebene mit einem Microtec Rotations Mikrotom (Techno-Med GmbH, München, Deutschland) angefertigt. Diese Schnitte wurden mit Toluidinblau, Trichrom Goldner und van Giesson / von Kossa Verfahren behandelt wie beschrieben (Amling et al.1999). Ungefärbte Schnitte von 12µm wurden benutzt um die Knochenformationsrate zu bestimmen.



**Abbildung 6:** Rotationsmikrotom mit dem die histologischen Schnitte angefertigt wurden.



**Abbildung 7:** Eingebettete Beckenkammbiopsie eingebettet in Acrylat vorbereitet für die Herstellung der histologischen Schnittpräparate

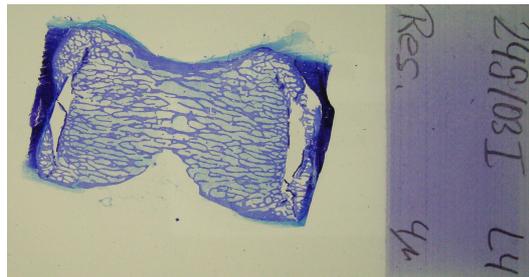


**Abbildung 8:** Eingebetteter Wirbelkörper in Acrylat, aus technischen Gründen wurden die Wirbelkörper vor der Herstellung unentkalkter Schnitte halbiert.

## 4.4 Histologische Färbungen

Diese Schnitte wurden mit Toluidinblau, Trichrom Goldner und van Giesson / von Kossa Verfahren behandelt wie beschrieben (Amling et al.1999).

### 4.4.1 Toluidinblau O-Färbung



**Abbildung 9:** Toluidinblau gefärbtes Schnittpräparat eines Wirbelkörpers

Mit Toluidinblau O-Färbung lassen sich Binde- und Stützgewebe darstellen und durch die unterschiedliche Farbintensität weiter differenzieren.

#### Herstellung der Färbelösung:

Sechs Teile - 1g Toluidinblau (Merck, Germany) in 100ml Aqua destillata gelöst

Drei Teile - 2,5g Natriumkarbonat (Merck, Germany) in 100ml Aqua destillata gelöst

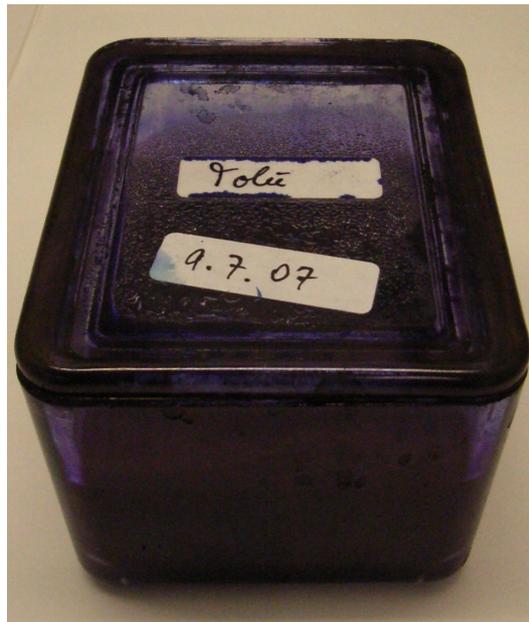
Ein Teil - Ethanol 70%

Die Lösung muß in dunkler Glasflasche aufbewahrt und zur Herstellung der Gebrauchslösung zu gleichen Teilen mit Aqua destillata verdünnt werden.

---

Färbung der Präparate:

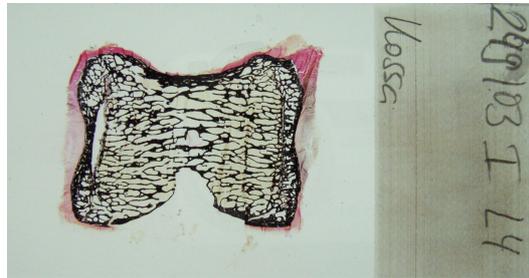
1. Dreimal für jeweils 15 min in 2-(Methoxyethyl)-acetat entplasten
2. Färbelösung auf pH 4,5 einstellen
3. Absteigende Alkoholreihe (100% - 50% Ethanol, Aqua destillata)
4. 1h Toluidinblau
5. Spülung für 10 min mit Aqua destillata
6. Aufsteigende Alkoholreihe (Aqua deastillata, 50% - 100% Ethanol)
7. Dreimal für jeweils 5 min Xylol
8. Trocknen bei Raumluft und Eindeckeln



**Abbildung 10:** Färbegrad für die Toluidinblaufärbung

---

#### 4.4.2 Modifizierte von Kossa-/van Gieson Gegenfärbung



**Abbildung 11:** Schnittpräparat eines Wirbelkörpers in von Kossa-/van Gieson Gegenfärbung

Mit der modifizierten von Kossa-/van Gieson Gegenfärbung lassen sich Bindegewebe und Stützgewebe darstellen, wobei alle mineralisierten Gewebeanteile gleichmäßig schwarz erscheinen und sich kontraststark abgrenzen lassen.

##### Herstellung der Färbelösung:

Silbernitratlösung:

5g Silbernitrat (Merck, Germany) in 100ml Aqua destillata gelöst

Natriumkarbonat-Formaldehydlösung:

5g Natriumkarbonat (Merck, Germany) in 25ml Formaldehyd 35-40% und 75ml Aqua destillata gelöst

Färbung der Präparate:

1. Dreimal für jeweils 15 min in 2-(Methoxyethyl)-acetat entplasten
2. Absteigende Alkoholreihe (100% - 50% Ethanol, Aqua destillata)
3. 5 min Silbernitratlösung
4. Spülung für 10 min mit Aqua destillata
5. 5 min Sodaformol
6. Spülung für 10 min unter fließendem Leitungswasser
7. 5 min Natriumthiosulfat (Sigma, USA)
8. Spülung für 10 min unter fließendem Leitungswasser
9. 20 min van Gieson-Lösung
10. Aufsteigende Alkoholreihe (Aqua deastillata, 50% - 100% Ethanol)
11. Dreimal für jeweils 5 min Xylol
12. Trocknen bei Raumluft und Eindeckeln



**Abbildung 12:** Färbereihe zur Herstellung der von Kossa-/van Gieson Gegenfärbung

## 4.5 Histomorphometrie

Die Parameter der statischen und dynamischen Histomorphometrie wurden an toluidinblau und von Kossa / van Gieson gefärbten unentkalkten 5µm dicken Schnitten des proximalen Beckenkammes, Femur und Lendenwirbelkörper gemessen. Die Analyse des Knochenvolumens, der Trabekelzahl, des Trabekelabstandes, und der Trabekeldicke und die Bestimmung der Osteoblasten- und Osteoklastenzahl und -oberfläche, sowie die der erodierten Oberfläche wurden gemäß standardisierter Verfahren unter Benutzung des OsteoMeasure Histomorphometrie-systems (Osteometrics Inc., Atlanta, Georgia, USA) (Parfitt et al.1987).

