

**Universität  
Rostock**



**Traditio et Innovatio**

Aus dem Institut für Immunologie

Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Thiesen

**Effekt von osteoinduktivem Laufbandtraining und  
pharmakologischer Intervention auf die STR/ort Maus**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Kathrin Koenen,

geboren am 18.03.1987 in Aachen

Rostock, 2017

**Gutachter:**

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke  
Universitätsmedizin Rostock  
Institut für Immunologie  
Arbeitsgruppe Klinische Immunologie
  
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Mittlmeier  
Universitätsmedizin Rostock  
Klinik und Poliklinik für Chirurgie  
Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
  
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Christoph Nies  
Marienhospital Osnabrück  
Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie

**Datum der Einreichung:** 23.01.2017

**Datum der Verteidigung:** 22.11.2017

**Inhalt**

Abbildungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis .....	VIII
Abkürzungsverzeichnis .....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Arbeit.....	1
1.2 Der physiologische Knochen .....	2
1.2.1 Die makroskopische und mikroskopische Struktur des Knochens.....	2
1.2.2 Knochenbildung und peak bone mass.....	4
1.2.3 Regulation des Knochenstoffwechsels .....	5
1.3 Knochenmasseveränderungen und Osteoporose .....	7
1.4 Therapeutische Ansätze zum Knochenaufbau .....	10
1.4.1 Leitliniengerechte Osteoporoseprophylaxe und -therapie.....	10
1.4.2 Bereits erprobte Trainingsformen .....	12
1.4.3 Das hier angewandte Laufbandtraining .....	14
1.4.4 Die hier durchgeführte pharmakologische Intervention.....	15
1.5 Die STR/ort Maus und ihre besondere Eignung .....	17
1.6 Hypothese .....	19
2 Materialien, Geräte, Chemikalien und Methoden .....	20
2.1 Materialien, Geräte und Chemikalien .....	20
2.2 Verwendete Tiere .....	22
2.3 Osteoinduktives Laufbandtraining .....	23
2.3.1 Eingewöhnungsphase .....	24
2.3.2 Run-to-Exhaustion-Test.....	25
2.3.3 Trainingseinheit .....	27
2.4 Pharmakologische Intervention .....	28
2.5 Knochen- und Blutentnahme .....	29
2.6 Mikro-CT-Analyse.....	31
2.6.1 Femur .....	31
2.6.2 Tibia.....	32
2.6.3 Humerus .....	33
2.7 3-Punkt-Biegetest .....	36
2.8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay.....	37
2.9 Genexpressionsanalyse .....	40
2.9.1 RNA-Isolation aus dem Knochen.....	40
2.9.2 cDNA Transkription.....	42
2.9.3 TaqMan Realtime PCR (Geneexpression Assays).....	42
2.10 Statistische Auswertung .....	46

---

3	Ergebnisse .....	47
3.1	Laufbandtraining .....	47
3.1.1	Gewichte – Physiologische Gewichtsentwicklung .....	47
3.1.2	Im Langzeitversuch betrug die Trainingsgeschwindigkeiten 35–45 % und 70–86 % der ermittelten Maximalgeschwindigkeiten. ....	48
3.1.3	Stetige Zunahme der Work Rate bei kontinuierlicher Gewichtszunahme .....	52
3.1.4	Knochenwerte der Femora im Langzeitversuch – Abnahme der trabekulären Knochenmasse bei Zunahme der kortikalen Knochenmasse .....	53
3.1.5	Knochenwerte der Tibiae im Langzeitversuch – Abnahme der trabekulären sowie kortikalen Knochenmasse .....	56
3.1.6	3-Punkt-Biege-Test der Femora im Langzeitversuch– Abnahme der Maximalen Belastungskraft sowie der Biegespannung .....	58
3.1.7	ELISA – keine gesteigerte Expression der Regulatoren des Knochenstoffwechsels auf Proteinebene nachweisbar .....	59
3.1.8	Im Kurzzeitversuch betrug die Trainingsgeschwindigkeiten 71 % und 35 % der durchschnittlich ermittelten Maximalgeschwindigkeit. ...	60
3.1.9	Knochenwerte der Femora im Kurzzeitversuch – keine Veränderungen der Knochenmasse im trabekulären und kortikalen Bereich .....	61
3.1.10	Knochenwerte der Humeri im Kurzzeitversuch – keine Veränderungen der Knochenmasse im Bereich des trabekulären und kortikalen Bereich .....	62
3.1.11	RNA RT-PCR – keine signifikante Veränderung der Expression der Regulatoren des Knochenstoffwechsels auf RNA-Ebene nachweisbar .....	62
3.1.12	Zusammenfassung der Ergebnisse des Laufbandtrainings .....	64
3.2	Pharmakologische Intervention .....	65
3.2.1	Gewichte – Leichte Gewichtsabnahme zu Beginn der pharmakologischen Intervention mit anschließend rascher Erholung ..	65
3.2.2	Knochenwerte der Femora – keine Veränderungen der Knochenmasse im trabekulären Anteil, Zunahme der kortikalen Knochenmasse .....	66
3.2.3	3-Punkt-Biege-Test der Femora – Abnahme der Belastungskraft sowie der Biegespannung .....	68
4	Diskussion .....	69
4.1	Die Zunahme der kortikalen Knochenmasse kann als Zeichen einer erhöhten Sensibilität der Kortikalis auf osteoinduktive Stimuli gedeutet werden .....	69

---

4.2 Die Rolle des trabekulären Knochens bei der Bruchfestigkeit bleibt fraglich; die Qualität des neu aufgebauten kortikalen Knochens scheint mangelhaft zu sein .....	71
4.3 Der axiale Stoß wirkt besonders auf distale Anteile der Knochenkette der Extremitäten .....	72
4.4 Mögliche Ursachen für die Reduktion der trabekulären Knochenmasse sind Hypoxie und Azidose, die auf eine hohe Intensität der Trainingsform zurückzuführen ist .....	72
4.4.1 Hypoxie.....	73
4.4.2 Azidose.....	73
4.4.3 Hohe Intensität der gewählten Trainingsform .....	74
4.5 Die genetischen Grundlagen haben Einfluss auf die Wirkung des Laufbandtrainings .....	75
4.6 Das Alter der Tiere ist sinnvoll gewählt.....	76
4.7 Der eigentliche Knochenaufbau findet erst in der Erhaltungsphase statt .....	77
4.8 Physiologische Fluktuationen der Knochenmasse zwischen den Kohorten ...	78
4.9 Die Regulatoren des Knochenstoffwechsels sind weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene nachweisbar erhöht .....	78
4.10 Modulatoren an endogenen Cannabinoidrezeptoren haben eine osteoinduktive Wirkung.....	79
4.11 Die osteoinduktive Therapie sollte auch in die palliative Therapie bei malignombedingten Knochenveränderungen integriert werden.....	81
5 Fazit und Ausblick .....	82
6 Literaturverzeichnis .....	85
7 Anhang.....	95
8 Thesen .....	105
9 Selbständigkeitserklärung .....	107

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung eines Röhrenknochens .....	3
Abbildung 2:	Osteoblasten-Osteoklasten-Regulation.....	5
Abbildung 3:	Der Knochen- und Gelenkphänotyp der weiblichen und männlichen STR/ort Maus.....	18
Abbildung 4:	Osteoinduktives Laufbandtraining .....	24
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des Ablaufs des Run-to-Exhaustion-Tests .....	26
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des Ablaufs einer Trainingseinheit.....	27
Abbildung 7:	Pharmakologische Intervention .....	29
Abbildung 8:	$\mu$ CT Analyse des Femur .....	32
Abbildung 9:	$\mu$ CT Analyse der Tibia.....	33
Abbildung 10:	$\mu$ CT des Humerus .....	34
Abbildung 11:	Trabekulärer Knochen und SMI .....	35
Abbildung 12:	Kortikaler Knochen.....	35
Abbildung 13:	3-Punkt-Biegetest.....	37
Abbildung 14:	A Schematische Darstellung der ELISA; B Beispiel einer Standardkurve anhand der Standardkurve von RANKL.....	40
Abbildung 15:	A Schematische Darstellung des Ablaufs der TaqMan Realtime PCR; B exemplarische Darstellung der Fluoreszenzmessung bei der Realtime PCR .....	45
Abbildung 16:	Gewichtsentwicklung.....	47
Abbildung 17:	Geschwindigkeiten während der RtETs und des Intervalltrainings im Langzeitversuch .....	52
Abbildung 18:	Work Rate .....	53
Abbildung 19:	Trabekuläre Knochenwerte der Femora nach Langzeittraining .....	55
Abbildung 20:	Kortikale Knochenwerte der Femora nach Langzeittraining .....	55
Abbildung 21:	Trabekuläre Knochenwerte der Tibiae nach Langzeittraining .....	57
Abbildung 22:	Kortikale Knochenwerte der Tibiae nach Langzeittraining .....	57
Abbildung 23:	Ergebnisse des 3-Punkt-Biegetest nach Langzeitlaufbandtraining ..	58
Abbildung 24:	Ergebnisse der ELISA.....	60
Abbildung 25:	Geschwindigkeiten während des RtET und des Intervalltrainings im Kurzzeitversuch.....	61
Abbildung 26:	Knochenwerte der Femora nach Kurzzeittraining .....	61
Abbildung 27:	Knochenwerte der Humeri nach Kurzzeittraining .....	62
Abbildung 28:	Ergebnisse der TaqMan Realtime PCR .....	63
Abbildung 29:	Gewichtsentwicklung.....	65

---

Abbildung 30: Knochenwerte des trabekulären Knochens der Femora nach $\mu$ CT-Analyse der Mäuse, die über 28 Tage 10 Injektionen URB597 erhalten haben.....	67
Abbildung 31: Knochenwerte des kortikalen Knochens der Femora nach $\mu$ CT-Analyse der Mäuse, die über 28 Tage 10 Injektionen URB597 erhalten haben. * $p < 0,05$ , ** $p < 0,005$ , *** $P < 0,0005$ .....	67
Abbildung 32: Ergebnisse des 3-Punkt-Biegetest nach pharmakologischer Intervention .....	68

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Materialien und Chemikalien und Software.....	20
Tabelle 2:	Ablauf der Eingewöhnungsphase.....	24
Tabelle 3:	Untersuchte Gene .....	42
Tabelle 4:	Übersicht über Geschwindigkeiten während des Langzeitversuchs .....	50
Tabelle 5:	Zusammenfassung der Ergebnisse des Laufbandtrainings. ....	64
Tabelle 6:	Gewichte der Tiere – Langzeitlaufbandtraining.....	95
Tabelle 7:	Knochenwerte der Femora – Langzeitlaufbandtraining.....	96
Tabelle 8:	Knochenwerte der Tibiae – Langzeitlaufbandtraining .....	97
Tabelle 9:	Ergebnisse des 3-Punkt-Biegetests – Langzeitlaufbandtraining .....	99
Tabelle 10:	Ergebnisse der ELISAs - Langzeitlaufbandtraining .....	100
Tabelle 11:	Gewichte der Tiere – Kurzzeitlaufbandtraining .....	101
Tabelle 12:	Knochenwerte der Femora – Kurzzeitlaufbandtraining .....	102
Tabelle 13:	Knochenwerte der Humeri – Kurzzeitlaufbandtraining .....	102
Tabelle 14:	Ergebnisse der RT-PCR – DeltaCT Werte.....	103
Tabelle 15:	Ergebnisse der RT-PCR – Relativer Expressionsunterschied .....	103
Tabelle 16:	Gewichte der Tiere über den Verlauf der pharmakologischen Intervention .....	103
Tabelle 17:	Knochenwerte der Femora – pharmakologische Intervention .....	104
Tabelle 18:	Ergebnisse des 3-Punkt-Biegetests – pharmakologische Intervention .....	104

## Abkürzungsverzeichnis

### Einheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
g	Gramm
IE	Internationale Einheiten
kg	Kilogramm
m/s	Meter pro Sekunde
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
N	Newton
ng	Nanogramm
pg	Picogramm

### Knochenregulation

ALP	Alkalische Phosphatase
Col1a1	Collagen Type 1, alpha 1
CTSK	Cathepsin K
CTX1	Cross linked C-Telopeptide of Type 1 Collagen
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HIF1a	Hypoxia induced Factor 1 alpha
IGF	Insulin-like Growth Factor
M-CSF	Makrophage Colony-Stimulating Factor
OB	Osteoblasten
OC	Osteoklasten
OPG	Osteoprotegrin
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PINP	Procollagen 1 N-Terminal Propetide
RANK	Receptor Activator Of Nuclear Factor Kappa B
RANKL	Receptor Activator Of Nuclear Factor Kappa B Ligand
TGF beta	Transforming Growth Factor
TRAP	Tartrat-Resistant Acid Phosphatase

### Knochenwerte

B.Ar	Mean total crossectional bone area
BV/TV	Bone Volume / Tissue Volume
Cs.Th	Crossectional Thickness
ROI	Region of interest
SMI	Structure Model Index
T.Ar	Mean total crossectional tissue area
Tb.N	Trabecular Number

---

Tb.Sp	Trabecular Separation
Tb.Th	Trabecular Thickness

---

**Sonstiges**

---

RtET	Run-to-Exhaustion-Test
CB1	Cannabinoidrezeptor 1
CB2	Cannabinoidrezeptor 2
FAAH	Fatty Acid Amide Hydrolase
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
$\mu$ CT	Mikro-Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
Fmax	Maximale Belastungskraft

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Arbeit

Knochen ist ein dynamisches Gewebe, das multiplen Regulationsmechanismen unterliegt, von denen einige noch unerforscht und unverstanden sind. Bedingt durch dieses Unverständnis gibt es bisher nur wenige therapeutische und prophylaktische Maßnahmen, mit denen in den Knochenstoffwechsel eingegriffen werden kann. Daher können zahlreiche Knochenerkrankungen bislang nur palliativ therapiert werden.

Osteoporose ist die häufigste Knochenerkrankung des alten Menschen und geht mit einem Verlust der Knochenmasse einher. Bislang stand vor allem die postmenopausale Osteoporose im Mittelpunkt der Aufmerksamkeit. Auf Grund des demografischen Wandels jedoch erlangt die senile Osteoporose, von der auch Männer betroffen sind, zunehmend an Bedeutung. Einigkeit besteht mittlerweile darüber, dass eine Kombination aus Bewegungstherapie, Lebensstilveränderung, Ernährungsumstellung und spezifischer pharmakologischer Therapie die größten Erfolge erzielt. Insgesamt handelt es sich bei der Osteoporosetherapie um eine Palliativtherapie, die darauf abzielt ein weiteres Fortschreiten des Knochenverlustes sowie pathologische Frakturen zu vermeiden. Das ist auch der Tatsache geschuldet, dass die Osteoporose häufig erst durch pathologische Frakturen auffällt, wenn der Knochen bereits bedrohlich ausgedünnt ist. Eine kurative Therapie, die den Knochen aktiv aufbaut, gibt es jedoch nicht.

Da seit einigen Jahren bekannt ist, dass die maximale Knochendichte, die bereits zum Zeitpunkt der frühen Adoleszenz vorliegt, in einem entscheidenden Zusammenhang zum Risiko späterer osteoporotischer Frakturen steht, wurden neben therapeutischen auch zunehmend prophylaktische Ansätze entwickelt. Jedoch zielen Prophylaxestrategien durch körperliche Aktivität bisher hauptsächlich darauf ab, die Koordination und Muskelkraft zu verbessern um Stürze und damit verbundene Frakturen zu vermeiden. Die Frage, welche körperliche Aktivität darüber hinaus auch den Aufbau in gesundem Knochen fördert und damit die prophylaktisch wirksame maximale Knochendichte erhöht, ist noch nicht beantwortet.

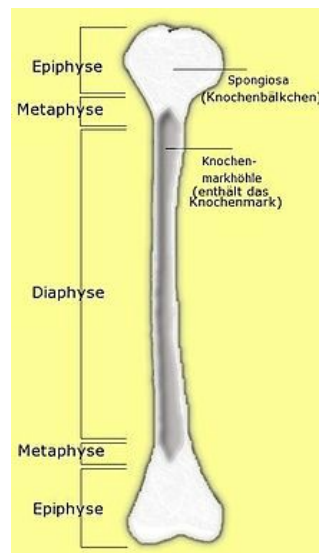
Auch die bisherige pharmakologische Osteoporosetherapie ist noch nicht vollends ausgereift. Viele der vorhandenen Pharmaka schützen lediglich den noch vorhandenen Knochen vor weiterem Knochenabbau, einige haben bei osteoanaboler Wirkung ein ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil.

Vor diesem Hintergrund ist es das Ziel dieser Arbeit sowohl ein spezielles Laufbandtraining als auch eine pharmakologische Therapie zu entwickeln, die im Mausmodell in gesundem Knochen zu einem aktiven Knochenaufbau führen, um damit der Prophylaxe und Therapie der Osteoporose einen Schritt näher zu kommen.

## **1.2 Der physiologische Knochen**

### **1.2.1 Die makroskopische und mikroskopische Struktur des Knochens**

In dieser Arbeit werden ausschließlich lange Röhrenknochen betrachtet. Im Querschnitt durch einen Röhrenknochen können makroskopisch zwei verschiedene Anteile unterschieden werden: die äußere kompakte Schicht, Substantia compacta, und die innere schwammartige Schicht, Substantia spongiosa. Im weiteren Verlauf werden hierfür ausschließlich die Begriffe kortikaler (Compacta) und trabekulärer (Spongiosa) Knochenanteil verwendet. Abbildung 1 stellt schematisch den Aufbau eines Röhrenknochens dar. Der mittlere Anteil wird als Diaphyse bezeichnet, hier befindet sich umhüllt von der kortikalen Knochenschale das Knochenmark. Im Säuglingsalter findet hier Blutbildung statt, man spricht daher von rotem Knochenmark. Im Erwachsenenalter hingegen findet die ossäre Blutbildung hauptsächlich in Platten- und kurzen Röhrenknochen statt, sodass das Knochenmark in den langen Röhrenknochen atrophiert und durch Fettzellen ersetzt wird und damit zu gelbem Fettmark wird. Der Übergang von Diaphyse in Epiphyse wird gebildet durch die Metaphyse. Hier finden sich neben der kortikalen Knochenschale auch vereinzelte Knochenbälkchen. Die Epiphysen bilden auf beiden Seiten die Enden des Röhrenknochens und bestehen neben einer dünnen Kortikalis fast ausschließlich aus trabekulärem Knochen. In den Räumen zwischen den Trabekeln befindet sich auch hier Knochenmark. Darüber hinaus befinden sich hier die Epiphysenfugen, die während der Kindheit und Adoleszenz für das Längenwachstum der Röhrenknochen verantwortlich sind.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Röhrenknochens**

Quelle: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1b/EpiMetaDiaphyse.jpg>  
(09.07.14)

Histologisch betrachtet besteht der Knochen aus zellulären Bestandteilen und extrazellulärer Matrix. Bei den zellulären Bestandteilen handelt es sich um Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten (siehe unten). Bei der extrazellulären Matrix kann ein organischer und ein anorganischer Anteil unterschieden werden. Der anorganische Teil besteht aus Mineralien, hauptsächlich aus Hydroxylapatit (Kalziumphosphatkomplexe). Der organische Anteil besteht zu 95 % aus Kollagen Typ 1 und darüber hinaus aus Proteoglykanen und Glykoproteinen (Osteonectin, Osteopontin, Osteocalcin). Die Glykoproteine scheinen durch die Bindung von Kalzium die Verkalkung der Knochenmatrix zu fördern (Junqueira et al. 2005).

Bei langen Röhrenknochen handelt es sich um Lamellenknochen. Dabei bildet die Knochenmatrix Lamellen, die sich in Schichten um den sogenannten Havers-Kanal anordnen. Die Osteozyten liegen vereinzelt zwischen den Lamellen und kommunizieren über Zellausläufer, die wiederum in kleinen Kanälen verlaufen, miteinander. Innerhalb einer Lamelle verlaufen die Kollagenfasern parallel, von Lamelle zu Lamelle wechseln sie jedoch ihre Verlaufsrichtung. Die zentral gelegenen Havers-Kanäle verlaufen entlang der Diaphyse und stehen mit der Knochenmarkshöhle, dem Periost und über quer verlaufende sogenannte Volkmann-Kanäle auch miteinander in Verbindung und stellen so die Versorgung der Knochenmatrix sicher. Die Einheit aus Kanal und Lamellen werden als Osteone bezeichnet und bilden die Baueinheit des Lamellenknochens. Im kortikalen Knochenanteil gibt es darüber hinaus noch eine sogenannte äußere und innere Generallamelle, die jeweils an das Periost bzw.

das Endost angrenzen und somit die kortikale Knochenschale nach außen und innen abgrenzen (Junqueira et al. 2005).

Der trabekuläre Knochen bildet neben dem Knochenmark das Innenleben eines jeden Knochens aus und unterliegt deutlich schnelleren Umbauprozessen als der kortikale Knochen. Im trabekulären Bereich ist das Knochenmaterial in Bälkchen, sogenannte Trabekel, angeordnet. Dabei ist die Ausrichtung der Trabekel von der Belastungsrichtung der jeweiligen Knochen abhängig. Es gibt verschiedene Trabekelformen, man unterscheidet platten- von stabförmigen Trabekeln. Während in gesundem Knochen hauptsächlich plattenförmige Trabekel vorkommen ist der ausgedünnte, osteoporotische Knochen durch stäbchenförmige Trabekel gekennzeichnet (van Ruijven et al. 2005, Moreno et al. 2012). In Röhrenknochen befindet sich der trabekuläre Knochenanteil hauptanteilig in den Epiphysen und vereinzelt auch in den Metaphysen, in platten Knochen wird zum Teil sogar der gesamte Knochenkörper mit trabekulärem Knochenmaterial ausgefüllt.

### **1.2.2 Knochenbildung und peak bone mass**

Knochen ist ein dynamisches Gewebe, das einem ständigen Umbau unterliegt. Verantwortlich für diesen Umbau sind neben den Osteozyten die beiden Hauptgruppen der knochenbildenden Zellen, die Osteoblasten und Osteoklasten. Osteozyten sind mechanosensitiv und sorgen durch Aktivierung bzw. Hemmung der Osteoblasten und Osteoklasten dafür, dass die Knochenbildung den entsprechenden mechanischen Erfordernissen angepasst wird (Silbernagl et al. 2013). Osteoblasten gehen aus mesenchymalen Progenitorzellen hervor und sind über die Proteinsynthese und Regulation der Mineralisation maßgeblich am Knochenaufbau beteiligt. Osteoklasten hingegen entstehen aus Monozyten und bewirken nach Aktivierung den Abbau von mineralisierter Knochenmasse.

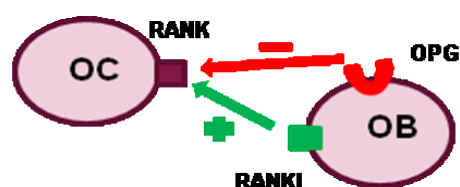
Bei der Knochenbildung unterscheidet man eine direkte (desmale) von einer indirekten (chondralen) Ossifikation. Die langen Röhrenknochen entstehen ausschließlich durch chondrale Ossifikation, weshalb hier lediglich diese Form des Knochenwachstums erläutert wird. Hierbei entsteht zunächst ein Primordialskelett aus hyalinem Knorpel. Die Chondrozyten des knorpeligen Modells hypertrophieren, gehen daraufhin zugrunde und hinterlassen sogenannte Lakunen. Die Knorpelmatrix wird von Osteoklasten und Chondroklasten zum Teil abgebaut und zu einem anderen Teil verkalkt. In die Lakunen der atrophierten Chondrozyten wandern mesenchymale

Stammzellen ein, die sich unter dem Einfluss von BMP (Bone morphogenetic protein) zu Osteoblasten entwickeln und die Reste der Knorpelmatrix durch Knochenmatrix ersetzen (Junqueira et al. 2005, Lüllmann-Rauch et al. 2009). Je nachdem, ob die Knochenbildung vom Inneren oder Äußeren des Röhrenknochens ausgeht, spricht man von einer enchondralen oder perichondralen Ossifikation.

Die Knochenbildung beginnt bereits intrauterin während der Embryonal- und Fetalphase. Dabei hat der Kalzium- und Vitamin D-Haushalt und damit auch die Ernährung der Mutter einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung und Qualität des kindlichen Knochens (Ebeling et al. 2013). In den ersten Lebensdekaden nimmt die Knochenmasse stetig zu bis sie zwischen der zweiten und dritten Lebensdekade ihre maximale Dichte erreicht. Diese wird dann als peak bone mass bezeichnet. Sie ist sowohl von genetischen Faktoren als auch von der Ernährung und der körperlichen Aktivität während der Kindheit und frühen Adoleszenz abhängig (Tenforde et al. 2011, Mitchell et al. 2015). Ab der vierten Lebensdekade nimmt die Knochenmasse tendenziell eher ab.

### 1.2.3 Regulation des Knochenstoffwechsels

Die einzelnen knochenbildenden Zellen unterliegen verschiedensten komplexen Regulationsmechanismen, die durch das Zusammenspiel zahlreicher Faktoren entstehen. So werden Osteoblasten durch Wachstumsfaktoren (TGFbeta, FGF, PDGF, IGF) stimuliert und exprimieren sowohl die Bestandteile der organischen Knochenmatrix (Typ 1 Kollagen, Osteopontin, Osteocalcin) als auch die knochen-spezifische alkalische Phosphatase, die wiederum durch Spaltung von Pyrophosphat die Mineralisation fördert (Silbernagl et al. 2013).



**Abbildung 2: Osteoblasten-Osteoklasten-Regulation**

Vereinfachte schematische Darstellung der Wechselwirkung zwischen Osteoklasten (OC) und Osteoblasten (OB).

Die Regulation der Osteoklasten erfolgt durch die Osteoblasten über eine Wechselwirkung zwischen RANK, RANKL und OPG und ist sehr vereinfacht in Abbildung 2

dargestellt. Dabei werden Osteoklasten, die den Rezeptor RANK tragen, durch den von Osteoblasten gebildete Liganden RANKL aktiviert. Darüber hinaus werden Osteoklasten über M-CSF (makrophage colony-stimulating factor) stimuliert. Die Hemmung der Osteoklasten und damit des Knochenabbaus erfolgt durch Osteoprotegerin (OPG), ein Zytokin, das ebenfalls von Osteoblasten gebildet wird und den Rezeptor der Osteoklasten okkupiert und damit die Aktivierung durch RANKL verhindert (Abb. 2). Aktivierte Osteoklasten bilden sogenannte Resorptionslakunen, in denen sie durch die Sekretion von Protonen den Umgebungs-pH senken und dadurch den Knochen entmineralisieren. Darüber hinaus bauen sie durch Proteasen die organische Knochenmatrix ab (Silbernagl et al. 2013).

Der übergeordnete Regler des Knochenstoffwechsels ist die Plasmakonzentration von Kalzium und Phosphat. Bei Kalziummangel führt das in den Nebenschilddrüsen produzierte Parathormon akut zur Demineralisierung des Knochens und damit zur Bereitstellung von Kalzium. Längerfristig führt es zur Aktivierung von Osteoblasten und Osteoklasten, jedoch überwiegt auf Dauer der Knochenabbau (Silbernagl et al. 2013). Daher kann es sowohl bei einem primären als auch sekundären Hyperparathyreoidismus zu einer Osteopenie bzw. zu einer renalen Osteopathie kommen (Herold et al. 2012). Neben der Osteolyse fördert das Parathormon auch eine vermehrte renale Kalziumrückresorption und induziert die Bildung von Calcitriol. Dieses wiederum fördert über die Stimulation des Vitamin D Rezeptors die Bildung von Knochenmatrixproteinen. Darüber hinaus fördert Calcitriol über RANKL und M-CSF auch die Bildung reifer Osteoklasten und unterstützt damit sowohl Knochenaufbau als auch -abbau.

Calcitonin wird als Hormon der medullären Schilddrüsenzellen durch eine Hyperkalzämie stimuliert und wirkt durch Hemmung der Osteoklasten einer zusätzlichen Kalziumfreisetzung entgegen. Östrogene hemmen die Apoptose der Osteoblasten und fördern die Apoptose der Osteoklasten und unterstützen damit ausschließlich den Knochenaufbau (Manolagas et al. 2013, Silbernagl et al. 2013). Aus diesem Grunde kann es postmenopausal durch einen Östrogenmangel zu einem Ungleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau zugunsten des Abbaus kommen, was wiederum zu einer verminderten Knochenmasse führen kann (Herold et al. 2012). Glukokortikoide hingegen hemmen die Bildung des Calcitriols sowie des Typ-1 Kollagens und fördern somit den Knochenabbau, weshalb bei einer Langzeitgluko-

kortikoidtherapie immer auch Calcitriol substituiert werden sollte. Insulin stimuliert die Bildung der Knochenmatrix (Silbernagl et al. 2013).

Durch diese Regulationsmechanismen unterliegt der Knochen einem anhaltenden Wechsel zwischen Auf- und -abbau, der auch als Remodeling bezeichnet wird. Unabhängig von diesem ständigen Umbau ist in den ersten beiden Lebensdekaden eine eindeutige Tendenz zum Knochenaufbau bis hin zum Erreichen der peak bone mass zu verzeichnen. Dieser ist durch dieselben oben genannten Regulationsmechanismen bedingt. Auf diese Mechanismen kann von außen durch die Ernährung, durch körperliche Aktivität und Pharmaka Einfluss genommen werden (Harvey et al. 2014, Mitchell et al. 2015).

### **1.3 Knochenmasseveränderungen und Osteoporose**

Wie in Einzelfällen schon angedeutet kann es durch Defekte der knochenbildenden Zellen, Erkrankungen der hormonproduzierenden Organe oder fehlerhafte Regulationsmechanismen zu einem gestörten Knochenstoffwechsel kommen. Je nachdem ob der Knochenauf- oder -abbau gestört ist, kommt es zu einem Mangel (Osteopenie, Osteoporose) oder Überschuss (Hyperostose) an Knochenmasse.

Im Folgenden sollen einige Beispiele für einen gestörten Knochenstoffwechsel aufgeführt werden. Beim Paget-Syndrom handelt es sich um eine Erkrankung, die in 30 % der Fälle mit einer Mutation des RANK-Gens assoziiert ist und am häufigsten die Beckenknochen und lange Röhrenknochen befällt. Bei der Paget Krankheit kommt es in der Frühphase zu einem unkontrolliert gesteigerten osteoklastären Knochenabbau, der gefolgt wird von einem ungeordneten überschießenden Knochenanbau in der Spätphase. Die Folgen sind aufgetriebene, weniger stabile Knochen sowie Deformierungen der langen Röhrenknochen (Herold et al. 2012; Piper et al. 2007). Unter Osteomalazie versteht man die mangelhafte Mineralisation der organischen Knochenmatrix nach Abschluss des Knochenwachstums. Dadurch kommt es im Erwachsenenalter zu einer Erweichung der Knochen und generalisierten Knochenschmerzen. Die infantile Form wird als Rachitis bezeichnet und geht auf Grund der gestörten Mineralisation der Epiphysenfugen mit einer Epiphysendysplasie sowie mit Deformierungen der Röhrenknochen einher. Ursache der Osteomalazie und Rachitis ist in den meisten Fällen ein Mangel an Vitamin D oder eine Störung im Vitamin D Stoffwechsel (Herold et al. 2012; Piper et al. 2007). Der Osteopetrosis liegt ein

Defekt der Osteoklastenfunktion zugrunde. Während die Knochenbildung normal verläuft, findet der Knochenabbau je nach Schweregrad vermindert oder gar nicht statt. Es kann zu einer Verengung der Hirnnervenaustrittsstellen mit entsprechenden Lähmungserscheinungen sowie auf Grund der Verdrängung des Knochenmarks zu einer Hepatosplenomegalie kommen. (Piper et al. 2007). Die Osteogenesis imperfecta kann durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mutationen des für das Typ-1 Kollagen zuständigen Gens verursacht sein. Je nach Lokalisation der Mutation werden Schweregrade der Erkrankung unterschieden. Von leichter Knochenbrüchigkeit kann es bis hin zu intrauterinem Fruchttod auf Grund multipler Knochenbrüche kommen (Piper et al. 2007).

Auf die Osteoporose soll in dieser Arbeit das Hauptaugenmerk gelegt werden. Sie stellt im höheren Lebensalter mit Abstand die häufigste Knochenerkrankung dar und nimmt auf Grund des demografischen Wandels weiterhin an Bedeutung zu (Richards et al. 2012). Osteoporose ist definiert als eine systemische Skeletterkrankung, die mit einer niedrigen Knochenmasse, einer Veränderung der Mikroarchitektur des Knochengewebes und einer gesteigerten Knochenbrüchigkeit einhergeht. Um eine manifeste Osteoporose handelt es sich erst, wenn zusätzlich zur nachgewiesenen mangelhaften Knochendichte eine pathologische Fraktur diagnostiziert werden konnte. Solange noch keine Frakturen vorliegen, spricht man von einer Osteopenie (Herold et al. 2012; Piper et al. 2007).

15 % der postmenopausalen 50–60 jährigen Frauen weisen eine verringerte Knochendichte auf. Bei den über 70 jährigen Frauen weisen sogar 45 % eine pathologisch erniedrigte Knochendichte auf. Lediglich 17 % der über 70 jährigen Männer zeigen in der DXA Messung eine verminderte Knochendichte (Dachverband Osteologie e.V. 2014).

Man unterscheidet die primäre von der sekundären Osteoporose, wobei sich diese Einteilung nach der Ursache der Entstehung richtet. Die primäre Osteoporose, die in 95 % der Fälle vorliegt ist zum einen auf den postmenopausalen Östrogenmangel (Typ 1 postmenopausale Osteoporose) (Manolagas et al. 2013) und zum anderen auf das hohe Lebensalter (Typ 2 senile Osteoporose) zurückzuführen. Die sekundäre Form kann bedingt sein durch eine endokrine Erkrankung wie z.B. einen Hyperkortisolismus oder einen Hypogonadismus, kann jedoch auch das Resultat einer Mangelernährung oder einer langanhaltende Immobilisation sein. Darüber hinaus

kann die sekundäre Osteoporose iatrogen verursacht sein, dabei handelt es sich in den meisten Fällen um eine langjährige Glukokortikoidtherapie (Herold et al. 2012).

Desweiteren kann die Osteoporose entsprechend ihrer Lokalisation in eine lokalisierte und eine generalisierte Form unterteilt werden. Je nach Metabolismus kann darüber hinaus zwischen einem Fast-loser und einem Low-loser Patienten unterschieden werden. Während der Fast-loser, bei dem sich die Osteoporose meist in der frühen Postmenopause manifestiert, jährlich über 3 % der Knochendichte verliert, ist der jährliche Knochendichteverlust bei einem Low-loser deutlich geringer (Herold et al. 2012).

Für die Entstehung einer Osteoporose existieren zahlreiche Risikofaktoren. Zu den therapeutisch nicht beeinflussbaren Faktoren zählen das hohe Lebensalter, das weibliche Geschlecht (Gudmundsdottir et al. 2010) sowie genetische Faktoren. Desweiteren stellen laut Leitlinie der Dachverbandes Osteologie auch ein Mangel an Geschlechtshormonen, körperliche Inaktivität, Nikotinabusus, fehlende UV-Strahlung, Untergewicht, eine mangelhafte orale Kalzium und Vitamin D Aufnahme und multiple Stürze Risikofaktoren für die Entstehung einer Osteoporose und damit vergesellschafteter Frakturen dar.

Darüber hinaus ist die maximale Knochendichte, die in der zweiten bis dritten Lebensdekade erreicht wird, ein entscheidender prädiktiver Marker für die Entstehung osteoporotischer Frakturen. So geht eine hohe peak bone mass mit einem geringeren Risiko einher, im späteren Lebensverlauf eine osteoporosebedingte Fraktur zu erleiden (Coli 2013, Ebeling et al. 2013). Das bedeutet Maßnahmen, die bereits in der Kindheit und in der Adoleszenz zu einer Zunahme der Knochenmasse führen und damit zu einer erhöhten peak bone mass beitragen, können der Entstehung späterer osteoporotischer Frakturen entgegenwirken.

Charakteristische Symptome sind Knochenschmerzen sowie pathologische Frakturen. Das Risiko für pathologische Frakturen ist besonders hoch im Bereich des Schenkelhalses sowie im Bereich der Wirbelsäule, wo sie zu einer messbaren Abnahme der Körpergröße führen können (Horner et al. 2010; Piscitelli et al. 2010; Stevens and Abrami 1964).

Diagnostisch möglich ist zum einen eine Röntgenaufnahme der Wirbelsäule, in der sich neben frischen Frakturzeichen auch charakteristische Formen der Wirbelkörper nach Sinterungsfrakturen nachweisen lassen können. Eine weitere Möglichkeit stellt

die Messung der Knochendichte dar. Dabei gilt die Dual X-ray Absorptiometrie als die Methode der Wahl. Hierbei wird die Flächendichte des Mineralgehaltes an der LWS sowie am proximalen Femur und am Femurhals gemessen. Das Ergebnis der Messung wird als sogenannter T-Score angegeben, der die Standardabweichung vom Mittelwert der maximalen Knochendichte gesunder Menschen im Alter von 30 Jahren darstellt. Darüber hinaus kann die Knochendichte auch mittels Quantitativer Computertomografie bestimmt werden, die eine echte Dichtemessung ermöglicht. Allerdings kann hier nur die Spongiosadichte im LWS-Bereich bestimmt werden. Auch die Sonografie stellt durch die Messung der Abschwächung des Schallstrahls eine Möglichkeit zur Knochendichtemessung dar. Desweiteren sollte im Rahmen der Osteoporosedagnostik ein Basislabor erfolgen um mögliche Ursachen auszuschließen bzw. nachzuweisen. Dazu gehört neben einem Differentialblutbild auch Entzündungsparameter, Elektrolyte, Parathormon, TSH, Kreatinin, alkalische Phosphatase, etc. Der Dachverband Osteologie empfiehlt in seiner Leitlinie eine Osteoporose Diagnostik ab einem errechneten Sturzrisiko über 20 % in den nächsten zehn Jahren sowie regelhaft ab einem Lebensalter von 70 Jahren bei Frauen und ab einem Lebensalter von 80 Jahren bei Männern (Dachverband Osteologie e.V. 2014; Herold et al. 2012; Piper et al. 2007).

Neben den reinen Knochenerkrankungen können auch Knochenmetastasen im Rahmen verschiedenster Malignomerkrankungen zu lokaler Instabilität des Knochens führen. Je nach Entität des Malignoms können bestimmte Anteile des Skeletts betroffen sein. Desweiteren können pharmakologische oder operative antiandrogene Therapien im Rahmen von Malignomerkrankungen zu einem gestörten Knochenstoffwechsel führen und folglich mit einer mangelhaften Knochenmasse und / oder -qualität einhergehen (Rhee et al. 2015, etc.).

