

Aus dem Julius-Wolff-Institut
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung der Knochen bei hepatischer
Osteodystrophie am MDR2^{-/-}-Mausmodell**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Yvonne Lau

aus Halle/Saale

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. rer. nat. B. Wildemann
 2. Prof. Dr. A. Nüssler
 3. Prof. Dr. med. G. Schmidmaier

Datum der Promotion: 12.09.2014

Widmung

für Moritz

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. | Einleitung | 5 |
| 1.1 | Osteoporose | 6 |
| 1.2 | Leber und Leberzirrhose | 9 |
| 1.3 | Zusammenhang zwischen Leber und Knochenstoffwechsel | 13 |
| 1.4 | MDR-2 | 16 |
| 1.5 | Ziel und Hypothese des Versuchsvorhabens | 17 |
| 2. | Material und Methode | 18 |
| 2.1 | Versuchstiere | 18 |
| 2.2 | Gruppeneinteilung | 18 |
| 2.3 | Mikro-Computertomographie (μ CT) | 19 |
| 2.3.1 | Scann und Evaluierung | 19 |
| 2.3.2 | Morphometrische Mikro-CT-Parameter | 24 |
| 2.4 | Histomorphologische Auswertung | 26 |
| 2.4.1 | Knochenaufbereitung | 26 |
| 2.4.2 | Herstellung von Schnittpräparaten | 28 |
| 2.4.3 | Färbung der histologischen Schnitte | 29 |
| 2.4.4 | Auswertung der histologischen Schnitte | 33 |
| 2.5 | Statistik | 35 |
| 3. | Ergebnisse | 36 |
| 3.1 | Längenmessungen der Mausknochen | 36 |
| 3.2 | μ CT-Daten | 37 |
| 3.2.1 | Vergleich der trabekulären Mikrostruktur an MDR2 ^{-/-} -Maus und Wildtyp | 38 |
| 3.2.2 | Vergleich der Kortikalis an MDR2 ^{-/-} -Maus und Wildtyp | 45 |
| 3.3 | Histomorphologische Auswertung | 49 |
| 3.3.1 | Ergebnisse der Versilberung nach von-Kossa-Färbung | 49 |
| 3.3.2 | Ergebnisse der Movat-Pentachrom-Färbung | 56 |
| 4. | Diskussion | 60 |
| 5. | Zusammenfassung | 73 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 75 |
| 7. | Abkürzungsverzeichnis | 83 |
| 8. | Abbildungsverzeichnis | 85 |
| 9. | Tabellenverzeichnis | 88 |
| 10. | Danksagung | 89 |
| 11. | Lebenslauf | 90 |
| 12. | Eidesstattliche Erklärung | 91 |

1 Einleitung

Das Skelettsystem übernimmt wichtige Funktionen im menschlichen Körper. Zum einen stellt der Knochen einen Schutz für die inneren Organe dar und gewährleistet als Stützgewebe die Stabilität und Mobilität; zum anderen ist das Knochengewebe ein Reservoir für Calcium und Phosphat und hat somit einen Einfluss auf den Mineralhaushalt.

Um diesen Aufgaben gerecht zu werden, unterliegt der Knochen einem ständigen Umbauprozess. Innerhalb von 10 Jahren wird beim Menschen eine Knochenmasse regeneriert, die dem gesamten Skelett entspricht [1]. Durch den Umbau (*Remodeling*) werden einerseits das Wachstum und andererseits eine Anpassung an mechanische Erfordernisse ermöglicht. In der Wachstumsphase überwiegt der Knochenaufbau (*Formation*), der zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr das Maximum der Knochenmasse erreicht hat, das so genannte „Peak Bone Mass“ [2]. Diese maximale Knochenmasse wird vor allem von genetischen Faktoren [3,4,5], aber auch vom Lebensstil wie Ernährung, Bewegung oder Krankheiten beeinflusst.

Für die Aufrechterhaltung der Knochenmasse ist eine fein abgestimmte Balance zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau (*Resorption*) nötig. Die Knochenresorption wird durch die Osteoklasten (*knochenabbauenden Zellen*) und die Bildung von neuem Knochengewebe durch die Osteoblasten (*knochenaufbauenden Zellen*) durchgeführt. Das neue Knochengewebe (*Osteoid*) mineralisiert innerhalb von 25-35 Tagen.

Kommt es zu einem Ungleichgewicht zugunsten der Resorption, wie es im Alter häufig der Fall ist, so entsteht ein Knochenmasseverlust, welcher auch als Osteoporose bezeichnet wird. Diese negative Knochenbilanz kann zwei unterschiedliche Ursachen haben [6]:

- erhöhte Osteoklastenaktivität bei normaler Osteoblastenfunktion und Mineralisierung
→ „*high turnover*“ = Erhöhung der Knochenresorption
- normale Osteoklastenfunktion bei verminderter Osteoblastenaktivität und Mineralisierung
→ „*low turnover*“ = Erniedrigung der Knochenformation

1.1 Osteoporose

Allein in Deutschland leidet bereits jede dritte Frau und ca. jeder fünfte Mann über 50 Jahren [7,8,9] an Osteoporose, was etwa 6 Millionen Menschen sind [10,11].

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine Reduktion der Knochenmasse und einer mikroarchitektonischen Verschlechterung des Knochengewebes mit entsprechend reduzierter Festigkeit und erhöhter Frakturneigung charakterisiert ist [12]. Laut WHO (*World health organisation*) gehört sie zu den 10 häufigsten Erkrankungen der Gegenwart.

In Anlehnung an die WHO-Definition liegt eine Osteoporoseerkrankung dann vor, wenn der Knochenmineralgehalt (*Bone Mineral Density [BMD]*) erniedrigt ist. Dieser lässt sich mittels einer radiologischen Knochendichtmessung (*single and dual-X-ray-absorptiometry [DXA]*), zum Beispiel am proximalen Femur oder am Wirbelkörper, bestimmen. Von einer manifesten Osteoporose wird dann gesprochen, wenn die gemessene Knochendichte um mehr als 2,5 Standardabweichungen (*SD*) vom durchschnittlichen Messwert gesunder 30-jähriger Frauen bzw. Männer nach unten abweicht (*T-Score < -2,5 SD*). Liegt die ermittelte Knochendichte im T-Score hingegen zwischen -1,0 und -2,5 SD, so wird von einer Osteopenie gesprochen [13] (*vergleiche Tabelle 1*).

Tabelle 1 : Osteoporosestadien [14]

| Osteoporosestadium | Knochendichte (<i>SD vom T-Wert</i>) |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Physiologischer Befund | Knochenmineralgehalt unverändert (bis -1,0 SD) |
| Osteopenie | Knochenmineralgehalt vermindert (-1,0 bis -2,5SD) Keine Fraktur |
| Osteoporose ohne Fraktur Präklinische Osteoporose | Knochenmineralgehalt vermindert (unter -2,5 SD) Ohne Fraktur |
| Osteoporose mit Fraktur Klinische Osteoporose | Knochenmineralgehalt vermindert (unter -2,5 SD) Wirbelfrakturen ohne adäquates Trauma |

Die Osteoporose ist allerdings nicht nur durch den Knochenmasseverlust, sondern auch durch einen Knochenstrukturdefekt charakterisiert. Der Knochen eines Erwachsenen besteht aus einer kompakten Rindenzone (*Kortikalis*), die etwa 80% der Knochenmasse, aber nur 20% des Knochenvolumens ausmacht, sowie aus einem schwammartigen Anteil (*Spongiosa*), der ca. 20% der Knochenmasse und 80% des Knochenvolumens einnimmt. Die Spongiosa besteht aus einem platten- und stabartigen Trabekelwerk. Kortikales und Spongiosa sollten als zwei getrennte Einheiten angesehen werden, da sie sich im Alter unterschiedlich verändern.

Bei der Osteoporose kommt es in dem Trabekelwerk zu richtungsabhängigen Verschmälerungen und somit zu einer Umwandlung von platten- zu stabartigen Trabekeln [15,16,17]. Aufgrund einer Perforation von Trabekeln kommt es zu einer starken Zunahme an „freien Enden“ (ca. 37%) [17]. Somit ist die Perforation ein wesentlicher Grund für die Stabilitätsabnahme des Knochen, da einmal durchtrennte Trabekel nicht wieder miteinander verknüpft werden können, um so wieder ein stabiles Trabekelwerk zu bilden [18,19].

Man unterscheidet zwischen einer **lokalen** und **generalisierten** Osteoporose. Die lokale Osteoporose tritt z.B. nach einem Trauma bei längerer Immobilisation einer Gliedmaße oder gelenksnah bei einer chronischen Arthritis auf. Die generalisierte Osteoporose hingegen befällt das gesamte Skelett ohne „bevorzugte“ Stellen.

Die generalisierte wird noch einmal in eine **primäre** und **sekundäre** Form untergliedert. Zur primären Osteoporose gehört die **postmenopausale** (*Typ I*) und die **altersabhängige / senile** (*Typ II*) Osteoporose [20].

Bei der postmenopausalen Osteoporose (*Typ I*) der Frau kommt es während bzw. nach der Menopause zu einem östrogenabhängigen, spongiosabetonten Knochenmasseverlust mit Manifestation am Achsenskelett (v.a. Wirbelkörper). Das durch den erhöhten Knochen turnover entstandene Ungleichgewicht löst die eigentliche Osteoporose aus. In den ersten fünf bis zehn Jahren unmittelbar nach der Menopause kann man einen jährlich steigenden Knochenmasseverlust von 0,5-1% auf 3-6% beobachten. Diese frühe postmenopausale Osteoporose mit verstärkter Osteoklastenaktivität nennt man auch „high turnover“-Osteoporose. Im späteren Verlauf kommt es zu einem langsam entstehenden Verlust der Osteoblastenaktivität gegenüber wieder normalisiertem Knochenabbau, das der „low turnover“-Osteoporose entspricht.

Während bei der eben beschriebenen Form des Knochenschwundes hauptsächlich Frauen betroffen sind, kommt die senile Osteoporose (*Typ II*) gleichermaßen bei Frauen und Männern im Alter über 70 Jahren vor. Bei diesem Typ der Osteoporose findet ein langsamer, aber lang anhaltender spongiosa- und kortikalisbetonter Knochenabbauprozess statt [21]. Daher kommt es vorwiegend zu Brüchen der langen Röhrenknochen, vor allem des Oberschenkelhalses und Unterarmknochen (*handgelenksnaher Speichenbruch*) [22].

Die **idiopatische** Osteoporose ist eine Osteoporoseform mit ungeklärter Ursache und kommt vermehrt bei Männern vor [23]. So fanden Resch et al. bei 60 von 95 Männern mit osteoporotischen Wirbelkörperfrakturen keine den Knochendichteverlust erklärende Ursache und stellten schließlich die Diagnose einer idiopatischen Osteoporose [23].

Die idiopathische juvenile Osteoporose ist eine seltene Form, die zwischen dem 8. und 14. Lebensjahr auftritt. Auch bei jungen Erwachsenen kann zwischen den 20 und 35. Lebensjahr eine idiopathische Osteoporose auftreten.

Die **sekundäre** Osteoporose, die insgesamt 5% aller Osteoporoseformen ausmacht, betrifft sowohl Frauen als auch Männer [24]. Ursächlich dafür können Risikofaktoren wie Medikamenteneinnahme (*orale Glukokortikoide oder Sedativa*), hormonelle Veränderungen und falsche Ernährung sein. Aber auch Grunderkrankungen, zum Beispiel Überfunktion der Nebennierenrinde, Schilddrüsenüberfunktion, bestimmte hormonproduzierende Tumoren oder Lebererkrankungen können dazu führen.

Jedoch ist der Zusammenhang zwischen der Leber und dem Knochen noch nicht vollständig geklärt.

In Tabelle 2 werden noch einmal alle Osteoporoseformen mit Differenzialdiagnosen dargestellt.

Tabelle 2 : Einteilung der Osteoporoseformen [25]

| | |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Primäre Osteoporose | <ul style="list-style-type: none"> • Postmenopausale Osteoporose (<i>Typ I</i>) • Senile Osteoporose (<i>Typ II</i>) • Idiopathische Osteoporose, juvenil |
| Sekundäre Osteoporose (als Folge einer Grundkrankheit) | <ul style="list-style-type: none"> • endokrin • iadrogen • medikamentös • gastrointestinal/alimentär • myelogen/onkologische • parainfektios/immunogen • genetisch • inaktivität/Immobilisation • Komplexe (renale, intestinale Osteopathien) • Hereditäre Bindegewebserkrankung |

1.2 Leber und Leberzirrhose

Die Leber ist eines der größten, wichtigsten und komplexesten Stoffwechselorgane des menschlichen Körpers. Durch ihre Synthese- und Metabolisierungsfunktion spielt sie eine große Rolle im Kohlenhydrat-, Protein- und Fettstoffwechsel, indem sie z.B. Glykogen als Energiespeicher, aber auch Gerinnungsfaktoren, Fettsäuren und Cholesterin bildet. Gleichzeitig ist die Leber das wesentliche Organ für die Entgiftung körpereigener (z.B. *Ammoniak*) und körperfremder Stoffe (z.B. *Medikamente*) [26]. Eine der wichtigsten Aufgaben der Leber ist die kontinuierliche Synthese und Sekretion von ca. 700 ml Galle pro Tag. Die Gallenflüssigkeit, die in den Leberzellen (*Hepatozyten*) gebildet wird, besteht aus folgenden Komponenten: Wasser (82%), Gallensäure (12%), Lecithin und anderen Phospholipiden (4%), nichtverestertem Cholesterin (0,7%) sowie konjugiertem Bilirubin, Elektrolyten und Schleim (*Mucin*) [30].

Mithilfe der Galle können hepatisch metabolisierte Stoffe und auch Cholesterin aus dem Körper ausgeschieden werden. Durch die emulgierende Wirkung der Gallensäure können fettlösliche Vitamine (*Vitamin A, D, E & K*) und andere lipidlösliche Nahrungsbestandteile über den Darm resorbiert werden [28].

Die Gallensäure wird mithilfe eines speziellen Transportsystems aktiv gegen das Konzentrationsgefälle aus den Hepatozyten in das kanalikuläre Gallengangssystem

sezerniert. Dieser Gallensäuretransporter BSEP („*bile salt efflux pump*“) gehört zu den aktiven, energieverbrauchenden ABC-Transportern (*ATP-Binding-Cassette*) und ist entscheidend für die Aufrechterhaltung des Galleflusses. Durch den extrazellulären Konzentrationsanstieg der Gallensäure werden Wasser und Elektrolyte passiv sowohl transzellulär als auch parazellulär über die semipermeable, kanalikuläre Membran gezogen [29]. Ein weiteres Transportprotein in der apikalen Membran ist das MRP2 („*multidrug resistance associated protein 2*“), welches konjugiertes Bilirubin, reduziertes Glutathion und anorganische Konjugate transportiert [28,36].

Die Phospholipide, bei denen mehr als 95% das Phosphatidylcholin ausmacht, werden mithilfe einer ATP-abhängigen Flippase (*MDR3*) kontinuierlich zur äußeren Membran transloziert. *MDR3* („*multidrug-resistance-3 P-glycoprotein*“) ist ein Transporter in der menschlichen kanalikulären Hepatozytenmembran, welcher in folgendem Projekt einen besonderen Stellenwert hat und im späteren Verlauf noch näher besprochen wird.

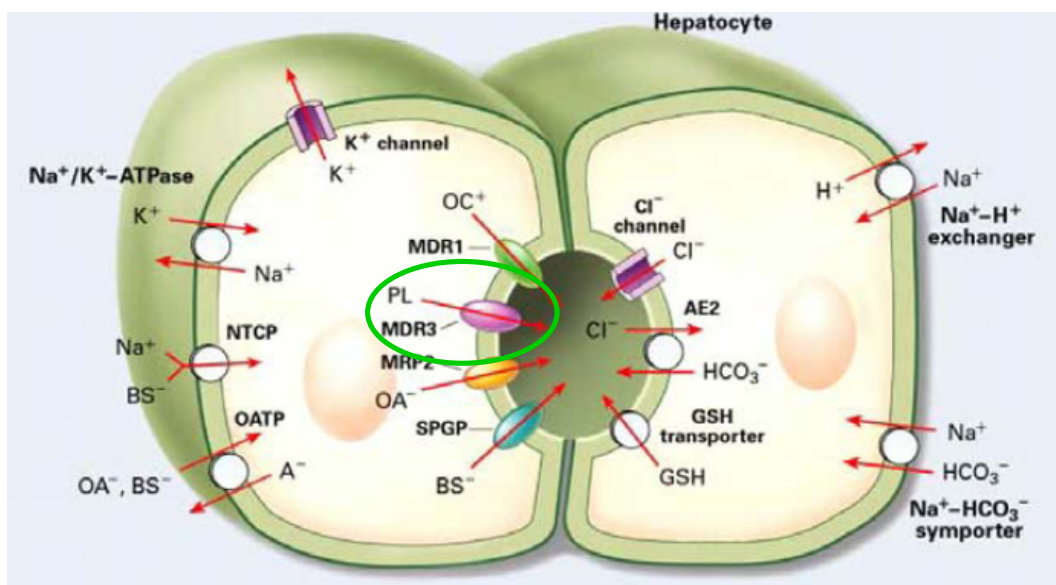


Abb. 1 : Transportpolarität der humanen Leberzelle [27]

Dargestellt sind die unterschiedlichen Transportsysteme in der sinusoidalen (basolateralen) und kanalikulären (apikalen) Plasmamembran einer menschlichen Hepatozyte mit dem jeweilig transportierten Molekülen. **Abkürzungen:** NTCP (Na⁺-abhängiges Taurocholot-Cotransportierendes Protein); OATP (Organische Anionen-Transportierendes Protein); MDR1&3 (Multidrug resistance p-glycoprotein 1 und 3); MRP2 (Multidrug resistance Associated protein 2)

Phosphatidylcholin bindet die Gallensäure und bildet gemischt Mizellen in dem Gallengangssystem und schützt so die Hepatozytenmembran vor der aggressiven Gallensäure. Ein weiterer physiologischer Schutz vor dem toxischen Effekt der

Gallensäure ist die Produktion und Sezernierung von Mucus (*Schleim*) aus dem Gallenblasenepithel.

Fallen diese Schutzmechanismen aus, so wird die eigentlich positive Eigenschaft der Gallensäure, als Detergenz zu wirken und dadurch die notwendigen Fette und lipidlöslichen Nahrungsbestandteile aus dem Darm zu resorbieren, zu einem Problem. Es kommt zu einem Konzentrationsanstieg freier Gallensäure, was dazu führt, dass die Hepatozytenmembran geschädigt wird, mit der Folge einer chronischen Leberschädigung bis hin zu einer Leberzirrhose [28,32].

Die Leberzirrhose ist das irreversible Endstadium ursächlich verschiedener chronischer Lebererkrankungen oder -schädigungen [31,33]. Sie ist definiert als ein diffuser Organbefall mit charakteristischen makroskopischen und histologischen Leberveränderungen [34]. Es kommt zu einer Zerstörung der ursprünglichen Struktur, die durch eine septenbildende Bindegewebsvermehrung (*Fibrose*) und einem Umbau der azinären Architektur in knotige Parenchymformationen gekennzeichnet ist. Aufgrund des hohen Bindegewebsanteil steigt der Widerstand durch die verlängerten Kapillarstrecken und die Elastizität ist vermindert. Dadurch kommt es zu einer eingeschränkten Durchblutung der Leber. Die Folge ist ein Untergang des Leberparenchyms und die Kapillarisierung von Sinusoidalwänden sowie ein dadurch verschlechterter Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten. Bei einem fortgeschrittenem Stadium der Leberzirrhose kann auch der gut ausgeprägte Regenerationsprozess der Hepatozyten nicht mehr greifen und es entwickelt sich langsam eine Leberinsuffizienz [37].

Neben der bereits genannten Ursache können viele Ereignisse zu einer Leberzirrhose führen (*siehe Tabelle 3*)

Tabelle 3 : häufigsten Ursachen der Leberzirrhose [35]

| | |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Toxine | Alkohol (50-60%) Medikamente Chemikalien (z.B.:CCl4) |
| Virushepatitis | HBV, HCV, HDV (20-30%) |
| hereditär | Hämochromatose (1-3%) M. Wilson (1%) α1-Antitrypsinmangel |
| biliär | Primär biliäre Zirrhose (<i>PBC</i>) (1-3%) Primär sklerosierende Cholangitis(<i>PSC</i>) (1%) |
| Autoimmunhepatitis | Typ I, II und III (1-5%) |
| andere | Nichtalkoholische Steatohepatitis (<i>NASH</i>) (<5%) |

Genauere Zahlen zur Inzidenz und Prävalenz zu diesem Krankheitsbild sind nicht bekannt. Schätzungen zufolge leiden 0,5-0,8% der Bevölkerung in Deutschland an einer Leberzirrhose [31].

Alle Erkrankungen, die zu einer Leberzirrhose führen, stellen auch Ursachen für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (*HCC*) dar. 80-90% der *HCC*-Fälle entstehen bei Patienten mit einer zirrhotisch umgebauten Leber. Es ist weltweit der fünfthäufigste Tumor und die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache [31,38,39].

Meist bleibt als einzige kurative Therapie für Patienten mit terminaler Leberzirrhose, maligner Lebererkrankung oder akutem Leberversagen eine orthotope Lebertransplantation (*LTX*) [40]. Seit 1963, als die erste Organtransplantation durchgeführt wurde, sind in Deutschland 18.952 Leberorgane transplantiert worden. Allein im Jahr 2011 wurden 1.199 Lebertransplantationen durchgeführt [41]. Häufige Komplikationen neben der Abstoßungsreaktion sind bakterielle und virale Infektionen, Gallengangskomplikationen sowie auch die Osteoporose [40]. In der frühen Posttransplantationsphase, d.h. innerhalb der ersten drei bis sechs Monate, konnte im klinischen Alltag eine Verminderung der Knochenmasse beobachtet werden [42,43,44]. Es wird angenommen, dass es eine Folge der immunsuppressiven Medikation und auch der postoperativen Immobilisation ist.

Die nach Transplantation notwendigen Glukokortikoide führen zu einer Verminderung der Osteoblastenproliferation und –funktion sowie zu einer gesteigerten Osteoklastenaktivität. Zusätzlich kommt es neben einer erhöhten Parathomonsekretion (*aus der Hypophyse*) zu einer Hemmung der Calciumabsorption und einer Beeinflussung der Gonadenfunktion [45].

Allerdings wird in einigen klinischen Studien beschrieben, dass die Knochenmasse ein Jahr nach der Transplantation wieder ansteigt und die Werte vor der Prätransplantationsphase erreicht. Nach zwei Jahren ist die Knochendichte mit etwa 2-5% über dem Prätransplantationswerten angesiedelt [43,44,46], was auch auf die durch die Transplantation verbesserte Leberfunktion zurückzuführen ist.

1.3 Zusammenhang zwischen Leber und Knochenstoffwechsel

Hepatische Osteodystrophie ist die Bezeichnung des Krankheitsbildes, bei der sich eine Knochenstoffwechselstörung bei chronischen Leberkrankungen entwickelt. Die häufigste extrahepatische Komplikation ist die Osteoporose [43,47,48,49]. Die Entstehung des Knochenmasseverlustes ist multifaktoriell und im einzelnen noch ungeklärt [42,49]. Da die Leber ein wichtiges und zentrales Organ im gesamten Stoffwechsel ist, scheint es daher plausibel, dass ein Leberschaden durch unterschiedliche Faktoren auch einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel hat. Faktoren, die direkt oder auch indirekt die Knochenmasse verändern können, wie zum Beispiel der Wachstumsfaktor „Insulin-like growth factor I“ (*IGF-I*), Hyperbilirubinämie, Hypogonadismus und subnormale Vitamin D- und K-Konzentrationen, werden in der Literatur diskutiert [49,50].

IGF-I ist ein Wachstumsfaktor, der hauptsächlich in der Leber gebildet wird und eine stimulierende Wirkung auf die Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten hat [44,49]. Die IGF-I Produktion wird durch das übergeordnete Steuersystem, dem hypothalamisch-hypophysären Regelkreislauf stimuliert.

„Growth Faktor“ (*GH*) ist ein Wachstumshormon, welches im vorderen Hypophysenlappen gebildet und gespeichert wird. Es hat einen direkten Einfluss auf die Produktion und Sekretion von IGF-I in den Hepatozyten. Östrogene, Androgene und

auch Schilddrüsenhormone wirken auf die GH-Stimulation und haben somit einen indirekten Einfluss auf die IGF-I-Produktion und den Knochenstoffwechsel.

In einer tierexperimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einer selektiven Mutation des IGF-I-Gen 75% weniger zirkulierendes IGF-I aufwiesen sowie eine 9%ige Reduktion der totalen BMD und eine 6%ige Abnahme der kortikalen Knochendichte zeigten [50,51]. In einer anderen Studie konnte nachgewiesen werden, dass sich bei Ratten, die an einer Leberzirrhose litten und mit IGF-I behandelt wurden, die Knochendichte verbesserte [2,42,52]. In anderen Studien, bei denen Patienten an Leberzirrhose oder anderen Leberkrankheiten erkrankten, konnte zwar eine Abnahme des IGF-I-Spiegels beobachtet werden, allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen dem IGF-I-Spiegel und der Knochenmineraldichte gezeigt werden [2,42,53,54].

Ein weiterer Wachstumsfaktor ist das „TGF- β_1 “ (*Transforming growth factor- β_1*), der in den Osteoblasten produziert wird und einen lokalen Einfluss auf den Knochen ausübt [56]. Er steigert die Osteoblasten- und hemmt die Osteoklastentätigkeit [55]. Die Synthese steht unter dem Einfluss von Östrogen, aber auch die Wirkung kann durch verschiedene Faktoren, wie Calcitonin, verstärkt werden [55]. Aufgrund des direkten Einflusses der systemisch wirkenden Stoffe (z.B. *Östrogen, Calcitonin*) auf die TGF- β_1 -Produktion haben diese somit auch einen indirekten Einfluss auf den Knochenstoffwechsel.

Vitamin D gehört zu den fettlöslichen Vitaminen. Es kann aus der Nahrung mithilfe von Cholesterol im Darm resorbiert oder im Körper selbst aus 7-Dehydrocholesterol unter Einwirkung von UV-Licht auf der Haut synthetisiert werden. Für die Umwandlung in das aktive Vitamin D (*1,25-Dihydroxycholecalciferol*) muss es in der Leber sowie in der Niere hydroxyliert werden. Vitamin D hat einen Einfluss auf den Calcium- und Phosphathaushalt und somit indirekt auf den Knochenstoffwechsel. Durch das Vitamin D wird die Phosphat- und Calciumresorption aus dem Darm gesteigert. Dies führt dazu, dass durch Calcium das Calcitonin (*aus der Schilddrüse*) vermehrt und das Parathormon (*aus der Nebenschilddrüse*) vermindert ausgeschüttet wird und dadurch die Osteoklastenaktivität gehemmt wird.

In den vergangenen Jahren haben mehrere Arbeitsgruppen den Zusammenhang zwischen Vitamin D und dem Knochenstoffwechsel untersucht. Allerdings konnte kein direkter Zusammenhang zwischen einem Vitamin D-Mangel und einer durch einen Leberschaden bedingten Reduktion der Knochendichte gezeigt werden. Man konnte

nur in Studien beobachten, dass Patienten mit einer Lebererkrankung, wenn überhaupt, nur eine geringe Vitamin D- und Calciummenge aufwiesen [2]. Es gab keine signifikante Korrelation zwischen Osteoporose und Vitamin D, Calcium und dem Parathormon bei Patienten mit cholestatischen Lebererkrankungen [44,57]. Auch eine Vitamin D-Supplementierung in einer anderen Studie hat das Fortschreiten der hepatischen Knochenstoffwechselstörung nicht verhindern können [2,42,58]. Allerdings gab es auch da Studien, die zeigen konnten, dass durch die Vitamin D-Gabe der Knochenabbau verlangsamt und die Knochenmasse gesteigert wurde [59].

