

---

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin  
an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg  
Arbeitsgruppe Q-BAM  
(Komm. Direktor: PD Dr. med. David Wohlrab)

**Ultraschallbasierte Untersuchungen struktureller  
Parameter und elastomechanischer Knocheneigenschaften  
unter dem Einfluss einer Leptindefizienz am  
genetisch veränderten C57Bl/6J - Mausmodell**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt der  
Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von  
Herrn **JÖRG MARR**,  
geb. am 07.11.1979 in Coburg

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Kay Raum

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Kay Raum

2. Prof. Dr. med. Raimund Kinne

Öffentliche Verteidigung am 28.04.2010

---

## REFERAT

Mit hochfrequentem Ultraschall können morphologische und elastische Gewebeeigenschaften mit hoher örtlicher Auflösung zerstörungsfrei dargestellt und quantitativ ermittelt werden. Die mittels hochauflösender akustischer Mikroskopie bestimmbare akustische Impedanz spiegelt die elastische Anisotropie wieder und korreliert gut mit dem elastischen Koeffizient  $c_{ij}$ . Die akustische Mikroskopie gilt als geeignete Methode zur mikroelastischen Knochenphänotypisierung.

Ziel war es, den Einfluss einer Leptindefizienz auf die strukturellen und mechanischen Knocheneigenschaften des Femur der C57Bl/6J Maus unter Berücksichtigung des Alters und Geschlechts zu untersuchen. Dadurch sollte zu einem besseren und umfassenderen Verständnis um den umstrittenen Einfluss des obese (ob) Gens mit seinem Hormon Leptin auf den Knochenstoffwechsel beigetragen werden.

Wildtyp (wt) und leptindefiziente (ob/ob) Mäuse wurden im Alter von 3, 6, 9 und 12 Monaten sakrifiziert. Messungen mit dem C-Bild Verfahren bei 200 MHz wurden an 57 transversalen wt und 45 ob/ob Femurschnitten durchgeführt und akustische Impedanz sowie strukturelle Parameter ermittelt.

Sowohl Knochendurchmesser als auch Knochenmarksdurchmesser änderten sich signifikant unter dem Einfluss des Alters, Geschlechts und der Kombination beider Parameter. Bezüglich der Kortikalisdicke konnte eine leichte Abhängigkeit vom Alter beobachtet werden. Die Femurlänge zeigte nur unter dem Einfluss des Phänotyps signifikante Veränderungen. Die akustische Kortikalisimpedanz war signifikant abhängig vom Phänotyp, Alter und Geschlecht. Nur innerhalb der 3 Monate- und der 9 Monategruppe waren die Werte der ob/ob Maus gegenüber der wt Maus signifikant reduziert. Im Alter von 12 Monaten waren die Impedanzwerte der wt-Gruppe gegenüber der ob/ob-Gruppe leicht erhöht.

Die Beobachtungen geben Anhalt, dass die Knochenreifung unter dem Einfluss der Leptindefizienz reduziert ist und im späteren Alter reduzierte Knochenneubildung und –resorption gegenüber einer periostnahen bis zentralen Knochenneubildung in der wt Maus zumindest im periostnahen Bereich schließlich zu höheren Knochenfestigkeiten führt.

*Marr, Jörg: Ultraschallbasierte Untersuchungen struktureller Parameter und elastomechanischer Knocheneigenschaften unter dem Einfluss einer Leptindefizienz am genetisch veränderten C57Bl/6J - Mausmodell*

*Halle(Saale), Univ., Med. Fak., Diss ,75 Seiten, 2009*

---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>Symbole und Abkürzungen</b>	<b>III</b>
<b>Glossar</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>2 Grundlagen Knochen</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Allgemeine Makrostruktur der Extremitätenknochen</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Knochenmatrix</b>	<b>8</b>
<b>2.3 Spezifische Zellen des Knochens</b>	<b>8</b>
2.3.1 Osteoblasten	8
2.3.2 Osteozyten	9
2.3.3 Endostale Saumzellen	9
2.3.4 Osteoklasten	9
2.3.5 Regulation von Osteoblasten und Osteoklastenfunktion	10
<b>3 Leptin</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Leptin und seine Rolle im Knochenstoffwechsel</b>	<b>14</b>
<b>4 Grundlagen Ultraschall und Funktionsweise eines akustischen Mikroskops</b>	<b>19</b>
<b>5 Zielstellung</b>	<b>21</b>
<b>6 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
<b>6.1 Chemikalien</b>	<b>22</b>
<b>6.2 Lösungen und Medien</b>	<b>22</b>
<b>6.3 Mausmodell</b>	<b>23</b>
<b>6.4 Proben</b>	<b>23</b>
6.4.1 Präparation	23
6.4.2 Einbettung	23
6.4.3 Bearbeitung der Proben	24
<b>6.5 Ultraschallbasierte Untersuchungsmethode SAM200Ex</b>	<b>24</b>
6.5.1 Impedanzberechnung	26
6.5.2 Parameterermittlung	29
6.5.3 Statistische Auswertung	31

---

<b>7</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
<b>7.1</b>	<b>Bestimmung struktureller Parameter</b>	<b>32</b>
7.1.1	Knochendurchmesser (B.Dm)	33
7.1.2	Knochenmarksdurchmesser (Ma.Dm)	35
7.1.3	Kortikalisdicke (Ct.Wi)	37
7.1.4	Femurlänge (Fe.Le.)	38
7.1.5	Körpergewicht	39
<b>7.2</b>	<b>Elastische Gewebsparameter</b>	<b>41</b>
7.2.1	Kortikalisimpedanz	41
7.2.2	Radialer Impedanzverlauf von periostal nach endostal	42
7.2.3	Kortikalisimpedanz in Abhängigkeit vom Körpergewicht	44
<b>7.3</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>Diskussion</b>	<b>45</b>
<b>8.1</b>	<b>Methodik</b>	<b>45</b>
<b>8.2</b>	<b>Strukturelle Parameter</b>	<b>46</b>
<b>8.3</b>	<b>Elastische Gewebsparameter</b>	<b>47</b>
<b>9</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>50</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>51</b>
<b>11</b>	<b>Thesen</b>	<b>67</b>
	<b>Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit</b>	<b>70</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>70</b>
	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>71</b>
	<b>Erklärung über frühere Promotionsversuche</b>	<b>72</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>73</b>

---

## SYMBOLLE UND ABKÜRZUNGEN

$f$	Frequenz [Hz] = [1/s]
$x,y,z$	kartesische Koordinaten [m]. Die Schallstrahlachse ist üblicherweise auf der $z$ -Achse, $x$ und $y$ sind die dazu orthogonalen Richtungen. Bei einem C-Scan wird die Richtung der kontinuierlichen Bewegung als $x$ und die Richtung der schrittweisen Bewegung als $y$ bezeichnet.
$T$	Transmissionskoeffizient; Temperatur [K]
$TOF$	Time of Flight (Puls-Echo-Laufzeit) [s]
$Z$	Akustische Impedanz [rayl] = [kgm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]
$\lambda$	Wellenlänge [m]
$\rho$	Dichte [kg/m <sup>3</sup> ]
$\omega$	Kreisfrequenz [Hz]
<i>AgRP</i>	Agouti-related Protein
<i>B.Dm.</i>	Bone Diameter (Knochendurchmesser)
<i>BMC</i>	Bone Mineral Content (Knochenmineralgehalt)
<i>BMD</i>	Bone Mineral Density (Knochenmineraldichte)
<i>BMP</i>	Bone Morphogenetic Protein
<i>bzgl.</i>	bezüglich
<i>bzw.</i>	beziehungsweise
<i>ca.</i>	circa
<i>DMB</i>	Degree of Mineralization of Bone
<i>CART</i>	Cocaine Amphetamine Related Transcript
<i>CSF</i>	Macrophage Colony Stimulating Factor
<i>Ct.Wi.</i>	Cortical width (Kortikalisdicke)
<i>Fe.Le.</i>	Femoral length (Femurlänge)
<i>IGF</i>	Insulinlike Growth Factor
<i>IL</i>	Interleukin
<i>Ma.Dm.</i>	Marrow Diameter (Knochenmarksdiameter)
<i>MHz</i>	Megahertz
<i>MMA</i>	Methylmethacrylat
<i>MPS</i>	Monozytäres Phagozytensystem

---

<i>PMMA</i>	Polymethylmethacrylat
<i>POMC</i>	Proopiomelanocortin
<i>pQCT</i>	periphere Quantitative Computertomographie
<i>PDGF</i>	Plateled derived Growth Factor (Plättchenwachstumsfaktor)
<i>RANK(L)</i>	Receptor Activator of Nuclear Factor $\kappa$ B (Ligand)
<i>ROC</i>	Radius of Curvature
<i>ROI</i>	Region of Interest
<i>RUNX2</i>	Runt-related Transcription Factor 2
<i>SAM</i>	Scanning Acoustic Microscope (akustisches Rastermikroskop)
<i>TGF-<math>\beta</math></i>	Transforming Growth Factor
<i>TNF</i>	Tumor Necrose Factor (Tumornekrosefaktor)

---

## GLOSSAR

- C-Bild** Der Wandler wird mäanderförmig in einer Ebene parallel zur Probenoberfläche geführt. Üblicherweise wird das Puls-Echo-Signal innerhalb eines wählbaren Zeitfensters (Gate) demoduliert und integriert, so dass pro Scanpunkt ein integraler Spannungswert zur Verfügung steht. Diese werden zu einem zweidimensionalen Grauwertbild zusammengesetzt. Im hier beschriebenen SAM100-System wird hingegen von jedem Scanpunkt das komplette Puls-Echo-Signal gespeichert.
- SAM** (=Scanning Acoustic Microscope). Das zu dieser Arbeit verwendete SAM200Ex ist eine modifizierte Version des KSI SAM100 (Krämer Scientific Instruments, Herborn, Deutschland)

## 1 EINLEITUNG

Unser Verständnis über die „Biologie des Knochens“ wurde in den letzten Jahren und Jahrzehnten nicht zuletzt durch die enormen Fortschritte im Bereich der Maus- und Humangenetik stark erweitert. Gleichzeitig ist jedoch unser Wissen um die physiologischen Vorgänge und Gegebenheiten auf molekularer und genetischer Ebene noch sehr stark eingeschränkt und somit wiederum unser Verständnis um die Pathophysiologie von Knochen- und Knorpelerkrankungen. Dieses Wissen ist allerdings die Voraussetzung zur Etablierung und Weiterentwicklung adäquater und erfolgreicher Therapien, speziell der Osteoporose und Osteoarthritis. Die bereits aktuell durch die Osteoporose bestehende sozioökonomische Problematik wird sich in den nächsten Jahren durch unsere demographische Situation weiter verschärfen. Neue Forschungsergebnisse, vor allem zu Regulationsmechanismen und Schlüsselfaktoren des „Knochenremodeling“ könnten jedoch zu einem Wandel oder einer Weiterentwicklung unseres Wissens führen und zu Fortschritten in der Behandlung von Knochenerkrankungen beitragen.

In den letzten Jahren haben genetisch veränderte Mausmodelle ein immer größeres Potential entwickelt, in bislang unerforschte Bereiche vorzudringen und neue Ideen in Bezug auf die Therapie regenerativer Erkrankungen zu entwickeln. Die Bedeutung solcher Mausmodelle ist nicht zuletzt durch die Nobelpreisverleihung für Medizin oder Physiologie 2007 [92] an die Forscher Mario Capecchi, Oliver Smithies und Martin J. Evans deutlich geworden, die das Verfahren entwickelt haben, gezielt bestimmte Gene ausschalten zu können und somit die sogenannte „Knock-out-Maus“ ins Leben gerufen haben.

Aktuelle Arbeiten an solchen Modellen [3-5,11,62,132,133] liefern stichhaltige Beweise, dass die Knochenstruktur und Knochenfestigkeit durch eine begrenzte Zahl von Genen reguliert wird. Der Maximalwert der Knochendichte, der während des pubertären Wachstums auftritt, wird als einer der stärksten Determinanten für spätere osteoporotische Frakturen angesehen [11]. Aufgrund von Zwillingsstudien [25,60,65,95,118,120,126] schätzt man heute, dass über 70% der Variabilität der Knochendichte genetisch bedingt ist.

Durch die Entwicklung genetisch veränderter Mausmodelle stehen beispielsweise Biologen ausgezeichnete Möglichkeiten zur Verfügung, Knochenentwicklung, Knochenmetabolismus, aber ebenso Physiopathologien und therapeutische Mechanismen zu untersuchen und zu entwickeln.

Aus dieser Bandbreite an Modellen hat das obese-Gen mit seinem Produkt Leptin viel Aufmerksamkeit und Interesse auf sich gezogen und wurde Inhalt von mehr als 1000 Publikationen innerhalb der letzten Jahre.

Trotz alledem ist unser Verständnis über dessen Einfluss auf Knochenentwicklung, Knochenphänotyp und Knochenremodeling nach wie vor sehr umstritten. Dies verlangt nach neuen und hochauflösenden Techniken, um sensibel und quantitativ den Einfluss der Leptindefizienz auf den Knochenphänotyp zu analysieren und so zur Vervollständigung und Klärung des Verständnisses beizutragen.

## 2 GRUNDLAGEN KNOCHEN

Knochen ist ein biologisches Material, das im Rahmen seiner funktionellen Aufgaben ständigem Umbau ausgesetzt ist. Nicht nur die Vorbeugung vor Materialermüdung, sondern auch seine Aufgabe der mechanischen Stütz- und Haltefunktionen erfordert Reaktion auf stetig wechselnde Belastungen und Beanspruchungen. Auch die Reparatur von Mikro- und Makrotraumen erfordert Umbauprozesse. Nicht zuletzt dient der Knochen als bedeutender Kalzium- und Phosphatspeicher und unterliegt permanenten Mineralisations- und Demineralisationsvorgängen.

Im Rahmen dieser Veränderungen zeigt gesunder Knochen adäquate, den Anforderungen angepasste Umbauprozesse, die als Knochenremodeling bezeichnet werden. Um diese Aufgaben erfüllen zu können, ist Knochen mit vier spezifischen Zellen ausgestattet: den Osteoblasten, Osteozyten, endostalen Saumzellen und den Osteoklasten.

### 2.1 Allgemeine Makrostruktur der Extremitätenknochen

Alle Extremitätenknochen des Menschen, aber auch der Maus, bestehen aus langen Röhrenknochen (*Ossa longa*). Diese bestehen aus einem Schaft (*Diaphyse*) und zwei Enden (*Epiphysen*). Letztere sind mit hyalinem Gelenkknorpel überzogen und bilden die Gelenkflächen. Zwischen Epiphyse und Diaphyse befindet sich die *Metaphyse*, welche sich als verbreiteter Knochenabschnitt darstellt. Die Epiphysenfuge, die sich nach der Pubertät schließt, befindet sich zwischen Metaphyse und Diaphyse und stellt die Wachstumszone des Knochens dar. Sie wird nach Verknöcherung als *linea epiphysealis* bezeichnet.

Die äußere Wand des Knochens (*substantia corticalis*, Kortikalis) besteht aus kompaktem Knochen (*substantia compacta*, Kompakta) und ist im Schaftbereich dicker als im Epiphysenbereich. Die Kompakta umschließt die Markhöhle des Knochens, welche beim Erwachsenen mit gelbem Knochenmark gefüllt ist. Die Epiphysen und Metaphysen bestehen hauptsächlich aus einer trajektorialen Anordnung von Knochenbälkchen (*substantia spongiosa*, Spongiosa), die mit blutbildendem, rotem Knochenmark ausgefüllt sind.

Überzogen wird der Knochen, ausgenommen den Gelenkflächen, von außen mit Knochenhaut (Periost), die aus zwei funktionellen Schichten besteht: einer derben äußeren aus vorwiegend Kollagenfasern und der zell-, gefäß- und nervenreichen Kambiumschicht (*stratum osteogenicum*), von welcher Knochenneubildung durch Osteoblastendifferenzierung ausgeht. Die Oberfläche der Spongiosatrabel, sowie die zur Markhöhle befindliche Oberfläche der Kompakta werden mit Endost bekleidet, das vor allem aufgrund der großen Oberfläche einen hohen Stellenwert für Resorptionsvorgänge einnimmt [29].

### 2.2 Knochenmatrix

Die Knochenmatrix oder Interzellulärsubstanz besteht, abgesehen von einem Wasseranteil (~10%), aus einer organischen (~25%) und einer anorganischen oder mineralischen Komponente (~65%) [112]. Der mineralische Anteil besteht zum größten Teil aus Hydroxylapatit-Kristallen, welche parallel zu Kollagenfasern angeordnet und von gebundenem Wasser umgeben sind. Weiterhin enthalten sind Kalziumcarbonat und amorphes Kalziumhydrogenphosphat. Die Matrix enthält außerdem verschiedene Ionen, wobei Kalzium-, Phosphat-, OH- und Carbonationen den größten Anteil darstellen. Die anorganischen Bestandteile werden in die organische Knochengrundsubstanz eingelagert und sorgen so für die Festigkeit des Knochens. Die organische Komponente besteht zu 90% aus Kollagen Typ I, das von den Osteoblasten produziert wird und durch Lamellenbildung und Quervernetzung dem Knochen Zugfestigkeit und Elastizität verleiht und die Kalzifizierungsmatrix darstellt. Im Lamellenknochen adulter Säuger und Menschen sind die in Bündeln parallel angeordneten Kollagenfibrillen nach dem „twisted plywood Modell“ in Schichten angeordnet, die sukzessiv um 30° gegeneinander verdreht sind und einzelne Einheiten bilden [46,47]. Die Dicke der einzelnen Lagen kann stark variieren, so dass der Eindruck einer Sperrholzstruktur entsteht. Die organische Komponente besitzt noch weitere Kollagene, nichtkollagene Proteine und Glykoproteine, deren Funktion zum Teil noch unbekannt und aktueller Gegenstand der Forschung ist [29].

### 2.3 Spezifische Zellen des Knochens

#### 2.3.1 Osteoblasten

Osteoblasten sind einkernige Zellen, die alle wesentlichen organischen Matrixkomponenten (Osteoid) bilden. Diese Substanzen werden nach allen Seiten abgeschieden, so dass sich die Zellen allmählich selbst in ihr Osteoid einmauern.

Osteoblasten weisen eine hohe Syntheseleistung auf und sind reich an alkalischer Phosphatase, welche als Kennmolekül für die Osteoblastendifferenzierung fungiert [29].

Die knochenaufbauenden Zellen entstehen aus multipotenten Stromazellen, welche sich unter dem Einfluss, vor allem von Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), in bipotente mesenchymale Vorläuferzellen (Progenitorzellen) und Präosteoblasten differenzieren können. Präosteoblasten und bipotente Progenitorzellen befinden sich im Knochenmark, Endost und Periost [29].

### 2.3.2 Osteozyten

Osteozyten stellen in verkalkte Knochenmatrix eingebaute Osteoblasten dar und sind der dominierende Zelltyp des Knochens. Sie sind untereinander und mit Osteoblasten und endostalen Saumzellen über ihre Zellfortsätze durch Nexus verbunden. Die Osteozyten bilden ein dreidimensionales zelluläres Netzwerk, dem die Aufgabe eines mechanosensorischen Organs zugeschrieben wird [88]. Die Zellen sollen durch ihre hohe Sensitivität gegenüber mechanischer Belastung, vor allem der Scherbelastung, eine Anpassung des Gewebes durch Knochenremodeling bewirken. Man vermutet, dass sie mechanische Stimuli in chemische Signale übersetzen und an die Osteoblasten weiterleiten [17,23,24,140]. Weiterhin wird angenommen, dass das Zellnetzwerk die informationsliefernde Stelle, gemäß dem „Wolff’schen Gesetz“, des adaptiven Knochenremodelings darstellt [88].

### 2.3.3 Endostale Saumzellen

Es handelt sich hierbei um flache Zellen mit abgeplattetem Zellkern, die einen kontinuierlichen Zellverband auf den Trabekeln und auf der inneren Oberfläche der Kortikalis bilden. Die endostalen Saumzellen sind ruhende Osteoblasten und sind untereinander und zu den Osteozyten mittels Nexus verbunden. Sie sind wahrscheinlich an der Regulation der Knochenresorption beteiligt, indem sie den Osteoklasten eine erosionsfähige Oberfläche schaffen [29]. Endostale Saumzellen leiten sich ebenso wie Osteoblasten und Osteozyten von Osteoprogenitorzellen ab.

### 2.3.4 Osteoklasten

Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen und haben sich terminal aus hämatopoetischen Zellen des monozytären Phagozytensystems (MPS) differenziert [64]. Die Zellen befinden sich typischerweise im Bereich der Trabekel in sogenannten Howship’schen Lakunen oder in kompaktem Knochengewebe in der Spitze von Erosionstunneln und sind für den Abbau von Knochensubstanz zuständig.

Die Zellen bestehen jeweils aus einer lakunären (apikalen) und einer stromawärtigen (basolateralen) Membranoberfläche. Am apikalen Pol der Zellen befindet sich ein

Bürstensaum (ruffled border) zur Oberflächenvergrößerung mit angrenzender Haftzone („sealing zone“). An der lakunären Oberfläche finden die Knochenabbau- und Resorptionsvorgänge statt [29].

### 2.3.5 Regulation von Osteoblasten und Osteoklastenfunktion

Wie bereits einleitend erwähnt wurde, unterliegt Knochengewebe lebenslangen Umbauvorgängen (Remodeling), die unter anderem, in Abhängigkeit vom Grad der mechanischen Belastung, für ein optimales Verhältnis zwischen Knochenstruktur und –masse sorgen sollen. Während des appositionellen Wachstums lagert das Periost auf die Diaphyse ständig neuen Knochen ab, der von innen her, das heißt von der Markhöhle wieder abgebaut wird. Nachdem diese Vorgänge im Erwachsenenalter beendet werden, beginnen sie im höheren Alter bis zu einem gewissen Grad erneut, wobei die endostale Resorption den periostalen Anbau übersteigen kann. Die Dicke der Kompakta sowie die Größe der Markhöhle werden demnach vom Verhältnis der jeweiligen An- und Abbaurate geregelt [87]. Ansonsten spricht man im kortikalen Knochen vom „sekundären Osteon Remodeling“, bei dem primäre Osteone und Generallamellen durch sekundäre Osteone ersetzt werden. Bei diesem Prozeß wird der von Osteoklasten gebildete Resorptionstunnel durch Osteoblasten mit neuer Knochensubstanz gefüllt [112]. Bei diesen gegenläufigen Mechanismen ist es essentiell, dass Abbau und Wiederaufbau in einem fein abgestimmten Gleichgewicht zueinander stehen. Durch die Umbauvorgänge findet nicht nur eine permanente Knochengewebserneuerung, sondern auch eine Anpassung des Mineralgehaltes statt. Die genauen Regulationsmechanismen des Remodeling sind noch nicht annähernd in ihrer Gesamtheit erschlossen bzw. verstanden und sind aktueller Gegenstand der Forschung. Um den Rahmen der Arbeit nicht zu sprengen, sollen hier nur einige grundlegende Verständnisse geschaffen werden.

