

Aus dem Department für biomedizinische Wissenschaften  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Biophysik  
(Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Dr.med. Reinhold Erben)

## **KOSTEN DER REPRODUKTION BEIM GOLDHAMSTER – BEZAHLEN DIE WEIBCHEN MIT IHREN KNOCHEN?**

Diplomarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades  
der Magistra Medicinae Veterinariae  
(Dipl.Tzt.)

an der Veterinärmedizinischen Universität  
Wien

vorgelegt von

Monika, Najsar

Wien, im März, 2020

Betreuerinnen:

Assoc.-Prof.<sup>in</sup> Mag<sup>a</sup> rer.nat. Dr<sup>in</sup> rer.nat. Priv.-Doz<sup>in</sup> Teresa G. Valencak

Ass.-Prof<sup>in</sup> Dr<sup>in</sup> rer.nat. Priv.-Doz<sup>in</sup> Olena Andrukhova †

Department für Biomedizinische Wissenschaften, Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Biophysik Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und experimentelle Endokrinologie Veterinärmedizinische Universität Wien

Begutachter: Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Sabine Schäfer-Somi Dipl.ECAR

Department für Biomedizinische Wissenschaften, Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Biophysik Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und experimentelle Endokrinologie Veterinärmedizinische Universität Wien

## DANKSAGUNG AN OLENA ANDRUKHOVA

Ich durfte Olena Andrukhova bereits einige Zeit vor Beginn meiner Diplomarbeit im Rahmen der an der veterinärmedizinischen Universität Wien laufenden Lehrveranstaltung „Wissenschaft in der Veterinärmedizin“ kennenlernen. Sie war die Betreuerin meiner Übungsgruppe. Ziel der Lehrveranstaltung war es, die Studierenden bestmöglich auf das zukünftige Schreiben der Diplomarbeit vorzubereiten und auch die Fertigkeiten zu vermitteln, erfolgreich die Literaturrecherche zu betreiben. Olena Andrukhova war stets eine der bemühtesten und motiviertesten Lehrkräfte in dieser Lehrveranstaltung und stellte uns immer wieder neue Aufgaben, die es galt, zu lösen. Doch nicht nur unser Einsatz war gefragt, nein, Olena hat auch zahlreiche Präsentationen und Vorträge für uns gehalten, in denen sie uns vielerlei Dinge erklärte. Innerhalb der Lehrveranstaltung herrschte durchwegs ein positives, angenehmes Klima. Als Olena im Zuge meiner diversen Präsentationen von Publikationen erfuhr, dass mein Hauptinteresse Nagetieren gilt, wandte sie sich bezüglich einer Diplomarbeit an mich und erzählte mir von Teresa Valencak und ihrer Forschung an Goldhamstern, was mich sehr interessierte, da ich selbst seit Jahren Nagetiere zu Hause habe und sehr an einer Diplomarbeit mit einem Thema über Nagetiere interessiert war. Nach diversen Gesprächen kam es relativ schnell zu einem gemeinsamen Treffen zwischen Olena Andrukhova, Teresa Valencak und mir und bald war mein Diplomarbeitsthema gefunden. Olena hatte immer ein offenes Ohr für Fragen jeglicher Art und stand mir mit Rat und Tat zur Seite. Auch bei institutsinternen Veranstaltungen zögerte sie nicht, mich einzuladen und somit etwas in die Gemeinschaft zu integrieren. Ich fühlte mich in ihrer Betreuung sehr gut aufgehoben. Umso erschütternder war es für mich, als ich erfahren musste, dass sie nach kurzer, schwerer Krankheit verstorben ist. Ich möchte ihr hiermit nochmals meinen aufrichtigen Dank und meine Bewunderung für ihre Forschung aussprechen. Mit ihr ist ein wichtiger Teil verloren gegangen.

## DANKSAGUNG

Ich möchte mich für die engagierte Unterstützung beim Schreiben meiner Diplomarbeit herzlich bei meiner Diplomarbeitsbetreuerin Frau Assoc.-Prof.<sup>in</sup> Mag<sup>a</sup> rer.nat. Dr<sup>in</sup>rer.nat. Priv.-Doz<sup>in</sup> Teresa G. Valencak bedanken. Sie übernahm die Betreuung für meine Diplomarbeit, nachdem Olena Andrukhoiva den Kontakt für mich hergestellt hatte, da die Goldhamster, die ich untersucht habe, aus ihrer Kolonie stammten und sie auch die Tierversuchsleiterin war. Sie stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite und verhalf mir so zu einer erfolgreichen Diplomarbeit. Ebenso möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts bedanken, insbesondere bei Claudia Bergow und Alexandra Petric, die mich sehr beim praktischen Teil meiner Diplomarbeit und mit der Organisation der Termine unterstützten. Ein großer Dank gilt natürlich meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meines Studiums der Veterinärmedizin immer begleitet haben. Danke an meine Freundin Conny Walchshofer, MSc, die mir bei der Berechnung der Statistik sehr geholfen hat. Besonders bedanken möchte ich mich natürlich auch bei meinen Eltern, die mir durch ihre finanzielle Unterstützung dieses Studium erst ermöglicht haben. Danke Mama und Papa! Und generell möchte ich allen, die diesen Weg mit mir gemeinsam gegangen sind, sagen: Danke!

## INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG .....	7
	JUNGENAUFGUCHT UND KALZIUMHAUSHALT .....	7
	FIBROBLAST GROWTH FACTOR 23 (FGF 23) UND DER KNOCHEN.....	10
	KNOCHENHISTOLOGIE (KNOCHENZELLEN UND DEREN AUFGABEN) .....	12
	HYPOTHESEN .....	15
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	16
	A) TIERE UND HALTUNG .....	16
	B.) BLUTABNAHME UND UNTERSUCHUNG DES SERUMS MITTELS COBAS C111 ANALYZER	16
	C.) UNTERSUCHUNG DER HAMSTER <i>TIBIAE</i> MITTELS xCT RESEARCH M+ .....	17
	D.) EINBETTUNG DER HAMSTERKNOCHEN.....	17
	E.) TRIMMEN DER BLÖCKE ZUR VORBEREITUNG AUF DIE SCHNITTANFERTIGUNG.....	18
	F.) ANFERTIGEN DER SCHNITTE FÜR DIE HISTOLOGISCHE ARBEIT MITTELS ROTATIONSMIKROTOM .....	19
	G.) FÄRBUNG DER SCHNITTE MITTELS KOSSA MC NEAL FÄRBUNG .....	19
	H.) HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG DER GEFÄRBTEN SCHNITTE MITTELS OSTEOMEASURE™ - SOFTWARE .....	20
	I.) DATENEINGABE UND -ANALYSE.....	20
	J.) STATISTIK.....	20
	K.) ETHIK.....	21
3.	ERGEBNISSE.....	22
	A.) ERGEBNISSE MÄNNLICH VS. WEIBLICH.....	22
	a.1.) xCT Research M+-Daten proximale <i>Tibia</i> .....	22
	a.2.) xCT Research M+-Daten <i>Tibiaschaft</i> .....	28
	a.3.) Serumergebnisse COBAS C111 Analyzer männlich vs. weiblich.....	33
	a.4.) OsteoMeasure™ - Daten männlich vs. weiblich proximaler Bereich .....	38
	a.5.) OsteoMeasure™ - Daten männlich vs. weiblich distaler Bereich.....	42

B.)	ERGEBNISSE NACH WURFGRÖßEN .....	43
b.1.)	xCT Research M+-Daten proximale <i>Tibia</i> .....	43
b.2.)	xCT Research M+-Daten <i>Tibiaschaft</i> .....	43
b.3.)	Serumergebnisse COBAS C111 Analyzer nach Wurfgrößen .....	46
b.4.)	OsteoMeasure™ - Daten nach Wurfgrößen proximaler Bereich .....	46
b.5.)	OsteoMeasure™ - Daten nach Wurfgrößen distaler Bereich .....	46
4.	DISKUSSION .....	47
	Zusammenfassung .....	52
	Summary	53
	Literaturverzeichnis .....	53
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	59
	Anhang	63

## 1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

### JUNGENAUFZUCHT UND KALZIUMHAUSHALT

Im Rahmen meiner Diplomarbeit testeten wir, inwieweit die Goldhamsterweibchen im Zuge der Trächtigkeit und anschließenden Laktation Kalzium aus ihren eigenen Knochen mobilisieren, um damit die ausreichende Kalziumversorgung ihrer Jungen zu gewährleisten. Die Kalziumversorgung der Jungtiere ist deshalb so wichtig, weil sich ihr Skelett im Wachstum befindet und damit ein Skelett wachsen kann, benötigt es Kalzium. Wenn nicht genügend Kalzium über die Muttermilch an die Jungen weitergegeben wird, kann das dazu führen, dass das Skelett der Jungen instabil und brüchig wird und somit ist das Risiko für Frakturen und Fehlbildungen deutlich erhöht. Jungtiere haben generell einen höheren Bewegungsdrang und spielen auch gerne miteinander, es gibt also eine Vielzahl an Situationen, in welchen es zu Verletzungen im Sinne von Frakturen kommen kann, wenn die Knochen und Gelenke durch Kalziummangel zu dünn und infolgedessen instabil sind. In der Gruppe der *Euplacentalia* haben Goldhamster mit 16–17 Tagen die kürzeste Trächtigkeitsdauer und haben im Laufe ihres Lebens meist drei bis vier Würfe zu je drei bis 16 Tieren (Ohrnberger *et al.*, 2016). Diesbezüglich kann man sie durchaus mit den MF1-Labormäusen vergleichen, denn auch sie haben ähnlich große Würfe, ihre Jungen sind Nesthocker und während der Aufzucht der Jungtiere, die ungefähr drei Wochen dauert, werden große Milchmengen produziert. Allerdings, wie Ohrnberger *et al.* im Jahr 2016 zeigten, brauchen Goldhamsterweibchen mit großen Würfen dementsprechend auch große Energiemengen, um ihre Jungen mit ausreichend Muttermilch versorgen zu können (Ohrnberger *et al.*, 2016). Da die Weibchen zum Teil durch den hohen Energieverbrauch so sehr herausgefordert sind, liegt die Annahme nahe, dass von den Tieren – um den Kalziumbedarf zu decken – Kalzium aus ihren eigenen Knochen für die Versorgung ihrer Jungen herangezogen wird. Während der Trächtigkeit und auch in der postnatalen Phase unterstützen Ratten ihren Nachwuchs, indem sie vermehrt Kalzium aufnehmen und eigene Mineralien aus ihren Knochen mobilisieren (Brommage, 1989). Die Annahme liegt daher nahe, dass sich Goldhamster sich in ähnlicher Weise für ihre Jungen aufopfern, da auch sie zu den Nagetieren zählen. *Speakman* schrieb bereits 2008 über die Nutzung des Skeletts als Kalziumquelle im Sinne von Kosten der Reproduktion (Speakman, 2008). Wie *Prange et al.* 1979 herausfanden, ist die Knochenmasse von kleinen Säugetieren im Vergleich zu den

größeren Säugetieren relativ gering (Prange, Anderson and Rahn, 1979). Demzufolge haben kleine Säugetiere auch weniger Knochensubstanz zur Verfügung, die sie mobilisieren können (Hood, Oftedal and Kunz, 2006). Obwohl dem so ist, hat *Wysolmerski* herausgefunden, dass der Verlust an Knochenmineralien während der Reproduktion bei den kleinen Säugetieren höher ist, als bei den größeren Individuen (Wysolmerski, 2002). Es wurde bereits herausgefunden, dass eine verminderte Knochenmineraldichte mit verminderter Knochenstärke in Verbindung steht (Reilly and Burstein, 1975; Broe *et al.*, 2000; Bouxsein, 2005). Genau deshalb, weil Goldhamster einen derart hohen Kalziumbedarf für ihre Jungen haben, eignen sie sich hervorragend als Tiermodell, da bei ihnen die Wahrscheinlichkeit sehr hoch ist, aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Ich untersuchte daher den Knochenaufbau von Goldhamsterweibchen – sowohl von jenen, die bereits mehrere Würfe hatten, als auch von solchen, die lediglich einmal tragend waren. Außerdem ist es sinnvoll, durch die Untersuchung von männlichen Tieren herauszufinden, ob geschlechtsspezifische Unterschiede in der Struktur oder in der histologischen Zusammensetzung der Knochen bestehen. Um die nachfolgenden Hypothesen besser verstehen zu können, wird im nächsten Abschnitt genauer auf die Physiologie und Histologie des Knochens im Allgemeinen und auf den FGF 23 (Fibroblast Growth Factor 23) sowie dessen Funktionen und Auswirkungen auf den Knochen eingegangen.

Die Knochen des Skeletts bieten strukturelle Unterstützung für den Rest des Körpers, ermöglichen dem Körper Bewegung und Fortbewegung, indem sie als Hebel für die Muskeln fungieren, schützen lebenswichtige innere Organe, sind verantwortlich für die Mineralhomöostase und den Säure-Basen-Haushalt, dienen als Reservoir für Wachstumsfaktoren und Zytokine und stellen innerhalb der Markräume die Umgebung für die *Hämatopoese* (Blutbildung) dar (Clarke, 2008).

Bei beinahe allen Knochen kann man zwei Anteile unterscheiden. Einerseits das äußere *Stratum corticale*, welches auch als *Substantia compacta* bekannt ist, und das in etwa 80 % der gesamten Knochenmasse einnimmt, und andererseits das innere *Stratum spongiosum*, das ca. 20 % der Knochenmasse ausmacht (Clarke, 2008). Bezüglich der Knochenarten kann man Lamellenknochen und Geflechtknochen unterscheiden (Downey and Siegel, 2006). Histologisch sind Lamellenknochen sind dadurch gekennzeichnet, dass die Anordnung der Zellen sehr geordnet ist, und die Kollagenfasern dicht aneinander angeordnet sind (Downey and Siegel, 2006). Geflechtknochen hat ein eher verstreutes, unregelmäßiges



Aussehen und auch die Osteozyten scheinen in der Histologie im Geflechtknochen verstreuter als im lamellären Knochen (Downey and Siegel, 2006). Im adulten Säugetier wird – außer bei der Frakturheilung – ausschließlich Lamellenknochen gebildet (Downey and Siegel, 2006). Knochen besteht im Frischzustand zu etwa 90% aus Trockensubstanz. Diese wiederum besteht zu 65% aus Mineralien (Downey and Siegel, 2006).

## FIBROBLAST GROWTH FACTOR 23 (FGF 23) UND DER KNOCHEN

Bei FGF23 handelt es sich um ein Glykoprotein, das vorwiegend von den Osteoblasten, also den Vorstufen der Osteozyten (eigentliche Knochenzellen) und den Osteozyten an sich produziert wird (Erben, 2018a). Es ist in allen Vertebraten zu finden (Erben, 2017). FGF 23 ist Teil der endokrinen Fibroblasten-Wachstumsfaktoren, zu denen auch FGF 19 und FGF 21 zählen. Sämtliche FGFs gelangen über das Blut zu ihren Zielgeweben (Erben, 2017). Den endokrinen Fibroblasten-Wachstumsfaktoren ist gemein, dass sie Co-Rezeptoren benötigen, um besser an die für sie spezifischen FGF-Rezeptoren ihre Wirkung in den Zielzellen entfalten zu können (Kurosu *et al.*, 2006; Kuro-o and Moe, 2017). Bei diesen Co-Rezeptoren handelt es sich um  $\alpha$ - und  $\beta$ -Klotho-Rezeptoren (Erben, 2018a). Klotho ist ein „single-pass“ Transmembranprotein, das über einen kleinen intrazellulären und einen großen extrazellulären Bereich verfügt. Es wird vor allem im distalen und proximalen Tubulus (Hu *et al.*, 2010; Andrukhova *et al.*, 2012) der Niere ausgeschüttet (Erben, 2018b).  $\alpha$ -Klotho wird aber auch in den Nebenschilddrüsen (Shiraki-Iida *et al.*, 1998; Urakawa *et al.*, 2006), im Sinusknoten des Herzens (Takeshita *et al.*, 2004) und im Gehirn produziert (Li *et al.*, 2004). In anderen Studien wurde entdeckt, dass Mäuse, die eine Klotho-Defizienz aufwiesen, früher starben, sowie Kalzifizierungen im Weichteilgewebe, Organatrophie, Osteomalazie, Hyperkalzämie, Hyperphosphatämie und erhöhte Konzentrationen an Vitamin D3 aufwiesen (Lanske and Razzaque, 2007; Erben, 2018b). An Ratten wurde bereits gezeigt, dass sie eine Beeinträchtigung in der Knochenmineralisation aufwiesen, wenn man sie mit hohen Dosen an Vitamin D3 versorgte (WRONSKI *et al.*, 1986; Erben *et al.*, 1990). Wie herausgefunden wurde, ist die physiologische Hauptfunktion von Klotho, als Co-Rezeptor für FGF23 zu fungieren (Yuan *et al.*, 2014; Andrukhova *et al.*, 2017; Erben, 2018b). Eines der wichtigsten Organe, für die FGF23 eine Rolle spielt, ist die Niere. Hier arbeitet das Glykoprotein besonders am proximalen und distalen *Tubulus contortus* (Erben, 2018a). Im proximalen *Tubulus contortus* unterdrückt FGF23 die Wiederaufnahme von Phosphat (Erben and Andrukhova, 2017) sowie die Expression der  $1\alpha$ -Hydroxylase, der Vorstufe des biologisch aktiven Vitamin D3 (Erben, 2018a). Vitamin D spielt eine wichtige für die Knochenbiologie, Immunabwehr, Mineralhomöostase und man vermutet auch, dass es in die Pathophysiologie bei kardiovaskulären Erkrankungen eingebunden ist (Ford *et al.*, 2018). Im distalen *Tubulus contortus* steigert FGF23 die Reabsorption von Kalzium und Natrium (Erben, 2018a). FGF23 ist demnach nicht nur ein phosphaturisches Hormon, sondern auch ein Kalzium- und Natrium-erhaltendes Hormon (Andrukhova *et al.*, 2016). Erhöhte

Konzentrationen von FGF23 im Blut sind daher auch erste Zeichen für chronische Nierenerkrankungen oder chronic kidney disease (Andrukhova *et al.*, 2018). Die Wirkungen von FGF23 auf die Niere im proximalen und distalen *Tubulus* passieren übrigens unabhängig voneinander (Erben, 2017). Aber auch im Knochen ist FGF 23 aktiv. Es inhibiert die Mineralisation des Knochens, indem bestimmte Enzyme, in diesem Fall die TNAP (tissue non-specific alkaline phosphatase) herabreguliert wird, wodurch über einen weiteren Signalweg das Enzym ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 und 2) aktiviert wird (Andrukhova *et al.*, 2018). Die Zellen, in denen die Unterdrückung der Ausbildung der TNAP vorstättengeht, sind die Osteozyten und Osteoblasten (Andrukhova *et al.*, 2018). Wie genau diese Signalkaskade von statten geht, ist bis dato noch nicht genau erforscht. Klar ist aber, dass die TNAP für eine normale Knochenmineralisation unabdingbar ist (Erben, 2018a). Neueste Erkenntnisse zeigen, dass CKD in Verbindung mit der MBD (metabolic bone disease), einer metabolischen Erkrankung des Knochens, in Zusammenhang steht (Andrukhova *et al.*, 2018). Im Experiment zeigten betroffene Mäuse verminderte totale Knochendichten sowie verminderte Knochendichten im subkortikalen, kortikalen und trabekulären Bereich des *Tibiaschaftes* sowie im Bereich der *Tibiometaphyse* (Andrukhova *et al.*, 2018). Wenngleich gezeigt wurde, dass eine Klotho-Defizienz nicht unbedingt zur Entstehung einer linksventrikulären Hypertrophie beiträgt (Slavic *et al.*, 2017), wird vermutet, dass FGF23 an der Entstehung der linksventrikulären Hypertrophie des Herzens beteiligt ist (Erben, 2019), denn wie herausgefunden wurde, ist FGF23 durch seine natriumerhaltende Funktion auch an der Regulation des zirkulierenden Blutvolumens und des Blutdrucks beteiligt (Andrukhova *et al.*, 2014). Bei Patienten mit verminderter Nierenfunktion wurde herausgefunden, dass erhöhte FGF23-Konzentrationen stark mit der linksventrikulären Hypertrophie in Verbindung standen (Gutiérrez *et al.*, 2009; Ärnlöv *et al.*, 2013).