Ein weiteres fettlösliches Vitamin ist das Vitamin K, das ebenfalls einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel hat, da es zum einen die Synthese von Osteocalcin stimuliert und zum anderen eine anti-apoptische Wirkung auf die Osteoblasten hat. Osteocalcin wird in den Osteoblasten gebildet und ist ein Protein der Knochenmatrix, welches Calcium und Hydroxylapatit bindet und somit das mineralisierte Knochengewebe entsteht.

Bei Patienten mit einer primären biliären Leberzirrhose konnte beobachtet werden, dass der Vitamin K-Serumspiegel verringert ist. Man konnte auch zeigen, dass bei solchen Patienten eine Vitamin K-Supplementierung den Knochenschwund vermindern kann [2,60].

Bilirubin ist ein Abbauprodukt des Häm-Anteils des roten Blutfarbstoffs (*Hämoglobin*) der abgestorbenen Erythrozyten. Es wird über das Blut mithilfe des Transportproteins Albumin in die Leber transportiert, wo es konjugiert und somit wasserlöslich wird, damit es mit der Galle ausgeschieden werden kann.

Bilirubin ist neben den Gallensalzen einer der Stoffe, der bei einer cholestatischen Leberkrankheit akkumulieren. Es hat einen inhibierenden Einfluss auf die Osteoblastenproliferation [44,50]. Einige Studien konnten eine Korrelation zwischen dem Bilirubin-Serumspiegel und dem BMD zeigen [61], andere allerdings nicht [62,63]. Auch bei der Behandlung mit einem Medikament gegen die erhöhten Bilirubinwerte konnte kein positiver Einfluss auf die Knochenmasse bei Patienten mit einer primären biliären Zirrhose beobachtet werden [56].

1.4 MDR-2

Um an dieser Thematik forschen zu können, haben sich genetisch veränderte Tiere, insbesondere Mäuse, bewährt. Um das menschliche Krankheitsbild Leberzirrhose und letztendlich das hepatozelluläre Karzinom nachstellen zu können, wurden ein Mausmodell (*MDR2-ko*) gezüchtet, welches eine Mutation in dem *mdr2*-Gen aufweist. Erstmals beschrieben wurde dieses Mausmodell 1994 von Mauad et al. [13]. Das *mdr2*-Gen der Maus ist homolog zu dem menschlichen *mdr3*-Gen. Es verschlüsselt bei der Maus das kanalikuläre Membranprotein MDR2 („*multidrug-resistance-2 P-glycoprotein*“). Dies ist eine Flippase, die für die Translozierung des Phosphatidylcholins vom Zellinneren in das Gallengangsystem zuständig ist. Phosphatidylcholin bindet die Gallensäure in Form von Mizellen, um so die Hepatozytenmembran vor der aggressiven Gallensäure zu schützen.

Aufgrund der Mutation kann dies nicht mehr bewerkstelligt werden und es kommt über mehreren Schritten zur Ausbildung einer Leberzirrhose. Ein Abfolge-Schema zur Entstehung ist in Abbildung 2 zu sehen.

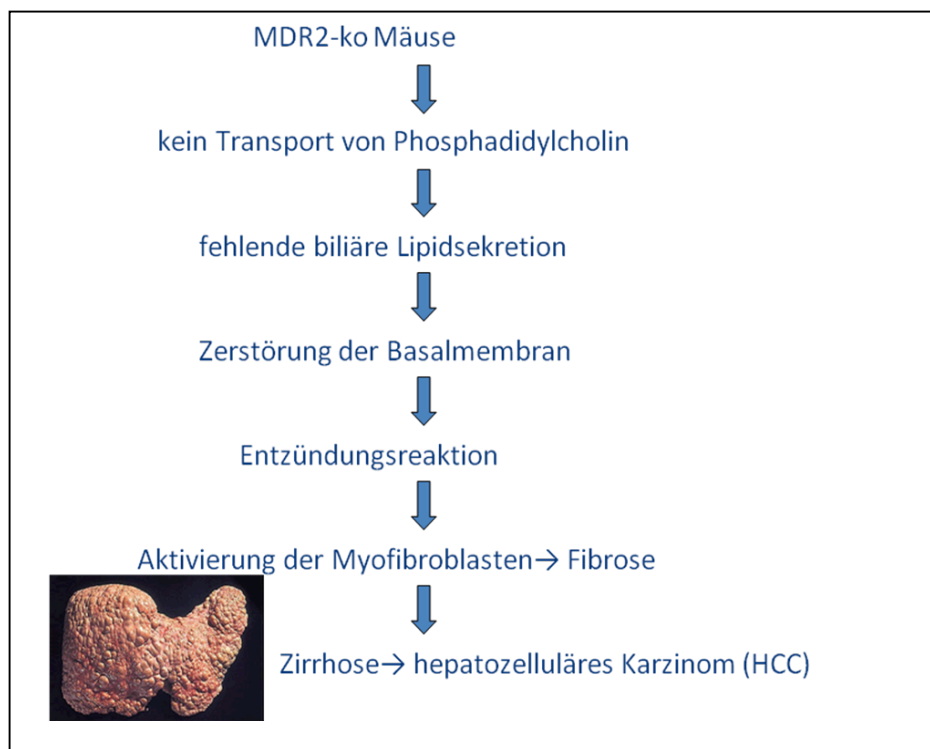


Abb. 2 : Pathologie der Leberzirrhose

1.5 Ziel und Hypothese des Versuchsvorhabens

Aus der beschriebenen Problematik ergab sich für diese Studie folgende Zielsetzung: Es soll der systemische Einfluss bei Leberschaden auf die trabekuläre und kortikale Struktur des Knochens beim MDR2^{-/-}-Mausmodell mittels bildgebenden Verfahren als auch histomorphologisch untersucht und mit den Wildtypen verglichen werden.

Dafür wurde je ein Femur der Maus von unterschiedlichen Altersgruppen entnommen und diese mithilfe eines μ CTs (*Mikrocomputertomograph*) untersucht. Diese Ergebnisse wurden durch die Histomorphometrie ergänzt.

Das MDR2^{-/-} Mausmodell wurde von einer kooperierenden Arbeitsgruppe aus München unter der dortigen Leitung von Herrn Prof. Nüssler untersucht. Dafür wurde die Leber histologisch und histochemisch untersucht sowie zu gleichen Zeitpunkten Blutentnahmen vorgenommen und ausgewertet.

Folgende Hypothese soll in der Studie untersucht werden: Die Tiermutanten mit Leberschaden weisen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine osteoporoseähnliche Knochenstruktur auf.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden BALB/c-Mäuse, die eine Mutation in dem *mdr2*-Gen aufweisen, verwendet. Dieses Gen ist homolog zu dem menschlichen *mdr3*-Gen und aus diesem Grund sind diese Mäuse für die Forschung am menschlichen Krankheitsbild der Leberzirrhose und dessen systemischen Einflüsse sehr gut geeignet.

Die Tiere wurden von Herrn Prof. Steven Dooley (Abteilung für molekulare Alkoholforschung in der Gastroenterologie, Universitätsklinikum Mannheim, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg) aufgezogen und bereitgestellt. Die Tötung und finale Organentnahme erfolgte bei der kooperierenden Arbeitsgruppe in München unter der dortigen Leitung von Herrn Prof. Nüssler (Abteilung für Unfallchirurgie, Technische Universität München rechts der Isar).

Nach der Tötung wurden die Femurknochen freipräpariert und im schockgefrorenen Zustand nach Berlin in das Julius-Wolff-Institut der Charité – Universitätsmedizin Berlin transportiert.

2.2 Gruppeneinteilung

Für das Versuchsvorhaben wurden Femura von insgesamt 48 BALB/c-Mäusen, im Alter von 5 bis 44 Wochen verwendet, wobei es sich dabei um 18 Tiere mit einem *mdr2*-Gendefekt und 20 Wildtiere ohne Mutation handelte. Diese zwei Hauptgruppen wurden in unterschiedliche Altersgruppen unterteilt, so dass die Mutante, wie auch die Wildtiere auf jeweils fünf Gruppen aufgeteilt wurden, wie in Tabelle 4 aufgeführt ist.

Alle Knochen wurden radiologisch wie auch histomorphologisch untersucht und ausgewertet. Die Ergebnisse wurden anschließend verglichen.

Zur Beurteilung der trabekulären und kortikalen Knochenstruktur wurde für die radiologische Untersuchung das μ CT (*Mikrocomputertomograph*) verwendet. Hierbei konnte ohne Destruktion des Objektes die dreidimensionale Knochenstruktur dargestellt, analysiert und bestimmte Parameter, wie z.B. die Vernetzung der Trabekel, berechnet werden.

Die histomorphologische Methode ist dagegen ein invasives Verfahren. Mithilfe bestimmter Färbetechniken konnte der Knochen hinsichtlich des Gewebes und der Struktur beurteilt werden. Allerdings kann mit dieser Methode der Knochen nur zweidimensional dargestellt werden.

Tabelle 4 : Gruppeneinteilung der Versuchstiere

| Alter / Gruppe | 5 Wo | 15 Wo | 20 Wo | 30 Wo | 44 Wo |
|-------------------------------|---------|----------|----------|----------|----------|
| MDR2 ^{-/-} (n=18) | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 |
| Wildtyp (n=20) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |

Wo= Wochen; n= Anzahl; 3,4= Anzahl der Tiere in der jeweiligen Gruppe

2.3 Mikro-Computertomographie (μCT)

2.3.1 Scan und Evaluierung

Geräte und Materialien:

- in viva μCT 40 (Scanco Medical AG, Bassersdorf; Schweiz)
- μCT-Evaluationsprogramm V6.5-1 (Scanco Medical AG; Bassersdorf, Schweiz)
- Messschieber
- FALCON-Röhrchen
- Pipette
- PBS (*phosphate buffered saline*), (Waldeck GmbH & Co. KG, Division Chroma; Münster, Deutschland)

Durchführung:

Das hier verwendete μ CT 40 basiert auf dem System von Rügsegger et al. 1996 vorgestellten Entwurf eines Desktop- μ CTs [64]. Die Mikrofokus-Röntgenröhre des μ CT 40 erzeugt einen Kegelstrahl (*small angle cone beam*). Im Gegensatz zur klassischen CT-Technologie rotiert die Probe im μ CT im starren Röntgenfokus [71]. Der Detektor besteht aus einem CCD-Array mit 2048 x 256 Elementen und einem Abstand (pitch) von 24 μ m [65]. Dieses Gerät fasst eine Probengröße von maximal 80 mm Durchmesser und einer Länge von 500 mm; allerdings kann nur ein Bereich von maximal 38,9 mm im Durchmesser und 145 mm in der Länge komplett gescannt werden.

Die tiefgefrorenen Knochen wurden zuerst mittels eines Messschiebers in ihrer Länge vermessen. Danach wurden jeweils vier Knochen in gleicher Ausrichtung in einer Pipette platziert. Somit waren die Knochen in ihrer Position fixiert und ein standardisierter Scan konnte gewährleistet werden. Zum Schutz der Knochen vor Austrocknung während des Scanvorgangs wurden diese in einem mit PBS gefülltes FALCON-Röhrchen gelagert. Die PBS-Lösung ist eine isotone Pufferlösung, die verhindert, dass den Knochen Mineralien entzogen werden.

Damit keine Luftblasen entstehen, die im Scan Artefakte bilden könnten, wurde die Pipette mit den Knochen langsam in das FALCON-Röhrchen eingeführt. Das verschlossene FALCON-Röhrchen wurde anschließend in einem vorgefertigtem Gestell im μ CT fixiert.

Zu Beginn erfolgte eine Übersichtsaufnahme (*sog. Scout-View*). In dieser wurde der zu scannende Bereich genau markiert und die Anzahl der Schnitte (*Slices*) ausgewählt, wie in Abbildung 3 dargestellt. Ein Slice hatte eine Dicke von 10,5 μ m. Gescannt wurden pro Knochen jeweils 415 Schichten vom distalen Knochenbereich und 50 Schichten von der Knochenmitte. Die Scannzeit betrug für jeden Knochen 47,8 Minuten.

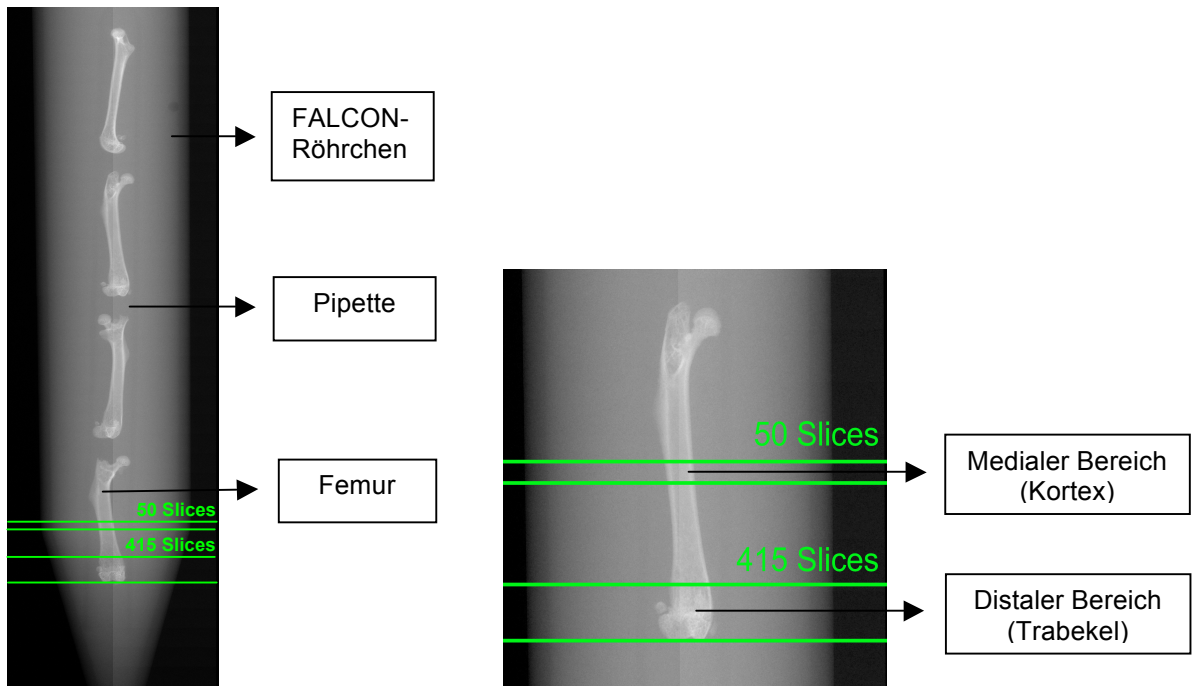


Abb. 3 : Scout-View zur Darstellung der Scannbereiche mit Slicesanzahl

Messparameter:

| | |
|----------------------------------------|-------------------------------------------|
| Anzahl der Schnitte (<i>Slices</i>): | 415 (<i>distaler Bereich</i>) |
| | 50 (<i>medialer Bereich</i>) |
| Länge : | 4,357 mm (<i>distaler Bereich</i>) |
| | 0,525 mm (<i>medialer Bereich</i>) |
| Integrationszeit: | 381ms (<i>gesamter Scann: 47,8 min</i>) |
| Increment: | 10,5 µm |
| Threshold: | 185 = 1982 HU (<i>distaler Bereich</i>) |
| | 255 = 2986 HU (<i>medialer Bereich</i>) |
| Spannung: | 70 kVp |
| Stromstärke: | 114 µA |

Die Bereiche zur Untersuchung und Auswertung von Trabekel und Kortex wurde in Anlehnung an Coleman et al. ausgewählt [66].

Um die Scanes der Femura auszuwerten, war ein spezielles Evaluationsprogramm nötig, bei dem jeder Schnitt einzeln betrachtet wurde und dadurch bestimmte Parameter berechnet werden konnten:

- Trabekel (*Anzahl, Dicke, Abstand und Vernetzung*)
- Knochenvolumen
- Knochenvolumen zu Gesamtvolumen
- Knochenmineraldichte

Damit das Programm die Parameter berechnen konnte, wurden aus dem Scan Bereiche, das „Volume of Interest“ (VOI), ausgewählt und diese manuell konturiert („Global objects“ gesetzt). Dies geschah nach einem genau definierten Verfahren:

Vom distalen Knochenende ausgehend wurde das proximale Ende der Metaphyse aufgesucht und von dort aus 10 Slices weiter begann das VOI für die trabekuläre Auswertung. Es betrug 135 Slices à 10,5 µm Dicke. In diesem Bereich wurde in jeder einzelnen Schicht die „Global objects“ eingezeichnet, indem an der inneren Kortexgrenze gegen den Uhrzeigersinn entlanggefahren wurde (*siehe Abbildung 4.1*). Somit wurde nur das Gewebe innerhalb des eingezeichneten Bereiches in die Berechnung einbezogen.

Zur Auswertung des Kortex beinhaltete das VOI 50 Slices à 10,5 µm Dicke. Um nur den Kortex auszuwerten, musste zum einen ein „Global object“ gegen den Uhrzeigersinn an der äußeren Kortexgrenze und ein weiterer mit dem Uhrzeigersinn entlang der inneren Kortexgrenze gezeichnet werden.

Mit dem „µCT-Evaluation-Program V6.5-1“ von der SCANCO Medical AG erfolgte dann die Auswertung beider Bereiche.

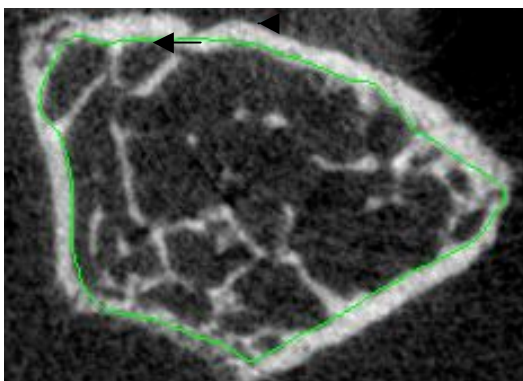


Abb. 4.1 : Konturierung eines Slices gegen den Uhrzeigersinn



Abb. 4.2 : Darstellung durch Thresholds

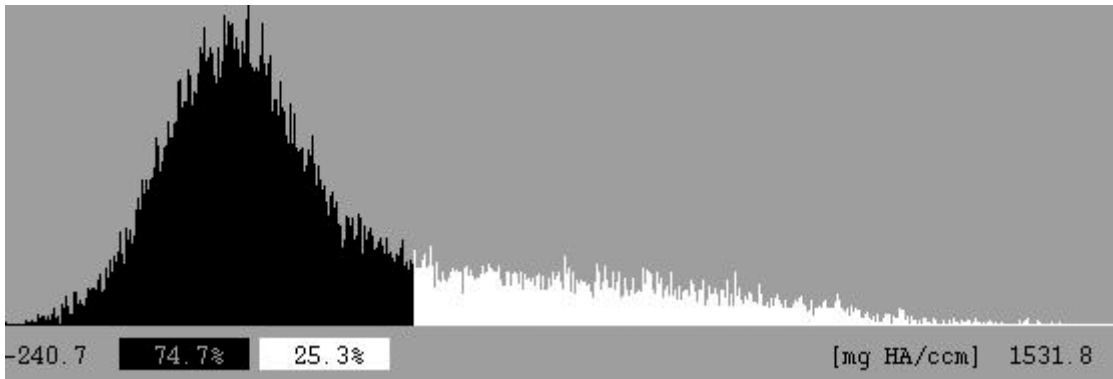


Abb. 4.3 : Histogramm eines Slices mit einem unteren Threshold von 1892 HU und einem oberen offenen Threshold

Die Auswertung erfolgte mithilfe von fixen Schwellenwerten (*Thresholds in Hounsfield-Einheiten [HU]*), um so Knochen- von Knochenmarkzone trennen zu können. Es wurde ein Bereich mit einem offenen oberen und einem festgelegten unteren Schwellenwert definiert, in dem die Werte als Knochen interpretiert wurden.

Für die Bestimmung dieser Schwellenwerte musste für jedes Bild-Pixel genau festgelegt werden, ob es als Knochen oder Mark zu interpretieren ist. Dafür wurden 10 Knochen konturiert und mithilfe von Histogrammen manuell die Grauwerte (*HU*) für das Knochengewebe festgelegt, so dass die visuell evaluierte trabekuläre Struktur optimal wiedergegeben wurde. In dem Histogramm wurde mineralisiertes Gewebe weiß dargestellt (*siehe Abbildung 4.2 und 4.3*). Aus diesen gewonnenen Werten wurde ein Durchschnittswert für den unteren Schwellenwert berechnet. Am Ende erfolgte mittels des Computerprogramms die 3D-Analyse und Berechnung des „weiß“ dargestellten Bereichs, wie in Abbildung 5 zu sehen ist.

Damit die Parameter immer gleich gemessen werden, musste wöchentlich mithilfe eines Phantoms die Intensität und die Stabilität der Röntgenquelle des μ CT sowie die Genauigkeit des Fokusses überprüft und ggf. nachkalibriert werden. Das Phantom besteht aus verschiedenen Materialien mit unterschiedlichen Dichteigenschaften und wird von der Firma SCANCO Medical AG mit dem μ CT mitgeliefert.

Die ermittelten Werte wurden in eine Tabelle übertragen und analysiert.

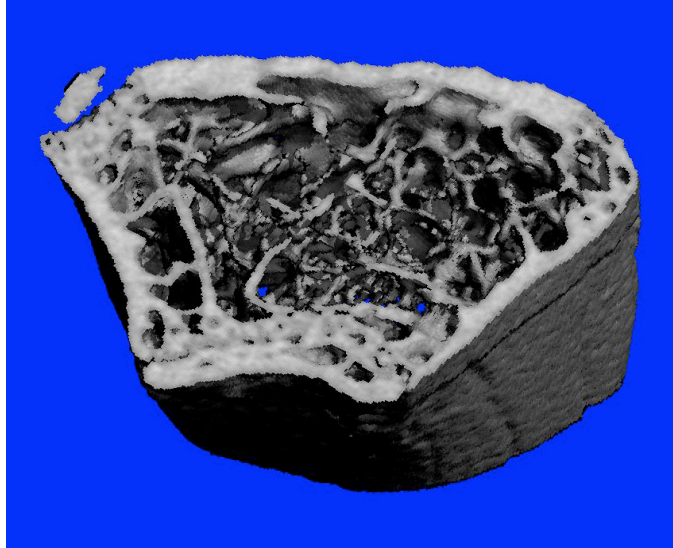


Abb. 5 : 3D-Darstellung des gescannten und ausgewerteten Trabekelbereich eines Femurknochens

2.3.2 Morphometrische Mikro-CT-Parameter

Folgende morphometrische 3D-Daten aus der μ CT-Analyse wurden zur Evaluation herangezogen [67]:

- **Bone Volume Fraktion (BV/TV) = Knochenvolumenanteil:**
Beschreibt das Verhältnis des Volumens des trabekulären Knochens (BV) zum gesamten Volumen (TV) innerhalb der untersuchten Probe [68].
 BV/TV wird in Prozent (%) angegeben.
- **Trabecularnumber ($Tb.N.$) = Trabekelanzahl:**
Gibt an, wie viele Trabekel innerhalb des untersuchten Probevolumens nachzuweisen sind [69]. $Tb.N.$ wird als die Umkehrfunktion des mittleren Abstandes zwischen den Achsen der Struktur definiert [47].
Die Einheit hierfür ist mm^{-1} ($1/\text{mm}$) [68].
- **Trabecularthickness ($Tb.Th.$) = Trabekeldicke:**
Gibt den Durchmesser der Knochen trabekel an.
Dieser Parameter wird in mm angegeben [68].

- **Trabecularseparation (*Tb.Sp.*) = Trabekelabstand:**
Gibt den durchschnittlichen Abstand der Trabekel innerhalb der Probe an.
Die zugehörige Einheit ist mm [68].
- **Connectivity Density (*Conn.D.*) = Konnektivität:**
Es ist ein dreidimensionaler Parameter und stellt ein Maß für die Vernetzung des trabekulären Geflechts dar. Es stellt die maximale Anzahl von Verbindungen dar, die innerhalb des Netzwerkes z.B. durch Mikrofrakturen unterbrochen werden können, ohne das Netz als Ganzes in zwei nicht mehr miteinander verbundene Teile zu unterbrechen [70,71].
Die Konnektivität wird in mm^{-3} ($1/\text{mm}^3$) angegeben.
- **Bone mineral density (*BMD*) = Knochenmineraldichte:**
Beschreibt ein Maß für die Menge an Mineralien (*Hydroxylapatit*, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) innerhalb der zu untersuchenden Knochenprobe.
Dieser Parameter wird in der Einheit $\text{mg HA}/\text{cm}^3$ ($\text{mg Hydroxylapatit}/\text{cm}^3$) angegeben.
- **Structur Model Index (*SMI*):**
Dieser Parameter ermöglicht es, die Struktur des Knochens in Bezug auf die Art der Knochen trabekel zu verifizieren, d.h. darzustellen, ob in der untersuchten Probe die stabförmigen oder die plattenförmigen Trabekel überwiegen. Der SMI ist dimensionslos und liegt bei 0 für eine ideale Plattenstruktur, wohingegen eine ideale Stabstruktur einen Wert von 3 aufweist. Bei einem realen Trabekelwerk mit Übergangsformen liegt der Wert dazwischen. Bei Proben gleicher Knochendichte kann demnach trotzdem eine unterschiedliche Trabekelstruktur vorherrschen, was durch den SMI dargestellt werden kann [72].
- **Cortical Bone Area (*Ct.Ar.*) = kortikaler Knochenbereich:**
Gibt das Verhältnis zwischen kortikalem Volumen (*Ct.V*) und kortikaler Dicke (*Schichtanzahl x Schichtdicke des Kortex*) an [47].
Die kortikale Knochenfläche wird in der Einheit mm^2 angegeben.

2.4 Histomorphologische Auswertung

2.4.1 Knochenaufbereitung

Materialien:

Fixierung:

- Plastikkassetten Tissue Tek, Mega Cassette, Quantity 125 (Sakura, USA)
- Fixierlösung: 324 ml Formaldehyd (37%), 550 ml Alkohol (100%),
130 ml Barbitol-Na-Puffer (0,1 molar, pH 7,3), 6 g Glucose
- Schüttler HS 501 digital (IKA-Werke GmbH&Co.KG; Staufen, Deutschland)

Entwässerung:

- 70% - 80% - 96% - 100% Alkohol
- Xylol (Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland)

Einbettung (*Präinfiltration, Infiltration, Polymerisation*)

- Polymerisationssystem Technovit 9100neu (Heraeus Kulzer GmbH; Wehrheim, Deutschland)
 - Basislösung (enthält Methylmethacrylat)
 - Härter-1
 - Härter-2
 - Regler
 - Poly-Methyl-Meth-Acrylat (PMMA)-Pulver

Durchführung:

Die aufgetauten Knochen wurden in je einer speziellen Gewebe-Plastikkassette gelagert und diese beschriftet. Anschließend wurden sie mittels einer formaldehydhaltigen Lösung unter Bewegung bei Raumtemperatur fixiert (*siehe Tabelle 5*). Am Ende der Fixierung wurde das Formaldehyd durch Spülung unter fließendem Leitungswasser entfernt und die Knochen in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Durch ein stufenweises Vorgehen, indem schwach- zu hochprozentigem Alkohol überging, wurden Schrumpfungen oder ein Zerreißen der Präparate vermieden. Anschließend wurden die Präparate für die Entfettung in Xylol gelagert. Dies diente als Intermedium zwischen dem Entwässerungsprozess und der Infiltration.