## **1.4 Therapeutische Ansätze zum Knochenaufbau**

### **1.4.1 Leitliniengerechte Osteoporoseprophylaxe und -therapie**

Laut den vom Dachverband Osteologie 2014 veröffentlichten Leitlinien werden allen Risikopatienten unabhängig von einer spezifischen medikamentösen Therapie allgemeine Basismaßnahmen zur Prophylaxe von Frakturen empfohlen. Diese Basismaßnahmen entsprechen im Allgemeinen auch der generellen Osteoporoseprophylaxe unabhängig vom Risikoprofil. Zu diesen Basismaßnahmen gehört vor allem die

Vermeidung von Risikofaktoren. Dazu zählt regelmäßige körperliche Aktivität, die zum einen die Muskelkraft fördern und zum anderen die Koordination verbessern soll, aber ansonsten nicht näher spezifiziert wird. Desweiteren sollte das Sturzrisiko sowohl durch die Anwendung adaptierter Hilfsmittel als auch durch die Vermeidung von sturzbegünstigenden Medikamenten minimiert werden. Die Patienten sollten täglich über die Nahrung 1000 mg Kalzium zu sich nehmen, falls diese Menge nicht durch die Nahrungsaufnahme gewährleistet werden kann, kann Kalzium supplementiert werden, allerdings sollte eine Gesamtmenge von 1500 mg nicht überschritten werden. Auch wird eine tägliche 30-minütige Sonnenlichtexposition empfohlen. Wird diese Expositionszeit nicht erreicht sollte eine tägliche Zufuhr von 800–1200 IE Vitamin D3 in Erwägung gezogen werden. Darüber hinaus werden den Patienten eine gesunde ausgewogene Ernährung und die Vermeidung von Untergewicht nahegelegt. Vitamin B12 und Folsäure können bei unzureichender Aufnahme mit der Nahrung auch supplementiert werden. Ein Nikotinabusus sollte vermieden werden.

Ab einem errechneten Sturzrisiko von über 30 % in den nächsten zehn Jahren empfiehlt der Dachverband Osteologie unabhängig von Alter und Geschlecht bei mittels DXA-Messung nachgewiesener verminderter Knochendichte eine spezifische medikamentöse Therapie. Dabei werden im Einzelfall je nach T-Score und individuellem Risikoprofil der Beginn und die Art der Therapie festgelegt. Bei der spezifischen medikamentösen Osteoporosetherapie stehen folgende Präparate zur Verfügung:

Bisphosphonate senken das vertebrale und extravertebrale Frakturrisiko. Dazu gehören Alendronat, Risedronat und Zoledronat. Diese haben durch Hemmung der Osteoklasten einen antiresorptiven Effekt. Zum Nebenwirkungsprofil zählen gastrointestinale Beschwerden sowie in seltenen Fällen Osteonekrosen im Kieferbereich.

Strontiumranelat hat einen calcimimetischen Effekt und wirkt daher stimulierend auf Osteoblasten und hemmend auf Osteoklasten. Dadurch kann das Risiko von Wirbelsäulen- und Hüftfrakturen gesenkt werden. Nebenwirkungen sind hier besonders ausgeprägt und betreffen auch hier den Gastrointestinaltrakt.

Raloxifen ist ein Selektiver Östrogenrezeptor Modulator (SERM), der im Bereich des Knochen- und Fettstoffwechsels agonistisch am Östrogenrezeptor wirkt, jedoch keine Wirkung auf Mamma und Uterus hat. Das Risiko für vertebrale Frakturen wird dadurch herabgesetzt, allerdings kann es auch zu klimakterischen Beschwerden kommen.

Bei Denosumab handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der an den RANK Ligand bindet und dadurch die Osteoklasten hemmt. Er senkt das Risiko vertebraler und nicht-vertebraler Frakturen und wird auch im Rahmen der anti-androgenen Therapie bei Prostatakarzinomen zum Schutz vor vertebralem Frakturen eingesetzt.

Parathormon (Teriparatid oder Parathormon rekombinant) wird bei komplizierten Verlaufsformen der Osteoporose oder bei Hochrisikopatienten eingesetzt. Bei intermittierender subkutaner Applikation des Parathormons überwiegt die knochenbauende Wirkung.

Östrogene wirken bei postmenopausalen Frauen antiresorptiv und senken das Frakturrisiko. Auf Grund des erhöhten Herzinfarkt-, Thrombose-, Schlaganfall-, und Mammakarzinomrisikos wird allerdings von einer Dauertherapie abgeraten.

Die oben aufgeführten Basismaßnahmen sollten über den Zeitraum des erhöhten Frakturrisikos umgesetzt werden. Da es sich bei der Osteoporose um eine chronische Erkrankung handelt, bleibt das Frakturrisiko in den meisten Fällen lebenslang erhöht. Die optimale Anwendungsdauer der Präparate ist auf Grund unzureichender Studienlage nicht bekannt. Eine Langzeittherapie mit Bisphosphonaten steht sogar im Verdacht das Risiko atypischer Frakturen zu erhöhen (Dachverband Osteologie e.V. 2014; Herold et al. 2012; Piper et al. 2007; Drake et al. 2015).

#### **1.4.2 Bereits erprobte Trainingsformen**

Verschiedenste Formen von Bewegungstherapie und deren Effekte sowohl auf den Knochen als auch auf zahlreiche andere Organsysteme wurden bereits in Studien sowohl an Tieren als auch an Menschen untersucht (Tanaka et al. 2010, Baker et al. 2011, Su et al. 2001, Hind et al. 2006, Cheetham et al. 1987). Der positive Effekt von körperlicher Aktivität auf kardiovaskuläre Erkrankungen sowie das metabolische Syndrom bzw. deren Risikofaktoren ist weitläufig bekannt. Hier wird vor allem ein Ausdauertraining bei moderater Belastung empfohlen (Fisher et al. 2015, Conti et al. 2015, Naderali et al. 2015, Nationale Versorgungsleitlinie Chronische KHK 2014). Da Herz-Kreislaufkrankungen in den Industrieländern die häufigste Todesursache darstellen, wurde dieser Trainingsform ein besonderer Stellenwert zugeteilt. Auf Grund des demografischen Wandels nimmt auch die Inzidenz degenerativer Erkrankungen zu. Dazu gehören Knochen- und Gelenkerkrankungen, allen voran Osteoporose und

Arthrose. Aus diesem Grund wurden auch die Effekte der unterschiedlichen Trainingsformen auf den Knochen und die Gelenke zunehmend zum Gegenstand der Untersuchungen. So wurde bereits durch Lapvetelainen et al. 1995 nachgewiesen, dass moderates Lauf(band)training, das über eine lange Zeit regelmäßig durchgeführt wird, die Entstehung von Arthrose fördern bzw. bereits vorhandene Gelenkschädigungen aggravieren kann. Desweiteren ist Bewegungstherapie im Allgemeinen heutzutage als Therapie und Prävention der Osteoporose anerkannt (Barry et al. 2008, Gomez Cabello et al. 2012, Hind et al. 2006) und wurde bereits in die Leitlinie des Dachverbandes Osteologie aufgenommen. Allerdings bleibt immer noch fraglich, welche Trainingsform die geeignete ist um Knochenmasse aufzubauen bzw. den Abbau der Knochenmasse beispielsweise im Rahmen einer Osteoporose aufzuhalten (Turner et al. 2003).

Es wurden die verschiedensten Trainingsformen untersucht: Klettern (Mori et al. 2003), Vibrationsplatten (Butzeloff et al. 2015), Krafttraining (Almstedt et al. 2011) und viele Varianten von Laufbandtraining (Morel et al. 2001, Meckel et al. 2009). Diese Untersuchungen wurden unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, so zum Beispiel an ovariektomierten Tieren (Butzeloff et al. 2015, Chang et al. 2011, Iwamoto et al. 2005, Barengolts et al. 1992) oder bei glukokortikoidinduziertem osteoporotischem Knochenstatus (Musumeci et al. 2012). Als Probanden wurden sowohl Menschen als auch Tiere – in den meisten Fällen Mäuse oder Ratten – verwendet. Die Compliance der menschlichen Probanden ist der der Tiere deutlich überlegen, was die Durchführung erleichtert. Jedoch können bei menschlichen Probanden viele andere Einflussfaktoren auf den Knochenstoffwechsel nicht ausgeschlossen und somit der Effekt des Trainings nicht isoliert betrachtet werden. Außerdem können die tierischen Knochen entnommen, detailliert mittels bildgebender Verfahren und sogar histologisch untersucht werden, während der menschliche Knochen postinterventionell lediglich mittels bildgebender Verfahren untersucht werden kann. Die DXA-Messung gilt dabei als die Methode der Wahl (Howe et al. 2011). Diese trifft eine Aussage über die Knochendichte, deren Aussagekraft über die tatsächliche Knochenbeschaffenheit in Frage gestellt wird (Turner et al. 2003).

### 1.4.3 Das hier angewandte Laufbandtraining

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. habil. Sven Bruhn, Institut für Sportwissenschaft der Universität Rostock, wurde ein Laufbandtraining entwickelt, das eine osteoinduktive Wirkung haben und damit eine Erhöhung der peak bone mass erreichen sollte. Dieses Laufbandtraining zeichnet sich durch zwei Besonderheiten aus, denen in der Entwicklungsphase eine potenzielle Osteoinduktivität zugeschrieben wurde. Dabei handelt es sich zum einen um die anaerobe Stoffwechsellage, die durch Geschwindigkeitsspitzen erreicht wird, und zum anderen um die (negative) Steigung des Laufbands.

Es ist bereits bekannt, dass Training mit hoher Belastung (high intensity training, HIT) sowie Training mit hohem Kraftaufwand (Resistance Training), das als Intervalltraining durchgeführt wird, größere Effekte auf den Knochen hat als moderates Ausdauertraining (Lester et al. 2009, Martyn-St James et al. 2010, Chilibeck et al. 1995, Robling et al. 2002, Jung et al 2014, Almstedt et al. 2011). Dabei ist die Überlegenheit des high intensity trainings auf den anaeroben Stoffwechsel und damit auf die deutliche Erhöhung des Laktats im Serum bis hin zur Überschreitung der sogenannten Laktatschwelle zurückzuführen (Godfrey et al. 2003). Der anaerobe Stoffwechsel kommt dann zum Einsatz, wenn in einem Belastungsbereich um ca. 80–90 % der maximalen Belastbarkeit trainiert wird. Bei diesen Belastungsspitzen sollte es sich allerdings um kurze, zeitlich begrenzte Intervalle handeln, die durch Erholungsphasen unterbrochen werden (Robling et al. 2002). Diese Erholungsphasen sollten zeitlich den größeren Anteil an der gesamten Trainingseinheit haben und während diesen sollte im Bereich um ca. 40–50 % des Leistungsmaximums trainiert werden (Turner et al.).

Basierend auf dieser Datenlage wurde die Vermutung aufgestellt, dass ein Intervalltraining bestehend aus Belastungsspitzen, in denen der anaerobe Stoffwechsel erreicht und die Laktatschwelle überschritten wird, und Erholungsphasen bei jungen gesunden Mäusen eine osteoinduktive Wirkung zeigen und damit zu einer erhöhten peak bone mass führen würde.

Die Schwierigkeit bei der Entwicklung des osteoinduktiven Laufbandtrainings bestand darin die maximale Belastbarkeit der Mäuse objektiv festzustellen. Laut Hoydal et al. 2007 ist es nicht notwendig die Herzfrequenz oder die Sauerstoffaufnahme zu bestimmen um Rückschlüsse auf den Laktatspiegel zu ziehen. Die Laufgeschwindig-

keit stellt eine ausreichende Variable dar um von einem anaeroben Stoffwechsel ausgehen zu können (Friedmann et al. 1992). Dazu führten wir, angelehnt an Ingalls et al. von 1996, nach einer zweiwöchigen Eingewöhnungsphase einen modifizierten Run-to-Exhaustion-Test durch.

Desweiteren wird durch die negative Steigung des Laufbands mit einer Steigerung des osteoinduktiven Effekts gerechnet, während einer positiven Steigung eher eine myoinduktive Wirkung zugeschrieben wird. Dabei wird davon ausgegangen, dass es beim Abwärtslaufen zu einem axialen Stoß auf den Knochen kommt, der stimulierend auf den Knochenaufbau wirkt (Robling et al. 2002, Boudenot et al. 2015). Dazu wurde das Laufband für den Run-to-Exhaustion-Test und das nachfolgende regelmäßige Laufbandtraining in unterschiedliche Neigungen gebracht (-10°, 0° und +12°).

#### **1.4.4 Die hier durchgeführte pharmakologische Intervention**

Das Endocannabinoidsystem beeinflusst viele verschiedene Organsysteme und ist so an unterschiedlichen physiologischen Prozessen beteiligt. So kontrolliert es beispielsweise den Appetit, Schmerzwahrnehmung, motorische Funktionen und die Immunantwort (Klein et al. 2000, Grant et al. 2005, Di Marzo et al. 2008). Darüber hinaus ist bereits bekannt, dass die Rezeptoren des endogenen Cannabinoidsystems, CB1 und CB2, wesentlich am Knochenstoffwechsel beteiligt sind. Sie werden sowohl von Osteoblasten als auch von Osteoklasten exprimiert und tragen entsprechend zu ihrer Differenzierung bei. Postmenopausal ließ sich eine gesteigerte Expression beider Rezeptoren nachweisen (Idris et al. 2010). Während es bei genveränderten C57Bl6 Mäusen, denen der CB2 Rezeptor fehlt bereits im Alter von acht Wochen im Vergleich zum Wildtyp auf Grund einer gesteigerten Osteoklastenaktivität zu einer deutlich verringerten Knochenmasse kommt (Ofek et al. 2006), weisen Tiere, denen der CB1 Rezeptor fehlt, noch im Alter von drei Monaten auf Grund einer verminderten Osteoklastenzahl bei normaler Osteoblastenzahl und -aktivität eine erhöhte Knochenmasse auf (Idris et al. 2005). Allerdings entwickeln auch die Tiere, denen der CB1 Rezeptor fehlt, im Verlauf das typische Bild einer Altersosteoporose. Im Alter von 12 Monaten ist das Knochenmaterial dieser Tiere fast vollständig durch Adipozyten ersetzt. Darüber hinaus ist die Anzahl und Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten gegenüber dem Wildtyp signifikant vermindert (Idris et al. 2009). Dennoch verringert der Gendefekt, der zum Verlust des CB1 Rezeptors führt, den Knochenverlust nach Ovariectomie (Idris et al. 2010).

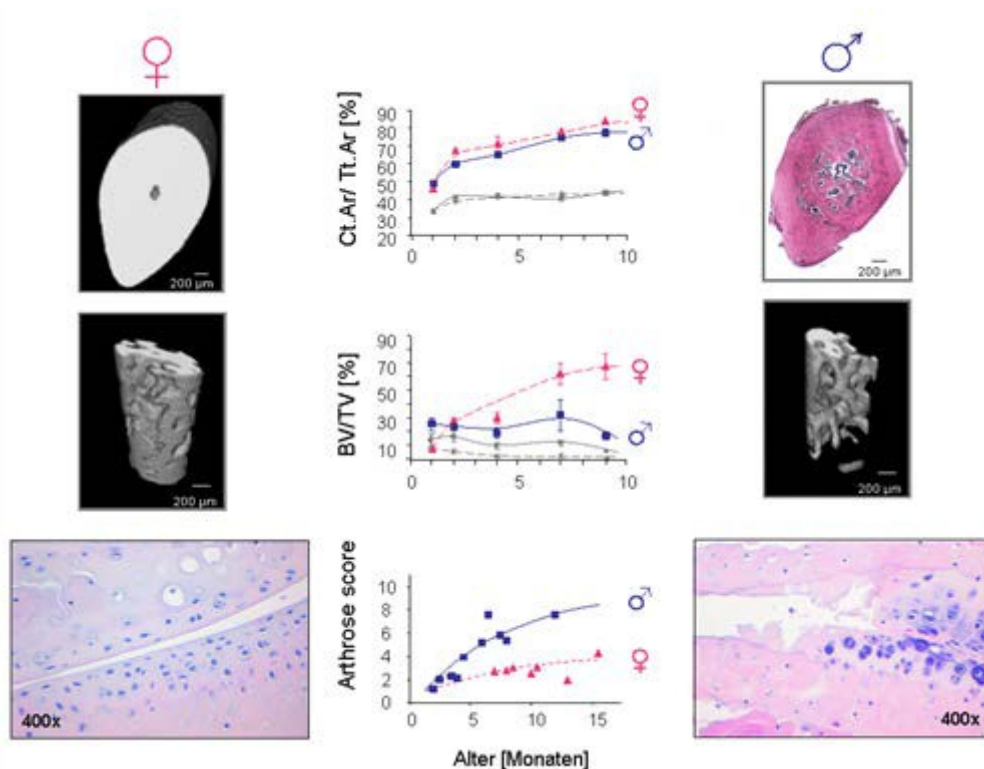
Desweiteren wurde gezeigt, dass Cannabidiol durch Hemmung des RANK / RANKL Systems den Verlust von Knochenmasse reduziert. Dabei wurde bei Ratten exogen eine Parodontose generiert, die zum Verlust von Knochenmasse am angrenzenden Knochen führt. Im Vergleich zu den Kontrollen, wiesen die Tiere, die über 30 Tage täglich Cannabidiol intraperitoneal erhalten hatten, einen deutlich geringeren Knochenverlust auf (Napimoga et al. 2009). Außerdem wurde nachgewiesen, dass ein selektiver CB2-Rezeptor-Agonist den Verlust von trabekulärem Knochenmaterial nach Ovariectomie bei C57Bl6 Mäusen verringert (Sophocleous et al. 2011). Darüber hinaus ist aus derselben Arbeit bekannt, dass dieser CB2-Rezeptor-Agonist die Osteoblastendifferenzierung und -migration in vitro stimuliert. Die Frage nach dem molekularen Mechanismus zwischen dem CB2 Rezeptor und der Osteoklastendifferenzierung wurde 2013 durch eine Studie von Schmuhl et al. aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Rostock beantwortet. Diese zeigte, dass Cannabidiol durch die Aktivierung von CB2 Rezeptoren über den p42/44 MAPK Signalweg zur Migration der Mesenchymalen Stammzellen führt und die Osteoblastendifferenzierung fördert. Das erklärt die positive Wirkung des CB2 Rezeptors auf den Knochenaufbau. Diese Tatsache legt nahe die osteoinduktive Wirkung von exogen zugeführten Cannabinoiden bzw. Agonisten an Cannabinoidrezeptoren in vivo zu untersuchen. Cannabinoide werden bereits in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zur Analgesie (Schicho and Storr 2014) sowie als Anxiolytika eingesetzt. In der Osteoporosetherapie finden Cannabinoide derzeit noch keine Anwendung.

FAAH-Inhibitoren hemmen die Fatty Acid Anandamid Hydrolase und damit den Abbau der Anandamide. Diese gehören zu den endogenen Cannabinoiden. Somit führt die Hemmung der Hydrolase zur Akkumulation der Anandamide und folglich zur gesteigerten Wirkung an den endogenen Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz, Institut für Pharmakologie der Universität Rostock, entschieden wir uns die osteoinduktive Wirkung von URB 597, einem gut erforschten FAAH-Inhibitor, in vivo zu untersuchen. URB 597 wird bereits als Analgetikum und Anxiolytikum (Haller et al. 2006, Patel et al. 2006, Kathuria et al 2002) eingesetzt, ist allerdings auf Carbamatbasis entwickelt und unterliegt damit einem hohen First-Pass-Effekt in der Leber (Clapper et al. 2009). Daher eignet sich vor allem eine nicht-orale Applikationsform.

### **1.5 Die STR/ort Maus und ihre besondere Eignung**

Der STR/ort Mausstamm weist zahlreiche Besonderheiten auf. Eine davon ist ein außergewöhnlicher Knochenphänotyp. Und zwar weist die STR/ort Maus im Vergleich zu gleichaltrigen Mäusen des Vergleichstamms (C57Bl6) sowohl im kortikalen als auch im trabekulären Bereich des Knochens eine deutlich erhöhte Knochenmasse auf (Abb. 3). Dabei unterliegt sie allerdings einem auffälligen Geschlechtsdimorphismus. Und zwar haben die weiblichen STR/ort Mäuse gegenüber den gleichaltrigen Männchen eine deutlich erhöhte Knochenmasse. Dies gilt vor allem für den trabekulären Bereich des Knochens (Abb. 3) (Pasold et al. 2013, Uchida et al. 2012).

Darüber hinaus liegt bei der STR/ort Maus eine geschlechtsgebundene Neigung zur Entwicklung arthrotischer Veränderungen der Kniegelenke vor. 80–90 % der männlichen STR/ort Mäuse entwickeln im Alter von neun Monaten histologisch nachweisbare Veränderungen der Kniegelenke. Dabei kommt es zu degenerativen Veränderungen des Knorpels und des angrenzenden Knochens, die dem Erscheinungsbild einer humanen Arthrose ähneln (Mahr et al. 2003, Pasold et al. 2013). Die Weibchen hingegen weisen auch im Alter von neun Monaten ein physiologisches Bild der Kniegelenke auf (Abb. 3).



**Abbildung 3: Der Knochen- und Gelenkphänotyp der weiblichen und männlichen STR/ort Maus**

Die Liniendiagramme in der Mitte zeigen die Mittelwerte der kortikalen Knochenmasse (cortical area/total area [%]), die Mittelwerte mit Standardabweichung der trabekulären Knochenmasse (bone volume/total volume [%]) und die Mittelwerte des Arthrosescores bei männlichen und weiblichen STR/ort Mäusen sowie bei männlichen und weiblichen C57Bl6 Mäusen im zeitlichen Verlauf. Links werden von oben nach unten der kortikale Knochen, der trabekuläre Knochen des Femurs und der Gelenknorpel des Kniegelenks weiblicher STR/ort Mäuse dargestellt. Rechts sind die entsprechenden Strukturen der stammesgleichen gleichaltrigen Männchen dargestellt. Bei den Schwarzweißbildern handelt es sich um  $\mu$ CT Bilder, bei den farbigen Bildern handelt es sich um histologische Dünnschnitte, die mittels Hämatoxylin / Eosin gefärbt wurden. Das Knochengewebe stammt von drei Monate alten Tieren, der Gelenknorpel jeweils von neun Monate alten STR/ort Mäusen. Quelle: Müller-Hilke, 2013

Die männliche STR/ort Maus ist für diese Arbeit in erster Linie auf Grund ihrer Neigung zu arthrotischen Veränderungen im Bereich der Kniegelenke interessant. So besteht im weiteren Verlauf, nachdem eine Zunahme der Knochenmasse erreicht werden konnte, auch die Möglichkeit deren Einfluss auf die Entstehung von Gelenkdegenerationen zu untersuchen.

Auch eignet sich die männliche STR/ort Maus auf Grund ihres besonderen Knochenphänotyps. Die gegenüber der Vergleichsmaus erhöhte Knochenmasse lässt auf eine erhöhte Sensibilität für osteoinduktive Stimuli schließen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass osteoinduktive Effekte der sportlichen und pharmakolo-

gischen Intervention bei der männlichen STR/ort Maus frühzeitiger und deutlicher sichtbar sein werden.

Die STR/ort Mäuse wurden den Interventionen in einem Alter unterzogen, das in etwa der ersten und zweiten Lebensdekade des Menschen entspricht, da in dieser Lebensphase der größte Einfluss auf die peak bone mass genommen werden kann.

## **1.6 Hypothese**

Das in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. habil. Sven Bruns entwickelte osteoinduktive Laufbandtraining, das in Intervallform bei unterschiedlichen Steigungen durchgeführt wird und durch anaerobe Leistungsspitzen gekennzeichnet ist, sowie die in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Burkhard Hinz entwickelte pharmakologische Intervention mit URB 597 führt bei männlichen STR/ort Mäusen nach sachgerechter und ausreichend langer Durchführung zu einer Zunahme der trabekulären und kortikalen Knochenmasse.

## 2 Materialien, Geräte, Chemikalien und Methoden

### 2.1 Materialien, Geräte und Chemikalien

**Tabelle 1: Verwendete Materialien und Chemikalien und Software**

Bezeichnung	Produktname / Seriennummer	Hersteller
Laufband	Process Control Treadmill	TSE systems
µCT-Scanner	Skyscan 1076	Skyscan
3-Punkt-Biege-Test- Bruchvorrichtung	Mini Zwick Z 2.5	Zwick/Roell GmbH
ELISA Plattenleser	Milenia Kinetic Analyzer	DPC
Waage	PT1200	Sartorius
Waage	MXX-212	Denver Instruments
Cryoröhrchen		
Glaskapillaren		
Spritze		
1,5 ml Eppendorfgefäße		
RNase freie 1,5 ml Eppendorfgefäße		
Pumpe	Vacumat	
Zentrifuge (groß)		
Zentrifuge (klein)		
Thermo Cyclor	Master Cyclor	Eppendorf
RNeasy Plus Mini Kit	Cat No./ID: 74134	Qiagen
1000 µl Pipette	Part. No. F123602	Gilson – Pipetman
200 µl Pipette	Part. No. F123601	Gilson – Pipetman
20 µl Pipette	Part. No. F123600	Gilson – Pipetman
Pipettenspitzen		
Schutzbrille	astropspec	Uvex
Isolationsbehälter		
Mörser		
Spachtel		
Handschuhe		
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Part. No. 4368814	Applied Biosystems
TaqMan Gene Expression Master Mix		
PCR Reaktionsplatte mit 96		

## Vertiefungen

Abdeckfolie für die Platte

1,5 ml Eppendorfgefäß

3 ml Eppendorfgefäß

PCR-Tubes

NanoDrop

ND-1000

Thermo Scientific

TaqMan Assay Mix RANK

Mm00437132\_m1 Tnfrsf1

Applied Biosystems

TaqMan Assay Mix RANKL

Mm00441906\_m1 Tnfsf11

Applied Biosystems

TaqMan Assay Mix OPG

Mm01205928\_m1 Tnfrsf1

Applied Biosystems

TaqMan Assay Mix ALP

Mm00475834\_m1 Alp1

Applied Biosystems

TaqMan Assay Mix COL1A1

Mm00801666\_g1 Col1a1

Applied Biosystems

TaqMan Assay Mix HIF1A

Mm00468869\_m1 Hif1a

Applied Biosystems

TaqMan Assay Mix CATHK

Mm00484039\_m1 Ctsk

Applied Biosystems

Forward Primer GAPDH

Reverse Primer GAPDH

VIC Probe GAPDH

Forward Primer TRAP

Sigma-Aldrich

Reverse Primer TRAP

Sigma-Aldrich

VIC Probe TRAP

Sigma-Aldrich

Forward Primer CALCR

Sigma-Aldrich

Reverse Primer CALCR

Sigma-Aldrich

VIC Probe CALCR

Sigma-Aldrich

Forward Primer TCIRG

Sigma-Aldrich

Reverse Primer TCIRG

Sigma-Aldrich

VIC Probe TCIRG

Sigma-Aldrich

ELISA Kit RANKL

SEA 855 Mu

Cloud Clone Corp

ELISA Kit OPG

SEA 108 Mu

Cloud Clone Corp

ELISA Kit PINP

SEA 57 Mu

Cloud Clone Corp

ELISA Kit CTX 1

CEA 665 Mu

Cloud Clone Corp

PFA 4 %

Formafix 4 % gepuffert

Grimm med. Logistik GmbH

NaCl 0,9 %

Natriumchlorid 0,9 %

B.Braun

Ketamin

URB 597

No. 10046

Cayman Chemical

Rompun

Bacillol

Flüssiger Stickstoff

I4100RB

Air Liquid Medical GmbH

Mercaptoethanol

Chloroform		
70 % Ethanol		Apotheke der Universität Rostock
BSA	Art. Nr. 80.76.5	Roth
PBS		
DMSO	Art. Nr. 4720.1	Roth
RNase freies H <sub>2</sub> O		
destilliertes H <sub>2</sub> O		
RT-PCR		
Vortexer		
Leckerlies	Drops für Nagetiere	Vitakraft
<b>Software:</b>		
GraphPad Prism 5	Version 5.0.0	GraphPad Software, Inc.
RQ-Manager	Version 1.2	Applied Biosystems
	Sequence Detection	
SDS 2.3	Systems 7900HT – Version 2.3	Applied Biosystems
NanoDrop Software	ND-1000 V3.3.0	Thermo Scientific
Office Paket	Version 2013	Microsoft
Prüfsoftware 3-Punkt-Biegetest	testXpert I	Zwick/Roell GmbH
NRecon	Version 1.6.6.0	Skyscan
Data Viewer	Version 1.4.	Skyscan
CT-Analyzer	Version 1.12.4.0	Skyscan

## 2.2 Verwendete Tiere

Es wurden ausschließlich männliche STR/ort Mäuse verwendet. Die Gesamtanzahl der verwendeten Tiere beträgt n=59.

In einigen Fällen standen Referenz- bzw. Kontrolldaten aus früheren Projekten der Arbeitsgruppe zur Verfügung, die übernommen und mit in die Ergebnisse einbezogen wurden.

Der STR/ort-Mausstamm wurde ursprünglich von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) erworben und wird seitdem im Institut für experimentelle Chirurgie der Universität Rostock von Frau Ilona Klamfuß unter keimfreien Bedingungen gezüchtet und betreut. Eine Woche vor Beginn der jeweiligen Intervention wurden die Mäuse in

jeweils einen eigenen Käfig gesetzt und in der chronischen Tierhaltung innerhalb des Instituts untergebracht.

Dort bestehen Wände und Böden aus PVC (Hohlkehle), das Lüftungssystem sorgt für einen 20fachen Luftwechsel, die Raumtemperatur beträgt  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , die Luftfeuchtigkeit beträgt  $60 \pm 20\%$ . Die Tiere waren einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt inklusive 30 min Dämmerung. Sie erhielten Wasser und Futterpellets ad libitum.

Eine Erkrankung sowie eine unverträglich hohe Belastung schlagen sich häufig in einer Gewichtsabnahme bzw. einer fehlenden Gewichtszunahme nieder. Daher wurden die Tiere alle zwei Wochen gewogen, um dadurch ein entsprechendes Ereignis frühzeitig wahrnehmen zu können.

### **2.3 Osteoinduktives Laufbandtraining**

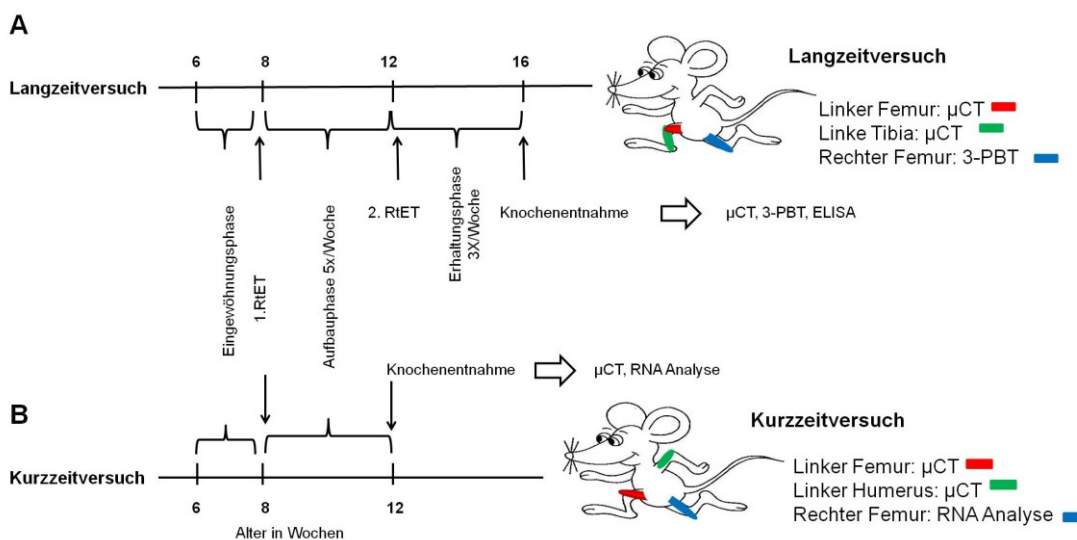
In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. habil. Sven Bruhn, Institut für Sportwissenschaft der Universität Rostock, wurde ein osteoinduktives Laufbandtraining entwickelt, dem zum einen durch das Erreichen einer anaeroben Stoffwechsellage in den Geschwindigkeitsspitzen und zum anderen durch die (negative) Steigung eine besondere Osteoinduktivität zugeschrieben wird.

Zunächst führten wir einen Langzeitversuch durch. Hier absolvierten die Mäuse ( $n=24$ ) nach der zweiwöchigen Eingewöhnungsphase über vier Wochen fünfmal wöchentlich eine Trainingseinheit (Aufbauphase) und über weitere vier Wochen dreimal wöchentlich eine Trainingseinheit (Erhaltungsphase). Es ist bereits bekannt, dass aufgebaute Knochenmasse auch nach Reduktion der Anzahl der Trainingseinheiten erhalten bleibt (Wu et al. 2004). Dabei wurde das Training bei den drei Gruppen mit jeweils acht Mäusen mit unterschiedlichen Steigungswinkeln des Laufbands durchgeführt ( $n=8$  bei  $-10^{\circ}$ ,  $n=8$  bei  $0^{\circ}$  und  $n=8$  bei  $+12^{\circ}$ ).

Hier konnten sowohl im trabekulären als auch im kortikalen Bereich ausgeprägte Veränderungen des Knochenaufbaus nachgewiesen werden. Um eine genauere Aussage über den Zeitpunkt der Entstehung der Veränderung treffen zu können, führten wir anschließend einen Kurzzeitversuch durch. Bei diesem Kurzzeitversuch absolvierten die Mäuse ( $n=4$ ) nach einer zweiwöchigen Eingewöhnungsphase über vier Wochen eine Trainingseinheit an fünf Tagen pro Woche bei einem Steigungswinkel von  $-10^{\circ}$ . Wir entschieden uns hier für die negative Steigung, da im Langzeitversuch

bei den Tieren, die das Training auf einem abwärts geneigten Laufband absolviert hatten, die größten Veränderungen im trabekulären Knochenaufbau zu verzeichnen waren.

Der genaue zeitliche Ablauf des Langzeitversuchs sowie des Kurzzeitversuchs ist der Abbildung 4 zu entnehmen.



**Abbildung 4: Osteoinduktives Laufbandtraining**

Zeitlicher Ablauf des Lang- (A) und Kurzzeitversuchs (B) sowie schematische Abbildung der Verwendung der entnommenen Knochen. Quelle: <http://www.danysworld.de> 05.02.2015, eigene Darstellung

### 2.3.1 Eingewöhnungsphase

Im Alter von fünf Wochen wurden die Mäuse auseinandergesetzt und in die chronische Haltung überführt. Nach einer einwöchigen Akklimatisierungsphase begann die zweiwöchige Eingewöhnungsphase auf dem Laufband im Alter von sechs Wochen. In dieser Phase ging es weniger darum die Mäuse an das Training als an das Laufband selbst und den menschlichen Kontakt zu gewöhnen. Der Ablauf der Eingewöhnungsphase ist der Tabelle 2 zu entnehmen.

**Tabelle 2: Ablauf der Eingewöhnungsphase**

Tag	Absolviertes Training
1. Tag	10 min auf ausgeschaltetem Laufband
2. Tag	10 min auf ausgeschaltetem Laufband, dann 10 min bei 9 m/min
3. Tag	5 min auf ausgeschaltetem Laufband, dann 15 min bei 12 m/min
4. Tag	10 min bei 12 m/min, dann 5 min. bei 15 m/min
5. Tag	10 min bei 12 m/min, dann 5 min bei 15 m/s, dann 5 min bei 18 m/s
6. Tag	Run-to-Exhaustion-Test (siehe unten)

Dazu wurden die Mäuse am ersten Tag der Eingewöhnungsphase für zehn Minuten auf das ausgeschaltete Laufband gesetzt. Am zweiten Tag der Eingewöhnungsphase wurde das Laufband, nachdem die Mäuse zehn Minuten auf dem ausgeschalteten Laufband gesessen hatten, für weitere zehn Minuten auf eine Geschwindigkeit von 0,15m/s (entspricht 9m/min) eingeschaltet. Dabei liefen die Mäuse zunächst scheinbar konzentriert am vorderen Ende des Laufbandes, ließen sich aber zunehmend ablenken, hatten aber augenscheinlich zu keinem Zeitpunkt Schwierigkeiten mit der Geschwindigkeit des Laufbandes Schritt zu halten. Am dritten Tag der Eingewöhnungsphase liefen die Mäuse nach kurzer Akklimatisierung auf dem Laufband 15 Minuten bei einer Geschwindigkeit von 0,2m/s (entspricht ca. 12m/min). Am vierten Tag der Eingewöhnungsphase absolvierten die Mäuse die erste Geschwindigkeitssteigerung innerhalb eines Trainingsprogramms, und zwar liefen sie zunächst zehn Minuten bei einer Geschwindigkeit von 0,2m/s und dann weitere fünf Minuten bei einer Geschwindigkeit von 0,25m/s (entspricht ca. 15m/min). Am fünften Tag der Eingewöhnungsphase wurde das Programm erneut gesteigert, indem die Mäuse zusätzlich noch fünf Minuten bei einer Geschwindigkeit von 0,3m/s (entspricht ca. 18m/min) liefen. Die Eingewöhnungsphase verlief komplikationslos und die Mäuse schienen zu keinem Zeitpunkt Schwierigkeit mit der Geschwindigkeit zu haben, im Gegenteil: Je höher die Geschwindigkeit, umso höher schien die Konzentration. Nach erfolgtem Training erhielten die Mäuse stets eine Belohnung in Form eines Leckerlies, auf das sie sich stürzten, sobald sie in den Käfig zurückgesetzt worden waren.

Am sechsten Tag der Eingewöhnungsphase erfolgte der Run-to-Exhaustion-Test.

Der detaillierte Ablauf des Run-to-Exhaustion-Tests ist Abbildung 5 zu entnehmen.

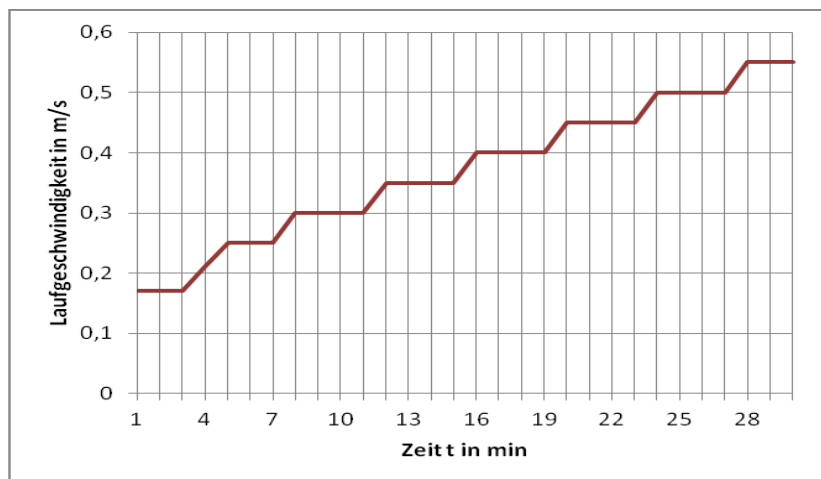
### **2.3.2 Run-to-Exhaustion-Test**

Der Test wurde stets nur mit zwei Mäusen gleichzeitig und jeweils in der Steigung, in der im Verlauf auch das eigentliche Lauftraining erfolgen sollte, durchgeführt. Der Test erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Ingalls et al. und wurde leicht modifiziert.

