

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Osteologie und Biomechanik

Direktor: Prof. Dr. med. Michael Amling

Quantitative Experimentelle Untersuchung von Osteozyten bei Vitamin D Mangel und Immobilisation

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Tim Rolvien
aus Berlin

Hamburg 2015

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.11.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Michael Amling

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Klaus Püschel

Inhaltsverzeichnis

1 Zielsetzung	1
2 Einleitung	2
2.1 Das Skelettsystem	2
2.1.1 Knochenentwicklung	2
2.1.2 Knochenaufbau/ -anatomie	3
2.1.3 Knochenzellen	5
2.2 Knochenstoffwechsel	8
2.2.1 Remodeling	8
2.2.2 Mineralisation und endokrine Regulation	10
2.2.3 Vitamin D	11
2.3 Ausgewählte Knochenkrankheiten	13
2.4 Osteozyten und Knochenstoffwechsel	15
2.5 Osteozyten und mechanische Belastung (Mechanotransduktion)	17
2.6 Hypermineralisierte Osteozytenlakunen	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Patientenkollektiv	20
3.1.1 Vitamin D - humane Beckenkammbiopsien	20
3.1.2 VDR Mäuse	21
3.1.3 Immobilisation – humane Femurbiopsien	21
3.2 Aufarbeitung	23
3.3 Färbung	25
3.4 Histologie	26

3.5 Histomorphometrie	27
3.6 Quantitative backscattered electron imaging	28
3.7 Acid Etching	30
3.8 Statistische Auswertung	31
4 Ergebnisse	32
4.1 Vitamin D – humane Beckenkammbiopsien.....	32
4.2 VDR- Mäuse	35
4.3 Femur – Immobilisation.....	39
5 Diskussion	45
6 Zusammenfassung.....	51
7 Abkürzungsverzeichnis	52
8 Anhang	53
9 Literaturverzeichnis	58
10 Danksagung	67
11 Lebenslauf.....	68
12 Eidesstattliche Erklärung	69

1 Zielsetzung

Um eine optimale Stabilität zu gewährleisten, muss sich das Skelettsystem ständig erneuern und sich an mechanische Veränderungen, welche in Form von Be- oder Entlastung auftreten, anpassen. Die im Rahmen der Knochenbildung in die Knochenmatrix eingemauerten Osteozyten scheinen über mechanische Stimuli aktiv in den Knochenumbauprozess (Remodeling) einzugreifen. Weiterhin scheinen auch hormonelle Einflüsse wie der Calcium- und Vitamin D Stoffwechsel einen Einfluss auf die Osteozytenaktivität zu haben. Bisher ist unklar, inwiefern Osteozyten neben der Aktivierung oder Deaktivierung von Osteoblasten und Osteoklasten auf einen langjährigen Vitamin D Mangel, wie auch fehlendem mechanischen Stimulus, z.B. infolge Immobilität im Knochengewebe reagieren.

Ziel dieser Dissertationsarbeit ist die Quantifizierung von Osteozyten, der häufigsten im Knochen anzutreffenden Zellpopulation, unter zwei Umständen: 1. im Rahmen eines prävalenten Vitamin D Mangels und 2. im Rahmen einer langfristigen fehlenden mechanischen Belastung. Besonderes Augenmerk wurde auf Osteozytenzahl, -vernetzung und -größe gelegt, wobei zwischen lebenden und toten Osteozyten unterschieden wurde.

Hierfür wurden humane Beckenkammbiopsien von Verstorbenen mit unterschiedlichen Vitamin D Spiegel untersucht, sowie zusätzlich Tibia Knochen Vitamin D defizienter Mäuse mit entsprechenden Wildtypen verglichen, um eine gültige Aussage über einen Zusammenhang zwischen Vitamin D und Osteozytenparametern in humanen sowie Mausknochen treffen zu können. Eventuelle Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede zwischen Mensch und Maus gilt es herauszuarbeiten.

Weiterhin wurden Femur Proben verstorbener Patienten mit sekundären Zeichen längerer Immobilisation (Dekubitus, Kontrakturen) generiert und mit Kontrollen gesunder junger Patienten, sowie Fällen von postmenopausaler Osteoporose verglichen, um die mechanosensorische Funktion von Osteozyten zu bestätigen. Methodisch konzentriert sich diese Arbeit auf eine histologisch-histomorphometrische Auswertung der Knochenbiopsien in Kombination mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

2 Einleitung

2.1 Das Skelettsystem

Das Skelett übernimmt im menschlichen Körper zahlreiche Funktionen. Zunächst stellt es als Stützgewebe die Voraussetzung für Stabilität, Schutz der inneren Organe und für die Bewegung dar. Der strukturelle Aufbau ergibt sich aus der Beanspruchung in der jeweiligen Skelettregion. Im Knochenmark erfolgt die für den Organismus essentielle Blutbildung. Außerdem stellt der Knochen den größten Speicher für Calcium, Phosphat und andere Ionen des menschlichen Körpers dar.

2.1.1 Knochenentwicklung

Der menschliche Knochen entwickelt sich bereits pränatal aus mesenchymalen Stammzellen und kann entweder desmal aus Bindegewebsvorstufen als auch enchondral an Stelle von Knorpelgewebe gebildet werden. Desmal entstehen die flachen Knochen des Schädels, sowie Gesichtsknochen inklusive des Unterkiefers. Mesenchymzellen entwickeln sich zu Osteoblasten, welche zunächst Mukoproteine und Kollagenfasern abscheiden, in die nach und nach Calciumphosphat - Kristalle eingelagert werden. Die entstandene unregelmäßig organisierte Knochenmasse wird als Geflechtknochen bezeichnet und entwickelt sich schließlich zu reifem Lamellenknochen mit Osteonen.

Bei der enchondralen Ossifikation an den langen Röhrenknochen wird an der epiphysären Seite Knorpel in Knochen umgewandelt, indem zunächst Kapillaren einsprossen und dann Mesenchymzellen einwandern, die wiederum zu Osteoblasten werden und an den Knochenenden Knochensubstanz anlagern. Dies ist auch das Prinzip des Längenwachstums. Der Endpunkt ist der Röhrenknochen mit außen liegender Kompakta/ Kortikalis sowie schwammartiger Spongiosa im Inneren (siehe Abbildung 1).

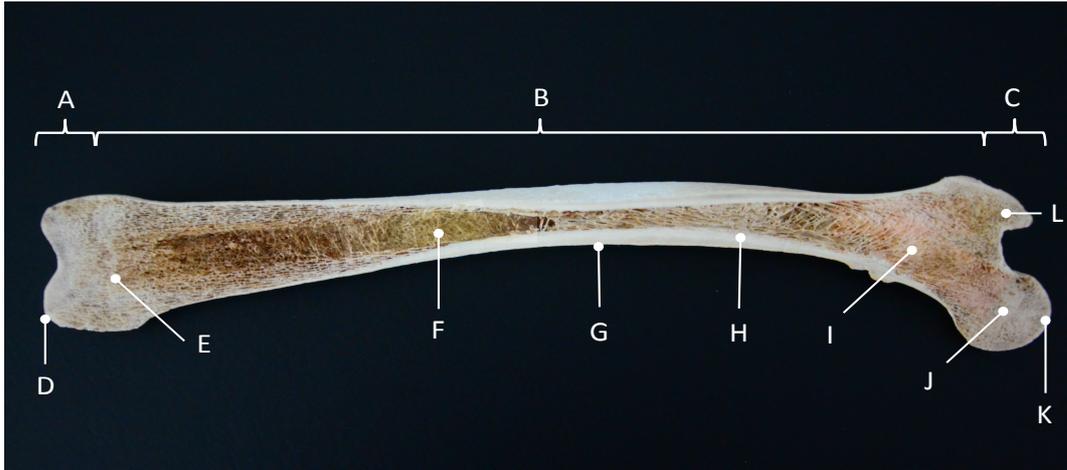


Abbildung 1: Aufbau eines Röhrenknochens (Femur). Es werden Diaphyse (Schaft) und Epiphyse unterschieden, die in der Wachstumsphase durch eine knorpelige Wachstumsfuge getrennt sind. A: distale Epiphyse, B: Diaphyse, C: proximale Epiphyse, D,K: Gelenkknorpel, E,J: knöchernen Epiphysenlinie, F: Markhöhle mit Fettmark, G: Periost, H: Kompakta, I: Spongiosa, L: Apophyse

2.1.2 Knochenaufbau/ -anatomie

In den großen Markräumen des zunächst entstandenen Geflechtknochens lagern Osteoblasten Knochensubstanz in Form von Lamellen ab. Übrig bleiben kleine Kanälchen, sogenannte Havers-Kanäle, die eine Arterie, Vene und Nervenfasern enthalten. Die Havers-Kanäle sind untereinander über Volkmann-Kanäle verbunden. Insgesamt ist der Knochen durch diese zahlreichen Kanäle, die bis an die Oberfläche reichen, mit Blut versorgt. In den erhaltenen Markräumen des ursprünglichen Geflechtknochens bildet sich das rote blutbildende Knochenmark.

Der nun entstandene Lamellenknochen, der den Hauptteil des Skeletts ausmacht, besteht aus konzentrischen Lagen von Knochensubstanz um die Havers-Kanäle, die als Osteone bezeichnet werden. Die Osteone sind durch Zementlinien getrennt, dabei sind Generallamellen die rundläufigen Knochenlagen um den Havers Kanal, Schaltlamellen die Reste ehemaliger Osteone. Die Ausrichtung der Kollagenfibrillen wechselt von Osteon zu Osteon, um dem Knochen eine optimale biomechanische Stabilität zu verleihen (1, 2). Mit geeigneten Färbungen kann diese Orientierung der Kollagenlamellen in polarisiertem Licht dargestellt werden, wobei sich zur Osteon-Achse transversal angeordnete Lamellen dunkel und longitudinal verlaufende Lamellen hell anfärben (3) (siehe Abbildung 2).

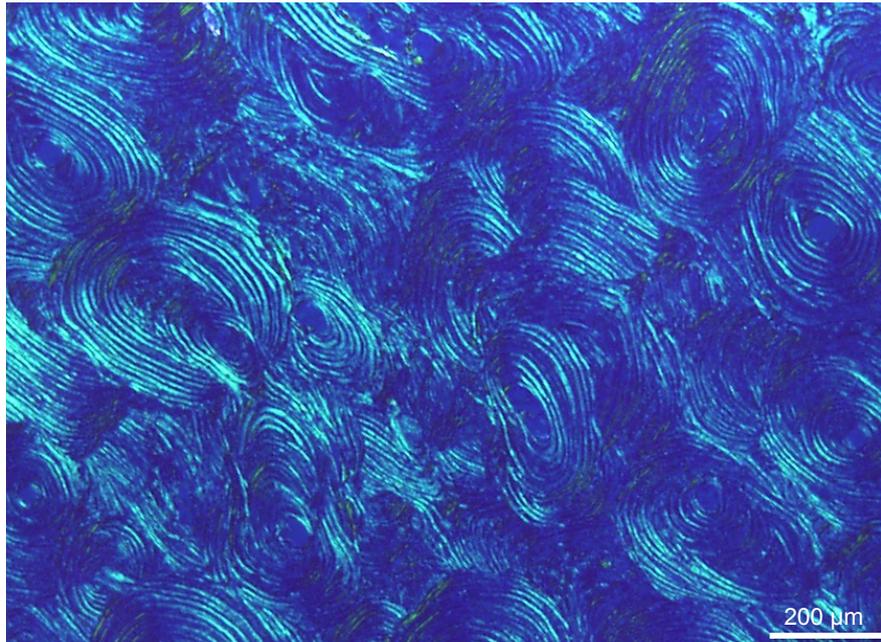


Abbildung 2: Darstellung der Osteone mit seinen Kollagenlamellen in kortikalem Knochen (Schenkelhals) in polarisiertem Licht. Picosirius Rot Färbung.

Neben der Unterscheidung zwischen Geflecht- und Lamellenknochen muss auch zwischen der Knochenschale (Kortikalis, Kompakta) und der schwammartigen Spongiosa unterschieden werden, welche beide aus Lamellenknochen bestehen (siehe Abbildung 1). Die Kortikalis weist den typischen Aufbau aus Osteonen, General- und Schaltlamellen wie oben beschrieben auf, wobei diese den Knochen in seiner gesamten Länge durchziehen. Als äußerste Schicht der Kortikalis findet sich das Periost, die Knochenhaut, während das Endost den Markraum von der Kortikalis trennt (siehe Abbildung 3). Die Spongiosa kommt vor allem an den Enden der Röhrenknochen und in kleinen Knochen wie den Wirbelkörpern vor und macht insgesamt ca. 20% der gesamten Knochenmasse aus. Da dieses komplizierte schwammartige Gebilde aber eine weitaus größere Oberfläche aufweist, reagiert die Spongiosa schneller auf metabolische Stimuli als die Kortikalis. Daher machen sich hier Stoffwechselkrankheiten des Skeletts wie z.B. Osteoporose deutlich schneller bemerkbar. Verschiedene Knochen und Knochenabschnitte haben unterschiedliche Anteile von Kortikalis und Spongiosa. Während in der Diaphyse der langen Röhrenknochen wie Femur und Tibia kaum spongiöser Knochen zu finden ist, überwiegt dieser in Wirbelkörpern und in Richtung Epiphyse der Röhrenknochen.

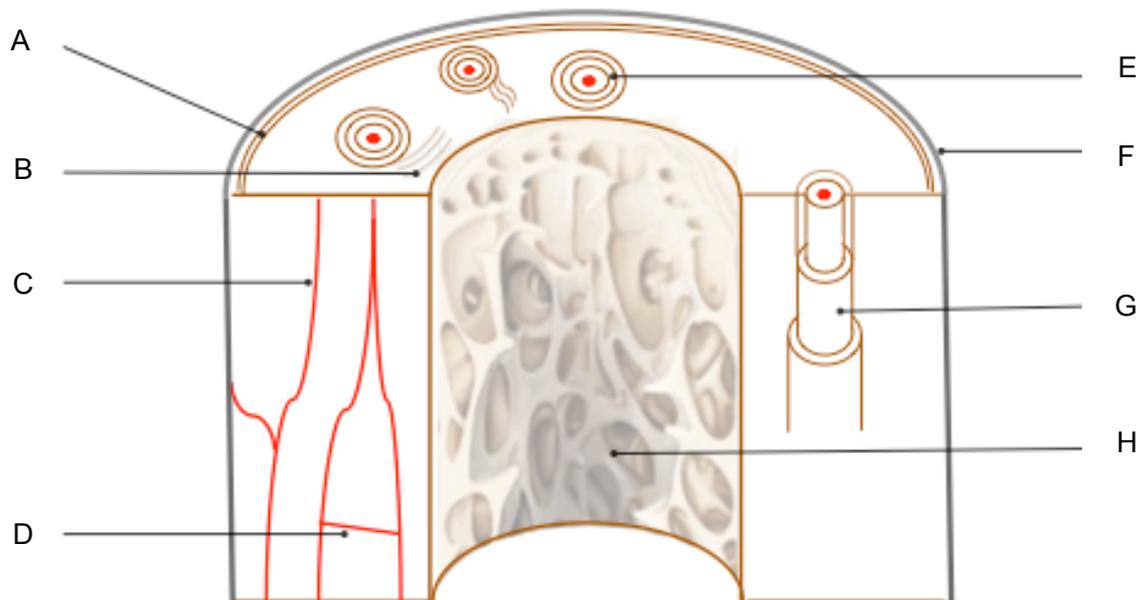


Abbildung 3: Aufbau Lamellenknochen (schematische Darstellung). A: einzelne Lamelle der äußeren Generallamellen, B: Schaltlamelle C: Havers Kanal mit Blutgefäß, D: Volkmann Kanal mit Blutgefäß, E,G: Osteon, F: Periosteum, H: Spongiosa

2.1.3 Knochenzellen

Die organische Masse des Knochens besteht aus Knochenzellen und nichtmineralisierter organischer Matrix, dem Osteoid. Obwohl die Knochenzellen nur etwa 2% der Knochenmasse ausmachen, sind sie allein verantwortlich für den Knochenumbau. Aus pluripotenten mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark entstehen verschiedene Zelllinien, die sich zu den jeweiligen Knochenzellen weiterentwickeln.

Osteoblasten sind einkernige, etwa 20 µm große, knochenaufbauende Zellen, die sich perlschnurartig an der Knochenoberfläche aufreihen. Sie bilden dort kollagene Fibrillen und das Osteoid, welches zunächst unverkalkt ist, wobei jeder Osteoblast ungefähr das Dreifache seines Volumens an Knochenmatrix bildet (siehe Abbildung 4). Osteoblasten sezernieren eine große Menge an alkalischer Phosphatase, was Phosphat-Ionen bereitstellt und somit zur Mineralisierung des Osteoids beiträgt. Schließlich geht ein Großteil der Osteoblasten in Apoptose (50-70%). Andernfalls differenzieren Osteoblasten zu Deckzellen an der Knochenoberfläche, sogenannten *Lining cells*, oder werden mit der Knochenbildung durch die verbleibenden aktiven Osteoblasten in den Knochen „eingemauert“ und

jetzt als Osteozyten bezeichnet (4). Insgesamt werden ca. 15% der Osteoblasten zu Osteozyten, wobei in der Literatur Werte von 10 - 30 % angegeben sind (5, 6).

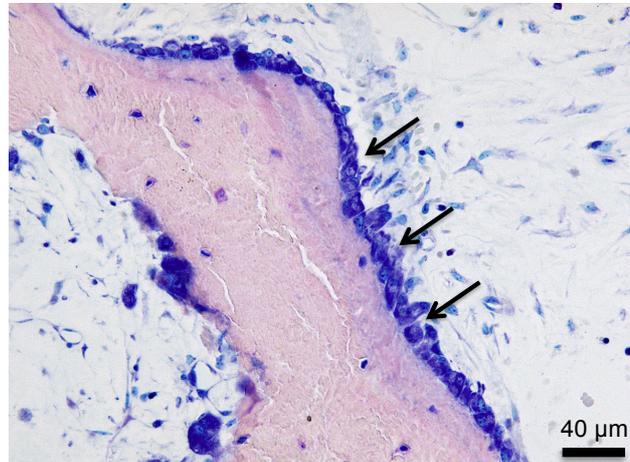


Abbildung 4: Osteoblasten (schwarze Pfeile), die perlschnurartig an der Knochenoberfläche aufgereiht sind, synthetisieren neue Knochenmatrix (Osteoid), welche hier nicht sichtbar ist. Toluidinblaufärbung, 20-fache Vergrößerung.

Zunächst liegen Osteozyten innerhalb des Osteoids und werden im Rahmen der Mineralisation Teil des mineralisierten Knochens. Sie sind stark verzweigte, in die Knochenmatrix eingemauerte, terminal ausdifferenzierte Osteoblasten, dessen Zellkörper in Lakunen liegen (siehe Abbildung 5). Über dendritische Fortsätze, welche sich in Canaliculi befinden, stehen sie untereinander sowie zur Knochenoberfläche in Verbindung. Während der Umwandlung von Osteoblasten zu Osteoid-Osteozyten und schließlich zu reifen Osteozyten nimmt das Zellvolumen um 30% (Osteoid Osteozyten) bzw. um 70% (reife Osteozyten) ab (7). Funktionell werden Osteozyten als Mechanorezeptoren angesehen, die Osteoblasten und Osteoklasten Signale senden können. Dabei scheinen die *Lining cells* als eine Art Bote an der Knochenoberfläche ebenfalls beteiligt zu sein. Das Netzwerk von Canaliculi kann mit einem Spinnennetz verglichen werden, bei dem Osteozyten wie eine Spinne im Netz, die über Schwingungen genau die Lage und Größe ihrer Beute kennt, mechanische Belastungen erkennen können (8).

Osteozyten leben jahrelang, sofern die Nährstoffversorgung über Gefäße im Havers Kanal sowie durch passive Diffusion gewährleistet ist. Nach einigen Jahren

sterben Osteozyten durch Apoptose. Dieser Mechanismus ist noch nicht hinreichend geklärt. Apoptotische Zellreste können in den Lakunen verbleiben, schließlich zeigen sich histologisch nur noch leere Lakunen. Diese können nach weiteren Jahren wiederum mit mineralisierter Matrix aufgefüllt werden (9). In geeigneten histologischen Färbungen ist der Zellkern vitaler Osteozyten deutlich sichtbar und von in Apoptose gegangenen, also avitalen Osteozyten, deutlich abzugrenzen.

In den letzten Jahren wurden einige spezifische Osteozytenmarker wie Sclerostin, FGF23, Dmp 1 sowie auch RANKL gefunden. Die Suche und Erweiterung des Wissens über die Interaktion von Osteozyten untereinander und mit anderen Zellen über diese spezifischen Proteine ist ein neben der Analyse von Osteozytenmorphologie und Distribution zentraler Bestandteil der Forschung auf molekularer Ebene.