Systemisch kann Remodeling durch Wachstumshormone, Schilddrüsen- und Nebenschilddrüsenhormone aktiviert und durch Kalzitinin und Kortison gehemmt werden. Neben dem systemischen Weg gibt es aber auch lokale Einflussfaktoren, beispielsweise Traumata, Implantate und mangelnde Blutversorgung des Knochengewebes, die ein Remodeling auslösen können [112]. Aufgrund der erwähnten notwendigen Feinabstimmung zwischen den resorptiven und aufbauenden Aktivitäten scheint die Frage nach regulierenden Faktoren von Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität von besonderem Interesse. Osteoblasten bilden verschiedene Zytokine, wie beispielsweise Interleukin-6 (IL-6), Plättchenwachstumsfaktor (PDGF), Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ), Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ),

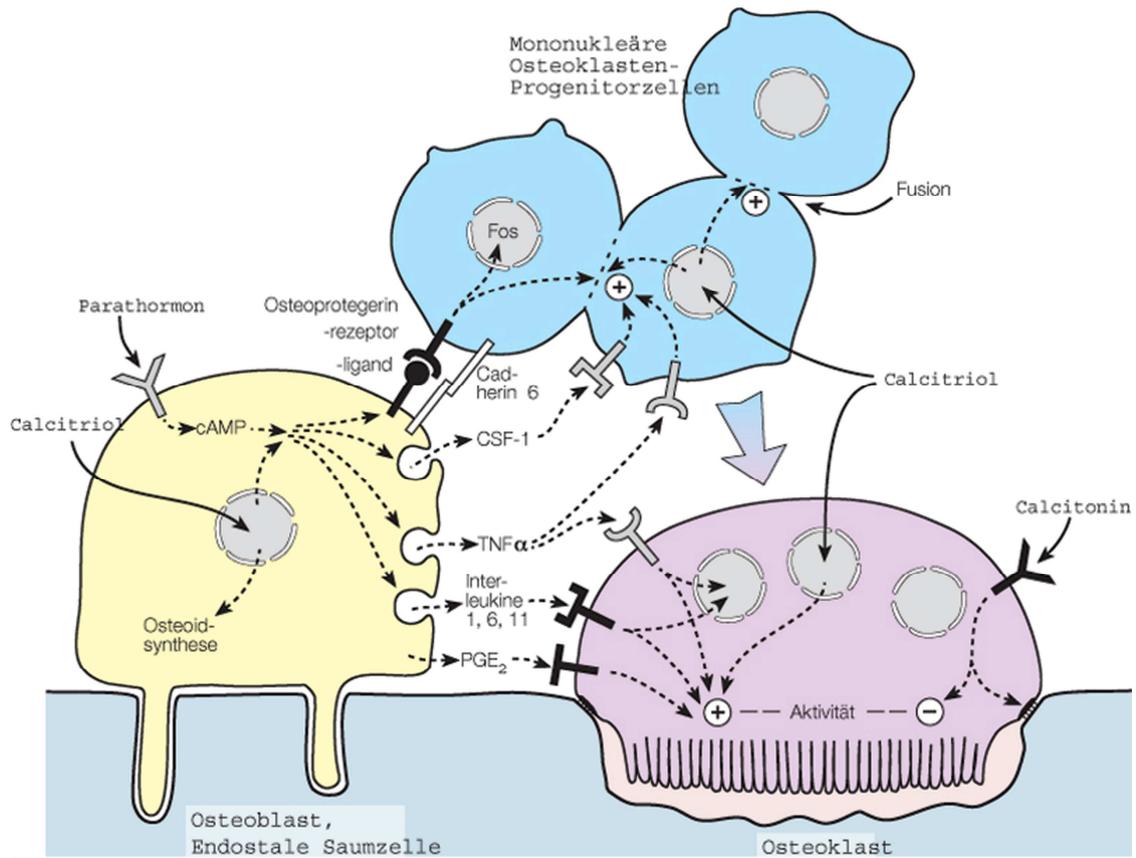
Insulinlike Growth Factor –I und –II (IGF-I, -II), Macrophage Colony Stimulating Factor (CSF-1) und einen membranständigen Osteoprotegerin-Ligand Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand (RANKL).

Dabei wirken TGF- $\beta$ , PDGF, IGF-I und –II autokrin auf Osteoblasten und können so Proliferation von Osteoblasten bzw. Präosteoblasten, aber auch die Osteoidbildung stimulieren [29]. Erlebacher et al. [36] haben z.B. gezeigt, dass TGF- $\beta$  eine wichtige Rolle in der Kopplung zwischen Resorption und Knochenaufbau einnimmt [36]. Er wird von Osteoblasten in die Knochenmatrix eingebaut und durch osteoklastäre Resorption während des Remodelingprozesses freigesetzt und kann dann seine Wirkung auf Osteoblasten und Osteoklasten entfalten [90,94]. Zwei Transkriptionsfaktoren, die essentiell für die Osteoblastenproliferation und –differenzierung sind, sind der Core Binding Factor 1 (Runx2) [31,69,91] und Osterix [64]. Neben autokrinen Faktoren gibt es zudem osteoblastäre Faktoren wie IL-6 und TNF- $\alpha$ , die Osteoklasten aktivieren und CSF-1, sowie den Osteoprotegerin-Ligand, welche essentielle Differenzierungsfaktoren für Osteoklasten aus Osteoklasten-Progenitorzellen sind.

Die Progenitorzellen der Osteoklasten gelangen über die Blutbahn in das Knochengewebe und müssen in Zellkontakt mit Saumzellen oder Osteoblasten treten, um zu Osteoklasten fusionieren zu können. Dieser Zellkontakt findet zwischen dem Osteoprotegerin-Rezeptor (RANK) von osteoklastären Progenitorzellen und RANKL statt. Weitere osteoblastäre Faktoren der Osteoklastendifferenzierung sind Interleukin-1, -6, -11, TNF- $\alpha$  und Prostaglandin E2.

**Abbildung 1** soll die Wechselwirkungen zwischen Osteoblast und Osteoklast und die tragende Rolle der Osteoblasten in der Aktivierung und Differenzierung der Osteoklasten verdeutlichen.

Sowohl Knochenresorption, als auch Knochenaufbau unterliegen unter anderem einer Regulation über  $\beta$ 2-Rezeptoren, die über die Stimulation der RANKL-Synthese die Osteoklastendifferenzierung fördern und somit dem Knochenabbau Vorschub leisten [13].



**Abbildung 1** Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten. Fusion von Osteoklasten-Progenitorzellen und daraus folgende Entstehung von Osteoklasten durch Zell-Zell Kontakt mit Osteoblast über RANK/RANKL und Cadherin 6. Notwendig dafür ist CSF-1. TNF- $\alpha$ , Interleukine und Prostaglandin E-2 als Aktivatoren des Osteoklasten. Calcitonin hemmt die Osteoklastenaktivität, Calcitriol aktiviert die Osteoklastenbildung und -aktivierung sowie die Osteoidbildung [29].

### 3 LEPTIN

Leptin (griechisch: leptos = dünn) und sein Gen wurden 1994 nach jahrelanger Suche von Zang et al. [142] entdeckt, nachdem der obese Genmutant (ob/ob), dem das Hormon Leptin fehlt, schon 1950 von Ingalls et al. [61] symptomatisch beschrieben wurde. Dabei handelte es sich um extrem fettleibige Mäuse mit gestörtem Sättigungsgefühl, Insulinresistenz, Hyperlipidämie und Hypogonadismus. Das Interesse boomte, als bekannt wurde, dass Leptin auch im Organismus des Menschen hergestellt wird und zentrale Funktionen bei der Regulierung der Nahrungsaufnahme und des Gewichts ausübt. Heute ist allgemein bekannt, dass Leptin primär mindestens ein Informationssignal zur Übermittlung des aktuellen Körperfettgehalts an unser Gehirn darstellt [86,122,142]. Über negative Rückkopplung [42] können Appetit und Energieaufnahme reguliert und verschiedenste Körperfunktionen dem aktuellen Energiehaushalt angepasst werden.

Im Folgenden soll nur ein kleiner Überblick über die pleiotropen Funktionen des Hormons gegeben werden. Viele interessante und komplexe Einzelheiten und Interaktionen müssen dabei unerwähnt bleiben.

Das aus 167 Aminosäuren bestehende Proteohormon wird hauptsächlich in Adipozyten produziert und von dort in die Blutbahn sezerniert. Die zirkulierende Plasmakonzentration von Leptin korreliert positiv mit dem Fettgehalt [50,68,76]. Über ein insulinabhängiges Transportsystem wird das Adipozytokin in die Cerebrospinalflüssigkeit aufgenommen, speziell in Strukturen der Medianen Eminenz [10]. Am stärksten ist der Leptinrezeptor im Nucleus Arcuatus und in Teilen des ventromedialen, dorsomedialen Nucleus des Hypothalamus exprimiert [34,37,49,85,115]. Leptin kann dementsprechend über hypothalamische Rezeptoren und Neuronen agieren [114,123]. Zum einen hemmt es dadurch die Produktion der Appetit stimulierenden Neuropeptide Neuropeptid Y und Agouti-related Protein (AgRP), zum anderen aber auch die Produktion von Proopiomelanocortin (POMC) und Cocaine Amphetamine Regulated Transcript (CART), welche Appetit zügelnde Wirkung und hemmende Wirkung auf den Energiemetabolismus besitzen [26]. Eine Abwesenheit des Hormons, wie sie bei der ob/ob Maus vorkommt, führt zu unkontrollierter Nahrungsaufnahme und zu resultierender enormer Fettleibigkeit. Die Hoffnung, Leptin als Appetit zügelndes Medikament einsetzen zu können ist verständlich, blieb aber leider unerfüllt, da der Großteil der adipösen Menschen eher an einer Leptinresistenz leidet [1] und sich die Substitution des Hormons als sinnlos erweisen würde.

Wie bereits erwähnt, ist man sich heute einig darüber, dass Leptin eine entscheidende Rolle bei der Anpassung des Organismus an den aktuellen Energiehaushalt darstellt.

Allerdings hat das Hormon im Rahmen dieser Aufgabe nicht nur bedeutende Wirkung auf Appetit, sexuelle Entwicklung [77,82], Reproduktion [22], Hämatopoese [44], Immunsystem [74], Angiogenese [117] und den Gastrointestinaltrakt [7], sondern übt auch einen erheblichen Einfluß auf die Regulation von Knochenresorption und Knochenaufbau aus. Seit längerem ist bekannt, dass das Körpergewicht ein wichtiger Determinant für die Knochendichte ist [84] und dass Fettleibige während der „knochenaufbauenden Jahre“ mehr Knochenmasse zulegen, wobei Fettleibigkeit und erhöhtes Körpergewicht in späteren Lebensjahren, vor allem bei postmenopausalen Frauen einen Schutz gegen Knochenabbau darstellt [38,106,128,131]. Umso interessanter war und ist es herauszufinden, ob Leptin der Schlüssel zwischen Fettgehalt und Knochenmasse ist.

#### **3.1 Leptin und seine Rolle im Knochenstoffwechsel**

In einigen Arbeiten wurden zunächst rein knochenphänotypische Veränderungen an ob/ob Mäusen beobachtet. In Arbeiten von Ducy et al. [30] zeigte sich bei leptindefizienten Mäusen gegenüber dem Wildtyp-Stamm ein höherer Gehalt an mineralisierter Knochenmatrix der Wirbelsäule und der Tibia, sowie erhöhte trabekuläre Knochen volumina bei gleichen kortikalen Knochen volumina. Besonders interessant erschien, dass trotz eines durch die Leptindefizienz auftretenden Hypogonadismus, der zu einer Osteoklastenzahlerhöhung führt und einen Hyperkortisolismus, der die Osteoblastenfunktion reduziert und in Osteoporose resultiert [2,30], ein Phänotyp mit hoher Knochenmasse auftrat. Leptin wurde eine stark knochenaufbauende Wirkung zugesprochen, da ausgeschlossen wurde, dass sich die Beobachtungen als sekundäre Folge des Übergewichts bei ob/ob Mäusen ergaben [6,30]. Während die Aussagen von Ducy von weiteren Autoren [6,63] gestützt wurden, stellten andere Autoren gegensätzliche Ergebnisse vor. Steppan et al. [124] beobachteten an leptindefizienten ob/ob Mäusen sowohl niedrigere Gesamtkörper-Knochenmineraldichte und –Knochenmineralgehalt, als auch niedrigere Femur-Knochenmineraldichte und –gehalt. Anhand des db/db-Mausmodells, bei dem ein funktioneller Leptinrezeptor fehlt, beobachteten Lorentzon et al. [75] eine ausgeprägte Osteopenie mit reduzierter kortikaler Dicke und reduzierter Trabekeldicke gegenüber gesunden Mäusen. Foldes et al. [40] und Mathey et al. [80] beobachteten an Diabetes-Ratten [144] mit fehlendem funktionalem Leptinrezeptor ebenfalls reduzierte Gesamtkörper-, diaphysale und metaphysale Knochenmineraldichte und Knochenmineralgehalt verglichen mit gesunden Ratten.

Hamrick et al. [53] untersuchten die Hypothese, dass die Wirkung Leptins auf den Knochen je nach lokalen Einflüssen wie mechanischer Belastung, Muskelmasse und Verhalten der Knochenmarkszellen unter dem Einfluss des hohen Fettgehaltes, von skelettaler Region zu Region unterschiedlich ist. Wie bereits erwähnt, galt bisher, dass Fettleibigkeit und erhöhtes Körpergewicht vor allem bei postmenopausalen Frauen einen Schutz gegen Knochenabbau darstellt. Hamrick et al. und weitere Autoren [53,66,137,141] gaben Anhalt dafür, dass die Muskelmasse für die Knochenbildung während des Wachstums von entscheidenderer Bedeutung als der Fettgehalt ist. Hamrick et al. beobachteten an C57Bl/6J ob/ob Mäusen gegenüber gesunden C57Bl/6J Mäusen am Femur einerseits signifikant reduzierte Werte für die Femurlänge, Knochenmineralgehalt (BMC), Knochenmineraldichte (BMD), Kortikalisdicke und trabekuläres Knochenvolumen, andererseits an der Wirbelsäule erhöhte Werte für die Wirbelsäulenlänge und -breite, BMC, BMD und trabekuläres Knochenvolumen. Die Autoren bestätigten durch ihre Ergebnisse die Hypothese, dass Leptin je nach Region unterschiedliche Einflüsse auf das Knochenwachstum hat.

Auf zellulärer Ebene zeigte sich in den Untersuchungen von Hamrick [53], dass die dünnere Kortikalis der ob/ob Mäuse eine signifikant niedrigere Osteozytendichte aufwies und somit eine geringere Rate der Osteoblastendifferenzierung widerspiegelte. Weiterhin zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Osteoklastenzahl in den Femura. Der Knochenstoffwechsel der genetisch veränderten Mäuse lässt folglich auf verminderten Knochenaufbau bei gleichzeitig erhöhtem Knochenabbau schließen.

Die Analyse der Knochenmarkszellen ergab in den Untersuchungen von Hamrick bei gleicher Gesamtzahl an Zellen eine erhebliche Erhöhung der Anzahl an Adipozyten in der ob/ob Maus, wobei diese im Bereich der mittleren Diaphyse etwa ein Drittel der Markhöhle einnahmen und im Vergleich dazu bei den gesunden Tieren fehlten. Fettzellen produzieren Faktoren, wie beispielsweise das Zytokin Interleukin-6 [41,83], das zur Differenzierung von knochenabbauenden Osteoklasten aus noch unreifen Knochenmarkszellen beiträgt [107] (siehe **Abbildung 2**). Weiterhin wurde Adipozyten eine hemmende Wirkung auf die Osteoblastenaktivität in der Zellkultur nachgewiesen [41]. Reid [107] vermutet einen kausalen Zusammenhang zwischen der hohen Anzahl an Adipozyten und der Osteopenie und bringt dafür zwei Hypothesen. Zum einen könnte es sich um ein physikalisches Phänomen handeln, indem sich die große Anzahl an Fettzellen auf Kosten einer anderen Zellreihe ausdehnt und diese im Knochenmark verdrängt. Alternativ könnte es sein, dass sich Vorläuferzellen im Knochenmark unter dem Einfluß der Leptindefizienz bevorzugt in Adipozyten anstatt in knochenaufbauende Osteoblasten differenzieren [130]. Außerdem wird ob/ob Mäusen ein hoher

Gehalt an zirkulierenden Glukokortikoiden zugeschrieben, die eine Differenzierung der Bindegewebszellen in Richtung der Adipozyten bewirken [28].

Eine weitere wichtige Beobachtung Hamricks Untersuchungen war die verminderte TGF $\beta$ -1 Anfärbarkeit des Knochenmarks der ob/ob Maus [53]. TGF $\beta$ -1 erhöht die Osteoblastenproliferation und Matrixbildung [16,45] und kann die Differenzierung von Osteoklasten hemmen [54]. Fehlende TGF $\beta$ -1 Aktivität kann folglich in erhöhter Osteoklastendifferenzierung bei gleichzeitig reduzierter Osteoblastenproliferation und Matrixbildung resultieren (siehe **Abbildung 2**). Zu allerletzt führen reduzierte TGF $\beta$ -1 Rezeptorsignale zu reduzierter Osteozytendichte [39]. Hamrick stützt somit die Hypothese, dass die Osteozytenzahl eine wichtige Determinante für das Knochenvolumen darstellt [135]. An in-vitro Untersuchungen zeigten Gabay et al. [21,43], dass Leptin die Expression und Sekretion von IL-1 Rezeptorantagonist aus humanen Monozyten induzierte, was eine IL-1-vermittelte Zunahme des Knochenumsatzes bewirkt.

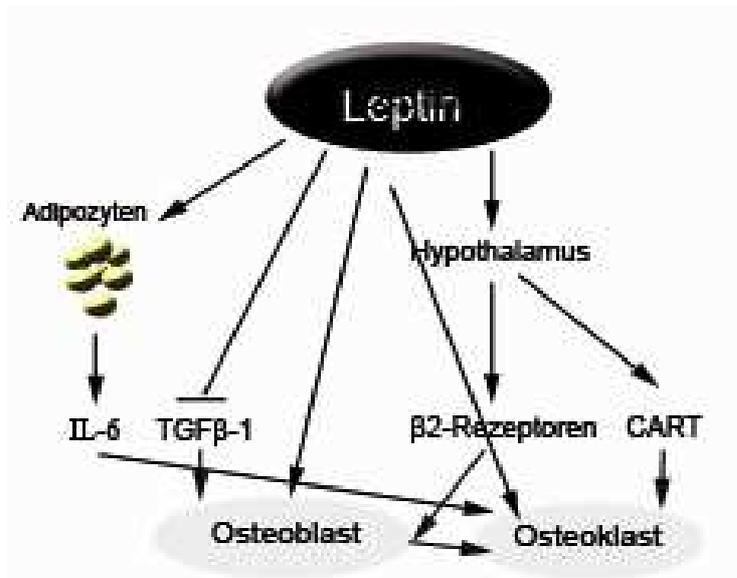
Der mediobasale Hypothalamus ist ein Angriffspunkt für Leptin [37,127], und eine gut beschriebene Konsequenz der Leptindefizienz ist eine reduzierte Aktivität des sympathischen Nervensystems [18]. Takeda et al. [125] konnten eine leptinabhängige neuronale Regulation der Knochenbildung über  $\beta$ 2-adrenerge Rezeptoren, die sie auf Osteoblasten fanden, feststellen (siehe **Abbildung 2**). Das hypothalamische Neuropeptid CART, dessen Expression durch Leptin kontrolliert wird und in ob/ob Mäusen fast vollständig fehlt [70], steigert über eine Hemmung der RANKL-Synthese durch Osteoblasten die Osteoklastogenese [33] (siehe **Abbildung 2**). Weiterhin stimuliert Leptin die Expression von Osteoprotegerin [21,59]. Elefteriou et al. [33] haben durch ihre Untersuchungen die Erkenntnis etabliert, dass Leptin-regulierte neuronale Signalwege in der Lage sind, beide Seiten des Knochenremodeling zu kontrollieren, nämlich die Resorption durch Osteoklasten und die Bildung neuer Knochen substanz durch Osteoblasten.

Neben diesen indirekten Effekten Leptins auf den Knochenstoffwechsel exprimieren Knochenzellen selbst Leptinrezeptoren [27,108] und sind Angriffspunkte für das Hormon [27,109,130], so dass Leptin einen direkten Einfluss auf die Osteoklastenbildung [27,59], Osteoklastenentwicklung [27], Osteoblastenproliferation [27] und –differenzierung [130] sowie Chronozytenaktivität [27] ausübt (siehe **Abbildung 2**). Diese Funde stehen im Einklang mit dem von Hamrick et al. [53] beschriebenen Knochenphänotyp der Leptindefizienten ob/ob Maus.

Zusammengefasst ist Leptin in der Lage in den Knochenstoffwechsel einzugreifen, indem es auf die Osteoblasten und die Osteoklasten sowohl direkt als auch indirekt wirken kann und somit einen wichtigen Stellenwert in der Knochenphysiologie einnimmt.

Um den klinischen Bezug nicht außer Acht zu lassen, stellt sich zu allerletzt die Frage nach klinischer Evidenz. Während einige Autoren eine Korrelation zwischen dem Serumleptinlevel und BMD [12,48,111,129,139,143] oder BMC [93] beobachten konnten, haben andere keine Korrelation [79,89,97] oder sogar eine negative Korrelation [14,134] gefunden. Während all diese Studien an erwachsenen Personen, vorzugsweise an postmenopausalen Frauen durchgeführt wurden, zeigen Whipple et al. [136] in einer Studie an Kindern und jungen Erwachsenen Ergebnisse auf, die Anhalt dafür geben, dass Leptin das Knochenwachstum des jungen Menschen steigert, indem es die Reifung vorantreibt. Es ist wohl bekannt, dass während der Entwicklungsjahre ein starker Zuwachs an Knochenmineralien erfolgt und eine erhöhte Knochenwachstumsrate vorherrscht [119]. 25% des gesamten adulten skelettalen Mineralgehaltes wird während der Adoleszenz erworben [9]. Leptinlevel sind besonders hoch während der Pubertät, und das Alter der Pubertät korreliert invers mit dem Serumleptinlevel [81]. Ein verspäteter Zeitpunkt der Menarche ist ein Hauptrisikofaktor für Osteoporose, und es gibt eine starke inverse Korrelation zwischen der BMD-Spitze und dem Lebensalter zum Zeitpunkt der Menarche [96,110]. Der Zenit des BMD-Wertes stellt einen wichtigen Faktor in der Entwicklung osteoporotischer Frakturen dar [73,116].

Der Link zwischen Leptin, Fettgehalt und Knochenbildung ist also besonders interessant vor der Pubertät und während der Entwicklungsjahre. Es wird demnach vermutet, dass die entscheidende Rolle Leptins im Knochenstoffwechsel und in der Prävention der Osteoporose in früheren Lebensabschnitten liegt und nicht zu einem Zeitraum, in dem Knochenabbau stattfindet [51].



**Abbildung 2** Vereinfachtes Schaubild über einige Effekte Leptins auf den Knochenstoffwechsel. Es kann zum einen zentral via Hypothalamus oder Fettgewebe wirken, zum anderen direkt auf die Peripherie.