Dabei wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,17m/s (entspricht ca. 10m/min) begonnen. Bei dieser Geschwindigkeit liefen die Mäuse zunächst drei Minuten auf dem Laufband. Dann wurde die Geschwindigkeit über eine Zeit von zwei Minuten auf

0,25m/s (entspricht ca. 15m/min) erhöht und für weitere zwei Minuten gehalten. Damit war die Aufwärmphase des Tests abgeschlossen. Danach wurde die Geschwindigkeit immer wieder innerhalb von 30 Sekunden um 0,05m/s (entspricht ca. 3m/min) gesteigert und bei der neuen Geschwindigkeit für zweieinhalb Minuten gehalten. Der Test wurde abgebrochen, wenn die Maus offensichtlich nicht mehr mit der Geschwindigkeit Schritt halten konnte. Das war der Fall, wenn die Maus nicht mehr aus eigener Kraft von der hinteren Begrenzung des Laufbands wegkam.

Zur Anpassung des Laufbands an Mäuse und zur deutlichen Distanzierung von der Verwendung von Strom, wurde das Laufband nach hinten durch Metallgitter begrenzt, sodass das Laufband sowohl nach vorne als auch nach hinten durch starre Wände begrenzt wurde.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Ablaufs des Run-to-Exhaustion-Tests**

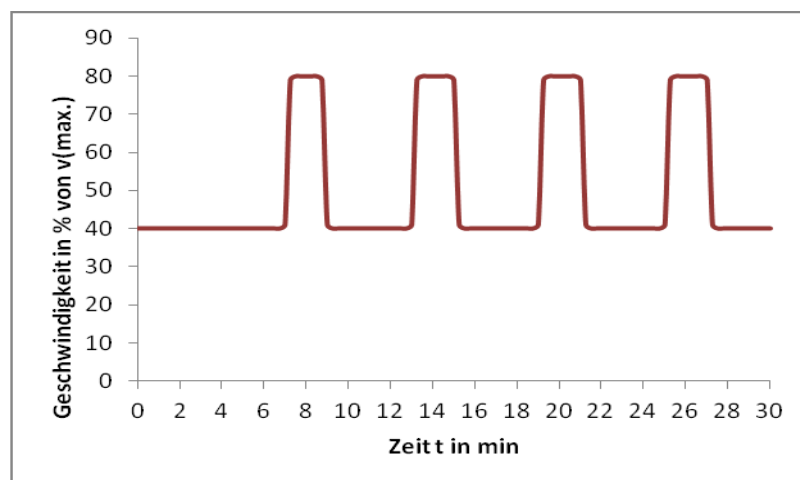
Konnte die Maus nicht mehr mit der Geschwindigkeit des Laufbandes mithalten, stieß sie unweigerlich gegen die hintere Begrenzung des Laufbandes. Allein die Tatsache gegen diese Begrenzung zu stoßen schien für die Tiere ein Anreiz zu sein, die restlichen Kraftreserven zu mobilisieren, sodass sie auch bei hohen Geschwindigkeiten noch aus eigener Kraft nach vorne und damit von der hinteren Begrenzung weg liefen. Erreichten sie jedoch ihr absolutes Leistungsmaximum, schafften sie es nicht mehr aus eigener Kraft sich von der Begrenzung weg zu bewegen und der Test wurde abgebrochen. Die Abbruchgeschwindigkeit wurde dem Leistungsmaximum und damit 100 % der maximalen Belastbarkeit der Maus gleichgesetzt.

Die acht Mäuse jeder Gruppe wurden beim Langzeitversuch entsprechend ihres Leistungsmaximums in eine schnelle oder langsame Gruppe eingeteilt. Die Leis-

tungsmaxima der jeweiligen Gruppe wurde gemittelt und 80 – 90 % bzw. 40–50 % der Leistung ermittelt. So konnten die Geschwindigkeiten für das Intervalltraining festgelegt werden. Beim Langzeitversuch wurde der Test nach den ersten vier Wochen (Aufbauphase) wiederholt, um gegebenenfalls einen Trainingseffekt und damit einen Leistungszuwachs aufzudecken und die Geschwindigkeiten des Trainings entsprechend anzugleichen.

### 2.3.3 Trainingseinheit

Beim Kurzzeitversuch wurde über den Zeitraum von vier Wochen fünfmal wöchentlich eine Trainingseinheit absolviert. Beim Langzeitversuch wurde nach zunächst gleichem Versuchsablauf (Aufbauphase) über weitere vier Wochen dreimal wöchentlich die besagte Trainingseinheit durchgeführt (Erhaltungsphase). Wobei nach der intensiven Trainingsphase der Run-to-Exhaustion-Test wiederholt wurde und die Geschwindigkeiten entsprechend an das neue Leistungsmaximum angeglichen wurden. Die Gesamtlänge einer Trainingseinheit betrug jeweils 30 Minuten. Der Ablauf einer Trainingseinheit ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des Ablaufs einer Trainingseinheit

Mit Hilfe der im Run-to-Exhaustion Test ermittelten maximalen Geschwindigkeit konnte nun das Trainingsprogramm erstellt werden. Dabei wurde die Trainingseinheit mit einer siebenminütigen Erwärmungsphase bei einer Geschwindigkeit von 40–50 % des Leistungsmaximums begonnen. Darauf folgten vier Belastungsspitzen, die eineinhalb Minuten andauerten und jeweils von dreieinhalb minütigen Erholungspausen unterbrochen wurden. Während der Belastungsspitzen betrug die Geschwindigkeit ca. 80–90 % der ermittelten Maximalgeschwindigkeit. In den Erholungsphasen, sowie

während der dreiminütigen Auslaufphase am Ende der Trainingseinheit liefen die Mäuse erneut bei ca. 40–50 % der Maximalgeschwindigkeit. Die Geschwindigkeitsänderungen, sowohl die Steigerung als auch die Abnahme der Geschwindigkeit, wurden jeweils innerhalb von 30 Sekunden durchgeführt. So war zumindest die theoretische Planung. Bei der praktischen Durchführung zeigte sich allerdings, dass einige Mäuse während eines schnellen Intervalls nicht mit einer Geschwindigkeit von 80–90 % der ermittelten Maximalgeschwindigkeiten mithalten konnten, sondern immer wieder gegen die hintere Begrenzung stießen und von dort nicht aus eigener Kraft von dieser weg kamen. Daher musste die Geschwindigkeit in den schnellen Intervallen zum Teil herabgesetzt werden, dabei wurde mindestens eine Geschwindigkeit von 70 % der Maximalgeschwindigkeit angestrebt.

Unmittelbar nach der Trainingseinheit wurden die Tiere zurück in ihren Käfig gesetzt und erhielten eine Belohnung in Form eines Leckerlies.

Die Knochenentnahme erfolgte bei den Mäusen, die das Kurzzeittraining absolvierten unmittelbar nach der letzten Trainingseinheit im Alter von zwölf Wochen. Bei den Mäusen, die das Langzeittraining absolvierten, erfolgte die Knochenentnahme am darauffolgenden Tag nach der letzten Trainingseinheit im Alter von 16 Wochen.

## **2.4 Pharmakologische Intervention**

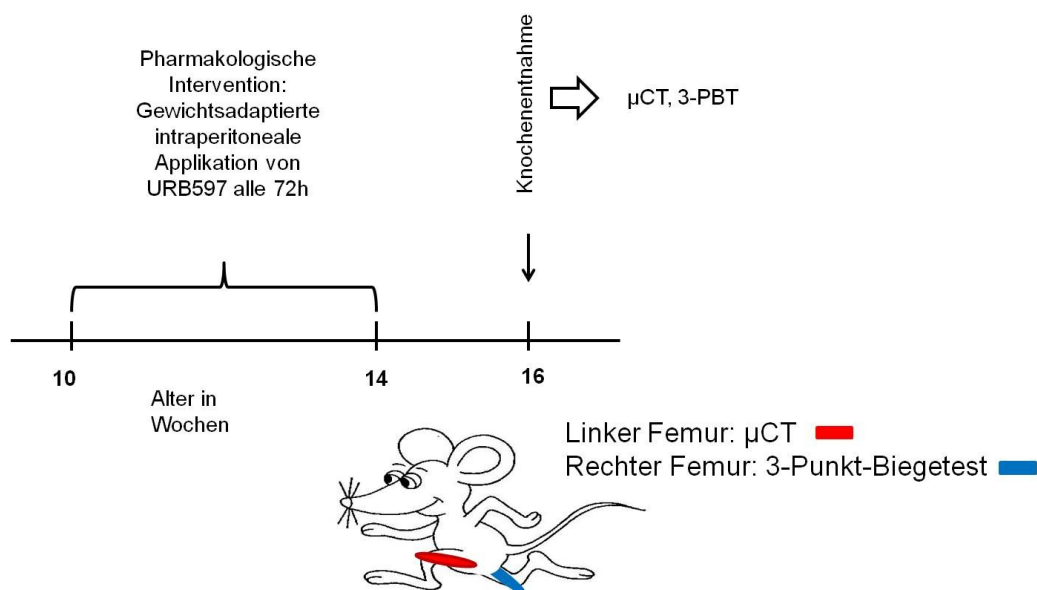
Die pharmakologische Intervention erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz, Institut für Pharmakologie der Universität Rostock.

Dazu wurden die Mäuse (n=10) im Alter von neun Wochen in jeweils einen eigenen Käfig gesetzt und in die chronische Haltung des Instituts für experimentelle Chirurgie der Universität Rostock überführt. Nach einer einwöchigen Akklimatisationsphase wurde die Intervention gewichtsadaptiert begonnen.

Bei der Dosierung und Verdünnung sowie der Applikationsform des FAAH-Inhibitors orientierten wir uns an den Protokollen folgender Arbeiten: Clapper et al. 2009, Haller et al. 2006 und 2008, Patel et al. 2006, Kathuria et al. 2002, Vacondio et al. 2011 und Zaniewska et al. 2006, Casajeros et al. 2013, Huang et al. 2011. Zunächst wurde der FAAH-Inhibitor URB597 in einem Verhältnis 100:1 in DMSO gelöst. Diese Lösung wiederum wurde in einem Verhältnis 1:100 mit PBS mit BSA (0,5 %) verdünnt. Den Mäusen wurde 5 µg URB597 pro g Körpergewicht und pro Injektion intraperitoneal verabreicht. Bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von ca. 30g erhielten die

Mäuse pro Injektion eine Menge von 150 $\mu$ g URB 597 gelöst in einem Gesamtvolumen von 0,15ml. Die Applikation erfolgte über einen Zeitraum von 30 Tagen alle 72 Stunden, sodass die Mäuse insgesamt zehn Injektionen und damit eine Gesamtmenge von 1,5 mg URB597 erhielten. Vor jeder Injektion wurden die Mäuse zum einen zur gewichtsadaptierten Gabe des Pharmakons, zum anderen zur Überwachung der physiologischen Gewichtsentwicklung gewogen.

Die Knochenentnahme erfolgte zwei Wochen nach der letzten intraperitonealen Injektion im Alter von 16 Wochen. Abbildung 7 stellt den zeitlichen Ablauf der Intervention schematisch dar.



**Abbildung 7: Pharmakologische Intervention**

Zeitlicher Ablauf der pharmakologischen Intervention sowie schematischer Abbildung der Verwendung der entnommenen Knochen. Quelle: <http://www.danysworld.de> 05.02.2015, eigene Darstellung

## 2.5 Knochen- und Blutentnahme

Die Narkoselösung wurde aus den beiden Substanzen, 0,2ml Rompun (Muskelrelaxanz, 15mg/kg) und 0,6ml Ketamin (Narkotikum, 50mg/kg) unmittelbar vor intraperitonealer Injektion in einer Tuberkulinspritze manuell zusammengemischt.

Für die individuelle Menge der Narkoselösung wurde die Maus vor Injektion gewogen (ca. 0,03–0,05ml). Die Sedierung trat ca. fünf Minuten nach intraperitonealer Injektion ein. Dann wurde die Maus erneut gewogen und die Körperlänge gemessen. Wenn die Schmerzreflexe an den Hinterläufen und am Schwanz erloschen waren, wurde

zunächst mittels einer Glaskapillare retrobulbär Blut entnommen. Danach erfolgte die zervikale Dislokation.

Nach der Hautdesinfektion mit Bacillol erfolgte dann die Knochenentnahme. Dazu wurden Femur und Tibia beider Hinterläufe sowie Humeri, Ulnae und Radii beider Vorderläufe freipräpariert. Der Femurkopf wurde aus der Hüftpfanne rotiert und die Pfote wurde abgetrennt. Analog dazu wurde mit den Vorderläufen verfahren. Danach erfolgte die sorgfältige Reinigung aller Extremitäten von Muskelgewebe. Das rechte Bein konnte im Bereich des Kniegelenks durchtrennt werden, das linke Bein und der linke Vorderlauf wurden als Ganzes asserviert.

Für die einzelnen Untersuchungen, die mit den entnommenen Knochen vorgenommen wurden, sind unterschiedliche Präparationen und Asservierungsformen notwendig. So wurden die Knochen für die  $\mu$ CT Untersuchung nach Entnahme in einem Histokästchen in 4 % Paraformaldehyd (PFA) eingelegt. Für den 3-Punkt-Biege-Test hingegen wurde der Knochen mit Mull umwickelt in einem Cryoröhrchen in 0,9 % NaCl bei  $-20^{\circ}$  eingefroren. Für die RNA-Analyse wurde der Knochen zunächst von Knochenmark befreit und unmittelbar nach Präparation mittels flüssigen Stickstoffs in einem Eppendorfgefäß schockgefroren.

Im Rahmen des Kurzzeitversuchs wurde das linke Bein für die  $\mu$ CT Analyse komplett entnommen und als Ganzes in 4 % PFA eingelegt. Aus dem rechten Femur wurde das Knochenmark mittels einer Kanüle heraus gespült, danach wurde der Knochen schockgefroren. Der linke Humerus wurde samt Ulna und Radius in 4 % PFA eingelegt. Auch im Rahmen des Langzeitversuchs und der pharmakologischen Intervention wurde das linke Bein komplett in 4 % PFA eingelegt, der rechte Femur wurde jedoch in Mull gewickelt und in 0,9 % NaCl getränkt bei  $-20^{\circ}$  eingefroren.

Den Abbildungen 5 und 8 ist zu noch einmal vereinfacht zu entnehmen, welcher Knochen nach der entsprechenden Intervention für welche Untersuchung genutzt wurde.

Das retrobulbär entnommene Blut wurde bei 5000 rpm sieben Minuten zentrifugiert, danach wurde das Serum, das im weiteren Verlauf für die ELISA genutzt wurde, abpipettiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

## 2.6 Mikro-CT-Analyse

Die Knochen wurden über mindestens sieben Tage in 4 % PFA fixiert. Für die eigentliche  $\mu$ CT-Analyse wurden die Knochen zunächst unter fließendem Wasser gespült und über 24 Stunden in 0,9 % NaCl eingelegt. Dann wurden sie einzeln in mit NaCl gefüllte Eppendorfgeläße überführt, diese wurden luftblasenfrei verschlossen und im  $\mu$ CT gescannt.

Bei dem hier vorliegenden  $\mu$ CT handelt es sich um ein Gerät der Firma SkyScan mit der Modellbezeichnung 1076 und der Softwareversion 4.2. Alle angefertigten Computertomogramme wurden mit einer isotropischen Voxelgröße von  $9\mu\text{m}$  bei 49kV und  $200\mu\text{A}$  durchgeführt. Weitere Einstellungen waren eine Expositionszeit von 1,5 s, ein Rotationsschritt von 0,5 Grad und eine Bildfeld-Mittelwertberechnung von 3.

Für die Rekonstruktion der Knochenproben wurde das Programm NRecon in der Version 1.6.3.3 verwendet. Zur Ausrichtung der Knochen wurde das Programm Data Viewer genutzt. Mit Hilfe der Software CT-Analyser der Firma SkyScan<sup>TM</sup> konnten die Bereiche, in denen die Werte ermittelt werden sollten, die sogenannte Region of interest (ROI), festgelegt werden. Die untenstehenden Werte wurden im Bereich dieser ROIs mit dem BatMan-Programm ermittelt. Im Folgenden wird erläutert wie die ROIs der unterschiedlichen Knochen definiert wurden.

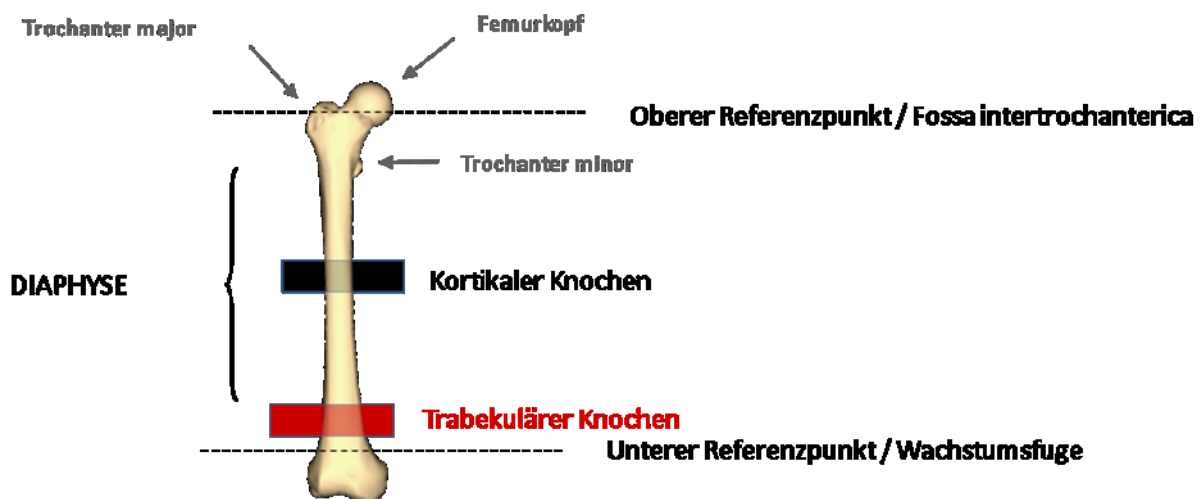
### 2.6.1 Femur

Mittels  $\mu$ CT wurde sowohl der kortikale als auch der trabekuläre Knochenanteil des Femurs, der Tibia und des Humerus analysiert. Der kortikale Knochenanteil des Femurs wurde im Bereich der Diaphyse und der trabekuläre Knochenanteil im Bereich der Metaphyse analysiert. Dabei wurde die Gesamtlänge des Femurs als der Abstand zwischen dem Beginn der distalen Epiphysenfuge und der Fossa intertrochanterica definiert. Innerhalb der mittleren 10 % der Diaphyse wurde der kortikale Knochen untersucht (Abb. 8). Die Region of interest (ROI) wurde dabei manuell entlang der periostealen Femuroberfläche eingezeichnet. Der trabekuläre Knochen hingegen wurde 5 % oberhalb der distalen Epiphysenfuge über einen Bereich von 10 % der gesamten Femurlänge analysiert (Abb. 8). Um ausschließlich trabekulären Knochen zu beurteilen, wurde ein zirkulärer Bereich im Zentrum des Femurquerschnitts mit einem Durchmesser von der Hälfte des gesamten Femurdurchmessers

ausgewählt. Die Definition der zu analysierenden Bereiche des Femurs wurde bereits durch Pasold et al. 2013 beschrieben.

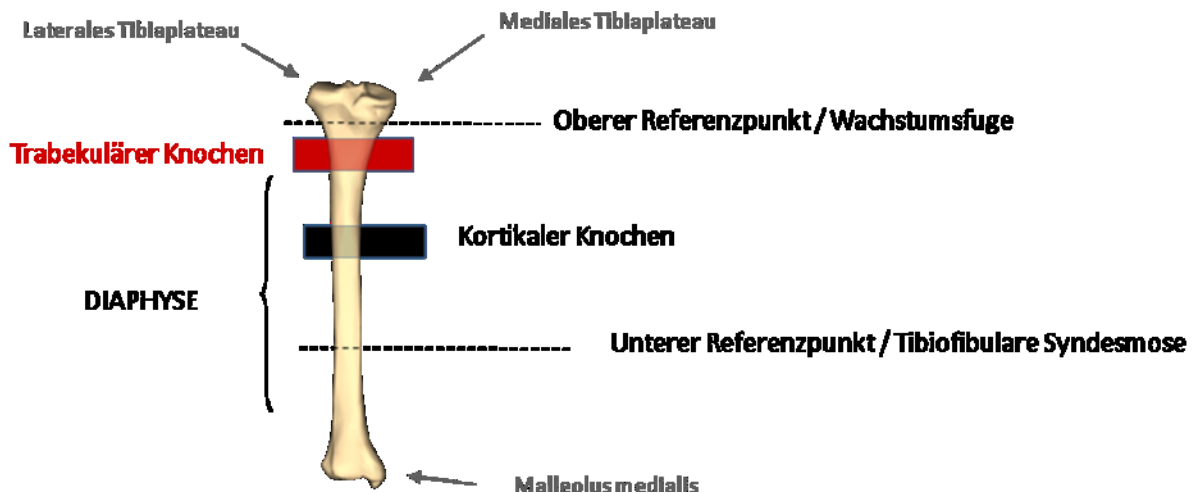
### 2.6.2 Tibia

Auch bei der Tibia wurde der kortikale Knochenanteil im Bereich der Diaphyse und der trabekuläre Knochenanteil im Bereich der Metaphyse analysiert. Die Gesamtlänge der Tibia wurde als der Abstand zwischen dem Beginn der proximalen Epiphysenfuge und der tibiofibularen Syndesmose definiert. Auch hier wurde der kortikale Knochen im Bereich der mittleren 10 % der Diaphyse analysiert (Abb. 9). Die Region of interest (ROI) wurde dabei manuell entlang der periostealen Tibiaoberfläche eingezeichnet. Die Analyse des trabekulären Knochens erfolgte 5 % unterhalb des oberen Referenzpunktes über einen Bereich von 10 % der gesamten Tibialänge (Abb. 9). Um ausschließlich trabekulären Knochen zu beurteilen, wurde ein zirkulärer Bereich im Zentrum des Tibiaquerschnitts mit einem Durchmesser von einem Drittel des größten gesamten Tibiadurchmessers ausgewählt.



**Abbildung 8:**  $\mu$ CT Analyse des Femur

Schematische Darstellung der Region-of-Interest zur Ermittlung der kortikalen und trabekulären Knochenparameter beim Femur; Quelle: <http://lifesciencedb.jp/bp3d/25.01.2015>, eigene Darstellung

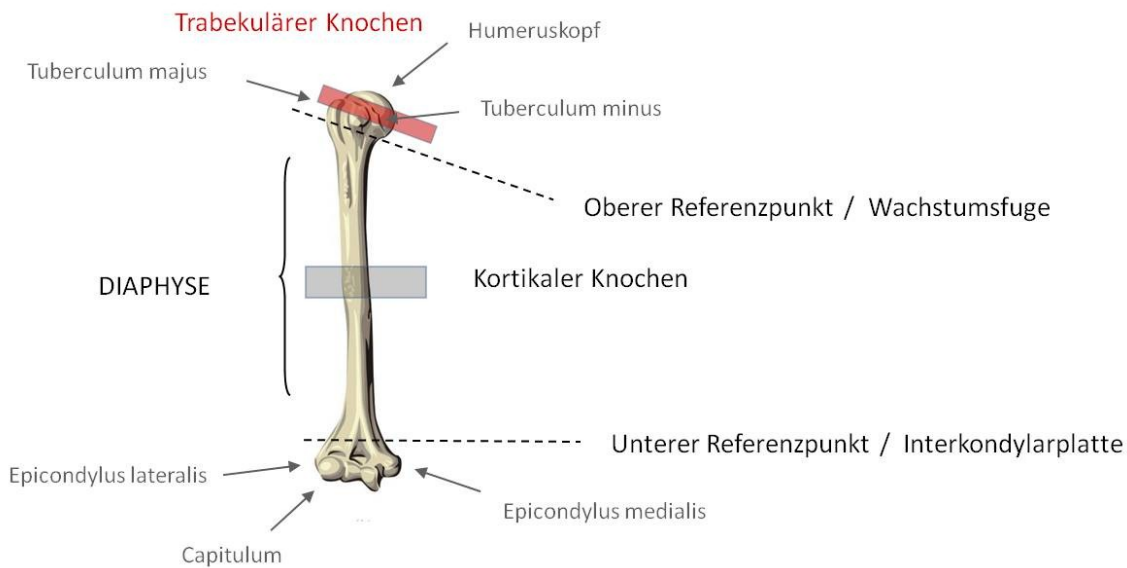


**Abbildung 9:  $\mu$ CT Analyse der Tibia**

Schematische Darstellung der Region-of-Interest zur Ermittlung der kortikalen und trabekulären Knochenparameter bei der Tibia; Quelle: <http://lifesciencedb.jp/bp3d/> 25.01.2015, eigene Darstellung

### 2.6.3 Humerus

Auch im Humerus erfolgte die Analyse des kortikalen Knochenanteils im Bereich der Diaphyse, die Analyse des trabekulären Knochenanteils erfolgte allerdings im Femurkopf. Dabei wurde die gesamte Humeruslänge als der Abstand zwischen Ende der proximalen Epiphysenfuge und der Intercondylarplatte definiert. Innerhalb der mittleren 10 % dieses Bereichs wurde der kortikale Knochen analysiert (Abb. 10). Die Region of interest wurde dabei manuell entlang der periostealen Humerusoberfläche eingezeichnet. Die Gesamtheit des Humeruskopfes wurde definiert als Bereich zwischen dem proximalen Ende des Humerus und Beginn der proximalen Epiphysenfuge. Der trabekuläre Knochen wurde in den mittleren 50 % der gesamten in diesem Bereich liegenden Bilder analysiert. Um ausschließlich trabekulären Knochen zu beurteilen, wurde ein zirkulärer Bereich im Zentrum des Humerusquerschnitts mit einem Durchmesser von der Hälfte des gesamten Humerusdurchmessers ausgewählt.



**Abbildung 10:  $\mu$ CT des Humerus**

Schematische Darstellung der Region-of-Interest zur Ermittlung der kortikalen und trabekulären Knochenparameter beim Humerus; Quelle: <http://lifesciencedb.jp/bp3d/> 25.01.2015, eigene Darstellung

Die Wertermittlung wurde mit Hilfe des Programms BatMan durchgeführt. Innerhalb der definierten Schnittbilder wurden im trabekulären Knochen folgende Werte bestimmt:

Bone Volume/Tissue Volume (Knochenanteil am gesamten Gewebevolumen, BV/TV), Trabecular Number (Anzahl der Trabekel, Tb. N), Trabecular Thickness (Dicke der Trabekel, Tb. Th), Trabecular Separation (Abstand zwischen den Trabekeln, Tb. Sp) und der Structure Model Index (Struktur der Trabekel, SMI).

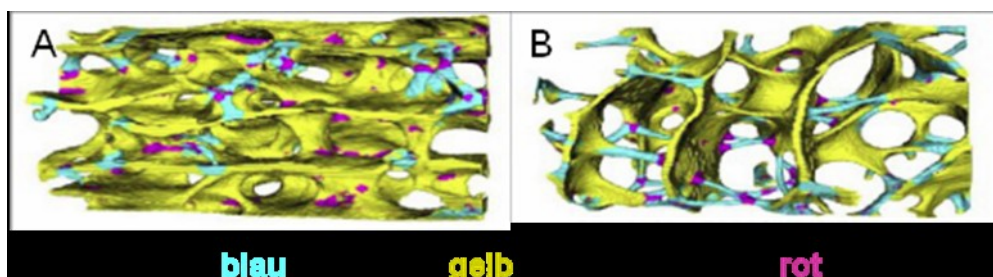
Mithilfe des Structure-Model-Index kann eine Aussage über die Form der Trabekel getroffen werden. Man unterscheidet plattenförmige Trabekel, die das typische Bild eines gesunden Knochens prägen, von stäbchenförmigen Trabekeln, die einen osteoporotischen Knochen kennzeichnen (van Ruijven et al. 2005, Moreno et al. 2012). Entsprechend der Form der Trabekel erreicht der SMI Werte zwischen 0 und 4 und ist einheitenlos. Knochen, der ausschließlich aus plattenförmigen Trabekeln besteht, hat einen SMI von 0. Hingegen Knochen, der nur aus stäbchenförmigen Trabekeln besteht, wird mit einem SMI von 3 beschrieben (Hildebrand et al. 2010). Während also ein gesunder Knochen Werte zwischen 0 und 2 aufweist geht der SMI bei einem osteoporotischen Knochen deutlich gegen 3. Bei einem Wert von 4 haben die Trabekel eine solide Kugelform und bei Werten kleiner 0 weisen sie eine konkave

Oberfläche auf. Abbildung 11 stellt den trabekulären Knochenanteil schematisch dar und verdeutlicht an Hand dieser Darstellung die Definition des SMI.

Desweiteren wurden im kortikalen Bereich folgende Werte bestimmt:

Mean total crosssectional tissue area (Gesamte Gewebefläche, T. Ar), Mean total crosssectional bone area (Gesamte Knochenfläche, B. Ar.), und die Crosssectional Thickness (Knochendicke, Cs. Th) (Abb. 12B). Der Quotient aus B. Ar und T. Ar liefert entsprechend den Anteil des Knochengewebes am Gesamtgewebe (Abb. 12A). Abbildung 12 zeigt eine vereinfachte schematische Darstellung der kortikalen Knochenwerte. Bei Zunahme dieses Quotienten aus B.Ar und T.Ar muss auch T. Ar isoliert betrachtet werden, um die Art des Knochenwachstums zu identifizieren. Hat T.Ar auch isoliert zugenommen, kann man von einem periostealen Wachstum, ansonsten von einem endostealen Wachstum ausgehen.

Darüber hinaus wurden mittels  $\mu$ CT noch weitere Werte bestimmt, die in dieser Arbeit keine Erwähnung finden.



**Abbildung 11: Trabekulärer Knochen und SMI**

Schematische Darstellung des trabekulären Knochens und der unterschiedlichen Trabekelformen. Je nach überwiegender Trabekelform, ergibt sich der SMI. A: SMI ungefähr 1 bei überwiegend plattenförmigen Trabekeln, physiologischer Knochen; B: SMI ungefähr 3 bei überwiegend stäbchenförmigen Trabekeln, osteoporotischer Knochen; Quelle: Moreno et al., ISBI 2012 "Evaluation of the plate-rod model assumption of trabecular bone." Van Ruijven et al., Bone 2005, eigene Darstellung.



**Abbildung 12: Kortikaler Knochen**

Schematische Darstellung des kortikalen Knochens. A: Bone Area/Tissue Area (B.Ar./T.Ar); B: Crosssectional Thickness; Quelle: eigene Darstellung

## 2.7 3-Punkt-Biegetest

Der 3-Punkt-Biegetest wurde am Institut für Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg durchgeführt.

Der 3-Punkt-Biege-Test wurde an den Femora der Mäuse durchgeführt, die das Langzeitlaufbandtraining absolviert hatten sowie der Mäuse, die der pharmakologischen Intervention unterzogen wurden.

Dabei wurde jeweils der rechte Femur so in die 3-Punkt-Biegetest-Bruchvorrichtung eingespannt, dass er mittig auf den beiden sechs Millimeter voneinander entfernten Sockeln zu liegen kam. Wie in Abbildung 13A verdeutlicht wurde der Stift (hier als Pfeil dargestellt) so eingestellt, dass er mit einer Kraft von 20 N und einer Geschwindigkeit von 1 mm/min auf den Knochen einwirkte. Der Bruchverlauf wurde automatisch in einem Bruchprotokoll (beispielhaft in Abbildung 13B dargestellt) dokumentiert. Darin wird die wirkende Kraft  $F$  in N über den Verlauf des Weges in mm dargestellt. Der Beginn der Kurve stellt den ersten Kontakt des Stiftes mit dem Knochen dar. Der plötzliche Abfall der Kurve stellt den endgültigen Bruch des Knochens dar. In diesem Beispiel (Abb. 13B, roter Kreis) bricht der Knochen bei 24 N und 0,32 mm.

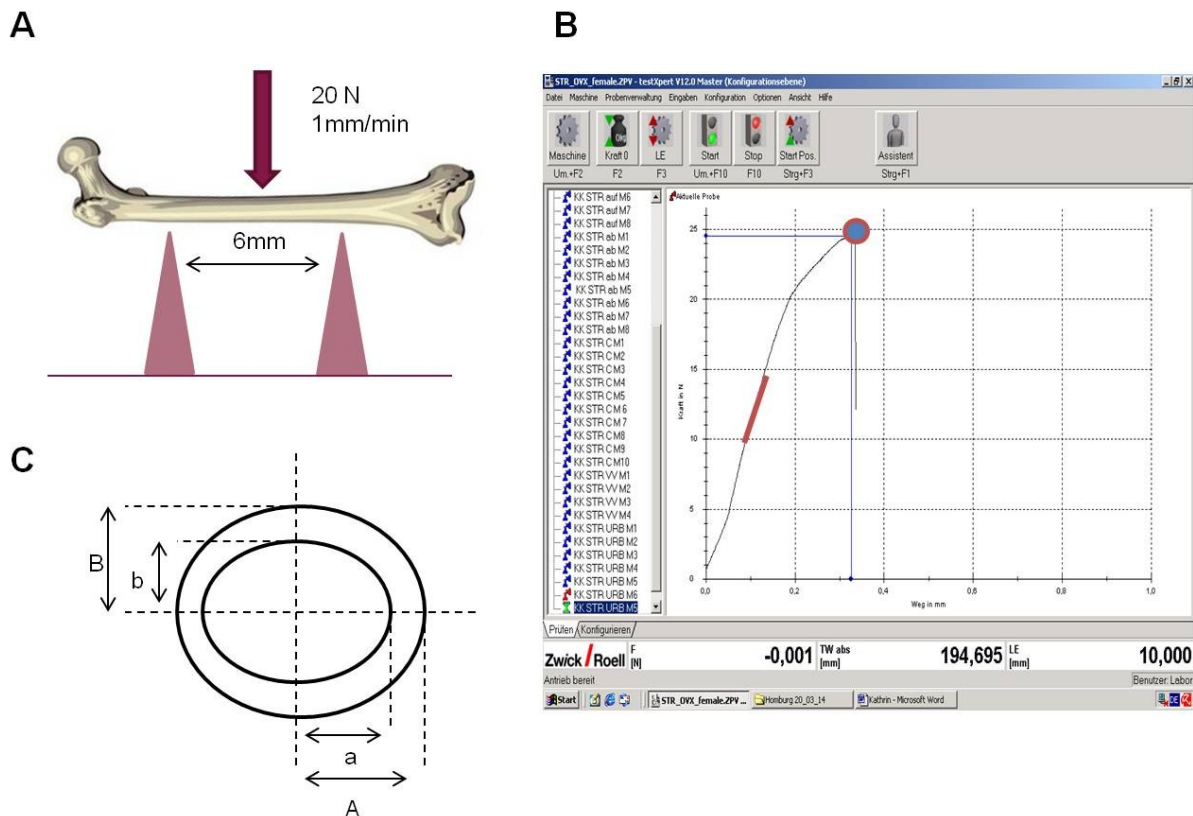
Mithilfe dieses Protokolls konnten folgende Werte ermittelt werden: Die Maximale Belastungskraft, die Steifigkeit und die Biegespannung des Knochens. Die Maximale Belastungskraft, ist die Kraft  $F_{max}$ , bei der der Knochen endgültig gebrochen ist, und wird gemessen in Newton (N). Die Steifigkeit entspricht der Steigung der Kurve in dem Bereich, in dem sie annähernd wie eine Gerade verläuft. Zur Berechnung dieser wurden zwei Punkte auf der Kurve festgelegt, durch eine Hilfsgerade miteinander verbunden (Abb. 13B, rote Gerade) und die Steigung derselben berechnet. Die Steifigkeit wird angegeben in N/mm. Die Steifigkeit wird auf Grund mangelnder Aussagekraft in dieser Arbeit nicht betrachtet.

Die Biegespannung ist eine geometrieunabhängige Variante der Maximalen Belastungskraft und kann daher annähernd eine Aussage über die Qualität des Knochens machen. Die Biegespannung wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Biegespannung} = (F \times L) / (4 \times W),$$

dabei ist  $F$  die Maximale Belastungskraft in Newton (N),  $L$  die Auflagelänge des Knochens auf den Sockeln (hier 6 mm) und  $W$  das Widerstandsmoment. Das

Widerstandsmoment  $W$  ist gleich dem Quotient aus axialem Flächenmoment  $I$  und der Radius  $R$ . Dabei ergibt sich das axiale Flächenmoment  $I$  aus den Knochenmaßen im Querschnitt (Abb. 13C) und wird wie folgt berechnet:  $I = (\pi / 4) \times (A \times B^3 - a \times b^3)$ .  $R$  stellt den Abstand der neutralen (inneren) Faser von der äußeren Faser im Querschnitt dar: hier  $R = B$  (Abb. 13C).



**Abbildung 13: 3-Punkt-Biegetest**

A Schematische Darstellung des Ablaufs des 3-Punkt-Biegetests; B exemplarische Abbildung eines Bruchprotokoll; C schematische Darstellung zur Berechnung der Biegespannung; Quelle: A <http://lifesciencedb.jp/bp3d/> 25.01.2015, eigene Darstellung; B Moritz-3-Punkt-Biegung Protokoll.ZPV –testXpert V12.0 Master; C eigene Darstellung

## 2.8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde die Konzentration ausgewählter Proteine im Serum der Tiere, die das Langzeitlaufbandtraining absolviert hatten, bestimmt.

Bei dem für CTX1 verwendeten ELISA handelt es sich um einen kompetitiven ELISA (Abb. 14B), bei den restlichen handelt es sich um nicht-kompetitive ELISAs (Abb. 14A). Auf Grund technischer Schwierigkeiten bei der retrobulbären Blutentnahme stand nicht von jedem Tier ausreichend Serum für diese Methode zur Verfügung, sodass die Anzahl der erhobenen Daten zum Teil nicht mit der Anzahl der Tiere

korreliert. Die Konzentrationen folgender Proteine (Antigene) im Serum der Tiere wurden bestimmt:

- RANKL (Receptor Activator Of Nuclear Factor Kappa B Ligand),
- CTX1 (Cross linked C-Telopeptide Of Type 1 Collagen),
- PINP (Procollagen 1 N-Terminal Propetide) und
- OPG (Osteoprotegrin).