Fluorescein-Messungen zur zur Bestimmung der Knochenformationsrate und der mineralisierenden Oberfläche wurden an zwei nichtkonsekutiven 12 µm-Schnitten pro Tier durchgeführt.

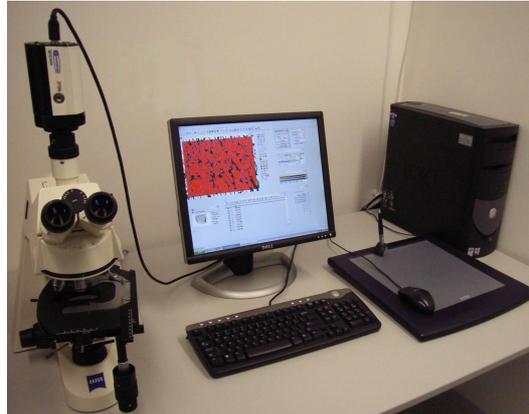
Für die histomorphometrische Auswertung wurden sämtliche Präparate der Schnitte auf Objektträgern mit einer Digitalkamera (Canon EOS 10D) und einem Makroobjektiv (Sigma 50mm 1:2.8 DG MACRO) über einer Durchlichtplatte (Hama LP 5000K) mit Stativ (Hama REPRO) fotografiert.



**Abbildung 13:** Kamera mit Stativ und Durchlichteinrichtung

### 4.5.1 Statische Histomorphometrie

Die Auswertung erfolgte mit dem PC-gestützten Bioquant Histomorphometriesystem.



**Abbildung 14:** Histomorphometrie-Arbeitsplatz mit Bioquant-System

## 4.6 Kontaktradiographie

Beckenkammbiopsien, Femora und Lendenwirbelsäule aller Schafe wurden mit Kontaktradiographie analysiert, es wurde eine Faxitron Röntgenkammer (Faxitron Xray Corp., Wheeling, Illinois, USA) verwendet.



**Abbildung 15:** Röntgenkammer für die Anfertigung der Kontaktradiographien

## 4.7 Statistische Analysen

Die Daten werden in der Form: Mittelwert $\pm$ Standardabweichung des Mittelwertes angegeben. Statistische Abweichungen zwischen den Gruppen ( $n=3$ ) wurden mit dem T-Test ermittelt. Das Signifikanzniveau ist durch Sternchen gekennzeichnet \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ .

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Intracerebroventrikuläre Langzeitinjektion, Versuchstiere**

Die neurochirurgische Anlage des Katheters erfolgte bei allen Schafen problemlos, es zeigten sich keine lokalen oder systemischen Komplikationen.

Das Allgemeinbefinden der Schafe und die artgerechte Bewegungsfreiheit der Tiere blieben während der gesamten Versuchsdauer uneingeschränkt.

Die verabreichte Leptindosis erreichte wie beabsichtigt keine erkennbare systemische Wirkung, da das Körpergewicht der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Verminderung zeigte.

### **5.2 Kontaktradiographien**

Bereits in den Kontaktradiographien, die von den Gewebeproben vor der weiteren histologischen Aufarbeitung angefertigt wurden, sind schon mit bloßem Auge Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen erkennbar.

Obwohl Nativröntgenaufnahmen keine hohe Sensitivität in der quantitativen Untersuchung der Knochendichte erzielen, zeichnet sich schon eine Tendenz zur Osteopenie des spongösen Knochens in der mit Leptin behandelten Versuchstiergruppe ab.

Im Bereich der Kortikalis kann diese Tendenz nicht beobachtet werden.

