

**Einfluss von Methotrexat und Glukokortikoiden in
Kombination mit Osteoprotegerin auf
Gelenkentzündung und Knochenstruktur bei der
Antigen-induzierten Arthritis der Ratte**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt dem Rat der Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

Von Stefanie Fleißner-Richter
Geboren am 29. Juli 1979 in Büdingen

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. P. Oelzner, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Klinik für Innere Medizin III
2. Prof. Dr. rer. nat. R. Bräuer, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Pathologisches Institut
3. Prof. Dr. U. Lange, Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim, Abt. Rheumatologie und Klinische Immunologie

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.Juni 2012

Abkürzungsverzeichnis

AG	Aktiengesellschaft
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
AICAR	5-aminoimidazol-4-carboxamide ribonucleotide-Transformylase
AMP	Adenosinmonophosphat
Aqua dest.	aqua destillata (destilliertes Wasser)
A.v.E	Abstand von der Epiphysenfuge
BMU	Bone Multicellular Units
BS	bone surface (Spongiosaoberfläche)
BV	bone volume (Songiosavolumen)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CA	amerikanischer Bundesstaat Kalifornien
CD	cluster of differentiation, Oberflächenrezeptoren von immunkompetenten Zellen
CIA	Kollageninduzierte Arthritis
cm	Zentimeter
Co	Kompanie
COX	Zyklooxygenase
d	dies (Tag)
DC	Dendritische Zellen
DKK-1	Dickkopf 1
DMARD	disease modifying antirheumatic drugs
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DVO	Dachverband Osteologie
DXA	Dexamethason; Gruppe der Tiere, die mit Dexamethason behandelt wurden
DXA+OPG	Gruppe der Tiere, die mit Dexamethason und Osteoprotegerin behandelt wurden
et al.	et alia (und andere)
F	Zahl der gemessenen Felder (Linear Scanning)
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	hora (Stunde)
HLA	humanes Leukozytenantigen
I	Gesamtschnittpunktzahl der Kurvenschar mit der trabekulären Knochenoberfläche (Linear Scanning)
IFN- γ	Interferon Gamma
Iho	Schnittpunkte Howshipsche Lakunen mit Osteoklasten (Linear Scanning)
Iio	Schnittpunkte Osteoid ohne Osteoblasten (Linear Scanning)
IL	Interleukin
Iob	Schnittpunkte Osteoid mit Osteoblasten (Linear Scanning)

Abkürzungsverzeichnis

k	Netzkonstante
KG	Kommanditgesellschaft
kg	Kilogramm
Ln.Le	Length of the line (Gesamtlänge der Meßlinie)
mBSA	methyliertes bovines Serumalbumin
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor (Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor)
Md.Le	Total mineralized length (Gesamtlänge der Meßlinienteilstrecke auf mineralisierten Strukturen)
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MI	amerikanischer Bundesstaat Michigan
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MTX	Methotrexat; Gruppe der Tiere, die mit Methotrexat behandelt wurden
MTX+OPG	Gruppe der Tiere, die mit Methotrexat und Osteoprotegerin behandelt wurden
n	Anzahl
NIH	National Institutes of Health (nationales Gesundheitsinstitut der Vereinigten Staaten von Amerika)
Nocl	Anzahl der Osteoklasten
N.Tb	Number of trabeculae (Anzahl der geschnittenen Trabekel)
Ob.S	Osteoblast Surface (Osteoblasten-besetzte Oberfläche)
Oc.S	Osteoclast Surface (Osteoklasten-besetzte Oberfläche)
o.g.	oben genannt
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
OS	Osteoid surface (Anbauoberfläche)
O.Th	Osteoid thickness (Osteoiddicke)
OV	Osteoidvolumen
p	Ergebnis des statistischen Signifikanztestes
P	Treffer mineralisierter Knochen und Osteoid (Linear Scanning)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung; Gruppe der Tiere, die mit Kochsalzlösung behandelt wurden
Po	Treffer Osteoid (Linear Scanning)
RA	Rheumatoide Arthritis
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor κB
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
sog.	sogenannt

SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (Softwarefirma, die Statistik- und Analyse-Software entwickelt, Auswertungsprogramm für statistische Daten)
Tb.Th	Trabecular thickness (Trabekeldurchmesser)
TCR	T-Lymphozyten-Rezeptor
TN	Trabekelanzahl (Trabecular number-linear referent)
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF- α	Tumornekrosefaktor Alpha
TNFR	Tumornekrosefaktor Rezeptor
TRAF	Tumornekrosefaktor- Rezeptorassoziierte Faktoren
TTW	Mineralisierter Knochenanteil (total trabecular width-linear referent)
TV	total volume (Gesamtvolumen)
TW	Trabekeldurchmesser (trabecular width-linear referent)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
v.a.	vor allem
WHO	World Health Oorganisation (Weltgesundheitsorganisation)
Wnt	Signalprotein
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Inhaltsverzeichnis	6
Zusammenfassung	10
1 Einleitung	13
1.1 Rheumatoide Arthritis	13
1.1.1 Definition.....	13
1.1.2 Klinisches Bild und Diagnose:	14
1.1.3 Immunpathogenese.....	14
1.1.4 Histologie	15
1.2 Osteoporose	15
1.3 Das RANKL/RANK/OPG-System	18
1.4 Experimentelle Arthritismodelle	21
1.5 Ziele der Arbeit.....	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Chemikalien und Medikamente.....	24
2.1.2 Versuchstiere:	24
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 Immunisierung und Induktion der Arthritis.....	25
2.2.2 Versuchsgruppen	25
2.2.3 Messung von Gewicht und Gelenkschwellung	26
2.2.4 Präparation des Wirbelkörpers und des rechten Tibiakopfes	26
2.2.5 Fixierung und Einbettung des Knochens.....	26
2.2.6 Schnittherstellung, Entplasten und Färbung.....	27
2.2.7 Histomorphometrie des Knochens	27
2.2.7.1 Lendenwirbelkörper.....	28
2.2.7.2 Tibiakopf	28
2.2.8 Linear scanning.....	29
2.2.9 Gemessene und berechnete Parameter	29
2.3 Statistische Verfahren.....	31
3 Ergebnisse.....	32

3.1	Teil 1: Behandlung der AIA mit OPG, Dexamethason und Dexamethason und OPG in Kombination.....	32
3.1.1	Gelenkschwellung	32
3.1.2	Körpergewichtsentwicklung.....	32
3.1.3	Histomorphometrie des Tibiakopfes- sekundäre Spongiosa	33
3.1.3.1	Volumenparameter	33
3.1.3.2	Oberflächenparameter	34
3.1.3.3	Zelluläre Parameter.....	35
3.1.4	Linear scanning-Parameter der Tibia-primäre Spongiosa	37
3.1.4.1	Trabekelanzahl.....	37
3.1.4.2	Trabekeldurchmesser.....	38
3.1.4.3	Mineralisierter Anteil am Knochengewebe.....	39
3.1.4.4	Mittlere Trabekelanzahl, Trabekeldurchmesser und Mineralisierter Knochenanteil.....	40
3.1.5	Histomorphometrie des Wirbelkörpers, sekundäre Spongiosa	41
3.1.5.1	Volumenparameter	41
3.1.5.2	Oberflächenparameter	42
3.1.5.3	Zelluläre Parameter.....	43
3.2	Teil 2: Behandlung der AIA mit MTX und MTX und OPG in Kombination.....	45
3.2.1	Gelenkschwellung	45
3.2.2	Körpergewicht	45
3.2.3	Histomorphometrie des Tibiakopfes-sekundäre Spongiosa	46
3.2.3.1	Volumenparameter	46
3.2.3.2	Oberflächenparameter	47
3.2.3.3	Zelluläre Parameter.....	48
3.2.4	Linear scanning-Parameter der Tibia - primäre Spongiosa.....	50
3.2.4.1	Trabekelanzahl.....	50
3.2.4.2	Trabekeldurchmesser.....	50
3.2.4.3	Mineralisierter Knochenanteil	51
3.2.4.4	Mittlere Trabekelanzahl, Trabekeldurchmesser und Mineralisierter Knochenanteil.....	51
3.2.5	Histomorphometrie des Wirbelkörpers, sekundäre Spongiosa	52
3.2.5.1	Volumenparameter	52
3.2.5.2	Oberflächenparameter	53

3.2.5.3	Zelluläre Parameter.....	53
4	Diskussion	55
4.1	Das Tiermodell	55
4.2	Analyse der Knochenstruktur mittels Histomorphometrie und Linear Scanning.....	57
4.3	Beziehung zwischen Entzündungsaktivität und Knochen bei der AIA der Ratte	62
4.3.1	Einfluss der Arthritis auf die periartikuläre sekundäre Spongiosa	62
4.3.2	Einfluss der Arthritis auf die periartikuläre primäre Spongiosa.....	62
4.3.3	Einfluss der Arthritis auf den axialen Knochen.....	63
4.4	Einfluss der Therapie mit OPG auf die Entzündungsaktivität und den Knochen bei der AIA.....	64
4.4.1	Einfluss der Therapie mit OPG auf die Entzündung	64
4.4.2	Einfluss der Therapie mit OPG auf den periartikulären Knochen.....	65
4.4.2.1	Sekundäre Spongiosa.....	65
4.4.2.2	Primäre Spongiosa	68
4.4.3	Einfluss von OPG auf den axialen Knochen	71
4.5	Einfluss der Therapie mit Dexamethason auf die Entzündungsaktivität und Knochen bei der AIA	71
4.5.1	Einfluss von Dexamethason auf den periartikulären Knochen	73
4.5.1.1	Sekundäre Spongiosa.....	73
4.5.1.2	Primäre Spongiosa	73
4.5.2	Einfluss von Dexamethason auf den axialen Knochen	74
4.6	Beeinflussung des Knochenstoffwechsels durch die kombinierte Therapie mit DXA und OPG	75
4.6.1.1	Sekundäre Spongiosa.....	75
4.6.1.2	Primäre Spongiosa	77
4.6.1.3	Axialer Knochen.....	77
4.7	Einfluss der Therapie mit Methotrexat auf die AIA und den Knochenstoffwechsel	78
4.7.1	Einfluss von MTX auf die Entzündung.....	79
4.7.2	Einfluss von MTX auf die periartikuläre Knochenstruktur.....	81
4.7.2.1	Sekundäre Spongiosa.....	81
4.7.2.2	Primäre Spongiosa	82
4.7.2.3	Axialer Knochen.....	83
4.8	Einfluss der kombinierten Therapie mit MTX und OPG auf die AIA und den Knochenstoffwechsel.....	84

4.8.1	Einfluss von MTX und OPG auf die periartikuläre Knochenstruktur.....	84
4.8.1.1	Sekundäre Spongiosa.....	84
4.8.1.2	Primäre Spongiosa.....	85
4.8.1.3	Axialer Knochen.....	85
5	Schlussfolgerung	86
6	Literatur	88
7	Anhang	104
7.1	Ehrenwörtliche Erklärung.....	104
7.2	Danksagung	105
7.3	Lebenslauf	106

Zusammenfassung

Einleitung und Zielsetzung

Die Rheumatoide Arthritis (RA) wird als inflammatorische Systemerkrankung neben einer progressiven Zerstörung von Knorpel und periartikulärem Knochen durch eine periartikuläre und generalisierte axiale, multifaktoriell bedingte Osteoporose kompliziert. Eine hohe Krankheitsaktivität ist ein entscheidender Faktor für den Knochenmasseverlust. Neben einer Reihe weiterer Einflüsse wie hormoneller Effekte oder Immobilität spielt die antientzündliche Therapie selbst eine Rolle bei der Pathogenese der systemischen Osteoporose. Dies wird vor allem am Beispiel der Glukokortikoid-begünstigten Osteoporose deutlich.

Als wesentliches Bindeglied zwischen Entzündung und Knochenstoffwechsel konnte das die osteoklastäre Knochenresorption regulierende System bestehend aus dem Receptor Activator of Nuclear Factor κ B ligand (RANKL), seinem Rezeptor RANK und Osteoprotegerin (OPG) identifiziert werden. Dieses wird durch eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren, Hormonen als auch durch antiinflammatorisch eingesetzte Substanzen moduliert. Andererseits konnte durch die Hemmung von RANKL bzw. Applikation von OPG in einer Reihe von Tiermodellen ein arthritisinguzierter Knochenmasseverlust inhibiert werden. Die Kombination einer antientzündlichen Therapie mit einem direkten Effektor am RANKL/OPG-System verspricht den knochenprotektiven Effekt der antiinflammatorischen Substanz zu verstärken und potentiell negative Einflüsse auf den Knochen auszugleichen, was in dieser Arbeit untersucht werden sollte.

Methodik

Am Modell der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) der Ratte wurde der Einfluss einer kombinierten antiresorptiven Therapie mit OPG und einer antientzündlichen Therapie mit Dexamethason bzw. Methotrexat (MTX) auf die Gelenkschwellung sowie die periartikulären und axialen Knochen volumina und zellulären Knochenumbauvorgänge untersucht und mit der entsprechenden Monotherapie verglichen.

Dazu wurde bei acht Wochen alten weiblichen, unter Standardbedingungen gehaltenen Lewis-Ratten nach einer Vorimmunisierung im rechten Kniegelenk eine Monarthritis induziert. Die AIA-Ratten wurden wie folgt behandelt: Drei Monotherapiegruppen bestehend aus einer OPG-Gruppe (2,5 mg/kg/d), einer Dexamethason-Gruppe (0,25 mg/kg/d) und einer MTX-Gruppe (3 mg/kg/d) sowie zwei Kombinationsgruppen mit OPG plus Dexamethason bzw. OPG plus MTX. Die Therapie erfolgte jeweils durch intraperitoneale Applikation in

regelmäßigen Intervallen. Eine sechste Gruppe erhielt an den gleichen Tagen intraperitoneale Injektionen einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS-) als Placebothherapie. Eine weitere Tiergruppe ohne AIA diente als gesunde Kontrolle.

Während des Experimentes wurde bei allen Behandlungsgruppen in regelmäßigen Abständen die Gelenkschwellung gemessen. Nach Abschluss des Versuches wurden mittels Histomorphometrie am rechten Tibiakopf und am 3. Lendenwirbelkörper das Knochenvolumen und die zellulären Umbauparameter erfasst. Die primäre Spongiosa wurde mittels Linear scanning ausgewertet. Für die statistische Auswertung kamen der multiple Test nach Kruskal und Wallis sowie der zweiseitige Mann-Whitney U-Test zur Anwendung.

Ergebnisse und Diskussion

Die AIA führte zu einem signifikanten periartikulären und axialen Knochenmasseverlust. Die Dexamethason-Monotherapie supprimierte effektiv die Gelenkschwellung ohne den AIA-induzierten Knochenmasseverlust an der sekundären Spongiosa zu inhibieren. Die OPG-Monotherapie zeigte erwartungsgemäß keine antiinflammatorischen Effekte. Trotz Reduktion der histomorphometrischen Resorptionsparameter wurde jedoch der AIA-induzierte Knochenmasseverlust durch die OPG-Monotherapie nicht gehemmt. Dahingegen konnte unter der kombinierten Therapie mit Dexamethason und OPG sowohl die Gelenkschwellung supprimiert, als auch der periartikuläre und axiale Knochenmasseverlust inhibiert werden. In der primären Spongiosa erhöhte OPG die Trabekelanzahl, die Kombination mit Dexamethason führte dahingegen sowohl zum Anstieg der Trabekelanzahl als auch des Trabekeldurchmessers.

Die MTX-Monotherapie supprimierte die Gelenkschwellung nicht. Sowohl periartikulär als auch axial war jedoch eine Zunahme der zellulären Umbauparameter mit potenziellen Hinweisen auf eine Mineralisationsstörung zu registrieren. Die MTX-Monotherapie hatte keinen Einfluss auf das Knochenvolumen im Vergleich mit der unbehandelten Arthritisgruppe. Die Kombination von MTX mit OPG reduzierte die osteoklastäre Resorption, sodass axial der Knochenmasseverlust inhibiert wurde. An der primären Spongiosa hatte die MTX-Monotherapie keinen Effekt, in der Kombination mit OPG entsprachen die Ergebnisse der OPG-Monotherapie.

Schlussfolgerung

Durch die Kombination einer antiinflammatorischen Therapie mit einem RANKL-Inhibitor läßt sich der knochenprotektive Effekt im Modell der AIA deutlich steigern. Dies konnte vor

allem für die Kombination eines Glukokortikoids mit OPG herausgestellt werden, da durch die OPG-Therapie selbst mit einer in der Monotherapie ineffektiven Dosierung ein durch direkte und indirekte Effekte der Glukokortikoide induziertes OPG-Defizit ausgeglichen wird. Das Prinzip der Kombination eines Glukokortikoids mit einem RANKL-Inhibitor ist eine erfolgversprechende Strategie zur Prävention des Knochenmasseverlustes bei RA.

1 Einleitung

Die inflammatorischen Veränderungen bei der Rheumatoiden Arthritis sind mit einer Zerstörung von Knorpel und Knochen assoziiert. Das Krankheitsbild wird zudem durch die Folgen der periartikulären und systemischen Osteoporose kompliziert. Die Aufklärung der dafür verantwortlichen molekularen und zellulären Zusammenhänge konnte in den vergangenen Jahren entscheidend vorangetrieben werden und hat zu neuen therapeutischen Ansatzpunkten geführt, die gerade in Kombination mit den bewährten Therapiestrategien der RA erfolgversprechend erscheinen.

1.1 Rheumatoide Arthritis

1.1.1 Definition

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch systemische Erkrankung bislang ungeklärter Ätiologie, die in den betroffenen Gelenken zu Entzündung, synovialer Hyperplasie und abnormaler Immunantwort führt und in einer Zerstörung von angrenzendem Knorpel und Knochen resultiert.

Sie ist mit einer weltweiten Prävalenz von ca. 0,5-1 % die häufigste systemische Autoimmunerkrankung. In allen Altersgruppen stellen Frauen 2/3 der Erkrankten.

Der Gipfel der Neuerkrankungen liegt für Frauen zwischen 55 und 64 Jahren, bei Männern im Alter von 65-75 Jahren (Symmons 2002).

Die RA beginnt in der Regel mit einem symmetrischen Befall der kleinen Hand- und Fußgelenke. Der schubweise progrediente Verlauf mit fortschreitender Gelenkdestruktion sowie die potentielle viszerale Beteiligung können je nach Ausprägung der Krankheit zu starker Beeinträchtigung der Lebensqualität bis hin zur Invalidität führen. Statistisch gesehen ist die Lebenserwartung der Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung um 5-10 Jahre vermindert, wobei die erhöhte Mortalität auf Infekte, Nieren-, Atemwegs- und Magen-Darm-Erkrankungen zurückgeführt wird. Diese sind zum einen durch die Grundkrankheit bedingt, zum anderen Folgen der notwendigen therapeutischen Immunsuppression.

1.1.2 Klinisches Bild und Diagnose

Die Diagnose der RA beruht im Wesentlichen auf der Anamnese und der körperlichen Untersuchung, was auch in den am weitesten verbreiteten Diagnose-Kriterien des American College of Rheumatology zum Ausdruck kommt (Tabelle 1).

Tab.1: Kriterien des American College of Rheumatology zur Klassifikation der Rheumatoiden Arthritis, 1987 überarbeitete Version (Arnett et al., 1988).

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">• Morgensteifigkeit mit einer Dauer von mindestens einer Stunde• Arthritis in drei oder mehr Gelenkregionen• Arthritis an Hand- oder Fingergelenken• Symmetrische Arthritis (gleichzeitiger beidseitiger Befall der gleichen Gelenkregion)• Subkutane Rheumaknoten• Rheumafaktornachweis• Typische radiologische Veränderungen an Hand- und Fingergelenken |
|--|

Die Symptome der Synovitis (1-4) müssen mindestens 6 Wochen bestehen. Wenn vier der sieben Kriterien erfüllt sind, kann die Diagnose gestellt werden.

Die Ätiologie der Erkrankung ist unbekannt. Neben exogenen Faktoren wird eine genetische Prädisposition diskutiert, was durch vergleichende Studien an monozygoten und heterozygoten Zwillingen untermauert wird (Aho et al. 1986). HLA-DR4 und HLA-DR1, Genprodukte des MHC-Komplexes, prädisponieren zur RA und sind mit schweren Krankheitsverläufen assoziiert (Villiger und Bühlmann 1999).

1.1.3 Immunpathogenese

Eine gängige Hypothese besagt, dass bei genetischer Prädisposition im Rahmen einer fehlgeleiteten Immunreaktion eine komplexe Sequenz immunologischer und entzündlicher Vorgänge in Gang gesetzt wird, die die normalen Kontrollmechanismen der Selbsttoleranz unterlaufen. Man geht davon aus, dass es initial zur Präsentation eines bisher unbekanntes Antigens auf antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen, synoviale Fibroblasten) kommt, die durch Interaktion mit dem passenden Rezeptor der T-Lymphozyten (TCR) zur Zellaktivierung und klonalen Expression von spezifischen T-Lymphozyten führt. Es kommt über Zell-Zellkontakte und freigesetzte Zytokine (v.a. IFN- γ) der T-Zellen zur Proliferation von B-Zellen, Antikörperbildung und zur Monozytenaktivierung. Über verschiedene lokal freigesetzte Mediatoren wird eine Migration von Entzündungszellen ins Gelenkkompartiment in Gang gesetzt. Die Akkumulation von Entzündungszellen im Gelenk führt v.a. über von Makrophagen sezerniertes TNF- α und IL-1 zur Aktivierung ortsständiger

Zellen wie Synovialzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Osteoklasten, die ihrerseits durch Freisetzung von weiteren Zytokinen und von Enzymen den Entzündungsprozess amplifizieren. Eine Vielzahl von Immunreaktionen und Entzündungsvorgängen führt zur Chronifizierung des Prozesses (Villinger und Bühlmann 1999).

1.1.4 Histologie

Histologisch lassen sich bei der RA dramatische Veränderungen der Gelenkinnenhaut nachweisen. Die gesunde Synovialis besteht aus einer gelenkseitigen, 1-2 Zellschichten umfassenden Intima, die die Gelenkflüssigkeit produziert, und einer tiefen Bindegewebsschicht, der zellarmen Subintima. In der Intima unterscheidet man Synovialzellen Typ A (makrophagenähnlich) und Typ B (fibroblastenähnlich). Bei der RA baut sich durch Hyperplasie der Zellen eine bis auf 10 Zellschichten verdickte Intima auf. Eine Subpopulation der Typ B Synoviozyten weist morphologische Veränderungen auf und wird als transformierte synoviale Fibroblasten bezeichnet. Da diese Zellen vermehrt im Bereich der Knorpelinvasion gefunden werden, vermutet man eine Beteiligung an der Gelenkzerstörung (Fassbender 1983). In der Subintima kommt es zur Neovaskularisation und Infiltration mit Monozyten, Plasmazellen und B- und T-Lymphozyten, die durch Produktion von Entzündungsmediatoren zur Synovialitis in Gelenken, aber auch in Bursen und Sehnenscheiden führen. Neben diesen auch bei anderen entzündlichen Gelenkerkrankungen vorkommenden Veränderungen, ist für die RA die Ausbildung des sog. Pannus charakteristisch, eines mesenchymalen Proliferationsgewebes der Synovialis, das ein weitgehend autonomes Wachstum aufweist. Die metabolisch hochaktiven Zellen sezernieren katabole Enzyme (Metalloproteinasen) die zur Destruktion des Gelenkknorpels führen. Beginnend im Insertionsbereich der Gelenkkapsel, in dem der Knochen nicht durch Knorpel überdeckt ist, kommt es durch invasiv-destruktives Wachstum des Pannus zu radiologisch als Knochenusuren darstellbaren Knochenerosionen (Villinger und Bühlmann 1999).

1.2 Osteoporose

Neben den beschriebenen Affektionen des Knochens im Bereich des Pannus kommt es bei der RA häufig zur Ausbildung einer systemischen Osteoporose.

Die Osteoporose stellt eine systemische Skeletterkrankung dar, die durch unzureichende Knochenfestigkeit charakterisiert wird, welche zu einem erhöhten Frakturrisiko prädisponiert.

Die Knochenfestigkeit spiegelt dabei primär das Zusammenwirken von Knochendichte und Qualität wider (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis 2001).

Die von der WHO 1994 veröffentlichten diagnostischen Richtlinien definieren einen um mehr als -2,5 SD vom Mittelwert der sog. peak bone mass abweichenden Mineralgehalt in der Knochendichtemessung als Osteoporose. Bestehen zusätzlich bereits eine oder mehrere Wirbelfrakturen oder gehen andere Frakturen aus der Anamnese hervor, wird eine fortgeschrittene (manifeste) Osteoporose festgestellt. Bei Abweichungen um mehr als -1,0 SD und weniger als -2,5 SD spricht man von Osteopenie.

Weibliche RA Patienten zeigen in ca. 40 % der Fälle eine Osteopenie, in ca. 20 % eine Osteoporose (Sinigaglia L et al. 2000). Bereits im ersten Erkrankungsjahr läßt sich ein 10 %iger Knochenmasseverlust nachweisen (Gough et al. 1994). Das relative Frakturrisiko von männlichen RA-Patienten mit schweren Bewegungseinschränkungen wird mit 1,3, das von weiblichen mit 1,2 angegeben (Holtmann I et al. 2007)

Die Osteoporose im Rahmen der RA muß als multifaktorielle und pathogenetisch heterogene Erkrankung aufgefaßt werden. Dabei kommt es neben einer gelenknah auftretenden Osteoporose, die auch in die röntgenologischen Diagnosekriterien der RA Eingang gefunden hat, zu einem systemischen Knochenmasseverlust (Goldring and Gravalles 2000). Die Ursachen für die Ausprägung der generalisierten Form sind vielfältig und der Einfluss einzelner Risikofaktoren schwer voneinander abzugrenzen. Hierzu zählen neben den unmittelbar mit der Entzündung assoziierten Vorgängen, insbesondere dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine, die Folgen der Immobilisation durch funktionelle Defizite und Schmerzen, Störungen auf hormoneller Ebene (Vitamin D - Metabolismus, veränderte Glukokortikoid- und Androgensekretion), Folgen systemischer Manifestationen (z.B. Niereninsuffizienz infolge Amyloidose) und nicht zuletzt Medikamentennebenwirkungen (Oelzner 2001). Eine entscheidende Rolle spielt unter diesen Faktoren die Therapie mit Glukokortikoiden. Seit einiger Zeit werden weitherhin auch negative Auswirkungen verschiedener Basistherapeutika auf den Knochen diskutiert.

Die periartikuläre Osteoporose ist vordergründig durch die Entzündung per se bedingt. Sie gehört zu den Frühzeichen der RA.

Beiden Formen der Knochenaffektion bei der RA ist ein Disäquilibrium von Knochenformation und -resorption gemeinsam.

Pathogenetische Aspekte des Knochenstoffwechsels

Für das Verständnis der Pathogenese einer Osteoporose ist die Kenntnis der Vorgänge beim sogenannten *Remodeling* essentiell.

Auch nach Abschluss des Längenwachstums finden im Skelett physiologische Knochenumbauprozesse statt, die man als *bone remodeling* bezeichnet und die es dem Knochen ermöglichen, sich den wechselnden mechanischen Anforderungen optimal strukturell anzupassen. Auf zellulärer Ebene stehen Osteoblasten als knochenaufbauende Zellen und Osteoklasten als knochenabbauende Zellen in kontrolliertem Wechselspiel. Der Zyklus des Remodeling findet in den von Frost und Parfitt beschriebenen sog. bone multicellular units (BMU) statt (Frost 1969). Er beginnt mit der Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen zu Osteoklasten durch die Interaktion mit Zellen der Osteoblastenreihe. Es folgt die kurze Resorptionsphase durch aktive Osteoklasten, die mit deren Apoptose endet. Daran schließt sich eine längere Formationsphase mit Produktion der Knochenmatrix durch Osteoblasten an. Diese wandeln sich anschließend entweder zu flachen lining cells um, werden zu in Knochen eingemauerten Osteozyten oder unterliegen ebenfalls der Apoptose.