## Knochenhistologie (Knochenzellen und deren Aufgaben)

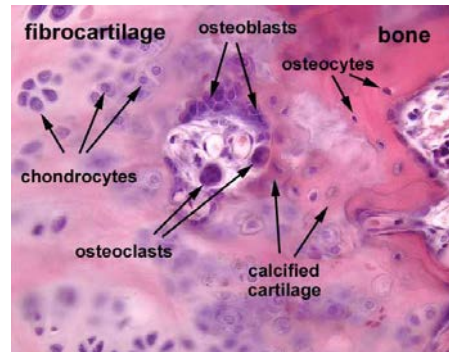
Man unterscheidet vier Zellarten, die im Knochen zu finden sind (Abb. 1):

Osteoblasten

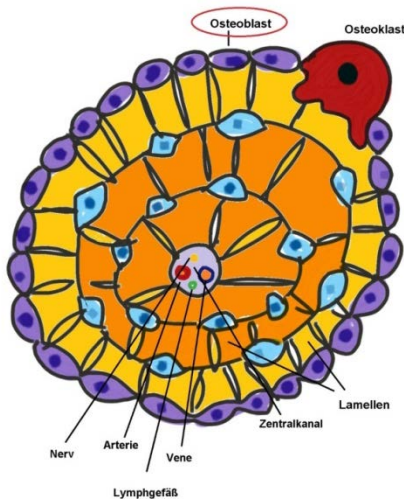
Osteozyten

Endostale Knochenbelegzellen

Osteoklasten



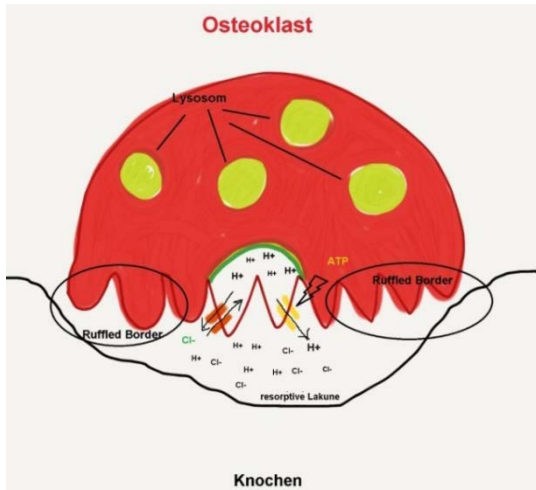
**Abb. 1 – Knochenhistologie,**  
unverändert übernommen aus  
<http://www.siumed.edu/~dking2/ssb/NM005b.htm>



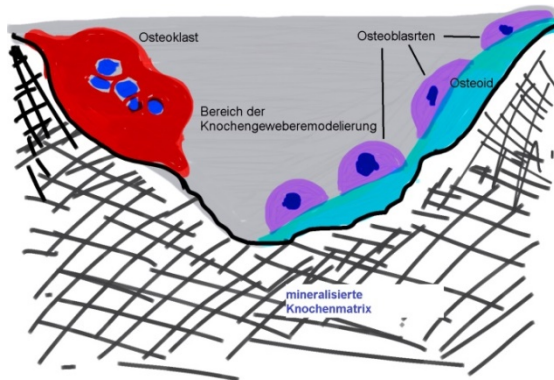
**Abb. 2: Osteoblast eines Knochens,**  
selbst gezeichnet, Najsar 2019

**Osteoblasten:** Osteoblasten gehen aus mesenchymalen Zellen hervor und präsentieren sich einkernig und asymmetrisch (Abb. 2) (Florencio-Silva *et al.*, 2015). Sie sind vorrangig für die Kollagensynthese, besonders für die Synthese des Kollagens vom Typ 1 verantwortlich (Florencio-Silva *et al.*, 2015). Kollagen 1 ist besonders wichtig, um mechanische Stabilität – unter anderem auch im Knochengewebe – zu gewährleisten (Florencio-Silva *et al.*, 2015).

Osteozyten inkl. endostale Knochenbelegzellen: Osteozyten gehen aus der Differenzierung von Osteoblasten hervor. Sie befinden sich in Lakunen, welche von mineralisierter Knochensubstanz umgeben sind (Florencio-Silva *et al.*, 2015). Die Osteozyten verfügen über ein dendritenartiges Netzwerk zur Kommunikation mit den Osteoblasten und den endostalen Knochenbelegzellen (Florencio-Silva *et al.*, 2015). Bei den endostalen Knochenbelegzellen handelt es sich um Osteoblasten, die jene Knochenoberfläche bedecken, an der sich weder Resorption des Knochens noch Neubildung des Knochens ereignet (Florencio-Silva *et al.*, 2015). In ihrer Form sind sie flach und endothelartig. Daraus erschließt sich, dass Osteozyten und endostale Knochenbelegzellen ein funktionelles Zusammenspiel aufweisen, das auch als funktionelles Synzytium bezeichnet wird (Manolagas, 2000). Dieses Synzytium ist der Grund, warum Osteozyten durch ihre umfangreiche Kommunikation als mechanosensorische Zellen fungieren, indem sie es bemerken, wenn neue Knochensubstanz aufgebaut werden muss bzw. wenn – während der Adaptation des Skeletts – Mikroschäden repariert werden müssen. Die mechanosensorischen Osteozyten leiten dann die entsprechenden Signale weiter (Manolagas, 2000). Dieser Komplex ist unter anderem äußerst wichtig für die Kalziumhomöostase, weil er die Anpassung des Kalziumhaushaltes an die äußeren Einflüsse bewerkstelligt. Der genaue Prozess ist jedoch nach wie vor noch nicht vollständig geklärt (Manolagas, 2000). Eindrucksvoll zeigt sich der Einfluss auf die Kalziumhomöostase insofern, als dass die Menge an bidirektionalem Kalziumfluss über ruhende Knochenoberflächen, die mit endostalen Belegzellen überzogen sind, im ausgewachsenen Skelett das ca. 10–20-fache beträgt, der durch die Remodeling-Aktivität entsteht (von Engelhardt and Breves, 2005).



**Abb. 3 – Osteoklast eines Knochens, selbst gezeichnet, Najsar 2019**



**Abb. 4 – Knochengewebemodellierung selbst gezeichnet, Najsar 2019**

Osteoklasten:

Osteoklasten sind die vollständig differenzierten Knochenzellen und verfügen über mehrere Kerne (Abb. 3). Reife Osteoklasten sind für gewöhnlich groß (ca. 50–100 µm Durchmesser) und beinhalten Mitochondrien, freie Ribosomen und eine Vielzahl an Lysosomen (Manolagas, 2000). Charakteristisch für aktive Osteoklasten

- falls im Elektronenmikroskop betrachtet - ist die sogenannte „ruffled border“ (Abb. 4). Diese beschreibt eine fingerförmige Struktur des Osteoklastenzytoplasmas, deren Funktion es ist, die Resorption der kalzifizierten Knochenmatrix zu steuern (Manolagas, 2000). Osteoklasten gehen aus hämatopoetischen Zellen

Hervor (Florencio-Silva *et al.*, 2015).

Osteoklasten sind dafür zuständig, Knochensubstanz abzubauen. Dies bewerkstelligen sie in einem Prozess aus zwei Schritten und wird durch die Aktivität einer ATP-gesteuerten Protonenpumpe initiiert (Manolagas, 2000). Im ersten Schritt werden in der Resorptionslakune vermehrt Wasserstoff-Ionen produziert, was zu einer Senkung des pH-Wertes führt, also ein saures Milieu hervorruft, wodurch sich das Mineral auflöst (Florencio-Silva *et al.*, 2015). Im nächsten Schritt werden diverse Enzyme aktiv (Cathepsin K, MMP9, TRACP und

andere), die die organischen Teile des Knochens abbauen (Florencio-Silva *et al.*, 2015). Dass Osteoklasten für den Abbau der Knochensubstanz zuständig sind, ist eine wichtige Grundlage für meine Diplomarbeit. Denn meine Hypothese war, wenn Osteoklasten vermehrt in den Knochen der Goldhamsterweibchen, die häufig tragend gewesen sind, auftreten, dass

andere), die die organischen Teile des Knochens abbauen (Florencio-Silva *et al.*, 2015). Dass Osteoklasten für den Abbau der Knochensubstanz zuständig sind, ist eine wichtige Grundlage für meine Diplomarbeit. Denn meine Hypothese war, wenn Osteoklasten vermehrt in den Knochen der Goldhamsterweibchen, die häufig tragend gewesen sind, auftreten, dass

im Zuge ihrer Laktation Knochensubstanz mobilisiert wurde. Es könnte durchaus sein, dass in Zeiten der Laktation die oben genannten Enzyme vermehrt aktiv sind, damit die Osteoklasten intensiver arbeiten können, um den Kalziumgehalt in der Muttermilch ausreichend hoch für die Jungen zu halten. Dies würde dann natürlich unweigerlich mit einem Verlust an Knochensubstanz beim Muttertier vonstattengehen.

## HYPOTHESEN

Ich erwartete mir zu Beginn der Diplomarbeit, dass die männlichen Goldhamster generell eine höhere Kalziumdichte im Knochen aufweisen würden, als die weiblichen Tiere, da ich die Annahme hatte, dass die weiblichen Tiere vermehrt Kalzium aus ihren eigenen Knochen für ihre Jungen zur Verfügung stellen (siehe oben). Demnach erwartete ich mir auch eine geringere Knochendichte und –dicke bei den weiblichen Tieren und dies indirekt proportional zur Anzahl an Trächtigkeiten/Anzahl der Jungtiere (= je öfter und mit je mehr Jungtieren trächtig, desto geringer die Knochendichte/-dicke und desto geringer ist der Kalziumgehalt in den Knochen der Weibchen). In Bezug auf die histologische Auswertung waren für mich besonders die Osteoklasten und die Osteoblasten interessant, da die Osteoklasten Aufschluss darüber geben, wie viel Knochenabbau stattfindet und die Osteoblasten Hinweise dazu liefern, inwieweit neue Knochenzellen gebildet werden. Ich erwartete mir generell bei weiblichen Tieren eine höhere Zahl an Osteoklasten, da ich davon ausgegangen bin, dass sie durch ihre Laktation an Knochensubstanz eingebüßt haben. Ich erwartete aber auch, mehr Osteoblasten bei Tieren mit mehreren Trächtigkeiten zu finden, als bei jenen, die nicht trächtig waren sowie bei männlichen Tieren. Denn ich nahm an, dass bei Einsatz eigener Knochensubstanz auch mehr nachproduziert werden müsste. Daher wurde sich im Speziellen auf diese beiden Parameter fokussiert, um daraus mittels OsteoMeasure™ die Werte zu berechnen. Ebenfalls von Interesse waren für mich die FGF23-Werte hinsichtlich Geschlecht und Wurfgrößen sowie die Serumwerte, die durch FGF23 beeinflusst werden (Kalzium, Natrium, Phosphor, Kreatinin, Harnstoff).

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **a) TIERE UND HALTUNG**

Für diesen Tierversuch wurden gesamt neun Goldhamster verwendet. Sechs Tiere waren weiblich und drei Tiere waren männlich. Die Goldhamster entstammten alle der in der AG Stoffwechselphysiologie gezüchteten Kolonie, deren Gründerpopulation 2014 von Charles River Deutschland angeschafft wurde. Die Kolonie war frei von spezifischen Pathogenen und wurde regelmäßig auf ihren Hygienestatus überprüft. Männchen und Weibchen wurden, sobald sie adult waren, allein in Käfigen des Typs Eurostandard IV (Techniplast, Italien) auf Einstreu aus Espenholz (Abedd, Wien) und mit Enrichmentmaterialien in Form von Holzhäusern, Zellstoff und PVC Röhren einzeln gehalten. Sämtliche Details zu Haltung und Zucht finden sich in Ohrnberger (2014), Brinkmann (2017) sowie in Ohrnberger et al., (2016) und Ohrnberger et al. (2018). Die Goldhamster waren Langtag- Lichtbedingungen von L:D 16:8 ausgesetzt, wobei das Licht um 22 Uhr aus- und um 6 Uhr morgens mittels Zeitschaltuhr angeschaltet wurde. Allen Goldhamstern stand uneingeschränkt Hamsterfutter (Sniff, Soest, Deutschland) zur Verfügung. Ebenso stand ihnen Trinkwasser uneingeschränkt zur Verfügung, wobei die Trinkflaschen einmal wöchentlich gewechselt wurden.

### **b.) BLUTABNAHME UND UNTERSUCHUNG DES SERUMS MITTELS COBAS C111 ANALYZER**

Zur Ermittlung der Blutparameter wurde den Goldhamstern Blut abgenommen, welches zunächst zentrifugiert wurde, um anschließend das Blutplasma abzupipettieren und mittels COBAS C111 zu analysieren. Hierbei waren vor allem Natrium, Kalzium, Phosphor und die Nierenwerte von Interesse, da FGF23 (wie oben beschrieben) einen Einfluss auf all diese Werte hat. Der COBAS C111 Analyzer (Roche, Wien) ist ein Gerät für die klinische Blutchemie.



### c.) UNTERSUCHUNG DER HAMSTERTIBIAE MITTELS xCT RESEARCH M+

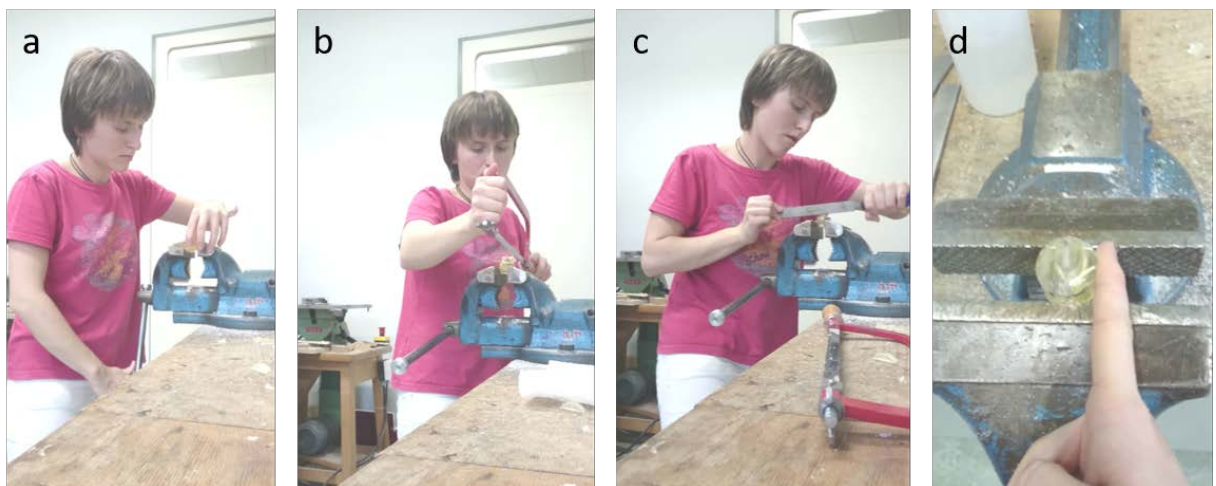
Nach der Tötung mittels Inhalation von Kohlendioxid wurden jeweils die *Femuren* und *Tibiae* inklusive *Fibulae* vom umliegenden Gewebe freipräpariert, sodass eine computertomographische Untersuchung durchgeführt werden konnte. Hierzu wurde der xCT Research M+ (Stratec Medizintechnik, Pforzheim, Deutschland) verwendet, ein peripherer, quantitativer Computertomograph, mit dem man die *Tibia* und den *Radius* messen kann. Mit der Betreuerin Olena Andrukhova wurde im Vorfeld vereinbart, dass lediglich die *Tibiae* mittels computertomographischer Untersuchung gemessen werden sollten. Die *Tibiae* wurden immer einzeln nacheinander gemessen und nach der Entnahme aus dem Gefäß sofort mit 70%igem Ethanol benetzt, um ein Austrocknen zu verhindern. Die *Fibulae* wurden im distalen Abschnitt gekürzt, damit sie während der Messung nicht störten. Anschließend wurde die *Tibia* in ein Gefäß platziert und mithilfe von Pinzette und Zellstoffkügelchen versucht, sie in eine möglichst gerade Position zu bringen. Als Maskenparameter wurde jener der Ratte („Ratte *Tibia* proximal; Ratte *Tibia* Schaft“, Durchmesser: 20 mm) verwendet, da die Rattentibiae bei jungen Ratten in etwa die gleiche Größe und Struktur aufweisen, wie die von adulten Goldhamstern. Die Referenzlinie A wurde etwas proximal des Bereichs der Epiphysenfuge und die Referenzlinie B wurde an der Verwachungsstelle von *Tibia* und *Fibula* platziert. Nach der Messung wurde am Bildschirm die ROI (region of interest) zum Zwecke der Auswertung festgelegt. Anschließend wurden die relevanten Werte mittels Computer ermittelt.

### d.) EINBETTUNG DER HAMSTERKNOCHEN

Die Einbettung der Hamsterknochen erfolgte gemäß der im Anhang auf Seite 63–65 befindlichen Anleitung (Standard Operating Procedure Erben et al. bzw. Petric et al.).

### e.) TRIMMEN DER BLÖCKE ZUR VORBEREITUNG AUF DIE SCHNITTANFERTIGUNG

Im Anschluss an die Einbettung der Hamsterknochen wurden die zylinderförmigen Blöcke zunächst mittels Hammer aus der Überschale geklopft. Dann wurde in der Werkstatt weitergearbeitet (Abb. 5a). Zunächst wurden die Blöcke möglichst knapp zum Knochen hin horizontal abgesägt (Abb. 5b) um den Schleifaufwand zu verringern. Danach wurde der Teil, der den Knochen beinhaltete, mittels Säge in eine rechteckige Form übergeführt und Klebstoff am zuvor abgesägten Teil des Zylinders fixiert. Nun wurde der Block wieder eingespannt und jener Teil mit dem Knochen glatt gefeilt (Abb. 5c) und zwar so, dass nur noch eine dünne Schicht Einbettungsmaterial über dem Knochen vorhanden war. Im nächsten Schritt wurde die Umgebung des Knochens mittels Säge so getrimmt, dass der Knochen von einem auf dem Kopf stehenden Regentropfen umgeben war (Abb. 5d).



