Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm

Institutsleiter: Prof. Dr. Anita Ignatius

Einfluss von psychosozialem Stress auf den Knochenmetabolismus im Mausmodell

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Florian Max Groß

geboren in Tübingen

2020

Amtierender Dekan:	Herr Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Frau Prof. Dr. Anita Ignatius
2. Berichterstatter:	Herr Prof. Dr. Stefan Reber
Tag der Promotion:	26.06.2020

Inhalte dieser Dissertation sind zu finden, in folgender Publikation:

Foertsch S, Haffner-Luntzer M, Kroner J, Gross F, Kaiser K, Erber M, Reber S O, Ignatius A: Chronic psychosocial stress disturbs long-bone growth in adolescent mice. Disease Models & Mechanisms, 10: 1399-1409 (2017)

Lizensiert unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License 3.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	iii
1 Einleitung	1
1.1 Knochen	1
1.2 Stress	11
1.3 Psychosozialer Stress	12
1.4 Ziel der Arbeit	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Chemikalien, Puffer und Antikörper	16
2.2 Geräte und Software	18
2.3 Experimentelles Vorgehen	19
2.4 Versuchstiere	20
2.5 Chronic subordinate colony housing	21
2.6 µCT Untersuchungen	22
2.7 Histologie	23
2.8 Dynamische Histomorphometrie	25
2.9 Immunhistochemische Untersuchungen	
2.10 Statistik 27	
3 Ergebnisse	28
3.1 Längenmessung	28
3.2 µCT-Untersuchungen	29
3.3 Histologie	32
3.4 Dynamische Histomorphometrie	34
3.5 Immunhistochemische Untersuchungen	35
4 Diskussion	37
4.1 Auswirkungen des CSC auf den Knochenphänotyp	37
4.2 Vergleich mit anderen Stressmodellen	42
4.3 Methodische Limitationen	45

4.4 S	chlussfolgerung und Ausblick	45
5	Zusammenfassung	47
6	Literaturverzeichnis	49
7	Abbildungsverzeichnis	62
8	Tabellenverzeichnis	63
Danl	<sagung< td=""><td>64</td></sagung<>	64
Lebe	enslauf	65

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung		
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon		
Aqua dest.	Destilliertes Wasser		
ASBMR	American Society for Bone and Mineral Research		
BFR	Bone formation rate, Knochenformationsrate		
BMD	Bone mineral density, Knochenminderaldichte		
BMP	Bone morphogenetic protein		
BMU	Bone modelling unit		
BPm	Bone perimeter, Knochenumfang		
BSA	Bovine Serum Albumine		
BV/TV	Bone volume / tissue volume, Verhältnis von Knochenvolumen zu Gewebevolumen		
Cbfa1	Core binding factor α 1, Synonym für Runx2		
cm	Zentimeter		
cm3	Kubikzentimeter		
CMS	Chronic mild stress		
CO ₂	Kohlenstoffdioxid		
cort.	Kortikale		
CREB	Cyclic AMP response element binding protein		
CSC	Chronic subordinate colony housing		
CTh	Cortical thickness, Dicke der Kortikalis		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
EGF	Epidermal growth factor		

et al.	und andere	
FGF	Fibroblast growth factor	
g	Gramm	
GH	Growth hormone, Somatotropin	
GHC	Group housing control	
Gli-transcription factor	Glioma associated-Trankriptionsfaktor	
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	
НА	Hydroxyapatit	
HPA-axis	Hypothalamus-pituitary-adrenal-axis, Hypothalamus- Hypophysen-Nebennieren-Achse	
HSD2 ^{OB}	Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2 der Osteoblasten	
IGF	Insulin like growth factor	
IgG	Immunglobulin G	
ІНН	Indian hedgehog	
IL-1	Interleukin 1	
IL-6	Interleukin 6	
IL-8	Interleukin 8	
kV	Kilovolt	
Lef-1	Lymphoid enhancer binding factor 1	
Lrp5/6	Low density lipoprotein receptor related protein 5/6	
М	Mol	
mA	Milliampere	
MAR	Mineral acquisition rate, Knochenmineralisierungsrate	
M-CSF	Monocyte-colony stimulating factor	
MDSC	Myeloid derived depressor cells	
mg	Milligramm	

iv

mM	Millimol		
mm	Millimeter		
Mmp13	Matrix-Metalloproteinase 13		
n	Anzahl der Versuchstiere		
NaCl	Natriumchlorid		
NICD	Notch intracellular domain		
NOb	Number of Osteoblasts, Anzahl der Osteoblasten		
NOc	Number of Osteoclasts, Anzahl der Osteoklasten		
ObPm	Osteoblast Perimeter, Fläche mit der Osteoblasten dem Knochen anliegen		
OcPm	Osteoclast perimeter, Fläche mit der die Osteoklasten dem Knochen anliegen		
Opg	Osteoprotegerin		
Osx	Osterix		
PPARy2	Peroxisome proliferator-activated receptor y2		
PTH	Parathormon		
PTHR1	Parathormonrezeptor 1		
PTHrP	Parathormon related Protein		
PTSD	Posttraumatic stress disorder, Posttraumatische Belastungsstörung		
RANK	Receptor activator of nuclear factor kB		
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kB Ligand		
ROI	Region of interest		
ROS	Reactive oxygen species, Reaktive Sauerstoffspezies		
RUNX2	Runt related transcription factor 2		
Runx2	Gen das für RUNX2 kodiert		

v

SHC	Single housing control			
SIR	Social isolation rearing			
SNS	Sympathisches Nervensystem			
SOX9	SRY-Box 9			
SRY	Sex determining region of Y-gene			
STAT5b	Signal transducer and activator of transcription 5b			
TbN	Trabecular number, Anzahl der Trabekel			
TbSp	Trabecular separation, Abstand zwischen den Trabekeln			
TbTh	Trabecular thickness, Dicke der Trabekel			
Tcf	T-cell factor			
TMD	Tissue mineral density, Gewebemineraldichte			
ΤΝFα	Tumornekrosefaktor α			
TRAP	Tartrate resistant acid phosphatase			
TTBS	Tris buffered saline mit Tween 20			
VOI	Volume of interest			
Wnt	Wingless int			
z.B.	zum Beispiel			
°C	Grad Celsius			
μСТ	Mikro-Computertomographie			
μm	Mikrometer			

vi

1.1 Knochen

Der Knochen hat im Organismus viele verschiedene Aufgaben. Neben der Stützfunktion und dem Schutz der inneren Organe dient er gleichzeitig als Ansatzpunkt der Muskeln und als Speicher anorganischer Ionen. Um diese Aufgaben erfüllen zu können, muss der Knochen in der Lage sein, sich veränderten Anforderungen anzupassen [82]. Dieser Prozess wird Knochenumbau oder remodeling genannt und findet über die differentielle Regulation von Knochenzellen statt.

Knochen ist in zwei Anteile aufgeteilt, den zellulären Anteil und der extrazellulären Matrix, die wiederum in organische und anorganische Bestandteile unterteilt werden kann. Die organische Matrix besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I (ca. 95%), weiteren Kollagentypen, Proteinen und Proteoglykanen. Der anorganische Teil besteht vor allem aus Calcium und Phosphor in Form von Hydroxylapatitkristallen ([3Ca₃(PO₄)₂](OH)₂). Die Hauptzelltypen im Knochengewebe sind Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten. Zusätzlich spielen Chondrozyten beim Wachstum der langen Röhrenknochen eine wichtige Rolle [82].

Makroskopisch wird zwischen kortikalem und spongiösem Knochen unterschieden. Der kortikale Knochen (Kortikalis) bildet die äußere Schicht des Knochens und ist hauptsächlich für die Stützfunktion im Körper verantwortlich. Die Spongiosa hingegen findet sich in der Markhöhle, bei den langen Röhrenknochen vor allem in der Metaphyse, und dient der Kräfteverteilung innerhalb des Knochens und der Aufrechterhaltung der Mineralhomöostase [56].

1.1.1 Knochenzellen

<u>Osteoblasten:</u>

Osteoblasten entstehen aus mesenchymalen Vorläuferzellen. Unter dem Einfluss von Wachstumshormonen wie dem epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), bone morphogenetic protein (BMP) und Transkriptionsfaktoren wie

runt-related transcription factor 2 (RUNX2) und dessen down stream Faktor Osterix (Osx) differenzieren diese zu Präosteoblasten [10, 19, 82, 106]. Die weitere Differenzierung zu reifen Osteoblasten steht unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie insulin-like growth factor (IGF), sowie dem Einfluss verschiedener Hormone, z.B. Parathormon (PTH) und Somatotropin (GH) [10, 19, 82].

RUNX2 ist mit der wichtigste Transkriptionsfaktor in der Osteoblastogenese. So zeigten zum Beispiel *Runx2*-defizite Mäuse einen Phänotyp, bei dem das Skelett ausschließlich aus Knorpel besteht und keinerlei Knochengewebe aufweist [59].

Des Weiteren spielt auch der kanonische Wnt (wingless int) -Signalweg eine Rolle in der Differenzierung von Osteoblasten. Dabei bindet Wnt an Rezeptoren der Frizzled-Familie und die Korezeptoren Lrp5/6, was zu einer Anreicherung von β-Catenin im Zytosol führt. Dieses wiederum transloziert in den Nucleus und aktiviert dort die Transkriptionsfaktoren Lef-1 und Tcf, was zur Differenzierung der Zellen führt. [19, 111].

Vollständig ausdifferenzierte Osteoblasten spielen eine wichtige Rolle im Knochenaufbau. Sie synthetisieren das Osteoid, die organischen Bestandteile der Knochenmatrix. Außerdem regen sie die Mineralisation desselben an [82]. Zusätzlich sind sie auch an der Osteoklastenregulation beteiligt, indem sie den receptor activator of nuclear factor kB ligand (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG) sezernieren [10, 59, 82].

Ein Teil der aktiven Osteoblasten begibt sich nach erfolgreichem Knochenaufbau in Apoptose. Ein weiterer Teil lagert sich dem neugebildeten Knochen an und wird zu Knochenbelegzellen. Osteoblasten, die von Knochenmatrix umschlossen sind, differenzieren weiter zu Osteozyten. Wie genau dies vonstatten geht ist noch nicht ausreichend geklärt, jedoch scheint unter anderem die umgebende Matrix Einfluss auf diesen Vorgang zu haben [10, 82].

<u>Osteozyten</u>

Die reifen Osteozyten liegen eingebettet in die Knochenmatrix. Sie besitzen wenige Organellen, stehen dafür aber mit vielen dendritischen Fortsätzen untereinander

und mit Zellen des Endosts und Periosts in Verbindung. Diese Fortsätze liegen in einem System aus Canaliculi und sind untereinander durch Gap Junctions verbunden. Sie dienen einerseits der Ernährung der Osteozyten und ermöglichen diesen andererseits, eine Funktion als Mechanosensoren wahrzunehmen. Dadurch können erhöhte bzw. veränderte Belastungen auf den Knochen wahrgenommen werden und eine Anpassung der Mikroarchitektur darauf erfolgen [10, 19, 82]

Knochenbelegzellen

Knochenbelegzellen fungieren wohl vor allem als ruhende Osteoblasten, die die Knochenoberfläche bedecken. Gleichzeitig spielen sie aber auch eine Rolle in der Induzierung des Knochenremodelling indem sie die Matrix degradieren [82]

<u>Osteoklasten</u>

Bei den Osteoklasten handelt es sich um Knochen-resorbierende polynukleäre Riesenzellen, die aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet werden [82]. Essentiell für die Osteoklastogenese ist das Vorliegen des RANK-Liganden (RANKL, Receptor Activator of NF-κB Ligand), der an den RANK-Rezeptor auf der Oberfläche der Osteoklasten bindet, und monocyte-colony stimulating factor (M-CSF). M-CSF regt die Differenzierung der Osteoklastenprogenitorzellen an, während RANKL die weitere Genese reguliert. [19, 82, 94]. Reife Osteoklasten binden über Integrine eng an die Knochenoberfläche und schaffen in der entstehenden Lakune ein saures Milieu, was zur Auflösung der anorganischen Matrix führt. Gleichzeitig sezernieren sie Enzyme, wie Cathepsin K und TRAP (tartrate resistant acid phosphatase), um die organischen Bestandteile der Matrix abzubauen [82]

1.1.2 Ossifikation

Die Knochenbildung oder Ossifikation findet einerseits während der Knochenneubildung statt (Osteogenese) und andererseits wachsen bestehende Knochen nach denselben Grundsätzen weiter. Man unterscheidet dabei zwischen zwei verschiedenen Vorgängen: 1. Der desmalen und 2. der chondralen Ossifikation

Bei beiden Arten entsteht zuerst minderwertiger Geflechtknochen, der im Laufe der Ossifikation in Lamellenknochen umgewandelt wird (s. 1.1.3) [10, 69].

Desmale Ossifikation

Bei der desmalen Ossifikation entstehen direkt aus mesenchymalen Stammzellen Osteoblasten, die Osteoid synthetisieren, das im Verlauf der Ossifikation mineralisiert. So entstehen einzelne Inseln von Knochen, die dann durch appositionelles Wachstum miteinander verschmelzen. Die desmale Ossifikation spielt vor allem bei der Osteogenese flacher Knochen wie den Schädelknochen, so wie der Claviculae eine Rolle [10, 69].

Chondrale Ossifikation

Bei der chondralen Ossifikation differenzieren mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten. Diese beginnen zu proliferieren und Knorpelmatrix zu sezernieren und bauen so ein Knorpelgerüst des neuen Knochens auf. Gleichzeitig differenzieren die Stammzellen peripher der Chondrozyten zu Perichondrium. In der Mitte des neuen Knochens kommt es nun zu einer Hypertrophie der Chondrozyten, die daraufhin über parakrine Signale anliegende Zellen des Perichondriums zu einer Differenzierung zu Osteoblasten anregen. Diese Osteoblasten bilden nun eine Knochenmanschette (perichondrale Ossifikation). Gleichzeitig die regen hypertrophen Chondrozyten eine Mineralisierung der Knorpelmatrix und ein Einsprossen von Gefäßen an. Daraufhin kommt es zur Apoptose der hypertrophen Chondrozyten und gleichzeitig wandern Osteoblasten über die Gefäße in die Knochenmatrix ein und beginnen primäre Spongiosa aufzubauen (enchondrale Ossifikation). Diese primäre Spongiosa wird dann im weiteren Verlauf in den trabekulären Knochen umgewandelt, während aus der Knochenmanschette die Kompakta entsteht [61, 85]. Außerdem können Chondrozyten direkt zu Osteoblasten transdifferenzieren und dadurch neues Knochengewebe bilden [118].

Die verbleibenden Chondrozyten verlängern die Knorpelmatrize weiter durch Proliferation. Gleichzeitig ordnen sie sich in zwei verschiedenen Zonen an. Zu den Enden hin finden sich runde, langsam proliferierende Chondrozyten. Zur Mitte hin

sind die Chondrozyten in Säulen parallel zur Wachstumsrichtung angeordnet, abgeflacht und proliferieren schnell [85].

Insgesamt kommt es so zu einem Längenwachstum des Knochens, wobei die endgültige Länge des Knochens im Endeffekt von der Länge abhängt, die die Wachstumsfuge insgesamt gewachsen ist. Dies korreliert proportional mit der Größe und Anzahl der hypertrophen Chondrozyten [61, 85].

Damit es bei diesen Vorgängen nicht zu Fehlbildungen kommt, stehen all diese Vorgänge unter enger physiologischer Kontrolle. Hierbei spielen unter anderem parakrine, endokrine und mechanische Reize eine Rolle, ebenso wie Hormone und inflammatorische Botenstoffe.

Einer der wohl am besten beschriebenen lokalen Faktoren ist der Indian Hedgehog (IHH)- PTHrP Feedback Loop. IHH wird von den hypertrophen und prähypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge exprimiert und bindet an den Zielzellen an seinen Rezeptor Patched. Daraufhin kommt es über die Aktivierung des Transmembranproteins Smoothened zur Akkumulation von glioma-associated oncogene (GLI)- Transkriptionsfaktoren [85].

Je nach Lokalisation führt dies zu unterschiedlichen Effekten. In den Chondrozyten am epiphysärem Ende der Wachstumsfuge führt IHH dazu, dass Parathormon related Protein (PTHrP) freigesetzt wird. Dieses diffundiert nun wieder in Richtung Hypertrophiezone und bindet dort an den PTH/PTHrP Rezeptor PTHR1. Dies führt wiederum zu einer Depression der Synthese von IHH sowie gleichzeitig zu einer Inhibition der Hypertrophie der Chondrozyten. Außerdem führt IHH zu einer Chondrozytenproliferation. Zuletzt wird IHH außerdem für die Osteoblastogenese im Perichondrium sowie der angrenzenden Spongiosa benötigt [76, 85].