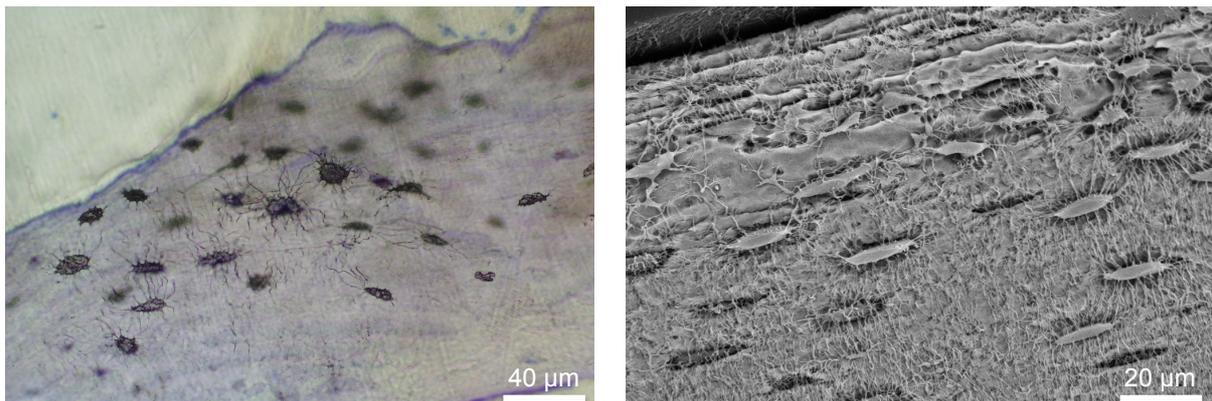


Abbildung 5: Osteozyten befinden sich in Lakunen und sind über ein System von Canaliculi verbunden. links: Schliifpräparat, Toluidinblau, rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme (durch Acid Etching modifizierte Beckenkammbiopsie).

Osteoklasten, die knochenabbauenden Zellen des Knochens, stammen von Blutmonozyten bzw. mononukleären Vorläuferzellen der Monozyten-Makrophagen Zelllinie ab. Sie sind meist mehrkernig und werden oft in Resorptionslakunen, den *Howship Lakunen* angetroffen (siehe Abbildung 6). Durch aktiven Protonentransport in die Lakunen, sowie Sekretion lysosomaler Enzyme bauen sie Knochen ab, wobei nur mineralisierter Knochen abgebaut werden kann. Osteoklasten binden an die Knochenmatrix via Integrinrezeptoren und entwickeln eine „geriffelte Oberfläche“,

über die H^+ Ionen und Enzyme wie Kathepsin K in die Resorptionslakunen abgegeben werden.

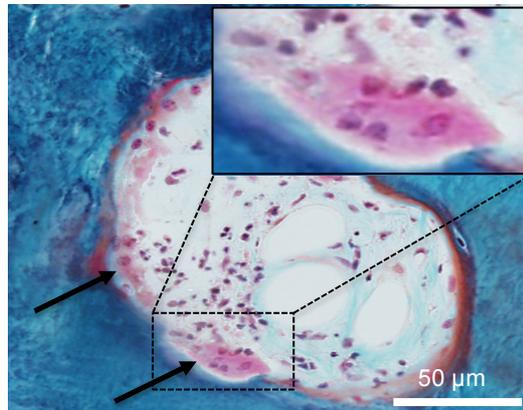


Abbildung 6: mehrkernige Osteoklasten (schwarzer Pfeil) eines Europäischen Aals *Anguilla Anguilla* während der Knochenresorption (Masson Goldner Färbung). Die Osteoklasten liegen in typischen Howship Lakunen.

2.2 Knochenstoffwechsel

Der Knochenstoffwechsel beinhaltet in der Regel drei Hauptmechanismen: (1.) Zunächst beeinflussen bestimmte Hormone wie Vitamin D und Parathormon die Mineralisierung des Knochens. (2.) Umgekehrt hat der Knochen, als wichtigstes Calciumreservoir, bedeutende Aufgabe in der Calciumhomöostase. (3.) Des Weiteren bestimmen mechanische Krafteinwirkungen und Hormone das Gleichgewicht zwischen Knochenbildung und Knochenresorption (Modeling, Remodeling).

2.2.1 Remodeling

Knochenstruktur und Knochenstoffwechsel werden maßgeblich von Osteoblasten und Osteoklasten bestimmt. Diese Funktionseinheit nennt man bone multicellular unit (BMU). Das Gleichgewicht von Knochenauf- und -abbau wird von vielen Faktoren wie Alter, Geschlecht, Belastung oder hormonellen Einflüssen beeinflusst.

Für den Knochenumbau „fressen“ Osteoklasten zunächst einen Bohrkanal in die Knochenmatrix, in welchen dann Bindegewebe, Blutgefäßen und Nervenfasern einwachsen. Nach und nach wird dieser Kanal von neuen Knochenlamellen

aufgefüllt, die von Osteoblasten produziert werden, bis nur noch der Havers Kanal frei bleibt. Osteozyten scheinen diese Funktionseinheit maßgeblich zu regulieren, unter anderem durch Sekretion von Sclerostin, welches die Knochenbildung hemmt (siehe Abbildung 7).

Weitere wichtige Faktoren des Remodelings sind der von Osteoblasten sezernierte M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) und die RANKL (RANK-Ligand)/ RANK (receptor activator of NF- κ B) Interaktion, die für die Osteoklastenproliferation erforderlich sind. RANK-Ligand, ebenfalls von Osteoblasten sezerniert, bindet an RANK und aktiviert so Osteoklasten. OPG (Osteoprotegerin), ein von Osteoblasten sezerniertes Protein, kann sich an RANKL binden und die Interaktion von RANK/RANKL verhindern. Viele Hormone wie Calcitriol (Vitamin D₃), Parathormon, Glucocorticoide, sowie Geschlechtshormone beeinflussen den Knochenstoffwechsel, indem sie in dieses System eingreifen (siehe Abbildung 7).

Mit steigendem Lebensalter vergrößert sich normalerweise der Durchmesser der (Röhren-)Knochen, während die Kortikalis dünner wird. Dies wird darauf zurückgeführt, dass endostal (innen) alter Knochen resorbiert wird, während periostal neuer Knochen aufgebaut wird. Allmählich überschreitet die endostale Resorption jedoch die periostale Apposition (10, 11).

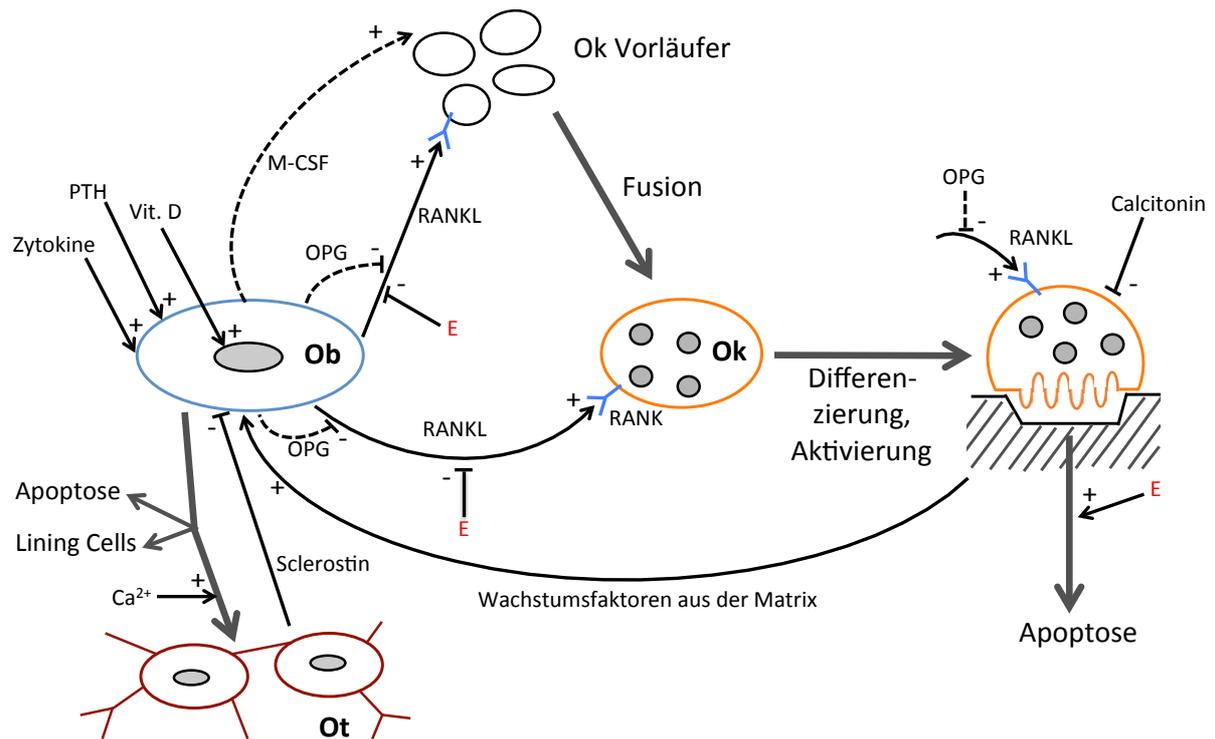


Abbildung 7: Koordination von Osteoblasten (Ob), Osteoklasten (Ok) und Osteozyten (Ot). (+) Stimulation bzw. (-) Hemmung. M-CSF und OPG werden als lösliche Proteine von Osteoblasten sezerniert (gestrichelte Pfeile). RANKL ist ein membranständiges Molekül. E: Estrogene. PTH: Parathormon. Vit. D: 1,25(OH)₂D₃ (Calcitriol, Vitamin D₃) stimuliert Osteoblasten, Knochenmineralisation, sowie den Übergang von Osteoblasten zu reifen Osteozyten.

2.2.2 Mineralisation und endokrine Regulation

Neben dem Remodelingprozess selbst ist auch der Mineralisationsgrad entscheidend für die Knochenqualität. Die mineralisierte Extrazellulärmatrix besteht aus Kollagenfibrillen und Hydroxylapatit - Kristallen, die wiederum vorwiegend aus Calcium-, Phosphat- und Hydroxid-Ionen bestehen. Das Parathormon - Vitamin D - Calcitonin System steuert die Calciumhomöostase über die intestinale Calciumresorption, renale Calciumrückresorption und die Calciummobilisierung aus dem Skelett.

Parathormon (PTH) wird von den Nebenschilddrüsen gebildet und ins Blut sezerniert. Sinkt der Calcium Spiegel, wird dies über Rezeptoren registriert und vermehrt PTH freigegeben. PTH aktiviert Osteoklasten und führt so zu einer Calciumfreisetzung aus dem Knochen. In der Niere kommt es zu einer gesteigerten

Calcium- und verminderten Phosphatreabsorption. Weiterhin steigert PTH die Vitamin D Synthese durch Aktivierung der renalen Hydroxylase. Calcitonin, gebildet in den C-Zellen der Schilddrüse, wird im Gegenzug bei hohen Calciumspiegeln ausgeschüttet und hemmt die Osteoklasten, wodurch der Calciumspiegel im Blut sinkt und die Knochenmineralisierung steigt.

Auch Steroidhormone haben einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel. So tragen Glucocorticoide in therapeutischen Konzentrationen bekanntermaßen zu einem verstärkten Knochenabbau bei, weshalb bei langfristiger Cortisongabe häufig eine Osteoporose zu beobachten ist. Östrogene tragen über Rezeptoren in Osteoblasten und Osteoklasten zu einer Erhaltung der Knochenmasse bei. Postmenopausale Frauen, bei denen der Östrogenspiegel stark zurückgeht, entwickeln ebenfalls häufig eine Osteoporose.

Das Polypeptidhormon Leptin, bekannt für die zentrale Regulation des Fettstoffwechsels, scheint nach Amling et al. die Knochenbildung bei Mäusen zu vermindern. Da aber weder Leptin noch Leptin-Rezeptoren auf den Knochenzellen gefunden wurden, scheint hier ein zentraler Regulationsmechanismus über den Hypothalamus vorzuliegen (12).

2.2.3 Vitamin D

Vitamin D₃, auch 1,25 Dihydroxycholecalciferol (1,25(OH)₂D₃) oder Calcitriol, hat als Steroidhormon zentrale Bedeutung in der Knochenmineralisation. Während die Korrelation zwischen Vitamin D Mangel und vermehrtem Osteoidvolumen bis hin zur Osteomalazie bereits untersucht und nachgewiesen wurde (13), ist ein Zusammenhang zwischen Vitamin D Spiegel und der Osteozytenanzahl sowie seiner Distribution noch nicht untersucht.

Vitamin D wird als Calciferol mit der Nahrung aufgenommen. Bei Calciferol handelt es sich um ein Provitamin, welches auch vom Körper über die Vorstufe 7-Dehydrocholesterol selbst synthetisiert werden kann. Durch ultraviolettes Licht (UVB) wird Calciferol in der Haut in Cholecalciferol umgewandelt, zur Leber transportiert und weiter in 25 Hydroxycholecalciferol (25(OH)D₃) hydroxyliert. Über das Blut gelangt es zur Niere, wo es schließlich noch einmal in die biologisch aktive Form 1,25 Dihydroxycholecalciferol hydroxyliert wird.

Vitamin D Rezeptoren (VDR) sind vor allem im Gastrointestinal Trakt vorhanden, wurden aber auch auf Osteoblasten und Osteoklasten gefunden (14). Es

handelt sich um nukleäre Rezeptoren, bei denen über Genexpression verstärkt Proteine, wie das Calcium bindende Protein oder Calbindin, gebildet werden. Somit fördert Vitamin D im Darm die Calcium- und Phosphataufnahme und wirkt sich dadurch positiv auf die Knochenqualität aus. Weiterhin beschleunigt es in der Niere die tubuläre Calcium Reabsorption. Über die erhöhte Calciumkonzentration im Blut wird indirekt Parathormon gehemmt.

Ein direkter Einfluss von Vitamin D auf den Knochenstoffwechsel im Sinne von Knochenformation und -mineralisation wird wegen seiner Rezeptoren auf Knochenzellen immer wieder vermutet. In Vitamin D defizienten Mäusen konnte allerdings gezeigt werden, dass eine calciumreiche Diät Knochen- und Mineralisationsdefekte wie vermehrtes Osteoidvolumen oder desorganisierte Wachstumsfugen ausgleichen kann (15).

Vitamin D Mangel geht mit einem sekundären Hyperparathyreodismus einher, bei dem der Grenzwert an Parathormon überschritten wird, wodurch es zu Aktivierung von Osteoklasten und damit einer Verminderung von Knochensubstanz kommt. In diesem Falle steigt das Frakturrisiko, weshalb Vitamin D und Calcium in diesen Zuständen supplementiert werden. Der Fakt, dass diese Therapie das Frakturrisiko signifikant senkt, obwohl die Knochenmasse nicht maßgeblich zunimmt und die Parathormon Spiegel nicht einheitlich sinken, zeigt auf, dass auch andere Faktoren zu einem verringerten Frakturrisiko bei Vitamin D Gabe beitragen können (16). Empfohlene Vitamin D Mindestwerte schwanken von 12 – 40 ng/ml, allgemein wird jedoch ein Mindestwert von 20 ng/ml 25(OH)D₃ angegeben (17). Nach neusten Definitionen sollten 25(OH)D₃ Serumwerte unter 75nmol/l bzw. 30ng/ml (13) schon als Vitamin D Mangel bezeichnet werden, da unter diesem Wert pathologische Knochenveränderungen beobachtet werden konnten. In Deutschland ist der weit verbreitete Vitamin D Mangel auf die geringe Sonnenlichtexposition sowie die fehlende Anreicherung von Vitamin D in Lebensmitteln zurückzuführen, wobei eine tägliche Substitution von 1000 IU Vitamin D die Anzahl von Hüftfrakturen um 25000 verringern könnte und somit 2,5 Milliarden Euro jährlich eingespart würden (18).

Es sind allerdings auch Fälle bekannt, bei denen Vitamin D eine osteokatabole Wirkung hat. Dies scheint bei der klinisch selten auftretenden Vitamin D Überdosierung oder bei einem starken Calciummangel der Fall zu sein, bei dem Vitamin D vermittelt Calcium aus dem Knochen mobilisiert wird (19).

25(OH)D₃ ist der zirkulierende Blutwert, mit dem der Vitamin D Status beurteilt wird, während die renale alpha 1- Hydroxylase das 25(OH)D₃ erst in die aktive Form, das 1,25(OH₂)D₃, umwandelt. Diese Enzymaktivität wird von Parathormon sowie Calcium und Phosphatspiegeln moduliert. Außerdem mindert der Fibroblast growth factor 23 (FGF23), wiederum hauptsächlich von Osteozyten synthetisiert, die 1,25(OH₂)D₃ Synthese (20). Dieser Zusammenhang zwischen Osteozyten, FGF23 Produktion und Vitamin D Spiegel könnte bedeutend für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit sein (21).

2.3 ausgewählte Knochenkrankheiten - Osteoporose, Rachitis/Osteomalazie

Osteoporose ist die häufigste aller Knochenerkrankungen und geht mit einer verminderten Knochenmasse (Osteopenie), sowie einer gestörten Mikroarchitektur und erhöhten Frakturneigung einher. Man unterscheidet die primäre idiopathische Osteoporose, zu der auch die postmenopausale Osteoporose gezählt wird, von der sekundären Osteoporose, die durch diverse Faktoren oder Krankheiten ausgelöst werden kann. Hierzu zählen langanhaltende Corticosteroidtherapie/ Morbus Cushing, Hyperparathyreodismus, Mangelernährung/ Malabsorption sowie auch Immobilisation.

Charakteristisch für die Osteoporose ist der starke Spongiosaverlust und eine verdünnte Kortikalis begleitet von Mikrofrakturen sowie atraumatischen Frakturen. Aktuell zugelassene Therapiemöglichkeiten sind u.a. Bisphosphonate, die den vermehrten Knochenabbau hemmen, der Ausgleich der Vitamin D und Calcium Knochenstoffwechsellage, Parathormonanaloga sowie einige monoklonale Antikörper. Auf zellulärer Ebene ist bisher relativ wenig über den Pathomechanismus der Osteoporose bekannt, die Verminderung der Knochenmasse wird jedoch versucht mit zellulären Mechanismen zu erklären. So kann die Osteoporose weiterhin in high turnover und low turnover Typ unterschieden werden. High turnover bedeutet ein gesteigerter Knochenabbau mit Überaktivität der Osteoklasten, low turnover hingegen eine verminderte Osteoblastenaktivität mit vermindertem Knochenanbau.

Vor allem konnte gezeigt werden, dass postmenopausale Frauen eine Abnahme der periostalen Apposition, also der Neubildung von Knochensubstanz an

der äußeren Kortikalis aufweisen, welche normalerweise der Kompensation der endostalen Knochenresorption dient (10, 22, 23). Da Osteozyten mechanosensorische Eigenschaften besitzen, könnte die verminderte periostale Apposition, auf einer Osteozytendefizienz basieren oder zumindest mit ihr korrelieren. Es ist daher sinnvoll Osteozytenparameter getrennt in periostalen sowie tiefen Knochenschichten zu analysieren.

Osteozyten könnten unter anderem auch durch vermehrte Sclerostinproduktion an der Pathogenese der Osteoporose beteiligt sein. Die Therapie mit Bisphosphonaten zum Beispiel ist bekannt als Hemmung der Knochenresorption durch Osteoklasten. Nach einiger Zeit wird jedoch auch die Knochenbildung gehemmt, was durch den ebenfalls beobachteten steigenden Sclerostinspiegel zu erklären sein könnte (24). So könnte ein gezielter Inhibitor von Sclerostin, alleinig durch Osteozyten produziert, maßgeblich für die Osteoporosetherapie sein. Tatsächlich befinden sich Sclerostin Antikörper schon in der Phase der klinischen Testung.

Im Gegensatz zu Osteoporose ist die Osteomalazie ein Mineralisationsdefekt des Knochens, welcher zu struktureller Schwäche des Skeletts führt. Dies beruht meist auf einem Vitamin D Mangel aufgrund einer gestörten Vitamin D Aufnahme, erhöhtem Verlust oder verringerten Synthese. Gründe des Vitamin D Mangels sind wie bereits genannt meist die zu geringe Sonnenlichtexposition, Malabsorption bei Fettresorptionsstörungen sowie Störungen des Vitamin D Metabolismus' in Leber und Nieren. Auch Calciummangel oder Hypophosphatämie können Ursache für die Entstehung einer Osteomalazie sein. Definitionsgemäß kommt es zu einer Oberflächenosteoidose, also einer Vermehrung des Osteoids, wobei man ab Werten von über 20 % von Osteoid bedeckter Oberfläche ($OS/BS > 20\%$ und über 2% Osteoidvolumen pro Knochenvolumen ($OV/BV > 2\%$) von einer Osteomalazie spricht (13).

Die kindliche Form der Osteomalazie heißt Rachitis und tritt in Deutschland nur noch selten auf. Beginnend meist im 2. bis 3. Lebensmonat kommt es zu einer Muskelhypotonie, einem eingefallenen Bauch sowie zu einer Aufweichung des Schädelskeletts, später zu schmerzhaften Veränderungen am gesamten Skelett. Die Osteomalazie hingegen macht sich erst im höheren Lebensalter bemerkbar und ist ebenfalls mit Schmerzen im Skelettsystem verbunden. Durch die mangelnde Mineralisierung und verminderte Knochendichte steigt die Frakturneigung. Erst über

einem Vitamin D Wert von 30 µg/l trat nach Priemel et. al. sicher keine Oberflächenosteoidose mehr auf (13).