**Abb. 5 a-d – Von links nach rechts: Einspannen des Blocks (5a), Sägen (5b), Feilen (5c) und das fertige Endprodukt (5d)**

#### f.) ANFERTIGEN DER SCHNITTE FÜR DIE HISTOLOGISCHE ARBEIT MITTELS ROTATIONSMIKROTOM

Nach dem Trimmen der Blöcke war der nächste Schritt das Anfertigen der Schnitte für die histologische Untersuchung. Hierzu wurde ein Rotationsmikrotom verwendet (MICROM HM360, Serien-Nr.: 11321, Hartmetallmesser mit D-Schliff). Die Schnitte wurden 5 µm breit geschnitten wobei jeweils zunächst zehn Schnitte angefertigt wurden, die dann auf einen Objektträger platziert wurden, anschließend vorsichtig gestreckt und dann mit einer Folie bedeckt wurden. Nach den ersten zehn gelungenen Schnitten wurden die nächsten 500 µm verworfen. Dann wurden abermals zehn Schnitte angefertigt und gleich präpariert. Die Objektträger wurden einzeln beschriftet und nummeriert. Zur Absicherung wurden von jedem Knochen jeweils fünf Schnitte von der ersten und von der zweiten Hälfte angefertigt. Anschließend wurden die Objektträger aufeinandergelegt und in eine Pressvorrichtung eingespannt, wo sie für 3–4 Wochen im Wärmeschrank gelagert wurden.

#### g.) FÄRBUNG DER SCHNITTE MITTELS KOSSA MC NEAL FÄRBUNG

Der nächste Schritt bestand im Färben der Schnitte für die histologische Auswertung. In diesem Fall wurde die Kossa Mc Neal Färbung gewählt. Die Pressvorrichtung wurde aus dem Wärmeschrank entnommen und aufgedreht, sodass die Objektträger entnommen werden konnten. Danach wurde sorgsam die Folie jedes einzelnen Objektträgers entfernt. Die Schnitte wurden im Mikroskop betrachtet und die schönsten Exemplare wurden für die Färbung ausgewählt. Anschließend wurde die Kossa Mc Neal Färbung durchgeführt, deren Anleitung auf Seite 66–67 im Anhang nachzulesen ist. Auffällig war, dass sich ca. 45 % der Knochen im letzten Arbeitsschritt vom Objektträger abzulösen begannen. Dies führte unweigerlich dazu, dass die Färbung mehrmals durchgeführt werden musste, und zwar mit den zuvor sicherheitshalber angefertigten Reserveschnitten. Insgesamt wurde die Färbung viermal durchgeführt, bis von allen Knochen je ein gefärbtes Präparat der ersten und eines der zweiten Hälfte vorhanden war.

#### h.) HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG DER GEFÄRBTEN SCHNITTE MITTELS OSTEOMEASURE™ - SOFTWARE

Nachdem die histologischen Schnitte fertig gefärbt waren, wurde die histologische Auswertung der Präparate durchgeführt. Auch hier wurde jedes Präparat einzeln beurteilt. Zur Beurteilung wurde die OsteoMeasure™ Software verwendet. Zunächst wurden die Umriss des Knochens umfahren und anschließend wurden sowohl die Osteoblasten als auch die Osteoklasten mit verschiedenen Einstellungen markiert. Im Anschluss daran wurden die vermessenen Werte ausgewertet und in Excel-Tabellen überführt, um ein Erstellen von Diagrammen zu ermöglichen.

#### i.) DATENEINGABE UND -ANALYSE

Sowohl die Daten aus der Messung mittels xCT Research M+ als auch die OsteoMeasure™-Daten wurden im Programm „Microsoft Office Excel 2010“ in Tabellen eingetragen. Anschließend wurden für alle relevanten Werte Säulendiagramme erstellt und eingefügt, um besser verdeutlichen zu können, ob und welche Zusammenhänge bestehen. Auf die Bedeutung der Werte wird im Ergebnis- und Diskussionsteil näher eingegangen.

#### j.) STATISTIK

Bei der statistischen Auswertung wurden die Daten aus xCT RESEARCH M+, die Serumparameter und die OsteoMeasure™-Daten mittels SPSS-Software (IBM® SPSS® Statistics, Version 26) mit nicht-parametrischen Testverfahren überprüft, um herauszufinden, ob statistisch signifikante Unterschiede der verschiedenen Gruppen bestehen. Getestet wurde im Falle männlich vs. (versus) weiblich mittels Mann-Whitney U-Test und hinsichtlich der Wurfgrößen mittels Kruskal-Wallis-Test (im Folgenden als KW-Test abgekürzt).

Nicht-parametrische Testverfahren wurden gewählt, weil es sich um einen sehr kleinen Stichprobenumfang (im Falle von männlich vs. weiblich 9; im Falle der verschiedenen

Wurfgrößen 7-8) handelte, und man daher mit nicht-parametrischen Tests eine höhere Wahrscheinlichkeit hatte, signifikante Ergebnisse zu erzielen. Im Rahmen der statistischen Auswertung wurde in dieser Diplomarbeit bei  $p < 0.05$  von einer Signifikanz und bei  $p \leq 0,01$  von hoch signifikanten Werten gesprochen. In die Interpretation der Statistik wurden lediglich die signifikanten und hoch signifikanten Werte miteinbezogen.

#### k.) ETHIK

Meine Diplomarbeit wurde im Rahmen eines Tierversuches an der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführt. Dieser wurde zunächst von der Ethik- und Tierschutzkommission (ETK) geprüft und befürwortet sowie in Übereinstimmung mit der Good Scientific Practice und unter Beachtung der einschlägigen nationalen Rechtsvorschriften durchgeführt. Meine Versuchstiere speziell stammten aus den Tierversuchen mit den Geschäftszahlen BMWFW-68.205/0035 WF/II3b/2014 und BMWFW-68.205/0028-WF/V/3b/2016. Im Laufe der Arbeiten hielten wir uns gewissenhaft an alle Vorgaben und kein Tier musste im Zuge der Untersuchungen leiden.

### 3. ERGEBNISSE

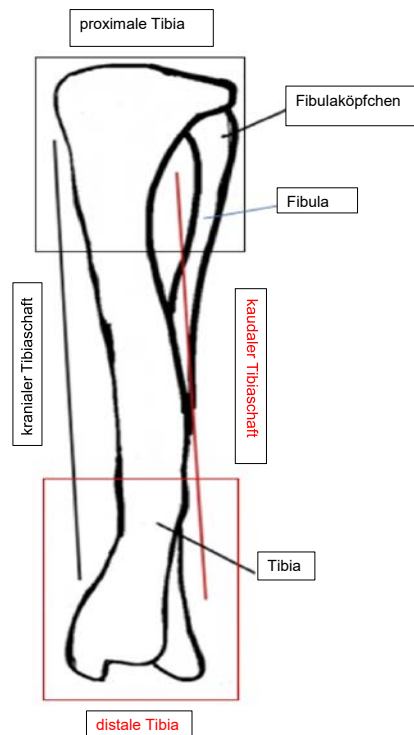
Im Ergebnisteil wird auf die Resultate der Messungen mittels xCT-Research-M+, der Serumparameter und der Auswertungen mittels OsteoMeasure™ sowohl hinsichtlich der Gruppen männlich vs. weiblich als auch in Bezug auf die Wurfgrößen eingegangen.

#### a.) Ergebnisse männlich vs. weiblich

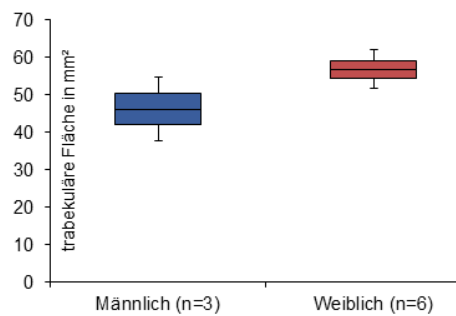
In diesem Abschnitt des Ergebnisteils werden die Untersuchungsergebnisse der computertomographischen Aufarbeitung, der Serumlevels mittels COBAS C111 Analyser und der knochenhistomorphometrischen Analysen mittels OsteoMeasure™ bezüglich männlich vs. weiblich sowohl in graphischer – als auch in Textform präsentiert.

##### a.1.) xCT Research M+-Daten proximale *Tibia*

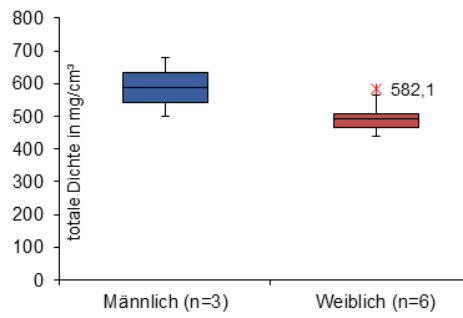
Dieser Teil beinhaltet die Ergebnisse hinsichtlich männlich vs. weiblich im Bereich der proximalen *Tibia*. Zur besseren Verständlichkeit der Regionen „proximale *Tibia*“ und „*Tibiaschaft*“ dient Abb. 6.



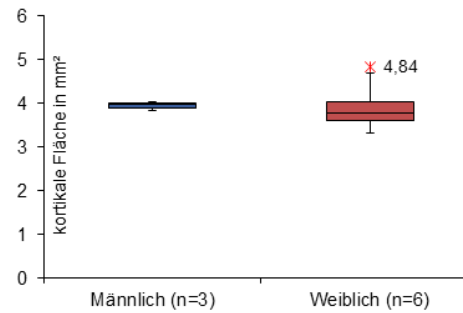
**Abb. 6 – Anatomisches Schema der *Tibia* und *Fibula* inklusive Kennzeichnung der Bereiche proximale *Tibia*, distale *Tibia*, kranialer *Tibiaschaft*, kaudaler *Tibiaschaft* und *Fibulaköpfchen*, selbst gezeichnet, Najsar 2020**



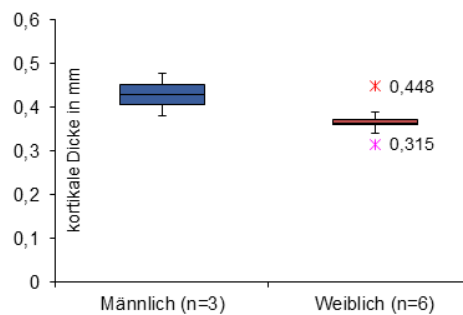
**Abb. 7 – Trabekuläre Fläche proximale *Tibia* männlich vs. weiblich in mm<sup>2</sup>**



**Abb. 8 – Totale Dichte proximale *Tibia* männlich vs. weiblich in mg/cm<sup>3</sup>**

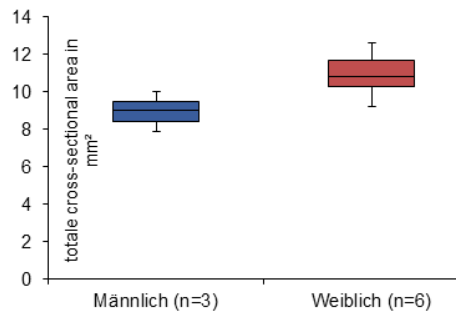


**Abb. 9 – Kortikale Fläche proximale *Tibia* männlich vs. weiblich in mm<sup>2</sup>**

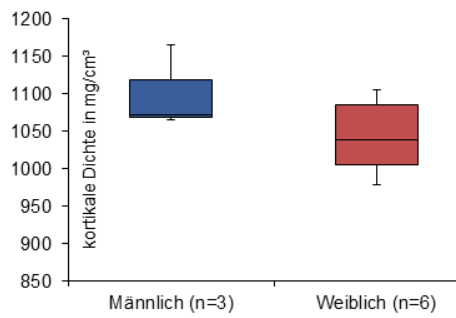


**Abb. 10 – Kortikale Dicke proximale *Tibia* männlich vs. weiblich in mm**

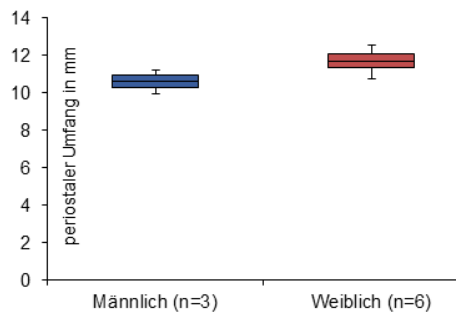




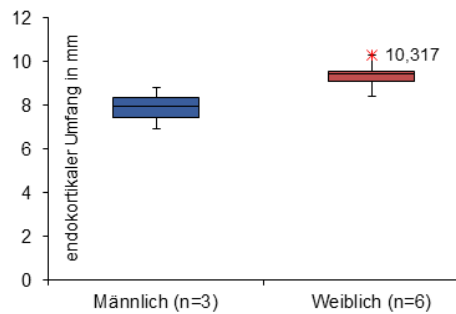
**Abb. 11 – Totale Knochenfläche proximale *Tibia* männlich vs. weiblich in mm<sup>2</sup>**



**Abb. 12 – Kortikale Dichte proximale *Tibia* männlich vs. weiblich in mg/cm<sup>3</sup>**



**Abb. 13 – Periostaler Umfang proximale *Tibia* männlich vs. weiblich in mm**



**Abb. 14 – Endokortikaler Umfang proximale *Tibia* männlich vs. weiblich in mm**

**Tab. 1 - Deskriptive Statistik xCT proximale *Tibia* männlich vs. weiblich;  $\sigma$  = Standardabweichung,  $\mu$  = Mittelwert, n = Stichprobenumfang**

Parameter	n (männlich)	$\mu$ (männlich)	$\sigma$ (männlich)	n (weiblich)	$\mu$ (weiblich)	$\sigma$ (weiblich)
Trabekuläre Fläche (mm <sup>2</sup> )	3	46.20	8.400	6	56.83	3.746
Totale Dichte (mg/cm <sup>3</sup> )	3	588.93	91.258	6	495.72	49.373
Totale Cross-Sectional Area (mm <sup>2</sup> )	3	8.95	1.075	6	10.91	1.214
Kortikale Dichte (mg/cm <sup>3</sup> )	3	1101.27	56.459	6	1043.07	51.638
Kortikale Fläche (mm <sup>2</sup> )	3	3.94	0.110	6	3.90	0.529
Kortikale Dicke (mm)	3	0.43	0.049	6	0.37	0.043
Periostaler Umfang (mm)	3	10.59	0.640	6	11.69	0.654
Endokortikaler Umfang (mm)	3	7.90	0.942	6	9.36	0.642

**Tab. 2 - p-Werte Mann-Whitney U-Test sowie Korrelationskoeffizient r nach Pearson xCT Research M+-Daten proximale *Tibia* männlich vs. weiblich; 0.10  $\leq$  0.3 entspricht einem schwachen Effekt, 0.30  $\leq$  r < 0.5 entspricht einem mittleren Effekt, r > 0.5 entspricht einem starken Effekt**

Parameter	p-Wert	Effektstärke r
Trabekuläre Fläche	0.095	0.36
Totale Dichte	0.167	0.52
Totale Cross-Sectional Area	0.048	0.69
Kortikale Dichte	0.262	0.43
Kortikale Fläche	0.714	0.17
Kortikale Dicke	0.381	0.32
Periostaler Umfang	0.048	0.69
Endokortikaler Umfang	0.048	0.69

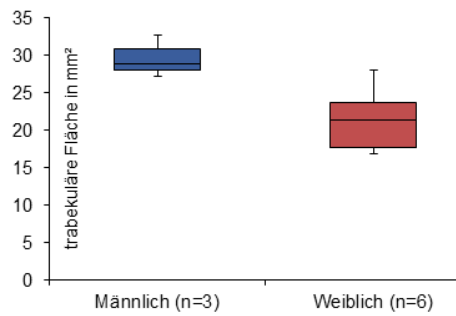
In Tab. 1 sind Stichprobenumfang, Mittelwert und Standardabweichung in Hinblick auf die Parameter von xCT-Research-M+ und das Geschlecht dargestellt. Tab. 2 beinhaltet die p-Werte des Mann-Whitney U-Tests sowie die Korrelationskoeffizienten nach Pearson.

Die weiblichen Goldhamster lagen in Bezug auf die trabekuläre Fläche mit  $56.8 \pm 3.746 \text{ mm}^2$  um  $10.6 \text{ mm}^2$  signifikant höher als die männlichen Goldhamster mit  $46.2 \pm 8.400 \text{ mm}^2$  (U-Test,  $p=0.095$ ,  $r=0,36$ , Abb.7). Die totale Knochenfläche (totale cross-sectional area) war bei den Weibchen mit  $10.91 \pm 1.214 \text{ mm}^2$  mit  $p=0.048$  ebenso signifikant höher als bei den Männchen mit  $8.95 \pm 1.075 \text{ mm}^2$  (U-Test,  $p=0.048$ ,  $r=0.69$ , Abb.8) Der Effektstärke nach Cohen (Wassertheil and Cohen, 1970) spricht bei einem Korrelationskoeffizienten von 0.69 für einen starken Effekt dieses Zusammenhangs. Der periostale Umfang der weiblichen Tiere war mit  $11.693 \pm 0.654 \text{ mm}$  größer als jener der männlichen Tiere mit  $10.594 \pm 0.640 \text{ mm}$  (U-Test,  $p=0.048$ ,  $r=0.69$ , Abb.13). Auch hier spricht der r-Wert für einen starken Effekt der Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen. Hinsichtlich des endokortikalen Umfangs lagen die weiblichen Goldhamster mit einem Mittel von  $9.364 \pm 0.642 \text{ mm}$  signifikant und mit einem starken Effekt höher als die männlichen Goldhamster mit einem Mittelwert von  $7.898 \pm 0.941 \text{ mm}$  (U-Test,  $p=0.048$ ,  $r=0.069$ , Abb.14).