Abb. 1: Entstehung und Regulation des chondralen Knochenwachstums: A-D) verschiedene Stadien des Prozesses der chondralen Ossifikation. A) Primär kommt es zu einer Kondensation der mesenchymalen Stammzellen. Das Perichondrium bildet sich um die Kondensationszone; B) Es bildet sich eine Knorpelmatrize in Form des späteren Knochens. Die Chondrozyten differenzieren und lagern sich in entsprechenden Schichten an; C) Gefäße wachsen von außen in die Knorpelmatrize ein und es kommt zur primären Ossifikation, von hier aus schreitet die Ossifikation fort; D) Die Wachstumsfuge postnatal im Vorgang der enchondralen Ossifikation, sowie der sekundären Ossifikation in der Epiphyse, Aufgelistet sind verschiedene Größen und Regulatoren, die Einfluss auf das Knochenwachstum nehmen. Die Graphik stammt von Roselló-Díez et al. und wurde 2015 veröffentlicht [85].

SOX9 (SRY-Box 9) ist ein Transkriptionsfaktor, der von Zellen in mesenchymalen Kondensationszentren exprimiert wird und essentiell für die Differenzierung von Chondrozyten ist. Er steuert dabei die Differenzierung von den mesenchymalen Stammzellen bis hin zu den hypertrophen Chondrozyten [61]. So zeigten z.B. SOX9-knockout Mäuse ein komplettes Fehlen einer Chondrozytenkondensation [2].

Auch Runx2 spielt in der Chondrozytendifferenzierung eine Rolle. Es führt zu einer Differenzierung der proliferierenden Chondrozyten zu hypertrophen Chondrozyten. Exprimiert wird es vor allem in den prä- und hyperplastischen Chondrozyten [61, 77]. Außerdem ist es wie oben beschrieben obligat für die Osteoblastogenese.

Auch in der Wachstumsfuge ist der kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg von Bedeutung. Er aktiviert die Transkription von Genen, die für die Proliferation und Hypertrophie der Chondrozyten benötigt werden. Gleichzeitig ist er wie oben beschrieben auch an der Osteoblastogenese beteiligt (siehe 1.1.1). Des Weiteren spielen nicht-kanonische Signalwege auch in der Transition zwischen den verschiedenen Zonen und der Säulenarchitektur der Chondrozyten eine Rolle [85].

Glukokortikoide, die als letzter Schritt der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse (HPA-Achse) ausgeschüttet werden, haben in physiologischen Konzentrationen keine Auswirkung auf das Knochenwachstum. Bei chronischem Hyperkortisolismus bei Kindern hingegen, kann es zu einem Wachstumsdefizit kommen. In der Wachstumsfuge hemmen Glukokortikoide vor allem die Proliferation der Chondrozyten [85].

Außerdem will ich hier noch Inflammatorische Erkrankungen bzw. Zustände nennen, wie zum Beispiel Autoimmunkrankheiten. Auch diese sind mit einem geringeren Knochenwachstum assoziiert [24]. Das kann einerseits an den Nebenerscheinungen der Krankheit selbst, wie z.B. Mangelzuständen aufgrund verschlechterter intestinaler Resorption liegen, bzw. den Nebenwirkungen der Medikamente, die dagegen gegeben werden. Andererseits jedoch auch an pathologischen Veränderungen auf Zellebene. So führen, um hier nur ein Beispiel zu nennen, die erhöhten Level an Zytokinen, die während eines inflammatorischen Prozesses freigesetzt werden, zu einer verringerten Sensitivität gegenüber dem GH-IGF Signalweg [24].

1.1.3 Knochenremodelling

Um sich veränderten Bedingungen anzupassen, Mikroschäden zu reparieren und die vielfältigen Aufgaben zu erfüllen, die unser Knochen übernimmt, ist die gesamte Knochenmasse Zeit unseres Lebens einem ständigen Umbau unterworfen. Diesen Umbauvorgang bezeichnet man als Remodelling [69]. Insgesamt werden so im Jahr ca. 4% der Kompakta und 28% der Spongiosa abgebaut [10]

Bone Modelling Unit

Beim Remodelling organisieren sich Osteoklasten und Osteoblasten in einer sogenannten Bone Modelling Unit (BMU) [69].

Im vorderen Bereich der BMU findet sich eine Gruppe von ca. neun Osteoklasten, die den alten Knochen parallel zur Längsachse abbauen. In den neu geschaffenen Kanal im Knochen wächst nun eine Kapillarschlinge ein, mit der einerseits neue Osteoklasten einwandern um die alten zu ersetzen, sobald diese absterben, und andererseits auch Osteoblasten einwandern. Diese Osteoblasten lagern sich an den Wänden des Kanals an und bilden dort eine erste Knochenlamelle. Darüber lagert sich dann eine weitere Schicht Osteoblasten und bildet eine zweite Lamelle. Dieser Vorgang wiederholt sich so lange, bis der Kanal wieder bis auf die Kapillarschlinge in der Mitte mit Knochen ausgefüllt ist. Die dabei eingemauerten Osteoblasten differenzieren entweder zu Osteozyten oder gehen in die Apoptose. Das entstehende Knochensytem aus mehreren Lamellen übereinander, bei denen die Kollagenfibrillen in Schraubenform mit alternierender Drehrichtung zwischen den Lamellen um die Mitte verlaufen, bezeichnet man als Osteon. Der zentral freibleibende Kanal wird als Haverscher Kanal bezeichnet [69, 78].



Abb. 2: Schematische Darstellung einer BMU: Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung einer bone modellig unit (BMU); Die ganze Einheit bewegt sich von rechts in der Abbildung nach links fort; An der Spitze finden sich die Osteoklasten die einen Kanal "fräsen", indem sie den Knochen abbauen (Querschnitt A). Dahinter wandern Gefäße ein und darüber Osteoblasten, die sich an die Wand des Kanals lagern und anfangen Knochen zu bilden (Querschnitt B); In älteren Abschnitten des Kanals haben die Osteoblasten schon mehrere Lamellen übereinander gebildet, bis am Ende nur noch ein Haverscher Kanal mittig übrig bleibt und das Remodelling abgeschlossen ist (Querschnitte C+D). Die Graphik stammt von Parfitt et al. und wurde 1976 veröffentlicht [79]

Steuerung des Remodelling

Dieser Vorgang des Remodelling steht physiologischerweise in einem Gleichgewicht, das den gegebenen Umständen angepasst werden kann. Gesteuert wird dies durch verschiedene Hormone, Zytokine oder andere lokale Faktoren.

Ein wichtiger hormoneller Regulator des Knochenumbaus ist das Parathormon (PTH). PTH wird unter anderem bei Hypokalzämie freigesetzt, um physiologische Kalziumspiegel im Blut sicherzustellen. Im Knochen führt es über die Hochregulation der Synthese von RANKL und Interleukin (IL) 6 in Osteoblasten vor allem zu einer gesteigerten Differenzierung, Aktivierung und Überlebensrate der Osteoklasten und somit zu einem vermehrten Knochenabbau [82, 91].

Eine weitere wichtige Rolle spielt Calcitriol (1α ,25-Dihydroxyvitamin D₃), die aktive Form des Vitamin D₃. Wir nehmen Vitamin D₃ entweder über die Nahrung auf, oder können es selbst in der Haut unter Sonnenstrahlung produzieren. In Leber und Niere wird es dann in die aktive Form umgewandelt. Diese Umwandlung wird von PTH stimuliert und von Kalzium gehemmt [67]. In den Knochenstoffwechsel greift Calcitriol vor allem ein, indem es den Kalziumspiegel im Blut auf einem konstanten Level hält. Dies erfolgt über eine vermehrte Resorption von Kalzium im Darm, über den Kalziumkanal TRPV6, und in der Niere, über den Kanal TRP5 [52]. Bei Hypokalzämie fördert Calcitriol den Knochenabbau und damit eine Kalziumspiegelerhöhung im Blut, indem es über eine verstärkte Exprimierung von RANKL zu einer vermehrten Osteoklastogenese führt [52, 57].

Auch die Sexualhormone wirken auf den Knochen, wobei man davon ausgeht, dass vor allem Östrogen die Hauptrolle übernimmt. Es wirkt einerseits indirekt hemmend auf die Osteoklasten, indem es die RANKL-Exprimierung aus den Osteoblasten supprimiert und gleichzeitig die Osteoprotegerinfreisetzung verstärkt [53, 82]. Außerdem wirkt es auch direkt auf Osteoklasten und Osteoblasten. Es fördert die Osteoklasten die Apoptose der und hemmt Osteoklastogenese und Osteoklastendifferenzierung über Eingriff in die intrazelluläre Signaltransduktion des RANK-Systemwegs [53]. Parallel dazu verlängert es die Lebensspanne der Osteoblasten. Insgesamt steigert Östrogen so den Knochenaufbau und hemmt den Knochenabbau, was zu einer positiven Knochenbilanz führt [53].

Wie schon oben beschrieben spielt der Wnt/ β Catenin-Signalweg eine wichtige Rolle in der Osteoblastogenese und damit auch der Kontrolle des Knochenremodellings [19, 111] (siehe 1.1.1). Des Weiteren weist Wnt auch eine synergistische Wirkung mit Östrogen auf [32]. Ein weiterer Faktor, der auch das Remodelling steuert, ist Notch. Einerseits unterbindet er die Differenzierung von Stammzellen zu Osteoblasten, unter anderem in dem er negativ in den Runx2 und den Wnt/ β Catenin-Signalweg eingreift [117]. Außerdem wirkt es sich auf die Osteoklastogenese aus. Hierbei wurden jedoch sowohl positive als auch negative Effekte beschrieben [30, 117]. Wenn man diese Effekte zusammen betrachtet, zeigt sich ein kataboler Effekt im Knochen.

Ebenfalls zu einer negativen Knochenbilanz führt der Signalweg über Glukokortikoide. Glukokortikoide führen über eine Hochregulation von PPARγ2,

einem Aktivator der Adipozytogenese, zu einer Hochregulation des Notch-Signalwegs und einer Inhibition des Wnt-Signalwegs und damit zu einer geringeren Osteoblastogenese. Zusätzlich führt die Inhibition des Wnt-Signalweges in schon bestehenden Osteozyten und Osteoblasten zu einer verfrühten Apoptose. Ein weiterer Grund für die Apoptose ist die Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in den Zellen [3, 18, 74, 81]. Zusätzlich zu der Wirkung auf die Osteoblasten, erhöhen Glukokortikoide auch die Ausschüttung von M-CSF und RANKL und hemmen Osteoprotegerin, was zu einer erhöhten Anzahl und einer verlängerten Lebenszeit der Osteoklasten führt [18, 50].

Auch chronische Inflammationsreaktionen können einen Einfluss auf das Knochenremodelling haben. So zeigte sich z.B. eine erhöhte Knochenbruchrate und eine herabgesetzte Knochendichte bei Komorbidität mit Rheumatoider Arthritis, Diabetes Mellitus oder systemischem Lupus Erythematodes [82, 86, 108]. Dabei kommt es vor allem zu einer erhöhten Osteoklastogenese. Induziert wird diese einerseits, durch eine vermehrte Ausschüttung von RANKL durch T-Lymphozyten und andererseits durch proinflammatorische Zytokine wie etwa IL1, IL6 und TNF α . [82, 97]. Almeida et al. postulierten 2011 des Weiteren auch eine vermehrte Apoptose der Osteoblasten durch die Zunahme von ROS [3].

Weiterhin weiß man noch, dass adäquate Belastung einen positiven Effekt auf den Knochen hat. Dies wurde bereits 1892 von Wolff postuliert [113]. Leptin hingegen wirkt sich negativ aus [22].

1.2 Stress

Was ist Stress? Als Stress wird eine bewusst oder unterbewusst wahrgenommene Gefahr für die Homöostase definiert, wobei die Antwort zu einem gewissen Grad spezifisch ist für die Art der Gefahr, der Wahrnehmung des Stressors durch den Körper und der empfundenen Fähigkeit des Organismus damit umzugehen [36, 37, 70].

Der Begriff der Homöostase wurde erstmals von Cannon im Jahr 1929 geprägt [15]. Er beschrieb damit die Regulierung von verschiedenen physiologischen Parametern, wie z.B. Blutzucker, Körperkerntemperatur und Sauerstoffsättigung, in

engen physiologischen Grenzen, was für den Organismus überlebenswichtig ist. Um dieses stabile Gleichgewicht zu erhalten, muss der Körper in der Lage sein, Unterschiede zwischen den Soll- und den Istwerten zu registrieren. Dafür gibt es in unserem Körper viele verschiedene Regelkreise, die sich z.B. über negative Rückkopplung ständig selbst regulieren [36]. Da man inzwischen festgestellt hat, dass sich die Sollwerte der einzelnen Regelkreise ständig ändern und den Gegebenheiten anpassen und nicht starr sind, hat sich der Begriff der Allostase herausgeprägt. Dieser beschreibt die Anpassung der festgelegten Grenzen, in denen sich die verschiedenen Größen bewegen, auf die jeweilige Situation [36, 70]. Falls es nun zu einer Gefährdung dieser Homöostase bzw. Allostase kommt, so reagiert der Körper, um das Gleichgewicht zu erhalten. Änderungen sind dabei in vielen verschiedenen Systemen zu beobachten, z.B. in der Aktivität des sympathischen Nervensystems, der Epiphysen-Hypophysen-Nebennierenachse sowie auch in der Schilddrüse, dem metabolischen System und dem Immunsystem. Die jeweils tatsächlich stattfindende Reaktion ist dabei spezifisch für den Stressor und die Kapazitäten des Organismus damit umzugehen [36, 70]. Jede größere Anpassungsreaktionen hat aber auf Dauer negative Auswirkungen auf unseren Körper. Diese Auswirkungen der allostatischen Reaktionen bezeichnet man als allostatische Last [70]

1.3 Psychosozialer Stress

Einer der häufigsten vorkommenden Stressoren beim Säugetier ist der psychosoziale Stress. Psychosozialer Stress gilt heutzutage als anerkannter Risikofaktor für viele unterschiedliche Krankheitsbilder. Unter anderem wird von einer Vergesellschaftung mit einer Schwächung des Immunsystems, einer verzögerten Wundheilung, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Depressionen und Posttraumatischen Belastungsstörungen (PTSD) berichtet. [1, 5, 29, 39, 54, 55, 115]. Depressionen und PTSD scheinen wiederum vergesellschaftet zu sein mit einer erniedrigten Knochendichte und einem erhöhten Frakturrisiko [14, 16, 17, 34, 35, 75, 102, 116, 119]. Während die Daten für Depression eindeutig sind, ist die Datenlage zur Korrelation zwischen PTSD und Osteoporose weniger klar. So ergab eine Studie von Tsai und Shen im Jahr 2017 [105] keine Assoziation zwischen

PTSD und Osteoporose und auch Dorn et al. fanden 2008 nur eine fragliche Assoziation [21]. Allerdings ergab eine andere Studie, dass Menschen, die während ihrer Kindheit wiederholt traumatisiert wurden und unter PTSD leiden, statistisch kleiner sind als solche ohne Traumata in der Kindheit [9]. Dies lässt auf eine Verringerung des enchondralen Längenwachstums durch psychosozialen Stress schließen. Um die genauen Assoziationen zwischen den Krankheiten festzustellen, bedarf es allerdings präklinischer Forschung. Präklinische Modelle für milden Stress, bei denen Mäuse leichten Formen von psychischem und physischem Stress ausgesetzt wurden, zeigten einen Depressions ähnlichen Phänotyp sowie eine Assoziation mit erniedrigter Knochendichte und Osteoporose. Gleichzeitig kam es bei diesen Modellen zu einem basalen Hyperkortisolismus und einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems (SNS) [6, 8, 31]. Als Modelle zur Darstellung der PTSD im Menschen sind diese Modelle jedoch nur fraglich geeignet, kommt es doch bei der PTSD eher zu einem Hypokortisolismus [115]. Als Alternative bietet sich das Chronic Subordinate Colony Housing (CSC) Modell an. Hierbei werden vier männliche Mäuse eines kleineren Phänotyps als Versuchstiere in einem Gehege mit einem dominanten Männchen eines größeren Phänotyps gehalten. Die kleineren Männchen müssen sich bei diesem Aufbau dem größeren Männchen chronisch unterordnen, dadurch kommte es zum psychosozialen Stress für die Versuchstiere (siehe auch 2.5). Dieses Modell führt zu einer Aktivierung des SNS, jedoch nicht zu einer chronischen Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) [64, 83, 84]. Die Nebennieren, sowie die Hypoyphysen der Tiere wiesen zwar ein erhöhtes Gewicht auf, jedoch zeigte sich in vitro eine erniedrigte Sensibilität der Zellen gegenüber Adrenocorticotropem Hormon (ACTH). Auch in vivo scheint dies der Fall zu sein. So zeigten Mäuse nach 19 Tagen CSC keine relevant veränderten basalen morgendlichen Corticosteronanstieg. Dafür war jedoch ACTH erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe [84, 95]. Diese reduzierte ACTH-Sensibilität führt wahrscheinlich auch zu dem beobachteten abendlichen Hypocortisolismus [83, 84]. Trotz all dem zeigen die CSC-Mäuse jedoch eine erhöhte Corticosteronausschüttung als Antwort auf einen akuten Stressor, was nahelegt, dass weitere Faktoren, wie zum Beispiel das SNS die reduzierte Sensibilität der Nebennierenmarkzellen gegenüber ACTH

ausgleichen können [84]. So zeigten sich in den CSC-Mäusen erhöhte Noradrenalin-Spiegel im Blut [83].