Sclerostin, das fast alleinig von Osteozyten produziert wird, verhindert auch eine zu starke Knochenbildung. Bleibt die Produktion von Sclerostin aus, wie bei der autosomal rezessiven Erbkrankheit Sclerosteosis, so haben die Betroffenen eine stark vermehrte Knochenmasse. Durch die Einengung der Foramina im Schädelskelett kann es zu Facialisparesen und Hörverlust kommen (25).

2.4 Osteozyten und Knochenstoffwechsel

Osteozyten machen ca. 90-95% der Knochenzellen aus und scheinen das Remodeling entscheidend zu beeinflussen (26). Daher ist es naheliegend zu vermuten, dass Unterschiede in der Osteozytenanzahl, -größe und -funktion ein geeigneter Marker für die strukturellen Eigenschaften des Knochens sind, welche neben der Knochenmasse (z.B. Bone Volume per Tissue Volume, BV/TV) als quantitativer Parameter maßgeblich die Knochenstabilität in Bezug auf z.B. das Bruchrisiko beeinflussen.

Es sind bereits einige Zusammenhänge zwischen Osteozytenanzahl bzw. leeren Lakunen und Knochenparametern untersucht worden. Zunächst sinkt die Osteozytenzahl mit dem Alter, gleichzeitig steigt die Anzahl leerer Lakunen. Da Knochenumbauprozesse an der Oberfläche stattfinden, ist der Unterschied in tieferen Schichten besonders deutlich. Hier ist der Knochen am ältesten und einige Osteozyten sind bereits in Apoptose gegangen, während an der Oberfläche, wo nach wie vor Remodeling stattfindet, kein signifikanter Unterschied in Bezug auf das Lebensalter besteht (27).

Untersuchungen an Osteoporosepatienten zeigten zunächst, dass Osteozyten hier in vermehrter Anzahl vorliegen. Dies wurde mit der Theorie begründet, dass Osteoblasten weniger Knochen pro Zelle produzieren und dann als Osteozyten in höherer Konzentration vorliegen (28). Diese Beobachtung konnte jedoch später in anderen Veröffentlichungen von zum Teil den selben Autoren widerlegt werden, indem die Ergebnisse zeigten, dass Osteoporosepatienten eine geringere Osteozytenzahl aufwiesen (29, 30). Hier sank jedoch sowohl die Osteozytenzahl als

auch die Anzahl leerer Lakunen, der relative Anteil „besetzter“ also lebender Osteozyten blieb somit gleich.

Weiterhin wurde ein verfrühter Osteozytentod begleitet von gehäuft auftretenden leeren Lakunen bei Patienten mit sekundärem Hyperparathyreodismus nach Parathyreoidektomie (PTX) beobachtet (31). Diese Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und renaler Osteodystrophie aufgrund des Vitamin D Mangels wiesen nach PTX neben weniger lebenden Osteozyten auch eine erhöhte Mineralisationsrate entlang des canaliculären Netzwerkes auf. Es wurde auf die Rolle des PTH Rezeptors in Osteozyten hingewiesen, dessen Aktivierung nach O'Brien et al. mit erhöhter Knochenmasse und Remodelingaktivität sowie verminderter Sclerostinproduktion verbunden ist (32).

Qiu et al. erörterte 2005 den Zusammenhang zwischen Microcracks in interstitiellem Knochen und Osteozytenzahl und fand heraus, dass diese als Zeichen verminderter Stabilität und gestörter Mechanotransduktion an Orten nahe der Microcracks verringert war (33). Weiterhin ist bekannt, dass Schwarze ein geringeres Frakturrisiko sowie eine höhere Knochenmasse und geringerem Knochenumsatz haben (34, 35). Es konnte eine höhere Osteozytenzahl bei schwarzen im Vergleich zu weißen Frauen in oberflächlichem spongiösen Beckenkammknochen ermittelt werden, was den Zusammenhang zwischen Osteozytenzahl und Knochenstärke unterstreicht (36). Diese Ergebnisse zeigen, dass ein starker Zusammenhang zwischen Osteozytendistribution und Knochenstoffwechsel besteht, wobei unklar ist, ob die initiale Osteozytendefizienz als solche die Ursache für Knochendefekte ist oder Osteozyten nur passiv auf veränderte hormonelle sowie physische Gegebenheiten reagieren. Es stellt sich dennoch die Frage, inwiefern hohe bzw. niedrige Vitamin D Spiegel und/oder Immobilisation einen Einfluss auf Osteozytenzahl, -größe und -konnektivität haben, was die beiden Hauptfragen dieser Dissertation darstellt.

Es konnte ein weiteres Phänomen zum Thema Osteozyten und Knochenstoffwechsel beobachtet werden: Die sogenannte „Periosteozytäre Osteolyse“ beschreibt einen vermehrten Knochenabbau bzw. eine Demineralisation innerhalb der Osteozytenlakune abhängig vom Calciumreservoir und -bedarf des jeweiligen Organismus, was mit vergrößerten Osteozytenlakunen einhergeht. Die Frage, ob Osteozyten einen direkten Einfluss auf den Mineralstoffwechsel des Knochens haben und die Fähigkeit besitzen aktiv dazu beizutragen Knochenmatrix

ab- oder aufzubauen (periosteozytäre Osteolyse), ist in vielen Studien untersucht worden. Es gibt jedoch bislang keine eindeutige Meinung, welche Bedeutung den Osteozyten zuzuschreiben ist (37). Vergrößerte Osteozytenlakunen wurden jedoch bereits bei laktierenden Mäusen gefunden, einem Zustand, in dem das Skelett als wichtiges Calciumreservoir dient und der Knochen demineralisiert. Weiterhin wurden hier Enzyme des Knochenabbaus wie Kathepsin K in den Osteozytenlakunen nachgewiesen (38).

In humanen Proben wurde auf eine Zunahme der Lakunengröße um 14% bei Vitamin D Mangel hingewiesen, wobei hier nicht zwischen Lakunen mit Zellkern und leeren Lakunen unterschieden wurde (39). Es konnte gezeigt werden, dass Calcium, welches zwangsläufig mit dem Vitamin D Metabolismus in Verbindung steht, den Übergang von Osteoblasten zu reifen Osteozyten während der Knochenmineralisation stimuliert (40). So besteht die Hypothese, dass Vitamin D indirekt die Osteozytenproliferation stimuliert und umgekehrt ein Vitamin D Mangel eine verfrühte Osteozytenapoptose, sowie vergrößerte Lakunen zur Folge hat.

2.5 Osteozyten und mechanische Belastung (Mechanotransduktion)

Knochen hat neben der Mineralhomöostase von Calcium, Phosphat und Magnesium (41) eine weitere wichtige Aufgabe. Das Skelettsystem muss den individuellen Belastungsansprüchen durch Körpergewicht sowie ansetzenden Sehnen und Muskeln gerecht werden.

Der Remodelingprozess des Knochens erfährt je nach Belastung funktionelle Anpassung. Da Osteozyten die einzigen im Knochen liegenden Zellen sind und zahlenmäßig gegenüber Osteoblasten und Osteoklasten deutlich überwiegen, lässt allein ihre Lage vermuten, dass sie maßgeblich das Remodeling beeinflussen und die Aufgabe eines Mechanosensors übernehmen. Es ist bekannt, dass Osteozyten einerseits intrazellulär über gap junctions als auch extrazellulär über Canaliculi in Verbindung stehen.

Die sogenannte Mechanotransduktion geschieht in mehreren Schritten, bei der mechanische Kräfte zunächst in Signale in Form von Flüssigkeitsströmen im lakunokanalikulären System des Knochens umgewandelt werden und dann an Effektorzellen (Osteoblasten, Osteoklasten) über Signalmoleküle weitergegeben

werden und so eine Reaktion dieser Zellen bewirken (Knochenan/-abbau) (42). Zerwekh et. al. untersuchte 1998 biochemische Marker der Knochenbildung in Zusammenhang mit Immobilisierung. Nach 12 wöchiger Bettruhe ging die Knochendichte am proximalen Femur um 3,8% zurück, Calcium- und Phosphatausscheidung stiegen schnell an, außerdem zeigte sich histomorphometrisch eine Verminderung der Osteoblasten, sowie ein Anstieg der Osteoklasten. Insgesamt wurde festgestellt, dass sich die Marker für Knochenabbau stärker veränderten, als diejenigen für Knochenaufbau. In wie weit Immobilisation einen direkten Einfluss auf humane Osteozyten hat, ist noch unbekannt.

Bekannt ist jedoch, dass das von Osteozyten produzierte Glykoprotein Sclerostin übermäßigen Knochenanbau verhindert, indem es den Wnt/ β -catenin Signalweg inhibiert und so die Osteoblastenproliferation blockiert (43). Im Falle von verminderter mechanischer Beanspruchung soll die Sclerostinproduktion gesteigert werden, wodurch die Osteoblastenaktivierung gehemmt wird, was schließlich eine Abnahme der Knochenmasse zur Folge hat (44). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass durch die Deletion eines β -catenin Allels in Osteozyten der osteoanabole Effekt von Belastung stark abgeschwächt werden kann (45).

Interessanterweise hat auch eine zu hohe mechanische Belastung Knochenabbau zur Folge. Wie oben beschrieben gehen Mikrorisse im Knochen mit einer verminderten Osteozytenzahl einher. Wenn durch zu hohe Belastung Mikrorisse entstehen, ist die mechanische Krafteinwirkung und -übertragung in diesem Gebiet verringert, sodass Osteozyten als Mechanosensor nicht ausreichend stimuliert werden und in Folge dessen absterben, was Osteoklastenaktivierung, Knochenabbau und schließlich Knochenerneuerung zu Folge hat (46).

Im Falle von Immobilität bedeutet das, dass die verminderte mechanische Belastung, einen verfrühten Osteozytentod zur Folge hat, was mit verstärktem Knochenabbau einhergeht. Damit in Zusammenhang stehende Mechanismen, wie die vermehrte Sclerostinproduktion, verhindern den anschließenden Knochenaufbau, wodurch ein rapider Verlust an Knochenmasse schlusszufolgern wäre.

Eine verfrühte Osteozytenapoptose nach Immobilisation wurde bereits nach 3 Tagen an Mäusen nachgewiesen und hatte in den darauffolgenden 2 Wochen eine verstärkte Knochenresorption zur Folge. Hingegen konnte die mechanische Stimulation von Osteozyten in vitro die Osteozytenapoptose verhindern (47, 48). Eine Osteozytenaktivierung bei Immobilisation wurde bei Ratten gefunden, bei denen die

Osteozytengröße, jedoch auch der Anteil leerer Lakunen stieg (49). Die Beobachtungen der verfrühten Osteozytenapoptose könnten funktionell in hohem Zusammenhang zu der vermehrten Sclerostinproduktion stehen.

2.6 Hypermineralisierte Osteozytenlakunen

Das Vorhandensein hypermineralisierter Osteozytenlakunen (Micropetrosis) wurde zuerst von Frost im Jahre 1960 als komplett mit Mineral gefüllte Osteozytenlakune beschrieben (50). 2010 wurde dieses Phänomen in Zusammenhang mit alterndem Knochen und einem verschlechterten bzw. verlangsamten Remodeling an humanem kortikalen Knochen festgestellt (27). Auch an Patienten, die eine osteoporotische Schenkelhalsfraktur erlitten, konnten proximale trabekuläre Femurhalsbiopsien gewonnen und verschiedene Ausprägungen der Hypermineralisation gefunden werden (51).

Es bleibt allerdings unklar, ob Hypermineralisation ein Phänomen ist, was von aktiven, vitalen Osteozyten ausgeht und zur Regulation des Remodelings beiträgt oder ob es sich um ein Begleitphänomen bzw. eine Folgeerscheinung der Osteozytenapoptose handelt. Für letzteres spricht der beobachtete hypermineralisierte Saum um die Osteozytenlakune herum, welcher vor allem bei avitalen Osteozytenlakunen zu finden ist. Auch der Vitamin D Stoffwechsel sowie Immobilisation könnte einen Einfluss auf Hypermineralisation in Osteozytenlakunen haben und soll nun mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

3.1.1 Vitamin D - humane Beckenkammbiopsien

Bei den humanen Proben handelt es sich um eine Auswahl aus einer früheren Vitamin D Studie (13). Diese transiliacalen Beckenkammbiopsien wurden 20 mm unter der Crista iliaca und 20 mm hinter der Spina iliaca superior anterior gewonnen, wie von Bordier et al. beschrieben (52). So bestanden die Proben aus äußeren und inneren Cortices, sowie der darin liegenden Spongiosa. Bei allen Patienten wurden Krankheiten wie Krebs, Nierenerkrankungen, primärer Hyperparathyreodismus, Morbus Paget sowie längere Hospitalisierung bzw. Immobilisation bei der Autopsie ausgeschlossen (13). Die Probenentnahme sowie eine Messung des Serum Vitamin D Spiegels erfolgte spätestens 48 Stunden nach dem Tod.

Die Beckenkammbiopsien wurden anschließend in Acrylat Blöcke gegossen wie in 3.2 beschrieben und anschließend histologisch sowie für die Rasterelektronenmikroskopie aufbereitet. Es erfolgte eine Aufteilung in zwei Kohorten: 30 Proben wurden von Verstorbenen mit einem Vitamin D Spiegel über 20 µg/l ($31,2 \pm 8,3$) gewonnen und 30 weitere mit einem Vitamin D Spiegel unter 4 µg/l ($2,4 \pm 0,9$). In beiden Gruppen stimmten Alter (Vitamin D hoch $53,9 \pm 19,9$ Jahre; Vitamin D niedrig $54,1 \pm 16,6$ Jahre) und Geschlechterverteilung überein (männlich:weiblich=18:12 in beiden Gruppen, siehe Abbildung 8).

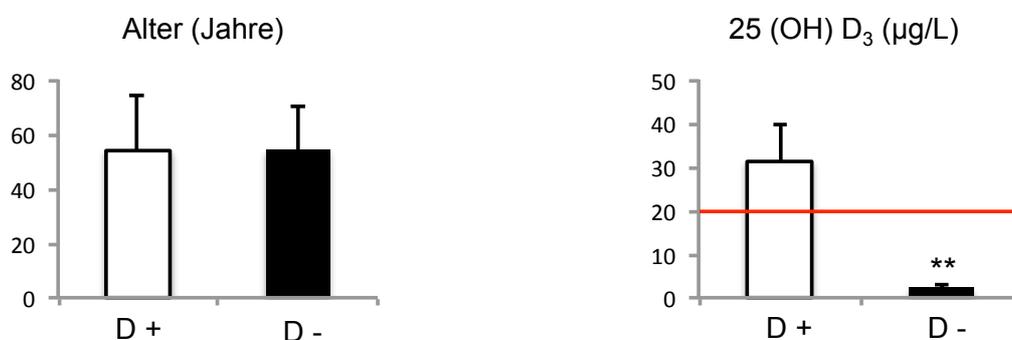


Abbildung 8: Alter und Vitamin D Spiegel der Proben (n=30x2). **D+** 25(OH)D₃ >20 ($31,2 \pm 8,3$ ng/ml), **D-** 25(OH)D₃ <4 ($2,4 \pm 0,9$ ng/ml), ** p<0,01.

3.1.2 VDR Mäuse

Um die humanen Daten in Bezug auf Vitamin D Mangel mit Mausmodellen vergleichen zu können, wurde eine Generation von 20 Mäusen gezüchtet. Diese entsprechen in der Aufzucht der Studie von Amling et al. von 1999 (15) und stellen entweder Wildtypen (WT) dar oder weisen einen defizienten Vitamin D Rezeptor (VDR) auf. Beide Populationen wurden jeweils entweder calciumarm oder calciumreich ernährt, sodass insgesamt vier Gruppen vorhanden waren: Wildtyp und Vitamin D defiziente Mäuse unter calciumarmer/regulärer Diät (1% Calcium, 0,67% Phosphat, 0% Lactose und 4,4 IU Vitamin D/g) sowie Wildtyp und Vitamin D defiziente Mäuse unter calciumreicher Diät (2% Calcium, 1,25% Phosphat, 20% Lactose und 2,2 IU Vitamin D/g) (jeweils n=5) (15). Diesen 70 Tage alten Mäusen wurden Wirbelkörper und Tibia Knochen entnommen, welche anschließend aufgearbeitet wurden. Bei dem Mausmodell des defekten Vitamin D Rezeptors handelt es sich um eine Ablation des zweiten Zinkfingers der VDR DNA-bindenden Domäne (53).

3.1.3 Immobilisation – humane Femurbiopsien

Für die Immobilisationsstudie wurden 8 Femur-Knochenbiopsien entnommen und ausgewertet. Hierfür wurden sämtliche Krematorien Hamburgs besucht und Leichen mit Muskelkontrakturen, ausgeprägtem Dekubitus Grad 3 oder höher, sowie Kachexie ausgewählt. Eingeschlossen wurden postmenopausale Frauen im Alter von 60-90 Jahren mit den oben genannten deutlichen Zeichen längerer Immobilität, Ausschlusskriterien waren Niereninsuffizienz, Tumoren, sowie andere Knochenerkrankungen. Nach Vorlage der Einverständniserklärung der Angehörigen wurden die Leichen ins Institut für Rechtsmedizin am UKE gebracht und es konnten die Femurproben entnommen werden. Die Oberschenkelknochen wurden komplett entnommen und zunächst bei -20°C tiefgefroren.

Als Vergleichskollektiv dienten 7 Proben gesunder junger Frauen (mittleres Alter 36.7), sowie 12 Fälle subtrochantär entnommener Knochenscheiben osteoporotischer Knochen, die im Rahmen der *BioAsset* Studie akquiriert wurden (54-56). Die Einschlusskriterien für das Osteoporosekollektiv entsprachen denen der immobilisierten Proben (Alter 60-90), sowie einer nach WHO Kriterien diagnostizierten, nicht mit Bisphosphonaten behandelten, postmenopausalen Osteoporose, sowie Schenkelhals-, Wirbel- oder distaler Radiusfraktur in der

Vorgeschichte, während Immobilität jedoch ein Ausschlusskriterium war. Die Entnahme und Untersuchung erfolgte unter dem Ethikvotum PV 3486 (siehe Abbildung 9/ 10).

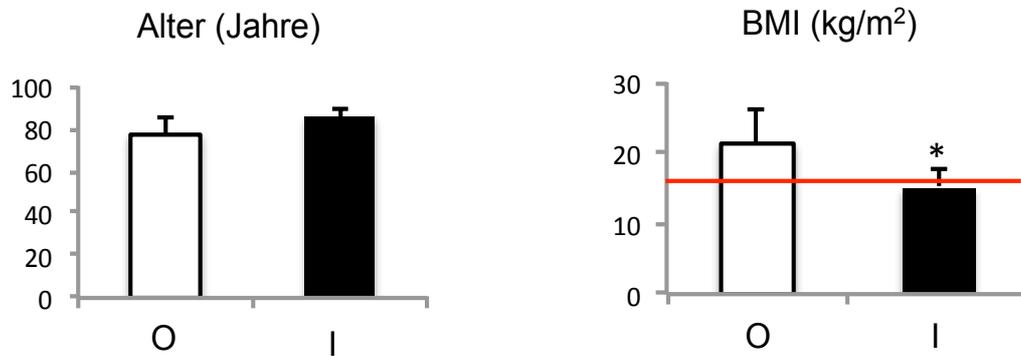


Abbildung 9: Alter und Body Mass Index (BMI) von Fällen postmenopausaler Osteoporose (O) und immobilisierten Fällen (I). Bei BMI<16 (rote Linie) spricht man laut WHO von starkem Untergewicht. * $p<0,05$. Das Vergleichskollektiv, welches jungen Frauen zwischen 30 und 40 Jahren entsprach, ist hier nicht dargestellt.

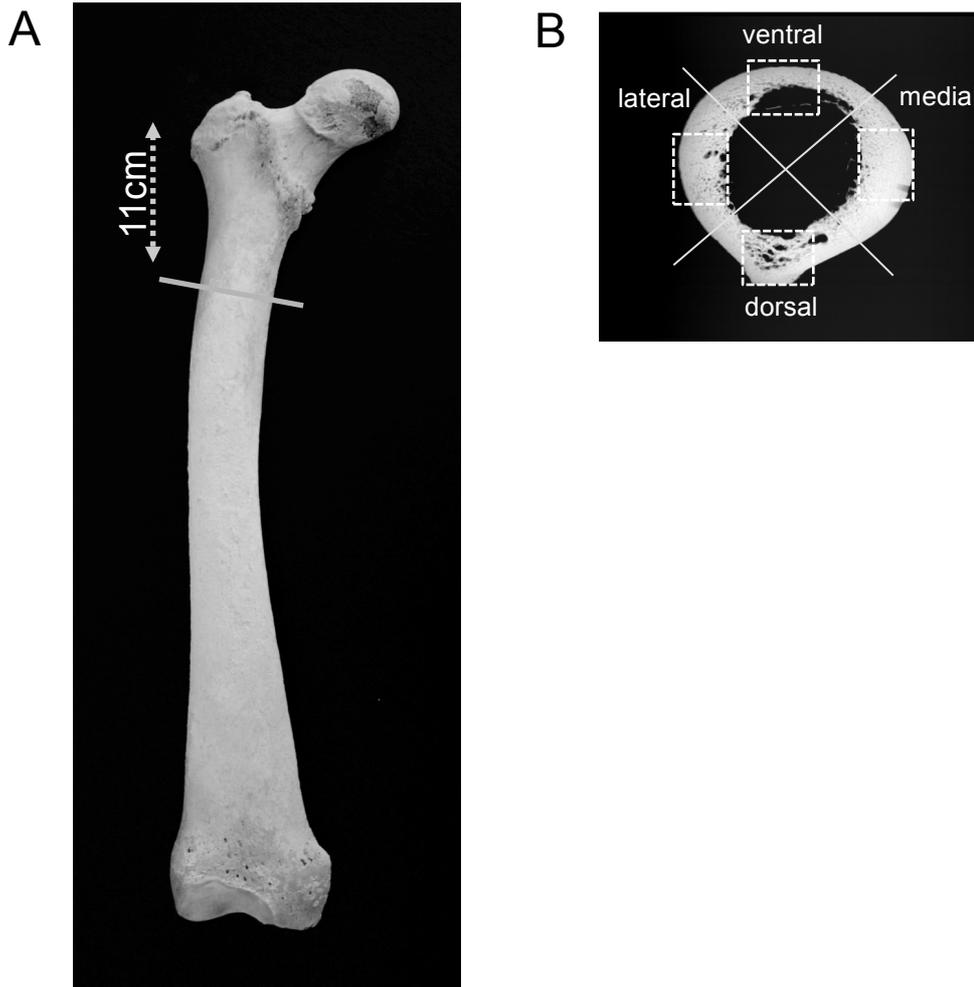


Abbildung 10: A: Entnahmestelle 11 cm subtrochantär und B: Präparation der Femurproben in 4 Teile (ventral-dorsal-lateral-medial).