Eine große Anzahl lokaler Wachstumsfaktoren und Zytokine sowie systemisch wirksamer Hormone greift regulierend in den Prozeß des Remodeling sowohl über die Differenzierung der osteoblastären wie der osteoklastären Linie ein. Imbalancen in diesem fein regulierten, gekoppelten System von Resorption und Formation können zur Osteoporose auf der einen und Osteopetrose auf der anderen Seite führen. Störungen im Remodelingprozeß manifestieren sich zuerst am trabekulären Knochen, da er über eine größere Oberfläche mit mehr Umbauzonen verfügt als kortikaler Knochen. Die Resorptionsphase dauert beim Menschen im trabekulären Knochen 43 Tage, während die Formationsphase mit 145 Tage wesentlich mehr Zeit beansprucht (Eriksen et al. 1994).

Eine Osteoporose kann einerseits durch ein Überwiegen des osteoklastären Abbaus gegenüber dem osteoblastären Anbau (High-turnover-Osteoporose) oder andererseits durch einen verminderten Anbau bei normalem osteoklastären Abbau (Low-turnover-Osteoporose) entstehen.

Bei den meisten Osteoporoseformen stellt eine Steigerung der osteoklastären Resorption den wesentlichen Pathomechanismus dar (Raisz 2005). Diese kann Folge einer Beschleunigung der Osteoklastendifferenzierung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen, einer gesteigerten

Fusion und Aktivierung sowie einer extendierten Lebensspanne infolge Hemmung der Apoptose von Osteoklasten sein.

Die Entdeckung und Charakterisierung des für die Osteoklastenzellbiologie essentiellen Zytokinsystems Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL) (Anderson et al. 1997, Wong et al. 1997, Lacey et al. 1998, Yasuda et al. 1998b), seines Rezeptors, Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (RANK) (Anderson et al. 1997, Li et al. 2000) und des löslichen Decoy- Rezeptors Osteoprotegerin (OPG) (Simonet et al. 1997, Yasuda et al. 1998a) führten zu einem neuen molekular- und zellbiologischen Konzept des Knochenstoffwechsels.

1.3 Das RANKL/RANK/OPG-System

RANKL ist ein Zytokin der TNF-Familie, das in einer membrangebundenen und einer löslichen Form in einer Reihe von Geweben nachgewiesen werden konnte. In hohem Maße wird er auf T-Lymphozyten und Zellen der osteoblastären Reihe exprimiert. In der Anwesenheit von M-CSF stimuliert RANKL in vitro die Differenzierung, Proliferation, Fusion und Aktivierung von Vorläuferzellen zu Osteoklasten und supprimiert deren Apoptose (Kong et al. 1999a). Dies führt zu einer erhöhten Anzahl funktionstüchtiger Osteoklasten und gesteigerter Knochenresorption. Die essentielle Bedeutung von RANKL für die Osteoklastogenese wird am Modell der RANKL-knockout-Maus besonders deutlich. Durch das Fehlen maturer Osteoklasten weisen die Tiere eine schwere Osteopetrose und eine defekte Zahnentwicklung auf. Weiterhin ließen sich Störungen der frühen T- und B-Zell Differenzierung, fehlende Lymphknoten und eine gestörte Thymusdifferenzierung nachweisen (Kong et al. 1999a).

RANKL entfaltet seine biologischen Effekte über Bindung an seinen membranständigen Rezeptor RANK, der vor allem auf Osteoklasten und deren Vorläuferzellen, Dendritischen Zellen (DC), B- und T-Lymphozyten exprimiert wird. Deletion von RANK führt bei Mäusen zu einem identischen Phänotyp wie bei RANKL defizienten Tieren (Dougall et al. 1999, Li et al., 2000).

Die Signaltransduktion ist komplex und umfaßt eine Vielzahl von Faktoren. Mit der Bindung des Liganden an RANK werden Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierte Faktoren (TRAF) aktiviert, unter denen vor allem TRAF 6 eine besondere Rolle spielt (Darnay et al. 1999). TRAF 6 setzt divergente Signalkaskaden in Gang. Diese umfassen den c-Jun N-terminal kinase / c-fos / c-jun Pathway und Nuclear Factor κ B (NF- κ B) die zur Differenzierung und

Aktivierung der Osteoklasten führen. Eine weitere Kaskade führt zur Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase Akt/PKB, welche antiapoptotisch wirksam ist (Hofbauer and Heufelder 2001b).

OPG ist ein löslicher Decoy-Rezeptor aus der TNF-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie. Er blockiert durch Bindung sowohl der löslichen als auch der zellgebundenen Form von RANKL die Interaktion mit RANK und kann somit die Osteoklastogenese hemmen (Simonet et al. 1997, Tsuda et al. 1997). OPG-mRNA wird von einer Vielzahl von Geweben exprimiert, außerhalb des Skelettsystems bei Erwachsenen vor allem in Herz, Lunge und Nieren (Yasuda et al. 1998a). OPG wird als 401 Aminosäuren umfassendes Propeptid gebildet und durch posttranskriptionale Modifikation in die mature Form aus 380 Aminosäuren überführt. Das zunächst als Monomer synthetisierte Glykoprotein wird als über Disulfidbrückenbindung gebundenes Homodimer in den Extrazellulärraum sezerniert (Yasuda et al. 1998a).

Die Überexpression von OPG in transgenen Mäusen führte zu einer Inhibition der Osteoklastogenese, der Zellaktivität der Osteoklasten und der Knochenresorption mit daraus resultierender Osteopetrose (Simonet et al. 1997). Im Gegensatz dazu wurden bei OPG-defizienten Tieren eine schwere Osteoporose und Kalzifizierungen der Aorta und der Nierenarterien beobachtet (Bucay et al. 1998, Mizuno et al. 1998).

Im Immunsystem spielt das RANK/RANKL/OPG System neben der Bedeutung für die frühe Entwicklung und Maturation von Prä-B und Prä-T-Zellen im Knochenmark und Thymus, wie im Modell der knockout Tiere deutlich geworden, eine entscheidende Rolle für die Interaktion zwischen DCs und T-Zellen. DCs sind in der Lage RANK zu exprimieren. Dessen Aktivierung durch RANKL führt über eine Hemmung der Apoptose der DCs zu einer verlängerten Überlebenszeit und somit zu einer verstärkten DC-induzierten T-Zell Proliferation (Wong et al. 1999).

In den letzten Jahren wurde das RANK/ RANKL/OPG System auf der Basis umfangreicher in vitro-Untersuchungen, tierexperimenteller und klinisch-epidemiologischer Studien als pathophysiologische Grundlage einer Vielzahl verschiedener Knochenerkrankungen diskutiert. Ein erhöhter RANK/OPG Quotient als Ausdruck einer Imbalance der hemmenden und stimulierenden Komponenten der Osteoklastogenese wurde bei verschiedenen Osteoporoseformen nachgewiesen (Hofbauer et al. 2004).

Seine besondere Eigenschaft als molekulares Bindeglied zwischen Immunsystem und Knochenstoffwechsel machte eine entscheidende Rolle dieses Zytokinsystems in der

Pathogenese von Osteoporose und periartikulärer Knochendestruktion bei RA wahrscheinlich und bot einen neuen Angriffspunkt für die Therapie.

In einer Reihe wegweisender Untersuchungen in *in vitro* und *in vivo* Modellen konnte nachgewiesen werden, dass aktivierte T-Zellen im Gegensatz zu ruhenden T-Zellen in der Lage sind, RANKL zu exprimieren (Kong et al. 1999b). RANKL aktiviert daraufhin RANK, der auf Zellen der Osteoklastenreihe und DCs exprimiert wird. Gesteigerte Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivität führt zum Verlust von Knochenmasse. Es wird weiterhin vermutet, dass eine RANK vermittelte Hemmung der Apoptose von DCs über eine Steigerung der DC getriggerten T-Zell-Aktivierung einen Einfluss auf die Initialisierung und Fortdauer der synovialen Entzündungsreaktion haben könnte (Hofbauer and Heufelder 2001a)

Mittels immunhistochemischer Untersuchungen und der *in-situ*-Hybridisierung konnten in der entzündeten Synovia von RA-Patienten RANKL-exprimierende T-Lymphozyten dargestellt werden. Es zeigte sich außerdem, dass Osteoklasten des Pannus gerade in den Bereichen den Knochen invadieren, in denen die RANKL-Expression am ausgeprägtesten ist (Gravallese et al. 2000).

Der gesteigerten RANKL Produktion durch T-Zellen und Synovialfibroblasten im entzündeten Gelenk von RA- Patienten stehen dahingegen unverhältnismäßig niedrige OPG-Spiegel gegenüber, die zu einer Erhöhung des RANKL/OPG Quotienten führen (Hofbauer and Heufelder 2001b).

Neben den beschriebenen Mechanismen der Knochenresorption scheint bei der RA aber auch eine Inhibition der Knochenformation von wesentlicher pathophysiologischer Bedeutung zu sein. Im Gegensatz zu anderen inflammatorischen (z.B. den Spondylarthropathien) oder auch degenerativen Gelenkerkrankungen treten bei der RA in der Regel keine Osteophyten auf. Es lassen sich zwar Osteoblasten im Bereich von Knochenerosionen bei der RA nachweisen, diese scheinen jedoch funktionell inaktiv zu sein (Zwerina et. al 2006). Man vermutet, dass die Hemmung der Knochenformation wesentlich über Interaktionen am sog. Wnt-pathway vermittelt wird. Der Wnt-pathway spielt eine entscheidende Rolle in der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblastenvorläufern und deren Reifung zu Osteoblasten. Im Arthritisgelenk im Tiermodell der TNF transgenen Maus konnte eine Überexpression von Dickkopf 1 (DKK-1), eines Inhibitors des Wnt-pathway, nachgewiesen werden (Diarra 2007). Man konnte außerdem sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen, dass proinflammatorische

Zytokine u.a. TNF- α die DKK-1-Expression steigern (Diarra 2007). Dadurch wird der Wnt-pathway und damit die Osteoblastendifferenzierung und -funktion gehemmt.

Indirekt kommt es damit aber auch zur Reduktion von OPG, das von Osteoblasten produziert wird, was somit die Knochenresorption fördert. Durch die Blockade von DKK-1 durch entsprechende Antikörper konnten im TNF transgenen Mausmodell sowohl die Ausbildung von Osteophyten als auch eine Hemmung der Knochenresorption gezeigt werden (Diarra 2007)

1.4 Experimentelle Arthritismodelle

Zur Erforschung der Pathomechanismen der RA und zur Erprobung neuer Pharmaka stehen verschiedene Arthritismodelle zur Verfügung. Aufgrund der Komplexität der molekularen und zellulären Wechselwirkungen und der nach wie vor ungeklärten Ätiologie können diese Modelle immer nur Teilaspekte der Erkrankung darstellen.

Man unterscheidet unter den experimentellen Modellen induzierte und spontan auftretende Erkrankungen. Zur ersten Gruppe zählen die Adjuvans Arthritis (induziert durch subkutane Injektion von Mykobakterium tuberculosis), die Antigen-induzierte Arthritis und die Kollagen-induzierte Arthritis (intradermale Injektion von Kollagen Typ 2). Die zweite Gruppe stellen die spontan auftretenden Arthritiden in transgenen- oder knockout-Tiermodellen dar, zu der z.B. das HLA-B27 transgene Rattenmodell, das MRL Ipr/Ipr Mausmodell oder das TNF-transgene Mausmodell zählen.

Antigen-induzierte Arthritis (AIA)

Bei der AIA handelt es sich um eine Monarthritis des Kniegelenkes der Ratte, die nach wiederholter subkutaner Immunisierung mit methyliertem bovines Serumalbumin (mBSA) in komplettem Freudschem Adjuvans durch intraartikuläre Injektion von mBSA ausgelöst wird (Bräuer 1994b). Dabei wird das akute Entzündungsgeschehen durch lokale Immunkomplexbildung zwischen zirkulierenden Antikörpern und dem Antigen im Rahmen einer Arthus-Reaktion und darauf folgender Komplementaktivierung initiiert. Auf die akute Phase der Arthritis folgt die Chronifizierung, die mit synovialer Hyperplasie, entzündlicher Infiltration der Synovialis, Knorpeldestruktion und periartikulärer Osteoporose viele Charakteristika der RA aufweist, und sich daher gut zur parallelen Untersuchung von entzündlicher Aktivität, Gelenkdestruktion und Knochenveränderung unter standardisierten Bedingungen eignet (Oelzner 2001).

Die Veränderungen der periartikulären und gelenkfernen Knochenstruktur während der Entzündung und deren pharmakologische Beeinflußbarkeit wurden mittlerweile in mehreren Arbeiten untersucht. Circa vier Wochen nach Induktion der Monarthrit im Kniegelenk zeigt sich in der proximalen Tibia eine deutliche Reduktion des Spongiosavolumens. Am gelenkfernen Knochen ist ebenfalls ein Knochenmasseverlust nachweisbar, der jedoch wesentlich geringer ausgeprägt ist (Oelzner 2001, Neumann 2006).

1.5 Ziele der Arbeit

Das RANKL/OPG-System spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Osteoporose im Rahmen der RA. Im Modell der AIA wurde der Effekt einer OPG-Therapie auf die Entzündung sowie den periartikulären und gelenkfernen Knochenmasseverlust bereits untersucht (Neumann 2006). Die Ergebnisse zeigten keinen Effekt von OPG auf die Gelenkentzündung und Destruktion. Am periartikulären Knochen konnte OPG den Knochenmasseverlust zwar reduzieren, das Niveau der gesunden Tiere wurde aber nicht erreicht. Axial zeigte sich unter OPG ein verminderter Knochenumbau ohne Einfluss auf das Knochenvolumen.

Andererseits konnte im Modell der AIA auch durch eine effektive antientzündliche Therapie mit Dexamethason der Knochenmasseverlust nur teilweise inhibiert werden (Oelzner 2001).

In dieser Untersuchung soll daher der Einfluss einer kombinierten antiinflammatorischen und antiresorptiven Therapie mit OPG auf die Arthritis-assoziierten Veränderungen am periartikulären und gelenkfernen Knochen im Modell der AIA untersucht werden. Dabei sollen als antiinflammatorische Substanzen Dexamethason sowie Methotrexat zum Einsatz kommen.

Die Fragestellung dieser Arbeit lassen sich somit wie folgt präzisieren:

1. Welchen Einfluss hat die kombinierte Therapie mit OPG und Dexamethason auf die entzündungsassoziierten Veränderungen am periartikulären sowie gelenkfernen Knochen bei der AIA im Vergleich zu einer OPG- bzw. Dexamethason-Monotherapie? Ist durch die Kombination der arthritische Knochenmasseverlust aufzuhalten?
2. Welchen Einfluss hat die Kombination OPG und MTX auf die Veränderungen am periartikulären und axialen Knochen im Vergleich zu einer entsprechenden Monotherapie?
3. Lassen sich potenziell ungünstige Effekte der antientzündlichen Therapie auf den Knochen durch OPG antagonisieren?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Medikamente

Für die Immunisierung und Induktion der Arthritis wurden verwendet:

- methyliertes bovines Serum Albumin (mBSA) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- komplettes Freud'sches Adjuvans (Sigma), supplementiert mit 2 mg/ml Mycobakterium tuberculosis Stamm H37RA (Difco, Detroit, MI, USA)

Die Behandlung der Tiere erfolgte mit:

- rekombinantem Osteoprotegerin (Fusionsprotein aus murinem OPG und Fc-Domäne eines humanen Immunglobulins) (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA)
- Dexamethason (Fortecortin Injekt 4 mg, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Methotrexat (Metex 10 mg/ml, medac, Hamburg, Deutschland)

Zur Fixierung der Knochen wurde verwendet:

- Aceton (Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland)

Die Infiltration und Einbettung erfolgte mittels:

- Technovit® 9100 NEU (ein kommerzielles Polymerisationssystem auf der Basis von Methylmethacrylat speziell zur Einbettung von mineralisierten Geweben in der Lichtmikroskopie (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG Bereich Kulzer/Wehrheim, Deutschland))

2.1.2 Versuchstiere:

Für die Untersuchungen wurden 59 1-2 Monate alte, weibliche Lewis Ratten verwendet (Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen (12/12 Stunden Hell/Dunkel-Zyklus). Futter (Altromin #1326, Lage, Deutschland) und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

Eine Genehmigung der Tierversuche durch das Thüringer Landesverwaltungsamt lag vor.

2.2 Methoden

2.2.1 Immunisierung und Induktion der Arthritis

Acht Tiere dienten als gesunde Kontrollgruppe (gesunde Tiere). Die verbleibenden 51 wurden an den Tagen 21 und 14 vor Induktion der Arthritis durch subkutane Applikation von 0,5 mg mBSA, in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung und 0,5 ml komplettem Freund'schem Adjuvans immunisiert.

Die Arthritis wurde am Tag 0 durch intraartikuläre Injektion von 0,5 mg mBSA in 50 µl steriler phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) in das rechte Kniegelenk ausgelöst. In das linke Knie wurde das gleiche Volumen physiologischer Kochsalzlösung injiziert, um einen intraindividuellen Vergleich der beiden Gelenke zu ermöglichen.

2.2.2 Versuchsgruppen

Zur Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit wurden die Versuchstiere randomisiert folgenden Gruppen zugeteilt:

- PBS-Kontrollgruppe (n=9): intraperitoneale Injektion von 200 µl PBS/d ohne Wirkstoff
- Osteoprotegerin (OPG)-Gruppe (n=8)
- Methotrexat (MTX)-Gruppe (n=8)
- MTX-OPG-Gruppe (n=8)
- Dexamethason (DXA)-Gruppe (n=10)
- DXA-OPG-Gruppe (n=8)
- Gesunde Tiere (n=8)

Dosierungen und Applikationsintervalle sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Therapieregime der Gruppen mit AIA

Gruppe	Medikation	Dosis	Verabreichungszeitpunkt
1	PBS	200 µl	nach 3 h und am Tag 1, 3, 6, 8, 11, 14, 17
2	OPG	2,5 mg/kg in 200 µl	nach 3 h und am Tag 1, 3, 6, 8, 11, 14, 17
3	MTX	3 mg/kg in 200 µl	am Tag 1, 8, 15
4	MTX OPG	3 mg/kg in 200 µl 2,5 mg/kg in 200 µl	am Tag 1, 8, 15 nach 3 h und am Tag 1, 3, 6, 8, 11, 14, 17
5	Dexamethason	0,25 mg/kg in 200 µl	nach 3 h und am Tag 1, 2, 3, 5, 8, 11, 14, 17
6	Dexamethason OPG	0,25 mg/kg in 200 µl 2,5 mg/kg in 200 µl	nach 3 h und am Tag 1, 2, 3, 5, 8, 11, 14, 17 nach 3 h und am Tag 1, 3, 6, 8, 11, 14, 17

2.2.3 Messung von Gewicht und Gelenkschwellung

An den Tagen 0, 1, 2, 3, 5, 6, 8, 11, 14, 17 und 20 wurde der medio-laterale Durchmesser beider Kniegelenke mittels eines Vernier Calpier bestimmt. Als Maß für die Gelenkschwellung wurde die Differenz zwischen dem Arthritisgelenk und dem kontralateralen Kontrollgelenk als relative Gelenkschwellung berechnet und in Millimetern angegeben.

2.2.4 Präparation des Wirbelkörpers und des rechten Tibiakopfes

Die Präparation der Versuchstiere erfolgte mit herkömmlichen chirurgischen Instrumenten im tierexperimentellen Labor des Pathologischen Institutes der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Am Tag 20 nach Arthritisinduktion wurden den Tieren in Äthernarkose die Carotiden durchtrennt und der 1. und 2. Halswirbelkörper disloziert. Thorax und Abdomen wurden eröffnet, die inneren Organe entnommen und die Wirbelsäule zwischen der Brustwirbelsäule und den Hüftgelenken präpariert. Der dritte Lendenwirbelkörper wurde aufgesucht, aus den Muskeln und Bändern herausgelöst und die zugehörigen Disci intervertebrales durchtrennt. Um das Eindringen von Fixierungs- und Einbettungsmedien in den Wirbelkörper zu ermöglichen, wurde der Pediculus arcus beidseitig eröffnet.

Am rechten Kniegelenk wurden Haut und Muskulatur oberhalb und weit unterhalb des Gelenkes entfernt und die Kniegelenksbänder sowie die Fibula nahe ihrer Verbindungsstelle zur Tibia durchtrennt. Daraufhin wurden mittels eines rotierenden Sägeblattes Tibia und Femur ca. 2 cm distal bzw. proximal des Gelenkes abgetrennt.

2.2.5 Fixierung und Einbettung des Knochens

Die Knochen wurden direkt nach Präparation in Aceton für 24 Stunden fixiert. Die weitere Aufbereitung erfolgte im Osteologischen Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin Jena mittels eines kommerziell erhältlichen Einbettungssystems für mineralisiertes Gewebe (Technovit 9100 NEU, Heraeus). Dabei findet eine chemische Polymerisation unter Sauerstoffausschluß mit Hilfe eines Katalysatorsystems aus Peroxid und Amin statt. Zusätzliche Komponenten ermöglichen eine gesteuerte Polymerisation bei Kälte. Vorbehandlung, Präinfiltration, Infiltration und Polymerisation wurden gemäß Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.2.6 Schnittherstellung, Entplasten und Färbung

Die Tibia- und Wirbelkörperschnitte wurden mit einem Hartschnittmikrotom „Polycut S“ der Firma Reichert und Jung, Arnsberg, Deutschland hergestellt. Dabei wurden in jeweils vergleichbaren Schnittebenen von Wirbelkörpern und Tibia 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf mit Chromalaungelatine beschichtete Objektträger aufgebracht und mit 80%igem Alkohol versetzt. Anschließend wurden die Schnitte gestreckt, mit OP-Folie bedeckt und mit einer kleinen Gummiwalze festgerollt. Die Objektträger wurden nun mit Bleigewichten beschwert und über 24 h im Brutschrank bei 37 °C getrocknet.

Vor dem Färben wurde das polymerisierte Einbettungsmedium entfernt. Dazu wurden die Schnitte für mindestens 1½ Stunden in Toluol eingebracht. Nach den Zwischenschritten Toluol-Alkohol 1:1, absoluter Alkohol, 90%iger Alkohol, 70%iger Alkohol, 40%iger Alkohol erfolgte die Überführung in Aqua dest.

Die Schnitte wurden nach Masson-Goldner (Modifikation nach Malluche) in einer Handfärbereihe gefärbt. Diese Färbung ermöglicht eine exakte Differenzierung zwischen mineralisierten (blau) und nichtmineralisierten Strukturen (rot) sowie eine ausreichende Identifikation der zellulären Parameter.

2.2.7 Histomorphometrie des Knochens

Die Methode der Volumenberechnung aus der Flächenausdehnung und der Oberflächenberechnung aus der Längenausdehnung eines Körpers im histologischen Schnitt geht auf das 1866 von DELESSE beschriebene Prinzip zurück. Von Merz (1967) wurde dieses Verfahren auf die Spongiosa des Knochens angewendet. Das von ihm entwickelte Zählnetz besteht aus 6 halbkreisförmigen Wellenlinien und 36 Punkten (Treffern). Volumenparameter werden durch die Anzahl der Punkte auf der Schnittfläche der betreffenden Struktur und Oberflächenparameter durch die Anzahl der Schnittpunkte der Wellenlinien mit der jeweiligen Oberfläche quantifiziert. Dabei zählt man in 200-facher Vergrößerung die Treffer mit dem mineralisierten Knochen und dem Osteoid. Außerdem wird die Schnittpunktzahl der Wellenlinien mit der osteoidbedeckten Knochenoberfläche (mit und ohne Osteoblasten), mit Howshipschen Lakunen (mit und ohne Osteoklasten) und mit inaktiver Spongiosaoberfläche ermittelt. Die Gesamtschnittpunktzahl der Kurvenscharen mit der Knochenoberfläche ergibt sich als Summe der drei letztgenannten. Pro Feld werden zusätzlich die Osteoklasten gezählt.

In der vorliegenden Untersuchung wurde auf die Einbeziehung der Schnittpunkte mit Howshipschen Lakunen ohne Osteoklasten in die Analyse aus Gründen der Meßgenauigkeit verzichtet.

2.2.7.1 Lendenwirbelkörper

Dem Meßort kommt bei der Bewertung struktureller Veränderungen der Spongiosa eine entscheidende Bedeutung zu. Sowohl Spongiosavolumen als auch Trabekeldurchmesser des Lendenwirbelkörpers erreichen epiphysennah und in den lateralen Anteilen höhere Werte als im Spongiosazentrum. Daher wurde das Meßfeld so definiert, dass die epiphysen- und corticalisnahen Bereiche ausgeschlossen wurden. Als Abstand von der Epiphysenfuge wurde 1 mm gewählt. Dieser wurde mit Hilfe der Kantenlänge des Zählnetzes in 100-facher Vergrößerung (entspricht 500 µm) ermittelt. Das verbleibende relativ homogene Meßfeld im Spongiosazentrum wurde mäanderförmig ausgezählt.

2.2.7.2 Tibiakopf

Bei der Tibia nimmt die Knochendichte von der Epiphysenfuge aus nach distal kontinuierlich ab und geht schließlich in das Fettmark über. Analog zum Wirbelkörper nimmt sie in Corticalisnähe zu.

Am wachsenden langen Röhrenknochen befindet sich zwischen Epiphyse und Metaphyse die Wachstumsfuge, die das Längenwachstum ermöglicht. In diesem Bereich findet die sog. enchondrale Ossifikation statt, bei der chondrale in ossäre Strukturen umgewandelt werden. Dabei werden in der Knorpelmatrix zuerst knorpelartige Kollagen Typ II Fasern mineralisiert, so dass sich Verkalkungszonen bilden, die zum Teil von Chondroblasten wieder resorbiert werden. Entlang der Reste der verkalkten Knorpelmatrix bilden aufgelagerte Osteoblasten organische Knochenmatrix, das Osteoid. Dieses wird mineralisiert und stellt mit den restlichen Einschlüssen von Knorpelmatrix die primäre Spongiosa dar.

Durch Abbau der primären Spongiosa und Umbau in lamellärgeschichtete, knorpelfreie Knochenbälkchen entsteht weiter distal der Epiphyse die sekundäre Spongiosa. Die sekundäre Spongiosa wurde mittels der beschriebenen konventionellen Hisomorphometrie analysiert, da hier die Knochenumbauvorgänge denen von erwachsenen Tieren entsprechen. Die primäre Spongiosa wurde im Linear scanning Verfahren untersucht.

2.2.8 *Linear scanning*

Die primäre Spongiosa wird proximal von der Epiphysenfuge begrenzt und geht ca. 1000 μm distal in die sekundäre Spongiosa über, von der sie anhand morphologischer Kriterien (Vorhandensein von Knorpelkernen) abgegrenzt werden kann (Ma et al. 1995, Murakami et al. 1995). Der Gradient der Knochenmineralisation mit zunehmendem Anteil mineralisierten Knochens nach distal von der Epiphysenfuge macht es erforderlich, entsprechende Strukturen im gleichen Abstand von der Wachstumsfuge zu analysieren. In dieser Untersuchung wurde die Methode des Linear Scanning angewandt, die von Erben 1990 entwickelt wurde (Erben et al. 1990). Bei dieser Methode wird eine Meßlinie bänderförmig parallel zur Wachstumsfuge durch die Metaphyse geführt und dabei die darunterliegenden Strukturen vermessen.