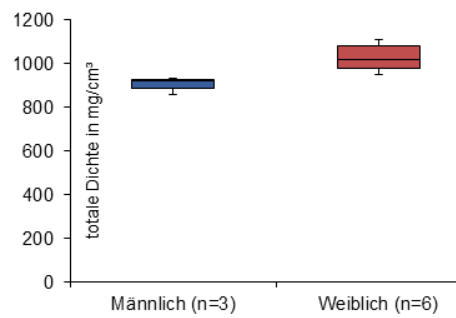
Totale Dichte (U-Test,  $p=0.167$ ,  $r=0.52$ , Abb.8), kortikale Fläche (U-Test,  $p=0.714$ ,  $r=0.17$ , Abb.9), kortikale Dicke (U-Test,  $p=0.381$ ,  $r=0.32$ , Abb.10) und kortikale Dichte (U-Test,  $p=0.262$ ,  $r=0.43$ , Abb.12), waren wie in Tab. 1 ersichtlich, bei männlichen Goldhamstern in einem höheren Wertebereich, als bei den weiblichen Individuen. Anhand der p-Werte des Mann-Whitney U-Tests ist klar zu erkennen, dass keiner dieser Werte den mit  $p=0.05$  festgelegten Wert für eine statistische Signifikanz erreicht. Lediglich die totale Knochendichte weist mit  $p=0.167$  und einem r-Wert von 0.52 eine Tendenz in Richtung Signifikanz auf und könnte darauf hinweisen, dass ein größerer Stichprobenumfang signifikante Unterschiede erbringen würde.

a.2.) xCT Research M+-Daten *Tibiaschaft*

In diesem Abschnitt werden die Resultate des Vergleichs männlich vs. weiblich im Bereich „*Tibiaschaft*“ behandelt. Zur Verdeutlichung der Region „*Tibiaschaft*“ dient Abb. 6.



**Abb. 15 – Trabekuläre Fläche *Tibiaschaft* männlich vs. weiblich in mm²**



**Abb. 16 – Totale Dichte *Tibiaschaft* männlich vs. weiblich in mg/cm³**

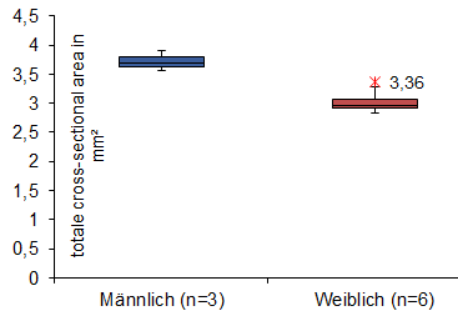


Abb. 17 – Totale Knochenfläche *Tibiaschaft* männlich vs. weiblich in mm<sup>2</sup>

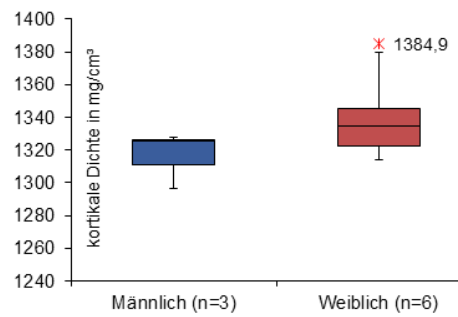


Abb. 18 – Kortikale Dichte *Tibiaschaft* männlich vs. weiblich in mg/cm<sup>3</sup>

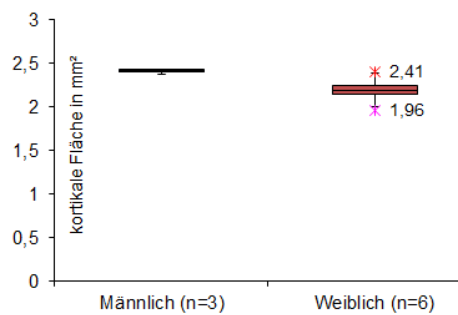
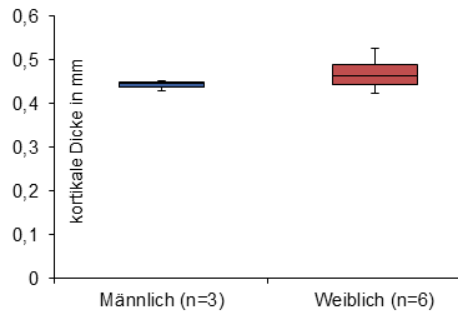
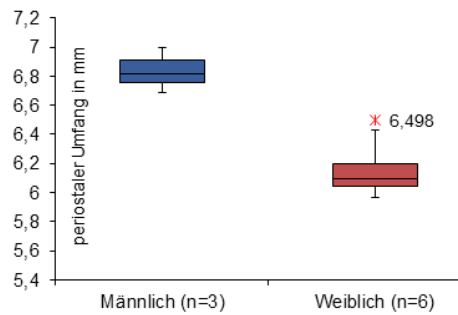


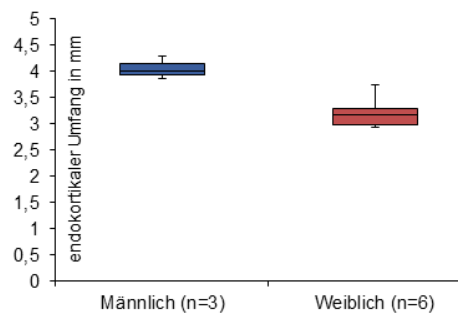
Abb. 19 – Kortikale Fläche *Tibiaschaft* männlich vs. weiblich in mm<sup>2</sup>



**Abb. 20 – Kortikale Dicke *Tibiaschaft* männlich vs. weiblich in mm**



**Abb. 21 – Periostaler Umfang *Tibiaschaft* männlich vs. weiblich in mm**



**Abb. 22 – Endokortikaler Umfang *Tibiaschaft* männlich vs. weiblich in mm**

**Tab. 3: Deskriptive Statistik xCT Tibiaschaft männlich vs. weiblich;  $\sigma$  = Standardabweichung,  $\mu$  = Mittelwert, n = Stichprobenumfang**

Parameter	n (männlich)	$\mu$ (männlich)	$\sigma$ (männlich)	n (weiblich)	$\mu$ (weiblich)	$\sigma$ (weiblich)
Trabekuläre Fläche (mm <sup>2</sup> )	3	29.63	2.871	6	21.40	4.356
Totale Dichte (mg/cm <sup>3</sup> )	3	903.97	41.153	6	1028.47	66.628
Totale Cross-Sectional Area (mm <sup>2</sup> )	3	3.72	0.171	6	3.02	0.190
Kortikale Dichte (mg/cm <sup>3</sup> )	3	1316.57	17.172	6	1339.35	25.526
Kortikale Fläche (mm <sup>2</sup> )	3	2.41	0.026	6	2.19	0.148
Kortikale Dicke (mm)	3	0.44	0.012	6	0.47	0.038
Periostaler Umfang (mm)	3	6.75	0.157	6	6.15	0.191
Endokortikaler Umfang (mm)	3	4.05	0.226	6	3.2	0.337

**Tab. 4 - p-Werte Mann-Whitney U-Test sowie Korrelationskoeffizient r nach Pearson xCT Research M+-Daten Tibiaschaft männlich vs. weiblich; 0.10  $\leq$  0.3 entspricht einem schwachen Effekt, 0.30  $\leq$  r < 0.5 entspricht einem mittleren Effekt, r > 0.5 entspricht einem starken Effekt**

Parameter	p-Wert	Effektstärke r
Trabekuläre Fläche	0.048	0.69
Totale Dichte	0.024	0.77
Totale Cross-Sectional Area	0.024	0.77
Kortikale Dichte	0.262	0.43
Kortikale Fläche	0.048	0.69
Kortikale Dicke	0.548	0.26
Periostaler Umfang	0.024	0.77
Endokortikaler Umfang	0.024	0.78

In Tab. 4 sind Stichprobenumfang, Mittelwert und Standardabweichung in Hinblick auf die Parameter von xCT-Research-M<sup>+</sup> und das Geschlecht dargestellt. Tab. 5 beinhaltet die p-Werte des Mann-Whitney U-Tests sowie die Korrelationskoeffizienten nach Pearson.

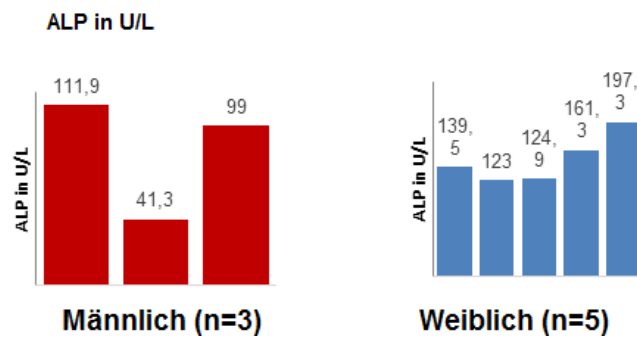
Anders als bei der proximalen *Tibia* lagen im Bereich des Tibiaschaftes die männlichen Goldhamster mit  $29.63 \pm 2.871 \text{ mm}^2$  statistisch signifikant höher als die weiblichen Goldhamster mit  $21.40 \pm 4.356 \text{ mm}^2$  (U-Test,  $p=0.048$ ,  $r=0.69$ , Abb.15). Der Korrelationskoeffizient  $r=0.69$  spricht in diesem Fall für einen starken Effekt dieses Ergebnisses. Ebenso war die totale Knochenfläche des Tibiaschaftes bei den Männchen mit  $3.72 \pm 0.17 \text{ mm}^2$  größer als jene der Weibchen mit  $3.02 \pm 0.190 \text{ mm}^2$  (U-Test,  $p=0.024$ ,  $r=0.69$ , Abb.17). Auch hier ist ein starker Effekt festzustellen. Der periostale (U-Test,  $p=0.024$ ,  $r=0.68$ , Abb.21) sowie der endokortikale (U-Test,  $p=0.024$ ,  $r=0.69$ , Abb.22). Umfang waren, anders als im Bereich der proximalen *Tibia*, bei den männlichen Tieren mit  $6.75 \pm 0.157 \text{ mm}$  (periostaler Umfang) bzw.  $4.05 \pm 0.226 \text{ mm}$  (endokortikaler Umfang) signifikant und mit starkem Effekt größer als bei den weiblichen Tieren mit  $6.15 \pm 0.191 \text{ mm}$  (periostaler Umfang) bzw.  $3.2 \pm 0.337 \text{ mm}$  (endokortikaler Umfang). Wie im Bereich der proximalen *Tibia* befand sich auch in der Region des Tibiaschaftes die kortikale Fläche der männlichen Goldhamster mit  $4.05 \pm 0.226 \text{ mm}$  in einem signifikant höheren Bereich als jene der weiblichen Goldhamster mit  $2.19 \pm 0.148 \text{ mm}^2$  (U-Test,  $p=0.048$ ,  $r=0.17$ , Abb.19). Der r-Wert von 0.17 spricht allerdings für einen schwachen Effekt dieser Signifikanz.

Die Werte der kortikalen Dicke (U-Test,  $p=0.548$ ,  $r=0.32$ , Abb.20), der kortikalen Dichte (U-Test,  $p=0.262$ ,  $r=0.43$ , Abb.18) lagen nicht im signifikanten Bereich.

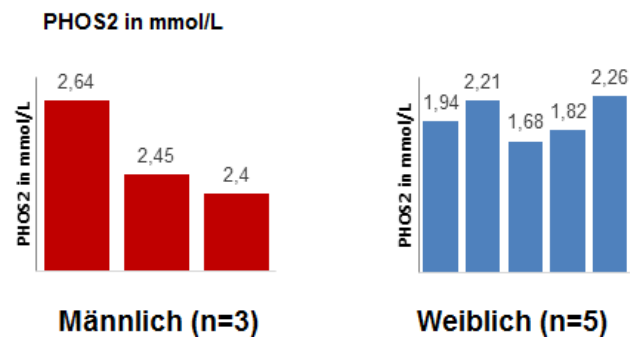


a.3.) Serumergebnisse COBAS C111 Analyzer männlich vs. weiblich

Hier werden die Ergebnisse der Serumanalyse mittels COBAS C111 Analyzer der männlichen und weiblichen Goldhamster beschrieben. Eine der neun Serumproben konnte bei der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt werden, da die Werte in diesem Fall nicht im messbaren Bereich lagen. Zusätzlich lag bei einem weiteren weiblichen Tier der Messwert für FGF23 nicht im messbaren Bereich.



**Abb. 23 – Serumgehalt der alkalischen Phosphatase nach Geschlecht in U/L**



**Abb. 24 – Serum-Phosphorgehalt nach Geschlecht in mmol/L**

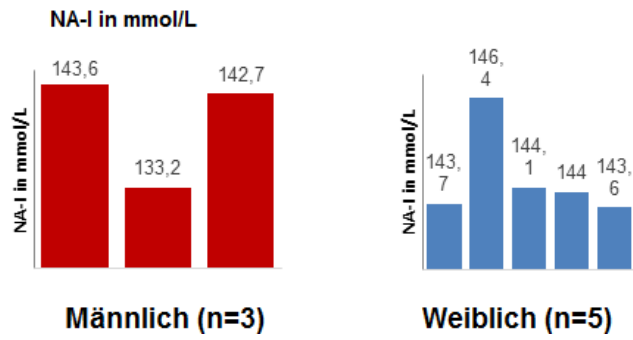


Abb. 25 – Serum-Natriumgehalt nach Geschlecht in mmol/L

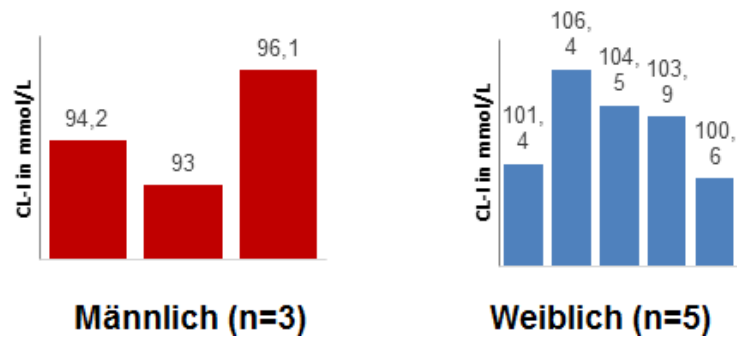


Abb. 26 – Serum-Chloridgehalt nach Geschlecht in mmol/L

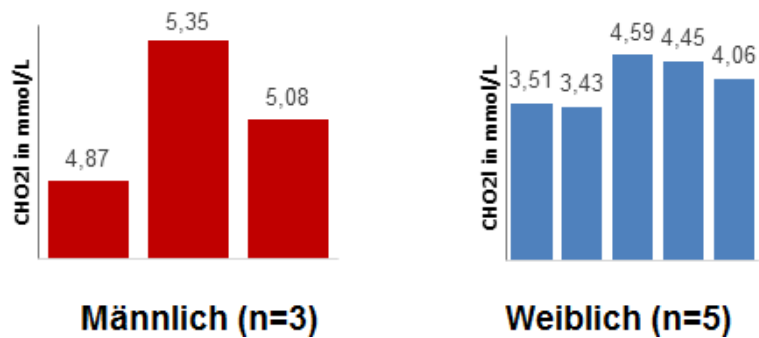


Abb. 27 – Serum-Cholesteringehalt nach Geschlecht in mmol/L

**Tab. 5: Deskriptive Statistik Serumwerte des COBAS 111 Analyzer männlich vs. weiblich;  $\sigma$ = Standardabweichung,  $\mu$  = Mittelwert, n = Stichprobenumfang, \*bei einem Tier war der Wert nicht messbar**

Parameter	n (männlich)	$\mu$ (männlich)	$\sigma$ (männlich)	n (weiblich)	$\mu$ (weiblich)	$\sigma$ (weiblich)
Alkalische Phosphatase in U/L	3	84.07	37.594	5	149.20	30.948
Kreatinkinase in U/L	3	1105.60	216.582	5	757.80	230.676
Albumin in g/L	3	32.28	2.335	5	29.77	0.869
Kreatinin in $\mu\text{mol/L}$	3	31.37	5.784	5	30.84	4.558
Phosphor in mmol/L	3	2.50	0.127	5	1.98	0.249
Harnstoff in mmol/L	3	8.39	2.625	5	11.54	3.244
Kalium in mmol/L	3	7.58	2.645	5	7.48	0.939
Natrium in mmol/L	3	139.83	5.762	5	144.36	1.159
Chlorid in mmol/L	3	94.43	1.563	5	103.36	2.361
Aspartat-Aminotransferase in U/L	3	172.97	87.585	5	128.84	57.015
Kalzium in mmol/L	3	3.31	0.401	5	3.89	1.036
Cholesterin in mmol/L	3	5.10	0.241	5	4.01	0.529
Triglyceride in mmol/L	3	1.95	0.297	5	1.40	0.295
Eisen in mmol/L	3	63.00	16.257	5	46.22	11.524
Serum FGF23 in pg/ml	3	243.67	101.614	4*	141.00	38.245

**Tab. 6 - p-Werte Mann-Whitney U-Test sowie Korrelationskoeffizient r nach Pearson der Serumwerte des COBAS 111 Analyzer männlich vs. weiblich; 0.10  $\leq$  0.3 entspricht einem schwachen Effekt, 0.30  $\leq$  r < 0.5 entspricht einem mittleren Effekt, r > 0.5 entspricht einem starken Effekt**

Parameter	p-Wert	Effektstärke r
Alkalische Phosphatase in U/L	0.036	0.83
Kreatinkinase in U/L	0.071	0.69
Albumin in g/L	0.250	0.47
Kreatinin in $\mu$ mol/L	1.000	0.05
Phosphor in mmol/L	0.036	0.79
Harnstoff in mmol/L	0.250	0.47
Kalium in mmol/L	0.786	0.16
Natrium in mmol/L	0.036	0.74
Chlorid in mmol/L	0.036	0.79
Aspartat-Aminotransferase in U	0.571	0.26
Kalzium in mmol/L	0.250	0.48
Cholesterin in mmol/L	0.036	0.79
Triglyceride in mmol/L	0.071	0.69
Eisen in mmol/L	0.250	0.47
FGF23 in pg/ml	0.057	0.81

In Tab. 5 sind Stichprobenumfang, Mittelwert und Standardabweichung in Hinblick auf die Parameter der Serumanalyse und das Geschlecht dargestellt. Tab. 6 beinhaltet die Korrelationskoeffizienten nach Pearson sowie die p-Werte des Mann-Whitney U-Tests in Hinblick auf die Serumergebnisse männlich vs. weiblich.

Die Serumlevels in Bezug auf die alkalische Phosphatase (Leberparameter), waren bei den Weibchen mit  $149.20 \pm 30.948$  U/L signifikant höher als bei den Männchen mit  $84.07 \pm 37.594$  U/L (U-Test,  $p=0.036$ ,  $r=0.83$ , Abb.23). Wie erwartet lagen die Phosphorwerte bei den männlichen Goldhamstern mit  $2.50 \pm 0.127$  mmol/L signifikant und mit starkem Effekt höher als bei den weiblichen Goldhamstern mit  $1.98 \pm 0.249$  mmol/L (U-Test,  $p=0.036$ ,  $r=0.79$ , Abb.24). Die Natriumkonzentrationen im Serum der Goldhamster befanden sich – wie angenommen – bei den weiblichen Tieren mit  $144.36 \pm 1.159$  mmol/L in einem signifikant höheren Bereich als bei den männlichen Tieren mit  $139.83 \pm 5.762$  mmol/L (U-

Test,  $p=0.036$ ,  $r=0.74$ , Abb.25). Der  $r$ -Wert von 0.74 spricht für einen starken Effekt dieses Zusammenhangs. Die Weibchen wiesen in Bezug auf den Serum-Chlorid-Gehalt mit im Mittel  $103.36 \pm 2.361 \text{ mmol/l}$  signifikant höhere Werte auf als die Männchen mit  $94.43 \pm 1.563 \text{ mmol/l}$  (U-Test,  $p=0.036$ ,  $r=0.79$ , Abb.26). Die Cholesterinwerte der männlichen Tiere lagen mit im Mittel  $5.10 \pm 0.241 \text{ mmol/l}$  signifikant höher als jene der weiblichen Tiere mit  $4.01 \pm 0.259 \text{ mmol/l}$  (U-Test,  $p=0.036$ ,  $r=0.79$ , Abb.27).