3.2 Aufarbeitung

Die vorhandenen Oberschenkelknochen der Immobilisationsstudie wurden mit einer Diamantsäge (Typ.No. 36/137, Exakt Gerätebau, Norderstedt, Deutschland) 11cm unterhalb des Trochanter major in ca. 1cm dicke Scheiben gesägt, die wiederum in vier Teile medial-lateral-ventral-lateral geteilt wurden (siehe Abbildung 10). Zur Fixation wurden die in Kapseln gelagerten beschrifteten Präparate bei 20 °C für 3 Tage in mit PBS- gepuffertem 3,7%igen Formalin gegeben. Anschließend erfolgte die Dehydrierung der Biopsien mithilfe eines automatischen Entwässerungsautomaten (Modell Nr. 2050/1.5, BAVIMED, Birkenau, Deutschland), indem die Proben in einen zylinderförmigen Drahtkorb gegeben wurden, welcher in die Halterung des Karussells eingespannt wird. Mittels Zeitschaltuhr wurden die

Biopsien dann in aufsteigender Alkoholreihe über 24 Stunden gleichmäßig dehydriert, beginnend mit 70%igem Alkohol und sich in Fünferschritten bis zu 100%igem Alkohol steigend (Apotheke UKE). Dann erfolgte eine Infiltration über 2 x 24 Stunden in einer Infiltrationslösung bei konstant 4°C, bestehend aus 1000ml Methylmethacrylat (Merck 800590), 100ml Nonylphenyl-polyethylenglycolacetat (Fluka- Biochemika 74432) und 3,3g Benzoylperoxid (Merck 801641). Die Infiltration diente der Verhinderung der vorzeitigen Polymerisation im nächsten Arbeitsschritt.

Nun wurden die Präparate in Rollrandschnappdeckelgläser eingebracht (siehe Abbildung 11) und in 10-15ml Methylmethacrylat eingebettet. Diese Einbettung dient der endgültigen Konservierung und Verbesserung der Schnittfähigkeit des Materials. Es wurde eine Gießlösung aus 1000ml Methylmetacrylat (Merck 800590), 100 ml Nonylphenylpolyethylenglycolacetat (Fluka-Biochemika 74432) und 6,6g Benzoylperoxid (Merck 801641) hergestellt. Unmittelbar vor dem Gießen wurde zur Gießlösung ein Starter (N,N Dimethyl-p-Toluidin (Merck 822040)) im Verhältnis 200:1 gegeben, um die Polymerisationsreaktion zu katalysieren. Die Einbettgefäße wurden luftdicht verschlossen und zur Vermeidung einer überschießenden Polymerbildung in einem Wasserbad über mindestens 12 Stunden bei 4°C aufbewahrt. Nach dem Aushärten wurden die Blöcke aus den Glasbehältern herausgeschlagen.

Die fertigen Blöcke mussten nun geschliffen werden, um die Schnittfläche auf den zu untersuchenden Knochen zu minimieren. Dies erfolgte mittels rotierendem Mikroschleifsystem (Phoenix Alpha; Fa. Buehler, Düsseldorf, Deutschland) in Form eines Sechsecks, sodass bereits mit den ersten Schnitten des Mikrotommessers die richtige Ebene des Knochens getroffen und eine unnötige Abnutzung des Messers und der Verlust von Knochenmaterial verhindert wurde. Zur Anwendung kam hier Nass-Schleifpapier P 80 Körnung (Fa. Hermes, Hamburg, Deutschland).

Zum Herstellen der 5 µm dicken mikroskopierfähigen Präparate wurden die fertigen Acrylblöcke mit einem Rotationsmikrotom (CVT 4060E, micro Tec, Walldorf, Germany) und einem Mikrotommesser aus Hartmetall geschnitten. Als Schnittebene wurden die vier Teile des Femurs horizontal geschnitten, sodass jeweils Viertel Kreise angeschnitten waren.

Das jeweilige Präparat und die Oberfläche des Messers wurde dabei regelmäßig mit Schneideflüssigkeit benetzt (WIV Schneideflüssigkeit, Fa. WIV Schwetzingen, Deutschland), um die Rate von Bruchartefakten möglichst gering zu halten. Auf dem Flüssigkeitsfilm konnten die Schnitte mit einem Haarpinsel auf die

Objekträger gezogen werden, welche zur besseren Haftung mit Chromalaungelatine beschichtet waren.

Mit dieser Technik wurden jeweils zwei Schnitte pro Präparat auf einen Objekträger gebracht, mit einer Strecklösung (80% Isopropanolol) benetzt und anschließend Falten und Blasen mit einem anderen Pinsel herausgezogen. Nun wurden sie mit PE Folie bedeckt und in einem Trockenblock vorgetrocknet. Anschließend wurden alle Schnitte in einer Presse bei 60°C über Nacht gepresst.

Aus den Biopsien der humanen Beckenkämme sowie Maus Tibiae und Wirbelkörpern, die für die Untersuchungen von Osteozyten unter Vitamin D Mangelzuständen gewonnen wurden, wurden ebenfalls histologische Schnitte mit der oben beschriebenen Methode angefertigt, sodass nun insgesamt 60 humane Beckenkamm- (30 Vit D+, 30 Vit D-), sowie 20 VDR Maus- (WT/VDR- reg/res. diet) und 108 Immobilisationsschnitte (8x4immobil, 11x4 Vergleichskollektiv BioAsset, 7x4 junge Kottrollen) zur Verfügung standen.

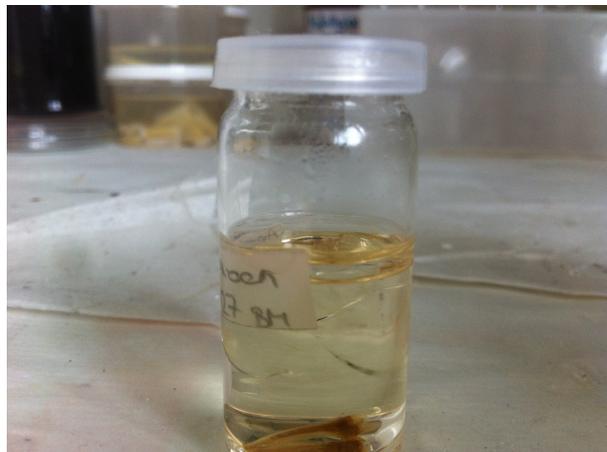


Abbildung 11: Verwendetes Rollschnappglas zur Anfertigung des Gusspräparats, welches nach Aushärten des Methylmethacrylats zerschlagen wurde.

3.3 Färbung

Alle vorhandenen Schnitte wurden in den drei Standardfärbungen Toluidinblau, von-Kossa und Masson-Goldner gefärbt. Die Objekträger wurden aus der Presse genommen, die Folien abgezogen und in Färbeständer gestellt. Diese

mussten zunächst durch 3x5 min Entplaster (2-Methoxyethyl-actetat Merck 806061) und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe (je 2 min. 2x 100%, 96%, 80%, 70% und 50% Ethanol und 1 x Aqua dest.), bevor sich die einzelnen Färbungen anschließen.

Im Falle der Toluidinblau Färbung erfolgte eine Überführung der Schnitte in den Toluidin-blau Farbstoff (1%, pH 4,5) für 30 min, gefolgt von einer aufsteigenden Alkoholreihe. Anschließend wurden die Präparate im Färbeständer in 3x5 min Xylol gegeben und anschließend mit DXP eingedeckt, indem ein Deckgläschen mit dem Harz bestrichen und dann langsam mit dem Objektträger verklebt wurden. Die Färbungen Toluidinblau, von Kossa und Goldner sind in einzelnen Schritten im Anhang in den Färbeprotokollen beschrieben.

3.4 Histologie

Die Zählung der Osteozyten erfolgte mit der Osteomeasure Software (OsteoMetrics Inc. Atlanta. GA) verbunden mit einem Lichtmikroskop (Axioskop 40, Fa. Carl Zeiss Vision GmbH, Deutschland) in 200facher bzw. 400facher Vergrößerung (20x/40x Objektiv). Als Osteozyten wurden nur Zellen mit deutlich erkennbaren Kernen gewertet, als leere Lakunen nur diejenigen ohne sichtbare Zellreste.

Bei den humanen Beckenkämmen (Vitamin D) wurden jeweils 10 Sichtfelder in Kortikalis und Spongiosa ausgezählt, die in Hinblick auf die unterschiedliche Osteozytenverteilung immer in der gleichen Entfernung zur Knochenoberfläche eingestellt wurden. Im kortikalen Knochen wurde dabei versucht einzelne Osteone als zentralen Orientierungspunkt zu nehmen, sodass jedes Osteon für sich ausgezählt werden konnte. Da die histologischen Schnitte eine gewisse Dicke aufweisen (5 µm) wurden nur Osteozyten bzw. Lakunen gezählt die so angeschnitten wurden, dass sie deutlich sichtbar waren.

Bei den Femurpräparaten der Immobilisationsstudie wurden dieselben Parameter bestimmt, da es sich im Femur jedoch hauptsächlich um kortikalen Knochen handelt, wurde diesmal in oberflächlichen Knochen (periostal, <25 µm von der Knochenoberfläche) und tiefen Knochen (>40 µm) unterschieden und jeweils 10 Sichtfelder in 200-facher Vergrößerung gezählt.

Auch die VDR Mäuse wurden histologisch mit diesen Methoden ausgewertet und die Ergebnisse anschließend mit denen der Rasterelektronenmikroskopie verglichen.

Folgende Parameter wurden erfasst: Osteozytenanzahl/Knochenfläche (N.Ot./B.Ar., N/mm²); Anzahl leerer Lakunen/Knochenfläche (N.Empt.Lc/B.Ar, N/mm²); Verhältnis leerer Lakunen pro Gesamtlakunen (Fract.Empt.Lc, %), Gesamtlakunenzahl/Knochenfläche (Tt.Lc.N/B.Ar., N/mm²) sowie mittlere Lakunenfläche (Lc.Ar., μm²).

In der Arbeit von Mullender et al. wurden Formeln angegeben, um die ermittelten Werte pro Fläche in Volumenparameter umzurechnen, da es sich bei Knochen um dreidimensionale Gewebe handelt. Es besteht die Annahme, dass die Lakunengröße in der Fläche einen Einfluss auf die Osteozytenzahl pro Volumen hat (28). Hier wurde die Auswertung allerdings auf Flächenparameter beschränkt, da auch die Osteomeasure Software bestimmte Algorithmen implementiert, mit denen Volumenparameter errechnet werden können. Die Angaben von Osteozytenparametern pro Fläche (z.B. N.Tt.Lc/B.Ar.) ist nach dem Histomorphometrie Standard der American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) (Parfitt et. al., 1987, (57)) eine anerkannte Methodik.

Einen dreidimensionalen Eindruck über das lacunocanaliculäre System von Osteozyten bot die elektronenmikroskopische Betrachtung der durch *acid etching* behandelten Proben (siehe 3.7).

3.5 Histomorphometrie

Bei den humanen Beckenkämmen der Vitamin D Studie, sowie der Wirbelkörper der Mäuse wurden mit 1,25x Objektiv (12,5 fache Vergrößerung) die Strukturparameter BV/TV, Tb.N., Tb.Th. und Tb.Sp. ausgemessen um in Zusammenhang mit den Osteozytenparametern eine Aussage über die Knochenqualität treffen zu können. Diese Messungen erfolgten an den von Kossa gefärbten Histologien ebenfalls mithilfe der Osteomeasure Software, indem die spongiösen Trabekel genau umfahren wurden. Weiterhin erfolgte eine Bestimmung von Osteoidparametern (OV/BV, OS/BS) an den Toluidinblau und von-Kossa gefärbten Beckenkämmen und Mäusehistologien.

3.6 Quantitative backscattered electron imaging

Die in Acrylat eingebetteten Tibiae der Mäuse wurden zunächst mit dem EXAKT 400 CS Tellerschleifgerät (Exakt-Apparatebau, Norderstedt; siehe Abbildung 12) planparallel geschliffen, indem zuerst die nicht zu untersuchende Seite mit einem Doppelklebeband auf einen Plexiglasobjektträger (Diaplug, Norderstedt) geklebt wurde und mit dem Nassschleifpapier Hermes WS Flex (Hermes Abrasives Ltd., Virginia Beach, Virginia) der Körnung 800 einige Minuten planparallel geschliffen wurde. Anschließend wurde die andere zu untersuchende Seite mit dem Silicon-Carbide-Schleifpapier der Körnung 1200/4000 (Allied High Tech Products Inc., Rancho Dominguez, California) poliert und anschließend im BAL-TEC CED 030 Carbon Evaporator mit Kohlenstoff besprüht („sputtering“).

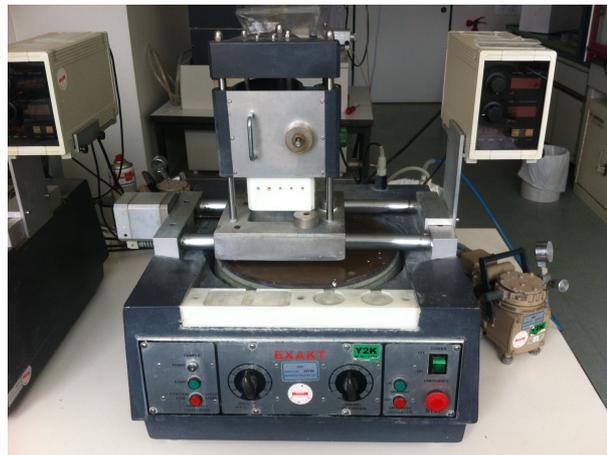


Abbildung 12: EXAKT 400 CS Tellerschleifgerät zur Erstellung planparalleler, polierter Blöcke.

Das Elektronenmikroskop (LEO 435 VP, LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, England) arbeitete hierbei mit konstanter Parametereinstellung (Beschleunigungsspannung 20kV bei 680 pA). Es wurde die Anzahl und Größe der Lakunen im mineralisierten Knochen bestimmt, indem die Aufnahmen exportiert und mit der Computersoftware ImageJ ausgewertet wurden. Dies erfolgte, indem über den im Bild angegebenen Maßstab einem Pixel genau eine Größe in μm zugeordnet wurde. So konnte die Knochenfläche markiert und deren Größe berechnet werden. Anschließend wurden über bestimmte Einstellungen gewisse Schwellenwerte gewählt und die einzelnen Partikel entsprechend den Osteozytenlakunen gezählt und die durchschnittliche Größe ausgerechnet. Das Programm zeigte genau an, welche

Partikel als Osteozytenlakunen gezählt wurden, sodass im Nachhinein eine Feinadjustierung der Einstellungen möglich war um den Fehler möglichst klein zu halten (Abbildung 13). Auf diese Weise wurden auch die Osteozytenlakunen der Femurbiopsien in den drei Gruppen jung - postmenopausale Osteoporose – und Immobilisation ausgewertet.

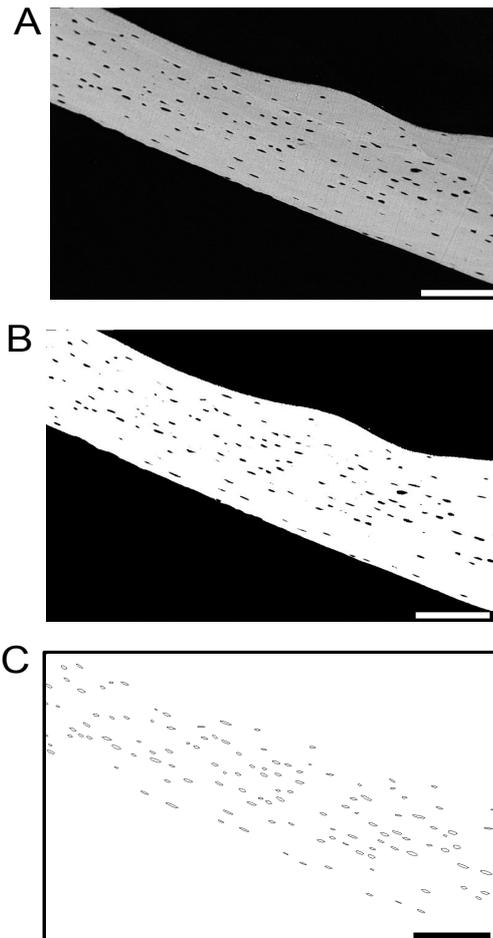


Abbildung 13: Darstellung der einzelnen Schritte zur Bestimmung der Größe und Anzahl der Osteozytenlakunen. A: Original REM Bild; B: Threshold (Schwellenwert); C: erfasste Lakunen in Form von Ellipsen. Maßstabskala 100µm.

Weiterhin wurden hypermineralisierte Osteozytenlakunen gesucht, sowie der Mineralisationsgrad des gesamten Knochens bestimmt. Es besteht nach Roschger et al. 2008 eine direkte Proportionalität zwischen den ermittelten Grauwerten und den entsprechenden Calcium Werten (58). Es erfolgte mithilfe von Eichstandards eine

Kalibrierung der Grauwerte, die im Nachhinein in Calcium Werte (Ca-Wt %) umgerechnet werden.

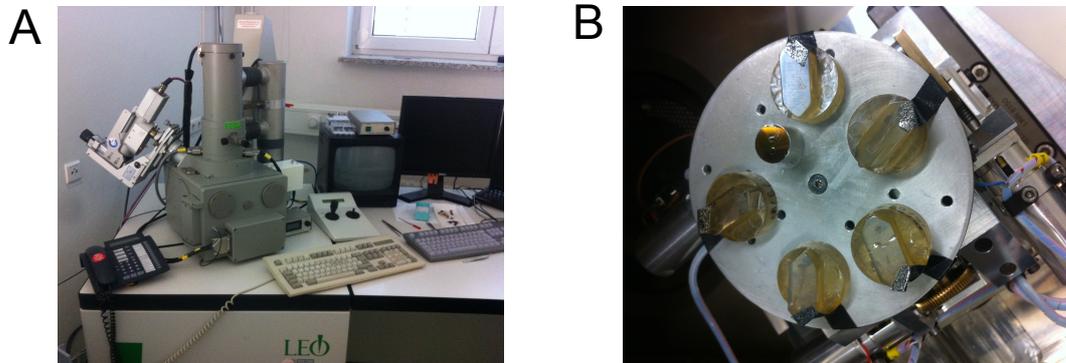


Abbildung 14: A: Elektronenmikroskop LEO 435 VP, B: Objektisch mit den Kohlenstoff besprühten Acrylat Präparaten in diesem Falle der VDR Mäuse.

3.7 Acid Etching

Um Osteozyten und ihr lakunäres System genauer betrachten und quantifizieren zu können, wie von Milanovic et al. (59) beschrieben, wurde die Acid Etching Technik in Bezug auf Vitamin D Spiegel an jeweils 5 der 30 humanen Beckenkammbiopsien durchgeführt (5 D+, 5 D-). Die in Acrylat eingebetteten Knochenproben wurden mit dem Exakt Tellerschleifgerät System poliert wie oben beschrieben. Das Acid Etching wurde nach Kubek et al. (60) durchgeführt. Die polierten Proben wurden zunächst für 20 Sekunden in 9%ige Phosphorsäure eingetaucht (polierte Seite nach oben zeigend) und dann kurz mit destilliertem Wasser ab gespült (1-2s). Dann wurden sie für 5 Minuten in Natriumhypochlorid gegeben und anschließend wieder mit destilliertem Wasser ab gespült. Danach trockneten die Proben langsam und bei Raumtemperatur. Mit dem Elektronenmikroskop LEO 435 VP wurden, diesmal nicht im Backscattered- sondern im SE Modus, Bilder von den Osteozytenlakunen und ihren Canaliculi in Kortikalis und Spongiosa aufgenommen, wobei in der Kortikalis wiederum Osteone als zentraler Orientierungspunkt dienten. Anschließend wurden die digitalen Bilder ausgewertet indem die Zahl der Canaliculi pro Lakune (N.Ot.Ca./Ot.Lc.) bestimmt wurde. Die Zählung erfolgte an 30-50 Lakunen pro Probe (jeweils Kortikalis und Spongiosa).