Bei RANKL handelt es sich um ein Oberflächenmolekül, das sich auf der Oberfläche von Osteoblasten befindet und Osteoklasten aktiviert. Entsprechend deutet eine erhöhte Konzentration von RANKL im Serum auf eine Mehraktivität der Osteoklasten und damit auf einen gesteigerten Knochenabbau hin. CTX1 ist ein Abbauprodukt des organischen Anteils des Knochens (Kollagen Typ 1), die bei Knochenabbau in höherer Konzentration im Serum vorhanden ist. Es handelt sich damit ebenfalls um einen Knochenabbaumarker. Eine erhöhte Konzentration von OPG und PINP im Serum hingegen weisen auf Knochenaufbau hin. OPG ist ein Zytokinrezeptor und gehört zu der Gruppe der TNF Rezeptoren. OPG verhindert die Osteoklasten- Osteoblasten-Interaktion, indem es den Oberflächenrezeptor der Osteoklasten (RANK) besetzt und hemmt so deren Aktivierung. PINP ist das Propetid von Kollagen Typ 1, stellt somit ein organisches Ausgangsprodukt des Knochenaufbaus dar und ist daher bei Knochenaufbau vermehrt im Serum nachweisbar.

Für die Konzentrationsmessung von RANKL und OPG wurde ein Kit der Firma Usnc verwendet, die Durchführung erfolgte entsprechend der von der Firma vorgegebenen Anleitung. Bei den restlichen Proteinen wurde jeweils ein Kit der Firma Cloud-Clone Corp verwendet, auch hier erfolgte die Durchführung entsprechend der Anleitung. In den Kits waren jeweils alle benötigten Materialien enthalten, diese sind im Folgenden aufgelistet:

- Beschichtete Platte mit 96 Vertiefungen (1x)
- Adhäsive Schutzfolie zum Verschluss der Platte (4x)
- Standardprotein (lyophilisiert) (2x)
- Standardverdünnungspuffer (1x20 ml)
- Detektionsreagenz A (1x120 µl)
- Probenverdünnung A (1x6 ml)
- Detektionsreagenz B (1x 120µl)
- Probenverdünnung B (1x 6ml)
- TMB Substrat (1x9 ml)
- Stopplösung (1x6 ml)
- Waschpuffer (1x20 ml)

Zunächst wurden alle Bestandteile des Kits sowie das Serum auf Raumtemperatur gebracht. Dann wurde 1ml der Standardverdünnung auf den Standard gegeben, sodass eine Stocklösung mit einer Konzentration von 2000 pg/ml entstand. Diese Stocklösung wurde zunächst auf eine Konzentration 200 pg/ml verdünnt. Daraus wurde eine Standardreihe mit den folgenden Konzentrationen generiert: 200 pg/ml, 100 pg/ml, 50 pg/ml, 25 pg/ml, 12,5 pg/ml, 6,25 pg/ml, 3,12 pg/ml, 0 pg/ml.

Die Probenverdünnungen A und B wurden jeweils im Verhältnis 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Detektionsreagenzien A und B wurden daraufhin jeweils mit der zugehörigen Probenverdünnung im Verhältnis 1:100 verdünnt.

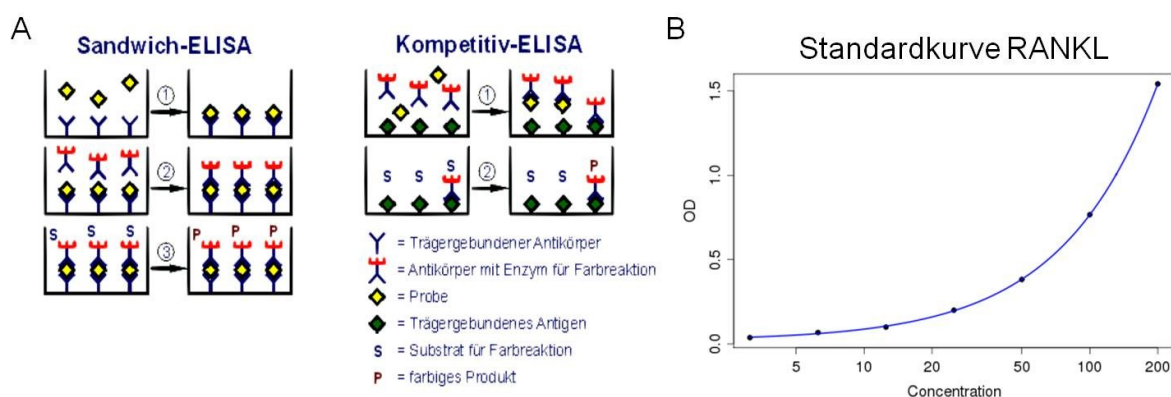
Der Waschpuffer wurde im Verhältnis 1:30 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Die Seren wurden je nach Kit in unterschiedliche Verdünnungsverhältnisse gebracht. Für den RANKL ELISA wurde eine fünffache Verdünnung des Serums hergestellt (laut Anleitung empfohlen 40 µl Serum auf 160 µl 0,01 molarer PBS). Für CTX1 und OPG wurden die Seren unverdünnt verwendet. Für PINP wurde eine 50fache Verdünnung hergestellt (laut Anleitung empfohlen 10 µl Serum auf 490 µl 0,01 molarer PBS).

Dann wurden 100 µl (bzw. 50 µl bei CTX1) sowohl der Standardreihe als auch der zu untersuchenden Serenverdünnungen in die dafür festgelegten Vertiefungen der Reaktionplatte gegeben. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden, wurde zunächst der Inhalt verworfen und dann 100 µl des Detektionsreagenz A in jede Vertiefung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde erneut der Inhalt der Vertiefungen verworfen und es folgten drei Waschgänge mit jeweils 350 µl Waschlösung pro Vertiefung und pro Waschgang. Danach wurden jeweils 100 µl der Detektionsreagenz B in jede Vertiefung gegeben. Das Detektionsreagenz enthält unter anderem die Peroxidase, die im weiteren Verlauf zum Farbumschlag des TMB Substrates führte. Nach einer weiteren Inkubationszeit von einer halben Stunde folgten erneut fünf Waschgänge. Dann wurden jeweils 90 µl des TMB Substrates in jede Vertiefung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15–25 Minuten wurden jeweils 50 µl der Stopplösung hinzugegeben. Die Stopplösung beendet zum einen die Peroxidasereaktion und führte zum anderen durch den Schwefelsäuregehalt zu einem Farbumschlag zu gelb. Unmittelbar nach der Zugabe der Stopplösung folgte die Messung der optischen Dichte (OD) mit dem automatischen ELISA-Plattenleser bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Alle Inkubationen wurden bei 37 ° C im abgedunkelten Raum durchgeführt und dabei war die Platte durch die adhäsive Schutzfolie verschlossen.

Durch die Ergebnisse der Messung der optischen Dichte und den bekannten Konzentrationen der Standardreihe konnte für jeden ELISA eine Standardkurve erstellt werden (Abb. 13B). Bei kompetitiven ELISAs nimmt die Konzentration mit steigender optischer Dichte zu (Abb. 13B), bei nicht-kompetitiven ELISAs ist es umgekehrt (nicht dargestellt). Mit Hilfe dieser Standardkurve konnten daraufhin bei bekannter optischer Dichte die Konzentrationen der gesuchten Antigene im Serum berechnet werden.



**Abbildung 14: A Schematische Darstellung der ELISA; B Beispiel einer Standardkurve anhand der Standardkurve von RANKL**

Quelle: A <http://archiv.aktuelle-wochenschau.de/2009/images/w30/abb2.gif> (19.04.2015); B eigene Darstellung

## 2.9 Genexpressionsanalyse

### 2.9.1 RNA-Isolation aus dem Knochen

Die Genexpressionsanalyse erfolgte aus Knochenmaterial. Dazu wurden die rechten Femora der Mäuse verwendet, die das Kurzzeitlaufbandtraining absolviert hatten.

Zunächst wurde aus dem Knochen bei der Präparation das Knochenmark ausgespült und die RNA aus dem knochenmarkfreien Knochen isoliert. Es ist aber nicht auszuschließen, dass auch mRNA aus Zellen des Knochenmarks isoliert wurde. Für die Isolation der RNA wurde das RNeasy Plus Mini Kit von Qiagen verwendet.

Hierzu musste zunächst ein homogenes Lysat aus den für die RNA-Isolation vorgesehenen Femora hergestellt werden. Zunächst wurden dazu die Knochen unter Zugabe von flüssigem Stickstoff und jeweils 600 µl RNA Plus-lysis Buffer sowie 6µl 1%igem Mercaptoethanol, gemörsert. Sowohl der Puffer als auch der Mercapto-

ethanol haben eine starke RNase-inaktivierende Wirkung und gewährleisten so die Isolation intakter RNA (Quiagen 2011).

Die so entstandene pulverförmige Masse wurde dann mit Hilfe eines Spachtels in ein RNase freies 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gestellt. Sobald diese Masse wieder in einen flüssigen Zustand übergegangen war, wurden 600 µl Chloroform auf diese gegeben und das gesamte Gemisch bei 16000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Dadurch entstanden drei Phasen. Die oberste Phase, in der sich die RNA befand, wurde abpipettiert und auf eine gDNA Eliminator spin column gegeben. Diese war dem Kit zu entnehmen und befand sich in einem 2ml Eppendorfgefäß.

Danach erfolgte die Durchführung entsprechend der dem Kit beigefügten Anleitung (Quiagen 2011).

Zunächst wurde die gDNA Eliminator spin column für 30 sec bei 8000 x g zentrifugiert, um auch die letzten unerwünschten DNA Fragmente in der besagten Säule zu isolieren. Diese wurde danach verworfen. Auf das sich am Boden des Eppendorfgefäß befindliche Zentrifugat, in dem sich die gesuchte RNA befand, wurden dann 350 µl Ethanol (ungefähr dieselbe Menge wie die des Zentrifugats) gegeben. Das gesamte Gemisch wurde nun auf die RNeasy spin column gegeben, die ebenfalls dem Kit zu entnehmen war und sich in einem 2 ml Eppendorfgefäß befand. Das Ethanol optimiert die Bindungseigenschaften der RNA an die Säule. Diese wird 15 sec bei 8000 x g zentrifugiert. Hier befand sich dann die zu isolierende RNA in besagter Säule, sodass die Flüssigkeit am Boden des Eppendorfgefäß verworfen wurde. Auf eine weitere Zentrifugation folgten drei Waschgänge jeweils einmal mit 700 µl und zweimal mit 500 µl Buffer RPE. Beim letzten Waschgang betrug die Zentrifugationszeit statt 15 Sekunden zwei Minuten.

Die so aufgereinigte RNA konnte abschließend, indem in zwei Durchgängen jeweils 30 µl RNase freies Wasser auf die Säule gegeben wurden, aus der Säule in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß ausgewaschen und damit isoliert werden.

Die Konzentration der RNA wurde mittels NanoDrop Messung bestimmt. Die Reinheit sowie der Grad der Degeneration der RNA wurden mittels Gelelektrophorese untersucht.

Die isolierte RNA konnte so direkt weiterverwendet oder bei -80°C gelagert werden.

### 2.9.2 cDNA Transkription

Für die Transkription der RNA in cDNA wurde das Capacity cDNA Reverse Transcription (RT) Kit der Firma Applied Biosystems verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend der dem Kit beigefügten Anleitung.

Die Komponenten des Kits sowie die RNA wurden zunächst auf Raumtemperatur gebracht. Die RNA wurde dann bei bekannter Konzentration der einzelnen Proben individuell so mit RNase freiem Wasser verdünnt, dass 10 µl 500 ng RNA enthielten.

Auf 10 µl der verdünnten RNA wurden 10 µl des Mastmixes gegeben, der sich pro Probe wie folgt zusammensetzte:

- 3,2 µl RNase freies Wasser
- 2 µl 10fach RT-Puffer
- 2 µl 10x RT Random Primer
- 1 µl MultiScribe RT
- 1 µl RNase Inhibitor
- 0,8 µl 25x dNTP Mix

Das Gemisch wurde dann dem folgenden Thermocycler Programm unterzogen:

- 25°C für 10 Minuten
- 37°C für 120 Minuten
- 85°C für 5 Minuten
- Danach Lagerung bei 4°C für bis zu 24h

Die so synthetisierte cDNA konnte dann direkt weiterverwendet werden oder für bis zu sieben Tage bei -20°C gelagert werden.

### 2.9.3 TaqMan Realtime PCR (Geneexpression Assays)

**Tabelle 3:      Untersuchte Gene**

Gen	Bezeichnung	Kodiertes Protein
TNFRSF11A	RANK	<b>R</b> eceptor <b>A</b> ctivator of <b>NF-κB</b>
TNFSF11	RANKL	<b>R</b> eceptor <b>A</b> ctivator of <b>NF-κB</b> <b>L</b> igand
TNFRSF11B	OPG	<b>O</b> steoprotegerin
ALPL	ALP	<b>A</b> lkalische <b>P</b> hosphatase
ACP5	TRAP	<b>T</b> artrat-resistente <b>s</b> aure <b>P</b> hosphatase
COL1A1	COL1A1	<b>C</b> ollagen, <b>T</b> yp <b>1</b> , <b>α</b> <b>1</b>
HIF1A	HIF1A	<b>H</b> ypoxie-induzierter <b>F</b> aktor <b>1</b> <b>α</b>
CTSK	CTSK	<b>K</b> athepsin <b>K</b>

Die Analyse der in cDNA umgeschriebenen RNA wurde mit Hilfe der TaqMan Gene Expression Assays durchgeführt. Die Gene, auf die die RNA untersucht wurde, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Zur groben Abgrenzung wurden die untersuchten Gene in Knochenauf- und -abbau-marker unterteilt. OPG, ALP und COL1A1 werden zu den Knochenaufbaumarkern gezählt, RANK, RANKL, ALP, TRAP und CTSK dienen als Knochenabbau-marker. Die Bedeutung von RANKL und OPG wurde bereits im Zuge der Proteinanalyse ausführlich erläutert (siehe ELISA). RANK ist ein Oberflächenprotein, das sich auf der Oberfläche der Osteoblasten befindet und der Osteoblasten-Osteoklasteninteraktion und damit auch der Osteoklastenaktivierung dient. TRAP wird von Osteoklasten gebildet, korreliert demzufolge mit der Anzahl der Osteoklasten und kann daher zum Nachweis einer erhöhten Knochenresorption eingesetzt werden. Cathepsin ist eine Endoprotease, die ebenfalls von Osteoklasten gebildet wird und als Aktivitätsmarker der Osteoklasten gilt. Kollagen Typ 1a1 bildet die Grundsubstanz der organischen Knochenmatrix und ist daher wesentliche Voraussetzung für Knochenaufbau. Die ALP liegt in unterschiedlichen Varianten im menschlichen Gewebe vor und führt überall zu Dephosphorylierungen. Im Knochen führt diese Freisetzung von Phosphatgruppen zu Anlagerung derselben an die Knochenmatrix und damit wiederum zum Knochenaufbau. HIF1a ist ein Protein, das bei mangelhafter Sauerstoffversorgung des Gewebes vermehrt exprimiert wird und daher den Nachweis einer stattgehabten Hypoxie liefert. Darüber hinaus führt es über Aktivierung von Osteoklasten zu gesteigertem Knochenabbau.

Zunächst wurde die synthetisierte cDNA im Verhältnis 1:5 verdünnt, um die Bestandteile des 2 x RT Mixes aus der Transkriptionsreaktion ausreichend zu verdünnen und eine Konzentration an RNA-Äquivalenten herzustellen, die eine sensitive Detektion der Expressionslevel ermöglicht.

Für jedes der Gene wurden individuelle TaqMan Premixes hergestellt. Der Hauptbestandteil dieses Premixes war der TaqMan Assay Mix, der aus forward Primer, reverse Primer und fluoreszenzmarkierten Sonden bestand. Hauptsächlich wurden hierfür sogenannte Ready-to-use-Assays verwendet, lediglich für GAPDH und TRAP wurden die self-made TaqMan Assay Mixes aus jeweils 0,7 µl forward Primer, 0,7 µl reverse Primer und 0,7 µl FAM Dye (fluoreszenzmarkierte Sonden) pro Assay hergestellt.

Die TaqMan Premixes wurden dann aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzt:

Für die ready-to-use Assays:

- 1,1 µl 20 x TaqMan Assay Mix
- 11 µl 2 x TaqMan Gene Expression Master Mix
- 4,4 µl RNase freies H<sub>2</sub>O

Für die self-made-Assays:

- 0,7 µl TaqMan Assay Mix
- 11 µl TaqMan Gene Expression Master Mix
- 4,8 µl RNase freies H<sub>2</sub>O

Um Duplikate erstellen zu können, die wiederum zur Ermittlung eines Mittelwertes benötigt werden, wurde von jedem Assay-Mix die doppelte Volumenmenge in der Zahl der zu testenden Proben in PCR-Tubes vorgelegt und jeweils 11 µl der verdünnten cDNA (5,5 µl pro Assay) hinzugegeben. Nach gründlichem Vortexen und Anzentrifugieren konnte dann das entstandene Gemisch auf eine Reaktionsplatte mit 96 Vertiefungen verteilt werden. Dabei wurden zur Erstellung von Duplikaten aus jedem PCR-Tube, mit entsprechendem Assay-Proben-Gemisch, zwei Vertiefungen befüllt (20µl pro Vertiefung).

Nachdem die Platte mit adhäsiver Schutzfolie verschlossen und zentrifugiert wurde, wurde sie im Schlitten des Messinstruments positioniert. Mit Hilfe der Software SDS 2.3 konnten den einzelnen Positionen auf der Platte die Proben-Assay-Kombinationen zugeordnet werden, um die sich anschließende Auswertung mit dem Programm RQ Manager, zu erleichtern.

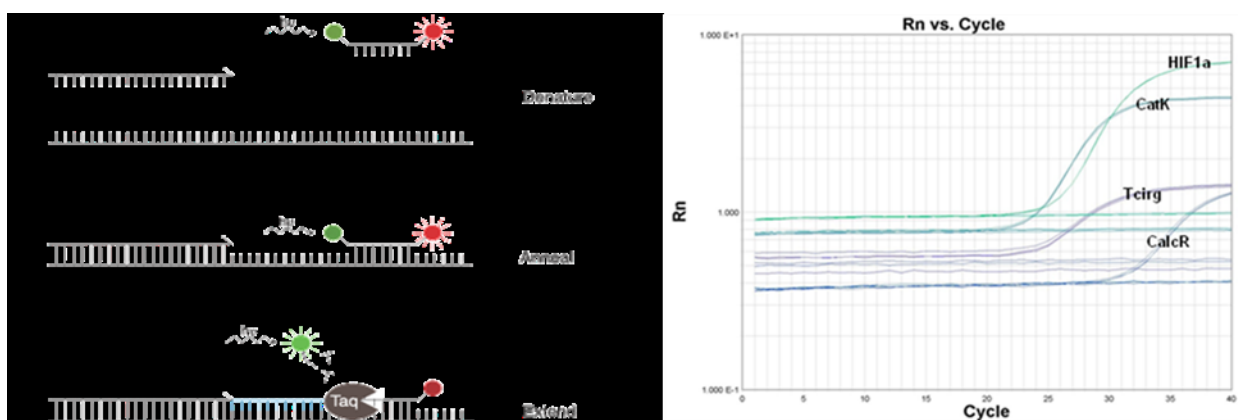
Bei der TaqMan Genexpressions-Analyse mittels Real-time PCR wird die Expression eines Zielgens mit Hilfe eines Fluoreszenzsignals quantifiziert. Der TaqMan Assay Mix besteht jeweils aus Genspezifischen vorwärts und rückwärts Primern und fluoreszenzmarkierten Sonden, bei denen die Fluoreszenz jedoch zunächst noch mittels eines Quenchers unterdrückt ist. Zu Beginn eines PCR-Zyklus lagert sich bei 55–65°C der Primer an das Zielgen, bei 68–72°C beginnt die Taq-Polymerase mit der Elongation des komplementären DNA-Stranges und stößt dabei im Verlauf auf die sich ebenfalls an das Zielgen fluoreszenzmarkierte Sonde. Diese wird im Verlauf der weiteren Polymerisation zerteilt, der Fluoreszenzfarbstoff vom Quencher getrennt und es kommt zu einem Fluoreszenzsignal. Bei 94–96°C kommt es zur Denaturierung des neu entstandenen Strangs von dem als Vorlage dienenden cDNA Strangs

(Abb. 15A). Dieser Ablauf wurde automatisch durch zyklische Veränderungen der Temperatur vierzigmal wiederholt. Gleichzeitig wird die Fluoreszenzstärke gemessen, deren Zunahme über den zeitlichen Verlauf der Zyklen automatisch grafisch dargestellt wurde (Abb. 15B).

Die Anzahl der Zyklen, nach denen erstmals die Nachweisgrenze des Fluoreszenzsignals überschritten wurde, legt die Software SDS 2.3 als sogenannten CT-Wert des Assays fest. Je früher diese Nachweisgrenze überschritten wurde, umso niedriger war demzufolge der CT-Wert und umso höher war die Konzentration des gesuchten Gens in der cDNA.

GAPDH, das als sogenanntes Housekeeping-Gen in jeder Zelle gleich stark exprimiert wird, diente als Referenzgen. Mit Hilfe des CT-Wertes dieses Referenzgens konnten folgende Werte berechnet werden:

- $\Delta CT = CT[\text{Zielgen}] - CT[\text{Referenzgen}]$
- $\Delta\Delta CT = \Delta CT[\text{Laufbandtraining}] - \Delta CT[\text{Kontrollgruppe}]$
- Relative Expressionsänderung =  $2^{-\Delta\Delta CT}$



**Abbildung 15: A Schematische Darstellung des Ablaufs der TaqMan Realtime PCR; B exemplarische Darstellung der Fluoreszenzmessung bei der Realtime PCR**

Quelle: A <http://www.bio.davidson.edu> 25.01.2015; B Abbildung aus dem RQ Manager

## 2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung so wie das Erstellen der Abbildungen erfolgte mit den Programmen Excel und GraphPad Prism. Zur Feststellung der Normalverteilung der Stichproben wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Für die Berechnung statistischer Signifikanzen wurde bei normalverteilten Stichproben der T-Test, bei nicht-normalverteilten Stichproben hingegen der Mann-Whitney Test angewendet. P-Werte kleiner als 0.05 wurden dabei als statistisch signifikant betrachtet. Signifikanzen sind in den Abbildungen wie folgt gekennzeichnet: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $P < 0,0005$ .

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Laufbandtraining

#### 3.1.1 Gewichte – Physiologische Gewichtsentwicklung

An Hand des Körpergewichts kann die körperliche Gesundheit der Mäuse kontrolliert werden. Aus diesem Grund wurden die Mäuse sowohl vor Beginn des Laufbandtrainings als auch im Verlauf alle zwei Wochen gewogen. Eine fehlende Gewichtszunahme oder sogar eine Gewichtsabnahme sind Zeichen von Krankheit oder zu großer körperlicher Belastung durch die Intervention. Alle Mäuse nahmen im Verlauf sowohl des Kurzzeittrainings als auch des Langzeittrainings kontinuierlich an Gewicht zu. Die absoluten Gewichte entsprachen in etwa den gleichaltrigen Kontrollen, die kein Laufbandtraining absolvierten, sodass man hier von einer physiologischen Gewichtsentwicklung sprechen kann. Die Mäuse waren durch das Laufbandtraining also keiner unphysiologisch hohen oder gar schädlichen Belastung ausgesetzt. Der Abbildung 16 ist die durchschnittliche Gewichtsentwicklung der Mäuse in den unterschiedlichen Trainingsgruppen zu entnehmen.

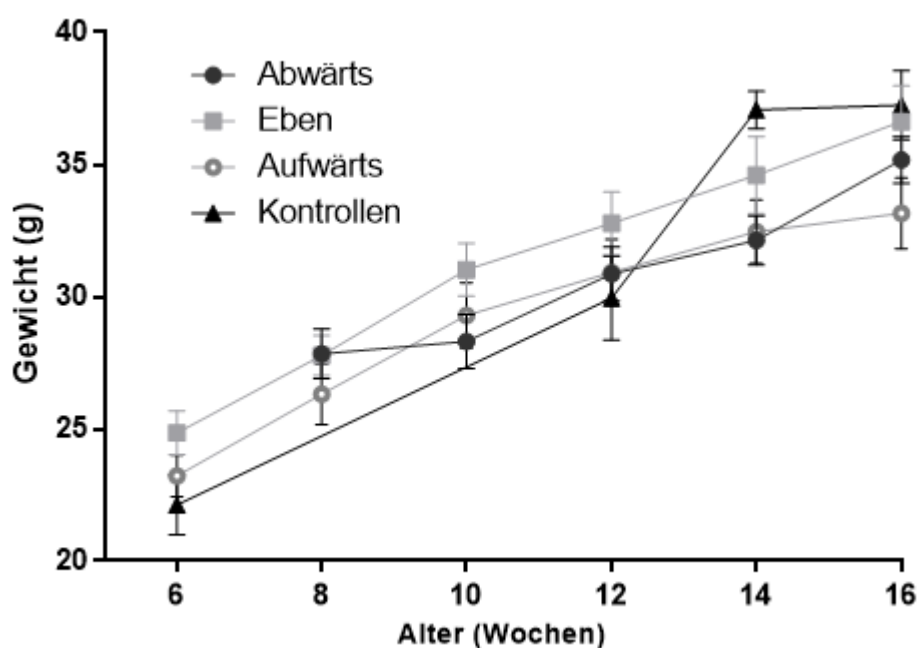


Abbildung 16: Gewichtsentwicklung

Das Liniendiagramm zeigt die Mittelwerte mit SEM der Körpergewichte der unterschiedlichen Trainingsgruppen über den zeitlichen Verlauf der Trainingsphase.

### **3.1.2 Im Langzeitversuch betrug die Trainingsgeschwindigkeiten 35–45 % und 70–86 % der ermittelten Maximalgeschwindigkeiten.**

Im Rahmen des Langzeitversuchs wurde der Run-to-Exhaustion-Test mehrmals durchgeführt um gegebenenfalls die Geschwindigkeit im Intervalltraining an eine veränderte Maximalgeschwindigkeit anzugleichen, da ein Trainingseffekt und damit eine Erhöhung der Maximalgeschwindigkeit nicht auszuschließen war.

Der erste RtET wurde am Ende der Eingewöhnungsphase durchgeführt, jeweils in der Steigung in der vorab die Eingewöhnungsphase absolviert worden war und in der auch nachfolgend das Training durchgeführt wurde. Es wurden folgende Maximalgeschwindigkeiten ermittelt: Abwärts im Mittel 0,52 m/s, Eben im Mittel 0,54 m/s, Aufwärts im Mittel 0,49 m/s (Abb. 17A). Aus Praktikabilitätsgründen wurden die Mäuse innerhalb ihrer Steigungsgruppe in zwei Gruppen a vier Mäuse aufgeteilt und zwar in eine schnelle und eine langsame Gruppe. Dadurch ergaben sich neue durchschnittliche Maximalgeschwindigkeiten: Abwärts im Mittel in der schnellen Gruppe 0,57 m/s und in der langsamen Gruppe 0,46 m/s, Eben im Mittel in der schnellen Gruppe 0,58 m/s und in der langsamen Gruppe 0,51 m/s, Aufwärts im Mittel in der schnellen Gruppe 0,51 m/s und in der langsamen Gruppe 0,46 m/s (Tab. 4). Entsprechend wurden die Geschwindigkeiten während des ersten Monats des Intervalltrainings mit 80–90 % und 40–50 % der ermittelten Maximalgeschwindigkeit festgelegt. Leider konnten manche Mäuse – vorrangig in den zuvor als schnelle Gruppe definierten Gruppen – mit diesen Geschwindigkeiten im Rahmen des Intervalltrainings nicht mithalten, sodass die Geschwindigkeiten in einigen Gruppen zum Teil schon sehr früh herabgesetzt und an die Möglichkeiten der Mäuse angeglichen werden mussten. Im Endeffekt absolvierten die Mäuse das Training im ersten Monat bei folgenden Geschwindigkeiten:

Abwärts: in der schnellen Gruppe 0,4 m/s im schnellen und 0,2 m/s im langsamen Intervall und in der langsamen Gruppe 0,38 m/s im schnellen und 0,2 m/s im langsamen Intervall (Abb. 17B); das entspricht 70 % und 35 % der Maximalgeschwindigkeit in der schnellen und 86 % und 45 % der Maximalgeschwindigkeit in der langsamen Gruppe.

Eben: in der schnellen Gruppe 0,42 m/s im schnellen und 0,21 m/s im langsamen Intervall und in der langsamen Gruppe 0,4 m/s im schnellen und 0,2 m/s im langsamen Intervall (Abb. 17B); das entspricht 73 % und 36 % der Maximalgeschwindigkeit

in der schnellen und 80 % und 40 % der Maximalgeschwindigkeit in der langsamen Gruppe.

Aufwärts: in der schnellen Gruppe 0,4 m/s im schnellen und 0,2 m/s im langsamen Intervall und in der langsamen Gruppe 0,38 m/s im schnellen und 0,19 m/s im langsamen Intervall (Abb. 17B); das entspricht 80 % und 40 % der Maximalgeschwindigkeit in der schnellen und 86 % und 43 % der Maximalgeschwindigkeit in der langsamen Gruppe.

Am Ende des ersten Monats des Intervalltrainings wurde erneut ein RtET durchgeführt. Hierbei wurden folgende Maximalgeschwindigkeiten ermittelt: Abwärts im Mittel 0,58 m/s, Eben im Mittel 0,49 m/s, Aufwärts im Mittel 0,54 m/s (Abb. 17C). Nach der erneuten Unterteilung in eine schnelle und eine langsame Gruppe ergaben sich folgende Maximalgeschwindigkeiten: Abwärts im Mittel in der schnellen Gruppe 0,6 m/s und in der langsamen Gruppe 0,55 m/s, Eben im Mittel in der schnellen Gruppe 0,51 m/s und in der langsamen Gruppe 0,47 m/s, Aufwärts im Mittel in der schnellen Gruppe 0,56 m/s und in der langsamen Gruppe 0,51 m/s (Tab. 4).

Sowohl bei den Mäusen, die abwärts, als auch bei denen, die aufwärts gelaufen waren, kam es im Durchschnitt also zu einer Leistungssteigerung. In der Gruppe der in der Ebene gelaufenen Mäuse kam es allerdings zu einer Abnahme der durchschnittlichen Maximalgeschwindigkeit. In den meisten Fällen entsprach das individuelle Ergebnis des ersten RtETs dem des zweiten. Das bedeutet die Mäuse, bei denen schon im ersten Test eine eher hohe Maximalgeschwindigkeit ermittelt worden war und die entsprechend der schnellen Gruppe zugeordnet wurden, erwiesen sich im Regelfall auch im zweiten Test als eher schnell und wurden erneut der schnellen Gruppe zugeteilt. In Einzelfällen kam es allerdings auch zu einer nicht gruppenkonformen Leistungsabnahme, dann kam es gegebenenfalls auch zu einem Gruppenwechsel. Entsprechend der im zweiten RtET ermittelten Maximalgeschwindigkeiten wurden die Geschwindigkeiten für das Intervalltraining im zweiten Monat mit 80–90 % im schnellen und 40–50 % im langsamen Intervall festgelegt. Auch im zweiten Monat kam es dazu, dass die Mäuse zum Teil mit den festgelegten Geschwindigkeiten im Rahmen des Intervalltrainings nicht Schritt halten konnten, sodass die Geschwindigkeiten erneut angepasst werden mussten. Im zweiten Monat absolvierten die Mäuse das Training bei folgenden Geschwindigkeiten:

Abwärts: in der schnellen Gruppe 0,42 m/s im schnellen und 0,21 m/s im langsamen Intervall und in der langsamen Gruppe 0,38 m/s im schnellen und 0,2 m/s im langsamen Intervall (Abb. 17D); das entspricht 70 % und 35 % der Maximalgeschwindigkeit in der schnellen und 70 % und 37 % der Maximalgeschwindigkeit in der langsamen Gruppe.

Eben: in der schnellen Gruppe 0,42 m/s im schnellen und 0,21 m/s im langsamen Intervall und in der langsamen Gruppe 0,38 m/s im schnellen und 0,19 m/s im langsamen Intervall (Abb. 17D); das entspricht 82 % und 41 % der Maximalgeschwindigkeit in der schnellen und 80 % und 40 % der Maximalgeschwindigkeit in der langsamen Gruppe.

**Tabelle 4: Übersicht über Geschwindigkeiten während des Langzeitversuchs**

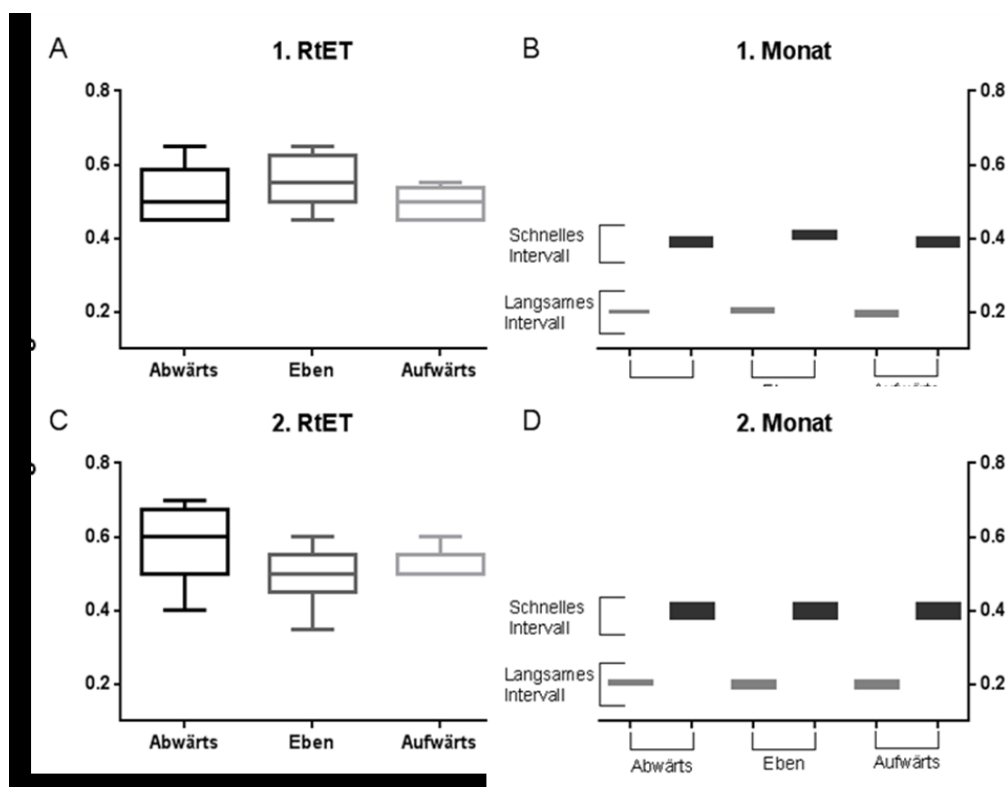
	1. RtET	1. Monat schnelles Intervall	1. Monat langsames Intervall	2. RtET	2. Monat schnelles Intervall	2. Monat langsames Intervall
Abwärts komplett	0,52 m/s			0,58 m/s		
Abwärts schnell	0,57 m/s	0,4 m/s	0,2 m/s	0,6 m/s	0,42 m/s	0,21 m/s
Abwärts langsam	0,46 m/s	0,38 m/s	0,2 m/s	0,55 m/s	0,38 m/s	0,2 m/s
Eben komplett	0,54 m/s			0,49 m/s		
Eben schnell	0,58 m/s	0,42 m/s	0,21 m/s	0,51 m/s	0,42 m/s	0,21 m/s
Eben langsam	0,51 m/s	0,4 m/s	0,2 m/s	0,47 m/s	0,38 m/s	0,19 m/s
Aufwärts komplett	0,49 m/s			0,54 m/s		
Aufwärts schnell	0,51 m/s	0,4 m/s	0,2 m/s	0,56 m/s	0,42 m/s	0,21 m/s
Aufwärts langsam	0,46 m/s	0,38 m/s	0,19 m/s	0,51 m/s	0,38 m/s	0,19 m/s

Aufwärts: in der schnellen Gruppe 0,42 m/s im schnellen und 0,21 m/s im langsamen Intervall und in der langsamen Gruppe 0,38 m/s im schnellen und 0,19 m/s im langsamen Intervall (Abb. 17D); das entspricht 75 % und 37 % der Maximalgeschwindigkeit in der schnellen und 76 % und 38 % der Maximalgeschwindigkeit in der langsamen Gruppe.

Eine Maus der langsamen Abwärts Gruppe verweigerte aus nicht eruierbaren Gründen ab der Mitte des zweiten Monats das Laufen komplett und wurde daher frühzeitig aus dem Trainingsprogramm ausgeschlossen.

Alle Geschwindigkeiten des Langzeittrainings sind noch einmal in übersichtlicher Form der Tabelle 4 zu entnehmen.

In Abbildung 17 A und C ist im direkten Vergleich der unterschiedlichen Steigungsgruppen deutlich zu sehen, dass bei den in der Ebene gelaufenen Mäusen zunächst im ersten RtET im Mittel die höchste, im zweiten RtET im Mittel allerdings die niedrigste Maximalgeschwindigkeit ermittelt wurde. Darüber hinaus zeigen Abbildung 17 A und C, dass die Gruppe der aufwärts gelaufenen Mäuse in beiden Tests die geringsten interindividuellen Unterschiede bezüglich der Maximalgeschwindigkeit aufweist. Abbildungen 17 B und D zeigen geringe Schwankungen im Bereich der im Intervalltraining absolvierten Geschwindigkeiten. Sowohl im direkten Gruppenvergleich als auch über den zeitlichen Verlauf sind die im Intervalltraining absolvierten Geschwindigkeiten relativ stabil. Im Gesamtüberblick verdeutlicht Abbildung 17, dass die Variabilität eher im Bereich der Maximalgeschwindigkeit als in den im Intervalltraining absolvierten Geschwindigkeiten liegt. Desweiteren legt die Abbildung 17 den direkten Vergleich der im RtET ermittelten Maximalgeschwindigkeiten mit den Geschwindigkeiten des Intervalltrainings nahe. Sowohl in der Abbildung 17 als auch in absoluten Zahlen (siehe oben) wird deutlich, dass der ursprünglich vorgegebene Rahmen von 80–90 % und 40–50 % der Maximalgeschwindigkeit nicht immer eingehalten werden konnte, die untere Grenze von 70 bzw. 35 % jedoch auch nicht unterschritten wurde.