In Hinsicht auf das Körpergewicht zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse. Teilweise führte das CSC-Paradigma zu einer Erniedrigung des Körpergewichts, teilweise zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Nach Beendigung des Versuchs jedoch kam es bei den gestressten Tieren zu einer signifikant erhöhten Gewichtszunahme im Vergleich zu den Kontrolltieren [84].

Des Weiteren wiesen CSC-Tiere ein erniedrigtes Thymusgewicht, sowie eine Splenomegalie auf [84]. Es zeigte sich außerdem eine vermehrte Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten in peripheren Lymphknoten. Gleichzeitig kommt es zu einer Zunahme der Bildung von Immunmodulatorzellen wie regulatorischen T-Zellen sowie myeloid-derived suppressor cells (MDSC) [89]. Insgesamt begünstigt das CSC-Schema jedoch die Entwicklung eines systemischen proinflammatorischen Zustands. So konnte nachgewiesen werden, dass CSC zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen führt [64, 84]. Im Rahmen dessen zeigte sich bei den CSC-Mäusen auch eine erhöhte Tendenz an Karzinomen des Kolons zu erkranken [84, 89].

Zu guter Letzt zeigen die CSC-Mäuse keine Anzeichen von depressivem Verhalten, sondern ausschließlich solches, das mit Angststörungen assoziiert ist [95].

Zusammenfassend kann man also sagen, dass sich das CSC sehr gut als präklinisches Modell für PTSD eignet.

1.4 Ziel der Arbeit

Bisher ist unbekannt, wie sich psychosozialer Stress bzw. PTSD auf den Knochenmetabolismus auswirkt. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, den Knochenmetabolismus in Mäusen zu untersuchen, die chronischem psychosozialen Stress unterliegen. Hierbei kommt das oben beschriebene CSC-Modell zum Einsatz.

Folgende Fragen sollen im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden:

1. Welchen Einfluss hat chronischer psychosozialer Stress auf das Längenwachstum der langen Röhrenknochen?

2. Welchen Einfluss hat chronischer psychosozialer Stress auf den trabekulären und kortikalen Knochen im Femur und in der Wirbelsäule?

3. Welchen Einfluss hat chronischer psychosozialer Stress auf Osteoblasten, Osteoklasten und osteogene Differenzierungsmarker?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Puffer und Antikörper

Tabelle 1: Liste der Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Ort
Alizarin rot	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Avidin-Biotin komplex	Vector Laboratories	Burlingame, USA
BSA	SERVA GmbH	Heidelberg
Calcein grün	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
DPBS	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
EDTA	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Ethanol	VWR International, LLC	Radnor, USA
Formalin	Merck KGaA	Darmstadt
H2O2	Otto Fischar GmbH	Saarbrücken
Hämatoxylin	Merck KGaA	Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Methylmethacrylat	Merck KGaA	Darmstadt
NaCl	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Nova Red	Vector Laboratories	Burlingame, USA
Paraffin	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Salzsäure	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Toluidinblau	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
TRAP-Farbstoff	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Tri-Natriumcitrat	Merck KGaA	Darmstadt
TRIS-Base Cleveland, USA	USB Corporation	Cleveland, USA

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Ort
Triton X-100	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Vitro-Clud	R. Langenbrinck GmbH	Emmendingen
Xylol	Fisher Scientific GmbH	Schwerte
Zitronensäuremonohydrat	Merck KGaA	Darmstadt

Tabelle 2: Liste der Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
10 x TBS	24,2 g TRIS-Base, 87,7 g NaCl, pH 7,5, auf
	1000 ml Aqua dest.
Antikörper-Verdünnungspuffer	1% BSA in DPBS-Puffer, 0,1% Triton X-100
Citratpuffer	5,4 ml 0,1 M Zitronensäuremonohydrat, 24,6 ml
	0,1 M Tri-Natriumcitrat in 300 ml H20; pH 6,0
Peroxidase-Blocklösung	10 ml 30% H2O2, 90 ml 100% Methanol
TTBS-Waschpuffer	100 ml 10 x TBS ad 1000 ml Aqua dest., 1 ml
	Tween20

Tabelle 3: Liste der Antikörper

Antikörper	Bestellnummer	Hersteller, Ort
Goat anti rabbit	sc-3840	Santa Cruz Biotechnology, Dallas
IgG, biotinyliert		USA
ChromPure Rabbit	011-000-003	Jackson ImmunoResearch, Ely
lgG		UK
Pferdeserum	Von lokalen Tierärzten	Ulm

Antikörper	Bestellnummer	Hersteller, Ort
Rabbit anti mouse	orb77248	Biorbyt Ltd. Cambridge UK
osteocalcin IgG		

2.2 Geräte und Software

Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte und Software

Bezeichnung	Modell/Version	Hersteller/Vertrieb, Ort
μСТ	SkyScan 1172	Bruker MicroCT, Kontich
		Belgien
µCT Analysesoftware	CTAn	Bruker MicroCT, Kontich
		Belgien
μCT	DataViewer	Bruker MicroCT, Kontich
Datenanzeigeprogramm		Belgien
μCT	NRecon	Bruker MicroCT, Kontich
Rekonstruktionsprogramm		Belgien
Dako Pen	Dako Pen S2002	Agilent, Santa Clara USA
Fluoreszenzfilter Axiophot	44 64 21	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Gefrierkühlschrank	CNP 3513	Liebherr, Bulle Schweiz
Gefrierschrank	HFU 686 Top	Thermo Scientific, Waltham
		USA
Kamera Mikroskop Leica	DFC420 C	Leica Mikrosysteme Vertrieb
		GmbH, Wetzlar
Magnetrührer	MR Hei-Mix S	Heidolph, Schwabach
Mikroskop, automatisiertes,	DMI6000B	Leica Mikrosysteme Vertrieb
inverses Fluoreszenz-		GmbH, Wetzlar
Mikroskop, Foto-	Axiophot	Carl Zeiss AG, Oberkochen

Bezeichnung	Modell/Version	Hersteller/Vertrieb, Ort
Objektträger	SuperFrost-Plus	VWR International, Radnor
		USA
Auswertungsprogramm für	Osteomeasure	OsteoMetrics, Inc., Decatur
Histologie		USA
Pipetten	20 µl-200 µl,	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten	100 µl-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten	1 µl-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Statistikprogramm	SPSS Statistics 24	IBM, Armonk USA
Waage	EW600-2M	Kern & Sohn GmbH,
		Balingen
Wärmeschrank	UT12	Heraeus, Hanau
Wasserbad	1012	GFL, Burgwedel

2.3 Experimentelles Vorgehen

Ziel der Studie war es, die Auswirkungen von psychosozialem Stress auf den Knochenmetabolismus in einem Mausmodell zu untersuchen. Dafür wurden zwei randomisierte Gruppen aus je acht männlichen Mäusen gebildet. Eine dieser Gruppen wurde, um chronischen psychosozialen Stress zu induzieren, für 19 Tage dem Chronic Subordinate Colony Housing (CSC) Paradigma unterzogen (s. 2.3). Die andere Gruppe diente als Kontrolle. Diese Mäuse wurden jeweils einzeln in einem Käfig gehalten (SHC = Single-Housed Control). Am 15. Tag wurde den Mäusen das Fluorochrom Calcein Grün und am 18. Tag das Fluorochrom Alizarin Rot injiziert. Diese Fluorochrome werden in den Knochen eingelagert. Dadurch unter konnte später dem Fluoreszenzmikroskop die Dynamik der Knochenmineralisation bestimmt werden (s. 2.6). Am Tag 20 wurden die Mäuse zwischen 7:00 und 10:00 Uhr euthanasiert. Dabei wurden sie nach einer kurzen CO₂ Anästhesie dekapitiert. Zur Untersuchung des Knochenmetabolismus wurden sowohl die Femora, die Tibiae, als auch die lumbalen Wirbelkörper entnommen. Femora und Tibiae wurden mit einem digitalen Präzisionsmessschieber auf ihre Länge untersucht und dann zur weiteren Untersuchung entweder in Formalin fixiert (Femora) oder eingefroren (Tibiae). Die Wirbelkörper wurden direkt in Formalin eingelegt. Anschließend wurden μ CT-Untersuchungen der Wirbelkörper und der rechten Femora durchgeführt (s. 2.4). Danach wurden sowohl die Wirbelkörper, als auch die rechten Femora in Methacrylat eingebettet, geschnitten und entweder Toluidinblau oder TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) gefärbt. So konnten die Osteoblasten und Osteoklasten histologisch untersucht werden (s. 2.5). Außerdem wurden ungefärbte Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht, um die dynamische Knochenformation zu bestimmen (s. 2.6). Die linken Femora wurden in EDTA dekalzifiziert und in Paraffin eingebettet. 8 μ m Schnitte wurden angerfertigt und immunhistochemisch angefärbt um die Expression von Osteocalcin zu bestimmen. (s. 2.7).

2.4 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Mäuse zweier verschiedener Genotypen benutzt, die beide bei den Charles River Laboratories in Sulzfeld Deutschland bezogen wurden. Als dominante Mäuse für die CSC-Käfige wurden CD-1 Mäuse mit einem Gewicht zwischen 30 g und 35 g benutzt. Als experimentelle Tiere dienten sieben Wochen alte C57BL/6N Mäuse mit einem Gewicht von 19 g bis 22 g.

Alle Mäuse wurden unter Standardlaborbedingungen gehalten, waren einem 12 Stunden hell / 12 Stunden dunkel Rhythmus ausgesetzt, wobei das Licht jeweils um sechs Uhr morgens anging. Die Raumtemperatur betrug 22° Celsius und die Luftfeuchtigkeit lag bei 60%. Des Weiteren hatten sie jederzeit Zugang zu frischem Wasser und Standard-Mäusefutter.

Alle Experimente wurden unter Berücksichtigung der internationalen Regulationen für die Haltung und Nutzung von Labortieren, den ARRIVE Guidelines und der EU-Direktive 2010/63/EU für Tierversuche, unternommen. Der Tierversuch wurde durch das lokale Ethikkomitee (Nr. 1219) des Regierungspräsidiums Tübingen bewilligt.

2.5 Chronic subordinate colony housing

Das Chronic Subordinate Colony Housing (CSC) Paradigma ist eine präklinisch validierte Methode, um bei männlichen Mäusen psychosozialen Stress auszulösen [63, 84]. Dazu wurden 16 C57BL/6N Mäuse für eine Woche einzeln in durchsichtigen Polycarbonatkäfigen (16 × 22 × 14 cm) gehalten, um eine Gewöhnung an die neue Umgebung zu gewährleisten. Nach Ablauf dieser Woche wurden sie randomisiert und entweder der experimentellen Gruppe (CSC; n=8) oder der Kontrollgruppe (SHC; n=8) zugeteilt (Abb. 1). Die CSC-Tiere wurden daraufhin jeweils zu viert in den Käfig (38 × 22 × 35 cm) einer größeren Maus des CD-1 Typs (als Residents bezeichnet) überführt.



Abb. 3: Der Aufbau des CSC-Modells: A) Schematische Darstellung eines Käfigs der CSC-Gruppe mit 4 C57BL/6N Versuchstieren und einem größeren CD-1 Resident; B) Schematische Darstellung eines Käfigs der SHC-Gruppe mit einem einzelnen C57BL/6N Kontrolltier; Die schematischen Mäuseabbildungen wurden unter Creative Commons CC0 (Lizenz: https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) veröffentlicht und am 14.10.2018 der Website svgsillh.com entnommen [43, 44]

Daraufhin entwickelt die CD-1 Maus ein dominantes Verhalten gegenüber den kleineren Versuchstieren. Dies äußert sich darin, dass die kleineren Mäuse attackiert und gejagt werden. Die kleineren Mäuse reagieren in dem sie flüchten und zurückweichen, bzw. sich unterwerfen. Damit sich bei den CSC-Tieren keine Habituation einstellen konnte, wurden sie jeweils an Tag 0, 8 und 15 in den Käfig eines neuen Residents übersiedelt. Nach jeder Neugründung einer Kolonie wurden

die Käfige für die erste halbe Stunde überwacht, um sicherzustellen, dass sich erneut ein dominantes Verhältnis des größeren Männchens einstellte.

Zur Haltung der Kontrollgruppe wurde das SHC-Schema gewählt und kein Group Housing Control (GHC) Schema, bei dem auch die Kontrollgruppe in Gemeinschaftskäfigen zu je vier Tieren untergebracht worden wäre. Das SHC ist dem GHC insofern überlegen, als es beim GHC ebenfalls zu Unterordnungsphänomenen kommt und somit die Mäuse auch hier psychosozialem Stress ausgesetzt sind [4, 92], was zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt hätte.



Abb. 4: Der zeitliche Verlauf des CSC-Schemas: An den ersten 7 Tage werden alle männlichen C57BL/6N Mäuse einzeln gehalten. Am Tag 0 wurden die CSC-Tiere jeweils zu viert in das Gehege eines CD-1 Residents gesetzt. An Tag 8, sowie an Tag 15 wurden sie in die Käfige neuer Residents gesetzt. Am Morgen des 20 Tages wurden die CSC- sowie die SHC-Tiere schließlich euthanasiert und ihre Knochen zu weiteren Untersuchungen entnommen.

Am Morgen des 20. Tages wurden sowohl Versuchs- als auch Kontrolltiere schließlich euthanasiert und Ihre Knochen zur weiteren Untersuchung entnommen und je nachdem, welche Untersuchung geplant war, entweder in Formalin fixiert oder eingefroren.

2.6 µCT Untersuchungen

Vor Beginn der Untersuchungen wurden die rechten Femora und die unteren Wirbelkörper aus der Formaldehydlösung, in der sie nach der Entnahme fixiert worden waren, genommen und je sechs Femora bzw. vier Wirbelkörper gleichzeitig in einen Scan Revolver gegeben. In die Mitte eines jeden Revolvers wurden zur späteren Knochendichte-Kalibrierung zwei Phantome mit definierten

Material und Methoden

Hydroxyapatitwerten (Hydroxyapatit = HA) gegeben. Die Dichten der beiden Phantome betrugen 250 und 750 mg HA/cm³.

Die µCT Untersuchungen wurden mit einem SkyScan 1172 (Kontich, Belgien) bei einer Spannung von 50 kV und einer Stromstärke von 200 mA durchgeführt. Als Voxel-Auflösung wurden isotrophe 8 µm gewählt. Zur 3D-Rekonstruktion und für die Analysen der Daten wurden die Programme NRecon, CTAn und DataViewer genutzt. Zuerst wurde in NRecon aus den Bilder-Stacks ein dreidimensionales Modell errechnet. In diesem konnte dann mittels CTAn ein volume of interest (VOI) eingezeichnet werden und die zu bestimmenden Parameter gewählt werden. Die Analysen fanden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) statt [12].

Für die Wirbelkörper wurde als VOI der trabekuläre Teil des 2. Lendenwirbelkörpers festgelegt. Für die Femora gab es zwei VOIs. VOI 1 umfasste den kortikalen Knochen zwischen 80 µm proximal bis 80 µm distal der Mitte der Diaphyse und VOI 2 umfasste den trabekulären Knochen 200 µm bis 280 µm proximal der Metaphyse.

Um das mineralisierte Gewebe von dem unmineralisierten Gewebe zu unterscheiden, wurden zwei Schwellenwerte für die Knochendichte gesetzt. Für den kortikalen Knochen waren das 642 mg HA/cm³ und für den trabekulären Knochen 390 mg HA/cm³.