## 4 GRUNDLAGEN ULTRASCHALL UND FUNKTIONSWEISE EINES AKUSTISCHEN MIKROSKOPS

Unter dem Begriff Ultraschall verstehen wir mechanische Wellen mit Frequenzen oberhalb von ca. 20 kHz, die damit oberhalb der menschlichen Hörschwelle liegen. Bei einem bildgebenden akustischen Mikroskop sendet ein Pulser einen kurzen elektrischen Impuls an einen Wandler mit piezoelektrischer Keramik, welcher diesen durch mechanische Verformung, also der Nutzung des inversen piezoelektrischen Effektes in mechanische Energie, eine Schallwelle, umwandelt und emittiert. Mit Hilfe einer am Wandler angebrachten Linse wird diese Schallwelle fokussiert. Die Wellenlänge  $\lambda$  und die Schallfeldgeometrie bestimmen das Auflösungsvermögen (der minimale Abstand zweier Punkte, die gerade noch getrennt voneinander wahrgenommen werden können) eines akustischen Bildgebungssystems. Die Wellenlänge hängt entsprechend Formel (1) von der Frequenz  $f$  und von der Ausbreitungsgeschwindigkeit  $c$  der Welle ab:

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad (1)$$

Am Übergang zwischen zwei Medien wird bei senkrechtem Auftreffen der Welle auf die Oberfläche ein Teil der Schallwellenenergie reflektiert und der andere Teil dringt in das zweite Medium ein. Die Größe des an der Grenzfläche reflektierten Anteils ist dabei abhängig von der akustischen Impedanz  $Z$  des Mediums. Reflexions- und Transmissionskoeffizienten  $R$  und  $T$  lassen sich nach (2) und (3) aus den akustischen Impedanzen  $Z$  der beiden Medien berechnen, wobei die Indizes die beiden Medien 1 und 2 kennzeichnen:

$$R = \frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} \quad (2)$$

$$T = \frac{2 \cdot Z_2}{Z_2 + Z_1} \quad (3)$$

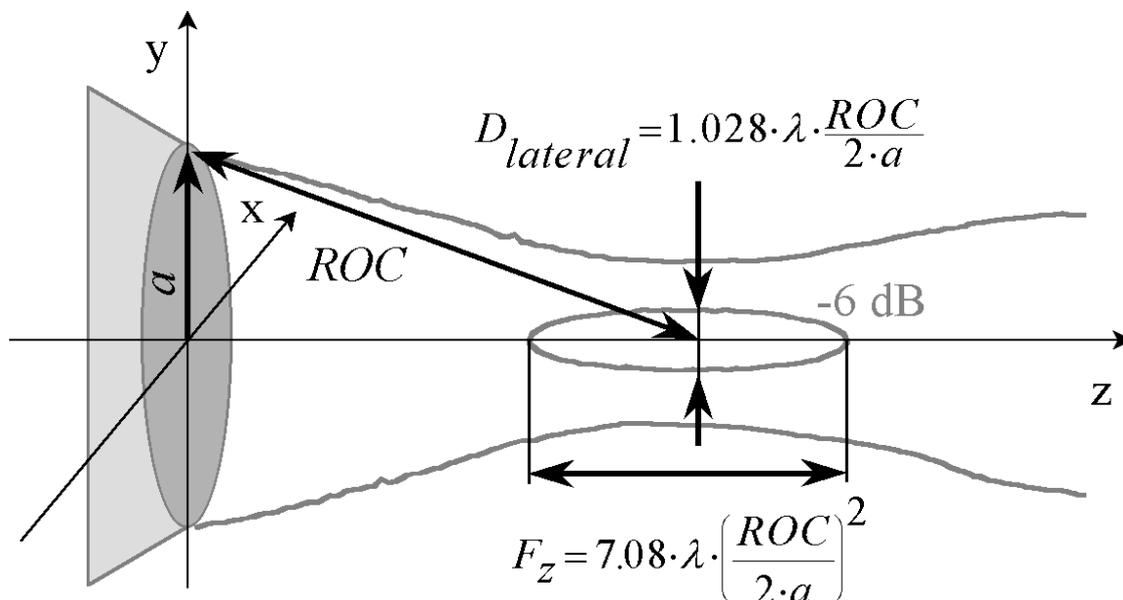
Durch den direkten piezoelektrischen Effekt des Wandlers wird der auf den Wandler einfallende reflektierte Teil der Welle wieder in elektrische Spannung umgewandelt, durch eine Empfangselektronik verstärkt und durch einen A/D-Wandler digitalisiert. Auf diese Weise kann die akustische Impedanz des zweiten Mediums bzw. der Probe bestimmt werden.  $Z$  ergibt sich aus dem Produkt von Schallgeschwindigkeit  $c$  und Massendichte  $\rho$  (siehe Formel 4).

$$Z = \rho \cdot c \quad (4)$$

Die Einheit der Impedanz ist  $1 \text{ rayl} = 1 \text{ kgm}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Voraussetzung zur quantitativen Nutzung der akustischen Mikroskopie ist das Auftreffen einer ebenen Schallwelle senkrecht auf die Oberfläche der Probe. Dies ist nur der Fall, wenn sich die Probe genau im Fokus des Schallfeldes befindet. **Abbildung 3** zeigt schematisch ein fokussiertes Schallfeld. Damit das laterale Auflösungsvermögen möglichst hoch ist, verwendet man stark fokussierte Wandler mit einer sphärischen Linse. Die laterale Auflösung hängt von der Frequenz und dem Schwingerdurchmesser ab und lässt sich wie eben erwähnt durch Fokussierung verbessern. Das laterale Auflösungsvermögen ergibt sich bei einem fokussierten Schallfeld mit dem Krümmungsradius  $ROC$  (Radius of Curvature) und einem Wandlerdurchmesser  $D = 2a$ , dessen Mittelpunkt sich im Ursprung eines kartesischen Koordinatensystems befindet, nach folgender Formel:

$$D_{lateral} = 1.028 \cdot \lambda \cdot \frac{ROC}{2 \cdot a} \quad (5)$$



**Abbildung 3** Schematische Darstellung eines fokussierten Schallfeldes [15].

Nach Dunn et al. [32] können bei Verwendung eines kleinen Schallfelddurchmessers und kurzer Wellenlänge im Verhältnis zur Mikrostruktur des zu untersuchenden Gewebes die mikroskopischen Gewebeeigenschaften untersucht werden. Voraussetzung ist, dass die Strukturen größer als die Wellenlänge sind und ein Teil der Welle an den Strukturgrenzen reflektiert wird.

Da das Auflösungsvermögen maßgeblich von der Wellenlänge abhängig und die Wellenlänge wiederum eine Funktion der Frequenz ist, ist durch die Wahl entsprechend hoher Frequenzen das Auflösungsvermögen eines akustischen Mikroskops mit dem eines Lichtmikroskops vergleichbar.

## 5 ZIELSTELLUNG

Mittels der akustischen Mikroskopie können morphologische, aber auch quantitative akustische Eigenschaften mit einer Auflösung bis in den Mikrometerbereich analysiert werden. Raum et al. haben gezeigt, dass die Impedanz elastische Anisotropie widerspiegelt [71,105] und gut mit den elastischen Koeffizienten  $c_{ij}$  [100,103], der Dichte und dem elastischen Kompressionsmodul [99] korreliert. Durch die Nutzung geeigneter Datenverarbeitungsalgorithmen lässt sich aus einem akustischen Bild die mineralisierte Knochenmatrix von größeren Poren oder Kanälen separieren. Somit kann die Impedanz des Gewebes unabhängig von der Knochenmikrostruktur bestimmt werden. Bisherige Arbeiten haben gezeigt, dass die akustische Impedanz  $Z$  zwar schwach, jedoch signifikant mit der Gewebemineralisierung korreliert [57,98-101,103], so dass der Wert von  $Z$  vielmehr von elastischen Komponenten, die wiederum von Faktoren wie der anisotropen Gewebeelastizität, der Quervernetzung von Kollagen und der Größe, sowie der gegenseitigen Verbindung von Mineralkristallen beeinflusst wird [58]. Die akustische Mikroskopie ist demnach prädestiniert zur direkten Beschreibung und Untersuchung mikrostruktureller und mikroelastischer Gewebeeigenschaften und des Knochenphänotyps. Raum et al. zeigten weiterhin, dass akustische Mikroskopie mit einer Frequenz von 200 MHz die Knochenarchitektur in vergleichbarer Auflösung zum  $\mu$ CT darstellt [102,103], wobei SAM (Scanning Acoustic Microscope) in der Lage ist, quantitativ über Impedanzbilder die elastischen Gewebeeigenschaft direkt zu erfassen, während Synchrotron Radiation  $\mu$ CT (SR- $\mu$ CT) indirekt über den DMB (Degree of Mineralisation of Bone) Wert und dessen Verteilung Aussagen über die elastischen Eigenschaften liefert und nicht in der Lage ist, diese direkt zu erfassen. Mittels eines weiteren Verfahrens, der Nanoindentation, können über die Ableitung des Elastizitätsmoduls mechanische Veränderungen von Knochen substanz detektiert werden. Das Verfahren ist jedoch destruktiv, die Varianz der Ergebnisse ist hoch, und es steht bei fehlender Bildgebung und annehmbarem Zeitaufwand eine relativ geringe Anzahl von Messpunkten zur Verfügung.

Im Vordergrund unserer Untersuchungen soll der Einfluss des obese-Gens mit seinem Produkt Leptin auf den Knochenphänotyp stehen. Trotz vieler Veröffentlichung in den letzten Jahren sind die Ergebnisse zum Teil kontrovers und unvollständig.

Mit der hochauflösenden Ultraschallmethode SAM steht eine Möglichkeit zur Verfügung, den Einfluss von Leptin auf die elastischen Knocheneigenschaften des Femur am C57Bl/6J-Mausmodell direkt zu untersuchen. Dabei soll der Einfluss von Alter und Geschlecht berücksichtigt werden. Weiterhin soll die bildgebende, hochauflösende Darstellung dieser Methode dazu benutzt werden, Veränderungen der makroskopischen Knochenparameter zu analysieren. Ziel soll es sein, einen Beitrag zum Verständnis und Wissen um den Einfluss dieses Hormons auf den Knochenstoffwechsel zu leisten und das Potential einer relativ jungen und unbekanntem Methode zu nutzen, um die elastischen Eigenschaften des Knochens von ob/ob Mäusen mit denen von Wildtyp-Mäusen auf der Gewebsebene zu vergleichen.

## 6 MATERIAL UND METHODEN

### 6.1 Chemikalien

Benzoylperoxid (mit 25% Wasser) zur Synthese	Merck KGaA, Darmstadt
Butylmethacrylat (stabilisiert) zur Synthese	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylenglycol zur Analyse Reag. Ph Eur	Merck KGaA, Darmstadt
Methylbenzoat zur Synthese	Merck KGaA, Darmstadt
Methylmethacrylat (stabilisiert) zur Synthese	Merck KGaA, Darmstadt
N,N-Dimethyl-p-toluidin zur Synthese	Merck KGaA, Darmstadt
Polyethylenglycol 400	Merck KGaA, Darmstadt
Xylol reinst (Isomerengemisch) Ph Helv VI	Merck KGaA, Darmstadt
DP-Spray, M, 3µm	Struers A/S, Dänemark

### 6.2 Lösungen und Medien

MMA I Lösung	60 ml MMA, 35 ml Butylmethacrylat, 5 ml Methylbenzoat und 1,2 ml Polyethylenglycol 400
MMA II Lösung	100 ml MMA I Lösung, 0,4 g Benzoylperoxid
MMA III Lösung	100 ml MMA I Lösung, 0,8 g Benzoylperoxid

Polymerisationslösung für Probenuntergrund	100 ml MMA III (4°C), 600 µl N,N-dimethyl-p-toluidin
Polymerisationslösung für Probeneinbettung	100 ml MMA III (4°C), 400 µl N,N-dimethyl-p-toluidin

### 6.3 Mausmodell

Vom Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg wurden uns leptindefiziente ob/ob C57Bl/6J und wildtyp (wt) C57Bl/6J Mäuse im Alter von 3, 6, 9 und 12 Monaten zur Verfügung gestellt. In jeder dieser Altersgruppen konnten männliche (m) und weibliche (w) ob/ob und wt Mäuse untersucht werden. Insgesamt stand eine Probenanzahl von 110 Femura zur Verfügung. Die Mäuse wurden gruppenweise in Metall-Standardkäfigen gehalten und mit Standard Diät Futter Pellets gefüttert. Alle Mäuse hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Der Hell/Dunkel Wechsel fand im 12-Studentakt statt.

### 6.4 Proben

#### 6.4.1 Präparation

Nach Sakrifizierung der Tiere wurden diese gewogen. Die Beine wurden mit gesamtem Hüftgelenk vom Körper abgetrennt und anschließend sofort von Haut-, Muskel- und Fettgewebe freipräpariert. Nach der Präparation und Längenmessung der Femura wurden Caput und Collum femoris mit einer Diamant-Trennschleifeinrichtung (Exakt-Trennschleifsystem Makro, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) entfernt, um ein besseres Eindringen der Fixierungs- und Einbettlösungen zu ermöglichen. Anschließend wurden die Femura in 70%igem Ethanol bei einer Temperatur von 4°C bis zur weiteren Bearbeitung fixiert.

#### 6.4.2 Einbettung

Die Proben wurden am Folgetag erneut in 70%igem Ethanol für drei weitere Tage fixiert und dehydriert. Die weitere Dehydrierung erfolgte für zwei Tage in 96%igem Ethanol, einen Tag in 100%igem Ethanol und anschließend einen Tag in Xylol. Die Lagerung erfolgte dabei stets auf dem Rüttler bei einer Temperatur von 4°C.

Die Infiltration der Proben mit dem Einbettungsgemisch erfolgte dreistufig in verschiedenen MMA-Lösungen. Dabei stellte MMA I die Grundlösung dar. Diese Schritte erfolgten für jeweils 3-4 Tage ebenfalls bei 4°C auf dem Rüttler.

Die Polymerisation der Proben erfolgte schließlich auf vorpolymerisierten Böden. Dabei mussten die mit dem Gemisch gefüllten Gläser zum Ausschluss von Sauerstoff mit medizini-

schem Kohlendioxid begast und sorgfältig abgedeckelt werden, um anschließend mindestens 3 Tage bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zu polymerisieren.

Bei der Einbettungsmethode handelt es sich um eine von Erben [35] modifizierte Methode von Wolf et al. [138], um die Enzymaktivitäten für nachfolgende histochemische und immunhistochemische Färbungen und quantitative Knochenhistomorphometrie besser zu konservieren.

### 6.4.3 Bearbeitung der Proben

Nach dem vollständigen Aushärten des MMA-Gemisches wurde zunächst das Glas entfernt und die eingebetteten Proben in circa 9 mm x 12 mm große Blöcke mit der Diamant-Bandschleifeinrichtung für die weitere Bearbeitung herausgesägt.

Mit dem mikroprozessorgesteuerten Großschnittmikrotom Polycut-E (Mikrotom Polycut-E, Reichert-Jung, Deutschland) wurden für nachfolgende Färbungen pro Probe etwa 10-15  $\mu\text{m}$  dicke transversale Schnitte in anterior-posteriorer Richtung bis etwa zur Mitte der Femurdurchmesser geschnitten und auf Objektträger aufgebracht.

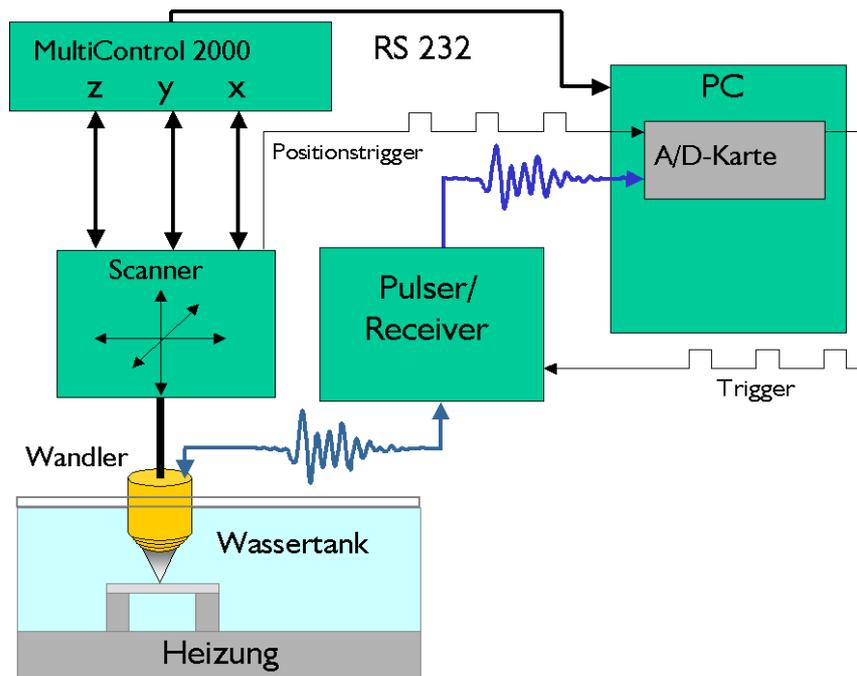
Die restlichen Blöcke wurden zur Messung am SAM 200 vorbereitet, indem die Oberflächen am Schleifgerät (Exakt-Mikroschleifsystem, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) mit allmählich steigender Körnung (1200, 2400, 4000) bearbeitet wurden. Um eine Verschlechterung der Oberflächenstruktur nach dem Schleifvorgang durch eventuelles Nachhärten des Kunststoffes zu vermeiden und damit verbundenen Fehlerquellen bei den Messungen aus dem Wege zu gehen, erwies es sich als sinnvoll, den abschließenden 15-minütigen Poliervorgang erst unmittelbar vor dem Scanvorgang durchzuführen. Dazu wurde ein Logitech WG2 Poliersystem mit einem Microtex 500 H-W, 300 mm Papier, Ehtylenglycol Suspension und 3- $\mu\text{m}$  Diamantpartikel als Abriebspartikel verwendet. Diese Prozedur stellte eine ausreichend plane Oberflächengüte ohne Diffusion von Wasser ins Knochengewebe während der endgültigen Bearbeitung sicher.

### 6.5 Ultraschallbasierte Untersuchungsmethode SAM200Ex

Das für diese Arbeit verwendete akustische Mikroskop SAM 200Ex, das im Q-BAM Labor der Orthopädischen Universitätsklinik Halle entwickelt wurde [99], arbeitet nach dem 1974 von Lemons und Quate [72] beschriebenen Prinzip der Puls-Echo Mikroskopie. Es besteht aus einem 200 MHz Pulser/Receiver (Panametrics 5900PR, Waltham, USA) und einer 500  $\text{MS s}^{-1}$  A/D-Karte (Gage CS8500, Gage Applied Technologies, Inc., Lachine, Canada).

Diese Komponenten werden von einer dafür programmierten Software (SAMEx, Q-BAM, Halle) gesteuert.

Für die Untersuchung wurde ein sphärisch fokussierter 200 MHz Schallwandler (KSI 200/60°: KSI, Herborn, Germany) mit einer konfokalen lateralen Auflösung von ca. 8  $\mu\text{m}$  verwendet. In **Abbildung 4** ist die schematische Funktionsweise des Mikroskops näher erläutert.

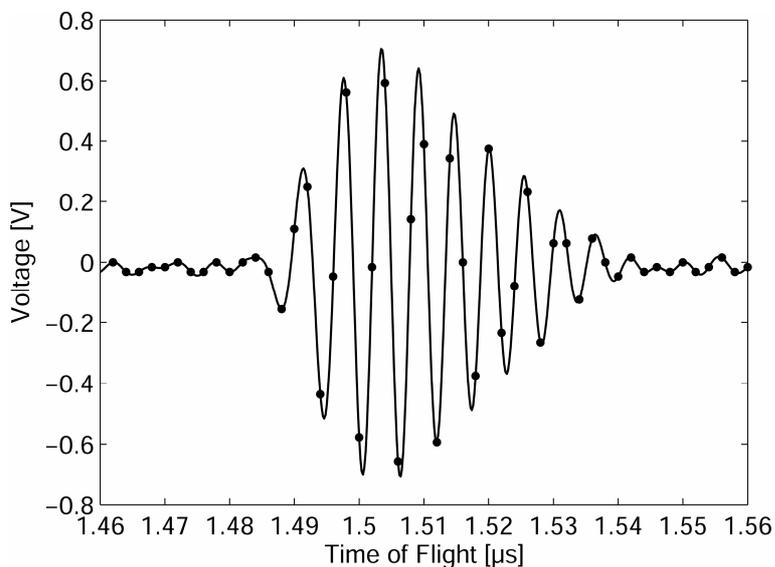


**Abbildung 4** Schematischer Aufbau des akustischen Rastermikroskops SAM200Ex mit Wassertank, Schallwandler, motorgesteuerter Scanvorrichtung, Pulser/Receiver und PC.

In einem Tank, der über eine steuerbare Heizung auf konstanten 25°C gehalten wird, befindet sich entgastes, destilliertes Wasser als Kopplungsmedium, in das die zu messende Probe vollständig eingebracht und mit Klemmen fixiert wird. Über einen stufenlos verstellbaren Tisch, auf dem sich der Tank mit der Probe befindet, kann die Oberfläche in die Fokusebene des Wandlers gebracht und planparallel justiert werden.

Das mechanische Meßsystem besteht aus drei 2-Phasenschrittmotoren, die über einen MC2000 3-Achsen-Motorcontroller (ITK Dr. Kassen GmbH, Lahnau, Deutschland) mit 32-Bit Risc-Prozessor gesteuert wird. Der Schallwandler kann so in allen drei Ebenen mit einer Positioniergenauigkeit von 0,1  $\mu\text{m}$  platziert und bewegt werden. Über eine RS-232 Schnittstelle erfolgt mittels der vom Controller unterstützten Programmiersprache VENUS-1 (ITK Dr. Kassen GmbH, Lahnau, Deutschland) die Kommunikation mit dem PC.

Das Scanfeld kann über eine Benutzeroberfläche für jede einzelne Probe am PC manuell ausgewählt werden und in der x-y-Ebene maximal 60x60mm<sup>2</sup> betragen. Auch die übrige Bedienung des Mikroskops erfolgt über ein im Q-BAM Labor entwickeltes Benutzerprogramm. Für das hier verwendete C-Bild Verfahren wird durch einen optischen Inkrementalgeber auf der x-Achse alle 4 µm ein TTL Signal erzeugt. Eine Triggerkarte leitet während der Bewegung der x-Achse das TTL-Signal an die A/D Karte weiter, wodurch auch während der Wandlerbewegung alle 4 µm ein Triggerereignis stattfindet. Von jedem dieser Punkte wird das komplette Empfangssignal digitalisiert, wobei das zeitliche Fenster des Signals manuell so eingestellt wird, dass an jedem Scanpunkt das komplette Puls-Echo Signal erfasst wird. Schließlich werden die digitalisierten Empfangssignale jedes einzelnen Triggerpunktes zusammen mit sämtlichen einstellbaren Parametern gespeichert.