In dieser Untersuchung wurden mit einem Axioplan-Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) histologische Präparate erfaßt und mit einer speziellen Softwareapplikation des halbautomatischen Bildanalyseystems KS 300 (Carl-Zeiss Jena) ausgewertet. Dabei wurde im ersten Schritt mit dem Kurser distal der letzten geschlossenen Knorpelzellschicht eine Linie eingezeichnet. Die Länge dieser Linie wurde erfaßt und gespeichert. Daraufhin erfolgte automatisch eine parallele Verschiebung der Linie im definierten Abstand von 16 μm in insgesamt 65 Einzelschritten nach distal durch das Präparat. An jeder Position ermittelte die Software die Summe aller Teilstrecken der Linie auf mineralisierten Strukturen sowie die Anzahl der geschnittenen Trabekel und speicherte diese mit Zuordnung zum Abstand von der Ausgangslinie (Vielfaches von 16 μm). Aus den gemessenen Parametern wurden Trabekelanzahl, -durchmesser und mineralisierter Knochenanteil berechnet.

2.2.9 *Gemessene und berechnete Parameter*

Bei den konventionellen histomorphometrischen Untersuchungen wurden nach Delling (1975) folgende Werte ermittelt:

F	Zahl der gemessenen Felder
P	Treffer mineralisierter Knochen und Osteoid
Po	Treffer Osteoid
I	Gesamtschnittpunktzahl der Kurvenschar mit der trabekulären Knochenoberfläche
Iob	Schnittpunkte Osteoid mit Osteoblasten
Iio	Schnittpunkte Osteoid ohne Osteoblasten

Iho	Schnittpunkte Howshipsche Lakunen mit Osteoklasten
Nocl	Anzahl der Osteoklasten

Folgende Parameter wurden berechnet:

1. Spongiosavolumen (Bone volume): $BV / TV = \frac{P * 100}{F * 36}$ [%]

2. Osteoidvolumen (Osteoid volume): $OV / BV = \frac{Po}{P} * 100$ [%]

3. Gesamtgrenzfläche Osteoid mit und ohne Osteoblasten zum Markraum-Anbauoberfläche (Osteoid surface): $OS / BS = \frac{Iob + Iio}{I} * 100$ [%]

4. Osteoblasten-besetzte Oberfläche (Osteoblast surface): $Ob.S / BS = \frac{Iob}{I} * 100$ [%]

5. Osteoklasten-besetzte Oberfläche (Osteoclast surface): $Oc.S / BS = \frac{Iho}{I} * 100$ [%]

6. Osteoiddicke (Osteoid thickness): $O.Th = \frac{Po}{Iob + Iio} * k$ [mm]

7. Trabekeldurchmesser (Trabecular thickness): $Tb.Th = \frac{P}{I} * k$ [mm]

Netzkonstante: $k = \pi * \frac{d}{4}$ (d = 0,085)

Mit der Linear scanning Methode wurden entsprechend Erben et al. (1990) folgende Werte gemessen:

Ln.Le	Gesamtlänge der Meßlinie (Length of the line)
Md.Le	Gesamtlänge der Meßlinienteilstrecke auf mineralisierten Strukturen (Total mineralized length)
N.Tb	Anzahl der geschnittenen Trabekel (Number of trabeculae)

und mit Zuordnung zum Abstand von der Ausgangslinie (Vielfaches von 16µm) gespeichert.

Aus diesen Daten wurden folgende Parameter berechnet:

1. Trabekelanzahl (Trabecular number-linear referent): $TN = \frac{N.Tb}{Ln.Le}$ [# / mm]

2. Trabekeldurchmesser (Trabecular width-linear referent): $TW = \frac{Md.Le}{N.Tb}$ [µm]

3. Mineralisierter Anteil (total trabecular width-linear referent): $TTW = \frac{Md.Le}{Ln.Le} [\%]$

2.3 Statistische Verfahren

Die statistische Analyse wurde mit dem Statistikprogramm SPSS durchgeführt. Für die Prüfung von Unterschieden der berechneten Parameter wurden der multiple Test nach Kruskal und Wallis sowie der zweiseitige Mann-Whitney U-Test verwendet. Die Testergebnisse wurden als signifikant betrachtet, wenn $p < 0.05$ war.

3 Ergebnisse

3.1 Teil 1: Behandlung der AIA mit OPG, Dexamethason und Dexamethason und OPG in Kombination

3.1.1 Gelenkschwellung

Die AIA führte in der akuten Phase zu einer Gelenkschwellung von maximal 2,19 mm an Tag 2 nach Arthritisinduktion in der PBS-Gruppe. Die Schwellung nahm im Verlauf des Versuchs in der PBS-Gruppe bis auf 0,53 mm an Tag 20 ab. Die Behandlung mit DXA führte zu einer signifikanten Reduktion der Gelenkschwellung ab Tag 8 bis zum Ende des Versuchs. OPG zeigte keinen Einfluss auf den Verlauf der Arthritis. In der DXA+OPG-Gruppe ist die Gelenkschwellung im Verlauf des gesamten Versuchs geringer als in der PBS-Gruppe, der Unterschied ist aber erst an Tag 17 und 20 signifikant (Abb. 1a).

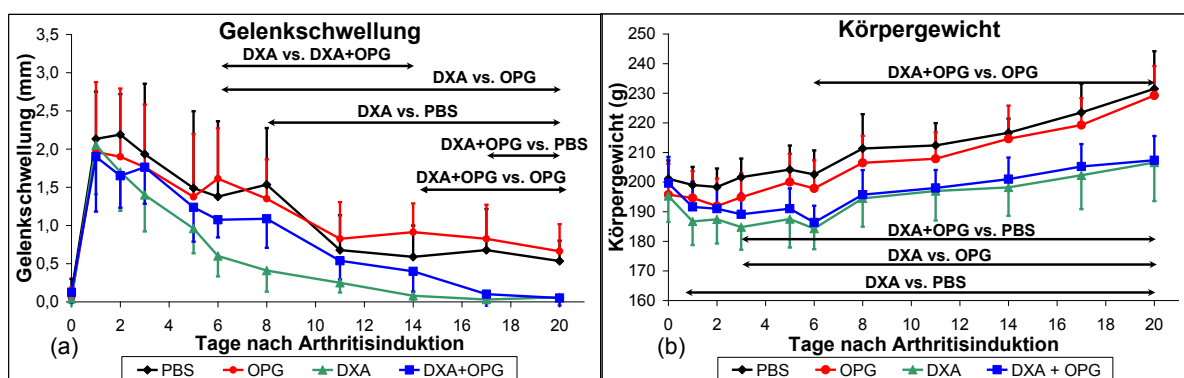


Abb.1: Einfluss der Therapie mit OPG, DXA und DXA+OPG auf die Gelenkschwellung des rechten Kniegelenks (a) und das Körpergewicht (b) an den Tagen 0, 1, 2, 3, 5, 6, 8, 11, 14, 17 und 20 nach Arthritisinduktion. (Mittelwerte und Standardabweichung). Bereiche mit signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen sind in der Grafik mit Pfeilen dargestellt.

3.1.2 Körpergewichtsentwicklung

Zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion bestanden keine Gewichtsunterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die PBS-Gruppe zeigte im Verlauf des Experiments eine mittlere Gewichtszunahme um ca. 13 % des Ausgangsgewichtes (Tag 20). Die Behandlung mit OPG hatte keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung bei der AIA. Dahingegen kam es sowohl in der DXA- als auch der DXA+OPG-Gruppe in den ersten sechs Tagen der Arthritis zu einer mittleren Gewichtsreduktion von ca. 7 % des Ausgangsgewichts. In den folgenden Tagen nahm das mittlere Körpergewicht dieser Tiere zu und erreichte am Tag 20 das Niveau des Ausgangsgewichtes (Abb. 1b).

3.1.3 Histomorphometrie des Tibiakopfes- sekundäre Spongiosa

3.1.3.1 Volumenparameter

Spongiosavolumen

Alle Gruppen, bei denen eine AIA ausgelöst wurde, zeigten im Mittel ein signifikant niedrigeres Spongiosavolumen des Tibiakopfes als die gesunden Tiere.

Sowohl die Monotherapie mit OPG als auch die Monotherapie mit Dexamethason hatten darauf keinen signifikanten Einfluss. Unter der Kombinationstherapie mit DXA und OPG fand sich im Vergleich mit der mit PBS-behandelten bzw. DXA-Monotherapie behandelten Gruppe ein signifikant höheres Spongiosavolumen. Dieses erreichte aber nicht das Niveau der gesunden Tieren (Abb. 2a).

Osteoidvolumen

Die PBS-Gruppe zeigte im Vergleich mit den gesunden Tieren ein tendenziell erhöhtes Osteoidvolumen, der Unterschied erreicht jedoch keine statistische Signifikanz. Weder in der DXA-, OPG- noch in der DXA+OPG-Gruppe konnten Treffer im Osteoid ermittelt werden, sodass kein Osteoidvolumen berechnet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Trabekeldurchmesser

Die Induktion der AIA führte bei allen Gruppen zu einer signifikanten Reduktion des Trabekeldurchmessers im Vergleich zu den gesunden Tieren. Die Kombination von DXA mit OPG erzielte einen signifikant höheren Trabekeldurchmesser als die OPG-Monotherapie (Abb. 2b).

Osteoiddicke

Der Parameter Osteoiddicke ließ sich nur in der PBS-Gruppe berechnen. Signifikante Unterschiede ergaben sich nicht (Daten nicht gezeigt).

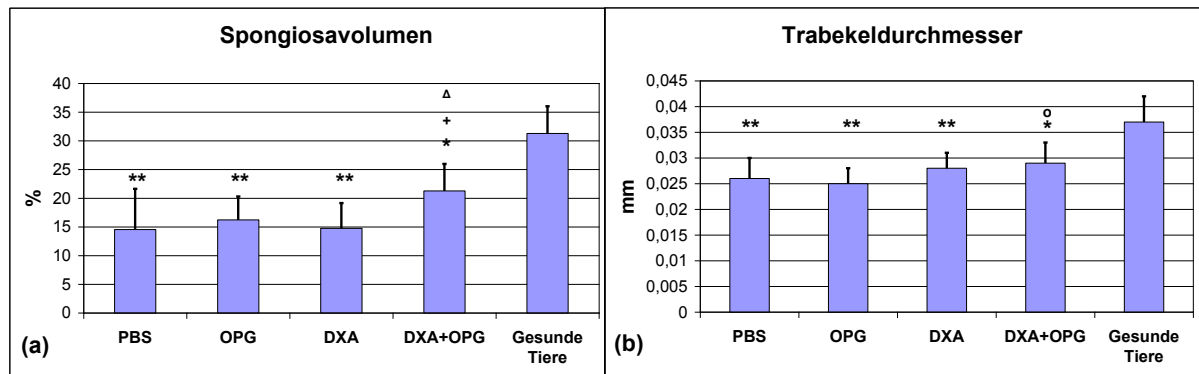


Abb.2: Spongiosavolumen (a) und Trabekeldurchmesser (b) des periartikulären Knochens der rechten Tibia 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung)
 Signifikanzen: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ im Vergleich mit gesunden Tieren, + $p < 0,05$ im Vergleich mit PBS, Δ $p < 0,05$ im Vergleich mit DXA, \circ $p < 0,05$ im Vergleich mit OPG

3.1.3.2 Oberflächenparameter

Anbauoberfläche

Hinsichtlich der Anbauoberfläche ergaben sich zwischen den verschiedenen Therapiegruppen und den gesunden Tieren keine signifikanten Unterschiede. Die PBS-Gruppe wies im Vergleich zu den gesunden Tieren numerisch eine größere Anbauoberfläche auf. Die Monotherapie mit OPG und die Kombinationstherapie mit OPG +DXA führten zu einer tendenziellen, aber nicht signifikanten Reduktion der Anbauoberfläche im Vergleich mit der PBS- Gruppe und der DXA-Monotherapie (Abb. 3).

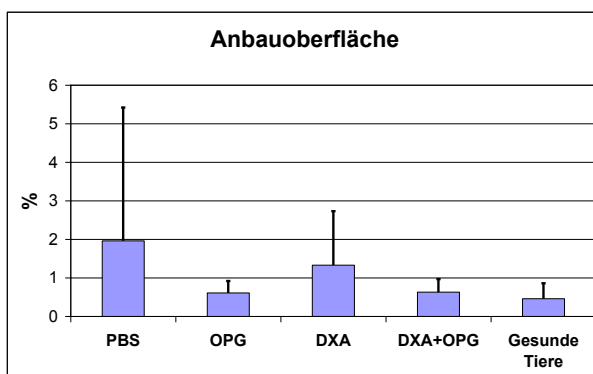


Abb.3: Anbauoberfläche des periartikulären Knochens der rechten Tibia 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung, keine Signifikanzen)

3.1.3.3 Zelluläre Parameter

Osteoblasten-besetzte Oberfläche

Die unbehandelte AIA führte zu einem signifikant höheren Anteil an Osteoblasten-besetzter Oberfläche im Vergleich zu den gesunden Tieren. Auch unter DXA-Monotherapie und unter Kombination mit DXA+OPG zeigte sich eine signifikant höhere Osteoblasten-besetzte Oberfläche als bei gesunden Tieren. Lediglich unter Monotherapie mit OPG waren keine signifikanten Unterschiede der Osteoblasten-besetzten Oberfläche im Vergleich zu gesunden Tieren nachweisbar (Abb. 4).

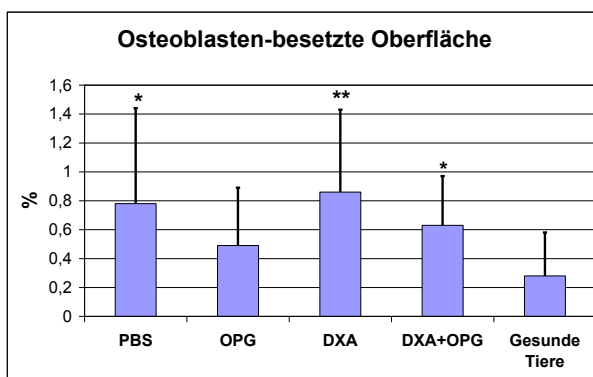


Abb.4: Osteoblasten-besetzte Oberfläche des periartikulären Knochens der rechten Tibia 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung).
Signifikanzen: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ im Vergleich mit gesunden Tieren.

Osteoklasten-besetzte Oberfläche

Die PBS-Gruppe zeigte im Vergleich mit den gesunden Tieren eine signifikante Zunahme der Osteoklasten-besetzten Oberfläche. Durch die Monotherapie mit OPG nahm die Osteoklasten-besetzte Oberfläche signifikant im Vergleich zur PBS-Gruppe ab und erreichte das Niveau gesunder Tiere. Auch die Kombination DXA+OPG konnte die Osteoklasten-besetzte Oberfläche im Vergleich mit PBS signifikant reduzieren, was bei der DXA-Monotherapie nicht der Fall war (Abb. 5).

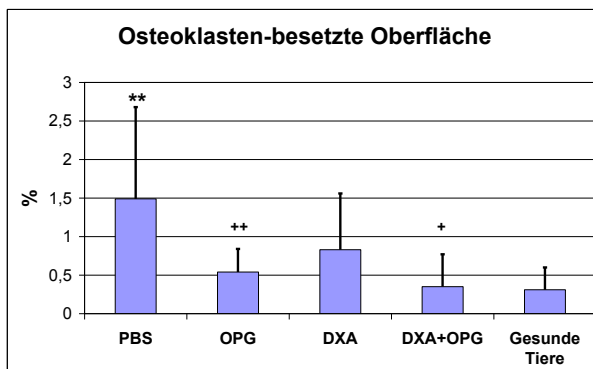


Abb.5: Osteoklasten-besetzte Oberfläche des periartikulären Knochens der rechten Tibia 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung).
Signifikanzen: ** $p < 0,01$ im Vergleich mit gesunden Tieren, ++ $p < 0,01$, + $p < 0,05$ im Vergleich mit PBS

Osteoklastenindex

Die Anzahl der Osteoklasten war in der PBS-Gruppe im Vergleich zu den gesunden Tieren signifikant erhöht. Sowohl die Monotherapie mit OPG als auch die Kombination OPG und DXA führten zu einer signifikanten Reduktion des Indexes, so dass sich in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede zu den gesunden Tieren zeigten. Der Unterschied zwischen der OPG und DXA+OPG-Gruppe war nicht signifikant (Abb. 6).

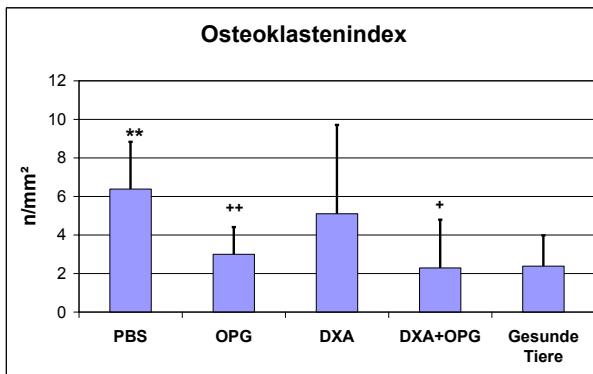


Abb.6: Osteoklastenindex des periartikulären Knochens der rechten Tibia 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung)
Signifikanzen: ** $p < 0,01$ im Vergleich mit gesunden Tieren, ++ $p < 0,01$, + $p < 0,05$ im Vergleich mit PBS

3.1.4 Linear scanning-Parameter der Tibia-primäre Spongiosa

3.1.4.1 Trabekelanzahl

In Abbildung 7 ist die Anzahl der Trabekel pro mm in Abhängigkeit vom Abstand von der Epiphysenfuge dargestellt. In allen Gruppen nimmt die Trabekelanzahl mit zunehmendem Abstand von der Epiphysenfuge (A.v.E.) ab. Dabei unterscheiden sich die Kurvenverläufe der PBS-, DXA- und gesunden Gruppe im Wesentlichen nicht voneinander. Erst ab 645 μm Entfernung von der Epiphysenfuge ist die Trabekelanzahl in der unbehandelten Arthritisgruppe (PBS-Gruppe) im Vergleich mit den gesunden Tieren signifikant geringer. Dahingegen weisen die OPG- und DXA+OPG Gruppe deutlich mehr Trabekel pro mm im Vergleich mit den übrigen Gruppen auf und erreichen ab 150 μm A.v.E (OPG-Monotherapie) bzw. 300 μm A.v.E (DXA+OPG) signifikant höhere Werte als die PBS-Gruppe. Es werden ab 150 μm A.v.E. in der OPG-Gruppe und ab 495 μm in der DXA+OPG-Gruppe signifikant höhere Werte als in der gesunden Gruppe erreicht. Die beiden mit OPG behandelten Gruppen unterscheiden sich lediglich in einem kurzen Abschnitt epiphysennah (15-105 μm A.v.E.) signifikant voneinander, in dem die OPG-Gruppe eine geringere Trabekelanzahl aufweist (Abb.7).

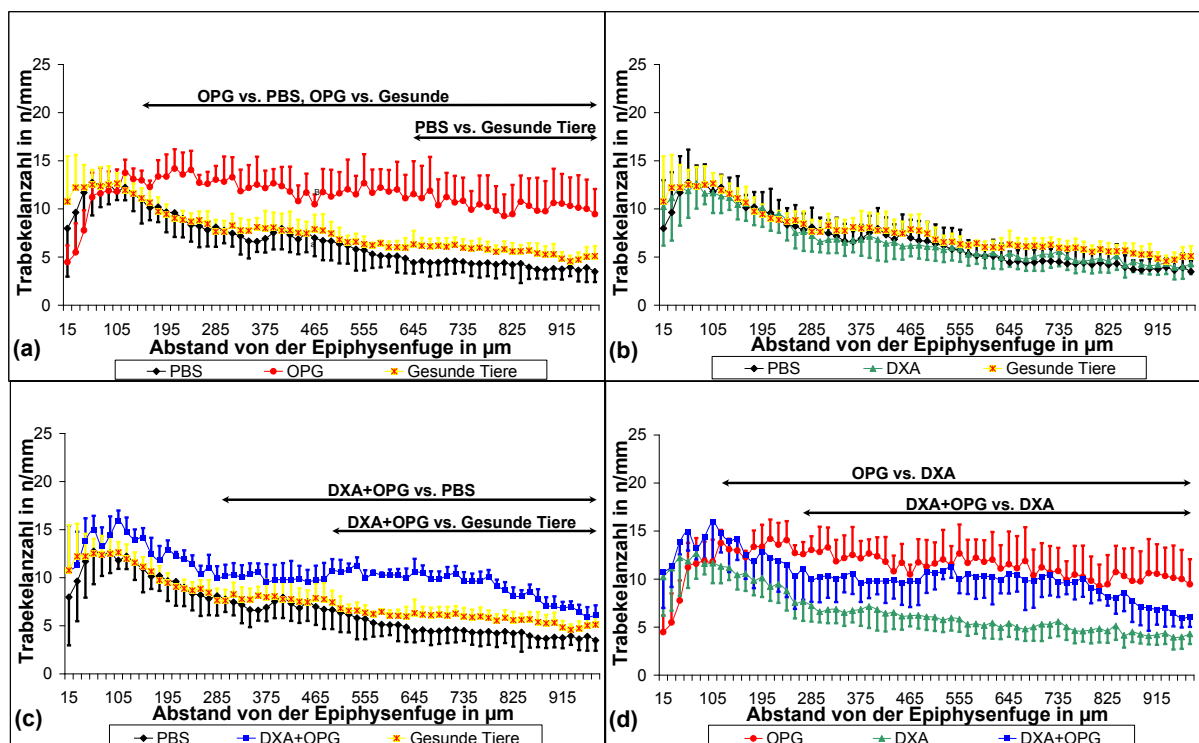


Abb.7: Trabekelanzahl (Mittelwerte und Standardabweichung) im epiphysennahen Bereich des Tibiakopfes im Abstand von 15 bis 975 μm von der Epiphysenfuge. Gruppenspezifische signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch Pfeile kenntlich gemacht. (Aus didaktischen Gründen wird auf die Darstellung einzelner signifikanter Werte außerhalb dieser Bereiche verzichtet.)

3.1.4.2 Trabekeldurchmesser

Die Abbildung 8 zeigt den Trabekeldurchmesser in Abhängigkeit vom Abstand von der Epiphysenfuge. In allen Gruppen nimmt der Trabekeldurchmesser mit wachsendem Abstand von der Epiphysenfuge zu. Die Kurven der PBS-, DXA-Gruppe und gesunden Tiere unterscheiden sich dabei insgesamt nur marginal voneinander. Der Trabekeldurchmesser der PBS-behandelten AIA-Tiere liegt zwar tendenziell mit wenigen Ausnahmen unterhalb der der gesunden Gruppe, der Unterschied ist jedoch im Wesentlichen nicht statistisch signifikant. Die OPG-Gruppe weist die niedrigsten Werte für den Trabekeldurchmesser von allen Gruppen auf, so dass sich signifikante Unterschiede zu den gesunden Tieren und zur DXA-Monotherapiegruppe ergeben. In der DXA+OPG-Gruppe fällt in der ersten Hälfte der Kurve eine deutlich größere Trabekelstärke auf (signifikante Unterschiede zu allen übrigen Gruppen). In der zweiten Hälfte fällt die Kurve ab und nähert sich im Verlauf der OPG-Gruppe an (Abb. 8).

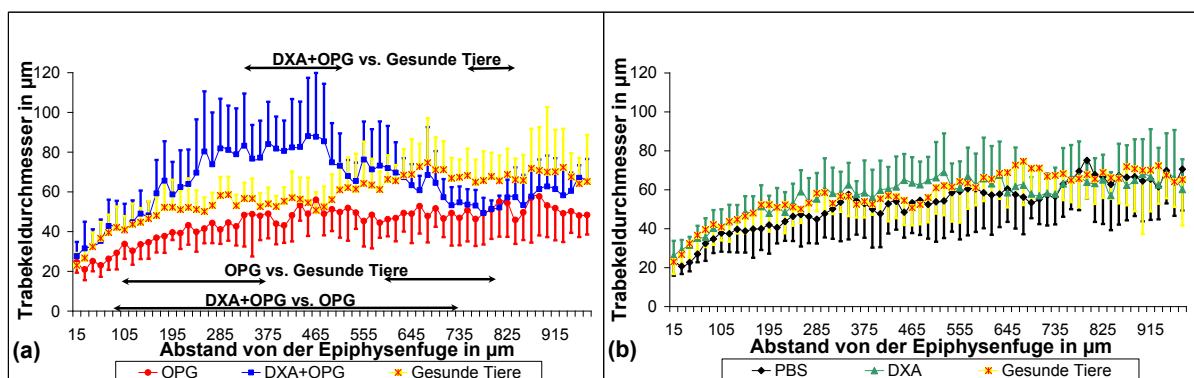


Abb.8: Trabekeldurchmesser (Mittelwerte und Standardabweichung) im epiphysennahen Bereich des Tibiakopfes im Abstand von 15 bis 975 µm von der Epiphysenfuge. Gruppenspezifische signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch Pfeile kenntlich gemacht. (Aus didaktischen Gründen wird auf die Darstellung einzelner signifikanter Werte außerhalb dieser Bereiche verzichtet.)

3.1.4.3 Mineralisierter Anteil am Knochengewebe

Der Mineralisierte Anteil des Knochens in Abhängigkeit vom Abstand von der Epiphysenfuge ist in Abbildung 9 dargestellt. In der Gruppe der gesunden Tiere nimmt der Mineralisierte Knochenanteil ab ca. 190 μm mit zunehmendem Abstand von der Epiphysenfuge ab. Die PBS-Gruppe und DXA-Gruppe beschreiben einen mit wenigen Ausnahmen parallelen Kurvenverlauf, wobei die PBS-Gruppe tendenziell die niedrigsten Werte von allen Gruppen aufweist. Signifikante Unterschiede zur gesunden Gruppe ergeben sich jedoch nur in einem kurzen Abschnitt im letzten Drittel der Kurve. Der Mineralisierte Knochenanteil in der OPG-Gruppe nimmt dahingegen von der Epiphysenfuge aus zunächst kontinuierlich zu, erreicht sein Maximum in größerem A.v.E. als bei gesunden Tieren und verbleibt dann annähernd auf diesem Niveau. Damit ist er in der OPG-Gruppe ab dem ersten Drittel des Meßbereiches signifikant größer als in der PBS-, DXA- und abschnittsweise auch der gesunden Gruppe. Die höchsten Werte für den Mineralisierten Knochenanteil erreicht die DXA+OPG-Gruppe. Die Werte dieser Gruppe liegen nahezu im gesamten Verlauf signifikant über denen der PBS- und DXA-Gruppe sowie denen der gesunden Tiere. In den ersten zwei Dritteln des Messbereiches ist der Mineralisierte Knochenanteil unter kombinierter DXA und OPG-Therapie auch signifikant größer als unter der OPG-Monotherapie (Abb. 9).