2.7 Histologie

Nach den µCT-Untersuchungen wurden die rechten Femora und die Wirbelkörper histologisch aufgearbeitet. Dafür wurden sie zuerst in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe dehydriert. Danach wurden die Knochen in Methylmethacrylat eingebettet und in 7 µm dünne Schnitte geschnitten. Diese Schnitte wurden nun mit Toluidinblau gefärbt und anschließend mit dem Programm Osteomeasure (OsteoMetrics, Decatur, USA) bei einer 400-fachen Vergrößerung auf Osteoblasten untersucht. Als Region of Interest (ROI) wurde hier der trabekuläre Knochen der Metaphyse der Femora bzw. der trabekuläre Knochen des 2. Lendenwirbelkörpers gewählt. Die Osteoblasten wurden aufgrund ihrer Morphologie und ihrer Lage zum Knochen bestimmt. Es handelt sich hierbei um kubische Zellen, die dem Knochen

pallisadenartig anliegen. Als Parameter wurden die Anzahl der Osteoblasten (NOb) und die Fläche, mit der sie dem Knochen anlagen (ObPm) im Vergleich zum Knochenumfang (BPm) untersucht (siehe Abb. 2A). Bei weiteren Schnitten wurde die Tartratresistente saure Phosphatase (engl. tartrate-resistant acid phosphatase/TRAP) angefärbt. Diese Färbung zeigt Osteoklasten in rot an. Die Auswertung erfolgte in Analogie zur Beurteilung der Osteoblasten (siehe Abb. 2B). Als Osteoklast wurde jede Zelle gewertet, die rot angefärbt war, mehr als zwei Zellkerne aufwies und dem Knochen anlag. Die Parameter, die ausgewertet wurden, waren die Anzahl an Osteoklasten (NOc) und die Strecke, mit der sie dem Knochen anlagen (OcPm) im Vergleich zum BPm.



Abb. 5: Die Auswahl der Osteoblasten und Osteoklasten, sowie die Bestimmung des Knochenumfangs im Osteomeasure-Programm: A) Mit Toluidinblau gefärbter Schnitt. Die Osteoblasten wurden morphologisch bestimmt und mit roten Punkten markiert. Ihre Fläche am Knochen wurde eingezeichnet (rot); B) Gegen TRAP gefärbter Schnitt. Die Osteoklasten wurden anhand der Färbung und Lage bestimmt und einzeln mit weißen Punkten markiert. Ihre Fläche am Knochen wurde ebenfalls eingezeichnet (rot). A)+B) Bei beiden Färbungen wurde der Umfang der Trabekel weiß eingezeichnet.

2.8 Dynamische Histomorphometrie

Zur Untersuchung des dynamischen Knochenaufbaus wurden in Methylacrylat eingebettete, ungefärbte Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Durch Abstandsmessung der Banden, die die zu unterschiedlichen Zeitpunkten injizierten Fluorochrome Calcein Grün und Alizarin Rot im Knochen gebildet hatten (s. 2.1), wurden die Knochenmineralisationsrate (MAR) und die Knochenformationsrate im Vergleich zur Knochenoberfläche (BFR/BPm) berechnet [26].

2.9 Immunhistochemische Untersuchungen

Die linken Femora wurden direkt nach der Entnahme in 4% Formaldehyd konserviert und dann wie bereits beschrieben [38] für die Immunhistochemie vorbereitet. Dabei wurden sie zuerst für 14 Tage mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA, pH 7,2-7,4) dekalzifiert. Danach wurden sie in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet. Es wurden 7 µm dicke Schnitte angefertigt, wovon jeweils zwei auf einen Objektträger transferiert wurden. Für die immunhistochemischen Untersuchungen sollten diese Schnitte nun gegen Osteocalcin, einem Marker für aktive Osteoblasten, angefärbt werden. Dazu wurde zunächst das Paraffin entfernt. Dafür wurden die Schnitte für eine Stunde bei 37° C im Wärmeschrank gelagert und danach für weitere 15 Minuten die Temperatur auf 60° C erhöht. Als nächstes durchliefen sie eine absteigende Alkoholreihe, bei der die Alkoholkonzentration immer weiter abnahm. Hierbei wurden sie jeweils für 5 Minuten in den Alkohollösungen belassen. Danach wurden sie für 5 Minuten zur Reinigung in destilliertes Wasser gegeben, bevor sie danach für 15 Minuten in eine 3 % H₂O₂ Lösung in Methanol gegeben wurden. Anschließend wurden sie wieder für 2 x 5 Minuten in destilliertem Wasser gereinigt. Als nächstes kamen sie für 20 Minuten bei 95° C in einem Citratpuffer (10mM, pH 6,0) ins Wasserbad und verblieben danach weitere 20 Minuten in diesem Puffer, bevor sie erneut 2 x 5 Minuten in destilliertem Wasser gereinigt wurden.

Um die Zellmembranen zu öffnen wurden die Schnitte nun für 15 Minuten in eine 0,1 % Lösung Triton-X in TTBS (Tris-Buffered Saline mit Tween 20) gegeben. Danach wurden sie leicht abgetrocknet und in der Mitte eines jeden Objektträgers ein Strich mit dem DakoPen (Agilent, Santa Clara, Kalifornien) gezogen, um die beiden Schnitte voneinander zu trennen und so zu verhindern, dass Flüssigkeiten von der einen Seite sich mit solchen der anderen Seite vermischen konnten. Nun wurden beide Seiten für 60 Minuten mit 5 % Pferdeserum in TTBS bei Raumtemperatur geblockt.

Material und Methoden

Diese Lösung wurde nun wieder abgeschüttet und einer der beiden Schnitte auf jedem Objektträger wurde nun über Nacht bei 4° C mit einem Rabbit-anti Mouse Osteocalcin Antikörper (orb77248, Biorbyt) im Verhältnis 1:100 in TTBS inkubiert, während der andere Schnitt zur Kontrolle nur mit Kaninchen IgG in der gleichen Verdünnung bedeckt wurde. Am nächsten Morgen wurden die Objektträger nun wieder für 3 x 5 Minuten in TTBS gewaschen und dann für eine Stunde mit einem biotinyliertem Goat anti Rabbit Antikörper (sc-3840, Santa Cruz) in der Verdünnung 1:200 in TTBS als Zweitantikörper inkubiert. Darauf folgte wieder ein Waschschritt für 3 x 5 Minuten in TTBS. Nun wurden die Schnitte mit einem Avidin-Biotin Komplex der Firma Vector Laboratories für 30 Minuten inkubiert und danach erneut für 3 x 5 Minuten in TTBS gewaschen. Danach wurde NovaRed für 4 Minuten aufgetragen, bevor die Überschüsse dann wieder für 2 x 5 Minuten in destilliertem Wasser ausgewaschen wurden. Gegengefärbt wurde nun für 3 Minuten mit Hämatoxylin, dass dann in einer Küvette unter fließend Leitungswasser ausgewaschen wurde, wobei es gleichzeitig zu einer Farbänderung des Hämatoxylins von rot zu blau kam.

Um die Schnitte nun wieder zu dehydratisieren wurden sie wieder einer aufsteigenden Alkoholreihe bis Xylol unterzogen und dann mit Vitro-Clud ein gedeckelt.

Mittels der Färbung gegen Osteocalcin konnten nun die aktiven Osteoblasten in Analogie zur Histologie (siehe 2.5) bestimmt werden.

2.10 Statistik

Die statistische Aufarbeitung meiner Arbeit erfolgte mittels SPSS Statistics 24 (IBM, Armonk USA). Zur Testung auf Normalverteilung führte ich zuerst einen Shapiro-Wilk-Test durch. Danach testete ich mittels Mann-Whitney-U-Tests auf Signifikanz. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wählte ich Box-Plots. Hierbei wurde der Median in rot eingezeichnet, während die Box den Interquartillsabstand kennzeichnet. Die T-Balken erstrecken sich jeweils maximal auf das 1,5 fache des Interquartillsabstandes, oder falls keine Daten mehr außerhalb dieses Abstandes lagen, bis zum maximalen/minimalen Datenwert. Wenn es noch Daten außerhalb der T-Balken gab, so wurden diese mittels eines Kreises mit dem jeweiligen Wert daneben gekennzeichnet.
3 Ergebnisse

3.1 Längenmessung

Um eine Aussage über das Längenwachstum der langen Röhrenknochen der Mäuse treffen zu können, wurden die Tibiae und die Femora der Tiere direkt nach der Entnahme vermessen. Dabei zeigten sich sowohl in den Femora als auch in den Tibiae signifikante Unterschiede zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe. Die Femora der CSC Mäuse waren mit einem Median von 15,6 mm signifikant kürzer als die der SHC Mäuse mit einem Median von 15,9 mm. Der p-Wert betrug dabei 0,021 (siehe Abb. 3A). Auch die Tibiae waren bei den CSC Mäusen verkürzt. Hier lag der Median bei 17,9 mm gegenüber einem Median von 18,9 mm bei den SHC Tieren. Hier betrug der p-Wert 0,004 (siehe Abb. 3B).



Abb. 6: Die Ergebnisse der Längenmessungen. Die Daten sind als Boxplot dargestellt, der Median ist in rot eingezeichnet. Ausreißer sind als Kreis mit dem jeweiligen Wert dargestellt; * $0.05 \ge p \ge 0.01$, ** $0.01 > p \ge 0.001$; A) Die Länge der Femora in mm, n = 8 pro Gruppe, p = 0.021; B) Die Länge der Tibiae in mm, n = 8 pro Gruppe, p = 0.021; B) Die Länge der Tibiae in mm, n = 8 pro Gruppe, p = 0.021; B) Die Länge der Tibiae in mm, n = 8 pro Gruppe, p = 0.021; B) Die Länge der Tibiae in mm, n = 8 pro Gruppe, p = 0.021; B) Die Länge der Tibiae in mm, n = 8 pro Gruppe, p = 0.021; B) Die Länge der Tibiae in mm, n = 8 pro Gruppe, p = 0.021; B) Die Länge der Tibiae in mm, n = 8 pro Gruppe, p = 0.021; B) Die Länge der Tibiae in mm, n = 8 pro Gruppe, p = 0.021; B) Die Länge der Tibiae in mm, n = 8 pro Gruppe, p = 0.021; B) Die Länge der Tibiae in mm, n = 8 pro Gruppe, p = 0.021; B) Die Länge der Tibiae in mm, n = 8 pro Gruppe, p = 0.021; B) Die Länge der Tibiae in mm, n = 8 pro Gruppe, p = 0.021; B) Die Länge der Tibiae in mm, n = 8 pro Gruppe, p = 0.021; B) Die Länge der Tibiae in mm, n = 8 pro Gruppe, p = 0.021; B) Die Länge der Tibiae in mm, n = 8 pro Gruppe, p = 0.004

3.2 µCT-Untersuchungen

Im Rahmen der µCT-Analyse wurden verschiedene Parameter untersucht um den Knochenphänotyp der CSC Mäuse zu bestimmen. In den Femora wurden folgende Parameter erhoben:

- 1. die Dicke der diaphysären Kortikalis (CTh)
- 2. die Knochenmineraldichte der diaphysären Kortikalis (cort. BMD)
- 3. die durchschnittliche Dicke der Trabekel in der Metaphyse (TbTh)
- 4. die durchschnittliche Anzahl der Trabekel (TbN)
- 5. die Knochenmineraldichte der Trabekel (trab. BMD)
- 6. den Abstand zwischen den einzelnen Trabekeln (TbSp)
- das Verhältnis von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen in der Metaphyse (BV/TV)

Im kortikalen Knochen der Femora zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Sowohl die kortikale Dicke als auch die kortikale Knochenmineraldichte war in CSC Tieren im Vergleich zu SHC Tieren nicht verändert.

Im trabekulären Knochen der Femora zeigten sich sowohl bei der trabekulären BMD, als auch bei der TbTh statistisch relevante Veränderungen zwischen den beiden Gruppen. Die Trabekeldicke der CSC Mäuse war mit einem Median von 0,051 mm, im Vergleich zu der der SHC Mäuse, mit einem Median von 0,045 mm, signifikant erhöht (siehe Abb. 4C). Der p-Wert betrug 0,001. Gleichzeitig war auch die Knochendichte der CSC Mäuse, mit einem Median von 790,2 mgHA/cm³, gegenüber der BMD der SHC Mäuse, mit einem Median von 752,3 mgHA/cm³, signifikant erhöht (siehe Abb. 4D). Hier betrug der p-Wert 0,007. Die Mäuse der CSC Gruppe hatten somit dickere Trabekel, die gleichzeitig eine höhere Dichte aufwiesen. Für die Anzahl der Trabekel, den Abstand der Trabekel und des Knochenvolumenanteils zeigten sich keine Unterschiede (siehe Abb. 4A+B und 4E-G).



Abb. 7: Die Ergebnisse der μ CT-Untersuchung der Femora. Die Daten sind als Boxplot dargestellt, der Median ist in rot eingezeichnet. Ausreißer sind als Kreis mit dem jeweiligem Wert dargestellt; ** 0,01 > p ≥ 0,001; A) die Dicke der Kortikalis in der Diaphyse in mm, n = 8 pro Gruppe; B) die kortikale Knochenmineraldichte in der Diaphyse in mgHA/cm³, n = 8 pro Gruppe; C) die durchschnittliche Dicke der Trabekel in der distalen Metaphyse in mgHA/cm³, n = 8 pro Gruppe, p = 0,001; D) die Knochenmineraldichte der Trabekel in der distalen Metaphyse in mgHA/cm³, n = 8 pro Gruppe, p = 0,007; E) die Anzahl der Trabekel in der distalen Metaphyse, n = 8 pro Gruppe; F) der durchschnittliche Abstand zwischen den Trabekeln in der distalen Metaphyse in mm, n = 8 pro Gruppe; G) das Verhältnis des Knochenvolumens zum Gesamtgewebevolumen in %, n = 8 pro Gruppe.

Im trabekulären Bereich der Wirbelkörper wurden die gleichen Parameter erhoben wie im trabekulären Bereich der Femora. Dabei zeigten die CSC Tiere sowohl signifikant dickere Trabekel als auch signifikant mehr Knochenvolumen im Vergleich zum Gesamtgewebevolumen. Für die Trabekeldicke betrug der p-Wert 0,003 (siehe Abb. 5A) und für BV/TV 0,0002 (siehe Abb. 5E). Für die anderen Parameter ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Abb. 5B-D)



Abb. 8: Die Ergebnisse der µCT-Untersuchung der Wirbelkörper. Die Daten sind als Boxplot dargestellt, der Median ist in rot eingezeichnet. Ausreißer sind als Kreis mit dem jeweiligem Wert dargestellt; ** 0,01 > p \ge 0,001; *** p < 0,001 A) die durchschnittliche Dicke der Trabekel in mm, n = 8 pro Gruppe, p = 0,003; B) die Knochenmineraldichte der Trabekel in mgHA/cm³, n = 8 pro Gruppe; C) die Anzahl der Trabekel, n = 8 pro Gruppe; D) der durchschnittliche Abstand zwischen den Trabekeln in mm, n = 8 pro Gruppe; E) das Verhältnis des Knochenvolumens zum Gesamtgewebevolumen in %, n = 8 pro Gruppe, p = 0,0002.



Abb. 9: µCT-Aufnahmen der Wirbelkörper. A) µCT-Aufnahme des Wirbelkörpers einer SHC Maus; B) µCT-Aufnahme des Wirbelkörpers einer CSC Maus.

Ergebnisse

3.3 Histologie

Bei der histomorphologischen Untersuchung wurden folgende Parameter erhoben:

- die Anzahl der Osteoblasten im Verhältnis zum Gesamtumfang der Trabekel (ObN/BPm)
- das Verhältnis der Oberfläche, die von Osteoblasten bedeckt war, im Verhältnis zum Gesamtumfang der Trabekel (ObPm/BPm)
- die Anzahl der Osteoklasten im Verhältnis zum Gesamtumfang der Trabekel (OcN/BPm)
- 4. das Verhältnis der Oberfläche, die von Osteoklasten bedeckt war, im Verhältnis zum Gesamtumfang der Trabekel (OcPm/BPm)

Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der erhobenen Parameter zwischen den beiden Gruppen (siehe Abb. 7). Hier zeigen sich weder in den Femora (siehe Abb. 7 A-D) noch in den Wirbelsäulen (siehe Abb. 7 E-H) nennenswerte Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.