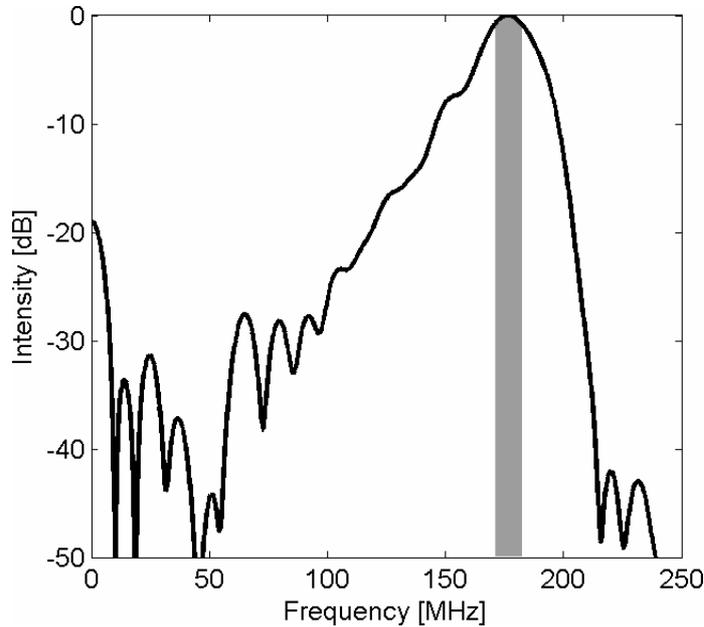
**Abbildung 5** Konfokales Puls-Echo Zeitsignal innerhalb des manuell festgelegten Zeitfensters [103].

### 6.5.1 Impedanzberechnung

Die Reflexionsamplitude wurde aus dem Energiespektrum  $S(f)$  (siehe **Abbildung 6**) innerhalb des gewählten Zeitfensters ermittelt. Die Pulse wurden durch ein Hamming-Fenster mit der doppelten Impulslänge des Wandlers isoliert. Die *ISI*-Werte (integrated spectral intensity) wurden nach Formel (6) berechnet, wobei die Integrationsgrenzen bei 175 MHz und 185 MHz lagen.

$$ISI = \int_{f_1}^{f_2} S(f) df \quad (6)$$

Die Quadratwurzeln der ISI-Werte wurden mit bekannten Reflexionskoeffizienten homogener Referenzmaterialien und bekannten Impedanzwerten korreliert.



**Abbildung 6** Energiespektrum des konfokalen Reflexionssignals des verwendeten Ultraschallwandlers KSI 200/60°. Grau dargestellt ist der Integrationsbereich zwischen 175 MHz und 185 MHz zur Berechnung der Reflexionsamplituden [103].

Die gemessene Spannungsamplitude im Fokus ist unter der Voraussetzung, dass die elektronischen Übertragungseigenschaften linear sind, proportional zum Reflexionskoeffizienten [19,55,56].

Die Laufzeit  $TOF$  (time of flight) ergibt sich aus der Änderung der Phase  $\phi$  mit der Kreisfrequenz  $\omega$  (siehe Formel 7).  $t_{ph}$  ist die Zeit relativ zu  $t_0$ , der Startzeitpunkt der digitalisierten Sequenz [67].

$$TOF = t_0 + t_{ph} = t_0 + \frac{\partial \phi}{\partial \omega} = t_0 + \frac{\partial N}{\partial f}. \quad (7)$$

$N$  ist die Anzahl der Phasensprünge in Abhängigkeit von der Frequenz  $f$ . Für die C-Bild-Daten wurde für die berechneten ISI-Werte, trotz der sehr präzisen Justierbarkeit der Proben eine TOF-abhängige Defokussierungskorrektur angewandt [71]. Diese ermöglicht es, für kleine Abweichungen von der konfokalen Puls-Echo-Laufzeit die konfokalen Signalamplituden abzuschätzen. Die ISI-Werte wurden mittels einer Kalibrierungskurve in Reflexionskoeffizienten umgewandelt und schließlich anhand Formel (8) in Werte der akustischen Impedanz:

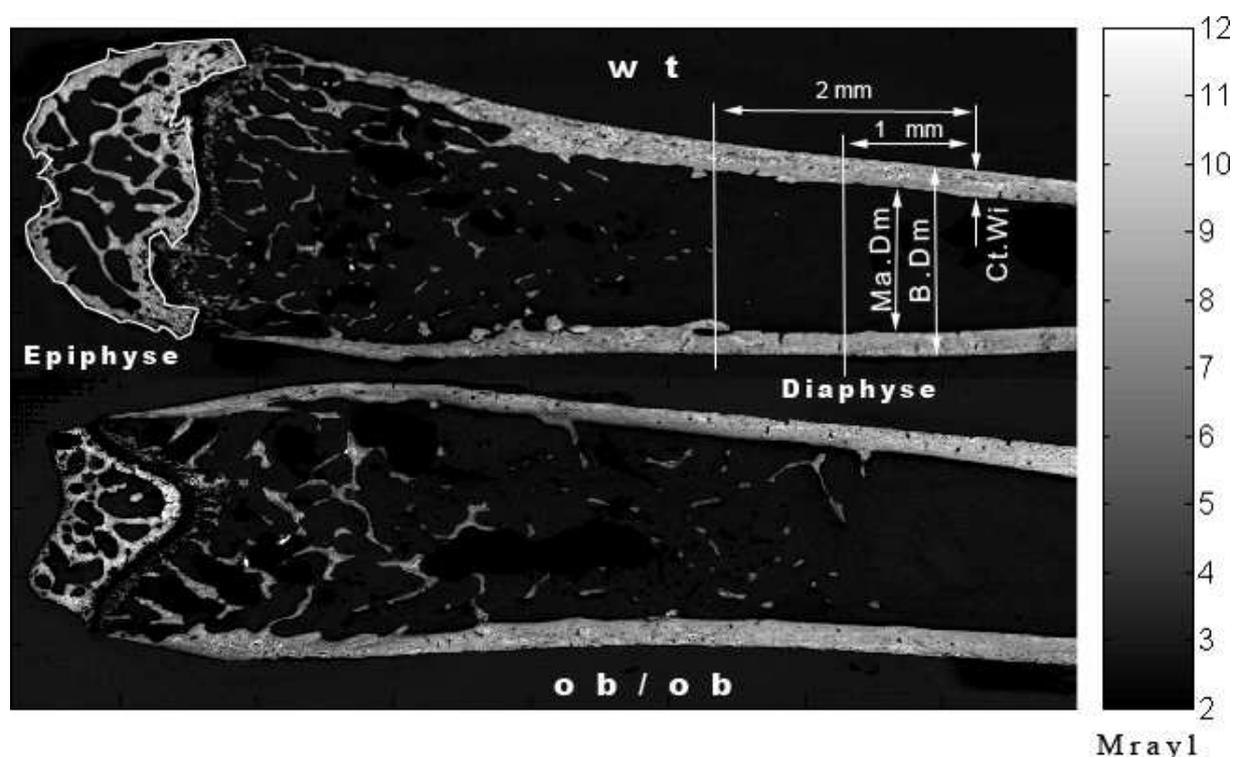
$$R = \frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1}, \quad (8)$$

wobei  $Z_1$  und  $Z_2$  jeweils die Impedanzen im Kopplungsmedium und in der Probe sind.

Aus den ISI Werten ermittelten Probenimpedanzen entsteht schließlich durch die 2D-Darstellung ein kalibriertes Impedanzbild (siehe **Abbildung 7**).

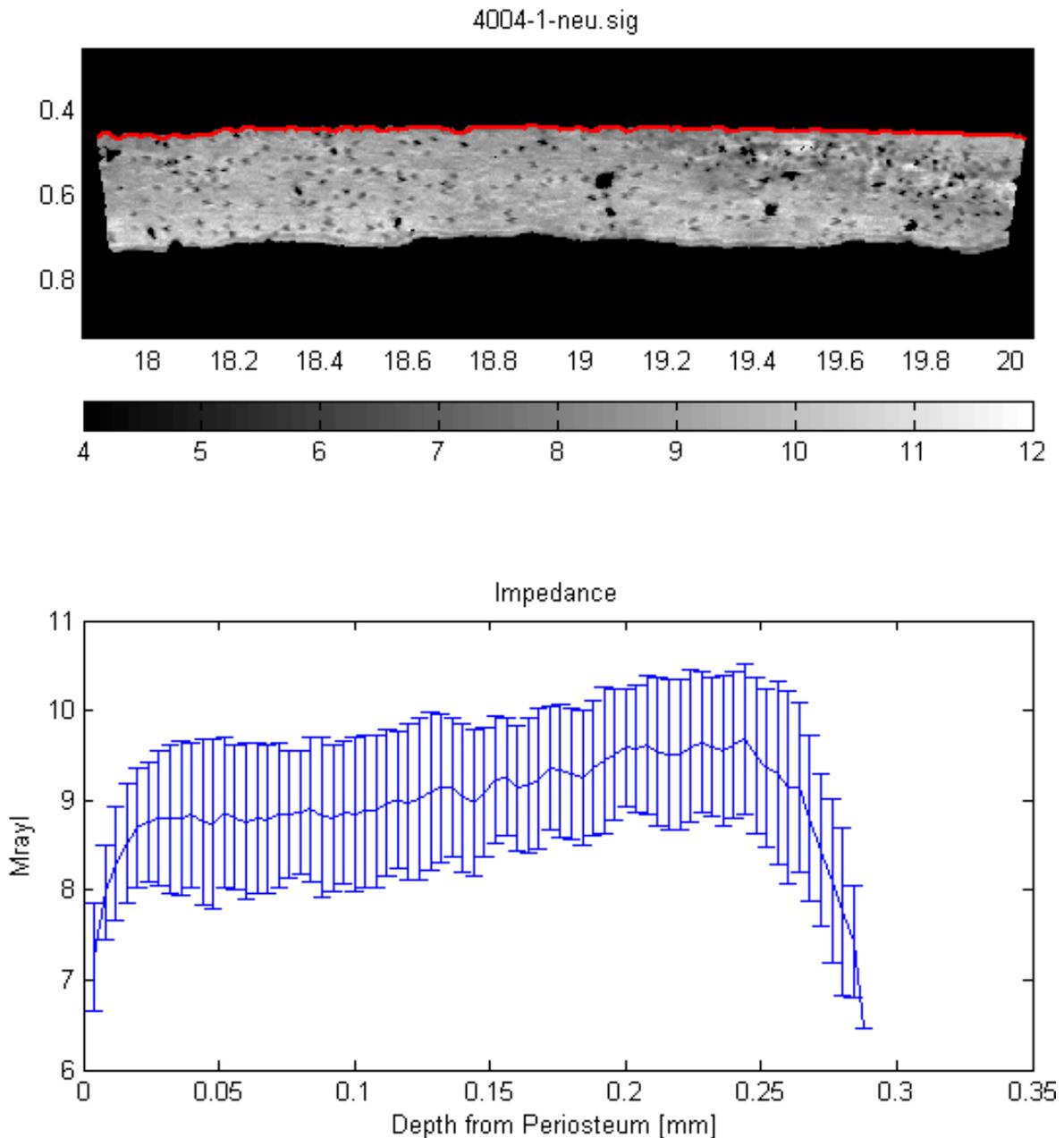
### 6.5.2 Parameterermittlung

Die in **Abbildung 7** eingezeichneten makroskopischen Parameter Knochendurchmesser *B.Dm* (Bone Diameter), Knochenmarksdurchmesser *Ma.Dm* (Marrow Diameter) und die Kortikalisdicke *Ct.Wi* (Cortical Width) wurden jeweils zehn Mal innerhalb einer 1-mm großen Region im Bereich der mittleren Diaphyse, ca. 7 mm von der distalen Gelenkfläche entfernt gemessen und daraus jeweils der Mittelwert gebildet. Die Impedanzwerte wurden in einer 2 mm großen manuell ausgewählten Region *ROI* (region of interest), ebenfalls ca. 7 mm von der distalen Gelenkfläche entfernt (Kortikalisimpedanz) bestimmt. Dazu wurde mittels einer manuell einstellbaren Schwellwert-Maske ein Impedanzbereich von ca. 6,15 Mrayl bis 12 Mrayl festgelegt, um möglichst ausschließlich Knochensubstanz zu analysieren und PMMA, größere Poren, Knochenkanäle und Artefakte bei den Messungen auszuschließen. Durch Erosion wurden durch die begrenzte räumliche Auflösung verursachte Ungenauigkeiten und Verfälschungen in den Randbereichen minimiert.



**Abbildung 7** Impedanzbilder eines wt und eines ob/ob Mäusepräparates. Die Abbildung zeigt die 1-mm Region, in der die makroskopischen Strukturparameter und die 2-mm Region, in der die Impedanzwerte ermittelt wurden.

Mittels einer im Q-BAM Labor speziell entwickelten Software konnte zudem der Verlauf der mittleren akustischen Impedanz mit Standardabweichung von periostal nach endostal anhand des manuell gewählten Bereichs der Kortikalis bestimmt werden (siehe **Abbildung 8**). Dieser Bereich entsprach genau dem Bereich, in dem die oben genannten strukturellen Parameter und die Kortikalisimpedanz abgeleitet wurden.



**Abbildung 8** Oberfläche der NEWSAM Analysis Software© Version 7.1. Die Abbildung zeigt einen manuell ausgewählten Bereich der Kortikalis (oben) und den Verlauf der Impedanz in Abhängigkeit von der Entfernung vom Periost (unten).

### 6.5.3 Statistische Auswertung

Alle Werte, die zur statistischen Auswertung herangezogen wurden, sind mit dem Jarque-Bera-Test auf Normalverteilung bzw. logarithmische Normalverteilung geprüft worden. Alle Werte werden, wenn nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Kolinearitäten und Abhängigkeiten zwischen den verschiedenen Parametern wurden mit Hilfe linearer Regressions- und Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Falls mehr als zwei Gruppen verglichen wurden, wurden die signifikanten Unterschiede mit dem Post-Hoc Tukey-Kramer Test (multiplem Vergleichstest) ermittelt. Für alle statistischen Untersuchungen wurde ein p-Wert  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant angenommen.

Die Auswertung der Meßdaten erfolgte mit Matlab 7.0.4 (The Mathworks Inc., Natick, MA, USA), die statistische Auswertung der Daten mit der Statistiktoolbox von Matlab 7.0.4.

Die Mehrzahl der Proben wurde zweimal mit dem SAM gemessen und deren Impedanzen sowie strukturelle Parameter bestimmt. Dies erfolgte obligat bei Werten die größer als die Standardabweichung innerhalb der jeweiligen Gruppe waren. Ebenso wurden Stichproben erneut gemessen, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen.

## 7 ERGEBNISSE

Nach Auslese der beschädigten Proben, konnten insgesamt 102 Präparate mit dem C-Bild Verfahren untersucht werden. Je nach Qualität der Proben, wurden für die statistischen Auswertungen der einzelnen Parameter jeweils unterschiedlich viele Proben aufgenommen (siehe jeweiliger Abschnitt).

### 7.1 Bestimmung struktureller Parameter

Von den 102 Präparaten konnten an 99 Proben Knochendiameter, Knochenmarkdiameter und Kortikalisdicke bestimmt werden und in die statistische Auswertung eingehen. **Tabelle 1** zeigt die Probenanzahl für die einzelnen Gruppen.

**Tabelle 1** Jeweilige Probenanzahl zur Bestimmung der strukturellen Parameter, aufgelistet nach Alter, Geschlecht und Phänotyp.

	3 Monate	6 Monate	9 Monate	12 Monate
<b>m (wt//ob/ob)</b>	5/4	7/9	4/4	2/4
<b>w (wt//ob/ob)</b>	7/4	12/6	13/10	4/4

Eine Übersicht über die ermittelten strukturellen Parameter in Abhängigkeit des Phänotyps gibt **Tabelle 2**. Zu beobachten ist dabei, dass alle hier aufgeführten makroskopischen Strukturparameter mit Ausnahme der Kortikalisdicke in der ob/ob Maus gegenüber der wt Maus erhöht waren. Signifikante Unterschiede unter Berücksichtigung der weiteren Einflussvariablen Alter und Geschlecht werden in den folgenden Kapiteln aufgeführt.

**Tabelle 2** Strukturelle Parameter in Abhängigkeit des Phänotyps. a kennzeichnet einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur wt-Gruppe.

	ob/ob	wt
<b>B.Dm. [mm]</b>	1,71±0,14	1,64±0,16
<b>Ma.Dm. [mm]</b>	1,26±0,14	1,21±0,18
<b>Ct.Wi. [mm]</b>	0,20±0,04	0,21±0,04
<b>Fe.Le. [mm]</b>	15,34±1,02 <sup>a</sup>	15,74±0,72
<b>Gewicht [Gramm]</b>	61,4±12,50 <sup>a</sup>	29,5±10,40

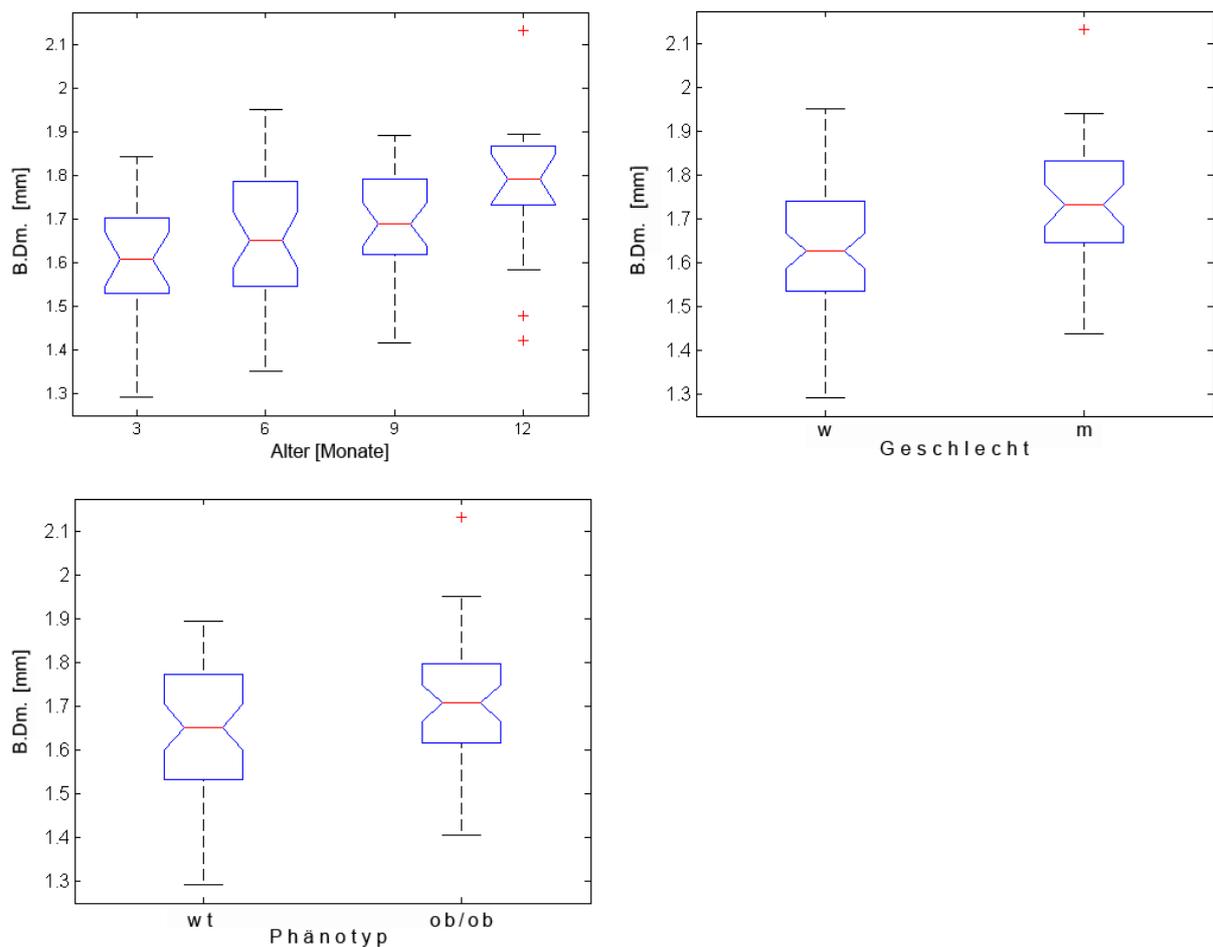
### 7.1.1 Knochendurchmesser (B.Dm)

Erwartungsgemäß zeigte der Knochendurchmesser unabhängig vom Phänotyp eine signifikante Abhängigkeit vom Alter ( $p=0,004$ ;  $F=4,46$ ) (siehe **Tabelle 3** und **Abbildung 9**).

**Tabelle 3** B.Dm. in Abhängigkeit vom Alter [mm].

	<b>3 Monate</b>	<b>6 Monate</b>	<b>9 Monate</b>	<b>12 Monate</b>
<b>beide Phänotypen</b>	1,60±0,15	1,66±0,15	1,68±0,13	1,77±0,18
<b>wt-Gruppe,</b>	1,58±0,18	1,62±0,14	1,66±0,13	1,72±0,20
<b>ob/ob-Gruppe,</b>	1,64±0,11	1,72±0,14	1,71±0,15	1,79±0,10
<b>wt-Gruppe, weiblich</b>	1,51±0,18	1,56±0,11	1,66±0,13	1,64±0,20
<b>wt-Gruppe, männlich</b>	1,67±0,13	1,72±0,14	1,79±0,10	1,89±0,01
<b>ob/ob-Gruppe, weiblich</b>	1,59±0,12	1,71±0,17	1,69±0,09	1,74±0,11
<b>ob/ob-Gruppe, männlich</b>	1,69±0,07	1,72±0,15	1,68±0,16	1,83±0,09

Bei den weiblichen Proben waren die Werte leicht reduziert ( $p=0,0002$ ;  $F=15,4$ ) (siehe **Abbildung 9** und **Tabelle 3**). Der Phänotyp erwies sich als nicht signifikanter Parameter. Die Werte in der wt-Gruppe waren leicht, aber nicht signifikant reduziert (siehe **Tabelle 2**, **Tabelle 3** und **Abbildung 9**).



**Abbildung 9** Abhängigkeit des Knochendurchmessers von Alter (oben links), Geschlecht (oben rechts) und Phänotyp (unten links); als Box-Whisker-Plot.

Im multiplen Vergleichstest ergab sich für das Geschlecht in Abhängigkeit vom Phänotyp ein signifikanter Unterschied ( $p=0,026$ ;  $F=5,05$ ).

Innerhalb der wt-Gruppe zeigten sich signifikant erniedrigte Werte im weiblichen Geschlecht gegenüber dem männlichen Geschlecht ( $p=0,0007$ ;  $F=12,86$ ) (siehe **Tabelle 3**). Innerhalb der ob/ob-Gruppe waren die Werte der weiblichen Mäuse gegenüber den männlichen ebenfalls reduziert, jedoch nicht signifikant und die Unterschiede waren im Alter von 6 und 9 Monaten nicht zu beobachten (siehe **Tabelle 3**). Deutlich trat der Unterschied zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht, sowohl für die wt- als auch für die ob/ob-Gruppe im Alter von 3 und 12 Monaten hervor (siehe **Tabelle 3**).

Die Untersuchung des B.Dm. in Abhängigkeit vom Alter, getrennt für die ob/ob- und wt-Gruppe, ergab in beiden Fällen keine signifikanten Unterschiede. Die Knochendurchmesser nahmen jedoch bei beiden Phänotypen zum 12. Monat hin zu (siehe **Tabelle 3**).