Vor der Einbettung wurden die Knochen zunächst in einer Präinfiltrationslösung und danach in einer Infiltrationslösung bei 0°C gelagert werden. Erst dann konnten sie in einem Polymerisationsgemisch (*Stammlösung A : Stammlösung B, 9:1*) eingebettet werden. Zur Herstellung dieser Lösungsgemische (*Präinfiltrations- & Infiltrationslösung, Stammlösung A & B*) wurde das Polymerisationssystem „Technovit9100neu“ auf der Basis von Methylmethacrylat (*MMA*) verwendet. Dieses eignet sich für die Hartschnitt-Technik zur Herstellung von Dünnschnitten von mineralisierten Geweben. Die nachstehenden Lösungen wurden nach Herstellerangaben gemäß in Tabelle 6 dargestellten Verarbeitungsschemas hergestellt. Hierfür wurde zunächst die Basislösung mittels AL_2O_3 -Chromographiesäule entstabilisiert. Für die Einbettung der Knochen waren spezielle Einbettplastikbecher nötig. Diese wurden etwa bis zur Hälfte mit dem Polymerisationsgemisch, welches erst kurz zuvor angemischt wurde, befüllt. Die Knochen wurden so gelagert, dass die anteriore Seite (Kondylen parallel) zum Becherdeckel zeigte. Der Becher wurde mit dem Gemisch aufgefüllt, mit dem Deckel verschlossen und anschließend in dem Kühlschrank für 4 Tage gelagert.

Tabelle 5 : Einbettungsschema

| Medium | Dauer | Einheit | Temp. |
|--------------------------------------|-------|---------|-------|
| Fixierlsg | 2 | Tage | RT |
| 30 min entwässern mit Leitungswasser | | | |
| 70% | 3 | Tage | RT |
| 80% | 3 | Tage | RT |
| 96% | 3 | Tage | RT |
| 96% | 3 | Tage | RT |
| 100% | 3 | Tage | RT |
| 100% | 3 | Tage | RT |
| Xylol | 2 | Tage | RT |
| Prä-infiltration | 2 | Tage | RT |
| Infiltration | 2 x 5 | Tage | RT |

RT: Raumtemperatur

Tabelle 6 : Verarbeitungsschema vom Polymerisationssystem Technovit 9100neu

| | Basislösung | PMMA-Pulver | Härter 1 | Härter 2 | Regler |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------|----------|-------------|-------------|
| Material-Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Präinfiltrationslösung | 200ml 190g | | 1g | | |
| Infiltrationslösung | ad 250 ml 237,5g | 20g | 1g | | |
| Stammlösung A | ad 500ml 475g | 80g | 3g | | |
| Stammlösung B | ad 50ml 47,5g | | | 4ml 4,3g | 2ml 1,7g |
| Polymerisationsgemische | 9 Volumenanteile Stammlösung A + 1 Volumenanteil Stammlösung B | | | | |

2.4.2 Herstellung von Schnittpräparaten

Geräte und Materialien:

- Handschleifgerät Phoenix 3000 (Jean Wirtz, Laborgeräte Vertriebs GmbH; Düsseldorf, Deutschland)
- Mikrotom SM 2500S (Leica Instruments GmbH; Nussloch, Deutschland)
- Schneidmesser Hartmetall, Schliff 16 cm (Leica Instruments GmbH; Nussloch, Deutschland)
- Presse (Eigenentwurf)
- Wärmeschrank Function line, Typ: B12 (Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products; Hanau, Deutschland)
- Objektträger HistoBond® 75 x 25 x 1 mm, ISO-Norm 8037/1 (Paul Marienfeld, Laboratory Glassware; Lauda-Königshofen, Deutschland)
- Schleifscheiben Discs, WS-Flex 18-C SK, 250 mm, P 60, (Hermes, Walter Messner GmbH; Oststeinbek/Hamburg, Deutschland)
- Schneidflüssigkeit (Fa. WIV; Schwetzingen, Deutschland)
- Streckflüssigkeit (20 ml *Butoxyethyl-Acetat* + 80 ml 70%iger Alkohol)
- Kisol-Folie (0,025 x 95 x 95 mm, farblos), Medim (Histotechnologie GmbH; Gießen, Deutschland)
- Filterpapier (58 x 58 cm)

Durchführung:

Um die histologischen Schnitte mit dem Mikrotom anfertigen zu können, mussten die Kunststoffblöcke zuerst mit einer Handschleifmaschine bearbeitet werden, damit die knochenferne Seite begradigt wurde. Mithilfe einer Wasserwaage wurde der Block so in das Mikrotom eingespannt, dass er mit der zu untersuchenden Seite waagrecht zum Messer lag. Das Messer wurde mit einem Winkel von 0-1° eingestellt. Nach optimaler Einstellung des Präparates zum Schneidemesser wurden vom Kunststoffblock und vom Knochen so viele Schnitte abgenommen, bis die Zielebene erreicht war. Als Zielebene wurde die komplette planparallele Darstellung der Diaphyse definiert. Während des Schneidevorgangs wurde sowohl der Block als auch das Messer permanent mit Schneideflüssigkeit benetzt, um so gute Schnittergebnisse zu gewährleisten bzw. ein Zerreißen der Schnitte zu vermeiden.

Von der Zielebene ausgehend wurden ca. zehn aufeinanderfolgende Schnitte mit einer Dicke von 6 µm angefertigt und je zwei Schnitte auf ein mit 70%igem Alkohol benetzten Objektträger gelegt. Anschließend wurden die Schnitte mit einer Streckflüssigkeit benetzt und mit einem Pinsel vorsichtig auseinander gezogen, um eine Faltenbildung zu vermeiden.

Über die gestreckten Präparate wurde eine Kisol-Folie gelegt und der überschüssige Alkohol mithilfe eines Filterpapiers abgesaugt. Um eine vollständige Haftung der Schnitte auf den Objektträgern zu gewährleisten, wurden sie für 3 Tage bei 60 °C in einem Brutschrank gepresst.

2.4.3 Färbung der histologischen Schnitte

Materialien und Lösungen:

- Glasküvetten
- Färbegestell für 10 Objektträger
- (2-Methoxyethyl)-Acetat (Merck-Schuchardt; Hohenbrunn, Deutschland)
- 100%iger Alkohol (Dr. K. Hollborn & Söhne; Leipzig, Deutschland)
- 96% - 80% - 70% - 60%iger Alkohol (*werden mit Aqua dest. entsprechend verdünnt*)
- Aqua dest. (B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland)

- 3%ige wässrige Silbernitrat-Lösung (Merck; Darmstadt, Deutschland)
- Natriumkarbonat-Formaldehyd-Lösung, min. 37% (Merck KgaA; Darmstadt, Deutschland)
- 5%ige Natriumthiosulfat-Lösung (Merck; Darmstadt, Deutschland)
- 0,5%ige Essigsäure (Merck KgaA; Darmstadt)
- Alcianblau (Chroma-Gesellschaft; Schmidt GmbH & Co.; Köngen)
- Weigert's Eisenhämatoxylin A und B (Chroma-Gesellschaft; Schmid GmbH & Co.; Köngen / N)
- Brillant Cocein-Säurefuchsin (Chroma-Gesellschaft; Schmidt GmbH & Co.;Köngen/N)
- 5%ige Phosphorwolframsäure (Chroma-Gesellschaft; Schmidt GmbH & Co.;Köngen/N)
- Saffron du Gâtinais (Chroma-Gesellschaft; Schmidt GmbH & Co.;Köngen)
- Xylol (Merck KgaA; Darmstadt, Deutschland)
- Vitro Clud (R. Langenbrinck; Emmendingen, Deutschland)

Durchführung:

Zur Färbung der histologischen Schnitte wurden zum einen die **Versilberung nach von-Kossa** zur Darstellung von mineralisiertem Knorpel- und Knochengewebe (*siehe Abbildung 6*) verwendet und zum anderen die **Movat-Pentachrom-Färbung**, die zur Darstellung von mineralisiertem Knochen und Osteoid dient (*siehe Abbildung 7*).

Bevor die Präparate gefärbt werden konnten, mussten diese zuerst entplastet werden. Dazu wurden vorsichtig die Kisol-Folien von den Objektträgern entfernt und anschließend in einer (2-Methoxyethyl)-Acetat-Lösung (MEA) gebadet. Danach wurden sie in einer absteigenden Alkoholreihe (100 - 96 - 80 - 70%igem Alkohol) und Aqua dest. rehydriert. Anschließend konnten die histologischen Färbungen durchgeführt werden.

Versilberung nach von-Kossa:

Nach dem Entplasten wurden jeweils zehn Objektträger mit den Präparaten in Färbegestelle platziert und in Glasküvetten mit vorbereiteten Chemikalien nach einem definierten Schema (*siehe Tabelle 7*) gefärbt. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte mit Vitro Clud und den Deckgläschen versiegelt.

Tabelle 7 : Schema zur Versilberung nach von-Kossa

| | |
|---------------------------------|-------------------------|
| 3% Silbernitratlösung | 5 min |
| Aqua dest. | 3 x Spülen |
| Natrium-Formaldehydlösung | 2 min |
| fließendes Leitungswasser | 10 min Spülen |
| 5%ige Natriumthiosulfat | 5 min |
| fließendes Leitungswasser | 10 min Spülen |
| 5%ige Natriumthiosulfat | 5 min |
| Leitungswasser | 10 min Spülen |
| Aqua dest. | kurzes Spülen |
| 70 – 80 – 96 – 100%igem Alkohol | je 2 min zum Entwässern |
| Xylol | 2 x 5 min |
| Vitro Clud | Versiegeln |

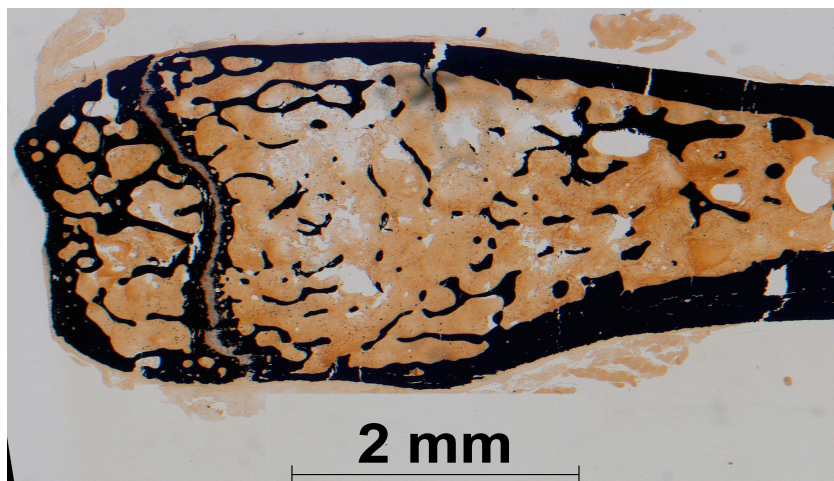


Abb. 6 : Histologischer Schnitt eines Mausfemur mit der Versilberung nach von-Kossa

Färbeergebnis:

Mineralisiertes Knorpel- und Knochengewebe: schwarz

Nichtmineralisierter Knorpel und Bindegewebe: braun

Movat-Pentachrom-Färbung:

Nach dem Entplasten wurden jeweils zehn Objektträger mit den Präparaten in Färbegestelle platziert. Die Schnitte wurden in Glasküvetten mit vorbereiteten Chemikalien nach einem bestimmten Schema (*siehe Tabelle 8*) gefärbt. Zum Schluss wurden diese mit Vitro Clud und den Deckgläschen versiegelt

Tabelle 8 : Schema zur Färbung nach Movat-Pentachrom-Färbung

| | |
|------------------------------|------------------|
| Alcianblau | 10 min |
| fließendes Leitungswasser | kurzes Spülen |
| Ethylalkohol | 60 min |
| fließendes Leitungswasser | 10 min |
| Aqua dest. | kurzes Spülen |
| Weigert´s Eisenhämatoxylin | 10 min |
| Leitungswasser | 15 min |
| Aqua dest. | kurzes Spülen |
| Brilant Crocein-Säurefuchsin | 10 min |
| 0,5%iger Essigsäure | kurzes Spülen |
| 5%igen Phosphorwolframsäure | 20 min |
| 0,5%igen Essigsäure | 2 min Spülen |
| 100%igem Alkohol | 3 x 5 min Spülen |
| Saffron du Gâtinais | 60 min |
| 100%igem Alkohol | 3 x Spülen |
| 100%igem Alkohol | 2 min |
| Xylol | 2 x 5 min |
| Vitro Clud | Versiegelung |

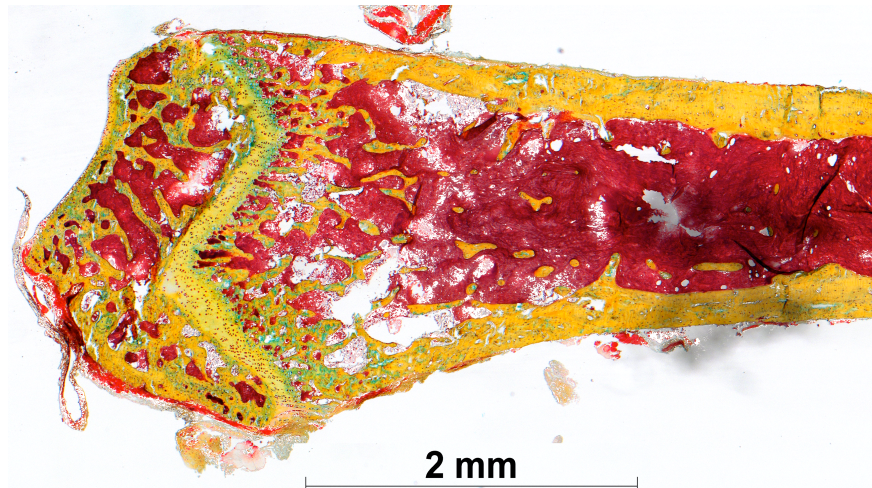


Abb. 7 : Histologischer Schnitt eines Mausfemur mit der Movat-Pentachrom-Färbung

Färbeergebnis:

| | |
|--------------------------|----------------|
| Mineralisierter Knochen: | leuchtend gelb |
| Mineralisierter Knorpel: | blau-grün |
| Osteoid: | dunkelrot |
| Zellkerne: | blauschwarz |

2.4.4 Auswertung der histologischen Schnitte

Material:

- Mikroskop: Leica DM R (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Objektiv, Vergrößerung 1,6 mm
- Kamera: AxioCam MRc5 Carl Zeiss
- Bildanalysesystem Zeiss KS 400

Durchführung:

Die gefärbten Schnitte wurden mithilfe eines Lichtmikroskops, welches mit einer Kamera ausgestattet war, zunächst einzeln abfotografiert und auf einem Computer gespeichert. Durch ein spezielles Bildanalyseprogramm war es möglich, die gefärbten Schnitte histomorphometrisch auszuwerten. Dabei wurde vor allem der distale Teil (*Trabekelstruktur*), sowie ein kurzer Teil des Schaftes (*Kortex*) der Mäusefemur betrachtet und auf folgende Parameter hin untersucht:

- Region of Interest (*ROI*)
- Trabekel (Fläche, Länge, Ausrichtung, Verzweigung)
- Kortex (Dicke)
- Schaftdicke

Die erhobenen Daten konnten in Korrelation zu Ergebnissen des μ CT gesetzt werden, da die Region of Interest (*ROI*) genau dem ausgewerteten Bereich des μ CT entsprach.

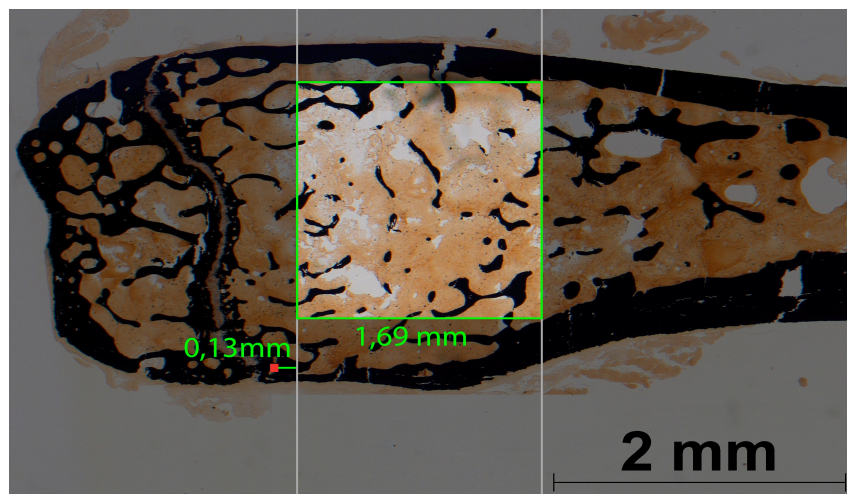


Abb. 8 : Knochen mit eingezeichneter ROI (*Region of Interest*)

Zuerst wurde die ROI festgelegt. Diese wurde in einem definierten Abstand von 0,13 mm vom proximalen Punkt der Epiphysenfuge (*siehe Abbildung 8: roter Punkt*) aus gemessen. Die Höhe war ebenfalls standardisiert mit 1,69 mm. Dies entsprach der ausgewählten Höhe vom μ CT (*siehe unter Punkt 2.3 μ CT*).

Die Breite war von der Markraumbreite des jeweiligen Knochens abhängig, so dass jeder Knochen eine andere ROI besaß, die Parameter aber immer in das Verhältnis gesetzt wurden.

Anhand der festgelegten ROI errechnete das Bildanalyseprogramm durch Farberkennung die zu analysierenden Parameter. Die computergestützte Auswertung der verschiedenen Gewebe basierte auf der automatischen Erkennung der unterschiedlichen Anfärbungen. Jedoch war eine Überprüfung am Mikroskop immer nötig und eine eventuelle manuelle Korrektur der markierten Gewebeareale möglich.

Die Auswertung der mit Movat-Pentachrom-gefärbten Schnitte erfolgte rein deskriptiv.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten von den radiologischen und histomorphometrischen Untersuchungen wurde mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 14.0, SPSS Inc. Chicago, Illinois) durchgeführt. Für die gewonnenen Daten wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Diese Ergebnisse wurden graphisch in Form von Diagrammen (*im zeitlichen Verlauf*) dargestellt.

Da es sich bei den Ergebnissen der einzelnen Gruppen um unabhängige, nicht-parametrisch verteilte Daten handelte, wurde der Mann-Whitney-Test angewendet.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des systemischen Einflusses auf die trabekuläre und kortikale Struktur des Knochens bei Leberschaden mittels radiologischer (μCT) und histomorphologischer Methoden. Für diesen Versuch wurden BALB/c-Mäuse verwendet, die eine Mutation in dem *mdr2*-Gen aufweisen, um somit das Krankheitsbild Leberzirrhose nachzustellen. Dieses *mdr2*-Gen ist homolog zu dem menschlichen *mdr3*-Gen und aus diesem Grund für die Forschung an der Leberzirrhose und dessen systemischen Einflüsse sehr gut geeignet.

3.1 Längenmessungen der Mausknöchel

Mithilfe eines Messschiebers wurden die Knochen in ihrer gesamten Länge vermessen und untereinander verglichen. Dabei ergibt sich in beiden Untersuchungsgruppen eine Längenzunahme mit steigendem Alter. Zwischen den *MDR2*^{-/-}-Mäusen und den Wildtypen ist in der Knochenlänge kein Unterschied zu erkennen (*siehe Tabelle 9*). Auch im Vergleich zwischen den Geschlechtern weisen die Knochen eine nahezu gleiche Länge auf.

Tabelle 9 : Längenmessung [in cm] der Mausknöchel über die Zeit

| Alter / Gruppe | 5. Wo | 15. Wo | 20. Wo | 30. Wo | 44. Wo |
|----------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| <i>MDR2</i> ^{-/-} | 1,2 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,7 |
| Wildtyp | 1,2 | 1,5 | 1,6 | 1,7 | 1,7 |

Einheiten in cm; Wo= Wochen

3.2 μ CT – Daten

Die Mausknöchel wurden in zwei definierten Bereichen, im trabekulären Netzwerk und in der Kortikalis, untersucht und verglichen (*siehe Abbildung 9*).

Für den trabekulären Bereich wurde ein „Volume of interest“ (VOI) mit einer Länge von 1,42 mm definiert, das 0,1 mm vom proximalen Ende der Metaphyse beginnt. Das VOI für den kortikalen Bereich beträgt 0,5 mm aus der Knochenschaftmitte.

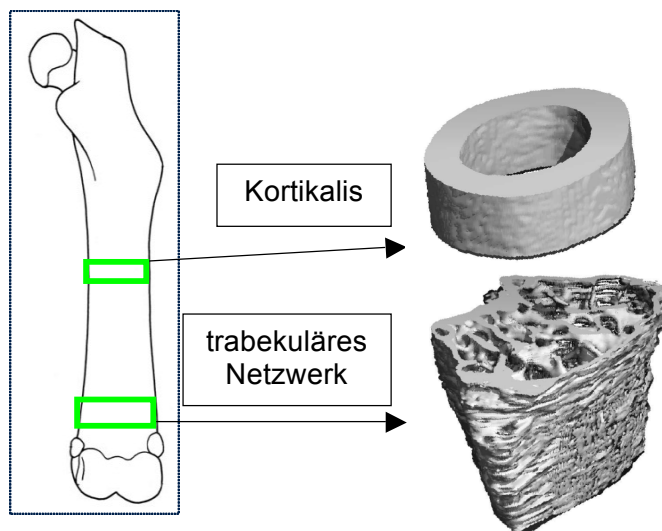


Abb. 9: Bearbeitete Bereiche des Knochens beim μ CT

3.2.1 Vergleich der trabekulären Mikrostruktur an MDR2^{-/-}-Maus und Wildtyp

Zunächst wurde anhand der Scanbilder des μ CT eine rein deskriptive Beurteilung durchgeführt und anschließend wurden die Knochenscans mithilfe eines μ CT-Evaluations-Programms ausgewertet (*Abbildung 11 a-h*).

Um die nachstehenden Bilder und Diagramme besser beurteilen zu können, ist im Folgenden ein Bild dargestellt, in dem die wichtigsten Parameter des kortikalen Bereiches eingezeichnet sind (*siehe Abbildung 10 a*). Aus dem trabekulären Bereich dieses Bildes wurde ein Teilausschnitt herausgenommen und dieser daneben vergrößert, um so die wichtigen Parameter des trabekulären Netzwerkes darzustellen (*siehe Abbildung 10 b*).

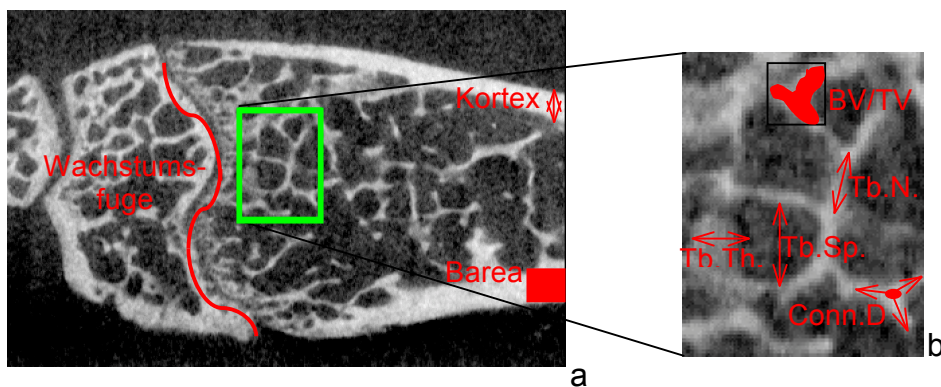


Abb. 10 : μ CT-Bilder zur Darstellung einzelner Parameter

- Bild a: mit Wachstumslinie und Kortex sowie mit dem Parameter Knochenfläche (*Barea*)
- Bild b: Ausschnitt des trabekulären Bereiches aus Bild a mit den Parametern
 Trabekelanzahl (*Tb.N.*), Trabekeldicke (*Tb.Th.*), Trabekelabstand (*Tb.Sp.*),
 Konnektivität (*Conn.D.*) und Knochenvolumenanteil im Quadrat (*BV/TV*)

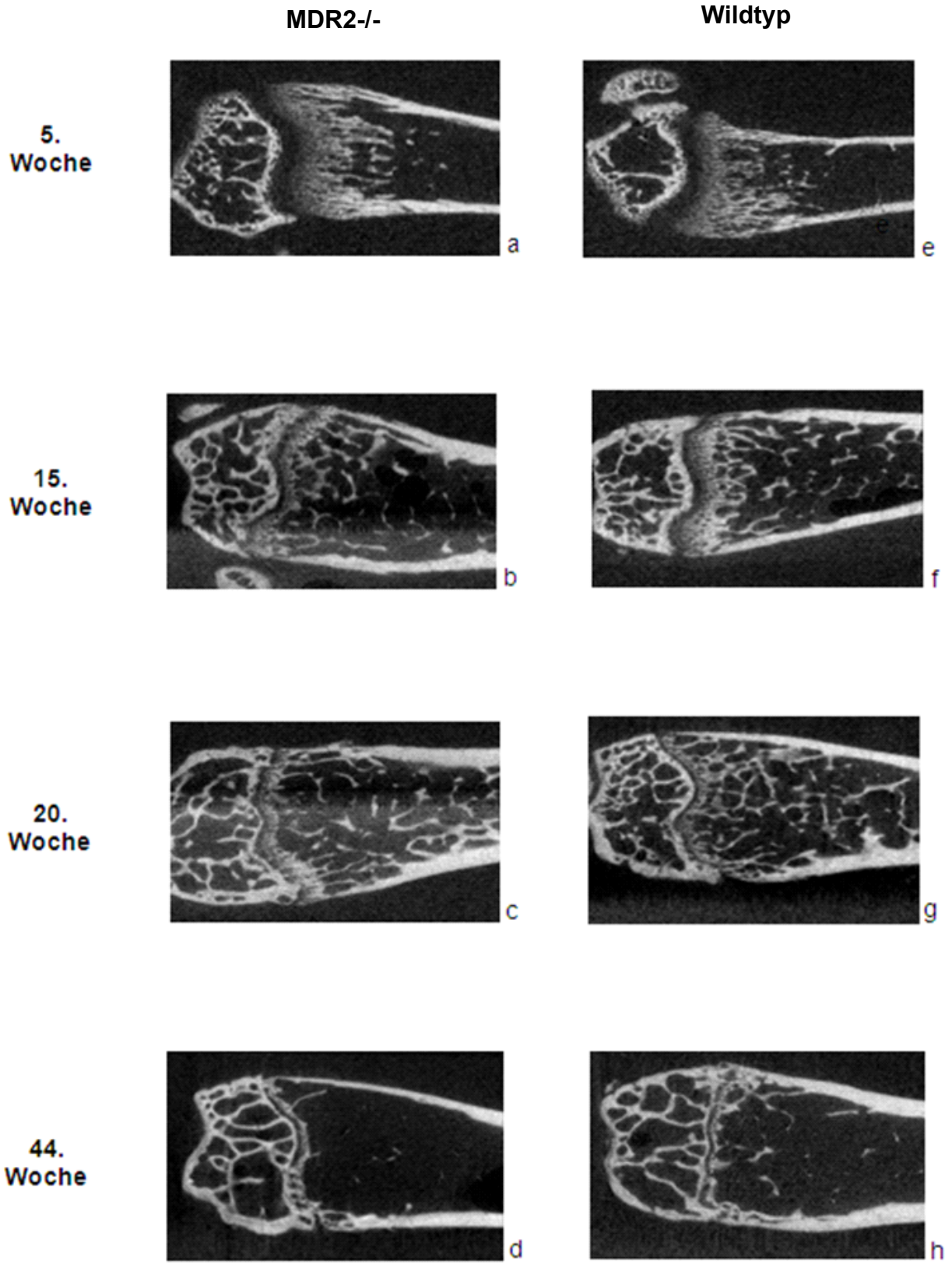


Abb.11: μ CT-Bilder zur Darstellung des Trabekelnetzwerkes zu unterschiedlichen Zeitpunkten von MDR2^{-/-} und Wildtyp

Lebensalter in Wochen (5,15,20,44); a-d: MDR2^{-/-} Mäuse; e-h: Wildtyp

Es ist bereits an den Beispielbildern zu erkennen, dass sich die Anzahl der Trabekel sowie die Knotenpunkte im Laufe der Zeit verändern. Während die Trabekel in beiden Untersuchungsgruppen in der 5. Woche nahe an der Wachstumsfuge angeordnet sind und fast ausschließlich parallel zueinander verlaufen, verändert sich in den nachfolgenden Zeitpunkten ihre Ausrichtung. Somit gehen die Trabekel untereinander Verbindungen ein und bilden damit das trabekuläre Netzwerk aus. Dieses Netzwerk ist bei den MDR2^{-/-}-Mäusen, wie auch bei den Wildtypen in der 15. Woche in Ansätzen erkennbar und erreicht in der 20. Woche sein Maximum. Allerdings ist das Trabekelwerk bei den Wildtypen stärker ausgebildet. Dabei verändern die Trabekel nicht nur ihre Ausrichtung, sondern entfernen sich von der Wachstumsfuge in Richtung Knochenchaftmitte. Es ist in beiden Gruppen zu sehen, dass im Vergleich zur 5. und 15. Woche die Trabekel in der 20. Woche weiter in das Knocheninnere reichen und somit eine größere Fläche für das Netzwerk einnehmen.