Abb. 10: Die Ergebnisse der histomorphologischen Untersuchung. Die Daten sind als Boxplot dargestellt, der Median ist in rot eingezeichnet. Ausreißer sind als Kreis mit dem jeweiligem Wert dargestellt; A-D Werte der rechten Femora, E-H Werte der Wirbelkörper; A) Anzahl der Osteoblasten pro mm Knochenumfang der Trabekel, n = 8 pro Gruppe; B) Verhältnis der Oberfläche, die von Osteoblasten bedeckt war (Ob.Pm), zum Gesamtknochenumfang (B.Pm) in %, n = 8 pro Gruppe; C) Anzahl der Osteoklasten bedeckt war (Oc.Pm), zum Gesamtknochenumfang (B.Pm) in %, n = 8 pro Gruppe; E) Anzahl der Osteoblasten bedeckt war (Oc.Pm), zum Gesamtknochenumfang (B.Pm) in %, n = 8 pro Gruppe; E) Anzahl der Osteoblasten bedeckt war (Ob.Pm), zum Gesamtknochenumfang (B.Pm) in %, n = 8 pro Gruppe; G) Anzahl der Osteoblasten bedeckt war (Ob.Pm), zum Gesamtknochenumfang (B.Pm) in %, n = 8 pro Gruppe; G) Anzahl der Osteoblasten pro mm Knochenumfang der Trabekel, n = 8 pro Gruppe; H) Verhältnis der Oberfläche, die von Osteoblasten bedeckt war (Ob.Pm), zum Gesamtknochenumfang (B.Pm) in %, n = 8 pro Gruppe; G) Anzahl der Osteoklasten pro mm Knochenumfang der Trabekel, n = 8 pro Gruppe; H) Verhältnis der Oberfläche, die von Osteoklasten bedeckt war (Ob.Pm), zum Gesamtknochenumfang (B.Pm) in %, n = 8 pro Gruppe; G) Anzahl der Osteoklasten pro mm Knochenumfang der Trabekel, n = 8 pro Gruppe; H) Verhältnis der Oberfläche, die von Osteoklasten pro mm Knochenumfang der Trabekel, n = 8 pro Gruppe; H) Verhältnis der Oberfläche, die von Osteoklasten bedeckt war (Oc.Pm), zum Gesamtknochenumfang (B.Pm) in %, n = 8 pro Gruppe; G) Anzahl der Osteoklasten bedeckt war (Oc.Pm), zum Gesamtknochenumfang (B.Pm) in %, n = 8 pro Gruppe.

3.4 Dynamische Histomorphometrie

Auch bei der dynamischen Histomorphometrie wurden sowohl Femora als auch Wirbelkörper untersucht. Dabei wurde einerseits bestimmt, wie viele µm Mineralisationsgewebe pro Tag an den Trabekeln angelagert wurde (Mineral Apposition Rate, Abb. 8A und Abb. 8C) und andererseits, um wie viel Volumen die Knochenmasse im Verhältnis zur Knochenoberfläche zunahm (siehe Abb. 8B und Abb. 8D).

Dabei ergaben sich weder bei den Femora noch bei den Wirbelkörpern relevante Differenzen zwischen den Versuchstieren und der Kontrollgruppe.



Abb. 11: Die Ergebnisse der histologischen Fluoreszenzuntersuchung. Die Daten sind als Boxplot dargestellt, der Median ist in rot eingezeichnet. Ausreißer sind als Kreis mit dem jeweiligem Wert dargestellt; A+B Werte der Femora, C+D Werte der Wirbelkörper; A) Mineral Apposition Rate der Trabekel der Wirbelkörper in μ m/Tag, SHC: n = 7, CSC: n = 8; B) Knochenbildungsrate/Knochenoberfläche der Trabekel der Wirbelkörper pro Tag in μ m³/ μ m²/Tag, SHC: n = 7, CSC: n = 8; D) Knochenbildungsrate/Knochenoberfläche der Trabekel der Femora in μ m/Tag, SHC: n = 7, CSC: n = 8; D) Knochenbildungsrate/Knochenoberfläche der Trabekel der Femora in μ m/Tag, SHC: n = 7, CSC: n = 8; D) Knochenbildungsrate/Knochenoberfläche der Trabekel der Femora pro Tag in μ m³/ μ m²/Tag, SHC: n = 7, CSC: n = 8.

3.5 Immunhistochemische Untersuchungen

Eine Osteocalcin-positive Färbung zeigte sich in der Knochenmatrix, ebenso wie intrazellulär in reifen, der Knochenoberfläche anliegenden Osteoblasten (siehe Abb. 10). Da Osteocalcin ein Marker für die Osteoblasten-Aktivität ist, wurde die Anzahl der positiven Zellen quantifiziert, um eine Aussage über das Vorhandensein von aktiven Osteoblasten treffen zu können.

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbung der linken Femora zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren der CSC- und denen der SHC-Gruppe. Die Tiere der CSC-Gruppe zeigten eine leicht erhöhte Anzahl an Osteocalcin positiven Osteoblasten im Vergleich zu den SHC-Tieren. Der Median lag hier bei 2,18 positiven Osteoblasten pro mm Trabekelumfang im Vergleich zu einem Median von 1,39 positiven Osteoblasten pro mm Trabekelumfang (siehe Abb. 9). Allerdings wurden nur 4 Tiere pro Gruppe ausgewertet, somit könnte sich bei ausreichender Gruppengröße durchaus ein signifikanter Unterschied ergeben.



Abb. 12: Das Ergebnis der Immunhistochemischen Untersuchung. Die Daten sind als Boxplot dargestellt, der Median ist in rot eingezeichnet. Der Boxplot zeigt die Anzahl der Osteocalcin positiven Osteoblasten pro mm Trabekelumfang der linken Femora; n = 4 pro Gruppe.

Ergebnisse



Abb. 13: Gegen Osteocalcin gefärbte Schnitte. Die Vergrößerung beträgt 40x. Die Osteocalcin positiven Osteoblasten sowie die Knochenmatrix stellt sich rot dar. A) Schnitt eines Femurs einer SHC Maus; B) Schnitt eines Femurs einer CSC Maus.

4.1 Auswirkungen des CSC auf den Knochenphänotyp

Ziel dieser Arbeit war es die Auswirkungen des CSC-Paradigmas, einem anerkannten Mausmodell für PTSD auf den Knochen zu untersuchen. Dabei stellten wir uns drei Fragen:

- 1. Wie wirkt sich der chronische psychosoziale Stress auf das Längenwachstum der langen Röhrenknochen aus?
- 2. Wie wirkt sich der chronische psychosoziale Stress auf den kortikalen und den trabekulären Teil der Femora und der Wirbelkörper aus?
- 3. Wie wirkt sich der chronische psychosoziale Stress auf Osteocalcin einen Differenzierungsmarker der Osteoblasten aus?

Dabei zeigte sich, dass der psychosoziale Stress innerhalb von 19 Tagen zu einer Verringerung des Knochenwachstums geführt hat. So waren sowohl die Femora, als auch die Tibiae der CSC-Mäuse signifikant kürzer als die der Kontrollgruppe. Da das Längenwachstum, wie oben beschrieben (siehe 1.1.2), hauptsächlich durch eine enchondrale Ossifikation vonstattengeht, lässt die verringerte Länge der Femora und Tibiae die Vermutung zu, dass chronischer psychosozialer Stress einen negativen Einfluss auf die enchondrale Ossifikation haben könnte. Dabei zeigten die Trabekel in den Femora eine erhöhte Dicke sowie eine erhöhte Knochendichte. Bei den Trabekeln der Wirbelkörper waren ebenfalls die Trabekeldicke, sowie das Verhältnis von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen der Spongiosa erhöht. Das Dickenwachstum der Trabekel erfolgt vor allem über appositionelles Wachstum, bei dem sich die Osteoblasten direkt dem bestehenden Knochen anlagern und dort neuen Knochen bilden. Aufgrund der Veränderungen hier, kann also parallel zu der bereits beschriebenen Störung des enchondralen Wachstums, eine Dysregulation des appositionellen Knochenwachstums angenommen werden. Bei Osteoblasten und Osteoklasten zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Diese Dysregulation, sowohl der enchondralen Ossifikation als auch des appositionellen Wachstums, könnte zurück zu führen sein, auf eine verringerte Runx2 (auch Cbfa1) - Expression in den Chondrozyten der Wachstumsfuge. Diese veringerte Expression konnte im CSC Modell bereits nachgewiesen werden [27]. Wie schon oben beschrieben (siehe 1.1.2, desmale Ossifikation) spielt Runx2 eine wichtige Rolle in der Chondrozytendifferenzierung und dadurch auch bei der enchondralen Ossifikation. Mäuse mit einer homozygoten Mutation in dem für Runx2 kodierenden Cbfa1-Gen und damit einem kompletten Ausfall von Runx2 zeigten einen Phänotyp, bei dem das Skelett ausschließlich aus Knorpel bestand. Es kam in diesen Mäusen also zu keiner Ausdiffernzierung des Knorpels zu Knochen. Unter anderem auch, weil es zu keiner Osteoblastogenese kam. Auch bei Mäusen, die nur eine heterozygote Mutation aufwiesen zeigte sich eine gestörte Ossifikation. Hier zeigten sich desorganisierte Wachstumsfugen und damit ein verlangsamtes Knochenwachstum [77]. Diese Ergebnisse wurden noch unterstützt von Inada et al. im Jahr 1999 [47]. Die Autoren zeigten ebenfalls, dass es bei homozygot Cbfa1-mutierten Mäusen zu einer Veränderung der Wachstumsfuge kommt. Die Zone der hypertrophen Chondrozyten zeigte sich deutlich verbreitert. während die prähypertrophe Zone verschmälert war.

All diese Merkmale: die desorganisierte Architektur, die Verbreiterung der Wachstumsfugen sowie eine gestörte enchondrale Ossifikation, zeigten sich auch in weiteren Untersuchungen im CSC Modell [27], wenn auch in abgeschwächterer Form. Dies unterstützt die These, dass die kürzeren Femora und Tibiae der CSC Tiere, auf eine gestörte Runx2 Exprimierung nach psychosozialem Stress zurück zu führen seien.

Weiterhin werden diese Parallelitäten zu unseren Ergebnissen noch untermauert durch die Beobachtungen von Stickens et al. 2004 [96] und Tang et al. 2012 [100]. Beide Arbeitsgruppen untersuchten die Auswirkungen eines Ausfalls des Matrix-Metalloproteinase 13 (Mmp13) - Gens. Mmp13 ist eine Proteinase, die downstream von Runx2 agiert, bzw gebildet wird. Sie ist also Teil des gleichen Signalwegs wie Runx2. Kommt es nun zu einer Abnahme der Aktivität von Runx2 führt dies gleichzeitig auch zu einer Abnahme der Expression von Mmp13 [51]. Stickens et al. zeigten nun bei Ausfall von Mmp13 eine Zunahme der hypertrophen Zone der Wachstumsfuge sowie eine Zunahme der trabekulären Knochenmasse [96]. Diese

Zunahme der Knochenmasse zeigten auch Tang et al. Sowohl BV/TV als auch die tissue mineral density (TMD) waren erhöht. Diese Erhöhung der TMD entspricht dabei der Erhöhung der BMD in unseren Untersuchungen. Zusätzlich wies die Arbeitsgruppe um Tang, wie wir, keine Veränderungen in der Anzahl an TRAPpositiven Osteoklasten im trabekulären Bereich des Knochens nach [100].

Insgesamt sprechen diese Parallelen, die erhöhten trabekulären Knochenparameter, die Störung der enchondralen Ossifikation und die unveränderte Anzahl der Osteoklasten, für eine Downregulation des Runx2- und damit auch des Mmp13-Signalwegs, durch die Auswirkungen des chronischen psychosozialen Stresses. Weiterführende Analysen zur Expression von Runx2-Zielmolekülen wie Mmp13 im CSC Modell wären sinnvoll.

Ein weiterer Mediator chronischen Stresses auf den Knochen könnte das sympathische Nervensystem (SNS) sein. Sowohl das Knochenmark, als auch das Periost zeigt eine Innervation durch sympathische Nervenfasern [11, 46]. Desweiteren zeigten Yirmiya et al. 2006, dass die negativen Auswirkungen des Chronic Mild Stress (CMS)-Modells auf den Knochen (siehe 4.2.1), durch die Gabe von Propanolol, einem β -Adrenozeptorblocker, gemindert werden konnten [116]. Dabei hemmt Propanolol kompetitiv die Bindung der Transmitter des Sympathikus – Adrenalin und Noradrenalin – an deren Rezeptoren β 1, β 2 und β 3 [45].

Da auch das CSC-Modell zu einer Erhöhung des Noradrenalin-Spiegels führt [83], könnte eine erhöhte Aktivierung des SNS ebenfalls zu den von uns beobachteten Auswirkungen des CSC auf den Knochen beigetragen haben. Ebenfalls für diese Theorie spricht, dass Förtsch et al. eine erhöhte Tyrosin Hydroxylase (TH)-Exprimierung in den Nebennieren, sowie lokal im Knochenmark nahe den Wachstumsfugen der CSC-Tiere nachwiesen. In den metaphysären Knochenabschnitten zeigte sich diese TH Erhöhung nicht. [27]. TH ist das Geschwindigkeits-limitierende Enzym der Katecholaminbiosynthese [20]. Die erhöhte TH-Expression spricht damit einerseits für die erhöhte Aktivierung des SNS und legt gleichzeitig nahe, dass es eventuell zusätzlich zu einer lokalen Produktion von Katecholaminen nahe der Wachstumsfuge kommt [27].

Förtsch et al. zeigten außerdem eine Expression von β_2 -Adrenozeptoren in den Chondrozyten der Wachstumsfuge [27]. Gerade dieser β_2 -Adrenozeptor wird als Hauptrezeptor in der Übermittlung der Reize des SNS auf den Knochen diskutiert [98]. Allerdings sind die genauen Mechanismen der Signalübertragung des SNS auf Chondrozytendifferenzierung und damit auch auf das enchondrale die Knochenwachstum bis jetzt noch nicht genau verstanden [27, 48, 62, 68, 72]. Lai und Mitchell zum Beispiel beschrieben 2007 [62], wie auch Takeda et al. 2002 [98], Expression von β_2 -Adrenozeptoren durch die Chondrozvten eine der Wachstumsfuge. Diese Rezeptoren würden, nach Aktivierung, durch eine Phosphorylierung, die Aktivierung des cyclic AMP response element binding protein (CREB) bewirken, was wiederum zu einer verminderten Expression verschiedener Gene, unter anderem auch Ihh, führe. Die Aktivierung der β_2 -Adrenozeptoren wirke also ähnlich wie PTHrP und führe, über eine reduzierte Ihh-Expression, zu einer Inhibierung der Chondrozytendifferenzierung und damit einem verminderten enchondralen Knochenwachstum [62]. Lorenz et al. beschrieben außerdem zusätzlich zur Expression der β_2 -Adrenozeptoren, eine Expression von α -Adrenozeptoren auf den Chondrozyten. Diese a-Adrenozeptoren weisen eine höhere Affinität gegenüber Noradrenalin auf als die β-Adrenozeptoren und werden deshalb bei geringen Noradrenalinspiegeln vermehrt aktiviert. Dadurch käme es vermehrt zu einer Apoptose der Chondrozyten 68]. Jenei-Lanzl et al. postulierten 2014 zusätzlich noch eine Erhöhung der Hypertrophie-Marker von Chondrozyten durch Noradrenalin [48]. Es gibt also verschiedene Theorien wie genau das SNS Einfluss auf den Knochen nimmt.

Trotz der ungenauen Datenlage lassen Studien von Herndon et al. auf Auswirkungen des SNS auf den Knochenmetabolismus im Menschen schließen. So konnten sie 2012 und 2016 zeigen, dass die Gabe von Propanolol über einen das Knochenwachstum Kindern langen Zeitraum von nach schweren Verbrennungen verbesserte [41, 42]. Nach solch schweren Verbrennungen kommt es zu einer hyperkatabolen Stoffwechsellage, die mit einer Erhöhung von Katecholaminen assoziiert ist [33, 73], und einem wiederum damit assoziiertem Knochenverlust [58]. Dieser konnte durch die einjährige Gabe von Propanolol vermindert werden [41, 42]. Aber auch hier ist noch nicht geklärt, wie genau dieser Mechanismus vonstatten geht. Der verminderte Knochenverlust könnte einerseits

auf direkte Effekte der SNS-Hemmung am Knochen zurückzuführen sein, oder aber indirekt über verminderte Serumwerte inflammatorischer Marker. Zu diesen Markern gehöhren zum Beispiel TNFα, oder IL-8 [49]. Diese sind ebenfalls erhöht im Blut von Brandopfern [25] und besitzen osteokatabole Eigenschaften.