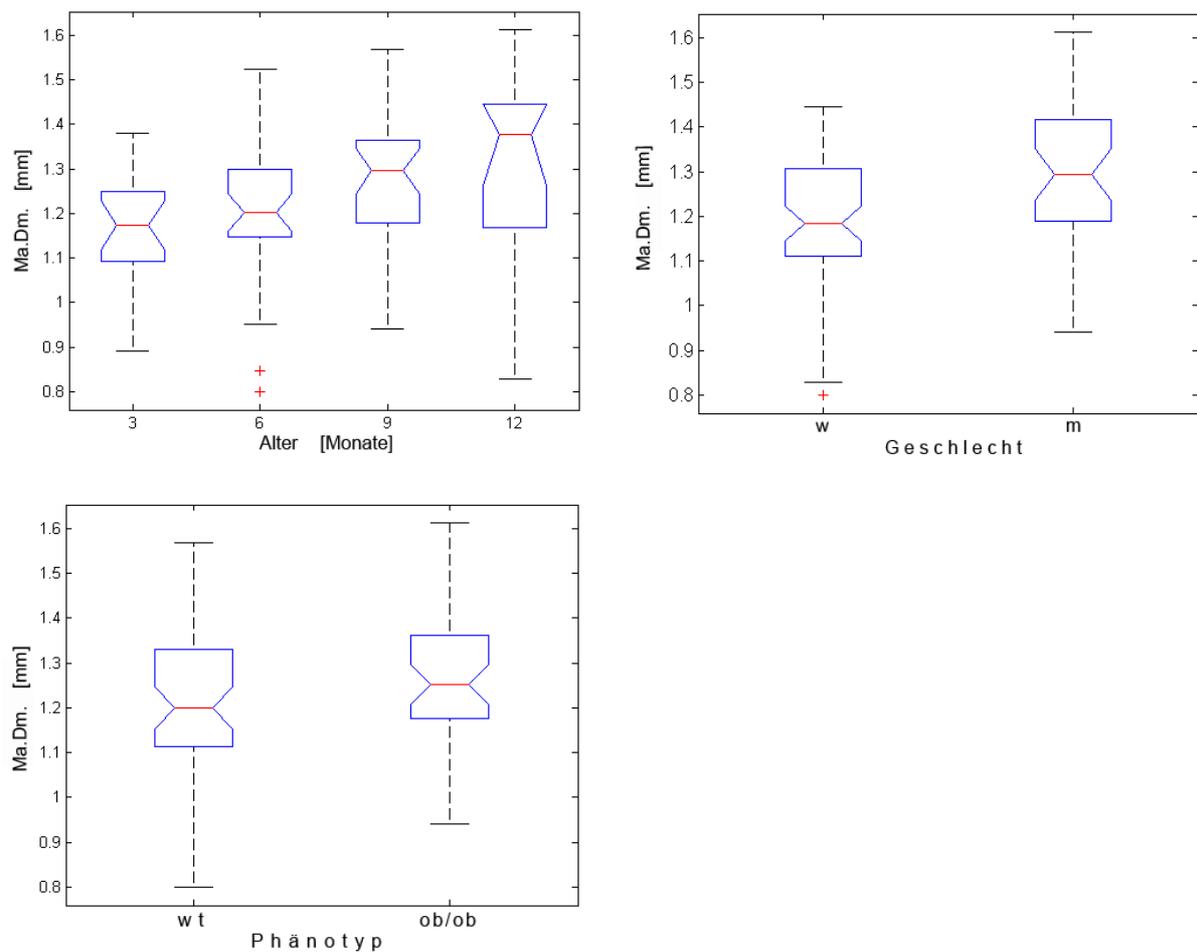
### 7.1.2 Knochenmarksdurchmesser (Ma.Dm)

Der Ma.Dm. zeigte analog dem B.Dm. signifikante Änderungen unter dem Einfluss von Alter ( $p=0,001$ ;  $F=5,61$ ) (siehe **Tabelle 4**) und Geschlecht ( $p=0,0001$ ;  $F=16,88$ ) mit deutlich reduzierten Werten in der weiblichen Gruppe (siehe **Abbildung 10**).

**Tabelle 4** Ma.Dm. in Abhängigkeit vom Alter [mm].

	<b>3 Monate</b>	<b>6 Monate</b>	<b>9 Monate</b>	<b>12 Monate</b>
<b>beide Phänotypen</b>	1,16±0,12	1,21±0,17	1,27±0,14	1,31±0,20
<b>wt-Gruppe, weiblich</b>	1,09±0,17	1,10±0,15	1,24±0,13	1,10±0,26
<b>wt-Gruppe, männlich</b>	1,21±0,07	1,34±0,12	1,37±0,19	1,45±0,02
<b>ob/ob-Gruppe, weiblich</b>	1,14±0,07	1,18±0,07	1,30±0,09	1,34±0,12
<b>ob/ob-Gruppe, männlich</b>	1,24±0,04	1,27±0,18	1,18±0,18	1,45±0,13

Bezüglich des Phänotyps, unter Vernachlässigung weiterer Einflussvariablen, zeigte die ob/ob-Gruppe nicht signifikant erhöhte Werte gegenüber der wt-Gruppe (siehe **Tabelle 2** und **Abbildung 10**).



**Abbildung 10** Abhängigkeit des Ma.Dm von Alter (oben links), Geschlecht (oben rechts) und Phänotyp (unten links); als Box-Whisker-Plot.

Im multiplen Vergleichstest ergab sich für das Geschlecht in Abhängigkeit vom Phänotyp ein signifikanter Einfluss ( $p=0,0075$ ;  $F=7,52$ ).

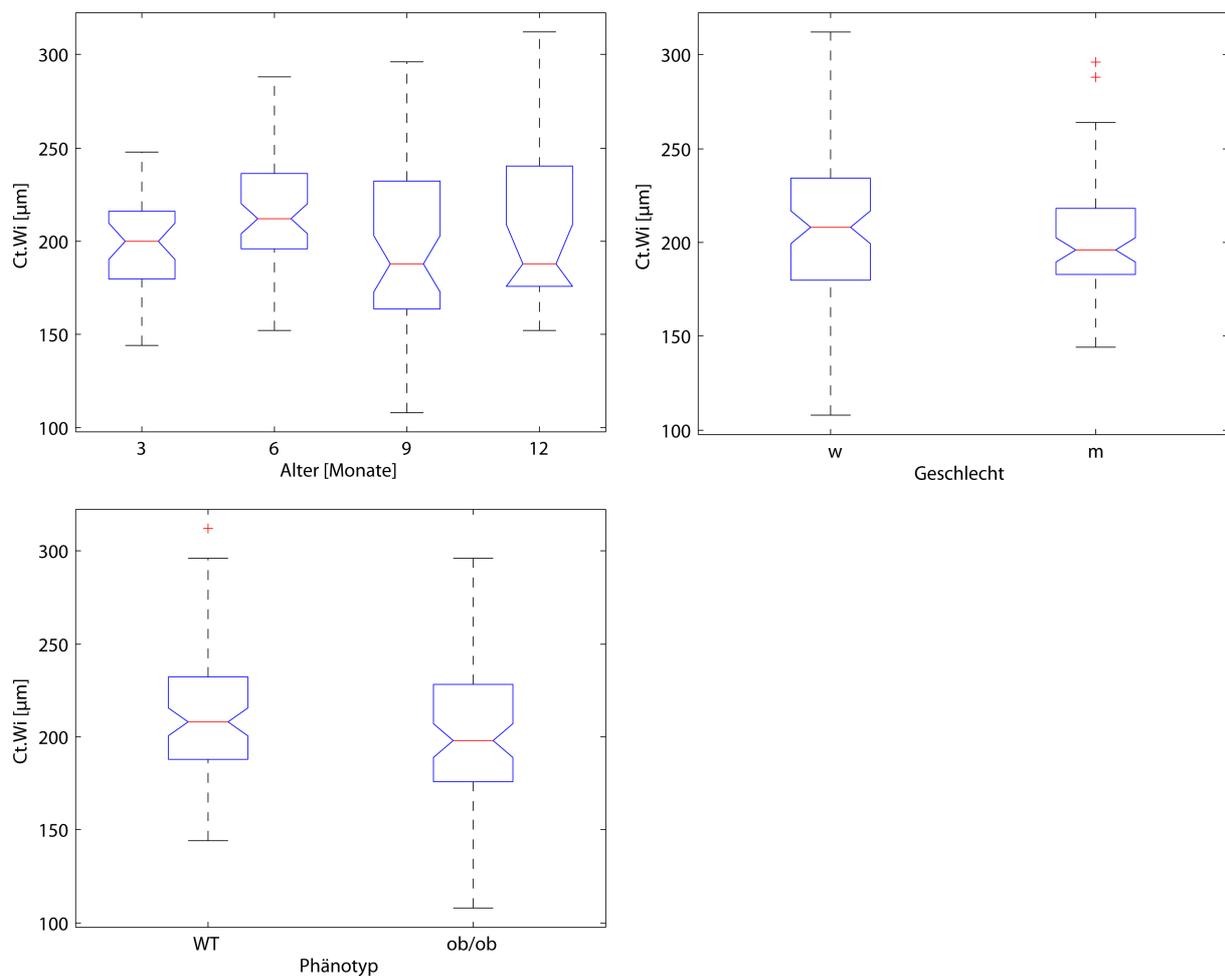
Analog dem B.Dm waren innerhalb der wt-Gruppe für das weibliche Geschlecht signifikant reduzierte Werte, verglichen mit dem männlichen Geschlecht zu beobachten ( $p=0,0004$ ;  $F=14,48$ ) (siehe **Tabelle 4**). Ebenfalls analog dem B.Dm. waren innerhalb der ob/ob-Gruppe die Werte der weiblichen Gruppe gegenüber der männlichen Gruppe nicht signifikant reduziert. Im Alter von 9 Monaten lag jedoch der mittlere Wert der weiblichen Gruppe über dem der männlichen Gruppe (siehe **Tabelle 4**).

Untersucht man den Ma.Dm. in Abhängigkeit vom Alter getrennt für beide Phänotypen, so zeigte sich für die ob/ob Maus eine signifikante Abhängigkeit vom Alter ( $p=0,026$ ;  $F=3,41$ ), mit im multiplen Vergleichstest signifikant erhöhten Werten in der 12 Monategruppe

gegenüber der 3 Monategruppe. Für die wt Maus konnte diesbezüglich keine signifikante Abhängigkeit festgestellt werden.

### 7.1.3 Kortikalisdicke (Ct.Wi)

Für die Ct.Wi. zeigte sich im ANOVA eine leichte Abhängigkeit vom Alter mit signifikant größeren Werten in der 6-Monatsgruppe als in den 3- und 9-Monatsgruppen ( $p=0,01$ ,  $F=3,87$ ), aber nicht von Phänotyp und Geschlecht (siehe **Tabelle 2** und **Abbildung 11**).



**Abbildung 11** Ct.Wi. in Abhängigkeit von Alter (oben links), Geschlecht (oben rechts) und Phänotyp (unten links); als Box-Whisker-Plot.

Nach Kompensation des Alters waren schwache, aber signifikante Einflüsse von Phänotyp ( $p=0,001$ ,  $F=5,28$ ) und Geschlecht ( $p=0,0004$ ,  $F=6,33$ ) in der mehrfaktoriellen ANOVA zu beobachten (siehe **Tabelle 5**).

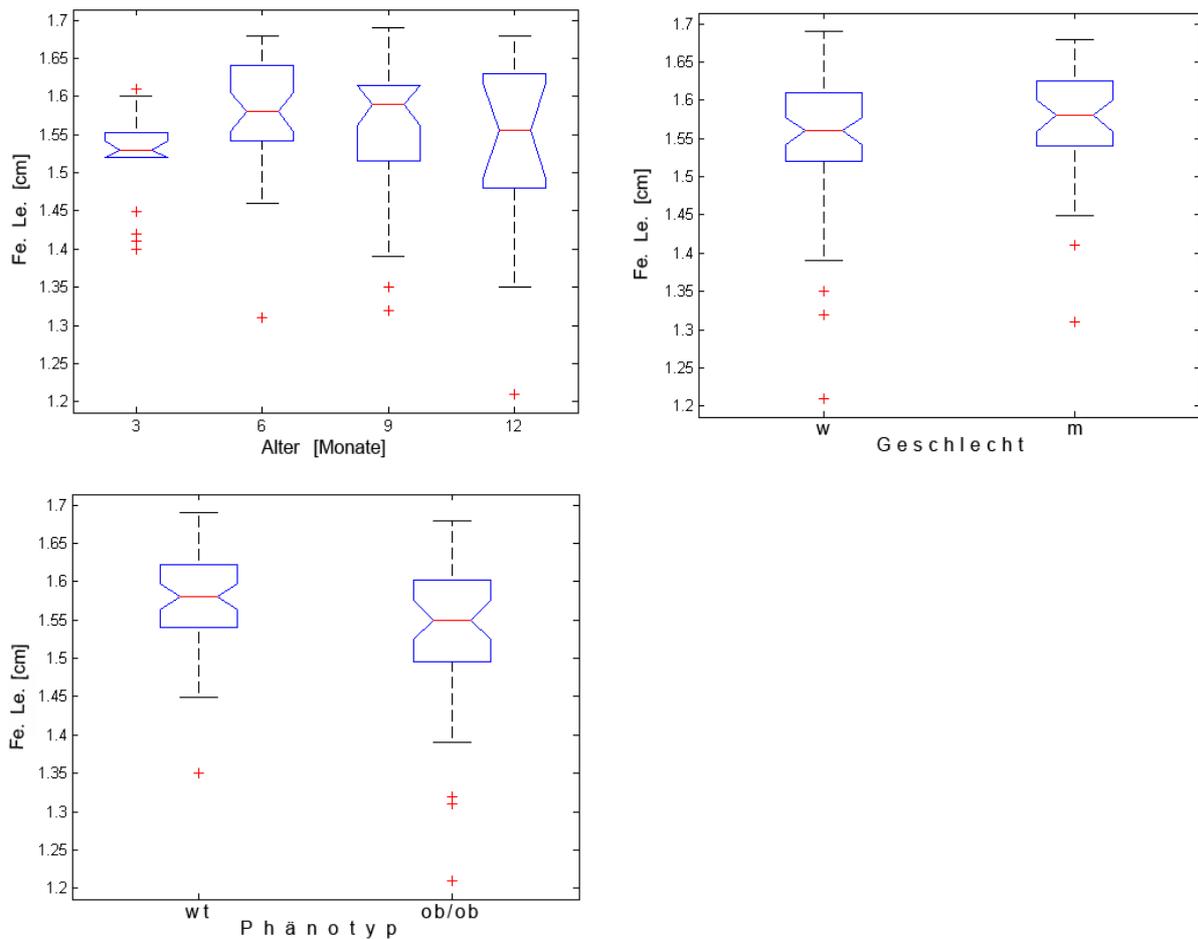
**Tabelle 5** Ct.Wi. in Abhängigkeit vom Alter [ $\mu\text{m}$ ].

	<b>3 Monate</b>	<b>6 Monate</b>	<b>9 Monate</b>	<b>12 Monate</b>
<b>beide Phänotypen</b>	197 $\pm$ 28	218 $\pm$ 31	197 $\pm$ 41	208 $\pm$ 48
<b>beide Phänotypen, männlich</b>	202 $\pm$ 32	206 $\pm$ 26	210 $\pm$ 44	185 $\pm$ 35
<b>beide Phänotypen, weiblich</b>	192 $\pm$ 25	231 $\pm$ 30	193 $\pm$ 39	232 $\pm$ 49
<b>wt-Gruppe</b>	198 $\pm$ 29	209 $\pm$ 17	211 $\pm$ 36	223 $\pm$ 52
<b>ob/ob-Gruppe</b>	196 $\pm$ 28	227 $\pm$ 37	181 $\pm$ 40	191 $\pm$ 39

Untersucht man auch die Kortikalisdicke in Abhängigkeit vom Alter getrennt für beide Phänotypen, so zeigte sich bei den wt Mäusen ein kontinuierlicher, aber nicht signifikanter Anstieg mit dem Alter, während in den ob/ob Mäusen zunächst ein nicht signifikanter Anstieg zwischen den 3- und 6-Monatsgruppen und anschließend ein signifikanter Abfall zu beobachten war (siehe **Tabelle 5**).

#### **7.1.4 Femurlänge (Fe.Le.)**

Die Femurlänge zeigte in Abhängigkeit vom Alter ( $p=0,07$ ;  $F=2,41$ ) und vom Geschlecht ( $p=0,26$ ;  $F=1,26$ ) keine signifikanten Veränderungen (siehe **Abbildung 12**). Bezüglich des Phänotyps war die mittlere Femurlänge der ob/ob-Gruppe mit  $15,34\pm 1,02$  mm gegenüber der wt-Gruppe mit  $15,74\pm 0,72$  mm signifikant reduziert ( $p=0,02$ ;  $F=5,4$ ; siehe **Abbildung 12**).



**Abbildung 12** Fe.Le. in Abhängigkeit von Alter (oben links), Geschlecht (oben rechts) und Phänotyp (unten links); als Box-Whisker-Plot.

Männliches Geschlecht resultierte sowohl in der wt- als auch der ob/ob-Gruppe in leicht aber nicht signifikant erhöhten Femurlängen.

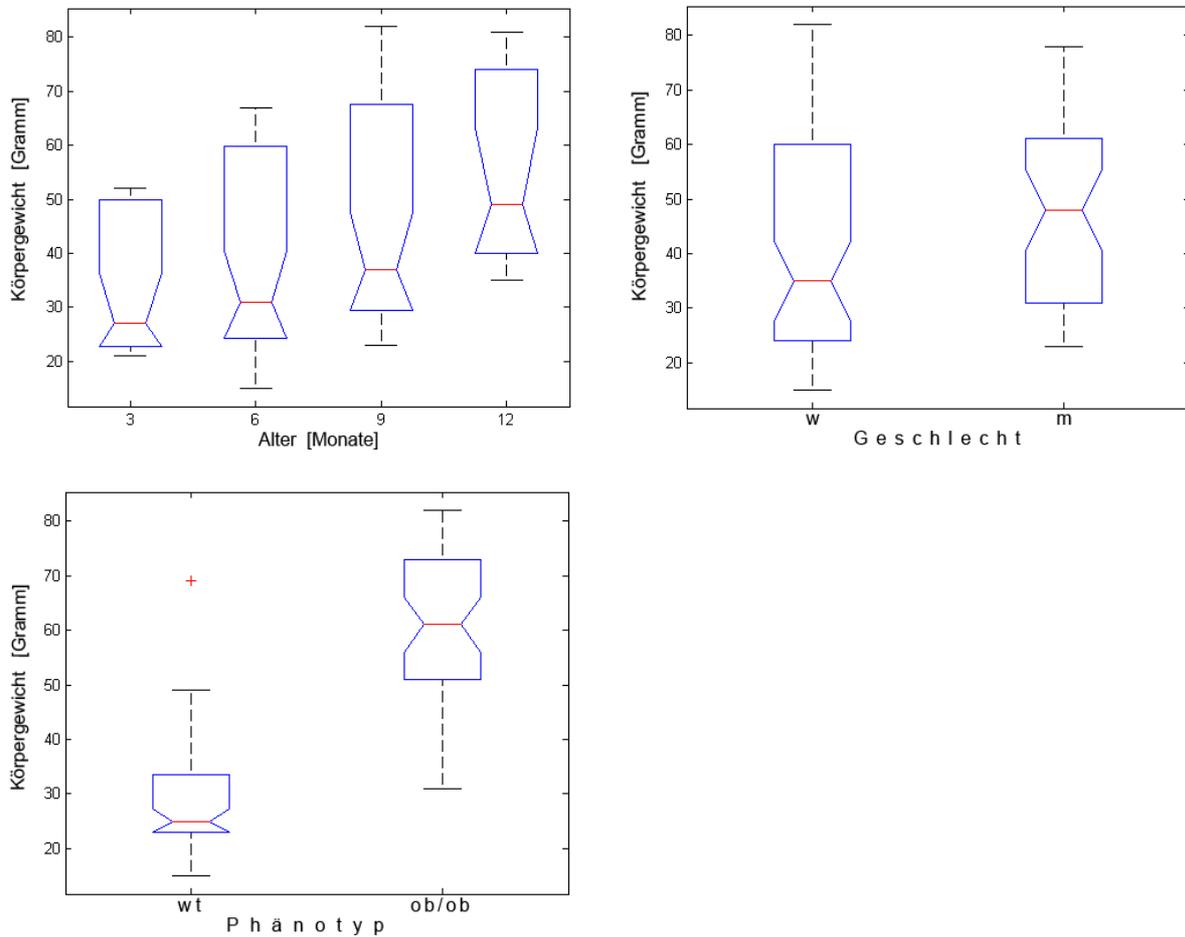
### 7.1.5 Körpergewicht

Das Körpergewicht zeigte in Abhängigkeit vom Alter ( $p=0$ ;  $F=12,83$ ) und vom Phänotyp ( $p=0$ ;  $F=247$ ) signifikante Veränderungen (siehe **Abbildung 12**). Das Durchschnittsgewicht der ob/ob-Gruppe gegenüber der wt-Gruppe war dabei etwa doppelt so hoch (siehe **Tabelle 2** und **Abbildung 12**).

Im mehrfaktoriellen ANOVA war ein signifikanter Einfluss des Alters in Abhängigkeit von Geschlecht und Phänotyp festzustellen ( $p=0,03$ ;  $F=3,05$ ).

Untersucht man das Gewicht in Abhängigkeit des Alters getrennt für beide Phänotypen, so zeigt sich für beide Gruppen eine Zunahme des Gewichtes mit zunehmendem Alter (ob/ob:

$F=4,79$ , wt:  $F=8,52$ ) (siehe **Abbildung 12**). Signifikante Gewichtszunahmen waren dabei in der ob/ob-Gruppe zwischen 3. und 9., sowie zwischen 3. und 12. Monat. In der wt-Gruppe waren zwischen 3. und 9., sowie zwischen 6. und 9. und 6. und 12. Monat signifikante Zunahmen.