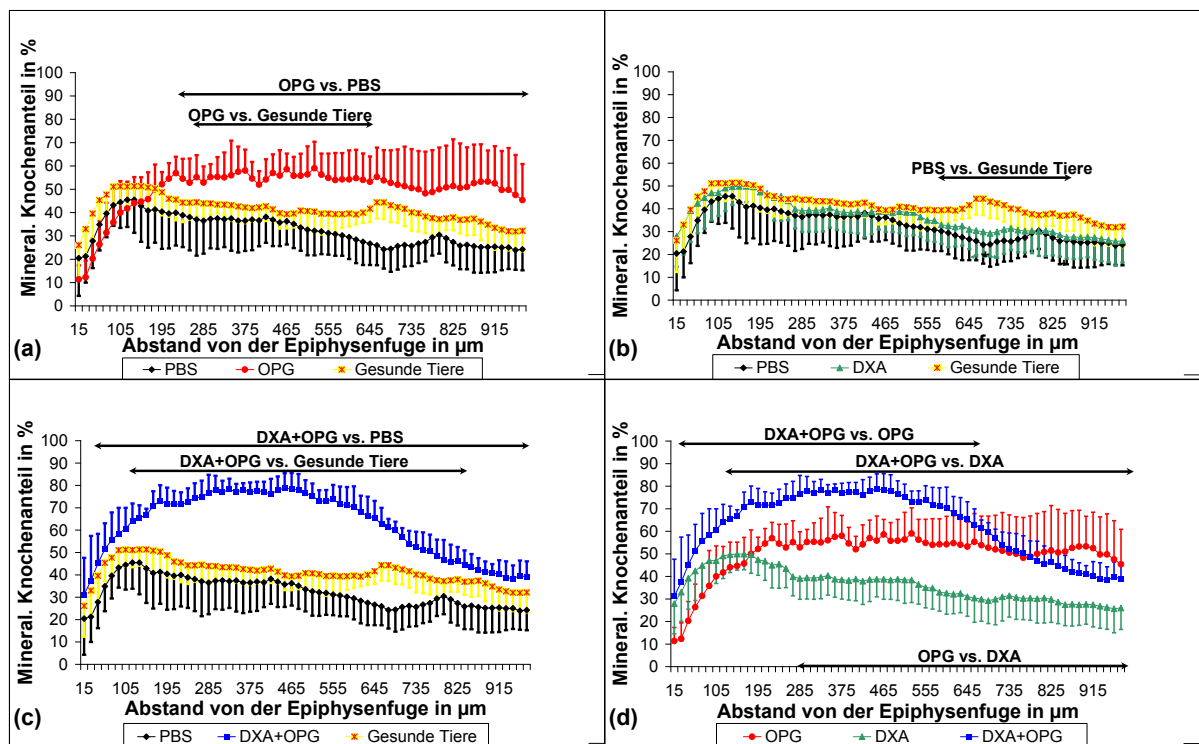


Abb.9: Mineralisierter Knochenanteil (Mittelwerte und Standardabweichung) im epiphysennahen Bereich des Tibiakopfes im Abstand von 15 bis 975 μm von der Epiphysenfuge. Gruppenspezifische signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch Pfeile kenntlich gemacht. (Aus didaktischen Gründen wird auf die Darstellung einzelner signifikanter Werte außerhalb dieser Bereiche verzichtet.)

3.1.4.4 Mittlere Trabekelanzahl, Trabekeldurchmesser und Mineralisierter Knochenanteil

Abbildung 10 zeigt die mittlere Trabekelanzahl, den mittleren Trabekeldurchmesser und mittleren mineralisierten Knochenanteil im Bereich von 15 bis 975 μm von der Epiphysenfuge für die einzelnen Gruppen. Die Arthritis geht unbehandelt (PBS-Gruppe) mit einer signifikanten Verminderung des Mineralisierten Knochenanteils bei tendentiell reduzierter Trabekelanzahl und tendentiell reduziertem Trabekeldurchmesser im Vergleich mit gesunden Tieren einher. Durch die Therapie mit OPG kommt es zu einer im Vergleich mit der PBS- und DXA-Gruppe signifikanten Zunahme der Trabekelanzahl, die sogar noch signifikant über der bei gesunden Tieren liegt ($p < 0,01$ vs Gesunde, PBS und DXA). Trotz geringerer Trabekeldicke ist daher ein signifikant erhöhter Mineralisierter Knochenanteil in der OPG-Gruppe verglichen mit der PBS-, DXA- und der gesunden Gruppe zu verzeichnen. In der DXA-Monotherapie-Gruppe verbleibt die Trabekelanzahl auf dem Niveau der unbehandelten Arthritis ($p < 0,01$ vs. Gesunde). Der Trabekeldurchmesser und der Mineralisierte Knochenanteil zeigen im Vergleich mit der PBS-Gruppe tendenziell eine Zunahme, der Unterschied erreicht aber keine statistische Signifikanz. Unter allen Versuchsgruppen weist die DXA+OPG-Gruppe den größten Mineralisierten Knochenanteil auf ($p < 0,01$ vs. PBS, DXA, OPG und Gesunde). Die Trabekelanzahl erreicht hier das Niveau der OPG-Gruppe. Der Trabekeldurchmesser ist signifikant größer als in der OPG-Gruppe und liegt tendenziell höher als in den übrigen Gruppen einschließlich der gesunden Gruppe.

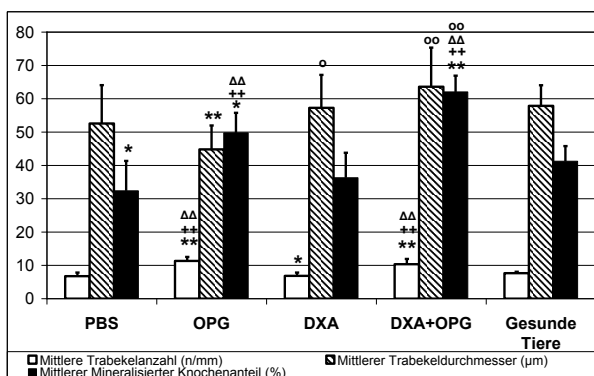


Abb.10: Mittlere Trabekelanzahl, mittlerer Trabekeldurchmesser und mittlerer Mineralisierter Knochenanteil der primären Spongiosa des rechten Tibiakopfes 21 Tage nach Arthritisinduktion
 Signifikanzen: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ im Vergleich mit gesunden Tieren, ++ $p < 0,01$ im Vergleich mit PBS, $\Delta\Delta$ $p < 0,01$ im Vergleich mit DXA, oo $p < 0,01$, o $p < 0,05$ im Vergleich mit OPG

3.1.5 Histomorphometrie des Wirbelkörpers, sekundäre Spongiosa

3.1.5.1 Volumenparameter

Spongiosavolumen

Die Induktion der Arthritis führte bei den PBS-behandelten Tieren zu einer signifikanten Reduktion des Spongiosavolumens des dritten Lendenwirbelkörpers im Vergleich zu den gesunden Tieren. Die Behandlung mit OPG hatte darauf keinen Einfluss. Die DXA-Gruppe bot zwar tendenziell höhere Werte, der Unterschied zur PBS-Gruppe erreichte aber keine statistische Signifikanz. Unter der Kombinationstherapie DXA+OPG wurde eine komplette Hemmung des AIA induzierten Verlustes an Spongiosavolumen erzielt (Abb. 11).

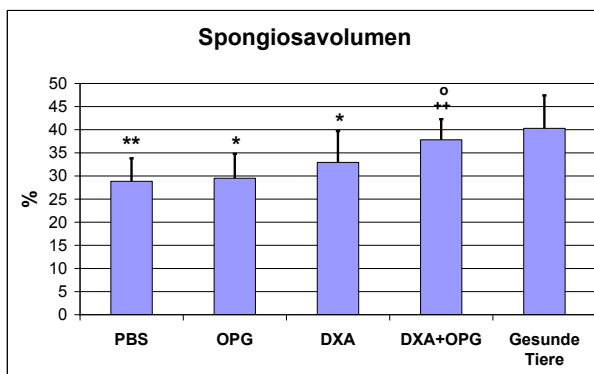


Abb.11: Spongiosavolumen des 3. Lendenwirbelkörpers 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung)

Signifikanzen: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ im Vergleich mit gesunden Tieren, ++ $p < 0,01$ im Vergleich mit PBS, o $p < 0,05$ im Vergleich mit OPG

Osteoidvolumen

Die histomorphometrische Analyse ergab nur in der OPG-Gruppe und bei den gesunden Tieren Treffer auf Osteoid. Das berechnete Osteoidvolumen in diesen Gruppen unterschied sich aufgrund der großen Streubreiten nicht signifikant voneinander (keine Abbildung).

Osteoiddicke

Die Berechnung der Osteoiddicke war nicht in allen Gruppen möglich, da für einige Tiere keine Schnittpunkte mit Osteoid ermittelt werden konnten. In den verbleibenden traten keine signifikanten Unterschiede auf (keine Abbildung).

Trabekeldurchmesser

Der Trabekeldurchmesser der PBS-Gruppe war im Vergleich zu den gesunden Tieren signifikant reduziert. Weder die Behandlung mit OPG noch mit DXA als Monotherapie konnte diese Veränderungen aufhalten. Signifikante Unterschiede zur PBS behandelten AIA ergaben sich dahingegen in der DXA+OPG Gruppe. Der Trabekeldurchmesser unterschied sich in dieser Gruppe nicht signifikant von dem gesunder Tiere (Abb. 12).

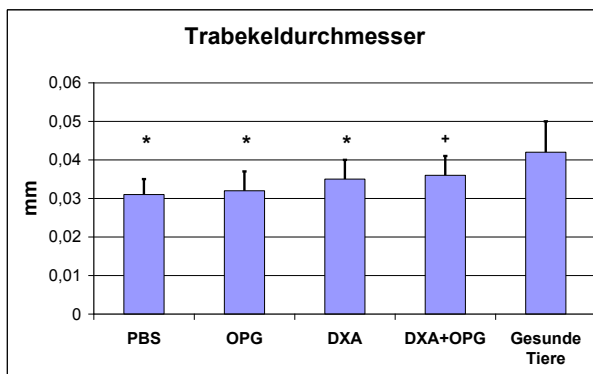


Abb.12: Trabekeldurchmesser des 3. Lendenwirbelkörpers 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung)

Signifikanzen: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ im Vergleich mit gesunden Tieren, + $p < 0,05$ im Vergleich mit PBS

3.1.5.2 Oberflächenparameter

Anbauoberfläche

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen der PBS-, OPG-, DXA-, DXA+OPG- Gruppe und gesunden Tieren bezüglich der Anbauoberfläche am axialen Knochen (Abb. 13).

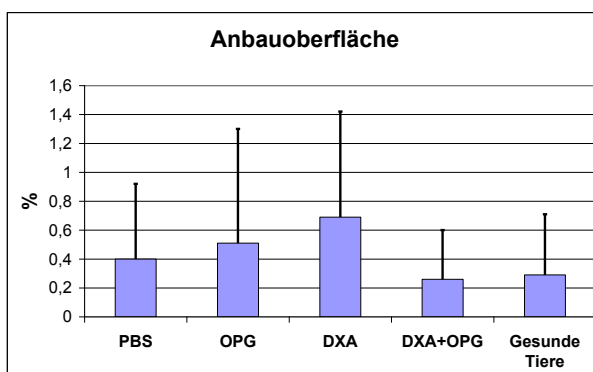


Abb.13: Anbauoberfläche des 3. Lendenwirbelkörpers 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung)

Signifikanzen: keine

3.1.5.3 Zelluläre Parameter

Osteoblasten-besetzte Oberfläche

Die Osteoblasten-besetzte Oberfläche war bei allen Gruppen nach Arthritisinduktion im Vergleich mit den gesunden Tieren signifikant erhöht. Es ließ sich kein signifikanter Einfluss der verschiedenen Therapien im Vergleich zur PBS-behandelten AIA nachweisen (Abb. 14).

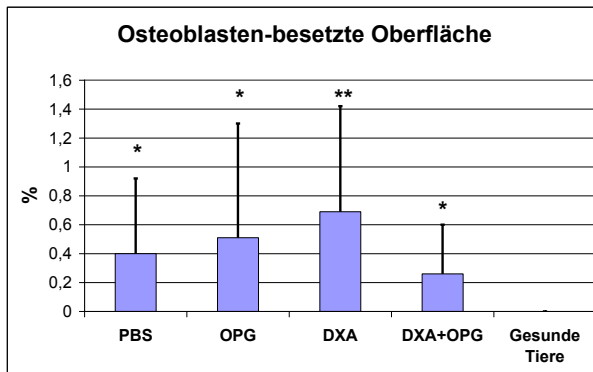


Abb.14: Osteoblasten-besetzte Oberfläche des 3. Lendenwirbelkörpers 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung)
Signifikanzen: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ im Vergleich mit gesunden Tieren

Osteoklasten-besetzte Oberfläche

Die Osteoklasten-besetzte Oberfläche war bei den PBS-behandelten Tieren zwar gegenüber den gesunden Tieren tendenziell erhöht, der Unterschied erreichte aber aufgrund der großen Streubreite in der PBS-Gruppe keine statistische Signifikanz. Die Osteoklasten-besetzte Oberfläche der OPG-Gruppe lag nicht signifikant unter der der PBS-Gruppe und unterschied sich nicht signifikant von der gesunder Tiere. Die DXA-Monotherapie führte zwar tendenziell zu einer Reduktion der Osteoklasten-besetzten Oberfläche, der Unterschied erreichte aber auch hier keine Signifikanz. Dahingegen führte die Kombination von DXA und OPG zu einer signifikanten Verminderung der Osteoklasten-besetzten Oberfläche im Vergleich mit der OPG-Monotherapie. In dieser Gruppe wurden insgesamt die niedrigsten Werte von allen Gruppen erreicht (Abb. 15).

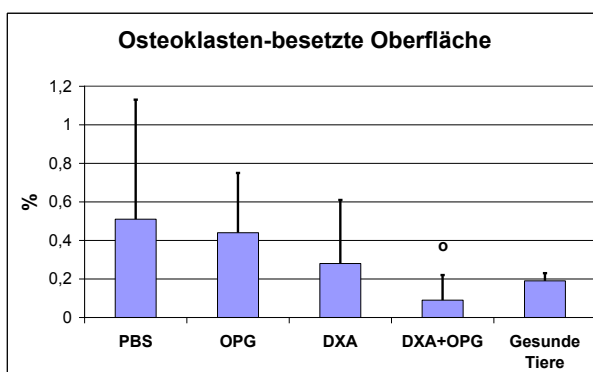


Abb.15: Osteoklasten-besetzte Oberfläche des 3. Lendenwirbelkörpers 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung)
Signifikanzen: o $p < 0,05$ im Vergleich mit OPG

Osteoklastenindex

Die Anzahl der Osteoklasten war zwischen den verschiedenen Therapiegruppen und den gesunden Tieren am axialen Knochen nicht signifikant unterschiedlich. Tendenziell die niedrigsten Werte bot die DXA+OPG Gruppe (Abb. 16).

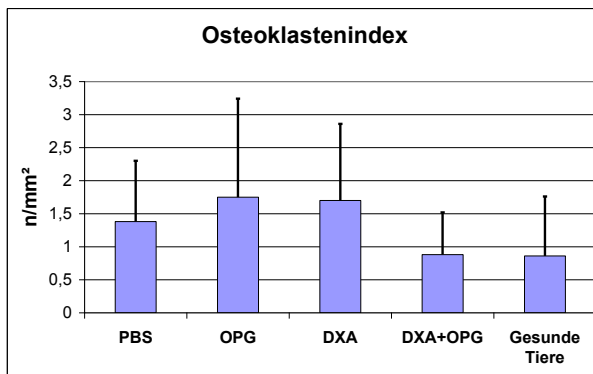


Abb.16: Osteoklastenindex des 3. Lendenwirbelkörpers 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung).
Signifikanzen: keine

3.2 Teil 2: Behandlung der AIA mit MTX und MTX und OPG in Kombination

Im Folgenden werden nur die Effekte der MTX- und MTX+OPG Kombinationstherapie erläutert, da auf die Ergebnisse der OPG-Gruppe bereits im ersten Teil eingegangen wurde.

3.2.1 Gelenkschwellung

Die Gelenkschwellung zeigte unter Therapie mit MTX keinen signifikanten Unterschied zur unbehandelten AIA (Abb. 17a).

3.2.2 Körpergewicht

Die Therapie mit MTX hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Körpergewicht der Tiere im Vergleich mit der PBS-Gruppe. An Tag 2 wurde ein signifikant größeres Körpergewicht in der MTX-Gruppe im Vergleich mit der OPG-Gruppe erreicht. Die Kombinationstherapie MTX-OPG wies keine signifikanten Unterschiede zur PBS-Behandlung auf (Abb. 17b).

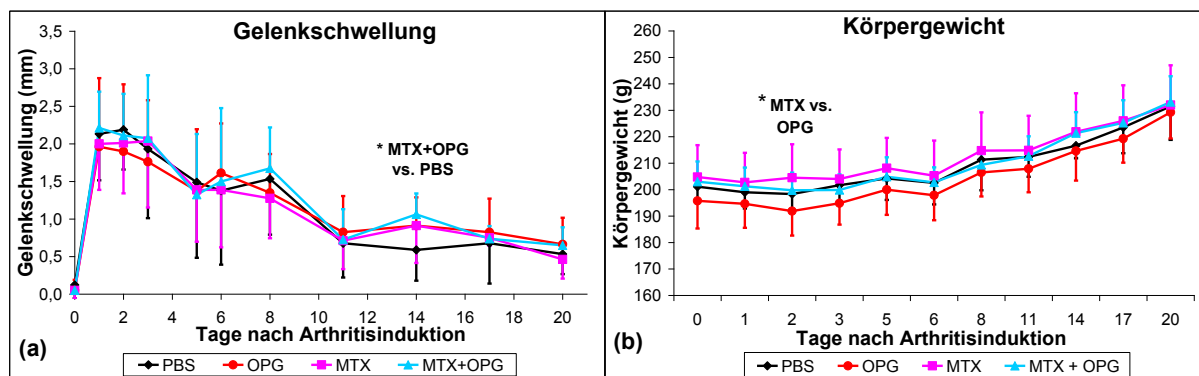


Abb.17: Einfluss der Therapie mit PBS, OPG, MTX und MTX+OPG auf Gelenkschwellung (a) und Körpergewicht (b) an den Tagen 0, 1, 2, 3, 5, 6, 8, 11, 14, 17 und 20 nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung).

3.2.3 Histomorphometrie des Tibiakopfes-sekundäre Spongiosa

3.2.3.1 Volumenparameter

Spongiosavolumen

Die Monotherapie mit MTX sowie die Kombinationstherapie MTX+OPG hatten keinen Einfluss auf den AIA-induzierten Verlust an Spongiosavolumen (Abb. 18a).

Osteoidvolumen

Die MTX behandelten Tiere unterschieden sich hinsichtlich des Osteoidvolumens nicht signifikant von der PBS-Gruppe. Die MTX-Gruppe und die MTX+OPG-Gruppe wiesen jedoch im Vergleich mit den gesunden Tieren und der OPG-Gruppe ein signifikant höheres Osteoidvolumen auf. Durch die kombinierte Gabe von MTX und OPG wurde das Osteoidvolumen zwar tendenziell im Vergleich zur MTX-Gruppe gesenkt, der Unterschied erreichte jedoch keine Signifikanz (Abb. 18b).

Trabekeldurchmesser

Der Trabekeldurchmesser MTX-behandelter Tiere sowie der MTX+OPG behandelten Tiere zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zur PBS-Gruppe. Er war sowohl in der MTX als auch der MTX+OPG-Gruppe signifikant geringer als bei den gesunden Tieren. Der Trabekeldurchmesser in der MTX-Gruppe war jedoch signifikant größer als in der OPG Gruppe (Abb. 18c).

Osteoiddicke

Die Osteoiddicke ließ sich nur in der PBS- und MTX- Gruppe berechnen. Signifikante Unterschiede ergaben sich nicht (keine Abbildung).

3.2.3.2 Oberflächenparameter

Anbauoberfläche

Die MTX-Monotherapiegruppe wies im Vergleich mit der PBS-Gruppe eine signifikant höhere Anbauoberfläche auf, die auch signifikant größer war als bei den gesunden und den OPG behandelten Tieren. Die kombinierte Gabe von MTX und OPG führte zu einer tendenziell geringeren Anbauoberfläche als in der MTX-Gruppe, die Unterschiede erreichten aber keine Signifikanz. Es bestanden signifikante Unterschiede zu den gesunden Tieren und zur OPG-Gruppe (Abb. 18d).

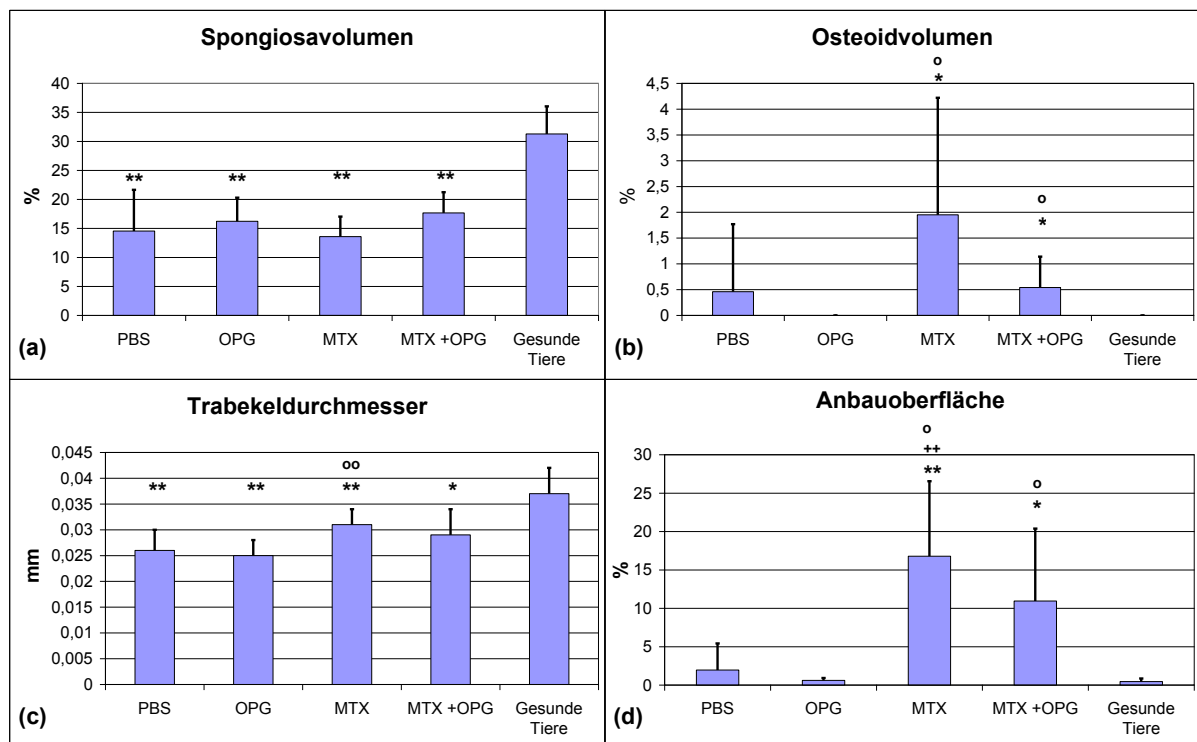


Abb.18: Spongiosavolumen (a), Osteoidvolumen (b), Trabekeldurchmesser (c), und Anbauoberfläche (d) des periartikulären Knochens der rechten Tibia 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung)

Signifikanzen: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ im Vergleich mit gesunden Tieren, **oo** $p < 0,01$, **o** $p < 0,05$ im Vergleich mit OPG, im Vergleich mit OPG, **++** $p < 0,01$ im Vergleich mit PBS.

3.2.3.3 Zelluläre Parameter

Osteoblasten-besetzte Oberfläche

Die größte Osteoblasten-besetzte Oberfläche wies die MTX-Monotherapiegruppe auf. Auch in Kombination mit OPG war der Unterschied zu allen anderen Gruppen signifikant (Abb. 19).

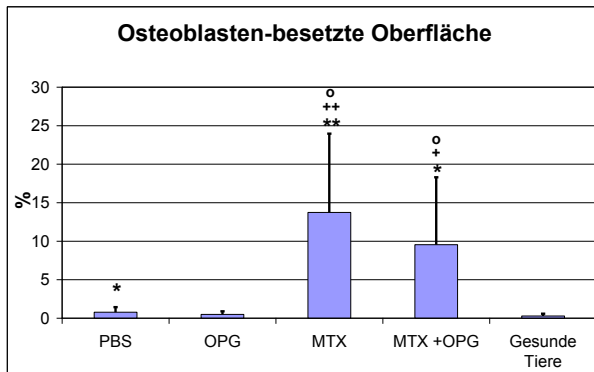


Abb.19: Osteoblasten-besetzte Oberfläche des periartikulären Knochens der rechten Tibia 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung)

Signifikanzen: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ im Vergleich mit gesunden Tieren, oo $p < 0,01$, o $p < 0,05$ im Vergleich mit OPG, ++ $p < 0,01$, + $p < 0,05$ im Vergleich mit PBS.

Osteoklasten-besetzte Oberfläche

Die Osteoklasten-besetzte Oberfläche war in der MTX-Gruppe im Vergleich mit der PBS-, OPG- und gesunden Gruppe signifikant erhöht. Durch die zusätzliche Applikation von OPG wurde der Parameter signifikant unter den Wert der MTX-Monotherapie gesenkt, erreichte aber nicht das Niveau gesunder Tiere (Abb. 20).

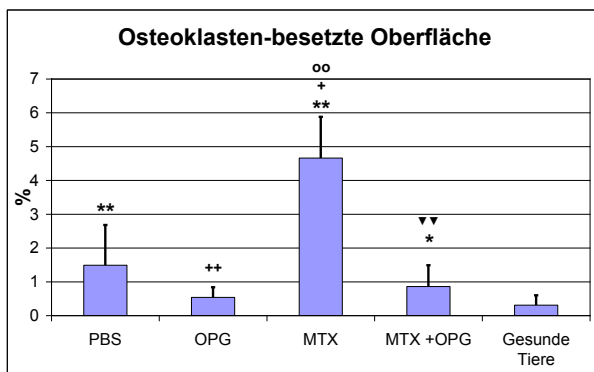


Abb.20: Osteoklasten-besetzte Oberfläche des periartikulären Knochens der rechten Tibia 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung)

Signifikanzen: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ im Vergleich mit gesunden Tieren, oo $p < 0,01$ im Vergleich mit OPG, ++ $p < 0,01$, + $p < 0,05$ im Vergleich mit PBS, ▼▼ $p < 0,01$ im Vergleich mit MTX

Osteoklastenindex

Die Anzahl der Osteoklasten war in der MTX-Gruppe im Vergleich zur PBS-, OPG- und gesunden Gruppe signifikant erhöht. In der MTX+OPG-Gruppe war der Osteoklastenindex im Vergleich zur MTX-Monotherapiegruppe signifikant geringer und unterschied sich nicht signifikant von dem gesunder Tiere (Abb. 21).

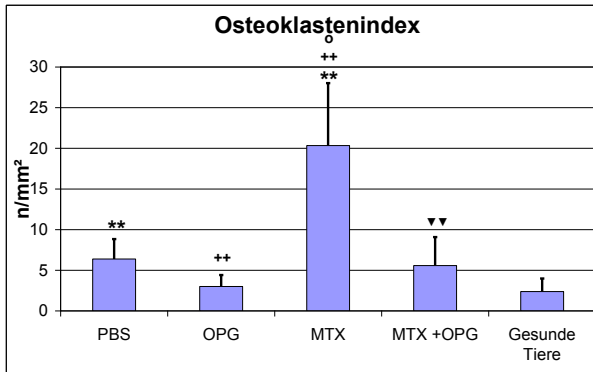


Abb.21: Osteoklastenindex des periartikulären Knochens der rechten Tibia 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung)
 Signifikanzen: ** $p < 0,01$ im Vergleich mit gesunden Tieren, oo $p < 0,01$ im Vergleich mit OPG, ++ $p < 0,01$ im Vergleich mit PBS, ▼▼ $p < 0,01$ im Vergleich mit MTX

3.2.4 Linear scanning-Parameter der Tibia - primäre Spongiosa

3.2.4.1 Trabekelanzahl

Die Trabekelanzahl der MTX behandelten Tiere unterschied sich nicht signifikant von der PBS-behandelten Arthritisgruppe. Die Kombination von MTX und OPG führte zu einer Zunahme der Trabekelanzahl auf das Niveau der OPG-Gruppe ($p < 0,05$ vs PBS, MTX und gesunde Tiere ab 300 μm). Die Trabekelanzahl unterschied sich nicht zwischen der OPG und MTX+OPG-Gruppe (Abb. 22).