Mit zunehmendem Alter nimmt die Anzahl der Trabekel wieder stark ab, was zum Zeitpunkt der 44. Woche eindrucksvoll anhand der μ CT-Bilder zu erkennen ist. Während die MDR2^{-/-}-Gruppe nur noch vereinzelte Trabekel aufweist, ist bei den Wildtypen noch ein kleines trabekuläres Netzwerk erkennbar.

Ebenfalls zu beobachten ist, dass sich die Wachstumsfuge mit dem Alter verändert. In der 5. Woche stellt sie sich in beiden Gruppen sehr breit dar, wohingegen die Wachstumsfuge in den folgenden Zeitpunkten immer schmaler wird und sie letztendlich in der 44. Woche nur noch sehr dünn ist.

Um die Veränderungen in der Knochenstruktur auch objektiv beurteilen zu können, wurden für das trabekuläre Netzwerk spezifische Parameter näher betrachtet.

Die detaillierten Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt (*siehe Abbildung 12-16*):

Die Untersuchung des Knochenvolumenanteils zeigt nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Bis zur 15. Woche nimmt bei der MDR2^{-/-}-Gruppe, wie auch bei den Wildtypen der Knochenvolumenanteil zu. Ab diesem Zeitpunkt zeigt sich jedoch bei den MDR2^{-/-}-Mäusen eine kontinuierliche Abnahme. Bei den Wildtypen hingegen bleibt es bis zur 20. Woche konstant und fällt erst danach auf das Niveau der MDR2^{-/-}-Mäuse ab (siehe Abbildung12).

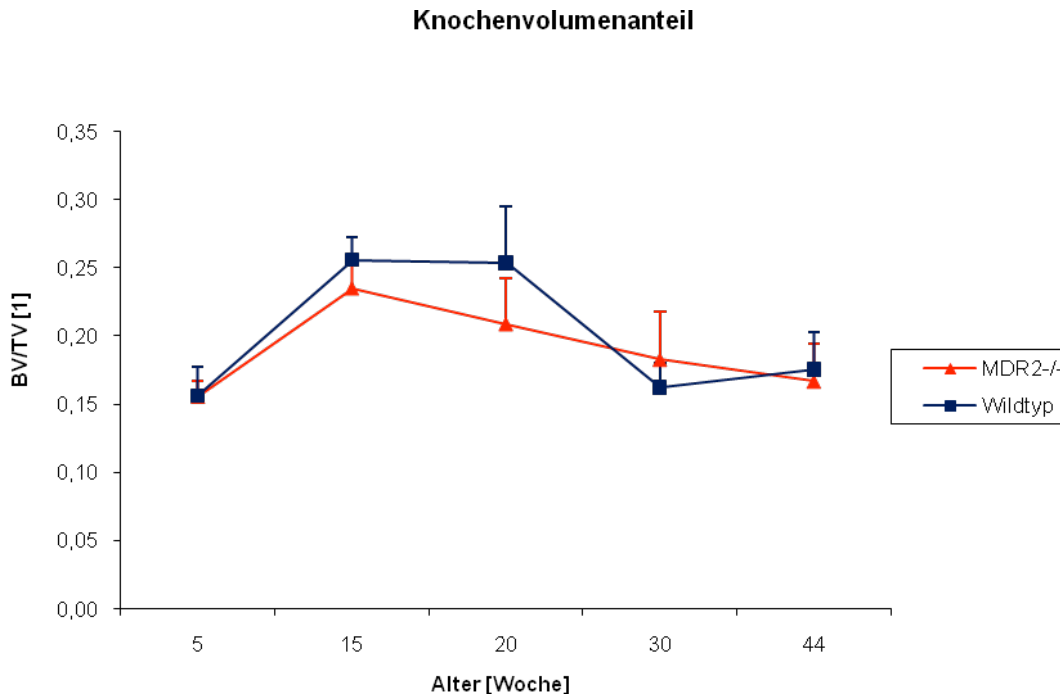


Abb. 12 : Knochenvolumenanteil der MDR2^{-/-}-Gruppe (rot) im Vergleich zum Wildtyp (blau)

Weitere wichtige Parameter zur Beurteilung des Trabekelwerkes sind die Anzahl und Dicke der einzelnen Trabekel sowie der Abstand zwischen diesen.

An den Abbildungen 13, 14 und 15 ist der zeitliche Verlauf dieser Parameter von MDR2^{-/-} und Wildtyp dargestellt:

Hierbei ist zu erkennen, dass die Anzahl der Trabekel bei beiden Untersuchungsgruppen bis zur 15. Woche ansteigt, wobei der Wildtyp signifikant mehr Trabekel ausbildet. Während in der MDR2^{-/-}-Gruppe ab der 15. Woche eine Verminderung der Trabekelanzahl zu erkennen ist, bleibt bei dem Wildtyp die Anzahl nahezu konstant.

Somit ist auch in der 20. Woche ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen darstellbar. Allerdings nimmt auch bei dem Wildtyp mit zunehmenden Alter die Trabekelanzahl ab.

Dies bestätigt auch das Ergebnis des Trabekelabstandes, der bei der Wildtyp-Gruppe dementsprechend bei der 15. Woche geringer ist als bei der MDR2^{-/-}-Gruppe. In der 20. Wochen ist eine Signifikanz zwischen den beiden Untersuchungsgruppen zu erkennen. Bei der Untersuchung der Trabekeldicke zeigt sich kein wesentlicher Unterschied im zeitlichen Verlauf.

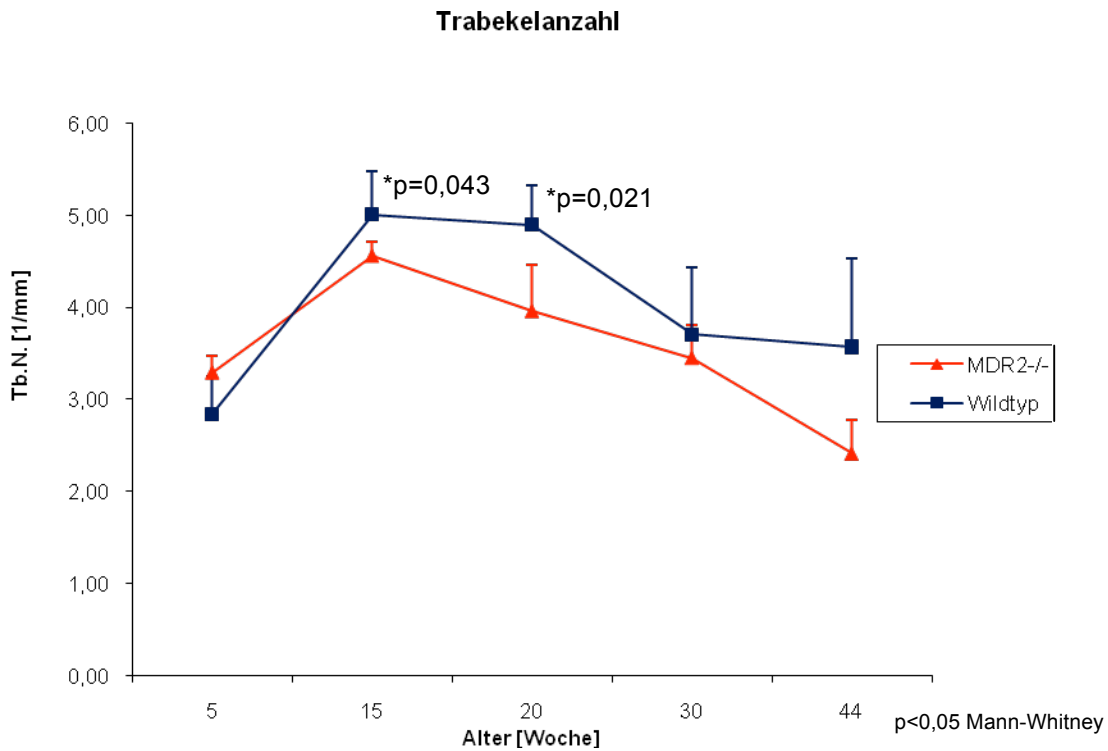


Abb. 13 : Gegenüberstellung von Trabekelanzahl im zeitlichem Verlauf

MDR2^{-/-} (rot) zeigt vor allem in der 15. und 20. Woche eine größere Anzahl von Trabekeln im Vergleich zum Wildtyp (blau)

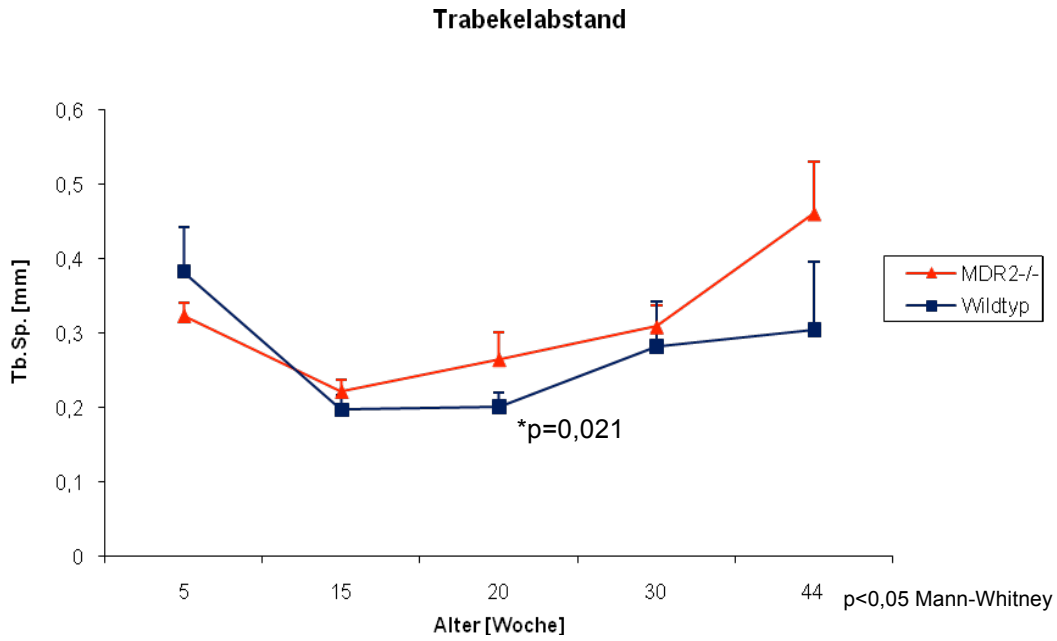


Abb. 14 : Trabekelabstand im Vergleich MDR2^{-/-} und Wildtyp

Die Wildtypen (*blau*) zeigen ab der 15. Woche und mit zunehmenden Alter einen geringeren Abenstand zwischen den Trabekel im Vergleich zu den MDR2^{-/-} Mäusen (*rot*)

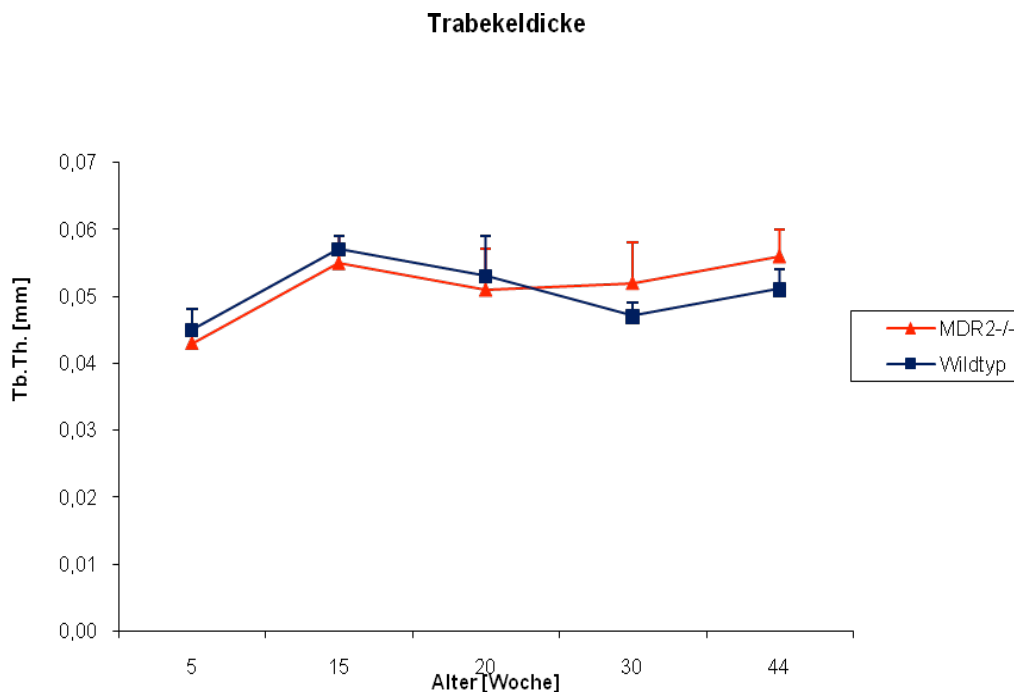


Abb. 15 : Trabekeldicke im zeitlichem Verlauf von MDR2^{-/-} (*rot*) und Wildtypen (*blau*)

Die Knochenmineraldichte ist ebenfalls ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Knochenqualität. Die Werte der beiden Untersuchungsgruppen verhalten sich über die Zeit sehr ähnlich, so dass hier keine größeren Unterschiede sichtbar sind.

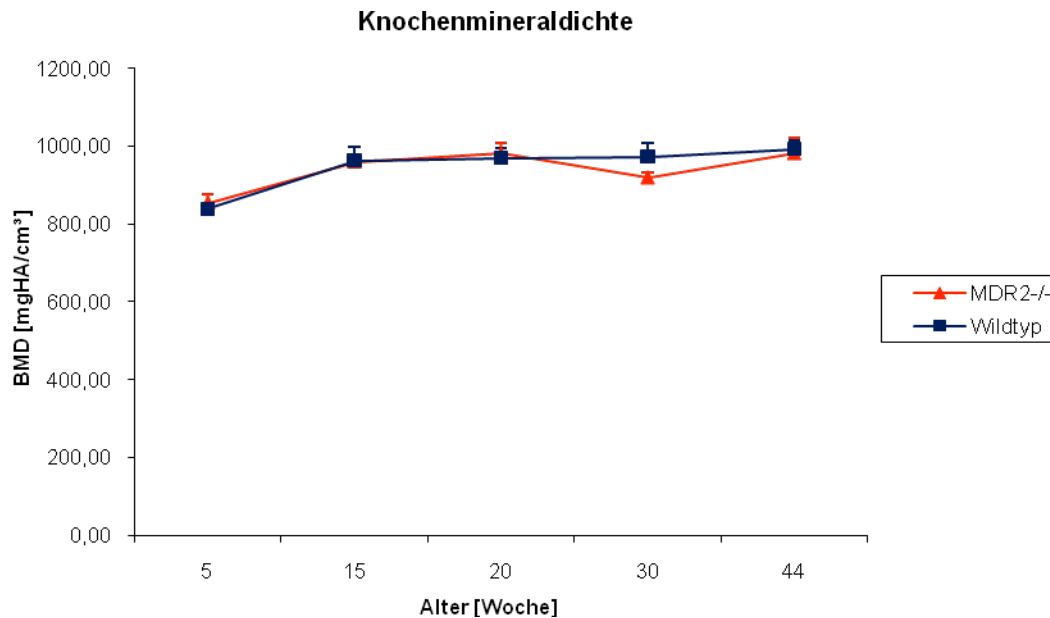


Abb. 16 : Darstellung der Knochenmineraldichte (*BMD*) von MDR2^{-/-} (rot) und Wildtyp (blau)

Die Parameter „Structur Model Index“ (*SMI*) und die Konnektivität (*Conn.D*) werden in der Tabelle 10 dargestellt.

Der *SMI* ist zur Quantifizierung der Mikroarchitektur des trabekulären Netzwerkes hilfreich, welches aus plattenförmigen (*Werte bei 0*) bzw. stabförmigen (*Werte bei 3*) Trabekel aufgebaut sein kann. Ein reales Trabekelwerk besteht jedoch aus Übergangsformen und weist somit Werte zwischen 0 und 3 auf (*siehe unter Punkt 2.3.2*). Bei dem Wildtyp zeigt sich gegenüber der MDR2^{-/-}-Gruppe in der 20. Woche ein signifikanter Unterschied beim *SMI*. Zu anderen Zeitpunkten, wie auch bei der *Conn.D.*, unterscheiden sich die Untersuchungsgruppen nur sehr gering.

Tabelle 10 : Ergebnisse von Struktur Model Index und Connectivity Densitiy

| Parameter | Alter (Woche) | MDR2 ^{-/-} | Wildtyp |
|---------------------------------------------------------------|---------------|---------------------|----------|
| Struktur-Model- Index (SMI) [Einheit:1] | 5 | 1,67 | 1,57 |
| | 15 | 1,01 | 1,04 |
| | 20 | 0,70 | 0,82 |
| | 30 | 1,34 | 0,98 |
| | 44 | 1,30 | 1,04 |
| Connecitivity Density (Conn.D.) [mm ⁻³] | 5 | 463,47 | 426,27 |
| | 15 | 318,22 | 367,21 |
| | 20 | 186,76 | 347,42 * |
| | 30 | 336,87 | 273,42 |
| | 44 | 236,37 | 268,89 |

* : p= 0,021 (p<0,05 Mann-Whitney)

3.2.2 Vergleich der Kortikalis an MDR2^{-/-}-Maus und Wildtyp

Im kortikalen Bereich wurde wie beim trabekulären Netzwerk die Parameter Knochenvolumenanteil, Knochendichte, Struktur-Model-Index und Connectivity Density analysiert sowie zusätzlich die Knochenfläche untersucht und ausgewertet. Bis auf die Knochendichte sind keine signifikanten Unterschiede zwischen der MDR2^{-/-}-Gruppe und dem Wildtyp zu beobachten.

Im Folgenden sind die detaillierten Ergebnisse graphisch (siehe Abbildung 17-19) und tabellarisch (siehe Tabelle 11) dargestellt:

Die Untersuchung des Knochenvolumenanteils ergibt keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Werten der MDR2^{-/-}-Gruppe und des Wildtyps.

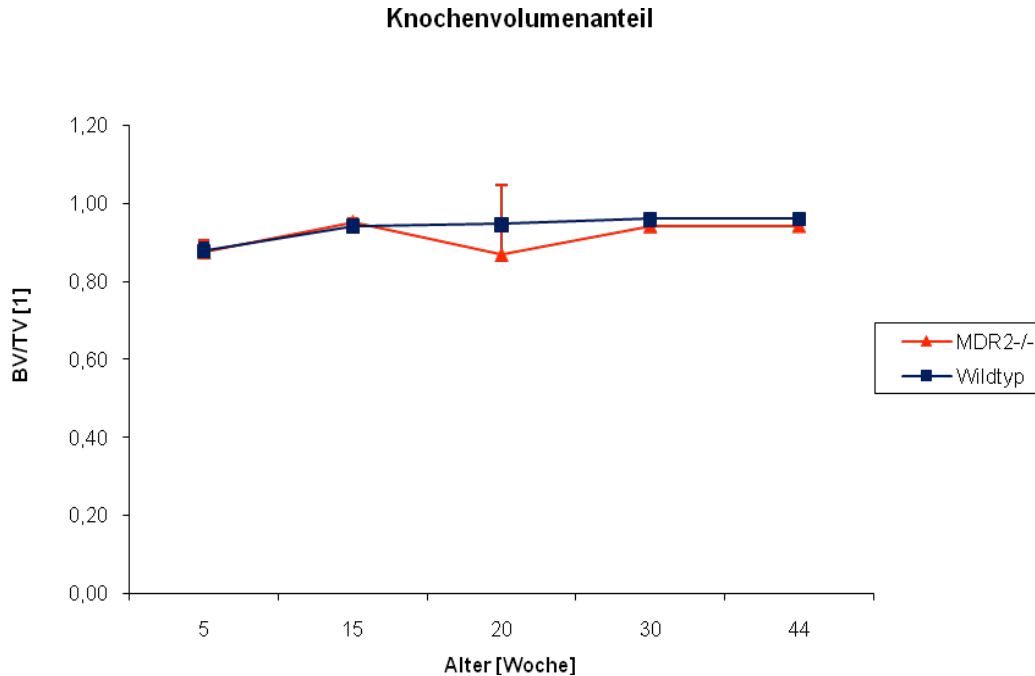


Abb. 17 : Zeitlicher Verlauf vom Knochenvolumenanteil von MDR2^{-/-} (rot) und Wildtyp (blau)

Bei der Knochenmineraldichte ist zu erkennen, dass die MDR2^{-/-}-Tiere gegenüber denen des Wildtyps einen besser mineralisierten Kortex aufweisen; vor allem in der 15. Woche ist ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennbar. Im weiteren zeitlichen Verlauf nähern sich die Werte der beiden Untersuchungsgruppen auf ein gemeinsames Niveau an.

Die Untersuchung der Knochenfläche zeigt, dass sie von der 5. bis zur 20. Woche in beiden Gruppen ansteigt. Während bei der MDR2^{-/-}-Gruppe die Knochenfläche ab der 20. Woche abnimmt, steigt sie bei dem Wildtyp weiter leicht an, so dass die Wildtypen in der 30. und 44. Woche eine signifikant größere Knochenfläche aufweist.

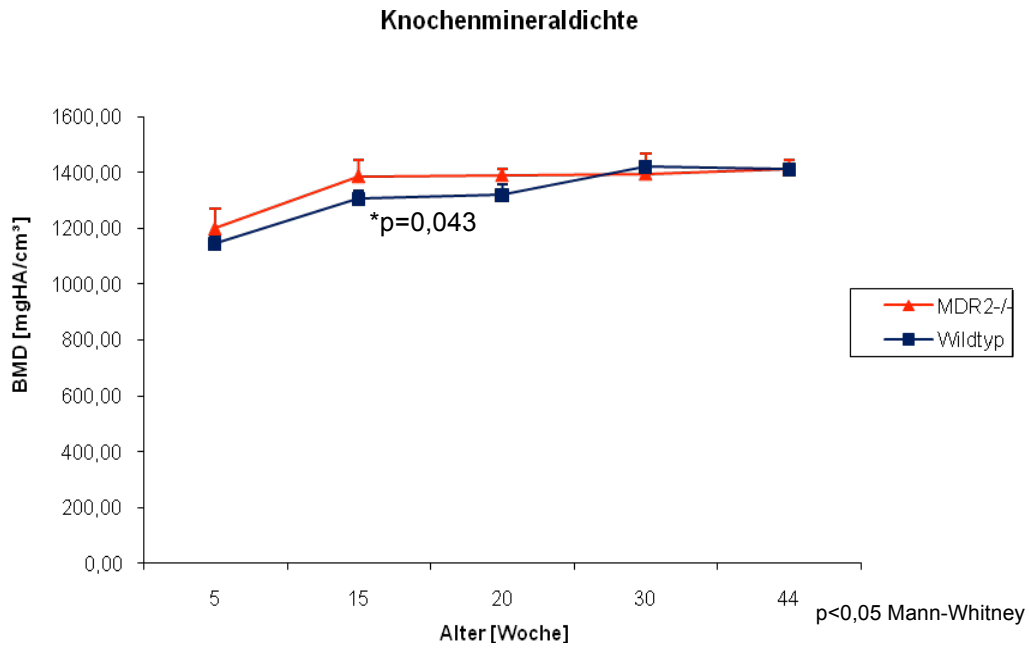


Abb. 18 : Gegenüberstellung von MDR2^{-/-} und Wildtyp von der Knochenmineraldichte

Die Knochen der MDR2^{-/-}-Mäuse (*rot*) sind in den ersten Lebenswoche, vor allem in der 15. Woche, stärker mineralisiert im Vergleich zu den Wildtypen (*blau*), ab der 20. Woche nimmt die Knochenmineraldichte bei den Wildtypen zu

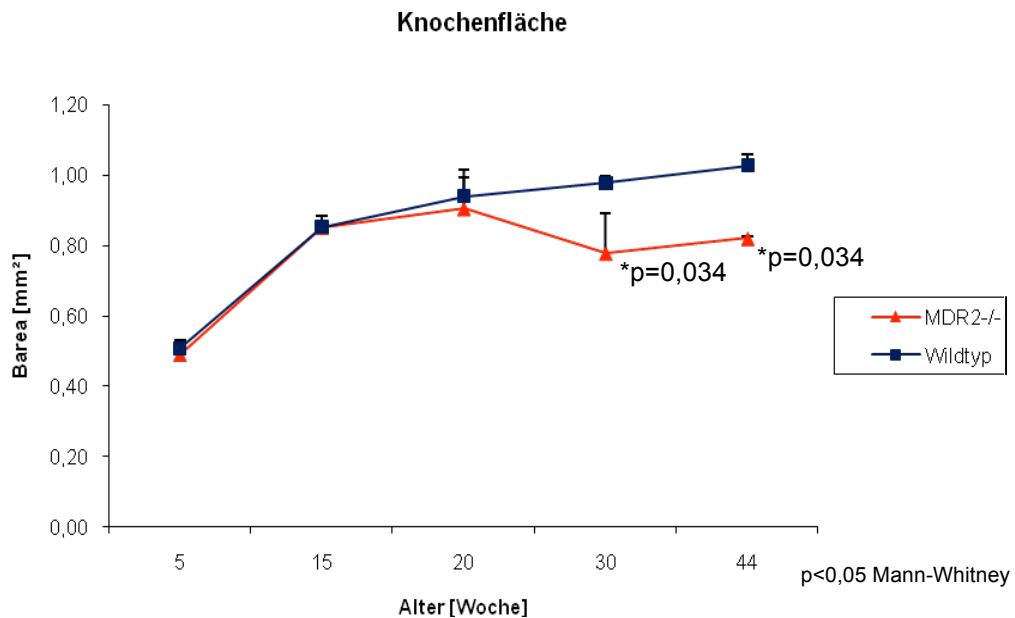


Abb. 19 : Knochenfläche von MDR2^{-/-} und Wildtyp

Die Wildtypen (*blau*) zeigen in der 30. und 44. Woche eine signifikant größere Knochenfläche gegenüber den MDR2^{-/-}-Mäusen (*rot*)

Tabelle 11 : Ergebnisse von Struktur Model Index

| Parameter | Alter (Woche) | MDR2 ^{-/-} | Wildtyp |
|-------------------------------------------|---------------|---------------------|---------|
| Struktur-Model- Index (SMI) [Eineit:1] | 5 | 0,51 | 0,4 |
| | 15 | 0,86 | 0,81 |
| | 20 | 0,94 | 0,47 |
| | 30 | 0,78 | 0,93 |
| | 44 | 1,35 | 0,87 |

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die Knochenstruktur der MDR2^{-/-}-Mäuse gegenüber der des Wildtyps über die Zeit in den untersuchten Bereichen unterscheidet. Vor allem im trabekulären Bereich, nach Auswertung spezifischer Parameter des μ CT-Evaluations-Programms, ist bei den MDR2^{-/-}-Mäusen hauptsächlich in der 20. Lebenswoche ein schlechter entwickeltes Trabekelnetzwerk im Vergleich zu den Wildtypen zu erkennen. Dies ist anhand der geringeren Anzahl von Trabekeln und somit einem größeren Abstand zwischen diesen, aber auch an der geringeren Trabekeldicke auszumachen. Allerdings ist bei der Knochenmineraldichte nur ein minimaler Unterschied zwischen den Untersuchungsgruppen zu erkennen. Anders ist dies im kortikalen Bereich, wo die MDR2^{-/-}-Gruppe vor allem in der 15. Woche eine höhere Knochenmineraldichte aufweist als die Wildtypgruppe. In den nachfolgenden Zeitpunkten nähern sich die Werte auf ein Niveau an. Allerdings nimmt die Knochenfläche zu diesen Zeitpunkten bei den MDR2^{-/-}-Mäusen ab, während sie bei den Wildtyp weiter leicht steigt.