Die Parameter Kreatinkinase (U-Test,  $p=0.071$ ,  $r=0.69$ , Tab.6), Albumin (U-Test,  $p=0.250$ ,  $r=0.47$ , Tab.6), Kreatinin (U-Test,  $p=1.000$ ,  $r=0.05$ , Tab.6), Harnstoff (U-Test,  $p=0.250$ ,  $r=0.47$ , Tab.6), Kalium (U-Test,  $p=0.786$ ,  $r=0.16$ , Tab.6), Aspartat-Aminotransferase (U-Test,  $p=0.571$ ,  $r=0.26$ , Tab.6), Kalzium (U-Test,  $p=0.250$ ,  $r=0.48$ , Tab.6), Triglyceride (U-Test,  $p=0.071$ ,  $r=0.69$ , Tab.6), Eisen (U-Test,  $p=0.250$ ,  $r=0.47$ , Tab.6) und FGF23 (U-Test,  $p=0.057$ ,  $r=0.81$ , Tab.6) lagen nicht im signifikanten Bereich. Hinsichtlich FGF23 ist jedoch anzumerken, dass mit  $p=0.057$  und einem Korrelationskoeffizient  $r=0.81$  und somit einem starken Effekt eine eindeutige Tendenz in Richtung Signifikanz vorhanden ist und mit größeren Stichprobenumfängen signifikante Ergebnisse erbracht werden könnten.

a.4.) OsteoMeasure™ - Daten männlich vs. weiblich proximaler Bereich

Zu den OsteoMeasure™-Daten ist anzumerken, dass – wie auch schon in den Methoden beschrieben – zunächst Schnitte am Mikrotom gefertigt wurden, dann 500 Mikrometer verworfen wurden, und dann erneut geschnitten wurde. Damit wollte man bezwecken, die proximale *Tibia* und den *Tibiaschaft* zu unterscheiden. Im Folgenden wird also der Bereich vor dem Verwerfen der 500 Mikrometer als „proximaler Bereich“ und jener nach dem Verwerfen als „distaler Bereich“ bezeichnet. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse des proximalen Bereichs beschrieben.

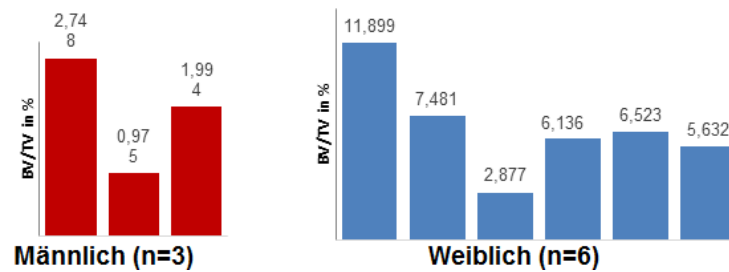


Abb. 28 – Verhältnis Knochenvolumen/Totales Volumen proximaler Bereich männlich vs. weiblich in %

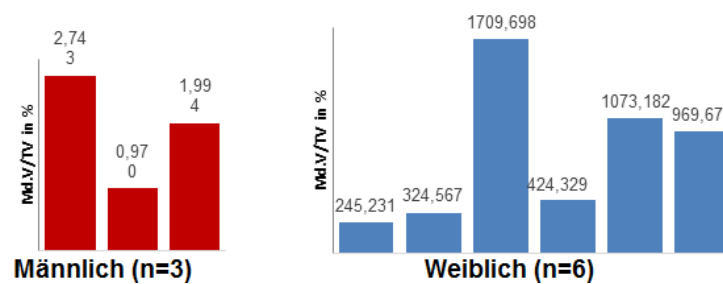


Abb. 29 – Verhältnis mineralisiertes Volumen/Totales Volumen proximaler Bereich männlich vs. weiblich in %

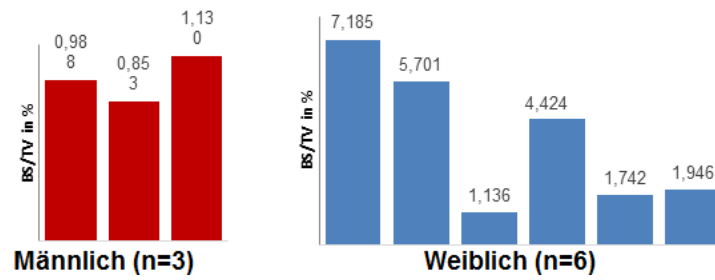


Abb. 30 – Verhältnis Knochenoberfläche/Totales Volumen proximaler Bereich männlich vs. weiblich in %

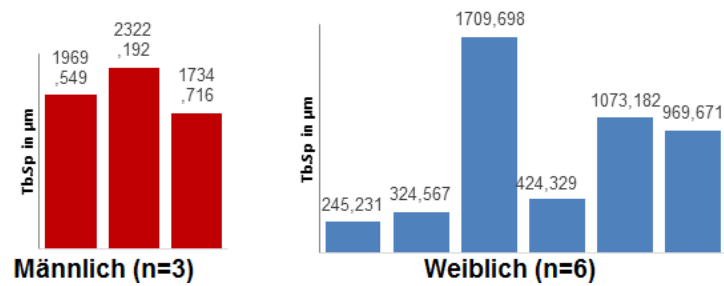


Abb. 31 – Trabekelseparation proximaler Bereich männlich vs. weiblich in µm

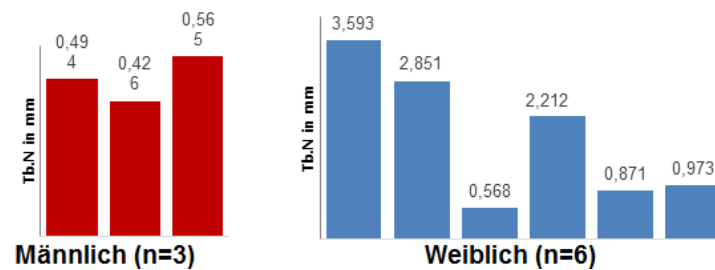


Abb. 32 – Trabekelzahl proximaler Bereich männlich vs. weiblich in mm

**Tab. 7 - Deskriptive Statistik OsteoMeasure™-Daten "proximaler Bereich" männlich vs. weiblich;  $\sigma$  = Standardabweichung,  $\mu$  = Mittelwert, n = Stichprobenumfang, \*bei einem Tier war der Wert nicht messbar, \*\*bei 3 Tieren war der Wert nicht messbar, \*\*\*OF= Oberfläche**

Parameter	n (männlich)	$\mu$ (männlich)	$\sigma$ (männlich)	n (weiblich)	$\mu$ (weiblich)	$\sigma$ (weiblich)
Knochenvolumen/Totales Volumen (%)	3	1,91	0,890	6	6,76	2,957
Osteoidvolumen/Totales Volumen (%)	3	0,00	0,003	6	0,03	0,034
Osteoidvolumen/Knochenvolumen (%)	3	0,21	0,228	6	6,73	2,983
Mineralisiertes Volumen/Totales Volumen (%)	3	1,90	0,890	6	6,73	2,983
Knochenoberfläche/Totales Volumen (%)	3	0,99	0,139	6	3,69	2,456
Knochenoberfläche/Knochenvolumen (%)	3	60,04	25,941	6	51,58	20,783
Osteoidoberfläche/Knochen-OF (%)	3	5,80	5,799	6	10,33	15,503
Osteoblastenoberfläche/Knochen-OF*** (%)	3	2,97	5,139	6	8,26	11,094
Trabekeldicke ( $\mu\text{m}$ )	3	37,93	16,553	6	45,08	19,400
Osteoiddicke ( $\mu\text{m}$ )	2*	0,58	0,099	3**	1,71	0,220
Trabekelseparation ( $\mu\text{m}$ )	3	2008,82	295,700	6	791,11	566,644
Trabekelzahl ( $\mu\text{m}$ )	3	0,50	0,069	6	1,84	1,228

**Tab. 8 - p-Werte Mann-Whitney U-Test sowie Korrelationskoeffizienten r nach Pearson der OsteoMeasure™-Daten "proximaler Bereich" männlich vs. weiblich; 0.10  $\leq$  0.3 entspricht einem schwachen Effekt, 0.30  $\leq$  r < 0.5 entspricht einem mittleren Effekt, r > 0.5 entspricht einem starken Effekt; OF = Oberfläche, Vol. = Volumen**

Parameter	p-Wert	Effektstärke r
Knochenvolumen/Totales Vol. (%)	0.024	0.74
Osteoidvolumen/Totales Vol. (%)	0.714	0.14
Osteoidvolumen/Knochenvolumen (%)	0.905	0.05
Mineralisiertes Volumen/Totales Vol. (%)	0.024	0.77
Knochenoberfläche/Totales Vol. (%)	0.024	0.77
Knochenoberfläche/Knochenvolumen (%)	0.714	0.17
Osteoid-OF/Knochen-OF (%)	0.905	0.05
Osteoblasten-OF/Knochen-OF (%)	0.548	0.28
Trabekeldicke ( $\mu\text{m}$ )	0.714	0.17
Osteoiddicke ( $\mu\text{m}$ )	0.200	0.77
Trabekelseparation ( $\mu\text{m}$ )	0.024	0.77
Trabekelzahl ( $\mu\text{m}$ )	0.024	0.77



In Tab. 7 sind Stichprobenumfang, Mittelwert und Standardabweichung in Hinblick auf die Parameter der OsteoMeasure™-Analyse und Geschlecht dargestellt. Tab. 8 beinhaltet die Korrelationskoeffizienten nach Pearson sowie die p-Werte des Mann-Whitney U-Tests in Hinblick auf die OsteoMeasure™-Daten des proximalen Bereichs.

In Bezug auf das Verhältnis „Knochenvolumen/Totales Volumen“ lagen die Weibchen mit  $6.76 \pm 2.957$  % signifikant höher als die Männchen mit  $1.91 \pm 0.890$  % (U-Test,  $p=0.024$ ,  $r=0.74$ , Abb.28). Auch beim Verhältnis „Mineralisiertes Volumen/Totales Volumen“ lagen die weiblichen Individuen mit im Mittel  $6.73 \pm 2.983$  % signifikant höher als die männlichen Individuen mit  $1.90 \pm 0.890$  % (U-Test,  $p=0.024$ ,  $r=0.77$ , Abb.29). Hinsichtlich des Verhältnisses „Knochenoberfläche/Totales Volumen“ wiesen die weiblichen Goldhamster mit im Mittel  $3.69 \pm 2.456$  % signifikant höhere Werte auf als die männlichen Goldhamster mit  $0.99 \pm 0.139$  % (U-Test,  $p=0.024$ ,  $r=0.77$ , Abb.30). Es ist zu erkennen, dass bei sämtlichen Verhältnissen, die statistisch signifikant waren, die weiblichen Tiere höhere Werte aufwiesen als die männlichen Tiere und dies in allen drei Fällen mit einem starken Effekt. In Bezug auf die Trabekelseparation, die den Abstand zwischen den beiden Knochenkanten beschreibt (Dempster *et al.*, 2013), befanden sich die Männchen mit  $2008.82 \pm 0.069$   $\mu m$  deutlich und statistisch signifikant höher als die Weibchen mit  $791 \pm 566.644$   $\mu m$  (U-Test,  $p=0.024$ ,  $r=0.77$ , Abb.31). Der hohe r-Wert von 0.77 spricht für einen starken Effekt dieses Zusammenhangs. Die Werte der Trabekelzahl lagen bei den weiblichen Tieren mit  $1.84 \pm 1.228$   $\mu m$  signifikant höher als bei den männlichen Tieren mit  $0.50 \pm 0.069$   $\mu m$  (U-Test,  $p=0.024$ ,  $r=0.77$ , Abb.32). Auch war ein starker Effekt vorhanden.

Die Verhältnisse „Osteoidvolumen/Totales Volumen“ (U-Test,  $p=0.714$ ,  $r=0.14$ , Tab.8), „Osteoidvolumen/Knochenvolumen“ (U-Test,  $p=0.905$ ,  $r=0.05$ , Tab.8), „Knochenoberfläche/Knochenvolumen“ (U-Test,  $p=0.714$ ,  $r=0.17$ , Tab.8), „Osteoidoberfläche/Knochenoberfläche“ (U-Test,  $p=0.905$ ,  $r=0.05$ , Tab.8), „Osteoblastenoberfläche/Knochenoberfläche“ (U-Test,  $p=0.548$ ,  $r=0.28$ , Tab.8) sowie die Parameter Trabekeldicke (U-Test,  $p=0.714$ ,  $r=0.17$ , Tab.8) und Osteoiddicke (U-Test,  $p=0.200$ ,  $r=0.77$ , Tab.8) lagen nicht im signifikanten Bereich.

## a.5.) OsteoMeasure™ - Daten männlich vs. weiblich distaler Bereich

Hier werden die Resultate der knochenhistomorphometrischen Messungen mittels OsteoMeasure™ männlich vs. weiblich in Bezug auf den distalen Bereich behandelt.

**Tab. 9 - Deskriptive Statistik OsteoMeasure™-Daten "distaler Bereich" männlich vs. weiblich;  $\sigma$  = Standardabweichung,  $\mu$  = Mittelwert, n = Stichprobenumfang, \*bei einem Tier war der Wert nicht messbar, \*\*bei einem Tier konnten die Werte nicht gemessen werden, da kein Schnitt aus dem „distalen Bereich“ zur Auswertung verfügbar war, \*\*\*zusätzlich zum Tier von \*\* war dieser Wert bei einem Tier nicht im messbaren Bereich, \*\*\*\*OF=Oberfläche**

Parameter	n (männlich)	$\mu$ (männlich)	$\sigma$ (männlich)	n (weiblich)	$\mu$ (weiblich)	$\sigma$ (weiblich)
Knochenvolumen/Totales Volumen (%)	3	4,98	0,628	5**	4,00	1,491
Osteoidvolumen/Totales Volumen (%)	3	0,02	0,026	5**	0,02	0,025
Osteoidvolumen/Knochenvolumen (%)	3	0,34	0,451	5**	0,46	0,640
Mineralisiertes Volumen/Totales Volumen (%)	3	4,96	0,603	5**	3,99	1,494
Knochenoberfläche/Totales Volumen (%)	3	2,58	1,141	5**	2,27	1,422
Knochenoberfläche/Knochenvolumen (%)	3	51,84	8,329	5**	57,13	25,426
Osteoidoberfläche/Knochen-OF**** (%)	3	3,92	4,981	5**	3,75	3,441
Osteoblastenoberfläche/Knochen-OF**** (%)	3	3,84	4,992	5**	4,19	3,841
Trabekeldicke ( $\mu\text{m}$ )	3	39,24	6,193	5**	42,90	22,517
Osteoiddicke ( $\mu\text{m}$ )	2*	1,77	0,048	4***	2,41	2,002
Trabekelseparation ( $\mu\text{m}$ )	3	758,38	169,215	5**	1145,83	612,080
Trabekelzahl ( $\mu\text{m}$ )	3	1,29	0,251	5*	42,90	0,711

In Tab. 9 sind Stichprobenumfang, Mittelwert und Standardabweichung in Hinblick auf die Parameter der OsteoMeasure™-Analyse und das Geschlecht dargestellt. Da keiner der OsteoMeasure™-Werte des distalen Bereichs im signifikanten Bereich lag, werden in diesem Abschnitt diesbezüglich keine Ergebnisse in Textform präsentiert.

## b.) Ergebnisse nach Wurfgrößen

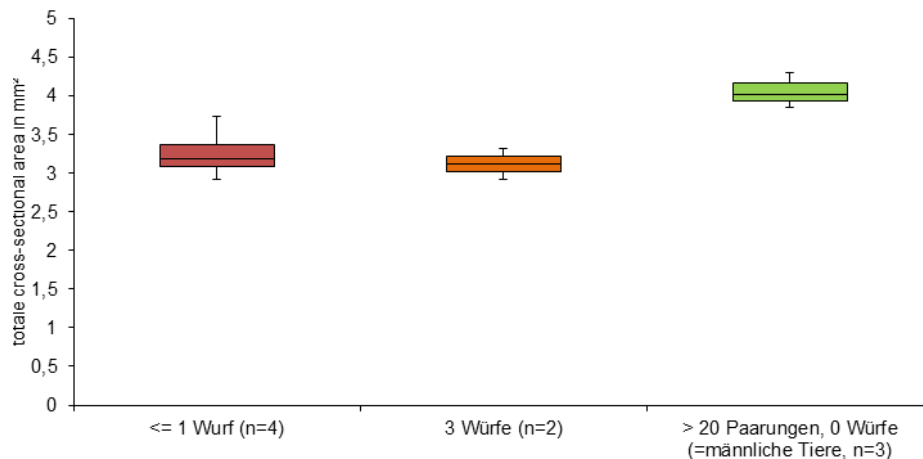
In diesem Abschnitt des Ergebnisteils werden die statistisch signifikanten Untersuchungsergebnisse der computertomographischen Aufarbeitung, der Serumlevels mittels COBAS C111 Analyzer und der knochenhistomorphometrischen Analysen mittels OsteoMeasure™ hinsichtlich der Wurfgrößen sowohl in graphischer – als auch in Textform präsentiert.

### b.1.) xCT Research M+-Daten proximale *Tibia*

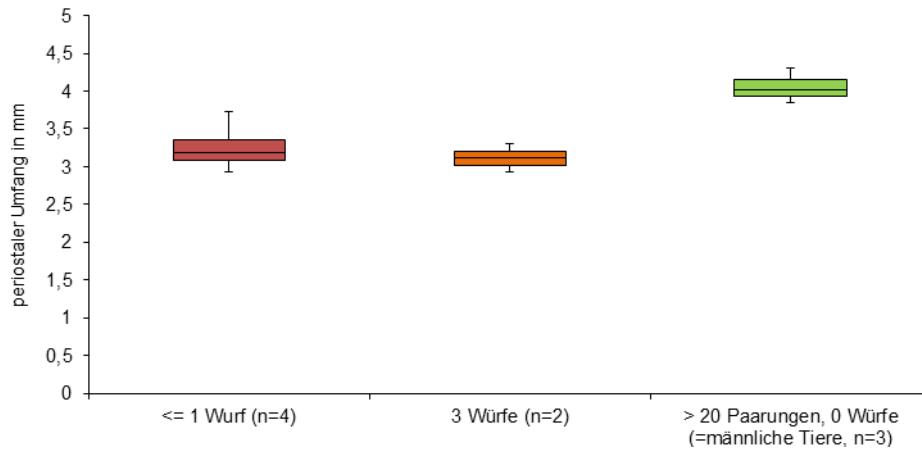
Hinsichtlich der xCT Research M+-Daten der proximalen *Tibia* nach Wurfgrößen wurde der Kruskal-Wallis-Test als statistisches Testverfahren angewandt. Keiner der gemessenen Parameter lag im statistisch signifikanten Bereich, weshalb keine Darstellung erfolgt.