**Abbildung 17: Geschwindigkeiten während der RtETs und des Intervalltrainings im Langzeitversuch**

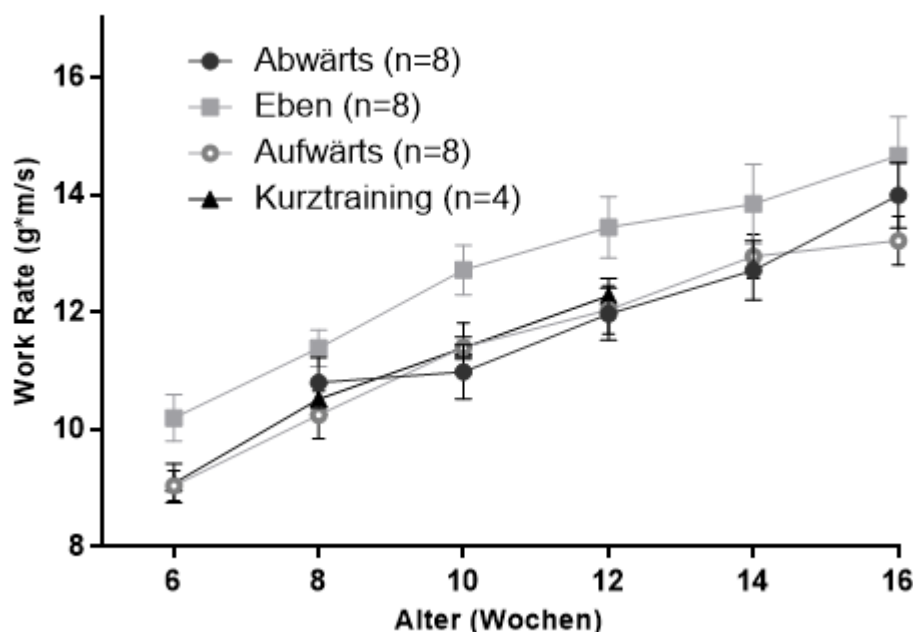
A, C Die Boxplots zeigen die Mediane und Verteilung der Quartile sowie minimale und maximale Werte der im ersten (A) und zweiten (C) Run-to-Exhaustion-Test ermittelten Maximalgeschwindigkeiten der Mäuse, die das Langzeittraining absolvierten, gemessen in m/s; dabei stehen die unterschiedlichen Steigungen des Laufbandes im direkten Vergleich zueinander; B, D Mittelwert und Standardabweichung der Geschwindigkeiten, mit der die Mäuse im Rahmen einer Trainingseinheit das langsame und das schnelle Intervall absolvierten, angegeben in % der im Run-to-Exhaustion-Test ermittelten Maximalgeschwindigkeit; die unterschiedlichen Steigungen des Laufbandes im direkten Vergleich zueinander.

### 3.1.3 Stetige Zunahme der Work Rate bei kontinuierlicher Gewichtszunahme

Die Work Rate trifft eine Aussage über die geleistete Arbeit im Verhältnis zum eigenen Körpergewicht. Zur Ermittlung der Work Rate wird das Körpergewicht (hier in Gramm) mit der maximal geleisteten Arbeit (hier  $V_{max}$ ) multipliziert.

Die Work Rate nimmt in allen Trainingsgruppen im Verlauf der Trainingsphase kontinuierlich zu (Abb.18). Das ist zum Teil auf die gesteigerte Geschwindigkeit im zweiten Monat des Langzeittrainings, vor allem aber auf die kontinuierliche Gewichtszunahme zurückzuführen. Dass die Trainingsgruppe, die in der Ebene gelaufen ist, grundsätzlich eine um 1–2 g\*m/s höhere Work Rate aufweist, ist damit zu erklären, dass die Mäuse dieser Gruppe im Durchschnitt 2 g schwerer sind als die anderen Gruppen (siehe auch Abb. 16).

Die Steigung, bei der die Mäuse das Training absolviert haben, wird allerdings in der Work Rate nicht berücksichtigt.



**Abbildung 18: Work Rate**

Das Liniendiagramm zeigt die Mittelwerte mit SEM der Work Rate der unterschiedlichen Trainingsgruppen über den zeitlichen Verlauf der Trainingsphase.

### 3.1.4 Knochenwerte der Femora im Langzeitversuch – Abnahme der trabekulären Knochenmasse bei Zunahme der kortikalen Knochenmasse

Mit der Bezeichnung „Knochenwerte“ sind im Folgenden immer die Ergebnisse der  $\mu$ CT Untersuchung gemeint. Dabei handelt es sich bei jedem mittels  $\mu$ CT untersuchten Knochen um folgende Werte:

Für den trabekulären Bereich: Bone Volume / Tissue Volume, Trabecular Number, Trabecular Thickness, Trabecular Separation, Structur Model Index und für den kortikalen Bereich: Bone Area / Tissue Area Crosssectional Thickness (ausführliche Erläuterung siehe Methodenteil).

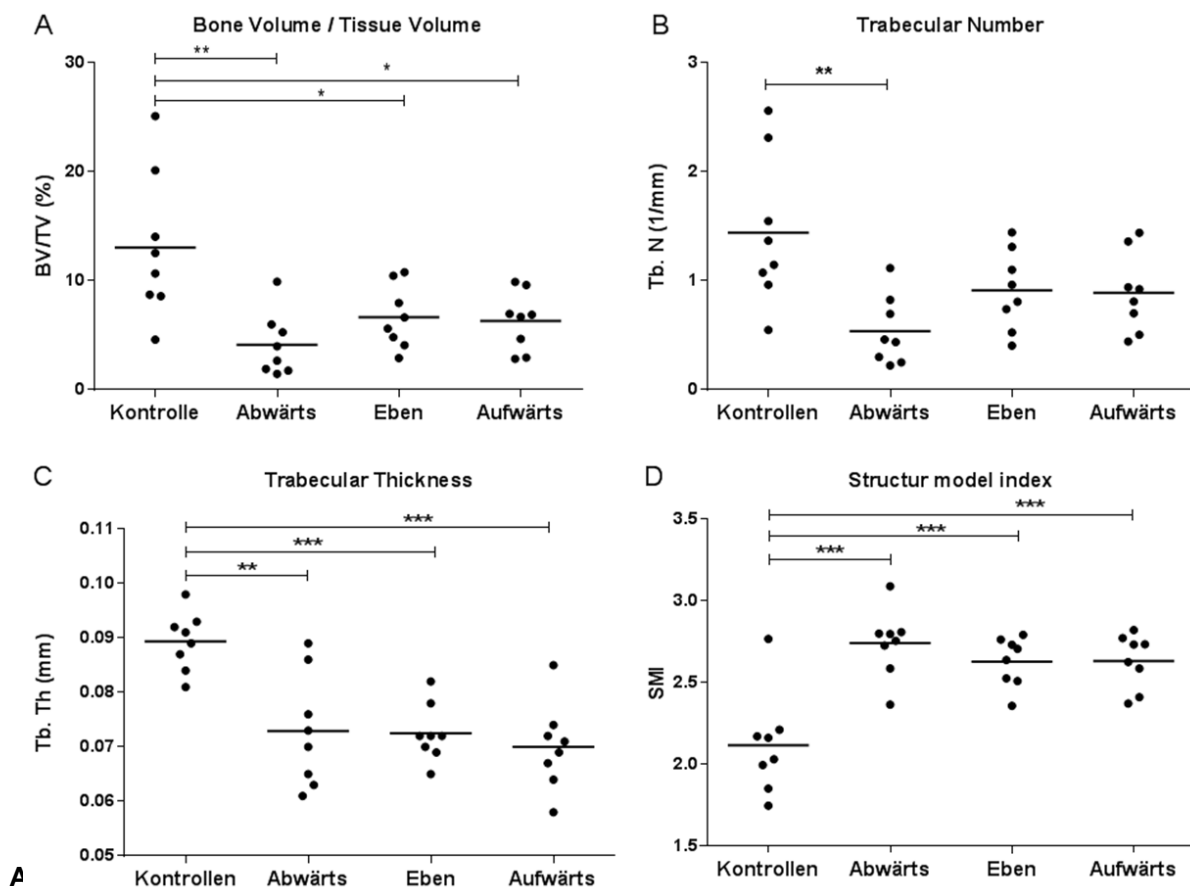
Im Bereich des trabekulären Knochens ist in allen Steigungsgruppen eine signifikante Abnahme der Knochenmasse im Vergleich zur gleichaltrigen untrainierten Kontrollgruppe zu verzeichnen (Abb. 19). Diese Abnahme der Knochenmasse ist besonders ausgeprägt bei den Mäusen, die das Laufbandtraining bei einer negativen Steigung absolvierten.

Während der Knochengewebeanteil am Gesamtgewebe (BV/TV, ein Volumen, das im trabekulären Bereich dreidimensional bestimmt wird) in der untrainierten gleichaltrigen Kontrollgruppe im Mittel 13,26 % beträgt, beträgt er in der Abwärtsgruppe 4,12 %, in der Ebengruppe 6,7 % und in der Aufwärtsgruppe 6,3 % (Abb. 19A). Die Anzahl der Trabekel ist im Vergleich zur Kontrollgruppe lediglich in der Abwärtsgruppe signifikant erniedrigt (Abb. 19B), wohingegen die Dicke der Trabekel wiederum in allen drei Steigungsgruppen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe abgenommen hat (Abb. 19C).

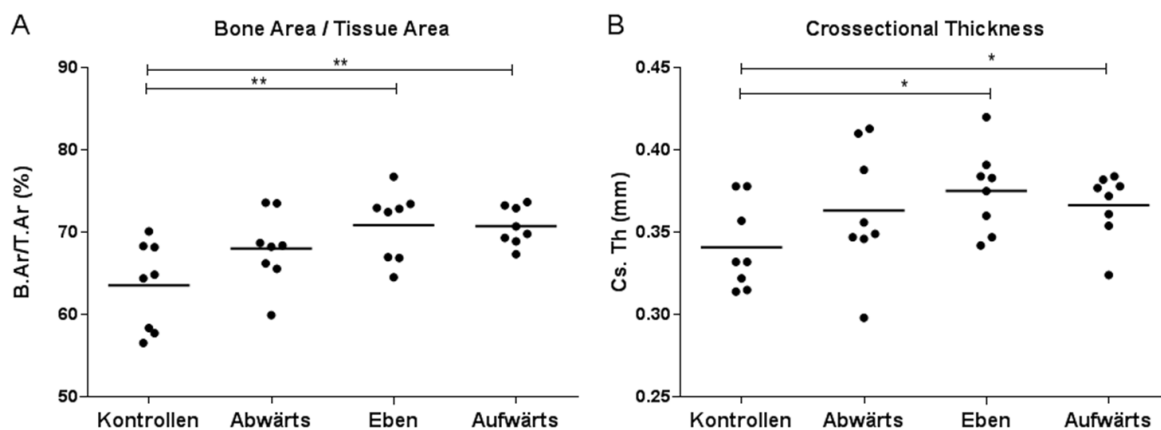
Die Femora der untrainierten gleichaltrigen Kontrollgruppe weisen im Mittel einen SMI von 2,15 auf. Die Trabekel in den Femora der trainierten Gruppen neigen eher zur Stäbchenform und prägen so das Bild eines beinahe osteoporotischen Knochens. Es ist daher naheliegend, dass der SMI in den trainierten Gruppen 2,74 (Abwärts) und 2,63 (Eben und Aufwärts) beträgt und somit in allen Steigungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht ist (Abb. 19D). Im Bereich des kortikalen Knochens ist in den Gruppen Eben und Aufwärts eine signifikante Zunahme der Knochenmasse im Vergleich zur gleichaltrigen untrainierten Kontrollgruppe zu verzeichnen. In der Gruppe der abwärts gelaufenen Mäuse sieht man allerdings nur eine Tendenz zum kortikalen Knochenwachstum (Abb. 20).

Während der Knochengewebeanteil am Gesamtgewebe (B.Ar /T.Ar, hier eine Fläche, die im kortikalen Bereich zweidimensional bestimmt wird) in der Kontrollgruppe im Mittel 64,7 % beträgt, beträgt er Abwärts 68,0 %, Eben 70,9 % und Aufwärts 70,8 % (Abb. 20A) und ist damit in der Eben- und Aufwärtsgruppe signifikant erhöht. Auch in der Abwärtsgruppe ist eine deutliche Tendenz zu sehen.

Darüber hinaus ist die kortikale Dicke (Cs.Th) in den Gruppen Eben und Aufwärts signifikant und in der Gruppe Abwärts tendenziell erhöht (Abb. 20B).



A Bone Volume / Tissue Volume; B Trabecular Number; C Trabecular Thickness; D SMI; die Punkte stellen Einzelwerte dar, die um die Mittelwerte (Linie) streuen, Laufgruppen (Abwärts, Eben und Aufwärts) in direktem Vergleich zur untrainierten Kontrollgruppe. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$



**Abbildung 20: Kortikale Knochenwerte der Femora nach Langzeittraining**

A Bone Area / Tissue Area; B Crossectional Thickness; die Punkte stellen Einzelwerte dar, die um die Mittelwerte (Linie) streuen, Laufgruppen (Abwärts, Eben und Aufwärts) in direktem Vergleich zur untrainierten Kontrollgruppe. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$

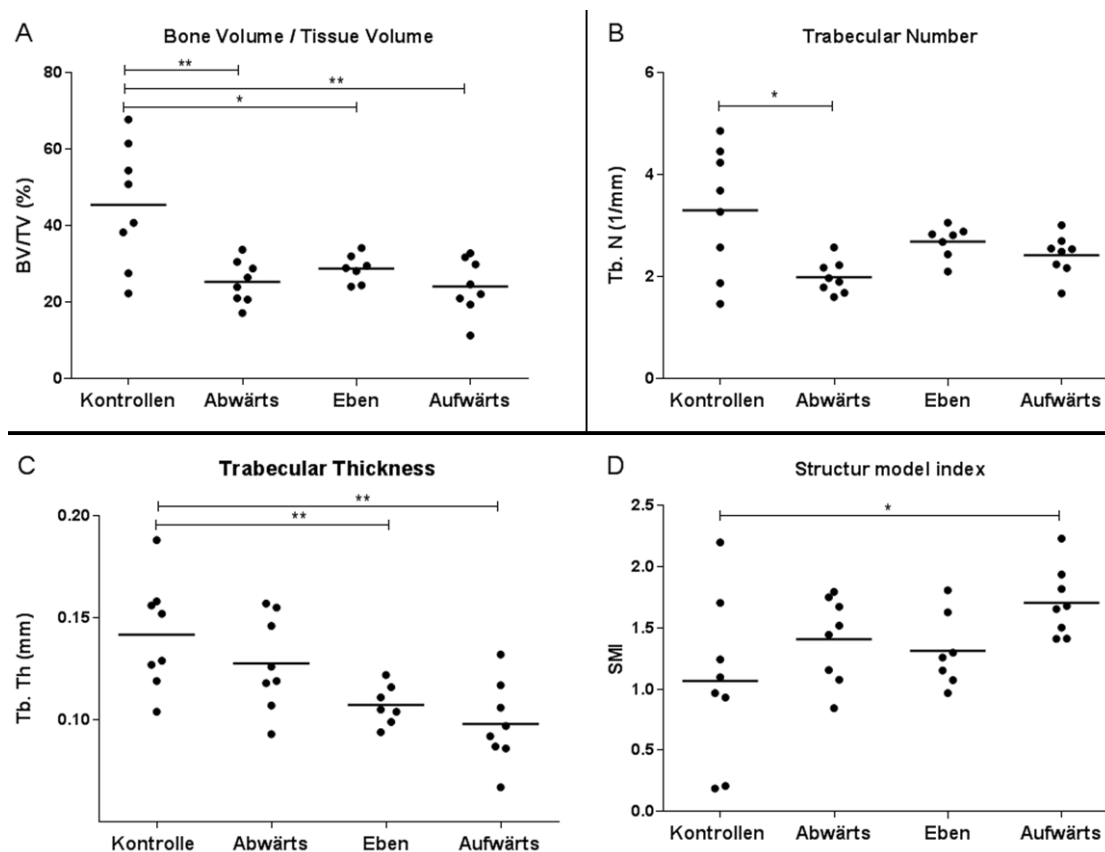
### **3.1.5 Knochenwerte der Tibiae im Langzeitversuch – Abnahme der trabekulären sowie kortikalen Knochenmasse**

Im Rahmen des Langzeitversuchs wurden neben den Femura auch die Tibiae als erster langer Röhrenknochen in der Kette der unteren Extremität, der den axialen Stoß mit jedem Laufschrift – besonders beim Abwärtslaufen – abfängt, mittels  $\mu$ CT untersucht. Die Knochenabschnitte, in denen der trabekuläre und kortikale Knochen der Tibia betrachtet wurde, sind andere als beim Femur (siehe Methodenteil), die ermittelten Werte hingegen sind dieselben.

In den Tibiae kommt es in allen drei Steigungsgruppen im Vergleich zur gleichaltrigen untrainierten Kontrollgruppe zu einer signifikanten Abnahme sowohl im Bereich des trabekulären (Abb. 21) als auch des kortikalen (Abb. 22) Knochens.

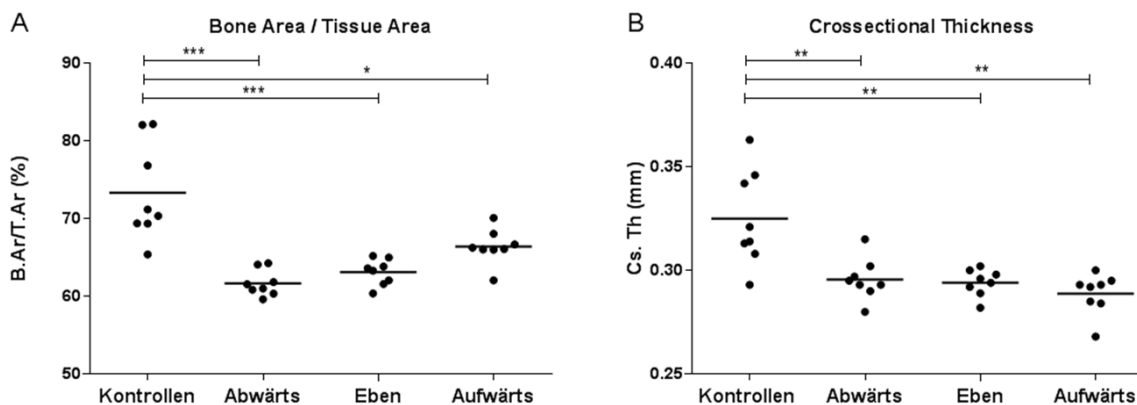
Der repräsentativste Wert des trabekulären Knochens BV/TV, der den Anteil des Knochengewebes am Gesamtgewebe beschreibt, ist in allen drei Steigungsgruppen im Vergleich zur gleichaltrigen untrainierten Kontrollgruppe signifikant erniedrigt (Abb. 21A). Die Anzahl der Trabekel ist nur in der Gruppe der abwärts gelaufenen Mäuse signifikant erniedrigt (Abb. 21B). Die Dicke der Trabekel hingegen ist nur in den anderen beiden Gruppen signifikant vermindert (Abb. 21C). Der SMI ist ausschließlich in der Gruppe der aufwärts gelaufenen Mäuse signifikant erhöht und deutet damit eine Entwicklung Richtung osteoporotischen Knochen an (Abb. 21D).

Im Bereich des kortikalen Knochens sind die Ergebnisse eindeutiger und einheitlicher: Sowohl der Anteil des Knochengewebes am Gesamtgewebe (B.Ar/T.Ar) als auch die Dicke der Kortikalis (C.Th) hat in allen drei Steigungsgruppen im Vergleich zur untrainierten Kontrollgruppe signifikant abgenommen (Abb. 22).



**Abbildung 21: Trabekuläre Knochenwerte der Tibiae nach Langzeittraining**

A Bone Volume / Tissue Volume; B Trabecular Number; C Trabecular Thickness; D SMI; die Punkte stellen Einzelwerte dar, die um die Mittelwerte (Linie) streuen, Laufgruppen (Abwärts, Eben und Aufwärts) in direktem Vergleich zur untrainierten Kontrollgruppe. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $P < 0,0005$



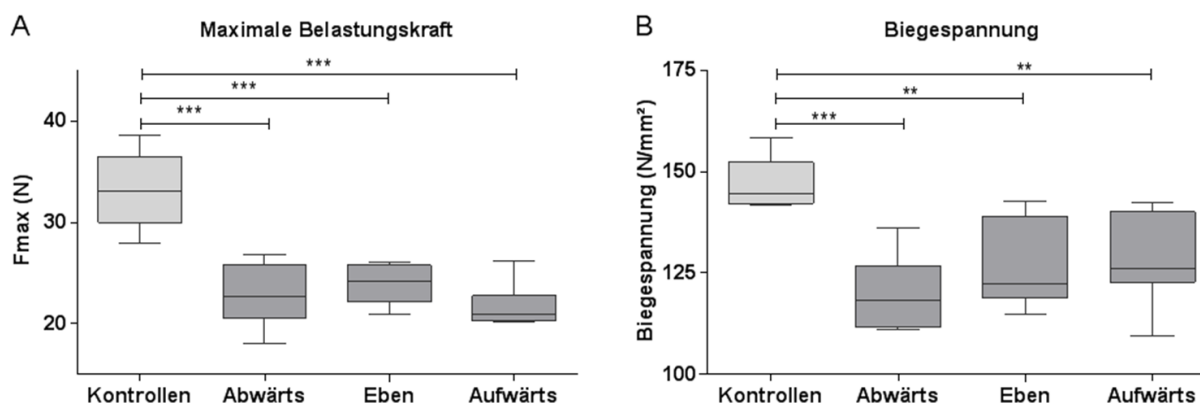
**Abbildung 22: Kortikale Knochenwerte der Tibiae nach Langzeittraining**

A Bone Area / Tissue Area; B Crossectional Thickness; die Punkte stellen Einzelwerte dar, die um die Mittelwerte (Linie) streuen, Laufgruppen (Abwärts, Eben und Aufwärts) in direktem Vergleich zur untrainierten Kontrollgruppe. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $P < 0,0005$

### 3.1.6 3-Punkt-Biege-Test der Femora im Langzeitversuch– Abnahme der Maximalen Belastungskraft sowie der Biegespannung

Die Maximale Belastungskraft  $F_{max}$ , bei der der Knochen bricht, ist in allen drei Steigungsgruppen im Vergleich zur untrainierten Kontrollgruppe signifikant erniedrigt (Abb. 23A). Das bedeutet, die Femora haben im Mittel bereits bei einer deutlich geringeren Kraft nachgegeben und sind gebrochen. Während die Maximale Belastbarkeit der Femora der untrainierten Mäuse im Mittel 33,23 N beträgt, beträgt diese in der Abwärtsgruppe 22,95 N, in der Ebengruppe 23,88 N und in der Aufwärtsgruppe 21,77N. In Anbetracht der Tatsache, dass die Maximale Belastbarkeit neben anderen Faktoren maßgeblich von der Breite der Kortikalis abhängig ist und diese zumindest in den Gruppen Eben und Aufwärts signifikant zugenommen hat, wirft die eindeutige Abnahme der Belastbarkeit in allen Gruppen Fragen auf.

Aus diesem Grund wurde neben der Maximalen Belastbarkeit, die zu einem gewissen Maße auch abhängig von der Geometrie des jeweiligen Knochens ist, auch die Biegespannung bestimmt. Diese wird geometriunabhängig berechnet und liefert somit annähernd eine Aussage über die Qualität des Knochenmaterials. Diese hat ebenfalls in allen drei Steigungsgruppen im Vergleich zur untrainierten Kontrollgruppe signifikant abgenommen (Abb. 23B). Besonders ausgeprägt ist die Abnahme der Biegespannung in der Gruppe der abwärts gelaufenen Mäuse. Das ließe sich allerdings mit der in dieser Gruppe fehlenden Zunahme der kortikalen Knochens erklären. Dennoch kann insgesamt von Abnahme der Qualität des Knochenmaterials bei allen trainierten Mäusen ausgegangen werden.



**Abbildung 23: Ergebnisse des 3-Punkt-Biegetest nach Langzeitlaufbandtraining**

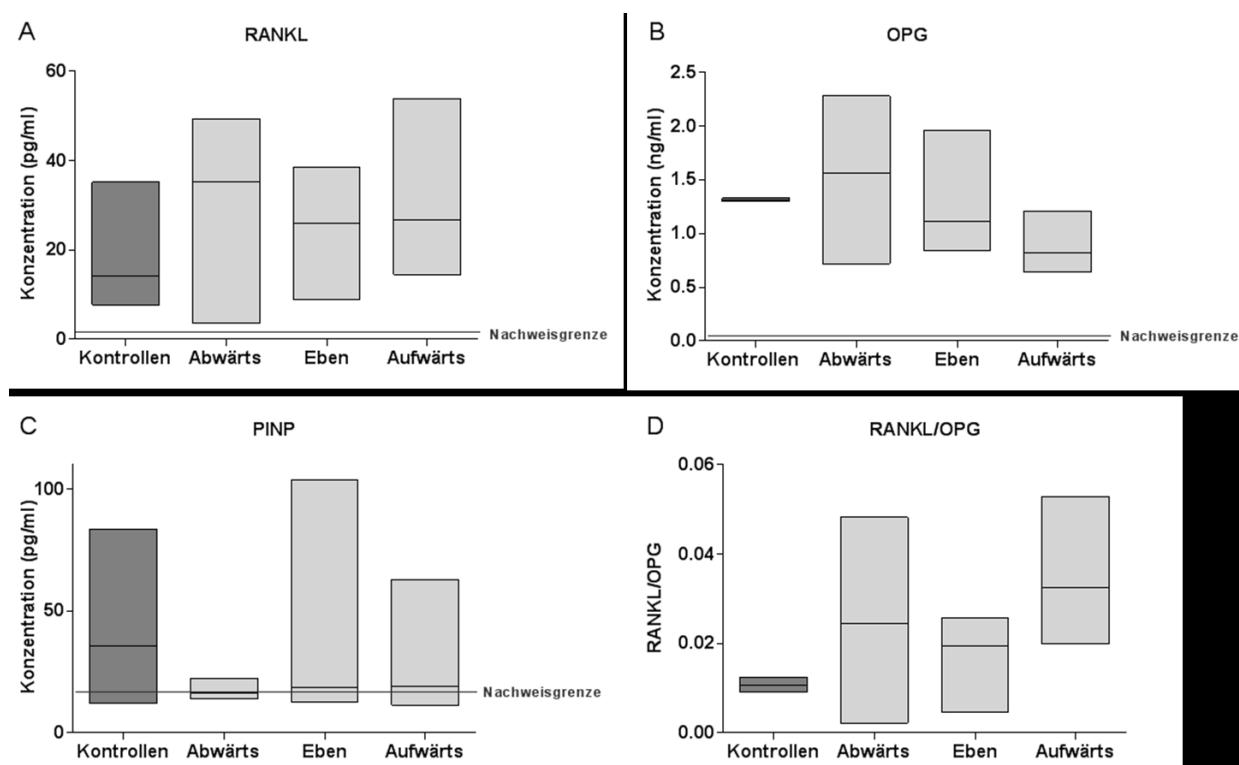
A Maximale Belastungskraft; B Biegespannung; die Boxplots zeigen die Mediane und Verteilung der Quartile sowie minimale und maximale Werte der Maximalen Belastungskraft (A) bzw. der Biegespannung (B); die drei Steigungsgruppen in direktem Vergleich; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $P < 0,0005$

### 3.1.7 ELISA – keine gesteigerte Expression der Regulatoren des Knochenstoffwechsels auf Proteinebene nachweisbar

Mittels ELISA wurde in den Seren der trainierten (Langzeittraining) und untrainierten Mäuse die Konzentration folgender am Knochenstoffwechsel beteiligter Proteine bestimmt: RANK Ligand, Osteoprotegrin, Procollagen I N-Terminal Propetide. Dabei ist RANKL eher als Marker für Knochenabbau zu sehen, während eine gesteigerte Expression von PINP und OPG auf Knochenaufbau schließen lässt. Darüber hinaus wurde der Quotient aus RANKL und OPG bestimmt, der eine Aussage über das Gleichgewicht zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau macht.

Die Konzentrationen der untersuchten Proteine sind in den Seren der trainierten Tiere im Vergleich zu denen der Untrainierten weder signifikant erhöht noch erniedrigt (Abb. 24). Auf Proteinebene konnte demnach kein gesteigerter Knochenstoffwechsel nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass hier lediglich Tendenzen zu sehen sind, ist zum einen auf die zum Teil geringe Anzahl der Werte zum anderen auf die große Streuung der vorhandenen Werte zurückzuführen.

Die Konzentration von RANKL zeigt in allen Steigungsgruppen eine leichte Tendenz zur gesteigerten Expression, weist allerdings eine große Streuung auf (Abb. 24A). Auch OPG weist eine große Streuung der Werte auf, besonders in der Gruppe der abwärts gelaufenen Mäuse. Die Aufwärtsgruppe tendiert zu einer verringerten Expression von OPG im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 24B). Die Konzentration von PINP liegt bei einem Großteil der trainierten Tiere unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 24C). Der Quotient aus RANKL und OPG ist in allen Steigungsgruppen im Vergleich zur untrainierten Kontrollgruppe tendenziell erhöht (Abb. 24D). Dieses Ergebnis spiegelt die Tendenzen der beiden einzelnen Proteine wieder und verdeutlicht es. Allerdings weist entsprechend auch der Quotient eine große Streuung auf.

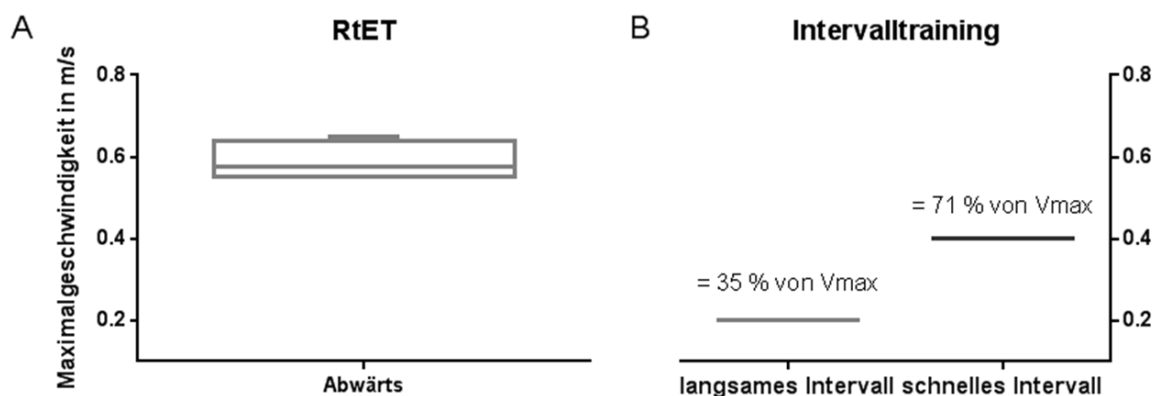


**Abbildung 24: Ergebnisse der ELISA**

A RANK Ligand; B Osteoprotegrin; C Procollagen I N-Terminal Propetide; D Quotient aus RANK Ligand und Osteoprotegrin; die Boxplots zeigen die Mediane (Linie) sowie minimale und maximale Werte der Konzentration des jeweiligen Proteins im Serum, die durchgezogene Linie entspricht der jeweiligen Nachweisgrenze.

### 3.1.8 Im Kurzzeitversuch betragen die Trainingsgeschwindigkeiten 71 % und 35 % der durchschnittlich ermittelten Maximalgeschwindigkeit.

Die Maximalgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ), die im Run-to-Exhaustion-Test am Ende der Eingewöhnungsphase bestimmt wurde, betrug im Median 0,59 m/s (Abb. 25A). Das Intervalltraining wurde begonnen mit Geschwindigkeiten, die 80 % und 40 % der Maximalgeschwindigkeit entsprechen, das bedeutete in absoluten Zahlen 0,47 und 0,24 m/s. Jedoch konnten die Mäuse im Verlauf des Trainings nicht mit diesen errechneten Geschwindigkeiten mithalten, sodass die Geschwindigkeiten herabgesetzt und an das Leistungsniveau der Mäuse angepasst werden mussten. Die letztendlichen Trainingsgeschwindigkeiten betragen 0,2 m/s im langsamen und 0,4 m/s im schnellen Intervall, das entspricht ungefähr 71 % und 35 % der durchschnittlichen Maximalgeschwindigkeit (Abb. 25B).



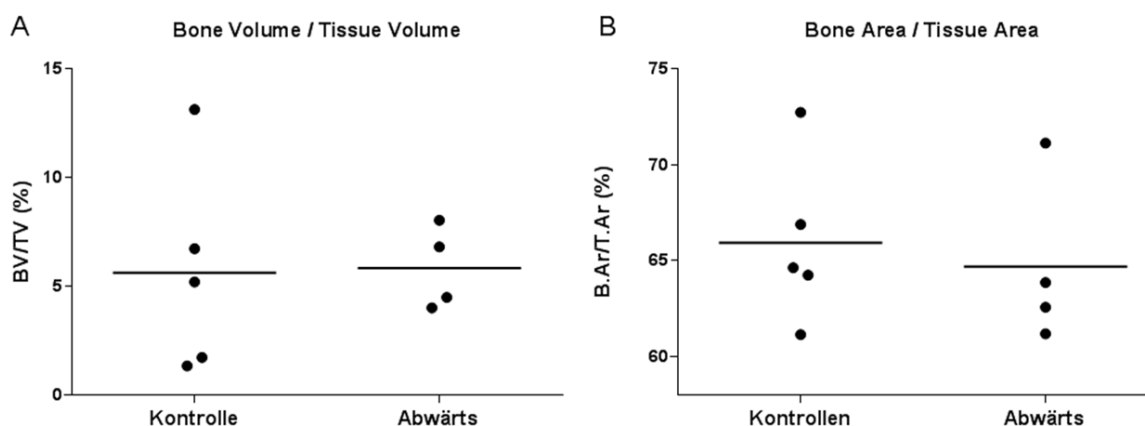
**Abbildung 25: Geschwindigkeiten während des RtET und des Intervalltrainings im Kurzzeitversuch**

A Der Boxplot zeigt den Median und die Verteilung der Quartile sowie minimale und maximale Werte der im Run-to-Exhaustion-Test ermittelten Maximalgeschwindigkeiten der Mäuse, die im Verlauf des Kurzzeitrainings absolvierten, gemessen in m/s; B Mittelwert und Standardabweichung der Geschwindigkeiten, mit der die Mäuse im Rahmen einer Trainingseinheit das langsame und das schnelle Intervall absolvierten.

### 3.1.9 Knochenwerte der Femora im Kurzzeitversuch – keine Veränderungen der Knochenmasse im trabekulären und kortikalen Bereich

Auch im Rahmen des Kurzzeitversuchs wurden die Femora mittels  $\mu$ CT untersucht und die oben aufgeführten Werte (siehe Knochenwerte der Femora im Langzeittraining) ermittelt.

Bei den untersuchten Femora der Mäuse, die das Kurzzeitraining absolvierten, kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Knochenmasse im Vergleich zur gleichaltrigen untrainierten Kontrollgruppe, weder im trabekulären noch im kortikalen Bereich. Die repräsentativsten Werte für den jeweiligen Knochenanteil sind in Abbildung 26 dargestellt. Die restlichen der oben aufgeführten Werte waren ebenfalls nicht signifikant verändert im Vergleich zur Kontrollgruppe (hier nicht dargestellt).



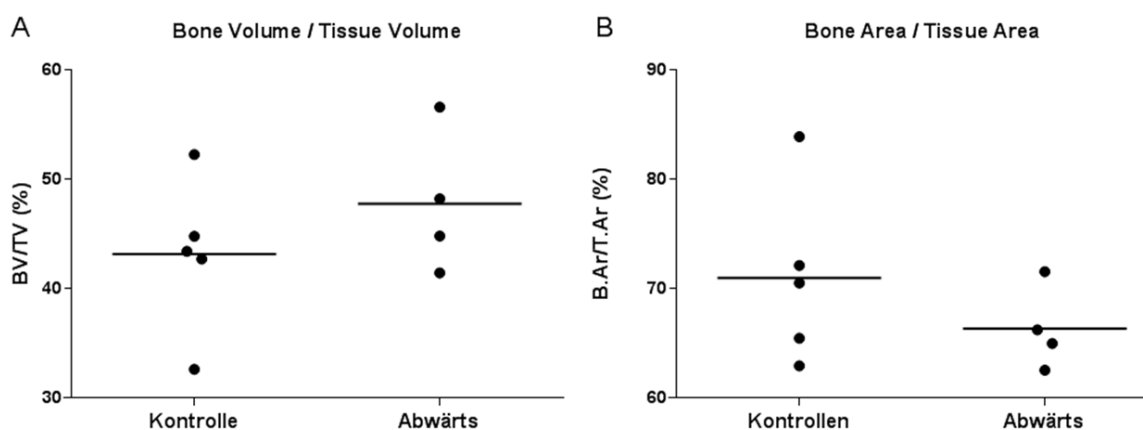
**Abbildung 26: Knochenwerte der Femora nach Kurzzeitraining**

A BV / TV als repräsentativster Wert des trabekulären Knochens; B B.Ar / T.Ar als repräsentativster Wert des kortikalen Knochens; die Punkte stellen Einzelwerte dar, die um die Mittelwerte (Linie) streuen, Laufgruppe (Abwärts) und untrainierte Kontrollgruppe in direktem Vergleich. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$

### 3.1.10 Knochenwerte der Humeri im Kurzzeitversuch – keine Veränderungen der Knochenmasse im Bereich des trabekulären und kortikalen Bereich

Da bei negativer Steigung der axiale Stoß im Bereich der Humeri besonders stark ist, wurden im Rahmen des Kurzzeitversuchs auch diese mittels  $\mu$ CT untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls keine signifikante Veränderung der Knochenmasse im Vergleich zur untrainierten Kontrollgruppe, weder im trabekulären noch im kortikalen Bereich. Die repräsentativsten Werte für den jeweiligen Knochenanteil sind in Abbildung 27 dargestellt. Die restlichen der oben aufgeführten Werte waren ebenfalls nicht signifikant verändert im Vergleich zur Kontrollgruppe (hier nicht dargestellt).

Auf Grund der großen Streuung der Werte ist eine Aussage über Tendenzen nicht sinnvoll.