3.3 Histomorphologische Auswertung

3.3.1 Ergebnisse der Versilberung nach von-Kossa-Färbung

Für die histologische Beurteilung wurden die 6 μm dünnen Schnitte nach der von-Kossa-Methode gefärbt und mithilfe eines speziellen Bildanalyseprogramms ausgewertet.

Diese Daten können mit den Daten aus dem μCT verglichen werden, da die „Region of interest“ (ROI) der Histologie dem ausgewerteten Bereich des μCT entspricht (siehe 2.2.4 Abb. 8).

Um die folgenden Bilder und Diagramme besser beurteilen zu können, sind in den nachstehenden histologischen Schnittbildern (Abbildung 20a und b) wichtige Strukturen und Parameter eingezeichnet.

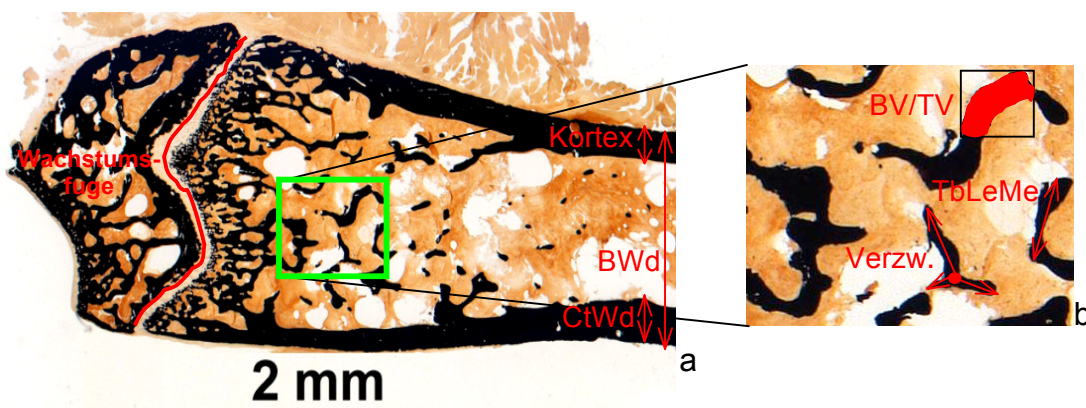


Abb. 20 : histologisches Schnittbild zur Darstellung von Parametern

Bild a: mit Wachstumslücke und Kortex, sowie mit den Parametern Knochenbreite (BWd) und Kortexdicke (CtWd)

Bild b: vergrößerter Ausschnitt des trabekulären Bereiches aus Bild a mit den Parametern Trabekellänge (TbLeMe), Verzweigung (Verzw.) und Knochenvolumenanteil (BV/TV)

An den folgenden Beispielbildern (*siehe Abbildung 21 a-h*) ist deskriptiv zu erkennen, dass auch hier im trabekulären Bereich Unterschiede zwischen den MDR2^{-/-}-Mäusen und den Wildtypen vorliegen. Wie auch bei den μ CT-Bildern ist zu erkennen, dass die Trabekel in beiden Gruppen in der 5. Woche nahezu parallel verlaufen und sich mit zunehmendem Alter die Trabekelausrichtung verändert, so dass sich ab der 15. Woche eine Vernetzung der Trabekel darstellt. Ebenfalls ist zu beobachten, dass die Anzahl der Trabekel von der 5. zur 15. Woche bei den MDR2^{-/-}-Mäusen sowie bei den Wildtypen ansteigt. Zu den nachfolgenden Zeitpunkten ist eine Abnahme der Trabekelanzahl in beiden Gruppen zu erkennen, allerdings sind bei der MDR2^{-/-}-Gruppe im Vergleich zum Wildtyp vor allem in der 20. und 44. Woche subjektiv weniger Trabekel zu beobachten. Auch bei der Wachstumsfuge sind, wie auch im μ CT, Veränderungen in beiden Untersuchungsgruppen im zeitlichen Verlauf erkennbar. Während sie sich in der 5. Woche noch sehr breit darstellt, zeigt sie sich bereits in der 15. Woche schmal und wird mit zunehmendem Alter nur noch minimal dünner.

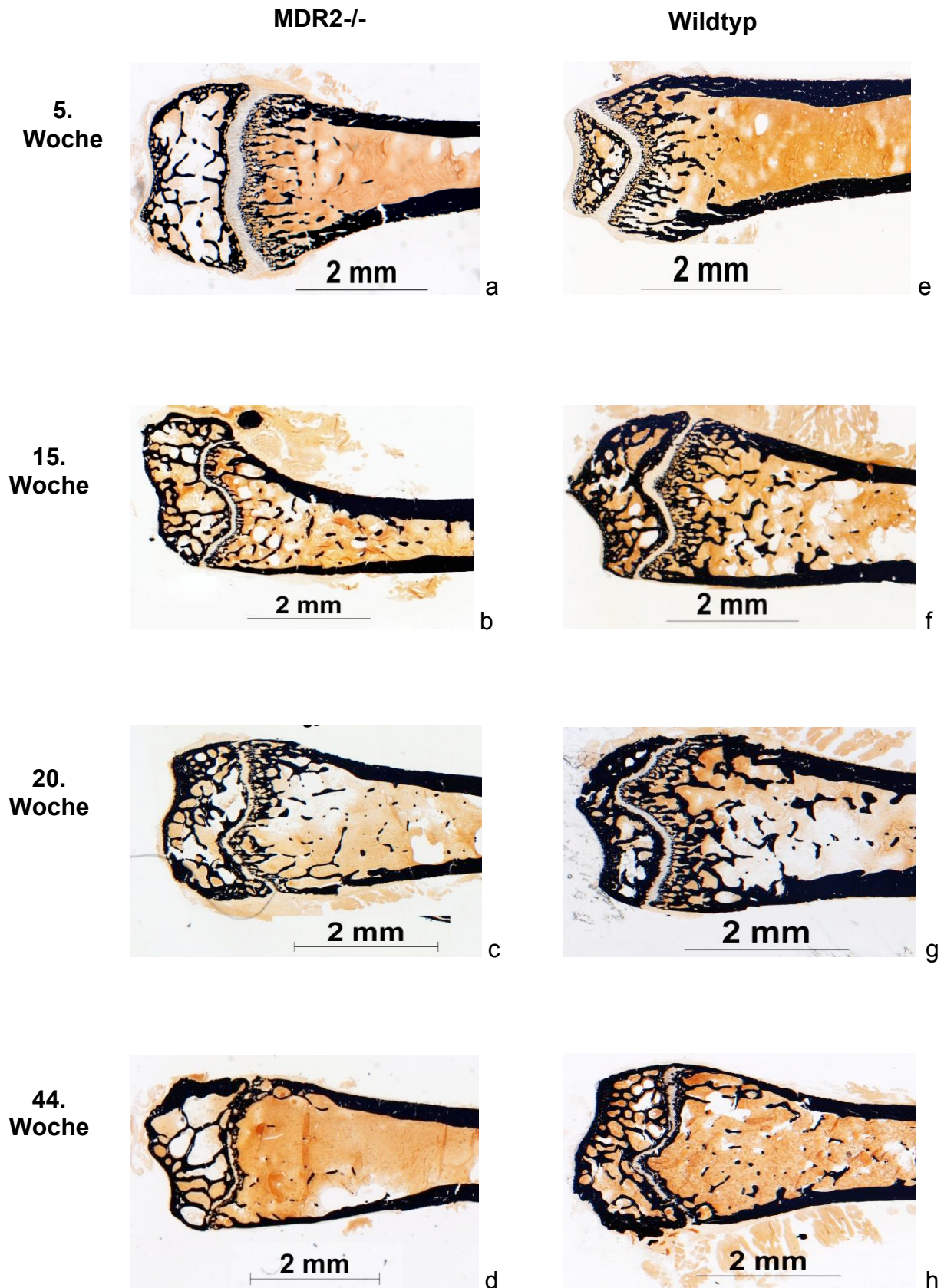


Abb. 21 : Histologische Schnittbilder von der Versilberung nach von-Kossa
 Lebensalter in Wochen (5,15,20,44); a-d: MDR2^{-/-}-Mäuse; e-h: Wildtyp
 Mineralisiertes Knorpel- und Knochengewebe stellt sich schwarz und
 nichtmineralisierter Knorpel und Bindegewebe braun dar.

Um das Ganze auch objektiv beurteilen zu können, wurden bestimmte Parameter näher betrachtet. Die detaillierten Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt (*siehe Abbildung 22-26*):

Für die histomorphometrische Auswertung des trabekulären Netzwerkes wurden spezifische Parameter näher untersucht. Dazu gehören die Dichte der Trabekel, sowie deren Länge und Verzweigungen (*siehe Abbildung 22-24*).

Die Trabekeldichte weist bei beiden Untersuchungsgruppen in der 5. Woche einen nahezu gleichen Ausgangswert auf. Über die Zeit ist zu beobachten, dass die Dichte der Trabekel bei den Wildtypen bis zur 15. Woche stark zunimmt, allerdings mit zunehmendem Alter fast genauso stark wieder abfällt. Die MDR2^{-/-}-Gruppe zeigt dagegen ab der 5. Woche eine stetige Abnahme der Trabekeldichte und ist insgesamt durchgehend geringer als bei den Wildtypen. Somit ergeben sich in der 15. und auch 44. Woche signifikante Unterschiede zwischen den MDR2^{-/-}-Mäusen und den Wildtypen.

Für die Untersuchung der Trabekellänge wurden alle in der ROI befindlichen Trabekel in ihrer Länge vermessen und daraus die durchschnittliche Trabekellänge berechnet. Es zeigt sich, dass bei den Wildtypen die Länge bis zur 15. Woche zunimmt, während sie bei den MDR2^{-/-}-Mäusen fast konstant beim Ausgangswert bleibt. Es ist zu diesem Zeitpunkt eine Signifikanz zwischen den beiden Gruppen zu erkennen. Im zeitlichen Verlauf werden die Trabekel der zwei Untersuchungsgruppen kürzer; allerdings sind sie auch in der 44. Woche bei der Wildtypgruppe im Vergleich zu der MDR2^{-/-}-Gruppe signifikant länger.

Die Verzweigung der Trabekel gibt eine Aussage darüber, wie sehr die einzelnen Trabekel untereinander im Kontakt stehen. An dem Graphen in Abbildung 24 ist zu erkennen, dass die Wildtypen gegenüber der MDR2^{-/-}-Gruppe über dem gesamten Untersuchungszeitraum mehr Verzweigungen innerhalb des Trabekelwerkes aufweisen. Vor allem in der 15., 20. und 44. Woche sind signifikante Unterschiede erkennbar.

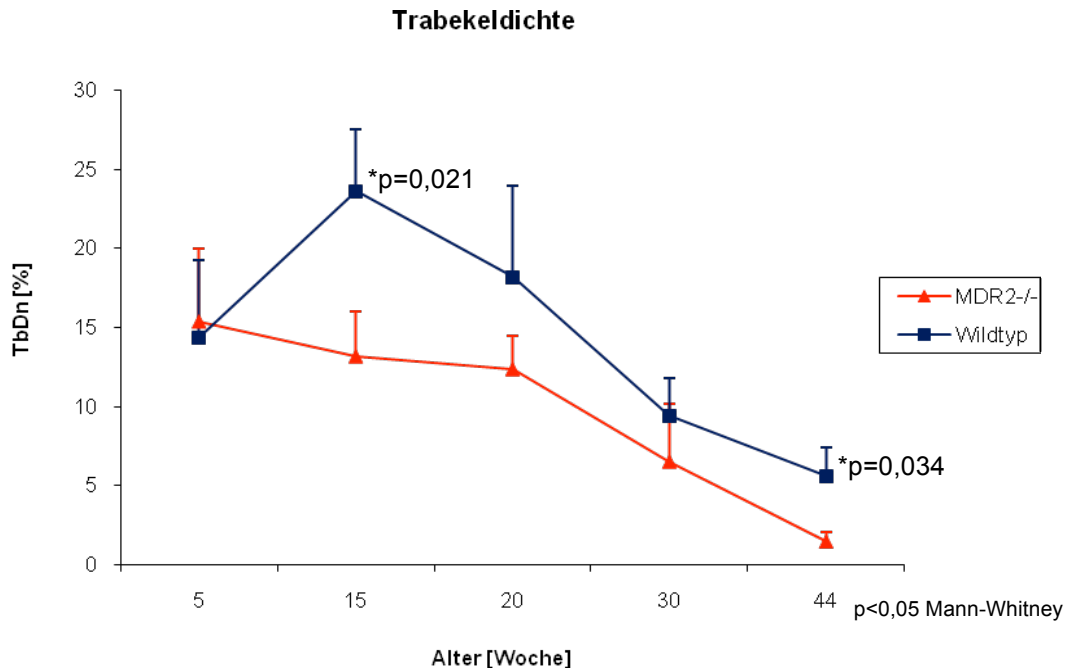


Abb. 22 : Trabekeldichte von MDR2^{-/-} und Wildtyp

Über den gesamten zeitlichen Verlauf ist die Trabekeldichte bei den Wildtypen (*blau*) größer als bei den MDR2^{-/-}-Mäusen (*rot*), mit signifikantem Unterschied in der 15. und 44. Woche

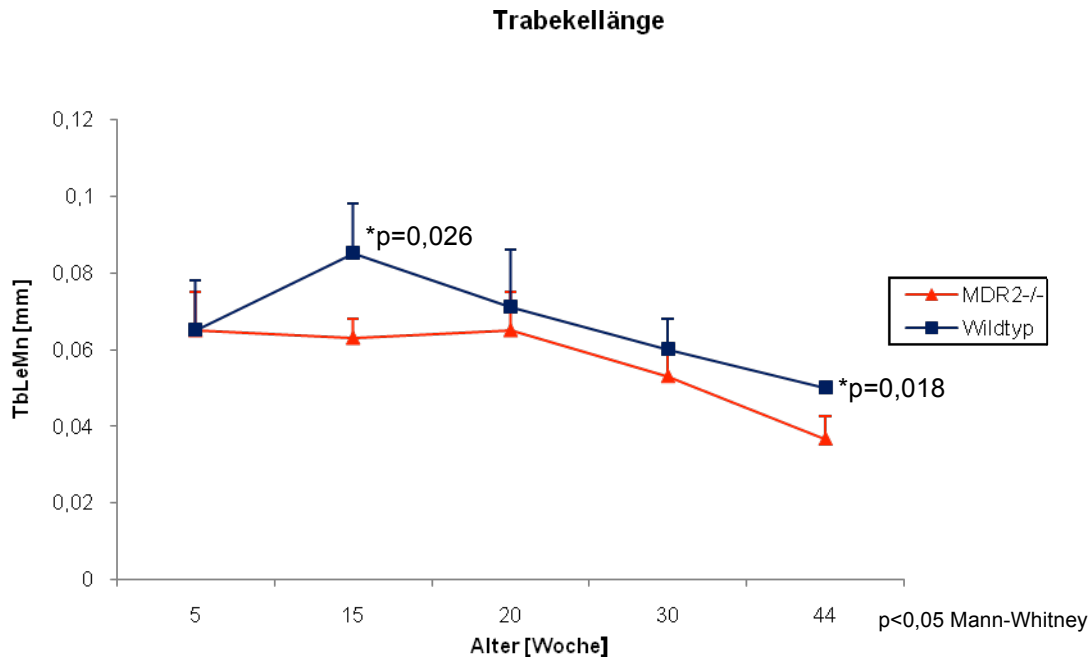


Abb. 23 : Trabekellänge von MDR2^{-/-} und Wildtyp im zeitlichen Verlauf

Die durchschnittliche Trabekellänge der Wildtypen (*blau*) ist im Vergleich zur MDR2^{-/-}-Gruppe (*rot*) immer länger, vor allem in der 15. und 44. Woche

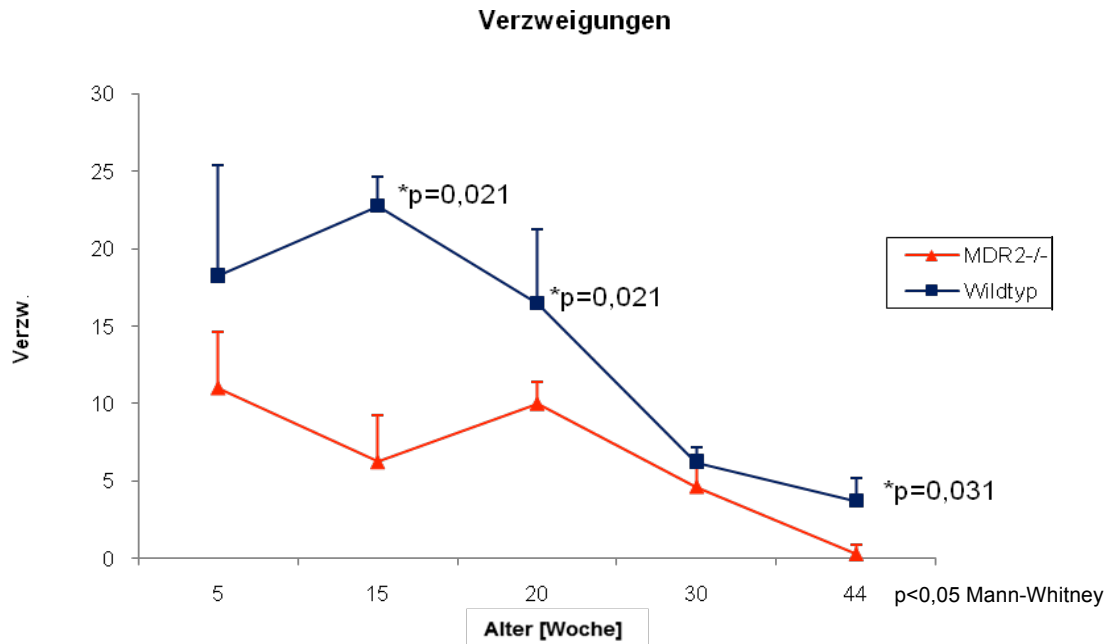


Abb. 24 : Anzahl der Trabekelverzweigungen von MDR2^{-/-} und Wildtyp

Die Wildtypen (*blau*) zeigen in allen Messpunkten (vor allem in der 15., 20. und 44. Woche) eine vermehrte Verzweigung zwischen den Trabekeln als die MDR2^{-/-}-Gruppe (*rot*)

Für die kortikalen Bereich wurden die Parameter Knochenbreite und Kortexdicke näher betrachtet (*siehe Abbildung 25 und 26*). Die Knochenbreite gibt eine Aussage über die gesamte Schaftbreite mit Markraum, während der Parameter Kortexdicke ausschließlich die durchschnittliche Dicke des Kortex beschreibt. Die Knochenbreite zeigt bei der Wildtypgruppe in der 5. wie auch in der 44. Woche signifikant höhere Werte (*siehe Abbildung 25*). Während bei den MDR2^{-/-}-Mäusen die Knochen bis zur 20. Woche stetig an Breite zunehmen, bleiben sie bei den Wildtypen nahezu konstant bei der Ausgangsbreite. Allerdings werden die Knochen mit steigendem Alter bei den MDR2^{-/-}-Mäusen wieder schmaler, währenddessen sich die Wildtypknochen ab der 30. Woche noch verbreitern.

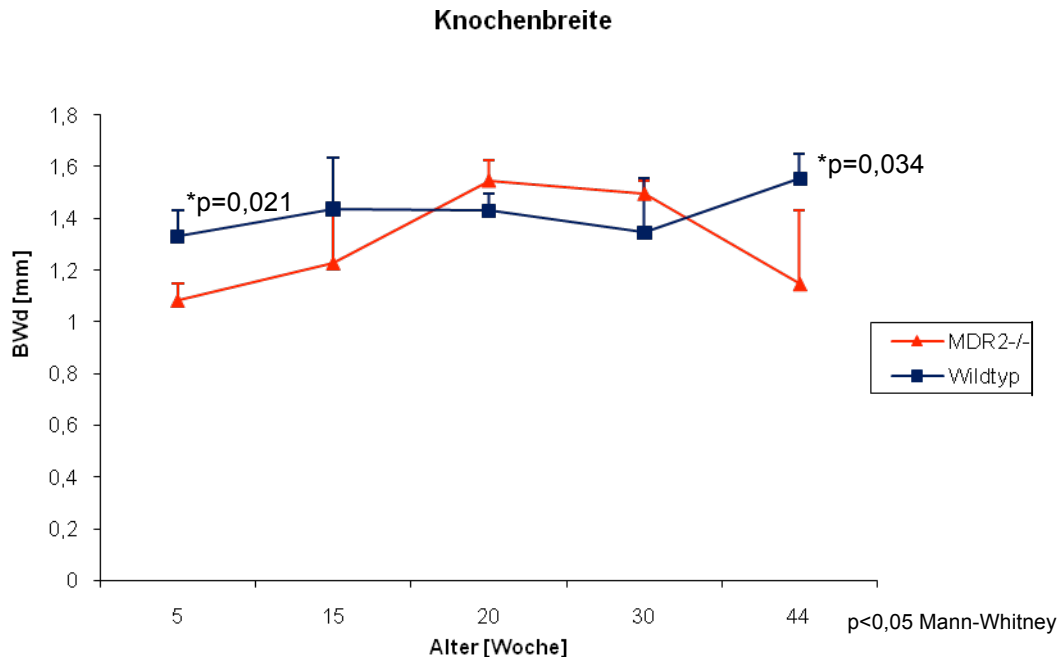


Abb. 25 : Gegenüberstellung der Knochenbreite von MDR2^{-/-} und Wildtyp

Die Wildtypen (*blau*) haben bis zur 15. Woche und am letzten Messpunkt einen breiteren Knochen als die MDR2^{-/-}-Mäuse (*rot*).

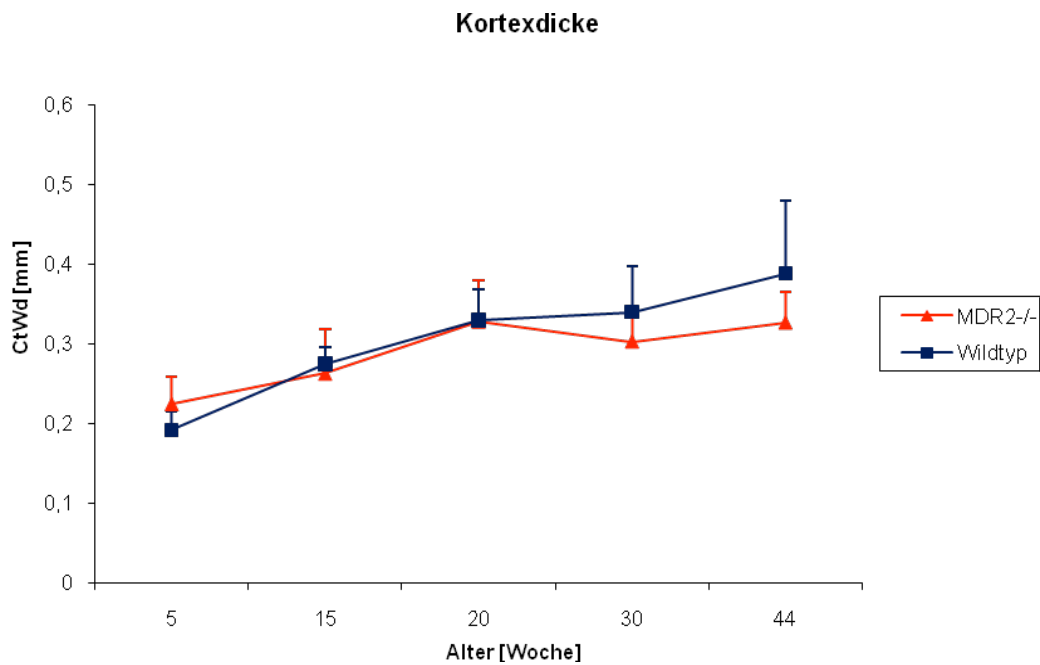


Abb. 26: Gegenüberstellung der Kortexdicke von MDR2^{-/-} (*rot*) und Wildtyp (*blau*)

3.3.2 Ergebnisse der Movat-Pentachrom-Färbung

Die 6 µm dünnen Schnitte aller Mausknochen wurden mit der Movat-Pentachrom-Färbung gefärbt. Diese ermöglicht die Unterscheidung von Knochen, Knorpel und Bindegewebe. Bei der Übersichtsfärbung wird mineralisierter Knochen leuchtend gelb und Knorpel blaugrün dargestellt, während sich das Osteoid dunkelrot zeigt. Zwischen dem Trabekelwerk ist Knochenmark zu erkennen, welches sich in rötlich-violetten Farbtönen darstellt. Die Zellkerne werden dunkel angefärbt.

Die Auswertung der Schnitte wurde rein deskriptiv durchgeführt.

An den folgenden Beispielschnitten (*siehe Abbildung 28 a-f*) ist zu erkennen, dass sich auch in dieser Färbung in beiden Untersuchungsgruppen das Trabekelwerk mit dem Alter verändert. Über den zeitlichen Verlauf lässt sich nicht nur die Veränderung der Anzahl, sondern auch die Ausrichtung und Lokalisation der Trabekel erkennen. In der 5. Woche verlaufen bei den MDR2^{-/-}-Mäusen wie auch bei den Wildtypen die Trabekel fast vollständig parallel zueinander. Bereits in der 15. Woche ist zu beobachten, dass sich die Ausrichtung der Trabekel verändert und sie somit untereinander Verbindungen eingehen. Das daraus entstandene trabekuläre Netzwerk ist bei beiden Gruppen in der 15. Woche gut ausgebildet, nimmt aber bei den MDR2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen bereits in der 20. Woche wieder ab. Auch die Lokalisation der Trabekel verändert sich mit zunehmendem Alter. Während sie in der 5. Woche noch nahe der Wachstumsfuge angeordnet sind, sind sie bereits in der 15. Woche weiter in Richtung Knochenschaft gewachsen. Das Trabekelwerk nimmt somit in der 15. und 20. Woche bei der Wildtyp- und MDR2^{-/-}-Gruppe die größte Fläche ein. Allerdings ist in der 44. Woche eine Trabekelabnahme zu erkennen und damit eine Minimierung der Verbindungen unter den einzelnen Trabekeln. Dies ist in beiden Untersuchungsgruppen zu beobachten, allerdings ist dies bei den MDR2^{-/-}-Mäuse stärker ausgeprägt.