---

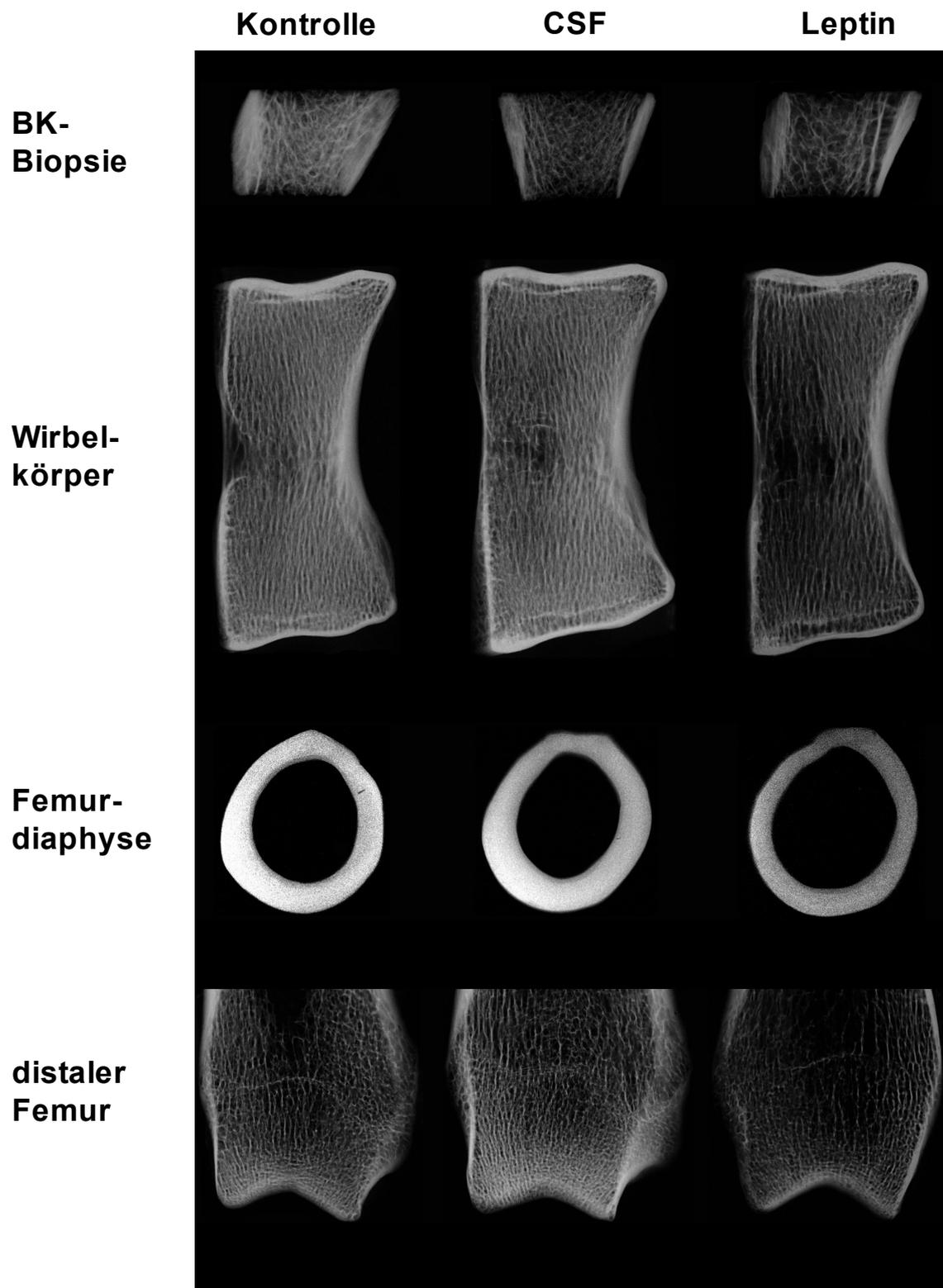
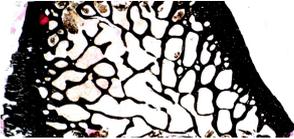
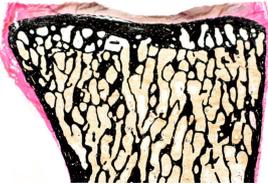


Abbildung 16: Kontaktradiographische Darstellung der makroskopischen Präparate

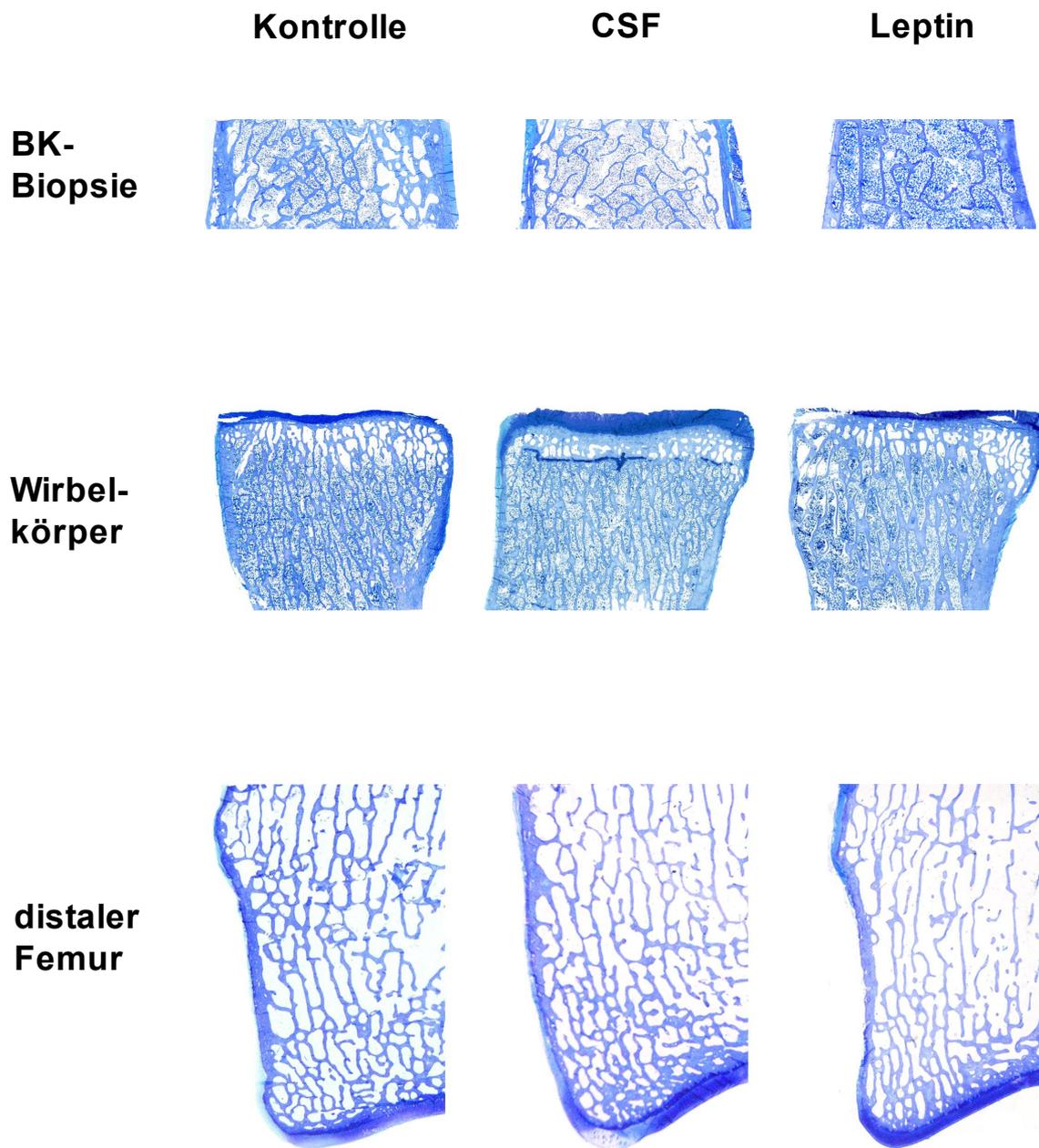
### 5.3 Histomorphometrie

Die detaillierten strukturellen Veränderungen der knöchernen Mikroarchitektur wurden durch statische Histomorphometrie analysiert. Die genaue Quantifizierung des Knochenvolumens konnte für die unterschiedlichen Skelettabschnitte durchgeführt und zwischen den Versuchsgruppen verglichen werden.