3.8 Statistische Auswertung

Für alle Stichproben in den jeweiligen Untersuchungsgruppen wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen bestimmt. Da es sich bei allen Teilversuchen um jeweils zwei Gruppen handelte, die untereinander verglichen wurden, konnte für die statistische Auswertung ein t-Test durchgeführt werden. Als signifikant galten p-Werte unter 0,05 (5%). Signifikante Ergebnisse wurden in den Grafiken mit Sternchen markiert. Die Ermittlung von Mittelwerten, Standardabweichungen sowie p-Werten mittels t-Tests erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel.

4 Ergebnisse

4.1 Vitamin D – humane Beckenkammbiopsien

Die zunächst bestimmten Strukturparameter der Beckenkammbiopsien zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen Vitamin D Spiegel ausgeglichen vs. defizient (D+, D-) in Bezug auf BV/TV ($19,8\% \pm 9,3\%$ vs. $17\% \pm 7,3\%$), Tb.N. ($1,04 \pm 0,3$ vs. $0,93 \pm 0,22$ 1/mm), Tb. Th. (184 ± 62 vs. 176 ± 72 μm) sowie Tb.Sp. (898 ± 538 vs. 957 ± 310 μm). Dies bestätigt Untersuchungen von Priemel et. al., bei denen bei Vitamin D Mangel unveränderte Strukturparameter, jedoch eine gehäufte Oberflächenosteoidose festgestellt wurden (13). Die Vermehrung von Osteoid bei Vitamin D Mangel konnte bei Betrachtung der histologischen Präparate bestätigt werden. Das Osteoidvolumen (OV/BV) war bei Vitamin D Defizienz auf $3,88 \pm 1,93$ % gegenüber von $1,23 \pm 0,75$ % bei suffizienten Vitamin D Spiegel erhöht, die von Osteoid bedeckte Knochenoberfläche (OS/BS) von $14,63 \pm 3,57$ % auf $35,92 \pm 20,57$ %.

Die histologische Auswertung der aufbereiteten Beckenkammbiopsien lieferte Ergebnisse jeweils für kortikalen und spongiösen Knochen bezüglich der Osteozytenparameter. Im kortikalen Knochen ergab sich für die Gruppe mit hohen Vitamin D Spiegel (D+) eine signifikant höhere Osteozytenzahl (N.Ot./B.Ar. D+ $102 \pm 37,3$ vs. D- $83,8 \pm 16,6$ N/mm²) und im Gegenzug geringere Zahl leerer Lakunen (N.Empty.Lc./B.Ar. D+ $41,7 \pm 17,1$ vs. D- $74,5 \pm 13,3$ N/mm²) pro Fläche als die Gruppe D-. Damit war auch der Anteil leerer Lakunen an den Gesamtlakunen (Fract.Empt.Lc.) signifikant geringer in den Proben mit ausgeglichenen Vitamin D Spiegel. Die Zahl der Gesamtlakunen (Osteozyten + leere Lakunen, Tt.Lc.N/B.Ar.) blieb unabhängig vom Vitamin D Spiegel unverändert (siehe Abbildung 15).

Im spongiösen Knochen zeigten sich hinsichtlich der Osteozytenzahl ebenfalls Unterschiede innerhalb des Signifikanzbereichs, bei der die Proben mit hohen Vitamin D Spiegel ebenfalls mehr Osteozyten und weniger leere Lakunen aufwiesen. Die Osteozytenzahl nahm bei Vitamin D Mangel von $113,5 \pm 24,9$ auf $96,9 \pm 30,9$ N/mm² ab, wohingegen die Anzahl leerer Lakunen von $26,7 \pm 13,9$ in D+ auf $49,6 \pm 20,1$ N/mm² in D- stieg. Diese Veränderung wurde bei wie bereits oben erwähnten erhöhten Osteoidparametern, jedoch unveränderten Strukturparametern quantifiziert.

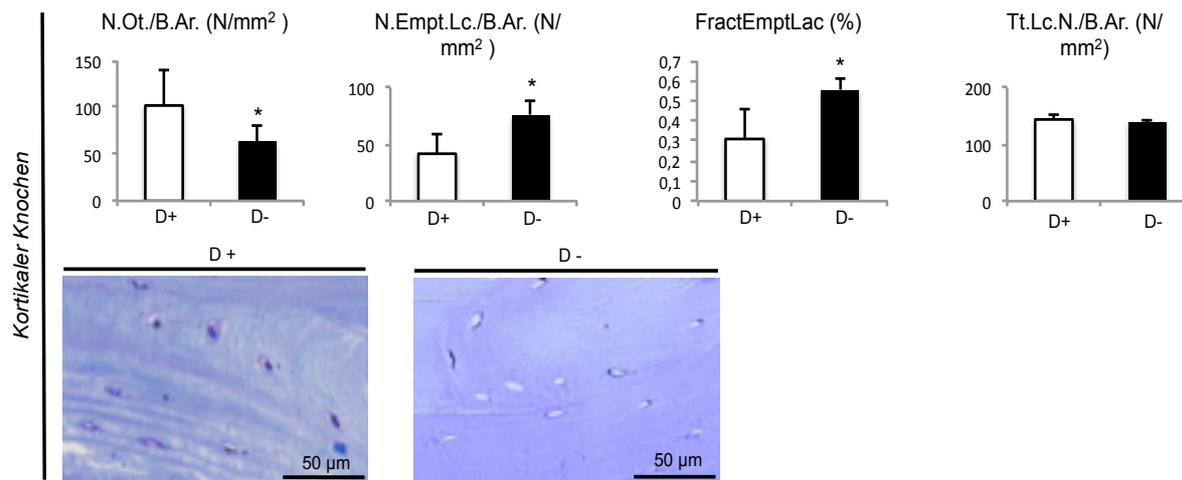


Abbildung 15: Kortikaler Beckenkammknochen. Die Osteozytenzahl pro Knochenfläche ist in der Gruppe mit ausgeglichenen Vitamin D Spiegel (D+) signifikant höher, die Anzahl leerer Lakunen geringer. Insgesamt bleibt die Gesamtlakunenzahl (Tt.Lc.N./B.Ar.) gleich, wohingegen der prozentuale Anteil leerer Lakunen (FractEmptLac) steigt. * $p < 0,05$. Histologie Toluidinblau links: Patient m, 64 J. Vit D >20 µg/l; rechts : m, 64 J. Vit D <20 µg/l. Deutlich mehr leere Osteozytenlakunen bei Vitamin D Mangel (D-).

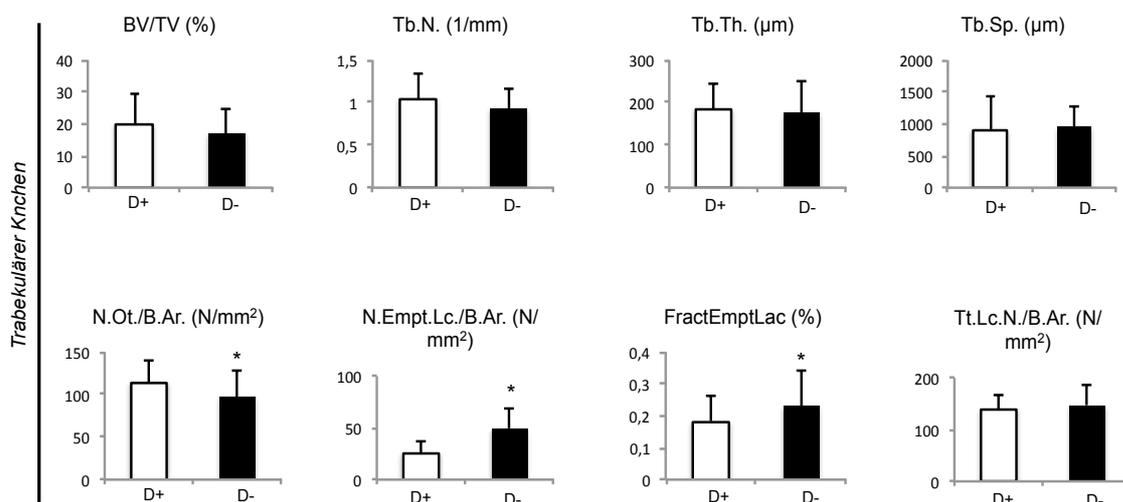


Abbildung 16: Die bestimmten Strukturparameter ändern sich bei Vitamin Defizienz nur insignifikant. Auch im spongiösen Knochen zeigt die Gruppe D+ mehr Osteozyten und im Gegenzug weniger leere Lakunen als D-; die Gesamtlakunenzahl bleibt gleich. Insgesamt scheint der Effekt jedoch schwächer ausgeprägt als im kortikalen Knochen.

Es konnte weiterhin ein Zusammenhang zwischen Vitamin D Mangel und einer abnehmenden Anzahl von Canaliculi pro Osteozytenlakune gefunden werden. Die Vernetzung der Osteozyten durch Canaliculi nahm bei Vitamin D Mangel in der Kortikalis signifikant ab, im trabekulären Knochen dagegen konnte nur eine nicht signifikante Tendenz gefunden werden (siehe Abbildung 17). Durch das Acid etching konnten die Vernetzungen zwischen den Osteozyten im Elektronenmikroskop genauer betrachtet werden. Zementlinien zwischen den Osteonen konnten in einigen Fällen tatsächlich von Canaliculi durchbrochen werden. Deutlich zu sehen war weiterhin, dass Osteozytenlakunen an der Knochenoberfläche eher rund sind, während sie in der Tiefe flacher werden, was deren Abstammung von Osteoblasten verdeutlicht. Die Ergebnisse der Quantifizierung der Canaliculi sind in Abbildung 17 zu sehen.

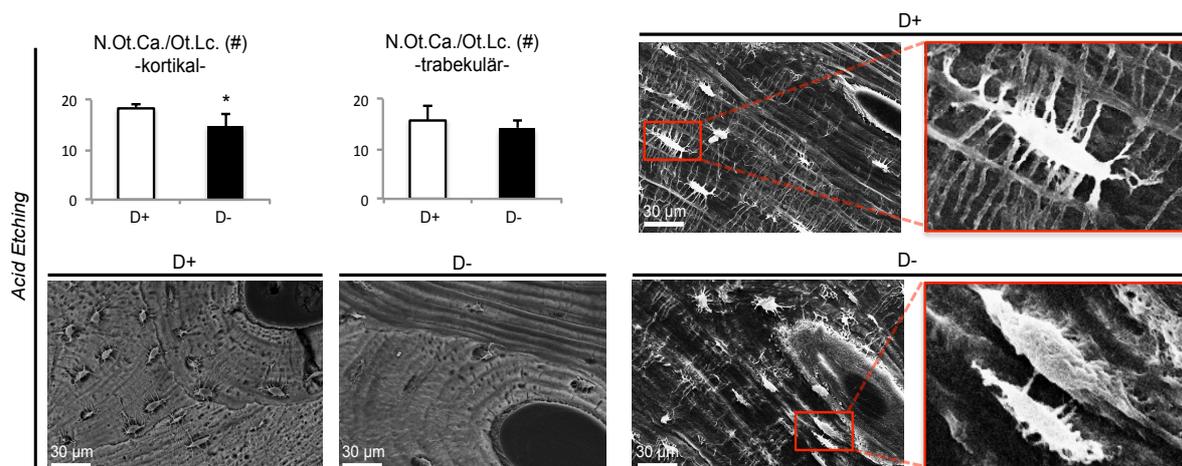


Abbildung 17: Die Balkendiagramme zeigen die Ergebnisse für die Quantifizierung der Canaliculi pro Lakune für kortikalen und spongiosen (trabekulären) Knochen (N.Ot.Ca./Ot.Lc.). Elektronenmikroskopische Bilder zeigen einzelne Osteone kortikalen Knochens mit den durch Acid Etching dargestellten Osteozytenlakunen und -canaliculi. So scheinen diese bei ausgeglichenem Vitamin D Spiegel deutlich besser vernetzt (N.Ot.Ca./Ot.Lc= 18,3 ± 0,7) als bei Vitamin D Defizienz (N.Ot.Ca./Ot.Lc=14,7 ± 2,6), welches durch die höhere Anzahl von Canaliculi ausgedrückt wird. *p<0,05

4.2 VDR- Mäuse

Angefertigte Kontaktradiographien der Mäuse zeigten den klassischen Phänotyp der Rachitis bei Vitamin D Defizienz unter ausgeschaltetem Vitamin D Rezeptor (VDR), wie Aufweichungen der Epiphysenfugen an den langen Röhrenknochen und den Rippen (Rachitischer Rosenkranz, siehe Abbildung 18 A). Die Osteoidose konnte in den Histologien der Wirbelkörper in von-Kossa Färbung mit bloßem Auge erkannt werden (Abb. 18 B). In der Histomorphometrie ergab sich eine insignifikante Abnahme des *bone volume per tissue volume* (BV/TV) und eine signifikante Abnahme der *trabecular number* (Tb.N) bei Vitamin D Defizienz, wohingegen die *trabecular separation* zunahm (Tb.Sp.). Die *trabecular thickness* (Tb.Th.) veränderte sich nicht, was auf die Vermehrung von Osteoid zurückzuführen ist (Abb. 18 C). Bei Vitamin D Defizienz zeigte sich insgesamt eine Anhäufung von Osteoid auf über 30 % des Knochenvolumens (OV/BV), sowie über 50 % der Knochenoberfläche (OS/BS, siehe Abbildung 19 C). Die Strukturparameter sowie Osteoidparameter glichen sich bei den VDR knock out Mäusen unter calciumreicher Diät aus.

Die histologisch ausgezählten Osteozytenlakunen in den Tibiae der Mäuse unter calciumarmer Diät ergaben eine signifikant höhere Osteozytenzahl, sowie Gesamtlakunenzahl für die Wildtypen im Vergleich zu den VDR defizienten Mäusen. Der Unterschied in der Gesamtlakunenzahl konnte durch die Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop bestätigt werden (Tt.Lc.N/B.Ar WT 564 ± 84 1/mm² vs. VDR_{reg} $454,2 \pm 30,2$ 1/mm²), glich sich unter calciumreicher Diät nicht vollständig aus (Tt.Lc.N/B.Ar. VDR_{res} $474,1 \pm 40,8$), sodass trotz calciumreicher Diät immer noch eine signifikant niedrigere Osteozytenlakunenzahl bestand, als bei den entsprechenden Wildtypen (siehe Abbildung 19 D). Es wurden insgesamt sehr wenig leere Lakunen beobachtet, ein Unterschied in der Anzahl leerer Lakunen konnte nicht ermittelt werden.

Weiterhin konnte bei der Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder über das in Abschnitt 3.6 beschriebene Verfahren (58) festgestellt werden, dass der Mineralisationsgrad der VDR defizienten Mäuse (CaMean%) insignifikant niedriger war und durch calciumreiche Ernährung komplett ausgeglichen werden konnte. Hypermineralisierte Lakunen als Ausdruck schlechter Knochenqualität, wie bei humanen Proben gefunden (27), scheinen bei Mäusen nicht zu existieren. Weiterhin

zeigte sich für die VDR-defizienten Mäuse in den Strukturparametern eine deutlich dünnere Kortikalis bei vermehrtem Osteoid (Abbildung 19).

Die Lakunengröße, die durch Vermessung der im REM generierten Bilder bestimmt wurde, war bei den Mäusen mit Vitamin D defizienten Rezeptoren signifikant höher als die der Wildtypen (WT $35 \pm 1,3 \mu\text{m}^2$ vs. VDR_{reg} $37,46 \pm 1 \mu\text{m}^2$) . Dieser Effekt hob sich allerdings unter calciumreicher Diät auf (VDR_{res} $33,1 \pm 2,7 \mu\text{m}^2$, siehe Abbildung 19).

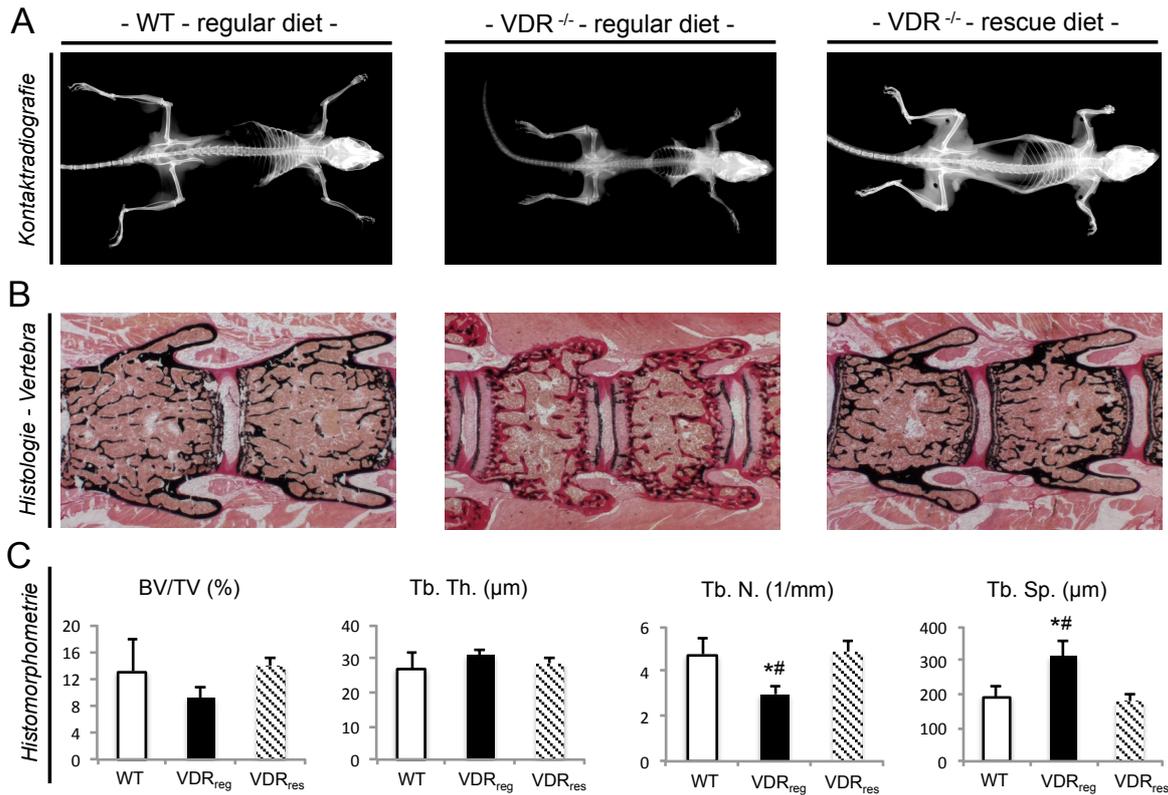


Abbildung 18: A: Kontaktradiographien der Mäuse zeigen den typischen Phänotyp der Rachitis (VDR^{-/-} regular diet) mit Aufweichung der Epiphysenfugen. B: Histologien der Wirbelkörper in von Kossa Färbung lassen die Vermehrung von Osteoid unter Vitamin D Defizienz feststellen, welche sich unter calciumreicher Diät (rescue diet) zurückbildet. C: Histomorphometrische Auswertung der Wirbelkörper. Bone volume per tissue volume (BV/TV) nimmt bei Vitamin D Defizienz insignifikant ab, die trabecular number (Tb.N) zeigt dagegen eine signifikante Abnahme, wohingegen die trabecular separation zunimmt (Tb.Sp.). Die trabecular thickness (Tb.Th.) veränderte sich nicht, was auf die Vermehrung von Osteoid zurückzuführen ist.