Zusätzlich kann mithilfe dieser Färbung auch die Reifung der Trabekel verfolgt werden. Anhand der Beispielbilder beider Untersuchungsgruppen kann in der 5. Woche eine grünliche Verfärbung der Trabekel beobachtet werden, was für eine geringe Mineralisierung und somit einem unreifen Knochen spricht. Mit zunehmendem Alter verändern sie ihren Farbton von grünlich zu gelb. Dies ist bei den MDR2^{-/-}-Mäusen bereits in der 15. Woche zu erkennen, während die Mineralisierung bei den Wildtypen erst in der 20. Woche erfolgt.

In der Kortikalis der Mausknöchel ist ebenfalls eine Gelb-Grünfärbung in den einzelnen Schnittbildern zu erkennen. Auch hier spricht dies für einen unreifen Knochen und unterstreicht die Ergebnisse der μ CT-Daten vom Kortex, in denen gezeigt wurde, dass die Wildtypen im Vergleich zu den MDR2^{-/-}-Mäusen eine geringere Knochenmineraldichte in der 15. Woche aufweisen (siehe oben in Abb.17).

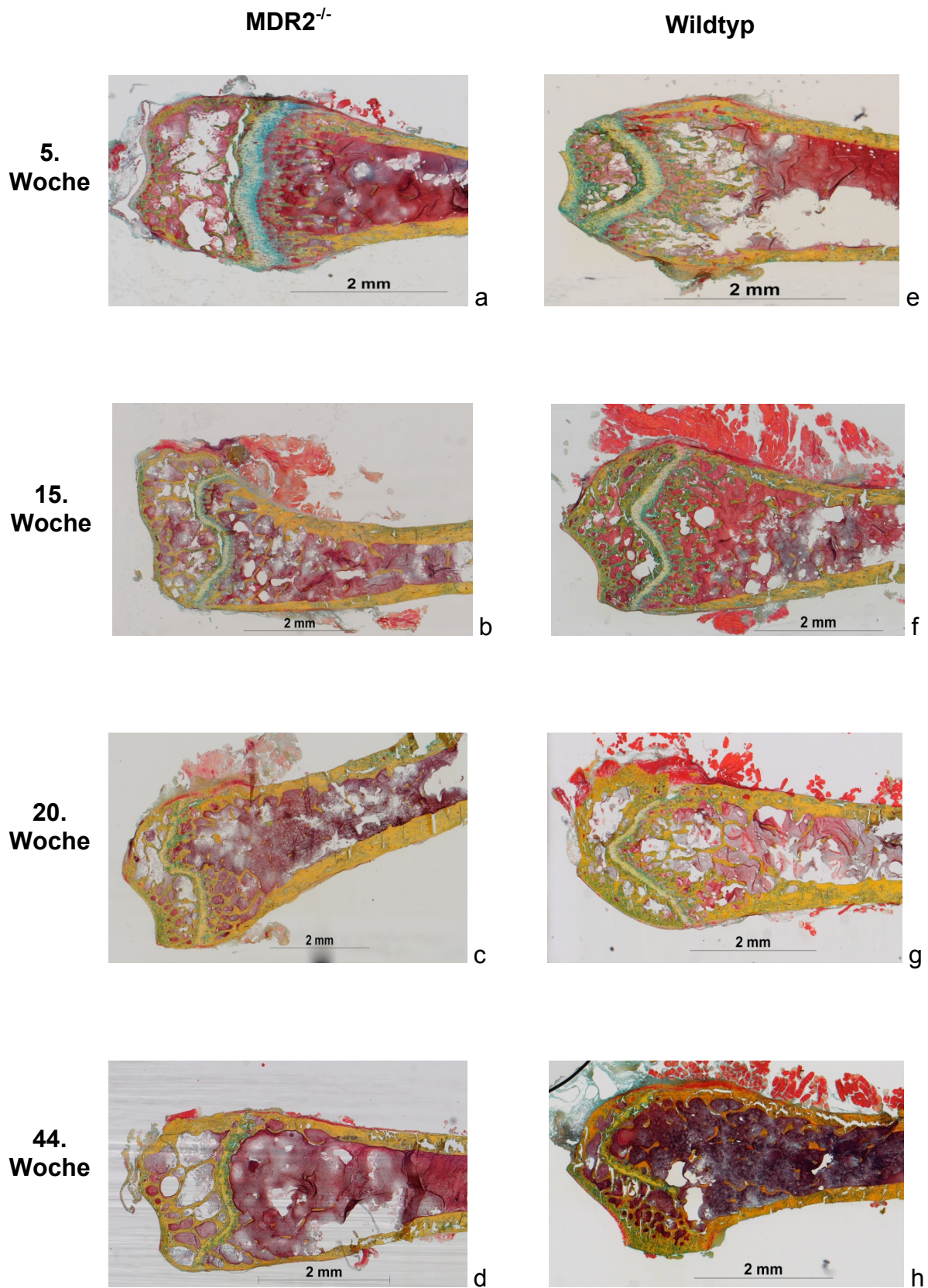


Abb. 28 : Histologische Schnittbilder von der Movat-Pentachrom-Färbung
 Lebensalter in Wochen (5,15,20,44); a-d: MDR2^{-/-}-Mäuse; e-h: Wildtyp;
 mineralisierter Knochen stellt sich leuchtend gelb und Knorpel blaugrün dar

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die gesamten Ergebnisse der beiden Färbungen (*von-Kossa-Färbung und Movat-Pentachrom-Färbung*) die Ergebnisse der μ CT-Untersuchung unterstreichen.

Es ist ebenfalls ein Unterschied im trabekulären Netzwerk zwischen der Wildtyp- und der MDR2^{-/-}-Gruppe zu erkennen. Im kortikalen Bereich sind nur leichte Unterschiede darstellbar, die vor allem in der Movat-Pentachrom-Färbung durch den Farbenreichtum aufgezeigt werden können.

4. Diskussion

Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die laut WHO zu den zehn häufigsten Erkrankungen der Gegenwart zählt. Nach der Definition ist die Osteoporose eine systemische Knochenstoffwechselkrankheit mit zwei Facetten. Zum einen führt sie zu einem Verlust der Knochenmasse, zum anderen zu einem Umbau des mikroarchitektonischen Knochengewebes. Eine reduzierte Festigkeit mit erhöhter Frakturneigung sind die Folgen beider Veränderungen [12]. Auf die einzelnen Formen der Osteoporose mit deren Ursachen und Häufigkeiten wurde bereits in der Einleitung näher eingegangen.

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten, die an einem Leberschaden leiden, meist auch eine osteoporoseähnliche Knochenstruktur bzw. einen Knochenmasseverlust aufweisen und somit ein erhöhtes Frakturrisiko haben. Dies wird auch als hepatische Osteodystrophie bezeichnet, wobei die Osteoporose die häufigste Manifestationsform darstellt [42,43,47,48,49,73,74]. Vor allem chronische Leberkrankheiten wie die primäre biliäre Zirrhose (*PBC*), die primär-sklerosierende Cholangitis (*PSC*) und die alkoholinduzierte Zirrhose sind mit dem vermehrten Auftreten von Osteoporose assoziiert [42,47,50,57,65]. In Europa weist die Leberzirrhose eine Häufigkeit von jährlich etwa 250 Fällen pro 100.000 Menschen auf. Männer sind dabei doppelt so häufig betroffen wie Frauen [75].

Ziel dieser Studie war es, den systemischen Einfluss bei Leberschäden auf die trabekuläre und kortikale Struktur des Knochens zu untersuchen. Um dies darstellen zu können, wurde das Femur von *MDR2^{-/-}*-Mäusen mit Leberschaden sowie von Wildtypmäusen mit normaler Leberfunktion zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten untersucht. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Leberschädigung und dem Knochenstoffwechsel darstellen zu können, wurden radiologische (μ CT) und histomorphologische Untersuchungen am Knochen sowie von der kooperierenden Arbeitsgruppe aus München histomorphologische Untersuchungen an der Leber, durchgeführt. Zusätzlich wurde das Zytokin TGF- β und der Vitamin D-Metabolismus näher betrachtet.

Dabei lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die Leber einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel hat und bei einer Leberschädigung eine negative Veränderung im trabekulären und kortikalen Knochenbereich zu beobachten ist.

Es kann in der vorliegenden Arbeit in beiden untersuchten Bereichen des Knochens (*trabekulärer und kortikaler Bereich*) gezeigt werden, dass die MDR2^{-/-}-Mäuse (*Tiere mit einem Leberschaden*) vor allem in der 20. Lebenswoche eine schlechtere Knochenstruktur im Vergleich zu den Kontrolltieren aufweisen.

Diese Aussage konnte mithilfe genau definierter Parameter getroffen werden, die bereits in vorhergehenden Studien zur Beurteilung der Knochenqualität herangezogen wurden [71,72,76,77,78,80].

Diese verwendeten für ihre Untersuchungen am Knochen das μ CT und bestimmten für die Analyse des trabekulären Bereiches den Knochenvolumenanteil (*BV/TV*), die Knochenmineraldichte (*BMD*), die Trabekelanzahl (*Tb.N.*), den Trabekelabstand (*Tb.Sp.*) und die Trabekeldicke (*Tb.Th.*) sowie die Connectivity Density (*Conn.D*) [71,72,76,77,79,80].

Dementsprechend wurden auch in der vorliegenden Arbeit diese Parameter mittels μ CT untersucht und es wurde festgestellt, dass die MDR2^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen vor allem in der 20. Woche ein schlechter ausgebildetes trabekuläres Netzwerk aufweisen, welches einer osteoporotischen Knochenstruktur ähnelt. Dieses ist anhand der signifikant verminderten Trabekelanzahl und Trabekeldicke zu erkennen, aber auch die Konnektivität, die die Verbindungen zwischen den Trabekeln darstellt, ist signifikant vermindert. Diese Ergebnisse des trabekulären Bereiches werden von den histomorphologischen Untersuchungen unterstrichen. Diese zeigen ebenfalls auf, dass die Trabekelanzahl und auch die Verzweigung zwischen den Trabekeln gegenüber denen der Wildtypen signifikant vermindert sind.

Bei der Untersuchung des kortikalen Bereiches, welcher entscheidend für die Einschätzung der Knochenfestigkeit ist [72,81,80], konnte im μ CT gezeigt werden, dass die MDR2^{-/-}-Tiere über den gesamten Zeitraum eine geringere Knochenfläche aufweisen, was für einen dünneren Kortex spricht. Dieses wird durch den Parameter der Kortexdicke aus der histomorphologischen Untersuchung bestätigt, welcher ebenfalls über den gesamten Zeitraum bei den MDR2^{-/-}-Tieren gegenüber den Wildtypen vermindert ist. Die Knochenmineraldichte hingegen ist bei den MDR2^{-/-}-Mäusen in der histomorphologischen Untersuchung kurzzeitig (*in der 15. Woche*) im Vergleich zu den Wildtypen leicht erhöht, welches sich zu den nachfolgenden

Zeitpunkten zugunsten der Tiere ohne Leberschädigung ändert. Dieses konnte allerdings im μ CT nicht beobachtet werden.

Die Mikro-Computertomographie (μ CT) wie auch die Histomorphometrie sind zwei Methoden zur genaueren Beurteilung der Knochenstruktur, die sich bereits in der Forschung am Knochen etabliert haben [71,77,78,79,82,83]. Das μ CT ist eine direkte Methode zur dreidimensionalen, non-destruktiven morphometrischen Analyse des Knochens [70,71,79]. Mit diesem Verfahren können Veränderungen der Mikrostruktur des menschlichen trabekulären Knochens wie z.B. bei der Osteoporose erkannt werden [11,71,78,79], aber auch für tierexperimentelle Versuche am Knochen ist das μ CT geeignet [76,82,83,84]. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist zum einen die Möglichkeit der wiederholten in-vivo-Messung und zum anderen die Durchführung weiterführender Untersuchungen am Knochen wie die Histomorphologie oder die Biomechanik. Der Vorteil der destruktiven Histomorphologie hingegen ist die Analyse der Knochenzellen und Knochenmatrix [78].

In anderen Studien wurde bereits gezeigt, dass eine Korrelation zwischen den Ergebnissen des μ CTs und denen der Histomorphometrie besteht [76,81,90]. Dies unterstreicht, dass beide Verfahren unabhängig voneinander für die Beurteilung der Knochenstruktur geeignet sind und somit für die Untersuchung der Osteoporose angewendet werden können. So untersuchten Schmid et al. unter anderem mittels μ CT und Histologie die Femora, Tibia und Lendenwirbelkörper am Mausmodell, wobei sie eine Korrelation zwischen beiden Methoden beweisen konnten [90]. Particelli et al. konnten, wie auch in der vorliegenden Arbeit, eine Übereinstimmung zwischen μ CT und Histomorphologie aufzeigen [81].

In Studien konnte gezeigt werden, dass neben der Reduktion der Bone Mineral Density (*BMD*) auch die Veränderung der Knochenstruktur einen Einfluss auf das erhöhte Frakturrisiko hat, welches eine Komplikation der Osteoporose darstellt [71,79]. In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass die genmutierten Tiere vor allem im trabekulären Bereich eine schlechtere Knochenstruktur aufweisen und somit davon auszugehen ist, dass die $MDR2^{-/-}$ -Mäuse eine verminderte Knochenstabilität und somit ein erhöhtes Frakturrisiko gegenüber den Wildtypen haben. Um allerdings eine sichere Aussage darüber machen zu können, müssen biomechanische Testungen am Knochen durchgeführt werden, wie zum Beispiel die Bestimmung der torsionalen Steifigkeit und

des maximalen Drehmoments. Biomechanische Untersuchungen zur Einschätzung des Frakturrisikos wurden bereits in anderen Studien durchgeführt [77,82,85].

Floerkemeier et al. zeigten bei der Untersuchung der Tibia von Schafen, dass eine Korrelation zwischen dem Trabekelabstand aus der μ CT-Untersuchung und der Biegungsfestigkeit bzw. der torsionalen Steifigkeit besteht. Diese zwei Parameter machen eine Aussage über die Knochenfestigkeit und damit über das Frakturrisiko [85]. Auch Wernle et al. zeigten in ihrer Untersuchung die Korrelation zwischen den μ CT-Daten und der Biomechanik [77], was die oben genannte Vermutung, dass die $MDR2^{-/-}$ -Tiere eine reduzierte Knochenstabilität und damit ein erhöhtes Frakturrisiko aufweisen, unterstreicht. Um hier genauere Aussagen treffen zu können, sind weitere Studien am $MDR2^{-/-}$ -Mausmodell nötig.

Welcher Zusammenhang besteht also zwischen der Knochenqualität und der Leberschädigung?

Bereits in vorhergehenden Untersuchungen wurde die Knochenstruktur von Tieren mit Leberschädigung analysiert [86,87,88].

Eines dieser Modelle zur Darstellung der Leberschädigung in Form einer Leberfibrose bis hin zu einer Leberzirrhose ist das CCl_4 -Mausmodell. Es ist eines der ältesten und am häufigsten verwendeten Tiermodelle, um z.B. die induzierte Leberfibrose histologisch zu untersuchen. Durch die Applikation der Chemikalie Tetrachlorkohlenwasserstoff (CCl_4) im Sinne einer Vergiftung kommt es in der Leber zu Schäden und es bilden sich Nekrosen mit anschließender Apoptose der Hepatozyten. Dies hat zur Folge, dass die extrahepatischen Matrixkomponenten vermehrt gebildet werden und dass letztendlich eine Fibrose und im Verlauf eine Leberzirrhose entsteht. Das CCl_4 wird entweder über die Nahrung, durch Inhalation oder intraperitonealen Injektionen verabreicht. Diese Variante der Leberschädigung verwendeten Nakano et al. bei Ratten, um das Krankheitsbild der hepatischen Osteodystrophie zu untersuchen und fand dabei heraus, dass das tibiale Knochenvolumen bei den lebergeschädigten Tieren signifikant niedriger ist als das der Kontrolltiere [88]. Auch Cemborain et al. benutzten in ihrer Studie dieses Tiermodell und konnte ebenfalls, gemessen an der Bone Minerale Density (*BMD*) und dem Knochenvolumen, einen qualitativ schlechteren Knochen dieser Tiere zeigen [86]. Van der Merwe und seine Kollegen nutzten unter anderem dieses Tiermodell, um Untersuchungen an der Leber und dem Knochen durchzuführen. Allerdings verwendeten sie zusätzlich in einer Vergleichsgruppe ein operatives Verfahren zur Shuntlegung, bei dem die Portalvene durchtrennt und dessen

distales Ende an die Vena cava end-zu-seit anastomosiert wurde, um so eine Leberschädigung bei den Ratten zu induzieren. Es konnte auch hier dargestellt werden, dass alle Tiere mit einem Leberschaden (*CCl₄ und Shunt*) eine verminderte Bone Mineral Density (*BMD*) sowie eine verminderte Dicke des medialen Knochenschafts aufzeigen [87].

In der vorliegenden Arbeit konnte bei den *MDR2^{-/-}*-Mäusen mit einem Leberschaden ebenso anhand der μ CT- und histomorphologischen Daten eine veränderte Knochenstruktur gezeigt werden, die durch die Ergebnisse oben vorgestellter Studien unterstrichen werden. Mithilfe dieser Tiermodelle konnte, wie auch in dieser Arbeit mit dem *MDR2^{-/-}*-Modell, ein Zusammenhang zwischen der Leber und dem Knochenstoffwechsel dargestellt werden.

Für dieses Versuchsvorhaben wurde das *MDR2^{-/-}*-Modell ausgewählt, da das *mdr2*-Gen homolog zu dem des menschlichen *mdr3*-Gens ist. Die Tiere entwickeln spontan mit makroskopischen und mikroskopischen Zeichen eine sklerosierende Cholangitis, d.h. mit extra- und intrahepatischen biliären Stenosen und konzentrischer periduktualer Fibrose. Im fortgeschrittenen Stadium bildet sich eine Leberzirrhose und letztendlich ein hepatozelluläres Karzinom (*HCC*) aus, was dem des menschlichen Krankheitsbildes entspricht. Ein weiterer Vorteil des Modells ist, dass dieser Defekt kontrollierbar ist und nicht von Dosierungen oder Applikationsformen abhängig ist, wie z.B. bei dem *CCl₄*-Tiermodell. Bei diesem Tiermodell wird die Leberschädigung durch ein Gift induziert, welches z.B. über die Nahrung aufgenommen wird. Außerdem ist der entstandene Schaden nach Beendigung der Applikation meist komplett regenerierbar. Dies ist bei den *MDR2^{-/-}*-Tieren nicht möglich. Zusätzlich muss beachtet werden, dass das Gift *CCl₄* nicht nur auf die Leber, sondern auch auf andere Organe (z.B. die Nieren, die Herzmuskulatur) wirkt. Des Weiteren kann bei allen *MDR2^{-/-}*-Tieren ab einem bestimmten Alter eine Leberzirrhose und ein hepatozelluläres Karzinom (*HCC*) beobachtet werden, was ebenfalls ein Vorteil für die Untersuchung dieser Krankheitsbilder bzw. dessen systemische Einflüsse ist.

Für die Untersuchung des Knochenstoffwechsels und vor allem des Krankheitsbildes der Osteoporose gibt es noch weitere Tiermodelle, die in der Forschung bereits etabliert sind.

So ist das ovariectomized Rattenmodell ein oft eingesetztes und gut untersuchtes Tiermodell in der Osteoporoseforschung. Vor allem für die Forschung an der humanen postmenopausalen Osteoporose ist dies ein etabliertes Tiermodell [89].

So konnten Shen et al. bei fünf Monate alten ovariectomized Ratten eine verminderte Bone Mineral Density (*BMD*) sowie in der histomorphologischen Untersuchung eine veränderte Knochenstruktur anhand der verminderten Trabekelanzahl und Trabekeldicke, aber auch durch einen vergrößerten Trabekelabstand feststellen [89]. Miller und Wronski untersuchten ebenfalls die Knochenstruktur am ovariectomized Rattenmodell und konnten hinsichtlich der strukturellen Veränderungen des Knochens die Ergebnisse von Shen et al. bestätigen [117].

Für die Untersuchungen der hypogonadismus-bedingten männlichen Osteoporose untersuchten Tezval et al. radiologisch wie auch biomechanisch die Femura von orchiectomized Ratten und fanden dabei heraus, dass diese Tiere eine verminderte Bruchfestigkeit und Elastizität aufweisen sowie ein schlechteres Trabekelnetzwerk [91]. Die induzierte Homocysteinämie (*HHCY*) am Tiermodell ist eine weitere Möglichkeit, den systemischen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel und vor allem die Entstehung der Osteoporose zu untersuchen. Homocystein entsteht im Stoffwechselabbau der Aminosäure Methionin. Die Störungen, die zu einer Hyperhomocysteinämie führen, ist meist ein Mangel an Folsäure und B-Vitaminen (*B2, B6, B12*), aber auch verschiedene Krankheiten (*chronische Niereninsuffizienz, Karzinome, Hypothyreose, Leberkrankheiten*) können zu einem erhöhten Homocysteinwert führen [92]. Herrmann et al. konnten bei Ratten durch eine Methionin-angereicherten Diät eine moderate *HHCY* und durch die Gabe einer Homocystein-angereicherten Nahrung eine intermediäre *HHCY* provozieren [93]. Für die Analyse des Knochens wurden, wie auch in der vorliegenden Arbeit, die histomorphologischen Parameter Knochenvolumen, Trabekelanzahl, Trabekeldicke und Trabekelabstand untersucht und es konnte ebenfalls ein schlechter ausgebildetes trabekuläres Netzwerk bei diesen Tieren gezeigt werden. Zusätzlich wiesen diese eine verminderte biomechanische Knochenstabilität auf [93]. In einer späteren Studie mit nahezu demselben Aufbau untersuchte er zusätzlich mittels μ CT die Knochenstruktur der Femora und wies auch hier eine verminderte Knochenqualität nach [82].

Anhand der verschiedenen Tiermodelle für die Osteoporoseforschung kann gezeigt werden, dass der Knochenstoffwechsel von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird.

So spielen verschiedene Regelkreise im Hormonstoffwechsel eine Rolle, aber auch der Einfluss der Ernährung und des Alters ist nicht zu vernachlässigen. So hat z.B. Alkohol einen negativen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel. Es konnte regelmäßig bei Patienten mit einer alkoholbedingten chronischen Lebererkrankung beobachtet werden, dass sie eine verringerte Knochenmineraldichte aufweisen [94] und dass der Schweregrad der Knochenerkrankung dabei mit der Schwere der Lebererkrankung korreliert [95]. Ob es nun daran liegt, dass der Alkohol eine direkt hemmende Wirkung auf die Osteoblasten hat oder es an der Fehlernährung bei Alkoholismus liegt bzw. an der Hemmung des Vitamin D-Stoffwechsels ist noch nicht eindeutig geklärt. Allerdings wird ein übermäßiger Alkoholkonsum als eigenständiger Risikofaktor für osteoporotische Frakturen gewertet [96]. Auch der Nikotinabusus wird als ein Risikofaktor für die Osteoporose angesehen, da ein antiöstrogener Effekt oder eine damit assoziierte Fehlernährung als Ursache vermutet wird [94]. Zusätzlich wird ein Einfluss auf die calcitropen Hormone (*Parathormon [PTH] und Vitamin D*) und damit indirekt auf den Calciumstoffwechsel angenommen, aber auch eine direkte Wirkung auf die Osteoklasten über das RANK-RANKL-OPG-System ist durch das Nikotin möglich [97]. In Studien konnte gezeigt werden, dass ein Nikotinabusus mit einer verminderten Bone Mineral Density (*BMD*) sowie mit einem erhöhtem Frakturrisiko assoziiert ist [97]. Auch anhand dieser Studien kann gezeigt werden, dass der Knochenstoffwechsel sehr komplex ist und von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst werden kann. Umso wichtiger ist es, den Zusammenhang zwischen den einzelnen Organsystemen, wie z.B. zwischen der Leber und dem Knochen zu verstehen.

Um genau diesen Zusammenhang zwischen der Leber und dem Knochen besser verstehen zu können, wurde für diese Studie das *MDR2^{-/-}*-Mausmodell verwendet, welches Mauad et al. als erster 1994 beschrieb. Dafür untersuchte er in seiner Studie die Leber von Mäusen mit einer homozygoten (*-/-*) und einer heterozygoten (*+/-*) Störung im *mdr2*-Gen sowie gesunde Wildtypen (*+/+*) histologischen und immunhistochemisch [13]. Nachfolgende Studien, wie auch die kooperierende Arbeitsgruppe aus München, nutzten ebenfalls dieses Modell, um das Krankheitsbild der Leberzirrhose bzw. des hepatozellulären Karzinoms näher zu untersuchen [13,84,98]. So konnte von Frau Andrea Schmid aus der Arbeitsgruppe in München in den Leberschnitten beider histologischen Färbungen (Hematoxylin Eosin- und Masson-Goldner-Trichromfärbung) über den gesamten zeitlichen Verlauf die zu erwartende zunehmende Leberschädigung in den *MDR2^{-/-}*-Mäusen nachweisen. Allerdings bildete

sich trotz der starken Leberschädigungen bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt keine biliäre Zirrhose aus. Bei den Wildtypen, bei denen kein Gendefekt vorliegt, wurde dagegen zu keinem Zeitpunkt eine Schädigung des Lebergewebes beobachtet. Somit konnte das MDR2^{-/-}-Mausmodell bestätigt werden. Katzellenbogen et al. führte ebenfalls histologische Untersuchungen der Leber mithilfe der HE-Färbung durch und konnte zeigen, dass die MDR2^{-/-}-Mäuse im Alter von drei Monaten eine charakteristische Entzündung in den Portalfeldern und eine leichte Fibrose mit früher septalen Formation ausbildeten. Zusätzlich entstand eine Hyperplasie der Gallengänge. Nach zwölf Monaten waren flächenhafte Entzündungen nicht mehr vorhanden, allerdings konnten lokale Ansammlungen von Entzündungszellen (*Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten*) beobachtet werden, die für eine anhaltende Entzündungsreaktion sprechen. Des Weiteren war bei den zwölf Monate alten MDR2^{-/-}-Tieren keine lobuläre Architektur mehr zu erkennen [99]. In einer weiteren Arbeit von Katzenellenbogen et al. konnte gezeigt werden, dass alle genmutierten MDR2^{-/-}-Tiere im Alter von 16 Monate ein hepatozelluläres Karzinom (*HHC*) ausgebildeten [98].

Neben den Untersuchungen an der Leber wurden von der Münchner Arbeitsgruppe im Rahmen dieses Versuchsvorhaben zusätzlich das Zytokin TGF- β und der Vitamin D-Metabolismus näher betrachtet, da diese ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung der hepatischen Osteodystrophie spielen könnten. Bis jetzt gibt es vor allem in klinischen Studien unterschiedliche Aussagen zum Einfluss des Zytokin TGF- β und dem Vitamin D im Zusammenhang mit der hepatischen Osteodystrophie. Im MDR2^{-/-}-Mausmodell wurde dieser allerdings noch nicht untersucht, weswegen dies von der Münchner Arbeitsgruppe näher betrachtet wurden.

TGF- β ist ein Wachstumsfaktor und ist mit Abstand das am häufigsten vorkommende Zytokin im Knochen, wo es als zentraler Akteur beim Knochenumsatz betrachtet werden muss [107]. Alle drei TGF- β -Formen (TGF- β_1 , - β_2 und β_3) werden von den Osteoblasten und Osteoklasten sezerniert, die in ihrer latenten Form innerhalb der Knochenmatrix ruhen [101]. Vor allem TGF- β_1 nimmt aufgrund seiner Wirkung auf Osteoblasten und Osteoklasten eine Schlüsselrolle bei der Induktion, Heilung und Remodeling von mineralisiertem Gewebe ein [102]. Allerdings konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass experimentell herbeigeführte, unphysiologisch hohe TGF- β_1 -Konzentrationen die Frakturheilung negativ beeinflussen können [103].