Es wurden dafür von allen Versuchstieren Beckenkammbiopsien, Lendenwirbelkörper und distale Femurepiphyen verwendet.

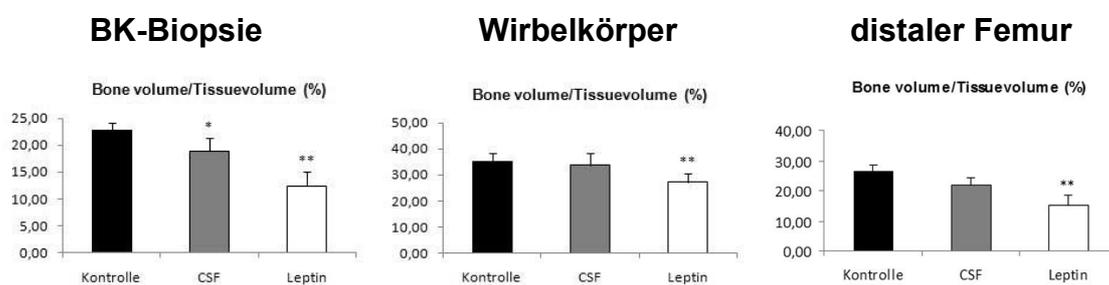
	Kontrolle	CSF	Leptin
<b>BK-Biopsie</b>			
BV/TV [%]	22,7±1,3	18,9±2,4*	12,4±2,6**
<b>Wirbelkörper</b>			
BV/TV [%]	35,2±3,2	33,6±4,6	27,2±3,2**
<b>distaler Femur</b>			
BV/TV [%]	26,4±2,2	22,0±2,5	15,4±3,1**

**Abbildung 17:** Von Kossa / van Gieson Darstellung der histologischen Präparate. Es zeigt sich eine signifikante Verringerung der trabekulären Knochenmasse in der mit Leptin behandelten Gruppe



**Abbildung 18:** Darstellung der histologischen Präparate in Toluidinblaufärbung.

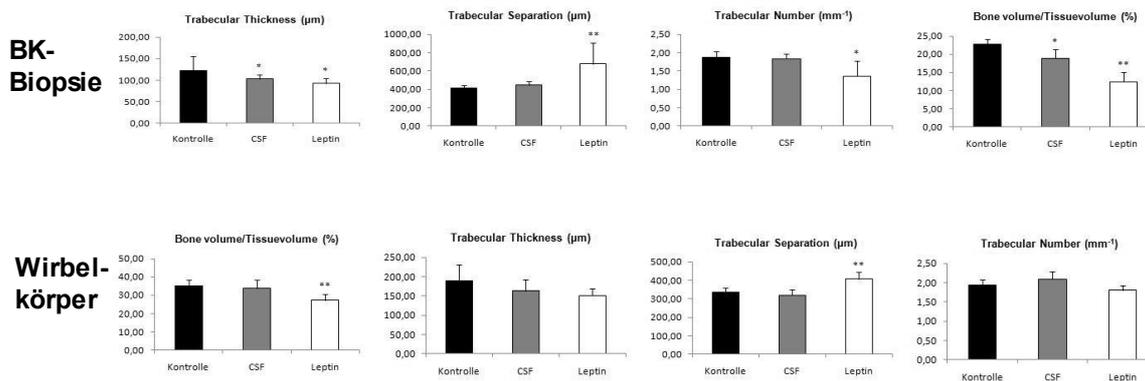
Die Untersuchungen an von Kossa / van Gieson und Toluidinblau gefärbten Schnittpräparaten zeigten in der mit Leptin behandelten Gruppe eine Abnahme des trabekulären Knochenvolumens in allen untersuchten Regionen gegenüber den beiden Kontrollgruppen. In der ovariectomierten und neurochirurgisch operierten Vergleichsgruppe, die keine Leptinapplikation erhalten hatte, zeigte sich lediglich in den Beckenkammbiopsien ein signifikanter, aber geringerer Rückgang des trabekulären Knochenvolumens.



**Abbildung 19:** Darstellung des Trabekulären Knochenvolumens als Anteil des gesamten Gewebevolumens (BV/TV [%]) im Säulendiagramm. Die mit Leptin behandelte Gruppe weist in allen untersuchten Bereichen einen signifikanten Rückgang des trabekulären Knochenvolumens auf, in der ovariectomierten Vergleichsgruppe zeigt sich lediglich in der Beckenkammbiopsie ein signifikanter, aber geringerer Verlust.

Die detaillierte Gegenüberstellung der statisch-histomorphometrischen Strukturparameter ermöglichte eine genauere Charakterisierung des ermittelten Knochenmasseverlustes.

Der in der Leptin – Gruppe ermittelte Knochenmasseverlust konnte bei genauerer Betrachtung in erster Linie auf eine signifikante Zunahme des trabekulären Abstandes bei abnehmender Anzahl trabekulärer Strukturen zurückgeführt werden.



**Abbildung 20:** Vollständige Darstellung der relevanten statisch-histomorphometrischen Parameter im Säulendiagramm. Der in der Leptin – Gruppe ermittelte Knochenmasseverlust kann auf eine signifikante Zunahme des trabekulären Abstandes (Trabecular Separation) bei abnehmender Anzahl trabekulärer Strukturen zurückzuführen ist.

In Übereinstimmung mit dem aus der Beurteilung der Kontaktradiographien gewonnenen Eindruck, konnten in transversalen Schnitten der Femurdiaphysen keine signifikanten Unterschiede der Kortikalisdicke zwischen den unterschiedlichen Versuchstiergruppen beobachtet werden. Sämtliche beobachteten Veränderungen betrafen somit ausschließlich das trabekuläre Kompartiment.