**Abbildung 27: Knochenwerte der Humeri nach Kurzzeittraining**

A BV / TV als repräsentativster Wert des trabekulären Knochens; B B.Ar / T.Ar als repräsentativster Wert des kortikalen Knochens; die Punkte stellen Einzelwerte dar, die um die Mittelwerte (Linie) streuen, Laufgruppe (Abwärts) und untrainierte Kontrollgruppe in direktem Vergleich. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $P < 0,0005$

### 3.1.11 RNA RT-PCR – keine signifikante Veränderung der Expression der Regulatoren des Knochenstoffwechsels auf RNA-Ebene nachweisbar

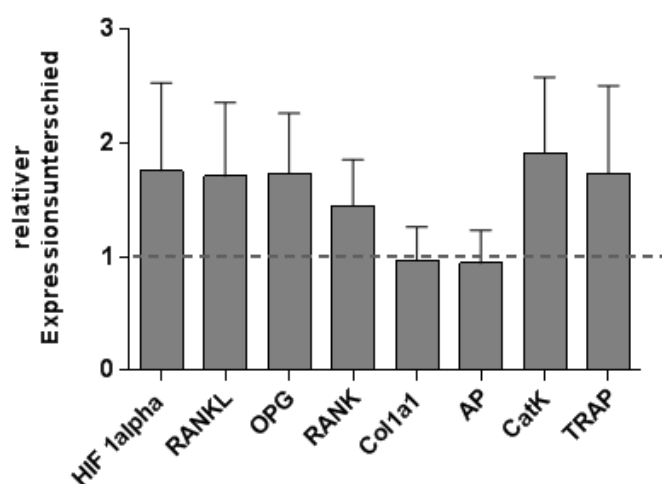
Da auf Proteinebene im Rahmen des Langzeitversuchs keine Veränderungen der an der Regulation des Knochenstoffwechsels beteiligten Faktoren nachgewiesen werden konnte, führten wir im Rahmen des Kurzzeitversuchs eine Analyse dieser Faktoren auf RNA-Ebene durch.

Da es wider Erwarten im Langzeitversuch zu einer Abnahme der trabekulären Knochenmasse gekommen war, nutzten wir diesen Kurzzeitversuch darüber hinaus zur Ursachenforschung. Eine mögliche Erklärung für die Abnahme der Knochenmasse

ist eine Hypoxie im Gewebe während der anaeroben Phasen des Trainings. Durch Hypoxie kommt es zur Aktivierung des HIF1a (Hypoxia induced factor 1 alpha), der wiederum durch eine Aktivierung von Osteoklasten zur gesteigertem Knochenabbau führt.

Aus diesem Grund wurde mittels Realtime PCR die Konzentration der RNA, die HIF1a kodiert, bestimmt. Darüber hinaus wurde die Expression der RNA, die folgende Proteine des Knochenstoffwechsels kodiert, untersucht: RANKL, Osteoprotegrin, RANK, Collagen 1a1, Alkalische Phosphatase, Cathepsin K, TRAP. Diese gelten als Marker für den Knochenabbau (RANKL, RANK, AP, Cathepsin K, TRAP) bzw. Knochenaufbau (OPG, Col1a1).

Die relative Expression ist in allen Fällen – außer bei Collagen 1a1 und der Alkalischen Phosphatase – über eins (Abb. 28). Das lässt auf eine leicht erhöhte Expression dieser betrachteten Gene schließen. Deutlichere Ergebnisse der RT-PCR in diese angedeutete Richtung würden zum einen eine Hypoxie und zum anderen eine Aktivierung des Knochenstoffwechsels nahelegen. Allerdings sind Schwankungen der relativen Expression um +/- eins als physiologische Schwankungen und als Artefakte der Untersuchungsmethode zu werten, sodass weder die Hypoxie noch der gesteigerte Knochenstoffwechsel eindeutig nachgewiesen werden konnten.



**Abbildung 28: Ergebnisse der TaqMan Realtime PCR**

Mittelwerte und Standardabweichungen des relativen Expressionsunterschied der Faktoren auf RNA (HIF 1alpha, RANKL, OPG, RANK, Collagen 1a1, Alkalische Phosphatase, Cathepsin K, TRAP); gestrichelte Linie: relative Expression =1, das bedeutet es besteht kein Unterschied in der Expression im Vergleich zur gleichaltrigen untrainierten Kontrolle.

### 3.1.12 Zusammenfassung der Ergebnisse des Laufbandtrainings

Es kam zu einer physiologischen Gewichtsentwicklung, die der der gleichaltrigen untrainierten Kontrollen entsprach.

Die Geschwindigkeiten, die im RtET ermittelt wurden, waren individuell sehr unterschiedlich und bedienten eine Bandbreite von 0,35 bis 0,7 m/s. In den Trainingseinheiten wurden mit Geschwindigkeiten von 0,19 bis 0,21m/s im langsamen Intervall und 0,38 bis 0,42 m/s im schnellen Intervall absolviert. Das entsprach je nach Ergebnis im RtET 35 bis 45 % der Maximalgeschwindigkeit im langsamen und 70 bis 86 % im schnellen Intervall. Vor allem die Mäuse mit hoher Maximalgeschwindigkeit im RtET waren im Intervalltraining nicht in der Lage mit der ermittelten Geschwindigkeit Schritt zu halten, sodass die Geschwindigkeit angepasst werden musste.

Im Rahmen des Langzeitversuchs kam es in den Femora der Mäuse aller Steigungsgruppen zu einer signifikanten Abnahme des trabekulären Knochens und in den Gruppen Eben und Aufwärts zu einer signifikanten Zunahme des kortikalen Knochens im Vergleich zur untrainierten Kontrollgruppe. Darüber hinaus konnte eine Abnahme der trabekulären und kortikalen Knochenmasse in den Tibiae der trainierten Mäuse aller Steigungsgruppen nachgewiesen werden.

Die Femora der trainierten Mäuse aller Steigungsgruppen wiesen im 3-Punkt-Biegetest eine signifikant geringere Maximale Belastbarkeit sowie Biegespannung als die der untrainierten Kontrollgruppe auf.

Im Serum der trainierten Mäuse konnte keine gesteigerte Expression der Regulatoren des Knochenstoffwechsels auf Proteinebene nachgewiesen werden.

**Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse des Laufbandtrainings.**

	Femora	Tibia	Humeri	Serum
Trabekulärer Knochen	↓	↓	↔	
Kortikaler Knochen	↑	↓	↔	
Maximale Belastungskraft	↓			
Biegespannung	↓			
Knochenaufbaumarker	tendenziell ↑			↔
Knochenabbaumarker	tendenziell ↑			tendenziell ↑

Im Kurzzeitversuch des Laufbandtrainings konnte weder eine signifikante Veränderung der Knochenmasse im Bereich des Femurs und des Humerus noch eine

gesteigerte Expression der Regulatoren des Knochenstoffwechsels auf RNA Ebene nachgewiesen werden.

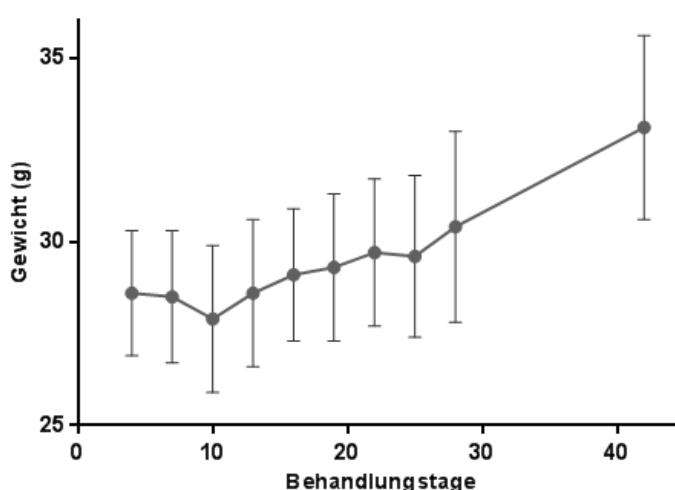
Alle Werte sind in Zahlen im Anhang tabellarisch aufgeführt.

## 3.2 Pharmakologische Intervention

### 3.2.1 Gewichte – Leichte Gewichtsabnahme zu Beginn der pharmakologischen Intervention mit anschließend rascher Erholung

Auch während der pharmakologischen Intervention wurden regelmäßige Gewichtskontrollen durchgeführt. Und zwar wurden die Mäuse vor jeder Injektion (alle 72 Stunden) gewogen, zum einen um URB 597 gewichtsadaptiert verabreichen zu können und zum anderen um die körperliche Gesundheit der Mäuse zu überwachen. Der genaue Verlauf der Gewichtsentwicklung über den Verlauf der Behandlung ist der Abbildung 29 zu entnehmen.

Nach den ersten beiden Behandlungen kam es zu einer Gewichtsabnahme. Im Mittel betrug diese Gewichtsabnahme 1,75 % des Ausgangsgewichtes. Im Verlauf kam es allerdings zu einer raschen Gewichtsnormalisierung und einer nachfolgenden physiologischen Gewichtsentwicklung. Sowohl das geringe Ausmaß der Gewichtsabnahme als auch die zeitnahe Gewichtsnormalisierung machen deutlich, dass es sich bei der intraperitonealen URB 597 Applikation lediglich um eine geringe Belastung handelte.



**Abbildung 29: Gewichtsentwicklung**

Das Liniendiagramm zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung der Gewichte der Mäuse in Gramm im Verlauf der pharmakologischen Intervention. Gewichtsabnahme im Mittel von 1,75 % des Ausgangsgewichtes nach den ersten beiden Injektionen, danach physiologische Gewichtsentwicklung.

### **3.2.2 Knochenwerte der Femora – keine Veränderungen der Knochenmasse im trabekulären Anteil, Zunahme der kortikalen Knochenmasse**

Trabekulär zeigt sich im  $\mu$ CT keine Veränderung der Knochenmasse. Sowohl der Knochenanteil am Gesamtgewebe (BV/TV) als auch die Dicke und Anzahl der Trabekel sowie der Structure Model Index, der eine Aussage über die Form der Trabekel macht, sind im Vergleich zu den gleichaltrigen unbehandelten Kontrollgruppe unverändert (Abb. 30).

Der kortikale Knochen hingegen hat in den Femora der pharmakologisch behandelten Mäuse im Vergleich zu den gleichaltrigen unbehandelten Kontrollen signifikant zugenommen. Und zwar zeigt sich sowohl eine signifikante Zunahme des Knochenanteils am Gesamtgewebe (B.Ar./T.Ar.) als auch der kortikalen Dicke (Cs.Th.) (Abb.31).

Während der Knochenanteil bei der Kontrollgruppe im Mittel 64,72 % am Gesamtgewebe beträgt, beträgt er in der behandelten Gruppe 69,56 % (Abb. 31A). Auch hier führt die isolierte Betrachtung des T.Ar (hier nicht dargestellt) zu der Erkenntnis, dass der kortikale Knochen endosteal gewachsen ist.

Die kortikale Dicke beträgt bei der Kontrollgruppe im Mittel 0,357 mm. In der pharmakologisch behandelten Gruppe hingegen liegt die kortikale Dicke im Mittel bei 0,367 mm (Abb. 31B) und ist damit signifikant erhöht.

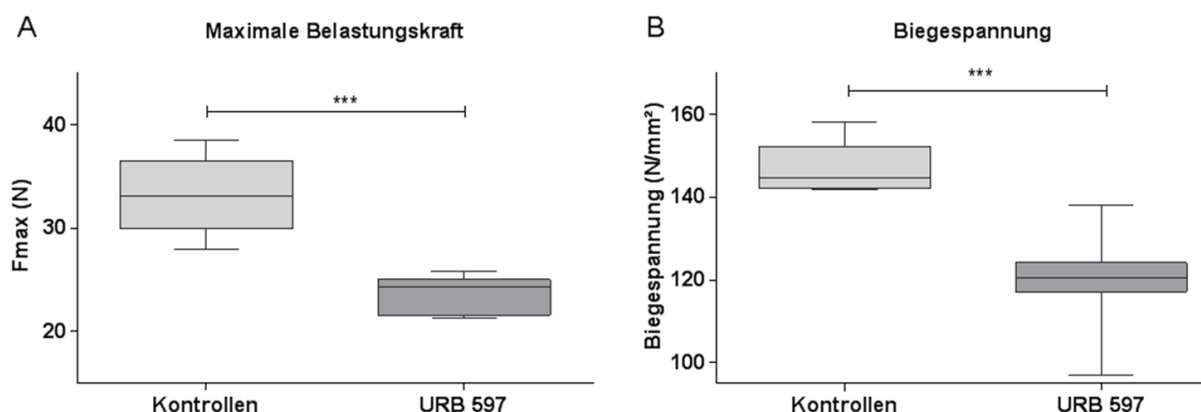


### 3.2.3 3-Punkt-Biege-Test der Femora – Abnahme der Belastungskraft sowie der Biegespannung

Analog zu den Femora der Mäuse, die das Laufbandtraining absolvierten, kommt es auch hier nach pharmakologischer Intervention sowohl zu einer signifikanten Abnahme der Maximalen Belastungskraft als auch zu einer signifikanten Abnahme der Biegespannung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 32).

Die Maximale Belastungskraft der Femora beträgt bei der unbehandelten Kontrollgruppe im Mittel 33,23 N, die Femora der behandelten Mäuse hingegen brechen im Mittel bei 23,72 N (Abb. 32A). Die unbehandelten Femora weisen im Mittel eine Biegespannung von 146,7 N/mm<sup>2</sup>, die behandelten Femora eine Biegespannung von 119,95 N/mm<sup>2</sup> (Abb. 32B).

Obwohl die Knochenmasse kortikal nachweislich signifikant zugenommen hat, brechen die Femora der behandelten Tiere im Test bei einer deutlich geringeren Belastung und sind qualitativ minderwertiger im Vergleich zu denen der gleichaltrigen Kontrollen.



**Abbildung 32: Ergebnisse des 3-Punkt-Biegetest nach pharmakologischer Intervention**

A Maximale Belastungskraft; B Biegespannung; die Boxplots zeigen die Mediane und Verteilung der Quartile sowie minimale und maximale Werte der Maximalen Belastungskraft (A) bzw. der Biegespannung (B); \*p<0,05, \*\*p<0,005, \*\*\*P<0,0005

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es mittels osteoinduktivem Laufbandtraining sowie pharmakologischer Intervention Knochenmasse bei der jungen, gesunden männlichen STR/ort Maus aufzubauen, um im weitesten Sinne einen Beitrag zur Entwicklung einer gelenkschonenden Osteoporoseprophylaxe und gegebenenfalls auch -therapie zu leisten. Da der Einfluss einer Intervention auf den menschlichen Knochen nicht isoliert und unabhängig von anderen Einflussfaktoren betrachtet werden kann und der menschliche Knochen darüber hinaus nach einer Intervention nicht im Detail mittels histologischer Verfahren analysiert werden kann, entschieden wir uns für das Mausmodell. Die STR/ort Maus ist dabei auf Grund ihrer phänotypischen Alleinstellungsmerkmale besonders gut für die Untersuchung von Knochen und Gelenken und deren Zusammenspiel geeignet.

Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arbeit bestätigen nur zum Teil die zu Beginn aufgestellte Hypothese. Es gelang uns sowohl durch Langzeitlaufbandtraining als auch durch pharmakologische Intervention im Bereich der Kortikalis Knochenmasse aufzubauen. Im Bereich des trabekulären Knochens mussten wir allerdings im Rahmen des Langzeitlaufbandtrainings eine Knochenmasseabnahme verzeichnen. Im Folgenden sollen einzelne Ergebnisse ausführlich diskutiert werden.

### 4.1 Die Zunahme der kortikalen Knochenmasse kann als Zeichen einer erhöhten Sensibilität der Kortikalis auf osteoinduktive Stimuli gedeutet werden

Im Rahmen des Langzeitlaufbandtrainings kam es zu einer Zunahme der Knochenmasse. Diese war allerdings ausschließlich im kortikalen Bereich der Femora der Tiere, die das Laufbandtraining in der Ebene und aufwärts absolviert hatten, zu verzeichnen. Die trabekuläre Knochenmasse der Femora hingegen hat in allen drei Steigungsgruppen signifikant abgenommen. Wie bereits zuvor aufgefallen war scheint der kortikale Knochen sensibler für osteoinduktive Stimuli zu sein und entsprechend frühzeitiger und ausgeprägter auf diese zu reagieren als der trabekuläre Knochen (Iwamoto et al. 2005).

Dabei trifft der B.Ar./T.Ar. eine Aussage über den Anteil des Knochens am gesamten Gewebe. Betrachtet man den Wert T.Ar. isoliert, kann ermittelt werden, ob der Anteil des kortikalen Knochens innen oder außen zugenommen hat, sprich ob der Knochen

endosteal oder periosteal gewachsen ist. Der T.Ar beschreibt den Durchmesser der gesamten Gewebefläche. Hat dieser bei erhöhtem B.Ar./T.Ar. zugenommen, kann man von einem periostealen Wachstum des Knochens ausgehen. Bleibt T.Ar. jedoch gleich oder nimmt ab bei erhöhtem Quotienten, hat das Wachstum des Knochens endosteal stattgefunden. In diesem Fall ist T.Ar. im Vergleich zur untrainierten Kontrollgruppe unverändert (nicht dargestellt). Daher kann von einem endostealen Wachstum des kortikalen Knochens ausgegangen werden.

Auch frühere Untersuchungen lieferten Ergebnisse über die Zunahme der kortikalen Knochenmasse (Wallace et al. 2007, Plochocki et al. 2009). In einer von Hamann et al. 2012 durchgeführten Studie, bei der Ratten ein Ausdauertraining auf einem abwärts geneigten Laufband absolviert hatten, war es hingegen ausschließlich zu einer Zunahme der trabekulären Knochenmasse gekommen. Der kortikale Knochen blieb dabei unverändert.

Darüber hinaus können die Veränderungen der Knochenmasse als Zeichen einer osteoporotischen Entwicklung gedeutet werden. Denn laut Ammann et al. 2003 geht die Osteoporose neben der Reduktion der trabekulären Knochenmasse auch mit einer Erweiterung des kortikalen Durchmessers (Cs.Th) einher. Auch der SMI, der in allen Steigungsgruppen der trainierten Tiere deutlich gegen 3 geht, spricht für eine osteoporotische Entwicklung.

Desweiteren kann es ausgelöst durch das Laufbandtraining zu einer Umverteilung des Knochenmaterials zugunsten der kortikalen Knochenmasse gekommen sein. Als ein Grund für die Umverteilung der Knochenmasse sollte mangelnde Kalzium- und Vitamin D Zufuhr in Erwägung gezogen werden, sodass es nur auf Kosten des trabekulären Knochens zu einer Zunahme der kortikalen Knochenmasse kommen konnte. Denn die Bedeutung von Kalzium und Vitamin D für die Struktur und Stabilität des Knochens ist bereits nachgewiesen (Amling et al. 2015, Carmeliet et al. 2015). Allerdings wird das Futter, das die Tiere erhalten haben, auch an tragende Tiere verfüttert, die bekanntlich einen besonders hohen Kalziumbedarf haben, was diese Erklärung unwahrscheinlich macht. Das legt die Vermutung nahe, dass durch äußere physikalische Reize, hier in Form des Laufbandtrainings, lediglich eine Umverteilung der vorhandenen Knochenmasse möglich ist, die absolute Knochenmasse und damit die peak bone mass nicht beeinflusst werden kann.

#### **4.2 Die Rolle des trabekulären Knochens bei der Bruchfestigkeit bleibt fraglich; die Qualität des neu aufgebauten kortikalen Knochens scheint mangelhaft zu sein**

Der 3-Punkt-Biegetest lieferte sowohl bei den Tieren, die das Langzeittraining absolviert hatten, als auch die, die der pharmakologischen Intervention unterzogen worden waren, ein überraschendes Ergebnis. Obwohl zu erwarten ist, dass bereits kleine Veränderungen der Knochenmasse im Bereich der Kortikalis zu großen Veränderungen in der Bruchfestigkeit führen (Turner et al. 2003), weisen die Femora dieser Tiere trotz signifikant breiterer Kortikalis eine signifikant geringere Maximale Belastungskraft sowie Biegespannung im Vergleich zu denen der untrainierten Tiere auf. In früheren Untersuchungen war es bereits sowohl zu gegenteiligen (Kohn et al. 2008) als auch ähnlichen Ergebnissen gekommen. So war beispielsweise bei einer Studie von Takedo et al. 2012 ebenfalls eine unveränderte Belastbarkeit bei signifikant erhöhter Knochenmasse nach Laufbandtraining aufgefallen.

Eine mögliche Erklärung für die verminderte Bruchfestigkeit kann der Verlust der trabekulären Knochenmasse sein. Auch bei der Osteoporose (Tervo et al. 2009) kommt es vor allem zu einer Reduktion der trabekulären Knochenmasse, in den seltensten Fällen wird die Kortikalis in Mitleidenschaft gezogen. Darüber hinaus führt Osteoporose häufig zu sogenannten pathologischen Frakturen (Frakturen ohne adäquates Trauma). Diese betreffen vor allem den Femurhals sowie die Wirbelkörper. Noch vor wenigen Jahren hat man diese beiden Tatsachen in direkten kausalen Zusammenhang gebracht (Piscitelli et al. 2011, Horner et al. 2010, Stevens and Abrami 1964). Heutzutage wird dem trabekulären Knochenanteil allerdings nur noch eine geringe Bedeutung bei der Bruchfestigkeit beigemessen (Holzer et al. 2009). Es ist weiterhin bekannt, dass die Belastbarkeit bzw. die Bruchfestigkeit eines Röhrenknochens weitgehend von der Kortikalis abhängig ist. Darüber hinaus ist die Biegespannung und Maximale Belastungskraft der Tiere, die pharmakologisch behandelt wurden, auch trotz unveränderter trabekulärer Knochenmasse herabgesetzt. Das Ergebnis des 3-Punkt-Biegetests lässt daher eher darauf schließen, dass die Breite der Kortikalis zwar zugenommen, ihre Qualität dabei aber abgenommen hat. Eine Ursache für die mangelnde Qualität könnte das schnelle Knochenwachstum sein. Das Knochenwachstum setzt sich bekanntlich aus organischen und einer anorganischen Phase zusammen. Entsprechend kann es zu einer mangel- oder fehlerhaften Kalzifizierung gekommen sein. Außerdem ist bereits bekannt, dass ein pharmakolo-

gisch vorbehandelter Knochen ein erhöhtes Risiko aufweist zu frakturieren. So kam es nach der Therapie mit Bisphosphonaten vermehrt zu Femurfrakturen (Abrahamson 2012 et al., Rizzoli et al 2011).

### **4.3 Der axiale Stoß wirkt besonders auf distale Anteile der Knochenkette der Extremitäten**

Da die Kraft des axialen Stoßes auf die weiter distal gelegenen Knochen der unteren Extremität stärker ist und hier folglich eine größere osteoinduktive Wirkung zu erwarten ist (Iwamoto et al. 2005), wurde auch die Tibia der Tiere, die das Langzeittraining absolviert hatten, entnommen und mittels  $\mu$ CT analysiert. Hier kam es sowohl im trabekulären als auch kortikalen Bereich des Knochens bei allen drei Steigungsgruppen zu einer signifikanten Abnahme der Knochenmasse. Allerdings wurden hier die proximalen Abschnitte der Tibia untersucht, während in Vorversuchen in den distalen Abschnitten der Tibiae von erwachsenen Frauen, die ein spezielles Training mit Belastungskomponente absolviert hatten, eine Zunahme der Knochenmasse beobachtet worden war (Lester et al. 2009).

Beim Abwärtslaufen ist die Belastung bzw. der axiale Stoß in den Vorderläufen besonders groß, weshalb im Rahmen des Kurzzeitversuchs auch die Humeri der Tiere entnommen und mittels  $\mu$ CT analysiert wurden. Auch hier kam es nicht zu einer Veränderung der Knochenmasse.

### **4.4 Mögliche Ursachen für die Reduktion der trabekulären Knochenmasse sind Hypoxie und Azidose, die auf eine hohe Intensität der Trainingsform zurückzuführen ist**

In vorangegangenen Arbeiten wurden verschiedenste Trainingsformen (Ausdauertraining / Intervalltraining, regelmäßiges / unregelmäßiges Training, Klettern (Mori et al. 2003), etc.) und deren Effekt auf den Knochen untersucht (...). Dabei wurde das Training häufig unter besonderen Bedingungen durchgeführt – nach Ovariectomie (Barengolts et al. 1992, Chang et al. 2011, Chen et al. 2010), bei glucokortikoidinduzierter Osteoporose (Musumeci et al. 2012), in Kombination mit Pharmaka (Starnes et al. 2013, Takeda et al. 2012 und 2013). In den meisten dieser Fälle lieferte die DEXA-Messung eine Zunahme der BMD (Bone mineral density, Knochendichte), die der Knochenmasse gleichgesetzt wurde (Hamann et al. 2012, Starnes et al. 2013, Chang et al. 2011, Hind et al. 2006, Mori et al. 2003, Chen et al. 2010). Allerdings ist

die Knochendichte ein Wert mit geringer Aussagekraft über die tatsächliche Knochenmasse und es herrscht Uneinigkeit über die Verwendbarkeit dieses Wertes (Turner et al. 2003). Zu einer Reduktion der Knochenmasse, wie es im trabekulären Bereich in dieser Arbeit der Fall ist, ist es jedoch in den seltensten Fällen gekommen.

#### 4.4.1 Hypoxie

Da dem Erreichen eines anaeroben Stoffwechsels während des Laufbandtrainings besondere Bedeutung beigemessen wurde, wurde eine Hypoxie im Gewebe als mögliche Ursache für die Abnahme der trabekulären Knochenmasse in Betracht gezogen. Es wurde bereits nachgewiesen, dass es auch durch körperliche Belastung bzw. sportliche Aktivitäten zu einer Hypoxie kommen kann (Cheng et al. 2010, Vollaard et al. 2005, Garvey et al. 2012). Dabei ist besonders high intensity Training prädestinierend für eine gesteigerte HIF1a Expression (Lundby et al. 2005). Hypoxie führt zu einer vermehrten Expression von HIF1a (Pialoux et al. 2008 und 2009). HIF1a wiederum führt zu einer Aktivierung der Osteoklasten und folglich zu einem Abbau von Knochenmasse (Miyachi et al. 2013, Nomura et al. 2013). Aus diesem Grund wurde im Rahmen des Kurzzeitversuchs neben Knochenauf- bzw. -abbau-markern auch die Konzentration des HIF1a im Femur auf RNA Ebene bestimmt. Hierfür wurden die Femora der trainierten Tiere eine halbe Stunde nach der letzten Trainingseinheit entnommen. Auch hier konnte weder eine gesteigerte Aktivität der Regulatoren des Knochenstoffwechsels noch eine erhöhte Expression von HIF1a nachgewiesen werden. Allerdings sind die Angaben zum optimalen Zeitpunkt der Bestimmung von HIF1a sehr unterschiedlich (Lundby et al. 2005, Wang et al. 2007, Pialoux et al. 2008 und 2009, Speth et al. 2014), weshalb es möglich ist, dass die Expression von HIF1a zum Zeitpunkt der Knochenentnahme noch nicht bzw. nicht mehr maximal erhöht war.

#### 4.4.2 Azidose

Darüber hinaus kann auch eine Laktatazidose als mögliche Ursache für die Knochenmasseabnahme in Erwägung gezogen werden. Wesentlicher Bestandteil des anaeroben Trainings ist das Überschreiten der sogenannten Laktatschwelle. Ab einem Laktatwert von 2 mmol/l im Serum kann von einer anaeroben Stoffwechsellage ausgegangen werden. Damit ist die Laktatschwelle gemeint (Cheetham et al.). Bei der Laktatazidose handelt es sich um eine metabolische Azidose, die definiert

wird als Serum pH < 7,35 bei gleichzeitig deutlich erhöhtem Laktat. Eine Azidose kann ebenfalls zur Aktivierung von Osteoklasten und damit zum Knochenabbau führen (Li et al. 2013, Takeuchi et al. 2013, Kato et al. 2013 und 2014). Jedoch gestaltet sich die Kapillarblutentnahme bei der STR/ort Maus schwierig und ist mit einer weiteren Teilnahme am Trainingsprogramm nicht vereinbar. Außerdem ist die Laufgeschwindigkeit zwar eine ausreichende Variable um von einem anaeroben Stoffwechsel ausgehen zu können (Hoydal et al. 2007), d. h. Laktat > 2 mmol/l, liefert aber keine genaue Aussage über die Höhe des Laktatspiegels bzw. über das Erreichen einer azidotischen Stoffwechsellage.

#### **4.4.3 Hohe Intensität der gewählten Trainingsform**

Demzufolge besteht die Möglichkeit, dass die von uns gewählte Trainingsform auf Grund der hohen Trainingsintensität zu einer Abnahme des trabekulären Knochens geführt hat. Sowohl die Dauer als auch die Häufigkeit der Trainingseinheiten sind vergleichbar mit denen anderer Arbeiten. Jedoch fallen im Vergleich zu anderen Trainingsprotokollen vor allem die hohen Geschwindigkeiten auf, die in der von uns gewählten Trainingsform absolviert wurden. In den meisten Arbeiten wurden die Tiere einem deutlich moderateren Training unterzogen. Darüber hinaus handelt es sich bei den meisten untersuchten Trainingsformen um ein Ausdauertraining mit gleichbleibender Geschwindigkeit über die gesamte Dauer einer Trainingseinheit (Takedo et al. 2012, Hamann et al. 2012, Barengolts et al. 1992, Chang et al. 2011, Kohn et al. 2008). Robling et al. 2002 hingegen untersuchte eine Trainingsform, die durch Belastungsspitzen gekennzeichnet war. Auch die Steigung des Laufbands unterscheidet sich von denen anderer Protokolle. In einigen Arbeiten wurde das Training bei einer leicht positiven Steigung durchgeführt (Wallace et al. 2007, Starnes et al. 2013, Kohn et al. 2008), in deutlich weniger Fällen absolvierten die Tiere das Training bei einer negativen Steigung. So untersuchte Hamann et al. 2012 eine Trainingsform, die bei 0° und -20° durchgeführt wurde. Die Femora der abwärts gelaufenen Tiere wiesen hier eine deutlich erhöhte trabekuläre Knochenmasse gegenüber denen der in der Ebene gelaufenen Tiere auf. Dabei blieb die kortikale Knochenmasse unverändert. Unsere Untersuchungen hingegen ergaben einen gegensätzlichen Befund: Während die Femora der Tiere, die das Laufbandtraining aufwärts und in der Ebene absolviert hatten eine signifikant erhöhte kortikale Knochenmasse aufwiesen, zeigte die Kortikalis der Femora der abwärts gelaufenen

Tiere keine Veränderungen gegenüber der gleichaltrigen untrainierten Kontrolle. In allen Steigungsgruppen kam es zu einer signifikant verminderten trabekulären Knochenmasse, die in der Gruppe der abwärts gelaufenen Tiere besonders ausgeprägt war. So wird deutlich, dass die untersuchten variablen Trainingsformen unter verschiedensten Bedingungen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, eine allgemeingültige osteoinduktive Trainingsform jedoch noch nicht gefunden wurde. Es ist jedoch äußerst unwahrscheinlich, dass das von uns gewählte Laufbandtraining eine zu hohe Belastung darstellte, da die Tiere eine physiologische Gewichtsentwicklung zeigten und zu jeder Zeit freiwillig das Laufbandtraining absolvierten.

#### **4.5 Die genetischen Grundlagen haben Einfluss auf die Wirkung des Laufbandtrainings**

Das Geschlecht sowie die Rasse der Tiere haben ebenfalls einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel. So haben wir in dieser Arbeit die STR/ort Maus gewählt, die einen Geschlechtsdimorphismus aufweist, der bereits ausführlich erläutert wurde. Im Vergleich zu den Weibchen weisen die Männchen dieses Stammes eine verminderte Knochenmasse auf, im Vergleich zu Männchen des C57Bl6 Stammes allerdings haben sie eine deutlich erhöhte Knochenmasse (Pasold et al. 2012). Männchen des C57Bl6 Stammes hingegen weisen gegenüber den stammesgleichen Weibchen eine erhöhte Knochenmasse auf (Wallace et al. 2007). Folglich scheint der Knochenstoffwechsel genetisch veranlagt zu sein. Darüber hinaus unterliegt der Knochenstoffwechsel einer geschlechtsspezifischen hormonellen Regulation (Almeida et al. 2013, Manologas et al. 2013). Östrogene und Androgene stimulieren den Knochenaufbau bzw. hemmen den Knochenabbau. Daher sind vor allem postmenopausale Frauen sowie Patienten, die einer Antiandrogenen Therapie unterzogen werden, von osteoporotischen Knochenveränderungen betroffen (Rhee et al. 2015, Alibhai et al. 2015, Ahmadi et al. 2013, Davison et al. 2012). Auch reagieren die Geschlechter und Rassen unterschiedlich auf osteoinduktives Laufbandtraining. In der Studie von Wallace et al. 2007 werden gleichaltrige C57Bl6 Männchen und Weibchen einem identischen Laufbandtraining unterzogen. Die Zunahme der Knochenmasse ist in den Femora der Männchen deutlich stärker ausgeprägt als in denen der Weibchen. In einer noch nicht veröffentlichten Arbeit wurde der Effekt des hier entwickelten Langzeitlaufbandtrainings auf den Knochen von STR/ort Weibchen untersucht. Dabei kam es zu einer signifikanten Zunahme sowohl des kortikalen als auch des trabe-

kulären Knochens. Diese Ergebnisse legen den Verdacht nahe, dass die Ausprägung des Knochenaufbaus abhängig von der ursprünglich vorhandenen Knochenmasse ist. Das bedeutet bei erhöhter Knochenmasse vor der Intervention ist auch die Zunahme der Knochenmasse stärker ausgeprägt. Dagegen sprechen allerdings die Ergebnisse der Arbeiten von Cheng et al. 2010, Chang et al. 2011, Barengolts et al. 1992, Jung et al. 2014. Hier kam es bei ovariectomierten Tieren, deren Ausgangsknochenmasse gegenüber gleichaltrigen Kontrollen reduziert war, durch unterschiedlichste Trainingsformen zu einer deutlichen Zunahme der Knochenmasse. Jedoch ist die durch Ovariectomie verursachte Knochenstoffwechselstörung weder genetisch veranlagt noch Folge einer physiologischen Veränderung, sondern rein exogen verursacht. Sie ahmt den Zustand der Postmenopause nach, dem allerdings im physiologischen Rahmen der Prozess der Menopause vorausgeht, der durch Anpassungsvorgänge gekennzeichnet ist. Da dieser Prozess übersprungen wurde, entspricht der Zustand nicht dem der Postmenopause und hat somit Krankheitswert. Daher kann man schlussfolgern, dass der Knochenstoffwechsel, der unter physiologischen Umständen reduziert ist, weniger sensibel auf osteoinduktives Laufbandtraining reagiert als der krankheitsbedingt reduzierte Knochenstoffwechsel.

Da die trainierten Tiere einer anderen Kohorte entstammen als die der Kontrollgruppe, ist es möglich, dass es im Verlauf zu phänotypischen Veränderungen des Knochenaufbaus im STR/ort Mausstamm gekommen ist, die die Unterschiede zwischen den trainierten und untrainierten Tieren im Bereich des kortikalen und trabekulären Knochens erklären würden.

#### **4.6 Das Alter der Tiere ist sinnvoll gewählt**

Das Alter der Mäuse, in dem sie das Training absolvierten bzw. der pharmakologischen Intervention unterzogen wurden, entspricht dem anderer Arbeiten. Dabei gelten Mäuse mit acht Wochen als adoleszente bis ausgewachsene Tiere (Plochocki et al. 2009, Kohn et al. 2008, Wallace et al. 2007). Es ist bereits bekannt, dass die peak bone mass in der zweiten bis dritten Lebensdekade erreicht wird (Tenforde et al. 2011) und diese einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung späterer osteoporotischer Frakturen hat. So ist eine hohe peak bone mass mit einem deutlich erniedrigtem Risiko verbunden im späteren Lebensverlauf eine osteoporotische Fraktur zu erleiden (Coli 2013, Ebeling et al. 2013). Durch die Ernährung, Mineralsubstitutionen und körperliche Aktivität kann im Verlauf der Kindheit und der Adoles-

zenz auf die peak bone mass und damit auch auf das osteoporotische Risiko Einfluss genommen werden (Mitchell et al. 2015, Harvey et al. 2014, Hind et al. 2006). Vor diesem Hintergrund ist das Alter von sechs Wochen mit Beginn der Eingewöhnungsphase richtig gewählt, um den Einfluss des Laufbandtrainings auf die peak bone mass zu untersuchen.

Darüber hinaus war es wichtig ein Lebensalter zu wählen, in dem die Tiere gesund sind und keine beginnenden Gelenkveränderungen aufweisen. Zum einen würde das Laufbandtraining bei einer beginnenden Osteoarthritis gegebenenfalls eine zu hohe Belastung darstellen, zum anderen führt eine manifeste Arthrose zu Veränderungen des subchondralen Knochens. Eine über die subchondralen Anteile hinaus gehende Knochenveränderung (Lowitz et al. 2014, Cöster et al. 2013, Yerges-Armstrong et al. 2013.) kann nicht ausgeschlossen werden und so hätte die Wirkung des Laufbandtrainings auf den Knochen nicht isoliert betrachtet werden können. Daher ist der Zeitpunkt unserer Intervention durchaus sinnvoll gewählt.

#### **4.7 Der eigentliche Knochenaufbau findet erst in der Erhaltungsphase statt**

Es ist bereits bekannt, dass aufgebaute Knochenmasse auch nach Reduktion der Anzahl der Trainingseinheiten erhalten bleibt (Wu et al. 2004). Aus diesem Grund wurde angenommen, dass der Knochenauf- bzw. abbau innerhalb des ersten Monats des Langzeitversuchs (Aufbauphase) stattgefunden hatte und es im zweiten Monat lediglich zu einer Erhaltung der veränderten Knochenmasse (Erhaltungsphase) kam. Zur Bestätigung dieser Annahme wurde noch ein Kurzzeitversuch angeschlossen. Dieser wurde im Vergleich zum Langzeitversuch um die Erhaltungsphase verkürzt. Hier kam es weder zu einer signifikanten Veränderung der trabekulären noch der kortikalen Knochenmasse. Das legt die Vermutung nahe, dass es zwar bereits in der ersten Trainingsphase zu einer Aktivierung des Stoffwechsels kommt, die Ergebnisse des aktivierten Knochenumsatzes aber erst nach der anschließenden Erhaltungsphase messbar werden.

#### **4.8 Physiologische Fluktuationen der Knochenmasse zwischen den Kohorten**

Die Knochen der Tiere, die dem Langzeitversuch unterzogen wurden – vor allem diejenigen, die das Training bei einer negativen Steigung absolviert hatten – wiesen im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe sowohl im trabekulären als auch im kortikalen Bereich deutliche Veränderungen auf. Die Knochen der Tiere, die das Laufbandtraining im Kurzzeitversuch absolvierten, zeigten gegenüber denselben Kontrollen keine Veränderungen weder im Bereich des trabekulären noch im Bereich des kortikalen Knochens.