Bei den MDR2^{-/-}-Mäusen zeigen sich in der vorliegenden Studie über den gesamten Untersuchungszeitraum erhöhte TGF- β -Werte im Serum im Vergleich zu der Kontrollgruppe und dies unterstreicht die histologischen Ergebnisse der Leber. Es ist zu erkennen, dass das Zytokin schon bei leichten Entzündungsreaktionen mit einem Anstieg im Serum reagiert. Nach einer leicht versetzten Reaktion auf die Veränderungen in der Leberhistologie, wo eine signifikante Steigerung der Lebergewebeschädigung (5. bis 15. Woche) stattgefunden hat, ist ein Anstieg des Serumwerts in der 30. Woche um das 120fache zu beobachten. Des Weiteren ist bei den MDR2^{-/-}-Mäusen zu erkennen, dass ab einem gewissen Grad der Leberschädigung der TGF- β -Wert wieder sinkt, da die Zellen nicht mehr in der Lage sind, das Zytokin zu produzieren. Die Wildtypen hingegen weisen nur sehr geringe TGF- β -Werte über den gesamten Untersuchungszeitraum auf, was für eine gesunde Leber ohne Entzündungsreaktionen oder Schädigung spricht [Ergebnisse der kooperierenden Arbeitsgruppe].

Es wird diskutiert, dass Patienten mit einer chronischen Entzündung einem erhöhten TGF- β_1 -Serum-Spiegel haben sowie oft ein reduzierter Knochenmineralgehalt und eine gestörte Knochenheilung [100]. Auch bei den Krankheitsbildern Leberfibrose und Zirrhose waren erhöhte TGF- β -Werte messbar [104]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der kardialen Fibrose, der chronischen Niereninsuffizienz oder Fibrosen anderer Gewebe gesehen, wobei das erhöhte TGF- β mit der Pathogenese in Verbindung gebracht wird [100,105]. Ehnert und Kollegen konnten bei einer kontinuierlichen Stimulation von primären menschlichen Osteoblasten mit aktivem TGF- β einen Funktionsverlust der Osteoblasten in Kombination mit einer Veränderung der Genexpression zur begünstigen Osteoklastogenese beobachten [100]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch die kontinuierliche Behandlung der Osteoblasten mit TGF- β die Mineralisierung der Knochenmatrix gehemmt wird [100]. Alliston et al. konnten in ihrer Arbeit nachweisen, dass TGF- β auch die Differenzierung zu reifen Osteoblasten hemmt [108], welches noch einmal den Zusammenhang des Zytokin auf den Knochenstoffwechsel unterstreicht.

Das Vitamin D, welches unter anderem in der Leber hydroxyliert wird, fördert dagegen die Osteoblastendifferenzierung und hat somit ebenfalls einen direkten Einfluss im Knochenstoffwechsel [109]. Ebenso unterstützt es durch die Steigerung der Genexpression der Calciumtransportproteine die Calcium- und Phosphatresorption im Darm, wodurch die Osteoblasten und die Osteoklasten aktiviert werden und der Knochenumbau begünstigt wird [110]. Dies weist darauf hin, dass das Vitamin D einen Einfluss auf den Knochen hat und somit bei einer Störung des Vitamin D-Metabolismus der Knochenstoffwechsel betroffen sein kann.

Für die Untersuchung des Vitamin D-Metabolismus am beschriebenen Mausmodell wurden von Frau Andrea Schmid aus der kooperierenden Arbeitsgruppe aus München vier wichtige Enzyme, die 7-Dehydrocholesterol-Reduktase (*DHCR7*), das Cytochrom P450 2R1 (*25-Hydroxylase*), das Cytochrom P450 27A1 und das Vitamin D-Binding-Protein (*GC*) und deren Expression genauer untersucht.

Bei der Untersuchung dieser Enzyme konnte bei den *MDR2*^{-/-}-Mäusen eine Störung des Vitamin D-Metabolismus festgestellt werden.

Es zeigte sich, dass die 7-Dehydrocholesterol-Reduktase (*DHCR7*) bei den *MDR2*^{-/-}-Mäusen bei einer beginnenden Entzündung in der Leber (5. Woche) im Vergleich zu den Wildtypen signifikant mehr exprimiert wird. Das zeigt, dass dem Vitamin D-Stoffwechsel weniger vom Provitamin D₃ zur Verfügung steht.

Ein wichtiger Syntheseschritt findet in der Leber mithilfe der zwei oben genannten Cytochrome P450 statt. Dabei wird Cholecalciferol zu Calcidiol hydroxyliert. Bei beiden Cytochromen weisen die Wildtypen über den gesamten zeitlichen Verlauf höhere Expressionswerte gegenüber den *MDR2*^{-/-}-Mäusen auf. Somit kann bei den *MDR2*^{-/-}-Mäusen die erste Hydroxylierung in der Leber nur vermindert stattfinden und damit die Vorstufe des aktiven Vitamin D weniger metabolisiert werden [unveröffentlichte Ergebnisse der kooperierenden Arbeitsgruppe].

Auch diese Ergebnisse deuten auf den Zusammenhang zwischen Leberschädigung und der Veränderung am Knochen hin und bieten einen möglichen Erklärungsansatz.

Dieses wird durch ein Gallengang-ligiertes Rattenmodell gestützt, dass eine verminderte Aktivität der 25-Hydroxylase (*Cytochrom P450 2R1*) aufweist. Das Enzym hydrolysiert in der Leber Vitamin D, und der Verlust scheint verantwortlich für einen Knochenmasseverlust im Zusammenhang mit der chronisch cholestatischen Lebererkrankung zu sein [50]. Auch CCl₄-behandelte Ratten sowie die operierten Ratten mit einem Shunt zeigten bereits nach 8 Wochen einen niedrigeren Serumwert

des 25-Hydroxy-Vitamin D bei gleichzeitig reduziertem BMD [87]. Dies bestätigt einerseits die Daten der Münchner Arbeitsgruppe und andererseits spricht es dafür, dass der Vitamin D-Metabolismus bei einer Lebergewebeschädigung gestört ist und das Vitamin D einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel hat.

Allerdings sind die klinischen Daten hierzu widersprüchlich. So konnte bei Patienten mit chronisch cholestatischen Lebererkrankungen beobachtet werden, dass die 25-Hydroxylase-Aktivität erhalten bleibt und somit auch der Vitamin D-Blutspiegel physiologisch ist [47,50]. Diamond et al. konnten diese Beobachtung in ihrer Studie unterstützen. Er fand heraus, dass der 25-Hydroxy-Vitamin D-Serumspiegel bei Patienten mit einer Leberzirrhose im Vergleich zu der Patientengruppe mit einer nicht zirrhotischen Lebererkrankung zwar niedriger ist, allerdings war im Vitamin D-Spiegel bei beiden Patientengruppen gegenüber der Kontrolle kein wesentlicher Unterschied zu erkennen [47]. Monegal et al. konnten dieses allerdings in ihrer Arbeit widerlegen, da Patienten mit einer Leberzirrhose mit unterschiedlicher Ursache ein signifikant niedrigeres 25-Hydroxy-Vitamin D im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen [111]. Ein Argument gegen einen direkten Einfluss des Vitamin D auf die Osteoporose ist eine fehlende Korrelation zwischen Vitamin D-Spiegel und der Knochendichte, sowie das ausbleibende Aufhalten der hepatischen Knochenstoffwechselstörung bei Vitamin D-Supplementierung [43,57]. In anderen klinischen Studien konnte hingegen ein leichter Anstieg des BMD bei Patienten mit einer Leberzirrhose mit einer Supplementierung von Vitamin D in Kombination von Calcium beobachtet werden [42].

An den Ergebnissen dieser Studien kann ein Zusammenhang zwischen dem Vitamin D und dem Knochenstoffwechsel gezeigt werden, auch wenn es bis jetzt keine einheitliche Meinung dazu gibt.

Aber nicht nur der Vitamin D-Stoffwechsel und das Zytokin TGF- β sind zwei Faktoren, die bei der Entstehung einer hepatischen Osteodystrophie näher betrachtet werden müssen.

Die Pathogenese des Krankheitsbildes hepatische Osteodystrophie ist multifaktoriell und in einzelnen Punkten noch ungeklärt [49,42]. Die häufigste Manifestationsform ist dabei die Osteoporose [43,49,42,47,48,73,74]. In den letzten 20 Jahren wurden viele klinische Studien dazu durchgeführt, die diesen Zusammenhang untersuchten.

Die Prävalenz der Osteoporose bei Patienten mit chronischer Lebererkrankung variiert in der Literatur sehr stark (10 - 60 %) [48,50,63,73, 95,112]. So zeigten Diamond et al. (1990) in ihrer Studie, dass die Prävalenz für eine Osteoporose bei den Patienten mit

einer Lebererkrankung um das Zweifache erhöht ist im Vergleich zur Kontrollgruppe [47].

In einigen Studien wurde festgestellt, dass vor allem chronische cholestatische Lebererkrankungen mit der Osteoporose assoziiert sind [43,48,63,74,95,96,113] und diese ein bis zu vierfach erhöhtes Risiko aufweisen können [42]. Schon 1985 konnten Stellan et al. zeigen, dass 42 % von 36 untersuchten Patienten eine osteoporotische Knochenstruktur aufwiesen. Dabei hatten 33 Patienten eine nachgewiesene primäre biliäre Zirrhose und drei eine primär-sklerosierende Cholangitis in unterschiedlichen Stadien. Wie auch in der vorliegenden Arbeit, führte er dafür histologische und radiologische Untersuchungen u.a. an der Wirbelsäule und am Beckenkamm durch [114]. Bestätigt wird dies von der aktuellen Studie von Angulo et al., die 237 Patienten mit primär-sklerosierende Cholangitis untersuchten und dabei herausfanden, dass diese Patienten eine 6,1fache erhöhte Prävalenz für eine Osteoporose im Vergleich zur Normalbevölkerung aufweisen [113].

Erklärungen für diese unterschiedlichen Prävalenzen der Osteoporose bei Leberschädigung sind vielfältig. Ein möglicher Ansatzpunkt könnte das unterschiedliche Design der Studien sein. So wurde ein großes Spektrum an Patientenklientel eingeschlossen, mit verschiedenen Altersgruppen, Body-Mass-Index und anderen Grunderkrankungen [49,74]; aber auch die Ätiologie und die Schwere der zugrunde liegenden Lebererkrankung ist einflussgebend [48,95,115].

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die klinische Forschung an der hepatischen Osteodystrophie ist die steigende Frakturinzidenz, die eine schwerwiegende Komplikation der Osteoporose darstellt [11,43,116]. Auch hier gibt es Studien die unterschiedliche Prävalenzen für das Frakturrisiko bei Patienten mit chronischer Leberkrankheiten darstellen [47,63,114]. So fanden Diamond et al (1990) heraus, dass das Frakturrisiko gegenüber der Kontrolle erhöht ist. Das erhöhte Risiko einer Wirbelkörperfraktur liegt zwischen 12 und 18 %, wobei die Art der zugrundeliegenden Leberkrankheiten keinen signifikanten Einfluss hat. Periphere Frakturen treten hingegen vermehrt bei der alkoholinduzierten Lebererkrankung (30 %) auf, während sie bei anderen ursächlichen Leberkrankheiten nur eine Prävalenz von 16 % aufweisen [47]. Guichelaar et al. legten in ihrer Langzeitstudie den Schwerpunkt auf die cholestatischen Leberkrankheiten und zeigten, dass das Frakturrisiko bei Patienten im Endstadium einer primären biliären Zirrhose um 22,5 % und bei der primär-sklerosierenden Cholangitis um 15,7 % zur Normalbevölkerung erhöht ist [63]. Die Ergebnisse dieser

klinischen Studien bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die MDR2^{-/-}-Tiere mit einem Leberschaden einer osteoporosähnlichen Knochenstruktur aufweisen und unterstützen die Aussage, dass die leberkranken Mäuse unter einem erhöhten Frakturrisiko leiden.

Limitation der Studie:

Für diese Studie wurden von insgesamt 38 Mäusen die Femura gewonnen, wobei es sich dabei um 20 Wildtypen und 18 MDR2^{-/-}-Tiere im Alter zwischen 5 und 44 Wochen handelte. Die Gruppenstärke pro Zeitpunkt und Gruppe (*MDR2^{-/-}-Gruppe und Wildtypgruppe*) betrug größtenteils vier Tiere, wovon zwei weibliche und zwei männliche Tiere vorhanden waren. In den meisten tierexperimentellen Studien ist eine Gruppengröße von 6-10 Tieren zu finden, wobei weniger Zeitpunkte untersucht wurden [86,90,93]. Somit ist die Größe der Untersuchungsgruppen in der vorliegenden Arbeit relativ klein. Allerdings konnte bereits in der rein deskriptiven Auswertung der Bilder Unterschiede gezeigt werden, welche durch die statistische Auswertung bestätigt werden. Für die Beurteilung des Knochens wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse verwendet. Um allerdings eine Aussage über eventuelle Unterschiede zwischen den Geschlechtern bei z.B. der Knochenstruktur im Krankheitsbild der hepatischen Osteodystrophie machen zu können, müsste eine größere Anzahl der jeweiligen Geschlechter untersucht werden.

Mit den hier angewendeten Methoden kann zwar die Knochenstruktur gut beurteilt werden, allerdings können über die Knochenqualität nur Vermutungen geäußert werden. Für eine konkrete Aussage müssten dafür biomechanische Testungen an dem MDR2^{-/-}-Mausmodell in Folgestudien durchgeführt werden.

Ziel war es zunächst mit einer geringen Anzahl von Tieren in verschiedenen Altersstufen den möglichen Zusammenhang zwischen Leberschaden und Knochenstruktur festzustellen, was durch die beschriebenen Ergebnisse erfolgte und auch signifikante Unterschiede gefunden wurden. Mithilfe dieser Untersuchungsmethoden konnte festgestellt werden, dass die lebergeschädigten Tiere vor allem im trabekulären Bereich eine verminderte Knochenstruktur und somit einen osteoporoseähnlichen Knochen haben. Aber auch im kortikalen Bereich konnte eine Veränderung der Kortexdicke in der MDR2^{-/-}-Gruppe beobachtet werden.

In dieser vorliegenden Arbeit konnte unter der Verwendung des MDR2^{-/-}-Mausmodells trotz der genannten Limitationen anhand der erhobenen Daten ein Zusammenhang zwischen der Leber und dem Knochenstoffwechsel gezeigt werden.

5. Zusammenfassung

Osteoporose ist die häufigste Knochenerkrankung in Deutschland, an der derzeit ca. 6 Millionen Menschen leiden. Aus diesem Grund ist die Osteoporose ein bedeutendes Thema in der Gesellschaft und vor allem im Gesundheitssystem.

Im klinischen Alltag konnte beobachtet werden, dass Patienten, die an einer chronischen Lebererkrankung leiden, meist auch einen gestörten Knochenstoffwechsel aufweisen. Dieses wird auch als hepatische Osteodystrophie bezeichnet, wobei die Osteoporose die häufigste Manifestationsform darstellt. Aber welcher Zusammenhang besteht zwischen der Leberschädigung und dem Knochenstoffwechsel?

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Veränderung am Knochen während der Entwicklung einer Leberschädigung zu zeigen. Dafür wurde ein Mausmodell verwendet, welches einen Gendefekt im *mdr2*-Gen aufweist. Dieses Gen ist homolog zu dem menschlichen *mdr3*-Gen und verschlüsselt das kanalikuläre Membranprotein MDR2 („*multidrug-resistance-2 P-glycoprotein*“). Aufgrund der Mutation bildet sich über mehrere Schritte eine Leberschädigung aus, welche der menschlichen Leberzirrhose entspricht und somit für die Forschung an diesem Krankheitsbild und dessen systemische Einflüsse sehr gut geeignet ist.

Für das Versuchsvorhaben wurden Femura von BALB/c-Mäusen mit und ohne MDR2-Mutation im Alter zwischen 5 und 44 Wochen hinsichtlich der Knochenstruktur untersucht. Die Mausknochen wurden mittels μ CT in zwei definierten Bereichen, dem trabekulären Netzwerk (VOI am distalen Femur mit 135 Slices à 10,5 μ m) und der Kortikalis (VOI in der Knochenschaftmitte mit 50 Slices à 10,5 μ m), hinsichtlich folgender Parameter analysiert: Knochenvolumenanteil (*BV/TV*), Knochenmineraldichte (*BMD*), Trabekelanzahl (*Tb.N.*), Trabekeldicke (*Tb.Th.*), Trabekelabstand (*Tb.Sp.*), Konnektivität (*Conn.D.*), Struktur Model Index (*SMI*) sowie für den kortikalen Bereich die Parameter Knochenvolumenanteil (*BV/TV*), Knochenmineraldichte (*BMD*) und Knochenfläche (*Barea*).

Für die histologische Auswertung wurden die zuvor angefertigten 6 μ m dünnen Schnitte nach der von-Kossa-Methode gefärbt, und mithilfe eines speziellen Bildanalyseprogramms konnten die Parameter Trabekeldichte, Trabekellänge, Verzweigung, Knochenbreite, Kortexdicke analysiert und ausgewertet werden. Diese Daten können mit den μ CT-Daten verglichen werden, da die „Region of interest“ (*ROI*)

der Histologie dem ausgewerteten Bereich des μ CT entspricht. Die Auswertung der Movat-Pentachrom-Schnitte erfolgte rein deskriptiv.

Es kann festgestellt werden, dass die Knochen der MDR2^{-/-}-Mäuse vor allem in der 20. Woche ein schlechter ausgebildetes trabekuläres Netzwerk im Vergleich zu den Wildtypen aufweisen und somit einer osteoporotischen Knochenstruktur ähneln. Dieses ist anhand der signifikant verminderten Trabekelanzahl und Trabekeldicke zu erkennen, aber auch die Konnektivität ist signifikant vermindert. Diese Ergebnisse des trabekulären Bereiches werden von den histomorphologischen Untersuchungen unterstrichen, die ebenfalls eine signifikante Verminderung der Trabekelanzahl und auch der Verzweigung zwischen den Trabekeln gegenüber denen der Wildtypen zeigen.

Bei der Untersuchung des kortikalen Bereiches konnte gezeigt werden, dass die MDR2^{-/-}-Tiere über den gesamten Zeitraum eine geringere Knochenfläche aufweisen, was für einen dünneren Kortex spricht. Dies wird durch den Parameter der Kortexdicke aus der histomorphologischen Untersuchung bestätigt, welcher ebenfalls zu allen Zeitpunkten bei den MDR2^{-/-}-Tieren gegenüber den Wildtypen vermindert ist. Die Knochenmineraldichte hingegen ist bei den MDR2^{-/-}-Mäusen in der histomorphologischen Untersuchung kurzzeitig (in der 15. Woche) im Vergleich zu den Wildtypen leicht erhöht, welches sich zu den nachfolgenden Zeitpunkten zugunsten der gesunden Tiere ändert. Dieses konnte allerdings im μ CT nicht beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit kann mithilfe des MDR2^{-/-}-Mausmodells ein Zusammenhang zwischen der Leberschädigung und dem Knochenstoffwechsel gezeigt werden. Es stellten sich bei den lebererkrankten Tieren eine osteoporoseähnliche Knochenstruktur im trabekulären Bereich sowie ein verdünnter Kortex in der Knochenschaftmitte dar. Zusätzlich konnte durch die Münchner Arbeitsgruppe insbesondere durch Frau Andrea Schmid gezeigt werden, dass die MDR2^{-/-}-Mäuse über den gesamten zeitlichen Verlauf die zu erwartende Leberschädigung entwickelten. Aber auch bei der näheren Betrachtung des Zytokin TGF- β und des Vitamin D-Metabolismus konnte gesehen werden, dass der TGF- β -Spiegel erhöht und die Expression von bestimmten Enzymen im Vitamin D-Metabolismus gemindert ist. Dies sind zwei Faktoren, die sowohl in der Leber als auch in dem Knochen eine wichtige Rolle spielen und somit Gründe für die veränderte Knochenstruktur sein können.

6. Literatur

- 1 Cohen MMJ: The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am Journal Med Genet A* 2006; 140 (23): 2646-2706.
- 2 Crippin JS: Bone disease after liver transplantation, *Liver Transplantation* 2001; 7 (11 Suppl): S27-35
- 3 Smith DM, Nance WE, Kang KW, Christian JC, Johnston CC: Genetic factors in determining bone mass. *Journal Clin Invest* 1973; 52 (11): 2800-2808.
- 4 Falch JA, Kaastad TS, Bohler G, Espeland J, Sundsvold OJ: Secular increase and geographical differences in hip fracture incidence in Norway. *Bone* 1993; 14 (4): 643-645.
- 5 NIH Osteoporosis and Related Bone Diseases National resource Center. Juvenile bone health. May 2009. Available at <http://www.niams.nih.gov>, Zugangsdatum: 14.11.2011
- 6 Pietschmann P, Peterlik M: Pathophysiologie und Therapie der Osteoporose. *Radiologe* 1999 39: 228–234
- 7 Pollähne W, Minne HW: Epidemiologie, Diagnostik und klinisches Bild der Osteoporose. *Bundesgesundheitsblatt* 2001; 44 (1): 32-36
- 8 Melton LJ, Chrischilles EA, Cooper C, Riggs BL: Perspective. How many women have osteoporosis? *Journal Bone Miner. Res.* 1992; 7 (9): 1005-1010
- 9 Melton LJ, Atkinson EJ, O'Connor MK, O'Fallon WM, Riggs BL: Bone density and fracture risk in men. *Journal Bone Miner Res* 1998; 13 (12): 1915-1923.
- 10 Bartl R: Osteoporose: Prävention – Diagnostik - Therapie. 2001 Stuttgart. N York.
- 11 Minne HW, Pfeiffer M, Begerow B, Pollähne W: Osteoporose. *Orthopäde* 2002; 31 (7): 681-699
- 12 DVO: DVO-Leitlinie 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen *Osteologie* 2009; 4: 304-328
- 13 Mauad TH, van Nieuwkerk CM, Dingemans KP et al.: Mice with homozygous disruption of the mdr2 P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *Am Journal Pathol* 1994; 145 (5): 1237-1245
- 14 WHO (world health organisation), 2006, Einteilung der Osteoporose-Stadien,
- 15 Ciarelli TE, Fyhrie DP, Schaffler MB, Goldstein SA: Variations in three-dimensional cancellous bone architecture of the proximal femur in female hip fractures and in controls. *Journal Bone and Mineral Research* 2000; 15 (1): 32-40
- 16 Dempster DW: The contribution of trabecular architecture to cancellous bone quality. *Journal Bone and Mineral Research* 2000; 15 (1): 20-23

- 17 Wehrli FW, Hwang SN, Song HK: New architectural parameters derived from micro- MRI for the prediction of trabecular bone strength. *Technology and Health Care* 1998; 6 (5-6): 307-320
- 18 Moskilde L: Consequences of the remodelling process for vertebral trabecular bone structure: a scanning electron microscopy study. *Bone and Mineral* 1990; 10 (1): 13-35
- 19 Moskilde L: The effect of modelling and remodelling of human vertebral body architecture. *Technology and Health Care* 1998; 6: 287-297
- 20 Gambacciani M, Ciapponi M, Cappagli B, Benussi C, Genazzani AR: Longitudinal evaluation of perimenopausal femoral bone loss: effects of a low dose oral contraceptive preparation on bone mineral density and metabolism. *Osteoporosis international* 2000; 11 (6): 544-548
- 21 Riggs BL and Melton LJ: The worldwide problem of osteoporosis: Insights afforded by epidemiology. *Bone* 1995; 17 (5 Suppl): 505s-511s
- 22 Riggs BL, Melton LJ: Involutional osteoporosis. *N Engl J Med.* 1986; 314 (26): 1676-86
- 23 Resch H, Pietschmann P, Woloszczuk W, Krexner E, Bernecker P, Willvonseder: Bone mass and biochemical parameters of bone metabolism in men with spinal osteoporosis. *Eur Journal of Clin Invest* 1992; 22 (8): 542-545
- 24 Jergas M and Schmidt G: Conventional radiology of osteoporosis and radiographic absorptiometry. *Radiologe* 1999; 39 (3): 174-18
- 25 Kraenzlin ME: Sinnvolle Osteoporose-Diagnostik in der Praxis
Osteoporose: Moderne Diagnostik - Therapeutische Konsequenzen für Klinik und Praxis (ed: Seibel MJ and Kraenzlin ME) 1995; 24-29, Karger, Freiburg
- 26 Kirsch J: *Duale Reihe Anatomie* 2007;1: 725-740
- 27 Trauner M, Meier PJ, Boyer JL: Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl Journal of Medicine* 1998; 339 (17): 1217-1227
- 28 Mwinyi J, Kullak-Ublick GA: Hereditärer Defekte hepatobiliärer Transportproteine. *Journal of Gastroenterologie* 2010; 5: 39-48
- 29 Meier PJ: Molecular mechanism of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. *Am Journal of Physiol* 1995; 269: G801-12
- 30 Carey MC.: Pathogenesis of gallstones. *Am Journal Surg* 1993; 165 (4): 410-419
- 31 Bahr MJ and Manns MP: Liver cirrhosis. *Der Internist* 1999; 40 (12): 1308-1322
- 32 Stiehl A: Gallensäure – von der toxischen Substanz zum effektiven Therapeutikum. *Deutsches Ärzteblatt* 1999; 96:764-770, Heft 12
- 33 Bläker H, Theuer D, Otto HF: Pathology of liver cirrhosis and portal hypertension. *Radiologe* 2001; 41 (10): 833-839

- 34 Millward-Sadler GH: Liver cirrhosis. In: MacSween RNM, Anthony PP, Schleuer PJ, Burt AD, Portmann BC (eds) Pathology of the liver. Churchill Livingstone, Philadelphia 1994
- 35 Schmieg-Kurz AK, Blum HE.: Ursachen der Leberzirrhose. Journal of Gastroenterologie 2007; 2:261-267
- 36 Keppler D and König J.: Hepatic secretion of conjugated drugs and endogenous substrates. Semin Liver Dis 2000; 20 (3): 377-94
- 37 Dombrowski F: Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie 2008; 11: 411-422
- 38 Sawatzki M, Semela D: Epidemiologie und Ätiologie des hepatozellulären Karzinoms. Tumordiagnostik und Therapie 2012; 33: 10-13
- 39 Eick J, Steinberg J, Schwertner C, Ring W, Wagner H-J, Scherübl H: Therapie des hepatozellulären Karzinoms. Tumordiagnostik und Therapie 2012; 33
- 40 Graziadei I. „State of the Art“: Lebertransplantation. Journal of Gastroenterol Hepatol Erkrankung 2004; 2 (3): 47-52
- 41 <http://www.dso.de/medien-und-presse/pressebilder-und-grafiken.html>. Deutsche Stiftung Organtransplantation. Jahresbericht 20011; Zugangsdatum: 15.03.2012
- 42 Collier J: Bone Disorders in chronic liver disease, Journal of Hepatology 2007; 46 (4): 1271-1278
- 43 Dobnig H, Fahrleitner A, Trauner M: Chronische cholestatische Lebererkrankungen und metabolische Knochenstoffwechselstörungen. Journal of Gastroenterol Hepatol Erkr. 2004; 2 (3): 23-29
- 44 Gasser RW: Cholestasis and metabolic bone disease - a clinic review. Wiener Medizinischen Wochenschrift 2008; 158 (19-20): 553-557
- 45 Wolfhagen FH, van Buuren HR, Vleggaar FP, Schalm SW: Management of osteoporosis in primary biliary cirrhosis. Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterology 2000; 14 (4): 629-41
- 46 Eastell R, Dickson ER, Hodgson SF et al. Rates of vertebral bone loss before and after liver transplantation in women with primary biliary cirrhosis. Hepatology 1991; 14 (2): 296-300
- 47 Diamond T, Stiel D, Lunzer M, Wilkinson M, Roche J, Posen S: Osteoporosis and skeletal fractures in chronic liver disease. Gut 1990; 31 (1): 82-87
- 48 Goral V, Simsek M, Mete N: Hepatic Osteodystrophy and liver cirrhosis. World Journal of Gastroenterol 2010; 16 (13): 1639-1643
- 49 Rouillard S and Lane NE: Hepatic Osteodystrophy. Journal of Hepatology 2001; 33 (1): 301-307