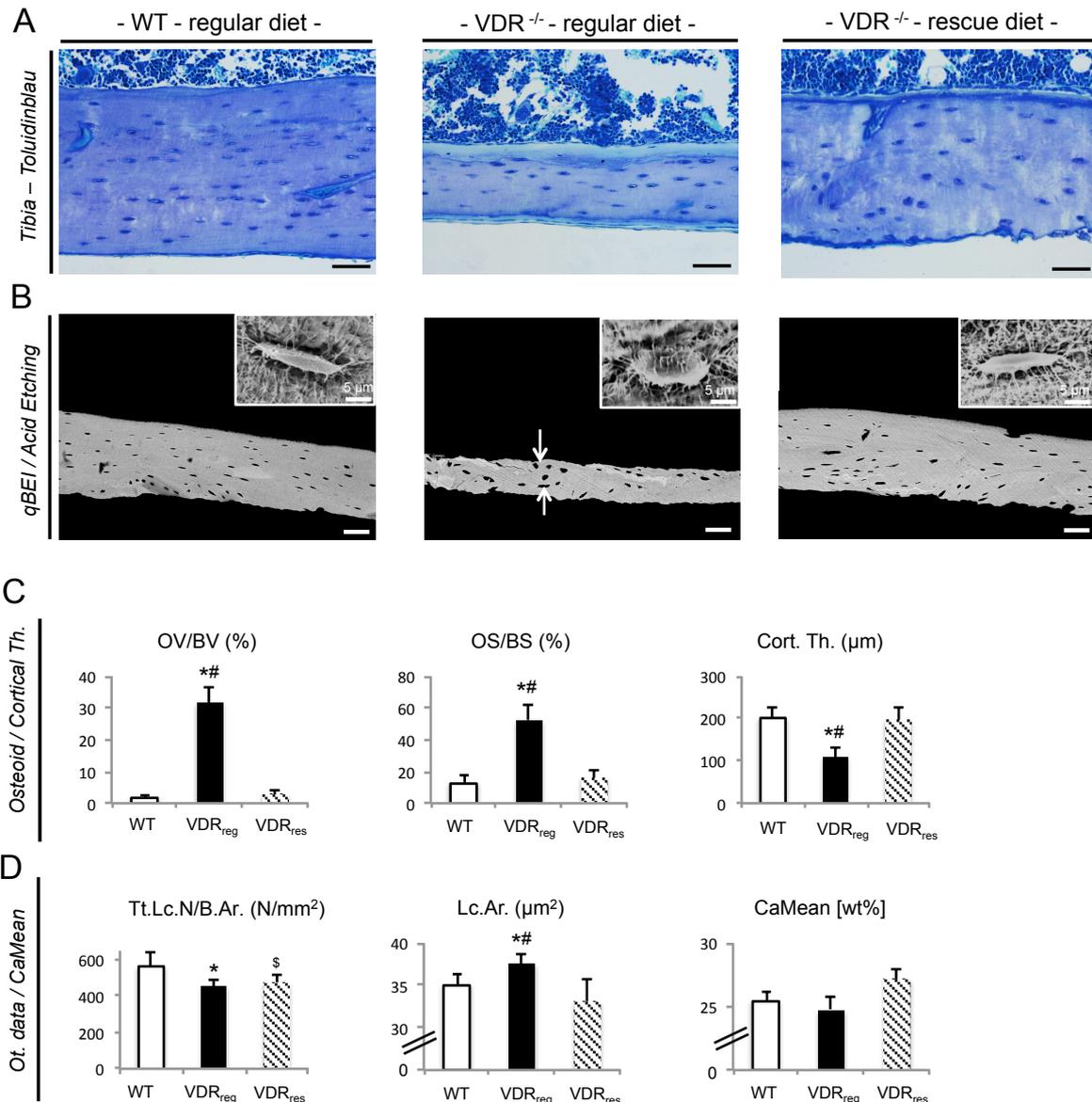


Abbildung 19: A: Toluidinblaufärbung der Tibiae der Mäuse. Hellblau stellt sich das nichtmineralisierte Osteoid dar. B: *QBEI* Aufnahmen mit jeweils durch Acid Etching dargestellte beispielhafte Osteozyten mit Canaliculi in der rechten oberen Ecke. Unter calciumarmer Diät zeigen die VDR defizienten Mäuse weniger (Tt.Lc.N), aber vergrößerte Lakunen (Lc.Ar); die Größe gleicht sich bei calciumreicher Diät aus, die Lakunenanzahl jedoch nicht. (Daten siehe Balkendiagramme C, D). Des Weiteren erhöhen sich die Osteoidparameter (OV/BV, OS/BS) signifikant bei VDR Defizienz, die Dicke des Kortikalen Knochens (Cort.Th.) nimmt hingegen ab. * $p < 0,05$ zwischen WT und VDR reg, # $p < 0,05$ zwischen VDR reg und VDR res., § $p < 0,05$ zwischen VDR res und WT.

4.3 Femur – Immobilisation

In geringen Vergrößerungen zeigten sich zwischen dem Kontrollkollektiv O (Osteoporose, nicht immobilisiert) und dem Kollektiv immobilisierter Fälle nur geringe strukturelle Unterschiede. Dies ist gut nachvollziehbar, da auch Immobilisation Osteoporose zur Folge hat und die Entnahmestellen die gleichen waren. Es wurden also die idiopathische mit der Immobilisationsosteoporose verglichen. Im Vergleich zum Kontrollkollektiv Y (jung, gesund, keine Osteoporose, nicht immobilisiert) war der kortikale Knochen in beiden Gruppen ausgedünnt und die angrenzende Spongiosa schwach ausgeprägt (normal für die langen Röhrenknochen). Die Quantifizierung der Cortical Porosity ergab eine Zunahme zwischen den 3 Gruppen von $5,2 \pm 1,9$ % in jungem Knochen auf $11,8 \pm 2,3$ % bei postmenopausaler Osteoporose und $17,2 \pm 5,1$ % bei Immobilisation (siehe Abbildung 20).

Die Bestimmung der Osteozytenparameter ergab im tiefen Knochen eine signifikant niedrigere Osteozytenzahl (N.Ot./B.Ar) im immobilisierten Kollektiv, bei dem der Unterschied besonders hoch in dorsolateralen Regionen war. Obwohl die absolute Zahl leerer Lakunen (N.Empt.Lc) im Gegenzug bei den immobilisierten Patientinnen nur insignifikant höher war, ergab sich im Anteil leerer Lakunen an Gesamtlakunen (Fract.Empt.Lc) eine signifikante Erhöhung. Auch die Gesamtlakunenzahl sank signifikant zwischen jungem, osteoporotischen und immobilisierten Knochen (siehe Tabelle 1).

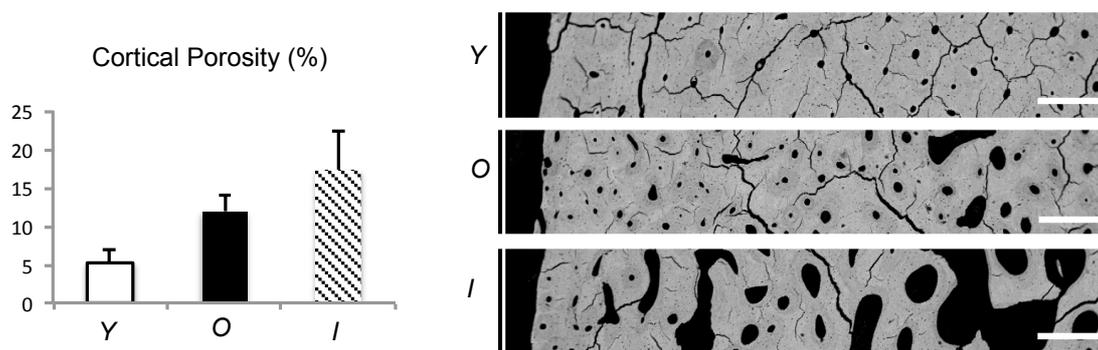


Abbildung 20: Zwischen jungen (Y), osteoporotischem (O) und immobilisiertem Kollektiv zeigt sich eine gesteigerte Cortical Porosity, welches in den elektronenmikroskopischen Bildern der Kortikalis zu erkennen ist.

	Alter	N.Ot./B.Ar	N.Empt.Lc./B.Ar	Fract.Empt.Lac	Tt.Lc.N/B.Ar
Jung	36,3 ± 4,8	179 ± 26	103 ± 30	0,36 ± 0,06	283 ± 44
Osteopor.					
<i>ventral</i>		121,1 ± 34,8	101,1 ± 23,5	0,46 ± 0,1	222,2 ± 41,5
<i>dorsal</i>		131,2 ± 30,8	90,3 ± 22,2	0,42 ± 0,1	216,6 ± 25,7
<i>lateral</i>		139,8 ± 33,6	93,8 ± 32,8	0,4 ± 0,12	233,7 ± 27,1
<i>medial</i>		118,3 ± 29,8	103,5 ± 36,8	0,46 ± 0,14	221,8 ± 29,4
Mittelwert	77 ± 8,4	126,4 # ± 30,9	97,2 ± 98,7	0,44 ± 0,12	223,6 # ± 30,8
Immobilisiert					
<i>ventral</i>		96,3 ± 21,3	116,3 ± 26	0,55 ± 0,1	212,6 ± 23,4
<i>dorsal</i>		96,9 ± 17,9 *	93,1 ± 18,3	0,49 ± 0,06	190 ± 25,6
<i>lateral</i>		93,4 ± 20,9 *	107,5 ± 22	0,53 ± 0,09 *	200 ± 26,6 *
<i>medial</i>		105,3 ± 26	112,2 ± 26	0,52 ± 0,1	217,6 ± 31,3
Mittelwert	85,6 ± 3,9	98 *\$ ± 21,1	107,8 ± 23,8	0,52 *\$ ± 0,09	205,8 *\$ ± 27,1

Tabelle 1: Ergebnisse für tiefen Knochen >45µm von der periostalen Knochenoberfläche. Werte ± Standardabweichung. Jung=Junges Vergleichskollektiv (n=7); Osteopor.=postmenopausale Osteoporose (n=11); Immobilisiert=immobilisiertes Patientenkollektiv (n=9). *p<0,05 für die jeweilige Region bzw. MW zwischen Osteoporose und Immobilisiert, #p<0,05 zwischen MW Osteoporose und jungem Vergleichskollektiv, \$p<0,05 zwischen MW Immobilisation und jungen Kontrollen.

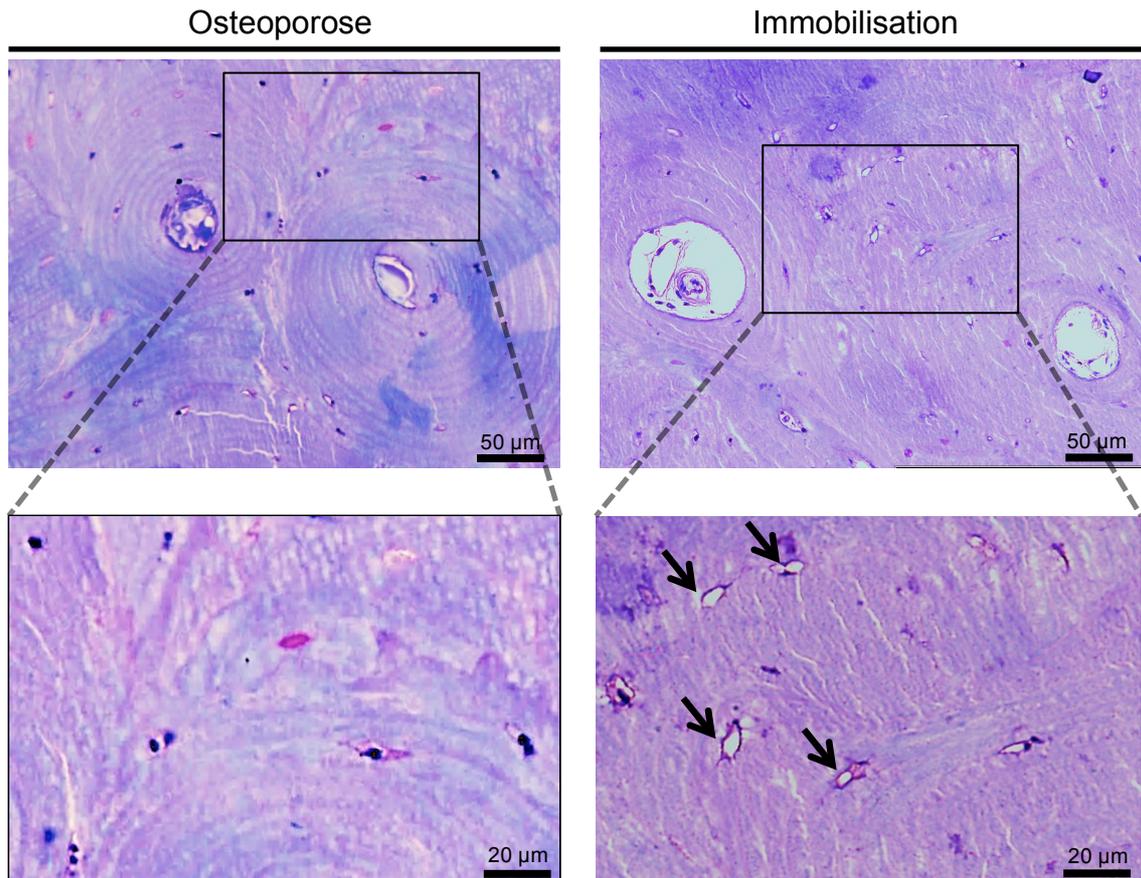


Abbildung 22: links: Kontrolle (postmenopausale Osteoporose, O), rechts: immobilisiert (Immobilisation, I). Der Anteil leerer Lakunen ist bei den immobilisierten Fällen höher (schwarze Pfeile). Toluidinblau, 40x.

Periostal sank in immobilisierten Knochen ebenfalls die Osteozytenzahl, während die Anzahl leerer Lakunen sowohl absolut als auch prozentual stieg. Auch die Gesamtlakunenzahl war bei den immobilisierten Fällen signifikant erniedrigt (siehe Tabelle 2). Die Veränderung in den Osteozytenparametern waren hier stärker ausgeprägt als in tieferen Knochenschichten: Die Osteozytenzahl war periostal 31,6 % geringer als bei postmenopausaler Osteoporose und der Anteil leerer Lakunen stieg um 41,6 % während in tieferen Knochenschichten die Abnahme der Osteozyten nur 22,4 % und die Steigerung leerer Lakunen 15,4 % betrug.

PERIOSTAL	N.Ot./B.Ar	N.Empt.Lc./B.Ar	Fract.Empt.Lac	Tt.Lc.N/B.Ar
Osteoporose				
<i>ventral</i>	258,8 ± 88,9	55,9 ± 57,1	0,19 ± 0,19	318,7 ± 71,9
<i>dorsal</i>	265,5 ± 51,9	70,6 ± 32,3	0,21 ± 0,09	336,1 ± 47
<i>lateral</i>	219,7 ± 93,1	80,3 ± 44,9	0,25 ± 0,09	300 ± 126,4
<i>medial</i>	257,5 ± 57,7	55,4 ± 18,9	0,18 ± 0,07	312,9 ± 50,9
Mittelwert	250,4 ± 54,2	66,5 ± 40,3	0,21 ± 0,12	316,9 ± 78,1
Immobilisiert				
<i>ventral</i>	157,9 ± 73,4 *	96,8 ± 33,9	0,4 ± 0,12 *	254,7 ± 82 *
<i>dorsal</i>	183,8 ± 56,5 *	79 ± 55,2	0,3 ± 0,15	262,8 ± 62,8
<i>lateral</i>	174,8 ± 70	87,1 ± 35,9	0,35 ± 0,17	262 ± 52,1
<i>medial</i>	170,7 ± 58,7 *	109,2 ± 44,1 *	0,39 ± 0,16 *	280 ± 47,8 *
Mittelwert	171,4 * ± 62,2	93,6 * ± 41,6	0,36 * ± 0,15	265 * ± 59,6

Tabelle 2: Periostaler Knochen (<30µm von der Knochenoberfläche). Die Osteozytendefizienz ist besonders ausgeprägt in periostalen Regionen der Femurschnitte. *p<0,05 zwischen Immobilisation und Osteoporose.

Im Folgenden wurden mit der Rasterelektronenmikroskopie (*qBEI*) die Anzahl der Gesamtlakunen (Tt.Lc.N), die Lakunengröße (Lc.Ar.) sowie der Mineralisationsgrad (CaMean) des Knochens bestimmt. Eine Abnahme der Gesamtlakunenzahl konnte bestätigt werden. Weiterhin sank die Lakunengröße, dies jedoch bei grenzwertig insignifikanten Werten ($p=0,064$). Die Bestimmung der Mineralisation im Rahmen der BMDD (bone mineral density distribution) Analyse über generierte Grauwerte der Aufnahmen zeigte auf, dass sich die Gesamtmineralisation bei postmenopausaler Osteoporose im Vergleich zu den jungen Patientinnen signifikant verringerte. Bei den immobilisierten Fällen war die Mineralisation wieder auf dem selben Level wie bei dem jungen Kollektiv (siehe Abbildung 24 F).

Außer der Immobilisations-assoziierten Abnahme der Osteozytenlakunen zeigte sich einer Zunahme hypermineralisierter Einschlüsse in den Lakunen zwischen jungen, osteoporotischen und immobilisierten Proben (siehe Abbildung 25).

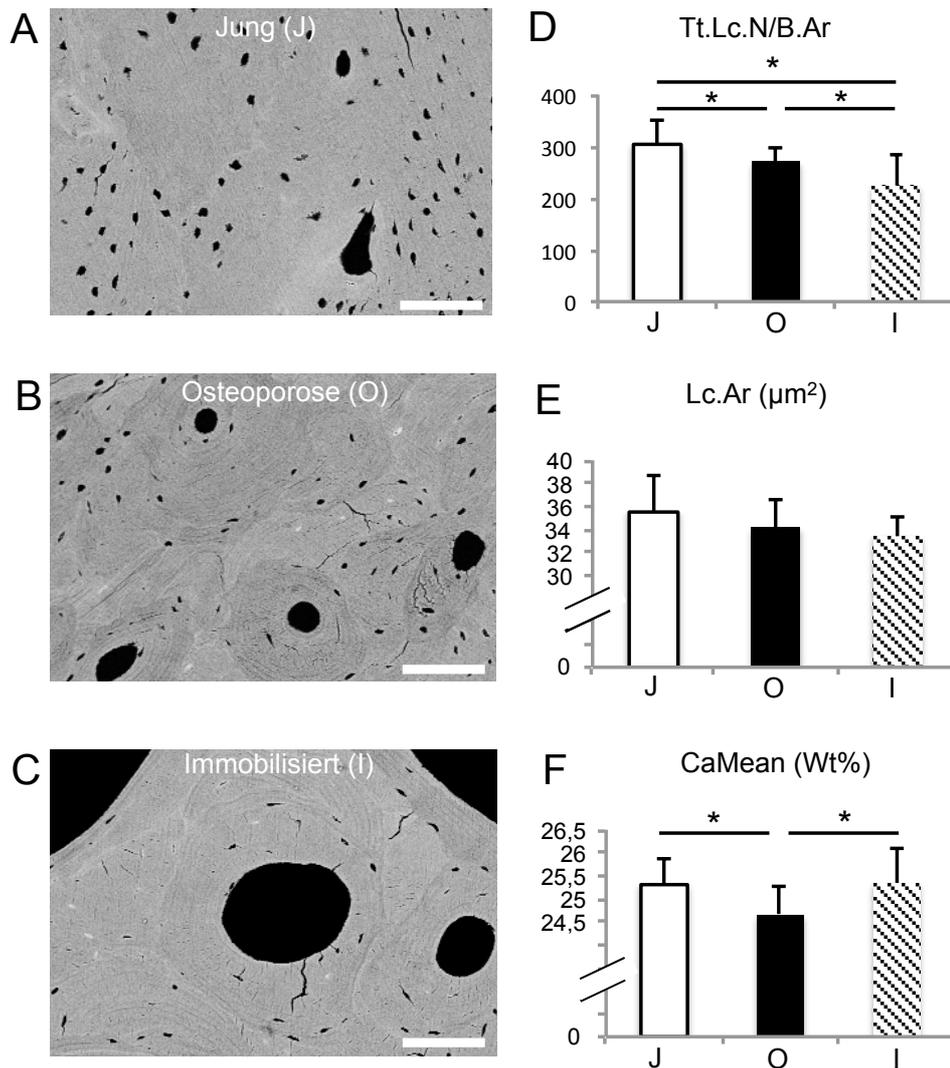


Abbildung 24: Die *qBEI* Bilder A-C auf der rechten Seite zeigen sowohl eine Verringerung der Gesamtlakunenzahl, als auch eine Verkleinerung der Lakunengröße (Balkendiagramm in D, E). Die Gesamtmineralisation (CaMean) war bei postmenopausaler Osteoporose geringer als bei dem jungen und immobilisierten Kollektiv (F), was sich durch die niedriger mineralisierten, dunkler erscheinenden Osteone bemerkbar macht. Maßstabskala 100 µm.