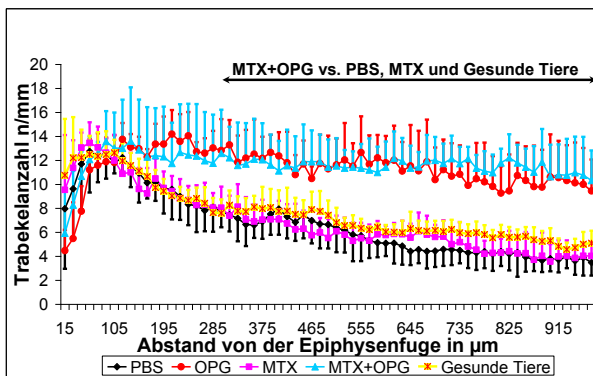


Abb.22: Trabekelanzahl (Mittelwerte und Standardabweichung) im epiphysennahen Bereich des Tibiakopfes im Abstand von 15 bis 975 μm von der Epiphysenfuge. Gruppenspezifische signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch Pfeile kenntlich gemacht. (Aus didaktischen Gründen wird auf die Darstellung einzelner signifikanter Werte außerhalb dieser Bereiche verzichtet.)

3.2.4.2 Trabekeldurchmesser

Die Kurve der Mittelwerte der Trabekeldurchmesser in der MTX behandelten Gruppe lag zwar tendenziell über der der PBS-Gruppe, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Es bestanden auch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit der gesunden Gruppe. Der Kurvenverlauf der MTX+OPG-Gruppe entspricht dem der OPG-Gruppe, es fanden sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 23).

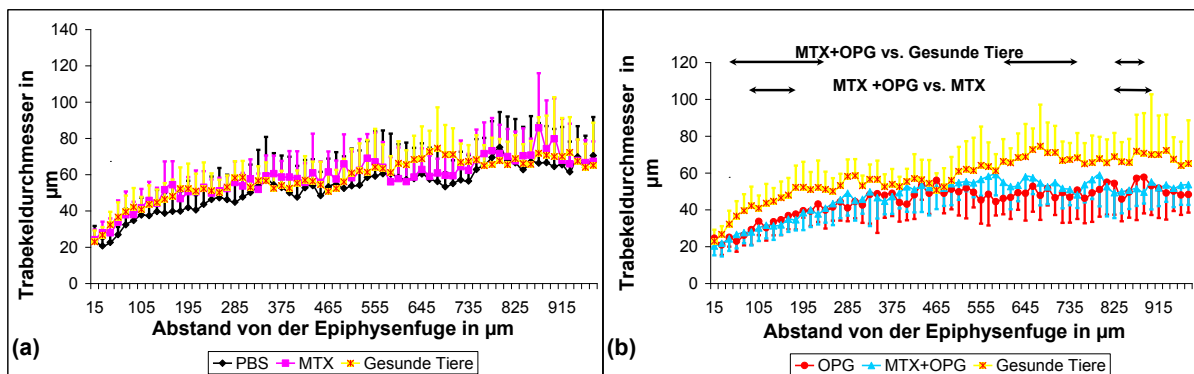


Abb.23: Trabekeldurchmesser (Mittelwerte und Standardabweichung) im epiphysennahen Bereich des Tibiakopfes im Abstand von 15 bis 975 μm von der Epiphysenfuge. Gruppenspezifische signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch Pfeile kenntlich gemacht. (Aus didaktischen Gründen wird auf die Darstellung einzelner signifikanter Werte außerhalb dieser Bereiche verzichtet.)

3.2.4.3 Mineralisierter Knochenanteil

Die Kurve der MTX-behandelten Tiere verläuft zwischen der PBS- und der gesunden Gruppe, so dass keine signifikanten Unterschiede bestehen. Sowohl die OPG als auch die OPG+MTX-Gruppe erreichten signifikant höhere Werte als die PBS-, MTX- und auch die gesunde Gruppe. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen der OPG- Monotherapie- und der MTX+OPG –Kombinationsgruppe (Abb. 24).

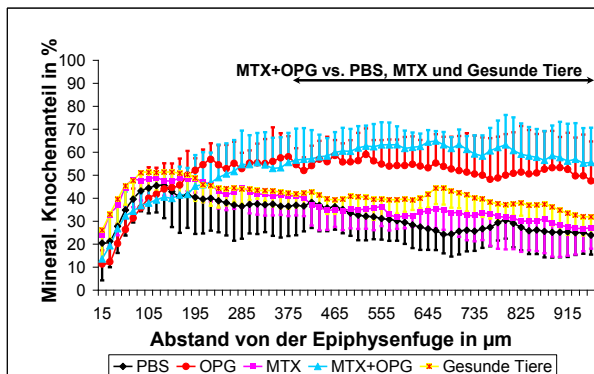


Abb.24: Mineralisierter Knochenanteil (Mittelwerte und Standardabweichung) im epiphysennahen Bereich des Tibiakopfes im Abstand von 15 bis 975 µm von der Epiphysenfuge. Gruppenspezifische signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch Pfeile kenntlich gemacht. (Aus didaktischen Gründen wird auf die Darstellung einzelner signifikanter Werte außerhalb dieser Bereiche verzichtet.)

3.2.4.4 Mittlere Trabekelanzahl, Trabekeldurchmesser und Mineralisierter Knochenanteil

Die Darstellung der gemittelten Parameter zeigt im Vergleich der MTX-Monotherapie mit der unbehandelten Arthritisgruppe keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Trabekelanzahl. Trabekeldurchmesser und Mineralisierter Knochenanteil nahmen in der MTX-Gruppe nur tendenziell zu. Die mit OPG behandelten Gruppen weisen im Vergleich mit der PBS-Gruppe eine signifikant höhere Trabekelzahl auf, der Trabekeldurchmesser ist jedoch signifikant geringer als in der gesunden Gruppe und tendenziell sogar geringer als in der unbehandelten Arthritisgruppe. Der resultierende Mineralisierte Knochenanteil sowohl der OPG als auch der OPG+MTX-Gruppe ist signifikant größer als in der PBS- und MTX-Gruppe sowie bei gesunden Tieren. Numerisch am größten ist er in der MTX+OPG-Kombinationsgruppe, jedoch bestehen hier keine signifikanten Unterschiede zur OPG-Monotherapie (Abb. 25).

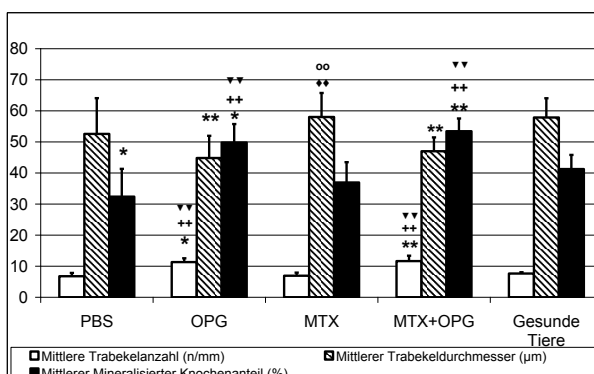


Abb.25: mittlere Trabekelanzahl, mittlerer Trabekeldurchmesser und mittlerer Mineralisierter Knochenanteil der primären Spongiosa des rechten Tibiakopfes 21 Tage nach Arthritisinduktion, Signifikanzen: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ im Vergleich mit gesunden Tieren, ++ $p < 0,01$ im Vergleich mit PBS, ▼▼ $p < 0,01$ im Vergleich mit MTX, oo $p < 0,01$ im Vergleich mit OPG, ◆◆ $p < 0,01$ im Vergleich mit MTX+OPG.

3.2.5 Histomorphometrie des Wirbelkörpers, sekundäre Spongiosa

3.2.5.1 Volumenparameter

Spongiosavolumen

Die MTX-Gruppe zeigte im Vergleich mit der PBS-Gruppe ein numerisch, jedoch nicht statistisch signifikant größeres Spongiosavolumen am 3. Wirbelkörper. Durch die kombinierte Gabe von MTX und OPG wurde eine signifikante Zunahme des Spongiosavolumens im Vergleich mit der PBS-Gruppe erreicht (Abb.26a).

Osteoidvolumen

Die histomorphometrische Analyse ergab nur in der MTX-, MTX+OPG-Gruppe sowie bei den gesunden Tiere Treffer auf Osteoid. Das berechnete Osteoidvolumen in diesen Gruppen unterschied sich aufgrund der großen Streubreiten nicht signifikant voneinander (keine Abbildung).

Trabekeldurchmesser

Der Trabekeldurchmesser war sowohl in der MTX-Gruppe als auch in der MTX+OPG Gruppe im Vergleich mit der PBS-Gruppe signifikant größer und zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit den gesunden Tieren (Abb.26b).

Osteoiddicke

Die Berechnung der Osteoiddicke war nicht in allen Gruppen möglich, da für einige Tiere keine Schnittpunkte mit Osteoid ermittelt werden konnten. In den verbleibenden traten keine signifikanten Unterschiede auf (keine Darstellung).

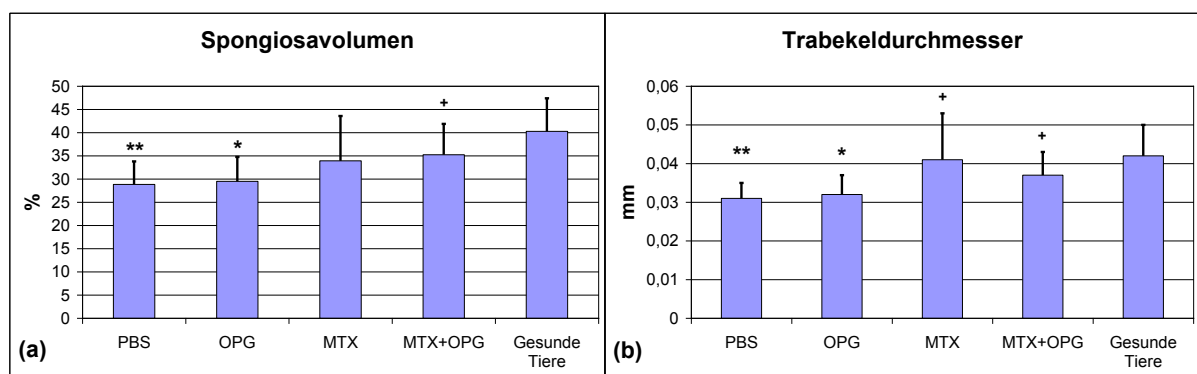


Abb.26: Spongiosavolumen (a) und Trabekeldurchmesser (b) des 3. Lendenwirbelkörpers 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung), Signifikanzen: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ im Vergleich mit gesunden Tieren, + $p < 0,05$ im Vergleich mit PBS

3.2.5.2 Oberflächenparameter

Anbauoberfläche

Die Anbauoberfläche am axialen Knochen war in der MTX-Gruppe im Vergleich mit der PBS- und OPG-Gruppe sowie gesunden Tieren signifikant erhöht. Die MTX+OPG-Gruppe zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit den genannten Gruppen. Auch der Unterschied zur MTX-Gruppe war nicht signifikant, jedoch war die Anbauoberfläche tendenziell niedriger (Abb. 27).

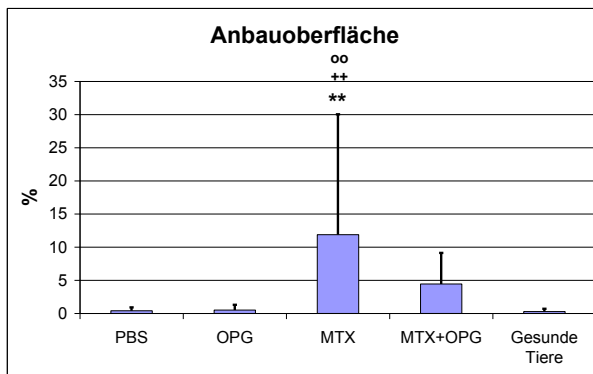


Abb.27: Anbauoberfläche des 3. Lendenwirbelkörpers 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung)
Signifikanzen: ** $p < 0,01$ im Vergleich mit gesunden Tieren, **oo** $p < 0,01$ im Vergleich mit OPG, ++ $p < 0,01$ im Vergleich mit PBS

3.2.5.3 Zelluläre Parameter

Osteoblasten-besetzte Oberfläche

Die Osteoblasten-besetzte Oberfläche war in der MTX-Gruppe im Vergleich mit der PBS- und OPG-Gruppe sowie gesunden Tieren signifikant erhöht. Die MTX+OPG-Gruppe zeigte die numerisch zweitgrößte Anbauoberfläche jedoch ohne signifikante Unterschiede zur PBS- und OPG-Gruppe (Abb. 28).

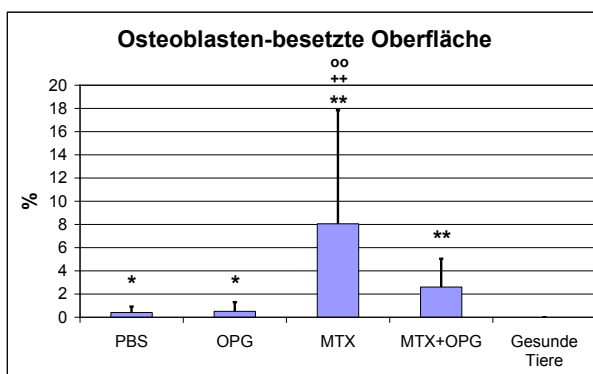


Abb.28: Osteoblastenbesetzten Oberfläche des 3. Lendenwirbelkörpers 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung)
Signifikanzen: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ im Vergleich mit gesunden Tieren, **oo** $p < 0,01$ im Vergleich mit OPG, ++ $p < 0,01$ im Vergleich mit PBS

Osteoklasten-besetzte Oberfläche

Am axialen Knochen führte die Therapie mit MTX hinsichtlich der Osteoklasten-besetzten Oberfläche zu keinen signifikanten Unterschieden im Vergleich mit der PBS-Gruppe, jedoch zu signifikant größeren Werten als bei gesunden Tieren. Durch die Kombination mit OPG wurde der Parameter im Vergleich zur MTX-Gruppe signifikant reduziert, so dass kein signifikanter Unterschied zu gesunden Tieren besteht (Abb. 29).

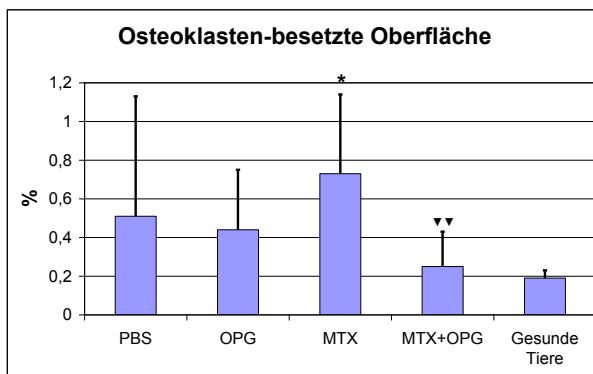


Abb.29: Osteoklasten-besetzte Oberfläche des 3. Lendenwirbelkörpers 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung)
Signifikanzen: * $p < 0,05$ im Vergleich mit gesunden Tieren, ▼▼ $p < 0,01$ im Vergleich mit MTX

Osteoklastenindex

Die Anzahl der Osteoklasten war bei den MTX-behandelten Tieren tendenziell am größten von allen Untersuchungsgruppen. Die MTX+OPG-Therapie führte zu einer Reduktion des Osteoklastenindex. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abb. 30).

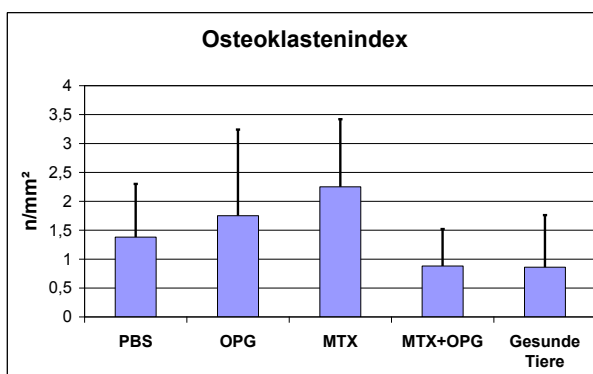


Abb.30: Osteoklastenindex des 3. Lendenwirbelkörpers 21 Tage nach Arthritisinduktion (Mittelwerte und Standardabweichung)
Signifikanzen: keine

4 Diskussion

4.1 Das Tiermodell

Die immunologischen Vorgänge in der Pathogenese der RA sind komplex und die Zusammenhänge der inflammatorischen Prozesse mit dem Knochenstoffwechsel bisher nur teilweise geklärt. Tiermodelle bieten den Vorteil, den Einfluss neuer Therapien unter standardisierten Bedingungen untersuchen zu können. Sie dienen weiterhin der Identifikation entscheidender Pathomechanismen der Erkrankung und können zur Aufklärung der bisher nur teilweise bekannten Ätiologie beitragen. Ein ideales Tiermodell sollte daher möglichst große Ähnlichkeit zur Rheumatoiden Arthritis aufweisen, einfach zu handhaben und gut zu reproduzieren sein. Für die RA existieren eine Vielzahl von Tiermodellen, die jeweils unterschiedliche Aspekte der RA widerspiegeln.

Die Antigen-induzierte Arthritis der Ratte ist eine Monarthritis, die durch die intraartikuläre Antigenapplikation bei systemisch immunisierten Tieren hervorgerufen wird (Bräuer et al. 1994a, Pohlers et al. 2004). Außer an Ratten läßt sich die AIA auch an Mäusen, Kaninchen und Meerschweinchen auslösen. Ein besonderer Vorteil der Antigen-induzierten Arthritis gegenüber anderen Arthritismodellen besteht in einem zeitlich determinierten Beginn der Arthritis durch die Injektion des Antigens in das Kniegelenk und dem Ablauf in definierten Stadien. Man unterscheidet eine akute Phase der Arthritis zwischen Tag 1 und 7 von einer chronischen Phase, die mehrere Wochen andauern kann (Brackertz et al. 1977). Die Antigeninjektion führt zunächst zur Bildung von lokalen Immunkomplexen zwischen dem applizierten Antigen und den durch die Immunisierung im Überflus vorhandenen zirkulierenden Antikörpern mit darauf folgender Komplementaktivierung (Arthusreaktion) (Cooke and Jasin 1972). In dieser frühen Phase wird das Entzündungsgeschehen maßgeblich durch IL-1 und TNF- α gesteuert. Mit dem Übergang in die chronische Phase kommt es zur Pannusformation und Gelenkdestruktion. Die Ursachen dieser Chronifizierung sind noch nicht vollständig geklärt. Diskutiert wird die Bedeutung der Antigenpersistenz im Gelenk (Consdon et al. 1971, Cooke and Jasin 1972) sowie einer protrahierten Antigenfreisetzung aus dem nicht metabolisierbaren Öl-Depot des Freund'schen Adjuvans (Glynn 1975). Weiterhin weisen verschiedene Untersuchungen darauf hin, dass die chronische Phase wesentlich durch die T-Zell-vermittelte Immunität bestimmt wird. IL-1 scheint für die anhaltende zelluläre Infiltration und Knorpeldegradation von entscheidender Bedeutung zu sein (Van De Loo et al. 1995, Van Den Berg et al. 1999).

Deutliche Übereinstimmungen der AIA mit der RA zeigen sich im histologischen Bild der chronischen Synovialitis mit Hyperplasie, Makrophagen-, Lymphozyten- und Plasmazellinfiltration und in der Pannusbildung mit erosiven Veränderungen an Knorpel und Knochen (Glynn 1975).

Wie auch die RA ist die AIA ein stark T-Zell abhängiger Prozeß, wie in verschiedenen Arbeiten zur Effektivität gegen T-Zellen gerichteter immunsuppressiver Medikamente (Bräuer, et al. 1994a) und monoklonaler Antikörper gegen CD4 (Pohlens et al. 2004) nachgewiesen werden konnte.

Durch den Vergleich der unilateralen AIA mit der unbehandelten Gegenseite bietet das Modell im Gegensatz zu anderen Modellen eine bessere Quantifizierbarkeit der arthritischen Gelenkveränderung.

Die auffälligsten Unterschiede der AIA zur RA bestehen in der Beschränkung der Arthritis auf das induzierte Gelenk, das Fehlen eines schubweisen Verlaufes sowie extraartikulärer Manifestationen.

Frühere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass sowohl die Immunisierung als auch der lokale entzündliche Prozeß systemische Auswirkungen haben. So konnten an kultivierten Peritonealmakrophagen von Tieren mit AIA Hinweise auf eine Aktivierung gefunden werden, die sich in einer signifikant erhöhten Zytokinsekretion von IL-1, IL-6 und TNF- α sowie von Stickstoffmonoxid äußerte (Bräuer et al. 1994b).

Wie bei der RA kommt es im Rahmen der inflammatorischen Prozesse bei der AIA zu einem periartikulären Knochenmasseverlust. Dieser geht mit gesteigerten zellulären Umbauvorgängen im Sinne einer high-turnover Osteoporose einher (Oelzner et al. 1999, Neumann et al. 2006). Der systemische Knochenmasseverlust ist demgegenüber deutlich weniger ausgeprägt. Bisher liegen Arbeiten zum Einfluss von Bisphosphonaten, Dexamethason und OPG auf den Knochenmasseverlust bei der AIA vor. In diesem Modellsystem existieren damit verhältnismäßig wenige Untersuchungen zum Knochenstoffwechsel im Rahmen der Entzündung. Die Vergleichbarkeit mit Ergebnissen aus anderen experimentellen Arthritismodellen ist jedoch, wie bereits erwähnt, eingeschränkt, da immer nur pathogenetische Teilaspekte der RA imitiert werden. Solange die Ätiologie und Pathogenese der RA nicht endgültig geklärt sind, kann es kein umfassendes Tiermodell für diese Erkrankung geben. Die komplexe Regulation des Knochenstoffwechsels im Tiermodell ist außerdem von einer Reihe von Faktoren wie Alter der Tiere, Stamm oder der Spezies abhängig. Prinzipiell ist somit auch die Übertragbarkeit der im Tierversuch gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen per se eingeschränkt und kann klinische Studien zur Klärung

der Bedeutung tierexperimentell gefundener Mechanismen und Medikamentenwirkungen beim Menschen nicht ersetzen.

4.2 Analyse der Knochenstruktur mittels Histomorphometrie und Linear Scanning

Eine wesentliche Voraussetzung für die histomorphometrische Untersuchung von Knochengewebe stellt ein genau standardisiertes Vorgehen sowohl bei der Gewinnung des Untersuchungsmaterials als auch bei der Messung selbst dar, da nur so die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden kann. Dies betrifft im Einzelfall die Haltungsbedingungen der Versuchstiere, Präparation, Fixierung der Proben, Einbettung, Schnittherstellung, Färbung und das Verfahren der Messung.

Haltungs- und Fütterbedingungen, Töten und Präparation der Versuchstiere wurden entsprechend vorangegangener Untersuchungen (Themel 1990, Wünsche und Wünsche 1994, Oelzner 1999, Neumann 2006) durchgeführt.

Die zur Verfügung stehende Meßfläche wurde durch frontale Schnittführung am dritten Lendenwirbelkörper und sagitale Schnittführung am Tibiakopf möglichst groß gewählt und gewährleistet eine ausreichende Anzahl von Meßfeldern. Wie in vorangegangenen Arbeiten wurde durch die Durchtrennung der Pediculi arcus der Wirbelkörper sowie die Eröffnung des Tibiaschaftes das Eindringen der Fixierungs- und Einbettungsmedien erleichtert. Hinsichtlich der Fixation der Präparate vor der Einbettung existiert in der Literatur eine Vielzahl möglicher Varianten. Abweichend von den Vorgängerarbeiten wurde in dieser Arbeit Aceton an Stelle von Carnoyscher Lösung zur Fixierung der Präparate verwendet. Die Acetonfixierung ist ein in der klinischen Routine gebräuchliches Verfahren für die Aufbereitung von Beckenkammbiopsien für die Kunststoffeinbettung. Aceton zeichnet sich als organisches Lösungsmittel durch ein gutes Eindringvermögen aus und es entwässert und entfettet die Präparate. Die Strukturen werden anderen Fixierungsmethoden vergleichbar gut erhalten. Es stellt eine einfache, schnelle und preisgünstige Methode dar, die sowohl für konventionelle Histologie als auch immunhistochemische Verfahren geeignet ist (Wolf 1992).

Die Fixierung der Präparate in Aceton stellte dabei den ersten Schritt zur Entwässerung der Präparate dar. Als Intermedium wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers Xylol eingesetzt und auch im Weiteren nach Vorschrift verfahren.

Für die histomorphometrische Untersuchung ist die Bearbeitung von unentkalktem Knochen erforderlich, da nur so eine Beurteilung der Strukturen des mineralisierten Knochens und des

Osteoids sowie der zellulären Komponenten möglich ist. Die Einbettung unentkalkter Knochen erfordert ein Material, das in etwa die gleiche Härte wie Knochen aufweist. Hierfür haben sich Kunststoffe auf Methyl-Methacrylat-Basis bewährt. In dieser Arbeit wurde das Polymerisationssystem Technovit[®] 9100 NEU der Firma Heraeus Kulzer verwendet. Es ermöglicht mit Hilfe eines Katalysatorsystems und zusätzlicher Komponenten eine gesteuerte Polymerisation im Gefrierschrank (-8 °C bis -20 °C) und garantiert so eine vollständige Ableitung der Polymerisationswärme, die zu einer thermischen Schädigung des Gewebes führen könnte. Es hat sich sowohl für die Routinehistologie am unentkalkten Knochen als auch für immunhistochemische Verfahren als gut geeignet erwiesen (Yang 2003). Mittels eines Spezialmikrotoms mit Hartschnittmetallmessern wurden von den so eingebetteten Präparaten 4 µm dicke Schnitte hergestellt. Dabei ist vor dem Schneideprozeß ein Benetzen der Oberfläche mit 30%igem Alkohol (sog. Schneideflüssigkeit) notwendig, um durch ein partielles Aufweichen der obersten Schicht das durch Scherkräfte bedingte Splintern der Knochenbälkchen zu minimieren. Aufgrund seiner histologischen Inhomogenität stellt das Schneiden des Tibiakopfpräparates mit angrenzenden knorpeligen Gelenkstrukturen eine besondere Schwierigkeit dar. Im Bereich der Grenzfläche, an der Knochen und Knorpel aufeinander treffen, kommt es aufgrund der Härteunterschiede der beiden Gewebeanteile häufig zu Rissen. Die Schnitte werden daraufhin manuell vom Mikrotom abgenommen und unter Zugabe von 85%igem Alkohol auf dem Objektträger gestreckt, da die beim Vorgang des Schneidens unvermeidbare Stauchung des Präparates zu Artefakten in Form von Falten und Verzerrungen der histologischen Präparate führen würde. Das Beträufeln mit Alkohol sowohl vor dem Schneiden als auch zum Strecken des Präparates sowie die mechanische Belastung beim Schneidevorgang und Abheben sind für das Auftreten von Artefakten in Form von ausgebrochenen Knochenbälkchen verantwortlich, die sich trotz größter Sorgfalt nicht vollständig vermeiden lassen. Bei drei Präparaten war aus diesen Gründen das Anfertigen eines Schnittes in ausreichender Qualität nicht möglich.