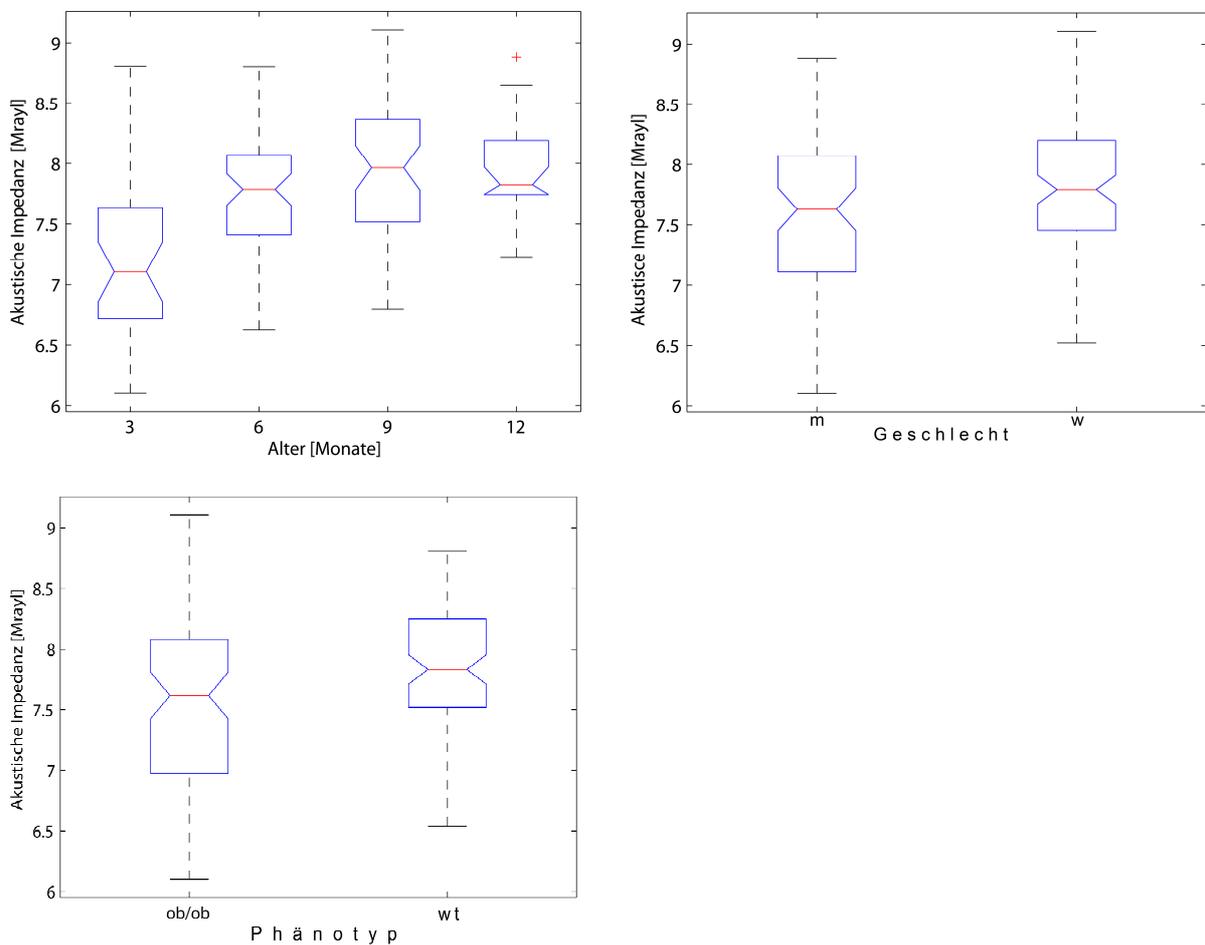
**Abbildung 12** Gewicht in Abhängigkeit von Alter (oben links), Geschlecht (oben rechts) und Phänotyp (unten links); als Box-Whisker-Plot.

## 7.2 Elastische Gewebsparameter

Für die statistische Auswertung der Kortikalisimpedanz und des radialen Impedanzverlaufs standen alle 102 Proben zur Verfügung.

### 7.2.1 Kortikalisimpedanz

Die Werte zeigten sich als signifikant abhängig von Alter ( $p=0$ ;  $F=16,4$ ), Geschlecht ( $p=0,04$ ;  $F=4,16$ ) und Phänotyp ( $p=0,0006$ ;  $F=12,3$ ) mit reduzierten Werten der ob/ob-Gruppe ( $7,57 \pm 0,93$  Mrayl) gegenüber der wt-Gruppe ( $7,87 \pm 0,83$  Mrayl) (siehe **Abbildung 13**). Die Altersabhängigkeit wurde dabei signifikant vom Phänotyp beeinflusst ( $p=0,0002$ ;  $F=6,96$ ).



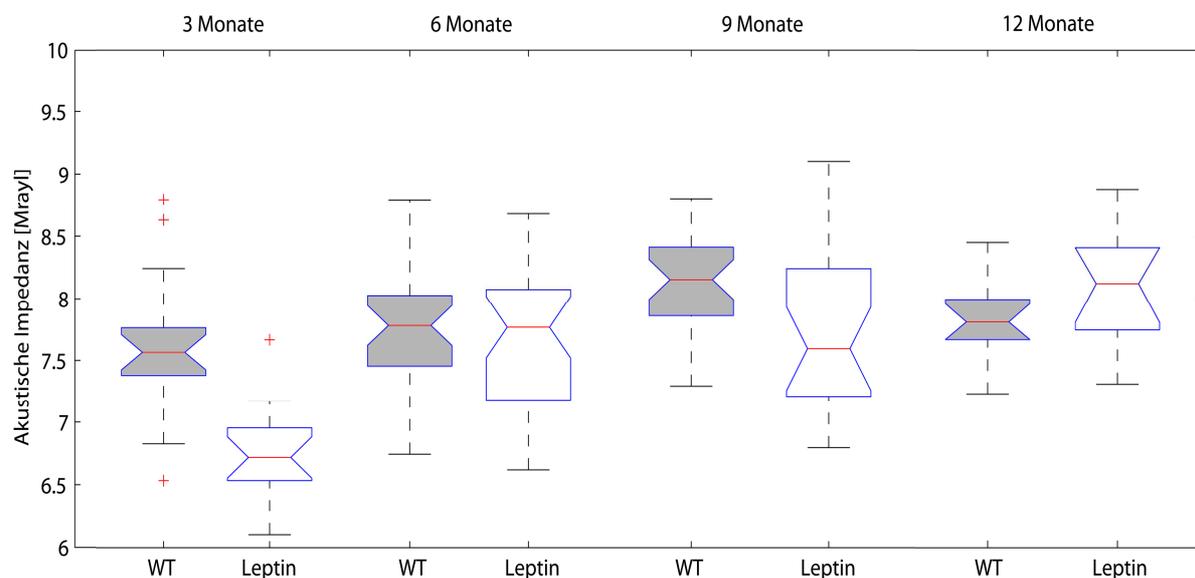
**Abbildung 13** Akustische Impedanz in Abhängigkeit von Alter (oben links), Geschlecht (oben rechts) und Phänotyp (unten links); als Box-Whisker-Plot.

Innerhalb der wt-Gruppe hatte das Alter einen signifikanten Einfluss ( $p=0,001$ ;  $F=5,59$ ) (siehe **Abbildung 13**). Die Werte der 9-Monatsgruppe waren signifikant höher als die der 3- und 6-Monatsgruppen.

Auch in der ob/ob-Gruppe ergab sich eine signifikante Altersabhängigkeit. Statistisch waren jedoch nur die Werte in der 3-Monatsgruppe gegenüber den anderen Gruppen erniedrigt.

(siehe **Abbildung 14**).

Untersucht man den Einfluss des Alters in Abhängigkeit vom Phänotyp genauer, so stellt man fest, dass nur innerhalb der 3 Monate- und der 9 Monategruppe die Werte der ob/ob Maus gegenüber der wt Maus signifikant reduziert waren (siehe **Abbildung 14**). Im Alter von 12 Monaten waren in der ob/ob-Gruppe leicht aber nicht signifikant erhöhte Werte gegenüber der wt-Gruppe zu beobachten (siehe **Abbildung 14**).



**Abbildung 14** Mittelwerte und Standardabweichungen der kortikalen Impedanz in Abhängigkeit von Alter und Phänotyp.

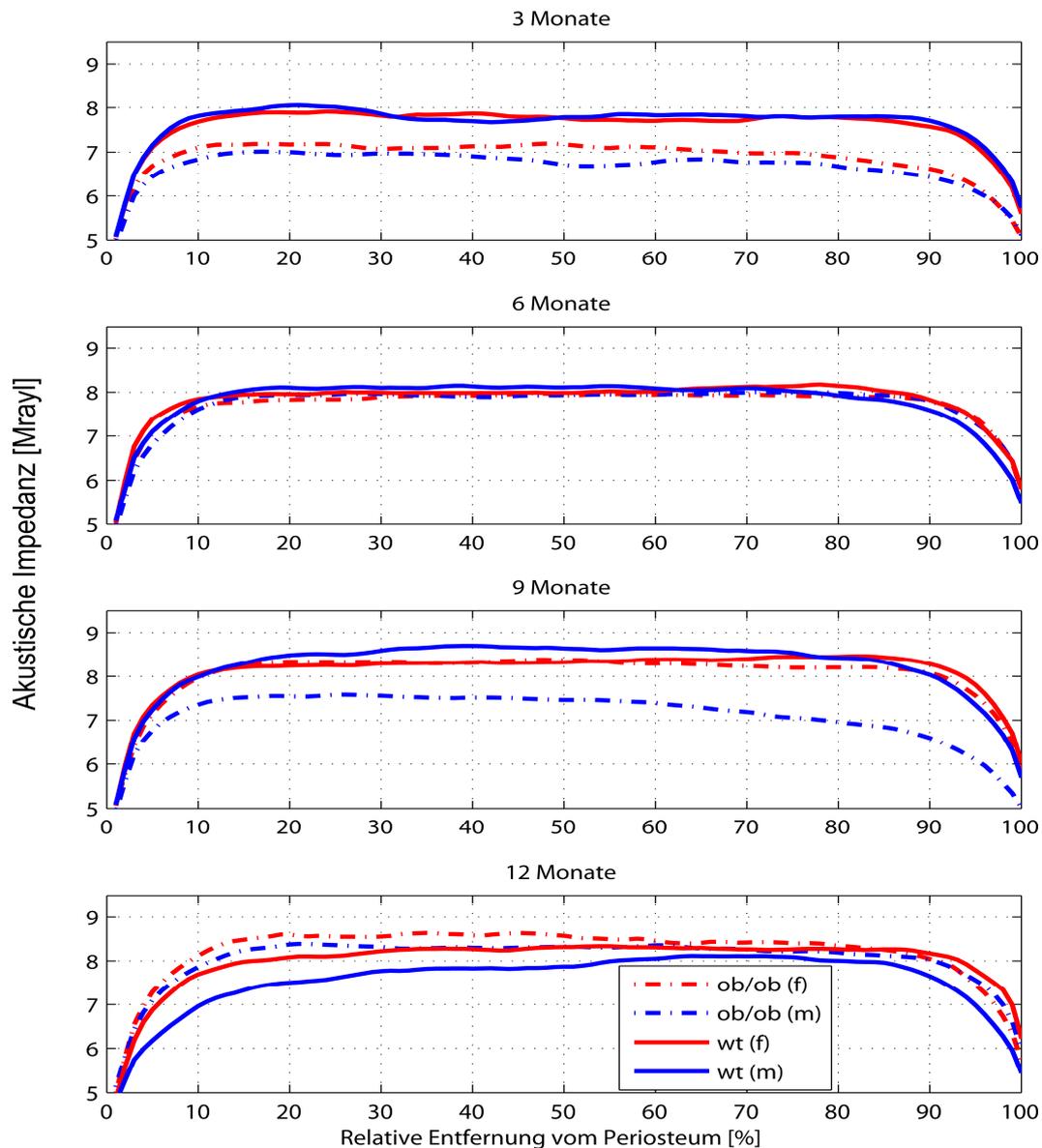
### 7.2.2 Radialer Impedanzverlauf von periostal nach endostal

Hinsichtlich der kortikalen akustischen Impedanz lagen im Alter von 3 Monaten, generell über den gesamten radialen Verlauf, sowohl die weibliche, als auch die männliche ob/ob-Gruppe hinter den beiden wt-Gruppen zurück (siehe **Abbildung 15**), während im Alter von 6 Monaten beide ob/ob-Gruppen relativ zu den wt-Gruppen aufholten.

Im Alter von 9 Monaten wurde in beiden wt-Gruppen eine Verfestigung der kortikalen Knochensubstanz deutlich, ein beginnender periostnaher Impedanzabfall lässt eine periostale Knochenneubildung vermuten (siehe **Abbildung 15**). Deutliche Unterschiede traten in diesem Alter zwischen der männlichen und weiblichen ob/ob-Gruppe auf, mit deutlich reduzierten Impedanzwerten und einem hinzukommenden deutlichen Abfall nach endostal in der

männlichen ob/ob-Gruppe (siehe **Abbildung 15**). Ursächlich könnte dem eine starke Knochenresorption in diesem Bereich zugrunde liegen.

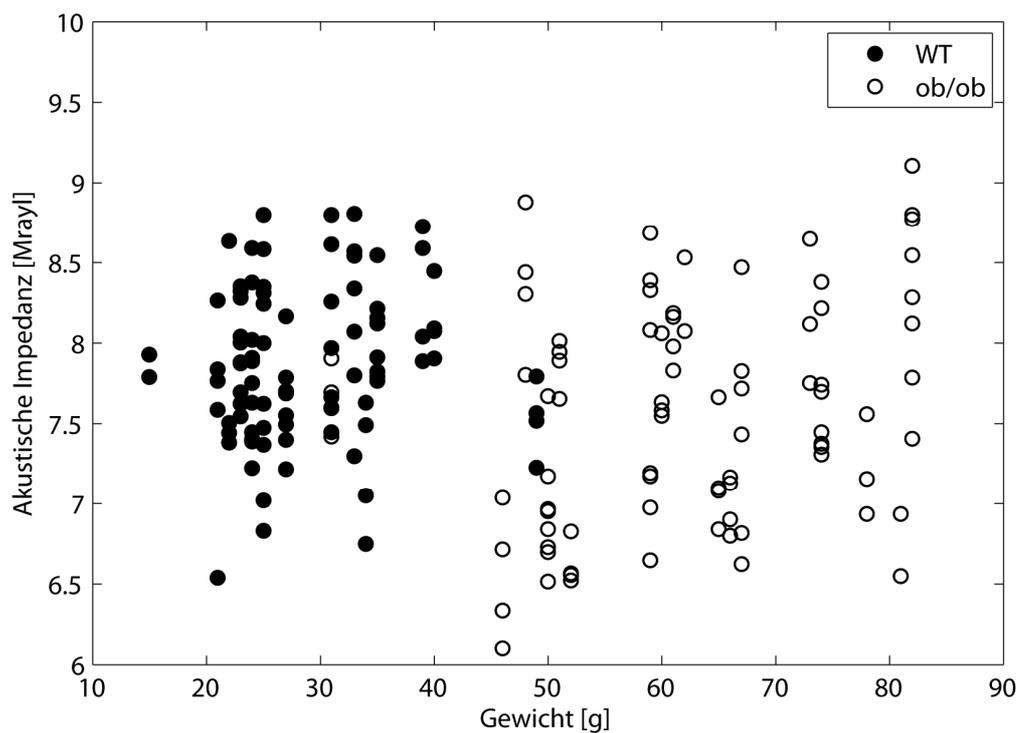
Im Alter von 12 Monaten zeigte sich in beiden wt-Gruppen, vor allem aber im männlichen Geschlecht, ein flacher Impedanzanstieg periostal mit erniedrigten Impedanzwerten. Im Gegensatz dazu zeigten beide ob/ob-Gruppen keine wesentlichen Abfälle im radialen Impedanzverlauf (siehe **Abbildung 15**).



**Abbildung 15** Radialer Impedanzverlauf von periostal nach endostal in Abhängigkeit von Alter, Phänotyp und Geschlecht.

### 7.2.3 Kortikalisimpedanz in Abhängigkeit vom Körpergewicht

Die Darstellung der Kortikalisimpedanz in Abhängigkeit vom Körpergewicht zeigte keine signifikante Korrelation. Obwohl die beiden Phänotypen sich deutlich in zwei voneinander getrennte Gewichtsklassen separieren ließen, wurde in jedem Phänotyp das gesamte Impedanzspektrum abgedeckt (siehe **Abbildung 16**). Eine dominante Abhängigkeit der Impedanz vom Körpergewicht wurde demzufolge ausgeschlossen.



**Abbildung 16** Mittlere Werte der akustischen Impedanz gegen Körpergewicht der ob/ob-Gruppe (weiß) und wt-Gruppe (schwarz) [78].

### 7.3 Zusammenfassung

Die Femurlänge der ob/ob-Gruppe war signifikant gegenüber der wt-Gruppe reduziert. Das Durchschnittsgewicht der ob/ob-Gruppe war gegenüber der wt-Gruppe mehr als verdoppelt. Sowohl Knochendurchmesser als auch Knochenmarksdurchmesser waren signifikant abhängig von Alter und Geschlecht. Die Einflüsse des Geschlechts zeigten zudem eine Abhängigkeit vom Phänotyp. Für die Kortikalisdicke konnte eine leichte Abhängigkeit vom Alter und nach Kompensation des Alters, schwache aber signifikante Einflüsse von Phänotyp und Geschlecht gezeigt werden.

Die Kortikalisimpedanz wurde signifikant von Alter, Phänotyp und der Interaktion beider Parameter verändert. Zudem war die Kortikalisimpedanz signifikant abhängig vom Geschlecht. Bezüglich des Alters in Abhängigkeit vom Phänotyp waren nur innerhalb der 3-Monats- und der 9-Monatsgruppe die Werte der ob/ob Maus gegenüber der wt Maus signifikant reduziert.

## 8 DISKUSSION

### 8.1 Methodik

Die Einbettung und Präparation der Proben gestaltete sich aufgrund der nicht immer auf Anhieb erfolgreichen Polymerisation des MMA Gemisches als sehr zeitaufwendig, da ca. 30-40% der Proben ein zweites Mal dem letzten Schritt des Einbettungsprozesses unterzogen werden mussten. Eine Erhöhung der Katalysatormenge bewirkte trotz der Polymerisation bei 20°C eine zu starke Wärmeentwicklung mit Gasblasenbildung, so dass dadurch keine Verbesserung der Einbettung bewirkt werden konnte. An den auspolymerisierten Proben konnte ein Nachhärten mit kleinsten damit in Zusammenhang stehenden Veränderungen der präparierten Oberfläche beobachtet werden. Aufgrund der verwendeten hohen Auflösung war es nötig, die Oberflächen ein zweites Mal unmittelbar vor dem Messvorgang zu bearbeiten (siehe **Kapitel 6.4.3**).

Mit dem 200-MHz SAM lässt sich die Knochenarchitektur mit einer Auflösung, vergleichbar dem  $\mu$ CT, darstellen (siehe **Kapitel 5**). An den 2D-Impedanzbildern lassen sich akkurate morphologische Messungen mit Bestimmung verschiedener standardisierter Parameter (siehe **Kapitel 6.5.2**) durchführen. Weiterhin kann die akustische Impedanz der Knochenprobe bestimmt werden, die sehr gut die elastischen Eigenschaften der Knochenmatrix repräsentiert und nicht von strukturellen Veränderungen beeinflusst wird (siehe **Kapitel 5**).

SAM ist deshalb eine geeignete und vorteilhafte Methode, um den mikroelastischen Knochenphänotyp, sowie dessen Veränderung unter bestimmten Einflüssen zu untersuchen und zu beschreiben.

Nachdem die strukturellen Parameter und die Kortikalisimpedanz zunächst genau in der Mitte der gemessenen Femurlänge ermittelt wurden, erwies es sich als nötig, die Werte in einem Bereich 7 mm von der distalen Gelenkfläche zu erheben, da sich der Messbereich ursprünglich in vielen Fällen bereits im Bereich der Trochanter befand und in diesen Proben zu überhöhten Impedanzwerten führte.

### 8.2 Strukturelle Parameter

Hamrick et al. [53] untersuchte den Einfluss der Leptindefizienz an 6 monatigen männlichen ob/ob C57Bl/6 Mäusen gegenüber wt C57Bl/6 Mäusen. Neben einer Reduktion der Femurlänge um 5,1% in der ob/ob-Gruppe konnten mittels histomorphometrischer Untersuchungen an Femurquerschnitten leptindefizienter Mäuse reduzierte Kortikalisdicken um 16,7% bei gleichzeitig leicht erhöhten Knochendurchmessern beobachtet werden. Die Knochenmarksfläche war ebenfalls in der ob/ob-Gruppe leicht und nicht signifikant gegenüber der wt-Gruppe erhöht.

In Einklang dazu steht der in unseren Untersuchungen beobachtete signifikante Einfluss des Phänotyps auf die Femurlänge (siehe **Kapitel 7.1.4**) mit einer Femurverkürzung der ob/ob-Gruppe gegenüber der wt-Gruppe um 2,52% und um 2,2% speziell in der männlichen 6 Monategruppe. Weiterhin in Einklang zu Hamricks Ausführungen steht, dass in unserer Untersuchung der Knochendurchmesser unabhängig vom Alter in der ob/ob-Gruppe gegenüber der wt-Gruppe leicht aber nicht signifikant erhöht war. Während die Kortikalisdicke der 6 monatigen ob/ob-Gruppe gegenüber der wt-Gruppe in unseren Untersuchungen sogar mit 8,6% erhöht war, zeigte sich ein Ergebnis wie von Hamrick beschrieben nur in der 6 Monate- und der 9 Monategruppe. Unabhängig vom Alter zeigte die ob/ob Maus gegenüber der wt Maus um 4,8% erhöhte und nicht signifikante Werte des Ma.Dm (siehe **Kapitel 7.1.2**), was aus einer stark erhöhten Zahl an Adipozyten im Knochenmark resultiert sein könnte [53].

Während die in Studien von Somerville et al. [121] ermittelten kortikalen Flächen im Tibiaquerschnitt von wt C57Bl/6 Mäusen mit ca. 4 Monaten ein Plateau erreichten und in weiblichen Mäusen gegenüber männlichen Mäusen signifikant reduziert waren, zeigten die hier vorgestellten Ergebnisse eine geringe aber kontinuierliche Zunahme der Knochendurchmesser mit dem Alter.

Die ermittelten Körpergewichte in Somervilles Untersuchungen verhielten sich ab einem Alter von ca. 5 Monaten relativ konstant.

Unsere Ergebnisse bestätigen jedoch die Ergebnisse von Hamrick et al. [52], die einen kontinuierlichen Anstieg des Körpergewichtes und eine signifikante Zunahme zwischen 6 und 12 Monaten beobachteten.

In Widerspruch zu Ducy et al. und Schilling et al. [30,113], die kortikalen Knochen als unbeeinflusst von einer Leptindefizienz bezeichneten, zeigten unsere Ergebnisse in Einklang mit Ergebnissen von Hamrick et al. [53] und weiteren Arbeiten, die an 4 wöchigen männlichen ob/ob Mäusen [75,124] und 11-13 Wochen alten männlichen und weiblichen db/db Mäusen [75] durchgeführt wurden, dass die Leptindefizienz einen Einfluss auf den kortikalen Knochen des Femurs ausübt. Im Gegensatz zu deren Ergebnissen, konnten wir allerdings keine generelle Reduktion der Kortikalisdicke und somit reduzierter kortikaler Knochenmasse unter dem Einfluss einer Leptindefizienz nachweisen. Unsere Ergebnisse zeigten stattdessen, dass das Alter einen wesentlich stärkeren und signifikanten Einfluss ausübte (siehe **Kapitel 7.1**).

### 8.3 Elastische Gewebsparameter

Somerville et al. [121] untersuchten in einer Studie den Einfluss des Alters und Geschlechts auf kortikalen Knochen der Tibia am C57BL/6 Mausmodell. Mit Hilfe von pQCT Densitometer Messungen, 10-MHz Ultraschallmessungen und Anwendung des Archimedischen Prinzips wurden unter anderem volumetrische Knochenmineraldichte, Mineralgehalt, Dichte des kortikalen Knochens und Elastizitätsmodul bestimmt. Mineralischer-, organischer Massenanteil und BMD erreichten in einem Alter von ca. 4 Monaten einen weitestgehend konstanten Wert. Die Feststellung, dass der BMD im Alter zwischen 3 und 12 Monaten relativ konstant bleibt, wird durch Ergebnisse von Hamrick et al. gestützt [52]. Die Dichte des Knochens zeigte signifikante Veränderungen unter dem Einfluss von Geschlecht und Alter mit erhöhten Werten des männlichen Geschlechts und Anstieg mit zunehmendem Alter, wobei nur die 12 monatigen Tiere eine Dichte aufwiesen, die signifikant größer als die Dichten mit 1, 2, 3 und 9 Monaten war. Der Elastizitätsmodul veränderte sich signifikant unter dem Einfluss des Alters, wobei der Wert beim männlichen Geschlecht einen schnellen 4-6 monatigen Anstieg mit sich anschließendem langsamen und geringen Anstieg bis zum Alter von 12 Monaten zeigte. Einen Anstieg mit dem Alter zeigte in beiden Geschlechtern auch die Torsionsfestigkeit. Somerville et al. folgerten aus den Ergebnissen, dass die skelettale Reife bezüglich der meisten Parameter in der C57Bl/6 Maus vor einem Alter von 6 Monaten erreicht wird. Die Tatsache, dass die Korrelation zwischen Elastizitätsmodul und Dichte schwach war, führte Somerville zur Annahme, dass die Steifigkeit des kortikalen Materials abhängig von der Natur des organischen Anteils und der Interaktion der Matrixkomponenten ist, die in einfachen Struktur- und Dichtemessungen nicht erfasst werden.