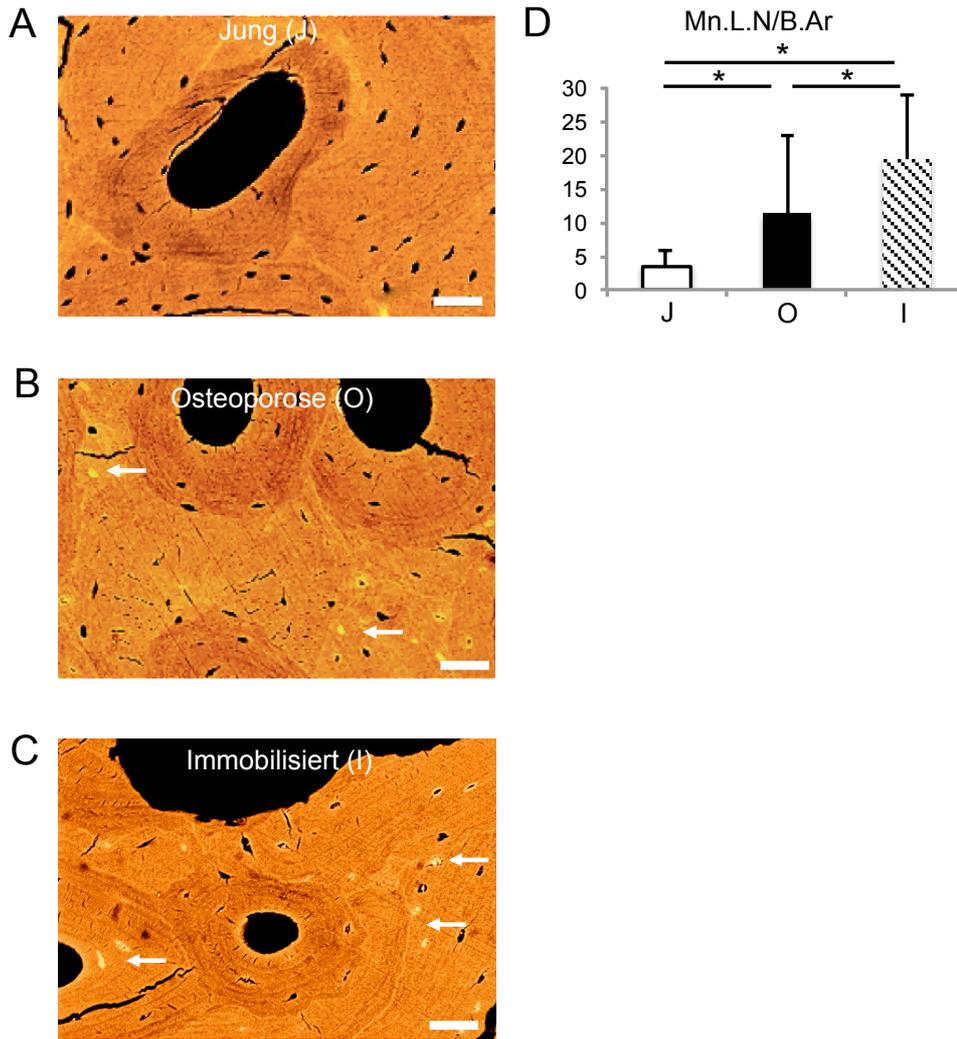


Abbildung 25: Hypermineralisierte Osteozytenlakunen (weiße Pfeile). A: Diese fanden sich nur äußerst selten bei jungen Patientinnen und nahmen in der Anzahl bei B: Osteoporose und C: Immobilisation signifikant zu (Balkendiagramm in D). * $p < 0,05$. Maßstabskala 100 μm .

5 Diskussion

Zum Thema Osteozytenzahl im Verhältnis zu leeren Lakunen sind wie in der Einleitung beschrieben bereits einige Ergebnisse publiziert. Mit steigendem Lebensalter steigt die Anzahl leerer Lakunen, während bei Osteoporose sowohl Osteozyten als auch leere Lakunen abnehmen. Sicher scheint, dass es sich in den Regionen, in denen viele leere Lakunen auffindbar sind, um „toten“ Knochen handelt, der möglichst abgebaut und schließlich erneuert werden soll. Lebende Osteozyten scheinen hingegen das Remodeling zu inhibieren (9). Auf diese Arbeit bezogen würde das heißen, dass in der Gruppe mit ausgeglichenem Vitamin D Spiegel, in der sich der Knochen in einer „gesunden“ Stoffwechsellage befindet, die zahlreichen lebenden Osteozyten das Signal geben, das Remodeling auf einem konstant - niedrigen Niveau zu halten. Im Kollektiv mit niedrigen Vitamin D Spiegel, bei dem schon von Priemel et al. (13) eine deutliche Osteoidzunahme festgestellt worden ist, scheinen vermehrt Osteozyten in Apoptose gegangen zu sein, ein Zeichen für einen schlechten Knochenzustand und eine daraus folgende Steigerung des Knochenabbaus.

Bei Vitamin D Mangel wurde ein weiteres Phänomen beobachtet: Vermehrung des Osteoidvolumens und vor allem der Osteoidoberfläche haben zur Folge, dass der sich darin befindende Knochen unerreichbar für Osteoklasten ist, schließlich können Osteoklasten nur mineralisierten Knochen abbauen. So „altert“ der Knochen schneller und hypermineralisiert, die Remodeling Rate nimmt ab. In Zusammenhang mit dem bereits vorhandenen Wissen über eine abnehmende Osteozytenzahl in alterndem Knochen, könnte das frühzeitige Altern des Knochens bei Vitamin D Mangel eine Erklärung für die verminderte Osteozytenzahl bieten.

Weiterhin besteht die Frage, ob Osteozyten eine Funktion im Mineralstoffwechsel haben, schließlich hat das lakunäre Osteozytensystem eine 400mal größere Oberfläche als das Havers/Volkmann System und eine 100mal größere Oberfläche als der trabekuläre Knochen (28), (61). Dieser mögliche Zusammenhang wird durch die hier ermittelten Ergebnisse unterstützt, bei denen die Proben mit ausgeglichenen Vitamin D Spiegel eine deutlich höhere Osteozytenzahl sowie weniger leere Osteozytenlakunen aufwiesen.

Auch an den untersuchten Mäusen zeigten die WT Mäuse eine höhere Osteozytenzahl als die $VDR^{-/-}$ Mäuse, leere Lakunen traten aufgrund der kurzen

Lebensdauer von 70 Tagen kaum auf. Bei calciumreicher Ernährung war dieser Effekt immernoch vorhanden, was für eine direkte Wirkung des Vitamin D auf die Osteozytenexpression bzw. den gesteigerten Übergang von Osteoblasten in Osteozyten spricht. Calcium wiederum wurde bereits mit Osteoblastenreifung und Exprimierung reifer Osteozytenmarker in Verbindung gebracht (40). Der Effekt von hypermineralisierten Osteozytenlakunen in Zusammenhang mit Vitamin D Mangel war bei den Mäusen in der Rasterelektronenmikroskopie nicht zu finden. Dies hängt höchstwahrscheinlich mit der viel kürzeren Lebensdauer der Mäuse zusammen. Es wurden hypermineralisierte Lakunen an Proben alternder Menschen in Verbindung mit einer abnehmenden Osteozytenzahl beschrieben. Nach neusten Erkenntnissen besteht der Effekt hypermineralisierter Lakunen tatsächlich auch bei jüngeren Menschen mit langjährigem Vitamin D Mangel in Verbindung mit einem stärker mineralisierten Knochen innerhalb des nichtmineralisierten Osteoids (39).

Bei den VDR defizienten Mäusen wurde allerdings über *qBEI* eine niedrigere Gesamtmineralisation der Tibia Knochen gemessen. Auch dieser Unterschied zwischen humanen- und Mausproben kann sich mit der kürzeren Lebensdauer begründen, bei der zu wenig Zeit vergangen ist, dass der sich innerhalb des Osteoids befindende Knochen brüchig wird und hypermineralisiert. Des Weiteren konnte die schlechtere Mineralisation der VDR-/- Mäuse durch die calciumreiche Diät ausgeglichen werden. Bereits festgestellt wurde, dass die VDR-Mäuse bereits nach 35 Tagen eine Osteomalazie entwickeln, sowie eine Desorganisation der Wachstumsfuge aufweisen. Weiterhin erzielten sie in biomechanischen Testungen deutlich schlechtere Werte. Diese Effekte wurden durch calciumreiche Diät jedoch ebenfalls ausgeglichen (15).

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Vernetzung der Osteozyten *via* Canaliculi gemessen. Dass Osteozytenlakunen bei Vitamin D Mangel tatsächlich weniger Canaliculi haben, wie bereits in alterndem Knochen gezeigt, kann damit zusammenhängen, dass in den vermehrt auftretenden leeren Lakunen eine verfrühte Mineralisation der Lakune eintritt, die in einigen Canaliculi beginnt. Jedoch kann im gealterten Knochen auch davon ausgegangen werden, dass die Potenz neue Zellfortsätze zu bilden abnimmt, wie dies zum Beispiel auch im gealterten Zentralen Nervensystem der Fall ist. Dieser Effekt könnte ebenfalls einen Einfluss auf die verminderte Konnektivität der Osteozytenlakunen untereinander haben. Knothe et. al beschrieben 2004 eine normale Viabilität, aber eine chaotisches Netzwerk von

Osteozyten und deren Canaliculi bei Osteomalazie (62). Dies können die Aufnahmen dieser Arbeit nicht bestätigen, bei denen gezeigt wurde, dass die Grundorganisation des Osteozytennetzwerkes bestehen bleibt. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass es sich bei den hier untersuchten Proben nicht durchweg um Osteomalazie Fälle handelte, sondern der Vitamin D Mangel als solcher vorrangiges Auswahlkriterium war.

Nun wurde darüberhinaus die Theorie der periosteozytären Osteolyse aufgegriffen, also einer Vergrößerung der Osteozytenlakunen unter pathologischen Zuständen. Dies konnten die Ergebnisse der VDR Mäuse bestätigen. Es besteht die Annahme, dass in einer speziellen körperlichen Situation, in der die Nachfrage an Calcium steigt, die Osteozytenlakunen größer werden, indem der Knochen um die Osteozyten herum demineralisiert bzw. resorbiert wird (37). In den VDR-defizienten Mäusen unter calciumarmer Ernährung waren die Osteozytenlakunen signifikant größer, das heißt hier kann davon ausgegangen werden, dass sich tatsächlich ein aktiver Prozess um die Osteozyten in den Lakunen abspielt. Bei Vitamin D Defizienz und calciumarmer Ernährung besteht im Organismus ein akuter Bedarf an Calcium, was mit Knochenabbau auch innerhalb der Osteozytenlakunen einhergeht. In einer ähnlichen Situation befinden sich auch laktierende Mäuse, in denen dieser Effekt ebenfalls dargestellt werden konnte (38). Dies heißt jedoch nicht, dass Osteozyten auch in normalen Stoffwechsellagen die Aufgabe von den hochspezialisierten Osteoklasten übernehmen können. Weiterhin muss davon ausgegangen werden, dass Osteozyten vorrangig als Sensor dienen, die im Falle von Minderbelastung oder auch gestörtem Calciummetabolismus Signale an Osteoklasten senden können.

Marotti postulierte in elektronenmikroskopischen Studien, dass die Größe der Osteozytenlakunen nur abhängig von der Osteoblastengröße ist, aus der die entsprechenden Osteozyten abstammen (63). Geht ein Osteoblast in ein Osteozyt über, ist die Zelle zunächst noch größer und rund und wird mit der Knochenmineralisation zum typischen elliptischen Osteozyten. Es stellt sich die Frage, ob bei einer VDR Defizienz die Lakunen größer angelegt werden oder die zunächst normal großen Osteozytenlakunen als Folge des Calciummangels wieder größer werden. Eine Vergrößerung von Osteozytenlakunen bei Vitamin D Mangel in humanen Proben wurde auch schon in der Arbeit von Busse et al. gefunden, allerdings wurden die Proben im μ -CT gemessen (3D) und nicht mit histologischen Methoden ausgewertet (39). In den humanen Proben wurde auffällig, dass leere

Lakunen deutlich kleiner erscheinen als Lakunen mit sich darin befindendem Zellkern. Dies kann mit einem Auffüllprozess in den Lakunen apoptotischer Osteozyten zusammenhängen, bei dem Osteozytenlakunen avitaler Osteozyten nach und nach wieder mit Mineral aufgefüllt werden, sofern das entsprechende Areal noch nicht resorbiert wurde. Ein entsprechender Auffüllprozess hätte zur Folge, dass sich die durchschnittliche Lakunengröße verringern würde. Genauere Quantifizierungen in der Lakunengröße zwischen vitalen und avitalen Osteozyten wären hierfür nötig.

Es muss bei der Osteozytenquantifizierung allgemein die Fehlerquelle der 2-dimensionalen Betrachtung des Knochens in Betracht gezogen werden. Wurde eine Osteozytenlakune beim Schneiden der in Acrylat Blöcken gegossenen Knochen peripher angeschnitten, erscheint sie leer, da der Zellkern nicht den kompletten Lakunenraum ausfüllt. Somit verringert sich auch die gemessene Fläche der leer erscheinenden Lakune. Das Problem wurde versucht zu minimieren, indem beim Mikroskopieren mit hin und herdrehen der Fokussierungsschraube genau überprüft wurde, ob sich ein Zellkern innerhalb der Lakune befindet. Bei einer Schnittdicke von 5µm kann davon ausgegangen werden, dass zumindest ein Großteil der Osteozytenlakune angeschnitten wurde. Weiterhin treffen die beschriebenen Effekte gleichermaßen für beide Gruppen zu. Es wurden bereits unterschiedliche Osteozytenmorphologien in den verschiedenen Teilen des Skeletts aufgezeigt, bei denen das Längen-Breiten Verhältnis stark schwankt (64). Da Osteozyten deutlich länger als breit sind, beeinflusst dessen Ausrichtung im Knochen die Messungen für die Osteozytengröße in zweidimensionalen Methoden.

Unbekannte Calciumspiegel der Proben lassen offen, ob es sich bei den Unterschieden in den Osteozytenparametern um einen direkten Effekt des Vitamin D's oder einen indirekten Effekt über die vermehrte bzw. verminderte Calciumaufnahme handelt.

Im Falle des 2. Teils dieser Arbeit wurde versucht eine Aussage darüber zu machen, ob Osteozyten im Falle von Immobilisation vermehrt in Apoptose gehen, wie bei Mäusen und Ratten gefunden (47). Als Vergleichskollektiv dienten Biopsien gleichaltriger Frauen mit Osteoporose, sowie ein Kollektiv junger, gesunder Frauen. Bei Osteoporose wurde bereits eine Abnahme von sowohl Osteozyten als auch leeren Lakunen, also eine Abnahme der Gesamtlakunenzahl, im Vergleich zu

gesunden Knochen beobachtet, was hier bestätigt werden konnte (30). Da Osteozytenapoptose durch Immobilisation gefördert wird, besteht hier im Gegensatz dazu eine Zunahme leerer Lakunen, während die Zahl von Osteozyten und Gesamtlakunen ebenfalls abnimmt. Schlusszufolgern wäre, dass der Unterschied darin besteht, dass bei Osteoporose sowohl Osteozyten als auch leere Lakunen durch einen unbekanntem Mechanismus wie z.B. die verminderte Anlage von Osteozyten im Rahmen der Knochenbildung abnehmen, während bei Immobilisation eine gesteigerte Osteozytenapoptose dazu führt, dass vermehrt auftretende leere Lakunen gefunden wurden. Diese Arbeit konnte bestätigen, dass die Zahl leerer Lakunen als Äquivalent für gesteigerte Apoptose bei Immobilisation zunimmt, während die Osteozytenzahl abnimmt. Allerdings zeigten die immobilisierten Fälle auch eine geringere Gesamtlakunenzahl als die Osteoporose Fälle, was sowohl in der histologischen als auch elektronenmikroskopischen Messung bestätigt wurde. Die Abnahme der Gesamtlakunenzahl ist eventuell auch auf das minimal höhere durchschnittliche Lebensalter des immobilisierten Kollektivs zurückzuführen (77 J. vs 85,6 J.). Weiterhin zeigte sich zwischen jungen Fällen, Osteoporose und Immobilisation eine Verkleinerung der Osteozytenlakunen, allerdings waren diese Ergebnisse insignifikant ($p=0,063$ zwischen Immobilisation und jungen Fällen). Für eine Bestätigung dieser Aussage müssten weitere Tests der Lakunengröße vorgenommen bzw. der Stichprobenumfang erweitert werden.

Ein noch differenzierteres Ergebnis von Osteozytenparametern durch weitere Gewinnung neuer immobilisierter Fälle ist in der Praxis allerdings nicht einfach, da die Verstorbenen sowohl die Kriterien langfristiger Immobilisation als auch die Zustimmung der Angehörigen erfüllen müssen. Insgesamt weisen die hier untersuchten Proben eine sehr hohe Zahl leerer Lakunen (%) auf. Vergleicht man den in dieser Arbeit bestimmten prozentualen Anteil leerer Lakunen von ca. 40% mit anderen Arbeiten (29, 36), fällt auf, dass hier von einem geringeren Prozentsatz leeren Lakunen gesprochen wird. Hierzu ist zu sagen, dass es sich in diesen Arbeiten um Knochenmaterial lebender Patienten handelte, während es sich bei den Beckenkammbiopsien sowie den Femurbiopsien um Verstorbene handelte, bei denen die Proben in einem Zeitraum von wenigen Tagen post mortem entnommen wurden. Es ist nicht klar, in wieweit Autolyseprozesse nach dem Tode dazu führen, dass vergleichsweise viele Osteozytenlakunen als leer erscheinen. Um noch bessere Aussagen über die Viabilität bzw. Apoptose von Osteozyten machen zu können, sind

immunhistochemische Verfahren wie z.B. Caspase 3 Assays (65) oder eine Anfärbung von Canaluculi mit basischem Fuchsin (33) hilfreich. In der Rasterelektronenmikroskopie konnte allerdings eine Erhöhung der Anzahl hypermineralisierter Lakunen zwischen jungen, osteoporotischen und immobilisierten Proben gefunden werden, was analog zu vorherigen Arbeiten als Zeichen der Apoptose mit begleitender Hypermineralisierung zu sehen ist (27, 50). Calciumphosphat Einschlüsse haben letztendlich einen negativen Einfluss auf die Knochenreparatur.

Ein etwaiger Zusammenhang zwischen den in dieser Arbeit untersuchten Parametern Vitamin D und Immobilisation ergibt sich aus der Überlegung, dass bei Immobilisation häufig eine Hypercalcämie vorliegt, was wiederum die Vitamin D Synthese hemmt, die PTH Ausschüttung senkt und die Calcitoninbildung steigert. Außerdem ist davon auszugehen, dass sich im Kollektiv bettlägeriger Fälle, auch durch Mangel an Sonnenlicht sowie Mangelernährung ein Vitamin D Mangel einstellt. Folglich ist Osteozytendefizienz durch Immobilisation und Vitamin D Mangel zu erklären, was gleichermaßen ein Signal für Knochenresorption darstellt.

6 Zusammenfassung

Haupterkennnis dieser Arbeit ist die Bestätigung bzw. Ausweitung der Ergebnisse bezüglich der Effekte von Vitamin D Mangel auf den Knochenstoffwechsel. Der von Osteoid „eingepackte“ Knochen altert schneller, was mit einer verstärkten Osteozytenapoptose einhergeht. Des Weiteren nimmt die Vernetzung der Osteozyten über Canaliculi unter Vitamin D Mangel ab.

Analysierte Mausknöchel zeigten bei defektem Vitamin D Rezeptor unter calciumarmer Diät neben einer ebenfalls verminderten Osteozytenzahl vergrößerte Osteozytenlakunen, was für die kontroverse Hypothese der periosteozytären Osteolyse spricht. Unklar bleibt jedoch, ob es sich bei der Vergrößerung der Osteozytenlakunen bei Vitamin D Defizienz um einen aktiven Prozess im Sinne von Mineralabbau in der Osteozytenkune handelt oder ob die Lakunen primär größer angelegt werden. Calciumreiche Ernährung glich die Unterschiede in der Osteozytengröße, jedoch nicht in der Osteozytenzahl aus.

Im Falle von Immobilisation sind bereits einige Arbeiten veröffentlicht, die sich jedoch hauptsächlich auf Tiermodelle konzentrieren. Nachvollziehbar scheint, dass Immobilisation eine gestörte Mechanotransduktion im lacunocanaliculären System zu Folge hat. In den hier untersuchten humanen Proben, die immobilisierte Fälle mit osteoporotischem sowie jungem gesunden Knochen verglichen, konnte festgestellt werden, dass sich bei Immobilisation a) die Osteozytenzahl verringert während b) die Anzahl leerer Lakunen zunimmt und c) dieser Effekt vornehmlich in periostalen Regionen des kortikalen Knochens stattfindet. Weiterhin konnten neben der Abnahme von Osteozytenlakunen vermehrt auftretende hypermineralisierten Osteozytenlakunen bei Immobilisation beobachtet werden. Biomechanische und materialanalytische Versuche in einem größeren Untersuchungskollektiv sind notwendig, um die Veränderungen des Knochens bei Immobilisation noch genauer zu verstehen.

Abschließend ist es hochwahrscheinlich, dass Osteozyten unter anderem durch Sekretion spezifischer Marker wie Sclerostin oder FGF-23 in den Knochenstoffwechsel eingreifen und dass die Osteozytendistribution sowohl durch Vitamin D Mangel als auch durch Immobilisation gestört ist. Dieser Zusammenhang wird in Zukunft ein zentraler Forschungsschwerpunkt auch in Bezug auf die Diagnose und Behandlung von Knochenerkrankungen sein.