Die Färbung nach Masson-Goldner (modifiziert nach Malluche) eignet sich gut sowohl zur Differenzierung von mineralisiertem Knochen und Osteoid als auch der zellulären Komponenten.

Zur Analyse des Knochengewebes wurde das Standardverfahren der Histomorphometrie eingesetzt. Es handelt sich bei dieser Methode definitionsgemäß um die quantitative Messung morphologischer Eigenschaften an einem histologischen Probestück durch Lichtmikroskopie (Hollinger u. Kleinschmidt 1990). Die mathematische Grundlage des Verfahrens stellt die Stereologie dar. Stereologie ist definiert als ein Komplex mathematischer Verfahren, welche

dreidimensionale Strukturparameter zu zweidimensionalen Schnittflächen dieser Struktur in Beziehung setzen (Weibel 1979). Es handelt dabei um statistische Untersuchungen, die es ermöglichen, über die Analyse zufälliger linearer und ebener Schnitte Aussagen über die geschnittenen Körper zu treffen. Dabei wird angenommen, dass jeder durch einen zufälligen Schnitt gewonnene Profiltyp mit einer definierten Wahrscheinlichkeit in der Struktur vorkommt und daher repräsentativ für diese ist. Die Anwendung stereologischer Methodik auf die zweidimensionale Messung morphologischer Eigenschaften wird als Morphometrie bezeichnet, dementsprechend umschreibt der Terminus Histomorphometrie deren Anwendung am Gewebe. Das Prinzip beruht darauf, dass der Volumenanteil einer Gewebekomponente proportional zum Flächenanteil der Ausschnitte dieser Komponente im Gewebe ist (Feifel et al. 1994). Dabei wird die Volumendichte der einzelnen Komponenten mittels Punktzählverfahren ermittelt. Unter Berücksichtigung der Besonderheit der Architektur der Spongiosa wurde von Merz ein spezielles Zählnetz entwickelt, das es ermöglicht, die Anisotropie des Knochengewebes, also die Abhängigkeit des mikroskopischen Bildes von seiner Ausrichtung, durch ein isotropes Meßsystem auszugleichen. Dieses besteht an Stelle der sonst üblichen geraden Meßstrecke aus 6 sinusförmigen Wellenlinien mit 36 Treffern.

Die Anzahl der in einer morphologischen Komponente registrierten Testpunkte, also der Treffer bzw. Schnittpunkte, ist dabei neben der Wahrscheinlichkeit des Vorkommens dieser Komponente von der Gesamtzahl der Meßpunkte abhängig. Ebenso hängt auch der Variationskoeffizient eines Meßwertes von diesen beiden Größen ab: Je größer die Volumendichte einer Komponente, desto kleiner ist der Variationskoeffizient. Anhand der Volumenanteile der einzelnen Strukturen ist eine Einteilung in 4 Kategorien gemäß der Größe der Variationskoeffizienten möglich. Nach Wünsche (Wünsche und Wünsche 1994) sind durch diese Meßmethode die Parameter Spongiosavolumen, Trabekeldurchmesser, Anbauoberfläche und Abbauoberfläche und mit größeren Einschränkungen auch der Oberflächenanteil mit Osteoblasten und der Oberflächenanteil mit Osteoklasten statistisch vergleichbar, während bei Osteoidvolumen und Osteoiddicke bestenfalls Tendenzen aufgezeigt werden können. Theoretisch läßt sich der Variationskoeffizient durch die Verwendung einer größeren Anzahl von Meßfeldern sowie eine stärkere Mikroskopvergrößerung verringern, da beides eine größere Anzahl an Meßpunkten in einer Struktur zur Folge hat. Die Anzahl der auswertbaren Meßfelder ist jedoch bei der Ratte aufgrund der begrenzten Spongiosafläche im Wirbelkörper und Tibiakopf wenig zu steigern und eine stärkere Vergrößerung ginge mit einem erheblich erhöhten Arbeits- und Zeitaufwand einher. Untersuchungen von Dellung 1975 haben außerdem gezeigt, dass ab einer bestimmten

Steigerung der Meßfeldanzahl oder der Vergrößerung nur noch eine geringfügige Verkleinerung des Variationskoeffizienten möglich ist (Delling 1975).

Weitere Probleme für die Vergleichbarkeit histomorphometrisch gewonnener Daten an Rattenknochen ergeben sich bei der Definition der Schnittebene, die bei allen Präparaten übereinstimmen muß. Diese Forderung leitet sich aus der Inhomogenität der Spongiosastruktur sowohl am Wirbelkörper als auch am Tibiakopf ab. Rattenwirbelkörper und –tibiaköpfe sind an den lateralen Seiten von Kortikalis umgeben und weisen an einem Ende bzw. an beiden Enden Epiphysenfugen auf. Dabei nimmt die Spongiosadichte zur Kortikalis und zur Epiphyse hin zu. Im Bereich der Ansatzstellen der Pediculi arcuati der Wirbelkörper treten ebenfalls Spongiosaverdichtungen auf, wohingegen der Tibiaschaft spongiosafrei und mit Fettmark gefüllt ist. In vorliegender Arbeit wurde darauf geachtet, einen repräsentativen Schnitt aus der Mitte des Präparates anzufertigen. Bei der Einbettung wird durch die Platzierung des Präparates auf dem Boden des Teflongefäßes erreicht, dass sich die dorsale Fläche des Wirbelkörpers bzw. die laterale Fläche der Tibia nach dem Aufblocken an der Oberfläche des Kunststoffblöckchens befindet. Dabei ist die genaue Ausrichtung der filigranen Strukturen (nach Themel betragen die Ausmessungen des dritten Lendenwirbelkörpers bei der bereits fünfzehn Monate alten männlichen Ratte etwa 7,5 x 5 x 3,5 mm, diese sind bei jüngeren Tieren sogar noch erheblich kleiner) in der Form schwierig und es kann nach Aufbringen des Einbettungsmediums auch leicht zum Verrutschen der Präparate kommen (Themel 1990). Nach Entfernung der eventuell noch über dem Knochen befindlichen Kunststoffschicht mittels einer Feile erfolgt das Justieren des Blöckchens im Mikrotom und das Anschneiden so, dass die Schnittebene am Wirbelkörper möglichst genau in der Mitte zwischen Ventral- und Dorsalfläche und am Tibiakopf zwischen den Kondylen plaziert wird.

Hieraus ergeben sich bei der kritischen Betrachtung der Methodik die Aufbereitung und das Schneiden der Präparate als mögliche Fehlerquellen, da sie nach „Augenmaß“ durchgeführt werden müssen und Abweichungen von der metrischen Mitte des Präparates trotz größter Sorgfalt nicht immer vermieden werden können. Um die Größe des Fehlers durch Abweichungen von der Mitte zu bestimmen, wurden von Wünsche Serienschritte von Wirbelkörpern in definierten Abständen angefertigt und histomorphometrisch gemessen. Dabei zeigte sich bei der Betrachtung der Variationskoeffizienten der Parameter nur eine geringe Abweichung bis zu einem Abstand vom 50 µm, jedoch eine deutlich größere Abweichung bei größeren Abständen (im konkreten Fall bei 1000 µm). Daraus folgt, dass

geringe Abweichungen der Präparatetiefe keine wesentlichen Auswirkungen auf die Vergleichbarkeit haben.

Die Linear scanning Methode ist aufgrund ihrer hohen räumlichen Auflösung eine ausgezeichnete Methode zur Charakterisierung der proximalen Anteile der Tibiametaphyse.

Durch die Art der Meßgeometrie mittels einer Meßlinie ist es im Gegensatz zur Verwendung von quadratischen Meßfeldern möglich, unabhängig von der Krümmung der Wachstumszone Meßwerte in definiertem Abstand von der Epiphysenfuge zu erheben. Die räumliche Entfernung besitzt dabei gleichzeitig eine Zeitdimension. Parallel zur Epiphysenfuge angeordnete Knochenstrukturen wurden zur gleichen Zeit gebildet. Die Sensitivität der Linear scanning-Untersuchung ist entsprechend der Wachstumsdynamik entscheidend vom Abstand von der Epiphysenfuge und vom Alter der Tiere abhängig. Für die Parameter des Linear scanning nehmen die Variationskoeffizienten mit zunehmender Entfernung von der Epiphysenfuge zu und steigen an jedem Meßort mit zunehmendem Alter der Tiere an (Wünsche und Wünsche 1994). Diese Beobachtung ist darauf zurückzuführen, dass in den epiphysennahen Bereichen und bei jüngeren Tieren die Knochenneubildung, das *bone modeling* dominiert, während mit zunehmendem Abstand von der Epiphysenfuge und bei älteren Tieren das *bone remodeling* überwiegt. Da die Prozesse des Bone remodeling eine Anpassung der Knochenstruktur auf lokale und individuelle Belastung darstellen, nehmen in diesem Bereich die interindividuellen Schwankungen und damit die Variationskoeffizienten zu. Epiphysenfern ist daher die konventionelle Histomorphometrie besser geeignet, da die individuellen Ausprägungen durch die Messung mit Meßfeldern nivelliert werden. Die Definition des proximalen Metaphysenbereiches ist immer vom Alter der Tiere abhängig. Da die Wachstumsgeschwindigkeit mit zunehmendem Lebensalter abnimmt, vergrößert sich bei älteren Tieren auch die Zeitdifferenz, die zwischen zwei Meßintervallen liegt. Für weibliche Ratten in der Altersgruppe bis acht Wochen sind nach Wünschens Untersuchungen die Variationskoeffizienten im Bereich zwischen 50 und 975 μm relativ niedrig, so dass bei der hier vorliegenden Arbeit eine hohe Sensitivität der Parameter im untersuchten Bereich vorausgesetzt werden darf.

4.3 Beziehung zwischen Entzündungsaktivität und Knochen bei der AIA der Ratte

4.3.1 Einfluss der Arthritis auf die periartikuläre sekundäre Spongiosa

Die sekundäre Spongiosa der Diaphyse erfüllt im Gegensatz zur primären Spongiosa, die am wachsenden Röhrenknochen vor allem das Längenwachstum realisiert, die Funktion der Kraftübertragung und stellt durch das Zusammenspiel mit der Kortikalis die mechanische Stabilität der Diaphyse sicher. Die unbehandelte (PBS-behandelte) AIA der Ratte führt zu einer signifikanten Verminderung des Spongiosavolumens. Dieser Parameter gibt Auskunft über den aktuellen Gehalt an mineralisiertem und nicht mineralisiertem Knochen in Relation zum Gesamtvolumen und spiegelt das Ergebnis der zellulären Umbauprozesse wider. Die Reduktion des Spongiosavolumens geht auf der einen Seite mit einer signifikanten Erhöhung der Parameter, die für eine Steigerung der Resorptionsvorgänge stehen (Osteoklastenoberfläche, Osteoklastenindex) einher, andererseits weisen die tendenzielle Steigerung der Anbauoberfläche und die signifikant gesteigerte Osteoblasten-besetzten Oberfläche auf eine erhöhte Knochenformation hin. Der erhöhte zelluläre Anbau kommt auch in einem tendenziell gesteigerten Osteoidvolumen zum Ausdruck. Allerdings konnte in Vorgängerarbeiten keine Steigerung der Mineralisation gezeigt werden (Oelzner et al. 2000). Die Steigerung der Knochenresorption im Rahmen der Arthritis führt demnach über das zelluläre Coupling zu einer reaktiven Zunahme der Knochenneubildung, die aber letztlich nicht ausreicht, die gesteigerte Resorption auszugleichen. Die beschriebene Steigerung der Knochenumbauvorgänge mit einem Nettoüberwiegen der Knochenresorption in der periartikulären sekundären Spongiosa sind charakteristische histologische Veränderungen im Rahmen der Arthritis und werden auch bei der RA (Goldring and Gravallesse 2000) und bei anderen Arthritismodellen beschrieben (Romas et al. 2002) und konnten auch in vorangegangenen Arbeiten am Modell der AIA dokumentiert werden (Oelzner et al. 1999, Neumann 2006).

4.3.2 Einfluss der Arthritis auf die periartikuläre primäre Spongiosa

Der Effekt der Arthritis ist an der primären Spongiosa im Vergleich mit den Veränderungen an der sekundären Spongiosa deutlich geringer ausgeprägt. Hinsichtlich des mineralisierten Knochenanteils ließen sich erst im distalen Drittel in kurzen Abschnitten (zwischen 585-780 µm und 825-870 µm) signifikant geringere Werte als bei Gesunden in der unbehandelten

Arthritisgruppe nachweisen. Der Trabekeldurchmesser war im gesamten untersuchten Bereich bei der AIA zwar tendenziell vermindert, der Unterschied erreichte aber nur in kurzen Abschnitten statistische Signifikanz. Die Trabekelanzahl war ab 645 μm Entfernung von der Epiphysenfuge signifikant geringer als bei gesunden Tieren. Auch in vorangegangenen Untersuchungen am Modell der AIA konnte gezeigt werden, dass sich der Effekt der Arthritis auf den Knochen erst distal einer Entfernung von etwa 450 μm manifestierte (Neumann, 2006). In Untersuchungen am Modell der TNF- α transgenen Mäuse, wo die Knochenanalyse mittels konventioneller Histomorphometrie erfolgte, ließ sich kein Einfluss der Arthritis auf das Knochenvolumen der primären Spongiosa feststellen (Schett et al. 2003). Die unterschiedliche Ausprägung der Arthritiseffekte auf die proximalen und distalen Anteile der primären Spongiosa könnte darauf hindeuten, dass die Knochenformationsprozesse im Rahmen des *bone modelling* in den epiphysenfugennahen Bereichen der primären Spongiosa von den inflammatorischen Einflüssen nur wenig beeinflusst werden, während es distal im Rahmen des Knochenremodelings bei der AIA zur verstärkten Resorption des neu gebildeten Knochens kommt. Es ist auch denkbar, dass wachstumsfugennah die durch proinflammatorische Mediatoren induzierte Knochenresorption durch kontinuierliche Knochenneubildung besser antagonisiert wird. Letztlich muß angenommen werden, dass neben der anatomischen Inhomogenität dieser Struktur auch entsprechende Unterschiede im Knochenmetabolismus zum Tragen kommen, deren Einfluss mit dieser Methode nicht ausreichend geklärt werden kann.

4.3.3 Einfluss der Arthritis auf den axialen Knochen

Die Untersuchung des dritten Lendenwirbelkörpers zeigte eine signifikante Reduktion des Spongiosavolumens und des Trabekeldurchmessers in der unbehandelten Arthritisgruppe im Vergleich mit den gesunden Tieren. Die zellulären Parameter wiesen mit tendenziell gesteigerten Parametern der Knochenresorption und teilweise signifikant gesteigerten Formationsparametern den Befunden am Tibiakopf vergleichbare Resultate auf. Auch vorangegangene Arbeiten am Modell der AIA zeigen in ihrer Tendenz mit unserer Untersuchung übereinstimmende Ergebnisse, wobei jedoch hinsichtlich des Spongiosavolumens als auch der zellulären Parameter nur numerische Unterschiede registriert wurden (Oelzner et al. 1999, Neumann 2006). Ein Erklärungsansatz für die graduellen Abweichungen bietet die Tatsache, dass der vorliegende Versuch im Gegensatz zu Vorgängerarbeiten nicht an Tag 28, sondern schon an Tag 21 nach Arthritisinduktion beendet

wurde. Vignery und Baron beschrieben für die Ratte eine im Vergleich zum Menschen deutlich höhere Umbaugeschwindigkeit des Knochens. Die Zeitdauer des Ablaufes eines Remodeling-Zyklus wird von ihnen auf etwa 6 Tage geschätzt (Vignery and Baron 1980). Es ist daher denkbar, dass bei längerer Versuchsdauer von 28 Tagen Veränderungen am axialen Knochen, die sich an die Phase der akuten Entzündung anschließen mit Übergang in das chronische Stadium bereits wieder rückläufig und nicht mehr anhand signifikanter histomorphometrischer Befunde zu detektieren sind. Auch in anderen Arthritismodellen der Ratte mit ausgeprägterem systemischem Charakter der Entzündung konnte neben dem periartikulären ein axialer Knochenmasseverlust nachgewiesen werden (Stolina et al. 2005). Die histomorphometrische Untersuchung von Wirbelkörpern zeigte in Untersuchungen von Stolina et al. ein signifikant reduziertes Knochenvolumen sowohl in der Kollagen-induzierten Arthritis als auch im Adjuvans-Arthritis-Modell. In beiden Modellen war der Knochenmasseverlust mit signifikant gesteigerten Osteoklastenzahlen assoziiert, wohingegen die Osteoblastenzahl im Adjuvans-Arthritis-Modell, nicht jedoch im CIA-Modell signifikant reduziert war.

4.4 Einfluss der Therapie mit OPG auf die Entzündungsaktivität und den Knochen bei der AIA

4.4.1 Einfluss der Therapie mit OPG auf die Entzündung

Für die Gelenkschwellung, die über den Verlauf des Experimentes zur Beurteilung der Intensität der Arthritis verwendet wurde, ergaben sich unter der Behandlung mit OPG keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten Arthritisgruppe. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit vorangegangenen Arbeiten am gleichen Modell sowie an anderen Modellsystemen, die keinen wesentlichen Einfluss von OPG auf die Gelenkentzündung feststellen konnten (Kong et. al. 1999, Romas et al. 2002, Redlich et. al. 2002). In wieweit auf zellulärer Ebene entzündliche Veränderungen durch die OPG-Therapie beeinflusst wurden, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. In vorangegangenen Untersuchungen am gleichen Modell konnte jedoch weder hinsichtlich der zellulären Infiltration der Synovialmembran noch der Zerstörung von Knorpelstrukturen und subchondralem Knochen ein signifikant protektiver Effekt für OPG nachgewiesen werden (Neumann 2006).

4.4.2 Einfluss der Therapie mit OPG auf den periartikulären Knochen

4.4.2.1 Sekundäre Spongiosa

Die Behandlung mit OPG führte in unserem Experiment zu einer signifikanten Reduktion der Resorptionsparameter in Form der Osteoklasten-besetzten Oberfläche und des Osteoklastenindex im Vergleich mit den unbehandelten Arthritistieren. Die Knochenformationparameter waren tendenziell aber nicht signifikant niedriger als in der unbehandelten AIA-Gruppe. Unerwartet gering fiel dahingegen das Spongiosavolumen der OPG-behandelten Tiere aus. Der Trabekeldurchmesser unterschied sich ebenfalls nicht signifikant von der unbehandelten AIA Gruppe. Die fehlende Hemmung des entzündungsassoziierten Knochenmasseverlustes an der periartikulären sekundären Spongiosa, die im Parameter Spongiosavolumen als „Nettobilanz“ der zellulären Umbauprozesse zum Ausdruck kommt, steht scheinbar im Widerspruch sowohl zu Untersuchungen der Wirkung von OPG in anderen Arthritismodellen als auch zu vorangegangenen Analysen am Modell der AIA der Ratte (Neumann 2006). Im Modell der Adjuvans-Arthritis konnten Kong et. al. durch die Administration von 1,0 mg/kg OPG täglich über sieben Tage sowohl den arthritissassoziierten Anstieg der Osteoklastenzahl im Talus als auch den Knochenmasseverlust, ermittelt mittels Knochenmineraldichtemessung der tibiotarsalen Region, komplett unterbinden (Kong, et al. 1999b). Schett und Mitarbeiter konnten bei TNF- α -transgenen Mäusen sowohl in der Knochendichtemessung als auch durch histomorphometrische Analyse des Tibiakopfes zeigen, dass die Gabe von 15 mg/kg OPG zweimal wöchentlich den TNF-getriggerten Knochenmasseverlust komplett verhinderte. In diesem Modell wurde durch die Therapie mit OPG sowohl die Resorption als auch die Formation supprimiert (Schett et al. 2003). Der Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeiten ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen Modellsysteme der Arthritis eingeschränkt. Für das hier verwendete Modell der AIA fand Neumann zwar eine partielle, signifikante Hemmung des Knochenmasseverlustes an der sekundären Spongiosa des Tibiakopfes, das Spongiosavolumen erreichte jedoch nicht das Niveau gesunder Tiere. Sowohl Resorptionsoberfläche als auch Formationsparameter waren unter OPG im Vergleich zur unbehandelten Arthritis signifikant reduziert (Neumann 2006). In unserer Untersuchung war dagegen am Tag der Auswertung die Knochenformation im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe nur tendenziell reduziert. Hinsichtlich der Ineffektivität der OPG-Therapie in unserem Experiment kommen prinzipiell zwei Erklärungen in Betracht: Zum einen eine zur Hemmung des Knochenmasseverlustes zu geringe OPG-Dosis, zum anderen RANKL

unabhängige Mechanismen der Knochenresorption, welche nicht durch OPG gehemmt werden.

Auch im Hinblick auf die unterschiedlichen Ergebnisse beider Arbeiten am Modell der AIA scheinen Abweichungen in der Dosierung und den Applikationsintervallen von OPG von Bedeutung. Die Tiere erhielten in unserem Experiment OPG in einer Dosis von 2,5 mg/kg Körpergewicht insgesamt acht mal zwischen Tag 0 und Tag 17. Entsprechend erhielten die Ratten eine kumulative Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht. In den Untersuchungen von Neumann wurden dagegen 3 mg/kg KG an insgesamt 10 Tagen appliziert, entsprechend einer kumulativen Dosis von 30 mg/kg. Von Campagnuolo et. al. liegen Untersuchungen zur Wirksamkeit von OPG in Abhängigkeit von Dosierung und Applikationsintervallen am Adjuvans-Arthritismodell der Ratte vor. Die tägliche subcutane Injektion einer Minimaldosis von 2,5 mg/kg KG über sieben Tage konnte in diesem Modell die Knochendichte konservieren (Campagnuolo et al. 2002). Für die Wirksamkeit von OPG ist weiterhin eine frühe therapeutische Intervention zu Beginn der Erkrankung von entscheidender Bedeutung (Bolon et al. 2002). Diese Beobachtung wird auch durch Untersuchungen gestützt, die in zwei Arthritismodellen der Ratte einen Anstieg von RANKL in den ersten 1-2 Tagen nach Krankheitsbeginn nachweisen (Stolina et al. 2005), sowie durch Untersuchungen zur Osteoklastenkinetik an drei unterschiedlichen Arthritismodellen der Ratte, die die Generierung funktionstüchtiger Osteoklasten in der frühen Phase der Arthritis belegen (Schett et al. 2005a). Entsprechend diesen Untersuchungen erfolgte die Behandlung mit OPG erstmals am Tag der Injektion des Antigens in das Kniegelenk, die den Beginn der Arthritis determiniert. Die Ergebnisse vorliegender Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass die hier verwendete OPG-Dosis von 2,5 mg/kg KG im untersuchten Zeitintervall nicht ausreichte, um den Einfluss der Inflammation auf die Knochenresorption komplett zu inhibieren. Die signifikante Reduktion der Parameter Osteoklasten-besetzte Oberfläche und Osteoklastenindex weisen zwar auf eine Reduktion der resorptiven Vorgänge am Tag 21 nach Arthritisinduktion hin, ein Effekt in Form einer Nettozunahme des trabekulären Knochenvolumens im Vergleich mit der unbehandelten Arthritis ist aber zu diesem Zeitpunkt nicht nachweisbar. In Analogie zu den Beobachtungen im CIA- und AIA-Modell ist es denkbar, dass vor allem in der Phase der akuten Arthritis in den ersten Tagen, in denen die größten RANKL-Konzentrationen im Gelenk und Serum vorliegen, ein Knochenmasseverlust durch gesteigerte Resorption durch Osteoklasten stattfand, der durch die gewählte Dosierung von OPG nicht ausreichend antagonisiert werden konnte. Andererseits kann angenommen werden, dass mit abnehmender RANKL-Konzentration im Verlauf des Versuches die

applizierte OPG-Dosis jedoch ausreichte, um die osteoklastären Parameter signifikant zu senken. Der osteoprotektive Effekt der OPG-Therapie in der von uns gewählten Dosierung in Form einer Zunahme der Knochenmasse würde somit erst zu einem späteren Zeitpunkt sichtbar. Untersuchungen zur Kinetik von RANKL im Verlauf der AIA, die diese Hypothese stützen könnten, liegen allerdings bisher nicht vor. Wie oben bereits erwähnt, wurde unser Versuch auch zu einem früheren Zeitpunkt beendet als das Experiment von Neumann.

Dennoch könnte die inkomplette Blockade des Knochenmasseverlustes auch bei höheren OPG-Dosierungen im AIA-Modell drauf hindeuten, dass auch alternative Wege der Osteoklastenaktivierung existieren, die nicht von RANKL abhängig sind. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass die durch T-Zellen induzierte Osteoklastenaktivierung in vitro durch OPG nicht vollständig blockiert werden kann (Weitzmann et al. 2001). Für eine Vielzahl von Zytokinen ist eine Beeinflussung der Osteoklastendifferenzierung und -aktivität beschrieben. Dabei ist für viele nicht abschließend geklärt, in wie weit sie von RANKL unabhängig wirken können oder zumindest teilweise RANKL-vermittelt wirken. In der Literatur wird die Rolle der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 in diesem Zusammenhang kontrovers diskutiert. In einer Studie wurde in vitro über die Stimulation mit TNF- α und M-CSF eine Differenzierung von Osteoklasten aus Vorläuferzellen der Maus induziert. Die Osteoklastenformation ließ sich weder durch OPG noch durch das Fab-Fragment von anti-RANK-Antikörper inhibieren, was auf einen RANKL unabhängigen Aktivierungsweg hinweist. Die TNF induzierten Osteoklasten waren jedoch erst in Anwesenheit von IL-1 aktiv (Kobayashi et al. 2000). Jimi et al. zeigten, dass IL-1 in vitro das Überleben, die Aktivierung und die Resorption von Osteoklasten direkt steigern kann (Jimi et al. 1999). Dahingegen konnte in einer Arbeit an Mäusen eine durch TNF- α und IL-1 induzierte Knochenresorption durch OPG gehemmt werden (Morony et al. 1999). Da TNF- α und IL-1 nachweislich zu einer Expression von RANKL in Osteoblasten führen, (Hofbauer et al. 1999a) sind sowohl RANKL abhängige als auch unabhängige Mechanismen der Osteoklastenaktivierung durch beide Zytokine wahrscheinlich. Untersuchungen von Lam et al. zu Folge, ist die TNF-induzierte Osteoklastendifferenzierung nur unter permissiven Konzentrationen von RANKL möglich (Lam et al. 2000). In einer reinen Osteoklastenvorläuferzellkultur konnte TNF- α alleine keine Differenzierung induzieren. Nach Zugabe von weniger als 1% der für die Osteoklastendifferenzierung benötigten Menge RANKL ließ sich dahingegen eine massive Stimulation der Osteoklastendifferenzierung durch TNF- α nachweisen. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte in vivo durch die Administration von TNF- α eine Osteoklastenformation in chimerischen Mäusen induzieren, die zwar über

TNF- α -empfindliche Osteoklastenvorläuferzellen, aber TNF- α -unempfindliche Stromazellen verfügten. Da unter Ausschaltung der stromalen TNF- α -getriggerten RANKL Expression nur basale RANKL-Spiegel vorliegen, konstatieren die Autoren, dass TNF- α die Osteoklastogenese unabhängig von erhöhten RANKL-Spiegel induzieren kann (Lam et al. 2000).