Weiterhin zeigte sich, dass die SNS-Aktivität über eine Aktivierung der B2-Adrenozeptoren von Osteoblasten zu einem katabolen Effekt auf den Knochenmetabolismus führt. Einerseits hemmt das SNS über ein Osteoblasten spezifisches CREB den Knochenaufbau durch die Osteoblasten und andererseits führt es über eine erhöhte RANKL-Exprimierung zu einer Verstärkung der Knochenresorption [98, 99]. Yirmiya et al. fanden zusätzlich eine Abnahme der Osteoblastenzahl unter SNS-Aktivierung. Diese wurde wiederum angehoben durch die Gabe von Sympatholytika wie Propanolol [116]. Wie oben schon beschrieben wurde diese Verstärkung der Knochenformation durch Propanolol auch von Takeda et al. 2002 aufgezeigt [98]. Zuletzt wiesen auch Teong et al. 2017 eine Verbesserung der Knochenarchitektur, sowie ein erhöhtes BV/TV und eine erhöhte BMD nach [101]. Diese Veränderungen wurden alle im Mausmodell beobachtet, jedoch wurden die positiven Effekte von β-Blockern auf den Knochen auch im Menschen nachgewiesen. So zeigten sowohl Pasco et al. 2009 als auch Toulis et senkt [80, 104]. Toulis et al. vermuteten dabei vor allem einen Benefit durch β1selektive Adrenozeptorblocker [104]. Pasco et al. zeigten außerdem eine erhöhte BMD nach β-Blockergabe [80]. Da in unserer Studie jedoch die Anzahl und die Aktivität der Osteoblasten nicht verändert war, scheint der Effekt des CSC auf den Knochen nicht über die Aktivierung von β-Adrenozeptoren auf Osteoblasten induziert zu sein. Hierfür spricht weiterhin auch die unveränderte TH-Expression in der Metaphyse [27]. Um nun zu klären, ob das SNS, nach CSC, Einfluss auf den Knochenmetabolismus nimmt, sollte man weitere Untersuchungen mit Mäusen durchführen, bei denen spezifisch die β-Adrenozeptoren der Chondrozyten ausgeschaltet sind. Falls hierbei ebenfalls positive Effekte auf den Knochen, beziehungsweise eine Verminderung der negativen Effekte des CSC, so würde dies für eine direkte Involvierung des SNS in das verminderte Längenwachstum nach CSC sprechen.

4.2 Vergleich mit anderen Stressmodellen

4.2.1 Chronic Mild Stress (CMS)

Das Chronic Mild Stress (CMS) -Modell ist ein Nagermodell zur Untersuchung der Auswirkungen von variablem Stress auf den Organismus. Allerdings induziert es bei den Versuchstieren ein Verhalten, das mit Depression assoziiert ist [112], wohingegen das CSC-Modell eher ein PTSD-assoziiertes Verhalten nach sich zieht [84, 95]. Bei dem CMS-Modell werden die Tiere über einen Zeitraum von mehreren Wochen verschiedenen milden Stressoren ausgesetzt. Diese Stressoren sind z.B. Futter- oder Wasserdeprivation für mehrere Stunden, Immobilisation über einen längeren Zeitraum, Stroboskoplicht, Schiefstellung des Käfigs, laute Geräusche über einen gewissen Zeitraum und noch einige mehr. Dabei unterscheiden sich die genauen Paradigmen in den Einzelheiten, je nach Labor und Versuch [6, 31, 66, 112, 116].

Bei Untersuchung der Knochen zeigte sich im CMS-Modell im Gegensatz zu unseren Untersuchungen keine Zunahme der trabekulären Knochenmasse. Im Gegenteil waren die trabekulären Knochenparameter erniedrigt. So fanden Yirmiya et al. eine Verringerung der BV/TV, sowie eine Verringerung der Trabekelanzahl, sowohl in Wirbelkörpern, als auch in den Femora [116]. Furuzawa et al. wiesen außerdem eine Erhöhung der TbSp, sowie eine Erniedrigung der TbTh in den Wirbelkörpern von Tieren, die vier Wochen dem CMS-Schema unterzogen worden waren, nach [31]. Auch Azuma et al. und Lertsinthai et al. unterstützten diese Beobachtungen mit ihren Ergebnissen [6, 66], wobei man dabei erwähnen sollte, dass die Untersuchungen von Lertsinthai et al. die Mäuse, zusätzlich zu dem Stressmodell, einer Ovariektomie unterzogen.

Weiterhin wiesen Furzawa et al. und Azuma et al. in den gestressten Tieren eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten pro mm Knochenoberfläche und eine erhöhte Osteoklastenoberfläche im Verhältnis zur Gesamtknochenoberfläche nach. Auch eine erniedrigte BFR/BS stellten sie fest [6, 31]. Auch dies steht im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, da wir für diese Parameter keinen signifikanten Unterschied zwischen CSC-Tieren und SHC-Tieren nachweisen konnten.

Der Grund für diese Unterschiede könnte die unterschiedliche Auswirkung der beiden Modelle auf die HPA-Achse sein. Mäuse bzw. Ratten, die dem CMS-

Paradigma unterzogen wurden, zeigten jeweils eine Zunahme sowohl in der Aktivität der HPA-Achse [60], als auch in der Aktivität des SNS [116]. Bei CSC-Mäusen kommt es hingegen nur zu einer chronischen Aktivierung des SNS, während die HPA-Achse nicht beeinflusst wird [83, 84].

Die chronische Aktivierung des HPA-Systems und der damit einhergehende Hyperkortisolismus jedoch sind ein etablierter Risikofaktor für einen Knochenverlust. Wie schon oben beschrieben, führt eine chronische Produktion von Glukokortikoiden zu einer verstärkten Apoptose der Osteoblasten und einer verlängerten Lebenszeit der Osteoklasten [18, 50, 74]. Dadurch kommt es zu einer negativen Knochenbilanz und einer Abnahme der Knochenmasse [109, 110].

Weiterhin für diese Hypothese spricht, dass Henneicke et al. nachweisen konnten, dass Mäuse, bei denen der Glukokortikoid-Signalweg gestört ist, nach vier Wochen CMS keine Auswirkungen auf den Knochen zeigen. Dafür benutzten sie einen Mäusestammm, bei dem selektiv die Weiterleitung der Glukokortikoid-Signale in den Osteoblasten und Osteozyten ausgeschaltet ist (HSD2^{OB}-transgenic mice) als Versuchstiere, während als Kontrolltiere Mäuse ohne diese Mutation dienten. Dabei zeigte sich bei den gestressten Mäusen ein ca. dreifach erhöhter Kortikosteronwert im Serum im Vergleich zu ungestressten Mäusen, sowohl in der Kontroll-, als auch in der Versuchsgruppe. Bei den Mäusen der Kontrollgruppe zeigte sich eine Abnahme der Knochenmasse in der Kortikalis. Dies war bei den HSD2^{OB}-Tieren nicht der Fall [40].

Analog finden sich diese Assoziationen auch beim Menschen. Patienten, die an einer Depression leiden, haben ein höheres Risiko auch an Osteoporose zu erkranken [16]. Gleichzeitig zeigte sich bei Patienten mit Depressionen ein erhöhter Glukokortikoidspiegel [107]. Konträr zu Depression und dem CMS und analog zu unserem Modell leiden Patienten mit PTSD eher an einem Hypokortisolismus, als einem Hyperkortisolismus [71, 115]. Auch ergab sich bei einer an PTSD Multivariablenanalyse zu und verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen von Tsai und Shen aus dem Jahr 2017 eine negative Korrelation zwischen PTSD und Osteoporose [105]. Zuletzt zeigten Kinder nach einem schweren Trauma in der Kindheit eine verringerte Körpergröße [9] was eventuell auf einen analogen Mechanismus zurückzuführen ist, wie unsere Beobachtung der verkürzten Femora und Tibiae.

4.2.2 Social Isolation Rearing

Sozial-isolierte Aufzucht (Social Isolation Rearing, SIR) ist ein Modell, bei dem die Versuchstiere direkt nach der Entwöhnung von der Mutter isoliert werden und in Einzelkäfigen gehalten werden, was bei den Jungtieren zu psychosozialem Stress führt [88]. Schiavone et al. zeigten 2016, dass es unter diesem Schema zu einer Veränderung der Knochenstruktur sowie zu Veränderungen von Knochenparametern kommt [88]. Wie oben schon beschrieben trennten sie 21 Tage alte männliche Ratten von der Mutter und zogen die Tiere entweder isoliert in Einzelkäfigen oder in Vierergruppen auf. Diese Unterbringung behielten sie für 7 Wochen bei, bevor sie dann die Ratten euthanisierten [88]. Dabei zeigten Shiavone et al. eine erhöhte BMD sowohl in den Femora der Ratten als auch in den Wirbelkörpern. Weiterhin wiesen sie auch eine erhöhte Dicke der Kortikalis der Femora nach [88].

Des Weiteren berichten Schiavone et al. von einer signifikanten Abnahme des Cathepsin K-Spiegels im Blut [88]. Dies könnte auch der Grund für die beschriebenen Veränderungen des Knochens sein, da Cathepsin K als Protease eine prominente Rolle im Knochenabbau und -remodelling spielt [13, 88, 114]. Somit zeigen sich im SIR Modell ähnliche, wenn auch nicht exakt gleiche Einflüsse von Stress auf den Knochen.

Ein wichtiger Unterschied zwischen den Untersuchungen von Schiavone et al. und dem CSC Modell ist, dass CSC-Mäuse keine erhöhte Lokomotion aufweisen [27], während dies bei den Ratten des SIR-Paradigmas der Fall ist [28, 87]. Diese erhöhte Lokomotion könnte Unterschiede zwischen dem Einfluss der beiden Modelle auf den Knochen erklären, führt doch erhöhte Bewegung zu einer positiven Knochenbilanz [23, 93]. Außerdem führen die beiden Paradigmen zu unterschiedlichem Verhalten. Während CSC-Tiere eher ein Verhalten, das mit PTSD assoziiert wird [95], zeigen, so liegt bei den SIR-Tieren eher ein psychotisches Verhalten vor [7, 28, 65]. Die Auswirkungen auf den Knochen jedoch sind zumindest bei der BMD ähnlich. Auch kommt es bei beiden Paradigmen zu keinem Anstieg der basalen Corticosteronlevel [83, 84, 90, 103]. Es wäre also durchaus möglich, dass ähnliche Mechanismen die Auswirkungen der unterschiedlichen Arten des psychosozialen Stresses auf den Knochen übermitteln. Sinnvoll wären hier weitere Untersuchungen, inwiefern das SIR das Längenwachstum der langen Röhrenknochen beeinflusst, oder ob es beim CSC zu einer Veränderung in der Expression von Cathepsin K kommt.

4.3 Methodische Limitationen

Zuletzt will ich hier noch kurz auf die methodischen Limitationen meiner Arbeit eingehen. Unsere Berechnungen vor Beginn der Studie ergaben, dass n = 8 pro Gruppe ausreicht, um statistische Aussagen treffen zu können. Diese Anzahl wurde jedoch bei den immunhistochemischen Untersuchungen nicht erreicht, so dass wir hier lediglich von einem Trend sprechen können. Hier wären weitere Untersuchungen interessant, mit einer höheren Anzahl an untersuchten Tieren pro Gruppe.

Eine weitere Limitation ist, dass diese Studie nur die unmittelbaren Folgen des chronischen Stresses untersucht. Da die Tiere unmittelbar nach Beendigung des CSC-Paradigmas getötet wurden, können wir keine Aussagen über die Langzeitauswirkungen von psychosozialem Stress auf den Knochenmetabolismus treffen. Auch hier wären weitere Untersuchungen mit einer längeren Erholungsphase vor der Tötung interessant, um eben diese Aussagen über die späten Folgeschäden von psychosozialem Stress treffen zu können.

Außerdem konnten wir aufgrund des Aufbaus des CSC-Modells unsere Untersuchungen nur an männlichen Mäusen durchführen. Es könnte also durchaus sein, dass weibliche Mäuse aufgrund z.B. einer anderen Hormonlage anders auf psychosozialen Stress reagieren, als unsere männlichen Versuchstiere.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Bei unseren Untersuchungen zu den Auswirkungen von psychosozialem Stress auf den Knochenmetabolismus analog zu den Auswirkungen einer PTSD, zeigte sich ein Phänotyp mit einer gestörten enchondralen Ossifikation. Dabei wiesen wir eine Verkürzung der langen Röhrenknochen nach, vermutlich aufgrund einer verringerten Differenzierung der Chondrozyten in der Wachstumsfuge mit einer einhergehenden verringerten Mineralisation des Knorpelgewebes sowie einer geringeren Transition von Knorpel zu Knochen. Als Grund für diese Veränderungen

kommt eine verringerte Expression von Runx2 eventuell aufgrund einer erhöhten Aktivierung des sympathischen Nervensystems in Frage.

Um dies vollständig zu klären sind jedoch weitere Untersuchungen von Nöten. Einerseits wäre es interessant, ob es zu einer Veränderung der Expression von Runx2-Zielgenen, wie z.B. Mmp13, kommt. Andererseits wären weitere Untersuchungen zur Auswirkung des CSC-Schemas in Mäusen, bei denen spezifisch die β-Adrenozeptoren Chondrozyten ausgeschaltet sind, wichtig, um der Frage nachzugehen, inwiefern die Auswirkungen durch das SNS gesteuert werden.

Desweiteren könnte die Veränderung des Knochenmetabolismus auch durch veränderte Cathepsin K-Expression induziert sein. Auch hier wären weitere Untersuchungen interessant, um diese Möglichkeit weiter zu erörtern.

Zuletzt stellt sich auch die Frage inwiefern sich die Ergebnisse aus dem Mausmodell auf den Menschen übertragen lassen. Wie auch PTSD führt das CSC-Modell zu Hypokortisolismus, während das SNS aktiviert wird. Klinische einem Untersuchungen zeigten außerdem, dass Kinder, die in frühen Jahren ein schweres Trauma erlitten, eine verringerte Körpergröße aufweisen [9]. Insgesamt könnten unsere Ergebnisse also durchaus auf den Menschen übertragbar sein. Hier würden sich jedoch auch noch weitere Untersuchungen empfehlen. Falls sich tatsächlich das SNS als Effektor auf den Knochen herausstellt, würde sich z.B. eine präventive β-Blockergabe für Kinder und Jugendliche nach schwerem Trauma oder bei chronischem psychosozialem Stress anbieten, um den negativen Auswirkungen auf das Knochenwachstum entgegen zu wirken.

5 Zusammenfassung

Einer der häufigsten Stressoren beim Säugetier ist der psychosoziale Stress. Heutzutage gilt dieser als anerkannter Risikofaktor verschiedener Krankheitsbilder. Unter anderem wird von einer Vergesellschaftung mit einer Schwächung des Immunsystems, einer verzögerten Wundheilung, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Depressionen und Posttraumatischen Belastungsstörungen (PTSD) berichtet. Depressionen und PTSD wiederum scheinen mit einer Beeinträchtigung des Knochenmetabolismus assoziiert zu sein. Für Depressionen scheint die Datenlage eindeutig, bei PTSD ist dies jedoch nicht der Fall. Deswegen untersuchten wir die Auswirkungen des Chronic Subordinate Colony Housing (CSC)-Modells einem validierten vorklinischem Modell für PTSD auf den Knochenmetabolismus mit folgender Fragestellung:

1. Welchen Einfluss hat chronischer psychosozialer Stress auf das Längenwachstum der langen Röhrenknochen?

2. Welchen Einfluss hat chronischer psychosozialer Stress auf den trabekulären und kortikalen Knochen im Femur und in der Wirbelsäule?

3. Wie wirkt sich der chronische psychosoziale Stress auf Osteocalcin einen Differenzierungsmarker der Osteoblasten aus?

Dazu wurden sieben Wochen alte Mäuse zufällig in eine Kontrollgruppe und eine Versuchsgruppe aufgeteilt mit einer Gruppengröße von je acht Tieren. Die Versuchstiere wurden daraufhin für vier Wochen dem CSC-Paradigma unterzogen, während die Kontrollgruppe in Einzelkäfigen gehalten wurde. Nach Beendigung der vier Wochen wurden die Tiere euthanasiert und wir entnahmen Femora, Tibiae und Wirbelkörper für verschiedene Untersuchungen. Zuerst maßen wir die Länge der Femora und Tibiae. Dem schlossen sich µCT-Untersuchungen der Femora und Wirbelkörper, histologische Untersuchungen der Femora und Wirbelkörper, und wirbelkörper, dynamisch histomorphometrische Untersuchungen der Femora an.