7 Abkürzungsverzeichnis

BV/TV	Bone Volume/ Tissue Volume (%)
CaMean	Mittlerer Calciumgehalt (<i>qBEI</i> , wt%)
Cort.Th.	Cortical Thickness (μm)
D+/ D-	jeweilige Gruppe 25(OH)D ₃ >20 bzw. <4 ng/ml
FGF-23	Fibroblast growth factor 23
Fract.Empt.Lac	Anteil leerer Lakunen an Gesamtlakunen (%)
Lc.Ar.	mittlere Lakunenfläche (μm^2)
N.EmptyLc/B.Ar	Leere Lakunen pro Knochenvolumen (N/mm^2)
N.Ot.Ca/Ot.Lc	Anzahl Canaliculi pro Osteozytenlakune (#)
N.Ot/B.Ar.	Osteozytenzahl pro Knochenfläche (N/mm^2)
OS/BS	OsteoidSurface/BoneSurface (%)
OV/BV	OsteoidVolume/BoneVolume (%)
qBEI	quantitative backscattered electron imaging
REM	Rasterelektronenmikroskopie
Tt.Lc.N/B.Ar	Gesamtlakunen pro Knochenvolumen (N/mm^2)
VDR	Vitamin D Rezeptor
VDR _{reg}	VDR Defizienz unter calciumarmer (regular) Diät
VDR _{res}	VDR Defizienz unter calciumreicher (rescue) Diät
WT	Wildtyp
μm	Mikrometer

8 Anhang

Färbeprotokolle

1. Toluidinblaufärbung der histologischen Schnitte

Stoffgemisch	Expositionsdauer
(2-Methoxyethyl)-acetat I-III	je 5 min
Ethanol 100%	2 min
Ethanol 100%	2 min
Ethanol 96%	2 min
Ethanol 80%	2 min
Ethanol 70%	2 min
Ethanol 50%	2 min
Aqua destillata	spülen
Toluidinblau-Lösung	30 min
Aqua destillata	kurz spülen
Ethanol 50%	spülen
Ethanol 70%	spülen
Ethanol 80%	spülen
Ethanol 96%	spülen
Ethanol 100%	5 min
Ethanol 100%	spülen
Xylol I-III	je 5 min
Eindecken mit DPX Mountant for Histology (Fa. Sigma)	

Färbeergebnis:

dunkelblau: Zellkerne

blau: Osteoblasten

türkisblau: Osteoklasten

hellblau: mineralisierter Knochen (mit dunkleren Kitlinien)

violett: Knorpel

Zusammensetzung der Toluidinblau-Lösung:

1g Toluidinblau O, 100ml Aqua destillata, mit 0,1% NaOH oder 0,1% HCL vor jeder Färbung auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt

2. Masson-Goldner-Trichomfärbung

Stoffgemisch	Expositionsdauer
(2-Methoxyethyl)-acetat I-III	je 5 min
Ethanol 100%	2 min
Ethanol 100%	2 min
Ethanol 96%	2 min
Ethanol 80%	2 min
Ethanol 70%	2 min
Ethanol 50%	2 min
Aqua destillata	spülen
Eisenhämatoxylin	15 min
Leitungswasser	10 min fließend wässern
Ponceau de Xylidine-Lösung	35 min
1%ige Essigsäure	5 s
Aqua destillata	5 s
Phosphorwolfram-Orange G-Lösung	7 min
1%ige Essigsäure	5 s
Aqua destillata	5 s
Lichtgrün-Lösung	15 min
1%ige Essigsäure	5 s
Aqua destillata	5 s
Ethanol 80%	kurz spülen
Ethanol 96%	kurz spülen
Ethanol 100%	kurz spülen
Ethanol 100%	2 min
Xylol I-III	je 5 min
Eindecken mit DPX Mountant for Histology (Fa. Sigma)	

Färbeergebnis:

bräunlich-schwarz: Zellkerne

ziegelrot: Zytoplasma

orange-gelb: Erythrozyten

grün: Bindegewebe und saure Mukosubstanzen

Zusammensetzung der Ponceau de Xylidine-Lösung:

2,5g Ponceau de Xylidine,

1,25g Säurefuchsin,

0,5ml Eisessig,

150ml Aqua destillata

Zusammensetzung der Phosphorwolfram-Orange G-Lösung:

2,5g Phosphorwolfram,

1,25g Orange G,

150ml Aqua destillata

Zusammensetzung der Lichtgrün-Lösung:

0,5g Lichtgrün,

0,5ml Eisessig,

250ml Aqua destillata

3. von Kossa-van Giesonfärbung

Stoffgemisch	Expositionsdauer
(2-Methoxyethyl)-acetat I-III	je 5 min
Ethanol 100%	2 min
Ethanol 100%	2 min
Ethanol 96%	2 min
Ethanol 80%	2 min
Ethanol 70%	2 min
Ethanol 50%	2 min

Aqua destillata	spülen
Silbernitrat-Lösung	5 min
Aqua destillata	10 min
Sodaformol-Lösung	5 min
Leitungswasser	10 min fließend wässern
Natriumthiosulfat-Lösung	5 min
Leitungswasser	10 min fließend wässern
van Gieson-Gemisch	20 min
Leitungswasser	kurz spülen
Ethanol 80%	kurz spülen
Ethanol 96%	kurz spülen
Ethanol 100%	kurz spülen
Ethanol 100%	kurz spülen
Xylol I-III	je 5 min
Eindecken mit DPX Mountant for Histology (Fa. Sigma)	

Färbeergebnis:

schwarz: mineralisierter Knochen

rot: Kollagen und Bindegewebe

gelb: Muskulatur und Erythrozyten

Zusammensetzung der Silbernitrat-Lösung:

3g Silbernitrat,

100ml Aqua destillata

Zusammensetzung der Sodaformol-Lösung:

12,5g Natriumcarbonat,

187ml Aqua destillata,

62,5ml 37%iges Formalin

Zusammensetzung der Natriumthiosulfat-Lösung:

5g Natriumthiosulfat,

100ml Aqua destillata

Zusammensetzung des van Gieson-Gemisches:

2,5g Säurefuchsin,

900ml gesättigte Pikrinsäure,

100ml Glycerin,

5ml konzentrierte Salpetersäure

9 Literaturverzeichnis

1. Portigliatti Barbos M, Bianco P, Ascenzi A, Boyde A. Collagen orientation in compact bone: II. Distribution of lamellae in the whole of the human femoral shaft with reference to its mechanical properties. *Metabolic bone disease & related research*. 1984;5(6):309-15.
2. Skedros JG, Mendenhall SD, Kiser CJ, Winet H. Interpreting cortical bone adaptation and load history by quantifying osteon morphotypes in circularly polarized light images. *Bone*. 2009 Mar;44(3):392-403.
3. Bromage TG, Goldman HM, McFarlin SC, Warshaw J, Boyde A, Riggs CM. Circularly polarized light standards for investigations of collagen fiber orientation in bone. *Anatomical record Part B, New anatomist*. 2003 Sep;274(1):157-68.
4. Palumbo C, Palazzini S, Marotti G. Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation. *Bone*. 1990;11(6):401-6.
5. Banks WJ. The ossification process of the developing antler in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Calcified tissue research*. 1974 May 28;14(4):257-74.
6. Parfitt AM. Bone-forming cells in Clinical Conditions. In: BK H, ed. *Bone. The Osteoblast and Osteocyte*, vol. 1. Boca Raton, FL: Telford Press and CRC Press. 1990:351–429.
7. Palumbo C. A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos. *Cell and tissue research*. 1986;246(1):125-31.
8. Seeman E. Osteocytes--martyrs for integrity of bone strength. *Osteoporos Int*. 2006 Oct;17(10):1443-8.

9. Parfitt AM. Life history of osteocytes: relationship to bone age, bone remodeling, and bone fragility. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2002 Dec;2(6):499-500.
10. Szulc P, Seeman E, Duboeuf F, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Bone fragility: failure of periosteal apposition to compensate for increased endocortical resorption in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2006 Dec;21(12):1856-63.
11. Milovanovic P, Adamu U, Simon MJ, Rolvien T, Djuric M, Amling M, Busse B. Age- and Sex-Specific Bone Structure Patterns Portend Bone Fragility in Radii and Tibiae in Relation to Osteodensitometry: A High-Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography Study in 385 Individuals. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2015 May 1.
12. Amling M, Takeda S, Karsenty G. A neuro (endo)crine regulation of bone remodeling. *BioEssays* 2211. 2000 Nov;22(11):970-5.
13. Priemel M, von Demarus C, Klatt TO, Kessler S, Schlie J, Meier S, Proksch N, Pastor F, Netter C, Streichert T, Puschel K, Amling M. Bone mineralization defects and vitamin D deficiency: histomorphometric analysis of iliac crest bone biopsies and circulating 25-hydroxyvitamin D in 675 patients. *J Bone Miner Res*. 2010 Feb;25(2):305-12.
14. Owen TA, Aronow MS, Barone LM, Bettencourt B, Stein GS, Lian JB. Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype: dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures. *Endocrinology*. 1991 Mar;128(3):1496-504.
15. Amling M, Priemel M, Holzmann T, Chapin K, Rueger JM, Baron R, Demay MB. 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*. 1999 Nov;140(11):4982-7.

16. Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA, Dallal GE. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *The New England journal of medicine*. 1997 Sep 4;337(10):670-6.
17. Norman AW, Bouillon R, Whiting SJ, Vieth R, Lips P. 13th Workshop consensus for vitamin D nutritional guidelines. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2007 Mar;103(3-5):204-5.
18. von Demarus C, Amling M. The economic importance of vitamin D food fortification: a health economic Markov analysis considering hip joint fractures. *Osteologie*. 2009;18:112-124.
19. Ng AH, Frick KK, Krieger NS, Asplin JR, Cohen-McFarlane M, Culbertson CD, Kyker-Snowman K, Grynpas MD, Bushinsky DA. 1,25(OH)(2)D(3) induces a mineralization defect and loss of bone mineral density in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Calcified tissue international*. 2014 May;94(5):531-43.
20. Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y. Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Molecular endocrinology*. 2003 Dec;17(12):2393-403.
21. Lanske B, Densmore MJ, Erben RG. Vitamin D endocrine system and osteocytes. *BoneKEy reports*. 2014;3:494.
22. Seeman E. Structural basis of growth-related gain and age-related loss of bone strength. *Rheumatology*. 2008 Jul;47 Suppl 4:iv2-8.
23. Seeman E. Periosteal bone formation--a neglected determinant of bone strength. *The New England journal of medicine*. 2003 Jul 24;349(4):320-3.
24. Rossini M, Gatti D, Adami S. Involvement of WNT/beta-catenin Signaling in the Treatment of Osteoporosis. *Calcified tissue international*. 2013 Jun 11.

25. Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, Lacza C, Wuyts W, Van Den Ende J, Willems P, Paes-Alves AF, Hill S, Bueno M, Ramos FJ, Tacconi P, Dikkers FG, Stratakis C, Lindpaintner K, Vickery B, Foerzler D, Van Hul W. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Human molecular genetics*. 2001 Mar 1;10(5):537-43.
26. Seeman E, Delmas PD. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *The New England journal of medicine*. 2006 May 25;354(21):2250-61.
27. Busse B, Djonic D, Milovanovic P, Hahn M, Puschel K, Ritchie RO, Djuric M, Amling M. Decrease in the osteocyte lacunar density accompanied by hypermineralized lacunar occlusion reveals failure and delay of remodeling in aged human bone. *Aging cell*. 2010 Dec;9(6):1065-75.
28. Mullender MG, van der Meer DD, Huiskes R, Lips P. Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. *Bone*. 1996 Feb;18(2):109-13.
29. Mullender MG, Tan SD, Vico L, Alexandre C, Klein-Nulend J. Differences in osteocyte density and bone histomorphometry between men and women and between healthy and osteoporotic subjects. *Calcified tissue international*. 2005 Nov;77(5):291-6.
30. Qiu S RD, Palnitkar S, Parfitt AM. Reduced iliac cancellous osteocyte density in patients with osteoporotic vertebral fracture. *J Bone Miner Res*. 2003; Sep;18(9):1657-63.
31. Yajima A, Inaba M, Tominaga Y, Nishizawa Y, Ikeda K, Ito A. Increased osteocyte death and mineralization inside bone after parathyroidectomy in patients with secondary hyperparathyroidism. *J Bone Miner Res*. 2010 Nov;25(11):2374-81.

32. O'Brien C, Plotkin L, Galli C, Goellner J, Gortazar A, et al. Control of Bone Mass and Remodeling by PTH Receptor Signaling in Osteocytes. *Plos One*. 2008;3(8):e2942.
33. Qiu S, Rao DS, Fyhrie DP, Palnitkar S, Parfitt AM. The morphological association between microcracks and osteocyte lacunae in human cortical bone. *Bone*. 2005 Jul;37(1):10-5.
34. Solomon L. Bone density in ageing Caucasian and African populations. *Lancet*. 1979 Dec 22-29;2(8156-8157):1326-30.
35. Nelson DA, Barondess DA, Hendrix SL, Beck TJ. Cross-sectional geometry, bone strength, and bone mass in the proximal femur in black and white postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2000 Oct;15(10):1992-7.
36. Qiu S, Rao DS, Palnitkar S, Parfitt AM. Differences in osteocyte and lacunar density between Black and White American women. *Bone*. 2006 Jan;38(1):130-5.
37. Teti A, Zallone A. Do osteocytes contribute to bone mineral homeostasis? Osteocytic osteolysis revisited. *Bone*. 2009 Jan;44(1):11-6.
38. Qing H, Ardeshirpour L, Pajevic PD, Dusevich V, Jahn K, Kato S, Wysolmerski J, Bonewald LF. Demonstration of osteocytic perilacunar/canalicular remodeling in mice during lactation. *J Bone Miner Res*. 2012 May;27(5):1018-29.
39. Busse B, Bale HA, Zimmermann EA, Panganiban B, Barth HD, Carriero A, Vettorazzi E, Zustin J, Hahn M, Ager JW, 3rd, Puschel K, Amling M, Ritchie RO. Vitamin d deficiency induces early signs of aging in human bone, increasing the risk of fracture. *Science translational medicine*. 2013 Jul 10;5(193):193ra88.
40. Welldon KJ, Findlay DM, Evdokiou A, Ormsby RT, Atkins GJ. Calcium induces pro-anabolic effects on human primary osteoblasts associated with acquisition of

mature osteocyte markers. *Molecular and cellular endocrinology*. 2013 Aug 25;376(1-2):85-92.

41. Burger EH, Klein-Nulend J, van der Plas A, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone--their role in mechanotransduction. *The Journal of nutrition*. 1995 Jul;125(7 Suppl):2020S-3S.

42. Steck R, Niederer P, Knothe Tate ML. A finite difference model of load-induced fluid displacements within bone under mechanical loading. *Medical engineering & physics*. 2000 Mar;22(2):117-25.

43. Ellies DL, Viviano B, McCarthy J, Rey J-P, Itasaki N, Saunders S, Krumlauf R. Bone Density Ligand, Sclerostin, Directly Interacts With LRP5 but Not LRP5G171V to Modulate Wnt Activity. *J Bone Miner Res*. 2006;21(11):1738-49.

44. Spatz JM, Fields EE, Yu EW, Divieti Pajevic P, Bouxsein ML, Sibonga JD, Zwart SR, Smith SM. Serum sclerostin increases in healthy adult men during bed rest. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012 Sep;97(9):E1736-40.

45. Javaheri B, Stern A, Lara N, Dallas M, Zhao H, Liu Y, Bonewald LF, Johnson ML. Deletion of a single beta-catenin allele in osteocytes abolishes the bone anabolic response to loading. *J Bone Miner Res*. 2013 Aug 8.

46. Verborgt O GG, Schaffler MB. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J Bone Miner Res* 15:60–67. 2000.

47. Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res*. 2006 Apr;21(4):605-15.

48. Bakker A, Klein-Nulend J, Burger E. Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004 Aug 6;320(4):1163-8.
49. Krempien B, Manegold C, Ritz E, Bommer J. The influence of immobilization on osteocyte morphology: osteocyte differential count and electron microscopical studies. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histology*. 1976 Apr 5;370(1):55-68.
50. Frost H. Micropetrosis. *J Bone Joint Surg Am*. 1960;42-A:144-50
51. Carpentier VT, Wong J, Yeap Y, Gan C, Sutton-Smith P, Badiei A, Fazzalari NL, Kuliwaba JS. Increased proportion of hypermineralized osteocyte lacunae in osteoporotic and osteoarthritic human trabecular bone: implications for bone remodeling. *Bone*. 2012 Mar;50(3):688-94.
52. Bordier P, Matrajt H, Miravet L, Hioco D. [Histological Measure of the Volume and Resorption of Bone Joints]. *Pathologie-biologie*. 1964 Dec;12:1238-43.
53. Li YC, Pirro AE, Amling M, Dellling G, Baron R, Bronson R, Demay MB. Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997 Sep 2;94(18):9831-5.
54. Gluer CC, Krause M, Museyko O, Wulff B, Campbell G, Damm T, Dauschies M, Huber G, Lu Y, Pena J, Waldhausen S, Bastgen J, Rohde K, Breer S, Steinebach I, Thomsen F, Amling M, Barkmann R, Engelke K, Morlock M, Pfeilschifter J, Puschel K. New horizons for the in vivo assessment of major aspects of bone quality Microstructure and material properties assessed by Quantitative Computed Tomography and Quantitative Ultrasound methods developed by the BioAsset consortium. *Osteologie*. 2013;22(3):223-33.

55. Krause M, Soltau M, Zimmermann EA, Hahn M, Kornet J, Hapfelmeier A, Breer S, Morlock M, Wulff B, Puschel K, Glueer CC, Amling M, Busse B. Effects of long-term alendronate treatment on bone mineralisation, resorption parameters and biomechanics of single human vertebral trabeculae. *European cells & materials*. 2014;28:152-63.
56. Krause M, Museyko O, Breer S, Wulff B, Duckstein C, Vettorazzi E, Glueer C, Puschel K, Engelke K, Amling M. Accuracy of trabecular structure by HR-pQCT compared to gold standard muCT in the radius and tibia of patients with osteoporosis and long-term bisphosphonate therapy. *Osteoporosis international*. 2014 May;25(5):1595-606.
57. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 1987 Dec;2(6):595-610.
58. Roschger P, Plenk H, Jr., Klaushofer K, Eschberger J. A new scanning electron microscopy approach to the quantification of bone mineral distribution: backscattered electron image grey-levels correlated to calcium K alpha-line intensities. *Scanning microscopy*. 1995 Mar;9(1):75-86.
59. Milovanovic P, Zimmermann EA, Hahn M, Djonic D, Puschel K, Djuric M, Amling M, Busse B. Osteocytic Canalicular Networks: Morphological Implications for Altered Mechanosensitivity. *ACS nano*. 2013 Aug 4.
60. Kubek DJ, Gattone VH, 2nd, Allen MR. Methodological assessment of acid-etching for visualizing the osteocyte lacunar-canalicular networks using scanning electron microscopy. *Microscopy research and technique*. 2010 Mar;73(3):182-6.
61. Marotti G, Ferretti M, Remaggi F, Palumbo C. Quantitative evaluation on osteocyte canalicular density in human secondary osteons. *Bone*. 1995 Jan;16(1):125-8.

62. Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2004;36(1):1-8.
63. Marotti G, Zallone AZ, Ledda M. Number, size and arrangement of osteoblasts in osteons at different stages of formation. Calcified tissue research. 1976 Aug;21 Suppl:96-101.
64. Vatsa A, Breuls RG, Semeins CM, Salmon PL, Smit TH, Klein-Nulend J. Osteocyte morphology in fibula and calvaria --- is there a role for mechanosensing? Bone. 2008 Sep;43(3):452-8.
65. Emerton KB, Hu B, Woo AA, Sinofsky A, Hernandez C, Majeska RJ, Jepsen KJ, Schaffler MB. Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. Bone. 2010 Mar;46(3):577-83.

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. med. Michael Amling danken, welcher mir das außerordentliche interessante und umfangreiche Thema dieser Dissertation zur Verfügung stellte und mich generell in meinem wissenschaftlichen Vorankommen besonders gefördert hat. Die Gespräche mit ihm waren stets anregend und aufschlussreich.

Ein besonderer Dank geht an meine Betreuer Herrn Dr. med. Matthias Krause und Herrn Dr. rer. medic. Björn Busse, die mich über die gesamte Zeit meiner Promotion uneingeschränkt unterstützt haben und mir bei jeder Frage mit hilfreichen Kommentaren zur Seite standen.

Herrn Dr. Ing. Michael Hahn danke ich für seine unermüdliche Betreuung und Unterstützung während meiner Arbeit im Institut.

Ein weiterer großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Klaus Püschel und allen Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin, da sie maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich möchte auch den übrigen Mitarbeitern des Instituts für Osteologie und Biomechanik für die ständige Hilfsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit danken.

Vor allem möchte ich mich auch bei meiner Freundin Jessica bedanken, die mir viel Kraft und über die ganze Zeit der Anfertigung meiner Dissertation und darüber hinaus gab.

Meinen Eltern Henner und Nicola und meiner Schwester Meghan danke ich für die grenzenlose Liebe und Unterstützung.

11 Lebenslauf

Tim Rolvien

Persönliche Information

Geburtsdatum: 06.09.1991

Geburtsort: Berlin

Schulische Ausbildung

1996-2000 Heinrich-Zille-Grundschule Stahnsdorf

2007 Schüleraustausch mit High School Diploma, Montrose, MI, USA

2000-2009 Weinberg Gymnasium Kleinmachnow (Abitur 1,4)

Studium

10/ 2009 Beginn des Medizinstudiums, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

9/2011 1. Teil der Ärztlichen Prüfung (Note 2)

seit 2011 klinische Ausbildung am UKE

10/2014 2. Teil der Ärztlichen Prüfung (Note 2)

Famulaturen

9/2012 Orthopädie, Benedictus Krankenhaus Tutzing

1/2013 Chirurgie, Mnazi Mmoja Hospital, Stone Town, Zanzibar

4/2014 Dr. Bhagali Clinic and Nursing Home, Pune, Indien

Praktisches Jahr

11/14-02/15 Innere Medizin, Spital Davos, Schweiz

03/15-04/15 Orthopädische Chirurgie, University of California San Diego, USA

05/15-06/15 Chirurgie, Westküstenklinikum Heide

07/15-10/15 Radiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

12 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel 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.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Tim Rolvien