Auch für die Zytokine IL-6 und IL-11 (Kudo et al. 2003) und für Leukotrien B4 (Jiang et al. 2005) wurde in vitro eine RANKL-unabhängige Osteoklastenaktivierung beschrieben.

Auch wenn somit prinzipiell RANKL-unabhängige Effekte anderer Zytokine auf die Knochenresorption hinsichtlich des fehlenden Effektes von OPG in unserem Experiment nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden können, sprechen die Ergebnisse aus anderen Experimenten eher für eine zu niedrige OPG-Dosierung als Hauptursache für die unzureichende Wirksamkeit von OPG.

4.4.2.2 Primäre Spongiosa

An der primären Spongiosa führt OPG zu einer massiven Zunahme des Mineralisierten Knochenanteils, der ab einer Entfernung von 225 μm von der Epiphysenfuge signifikant über dem der PBS-behandelten Tiere liegt und sogar über das Niveau der gesunden Tiere ansteigt. Auch in vorangegangenen Experimenten ließ sich eine entsprechende Zunahme der mineralisierten Strukturen der primären Spongiosa unter OPG-Therapie der AIA nachweisen (Neumann et. al 2006). Dieser Zuwachs an Knochenmasse ist in unserem Experiment durch eine drastische Steigerung der Trabekelanzahl bedingt, die ab 100 μm A.v.E. über das Maximum in der gesunden Gruppe ansteigt und mit steigender Distanz von der Epiphysenfuge wesentlich langsamer abfällt als bei den gesunden Tieren. Der Trabekeldurchmesser nimmt hingegen im Verlauf nur wenig zu und ist im gesamten untersuchten Bereich tendenziell sogar geringer als in der unbehandelten Arthritisgruppe.

Unter physiologischen Bedingungen kommt es im Rahmen der Wachstumsvorgänge epiphysenfugennah zur Ausbildung vieler, vorwiegend längsgerichteter, schmaler Trabekel. Mit zunehmendem Abstand von der Epiphysenfuge nimmt die Trabekelanzahl ab, während die Trabekelstärke kontinuierlich zunimmt. Der Umbau der Architektur hin zu einer „Gewölbekonstruktion“ stellt dabei eine optimale Kraftübertragung der Epiphyse auf die Diaphyse sicher (Wünsche und Wünsche 1994). Diese Umbauvorgänge sind in der OPG-Gruppe so nicht nachweisbar. Hier entspricht das Verhältnis Trabekelanzahl zu Trabekeldurchmesser konstant dem in den epiphysenfugennahen Knochenbereichen bei den gesunden Tieren. Für das Abweichen vom physiologischen Aufbau der Diaphyse in der OPG-

Gruppe kommen prinzipiell zwei Erklärungen in Frage. In erster Linie kommt ursächlich eine Hemmung der entsprechenden Modeling/Remodelingprozesse im Sinne der Knochenreifung unter OPG in Betracht, so dass die neugebildeten unreifen, dünnen Trabekel distal der Epiphysenfuge durch eine Hemmung der Osteoklastenaktivität nicht entsprechend resorbiert werden können.

Andererseits ist in Anbetracht des Arthritis-induzierten high-turnovers ein relatives Überwiegen der gesteigerten Knochenformation bei durch OPG gehemmter Knochenresorption, wie es von Schett et. al. diskutiert wird, denkbar.

Schett et. al. beschreiben eine dramatische Verbreiterung der primären Spongiosa unter Therapie mit OPG im Modell der TNF- α -transgenen Maus (Schett et al., 2003). Die Verbreiterung der primären Spongiosa unter OPG-Therapie trat nur bei Arthritistieren, nicht jedoch bei der Applikation der gleichen Dosis in gesunden Mäusen auf. Die unterschiedliche Ausprägung der Effekte von OPG an der primären Spongiosa bei gesunden Tieren und Arthritistieren in Schetts Untersuchung werden durch einen massiv gesteigerten Knochenumsatz im Rahmen der Arthritis erklärt. Dabei kommt es in Folge der gesteigerten Osteoklastenaktivität im Rahmen der Arthritis durch das zelluläre Coupling auch zu einer Zunahme der Knochenformation. Die primäre Spongiosa scheint als Region mit hohem Knochenumsatz in der Lage zu sein, einen Anstieg der Osteoklastenaktivität im Rahmen der Entzündung durch Knochenneubildung zu kompensieren, so dass es in der Arthritisgruppe in der primären Spongiosa im Gegensatz zur sekundären Spongiosa nicht einem Nettoverlust von Knochenmasse kommt. Auf dem Boden dieser arthritisinduzierten high-turnover Situation könnte die selektive Hemmung der Osteoklastenaktivität durch OPG bei Fortbestehen der kompensatorisch gesteigerten Osteoblastenaktivität eine massive Steigerung der Formation initiieren, die das Ansteigen der Knochenmasse über die Werte der gesunden Tiere erklären könnte.

Die Daten von Schett et. al. sind jedoch nur bedingt mit unseren vergleichbar, da die Analyse des Knochens mittels konventioneller Histomorphometrie erfolgte, welche die Inhomogenität dieser Struktur nicht abbildet.

Das o.g. Hypothese einer gesteigerten Knochenformation nicht als alleinige Erklärung der histologischen Veränderungen ausreicht, zeigt sich darin, dass der Trabekeldurchmesser unter OPG-Therapie im Vergleich mit gesunden Tieren epiphysenferner nicht zunahm. Die Nettozunahme an Knochensubstanz in der OPG-Gruppe gegenüber gesunden Tieren war vielmehr dadurch begründet, dass es bei den mit OPG behandelten Tieren nicht zu einer Abnahme der Trabekelzahl epiphysenfern kommt. Somit liegt wohl auch ein geringeres

Knochenremodelling durch eine OPG-bedingte reduzierte Osteoklastenaktivität und somit eine verminderte Anpassung an physiologische Reize vor. In wieweit das Abweichen von der physiologischen Architektur in der OPG-Gruppe die Stabilität des resultierenden Knochens trotz Zunahme des Mineralisierten Knochenanteil tatsächlich beeinflusst, wurde hier nicht untersucht und bleibt spekulativ.

Setzt man ein intaktes zelluläres Coupling voraus, so könnte OPG sogar durch die Hemmung der Osteoklastenaktivität im Verlauf zu einer Reduktion der Formation führen. Eine Hemmung der Knochenformation unter OPG ist in mehreren Arbeiten beschrieben (Schett et al. 2003, Zwerina et al. 2005). Auch im Modell der AIA konnte Neumann mittels Tetrazyklinmarkierung gemessener Parameter nachweisen, dass unter OPG im Vergleich zur unbehandelten Arthritis die Knochenformation hochsignifikant abfiel (Neumann et al. 2006). Somit ist hinsichtlich der Zunahme der Trabekelzahl unter OPG die Interpretation im Sinne der o.g. Einflüsse auf das Remodeling gegenüber einer gesteigerten Knochenneubildung zu favorisieren.

Ob die vorliegenden Daten weiterhin Ausdruck einer Störung der Skelettreifung sein könnten, kann mit der hier verwendeten Technik nicht geklärt werden. Aus Experimenten mit RANKL-Knockoutmäusen ist jedoch bekannt, dass RANKL in der Skelettentwicklung von entscheidender Bedeutung ist. Diese Tiere zeigen neben einer ausgeprägten Osteopetrose eine Wachstumsretardierung sämtlicher Skeletteile, die durch Störungen der Chondrozytendifferenzierung und Knochenresorption innerhalb der Wachstumsfuge verursacht wird. Die Übertragung transgener RANKL-überexprimierender Lymphozyten in diese RANKL-defizienten Tiere führte zwar zur Entwicklung von Markhöhlen mit Hämatopoese und zur Normalisierung der Knochenstrukturen im Knochenschaft der langen Röhrenknochen, die Wachstumsfuge und der Knorpel-Knochenübergang blieben jedoch unbeeinflusst, so dass die Tiere weiterhin sklerotische Metaphysen aufwiesen. Die Autoren schlussfolgern, dass während des Skelettwachstums eine lokale RANKL-Expression für die Wachstumsvorgänge an der Epiphysenfuge essenziell ist (Kim et al. 2000). Im Unterschied zum Modell der RANKL-Knockout Maus führt eine OPG-Überexpression in transgenen Mäusen nicht zu Störungen des Längenwachstums (Simonet et al., 1997).

Die Regulation der Wachstumsprozesse an den langen Röhrenknochen ist komplex und die Rolle des RANKL/RANK/OPG-Systems in diesem Zusammenhang noch nicht vollständig geklärt. Es liegen zudem wenige Untersuchungen vor, die mittels Linear scanning die primäre Spongiosa unter OPG-Einfluss untersuchen.

4.4.3 Einfluss von OPG auf den axialen Knochen

Die Behandlung mit OPG in der verwendeten Dosierung ist in dieser Untersuchung nicht ausreichend, die durch die Arthritis am axialen Knochen hervorgerufenen Veränderungen zu verhindern. Weder die Volumen- noch die zellulären Parameter weisen signifikante Unterschiede im Vergleich zur PBS-Gruppe auf. Es ist allerdings anzumerken, dass die histomorphometrische Untersuchung der Wirbelkörper in Hinblick auf die zellulären Parameter problematisch ist, da die Anzahl der Meßfelder begrenzter ist als im Tibiakopf. Dennoch widerspricht das Ergebnis dieser Untersuchung den Beobachtungen an anderen Arthritismodellen, in denen OPG in der Lage war, den generalisierten Knochenmasseverlust effektiv zu antagonisieren (Stolina et al. 2005). Als Erklärung für die Ineffektivität am axialen Knochen kommt wie auch am Tibiakopf eine nicht ausreichend hohe OPG-Dosis in Frage.

4.5 Einfluss der Therapie mit Dexamethason auf die Entzündungsaktivität und Knochen bei der AIA

Unter der Dexamethasontherapie war erwartungsgemäß eine deutliche Suppression der klinischen Entzündungsaktivität zu erreichen, wie er am gleichen Modellsystem bereits vorgeschrieben wurde (Oelzner et al. 1999).

Glukokortikoide sind aufgrund ihrer pleiotropen Wirkung höchst effektive Entzündungshemmer und werden bei einer Vielzahl von Erkrankungen des entzündlich-rheumatischen Formenkreises angewendet. Die Wirkung der Glukokortikoide auf die Entzündungsreaktion ist komplex und beinhaltet neben der Beeinflussung des Zytokin-Netzwerks die Modulation von Entzündungsmediatoren, Adhäsionsmolekülen und der Funktion und des Überlebens von Immunzellen. Gut erforscht sind dabei vor allem die genomischen Wirkungen, die durch die Bindung des Glukokortikoid-Rezeptorkomplexes an die DNA im Zellkern vermittelt werden. Auf diese Weise kommt es zur Transkription von Genen und zur Synthese antiinflammatorisch wirksamer Proteine, wie z.B. I κ B α , Endonukleasen, neutrale Endopeptidasen, Angiotensin-Converting-Enzyme, Lipocortin 1 (Inhibitor der Phospholipase A2), IL-10 und IL-1-Rezeptor-Antagonist. Der Glukokortikoid-Rezeptorkomplex führt weiterhin zu einer Inhibition von NF κ B und damit zur verminderten Transkription einer Reihe von diesem Transkriptionsfaktor abhängiger Gene und Reduktion ihrer Genprodukte wie COX-2, Phospholipase A2 sowie der Zytokine TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 u.a. (Wagner 2005).

Der Knochenstoffwechsel wird durch Glukokortikoide sowohl durch direkte als auch indirekte Effekte auf die unterschiedlichen Knochenzellen beeinflusst. Zum einen konnte in Arbeiten zur Steroidosteoporose, die ein schwerwiegendes Problem vor allem in der Langzeittherapie mit Glukokortikoiden darstellt, gezeigt werden, dass der Verlust an Knochenmasse im Rahmen einer systemischen Glukokortikoidtherapie sowohl durch eine Hemmung der Knochenformation als auch durch eine Steigerung der Knochenresorption verursacht wird (Reid 1997, Weinstein et al. 1998). Glukokortikoide führen sowohl zu einer gesteigerten Osteoklastenaktivität, zum anderen wird die Osteoblastogenese im Knochenmark gehemmt. Hinzu treten Effekte über ein negatives Feed-back auf die Hypophysen-Gonaden-Achse mit Reduktion der Sexualhormone und eine verminderte intestinale Calciumabsorption sowie eine verstärkte renale Calciumausscheidung (Reid 1997). In einer Reihe neuer Arbeiten wurde die Rolle des RANKL/RANK/OPG-Systems für Effekte der Glukokortikoide am Knochen untersucht. Dabei konnte in vitro gezeigt werden, dass Glukokortikoide in humanen Osteoblasten die OPG-mRNA-Expression und -Proteinsekretion hemmen und die RANKL-mRNA-Expression steigern (Hofbauer et al. 1999b). Verschiedene klinische Untersuchungen konnten ebenfalls belegen, dass während einer systemischen Glukokortikoidtherapie die OPG-Serumkonzentrationen sinken (Hofbauer, et al. 2004).

Einige Studien sprechen jedoch dafür, dass im Rahmen der RA die entzündliche Aktivität den wesentlichen Risikofaktor für den Knochenmasseverlust darstellt (Gough et al. 1998). Daher ist für eine antientzündliche Therapie mit Glukokortikoiden indirekt auch ein knochenprotektiver Effekt zu erwarten. Da RANKL von proinflammatorischen Zytokinen induziert wird, führen Glukokortikoide indirekt durch Hemmung der Entzündungsreaktion zu einer Hemmung von RANKL. Damit in Übereinstimmung sind auch Untersuchungen am Modell der AIA, wo gezeigt werden konnte, dass Glukokortikoide den entzündungsassoziierten Knochenmasseverlust durch Suppression der Knochenresorption hemmen, während sie bei gesunden Tieren durch gesteigerte Knochenresorption und verminderte Formation zum Knochenmasseverlust führten (Okazaki et al. 1998). Interessanter Weise konnte ein knochenprotektiver Effekt von Glukokortikoiden auch in Untersuchungen an Ratten mit verschiedenen nicht-entzündlichen Konstellationen, die mit Knochenmasseverlust aufgrund erhöhter Knochenresorption einhergehen, nachgewiesen werden. Dabei führte eine Prednisolontherapie sowohl bei ovariectomierten, als auch immobilisierten Ratten und bei Ratten mit diätetischer Calciumdefizienz zu einer Zunahme des trabekulären Knochenvolumens (Shen et al. 1997). Auch hier war der knochenprotektive Effekt auf eine Hemmung der Knochenresorption zurückzuführen, die trotz gleichzeitiger

Hemmung der Knochenformation insgesamt eine netto Zunahme der Knochenmasse bedingte (Shen et al. 1997). Verschiedene Arbeiten belegen jedoch auch eine Stimulation der OPG-Produktion durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α , wobei man hier von einem gegenregulatorischen Mechanismus ausgeht (Hofbauer et al. 1999a). Die Hemmung der proinflammatorischen Zytokine im Rahmen der Glukokortikoidtherapie führt somit neben der direkten auch zu einer indirekten Hemmung der OPG-Expression.

4.5.1 Einfluss von Dexamethason auf den periartikulären Knochen

4.5.1.1 Sekundäre Spongiosa

Die Therapie mit Dexamethason hatte in dieser Untersuchung keinen protektiven Einfluss auf die sekundäre Spongiosa des periartikulären Knochens. Trotz deutlicher Reduktion der klinischen Entzündungszeichen unter Dexamethason verblieb das Spongiosavolumen im Tibiakopf auf dem Niveau der unbehandelten Arthritis. Auch bei der Betrachtung der zellulären Parameter zeigte sich als einziger Unterschied eine Abnahme der Osteoklasten-besetzten Oberfläche, die aber nicht statistisch signifikant war. In einer vorangegangenen Untersuchung am Modell der AIA konnte Dexamethason in vergleichbarer Dosierung den Knochenmasseverlust an der sekundären Spongiosa zwar reduzieren, jedoch wurde auch hier trotz massiver antientzündlicher Wirkung der Dexamethasontherapie und einer signifikanten Reduktion der Resorptionsoberfläche nicht das Niveau gesunder Tiere erreicht (Oelzner 2001). Für die fehlende Hemmung der Knochenresorption trotz effektiver Entzündungshemmung durch Dexamethason kommen ursächlich zum einen die entzündungsunabhängigen, direkten durch Hemmung der OPG- und Steigerung der RANKL-Expression vermittelten Effekte von Dexamethason auf den Knochenstoffwechsel (Hofbauer et al. 1999b) in Betracht. Glukokortikoide hemmen OPG jedoch nicht nur *direkt* sondern auch *indirekt* vermittelt über eine Hemmung proinflammatorischer Zytokine. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die Glukokortikoidtherapie durch direkte und indirekte Mechanismen ein relatives OPG-Defizit induziert, welches die potentiell knochenprotektiven Effekte der Entzündungshemmung durch Glukokortikoide zumindest teilweise antagonisiert.

4.5.1.2 Primäre Spongiosa

Die Parameter der Linear scanning Untersuchung zeigten sowohl im Vergleich der DXA-Gruppe mit der unbehandelten Arthritis als auch mit der gesunden Gruppe aufgrund großer Streubreiten nur wenig signifikante Unterschiede. Der mineralisierte Knochenanteil lag dabei

nur in einem kurzen Abschnitt signifikant unter dem gesunden Tiere. Dahingegen wird in der Darstellung der gemittelten Parameter deutlich, dass unter DXA-Therapie die Trabekelstärke tendenziell im Vergleich zur unbehandelten AIA zunimmt, während die Trabekelanzahl signifikant unter dem Niveau der gesunden Tiere liegt. Insgesamt kommt es tendenziell zu einer Nettozunahme des mineralisierten Knochenanteils in der primären Spongiosa im Vergleich mit der PBS-Gruppe, so dass der Unterschied zu gesunden Tieren nicht mehr signifikant ist. Auch in den Untersuchungen von Oelzner wurde durch die Therapie mit Dexamethason an der primären Spongiosa die AIA-induzierte Abnahme des Trabekeldurchmessers vollständig inhibiert, während die Trabekelanzahl durch Dexamethason unbeeinflusst blieb (Oelzner 2001).

Dexamethason verhindert somit wahrscheinlich die arthritisinguzierte Verdünnung der Trabekel durch die Hemmung der gesteigerten Resorptionsprozesse. Die differenten Effekte von Dexamethason auf den Knochenmasseverlust in der primären Spongiosa und der sekundären Spongiosa sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf unterschiedliche Mechanismen des Knochenturnovers in beiden Regionen zurückzuführen (Loveridge 1995).

4.5.2 Einfluss von Dexamethason auf den axialen Knochen

Die Dexamethasontherapie der AIA hatte keine signifikanten Auswirkungen auf das Spongiosavolumen am 3. Lendenwirbelkörper im Vergleich mit der unbehandelten Arthritis, womit vorangegangene Ergebnisse am gleichen Modell bestätigt werden (Oelzner 2001). Unterschiede finden sich jedoch hinsichtlich der Oberflächenparameter. In unserer Untersuchung entsprechen die Ergebnisse in der Dexamethasongruppe am axialen Knochen tendenziell denen an der sekundären Spongiosa des periartikulären Knochens. Die Osteoklasten-besetzte Oberfläche war tendenziell, jedoch nicht signifikant im Vergleich zur unbehandelten AIA reduziert, während die Osteoblasten-besetzte Oberfläche, ebenfalls nicht signifikant zur AIA, anstieg. In vorangegangenen Arbeiten war in der Dexamethasongruppe eine signifikante Abnahme der Osteoblasten-besetzten Oberfläche im Vergleich mit gesunden Tieren am gelenkfernen Knochen auffällig (Oelzner 2001). Die Resorptionsparameter erreichten dort unter Dexamethason tendenziell die höchsten Werte, wenn auch keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten Arthritis bestanden. Im Unterschied zu unserer Untersuchung war jedoch im vorangegangenen Experiment in der Arthritisgruppe kein signifikanter Knochenmasseverlust am gelenkfernen Knochen nachweisbar. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse der vorhergehenden Untersuchung mit

gesteigerter Knochenresorption bei verminderter Knochenformation am axialen Knochen die Glukokortikoidwirkungen auf den durch die Arthritis nicht beeinflussten bzw. den Knochen gesunder Tiere reflektieren. In unserer Untersuchung sprechen die Befunde der zellulären Umbauparameter vor dem Hintergrund eines im Rahmen der Arthritis reduzierten Spongiosavolumens tendenziell für einen protektiven Effekt der Dexamethasontherapie. Der Effekt der Dexamethasontherapie ist am gelenknahen und gelenkfernen Knochen vergleichbar. Auch gelenkfern ist die Hemmung der Entzündung nicht ausreichend, den arthritisinduzierten Knochenmasseverlust aufzuhalten.

4.6 Beeinflussung des Knochenstoffwechsels durch die kombinierte Therapie mit DXA und OPG

In vorangegangenen Arbeiten am Modell der AIA konnte durch eine höherdosierte Therapie mit OPG nur eine partielle Hemmung des arthritissoziierten Knochenmasseverlustes an der sekundären Spongiosa erreicht werden (Neumann et al. 2006). In unserer Untersuchung wurden durch OPG in der gewählten Dosierung zwar die Resorptionsparameter signifikant reduziert, das trabekuläre Knochenvolumen verblieb aber auf dem Niveau der unbehandelten Tiere. Da für OPG bisher kein Einfluss auf die Entzündungsaktivität nachgewiesen werden konnte, ist die Kombination mit einer entzündungshemmenden Therapie vielversprechend. Glukokortikoide stellen potente antiphlogistische und immunmodulatorische Substanzen da. Somit könnten durch Glukokortikoide alternative Wege, die teilweise RANKL-unabhängig im Rahmen der Entzündung zur Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung führen, blockiert werden.

Durch Therapie mit Dexamethason läßt sich offenbar im Modell der AIA der Knochenmasseverlust trotz effektiver Entzündungshemmung nicht oder nur unzureichend (Oelzner 2001) aufhalten. Daher erscheint eine OPG-Substitution zur Antagonisierung der oben beschriebenen hemmenden direkten und indirekten Effekte der Steroide auf die OPG-Expression sinnvoll.

4.6.1.1 Sekundäre Spongiosa

Die kombinierte Therapie mit Dexamethason und OPG erreichte im Mittel die höchsten Werte für das Spongiosavolumen unter allen Tieren, bei denen eine Arthritis ausgelöst worden war. Während weder die Dexamethason- noch die OPG-Monotherapie diesen Parameter im Vergleich mit unbehandelten AIA-Tieren veränderten, führte die gleichzeitige Applikation beider Substanzen zu einer signifikanten Zunahme des Spongiosavolumens

gegenüber der DXA-Monotherapie und gegenüber den unbehandelten Arthritistieren. Der Trabekeldurchmesser nahm im Vergleich mit der OPG-Monotherapiegruppe signifikant zu. Dennoch wurde auch durch die Kombination der antientzündlichen mit der antiresorptiven Therapie nicht das Niveau der gesunden Tiere erreicht.

Für die Erklärung des synergistischen Effekts der Kombinationstherapie kommen mehrere Möglichkeiten in Frage. Die Analyse der zellulären Parameter zeigte im Vergleich der OPG-, DXA- und DXA+OPG-behandelten Gruppen nur numerische Unterschiede. Dabei kam es unter der Kombinationstherapie zu einer Reduktion der Osteoklasten-besetzten Oberfläche und des Osteoklastenindex, der damit numerisch unter den beiden Monotherapiegruppen lag, während die Parameter der Knochenformation ebenfalls im Vergleich mit der DXA-Monotherapie tendenziell reduziert waren.

Der Benefit, der aus der Kombination der beiden Substanzen erwächst, könnte daher durch eine stärkere Hemmung der osteoklastären Resorption in der akuten Phase der Entzündung bedingt sein. Die gleiche Dosis OPG, die in der Monotherapie in dieser Versuchsanordnung nicht ausreicht, um die durch inflammatorische Zytokine induzierte Osteoklastendifferenzierung und Aktivierung via RANKL zu antagonisieren, zeigt unter der Voraussetzung einer herunterregulierten Zytokinfreisetzung und damit bereits supprimierter RANKL-Expression durch die antientzündliche Therapie nun Wirkung.

Durch die OPG-Gabe könnten sowohl das durch den Wegfall der zytokingetriggerten, gegenregulatorischen OPG-Expression unter Dexamethasontherapie induzierte relative OPG-Defizit, als auch die steroidinduzierte, direkte OPG-Suppression ausgeglichen werden.

Dahingegen wird die Knochenformation in der Kombinationsgruppe im Vergleich zu unbehandelten Arthritistieren wenig beeinflusst. Für Glukokortikoide ist grundsätzlich eine hemmende Wirkung auf die Osteoblastendifferenzierung beschrieben (Reid 1997, Weinstein et al. 1998), während OPG im Rahmen des zellulären Couplings die Knochenformation ebenfalls negativ beeinflussen kann (Nakamura et al. 2003, Schett et al. 2003). Mit den hier verwendeten Methoden läßt sich jedoch nicht abschließend klären, ob die kombinierte Therapie eine inadäquat starke Suppression der Knochenformation bewirkt haben könnte, die die protektiven antiresorptiven Effekt teilweise antagonisiert. In Untersuchungen an verschiedenen Arthritismodellen konnte durch die Kombination einer antiresorptiven, antiinflammatorischen und osteoanabolen Therapie der knochenprotektive Effekt weiter verbessert werden (Redlich et al. 2004, Schett et al. 2005b).

4.6.1.2 Primäre Spongiosa

Die Kombination der antiresorptiven und antientzündlichen Therapie führte zu einer deutlichen Zunahme der mineralisierten Strukturen der primären Spongiosa. Während die OPG-Monotherapie eine ausgeprägte Zunahme der Trabekelanzahl bedingte, der Trabekeldurchmesser jedoch gleich blieb, führte die Kombination mit Dexamethason auch zu einer signifikanten Steigerung des Durchmessers dieser Trabekel. Daraus resultiert ein erheblicher Zuwachs an trabekulärer Knochenmasse, die signifikant über allen weiteren Gruppen lag.

Diese Ergebnisse sind mit Beobachtungen am Modell der TNF- α transgenen Maus in Übereinstimmung. In einer Untersuchung nahm unter Therapie mit OPG die Trabekelanzahl zu, während der Trabekeldurchmesser erst durch die Kombination mit einer antiinflammatorischen Therapie (TNF- α Blocker) gesteigert werden konnte (Redlich et al. 2004).

Die ausgeprägte Zunahme des Trabekeldurchmessers über das Niveau gesunder Tiere in unserer Untersuchung spricht dabei dafür, dass das Gleichgewicht von Anbau und Abbau durch die Kombination der antiresorptiven Effekte der Substanzen in den ersten 500 μm von der Epiphysenfuge massiv in Richtung Knochenformation verschoben wurde. Dieses Ergebnis erscheint überraschend, da wie bereits erwähnt für Glukokortikoide in gesunden Tieren eine Hemmung der Osteoblastendifferenzierung beschrieben ist. Hier führt die systemische Gabe von Glukokortikoiden zudem zur Beeinträchtigung der Knorpelremodelings und hat Wachstumsretardierung zur Folge. Scheinbar ist hier erneut die Ausgangssituation eines High-Turnover-Knochenstoffwechsels entscheidend, so dass bei Fortbestehen einer kompensatorisch gesteigerten Osteoblastenaktivität nach Hemmung der Osteoklastentätigkeit die Werte über das physiologische Maß ansteigen.