Da die Tiere der Kontrollgruppe, der Gruppe des Langzeitversuchs und der des Kurzzeitversuchs unterschiedlichen Kohorten entstammten, sind auch physiologische Fluktuationen der Knochenmasse von einer Kohorte zur nächsten nicht auszuschließen. Daher wird es für künftige Experimente unumgänglich sein, Versuchs- und Kontrolltiere aus derselben Kohorte zu rekrutieren.

#### **4.9 Die Regulatoren des Knochenstoffwechsels sind weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene nachweisbar erhöht**

Im Rahmen des Langzeitversuchs wurde die Konzentration der Knochenauf- bzw. Knochenabbaumarker im Serum der Tiere mittels ELISA bestimmt. Da jedoch auf Grund technischer Schwierigkeiten bei der retroorbitalen Blutentnahme nicht von allen Tieren ausreichend Serum zur Verfügung stand, korreliert die Anzahl der Werte zum Teil nicht mit Anzahl der Tiere, die das Langzeitlaufbandtraining absolvierten. Außerdem kam es innerhalb der ermittelten Werte zu einer großen Streuung. Aus diesen Gründen konnte in einigen Fällen keine Korrelation berechnet werden. Die Tatsache, dass PINP bei einem Großteil der trainierten Tiere unter der Nachweisgrenze liegt, ist am ehesten auf ein fehlerhaftes ELISA-Kit oder eine falsche Verdünnung bei der Durchführung zurückzuführen. Auf Grund der deutlich veränderten Knochenmasse im Bereich des trabekulären und des kortikalen Knochens im Vergleich zu den gleichaltrigen untrainierten Kontrollen, hatten wir eigentlich mit einer gesteigerten Expression sowohl der Knochenaufbau- als auch abbaumarker gerechnet. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass der Knochenauf- bzw. abbau bereits im Verlauf der Erhaltungsphase abgeschlossen war und der Knochenstoffwechsel am Ende der Trainingsphase bereits wieder ein physiologisches Niveau erreicht hatte. Möglich ist jedoch auch, dass der Zeitpunkt der Blutentnahme falsch gewählt wurde. Falls Regulatoren des Knochenstoffwechsels unmittelbar nach dem osteoinduktiven

Training erhöht sind, kann uns eine mögliche gesteigerte Expression entgangen sein, da die Blutentnahme im Rahmen des Langzeitversuchs 24 Stunden nach dem letzten Training durchgeführt wurde.

Analog dazu wurde im Rahmen des Kurzzeitversuchs die Konzentration der Knochenauf- bzw. Knochenabbaumarker im Knochengewebe auf RNA-Ebene mittels RT-PCR bestimmt. Auch hier konnte keine signifikant gesteigerte Expression detektiert werden. Ähnlich wie bei der Bestimmung des HIF1a differieren die Angaben zum idealen Zeitpunkt der RNA Isolation, sodass eine Bestimmung zum falschen Zeitpunkt auch hier in Erwägung gezogen werden muss. Allerdings ist es durch das Kurzzeitlaufbandtraining nicht zu einer Veränderung der Knochenmasse im Vergleich zu den gleichaltrigen untrainierten Kontrollen gekommen, weshalb eine gesteigerte Expression der Knochenauf- bzw. abbaumarker nicht zu erwarten war.

#### **4.10 Modulatoren an endogenen Cannabinoidrezeptoren haben eine osteoinduktive Wirkung**

Es stehen verschiedenste Pharmaka zur Verfügung, bei denen eine agonistische Wirkung an den endogenen Cannabinoidrezeptoren nachgewiesen wurde und die damit potentiell osteoinduktiv sind. Wir wählten den auf Carbamatbasis entwickelten FAAH-Inhibitor URB597, dessen anxiolytische und analgetische Wirkung bereits bekannt, dessen potentiell osteoinduktive Wirkung jedoch weitgehend unerforscht ist. URB597 hemmt die endogene Fatty Acid Amidohydrolase und damit den Abbau von Anandamiden. Anandamide gehören zu den endogenen Cannabinoiden und binden an die entsprechenden Rezeptoren. In vitro ist nachgewiesen, dass die Aktivierung des endogenen Cannabinoidrezeptors CB2 über den p42/44 MAPK Signaltransduktionsweg zu einer Stimulation der Osteoblastendifferenzierung führt (Schmuhl et al. 2013).

Wir konnten eine signifikante Zunahme der kortikalen Knochenmasse bei unverändertem trabekulären Knochen gegenüber den gleichaltrigen Kontrollen verzeichnen. Diese Tatsache bestätigt erneut, dass der kortikale Knochen sensibler auf osteoinduktive Stimuli zu reagieren scheint als der trabekuläre Knochen (Iwamoto et al. 2005). Allerdings weist der Knochen auch hier eine deutlich herabgesetzte Bruchfestigkeit auf, was auf eine mögliche mangelhafte Qualität des neu gebildeten Knochens zurückzuführen ist.

Neben URB597 sind auch andere Pharmaka mit agonistischer Wirkung an den Cannabinoidrezeptoren bekannt. So ist HU308 beispielsweise ein spezifischer CB2 Rezeptoragonist, der in C57Bl6 Mäusen die Ovariectomie bedingte Reduktion der trabekulären und kortikalen Knochenmasse abschwächt (Sophocleous et al. 2011, Ofek et al. 2006). Darüber hinaus führt die Therapie mit dem pflanzlichen Cannabinoid Cannabidiol nach exogen induzierter Parodontose zu einem verminderten Knochenverlust im Bereich der Mandibula (Napimoga et al. 2009). Allerdings wurde zuvor nur die Wirkung der Cannabinoide in einem pathologischen Zustand untersucht. In den genannten Fällen wurde zunächst eine Situation geschaffen, die mit einer krankheitsbedingten Reduktion der Knochenmasse einhergeht, während wir die Wirkung des FAAH-Inhibitors in einem vollkommen gesunden Tier untersucht haben. Gegebenenfalls ist die Wirkung von FAAH-Inhibitoren in einem kranken Organismus ausgeprägter. Außerdem sollte auch die Wirkung von direkten Agonisten an Cannabinoidrezeptoren auf den Knochen in gesunden Tieren untersucht werden. Da Tiere, denen der CB1 Rezeptor fehlt, nach Ovariectomie vermindert an Knochenschwund leiden, lag der Verdacht nahe, dass auch Antagonisten an Cannabinoidrezeptoren eine osteoinduktive bzw. osteoprotektive Wirkung haben. Idris et al. konnte 2005 den Verdacht bestätigen. So konnte durch eine pharmakologische Blockade des CB1 Rezeptors mittels AM251 und SR144528 bei ovariectomierten Tieren ebenfalls einen verminderten Knochenverlust bewirkt werden. Folglich sind die Wirkung der Cannabinoidrezeptoren sowie die Regulation ihrer Expression noch nicht abschließend erforscht (Di Marzo et al. 2008).

In einigen Arbeiten wurde eine Pharmakotherapie mit einem Trainingsprogramm kombiniert. Hierbei kam es zu einer Augmentation der osteoinduktiven Wirkung (Starnes et al. 2013, Takeda et al. 2012). Daher bietet sich auch hier die Kombination der beiden osteoinduktiven Verfahren an.

Zu Beginn der pharmakologischen Intervention kam es bei den Tieren zu einer deutlichen Gewichtsabnahme, die auf eine körperliche Belastung schließen lässt. Leider kann nicht differenziert werden, ob die Belastung auf die intraperitoneale Injektion im Allgemeinen oder auf die Applikation des FAAH-Inhibitors im Speziellen zurückzuführen ist, da der Kontrollgruppe kein Vehicle verabreicht wurde. Neben der Gewichtsabnahme konnten weder Verhaltensauffälligkeiten noch äußere Merkmale, die auf eine Belastungssituation schließen lassen, verzeichnet werden. Die intraperitoneale Injektion ist eine gängige und gut erforschte Applikationsform in der Tierforschung.

Bei der Dosierung des FAAH-Inhibitors hielten wir uns an die Literatur, die hierzu einheitliche Angaben macht (Clapper et al. 2009, Haller et al. 2006 und 2008, Patel et al. 2006, Kathuria et al 2002, Vacondio et al. 2011 und Zaniewka et al. 2006).

#### **4.11 Die osteoinduktive Therapie sollte auch in die palliative Therapie bei malignombedingten Knochenveränderungen integriert werden**

Nicht nur die primäre und sekundäre Osteoporose sondern auch andere Knochenkrankungen führen zu einer Instabilität des Knochenmaterials. Knochenmetastasen, die vor allem im Rahmen eines medullären Schilddrüsenkarzinom, eines Mamma-, Bronchial-, Nebennieren- und Prostatakarzinom auftreten, führen zwar nicht zu einer generalisierten Abnahme der Knochendichte im Sinne einer Osteoporose, aber durch die Infiltration des Knochens mit maligne entartetem Fremdgewebe wird auch hier der Knochen lokal instabil. Diese lokale Instabilität führt zu pathologischen Frakturen. Je nach Primärtumor unterscheidet sich auch die Lokalisierung der sekundären Knochenmetastasen, so metastasieren Prostatakarzinome vorrangig in den Bereich der unteren Lendenwirbelsäule. Daher sollten in nachfolgenden Versuchen auch die Lendenwirbelsäulen der Tiere entnommen und sowohl die Knochendichte als auch die Bruchfestigkeit ermittelt werden, um den Einfluss des Laufbandtrainings sowie der pharmakologischen Intervention nicht nur auf die langen Röhrenknochen der Extremitäten sondern auch auf die Wirbelkörper zu untersuchen. Damit könnte ein Beitrag zur palliativen Therapie metastasierter Malignomerkrankungen geleistet werden.

## 5 Fazit und Ausblick

Bis heute existiert keine einheitliche Empfehlung über die Modalität und die Intensität der Bewegungsprophylaxe und -therapie bei Osteoporose. Diese Arbeit hat die komplexen Reaktionen des Knochenstoffwechsels auf die unterschiedlichen therapeutischen Ansätze gezeigt und verdeutlicht, dass der Knochen als reaktives Gewebe noch weitgehend unerforscht ist. Sie liefert aber auch viele neue Erkenntnisse, die bei der Entwicklung einer multimodalen Osteoporoseprophylaxe und -therapie hilfreich sein können. Es ist uns gelungen eine Form des Laufbandtrainings zu entwickeln, die im Bereich der Kortikalis zu einer Knochenmassezunahme führt. Darüber hinaus haben wir die osteoinduktive Wirkung des FAAH-Inhibitors URB597 nachgewiesen. Allerdings sind wir bei unseren Untersuchungen auch auf unerwartete Ergebnisse gestoßen, die deutlich machen, dass wir noch weit von einer allumfassenden Osteoporosetherapie entfernt sind.

Daher sollten weitere Varianten des Laufbandtrainings und deren Effekte auf den Knochen untersucht werden. Von besonderem Interesse wäre in diesem Zusammenhang, ob moderatere Trainingsformen denselben Effekt auf den Knochen haben oder sogar zusätzlich die Entstehung des trabekulären Knochens fördern. Dabei sollte zum einen eine geringere Peakgeschwindigkeit (ca. 60 % der  $V_{max}$ ) bei gleichbleibender Trainingshäufigkeit und zum anderen eine geringere Trainingshäufigkeit (dreimal pro Woche) bei gleichbleibender Peakgeschwindigkeit untersucht werden.

Desweiteren wäre eine eindeutigere Differenzierung und Interpretation der Effekte der unterschiedlichen Steigungen wünschenswert. Diese lässt sich vermutlich durch extremere Ausprägungen der Steigungen (+ und  $- 20^\circ$ ) des Laufbands erreichen. Dadurch könnte der Effekt von axialem Stoß bei negativer Steigung und vom Muskelzug bei positiver Steigung deutlicher differenziert werden.

Bezüglich der pharmakologischen Intervention sollten wie bereits erwähnt andere Substanzen (z.B. Cannabidiol), Dosierungen sowie unterschiedliche Zeitpunkte der Applikation und der Knochenentnahme untersucht werden. Neben dem bereits gewählten Applikationszeitpunkt bietet es sich ebenfalls an, die Applikation in den späteren Lebensverlauf durchzuführen, wenn die Knochenmasse altersbedingt reduziert ist bzw. die ersten arthrotischen Gelenkveränderungen aufgetreten sind. Ebenso kann auch der Zeitpunkt der Knochenentnahme im Verhältnis zum Applikationszeitpunkt variiert werden. Zusammenfassend wird eines der übergeordneten Ziele

nachfolgender Untersuchungen der Weg zu noch deutlicherem Aufbau von Knochenmasse und zu signifikanter Zunahme des trabekulären Knochenmaterials sein.

Darüber hinaus sollte eine Kombination aus Laufbandtraining und pharmakologischer Intervention durchgeführt werden, um gegebenenfalls die osteoinduktive Wirkung beider Komponenten noch zu steigern.

Sollte es in zukünftigen Untersuchungen zu einer signifikanten Zunahme des trabekulären Knochens kommen, sollte der 3-Punkt-Biegetest mit der Fragestellung nach Maximaler Belastungskraft und Biegespannung wiederholt werden. Damit kann der Einfluss des trabekulären Knochens auf die Belastbarkeit und Biegespannung untersucht und gegebenenfalls die erhöhte Belastbarkeit des Knochens durch gesteigerte trabekuläre Knochenmasse nachgewiesen werden.

Auffällig ist das gemeinsame Auftreten einer verminderten Knochenmasse gegenüber den stammesgleichen Weibchen und Arthrose bei den Männchen des STR/ort Mausstammes. Die Männchen haben gegenüber den Weibchen sowohl eine deutlich verminderte Knochendichte als auch ein deutlich erhöhtes Risiko mit zunehmendem Alter arthrotische Veränderungen der Kniegelenke zu entwickeln. Die Weibchen desselben Mausstammes hingegen weisen eine stark erhöhte Knochendichte sowohl des trabekulären als auch des kortikalen Knochens auf und haben in Vergleich zu den Männchen ein deutlich geringeres Risiko arthrotische Gelenkveränderungen zu entwickeln. Im Fall dieses Mausstammes scheint die erhöhte Knochendichte einen prophylaktischen Effekt auf die Entstehung arthrotischer Gelenkveränderungen zu haben.

Daher drängt sich die Frage förmlich auf, ob ein Zusammenhang zwischen der Pathogenese der Osteoporose und der Arthrose besteht. Welchen Einfluss hat die Knochendichte auf die Entstehung arthrotischer Veränderungen der Gelenke? Hat eine erhöhte Knochendichte eine protektive Wirkung auf mögliche Abnutzungserscheinungen des Gelenkknorpels?

Weiterführend kann daraus die Frage nach der Entwicklung einer Arthroseprophylaxe und eines gemeinsamen therapeutischen Ansatzes abgeleitet werden. Kann durch die Erhöhung der Knochendichte das Auftreten von Arthrose oder das Fortschreiten einer bereits manifesten Arthrose verhindert werden?

---

Dazu müssen in nachfolgenden Versuchen, die auf eine Zunahme der Knochendichte abzielen, neben den Knochen auch die entsprechenden Gelenke histologisch auf arthrotische Veränderungen der knorpeligen Strukturen und des subchondralen Knochens untersucht werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abrahamsen, B. (2012): Atypical femur fractures: Refining the clinical picture. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 27 (5), S. 975–976.
- Ahmadi, H.; Daneshmand, S. (2013): Androgen deprivation therapy: evidence-based management of side effects. In: *British Journal of Urology International* 111 (4), S. 543–548.
- Alibhai, S. M. H.; Mohamedali, H. Z.; Gulamhusein, H.; Panju, A. H.; Breunis, H.; Timilshina, N. et al. (2013): Changes in bone mineral density in men starting androgen deprivation therapy and the protective role of vitamin D. In: *Osteoporosis International* 24 (10), S. 2571–2579.
- Almeida, M.; Iyer, S.; Martin-Millan, M.; Bartell, S.M.; Han, L.; Ambrogini, E. et al. (2013): Estrogen receptor- $\alpha$  signaling in osteoblast progenitors stimulates cortical bone accrual. In: *Journal of Clinical Investigation* 123 (1), S. 394–404.
- Almstedt, H.C.; Canepa, J.A.; Ramirez, D.A.; Shoepe, T.C. (2011): Changes in bone mineral density in response to 24 weeks of resistance training in college-age men and women. In: *Journal of Strength and Conditioning Research* 25(4), S. 1098–1103.
- Amling, M. (2015): Kalzium und Vitamin D im Knochenstoffwechsel. In: *Unfallchirurg* 118 (12), S. 995–999.
- Ammann, P. (2009): Bone strength and ultrastructure. In: *Osteoporosis International* 20 (6), S. 1081–1083.
- Baker, J. M.; Lisio, M. de; Parise, G. (2011): Endurance exercise training promotes medullary hematopoiesis. In: *The FASEB Journal* 25 (12), S. 4348–4357.
- Barengolts, E.I.; Curry, D.J.; Bapna, M.S.; Kukreja, S.C. (1993): Effects of Two Non-Endurance Exercise Protocols on Established Bone Loss in Ovariectomized Adult Rats. In: *Calcified Tissue International* 1993 (52), S. 239–242.
- Barry, D.W.; Kohrt, W.M. (2008): Exercise and the preservation of bone health. In: *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention* 28 (3), S. 153–162.
- Boudenot, A.; Achiou, Z.; Portier, H. (2015): Does running strengthen bone? In: *Applied physiology, nutrition and metabolism* 40(12), S. 1309–1312.
- Boyce, B.F.; Xing, L. (2007): Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. In: *Arthritis Research & Therapy* 9 (1), S. 1–7.
- Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF); Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin (ÄZQ): Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische KHK. Kurzfassung. 3. Auflage, Version 1.

- Butezloff, M.M.; Zamarioli, A.; Leoni, G.B.; Sousa-Neto, M.D.; Volpon, J.B. (2015): Whole-body vibration improves fracture healing and bone quality in rats with ovariectomy-induced osteoporosis. In: *Acta Cirurgica Brasileira* 30 (11), S. 727–735.
- Carmeliet, G.; Dermauw, V.; Bouillon, R. (2015): Vitamin D signaling in calcium and bone homeostasis: A delicate balance. In: *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 29 (4), S. 621–631.
- Casarejosa, M.J.; Perucho, J.; Gomez, A.; Muñoz, M.P.; Fernandez-Estevéz, M.; Sagredo, O. et al. (2013): Natural Cannabinoids Improve Dopamine Neurotransmission and Tau and Amyloid Pathology in a Mouse Model of Tauopathy. In: *Journal of Alzheimer's Disease* 2013 (35), S. 525–539.
- Chang, T.-K.; Huang, C.-H.; Huang, C.-H.; Chen, H.-C.; Cheng, C.-K. (2010): The influence of long-term treadmill exercise on bone mass and articular cartilage in ovariectomized rats. In: *BMC Musculoskeletal Disorders* 11 (1), S. 185.
- Cheetham, M.E.; Williams, C. (1987): High Intensity Training and Treadmill Sprint Performance. In: *British Journal of Sports Medicine* (21), S. 14–17.
- Chen, Y.; Wang, S.; Bu, S.; Wang, Y.; Duan, Y.; Yang, S. (2011): Treadmill training prevents bone loss by inhibition of PPAR $\gamma$  expression but not promoting of Runx2 expression in ovariectomized rats. In: *European Journal of Applied Physiology* 111 (8), S. 1759–1767.
- Cheng, X. W.; Kuzuya, M.; Kim, W.; Song, H.; Hu, L.; Inoue, A. et al. (2010): Exercise Training Stimulates Ischemia-Induced Neovascularization via Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Dependent Hypoxia-Induced Factor-1 Reactivation in Mice of Advanced Age. In: *Circulation* 122 (7), S. 707–716.
- Chilibeck, P.D.; Sale, D.G.; Webber, C.E. (1995): Exercise and bone mineral density. In: *Sports Medicine* 19 (2), S. 103–122.
- Clapper, J.R.; Vacondio, F.; King, A.R.; Duranti, A.; Tontini, A.; Silva, C. et al. (2009): A Second Generation of Carbamate-Based Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitors with Improved Activity in vivo. In: *ChemMedChem* 4 (9), S. 1505–1513.
- Coli, G. (2013): To prevent the osteoporosis playing in advance. In: *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 10(2), S. 83–85.
- Conti, F.F.; Brito, J.; Bernardes, N.; Dias, D.; Malfitano, C.; Morris, M. et al. (2015): Positive effect of combined exercise training in a model of metabolic syndrome and menopause: autonomic, inflammatory, and oxidative stress evaluations. In: *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 309 (12).
- Cöster, M.C.; Rosengren, B.E.; Karlsson, C.; Schevelow, T. von; Magnusson, H.; Brudin, L.; Karlsson, M.K. (2014): Bone mass and anthropometry in patients with osteoarthritis of the foot and ankle. In: *Foot and Ankle Surgery* 20 (1), S. 52–56.

- Dachverband Osteologie e.V. (2014): Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen, S3-Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V..
- Davison, B. J.; Wiens, K.; Cushing, M. (2012): Promoting calcium and vitamin D intake to reduce the risk of osteoporosis in men on androgen deprivation therapy for recurrent prostate cancer. In: *Supportive Care in Cancer* 20 (10), S. 2287–2294.
- Di Marzo, V. (2008): Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? In: *Nature Reviews Drug Discovery* 7 (5), S. 438–455.
- Drake, M.T.; Clarke, B.L.; Lewiecki, E. M. (2015): The Pathophysiology and Treatment of Osteoporosis. In: *Clinical Therapeutics* 37 (8), S. 1837–1850.
- Ebeling, P.R.; Daly, R.M.; Kerr, D.A.; Kimlin, M.G. (2013): Building healthy bones throughout life: an evidence-informed strategy to prevent osteoporosis in Australia. In: *The Medical Journal of Australia* 199, S. S1.
- Fisher, G.; Brown, A.W.; Bohan Brown, M.M.; Alcorn, A.; Noles, C.; Winwood, L. et al. (2015): High Intensity Interval- vs Moderate Intensity- Training for Improving Cardiometabolic Health in Overweight or Obese Males: A Randomized Controlled Trial. In: *PLoS ONE* 10 (10).
- Friedman, W.A.; Garland, T.; Dohm, M.R. (1991): Individual Variation in Locomotor Behavior and Maximal Oxygen Consumption in Mice. In: *Physiology & Behavior* 52, S. 97–104.
- Garvey, C.; Tiep, B.; Carter, R.; Barnett, M.; Hart, M.; Casaburi, R. (2012): Severe Exercise-Induced Hypoxemia. In: *Respiratory care* 57 (7), S. 1154–1160.
- Godfrey, R.J.; Madgwick, Z.; Whyte, G.P. (2003): The exercise-induced growth hormone response in athletes. In: *Sports Medicine* 33 (8), S. 599–613.
- Gomez-Cabello, A.; Ara, I.; Gonzalez-Aguero, A.; Casajus, J.A., Vicente-Rodriguez, G. (2012): Effects of training on bone mass in older adults: a systematic review. In: *Sports Med* 42 (4), S. 301–325.
- Grant, I.; Cahn, B. R. (2005): Cannabis and endocannabinoid modulators: Therapeutic promises and challenges. In: *Clinical Neuroscience Research* 5 (2–4), S. 185–199.
- Gudmundsdottir, S.L.; Oskarsdottir, D.; Indridason, O.S.; Franzson, L.; Sigurdsson, G. (2010): Risk factors for bone loss in the hip of 75-year-old women: A 4-year follow-up study. In: *Maturitas* 67 (3), S. 256–261.
- Hafstad, A. D.; Boardman, N. T.; Lund, J.; Hagve, M.; Khalid, A. M.; Wisloff, U. et al. (2011): High intensity interval training alters substrate utilization and reduces oxygen consumption in the heart. In: *Journal of Applied Physiology* 111 (5), S. 1235–1241.

- Haller, V.L.; Cichewicz, D.L.; Welch, S.P. (2006): Non-cannabinoid CB1, non-cannabinoid CB2 antinociceptive effects of several novel compounds in the PPQ stretch test in mice. In: *European Journal of Pharmacology* 546 (1–3), S. 60–68.
- Haller, V.L.; Stevens, D.L.; Welch, S.P. (2008): Modulation of opioids via protection of anandamide degradation by fatty acid amide hydrolase. In: *European Journal of Pharmacology* 600 (1–3), S. 50–58.
- Hamann, N.; Kohler, T.; Müller, R.; Brüggemann, G.-P.; Niehoff, A. (2012): The Effect of Level and Downhill Running on Cortical and Trabecular Bone in Growing Rats. In: *Calcified Tissue International* 90 (5), S. 429–437.
- Harvey, N.; Dennison, E.; Cooper, C. (2014): Osteoporosis: A Lifecourse Approach. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 29 (9), S. 1917–1925.
- Herold, G. (2012): Innere Medizin. S. 752–758
- Hildebrand, T.O.R.; Rüegsegger, P. (1997): Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. In: *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* 1 (1), S. 15–23.
- Hind, K.; Burrows, M. (2007): Weight-bearing exercise and bone mineral accrual in children and adolescents: A review of controlled trials. In: *Bone* 40 (1), S. 14–27.
- Holzer, G.; Skrbensky, G. von; Holzer, L.A.; Pichl, W. (2009): Hip Fractures and the Contribution of Cortical Versus Trabecular Bone to Femoral Neck Strength. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 24 (3), S. 468–474.
- Horner, K.; Allen, P.; Graham, J.; Jacobs, R.; Boonen, S.; Pavitt, S. et al. (2010): The relationship between the OSTEODENT index and hip fracture risk assessment using FRAX. In: *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 110 (2), S. 243–249.
- Howe, T.E.; Shea, B.; Dawson, L.J.; Downie, F.; Murray, A.; Ross, C.; Harbour, R.T.; Caldwell, L.M.; Creed, G. (2011): Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews* 7.
- Høydal, M.A.; Wisløff, U.; Kemi, O.J.; Ellingsen, Ø. (2007): Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. In: *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation* 14 (6), S. 753–760.
- Huang, L.; Ramirez, J.C.; Frampton, G.A.; Golden, L.E.; Quinn, M.A.; Pae, H.Y. et al. (2011): Anandamide exerts its antiproliferative actions on cholangiocarcinoma by activation of the GPR55 receptor. In: *Laboratory Investigation* 91 (7), S. 1007–1017.
- Idris, A.I. (2010): Cannabinoid Receptors as Target for Treatment of Osteoporosis: A Tale of Two Therapies. In: *Current Neuropharmacology* 8 (3), S. 243–253.

- Idris, A.I.; Sophocleous, A.; Landao-Bassonga, E.; Canals, M.; Milligan, G.; Baker, D. et al. (2009): Cannabinoid Receptor Type 1 Protects against Age- Related Osteoporosis by Regulating Osteoblast and Adipocyte Differentiation in Marrow Stromal Cells. In: *Cell Metabolism* 10 (2), S. 139–147.
- Idris, A.I.; van 't Hof R.J.; Greig, I.R.; Ridge, S.A.; Baker, D.; Ross, R.A.; Ralston, S.H. (2005): Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. In: *Nature Medicine* (11(7)), S. 774–779.
- Ingalls, C. P.; Barnes, W.S.; Smith, S.B. (1996): Interaction between clenbuterol and run training: effects on exercise performance and MLC isoform content. In: *Journal of Applied Physiology* 80 (3), S. 795–801.
- Iwamoto, J.; Takeda, T.; Sato, Y. (2005): Effect of Treadmill Exercise on Bone Mass in Female Rats. In: *Experimental Animals* 54 (1), S. 1–6.
- Jung, S.R.; Kim, S.H.; Ahn, N.Y.; Kim, K.J. (1975): Changes of bone metabolism based on the different interventions with exercise type or additional intake material in ovariectomized rats. In: *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry* 6 (1), S. 111–117.
- Junqueira, L.C.U.; Carneiro, J. (2005): Histologie. 6. Aufl. Heidelberg: Springer.
- Kathuria, S.; Gaetani, S.; Fegley, D.; Valiño, F.; Duranti, A.; Tontini, A. et al. (2002): Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. In: *Nature Medicine* 9 (1), S. 76–81.
- Kato, K.; Morita I. (2013): Promotion of osteoclast differentiation and activation in spite of impeded osteoblast-lineage differentiation under acidosis: Effects of acidosis on bone metabolism. In: *Bioscience Trends* 7 (1), S. 33–41.
- Kato, K.; Matsushita, M. (2014): Proton concentrations can be a major contributor to the modification of osteoclast and osteoblast differentiation, working independently of extracellular bicarbonate ions. In: *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 32 (1), S. 17–28.
- Klein, T.W.; Lane, B.; Newton, C.A.; Friedman, H. (2000): The cannabinoid system and cytokine network. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 225(1), S.1–8.
- Kohn, D.H.; Sahar, N.D.; Wallace, J.M.; Golcuk, K.; Morris, M.D. (2009): Exercise Alters Mineral and Matrix Composition in the Absence of Adding New Bone. In: *Cells Tissues Organs* 189 (1–4), S. 33–37.
- Lapvetelainen, T.; Nevalainen, T.; Parkkinen, J.J.; Arokosi, J.; Kiraly, K.; Hyttinen, M. et al. (1995): Lifelong Moderate Running Training Increases the Incidence and Severity of Osteoarthritis in the Knee Joint of C57BL Mice. In: *The Anatomical Record* 242, S. 159–165.
- Lester, M.E.; Urso, M.L.; Evans, R.K.; Pierce, J.R.; Spiering, B.A.; Maresh, C.M. et al. (2009): Influence of exercise mode and osteogenic index on bone biomarker responses during short-term physical training. In: *Bone* 45 (4), S. 768–776.

- Li, X.; Xu, R.-S.; Jiang, D.-L.; He, X.-L.; Jin, C.; Lu, W.-G. et al. (2013): Acid-sensing ion channel 1a is involved in acid-induced osteoclastogenesis by regulating activation of the transcription factor NFATc1. In: *FEBS Letters* 587 (19), S. 3236–3242.
- Lowitz, T.; Museyko, O.; Bousson, V.; Kalender, W.A.; Laredo, J.D.; Engelke, K. (2014): Characterization of knee osteoarthritis-related changes in trabecular bone using texture parameters at various levels of spatial resolution—a simulation study. In: *BoneKEy Reports* 3, S. 615.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009): Histologie. Taschenlehrbuch. 3. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Lundby, C.; Gassmann, M.; Pilegaard, H. (2006): Regular endurance training reduces the exercise induced HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  mRNA expression in human skeletal muscle in normoxic conditions. In: *European Journal of Applied Physiology* 96 (4), S. 363–369.
- Mahr, S.; Menard, J.; Krenn, V.; Müller, B. (2003): Sexual dimorphism in the osteoarthritis of str/ort mice may be linked to articular cytokines. In: *Annals of Rheumatic Diseases*, S. 1–4.
- Manolagas, S.C.; O'Brien, C.A.; Almeida, M. (2013): The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. In: *Nature Review Endocrinology* 9 (12), S. 699–712.
- Martyn-St James, M.; Carroll, S. (2010): Effects of different impact exercise modalities on bone mineral density in premenopausal women: a meta-analysis. In: *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 28 (3), S. 251–267.
- Meckel, Y.; Eliakim, A.; Seraev, M.; Zaldivar, F.; Cooper, D.M.; Sagiv, M.; Nemet, D. (2009): The effect of a brief sprint interval exercise on growth factors and inflammatory mediators. In: *Journal of Strength and Conditioning Research* 23, S. 225–230.
- Mitchell, P. J.; Cooper, C.; Dawson-Hughes, B.; Gordon, C. M.; Rizzoli, R. (2015): Life-course approach to nutrition. In: *Osteoporosis International* 26 (12), S. 2723–2742.
- Miyauchi, Y.; Sato, Y.; Kobayashi, T.; Yoshida, S.; Mori, T.; Kanagawa, H. et al. (2013): HIF1 is required for osteoclast activation by estrogen deficiency in postmenopausal osteoporosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (41), S. 16568–16573.
- Morel, J.; Combe, B.; Francisco, J.; Bernard, J. (2001): Bone Mineral Density of 704 Amateur Sportsmen Involved in Different Physical Activities. In: *Osteoporosis International* (12), S. 152–157.
- Moreno, R.; Borga, M.; Smedby, Ö. (2012): Evaluation of the plate-rod Model Assumption of trabecular Bone. In: *Biomedical Imaging* 9, S. 470–473.

- Mori, T.; Okimoto, N.; Sakai, A.; Okazaki, Y.; Nakura, N.; Notomi, T.; Nakamura, T. (2003): Climbing Exercise Increases Bone Mass and Trabecular Bone Turnover Through Transient Regulation of Marrow Osteogenic and Osteoclastogenic Potentials in Mice. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 18 (11), S. 2002–2009.
- Musumeci, G.; Loreto, C.; Leonardi, R.; Castorina, S.; Giunta, S.; Carnazza, M.L. et al. (2013): The effects of physical activity on apoptosis and lubricin expression in articular cartilage in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis. In: *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 31 (3), S. 274–284.
- Naderali, E.; Sari-Sarraf, V.; Aliasgarzadeh, A.; Naderali, M.M.; Esmaeili, H. (2015): A combined continuous and interval aerobic training improves metabolic syndrome risk factors in men. In: *International Journal of Graphics and Multimedia* 8, S. 203–210.
- Napimoga, M.H.; Benatti, B.B.; Lima, F.O.; Alves, P.M.; Campos, A.C.; Pena-dos-Santos, D.R. et al. (2009): Cannabidiol decreases bone resorption by inhibiting RANK/RANKL expression and pro-inflammatory cytokines during experimental periodontitis in rats. In: *International Immunopharmacology* 9 (2), S. 216–222.
- Nomura, T.; Aoyama, M.; Waguri-Nagaya, Y.; Goto, Y.; Suzuki, M.; Miyazawa, K. et al. (2014): Tumor necrosis factor stimulates osteoclastogenesis from human bone marrow cells under hypoxic conditions. In: *Experimental Cell Research* 321 (2), S. 167–177.
- Ofek, O.; Karsak, M.; Leclerc, N.; Fogel, M.; Frenkel, B.; Wright, K. et al. (2006): Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (3), S. 696–701.
- Pasold, J.; Engelmann, R.; Keller, J.; Joost, S.; Marshall, R.P.; Frerich, B.; Müller-Hilke, B. (2013): High bone mass in the STR/ort mouse results from increased bone formation and impaired bone resorption and is associated with extra-medullary hematopoiesis. In: *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 31 (1), S. 71–81.
- Pasold, J.; Osterberg, A.; Peters, K.; Taipaleenmäki, H.; Säämänen, A.; Vollmar, B.; Müller-Hilke, B. (2013): Reduced expression of Sfrp1 during chondrogenesis and in articular chondrocytes correlates with osteoarthritis in STR/ort mice. In: *Experimental Cell Research* 319 (5), S. 649–659.
- Patel, S. (2006): Pharmacological Evaluation of Cannabinoid Receptor Ligands in a Mouse Model of Anxiety: Further Evidence for an Anxiolytic Role for Endogenous Cannabinoid Signaling. In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 318 (1), S. 304–311.
- Pialoux, V.; Brugniaux, J.V.; Fellmann, N.; Richalet, J.-P.; Robach, P.; Schmitt, L. et al. (2009): Oxidative stress and HIF-1 $\alpha$  modulate hypoxic ventilatory responses after hypoxic training on athletes. In: *Respiratory Physiology & Neurobiology* 167 (2), S. 217–220.

- Pialoux, V.; Mounier, R.; Brown, A.D.; Steinback, C.D.; Rawling, J.M.; Poulin, M.J. (2009): Relationship between oxidative stress and HIF-1 $\alpha$  mRNA during sustained hypoxia in humans. In: *Free Radical Biology and Medicine* 46 (2), S. 321–326.
- Piper, W. (2007): Innere Medizin. Heidelberg: Springer. S. 810–818.
- Piscitelli, P.; Brandi, M.L.; Tarantino, U.; Baggiani, A.; Distante, A.; Muratore, M.; Grattagliano, V. (2010): Incidence and socioeconomic burden of hip fractures in Italy: extension study 2003–2005. In: *Reumatismo* 62(2), S. 113–118.
- Plochocki, J.H. (2009): Mechanically-induced osteogenesis in the cortical bone of pre- to peripubertal stage and peri- to postpubertal stage mice. In: *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 4 (1), S. 22.
- Qiagen, RNeasy® Plus Mini Handbook (2011)
- Rhee, H.; Gunter, J.H.; Heathcote, P.; Ho, K.; Stricker, P.; Corcoran, N.M.; Nelson, C.C. (2015): Adverse effects of androgen-deprivation therapy in prostate cancer and their management. In: *British Journal of Urology International* 115, S. 3–13.
- Richards, J. B.; Zheng, H.-F.; Spector, Tim D. (2012): Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. In: *Nature Reviews Genetics* 13 (8), S. 576–588.
- Rizzoli, R.; Åkesson, K.; Bouxsein, M.; Kanis, J. A.; Napoli, N.; Papapoulos, S. et al. (2011): Subtrochanteric fractures after long-term treatment with bisphosphonates: a European Society on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis, and International Osteoporosis Foundation Working Group Report. In: *Osteoporosis International* 22 (2), S. 373–390.
- Robling, A.G.; Hinant, F.M.; Burr, D.B.; Turner, C.H. (2012): Improved Bone Structure and Strength After Long-Term Mechanical Loading Is Greatest if Loading Is Separated Into Short Bouts. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 17 (8), S. 1545–1554.
- Salmon, P.: Bruker-MicroCT CT-Analyser: morphometric parameters in 3D and 2D.
- Schicho, R.; Storr, M. (2014): Cannabis Finds Its Way into Treatment of Crohn's Disease. In: *Pharmacology* 93 (1–2), S. 1–3.
- Schmuhl, E.; Ramer, R.; Salamon, A.; Peters, K.; Hinz, B. (2014): Increase of mesenchymal stem cell migration by cannabidiol via activation of p42/44 MAPK. In: *Biochemical Pharmacology* 87 (3), S. 489–501.
- Silbernagl, S.; Lang, F. (2013): Taschenatlas Pathophysiologie. 4. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Sophocleous, A.; Landao-Bassonga, E.; van't Hof, R.J.; Idris, A.I.; Ralston, S.H. (2011): The Type 2 Cannabinoid Receptor Regulates Bone Mass and Ovariectomy-Induced Bone Loss by Affecting Osteoblast Differentiation and Bone Formation. In: *Endocrinology* 152 (6), S. 2141–2149.