Dabei zeigte sich eine Verkürzung der langen Röhrenknochen, eine Erhöhung der trabekulären Dicke sowie der trabekulären Knochenmineraldichte der Femora, sowie eine Erhöhung der trabekulären Dicke sowie des Verhältnisses von Knochenvolumen zu Gewebevolumen der Wirbelkörper. Die histologische und immunhistochemische Untersuchung ergab keine Veränderung in Osteoblasten und Osteoklastenaktivität. Auch die Knochenmineralisierungsrate zeigte sich nicht verändert.

Ursächlich für diese Veränderungen könnte eine erhöhte Aktivierung des sympathischen Nervensystems mit einer erhöhten Ausschüttung von Noradrenalin, eventuell auch lokal, sein. Diese Aktivierung könnte wiederum zu einer verringerten Exprimierung des runt related transcription factor 2 (Runx2) oder dessen Zielgenen führen. Hier wären weitere Untersuchungen von Nöten, um die Mechanismen besser zu verstehen. Daraus könnten sich Konsequenzen für die Behandlung von Kindern nach schwerem psychosozialem Trauma, einer PTSD, oder unter chronischem psychosozialem Stress ergeben.

6 Literaturverzeichnis

1. Agid O, Shapira B, Zislin J, Ritsner M, Hanin B, Murad H, Troudart T, Bloch M, Heresco-Levy U, Lerer B: Environment and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. Molecular Psychiatry, 4: 163-172 (1999)

2. Akiyama H, Chaboissier M, Martin J F, Schedl A, de Crombrugghe B: The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. Genes and Development, 16: 2813-2828 (2002)

3. Almeida M, Han L, Ambrogini E, Weinstein R S, Manolagas S C: Glucocorticoids and tumor necrosis factor α increase oxidative stress and suppress Wnt protein signaling in osteoblasts. The Journal of Biological Chemistry, 286: 44326-44335 (2011)

 Apps P J, Rasa A, Viljoen H W: Quantitative chromatographic profiling of odours associated with dominance in male laboratory mice. Aggressive Behavior, 14: 451-461 (1988)

5. Azuma K, Adachi Y, Hayashi H, Kubo K: Chronic Psychological Stress as a Risk Factor of Osteoporosis. Journal of UOEH, 37: 245-253 (2015)

6. Azuma K, Furuzawa M, Fujiwara S, Yamada K, Kubo K: Effects of Active Mastication on Chronic Stress-Induced Bone Loss in Mice. International Journal of medical Sciences, 12: 952-957 (2015)

7. Bakshi V P, Geyer M A: Ontogeny of isolation rearing-induced deficits in sensorimotor gating in rats. Physiology & Behavior, 67: 385-392 (1999)

8. Baldock P A, Lin S, Zhang L, Karl T, Shi Y, Driessler F, Zengin A, Hörmer B, Lee N J, Wong I, Lin E, Enriquez R F, Stehrer B, During M J, Yulyaningsih E, Zolotukhin S, Ruohonen S T, Savontaus E, Sainsbury A, Herzog H: Neuropeptide Y Attenuates Stress-Induced Bone Loss Through Suppression of Noradrenaline Circuits. Journal of Bone and Mineral Research, 29: 2238-2249 (2014)

9. Batty G D, Shipley M J, Gunnell D, Huxley R, Kivimaki M, Woodward M, Lee C M Y, Smith G D: Height, wealth, and health: An overview with new data from three longitudinal studies. Economics & Human Biology, 7: 137-152 (2009)

10. Beie S: Immunhistologische Untersuchungen zur Frakturheilung Midkinedefizienter Mäuse. Med Dissertation, Universität Ulm (2017)

11. Bjurholm A, Kreicbergs A, Ahmed M, Schultzberg M: Noradrenergic and peptidergic nerves in the synovial membrane of the Sprague-Dawley rat. Arthritis and Rheumatism, 33: 859-865 (1990)

12. Bouxsein Mary L, Boyd Stephen K, Christiansen Blaine A, Guldberg Robert E, Jepsen Karl J, Müller Ralph: Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro–computed tomography. Journal of Bone and Mineral Ressearch, 25: 1468-1486 (2010)

13. Brix K, Dunkhorst A, Mayer K, Jordans S: Cysteine cathepsins: Cellular roadmap to different functions. Biochimie, 90: 194-207 (2008)

14. Calarge Chadi A, Butcher Brandon D, Burns Trudy L, Coryell William H, Schlechte Janet A, Zemel Babette S: Major Depressive Disorder and Bone Mass in Adolescents and Young Adults. Journal of Bone and Mineral Research, 29: 2230-2237 (2014)

15. Cannon W B: Organization for Physiological Homeostasis. Physiological Reviews, 9: 399-431 (1929)

16. Cizza G, Primma S, Csako G: Depression as a risk factor for osteoporosis. Trends in Endocrinology & Metabolism, 20: 367-373 (2009)

17. Cizza G, Ravn P, Chrousos G P, Gold P W: Depression: a major, unrecognized risk factor for osteoporosis? Trends in Endocrinology & Metabolism, 12: 198-203 (2001)

 Compston J: Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. Endocrine, 61: 7-16 (2018)

19. Datta H K, Ng W F, Walker J A, Tuck S P, Varanasi S S: The cell biology of bone metabolism. Journal of Clinical Pathology, 577-587 (2008)

20. Daubner S C, Le T, Wang S: Tyrosine Hydroxylase and Regulation of Dopamine Synthesis. Archives of Biochemistry and Biophysics, 508: 1-12 (2010)

21. Dorn L D, Susman E J, Pabst S, Huang B, Kalkwarf H, Grimes S: Association of Depressive Symptoms and Anxiety With Bone Mass and Density in Ever-Smoking and Never-Smoking Adolescent Girls. Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine, 162: 1181-1188 (2008)

22. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling A F, Beil F T, Shen J, Vinson C, Rueger J M, Karsenty G: Leptin Inhibits Bone Formation through a Hypothalamic Relay: A Central Control of Bone Mass. Cell, 100: 197-207 (2000)

23. Falcai M J, Zamarioli A, Leoni G B, de S N, Volpon J B: Swimming Activity Prevents the Unloading Induced Loss of Bone Mass, Architecture, and Strength in Rats. BioMed Research International, 2015: 507848 (2015)

24. Farquharson C, Ahmed S F: Inflammation and linear bone growth: the inhibitory role of SOCS2 on GH/IGF-1 signaling. Pediatric Nephrology, 28: 547-556 (2013)

25. Finnerty C C, Herndon D N, Przkora R, Pereira C T, Oliveira H M, Queiroz D M M, Rocha A M C, Jeschke M G: Cytokine expression profile over time in severely burned pediatric patients. Shock, 26: (2006)

26. Fischer V, Haffner-Luntzer M, Prystaz K, Scheidt A v, Busse B, Schinke T, Amling M, Ignatius A: Calcium and vitamin-D deficiency marginally impairs fracture healing but aggravates posttraumatic bone loss in osteoporotic mice. Scientific Reports, 7: 7223 (2017)

27. Foertsch S, Haffner-Luntzer M, Kroner J, Gross F, Kaiser K, Erber M, Reber S O, Ignatius A: Chronic psychosocial stress disturbs long-bone growth in adolescent mice. Disease Models & Mechanisms, 10: 1399-1409 (2017)

28. Fone K C F, Porkess M V: Behavioural and neurochemical effects of postweaning social isolation in rodents—Relevance to developmental neuropsychiatric disorders. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 32: 1087-1102 (2008)

29. Forsén L, Meyer H E, Søgaard A J, Næss S, Schei B, Edna T: Mental Distress and Risk of Hip Fracture. Do Broken Hearts Lead to Broken Bones? Journal of Epidemiology and Community Health, 53: 343-347 (1999) 30. Fukushima H, Nakao A, Okamoto F, Shin M, Kajiya H, Sakano S, Bigas A, Jimi E, Okabe K: The Association of Notch2 and NF-κB Accelerates RANKL-Induced Osteoclastogenesis. Molecular and Cellular Biology, 28: 6402 (2008)

31. Furuzawa M, Chen H, Fujiwara S, Yamada K, Kubo K: Chewing ameliorates chronic mild stress-induced bone loss in senescence-accelerated mouse (SAMP8), a murine model of senile osteoporosis. Experimental Gerontology, 55: 12-18 (2014)

32. Gao Y, Huang E, Zhang H, Wang J, Wu N, Chen X, Wang N, Wen S, Nan G, Deng F, Liao Z, Wu D, Zhang B, Zhang J, Haydon R C, Luu H H, Shi L L, He T: Crosstalk between Wnt/β-Catenin and Estrogen Receptor Signaling Synergistically Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Progenitor Cells. PLOS ONE, 8: e82436 (2013)

33. Gauglitz G,G., Herndon D,N., Kulp G,A., Meyer, III ,Walter,J., Jeschke M,G.: Abnormal Insulin Sensitivity Persists up to Three Years in Pediatric Patients Post-Burn. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 94: 1656-1664 (2009)

34. Gebara M A, Shea M L O, Lipsey K L, Teitelbaum S L, Civitelli R, Müller D J, Reynolds C F, Mulsant B H, Lenze E J: Depression, Antidepressants, and Bone Health in Older Adults: A Systematic Review. Journal of the American Geriatrics Society, 62: 1434-1441 (2014)

35. Glaesmer H, Brähler E, Gündel H, Riedel-Heller S: The Association of Traumatic Experiences and Posttraumatic Stress Disorder With Physical Morbidity in Old Age: A German Population-Based Study. Psychosomatic Medicine, 73: 401-406 (2011)

36. Goldstein D S, Kopin I J: Evolution of concepts of stress. Stress: The International Journal on the Biology of Stress, 10: 109-120 (2007)

37. Goldstein D S, McEwen B: Allostasis, Homeostats, and the Nature of Stress. Stress: The International Journal on the Biology of Stress, 5: 55-58 (2002)

38. Haffner-Luntzer M, Heilmann A, Rapp A E, Beie S, Schinke T, Amling M, Ignatius A, Liedert A: Midkine-Deficiency Delays Chondrogenesis during the Early Phase of Fracture Healing in Mice. PLOS ONE, 9: e116282 (2014)

39. Heim C, Nemeroff C B: The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. Biological Psychiatry, 49: 1023-1039 (2001)

40. Henneicke H, Li J, Kim S, Gasparini S,J., Seibel M,J., Zhou H: Chronic Mild Stress Causes Bone Loss via an Osteoblast-Specific Glucocorticoid-Dependent Mechanism. Endocrinology, 158: 1939-1950 (2017)

41. Herndon D N, Rodriguez N A, Diaz E C, Hegde S, Jennings K, Mlcak R P, Suri J S, Lee J O, Williams F N, Meyer W, Suman O E, Barrow R E, Jeschke M G, Finnerty C C: Long-Term Propranolol Use in Severely Burned Pediatric Patients: A Randomized Controlled Study. Annals of Surgery, 256: 402-411 (2012)

42. Herndon D N, Voigt C D, Capek K D, Wurzer P, Guillory A, Kline A, Andersen C R, Klein G L, Tompkins R G, Suman O E, Finnerty C C, Meyer W J, Sousse L E: Reversal of Growth Arrest With the Combined Administration of Oxandrolone and Propranolol in Severely Burned Children. Annals of Surgery, 264: 421-428 (2016)

43. https://svgsilh.com/de/000000/image/1295327.html (14.10.2018)

44. https://svgsilh.com/de/image/1471870.html (14.10.2018)

45. Huppelsberg J, Walter K: 14. Vegetatives Nervensystem (VNS). In: Huppelsberg J and Walter K (Hrsg) Kurzlehrbuch Physiologie, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, S. 263-273 (2009)

46. Imai S, Matsusue Y: Neuronal regulation of bone metabolism and anabolism: Calcitonin gene-related peptide-, substance P-, and tyrosine hydroxylase-containing nerves and the bone. Microscopy Research and Technique, 58: 61-69 (2002)

47. Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, Sato M, Yamagiwa H, Kimura T, Yasui N, Ochi T, Endo N, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T: Maturational disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. Developmental Dynamics, 214: 279-290 (1999)

48. Jenei-Lanzl Z, Grässel S, Pongratz G, Kees F, Miosge N, Angele P, Straub R H: Norepinephrine Inhibition of Mesenchymal Stem Cell and Chondrogenic Progenitor Cell Chondrogenesis and Acceleration of Chondrogenic Hypertrophy. Arthritis & Rheumatology, 66: 2472-2481 (2014)

49. Jeschke M G, Norbury W B, Finnerty C C, Branski L K, Herndon D N: Propranolol Does Not Increase Inflammation, Sepsis, or Infectious Episodes in Severely Burned Children. Journal of Trauma and Acute Care Surgery, 62: (2007) 50. Jia D, O'Brien C A, Stewart S A, Manolagas S C, Weinstein R S: Glucocorticoids Act Directly on Osteoclasts to Increase Their Life Span and Reduce Bone Density. Endocrinology, 147: 5592-5599 (2006)

51. Jiménez M J G, Balbín M, López J M, Alvarez J, Komori T, López-Otín C: Collagenase 3 Is a Target of Cbfa1, a Transcription Factor of the *runt* Gene Family Involved in Bone Formation. Molecular and Cellular Biology, 19: 4431-4442 (1999)

52. Khammissa R A G, Fourie J, Motswaledi M H, Ballyram R, Lemmer J, Feller L: The Biological Activities of Vitamin D and Its Receptor in Relation to Calcium and Bone Homeostasis, Cancer, Immune and Cardiovascular Systems, Skin Biology, and Oral Health. BioMed Research International, 2018: 9276380 (2018)

53. Khosla S, Oursler M J, Monroe D G: Estrogen and the skeleton. Trends in Endocrinology & Metabolism, 23: 576-581 (2012)

54. Kiecolt-Glaser J K, Glaser R, Gravenstein S, Malarkey W B, Sheridan J: Chronic stress alters the immune response to influenza virus vaccine in older adults. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93: 3043-3047 (1996)

55. Kiecolt-Glaser J K, Marucha P T, Mercado A M, Malarkey W B, Glaser R: Slowing of wound healing by psychological stress. The Lancet, 346: 1194-1196 (1995)

56. Kirsch J: Elemente und Bauprinzipien des Skeletts. In: Kirsch J, May C A, Lorke D, Winkelmann A, Schwab W, Herrmann G and Funk R (Hrsg) Taschenlehrbuch Anatomie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 15-20 (2011)

57. Kitazawa S, Kajimoto K, Kondo T, Kitazawa R: Vitamin D3 supports osteoclastogenesis via functional vitamin D response element of human RANKL gene promoter. Journal of Cellular Biochemistry, 89: 771-777 (2003)

58. Klein G L, Herndon D N, Langman C B, Rutan T C, Young W E, Pembleton G, Nusynowitz M, Barnett J L, Broemeling L D, Sailer D E, McCauley R L: Long-term reduction in bone mass after severe burn injury in children. The Journal of Pediatrics, 126: 252-256 (1995)

59. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson R T, Gao Y -, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S,

Kishimoto T: Targeted Disruption of Cbfa1Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts. Cell, 89: 755-764 (1997)

60. Konkle A T M, Baker S L, Kentner A C, Barbagallo L S, Merali Z, Bielajew C: Evaluation of the effects of chronic mild stressors on hedonic and physiological responses: sex and strain compared. Brain Research, 992: 227-238 (2003)

61. Kronenberg H M: Developmental regulation of the growth plate. Nature, 423: 332-336 (2003)

62. Lai L P, Mitchell J: β2-adrenergic receptors expressed on murine chondrocytes stimulate cellular growth and inhibit the expression of Indian hedgehog and collagen type X. Journal of Cellular Biochemistry, 104: 545-553 (2008)

63. Langgartner D, Füchsl A M, Uschold-Schmidt N, Slattery D A, Reber S O:
Chronic Subordinate Colony Housing Paradigm: A Mouse Model to Characterize the Consequences of Insufficient Glucocorticoid Signaling. Frontiers in Psychiatry,
6: 18 (2015)

64. Langgartner D, Peterlik D, Foertsch S, Füchsl A M, Brokmann P, Flor P J, Shen Z, Fox J G, Uschold-Schmidt N, Lowry C A, Reber S O: Individual differences in stress vulnerability: The role of gut pathobionts in stress-induced colitis. Brain, Behavior, and Immunity, 64: 23-32 (2017)