- 50 Nakchbandi IA and van der Merwe SW: Current understanding of osteoporosis associated with liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6 (11): 660-670
- 51 Yarkar S, Rosen CJ, Beamer WG et al.: Circulating levels of IGF-I directly regulate bone growth and density. *Journal of Clin Invest* 2002; 110 (6): 771-781
- 52 Cemborain A, Castilla-Cortazar I, Garcia M et al.: Osteopenia in rats with liver cirrhosis: beneficial effects of IGF-I treatment. *Journal of Hepatol* 1998; 28 (1): 122-131
- 53 Lakatos PL, Bajnok E, Tornai I et al.: Insulin-like growth factor I gene microsatellite repeat, collagen type alpha1 gene Sp1 polymorphism. And bone disease in primary biliary cirrhosis. *Eur Journal of Gastroenterol Hepatol* 2004; 16 (8): 753-759
- 54 Ormarsdóttir S, Ljunggren O, Mallmin H, Olofsson H, Blum WF, Lööf L: Circulating levels of insulin-like growth factors and their binding proteins in patients with chronic liver disease: lack of correlation with bone mineral density. *Liver* 2001; 21 (2): 123-128
- 55 Bracamonte MP, Rud KS, Owen WG, Miller VM: Ovariectomy increases mitogens and platelet induced proliferation of arterial smooth muscle. *Am Journal of Physiol Heart Circ Physiol*.2002; 283 (2): 853-860
- 56 Lindor KD, Janes CH, Crippin JS, Jorgensen RA, Dickson ER: Bone disease in primary biliary cirrhosis: does ursodeoxycholic acid make a difference? *Journal of Hepatology* 1995; 21 (2): 389-392
- 57 Hay JE: Osteoporosis in liver diseases and after liver transplantation. *Journal of Hepatology* 2003; 38 (6): 856-865
- 58 Herlong FH, Recker RR, Maddrey WC: Bone disease in primary biliary cirrhosis: Histologic features and response to 25-Hydroxyvitamin D. *Gastroenterology* 1982; 83: 103-108
- 59 Lips P: Vitamin D deficiency and secondary Hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and Fractures and Therapeutic Implications. *Endocrine Reviews* 2001; 22 (4): 477-501
- 60 Nishiguchi S, Shimoi S, Kurooka H et al.: Randomized pilot trial of Vitamin K2 for bone loss in patients with primary biliary cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2001; 35 (4): 543-545
- 61 Guanabens N, Parés A, Ros I et al: Severity of cholestasis and advanced histological stage but not menopausal status are the major risk factors for osteoporosis in primary biliary cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2005; 42 (4): 573-577
- 62 Smith DLH, Shire NJ, Watts NB et al.: Hyperbilirubinemia is not a major factor to altered bone mineral density in patients with chronic liver disease. *Journal of Clinical Densitometry* 2006; 9 (1): 105-113

- 63 Guichelaar MM, Kendall R, Malinchoc M, Hay JE: Bone mineral density before and after OLT: long-term follow-up and predictive factors. *Liver Transpl.* 2006;12 (9): 1390-1402
- 64 Rügsegger P, Koller B, Müller R: A Microtomographic System of the nonkonstruktive evaluation of bone architecture. *Calaf Tissue Int.* 1996; 58 (1): 24-29
- 65 Klibanski A, Adams Cambell L, Bassford T: Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *NIH Consensus Statement* 2000; 17: 1-45.
- 66 Coleman R, Poirier C, Boskey : Age-Dependent Chanes in the Bones of the Fragilitas Ossium (fro/fro) Mouse Model of Osteogenesis Imperfecta. *Transactions 56th ORS 2010 annual meeting*
- 67 Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH et al.: Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Journal of Bone Miner Res.* 1987; 2 (6): 595-610
- 68 Goulet RW, Goldstein SA, Ciarelli MJ, Kuhn JL, Brown MB, Feldkamp LA: The relationship between the structural and orthogonal compressive properties of trabecular bone. *Journal of Biomech* 1994; 27 (4): 375-389
- 69 Tamada T, Sone T, Jo Y, Imai S, Kaijbara Y, Fukunaga M: Three-dimensional trabecular bone architecture of the lumbar spine in bone metastasis from prostate cancer: comparison with degenerative sclerosis. *Skeletal Radiol* 2005; 34 (3): 149-155
- 70 Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M: The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *Journal of Bone Miner Res* 1989; 4 (1): 3-11
- 71 Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W: Micro-CT – Technology and application for assessing bone structure. *Radiologe* 1999; 39 (3): 203-212
- 72 Hildebrand T and Rügsegger P: Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 1997; 1 (1): 15-23
- 73 López-Larramona G, Lucendo AJ, González-Castillo S, Tenias JM: Hepatic osteodystrophy: An important matter for consideration in chronic liver disease. *World Journal of Hepatology* 2011; 3(12): 300-307
- 74 Gundling F, Seidl H, Löffler N, Strassen I, Schepp W: Metabolische Störungen bei Leberzirrhose (Teil1) - Hepatische Osteopathie und Malnutrition. *Dtsch Med Woschr* 2009; 134 (48): 2461-2464
- 75 Herold G und Mitarbeiter: *Innere Medizin.* Herold 2011

- 76 Kohler T, Beyeler M, Webster D, Müller R: Compartmental Bone Morphometry in the Mouse Femur – Reproducibility and Resolution Dependence of Microtomographic Measurements. *Calcified Tissue International* 2005; 77: 281-290
- 77 Wernle JD, Damron TA, Allen MJ, Mann KA: Local irradiation alters bone morphology and increases bone fragility in a mouse model. *Journal of Biomechanics* 2010; 43: 2738-2746
- 78 Brandi ML: Microarchitecture, the key to bone quality. *Rheumatology* 2009; 48: iv3-iv8
- 79 Issever AS and Link TM: New techniques for the diagnosis of osteoporosis. *Radiologe* 2006; 46 (10): 870-880
- 80 Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R: Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. *Journal of Bone and Mineral Research* 2010; 25(7): 1468–1486
- 81 Particelli F, Mecozzi L, Beraudi A, Montesi M, Baruffaldi F and Viceconti M: A comparison between micro-CT and histology for the evaluation of cortical bone-effect of polymethylmethacrylate embedding on structural parameters. *Journal of Microscopy* 2011; 245: 302-310
- 82 Herrmann M, Tami A, Wildemann B: Hyperhomocysteinemia induces a tissue specific accumulation of homocysteine in bone by collagen binding and adversely affects bone. *Bone*. 2009 Mar;44(3): 467-75.
- 83 Graichen H, Lochmüller E-M, Wolf E et al. : A non-destructive technique for 3-D microstructural phenotypic characterisation of bones in genetically altered mice – preliminary data in growth hormone transgenic animals and normal controls. *Anat Embryol* 1999 ; 199 (3): 239-248
- 84 Eckstein F, Lochmüller E-M, Koller B, et al.: Body composition, bone mass and microstructural analysis in GH-transgenic mice reveals that skeletal changes are specific to bone compartment and gender. *IGF Research* 2002; 12: 116-125
- 85 Floerkemeier T, Witte F, Nellesen J, Thorey F, Windhagen H and Wellmann M: Repetitive recombinant human bone morphogenetic protein 2 injections improve the callus microarchitecture and mechanical stiffness in a sheep model distraction osteogenesis. *Orthopedic Reviews* 2012; volume 4(1): 59-63
- 86 Cemborain A, Castilla-Cortázar I, García M, Muguera B, Delgado G, Díaz-Sánchez M and Picardi A: Effects of IGF-I treatment on osteopenia in rats with advanced liver cirrhosis. *Journal of Physiol. Biochem.* 2000; 56(2): 91-100
- 87 van der Merwe SW, van den Bogaerde JB, Goosen C et al.: Hepatic osteodystrophy in rats results mainly from porasystemic shunting. *GUT* 2003; 52: 580-585

- 88 Nakano A, Kanda T, Abe H: Bone changes and mineral metabolism disorders in rats with experimental liver cirrhosis. *Journal of Gastroenterol Hepatol.* 1996;11(12): 1143-1154
- 89 Shen V, Dempster DW, Birchman R, Xu R, Lindsay R: Loss of cancellous bone mass and connectivity in ovariectomized rats can be restored by combined treatment with parathyroid hormone and estradiol. *J Clin Invest.* 1993; 91(6): 2479–2487
- 90 Schmidt C, Priemel M, Kohler T et al.: Precision and Accuracy of peripheral quantitative computed tomography (pQCT) in the mouse skeleton compared with histology and microcomputed tomography (μ CT). *Journal of Bone and Mineral Research* 2003; 18 (18):1486-1494
- 91 Tezval M, Sehmisch S, Tezval H, Sturmer EK, Sturmer KM: Effekt von Parathormon am proximalen Femur orchiektomierter Ratten: eine Alternative für die Behandlung der hypogonadismus-bedingten männlichen Osteoporose. www.osteologie-journal.de on 2012-08-07 | IP: 85.178.136.22
- 92 <http://www.imd-berlin.de/einsender-aktuellefachinformationen-homocysteinaemie.htm> Zugangsdatum 09.08.2012
- 93 Herrmann M, Wildemann B, Claes L et al.: Experimental hyperhomocysteinemia reduces bone quality in rats. *Clinical Chemistry* 2007; 53 (8): 1455-1460
- 94 Woschnagg H: Arzneimitteltherapie – Relevante Interaktionen und (negative) Effekte auf den Knochen. *Journal of Miner Stoffwechs* 2003;10(3): 16-19
- 95 Carey EJ, Balan V, Kremers WK, Hay JE: Osteopenia and osteoporosis in patients with end-stage liver disease caused by hepatitis C and alcoholic liver disease: not just a cholestatic problem. *Liver Transpl.* 2003; 9(11): 1166-73
- 96 Gaugg M, Erlacher L: Lebererkrankungen und Osteoporose. *J Klin Endokrinol Stoffwechsel* 2011; 4(1): 14-19
- 97 Yoon V, Maalouf M, Sakhaee K: The effects of smoking on bone metabolism. *Osteoporos Int Review* 2012; 23(8): 2081-92
- 98 Katzenellenbogen M, Mizrahi L, Pappo O, Klopstock N, Olam D et al: Molecular Mechanisms of Liver Carcinogenesis in the Mdr2-Knockout Mice. *Mol Cancer Res* 2007; 5(11): 1159-1169
- 99 Katzenellenbogen M, Pappo O, Barash H et al.: Multiple Adaptive Mechanisms to Chronic Liver Disease Revealed at Early Stages of Liver Carcinogenesis in the Mdr2-Knockout Mice. *Cancer Res* 2006; 66 (8): 4001-4009
- 100 Ehnert S, Baur J, Schmitt A et al.: TGF- β 1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation. *PLoS ONE* 2010; 5 (11): e14073
- 101 Erlebacher A, Filvaroff EH, Ye J-Q, Derynck R: Osteoblastic Responses to TGF- β during Bone Remodeling. *Mol Biol Cell.* 1998; 9(7): 1903–1918.

- 102 Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W: Transforming growth factor- β 1 to the bone. *Endocr Rev.* 2005 Oct; 26(6): 743-74.
- 103 Zimmermann G, Moghaddam A, Reumann M, Wangler B, Breier L, Wentzensen A, Henle P, Weiss S: TGF- β 1 als pathophysiologischer Faktor bei der Frakturheilung. *Unfallchirurg* 2007; 110: 130–136
- 104 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S: Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci.* 2002; 7: d793-807
- 105 Border WA, Noble NA: Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl Journal Med.* 1994; 331(19): 1286-92
- 106 Nüssler A, Schmid A, Lau Y, Dooley S, Stöckle U, Wildemann B, Ehnert S: Disturbed TGF- β signaling as cause for reduced bone mineral density in Hepatic Osteodystrophy? *Osteologie* 2011; 20 (Suppl 1): S10
- 107 Bonewald LF, Dallas SL: Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation. *J Cell Biochem.* 1994 Jul; 55(3): 350-7
- 108 Alliston T, Choy L, Ducky P, Karsenty G, Derynck R: TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J.* 20 (2001): 2254-2272
- 109 Oelzner P, Franke S, Hofmann G, Wolf G: Aktives Vitamin-D-Hormon antagonisiert antiosteogene Effekte von AGEs auf humane Osteoblasten. www.osteologie-journal.de on 2012-08-07 | IP: 85.178.136.22
- 110 DeLuca HF: Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80(6 Suppl): 1689S-96S.
- 111 Monegal A, Navasa M, Guañabens N et al.: Osteoporosis and bone mineral metabolism disorders in cirrhotic patients referred for orthotopic liver transplantation. *Calcif Tissue Int.* 1997; 60(2): 148-54
- 112 Hay JE: Bone disease in cholestatic liver disease. *Gastroenterology* 1995; 108(1): 276-283
- 113 Angulo P, Grandison GA, Fong DG, et al.: Bone disease in patients with primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2011; 140(1): 180-188
- 114 Stellon AJ, Davies A, Compston J, Williams R: Osteoporosis in chronic cholestatic liver disease. *Quarterly Journal of Medicine* 1985; 57(223): 783-790
- 115 Ormarsdóttir S, Ljunggren O, Mallmin H, Michaëlsson K, Lööf L: Increased rate of bone loss at the femoral neck in patients with chronic liver disease. *Eur Journal of Gastroenterol Hepatol.* 2002; 14(1): 43-48
- 116 Pietschmann P, Kerschman-Schindl K: Knochenqualität – wissenschaftliche Aspekte versus praktische Relevanz. *J Miner Stoffwechs* 2004; 11(3): 24-26
- 117 Miller SC, Wronski TJ: Long-term osteopenic changes in cancellous bone structure in ovariectomized rats. *Anat Rec.* 1993 ;236(3): 433-441

7. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Abb. | Abbildung |
| ABC-Transporter | ATP-Binding-Cassette |
| Barea | Bone area |
| BMD | Bone mineral density |
| BMP | Bone Morphogenetic Protein |
| BV/TV | Knochenvolumenanteil |
| BSEP | Bile salt efflux pump |
| bzw. | beziehungsweise |
| CCl ₄ | Tetrachlorkohlenwasserstoff |
| Conn.D. | Connectivity Density |
| Ct.Ar. | Cortical Bone Area |
| Ct.Wd | Cortical Bone Width |
| dest. | destilliert |
| d.h. | das heißt |
| DHCR7 | 7-Dehydrocholesterol-Reduktase |
| DEXA | Dual-Energy-X-ray-Absorptiometry |
| GC | Vitamin-D-Binding-Protein |
| GH | Growth hormone / Wachstumshormon |
| HCC | hepatozelluläres Karzinom |
| HU | Hounsfield-Einheit |
| IGF-I | Insulin-like Growth Factor 1 |
| LDL | low density lipoprotein |
| LTX | Lebertransplantation |
| MDR2 | multidrug resistance-2 P-glycoprotein |
| MDR3 | multidrug-resistance-3 P-glycoprotein |
| MEA | 2-Methoxyethyl-Acetat-Lösung |
| MMA | Methylmethacrylat |
| MRP2 | multidrug resistance associated protein 2 |
| NTCP | Na ⁺ -abhängiges Taurocholat-Cotransportierendes Protein |
| OATP | Organische Anionen-Transportierendes Protein |
| PBC | Primäre biliäre Zirrhose |
| PBS | phosphate buffered saline |

| | |
|--------------|-----------------------------------|
| PMMA-Pulver | Poly-Methyl-Meth-Acrylat |
| PSC | primär sklerosierende Cholangitis |
| PTH | Parathormon |
| ROI | Region Of Interest |
| RT | Raumtemperatur |
| SD | Standardabweichung |
| SMI | Structur Model Index |
| Tab. | Tabelle |
| TGF- β | Transforming Growth Factor beta |
| Tb.Dn. | Trabecular Density |
| TbLeMn | Trabecularlength median |
| Tb.N. | Trabecularnumber |
| Tb.Th | Trabecularthickness |
| Tb.Sp. | Trabecularseparation |
| Verzw. | Verzweigung |
| VOI | Volume of interest |
| WHO | World health organisation |
| μ CT | Mirkocomputertomographie |

8. Abbildungsverzeichnis

| | Seite |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Abb. 1 Transportpolarität der humanen Leberzelle Dargestellt sind die unterschiedlichen Transportsysteme in der sinusoidalen (<i>basolateralen</i>) und kanalikulären (<i>apikalen</i>) Plasmamembran einer menschlichen Hepatozyte mit dem jeweilig transportierten Molekülen. | 10 |
| Abb. 2 Pathologie der Leberzirrhose | 16 |
| Abb. 3 Scout-View zur Darstellung der Scannbereiche mit Slicesanzahl | 21 |
| Abb. 4.1 Konturierung eines Slices gegen den Uhrzeigersinn | 22 |
| Abb. 4.2 Darstellung durch Thresholds | 22 |
| Abb. 4.3 Histogramm eines Slices mit einem unterem Threshold von 1892 HU und einem oberen offenen Threshold | 23 |
| Abb. 5 3D Darstellung des gescannten und ausgewerteten Trabekelbereich eines Femurknochens | 24 |
| Abb. 6 Histologischer Schnitt eines Mausfemur mit der Versilberung nach von-Kossa | 31 |
| Abb. 7 Histologischer Schnitt eines Mausfemur mit der Movat-Pentachrom-Färbung | 33 |
| Abb. 8 Knochen mit eingezeichneter ROI (<i>Region of Interest</i>) | 34 |
| Abb. 9 Bearbeitete Bereiche des Knochens beim μ CT | 37 |
| Abb. 10 μ CT-Bilder zur Darstellung einzelner Parameter Bild a: mit Wachstumsfuge und Kortex, sowie mit dem Parameter Knochenfläche (<i>Barea</i>) Bild b: Ausschnitt des trabekulären Bereiches aus Bild a mit den Parametern Trabekelanzahl (<i>Tb.N.</i>), Trabekeldicke (<i>Tb.Th.</i>), Trabekelabstand (<i>Tb.Sp.</i>), Konnektivität (<i>Conn.D.</i>) und Knochenvolumenanteil im Quadrat (<i>BV/TV</i>) | 38 |
| Abb. 11 μ CT-Bilder zu unterschiedlichen Zeitpunkten von $MDR2^{-/-}$ und Wildtyp Lebensalter in Wochen (5,15,20,44); a-d: $MDR2^{-/-}$ -Mäuse; e-h: Wildtyp | 39 |
| Abb. 12 Knochenvolumenanteil der $MDR2^{-/-}$ -Gruppe (<i>rot</i>) im Vergleich zum Wildtyp (<i>blau</i>) | 41 |
| Abb. 13 Gegenüberstellung von Trabekelanzahl im zeitlichem Verlauf $MDR2^{-/-}$ (<i>rot</i>) zeigt vor allem in der 15. und 20. Woche eine Größere Anzahl von Trabekeln im Vergleich zum Wildtyp (<i>blau</i>) ($p < 0,05$ Mann-Whitney) | 42 |

| | | |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abb. 14 | Trabekelabstand im Vergleich MDR2 ^{-/-} und Wildtyp Die Wildtypen (<i>blau</i>) zeigen ab der 15. Woche und mit zunehmenden Alter einen geringeren Abenstand zwischen den Trabekel im Vergleich zu den MDR2 ^{-/-} -Mäusen (<i>rot</i>) | 43 |
| Abb. 15 | Trabekeldicke im zeitlichem Verlauf von MDR2 ^{-/-} (<i>rot</i>) und Wildtyp (<i>blau</i>) | 43 |
| Abb. 16 | Darstellung der Knochenmineraldichte (BMD) von MDR2 ^{-/-} (<i>rot</i>) und Wildtyp (<i>blau</i>) | 44 |
| Abb. 17 | Zeitlicher Verlauf vom Knochenvolumenanteil von MDR2 ^{-/-} (<i>rot</i>) und Wildtyp (<i>blau</i>) | 46 |
| Abb. 18 | Gegenüberstellung von MDR2 ^{-/-} und Wildtyp von der Knochenmineraldicht Die Knochen der MDR2 ^{-/-} -Mäuse (<i>rot</i>) sind in den ersten Lebenswoche, vor allem in der 15. Woche, stärker mineralisiert im Vergleich zu den Wildtypen (<i>blau</i>), ab der 20. Woche nimmt die Knochenmineraldicht bei den Wildtypen zu; (p<0,05 Mann-Whitney) | 47 |
| Abb. 19 | Knochenfläche von MDR2 ^{-/-} (<i>rot</i>) und Wildtyp (<i>blau</i>) | 47 |
| Abb. 20 | histologisches Schnittbild zur Darstellung von Parametern Bild a: mit Wachstumsfuge und Kortex sowie mit den Parametern Knochenbreite (<i>BWd</i>) und Kortexdicke (<i>CtWd</i>) Bild b: vergrößerter Ausschnitt des trabekulären Bereiches aus Bild a mit den Parametern Trabekellänge (<i>TbLeMe</i>), Verzweigung (<i>Verzw.</i>) und Knochenvolumenanteil im Quadrat (<i>BV/TV</i>) | 49 |
| Abb. 21 | Histologische Schnittbilder von der Versilberung nach von-Kossa Lebensalter in Wochen (5,15,20,44); a-d: MDR2 ^{-/-} -Mäuse; e-h: Wildtyp Mineralisiertes Knorpel- und Knochengewebe stellt sich schwarz und nichtmineralisierter Knorpel und Bindegewebe braun dar | 51 |
| Abb.22 | Trabekeldichte von MDR2 ^{-/-} und Wildtyp über den gesamten zeitliche Verlauf ist die Trabekeldichte bei den Wildtypen (<i>blau</i>) größer als bei den MDR2 ^{-/-} -Mäusen (<i>rot</i>), mit Signifikantem Unterschied in der 15. und 44. Woche; (p<0,05 Mann-Whitney) | 53 |
| Abb. 23 | Trabekellänge von MDR2 ^{-/-} und Wildtyp im zeitlichen Verlauf Die durschnittliche Trabekellänge der Wildtypen (<i>blau</i>) ist im Vergleich zur MDR2 ^{-/-} -Gruppe (<i>rot</i>) immer länger, vor allem in der 15. und 44. Woche (p<0,05 Mann-Whitney) | 53 |
| Abb. 24 | Anzahl der Trabekelverzweigungen von MDR2 ^{-/-} und Wildtyp Die Wildtypen (<i>blau</i>) zeigen in allen Messpunkten (vor allem in Der 15., 20. und 44. Woche) eine vermehrte Verzweigung zwischen Den Trabekeln als die MDR2 ^{-/-} -Gruppe (<i>rot</i>); (p<0,05 Mann-Whitney) | 54 |

| | | |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abb. 25 | Gegenüberstellung der Knochenbreite von MDR2 ^{-/-} und Wildtyp Die Wildtypen (<i>blau</i>) haben bis zur 15. Woche und am letzten Messpunkt einen breiteren Knochen als die MDR2 ^{-/-} -Mäuse (<i>rot</i>) (p<0,05 Mann-Whitney) | 55 |
| Abb. 26 | Gegenüberstellung der Kortexdicke von MDR2 ^{-/-} (<i>rot</i>) und Wildtyp (<i>blau</i>) | 55 |
| Abb. 28 | Histologische Schnittbilder von der Movat-Pentachrome-Färbung Lebensalter in Wochen (5,15,20,44); a-d: MDR2 ^{-/-} -Mäuse; e-h: Wildtypen; mineralisierter Knochen stellt sich leuchtend gelb und Knorpel blaugrün dar | 58 |

9. Tabellenverzeichnis

| | | |
|---------|--------------------------------------------------------------------|----|
| Tab. 1 | Osteoporosestadien | 6 |
| Tab. 2 | Einteilung der Osteoporoseformen | 9 |
| Tab. 3 | häufigsten Ursachen der Leberzirrhose | 12 |
| Tab. 4 | Gruppeneinteilung der Versuchstiere | 19 |
| Tab. 5 | Einbettungsschema | 27 |
| Tab. 6 | Verarbeitungsschema vom Polymerisationssystem Technovit 9100neu | 28 |
| Tab. 7 | Schema zur Versilberung nach von-Kossa | 31 |
| Tab. 8 | Schema zur Färbung nach Movat-Pentachrome-Färbung | 32 |
| Tab. 9 | Längenmessung [in cm] der Mausknöchel | 36 |
| Tab. 10 | Ergebnisse von Structur Model Index und Connectivity Density | 45 |
| Tab. 11 | Ergebnisse von Structur Model Index | 48 |

10. Danksagung

Die vorliegende Dissertationsarbeit wurde im Julius-Wolff-Institut der Charité in der Arbeitsgruppe „Stimulation der Heilung“ absolviert. Ich bedanke mich für die Möglichkeit, diese Dissertationsarbeit an dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité (Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Norbert P. Haas) bzw. dem Julius Wolff Institut (Leitung von Prof. Dr. Georg Duda) durchführen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof Dr. rer. nat. Britt Wildemann für die exzellente wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung während dieser Zeit. Durch ihr großes Engagement wurde mir die Durchführung dieser Arbeit sehr erleichtert.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Dr. med. vet. Mirja Faßbender bedanken, die mir zu jeder Zeit bei allen Fragen hilfsbereit zur Seite stand.

Sehr gute Unterstützung bei der radiologischen Untersuchung erhielt ich von Herrn Mario Thiele.

Bei der histologischen Aufarbeitung der Präparate unterstützten mich hilfreich Frau Marzena Princ und Frau Zienab Kronbach, die mir die Arbeit sehr erleichtert haben.

Bei den Mitarbeitern des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie der Medizinischen Fakultät der Charité möchte ich mich für die kollegiale Zusammenarbeit und die einfach schöne Zeit bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Nüssler für die erfolgreich Kooperation und Unterstützung des Projektes sowie Frau Dr. Sabrina Ehnert und ihrer Doktorandin Frau Andrea Schmidt für die gute Zusammenarbeit.

Mein größter Dank gilt Moritz und meiner Familie, die mich auch in schwierigen Momenten immer unterstützt haben und am Gelingen dieser Arbeit großen Anteil haben.

11. Lebenslauf

„ Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektrischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

12 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Yvonne Lau, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Untersuchung am Knochen bei hepatischer Osteodystrophie am MDR2^{-/-}-Mausmodell] selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Publikationsliste

Die erhobenen Daten dieser Arbeit sind Teil eines Hauptprojektes in München unter der Leitung von Prof Nüssler und wurden diesen für die nachstehenden Publikationen zur Verfügung gestellt.

Schmid, A; Lau, Y; Ehnert, S; Dooley, S; Stöckle, U; Wildemann, B; Nussler, AK:
MDR2-/- Mice as Model for Hepatic Osteodystrophy. J Gastroenterol 2011; 49 - P2_78

Schmid, A; Lau, Y; Ehnert, S; Dooley, S; Stöckle, U; Wildemann, B; Nussler, AK.
MDR-/- mice as model for hepatic osteodystrophy.
Falk Workshop 2011 - Liver and Immunology, Regensburg

Nüssler, AK; Schmid, A; Lau, Y; Dooley, S; Stöckle, U; Wildemann, B; Ehnert, E.
Disturbed TGF- β signaling as cause for reduced bone mineral density in Hepatic Osteodystrophy? Osteologie 2011; 20 (Suppl 1):S10

Nüssler, AK; Schmid, A; Lau, Y; Dooley, S; Stöckle, U; Wildemann, B; Ehnert, E.
Disturbed TGF- β signaling as cause for reduced bone mineral density in Hepatic Osteodystrophy? Osteologie 2011, Fürth

Schmid, A; Ehnert, S; Lau, Y; Dooley, S; Stöckle, U; Wildemann, B; Nüssler, AK.
Mouse model for hepatic osteodystrophy.
14.Chirurgische Forschungstage 2010, Rostock