- Speth, J. M.; Hoggatt, J.; Singh, P.; Pelus, L. M. (2014): Pharmacologic increase in HIF1 enhances hematopoietic stem and progenitor homing and engraftment. In: *Blood* 123 (2), S. 203–207.
- Starnes, J.W.; Neidre, D.B.; Nyman, J.S.; Roy, A.; Nelson, M.J.; Gutierrez, G.; Wang, X. (2013): Synergistic effect of exercise and statins on femoral strength in rats. In: *Experimental Gerontology* 48 (8), S. 751–755.
- Stevens, J.; Abrami, G. (64): Osteoporosis in Patients with Femoral Neck Fractures. A Follow-up Study. In: *The Journal of Bone and Joint Surgery* 46 B (1), S. 24–27.
- Su, S.-H.; Chen, H.; Jen, C.J. (2001): Severe exercise enhances phagocytosis by murine bronchoalveolar macrophages. In: *Journal of Leukocyte Biology* 69, S. 75–80.
- Su, S.-H.; Chen, H.; Jen, C.J. (2005): Exercise Enhances Surfactant-Mediated Phagocytosis in Bronchoalveolar Macrophages. In: *Chinese Journal of Physiology* 48 (4), S. 210–216.
- Takeda, S.; Kobayashi, Y.; Park, J.-H.; Ezawa, I.; Omi N. (2012): Effect of Different Intake Levels of Dietary Protein and Physical Exercise on Bone mineral Density and Bone Strength in Growing Male Rats. In: *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* (58), S. 240–246.
- Takeda, S.; Park, J.-H.; Kawashima, E.; Ezawa, I.; Omi, N. (2013): Hydrolyzed collagen intake increases bone mass of growing rats trained with running exercise. In: *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 10 (1), S. 35.
- Takeuchi, S.; Hirukawa, K.; Togari, A. (2013): Acidosis Inhibits Mineralization in Human Osteoblasts. In: *Calcified Tissue International* 93 (3), S. 233–240.
- Tanaka, Y.; Kawanishi, N.; Shiva, D.; Tsutsumi, N.; Uchida, M.; Kitamura, H. et al. (2010): Exhaustive Exercise Reduces Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Production in Response to Lipopolysaccharide in Mice. In: *Neuroimmunomodulation* 17 (4), S. 279–286.
- Tenforde, A.S.; Fredericson, M. (2011): Influence of sports participation on bone health in the young athlete: a review of the literature. In: *PM & R* 3(9), S. 861–867.
- Tervo, T.; Nordström, P.; Neovius, M.; Nordström, A. (2009): Reduced physical activity corresponds with greater bone loss at the trabecular than the cortical bone sites in men. In: *Bone* 45 (6), S. 1073–1078.
- Turner, C.H.; Robling, A.G. (2003): Designing Exercise Regimens to Increase Bone Strength. In: *Exercise and Sport Sciences Reviews* 31 (1), S. 45–50.
- Uchida, K.; Urabe, K.; Naruse, K.; Kozai, Y.; Onuma, K.; Mikuni-Takagaki, Y. et al. (2012): Differential Age-Related Bone Architecture Changes between Female and Male STR/Ort Mice. In: *Experimental Animals* 61 (1), S. 59–66.
- Vacondio, F.; Silva, C.; Lodola, A.; Carmi, C.; Rivara, S.; Duranti, A. (2011): Biphenyl-3-yl alkylcarbamates as fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors: Steric effects of N-alkyl chain on rat plasma and liver stability. In: *European Journal of Medicinal Chemistry* 46 (9), S. 4466–4473.

- van Ruijven, L.J.; Giesen, E.B.W.; Mulda, L.; Farella, M.; van Eijden, T.M.G.J. (2005): The effect of bone loss on rod-like and plate-like trabeculae in the cancellous bone of the mandibular condyle. In: *Bone* 36 (6), S. 1078–1085.
- Vollaard, N.B.J.; Shearman, J.P.; Cooper, C.E. (2005): Exercise-Induced Oxidative Stress. Myths, Realities and Physiological Relevance. In: *Sports Medicine* 35 (12), S. 1045–1062.
- Wallace, J.M.; Rajachar, R.M.; Allen, M.R.; Bloomfield, S.A.; Robey, P.G.; Young, M.F.; Kohn, D.H. (2007): Exercise-induced changes in the cortical bone of growing mice are bone- and gender-specific. In: *Bone* 40 (4), S. 1120–1127.
- Wang, Y.; Wan, C.; Deng, L.; Liu, X.; Cao, X.; Gilbert, S.R. et al. (2007): The hypoxia-inducible factor  $\alpha$  pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. In: *Journal of Clinical Investigation* 117 (6), S. 1616–1626.
- Wu, J.; Wang, X.X.; Higuchi, M.; Yamada, K.; Ishimi, Y. (2004): High bone mass gained by exercise in growing male mice is increased by subsequent reduced exercise. In: *Journal of Applied Physiology* 97 (3), S. 806–810.
- Yerges-Armstrong, L.M.; Yau, M.S.; Liu, Y.; Krishnan, S.; Renner, J.B.; Eaton, C.B. et al. (2014): Association Analysis of BMD-associated SNPs with Knee Osteoarthritis. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 29 (6), S. 1373–1379.
- Zaniewska, M.; McCreary, A.C.; Przegaliński, E.; Filip, M. (2006): Evaluation of the role of nicotinic acetylcholine receptor subtypes and cannabinoid system in the discriminative stimulus effects of nicotine in rats. In: *European Journal of Pharmacology* 540 (1–3), S. 96–106.

## 7 Anhang

**Tabelle 6: Gewichte der Tiere – Langzeitlaufbandtraining**

Gewichte in g				
Kontrollen	6 Wochen	11 Wochen	13 Wochen	16 Wochen
M2 (P_S5)	16,7			39,3
M3 (P_S6)	23			34,4
M4 (P_S7)	23,6			34,8
M5 (P_S13)	20,4			44,6
M6 (P_S14)	18,7	26,52	39,34	37,29
M7 (P_S15)	24,3	25,69	37,50	35,31
M8 (P_S16)	24,4	33,57	36,94	38,95
M9 (P_S17)	25,9	34,00	34,51	33,32
STR_M1 (1187)				
STR_M2 (1188)				
STR_M4 (1191)				
Mittelwert	22,125	29,945	37,073	37,246
Standardabw.	3,190	4,450	1,992	3,673

Gewichte in g						
Abwärts	6 Wochen	8 Wochen	10 Wochen	12 Wochen	14 Wochen	16 Wochen
M1 (968)		25,9	24	26,9	27,5	
M2 (957)		26,3	28	30,2	31,5	35,1
M3 (962)		30,5	30,2	31,6	33,4	35,5
M4 (969)		31,9	32,4	34,5	34,8	38,2
M5 (958)		26,3	26,6	29,4	30,4	32
M6 (959)		24,6	27	28,9	30,7	31,9
M7 (961)		27	26,5	29,9	33,1	35,5
M8 (970)		30,2	31,8	35,5	35,7	38
Mittelwert		27,838	28,313	30,863	32,138	35,171
Standardabw.		2,641	2,905	2,887	2,654	2,522

Gewichte in g						
Eben	6 Wochen	8 Wochen	10 Wochen	12 Wochen	14 Wochen	16 Wochen
M1 (966)	21,9	24	26	26,9	27	29,2
M2 (977)	29,6	30,2	34,7	37,8	39,2	41,5
M3 (978)	26,2	28,9	33	35,4	38,6	40,4
M4 (979)	25,8	26,6	29,2	32,8	34,9	37,5
M5 (1002)	23,9	26,5	31	31,1	33	34,5
M6 (1008)	23,6	26,8	29	30,3	30,9	35,3
M7 (1010)	24,2	29,2	32,2	33,9	35,6	36,7
M8 (1015)	23,6	30	33,1	34	37,5	37,9
Mittelwert	24,850	27,775	31,025	32,775	34,588	36,625
Standardabw.	2,343	2,149	2,823	3,346	4,152	3,814

Gewichte in g						
Aufwärts	6 Wochen	8 Wochen	10 Wochen	12 Wochen	14 Wochen	16 Wochen
M1 (1001)	24,9	31,2	33,7	35,4	35,9	36,4
M2 (1003)	21,9	22,3	24,8	27	28,7	28,6
M3 (1006)	23,4	26	27,4	27,8	30	31,1
M4 (1009)	18,3	21,3	24	25,9	27,7	27,8
M5 (1000)	24,7	26,6	31,8	34,1	36,4	37,6
M6 (1004)	24,1	28,6	30	31,8	32,5	32,4
M7 (1005)	24,4	26,5	30,8	32,2	32,8	34,1
M8 (1016)	24,1	28	31,8	33,2	35,7	37,2
Mittelwert	23,225	26,313	29,288	30,925	32,463	33,150
Standardabw.	2,202	3,238	3,516	3,548	3,398	3,813

**Tabelle 7: Knochenwerte der Femora – Langzeitlaufbandtraining**

Knochenwerte $\mu$ CT-Analyse Femora								
Kontrollen	BV/TV in %	Tb.Th in mm	Tb.N in 1/mm	B.Ar. in mm <sup>2</sup>	T.Ar. in mm <sup>2</sup>	B.Ar/T.Ar in %	Cs.Th in mm	SMI
M2 (P_S5)	20,134	0,087	2,314	1,629	2,384	68,315	0,378	2,161
M3 (P_S6)	10,663	0,093	1,147	1,382	2,146	64,412	0,378	1,994
M4 (P_S7)	25,128	0,098	2,561	1,455	2,244	64,851	0,357	1,746
M5 (P_S13)	12,548	0,092	1,368	1,963	2,800	70,104	0,315	2,170
M6 (P_S14)	4,589	0,084	0,549	1,307	2,312	56,553	0,314	2,766
M7 (P_S15)	8,596	0,089	0,963	1,490	2,552	58,377	0,332	2,030
M8 (P_S16)	8,727	0,081	1,074	1,446	2,504	57,745	0,332	2,210
M9 (P_S17)	14,047	0,091	1,548	1,731	2,538	68,196	0,322	1,850
STR_M1 (1187)	9,876	0,088	1,121	1,986	2,901	68,452	0,406	2,337
STR_M2 (1188)	24,780	0,115	2,162	2,128	2,982	71,350	0,445	1,963
STR_M4 (1191)	6,772	0,079	0,858	1,598	2,511	63,612	0,348	2,384
Mittelwert	13,260	0,091	1,424	1,647	2,534	64,724	0,357	2,146
Standardabw.	7,069	0,010	0,651	0,273	0,267	5,185	0,042	0,283

Abwärts	BV/TV in %	Tb.Th in mm	Tb.N in 1/mm	B.Ar. in mm <sup>2</sup>	T.Ar. in mm <sup>2</sup>	B.Ar/T.Ar in %	Cs.Th in mm	SMI
M1 (968)	6,002	0,073	0,825	1,668	2,266	73,608	0,413	2,585
M2 (957)	1,440	0,065	0,222	1,455	2,220	65,562	0,347	2,807
M3 (962)	1,897	0,063	0,300	1,487	2,245	66,223	0,346	2,726
M4 (969)	3,986	0,086	0,461	1,525	2,220	68,689	0,356	2,755
M5 (958)	2,656	0,061	0,437	1,672	2,450	68,247	0,349	2,799
M6 (959)	5,281	0,076	0,696	1,230	2,052	59,943	0,298	2,364
M7 (961)	9,923	0,089	1,116	1,852	2,518	73,531	0,410	2,796
M8 (970)	1,744	0,070	0,251	1,808	2,642	68,404	0,388	3,088
Mittelwert	4,116	0,073	0,538	1,587	2,327	68,026	0,363	2,740
Standardabw.	2,891	0,010	0,315	0,204	0,193	4,420	0,038	0,206

Eben	BV/TV in %	Tb.Th in mm	Tb.N in 1/mm	B.Ar. in mm <sup>2</sup>	T.Ar. in mm <sup>2</sup>	B.Ar/T.Ar in %	Cs.Th in mm	SMI
M1 (966)	5,623	0,070	0,808	1,420	2,200	64,536	0,342	2,637
M2 (977)	6,631	0,069	0,964	1,729	2,581	66,990	0,384	2,705
M3 (978)	10,792	0,082	1,312	1,806	2,353	76,760	0,420	2,508
M4 (979)	7,960	0,072	1,101	1,726	2,382	72,459	0,375	2,525
M5 (1002)	4,826	0,065	0,740	1,482	2,034	72,859	0,360	2,730
M6 (1008)	2,900	0,072	0,405	1,477	2,208	66,878	0,347	2,791
M7 (1010)	4,080	0,078	0,526	1,893	2,578	73,442	0,391	2,762
M8 (1015)	10,473	0,072	1,445	1,688	2,313	72,977	0,383	2,357
Mittelwert	6,661	0,072	0,913	1,653	2,331	70,863	0,375	2,627
Standardabw.	2,892	0,005	0,364	0,173	0,188	4,198	0,026	0,151

Aufwärts	BV/TV in %	Tb.Th in mm	Tb.N in 1/mm	B.Ar. in mm <sup>2</sup>	T.Ar. in mm <sup>2</sup>	B.Ar/T.Ar in %	Cs.Th in mm	SMI
M1 (1001)	9,892	0,069	1,441	1,666	2,261	73,674	0,382	2,410
M2 (1003)	2,938	0,058	0,504	1,276	1,895	67,347	0,324	2,624
M3 (1006)	2,824	0,064	0,442	1,525	2,090	72,953	0,372	2,820
M4 (1009)	4,674	0,067	0,702	1,450	2,077	69,799	0,354	2,585
M5 (1000)	6,951	0,074	0,941	1,649	2,250	73,280	0,377	2,732
M6 (1004)	6,879	0,085	0,809	1,530	2,206	69,337	0,361	2,733
M7 (1005)	6,691	0,072	0,924	1,588	2,245	70,727	0,378	2,771
M8 (1016)	9,616	0,071	1,360	1,626	2,359	68,912	0,384	2,370
Mittelwert	6,308	0,070	0,890	1,539	2,173	70,754	0,366	2,631
Standardabw.	2,695	0,008	0,362	0,128	0,146	2,320	0,020	0,167

**Tabelle 8: Knochenwerte der Tibiae – Langzeitlaufbandtraining**

Knochenwerte $\mu$ CT-Analyse Tibiae								
Kontrollen	BV/TV in %	Tb.Th in mm	Tb.N in 1/mm	B.Ar. in mm <sup>2</sup>	T.Ar. in mm <sup>2</sup>	B.Ar/T.A r in %	Cs.Th in mm	SMI
M2 (P_S5)	54,423	0,129	4,235	1,797	2,187	82,161	0,363	0,187
M3 (P_S6)	67,738	0,152	4,456	1,654	2,325	71,168	0,342	1,242
M4 (P_S7)	61,489	0,127	4,859	1,710	2,084	82,065	0,346	0,967
M5 (P_S13)	50,837	0,156	3,269	1,539	2,003	76,843	0,313	0,207
M6 (P_S14)	22,279	0,119	1,873	1,321	1,905	69,373	0,293	1,703
M7 (P_S15)	40,712	0,158	2,573	1,528	2,173	70,331	0,321	0,930
M8 (P_S16)	27,554	0,188	1,468	1,516	2,318	65,384	0,314	2,198
M9 (P_S17)	38,272	0,104	3,687	1,418	2,044	69,354	0,308	1,096
STR_M1 (1187)								
STR_M2 (1188)								
STR_M4 (1191)								
Mittelwert	45,413	0,141	3,302	1,560	2,130	73,335	0,325	1,066
Standardabw.	16,012	0,027	1,237	0,155	0,149	6,267	0,023	0,682

Abwärts	BV/TV in %	Tb.Th in mm	Tb.N in 1/mm	B.Ar. in mm <sup>2</sup>	T.Ar. in mm <sup>2</sup>	B.Ar/T.A r in %	Cs.Th in mm	SMI
M1 (968)	28,818	0,146	1,973	1,293	2,121	60,986	0,280	1,443
M2 (957)	26,432	0,157	1,684	1,368	2,130	64,256	0,293	1,749
M3 (962)	20,672	0,093	2,224	1,511	2,444	61,820	0,302	1,076
M4 (969)	33,729	0,155	2,178	1,557	2,580	60,340	0,315	0,843
M5 (958)	21,059	0,118	1,789	1,352	2,110	64,071	0,295	1,672
M6 (959)	17,157	0,107	1,602	1,403	2,306	60,846	0,297	1,794
M7 (961)	23,947	0,126	1,900	1,397	2,343	59,619	0,290	1,518
M8 (970)	30,514	0,119	2,575	1,470	2,387	61,562	0,293	1,155
Mittelwert	25,291	0,128	1,990	1,419	2,303	61,687	0,296	1,406
Standardabw.	5,599	0,023	0,322	0,087	0,171	1,674	0,010	0,347

Eben	BV/TV in %	Tb.Th in mm	Tb.N in 1/mm	B.Ar. in mm <sup>2</sup>	T.Ar. in mm <sup>2</sup>	B.Ar/T.A r in %	Cs.Th in mm	SMI
M1 (966)	24,054	0,099	2,438	1,310	2,060	63,605	0,282	1,627
M2 (977)	29,530	0,104	2,832	1,474	2,375	62,060	0,298	0,966
M3 (978)	32,003	0,111	2,884	1,384	2,122	65,186	0,296	1,072
M4 (979)	28,897	0,094	3,058	1,406	2,163	64,990	0,302	1,257
M5 (1002)	28,126	0,105	2,679	1,340	2,116	63,305	0,294	1,296
M6 (1008)	61,585	0,212	2,899	1,433	2,326	61,587	0,289	1,296
M7 (1010)	24,408	0,116	2,101	1,491	2,470	60,367	0,292	1,806
M8 (1015)	34,182	0,122	2,811	1,421	2,226	63,823	0,300	1,151
Mittelwert	32,848	0,120	2,713	1,407	2,232	63,115	0,294	1,309
Standardabw.	12,105	0,038	0,307	0,062	0,144	1,673	0,006	0,280

Aufwärts	BV/TV in %	Tb.Th in mm	Tb.N in 1/mm	B.Ar. in mm <sup>2</sup>	T.Ar. in mm <sup>2</sup>	B.Ar/T.A r in %	Cs.Th in mm	SMI
M1 (1001)	31,767	0,106	3,011	1,449	2,195	66,021	0,293	1,501
M2 (1003)	24,682	0,092	2,698	1,279	1,931	66,244	0,284	1,411
M3 (1006)	19,356	0,086	2,242	1,336	2,004	66,667	0,292	1,818
M4 (1009)	29,891	0,117	2,551	1,175	1,893	62,066	0,268	1,410
M5 (1000)	32,783	0,132	2,489	1,362	2,061	66,071	0,285	1,653
M6 (1004)	20,984	0,097	2,168	1,391	1,985	70,076	0,300	1,935
M7 (1005)	11,285	0,067	1,674	1,378	2,087	65,996	0,293	2,230
M8 (1016)	22,101	0,087	2,539	1,396	2,052	68,054	0,295	1,679
Mittelwert	24,106	0,098	2,421	1,346	2,026	66,399	0,289	1,705
Standardabw.	7,255	0,020	0,399	0,085	0,095	2,253	0,010	0,283

**Tabelle 9: Ergebnisse des 3-Punkt-Biegetests – Langzeitlaufbandtraining**

3-Punkt-Biegetest		
Kontrollen	Maximale Belastungskraft F <sub>max</sub> in N	Biegespannung in N/mm <sup>2</sup>
M2 (P_S5)		
M3 (P_S6)		
M4 (P_S7)		
M5 (P_S13)	38,543	158,317
M6 (P_S14)	27,900	141,881
M7 (P_S15)	32,060	146,303
M8 (P_S16)	33,145	142,431
M9 (P_S17)	34,509	144,547
STR_M1 (1187)		
STR_M2 (1188)		
STR_M4 (1191)		
Mittelwert	33,231	146,696
Standardabw.	3,862	6,730

Abwärts	Maximale Belastungskraft F <sub>max</sub> in N	Biegespannung in N/mm <sup>2</sup>
M1 (968)	18,040	112,605
M2 (957)	25,492	136,270
M3 (962)	22,742	115,918
M4 (969)	25,886	120,598
M5 (958)	22,504	128,033
M6 (959)	22,183	122,655
M7 (961)	19,929	111,047
M8 (970)	26,783	111,413
Mittelwert	22,945	119,817
Standardabw.	3,020	8,957

Eben	Maximale Belastungskraft F <sub>max</sub> in N	Biegespannung in N/mm <sup>2</sup>
M1 (966)	20,928	118,441
M2 (977)	25,165	120,797
M3 (978)	23,683	119,982
M4 (979)	24,573	114,592
M5 (1002)	22,757	142,760
M6 (1008)	21,874	132,465
M7 (1010)	26,067	123,990
M8 (1015)	26,006	141,169
Mittelwert	23,882	126,775
Standardabw.	1,908	10,708

Aufwärts	Maximale Belastungskraft F <sub>max</sub> in N	Biegespannung in N/mm <sup>2</sup>
M1 (1001)	26,233	141,825
M2 (1003)	20,441	142,259
M3 (1006)	21,172	124,919
M4 (1009)	20,615	123,980
M5 (1000)	22,890	134,925
M6 (1004)	20,235	122,388
M7 (1005)	22,394	126,993
M8 (1016)	20,200	109,450
Mittelwert	21,773	128,342
Standardabw.	2,065	10,979

**Tabelle 10: Ergebnisse der ELISAs - Langzeitlaufbandtraining**

Kontrollen	ELISA			
	PINP in pg/ml	RANKL in pg/ml	OPG in ng/ml	RANKL/OPG
M2 (P_S5)				
M3 (P_S6)				
M4 (P_S7)				
M5 (P_S13)				
M6 (P_S14)	13,44	7,75		
M7 (P_S15)	12,03	11,78	1,3	0,009
M8 (P_S16)	83,49	16,6	1,33	0,012
M9 (P_S17)	57,75	35,2		
STR_M1 (1187)				
STR_M2 (1188)				
STR_M4 (1191)				
Mittelwert	41,678	17,833	1,315	0,011
Standardabw.	35,038	12,130	0,021	0,002

Abwärts	PINP in pg/ml	RANKL in pg/ml	OPG in ng/ml	RANKL/OPG
M1 (968)	16,41	34,73	0,72	0,048
M2 (957)	13,86	32,04		
M3 (962)	17,31	3,65	1,67	0,002
M4 (969)	22,35	20,69	2,28	0,009
M5 (958)	15,99	45,81	2,01	0,023
M6 (959)	14,04	49,33		
M7 (961)	18,93	38,08	1,46	0,026
M8 (970)	16,2	35,67	1,13	0,032
Mittelwert	16,886	32,500	1,545	0,023
Standardabw.	2,751	14,534	0,571	0,016

Eben	PINP in pg/ml	RANKL in pg/ml	OPG in ng/ml	RANKL/OPG
M1 (966)	14,67	26,92	1,05	0,026
M2 (977)	12,84	30,5	1,79	0,017
M3 (978)	103,77	38,61		
M4 (979)	16,86	8,87	1,96	0,005
M5 (1002)	61,2	28,48		
M6 (1008)	20,61	24,76	0,97	0,026
M7 (1010)	20,13	18,44	0,84	0,022
M8 (1015)	16,41	18,24	1,18	0,015
Mittelwert	33,311	24,353	1,298	0,018
Standardabw.	32,514	9,078	0,463	0,008

Aufwärts	PINP in pg/ml	RANKL in pg/ml	OPG in ng/ml	RANKL/OPG
M1 (1001)	11,46	24,02	1,21	0,020
M2 (1003)	62,73	53,84		
M3 (1006)	21,09	14,54		
M4 (1009)	23,37	31,71		
M5 (1000)	19,17	33,79	0,64	0,053
M6 (1004)	11,46	16,05		
M7 (1005)	18,93	26,86	0,87	0,031
M8 (1016)	13,44	26,59	0,78	0,034
Mittelwert	22,706	28,425	0,875	0,034
Standardabw.	16,778	12,286	0,243	0,014

**Tabelle 11: Gewichte der Tiere – Kurzzeitlaufbandtraining**

Gewichte in g				
Kontrollen	6 Wochen	8 Wochen	10 Wochen	12 Wochen
KK M1 (1143)				28,3
KK M2 (1144)				29,4
KK M3 (1145)				29,9
KK M4 (1150)				32
KK M5 (1163)				33,15
Mittelwert				30,550
Standardabw.				1,979

Kurzzeittraining Gewichte in g				
K M1 (1159)	6 Wochen	8 Wochen	10 Wochen	12 Wochen
K M2 (1160)	23,1	27,3	28,3	29,26
K M3 (1161)	22,7	25,4	29,2	31,5
K M4 (1162)	20,5	24,9	27,2	29,66
Mittelwert	24,6	27,6	29,2	32,35
Mittelwert	22,725	26,300	28,475	30,693
Standardabw.	1,694	1,349	0,950	1,474

**Tabelle 12: Knochenwerte der Femora – Kurzzeitlaufbandtraining**

Knochenwerte $\mu$ CT-Analyse Femora								
Kontrollen	BV/TV in %	Tb.Th in mm	Tb.N in 1/mm	B.Ar. in mm <sup>2</sup>	T.Ar. in mm <sup>2</sup>	B.Ar/T.Ar in %	Cs.Th in mm	SMI
KK M1 (1143)	1,730	0,056	0,307	1,343	2,007	66,883	0,313	2,986
KK M2 (1144)	1,342	0,057	0,237	1,281	2,094	61,147	0,307	2,852
KK M3 (1145)	5,204	0,068	0,760	1,412	2,185	64,639	0,337	2,686
KK M4 (1150)	13,123	0,102	1,283	1,634	2,247	72,716	0,385	2,638
KK M5 (1163)	6,720	0,066	1,013	1,460	2,272	64,252	0,343	2,699
Mittelwert	5,624	0,070	0,720	1,426	2,161	65,927	0,337	2,772
Standardabw.	4,773	0,019	0,449	0,135	0,110	4,310	0,031	0,144

Kurzzeittraining	BV/TV in %	Tb.Th in mm	Tb.N in 1/mm	B.Ar. in mm <sup>2</sup>	T.Ar. in mm <sup>2</sup>	B.Ar/T.Ar in %	Cs.Th in mm	SMI
K M1 (1159)	4,486	0,073	0,619	1,375	2,247	61,186	0,325	2,311
K M2 (1160)	4,011	0,078	0,516	1,449	2,268	63,861	0,341	2,794
K M3 (1161)	8,034	0,064	1,263	1,485	2,088	71,119	0,356	2,511
K M4 (1162)	6,809	0,068	1,002	1,416	2,263	62,571	0,334	2,547
Mittelwert	5,835	0,070	0,850	1,431	2,217	64,684	0,339	2,540
Standardabw.	1,908	0,006	0,346	0,047	0,086	4,427	0,013	0,198

**Tabelle 13: Knochenwerte der Humeri – Kurzzeitlaufbandtraining**

Knochenwerte $\mu$ CT-Analyse Humeri								
Kontrollen	BV/TV in %	Tb.Th in mm	Tb.N in 1/mm	B.Ar. in mm <sup>2</sup>	T.Ar. in mm <sup>2</sup>	B.Ar/T.Ar in %	Cs.Th in mm	SMI
KK M1 (1143)	32,601	0,094	3,456	0,874	1,336	65,433	0,282	1,618
KK M2 (1144)	44,770	0,111	4,032	0,840	1,334	62,927	0,273	1,272
KK M3 (1145)	42,696	0,114	3,761	0,919	1,304	70,499	0,322	1,461
KK M4 (1150)	43,395	0,118	3,691	1,105	1,317	3,185	0,410	0,973
KK M5 (1163)	52,248	0,122	4,294	0,953	1,322	2,834	0,316	1,098
Mittelwert	43,142	0,112	3,847	0,938	1,323	40,976	0,321	1,284
Standardabw.	7,017	0,010	0,323	0,103	0,013	34,765	0,054	0,262

Kurzzeittraining	BV/TV in %	Tb.Th in mm	Tb.N in 1/mm	B.Ar. in mm <sup>2</sup>	T.Ar. in mm <sup>2</sup>	B.Ar/T.Ar in %	Cs.Th in mm	SMI
K M1 (1159)	44,792	0,114	3,921	0,967	1,460	66,212	0,284	1,167
K M2 (1160)	41,415	0,116	3,556	0,937	1,499	62,525	0,310	1,359
K M3 (1161)	56,579	0,136	4,161	1,009	1,411	71,544	0,355	1,075
K M4 (1162)	48,196	0,123	3,913	1,036	1,594	64,966	0,321	1,228
Mittelwert	47,746	0,122	3,888	0,987	1,491	66,312	0,318	1,207
Standardabw.	6,507	0,010	0,249	0,044	0,078	3,810	0,029	0,119

**Tabelle 14: Ergebnisse der RT-PCR – DeltaCT Werte**

RNA Femora - deltaCT Werte								
Kontrollen	HIF1alpha	RANKL	OPG	RANK	Col1a1	ALP	Cathepsin K	TRAP 5b
KK M1 (1143)	3,270	6,854	4,229	5,854	-5,381	2,093	1,158	1,605
KK M2 (1144)	2,378	5,941	4,241	5,241	-5,475	1,028	-0,004	-0,464
KK M3 (1145)	2,684	6,294	4,660	5,990	-4,082	2,203	1,022	0,899
KK M4 (1150)	3,108	7,490	4,358	6,759	-5,885	0,184	0,990	
KK M5 (1163)	4,028	8,272	4,739	7,734	-3,540	2,809	0,952	
Mittelwert	3,093	6,970	4,445	6,316	-4,873	1,663	0,824	0,680
Standardabw.	0,629	0,935	0,239	0,960	1,006	1,046	0,469	1,052

Kurzzeittraining	HIF1alpha	RANKL	OPG	RANK	Col1a1	ALP	Cathepsin K	TRAP 5b
K M1 (1159)	2,568	6,035	4,373	6,470	-4,039	2,450	0,941	1,206
K M2 (1160)	2,613	6,317	3,502	5,839	-5,082	1,536	-0,252	-0,089
K M3 (1161)	1,549	5,675	3,237	5,445	-4,857	1,350	-0,401	-0,328
K M4 (1162)	2,728	7,106	3,715	5,569	-5,127	1,857	-0,372	-0,661
Mittelwert	2,364	6,284	3,707	5,831	-4,776	1,798	-0,021	0,032
Standardabw.	0,548	0,608	0,485	0,457	0,506	0,483	0,645	0,817

**Tabelle 15: Ergebnisse der RT-PCR – Relativer Expressionsunterschied**

RNA Femora - Relativer Expressivitätsunterschied								
Kurzzeittraining	HIF1alpha	RANKL	OPG	RANK	Col1a1	ALP	Cathepsin K	TRAP 5b
K M1 (1159)	1,440	1,912	1,051	0,898	0,561	0,580	0,922	0,694
K M2 (1160)	1,395	1,572	1,923	1,391	1,156	1,092	2,108	1,704
K M3 (1161)	2,917	2,454	2,311	1,828	0,989	1,243	2,338	2,011
K M4 (1162)	1,288	0,910	1,659	1,678	1,193	0,875	2,291	2,533
Mittelwert	1,760	1,712	1,736	1,449	0,975	0,947	1,915	1,736
Standardabw.	0,774	0,646	0,529	0,409	0,290	0,288	0,669	0,774

**Tabelle 16: Gewichte der Tiere über den Verlauf der pharmakologischen Intervention**

Gewichte während der Intervention in g										
URB 597	4. Tag	7. Tag	10. Tag	13. Tag	16. Tag	19. Tag	22. Tag	25. Tag	28. Tag	42. Tag
M1 (1030)	31,7	32,0	32,0	32,5	32,4	32,8	33,2	33,6	35,3	36,8
M2 (1031)	26,9	26,3	25,7	26,1	26,7	26,4	27,0	26,0	26,7	30,3
M3	27,1	26,9	26,0	26,7	27,1	26,7	28,0	27,4	28,1	33,7
M4	27,8	28,2	27,5	29,2	29,7	30,5	31,9	31,5	33,1	34,3
M5	27,6	27,4	26,9	27,20	28,00	28,0	28,0	28,0	27,9	28,9
M6	29,7	29,5	29,3	30,2	31,1	31,1	31,0	30,7	31,3	34,5
M7	30,8	30,6	30,0	30,2	30,6	30,5	30,8	30,9	31,5	35,1
M8	29,2	29,3	27,7	28,7	29,1	29,3	29,0	28,6	29,2	32,6
M9	28,5	27,7	26,8	27,5	28,5	29,1	29,6	30,0	30,7	33,3
M10	26,8	26,7	27,6	27,7	28,2	28,1	29,2	30,1	31,7	33,6
Mittelwert	28,610	28,460	27,950	28,600	29,140	29,250	29,770	29,680	30,550	33,310
Standardabw.	1,701	1,852	1,947	1,959	1,814	2,019	1,937	2,217	2,615	2,286

**Tabelle 17: Knochenwerte der Femora – pharmakologische Intervention**

Knochenwerte $\mu$ CT-Analyse Femora								
URB 597	BV/TV in %	Tb.Th in mm	Tb.N in 1/mm	B.Ar. in mm <sup>2</sup>	T.Ar. in mm <sup>2</sup>	B.Ar/T.Ar in %	Cs.Th in mm	SMI
M1 (1030)	7,912	0,085	0,929	1,625	2,332	69,662	0,379	2,623
M2 (1031)	10,236	0,104	0,986	1,233	1,891	65,191	0,321	2,695
M3	7,245	0,083	0,869	1,530	2,222	68,859	0,372	2,458
M4	13,255	0,108	1,229	1,672	2,425	68,950	0,369	2,306
M5	9,274	0,088	1,053	1,644	2,397	73,620	0,375	2,416
M6	7,515	0,086	0,878	1,615	2,194	71,958	0,392	2,668
M7	9,524	0,071	1,340	1,677	2,331	66,064	0,352	2,376
M8	8,622	0,081	1,066	1,508	2,283	76,602	0,402	2,305
M9	32,620	0,096	3,401	1,731	2,259	68,590	0,366	1,486
M10	7,371	0,096	0,765	1,473	2,229	66,095	0,338	2,219
Mittelwert	11,357	0,090	1,252	1,571	2,256	69,559	0,367	2,355
Standardabw.	7,685	0,011	0,775	0,144	0,149	3,605	0,024	0,346

**Tabelle 18: Ergebnisse des 3-Punkt-Biegetests – pharmakologische Intervention**

3-Punkt-Biegetest		
URB 597	Maximale Belastungskraft F <sub>max</sub> in N	Biegespannung in N/mm <sup>2</sup>
M1 (1030)	25,823	122,260
M2 (1031)	21,246	128,309
M3	21,386	118,835
M4	24,807	111,977
M5	21,661	97,008
M6	24,529	137,956
M7	25,658	122,754
M8	24,457	120,595
M9	24,101	119,243
M10	23,574	120,581
Mittelwert	23,724	119,952
Standardabw.	1,717	10,540

## 8 Thesen

1. Osteoporose ist die häufigste Knochenerkrankung des alten Menschen und gewinnt unter anderem auf Grund des demografischen Wandels zunehmend an Bedeutung. Allerdings ist ihre Prophylaxe und Therapie in einigen Bereichen noch insuffizient und ist daher Gegenstand aktueller Forschung. Bekannt ist mittlerweile, dass die maximale Knochendichte (peak bone mass), die in der zweiten bis dritten Lebensdekade vorliegt, entscheidend für die Entstehung osteoporotischer Frakturen im Alter ist und durch verschiedene Maßnahmen (Ernährung, körperliche Aktivität, Pharmaka) beeinflusst werden kann. Daher ist vor allem die Prophylaxe der Osteoporose in den Vordergrund des Forschungsinteresses gerückt.
2. Die STR/ort-Maus eignet sich auf Grund ihres außergewöhnlichen Knochen- und Gelenkphänotyps insbesondere zur Untersuchung von Knochen- und Gelenkerkrankungen und deren Interaktion.
3. Ziel dieser Arbeit ist es sowohl ein spezielles Laufbandtraining als auch eine pharmakologische Therapie zu entwickeln, die im Mausmodell in gesundem Knochen zu einem aktiven Knochenaufbau führen, um damit der Prophylaxe und Therapie der Osteoporose einen Schritt näher zu kommen.
4. Bei dem Laufbandtraining handelt es sich um ein Intervalltraining, das sich durch Belastungsspitzen in Form von Geschwindigkeitsspitzen und Erholungsphasen auszeichnet. Die Belastungsgrenze wird durch einen sogenannten Run-to-Exhaustion-Test ermittelt. Außerdem wird das Training in unterschiedlichen Steigungen des Laufbandes absolviert. Vom anaeroben Stoffwechsel in den Belastungsspitzen sowie dem axialen Stoß bei negativer Steigung wird der osteoinduktive Effekt des Trainings erwartet. Die Tiere absolvieren dieses Training im Rahmen eines Langzeitversuchs über acht und im Rahmen eines Kurzzeitversuchs über vier Wochen.
5. Die pharmakologische Intervention wird mit dem FAAH-Inhibitor URB 597 durchgeführt, der über die Hemmung des Anandamidabbaus die Konzentration endogener Cannabinoide erhöht. Diese hatten in vorangegangenen Untersuchungen bereits eine osteoinduktive Wirkung gezeigt. Die Intervention wird über eine wiederholte intraperitoneale Applikation über vier Wochen durchgeführt.

6. Die entnommenen Knochen sowie das Serum der Tiere werden verschiedenen Untersuchungsmethoden zur Beurteilung der Knochenmasse, der Materialqualität und der Aktivität des Knochenstoffwechsels unterzogen.
7. Die Tiere absolvieren das Training bei einer physiologischen Gewichtsentwicklung und zeigen individuell sehr unterschiedliche Belastungsgrenzen.
8. Im Rahmen des Langzeitversuchs lässt sich bei einigen Steigungsgruppen eine signifikante Zunahme des kortikalen Knochens bei regelhafter Abnahme des trabekulären Knochens in allen Gruppen im Bereich der Femora verzeichnen. In den Tibiae kommt es in beiden Knochenanteilen zu einer Abnahme der Knochenmasse. Im Rahmen des Kurzzeitversuchs kommt es in allen untersuchten Knochen in beiden Knochenanteilen zu keiner signifikanten Knochenmasseveränderung.
9. In den Untersuchungen der Materialqualität zeigt sich nach Laufbandtraining im Langzeitversuch eine deutlich herabgesetzte Belastbarkeit (Maximale Belastungskraft und Biegespannung) der untersuchten Femora.
10. Weder im Serum noch im Knochenmaterial ist nach dem Laufbandtraining eine erhöhte Aktivität des Knochenstoffwechsels messbar.
11. Nach pharmakologischer Intervention weisen die Femora eine signifikant erhöhte kortikale Knochenmasse bei gleichbleibender trabekulärer Knochenmasse auf. Darüber hinaus zeigt sich eine deutlich herabgesetzte Belastbarkeit derselben.

## 9 Selbständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema:  
„Effekt von osteoinduktivem Laufbandtraining und pharmakologischer Intervention  
auf die STR/ort Maus“

selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt  
habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach  
entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall durch Angabe der Quelle  
kenntlich gemacht.

Osnabrück, den \_\_\_\_\_