## 6 Diskussion

Die im Rahmen dieser Dissertation besprochenen Ergebnisse aus der kontaktradiographischen und histomorphometrischen Analyse von Gewebeproben sind Teil der Auswertung eines Experimentes zur Erforschung der zentralen Steuerung der Regulation der Knochenmasse von Schafen.

Es wurde versucht, durch neurochirurgische Intervention und intracerebroventrikuläre Behandlung mit Leptin einen Verlust von Knochenmasse zu induzieren.

Neben den hier beschriebenen Verfahren wurden unter anderem auch zelluläre Histomorphometrie, dynamische Histomorphometrie, chemische Analysen von Urin- und Serumproben sowie  $\mu$ -CT-Untersuchungen durchgeführt.

Diese Arbeit ist der Grundlagenforschung dienlich, indem sie das allgemeine Verständnis der Knochenphysiologie fördert, wobei insbesondere die Verbindung zwischen Zentralem Nervensystem und Skelett, sowie die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Experimenten mit Nagetieren auf größere Säugetiere (was den nächsten notwendigen Schritt auf dem Weg zur Übertragbarkeit auf die menschliche Physiologie darstellt) erforscht werden.

Als erste Schritte zur Entwicklung eines zur Erforschung von neuen Behandlungsverfahren (medikamentöse Therapie, Osteosynthesetechniken etc.) geeigneten Großtiermodells leisten die hier vorgestellten Ergebnisse einen Beitrag zur klinischen Behandlung von Patienten mit Erkrankungen des Knochenstoffwechsels wie z.B. Osteoporose.

Es konnte in dieser Untersuchung gezeigt werden, dass durch kontinuierliche Infusion von Leptin in den lateralen Ventrikel von weiblichen ovariectomierten Schafen eine Osteopenie erzeugt wurde. Dieser bei Mäusen beobachtete Effekt ließ sich auf das Schaf übertragen und in dieser Applikationsform bereits in Dosisbereichen beobachten, die zu keinen Auswirkungen auf Appetit und Körpergewicht führten, wie sie für Leptin beschrieben sind. Diese Ergebnisse sind der erste experimentelle Beleg für die Übertragbarkeit der antiosteogenen Wirkung von Leptin zwischen Maus und Schaf und somit ein deutlicher Hinweis dafür, dass die zentrale Regulation des Remodelings ein generelles Prinzip in der Skelettphysiologie darstellt.

---

Die weitreichende Bedeutung dieser Entdeckung wird erkennbar, wenn man die wesentliche Bedeutung des Remodelings für die Skelettfunktion und Regulation der Knochenmasse betrachtet. Fast alle erworbenen Skeletterkrankungen lassen sich auf eine Störung des Remodeling zurückführen (Karsenty 1999, Karsenty und Wagner 2002, Harada und Rodan 2003).

Rückblickend können verschiedene Beobachtungen aus mehreren Studien mit den hier vorliegenden Ergebnissen in Zusammenhang gebracht werden, in denen schon früher Hinweise gesammelt wurden, die den Verdacht hätten aufbringen können, dass eine zentrale Steuerung oder zumindestens Beeinflussung des Knochenwachstums existiert:

- bei Patienten mit Schädel-Hirn-Traumata wurden eine Steigerung der Osteogenese und heterotope Ossifikationen beobachtet (Trentz et al. 2005, Morley et al 2005, Rigaux et al. 2005)
- Patienten mit CRPS Typ I weisen postraumatisch regionale Osteopenie auf, die von der autonomen Innervation beeinflusst ist (Sudeck 1900, Schwartzmann 2000)
- bei Patienten unter  $\beta$ -Blocker Langzeitmedikation wurde eine verringerte Frakturneigung beobachtet (Pasco et al 2004)

Die These einer zentralen Steuerung des Knochenwachstums wurde zuerst bei Beobachtung einer hohen Knochenmasse bei Leptindefizienten (ob/ob) Mäusen aufgestellt und durch den Nachweis der antiosteogenen Wirkung von intracerebroventrikulärer Leptinapplikation im Mausmodell belegt (Ducy et al. 2000, Takeda et al. 2002).

Das hier vorgestellte Modell lässt erkennen, dass durch kontinuierliche Applikation von Leptin in die Liquorräume des Gehirns auch beim Schaf eine Beeinflussung des Knochenwachstums erreicht werden kann. Es wird dadurch gezeigt, dass eine zentrale Komponente der Steuerung des Knochenwachstums existiert. Diese Ergebnisse zeigen jedoch keinen Widerspruch zu den bisher etablierten lokalen Steuerungsmechanismen des Knochenwachstums oder den für Leptin beschriebenen peripheren,

---

---

systemischen und zentralnervösen Effekten auf. Die Vermutung, dass das Knochen-Remodeling auf verschiedenen Ebenen reguliert wird liegt nahe.

Den hier vorgestellten Ergebnisse kommt der Stellenwert einer Pilotstudie zu, es müssen noch größere Versuchstiergruppen untersucht werden um Beweisniveau zu erreichen. In weiteren Experimenten wurde beispielsweise am Schaf der Knochenphenotyp nach stereotaktischer Isolation von Hypothalamus und Hypophyse untersucht (Pogoda 2006). Darüber hinaus bietet die weitere Untersuchung z.B. der Signalkaskade der zentralen Steuerung des Knochenwachstums, die unter anderem durch Leptin beeinflusst wird, noch viele offene Fragestellungen.

---

## 7 Zusammenfassung

Die steigende Bedeutung der Knochenstoffwechselerkrankungen, insbesondere der Osteoporose, zeigt sich in sozialen und wirtschaftlichen Auswirkungen auf unsere Gesellschaft und individuell nicht selten in dramatischen Konsequenzen für Lebensqualität und Existenz des einzelnen Menschen.

Eine weitere Erforschung des Knochenstoffwechsels ist demnach unabdingbar, da neue Verfahren zur Behandlung und Prävention dieser Erkrankungen benötigt werden. Dafür ist unter anderem die Etablierung eines sinnvollen Großtiermodelles essentiell.