Entsprechend der Dichte und dem elastischen Moduls in Somervilles Arbeit ergab sich für den Wert der akustischen Impedanz eine signifikante Abhängigkeit vom Alter, wobei der Impedanzverlauf ähnlich dem der Dichte war. Bezugnehmend auf Ergebnisse von Brodt et al. [20] vermutet Somerville Änderungen in der Quervernetzung von Kollagenfibrillen und eine Reifung reduzierbarer Querverbindungen in stabilere, nicht reduzierbare Formen, die bekanntlich eine Zunahme der Steifigkeit und Knochenstärke bewirken [8].

Problematisch ist das Auflösungsvermögen der in Somervilles Arbeiten verwendeten Techniken zu sehen. Während SAM bei einer Frequenz von 200 MHz eine Wellenlänge im Knochen von 20  $\mu\text{m}$  aufweist und eine Ortsauflösung von 8  $\mu\text{m}$  an der Kopplungsmedium-Knochen Grenze bietet, hatte die von Somerville zur Bestimmung des elastischen Moduls verwendete Frequenz von 10 MHz eine Wellenlänge im Knochen von 400  $\mu\text{m}$ . Die Auflösung der unter anderem zur Bestimmung der Knochenmineraldichte verwendeten peripheren quantitativen Computertomographie (pQCT) liegt bei 100-1000  $\mu\text{m}$  und damit deutlich unter dem Auflösungsvermögen anderer zur Verfügung stehender Methoden, wie beispielsweise der MicroCT mit einer Auflösung bis zu 10  $\mu\text{m}$ .

Bezüglich des Einflusses der Leptindefizienz beobachtete Hamrick et al. [53] an männlichen 6 monatigen ob/ob Mäusen reduzierte Knochenmineraldichten und Knochenmineralgehalte. Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu unseren Beobachtungen, dass die akustische Impedanz von wt Mäusen und ob/ob Mäusen in dieser Altersgruppe nahezu identisch war. Signifikant reduzierte elastische Gewebeeigenschaften unter dem Einfluss der Leptindefizienz konnten für kortikalen Knochen im Bereich der Diaphyse im Alter von 3 Monaten beobachtet werden (siehe **Kapitel 7.2.1**). Untersuchungen an jungen ob/ob Mäusen sind spärlich vorhanden und bieten wenig Basis zur Diskussion und genaueren Interpretation unserer Ergebnisse. Untersuchungen an jungen Mäusen wurden unter anderem von Steppan et al. [124] an 4 Wochen alten Tieren durchgeführt, der unter peripherer Gabe von Leptin eine Erhöhung des kortikalen Mineralgehaltes um 16% beobachtete. Steppan untersuchte zwar den Effekt der Leptingabe auf die Entwicklung des Mineralgehaltes, präsentierte jedoch keine Unterschiede im Mineralgehalt der unbehandelten ob/ob Maus gegenüber der wt Maus.

Reduzierte elastische Gewebeeigenschaften unter dem Einfluss der Leptindefizienz konnten in unseren Untersuchungen auch in der 9-Monategruppe beobachtet werden. Vor allem im männlichen Geschlecht traten diese Unterschiede deutlich in den Vordergrund. Der radiale Impedanzverlauf ließ dabei eine starke Knochenresorption im endokortikalen Bereich der männlichen ob/ob Maus vermuten (siehe **Kapitel 7.2.2**).

Diese Feststellungen sind in Einklang mit Ergebnissen von Hamrick et al. [52] zu bringen, die in der männlichen wt C57Bl/6 Maus eine erhöhte Knochenmineralisierung endokortikal zwischen dem 6. und 12. Monat beschrieben und eine reduzierte endokortikale Knochenneubildung unter dem Einfluss einer Leptindefizienz feststellten. Möglicherweise sind dies Auswirkungen einer erhöhten endostalen Osteoklastenzahl und reduzierten Osteoblastendifferenzierung, die sich nach einem Alter von 6 Monaten weiter auswirken [53]. Im Alter von 12 Monaten waren in der ob/ob-Gruppe leicht aber nicht signifikant erhöhte Werte gegenüber der wt-Gruppe zu beobachten. In beiden wt-Gruppen, vor allem aber im männlichen Geschlecht, zeigte sich im radialen Impedanzverlauf ein flacher Anstieg periostal mit insgesamt erniedrigten Werten durch vermutlich stark ausgeprägte periostnahe bis zentrale Knochenneubildung (siehe **Kapitel 7.2.2**). Dies ist konform mit einer starken Erhöhung von Knochen- und Kortikalisdurchmesser in diesem Alter (siehe **Kapitel 7.1**). Auch diese Beobachtungen stehen in Einklang zu Hamrick et al. [52], der von einem Abfall mineralisierender Oberfläche entlang der periostalen Fläche im Alter von 12 Monaten berichtete. In diesem Alter sind die physiologischen Leptinlevel der gesunden männlichen C57Bl/6 Maus besonders hoch [52], und der Einfluss einer Leptindefizienz sollte sich demnach besonders jetzt auf den Knochenstoffwechsel auswirken. Eine damit in Zusammenhang stehende reduzierte Knochenneubildung und –resorption in der 12 monatigen ob/ob Maus resultiert in höheren Knochenfestigkeiten zumindest im periostnahen Bereich.

## 9 SCHLUSSFOLGERUNG

Ziel der Arbeit war es, strukturelle und mechanische Veränderungen unter dem Einfluss einer Leptindefizienz und weiterer Einflussvariablen (Alter und Geschlecht) mit Hilfe hochauflösender Ultraschallmikroskopie zu charakterisieren und einen Beitrag zum Verständnis und Wissen um den Einfluss dieses Hormons auf den Knochenstoffwechsel zu leisten.

Durch Untersuchungen mit Ultraschall können quantifizierbare morphologische und elastische Parameter abgeleitet werden. Dabei geben unsere Daten, widersprüchlich zu bestehender Meinung, Anhalt dafür, dass die volle elastische Reifung kortikalen Extremitätenknochens der C57Bl/6J Maus nicht vor einem Alter von 9 Monaten erreicht ist.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass Faktoren, wie die räumliche Orientierung der mineralisierten Kollagenfibrillen, Querverbindungen der Fibrillen, Mineralclustergröße und die Verbindung der Cluster untereinander die akustischen und elastischen Eigenschaften wesentlich bestimmen, während andere Parameter wie der BMD unberührt davon bleiben und somit im Verlauf abweichend sind.

Wir vermuten, dass bezüglich der elastischen Gewebsparameter eine reduzierte Rate an Knochenreifung in der leptindefizienten Maus im frühen Alter und reduzierte Knochenneubildung und –resorption in der 12 monatigen ob/ob Maus gegenüber einer periostnahen bis zentralen Knochenneubildung in der wt Maus zumindest im periostnahen Bereich jetzt zu höheren Knochenfestigkeiten führt.

Fettleibigkeit und erhöhtes Körpergewicht wurden protektive Effekte vor Knochenverlust zugeschrieben, und Knochenmasse zeigt eine positive Korrelation zum Körpergewicht. Unsere Ergebnisse zeigten, dass der Knochenphänotyp als sekundäre Folge des Gewichts per se in Einklang mit Erkenntnissen weiterer Autoren auszuschließen ist. Vielmehr ist wahrscheinlich, dass andere Faktoren, wie beispielsweise geschlechtliche Einflüsse und/oder von Adipozyten produzierte Produkte, allen voran Leptin, das Potential haben, positive Effekte auf die Knochensubstanz auszuüben.

## 10 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahima, R.S., Flier, J.S.: Leptin; *Annu.Rev.Physiol* 62 (2000) 413-437
2. Ahima, R.S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E., Flier, J.S.: Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting; *Nature* 382 (1996) 250-252
3. Akhter, M.P., Cullen, D.M., Pedersen, E.A., Kimmel, D.B., Reeker, R.R.: Bone response to in vivo mechanical loading in two breeds of mice; *Calcif. Tissue Int.* 63 (1998) 442-449
4. Akhter, M.P., Fan, Z., Rho, J.Y.: Bone intrinsic material properties in three inbred mouse strains; *Calcif.Tissue Int.* 75 (2004) 416-420
5. Akhter, M.P., Iwaniec, U.T., Covey, M.A., Cullen, D.M., Kimmel, D.B., Recker, R.R.: Genetic variations in bone density, histomorphometry, and strength in mice; *Calcif.Tissue Int.* 67 (2000) 337-344
6. Amling, M., Takeda, S., Karsenty, G.: A neuro (endo)crine regulation of bone remodeling; *Bioessays* 22 (2000) 970-975
7. Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J.P., Bortoluzzi, M.N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Marchand-Brustel, Y., Lewin, M.J.: The stomach is a source of leptin; *Nature* 394 (1998) 790-793
8. Bailey, A.J., Paul, R.G., Knott, L.: Mechanisms of maturation and ageing of collagen; *Mech.Ageing Dev.* 106 (1998) 1-56
9. Bailey, D.A., Martin, A.D., McKay, H.A., Whiting, S., Mirwald, R.: Calcium accretion in girls and boys during puberty: a longitudinal analysis; *J.Bone Miner.Res.* 15 (2000) 2245-2250
10. Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., Jaspan, J.B., Maness, L.M.: Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin; *Peptides* 17 (1996) 305-311

11. Beamer, W.G., Donahue, L.R., Rosen, C.J., Baylink, D.J.: Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice; *Bone* 18 (1996) 397-403
12. Blain, H., Vuillemin, A., Guillemin, F., Durant, R., Hanesse, B., De Talance, N., Doucet, B., Jeandel, C.: Serum leptin level is a predictor of bone mineral density in postmenopausal women; *J.Clin.Endocrinol.Metab* 87 (2002) 1030-1035
13. Blank, R.: The Complex Interplay Between Fat and Bone; *Cellscience Reviews* 1 (2005)
14. Blum, M., Harris, S.S., Must, A., Naumova, E.N., Phillips, S.M., Rand, W.M., Dawson-Hughes, B.: Leptin, body composition and bone mineral density in premenopausal women; *Calcif.Tissue Int.* 73 (2003) 27-32
15. Bodi, A.: Bestimmung der mikromorphologischen und anisotropen elastischen Eigenschaften von kortikalen Knochenstanzproben mit Hilfe quantitativer akustischer Mikroskopie.; Diplom, Fachhochschule Merseburg, 2004
16. Bonewald, L.: Transforming growth factor-beta. In: Bilezikian, J., Raisz, G., Rodan, G. (Hrsg): *Principles of bone biology*. Academic Press, New York, 2002, S. 903-918
17. Bonewald, L.F.: Osteocytes: a proposed multifunctional bone cell; *J.Musculoskelet.Neural.Interact.* 2 (2002) 239-241
18. Bray, G.A., York, D.A.: The MONA LISA hypothesis in the time of leptin; *Recent Prog.Horm.Res.* 53 (1998) 95-117
19. Briggs, A.: *Acoustic Microscopy*. Clarendon Press, Oxford, 1992
20. Brodt, M.D., Ellis, C.B., Silva, M.J.: Growing C57Bl/6 mice increase whole bone mechanical properties by increasing geometric and material properties; *J.Bone Miner.Res.* 14 (1999) 2159-2166

21. Burguera, B., Hofbauer, L.C., Thomas, T., Gori, F., Evans, G.L., Khosla, S., Riggs, B.L., Turner, R.T.: Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats; *Endocrinology* 142 (2001) 3546-3553
22. Chehab, F.F., Lim, M.E., Lu, R.: Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin; *Nat.Genet.* 12 (1996) 318-320
23. Cherian, P.P., Cheng, B., Gu, S., Sprague, E., Bonewald, L.F., Jiang, J.X.: Effects of mechanical strain on the function of Gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP2 receptor; *J.Biol.Chem.* 278 (2003) 43146-43156
24. Cherian, P.P., Siller-Jackson, A.J., Gu, S., Wang, X., Bonewald, L.F., Sprague, E., Jiang, J.X.: Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin; *Mol.Biol.Cell* 16 (2005) 3100-3106
25. Christian, J.C., Yu, P.L., Slemenda, C.W., Johnston, C.C., Jr.: Heritability of bone mass: a longitudinal study in aging male twins; *Am.J.Hum.Genet.* 44 (1989) 429-433
26. Cock, T.A., Auwerx, J.: Leptin: cutting the fat off the bone; *Lancet* 362 (2003) 1572-1574
27. Cornish, J., Callon, K.E., Bava, U., Lin, C., Naot, D., Hill, B.L., Grey, A.B., Broom, N., Myers, D.E., Nicholson, G.C., Reid, I.R.: Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo; *J.Endocrinol.* 175 (2002) 405-415
28. Cui, Q., Wang, G.J., Balian, G.: Steroid-induced adipogenesis in a pluripotential cell line from bone marrow; *J.Bone Joint Surg.Am.* 79 (1997) 1054-1063
29. Drenckhahn, D.: Allgemeine Gewebelehre. In: Drenckhahn, D. (Hrsg): *Anatomie.* Urban&Fischer Verlag, München, 2003, S. 93-205

30. Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A.F., Beil, F.T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J.M., Karsenty, G.: Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass; *Cell* 100 (2000) 197-207
31. Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., Karsenty, G.: *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation; *Cell* 89 (1997) 747-754
32. Dunn, F., Tanaka, M., Ohtsuki, S., and Saijo, Y.: *Ultrasonic Tissue Characterization*, 1996
33. Eleftheriou, F., Ahn, J.D., Takeda, S., Starbuck, M., Yang, X., Liu, X., Kondo, H., Richards, W.G., Bannon, T.W., Noda, M., Clement, K., Vaisse, C., Karsenty, G.: Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART; *Nature* 434 (2005) 514-520
34. Elmquist, J.K., Bjorbaek, C., Ahima, R.S., Flier, J.S., Saper, C.B.: Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain; *J.Comp Neurol.* 395 (1998) 535-547
35. Erben, R.G.: Embedding of bone samples in methylmethacrylate: an improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry; *J.Histochem.Cytochem.* 45 (1997) 307-313
36. Erlebacher, A., Filvaroff, E.H., Ye, J.Q., Derynck, R.: Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling; *Mol.Biol.Cell* 9 (1998) 1903-1918
37. Fei, H., Okano, H.J., Li, C., Lee, G.H., Zhao, C., Darnell, R., Friedman, J.M.: Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 (1997) 7001-7005
38. Felson, D.T., Zhang, Y., Hannan, M.T., Anderson, J.J.: Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study; *J.Bone Miner.Res.* 8 (1993) 567-573
39. Filvaroff, E., Erlebacher, A., Ye, J., Gitelman, S.E., Lotz, J., Heilman, M., Derynck, R.: Inhibition of TGF-beta receptor signaling in osteoblasts leads to decreased

- bone remodeling and increased trabecular bone mass; *Development* 126 (1999) 4267-4279
40. Foldes, J., Shih, M.S., Levy, J.: Bone structure and calcium metabolism in obese Zucker rats; *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 16 (1992) 95-102
41. Fried, S.K., Bunkin, D.A., Greenberg, A.S.: Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid; *J.Clin.Endocrinol.Metab* 83 (1998) 847-850
42. Friedman, J.M.: The function of leptin in nutrition, weight, and physiology; *Nutr.Rev.* 60 (2002) S1-14
43. Gabay, C., Dreyer, M., Pellegrinelli, N., Chicheportiche, R., Meier, C.A.: Leptin directly induces the secretion of interleukin 1 receptor antagonist in human monocytes; *J.Clin.Endocrinol.Metab* 86 (2001) 783-791
44. Gainsford, T., Willson, T.A., Metcalf, D., Handman, E., McFarlane, C., Ng, A., Nicola, N.A., Alexander, W.S., Hilton, D.J.: Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93 (1996) 14564-14568
45. Geiser, A.G., Zeng, Q.Q., Sato, M., Helvering, L.M., Hirano, T., Turner, C.H.: Decreased bone mass and bone elasticity in mice lacking the transforming growth factor-beta1 gene; *Bone* 23 (1998) 87-93
46. Giraud-Guille, M.M.: Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons; *Calcif.Tissue Int.* 42 (1988) 167-180
47. Giraud-Guille, M.M., Besseau, L., Martin, R.: Liquid crystalline assemblies of collagen in bone and in vitro systems; *Journal of Biomechanics* 36 (2003) 1571-1579
48. Goulding, A., Taylor, R.W.: Plasma leptin values in relation to bone mass and density and to dynamic biochemical markers of bone resorption and formation in postmenopausal women; *Calcif.Tissue Int.* 63 (1998) 456-458

49. Hakansson, M.L., Brown, H., Ghilardi, N., Skoda, R.C., Meister, B.: Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus; *J.Neuroscience* 18 (1998) 559-572
50. Hamilton, B.S., Paglia, D., Kwan, A.Y., Deitel, M.: Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans; *Nat.Med.* 1 (1995) 953-956
51. Hamrick, M.W.: Leptin, bone mass, and the thrifty phenotype; *J.Bone Miner.Res.* 19 (2004) 1607-1611
52. Hamrick, M.W., Ding, K.H., Pennington, C., Chao, Y.J., Wu, Y.D., Howard, B., Immel, D., Borlongan, C., McNeil, P.L., Bollag, W.B., Curl, W.W., Yu, J., Isales, C.M.: Age-related loss of muscle mass and bone strength in mice is associated with a decline in physical activity and serum leptin; *Bone* 39 (2006) 845-853
53. Hamrick, M.W., Pennington, C., Newton, D., Xie, D., Isales, C.: Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bones of the limb and spine; *Bone* 34 (2004) 376-383
54. Heino, T.J., Hentunen, T.A., Vaananen, H.K.: Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen; *J.Cell Biochem.* 85 (2002) 185-197
55. Hirsekorn, S., Pangraz, S., Weides, G., Arnold, W.: Measurement of elastic impedance with high spatial resolution using acoustic microscopy; *Applied Physics Letters* 67 (95 A.D.) 745-747
56. Hirsekorn, S., Pangraz, S., Weides, G., Arnold, W.: Erratum: Measurements of elastic impedance with high spatial resolution using acoustic microscopy; *Applied Physics Letters* 69 (1996) 2138-2139
57. Hofmann, T., Raum, K., Leguerney, I., Saied, A., Peyrin, F., Vico, L., Laugier, P.: Assessment of bone structure and acoustic impedance in C3H and BL6 mice

- using high resolution scanning acoustic microscopy; *Ultrasonics* 44 Suppl 1 (2006) 1307-1311
58. Hofmann, T., Heyroth, F., Meinhard, H., Franzel, W., Raum, K.: Assessment of composition and anisotropic elastic properties of secondary osteon lamellae; *Journal of Biomechanics* 39 (2006) 2282-2294
59. Holloway, W.R., Collier, F.M., Aitken, C.J., Myers, D.E., Hodge, J.M., Malakellis, M., Gough, T.J., Collier, G.R., Nicholson, G.C.: Leptin inhibits osteoclast generation; *J.Bone Miner.Res.* 17 (2002) 200-209
60. Hustmyer, F.G., Peacock, M., Hui, S., Johnston, C.C., Christian, J.: Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor gene locus; *J.Clin.Invest* 94 (1994) 2130-2134
61. Ingalls, A.M., Dickie, M.M., Snell, G.D.: Obese, a new mutation in the house mouse; *Obes.Res.* 4 (1996) 101
62. Judex, S., Garman, R., Squire, M., Donahue, L.R., Rubin, C.: Genetically based influences on the site-specific regulation of trabecular and cortical bone morphology; *Journal of Bone and Mineral Research* 19 (2004) 600-606
63. Karsenty, G.: Leptin controls bone formation through a hypothalamic relay; *Recent Prog.Horm.Res.* 56 (2001) 401-415
64. Katagiri, T., Takahashi, N.: Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation; *Oral Dis.* 8 (2002) 147-159
65. Kelly, P.J., Nguyen, T., Hopper, J., Pocock, N., Sambrook, P., Eisman, J.: Changes in axial bone density with age: a twin study; *J.Bone Miner.Res.* 8 (1993) 11-17
66. Khosla, S., Atkinson, E.J., Riggs, B.L., Melton, L.J., III: Relationship between body composition and bone mass in women; *J.Bone Miner.Res.* 11 (1996) 857-863

67. Kim, T.J., Grill, W.: Determination of the velocity of ultrasound by short pulse switched sinusoidal excitation and phase-sensitive detection by a computer-controlled pulse-echo system; *Ultrasonics* 36 (1998) 233-238
68. Klein, S., Coppack, S.W., Mohamed-Ali, V., Landt, M.: Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans; *Diabetes* 45 (1996) 984-987
69. Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., Kishimoto, T.: Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts; *Cell* 89 (1997) 755-764
70. Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., Larsen, P.J., Hastrup, S.: Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin; *Nature* 393 (1998) 72-76
71. Lakshmanan, S., Bodi, A., Raum, K.: Assessment of anisotropic tissue elasticity of cortical bone from high-resolution, angular acoustic measurements; *IEEE Trans.Ultrason.Ferroelectr.Freq.Control* 54 (2007) 1560-1570
72. Lemons, R.A., Quate, C.F.: Acoustic microscopy: biomedical applications; *Science* 188 (1975) 905-911
73. Levin, R.M.: Osteoporosis: prevention is key to management; *Geriatrics* 48 Suppl 1 (1993) 18-24
74. Lord, G.M., Matarese, G., Howard, J.K., Baker, R.J., Bloom, S.R., Lechler, R.I.: Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression; *Nature* 394 (1998) 897-901
75. Lorentzon, R., Alehagen, U., Boquist, L.: Osteopenia in mice with genetic diabetes; *Diabetes Res.Clin.Pract.* 2 (1986) 157-163

76. Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S. : Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects; *Nat.Med.* 1 (1995) 1155-1161
77. Mantzoros, C.S., Flier, J.S., Rogol, A.D.: A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty; *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82 (1997) 1066-1070
78. Marr, J., Raum, K., Ruschke, K.: Assessment of bone structure and elasticity under the influence of leptin deficiency in C57Bl/6 mice using high resolution scanning acoustic microscopy; *Proceedings of the International Congress on Ultrasonics, Wien* (2007)
79. Martini, G., Valenti, R., Giovani, S., Franci, B., Campagna, S., Nuti, R.: Influence of insulin-like growth factor-1 and leptin on bone mass in healthy postmenopausal women; *Bone* 28 (2001) 113-117
80. Mathey, J., Horcajada-Molteni, M.N., Chanteranne, B., Picherit, C., Puel, C., Lebecque, P., Cubizoles, C., Davicco, M.J., Coxam, V., Barlet, J.P.: Bone mass in obese diabetic Zucker rats: influence of treadmill running; *Calcif.Tissue Int.* 70 (2002) 305-311
81. Matkovic, V., Ilich, J.Z., Skugor, M., Badenhop, N.E., Goel, P., Clairmont, A., Klisovic, D., Nahhas, R.W., Landoll, J.D.: Leptin is inversely related to age at menarche in human females; *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82 (1997) 3239-3245
82. Matkovic, V., Ilich, J.Z., Skugor, M., Badenhop, N.E., Goel, P., Clairmont, A., Klisovic, D., Nahhas, R.W., Landoll, J.D.: Leptin is inversely related to age at menarche in human females; *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82 (1997) 3239-3245
83. Maurin, A.C., Chavassieux, P.M., Frappart, L., Delmas, P.D., Serre, C.M., Meunier, P.J.: Influence of mature adipocytes on osteoblast proliferation in human primary cocultures; *Bone* 26 (2000) 485-489

84. Mazess, R.B., Barden, H.S., Ettinger, M., Johnston, C., Dawson-Hughes, B., Baran, D., Powell, M., Notelovitz, M.: Spine and femur density using dual-photon absorptiometry in US white women; *Bone Miner.* 2 (1987) 211-219
85. Mercer, J.G., Hoggard, N., Williams, L.M., Lawrence, C.B., Hannah, L.T., Trayhurn, P.: Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization; *FEBS Lett.* 387 (1996) 113-116
86. Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., Cheetham, C.H., Earley, A.R., Barnett, A.H., Prins, J.B., O'Rahilly, S.: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans; *Nature* 387 (1997) 903-908
87. Moore, K. L. and Persaud, T. V. N.: *Embryologie*. 4. Aufl. Schattauer, Stuttgart, 1996
88. Nijweide, P.J., Burger, E.H., Klein-Nulend, J.: The Osteocyte. In: *Principles of Bone Biology*. Academic Press, New York 2002, S. 93-107
89. Odabasi, E., Ozata, M., Turan, M., Bingol, N., Yonem, A., Cakir, B., Kutlu, M., Ozdemir, I.C.: Plasma leptin concentrations in postmenopausal women with osteoporosis; *Eur.J.Endocrinol.* 142 (2000) 170-173
90. Oreffo, R.O., Mundy, G.R., Seyedin, S.M., Bonewald, L.F.: Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 158 (1989) 817-823
91. Otto, F., Thornell, A.P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K.C., Rosewell, I.R., Stamp, G.W., Beddington, R.S., Mundlos, S., Olsen, B.R., Selby, P.B., Owen, M.J.: *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development; *Cell* 89 (1997) 765-771
92. Owen, J.: Nobel in Medicine Awarded to Three for "Knockout" Mice; *National Geographic News* (2007)

93. Pasco, J.A., Henry, M.J., Kotowicz, M.A., Collier, G.R., Ball, M.J., Ugoni, A.M., Nicholson, G.C.: Serum leptin levels are associated with bone mass in nonobese women; *J.Clin.Endocrinol.Metab* 86 (2001) 1884-1887
94. Pfeilschifter, J., Mundy, G.R.: Modulation of type beta transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84 (1987) 2024-2028
95. Pocock, N.A., Eisman, J.A., Hopper, J.L., Yeates, M.G., Sambrook, P.N., Eberl, S.: Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study; *J.Clin.Invest* 80 (1987) 706-710
96. Rakover, Y., Lu, P., Briody, J.N., Tao, C., Weiner, E., Ederveen, A.G., Cowell, C.T., Ben Shlomo, I.: Effects of delaying puberty on bone mineralization in female rats; *Hum.Reprod.* 15 (2000) 1457-1461
97. Rauch, F., Blum, W.F., Klein, K., Allolio, B., Schonau, E.: Does leptin have an effect on bone in adult women?; *Calcif.Tissue Int.* 63 (1998) 453-455
98. Raum, K.: Microelastic imaging of bone; *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 55 (2008) 1417-1431
99. Raum, K., Brandt, J., Klemenz, A., Cobet, U.: Quantitative Ultraschallrastermikroskopie zur Bestimmung der akustischen Impedanz von kortikalem Knochengewebe; *Z.Med.Phys.* 9 (1999) 246-253
100. Raum, K., Cleveland, R.O., Peyrin, F., Laugier, P.: Derivation of elastic stiffness from site-matched mineral density and acoustic impedance maps; *Phys.Med.Biol.* 51 (2006) 747-758
101. Raum, K., Hofmann, T., Leguerney, I., Saied, A., Peyrin, F., Vico, L., Laugier, P.: Variations of microstructure, mineral density and tissue elasticity in B6/C3H mice; *Bone* 41 (2007) 1017-1024

102. Raum, K., Leguerney, I., Chandelier, F., Bossy, E., Talmant, M., Saied, A., Peyrin, F., Laugier, P.: Bone microstructure and elastic tissue properties are reflected in QUS axial transmission measurements; *Ultrasound Med.Biol.* 31 (2005) 1225-1235
103. Raum, K., Leguerney, I., Chandelier, F., Talmant, M., Saied, A., Peyrin, F., Laugier, P.: Site-matched assessment of structural and tissue properties of cortical bone using scanning acoustic microscopy and synchrotron radiation  $\mu$ CT; *Phys.Med.Biol.* 51 (2006) 733-746
104. Raum, K., Leguerney, I., Chandelier, F., Talmant, M., Saied, A., Peyrin, F., Laugier, P.: Site-matched assessment of structural and tissue properties of cortical bone using scanning acoustic microscopy and synchrotron radiation  $\mu$ CT; *Phys.Med.Biol.* 51 (2006) 733-746
105. Raum, K., Reissbauer, J., Brandt, J.: Frequency and resolution dependence of the anisotropic impedance estimation in cortical bone using time-resolved scanning acoustic microscopy; *J Biomed.Mater.Res.* 71A (2004) 430-438
106. Ravn, P., Cizza, G., Bjarnason, N.H., Thompson, D., Daley, M., Wasnich, R.D., McClung, M., Hosking, D., Yates, A.J., Christiansen, C.: Low body mass index is an important risk factor for low bone mass and increased bone loss in early postmenopausal women. Early Postmenopausal Intervention Cohort (EPIC) study group; *J.Bone Miner.Res.* 14 (1999) 1622-1627
107. Reid, I.R.: Leptin deficiency--lessons in regional differences in the regulation of bone mass; *Bone* 34 (2004) 369-371
108. Reseland, J.E., Gordeladze, J.O.: Role of leptin in bone growth: central player or peripheral supporter? *FEBS Lett.* 528 (2002) 40-42
109. Reseland, J.E., Syversen, U., Bakke, I., Qvigstad, G., Eide, L.G., Hjertner, O., Gordeladze, J.O., Drevon, C.A.: Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization; *J.Bone Miner.Res.* 16 (2001) 1426-1433

110. Rosenthal, D.I., Mayo-Smith, W., Hayes, C.W., Khurana, J.S., Biller, B.M., Neer, R.M., Klibanski, A.: Age and bone mass in premenopausal women; *J.Bone Miner.Res.* 4 (1989) 533-538
111. Ruhl, C.E., Everhart, J.E.: Relationship of serum leptin concentration with bone mineral density in the United States population; *J.Bone Miner.Res.* 17 (2002) 1896-1903
112. Schenk, R.K.: Bone Regeneration: Biologic Basis. In: Buser, D., Dahlin, C., Schenk, R.K. (Hrsg): *Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry*. Quintessence Publishing Co., Chicago 1994, S. 49-100
113. Schilling, A.F., Holzmann, T., Rueger, J.M., Karsenty, G., Amling, M.: Leptin regulates bone mass in rats; *Bone* 28 (2001)
114. Schwartz, M.W.: Neuronal pathways regulating food intake and body adiposity; *Ann.Endocrinol.* 63 (2002) 117-120
115. Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Campfield, L.A., Burn, P., Baskin, D.G.: Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus; *J.Clin.Invest* 98 (1996) 1101-1106
116. Seeman, E., Tsalamandris, C., Formica, C.: Peak bone mass, a growing problem?; *Int.J.Fertil.Menopausal Stud.* 38 Suppl 2 (1993) 77-82
117. Sierra-Honigmann, M.R., Nath, A.K., Murakami, C., Garcia-Cardena, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C., Madge, L.A., Schechner, J.S., Schwabb, M.B., Polverini, P.J., Flores-Riveros, J.R.: Biological action of leptin as an angiogenic factor; *Science* 281 (1998) 1683-1686
118. Slemenda, C.W., Christian, J.C., Williams, C.J., Norton, J.A., Johnston, C.C., Jr.: Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates; *J.Bone Miner.Res.* 6 (1991) 561-567

119. Slemenda, C.W., Reister, T.K., Hui, S.L., Miller, J.Z., Christian, J.C., Johnston, C.C., Jr.: Influences on skeletal mineralization in children and adolescents: evidence for varying effects of sexual maturation and physical activity; *J.Pediatr.* 125 (1994) 201-207
120. Smith, D.M., Nance, W.E., Kang, K.W., Christian, J.C., Johnston, C.C., Jr.: Genetic factors in determining bone mass; *J.Clin.Invest* 52 (1973) 2800-2808
121. Somerville, J.M., Aspden, R.M., Armour, K.E., Armour, K.J., Reid, D.M.: Growth of C57BL/6 mice and the material and mechanical properties of cortical bone from the tibia; *Calcif.Tissue Int.* 74 (2004) 469-475
122. Spiegelman, B.M., Flier, J.S.: Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture; *Cell* 87 (1996) 377-389
123. Spiegelman, B.M., Flier, J.S.: Obesity and the regulation of energy balance; *Cell* 104 (2001) 531-543
124. Steppan, C.M., Crawford, D.T., Chidsey-Frink, K.L., Ke, H., Swick, A.G.: Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice; *Regul.Pept.* 92 (2000) 73-78
125. Takeda, S., Eleftheriou, F., Levasseur, R., Liu, X., Zhao, L., Parker, K.L., Armstrong, D., Ducy, P., Karsenty, G.: Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system; *Cell* 111 (2002) 305-317
126. Takeshita, T., Yamagata, Z., Iijima, S., Nakamura, T., Ouchi, Y., Orimo, H., Asaka, A.: Genetic and environmental factors of bone mineral density indicated in Japanese twins; *Gerontology* 38 Suppl 1 (1992) 43-49
127. Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K.J., Smutko, J.S., Mays, G.G., Wool, E.A., Monroe, C.A., Tepper, R.I.: Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R; *Cell* 83 (1995) 1263-1271

128. Thomas, T., Burguera, B.: Is leptin the link between fat and bone mass? *J.Bone Miner.Res.* 17 (2002) 1563-1569
129. Thomas, T., Burguera, B., Melton, L.J., III, Atkinson, E.J., O'Fallon, W.M., Riggs, B.L., Khosla, S.: Role of serum leptin, insulin, and estrogen levels as potential mediators of the relationship between fat mass and bone mineral density in men versus women; *Bone* 29 (2001) 114-120
130. Thomas, T., Gori, F., Khosla, S., Jensen, M.D., Burguera, B., Riggs, B.L.: Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes; *Endocrinology* 140 (1999) 1630-1638
131. Tremollieres, F.A., Pouilles, J.M., Ribot, C.: Vertebral postmenopausal bone loss is reduced in overweight women: a longitudinal study in 155 early postmenopausal women; *J.Clin.Endocrinol.Metab* 77 (1993) 683-686
132. Turner, C.H., Hsieh, Y.F., Muller, R., Bouxsein, M.L., Baylink, D.J., Rosen, C.J., Grynbas, M.D., Donahue, L.R., Beamer, W.G.: Genetic regulation of cortical and trabecular bone strength and microstructure in inbred strains of mice; *J.Bone Miner.Res.* 15 (2000) 1126-1131
133. Turner, C.H., Hsieh, Y.F., Muller, R., Bouxsein, M.L., Rosen, C.J., McCrann, M.E., Donahue, L.R., Beamer, W.G.: Variation in bone biomechanical properties, microstructure, and density in BXH recombinant inbred mice; *J.Bone Miner.Res.* 16 (2001) 206-213
134. Ushiroyama, T., Ikeda, A., Hosotani, T., Higashiyama, T., Ueki, M.: Inverse correlation between serum leptin concentration and vertebral bone density in postmenopausal women; *Gynecol.Endocrinol.* 17 (2003) 31-36
135. Vashishth, D., Gibson, G., Kimura, J., Schaffler, M.B., Fyhrie, D.P.: Determination of bone volume by osteocyte population; *Anat.Rec.* 267 (2002) 292-295
136. Whipple, T., Sharkey, N., Demers, L., Williams, N.: Leptin and the skeleton; *Clin.Endocrinol.* 57 (2002) 701-711

137. Winters, K.M., Snow, C.M.: Body composition predicts bone mineral density and balance in premenopausal women; *J.Womens Health Gend.Based.Med.* 9 (2000) 865-872
138. Wolf, E., Roser, K., Hahn, M., Welkerling, H., Delling, G.: Enzyme and immunohistochemistry on undecalcified bone and bone marrow biopsies after embedding in plastic: a new embedding method for routine application; *Virchows Arch.A Pathol.Anat.Histopathol.* 420 (1992) 17-24
139. Yamauchi, M., Sugimoto, T., Yamaguchi, T., Nakaoka, D., Kanzawa, M., Yano, S., Ozuru, R., Sugishita, T., Chihara, K.: Plasma leptin concentrations are associated with bone mineral density and the presence of vertebral fractures in postmenopausal women; *Clin.Endocrinol.* 55 (2001) 341-347
140. Yang, W., Lu, Y., Kalajzic, I., Guo, D., Harris, M.A., Gluhak-Heinrich, J., Kotha, S., Bonewald, L.F., Feng, J.Q., Rowe, D.W., Turner, C.H., Robling, A.G., Harris, S.E.: Dentin matrix protein 1 gene cis-regulation: use in osteocytes to characterize local responses to mechanical loading in vitro and in vivo; *J.Biol.Chem.* 280 (2005) 20680-20690
141. Young, D., Hopper, J.L., Macinnis, R.J., Nowson, C.A., Hoang, N.H., Wark, J.D.: Changes in body composition as determinants of longitudinal changes in bone mineral measures in 8 to 26-year-old female twins; *Osteoporos.Int.* 12 (2001) 506-515
142. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M.: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue; *Nature* 372 (1994) 425-432
143. Zoico, E., Zamboni, M., Adami, S., Vettor, R., Mazzali, G., Tosoni, P., Bissoli, L., Bosello, O.: Relationship between leptin levels and bone mineral density in the elderly; *Clin.Endocrinol.* 59 (2003) 97-103
144. Zucker, L.M., Antoniades, H.N.: Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty"; *Endocrinology* 90 (1972) 1320-1330

## 11 THESEN

1. In den letzten Jahren haben genetisch veränderte Mausmodelle ein immer größeres Potential entwickelt in bislang unerforschte Bereiche vorzudringen und neue Ideen in Bezug auf die Therapie regenerativer Erkrankungen zu entwickeln. Aus dieser Bandbreite an Modellen hat das obese-Gen mit seinem Produkt Leptin viel Aufmerksamkeit und Interesse auf sich gezogen. Dessen Einfluss auf Knochenentwicklung, Knochenphänotyp und Knochenremodelling ist allerdings umstritten. Dies verlangt nach neuen und hochauflösenden Techniken, um sensibel und quantitativ den Einfluss der Leptindefizienz auf den Knochenphänotyp zu analysieren.
2. Mit hochfrequentem Ultraschall können morphologische und elastische Gewebeeigenschaften mit hoher örtlicher Auflösung bis in den Mikrometerbereich zerstörungsfrei dargestellt und quantitativ ermittelt werden. Die akustische Mikroskopie gilt als geeignete Methode zur mikroelastischen Knochenphänotypisierung.
3. An mit dem C-Bild Verfahren mit einem 200 MHz-Wandler an Transversalschnitten untersuchten Proben zeigte der Knochendurchmesser unter dem Einfluss des Alters ( $p=0,004$ ;  $F=4,46$ ) und Geschlechts ( $p=0,0002$ ;  $F=15,4$ ), nicht aber unter dem Einfluss des Phänotyps, signifikante Veränderungen. Deutlich trat der Unterschied zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht, sowohl für die wildtyp als auch für die leptindefiziente Gruppe im Alter von 3 und 12 Monaten hervor. Im multiplen Vergleichstest ergab sich für das Geschlecht in Abhängigkeit vom Phänotyp ein signifikanter Unterschied ( $p=0,026$ ;  $F=5,05$ ).
4. An mit dem C-Bild Verfahren mit einem 200 MHz-Wandler an Transversalschnitten untersuchten Proben konnten bezüglich des Knochenmarkdurchmessers analog dem Knochendurchmesser signifikante Änderungen unter dem Einfluss von Alter ( $p=0,001$ ;  $F=5,61$ ) und Geschlecht ( $p=0,0001$ ;  $F=16,88$ ) gezeigt werden. Ebenso erwies sich das Geschlecht in Abhängigkeit vom Phänotyp als signifikanter Einflussparameter ( $p=0,0075$ ;  $F=7,52$ ). Der Phänotyp war keine signifikante Variable.

5. An mit dem C-Bild Verfahren mit einem 200 MHz-Wandler an Transversalschnitten untersuchten Proben konnte bezüglich der Kortikalisdicke eine leichte Abhängigkeit vom Alter mit signifikant größeren Werte in der 6-Monatsgruppe als in den 3- und 9-Monatsgruppen ( $p=0,01$ ,  $F=3,87$ ) gezeigt werden. Nach Kompensation des Alters waren schwache, aber signifikante Einflüsse von Phänotyp ( $p=0,001$ ,  $F=5,28$ ) und Geschlecht ( $p=0,0004$ ,  $F=6,33$ ) in der mehrfaktoriellen ANOVA zu beobachten.
6. Die Femurlänge war in der leptindefizienten Gruppe gegenüber der wildtyp Gruppe signifikant reduziert ( $p=0,02$ ;  $F=5,4$ ).
7. Die im C-Bild Verfahren mit einem 200 MHz-Wandler bestimmte Kortikalisimpedanz zeigte sich als signifikant abhängig von Alter ( $p=0$ ;  $F=16,4$ ), Geschlecht ( $p=0,04$ ;  $F=4,16$ ) und Phänotyp ( $p=0,0006$ ;  $F=12,3$ ) mit deutlich reduzierten Werten der ob/ob-Gruppe gegenüber der wt-Gruppe. Die Altersabhängigkeit wurde dabei signifikant vom Phänotyp beeinflusst ( $p=0,0002$ ;  $F=6,96$ ).
8. Innerhalb der wt-Gruppe hatte das Alter einen signifikanten Einfluss ( $p=0,001$ ;  $F=5,59$ ) auf die Werte der Kortikalisimpedanz. Die Werte der 9-Monatsgruppe waren signifikant höher als die der 3- und 6-Monatsgruppen.
9. In der ob/ob-Gruppe ergab sich eine signifikante Altersabhängigkeit für die Werte der Kortikalisimpedanz. Statistisch waren jedoch nur die Werte in der 3-Monatsgruppe gegenüber den anderen Gruppen erniedrigt
10. Das Durchschnittsgewicht der leptindefizienten C57/Bl6J Mäuse gegenüber den wildtyp C57/Bl6J Mäusen war etwa doppelt so hoch ( $p=0$ ;  $F=247$ ). Neben dem Phänotyp stellte das Alter eine signifikante Einflussvariable dar ( $p=0$ ;  $F=12,83$ ), sowie das Alter in Abhängigkeit von Geschlecht und Phänotyp ( $p=0,03$ ;  $F=3,05$ ).
11. Durch Untersuchungen mit Ultraschall können quantifizierbare morphologische und elastische Parameter abgeleitet werden. Unsere Daten geben Anhalt dafür, dass die volle elastische Reifung kortikalen Extremitätenknochens der C57Bl/6J Maus nicht vor einem Alter von 9 Monaten erreicht ist. Die Ergebnisse geben Anhalt dafür, dass die Knochenreifung unter dem Einfluss der Leptindefizienz reduziert ist und im späteren

Alter reduzierte Knochenneubildung und –resorption gegenüber einer periostnahen bis zentralen Knochenneubildung in der wt Maus zumindest im periostnahen Bereich schließlich zu höheren Knochenfestigkeiten führt.

12. Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Knochenphänotyp als sekundäre Folge des Gewichts per se in Einklang mit Erkenntnissen weiterer Autoren auszuschließen ist und Leptin das Potential hat, positive Effekte auf den Knochenstoffwechsel auszuüben

## **PUBLIKATIONEN VON ERGEBNISSEN DIESER ARBEIT**

Marr, J., Raum, K., Ruschke, K.: Assessment of bone structure and elasticity under the influence of leptin deficiency in C57/B16 mice using high resolution scanning acoustic microscopy, Proceedings of the International Congress on Ultrasonics, April 9-13, 2007, Wien, Österreich.

Assessment of bone structure and elasticity under the influence of leptin deficiency in C57/B16 mice using high resolution scanning acoustic microscopy in European Symposium on Ultrasonic Characterization of Bone. K. Raum, Ed. Aachen: Shaker Verlag, 2007, DOI:10.2370/353\_260.

## **DANKSAGUNG**

Ich danke meiner Familie, ohne deren Unterstützung und Zuversicht diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre, sowie meiner Lebensgefährtin für das Behalten starker Nerven während des Entstehungszeitraumes. Weiterhin möchte ich der Arbeitsgruppe Q-BAM und Frau Schneider für die fachliche und vor allem technische Hilfe danken. Vielen Dank auch an Frau Dr. Karen Ruschke für die gute und nette Zusammenarbeit. Allen voran gilt Dank meinem Betreuer Dr. Kay Raum für die Vermittlung des fachlichen Know-Hows im Vorfeld, seiner ständigen Hilfe, sowie der langjährigen Betreuung und Begleitung durch die Höhen und Tiefen der wissenschaftlichen Arbeit und natürlich für eine erfahrungsreiche, unvergesslich heitere Zeit. Dank gilt natürlich auch allen die hier vergessen wurden und sich jetzt benachteiligt fühlen.

---

## **SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, sowie die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich habe mich zuvor noch nicht um den Doktorgrad beworben.

Jörg Marr

Schwerin, 28.04.2010

---

## **ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE**

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Jörg Marr

Schwerin, 28.04.2010

## **LEBENS LAUF**

Name: Jörg Marr  
Geburtsdatum: 07.11.1979  
Geburtsort: Coburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: verheiratet

### **Schulbildung**

1986-1990 Grundschohle „Johannisthal“  
1990-2000 Kaspar-Zeuß Gymnasium Kronach mit Abschluss Abitur  
1996-1997 Gastschuljahr an der W.F. West High School Chehalis, USA

### **Zivildienst**

2000-2001 Frankenwaldklinik Kronach, Notaufnahme

### **Studium**

2001-2008 Humanmedizinstudium an der Martin-Luther Universität  
Halle-Wittenberg, Abschluss mit Staatsexamen  
10/2003 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
05/2008 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
05/2008 Approbation

### **Berufliche Tätigkeit**

Seit 06/2008 Arzt in Weiterbildung an der Carl-Friedrich-Flemming-Klinik  
der Helios Kliniken Schwerin GmbH