### b.2.) xCT Research M+-Daten *Tibiaschaft*

Zur statistischen Auswertung der xCT Research M+-Daten des *Tibiaschaftes* nach Wurfgrößen diente der Kruskal-Wallis-Test. Die Ergebnisse dieser Auswertung werden in diesem Abschnitt sowohl graphisch als auch in Textform präsentiert.



**Abb. 33 – Totale Knochenfläche *Tibiaschaft* nach Wurfgrößen in mm<sup>2</sup>**



**Abb. 34 – Periostaler Umfang Tibiaschaft nach Wurfgrößen in mm**

**Tab. 10 - Deskriptive Statistik xCT Tibiaschaft (nach Wurfgrößen);  $\sigma$  = Standardabweichung,  $\mu$  = Mittelwert, n = Stichprobenumfang, \*Verpaarungen = männliche Tiere**

Parameter	n (<=1 Wurf)	$\mu$ (<=1 Wurf)	$\sigma$ (<=1 Wurf)	n (3 Würfe)	$\mu$ (3 Würfe)	$\sigma$ (3 Würfe)	n (>20 VP*)	$\mu$ (>20 VP*)	$\sigma$ (>20 VP*)
Trabekuläre Fläche (mm <sup>2</sup> )	4	21.88	4.724	2	20.45	5.020	3	29.633	2.871
Totale Dichte (mg/cm <sup>3</sup> )	4	1023.25	60.893	2	1038.90	103.662	3	903.97	41.153
Totale Cross-Sectional Area (mm <sup>2</sup> )	4	3.09	0.191	2	2.87	0.049	3	3.72	0.171
Kortikale Dichte (mg/cm <sup>3</sup> )	4	1334.33	12.034	2	1349.40	50.205	3	1316.57	17.172
Kortikale Fläche (mm <sup>2</sup> )	4	2.24	0.123	2	2.09	0.184	3	2.41	0.026
Kortikale Dicke (mm)	4	0.47	0.038	2	0.46	0.052	3	0.44	0.012
Periostaler Umfang (mm)	4	6.23	0.191	2	6.00	0.052	3	6.84	0.157
Endokortikaler Umfang (mm)	4	3.25	0.345	2	3.11	0.271	3	4.05	0.226

**Tab. 11 - p-Werte Kruskal-Wallis-Test xCT Tibiaschaft (nach Wurfgrößen)**

Parameter	p-Wert
Trabekuläre Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.127
Totale Dichte (mg/cm <sup>3</sup> )	0.082
Totale Cross-Sectional Area (mm <sup>2</sup> )	0.044
Kortikale Dichte (mg/cm <sup>3</sup> )	0.574
Kortikale Fläche (mm <sup>2</sup> )	0.133
Kortikale Dicke (mm)	0.368
Periostaler Umfang (mm)	0.044
Endokortikaler Umfang (mm)	0.078

In Tab. 10 sind Stichprobenumfang, Mittelwert und Standardabweichung in Hinblick auf die Parameter von xCT Research M<sup>+</sup> und die Wurfgröße dargestellt. Tab. 11 beinhaltet die p-Werte des Kruskal-Wallis-Tests in Hinblick auf die xCT Research M<sup>+</sup>-Daten des Tibiaschaftes.

In Bezug auf die totale Knochenfläche und den periostalen Umfang wiesen die Weibchen mit den meisten Würfen wie erwartet die niedrigsten Werte auf. Hinsichtlich der totalen Knochenfläche lagen die männlichen Tiere mit  $3.72 \pm 0.17 \text{ mm}^2$  am höchsten, danach folgten die Tiere der Gruppe „ $\leq 1$  Wurf“ mit im Mittel  $3.09 \pm 0.191 \text{ mm}^2$  und die niedrigsten Werte wiesen die Tiere der Gruppe „3 Würfe“ mit im Mittel  $2.87 \pm 0.049 \text{ mm}^2$  auf (KW-Test,  $p=0.044$ , Abb.36). Der periostale Umfang der männlichen Tiere war  $6.84 \pm 0.157 \text{ mm}$  am höchsten, es folgten mit  $6.23 \pm 0.191 \text{ mm}$  die Goldhamster der Gruppe „ $\leq 1$  Wurf“ und im niedrigsten Wertebereich lagen die Weibchen mit 3 Würfen mit im Mittel  $6.00 \pm 0.052 \text{ mm}$  (KW-Test,  $p=0.044$ , Abb.37).

Die Parameter trabekuläre Fläche (KW-Test,  $p=0.127$ , Tab.11), totale Dichte (KW-Test,  $p=0.082$ , Tab.11), kortikale Dichte (KW-Test,  $p=0.574$ , Tab.11), kortikale Fläche (KW-Test,  $p=0.133$ , Tab.11), kortikale Dicke (KW-Test,  $p=0.368$ , Tab.11) und endokortikaler Umfang (KW-Test,  $p=0.078$ , Tab.11) lagen nicht im signifikanten Bereich.

b.3.) Serumergebnisse COBAS C111 Analyzer nach Wurfgrößen

Der Kruskal-Wallis-Test wurde zur statistischen Auswertung der Ergebnisse der Serumanalyse nach Wurfgrößen mittels COBAS C111 Analyzer verwendet. Da keiner der gemessenen Parameter im statistisch signifikanten Bereich lag, erfolgt keine Darstellung.

b.4.) OsteoMeasure™ - Daten nach Wurfgrößen proximaler Bereich

Um die Ergebnisse der knochenhistomorphometrischen Analyse mittels OsteoMeasure™ statistisch auszuwerten, wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test gearbeitet. Es lag keiner der Parameter im statistisch signifikanten Bereich, daher erfolgt keine Darstellung.

b.5.) OsteoMeasure™ - Daten nach Wurfgrößen distaler Bereich

Das statistische Auswertungsverfahren für die OsteoMeasure™-Daten nach Wurfgrößen im distalen Bereich war der Kruskal-Wallis-Test. Mit dem ausgewählten statistischen Testverfahren lag keiner der analysierten Parameter im statistisch signifikanten Bereich, weshalb keine Darstellung erfolgt.

#### 4. DISKUSSION

In meiner Diplomarbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass weibliche Goldhamster eine geringere Knochendichte, eine geringere Kalziumdichte und eine geringere Knochendicke aufweisen, da angenommen wurde, dass die weiblichen Tiere, die tragend waren, während der Laktation Kalzium aus ihren eigenen Knochen mobilisieren, um ihre Nachkommen über die Muttermilch mit ausreichend Kalzium zu versorgen. Es wurde bereits in einigen Studien gezeigt, dass gewisse Säugetierarten ihre eigene Knochensubstanz mobilisieren, um ihren Nachwuchs versorgen zu können (Benzie *et al.*, 1955; Ott, Lipkin and Newell-Morris, 1999; Hood, Oftedal and Kunz, 2006; Hood, 2012; Schmidt, Chiba and Hood, 2018). Demzufolge wurde die Annahme getätigt, dass die Weibchen geringere Knochendichten sowie Veränderungen in den Blutwerten (Harnstoff, Kreatinin, Kalzium, Natrium, Phosphor, FGF23) aufweisen. Weiters wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Muttertiere – je mehr Trächtigkeiten sie durchlaufen haben – umso mehr Knochensubstanz für ihre Jungen „geopfert“ haben, wodurch sich ein höheres Risiko für Frakturen etc. entwickelt. Anhand der statistischen Auswertungen kann interpretiert werden, dass die weiblichen Individuen im Bereich der proximalen *Tibia* eine höhere trabekuläre Fläche (Abb. 7) und eine höhere totale Fläche (Abb. 11) besitzen. Wendy Hood *et al.* fanden bei Mäusen heraus, dass die Knochendichte bei Weibchen, die eine kalziumarme Diät hatten, signifikant höhere Verluste in der Knochendichte zeigten, als bei Mäusen auf einer normalen Diät (Schmidt and Hood, 2014). Auch Wang *et al.* zeigten an Mäusen, dass eine kalziumarme Diät Verminderungen in der Knochensubstanz mit sich brachte (Wang, Brown and Bhattacharyya, 1994). Es wird vermutet, dass Spezies, deren Ernährung im Generellen eher kalziumarm ist, in Zeiten der Trächtigkeit und Laktation auf Futterquellen zurückgreifen, die kalziumreich sind (Ruby *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2003; Nelson, Kunz and Humphrey, 2005). Allerdings gibt es bisher keine Publikation, die sich explizit auf einen Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Tieren bezieht. Beim periostalen Umfang hielten sich die beiden Geschlechter in etwa die Waage, wobei die Weibchen geringgradig höher lagen (Abb. 13). Auch beim endokortikalen Umfang, der sich auf den oberflächlichen, kortikalen Knochen, der zur Markhöhle hin gewandt ist (Dempster *et al.*, 2013), bezieht, lagen die Weibchen vorne (Abb. 14). Auch an Ratten wurde bereits nachgewiesen, dass während der Laktation vermehrt Knochensubstanz mobilisiert wird (Peng *et al.*, 1988). Die Einbußen der Knochensubstanz waren umso höher, je mehr Junge im Wurf waren und je kalziumärmer die Diät war, die verfüttert wurde (Peng *et*

al., 1988). Dass die Umfänge bei den weiblichen Goldhamstern höher waren, ergibt sich automatisch daraus, dass ihre totalen Knochenflächen sich höher gestalteten als jene der Männchen (Abb. 11). Demzufolge ist anzunehmen, dass weibliche Goldhamster generell höhere Flächen im Bereich der proximalen *Tibia* aufweisen. In der Literatur gibt es in Bezug auf Goldhamster bis dato keine ähnlichen Studien. Betrachtet man die Knochendichte (Abb. 8), die kortikale Dichte (Abb. 12) und die kortikale Dicke (Abb. 10), erwecken diese Werte zunächst den Eindruck, als würden die Männchen höhere Werte aufweisen. Dies bestätigt die Hypothese, dass Weibchen eigene Knochensubstanz durch die Laktation bzw. sogar mehrere einbüßen, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant, womit diese Hypothese für den Bereich der proximalen *Tibia* zunächst unbestätigt im Raum stehen bleibt. Es ist nämlich möglich, dass die Unterschiede zwischen den Geschlechtern feiner aufgelöst werden müssen bzw. die Effektgröße zu gering war um sie mit einer Stichprobengröße von  $n=3$  Männchen und  $n=6$  Weibchen zu zeigen (Tab. 1). Interessanterweise kehrten sich die Werte im Bereich des *Tibiaschaftes* bei mehreren Parametern um, so dass die männlichen Tiere höhere Werte aufwiesen als die Weibchen. Diese Parameter umfassten die trabekuläre Fläche (Abb. 15), die totale Knochendichte (Abb. 16), die totale Knochenfläche (Abb. 17), den periostalen (Abb. 21) und endokortikalen Umfang (Abb. 22). Auffällig ist, dass sich die meisten Werte generell in den distalen Bereichen der *Tibia* umkehrten. Es könnte sein, dass es generell Unterschiede des Knochenaufbaus zwischen proximaler und distaler *Tibia* gibt, was unbedingt noch näher erforscht werden sollte. Weiters ist besonders hervorzuheben, dass im Bereich des *Tibiaschaftes* auch bei der Knochendichte signifikante Unterschiede gefunden wurden, wonach die männlichen Tiere eine geringere Knochendichte aufwiesen als die weiblichen (Abb. 18), was die erste Hypothese von der Mobilisation von Knochen zur Deckung der Laktationsbedürfnisse widersprechen würde. Bei den xCT Research M+ - Daten hinsichtlich der Wurfgrößen konnte im Bereich „proximale *Tibia*“ kein signifikanter Unterschied zwischen Männchen und Weibchen gefunden werden. Im Bereich „*Tibiaschaft*“ gab es Unterschiede bei der totalen Knochenfläche (Abb. 33) und beim periostalen Umfang (Abb. 34). In der Literatur findet sich, dass die Laktation mit einem erhöhten Knochen turnover und Remodeling in den langen Röhrenknochen, wie *Femur* und *Tibia*, in Verbindung steht (Miller, Omura and Miller, 1989). Hood et.al fanden heraus, dass es mit steigender Wurfgröße vermehrt zu Kannibalismus kommt (Hood, 2012), was vermutlich daran liegt, dass die Kalziummengen, die die vielen Jungen benötigen würden, nicht ohne ein Einbüßen der Knochen- und Lebensqualität der Goldhamster bewerkstelligt werden könnten. Bei der totalen Knochenfläche hatten tatsächlich die männlichen Tiere die



höchsten Werte, während die Weibchen mit den höchsten Wurfgrößen die geringsten Werte aufwiesen (Abb. 33). Dies spricht für meine Ausgangshypothese, dass die weiblichen Goldhamster mit zunehmenden Wurfzahlen und somit zunehmendem Laktationsaufwand ihre Knochensubstanz mobilisieren, um ihre Jungen mit ausreichend Kalzium versorgen zu können. Zusammenfassend lässt sich hinsichtlich der xCT Research M+ - Daten sagen, dass es durchaus Hinweise darauf gibt, dass der Rückgang von Knochensubstanz mit der Anzahl an Würfen in Verbindung steht. Es wäre wünschenswert, weiterführende Studien zu dieser Thematik durchzuführen. Es wäre am sinnvollsten, eine erweiterte Studie durchzuführen, die eine weitaus größere Tieranzahl umfasst, um so zu eindeutig aussagekräftigen Aussagen zu gelangen, und diese Studie als Vorstudie anzusehen. Eine höhere Tieranzahl steht allerdings im Widerspruch zu den 3 R's (Refine, Reduce, Replace) der Tierversuchskunde (Kirk, 2018). Am besten wäre daher, anhand meiner Diplomarbeit, durch Abschätzen der Effektgröße, eine „Poweranalyse“ zur Ermittlung der minimalen, jedoch aussagekräftigsten Stichprobe zu ermitteln. In der Literatur fanden Prange et al. 1979 bereits heraus, dass die weiblichen Tiere zur Unterstützung des Wachstums der Jungen mehr Kalzium über die Nahrung aufnehmen und auch Mineralien aus ihren Knochen mobilisieren (Prange, Anderson and Rahn, 1979). In Hinblick auf die Parameter der Serumanalyse mittels COBAS C111 Analyzer lagen die Phosphorwerte dieser Studie bei den männlichen Tieren höher als bei den weiblichen Tieren. Geht man von der Hypothese aus, dass die Weibchen Knochensubstanz „verlieren“, müsste FGF23 erhöht sein, denn FGF23 inhibiert die Mineralisation des Knochens, indem es die TNAP inhibiert (Andrukhova *et al.*, 2018). Diese Zusammenhänge wurden bei der Maus gezeigt (Andrukhova *et al.*, 2018). FGF23 ist eines der wichtigsten endokrinen Regulatoren des Phosphatmetabolismus (Andrukhova *et al.*, 2012). Da FGF23 die Wiederaufnahme von Phosphat im proximalen *Tubulus contortus* (Erben, 2018a) unterdrückt, wie in der Einleitung erwähnt, müsste die Konzentration von Phosphat bei weiblichen Tieren niedriger sein, falls FGF23 erhöht wäre. Tatsächlich war der Phosphorgehalt bei den weiblichen Tieren niedriger als bei den männlichen Tieren (Abb. 24), aber FGF23 war bei der statistischen Auswertung bei den männlichen Goldhamstern um 42% (ausgehend von den Mittelwerten) höher als bei den weiblichen Tieren (Tab. 5). Es kann daher wiederum nicht ausgeschlossen werden, dass die geringe Stichprobe bei den Männchen und Weibchen zu diesem Ergebnis führte denn in die richtige Richtung schien der Trend sehr wohl zu gehen (Tab. 6). In der einschlägigen Literatur wurde der Aspekt des Einflusses der Laktation auf FGF23 meines Wissens nach noch nicht untersucht. Zukünftige Studien wären daher wünschenswert. Die Natriumwerte waren im Serum der Weibchen um

3.1% höher als bei den Männchen (Abb. 25, Tab. 6). FGF 23 ist ein Kalzium- und Natrium-erhaltendes Hormon und steigert die Reabsorption von Kalzium und Natrium (Andrukhova *et al.*, 2016). Die bei den weiblichen Individuen höheren Natriumwerte würden dafür sprechen, dass FGF23 eine erhöhte Aktivität haben müsste. Hinsichtlich der Chlorid- (Abb. 26), ALP- (Abb. 23) und Cholesterinserumgehalte (Abb. 27) zeigten sich ebenfalls statistisch signifikante Unterschiede der beiden Geschlechter (Tab. 6). Die alkalische Phosphatase war bei den weiblichen Tieren höher als bei den männlichen Tieren. Bedenkt man jedoch, dass FGF23 ein Suppressor der gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase ist (Erben, 2018b), decken sich die Serumergebnisse der Goldhamster nicht damit, was aber dadurch begründet sein könnte, dass der Stichprobenumfang nicht ausreichend groß war. Die anderen signifikanten Parameter der Serumanalyse könnten ein Hinweis darauf sein, dass auch sie einen unterschiedlichen Einfluss auf den Stoffwechsel der Goldhamster haben, wozu noch weitere Studien durchgeführt werden sollten. Zusammenfassend lässt sich in Bezug auf die Serumparameter sagen, dass eindeutig Hinweise darauf vorliegen, dass Weibchen eine erhöhte FGF23-Aktivität besitzen, die Datenlage dazu jedoch noch kein eindeutiges Bild lieferte. Auch in diesem Fall wäre die beste Lösung, eine weitere Studie mit einem treffsicheren Stichprobenumfang (siehe oben) durchzuführen, um zu sehen, ob eindeutigere Ergebnisse erlangt werden können. In Bezug auf die Wurfgrößen kann die Hypothese, dass Weibchen signifikant andere Serumwerte besitzen, je öfter sie trächtig waren, verworfen werden. In Anbetracht der Histomorphometrie-Ergebnisse mittels OsteoMeasure™, mit denen unter anderem eruiert werden kann, ob Tiere osteopenisch sind (Erben and Glösmann, 2012), also zu wenig Knochensubstanz aufweisen, zeigte sich im proximalen Bereich, also vor Verwerfen der 500 µm, dass die Weibchen hinsichtlich der Verhältnisse „Knochenvolumen/Totales Volumen (Abb. 28)“, „Mineralisiertes Volumen/Totales Volumen (Abb. 29) und beim Parameter Trabekelzahl (Abb. 32) signifikant höhere Werte als die Männchen aufwiesen (Tab. 8). Dass die Trabekelzahl bei den weiblichen Tieren höher war als bei den männlichen Tieren, könnte ein Hinweis darauf sein, dass vermehrt neuer Knochen nachgewiesen wird, denn PTH (Parathormon), ein Hormon, das die Calciumhomöostase beeinflusst, wirkt sich steigernd auf die Osteoblasten-Aktivität im trabekulären und kortikalen Knochen aus, wenn es erhöht ist (Calvi *et al.*, 2001). Dass die Verhältnisse bei den Weibchen höher ausfielen als bei den männlichen Tieren, unterstreicht meine Vermutung der erhöhten Knochenneubildung bei weiblichen Goldhamstern. Hinsichtlich der Wurfgrößen ergaben sich bei den OsteoMeasure™-Daten keine signifikanten Unterschiede. Hood *et al.* fanden 2012 in einer Studie an Mäusen heraus, dass die

Wurfgröße keine Unterschiede hinsichtlich Körperkomposition und Stärke des Knochens bewirkte. Allerdings war das Gesamtkalzium im Körper der weiblichen Tiere bei den nicht-reproduktiven Weibchen signifikant höher (Hood, 2012), was wiederum dafür sprechen würde, dass reproduktive Weibchen Kalzium mobilisieren. Auch Schmidt et al. fanden 2018 an Schweinen heraus, dass sich die Wurfgröße nicht auf den Knochenstoffwechsel der Muttertiere auswirkte (Schmidt, Chiba and Hood, 2018). Alle Parameter meiner Diplomarbeit in Zusammenhang setzend, ergibt sich der Schluss, dass es klare Hinweise für eine Mobilisation von Knochenmaterial bei den Weibchen gibt und auch dass der Na- und P-Stoffwechsel in der Laktation verändert ist. Diese Beobachtung ist neu und ruft nach weiteren experimentellen Studien.