Diese Untersuchung ist Teil eines Projektes zur Entwicklung eines neuen Großtiermodelles, das folgenden Anforderungen gerecht werden soll:

- Zur Annäherung an die menschliche Physiologie, im Dienste sowohl der Grundlagenforschung als auch um makroskopische Experimente (z.B. OP-Techniken, Frakturversuche etc.) mit Relevanz für zukünftige Behandlungskonzepte zu ermöglichen sollen die eingesetzten Tiere dem Menschen vergleichbare skelettale und hormonelle Eigenschaften haben.
  - Um eine Verwendbarkeit bei weiterer Forschung überhaupt zu ermöglichen, müssen die zur Osteopenie – Induktion vorgenommenen Maßnahmen bei Großtieren mit längerem Generationszyklus und unter Berücksichtigung der im Vergleich zum Nagetier wesentlich aufwändigeren Haltung bezahlbar bleiben.
  - Eine humane Lösung zur Osteopenie-Induktion muss aus ethischen Gründen gefordert werden und bietet zudem den wissenschaftlichen Vorteil, dass die Versuchstiere so in ihrer artgerechten Lebensweise wenig beeinträchtigt die Möglichkeit bieten z.B. mechanische Fragestellungen unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen.
-

- Eine osteoporoseverursachende Behandlung ohne wesentliche systemische Nebenwirkungen wäre wünschenswert.

Als geeignetes Großtier wurde das Schaf ausgewählt, für welches bereits umfangreiche Erfahrungen aus Osteosyntheseexperimenten bestehen.

Das Schaf weist dem menschlichen Hormonsystem ähnliche Prinzipien auf, es verfügt über ein dem Menschen vergleichbares Skelettsystem mit der Eigenschaft des Remodeling und Havers' schen Kanälen (Thorndike und Turner 1998, Turner 2002, Goodman 1994).

Wegen der unvollständigen Kenntniss des genetischen Codes beim Schaf und der wirtschaftlichen Unmöglichkeit Veränderungen durch gezielte Inzuchtkreuzung herbeizuführen musste von den im Mausmodell etablierten Verfahren abgewichen werden, trotzdem konnten die gewonnenen Erkenntnisse genutzt werden, indem die im Mausmodell erforschten Eigenschaften des Leptins erfolgreich zur Osteopenie - Induktion eingesetzt werden konnten.

Nach neurochirurgischer Instrumentierung des lateralen Ventrikels konnte mittels intracerebroventrikulärer Langzeit-Leptinapplikation eine signifikante Osteopenie erzeugt werden.

Die erzeugten Veränderungen wurden in dieser Arbeit mit radiologischen und histomorphometrischen Verfahren untersucht, Daten aus weiteren histologischen, radiologischen und laborchemischen Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse.

Es ist somit durch dieses Experiment ein erster Schritt sowohl zur Entwicklung eines ethisch vertretbaren, wirtschaftlichen und wissenschaftlich vielfältig nutzbaren aussagekräftigen Großtiermodells, als auch zur Übertragung von Ergebnissen aus Nagetierexperimenten in Annäherung an die menschliche Physiologie getan worden

---

Zusammengenommen bilden diese Daten den direkten Hinweis für die Existenz einer zentralen Komponente der Wirkung des Leptins auf den Knochenumbau jenseits der Nagetiere.

## 8 Literaturverzeichnis

Amling M, Takeda S, Karsenty G 2000 A neuro (endo)crine regulation of bone remodeling. *Bioessays* 22:970-975.

Amling M, Priemel M, Holzmann T, Chapin K, Rueger JM, Baron R, Demay MB 1999 Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: Formal histomorphometric and biomechanical analyses. *Endocrinology* 140:4982-4987.

Ballard PA, Purdie DW, Langton CM Steel SA, Mussurakis S 1998 Prevalence of osteoporosis and related risk factors in UK women in the seventh decade: osteoporosis case finding by clinical referral criteria or predictive model? *Osteoporos Int* 8:535-539

Barker-Gibb MI, Scott CJ, Boublik JH, Clarke IJ 1995 The role of neuropeptide Y (NPY) in the control of LH secretion in the ewe with respect to season, NPY receptor Subtype and the site of action in the hypothalamus. *J Endocrinol* 147:565-579.

Baron R, Ravesloot J-H, Neff L, Chakraborty M, Chatterjee D, Lombri A, Horne W. Cellular and molecular biology of the osteoclast. In: Noda M. Ed; *Cellular and molecular biology of bone*. pp.445-495. Academic Press, San Diego, 1993.

Chien KR, Karsenty G 2005 Longevity and lineages: Toward the integrative biology of degenerative diseases in heart, muscle, and bone. *Cell* 120:533-544.

Clarke U, Tilbrook AJ, Turner AI, Doughton BW, Goding JW 2001 Sex, fat and the tilt of the earth: Effects of Sex and season on the Teeding response to centrally administered leptin in sheep. *Endocrinology* 142:2725-2728.

---

---

Consensus Development Conference on Osteoporosis. Hong Kong, April, 1993.  
Am J Med 95:1-78

Cooper C, Melton LJ III. Magnitude and impact of osteoporosis and fractures. In: Osteoporosis. Eds. Marcus R, Feldman D, Kelsey J. pp. 419-434, Academic Press, New York, 1996.

Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemet M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G 2000 Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: A central control of bone mass. Cell 100:197-207.

Egermann M, Goldhahn J, Schneider E 2005 Animal models for fracture treatment in osteoporosis. Osteoporos Int Suppl 2:129-138.

Elefteriou F, Takeda S, Ebihara K, Magre J, Patano N, Kim CA, Ogawa Y, Liu X, Ware SM, Craigden WJ, Robert JJ, Vinson C, Nakao K, Capeau J, Karsenty G 2004 Serum leptin level is a regulator of bone mass. Proc Natl Acad Sci USA 101:3258-3263.

Elefteriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clemens K, Vaisse C, Karsenty G 2005 Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. Nature 434:514-520.

Folder J, Shih MS, Levy J 1992 Bone structure and calcium metabolism in obese Zucker rats. Int J Obes Relat Metab Disord 16:95-102.

Frost HM. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. Calcif. Tissue Res. 3: 211-273, 1969

---

---

Fu L, Patel MS, Bradley A, Wagner EF, Karsenty G 2005 The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell* 122: 803-815.