65. Lapiz M, Fulford A, Muchimapura S, Mason R, Parker T, Marsden C: Influence of Postweaning Social Isolation in the Rat on Brain Development, Conditioned Behavior, and Neurotransmission. Neuroscience and Behavioral Physiology, 33: 13-29 (2003)

66. Lertsinthai P, Charoenphandhu J, Suntornsaratoon P, Krishnamra N, Charoenphandhu N: Voluntary wheel running mitigates the stress-induced bone loss in ovariectomized rats. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 33: 261-269 (2015)

67. Lips P: Vitamin D physiology. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 92:4-8 (2006)

68. Lorenz J, Schäfer N, Bauer R, Jenei-Lanzl Z, Springorum R H, Grässel S: Norepinephrine modulates osteoarthritic chondrocyte metabolism and inflammatory responses. Osteoarthritis and Cartilage, 24: 325-334 (2016) 69. Lüllmann-Rauch R: Knochen. In: Lüllman-Rauch R (Hrsg) Histologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 122-140 (2003)

70. McEwen B S: Stress, Adaptation, and Disease: Allostasis and Allostatic Load. Annals of the New York Academy of Sciences, 840: 33-44 (1998)

71. Morris M C, Compas B E, Garber J: Relations among posttraumatic stress disorder, comorbid major depression, and HPA function: A systematic review and meta-analysis. Clinical Psychology Review, 32: 301-315 (2012)

72. Niedermair T, Kuhn V, Doranehgard F, Stange R, Wieskötter B, Beckmann J, Salmen P, Springorum H, Straub R H, Zimmer A, Grifka J, Grässel S: Absence of substance P and the sympathetic nervous system impact on bone structure and chondrocyte differentiation in an adult model of endochondral ossification. Matrix Biology, 38: 22-35 (2014)

73. Norbury W B, Herndon D N, Branski L K, Chinkes D L, Jeschke M G.: Urinary Cortisol and Catecholamine Excretion after Burn Injury in Children. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 93: 1270-1275 (2008)

74. O'Brien C A, Jia D, Plotkin L I, Bellido T, Powers C C, Stewart S A, Manolagas S C, Weinstein R S: Glucocorticoids Act Directly on Osteoblasts and Osteocytes to Induce Their Apoptosis and Reduce Bone Formation and Strength. Endocrinology, 145: 1835-1841 (2004)

75. O'Donovan A, Cohen B E, Seal K H, Bertenthal D, Margaretten M, Nishimi K, Neylan T C: Elevated Risk for Autoimmune Disorders in Iraq and Afghanistan Veterans with Posttraumatic Stress Disorder. Biological Psychiatry, 77: 365-374 (2015)

76. Ohba S: Hedgehog Signaling in Endochondral Ossification. Journal of Developmental Biology, 4: 20 (2016)

77. Otto F, Thornell A P, Crompton T, Denzel A, Gilmour K C, Rosewell I R, Stamp G W H, Beddington R S P, Mundlos S, Olsen B R, Selby P B, Owen M J: Cbfa1, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. Cell, 89: 765-771 (1997)

78. Parfitt A M: Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. Journal of Cellular Biochemistry, 55: 273-286 (1994)

79. Parfitt A M: The actions of parathyroid hormone on bone: Relation to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis, and metabolic bone disease: Part I of IV parts: Mechanisms of calcium transfer between blood and bone and their cellular basis: Morphological and kinetic approaches to bone turnover. Metabolism, 25: 809-844 (1976)

80. Pasco J A, Henry M J, Sanders K M, Kotowicz M A, Seeman E, Nicholson G C: β-Adrenergic Blockers Reduce the Risk of Fracture Partly by Increasing Bone Mineral Density: Geelong Osteoporosis Study. Journal of Bone and Mineral Research, 19: 19-24 (2004)

81. Pereira R M, Delany A M, Durant D, Canalis E: Cortisol regulates the expression of Notch in osteoblasts. Journal of Cellular Biochemistry, 85: 252-258 (2002)

82. Rauner M, Sipos W, Pietschmann P: Osteoimmunology. International Archives of Allergy and Immunology, 143: 31-48 (2007)

83. Reber S O, Birkeneder L, Veenema A H, Obermeier F, Falk W, Straub R H, Neumann I D: Adrenal Insufficiency and Colonic Inflammation after a Novel Chronic Psycho-Social Stress Paradigm in Mice: Implications and Mechanisms. Endocrinology, 148: 670-682 (2007)

84. Reber S O, Langgartner D, Foertsch S, Postolache T T, Brenner L A, Guendel H, Lowry C A: Chronic subordinate colony housing paradigm: A mouse model for mechanisms of PTSD vulnerability, targeted prevention, and treatment—2016 Curt Richter Award Paper. Psychoneuroendocrinology, 74: 221-230 (2016)

85. Roselló-Díez A, Joyner A L: Regulation of Long Bone Growth in Vertebrates; It Is Time to Catch Up. Endocrine Reviews, 36: 646-680 (2015)

86. Sato K, Takayanagi H: Osteoclasts, rheumatoid arthritis, and osteoimmunology. Current Opinion in Rheumatology, 18: 419-426 (2006)

87. Schiavone S, Jaquet V, Sorce S, Dubois-Dauphin M, Hultqvist M, Bäckdahl L, Holmdahl R, Colaianna M, Cuomo V, Trabace L, Krause K: NADPH oxidase elevations in pyramidal neurons drive psychosocial stress-induced neuropathology. Translational Psychiatry, 2: e111 (2012)

88. Schiavone S, Morgese M G, Mhillaj E, Bove M, De Giorgi A, Cantatore F P, Camerino C, Tucci P, Maffulli N, Cuomo V, Trabace L: Chronic Psychosocial Stress Impairs Bone Homeostasis: A Study in the Social Isolation Reared Rat. Frontiers in Pharmacology, 7: 152 (2016)

89. Schmidt D, Peterlik D, Reber S O, Lechner A, Männel D,N.: Induction of Suppressor Cells and Increased Tumor Growth following Chronic Psychosocial Stress in Male Mice. PLoS ONE, 11: e0159059 (2016)

90. Schrijver N C A, Bahr N I, Weiss I C, Würbel H: Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 73: 209-224 (2002)

91. Silva B C, Costa A G, Cusano N E, Kousteni S, Bilezikian J P: Catabolic and anabolic actions of parathyroid hormone on the skeleton. Journal of Endocrinological Investigation, 34: 801-810 (2011)

92. Singewald G M, Nguyen N K, Neumann I D, Singewald N, Reber S O: Effect of chronic psychosocial stress-induced by subordinate colony (CSC) housing on brain neuronal activity patterns in mice. Stress, 12: 58-69 (2009)

93. Sioen I, Michels N, Polfliet C, De Smet S, D'Haese S, Roggen I, Deschepper J, Goemaere S, Valtueña J, De Henauw S: The influence of dairy consumption, sedentary behaviour and physical activity on bone mass in Flemish children: a cross-sectional study. BMC Public Health, 15: 717 (2015)

94. Sipos W, Pietschmann P, Rauner M, Kerschan-Schindl K, Patsch J: Pathophysiology of osteoporosis. Wiener Medizinische Wochenschrift, 159: 230-234 (2009)

95. Slattery D A, Uschold N, Magoni M, Bär J, Popoli M, Neumann I D, Reber S O: Behavioural consequences of two chronic psychosocial stress paradigms: Anxiety without depression. Psychoneuroendocrinology, 37: 702-714 (2012)

96. Stickens D, Behonick D J, Ortega N, Heyer B, Hartenstein B, Yu Y, Fosang A J, Schorpp-Kistner M, Angel P, Werb Z: Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. Development, 131: 5883-5895 (2004)

97. Takayanagi H: Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. Nature Reviews Immunology, 7: 292–304 (2007)

98. Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker K L, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G: Leptin Regulates Bone Formation via the Sympathetic Nervous System. Cell, 111: 305-317 (2002)

99. Takeda S, Karsenty G: Molecular bases of the sympathetic regulation of bone mass. Bone, 42: 837-840 (2008)

100. Tang S Y, Herber R, Ho S P, Alliston T: Matrix metalloproteinase–13 is required for osteocytic perilacunar remodeling and maintains bone fracture resistance. Journal of Bone and Mineral Research, 27: 1936-1950 (2012)

101. Teong B, Kuo S M, Tsai W H, Ho M L, Chen C H, Huang H H: Liposomal Encapsulation for Systemic Delivery of Propranolol via Transdermal Iontophoresis Improves Bone Microarchitecture in Ovariectomized Rats. International Journal of Molecular Sciences, 18: 10.3390/ijms18040822 (2017)

102. Tolea M, Black S, Carter-Pokras O, Kling M: Depressive symptoms as a risk factor for osteoporosis and fractures in older Mexican American women. Osteoporosis International, 18: 315-322 (2007)

103. Toth M, Mikics E, Tulogdi A, Aliczki M, Haller J: Post-weaning social isolation induces abnormal forms of aggression in conjunction with increased glucocorticoid and autonomic stress responses. Hormones and Behavior, 60: 28-36 (2011)

104. Toulis K A, Hemming K, Stergianos S, Nirantharakumar K, Bilezikian J P: βadrenergic receptor antagonists and fracture risk: a meta-analysis of selectivity, gender, and site-specific effects. Osteoporosis International, 25: 121-129 (2014)

105. Tsai J, Shen J: Exploring the Link Between Posttraumatic Stress Disorder and inflammation-Related Medical Conditions: An Epidemiological Examination. Psychiatric Quarterly, 88: 909-916 (2017)

106. Valta M P, Hentunen T, Qu Q, Valve E M, Harjula A, Seppänen J A, Väänänen H K, Härkönen P L: Regulation of Osteoblast Differentiation: A Novel Function for Fibroblast Growth Factor 8. Endocrinology, 147: 2171-2182 (2006)

107. Vrkljan M, Thaller V, Lovricević I, Gaćina P, Resetić J, Bekić M, Sonicki Z: Depressive disorder as possible risk factor of osteoporosis. Collegium antropologicum, 25: 485-492 (2001)

108. Walsh N C, Crotti T N, Goldring S R, Gravallese E M: Rheumatic diseases: the effects of inflammation on bone. Immunological Reviews, 208: 228-251 (2005)

109. Weinstein R S, Jilka R L, Parfitt A M, Manolagas S C: Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. The Journal of Clinical Investigation, 102: 274-282 (1998)

110. Weinstein R S, Jia D, Powers C C, Stewart S A, Jilka R L, Parfitt A M, Manolagas S C: The Skeletal Effects of Glucocorticoid Excess Override Those of Orchidectomy in Mice. Endocrinology, 145: 1980-1987 (2004)

111. Westendorf J J, Kahler R A, Schroeder T M: Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. Gene, 341: 19-39 (2004)

112. Willner P: Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and Behavioural-Neurobiological Concordance in the Effects of CMS. Neuropsychobiology, 52: 90-110 (2005)

113. Wolff J: Das Gesetz der Transformation der Knochen. August Hirschwald, Berlin, (1892)

114. Yasuda Y, Kaleta J, Brömme D: The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: Rationale for the design of new therapeutics. Advanced Drug Delivery Reviews, 57: 973-993 (2005)

115. Yehuda R, Seckl J: Minireview: Stress-Related Psychiatric Disorders with Low Cortisol Levels: A Metabolic Hypothesis. Endocrinology, 152: 4496-4503 (2011)

116. Yirmiya R, Goshen I, Bajayo A, Kreisel T, Feldman S, Tam J, Trembovler V, Csernus V, Shohami E, Bab I: Depression induces bone loss through stimulation of the sympathetic nervous system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103: 16876-16881 (2006)

117. Zanotti S, Canalis E: Notch regulation of bone development and remodeling and related skeletal disorders. Calcified Tissue International, 90: 69-75 (2011)

118. Zhou X, von d M, Henry S, Norton W, Adams H, de Crombrugghe B: Chondrocytes Transdifferentiate into Osteoblasts in Endochondral Bone during Development, Postnatal Growth and Fracture Healing in Mice. PLOS Genetics, 10: e1004820 (2014)

119. Zong Y, Tang Y, Xue Y, Ding H, Li Z, He D, Zhao Y, Wang P: Depression is associated with increased incidence of osteoporotic thoracolumbar fracture in postmenopausal women: a prospective study. European Spine Journal, 25: 3418-3423 (2016)

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Entstehung und Regulation des chondralen Knochenwachstums 6
Abb. 2: Schematische Darstellung einer BMU9
Abb. 3: Der Aufbau des CSC-Modells 21
Abb. 4: Der zeitliche Verlauf des CSC-Schemas 22
Abb. 5: Die Auswahl der Osteoblasten und Osteoklasten, sowie die Bestimmung
des Knochenumfangs im Osteomeasure-Programm
Abb. 6: Die Ergebnisse der Längenmessungen 28
Abb. 7: Die Ergebnisse der µCT-Untersuchung der Femora
Abb. 8: Die Ergebnisse der µCT-Untersuchung der Wirbelkörper
Abb. 9: µCT-Aufnahmen der Wirbelkörper 31
Abb. 10: Die Ergebnisse der histomorphologischen Untersuchung
Abb. 11: Die Ergebnisse der histologischen Fluoreszenzuntersuchung
Abb. 12: Das Ergebnis der Immunhistochemischen Untersuchung
Abb. 13: Gegen Osteocalcin gefärbte Schnitte

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der Chemikalien	15
Tabelle 2: Liste der Lösungen und Puffer	16
Tabelle 3: Liste der Antikörper	16
Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte und Software	17
Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. Anita Ignatius, Leiterin des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm, für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit diese experimentelle Arbeit anzufertigen, danken. Ebenso möchte ich mich ganz besonders bei meiner Betreuerin Frau Dr. Melanie Haffner-Luntzer bedanken. Ohne ihre Hilfe, Geduld, Tipps und Ratschläge wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. An sie konnte ich mich immer wieder wenden und bekam immer Hilfe.

Desweiteren gilt mein Dank Frau Iris Baum. Ohne ihre Unterstützung im Labor hätte wahrscheinlich keiner meiner Versuche überhaupt ein Ergebnis erzielt.

Zuletzt auch noch ein herzliches Dankeschön an all die Menschen, die ich bis jetzt hier noch nicht genannt habe und die mir bei der Entstehung dieser Arbeit tatkräftig unter die Arme gegriffen haben, allen voran meine Eltern und meine Partnerin.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Florian Max Groß
Geburtsdatum und Ort:	1993 in Tübingen
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Beruf:	Assistenzarzt der Orthopädie im Klinikum rechts der Isar

SCHULE / STUDIUM / PROMOTION

09/1999 – 09/2003	Grundschule Würzburg-Versbach
09/2003 – 09/2005	Wirsberg-Gymnasium in Würzburg
09/2005 – 06/2012	Heinrich-Suso-Gymnasium in Konstanz,
	Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife
	(Note 1,7)
01/2010 – 07/2010	Auslandsaufenthalt in Australien, Cairns State High School
10/2012 – 11/2019	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
	Approbation: November 2019
11/2018 – 05/2019	Praktisches Jahr am Karl-Olga-Krankenhaus Stuttgart
05/2019 – 06/2019	Praktisches Jahr an der Royal-Victoria-Infirmary in Newcastle upon Tyne, England
07/2019 – 10/2019	Praktisches Jahr am Klinikum rechts der Isar München
01/2020 – heute	Assistenzarzt Orthopädie Klinikum rechts der Isar München
06/2020	Verteidigung der Dissertation: "Einfluss von psychosozialem Stress auf den Knochenmetabolismus im Mausmodell" (Institut für unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm)

PRAKTIKA / NEBENTÄTIGKEITEN

03/2013	Krankenpflegepraktikum am Fatima Hospital in Gorakhpur/Indien
10/2014 – 10/2016	Teilnahme am Forschungstrack "Traumaversorgung und Traumaforschung" der Universität Ulm
10/2014 – 03/2018	Tutor im vorklinischen Wahlfach "Fit für den OP" der Universität Ulm
10/2015 – 10/2018	Tutor in der Chirurgie der Universität Ulm
08/2016 – 09/2016	Famulatur in der Anästhesie der Klinik Radolfzell
09/2016 – 10/2016	Famulatur in der Radiologie der Universität Ulm
03/2017	Famulatur in der orthopädischen Praxis Dr. Schleicher in Berlin
03/2018 – 04/2018	Famulatur in der Orthopädie/Chirurgie des Kantonsspitals Münsterlingen, Schweiz

PUBLIKATIONEN

2017

Mitautorenschaft Foertsch et al.: Chronic psychosocial stress disturbs long-bone growth in adolescent mice, Disease Models & Mechanisms, 10: 1399-1409 (2017)