## Zusammenfassung

Die Aufzucht von Jungen ist eine enorme Herausforderung für Mensch und Tier. Vor allem die Laktation ist mit besonderem Energieaufwand verbunden. In den vergangenen Jahren gab es einige Hinweise darauf, dass weibliche Tiere während der Laktation ihr eigenes Kalzium mobilisieren, um ihren Nachwuchs ausreichend mit diesem Mineralstoff zu versorgen. In dieser Diplomarbeit wurde dies erstmals am Modelltier „Goldhamster“ untersucht. Goldhamster können Würfe mit sehr hohen Wurfgrößen (bis zu 16 Jungtiere) haben, die Jungen, die Nesthocker sind, werden dann ungefähr 3 Wochen von der Mutter gesäugt, was enormen Milchmengen und somit auch Kalziummengen entspricht. Es wurde daher angenommen, dass weibliche Tiere geringere Knochendichten und geringere Knochenflächen aufweisen. Weiters wurde vermutet, dass – je mehr Würfe die Weibchen hatten – dies umso stärker ausgeprägt ist. Auch wurden Unterschiede in Bezug auf die Parameter, die durch FGF23 beeinflusst werden (Kalzium, Natrium, Phosphor, Kreatinin, Harnstoff) angenommen. Die Goldhamster wurden in dieser Diplomarbeit zum einen hinsichtlich der Unterschiede männlich versus weiblich und zum anderen hinsichtlich unterschiedlicher Wurfgrößen untersucht. Hierzu wurden eine computertomographische Analyse sowie eine knochenhistomorphometrische Analyse der Goldhamstertibiae, sowie eine quantitative Auswertung der Parameter des Blutserums der Tiere durchgeführt. Besonders im Bereich des Tibiaschaftes ergaben sich eindeutige Hinweise darauf, dass weibliche Goldhamster Einbußen in ihrem eigenen Kalzium auf sich nehmen, da sie signifikant weniger trabekuläre Flächen und totale Knochenflächen aufwiesen. Dies konnte auch hinsichtlich der Wurfgrößen gezeigt werden, da die Tiere mit den meisten Würfen die geringsten Flächen aufwiesen. Auch hinsichtlich der Blutparameter deckten sich einige Annahmen mit den Ergebnissen, wie beispielsweise beim Serumphosphorgehalt (männlich > weiblich) und beim Serumnatriumgehalt (weiblich > männlich). Diese Ergebnisse weisen alle darauf hin, dass weibliche Goldhamster ihre eigene Knochensubstanz für ihren Nachwuchs opfern.

## Summary

The rearing of young is an enormous challenge for humans and animals. Lactation in particular is associated with a special energy input. In recent years, there has been some evidence that female animals mobilize their own calcium during lactation in order to supply their offspring with sufficient amounts of it. In this diploma thesis this was investigated for the first time on the golden hamster. Golden hamsters can have litters with high litter sizes (up to 16 young), the young, which are nest-stools, are then suckled by the mother for about 3 weeks, which corresponds to enormous amounts of milk and thus also calcium. It was therefore assumed that female animals have lower bone densities and smaller bone areas. It was also assumed that the more litters the females had, the more pronounced this is. Differences in parameters influenced by FGF23 (calcium, sodium, phosphorus, creatinine, urea) were also assumed. In this work, the animals were examined on the one hand with regard to the differences between male and female and on the other hand with regard to different litter sizes. For this purpose, a computer tomographic analysis as well as bone histomorphometry of the tibiae and a quantitative evaluation of the blood serum parameters were carried out. Especially in the area of the *tibia* shaft, clear indications were found that female animals suffered losses in their own calcium, as they had significantly less trabecular surfaces and total bone areas. This could also be shown in terms of litter sizes, as the animals with the most litters had the smallest areas. Some assumptions regarding blood parameters were also consistent with the results, such as serum phosphorus (male > female) and serum sodium (female > male). These results all indicate that female golden hamsters sacrifice their own bone substance for their offspring.

## Literaturverzeichnis

- Adams, R. A., Pedersen, S. C., Thibault, K. M., Jadin, J. and Petru, B. (2003) 'Calcium as a limiting resource to insectivorous bats: Can water holes provide a supplemental mineral source?', *Journal of Zoology*. doi: 10.1017/S0952836903003613.
- Andrukhova, O., Zeitz, U., Goetz, R., Mohammadi, M., Lanske, B. and Erben, R. G. (2012) 'FGF23 acts directly on renal proximal tubules to induce phosphaturia through activation of the ERK1/2-SGK1 signaling pathway', *Bone*. doi: 10.1016/j.bone.2012.05.015.
- Andrukhova, O., Slavic, S., Smorodchenko, A., Zeitz, U., Shalhoub, V., Lanske, B., Pohl, E.

- E. and Erben, R. G. (2014) 'FGF23 regulates renal sodium handling and blood pressure', *EMBO Molecular Medicine*. doi: 10.1002/emmm.201303716.
- Andrukhova, O., Streicher, C., Zeitz, U. and Erben, R. G. (2016) 'Fgf23 and parathyroid hormone signaling interact in kidney and bone', *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd, 436, pp. 224–239. doi: 10.1016/j.mce.2016.07.035.
- Andrukhova, O., Bayer, J., Schüler, C., Zeitz, U., Murali, S. K., Ada, S., Alvarez-Pez, J. M., Smorodchenko, A. and Erben, R. G. (2017) 'Klotho Lacks an FGF23-Independent Role in Mineral Homeostasis', *Journal of Bone and Mineral Research*, 32(10), pp. 2049–2061. doi: 10.1002/jbmr.3195.
- Andrukhova, O., Schüler, C., Bergow, C., Petric, A. and Erben, R. G. (2018) 'Augmented fibroblast growth factor-23 secretion in bone locally contributes to impaired bone mineralization in chronic kidney disease in mice', *Frontiers in Endocrinology*, 9(JUN). doi: 10.3389/fendo.2018.00311.
- Ärnlöv, J., Carlsson, A. C., Sundström, J., Ingelsson, E., Larsson, A., Lind, L. and Larsson, T. E. (2013) 'Higher fibroblast growth factor-23 increases the risk of all-cause and cardiovascular mortality in the community', *Kidney International*. doi: 10.1038/ki.2012.327.
- Benzie, D., Boyne, A. W., Dalgarno, A. C., Duckworth, J., Hill, R. and Walker, D. M. (1955) 'Studies of the skeleton of the sheep I. The effect of different levels of dietary calcium during pregnancy and lactation on individual bones', *The Journal of Agricultural Science*. 2009/03/27. Cambridge University Press, 46(4), pp. 425–440. doi: DOI: 10.1017/S0021859600040491.
- Bouxsein, M. L. (2005) 'Determinants of skeletal fragility', *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*. doi: 10.1016/j.berh.2005.07.004.
- Broe, K. E., Hannan, M. T., Kiely, D. K., Cali, C. M., Cupples, L. A. and Kiel, D. P. (2000) 'Predicting Fractures Using Bone Mineral Density: A Prospective Study of Long-Term Care Residents', *Osteoporosis International*, 11(9), pp. 765–771. doi: 10.1007/s001980070055.
- Brommage, R. (1989) 'Measurement of calcium and phosphorus fluxes during lactation in the rat', *Journal of Nutrition*. doi: 10.1093/jn/119.3.428.
- Calvi, L. M., Sims, N. A., Hunzelman, J. L., Knight, M. C., Giovannetti, A., Saxton, J. M., Kronenberg, H. M., Baron, R. and Schipani, E. (2001) 'Activated parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor in osteoblastic cells differentially affects cortical and trabecular bone', *Journal of Clinical Investigation*. doi: 10.1172/JCI11296.
- Clarke, B. (2008) 'Normal bone anatomy and physiology.', *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*. doi: 10.2215/CJN.04151206.

- Dempster, D. W., Compston, J. E., Drezner, M. K., Glorieux, F. H., Kanis, J. A., Malluche, H., Meunier, P. J., Ott, S. M., Recker, R. R. and Parfitt, A. M. (2013) 'Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee', *Journal of Bone and Mineral Research*. doi: 10.1002/jbmr.1805.
- Downey, P. A. and Siegel, M. I. (2006) 'Bone biology and the clinical implications for osteoporosis', *Physical Therapy*. doi: 10.1093/ptj/86.1.77.
- von Engelhardt, W. and Breves, G. (2005) 'Physiologie der Haustiere', *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*. doi: 10.1024/0036-7281.147.11.507.
- Erben, R. G., Kohn, B., Weiser, H., Sinowatz, F. and Rambeck, W. A. (1990) 'Role of vitamin D metabolites in the prevention of the osteopenia induced by ovariectomy in the axial and appendicular skeleton of the rat', *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*. doi: 10.1007/BF02023080.
- Erben, R. G. (2017) 'Pleiotropic Actions of FGF23', *Toxicologic Pathology*, 45(7), pp. 904–910. doi: 10.1177/0192623317737469.
- Erben, R. G. (2018a) 'Physiological actions of fibroblast growth factor-23', *Frontiers in Endocrinology*, 9(MAY). doi: 10.3389/fendo.2018.00267.
- Erben, R. G. (2018b) 'α-Klotho's effects on mineral homeostasis are fibroblast growth factor-23 dependent', *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 27(4), pp. 229–235. doi: 10.1097/MNH.0000000000000415.
- Erben, R. G. (2019) 'Editorial: Endocrine and paracrine role of FGF23 and klotho in health and disease', *Frontiers in Endocrinology*. doi: 10.3389/fendo.2019.00002.
- Erben, R. G. and Andrukhova, O. (2017) 'FGF23-Klotho signaling axis in the kidney', *Bone*. doi: 10.1016/j.bone.2016.09.010.
- Erben, R. G. and Glösmann, M. (2012) 'Histomorphometry in rodents', *Methods in Molecular Biology*. doi: 10.1007/978-1-61779-415-5\_19.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. and Cerri, P. S. (2015) 'Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells', *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2015/421746.
- Ford, K., Latic, N., Slavic, S., Zeitz, U., Dolezal, M., Andrukhov, O., Erben, R. G. and Andrukhova, O. (2018) 'Lack of vitamin D signalling per se does not aggravate cardiac functional impairment induced by myocardial infarction in mice', *PLoS ONE*, 13(10), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0204803.
- Gutiérrez, O. M., Januzzi, J. L., Isakova, T., Laliberte, K., Smith, K., Collerone, G., Sarwar,

- A., Hoffmann, U., Coglianese, E., Christenson, R., Wang, T. J., DeFilippi, C. and Wolf, M. (2009) 'Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease', *Circulation*. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.844506.
- Hood, W. R. (2012) 'A test of bone mobilization relative to reproductive demand: Skeletal quality is improved in cannibalistic females with large litters', *Physiological and Biochemical Zoology*, 85(4), pp. 385–396. doi: 10.1086/666057.
- Hood, W. R., Oftedal, O. T. and Kunz, T. H. (2006) 'Variation in body composition of female big brown bats (*Eptesicus fuscus*) during lactation', *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. doi: 10.1007/s00360-006-0102-y.
- Hu, M. C., Shi, M., Zhang, J., Pastor, J., Nakatani, T., Lanske, B., Razzaque, M. S., Rosenblatt, K. P., Baum, M. G., Kuro-o, M. and Moe, O. W. (2010) 'Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule', *The FASEB Journal*. doi: 10.1096/fj.10-154765.
- Kirk, R. G. W. (2018) 'Recovering The Principles of Humane Experimental Technique', *Science, Technology, & Human Values*. doi: 10.1177/0162243917726579.
- Kuro-o, M. and Moe, O. W. (2017) 'FGF23- $\alpha$ Klotho as a paradigm for a kidney-bone network', *Bone*, 100, pp. 4–18. doi: 10.1016/j.bone.2016.11.013.
- Kurosu, H., Ogawa, Y., Miyoshi, M., Yamamoto, M., Nandi, A., Rosenblatt, K. P., Baum, M. G., Schiavi, S., Hu, M. C., Moe, O. W. and Kuro-o, M. (2006) 'Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by Klotho', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.C500457200.
- Lanske, B. and Razzaque, M. S. (2007) 'Premature aging in klotho mutant mice: Cause or consequence?', *Ageing Research Reviews*. doi: 10.1016/j.arr.2007.02.002.
- Li, S. A., Watanabe, M., Yamada, H., Nagai, A., Kinuta, M. and Takei, K. (2004) 'Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice', *Cell Structure and Function*. doi: 10.1247/csf.29.91.
- Manolagas, S. C. (2000) 'Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis\*', *Endocrine Reviews*. doi: 10.1210/edrv.21.2.0395.
- Miller, M. A., Omura, T. H. and Miller, S. C. (1989) 'Increased cancellous bone remodeling during lactation in beagles', *Bone*. doi: 10.1016/8756-3282(89)90065-3.
- Nelson, S. L., Kunz, T. H. and Humphrey, S. R. (2005) 'Folivory in fruit bats: Leaves provide a natural source of calcium', *Journal of Chemical Ecology*. doi: 10.1007/s10886-005-5920-y.
- Ohrnberger, S. A., Monclús, R., Rödel, H. G. and Valencak, T. G. (2016) 'Ambient temperature affects postnatal litter size reduction in golden hamsters', *Frontiers in Zoology*.



doi: 10.1186/s12983-016-0183-8.

Ott, S. M., Lipkin, E. W. and Newell-Morris, L. (1999) 'Bone physiology during pregnancy and lactation in young macaques', *Journal of Bone and Mineral Research*. doi: 10.1359/jbmr.1999.14.10.1779.

Peng, T. C., Garner, S. C., Kusy, R. P. and Hirsch, P. F. (1988) 'Effect of number of suckling pups and dietary calcium on bone mineral content and mechanical properties of femurs of lactating rats', *Bone and Mineral*.

Prange, H. D., Anderson, J. F. and Rahn, H. (1979) 'Scaling of Skeletal Mass to Body Mass in Birds and Mammals', *The American Naturalist*. doi: 10.1086/283367.

Reilly, D. T. and Burstein, A. H. (1975) 'The elastic and ultimate properties of compact bone tissue', *Journal of Biomechanics*. doi: 10.1016/0021-9290(75)90075-5.

Ruby, J., Nathan, P. T., Balasingh, J. and Kunz, T. H. (2000) 'Chemical Composition of Fruits and Leaves Eaten by Short-Nosed Fruit Bat, *Cynopterus sphinx*', *Journal of Chemical Ecology*, 26(12), pp. 2825–2841. doi: 10.1023/A:1026446011693.

Schmidt, C. M., Chiba, L. I. and Hood, W. R. (2018) 'The effects of parity and litter size on bone metabolic activity in pregnant and lactating sows', *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. doi: 10.1111/jpn.12958.

Schmidt, C. M. and Hood, W. R. (2014) 'Bone loss is a physiological cost of reproduction in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*)', *Mammalian Biology*. doi: 10.1016/j.mambio.2013.09.003.

Shiraki-Iida, T., Aizawa, H., Matsumura, Y., Sekine, S., Iida, A., Anazawa, H., Nagai, R., Kuro-O, M. and Nabeshima, Y. I. (1998) 'Structure of the mouse *klotho* gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein', *FEBS Letters*. doi: 10.1016/S0014-5793(98)00127-6.

Slavic, S., Ford, K., Modert, M., Becirovic, A., Handschuh, S., Baierl, A., Katica, N., Zeitz, U., Erben, R. G. and Andrukhova, O. (2017) 'Genetic Ablation of *Fgf23* or *Klotho* Does not Modulate Experimental Heart Hypertrophy Induced by Pressure Overload', *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-017-10140-4.

Speakman, J. R. (2008) 'The physiological costs of reproduction in small mammals', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. doi: 10.1098/rstb.2007.2145.

Takeshita, K., Fujimori, T., Kurotaki, Y., Honjo, H., Tsujikawa, H., Yasui, K., Lee, J. K., Kamiya, K., Kitaichi, K., Yamamoto, K., Ito, M., Kondo, T., Iino, S., Inden, Y., Hirai, M., Murohara, T., Kodama, I. and Nabeshima, Y. I. (2004) 'Sinoatrial Node Dysfunction and

- Early Unexpected Death of Mice with a Defect of *klotho* Gene Expression', *Circulation*. doi: 10.1161/01.CIR.0000124224.48962.32.
- Urakawa, I., Yamazaki, Y., Shimada, T., Iijima, K., Hasegawa, H., Okawa, K., Fujita, T., Fukumoto, S. and Yamashita, T. (2006) 'Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23', *Nature*. doi: 10.1038/nature05315.
- Wang, C. H., Brown, S. and Bhattacharyya, M. H. (1994) 'Effect of cadmium on bone calcium and <sup>45</sup>Ca in mouse dams on a calcium-deficient diet: Evidence of itai-itai-like syndrome', *Toxicology and Applied Pharmacology*. doi: 10.1006/taap.1994.1168.
- Wassertheil, S. and Cohen, J. (1970) 'Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences', *Biometrics*. doi: 10.2307/2529115.
- WRONSKI, T. J., HALLORAN, B. P., BIKLE, D. D., GLOBUS, R. K. and MOREY-HOLTON, E. R. (1986) 'Chronic Administration of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: Increased Bone but Impaired Mineralization\*', *Endocrinology*, 119(6), pp. 2580–2585. doi: 10.1210/endo-119-6-2580.
- Wysolmerski, J. J. (2002) 'The evolutionary origins of maternal calcium and bone metabolism during lactation', *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. doi: 10.1023/A:1022800716196.
- Yuan, Q., Jiang, Y., Zhao, X., Sato, T., Densmore, M., Schüler, C., Erben, R. G., McKee, M. D. and Lanske, B. (2014) 'Increased osteopontin contributes to inhibition of bone mineralization in FGF23-deficient mice', *Journal of Bone and Mineral Research*. doi: 10.1002/jbmr.2079.