Goodman RL 1994 Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: Knobil E, Neill JD (eds.) *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. Raven Press, New York, NY, USA, pp. 659-709.

Haberland M, Schilling AF, Rueger JM, Amling M 2001 Brain and Bone: Central regulation of bone mass. *J. Bone Joint Surg.* 83A: 1801-1809.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. 1995 Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269: 543-546.

Harada S, Rodan GA 2003 Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423:349-355.

Häussler B, Gothe H, Göl D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D 2007 Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany – the BoneEVA Study. *Osteoporos Int* 18:77-84

Henry BA, Goding JW, Alexander WS, Tilbrook AJ, Canny BJ, Dunshea F, Rao A, Mansell A, Clarke IJ 1999 Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without affecting the secretion of hormones from the pituitary gland: Evidence for a dissociation of effects on appetite and neuroendocrine function. *Endocrinology* 140:1175-1182.

---

---

Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhaue M, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep.* 11: 1054-1060, 2003

Kalu DN 1999 Animal models of the aging Skeleton. In: Rosen C, Glowacki J, Bilezikian JP (eds.) *The Aging Skeleton*. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 37-50.

Kanis JA, Johnell O, Oden A, Jonsson B, De Laet C, Dawson A 2000 Risk of hip fracture according to the World Health Organization criteria for osteopenia and osteoporosis. *Bone* 27:585-590

Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Genev. Dev* 13: 3037-3051, 1999.

Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell.* 2: 389-406, 2002.

Klose R, Kemter E, Bedke T, Bittmann I, Kelsner B, Endres R, Pfeffer K, Schwinzer R, Wolf E. Expression of biologically active human TRAIL in transgenic pigs. *Transplantation.* 80: 222-230, 2005

Lill CA, Fluegel AK, Schneider E 2000 Sheep model for fracture treatment in osteoporotic bone: A pilot study about different induction regimens. *J Orthop Trauma* 14:559-566.

---

Lill CA, Gerlach UV, Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E 2002 Bone drängen due to glucocorticoid application in an ovariectomized animal model for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int* 13:407-414.

Looker AC, Orwoll ES, Johnston CC Jr, Lindsay RL, Wahner HW, Dunn WL, Calvo MS, Harris TB, Heyse SP 1997 Prevalence of low femoral bone density in older U.S. adults from NHANES III. *J Bone Miner Res* 12:1761-1768

Martin A, de Vittoris R, David V, Moraes R, Begeot M, Lafage-Proust MH, Alexandre C, Vico I, Thomas T 2005 Leptin modulates both resorption and formation while preventing disuse-induced bone loss in tau-suspended female rats. *Endocrinology* 146:3652-3659.

Mathey J, Horeajada-Motten MN, Chanteranne B, Picherit C, Puel C, Lebecque P, Cubizoles C, Davicco MJ, Coxam V, Barlee JP 2002 Bone mass in obese diabetic Zucker rats: Influence of treadmill running. *Calcif Tissue Int* 70:305-311.

Melton LJ III 1988 Osteoporosis: etiology, diagnosis and management. In: Riggs BL, Melton LJ (eds) *Epidemiology of fractures*. Raven Press, New York: 133-154

Melton LJ III, Thamer M, Ray NF, Chan JK, Chesnut CH III, Einhorn TA, Johnston CC, Raisz LG, Silverman SL, Siris ES 1997 Fractures attributable to osteoporosis: report from the National Osteoporosis Foundation. *J Bone N Miner Res* 12:16-23

Melton LJ III 2003 Epidemiology worldwide. *Endocrinol Metab Clin North Am* 32:1-13.

---

---

Morley J, Marsh S, Drakoulakis E, Pape HC, Giannoudis PV 2005 Does traumatic brain injury result in accelerated fracture healing? *Injury* 36:363-368.

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

O'Connell SL. The sheep as an experimental model for osteoporosis. Ph.D. thesis. Department of Medicine, Melbourne, Australia. 1999.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanin JA, Maltuche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR 1987 Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, Symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2:595-610.

Pasco JA, Henry MJ, Sanders KM, Kotowicz MA, Seuran E, Nicholson GC; Geelong Osteoporosis Study. 2004 Beta-adrenergic blockers reduce the risk of fracture partly by increasing bone mineral density: Geelong Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 19:19-24.

Pogoda P, Egermann M, Schnell JC, Priemel M, Schilling AF, Alini M, Schinke T, Rueger JM, Schneider E, Clarke I, Amling M 2006 Leptin inhibits bone formation not only in rodents, but also in sheep. *J Bone Min Res* 21:1591-1599.

Pogoda P, Priemel M, Rueger JM, Amling M. Bone remodeling: New aspects of a key process that controls skeletal maintenance and repair. *Osteoporosis Int.* 16S: 18-24, 2005.

---

Rigaux P, Benabid N, Daniel D, Delecourt C, Chieux V, Dudermel AF, Sutter B, Anselme K, Hardouin P 2005 Study of Serum factors potentially involved in the pathogenesis of heterotopic bone formation after severe brain injury. *Joint Bone Spine* 72:146-149.

Riggs BL, Melton LJ III 1986 Involutional osteoporosis. *N Engl J Med* 314:1676-1686.

Rodan GA, Martin TJ 1981 Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption - a hypothesis. *Calcif tissue Int* 33:349-351.

Rodan GA, Martin TJ 2000 Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289:1508-1514.

Schilling AF, Priemel M, Beil FT, Haberland M, Holzmann T, Català-Lehnen P, Pogoda P, Blicharski D, Müldner C, Löcherbach C, Rueger JM, Amling M. Transgenic mice in skeletal research. Towards a molecular understanding of the mammalian skeleton. *J.Musculoskeletal Neuronal Interactions*. 1: 275-289, 2001.

Schorlemmer S, Ignatius A, Claes I, Augat P 2005 Inhibition of cortical and cancellous bone Formation in glucocorticoid-treated OVX sheep. *Bone* 37:491-496.

Schwartzman RJ 2000 New treatments for reflex sympathetic dystrophy. *N Engl J Med* 343:654-656.

Sudeck PHM 1900 Über die akute entzündliche Knochenatrophie. *Arch Klin Chirurg* 62:147-154.

---

---

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Rev.* 3: 345-357, 1999.

Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G 2002 Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous System. *Cell* 111:305-317.

Tamasi JA, Arey BJ, Bertolini DR, Feyen JH 2003 Characterization of bone structure in leptin receptor-deficient Zucker (falfa) rats. *J Bone Miner Res* 18:1605-1611.

Thomas T 2003 Leptin: A potential mediator for protective effects of fat mass on bone tissue. *Joint Bone Spine* 70:18-21.

Thorndike EA, Turner AS 1998 In search of an animal model for postmenopausal diseases. *Front Biosci* 3:17-26.

Trentz OA, Handschin AE, Bestmann L, Hoerstrup SP, Trentz OL, Platz A 2005 Influence of brain injury on early posttraumatic bone metabolism. *Crit Care Med* 33:399406.

Turner AS, Villanueva AR 1993 Histomorphometry of the iliac crest: 9-11 year old ewes. *Proc Vet Surg* 22:413.

Turner AS 2001 Animal models of osteoporosis - necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 1:66-81.

Turner AS 2002 The sheep as a model for osteoporosis in human. *Vet J* 163:232-239.

---

---

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM 1994  
Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*  
372: 425–432.

---

---

## 9 Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Pathologische Schenkelhalsfraktur.....	10
<b>Abbildung 2:</b> Schaf im Freilaufgehege.....	16
<b>Abbildung 3:</b> Längsschnittpräparat eines Schafgehirnes, Ventrikel mit Injektionsschlauch.....	17
<b>Abbildung 4:</b> Fixiertes Präparat eines Wirbelkörpers.....	18
<b>Abbildung 5:</b> Längsschnittpräparat aus dem distalen Femur.....	18
<b>Abbildung 6:</b> Rotationsmikrotom.....	19
<b>Abbildung 7:</b> Eingebettete Beckenkammbiopsie.....	20
<b>Abbildung 8:</b> Eingebetteter Wirbelkörper.....	20
<b>Abbildung 9:</b> Toluidinblau gefärbtes Schnittpräparat.....	21
<b>Abbildung 10:</b> Färbegrad für die Toluidinblaufärbung.....	22
<b>Abbildung 11:</b> Schnittpräparat in von Kossa-/van Gieson Gegenfärbung.....	23
<b>Abbildung 12:</b> Färbereihe von Kossa-/van Gieson Gegenfärbung.....	24
<b>Abbildung 13:</b> Kamera mit Stativ und Durchlichteinrichtung.....	25
<b>Abbildung 14:</b> Histomorphometrie-Arbeitsplatz.....	26
<b>Abbildung 15:</b> Röntgenkammer.....	27
<b>Abbildung 16:</b> Kontaktradiographische Darstellung.....	29
<b>Abbildung 17:</b> Darstellung in von Kossa-Färbung.....	30
<b>Abbildung 18:</b> Darstellung in Toluidinfärbung.....	31
<b>Abbildung 19:</b> Diagramme (BV/TV).....	32
<b>Abbildung 20:</b> Diagramme (Parameter der statischen Histomorphometrie)....	33

---

---

## 9.2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

BK	Beckenkamm
BV/TV	Bone volume per tissue volume
CART	Cocain and amphetamin regulated transcript
Chr.	Chromosom
CRPS	Complex regional pain syndrom
CSF	Cerebrospinal fluid („künstlicher Liquor“)
icv	intracerebroventrikulär
IGF	Insulin-like growth factor
L	Lumbalsegment (+Nummer)
LepRa-LepRf	Leptinrezeptor (Subtypen a-f)
$\mu$ -CT	Mikro-Computertomographie
ob/ob	Obesity-Gen
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
ovx	ovarektomiert
p	Signifikanzwert
RANKL	Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand
SNS	Symphatisches Nervensystem
V.	Vena
ZNS	Zentrales Nervensystem

---

## 10 Danksagung

Ich danke dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie Herrn Prof. Dr. Johannes M. Rueger, dass er mir diese Doktorarbeit in seiner Klinik ermöglicht hat.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Amling, der mich während meiner gesamten Doktorandenzeit wohlwollend und menschlich unterstützt hat.

Frau PD Dr. Pia Pogoda hat mir als Betreuerin zur Seite gestanden und mir insbesondere geholfen die erhobenen Daten mit der ursprünglichen Versuchsdurchführung und der „klinischen“ Situation der Tiere in Zusammenhang zu bringen.

Ich danke allen Mitarbeitern des Labors für die kollegiale Aufnahme und alltägliche Unterstützung, insbesondere Herrn Dr. Arndt F. Schilling für technische Hilfe mit EDV und Fotografie, Herrn Dr. Matthias Priemel für Einführung und Beratung bei der Histomorphometrie, Herrn Dr. F. Timo Beil für die Unterstützung bei der Auswahl von Bildmaterial, Frau Sandra Riecke für die spontane Unterstützung bei der Fotodokumentation, sowie Frau Olga Winter und Frau Cordula Müldner für die Hilfe bei der histologischen Aufbereitung des Knochenmaterials.

Ich danke meiner Familie insbesondere meinen Eltern, für Ihre liebevolle und aufopferungsvolle Fürsorge.

Nur durch Ihre Unterstützung von Lebensbeginn an bis heute standen mir auf meinem bisherigen Weg alle Möglichkeiten offen, die ich mir nur wünschen konnte.

Ich danke meiner Lebensgefährtin, die mich besonders während des Verfassens dieser Dissertation unterstützt und ertragen hat, für Ihren Beistand in allen Lebenslagen.

(gekürzte Onlineversion)

---

## **11 Lebenslauf**

Persönliche Daten: Johann-Christoph Schnell

Aus Datenschutzgründen wurde der Lebenslauf aus der Onlineversion entfernt.

Hamburg, August 2009

---

---

## 12 Veröffentlichungen

“Leptin Inhibits Bone Formation Not Only in Rodents, but Also in Sheep”

(Pia Pogoda, Marcus Egermann, **Johann-C Schnell**, Matthias Priemel, Arndt F Schilling, Mauro Alini, Thorsten Schinke, Johannes M Rueger, Erich Schneider, Ian Clarke, Michael Amling - Journal of Bone and Mineral Research, Volume 21, Number 10, 2006)

---

### **13 Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, August 2009

Johann-Christoph Schnell

---