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 – Knochenhistologie, unverändert übernommen aus <a href="http://www.siumed.edu/~dking2/ssb/NM005b.htm">http://www.siumed.edu/~dking2/ssb/NM005b.htm</a> .....	12
Abb. 2: Osteoblast eines Knochens, selbst gezeichnet, Najsar 2019 .....	12
Abb. 3 – Osteoklast eines Knochens, selbst gezeichnet, Najsar 2019 .....	14
Abb. 4 – Knochengewebemodellierung, selbst gezeichnet, Najsar 2019 .....	14
Abb. 5 a-d – Von links nach rechts: Einspannen des Blocks (5a), Sägen (5b), Feilen (5c) und das fertige Endprodukt (5d) .....	18
Abb. 6 – Anatomisches Schema der <i>Tibia</i> und <i>Fibula</i> inklusive Kennzeichnung der Bereiche proximale <i>Tibia</i> , distale <i>Tibia</i> , kranialer <i>Tibiaschaft</i> , kaudaler <i>Tibiaschaft</i> und <i>Fibulaköpfchen</i> , selbst gezeichnet, Najsar 2020 .....	23
Abb. 7 – Trabekuläre Fläche proximale <i>Tibia</i> männlich vs. weiblich in mm <sup>2</sup> .....	23
Abb. 8 – Totale Dichte proximale <i>Tibia</i> männlich vs. weiblich in mg/cm <sup>3</sup> .....	24
Abb. 9 – Kortikale Fläche proximale <i>Tibia</i> männlich vs. weiblich in mm <sup>2</sup> .....	24
Abb. 10 – Kortikale Dicke proximale <i>Tibia</i> männlich vs. weiblich in mm .....	24
Abb. 11 – Totale Knochenfläche proximale <i>Tibia</i> männlich vs. weiblich in mm <sup>2</sup> .....	25
Abb. 12 – Kortikale Dichte proximale <i>Tibia</i> männlich vs. weiblich in mg/cm <sup>3</sup> .....	25
Abb. 13 – Periostaler Umfang proximale <i>Tibia</i> männlich vs. weiblich in mm .....	25
Abb. 14 – Endokortikaler Umfang proximale <i>Tibia</i> männlich vs. weiblich in mm .....	26
Abb. 15 – Trabekuläre Fläche <i>Tibiaschaft</i> männlich vs. weiblich in mm <sup>2</sup> .....	28

Abb. 16 – Totale Dichte <i>Tibiaschaft</i> männlich vs. weiblich in mg/cm <sup>3</sup> .....	28
Abb. 17 – Totale Knochenfläche <i>Tibiaschaft</i> männlich vs. weiblich in mm <sup>2</sup> .....	29
Abb. 18 – Kortikale Dichte <i>Tibiaschaft</i> männlich vs. weiblich in mg/cm <sup>3</sup> .....	29
Abb. 19 – Kortikale Fläche <i>Tibiaschaft</i> männlich vs. weiblich in mm <sup>2</sup> .....	29
Abb. 20 – Kortikale Dicke <i>Tibiaschaft</i> männlich vs. weiblich in mm .....	30
Abb. 21 – Periostaler Umfang <i>Tibiaschaft</i> männlich vs. weiblich in mm .....	30
Abb. 22 – Endokortikaler Umfang <i>Tibiaschaft</i> männlich vs. weiblich in mm.....	30
Abb. 23 – Serumgehalt der alkalischen Phosphatase nach Geschlecht in U/L.....	33
Abb. 24 – Serum-Phosphorgehalt nach Geschlecht in mmol/L .....	33
Abb. 25 – Serum-Natriumgehalt nach Geschlecht in mmol/L.....	34
Abb. 26 – Serum-Chloridgehalt nach Geschlecht in mmol/L.....	34
Abb. 27 – Serum-Cholesteringehalt nach Geschlecht in mmol/L .....	34
Abb. 28 – Verhältnis Knochenvolumen/Totales Volumen proximaler Bereich männlich vs. weiblich in %.....	38
Abb. 29 – Verhältnis mineralisiertes Volumen/Totales Volumen proximaler Bereich männlich vs. weiblich in %.....	38
Abb. 30 – Verhältnis Knochenoberfläche/Totales Volumen proximaler Bereich männlich vs. weiblich in %.....	39
Abb. 31 – Trabekelseparation proximaler Bereich männlich vs. weiblich in µm.....	39
Abb. 32 – Trabekelzahl proximaler Bereich männlich vs. weiblich in mm .....	39

Abb. 33 – Totale Knochenfläche <i>Tibiaschaft</i> nach Wurfgrößen in mm <sup>2</sup> .....	43
Abb. 34 – Periostaler Umfang <i>Tibiaschaft</i> nach Wurfgrößen in mm.....	44
Tab. 1 - Deskriptive Statistik xCT proximale <i>Tibia</i> männlich vs. weiblich; σ = Standardabweichung, μ = Mittelwert, n = Stichprobenumfang.....	26
Tab. 2 - p-Werte Mann-Whitney U-Test sowie Korrelationskoeffizient r nach Pearson xCT Research M+-Daten proximale <i>Tibia</i> männlich vs. weiblich; 0.10 ≤ 0.3 entspricht einem schwachen Effekt, 0.30 ≤ r < 0.5 entspricht einem mittleren Effekt, r > 0.5 entspricht einem starken Effekt.....	26
Tab. 3: Deskriptive Statistik xCT <i>Tibiaschaft</i> männlich vs. weiblich; σ = Standardabweichung, μ = Mittelwert, n = Stichprobenumfang.....	31
Tab. 4 - p-Werte Mann-Whitney U-Test sowie Korrelationskoeffizient r nach Pearson xCT Research M+-Daten <i>Tibiaschaft</i> männlich vs. weiblich; 0.10 ≤ 0.3 entspricht einem schwachen Effekt, 0.30 ≤ r < 0.5 entspricht einem mittleren Effekt, r > 0.5 entspricht einem starken Effekt .....	31
Tab. 5: Deskriptive Statistik Serumwerte des COBAS 111 Analyzer männlich vs. weiblich; σ= Standardabweichung, μ = Mittelwert, n = Stichprobenumfang, *bei einem Tier war der Wert nicht messbar .....	35
Tab. 6 - p-Werte Mann-Whitney U-Test sowie Korrelationskoeffizient r nach Pearson der Serumwerte des COBAS 111 Analyzer männlich vs. weiblich; 0.10 ≤ 0.3 entspricht einem schwachen Effekt, 0.30 ≤ r < 0.5 entspricht einem mittleren Effekt, r > 0.5 entspricht einem starken Effekt.....	36
Tab. 7 - Deskriptive Statistik OsteoMeasure™-Daten "proximaler Bereich" männlich vs. weiblich; σ= Standardabweichung, μ = Mittelwert, n = Stichprobenumfang, *bei einem Tier war der Wert nicht messbar, **bei 3 Tieren war der Wert nicht messbar, ***OF= Oberfläche.....	40
Tab. 8 - p-Werte Mann-Whitney U-Test sowie Korrelationskoeffizienten r nach Pearson der OsteoMeasure™-Daten "proximaler Bereich" männlich vs. weiblich; 0.10 ≤ 0.3 entspricht	

einem schwachen Effekt,  $0.30 \leq r < 0.5$  entspricht einem mittleren Effekt,  $r > 0.5$  entspricht einem starken Effekt; OF = Oberfläche, Vol. = Volumen ..... 40

Tab. 9 - Deskriptive Statistik OsteoMeasure™-Daten "distaler Bereich" männlich vs. weiblich;  $\sigma$  = Standardabweichung,  $\mu$  = Mittelwert, n = Stichprobenumfang, \*bei einem Tier war der Wert nicht messbar, \*\*bei einem Tier konnten die Werte nicht gemessen werden, da kein Schnitt aus dem „distalen Bereich“ zur Auswertung verfügbar war, \*\*\*zusätzlich zum Tier von \*\* war dieser Wert bei einem Tier nicht im messbaren Bereich, \*\*\*\*OF=Oberfläche ..... 42

Tab. 10 - Deskriptive Statistik xCT Tibiaschaft (nach Wurfgrößen);  $\sigma$  = Standardabweichung,  $\mu$  = Mittelwert, n = Stichprobenumfang, \*Verpaarungen = männliche Tiere ..... 44

Tab. 11 - p-Werte Kruskal-Wallis-Test xCT Tibiaschaft (nach Wurfgrößen) ..... 45

## Anhang

Veterinärmedizinische Universität Wien  
 Department für Naturwissenschaften  
 Institut für Pathophysiologie  
 Veterinärplatz 1  
 A-1210 Wien

SOP IMMA-Einbettung

### **Standard Operating Procedure** **MMA-Einbettung von unentkalkten Knochen für Histochemie** **und Immunhistochemie**

**Verfasser:** Dr. Reinhold G. Erben

**Geprüft und genehmigt:**

**Laborleiter:** \_\_\_\_\_ **Datum:** \_\_\_\_\_

#### A. Zweck

Diese SOP beschreibt die Fixierung und Einbettung von unentkalkten Knochen in einer modifizierten Methylmethacrylat (MMA)-Einbettung, die auch für Histochemie und Immunhistochemie geeignet ist.

#### B. Vorgehensweise

1. Die Knochen werden bei der Nekropsie sorgfältig von anhängenden Geweberesten befreit und so schnell wie möglich in 40% Ethanol bei 4° C fixiert. Die Dauer dieser Fixierung beträgt 48 Stunden. Alternativ ist für eine optimale Erhaltung der Gewebemorphologie die Fixierung in 4% Paraformaldehyd (PFA) bei 4° C für 24 Stunden möglich. Danach wird das PFA in 0.1 M Phosphat-Puffer + 10% Sucrose bei 4° C für 24 Stunden ausgewaschen. Der Phosphat-Puffer sollte zumindest 1 Mal ausgetauscht werden. Zur gleichmäßigen Durchmischung des Fixans wird für beide Fixierungen ein Magnetrührer verwendet. Die Kennzeichnung der Proben erfolgt über mit Bleistift beschriftete Papierschildchen, die zusammen mit den Knochen in die Histo-Körbchen gegeben werden. Bei Fixierung in Ethanol wird die Aktivität von alkalischer Phosphatase und tartrat-resistenter saurer Phosphatase erhalten, die Fixierung mit PFA führt jedoch zu einer deutlichen Reduktion der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase.
2. Die fixierten Knochen werden nach folgendem Protokoll bei 4° C auf einem Magnetrührer je nach Probengröße entwässert und infiltriert:

70% Ethanol	1-4 Tage
96% Ethanol	1-4 Tage
100% Isopropanol	1-2 Tage
100% Isopropanol	1-2 Tage
Xylol	1-4 Tage
Xylol	1-4 Tage
MMA 1	2-4 Tage
MMA 2	2-4 Tage
MMA 3	2-4 Tage

3. Die Knochen werden in Rollrandgläsern eingebettet. Es werden Gläser mit vorgefertigten MMA-Böden verwendet. Für die Böden werden ca. 3 – 5 ml frisch angesetzte, kalte *Polymerisations-Lösung für Böden* in jedes Glas gegeben, die Gläser sorgfältig mit CO<sub>2</sub> begast (pro Boden 20–30 Sek. lang), sofort verschlossen und anschließend bei 4° C im Kühlschrank polymerisiert. Eine Kühlung der Gläser während des Begasens ist nicht notwendig.
4. Für die Einbettung ist es wichtig, dass der gesamte Vorgang auf (Wasser-) Eis durchgeführt wird und die Polymerisationslösung sich bei keinem Schritt auf Raumtemperatur erwärmen kann. Die verschlossenen Rollrandgläser werden auf Eis vorgekühlt. Nach dem Öffnen der Gläser wird sofort gekühlte Polymerisationslösung eingefüllt und die Gläser wieder auf Eis gestellt. Die infiltrierten Knochen werden mit den zugehörigen Papierschildchen in den Rollrandgläsern auf die MMA-Böden platziert und die Gläser verschlossen. Die Gläser müssen luftdicht verschlossen sein, da der Kunststoff sonst nicht aushärtet (eventuell mit Parafilm umwickeln). Die Gläser mit den Knochen werden sofort in die BINDER Klimakammer verbracht und dort durch Start des Polymerisations-Programmes polymerisiert.

### C. Lösungen

#### 4% PFA-Fixierlösung

8 g Paraformaldehyd-Pulver

ad 100 ml Aqua dest. (8%ige Lösung)

Auf Magnetrührer mit Heizplatte solange erhitzen (ca. 80° C), bis das PFA vollständig gelöst ist. Dann Tropfen für Tropfen 2 M NaOH (bei größeren Flüssigkeitsmengen ab ca. 0,5 Liter 10 M NaOH) zugeben, bis sich die Lösung schlagartig klärt. Nach Abkühlen 1:1 mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 mischen, den pH-Wert kontrollieren und gegebenenfalls auf pH 7,4 einstellen. Die 8%ige Lösung kann auch portionsweise bei -20° C eingefroren und bei Bedarf bei 80° C im Wasserbad aufgetaut werden.

#### MMA 1

60 ml Methylmethacrylat (Merck, nicht entstabilisiert) + 35 ml Butylmethacrylat (Sigma, nicht entstabilisiert) + 5 ml Methylbenzoat + 1,2 ml Polyethylenglykol 400

#### MMA 2

MMA 1 + 0,4 g trockenes Benzoylperoxid (BPO). BPO kann im Exsikkator (einige Tage) oder im Trockenschrank (ca. 1 – 2 Tage) bei 40° C getrocknet werden;

**Vorsicht:** trockenes Benzoylperoxid ist explosiv!

#### MMA 3

MMA 1 + 0,8 g BPO

#### Polymerisationsgemisch

frisch angesetztes MMA 3 + 400 µl N,N-Dimethyl-p-Toluidin

#### Polymerisationsgemisch für Böden

frisch angesetztes MMA 3 + 600 µl N,N-Dimethyl-p-Toluidin

**Wichtig:** Nach Zugabe des Accelerators N,N-Dimethyl-p-Toluidin ist strikt auf ständige Kühlung (Eis) des Polymerisationsgemisches zu achten. Das Polymerisationsgemisch muss innerhalb von 1 – 2 Std. verarbeitet werden. Bei größeren Probenmengen, die an einem Tag eingebettet werden sollen, muss das Polymerisationsgemisch auf mehrere Male angesetzt werden.

### D. Aufbewahrung der Chemikalien

Der Tagesbedarf von Alkoholen und Xylol kann unter dem Abzug oder in einem explosionsgeschützten Kühlschrank aufbewahrt werden. MMA wird in einem explosionsgeschützten Kühlschrank aufbewahrt. Methylbenzoat kann unter dem Abzug



gelagert werden. Getrocknetes BPO wird in den benötigten Mengen in einem entsprechend gekennzeichneten Exsikkator aufbewahrt. BMA und N,N-Dimethyl-p-Toluidin werden in einem absperrbaren, explosionsgeschützten Kühlschrank aufbewahrt.

#### **E. Aufzeichnungen**

Zur Protokollierung der Fixierung, Entwässerung, Infiltration und Einbettung wird ein MMA-Einbettungs-Vordruck verwendet. Diese Vordrucke werden bei den Unterlagen für das jeweilige Projekt aufbewahrt.

Veterinärmedizinische Universität Wien  
 Department für Naturwissenschaften  
 Institut für Pathophysiologie  
 Veterinärplatz 1  
 A-1210 Wien

SOP Kossa/McNeal-Färbung

## Standard Operating Procedure

### Kossa/McNeal-Färbung von MMA-Knochenschnitten

**Verfasser:** Claudia Bergow

**Geprüft und genehmigt:**

**Laborleiter:** \_\_\_\_\_ **Datum:** \_\_\_\_\_

#### A. Zweck

Diese SOP beschreibt die für die Histomorphometrie verwendete Kossa/McNeal-Färbung von unentkalkten Methylmethacrylat-Knochenschnitten.

#### B. Vorgehensweise

##### Herauslösen des Kunststoffs:

Methoxyethylacetat I	20 min.
Methoxyethylacetat II	20 min.
Methoxyethylacetat III	20 min.
70% Ethanol	5 min.
40% Ethanol	5 min.
A. dest.	5 min.

##### Färben:

5% Silbernitrat (im Dunkeln)	5-10 min. (bei älterer Lsg. länger!)
Abspülen in Aqua dest.	3x
Natriumcarbonat/Formaldehyd-Lsg.	2 min
Abspülen in Leitungswasser	1x
Farmer's Reducer	30 sec
Fließendes Leitungswasser	20 min
Abspülen in Aqua dest.	1x
5% Tetrachrom-Lösung (frisch angesetzt)	(20-) 60 min.
Spülen in A. dest.	2x
Isopropanol	2x kurz
Xylol	2x 5 min.

Eindecken in DePeX (Fa. SERVA)

**C. Lösungen****Silbernitratlösung:**

5g Silbernitrat  
 100ml A. dest.  
 Dunkel lagern!  
 Kann wiederverwendet werden.

**Natriumcarbonat-Vorratslösung:**

67 g Natriumcarbonat  
 ad 1000 ml A. dest.

**Natriumcarbonat/Formaldehyd-Gebrauchslösung:**

150 ml Natriumcarbonat-Vorratslösung  
 50 ml Formaldehydlösung 38%  
 nach jedem Färbedurchgang frisch ansetzen!

**Farmer's Reducer:**

200 ml 10%ige Natriumthiosulfat-Lösung  
 10 ml 10%ige Kaliumferricyanid-Lösung  
 Nach Mischen nur  $\frac{1}{2}$  Stunde haltbar!  $\rightarrow$  Auf „ENTFÄRBUNG“ ACHTEN!!

**Tetrachrom-Stammlösung:**

0,5g Methylenblau-Chlorid  
 (= Methylenblau f. d. Mikroskopie,  $C_{16}H_{18}ClN_3SxH_2O$ )  
 0,8g Azur-A-Eosinat  
 0,1g Methylen Violett (Bernthsen)  
 250 ml Methanol z.S.  
 250 ml Glycerin z.S.

In einer Flasche mischen und 12 Std. bei 50°C in den Wärmeschrank stellen,  
 Danach Wärme auf 37°C reduzieren, Flasche für weitere 3 Tage darin stehen lassen.

In eine braune (!) Flasche filtrieren (dauert lange).

**Tetrachrom-Gebrauchslösung (5%):**

10ml Tetrachrom-Stammlösung  
 190ml A. dest.

**D. Aufzeichnungen**

Zur Protokollierung der Färbung wird ein Vordruck für die histologische Aufarbeitung verwendet. Dieser Vordruck wird bei den Unterlagen für das jeweilige Projekt aufbewahrt. Zusätzlich wird die Färbung in das Histologie-Laborbuch eingetragen.