4.6.1.3 Axialer Knochen

Am axialen Knochen verhinderte die kombinierte Therapie mit Dexamethason und OPG den entzündungsassoziierten Knochenmasseverlust vollständig. Die Kombinationstherapiegruppe wies die geringste Osteoklasten-besetzte Oberfläche bei weiterhin im Vergleich zur gesunden Gruppe erhöhter Osteoblasten-besetzter Oberfläche auf. Es resultierte ein signifikant größeres Spongiosavolumen als in der unbehandelten Arthritisgruppe, dass das Niveau gesunder Tiere erreichte. Die eingesetzte OPG-Dosis ist somit am primär durch die Entzündung weniger geschädigten, gelenkfernen Knochen unter der Bedingung einer supprimierten Entzündungsreaktion ausreichend, um durch Hemmung der Resorption den Knochen zu

erhalten, während an der sekundären Spongiosa des Tibiakopfes wohl durch die Nähe zum entzündlichen Fokus nur ein partieller Erhalt der Knochenmasse unter dieser Dosierung erreicht wird.

4.7 Einfluss der Therapie mit Methotrexat auf die AIA und den Knochenstoffwechsel

MTX hat sich unter den DMARDs als Mittel der Wahl bei mittelschwerer bis schwerer RA etabliert. Verschiedene kontrollierte klinische Studien belegen die Effektivität bei insgesamt vergleichsweise guter Langzeitverträglichkeit (Williams et al. 1985, Weinblatt et al. 1994, Alarcon 2000). Ursprünglich wurde die Substanz als Zytostatikum entwickelt. Ihre Wirkung liegt als Antimetabolit in der kompetitiven Verdrängung von Dihydrofolsäure vom Enzym Dihydrofolatreduktase und Hemmung des Enzyms. Da Tetrahydrofolat, ein Substrat der Purinnucleotidsynthese, fehlt, ist die DNA-/RNA-Synthese vermindert. Die Wirkungsmechanismen von MTX bei der RA und anderen entzündlichen Erkrankungen sind jedoch nicht vollständig geklärt und nur teilweise auf einen antiproliferativen Effekt zurückzuführen. Man vermutet, dass bei den in der Rheumatologie eingesetzten niedrigen Dosierungen (7,5-20 mg einmal pro Woche als Einzeldosis oral oder parenteral; in der Onkologie im Vergleich dazu 50 mg - 20 g) die Hemmung der Neutrophilen-Chemotaxis (O'callaghan et al. 1988) und die Verminderung der Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α durch mononukleäre Zellen im Vordergrund stehen (Connolly et al. 1988, Chang et al. 1992, Thomas and Carroll 1993). Parallel wird die Freisetzung von Zytokininhibitoren wie IL-1 Rezeptor Antagonist und löslicher TNF-Rezeptor stimuliert (Seitz et al. 1996). Es ist jedoch unklar, ob die unter der MTX-Therapie nachweisbaren Veränderungen der Zytokinspiegel im Serum und der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten tatsächlich die Effektivität der Substanz erklären, oder sekundäre Effekte darstellen (Cronstein 2005). Trotz intensiver Forschung sowohl in in vitro Modellen als auch in vivo ist der wesentliche biochemische Mechanismus der MTX-Wirkung im Rahmen der Entzündung nicht abschließend geklärt. Verschiedene Autoren favorisieren die Hypothese, dass MTX seine antiinflammatorische Wirkung über eine Erhöhung des extrazellulären Adenosins entfaltet (Baggott et al. 1993, Cronstein et al. 1994). Nach Aufnahme in die Zelle kommt es zur Bildung langlebiger MTX-Polyglutamate, die zu einer Hemmung des folsäureabhängigen Enzyms AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamide ribonucleotide)-Transformylase führen. Die Akkumulation von AICAR und Derivaten hemmen die AMP-

Desaminase, was zur Freisetzung von AMP, bzw. nach Dephosphorylierung von Adenosin, führt. Adenosin gilt als potenter endogener antiinflammatorischer Mediator (Hasko and Cronstein 2004).

Ein Wirkungseintritt beim Menschen ist nach 4-6 Wochen zu erwarten. Die wichtigsten unerwünschten Wirkungen betreffen den Gastrointestinaltrakt, die Lunge (akute interstitielle Pneumonitis, interstitielle Fibrose), die Leber und die Blutbildung (Knochenmarksdepression mit Zytopenie 5 %/Jahr) (Rau 1994).

Ungünstige Effekte von Methotrexat auf den Knochenstoffwechsel wurden erstmals im Rahmen der Therapie onkologischer Erkrankungen im Kindesalter beschrieben und sind unter dem Terminus MTX-Osteopathie bekannt (Mazzantini 2000b). Als möglicher Pathomechanismus wurde eine Hemmung der Osteoblastenaktivität vermutet. Ein MTX-induzierter Knochenmasseverlust im Rahmen der Low-dose-Langzeittherapie bei entzündlich-rheumatischen Erkrankungen wurde lange kontrovers diskutiert. Mazzantini et. al. fanden jedoch, dass eine Therapie mit MTX in niedriger Dosis über 2 Jahre zu keiner Verminderung der Knochendichte bei Patienten mit chronischer Polyarthritits führte (Mazzantini et al. 2000a, Di Munno et al. 2004). In tierexperimentellen Studien ergaben sich sogar Hinweise darauf, dass die Therapie mit MTX einen arthritissinduzierten Knochenmasseverlust hemmen kann. Während eine 16-wöchige Gabe von MTX in einer Dosis äquivalent zur Standarddosierung bei der RA bei gesunden Ratten durch verminderte Knochenformation und gesteigerte Resorption einen signifikanten Knochenmasseverlust bedingte (May et al. 1994), fand sich in Untersuchungen am Modell der Adjuvans Arthritis ein knochenprotektiver Effekt, der auf die Hemmung der Entzündungsreaktion zurückgeführt wurde (Segawa et al. 1997, Suzuki et al. 1997, Morgan et al. 2004). Damit ähnelt die Konstellation der der Therapie mit Glukokortikoiden, wo potentiell negative direkte Effekte der Substanz auf den Knochenstoffwechsel den indirekten knochenprotektiven Effekten durch die Hemmung der Entzündungsreaktion gegenüber stehen.

4.7.1 Einfluss von MTX auf die Entzündung

Die MTX-Therapie hatte in unserem Experiment im untersuchten Zeitraum keinen nachweisbaren Effekt auf die klinische Manifestation der Entzündungsreaktion in Form der Gelenkschwellung. In einer früheren Studie am hier verwendeten Modell der AIA konnte durch die Applikation von 2-4 mg/kg wöchentlich eine Reduktion der Gelenkschwellung erreicht werden (Andersson et al. 2000). Eine mögliche Ursache für die Ineffektivität der

MTX-Therapie in unserer Untersuchung könnte an dem im Vergleich zur Studie von Andersson et al. späteren Applikationszeitpunkt liegen. Die Therapie wurde in der Studie von Andersson bereits eine Woche vor Induktion der Arthritis begonnen und am Tag der Arthritisinduktion und 7 Tage nach Induktion wiederholt. Dahingegen wurde die gleiche Dosis in unserer Studie erstmals an Tag 1 nach Arthritisinduktion appliziert. Der frühere Therapiebeginn könnte unter der Vorstellung einer gewissen Latenzzeit bis zum Einsetzen der Wirkung des Medikaments, wie es aus der klinischen Anwendung beim Menschen bekannt ist, die Diskrepanz im Ansprechen der Arthritis zu unserer Studie erklären. Dennoch wird auch von Andersson et. al. eine Variabilität im Ansprechen auf die Therapie beschrieben, wobei die Gabe von 3 mg/kg wöchentlich nicht immer zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Gelenkschwellung führte. Da der antiarthritische Effekt von MTX auch in anderen Modellen eine deutliche Dosis- und Zeitabhängigkeit aufweist, ist in unserem Experiment insgesamt davon auszugehen, dass keine ausreichenden Substanzspiegel zur effektiven Hemmung der Entzündung vorlagen.

Antiarthritische Effekte von MTX sind vor allem im Modell der Adjuvans-Arthritis beschrieben (Connolly et al., 1988, Johnson et al. 1988, Morgan et al. 2004). Lange et. al. fanden, dass antiarthritische Effekte von MTX in stark T-Zell abhängigen Modellen wie der CIA und AIA ausgeprägt waren, während die Antikollagen-I-Antikörper induzierte Arthritis und Fibroblasten-induzierte Arthritis nicht auf die Therapie ansprachen (Lange, et al., 2005). In tierexperimentellen Untersuchungen von Segawa hatte eine tägliche Gabe von 0,1-0,2 mg/kg MTX über drei Wochen im Adjuvans-Arthritis-Modell der Ratte keine Wirkung auf das frühe Ödem (Tag 1-7), während ab dem 10. Tag sowohl auf der Seite der Adjuvans-Injektion als auch kontralateral die Gelenkschwellung reduziert wurde (Segawa et al. 1997). Trotz des fehlenden Effektes am Arthritisgelenk hinsichtlich des Parameters Gelenkschwellung in unserer Untersuchung, ist jedoch eine Beeinflussung einzelner Komponenten des Zytokinsystems auch unter der gewählten Dosis nicht auszuschließen. Ein Einfluss auf systemische Effekte der Arthritis durch die von uns verwendete MTX-Dosis erscheint daher trotz fehlender Wirkung auf das Gelenk als Ort der höchsten Entzündungsaktivität möglich.

4.7.2 Einfluss von MTX auf die periartikuläre Knochenstruktur

4.7.2.1 Sekundäre Spongiosa

In unserer Untersuchung war die Therapie mit MTX nicht in der Lage, den AIA-induzierten Knochenmasseverlust an der periartikulären Spongiosa zu reduzieren. Gleichzeitig zeigten sowohl die Osteoblasten-besetzte als auch die Osteoklasten-besetzte Oberfläche unter der Therapie im Vergleich mit der unbehandelten Arthritis als auch mit gesunden Tieren massiv erhöhte Werte im Sinne eines high-turnovers. Die von uns applizierte MTX-Dosis entspricht mit 3 mg/kg Körpergewicht einmal wöchentlich der von May beschriebenen Äquivalenzdosis einer MTX-Standardtherapie bei der RA (May et al. 1994). Bei gesunden Ratten fanden sich dort nach sechzehnwöchiger Behandlung in der histomorphometrischen Analyse eine gehemmte Knochenformation und gesteigerte Resorption, was deutliche Knochenmasseverluste bedingte (May et al. 1994). Im Modell der Adjuvans-Arthritis konnten Suzuki et. al. nachweisen, dass die gleiche Dosis die Arthritis supprimierte und zu einem signifikanten Anstieg der periartikulären Knochendichte im Femur führte. In Knochenmarkkulturen konnte MTX die durch die Arthritis induzierte Abnahme der osteoblastären und Zunahme von osteoklastären Vorläuferzellen verhindern (Suzuki et al. 1997). Ähnliche Ergebnisse erzielte Segawa et. al. im gleichen Tiermodell bei der Applikation von 0,2 mg/kg täglich über einen Zeitraum von 28 Tagen (Segawa et al. 1997). Morgen et al. konnten durch zweimal wöchentliche intraperitoneale Applikation von 1 mg/kg in einem Therapiezeitraum von 42 Tagen trotz effektiver Hemmung der Gelenkschwellung nur eine partielle Hemmung des Arthritis-induzierten Knochenmasseverlusts nachweisen, was unterstreicht, dass die Effekte auf den Knochenstoffwechsel stark von der Dosis, Applikationsfrequenz und Behandlungsdauer abhängig sind (Morgan et al. 2004). Zu berücksichtigen ist beim Vergleich der Modelle, dass die Adjuvans-Arthritis per se zu einer Abnahme der Knochenformation führt, wohingegen die AIA mit sowohl gesteigerten Osteoklasten- als auch Osteoblastenzahlen im Sinne einer high-turnover Osteoporose einhergeht. In unserer Untersuchung stiegen unter MTX die histomorphometrischen Knochenformationsparameter massiv an, es war aber gleichzeitig auch ein Anstieg der Osteoklasten-besetzten Oberfläche zu verzeichnen. Hinsichtlich der Interpretation dieser Ergebnisse müssen sowohl der fehlende Effekt der MTX-Therapie auf die Entzündung in unserem Versuch als auch beschriebene, potenziell ungünstige direkte MTX-Effekte (Mazzantini et. al 2000b.) auf den Knochen berücksichtigt werden. Günstige Effekte von MTX auf den gesunden Knochen wurden bisher nicht beschrieben, dagegen sind eine Steigerung der Knochenresorption als auch eine potenzielle Mineralisationsstörung des

Rattenknochens infolge MTX-Gabe gut belegt (Revell 1983). Aus diesem Grunde muß angenommen werden, dass potenziell günstige Effekte einer MTX-Therapie auf den Knochenumbau nur indirekt vermittelt durch eine Suppression der Entzündung zu erwarten sind. Da diese Suppression der Entzündung in unserem Versuch ausblieb, kann vermutet werden, dass sich unter MTX-Gabe ungünstige Effekte der Arthritis mit solchen der MTX-Therapie summieren und eine Verstärkung des arthritisinduzierten High-turnovers mit Mineralisationsstörung induzieren. Eine Mineralisationsstörung wird sowohl im Zusammenhang mit der Arthritis, als auch als Effekt von MTX auf Knochenzellkulturen *in vitro* (May et al. 1996) und in gesunden Ratten *in vivo* (May et al. 1994, Cegiela et al. 2005) beschrieben.

4.7.2.2 Primäre Spongiosa

Die Linear scanning Analyse der primären Spongiosa des periartikulären Knochens zeigte keine signifikanten Unterschiede der MTX-Monotherapie im Vergleich mit den unbehandelten Arthritistieren für die Parameter Trabekelanzahl, -durchmesser und Mineralisierter Knochenanteil. Dennoch liegt der Trabekeldurchmesser nahezu im gesamten untersuchten Bereich numerisch über dem in der PBS-Gruppe, so dass die Unterschiede zur gesunden Kontrollgruppe nicht mehr signifikant sind. Dahingegen kann die Therapie die arthritisinduzierte Abnahme der Trabekelanzahl distal nicht beeinflussen. Insgesamt nahm der Mineralisierter Knochenanteil tendenziell im Vergleich mit der unbehandelten Arthritisgruppe zu, so dass ein diskreter knochenprotektiver Effekt der MTX-Monotherapie an der primären Spongiosa zu verzeichnen war, der vor allem in der Hemmung der Verschmälerung der Trabekel bestand.

Der Einfluss einer Methotrexattherapie auf die Wachstumsplatte und angrenzende methaphysäre Knochenstrukturen wurde bisher vorwiegend unter dem Gesichtspunkt der Auswirkungen einer Chemotherapie im Kindesalter untersucht. Dementsprechend wurden in tierexperimentellen Studien wesentlich höhere Dosierungen und kürzere Applikationsintervalle gewählt. Unter diesen Bedingungen führte MTX bei Ratten bzw. Mäusen zu retardiertem Längenwachstum, das mit Störungen des zellulären Aufbaus der Wachstumsplatte und der Chondrozytenproliferation einherging (Van Leeuwen et al. 2000, Iqbal et al. 2003). Die drei Parameter der Linear scanning Untersuchung zeigten in unserem Experiment vor allem epiphysenfugennah keine Unterschiede im Vergleich mit gesunden Kontrolltieren, was darauf hindeutet, dass die Wachstumsvorgänge durch MTX in der gewählten Dosierung im untersuchten Zeitraum nicht beeinträchtigt wurden.

Eine klinische Studie zu Auswirkungen der Therapie der juvenilen RA mit MTX im Kindesalter spricht dafür, dass MTX im Rahmen der Erkrankung auftretende Wachstumsverzögerungen antagonisieren kann, wenn durch die Therapie die Aktivität der Arthritis effektiv supprimiert wird (Chedeville et al. 2005). Das hier verwendete Modell und die Analysemethoden sind jedoch im Speziellen nicht geeignet, die Auswirkungen der MTX-Therapie auf das Längenwachstum zu untersuchen.

4.7.2.3 Axialer Knochen

Am periartikulären Knochen war kein protektiver Effekt der MTX-Therapie auf den durch die Arthritis geschädigten Knochen in Form von Zunahme der ossären Volumenparameter messbar. Die Ergebnisse am gelenkfernen Knochen unterscheiden sich hiervon. Unter der Therapie mit MTX erreichte der Trabekeldurchmesser das Niveau gesunder Tiere und das Spongiosavolumen stieg numerisch deutlich an, obgleich aufgrund der großen Standardabweichung keine Signifikanz gegenüber den unbehandelten Arthritistieren erreicht wurde. Zwar war vergleichbar den Resultaten am periartikulären Knochen auch gelenkfern eine Zunahme sowohl der Formations- als auch der Resorptionsparameter feststellbar, wobei sich jedoch die Osteoklastenzahl im Gegensatz zum periartikulären Knochen nicht signifikant von den unbehandelten Arthritistieren unterschied. Es resultierte trotz der gesteigerten Umbauvorgänge im Vergleich mit den unbehandelten Tieren ein Zuwachs an Knochenmasse unter der MTX-Therapie. Denkbar ist, dass die im Vergleich mit dem periartikulären Knochen geringeren Auswirkungen der Entzündung am weniger exponierten, gelenkfernen Knochen durch die eingesetzte MTX-Dosis noch kompensiert werden. Hier kommen lokale Effekte der Substanz auf Zellen des gelenkfernen Knochenmarks in Betracht, so dass trotz unzureichender Wirkung periartikulär das Zytokinnetzwerk dort entsprechend modifiziert wird. Mehrere Arbeiten sowohl im Tiermodell als auch bei RA-Patienten konnten zeigen, dass im Rahmen der Arthritis im Knochenmark proinflammatorische Zytokine, die die Knochenresorption steigern, im Vergleich zu Gesunden vermehrt sezerniert werden. So konnte eine vermehrte Sekretion von IL-1 und IL-6 im Knochenmarkblut sowohl in der Kollagen-induzierten Arthritis als auch in der Adjuvans-Arthritis der Ratte nachgewiesen werden (Hayashida et al. 1992). In Knochenmarkkulturen der Tibia von Ratten mit Adjuvansarthritis zeigte sich eine im Vergleich mit gesunden Tieren gesteigerte Generation von Osteoklasten, die durch IL-1 Antikörper gehemmt wurde (Suzuki et al. 1995). Eine gesteigerte Sekretion von IL-1 Rezeptor Antagonist unter MTX Therapie wurde sowohl bei RA-Patienten (Seitz et al. 1996) als auch in vitro (Seitz et al. 1998) beschrieben. Die

Beobachtung, dass der gelenkferne Knochen mehr von der MTX-Therapie profitiert als der periartikuläre wird auch in einer Arbeit am Modell der Adjuvansarthritis bestätigt. Dort konnte durch MTX in unterschiedlicher Dosierung zwar das Knochenvolumen des dritten Lendenwirbelkörpers und kontralateralen Femurs signifikant im Vergleich mit unbehandelten Arthritistieren angehoben werden. Der Knochenmineralgehalt des Femur ipsilateral zur Arthritisinduktion (hier in die rechte Hinterpfote) verblieb jedoch in allen MTX-Gruppen auf dem Niveau unbehandelter Tiere (Segawa et al. 1997). MTX war weiterhin, vergleichbar mit unserer Arbeit, nicht vollständig in der Lage, eine frühe Gelenkschwellung am Injektionsgelenk zu unterbinden, obgleich die oben genannte Knochenprotektion nachweisbar war.

4.8 Einfluss der kombinierten Therapie mit MTX und OPG auf die AIA und den Knochenstoffwechsel

4.8.1 Einfluss von MTX und OPG auf die periartikuläre Knochenstruktur

4.8.1.1 Sekundäre Spongiosa

Die Kombination von OPG und MTX führte zu einem Anstieg des Spongiosavolumens im Vergleich mit der MTX- bzw. OPG-Monotherapie, die Unterschiede waren jedoch zu keiner der beiden Gruppen signifikant. Die Osteoklasten-besetzte Oberfläche und der Osteoklastenindex wurden im Vergleich mit der MTX-Gruppe signifikant reduziert, die Osteoklasten-besetzte Oberfläche war jedoch weiterhin signifikant höher als bei den gesunden Tieren. OPG scheint damit in der Lage, den MTX assoziierten Anstieg der Knochenresorption teilweise zu antagonisieren. Die zusätzliche Gabe von OPG bewirkte auch eine tendenzielle Reduktion der in der MTX-Gruppe massiv gesteigerten Anbauoberfläche und Osteoblasten-besetzten Oberfläche, was wiederum im Rahmen des zellulären Couplings erklärt werden kann. Die Parameter der Knochenformation waren aber weiterhin signifikant höher als in der unbehandelten Arthritisgruppe. Wie am im Vergleich mit der unbehandelten Gruppe nur tendenziell gesteigerten Spongiosavolumen ersichtlich ist, ist aber trotz der Hemmung der Resorption der Benefit der Kombinationstherapie OPG+MTX am periartikulären Knochen nur gering. Hierfür ursächlich erscheinen die bereits oben diskutierten Gesichtspunkte hinsichtlich Dosis und Applikationsintervall der beiden Einzelsubstanzen.

4.8.1.2 Primäre Spongiosa

Bei fehlenden statistisch signifikanten Einflüssen der MTX-Monotherapie entsprach der Effekt der kombinierten Therapie mit MTX und OPG auf die primäre Spongiosa des periartikulären Knochens erwartungsgemäß dem der OPG-Monotherapie. Die drei Parameter der Linear scanning Untersuchung zeigen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu der MTX-Monotherapie und der MTX+OPG-Kombinationstherapie.

4.8.1.3 Axialer Knochen

Im Gegensatz zur MTX-Monotherapie, welche den arthritisinduzierten Knochenmasseverlust nur numerisch, aber nicht signifikant hemmt, konnte unter der kombinierten Therapie mit MTX und OPG eine signifikante Hemmung des arthritisinduzierten Knochenmasseverlustes beobachtet werden. Dieser Effekt der Kombinationstherapie, welcher dazu führte, dass das trabekuläre Knochenvolumen am Lendenwirbelkörper sich nicht mehr signifikant von dem gesunder Tiere unterschied, war assoziiert mit einer signifikanten Suppression der zellulären Resorptionsparameter unter Kombinationstherapie im Vergleich zur MTX-Monotherapie.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass durch die zusätzliche Gabe von OPG, das durch die Einflüsse der Arthritis und potentiell auch der MTX-Therapie komplex beeinflusste Zytokinmilieu so modifiziert wird, dass ein protektiver Effekt am Knochen resultiert.

5 Schlussfolgerung

Am Modell der AIA der Ratte wurde der Effekt einer kombinierten antiresorptiven (OPG) mit einer antiinflammatorischen Therapie (Dexamethason bzw. MTX) auf den periartikulären und axialen Knochen untersucht. Dabei lassen die Resultate folgende Schlussfolgerungen zu:

Die vorliegende Untersuchung belegt eine Hemmung der periartikulären und axialen Knochenmasseverluste unter einer kombinierten Therapie mit Dexamethason und OPG. Dahingegen waren beide Substanzen in der entsprechenden Monotherapie diesbezüglich ineffektiv.

Im Falle der OPG-Monotherapie scheint dies u.a. Folge einer im Vergleich mit Vorgängearbeiten am gleichen Modell unzureichenden Dosis. Die verwendete Dosis ist zwar ausreichend, in der chronischen Phase der Entzündung die Osteoklasten-besetzten Oberfläche signifikant zu reduzieren, jedoch ineffektiv um in der vorangegangenen akuten Phase den Knochenmasseverlust zu verhindern. Folglich können in anderen Modellen wirksame Dosisbereiche und Applikationsintervalle, an denen sich dieser Versuch orientierte, nicht uneingeschränkt auf die AIA übertragen werden. Es bedarf daher weiterer Untersuchungen am Modell der AIA zur Dosis-Wirkungs-Beziehung von OPG auf den Knochenstoffwechsel. Dabei erscheinen detailliertere time-course-studies zur RANKL-Kinetik bei der AIA, wie sie zu anderen Modellen bereits vorliegen, zur Charakterisierung der Inflammationsreaktion sinnvoll und sollten die Grundlage einer darauf optimal angepassten OPG-Applikation darstellen.

Die Glukokortikoidmonotherapie führte erwartungsgemäß zu einer Suppression der Entzündung. Vor dem Hintergrund der direkten und indirekten Effekte einer Glukokortikoidtherapie auf das RANK/OPG-System resultiert jedoch vermutlich ein relatives OPG-Defizit, so dass die Glukokortikoidtherapie ihre eigenen knochenprotektiven Effekte wieder begrenzt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen somit nahe, dass unter einer Glukokortikoidtherapie eine OPG-Substitution auch in einer in der Monotherapie ineffektiven Dosis den AIA-induzierten Knochenmasseverlust hemmen kann. Der knochenprotektive Effekt ist dabei am

gelenkfernen, nicht unmittelbar dem entzündlichen Fokus benachbarten Knochen am ausgeprägtesten.

Die Strukturen der primären Spongiosa scheinen dahingegen auf Grund ihrer Besonderheiten in der hormonellen Regulation weniger von einem arthritisinduzierten Knochenmasseverlust betroffen. Während OPG auch in der gewählten Dosis offensichtlich durch die Hemmung der osteoklastären Knochenresorption die physiologische Reduktion der Trabekelanzahl verhindert, führt hier die Kombination mit Dexamethason auch zu einer Zunahme des Trabekeldurchmessers. Hinsichtlich der ausgeprägten Zunahme der mineralisierten Strukturen über das Maß bei Gesunden in der Kombinationsgruppe und der auffälligen Veränderungen der Knochenarchitektur weg von der physiologischen Gewölbekonstruktion erscheinen weitere Untersuchungen zum Einfluss der Therapie auf den wachsenden Knochen und der Stabilität der resultierenden Strukturen sinnvoll.

Im MTX-Arm des Versuches konnte unter dem gewählten Applikationsmodus in den MTX-haltigen Gruppen die Entzündung nicht nachweislich supprimiert werden. Dennoch hatte die Substanz sowohl in der Mono-als auch in der Kombinationstherapie nachweisbare Effekte auf den der Entzündung ausgesetzten Knochen. Während die MTX-Monotherapie an der Sekundären Spongiosa v.a. eine Steigerung der High-turnover Situation mit potentieller Mineralisationsstörung bedingte, ohne dass sich signifikante Änderungen am Spongiosavolumen ergaben, scheint der axiale Knochen in Form einer Zunahme des Trabekeldurchmessers von der MTX-Therapie zu profitieren, wobei hier lokale Effekte der Substanz auf Zellen des gelenkfernen Knochenmarkes in Betracht kommen. Unter der kombinierten Therapie mit OPG konnte am gelenkfernen Knochen durch die Reduktion der osteoklastären Resorption der Knochenmasseverlust vollständig verhindert werden.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dafür, dass der knochenprotektive Effekt einer antiinflammatorischen Therapie durch die Kombination mit einer RANKL-inhibierenden Therapie deutlich zu steigern ist und somit auch neue Angriffspunkte in der Osteoporosetherapie der RA verheißt.

6 Literatur

1. Aho K, Koskenvuo M, Tuominen J and Kaprio J (1986) Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. *J Rheumatol* 5: 899-902.
2. Alarcon GS (2000) Methotrexate use in rheumatoid arthritis. A clinician's perspective. *Immunopharmacology* 2-3: 259-271.
3. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D and Galibert L (1997) A homologue of the tnfr receptor and its ligand enhance t-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 386: 175-179.
4. Andersson SE, Johansson LH, Lexmuller K and Ekstrom GM (2000) Anti-arthritic effect of methotrexate: Is it really mediated by adenosine? *Eur J Pharm Sci* 4: 333-343.
5. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS and et. al (1988) The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 3: 315-324.
6. Baggott JE, Morgan SL, Ha TS, Alarcon GS, Koopman WJ and Krumdieck CL (1993) Antifolates in rheumatoid arthritis: A hypothetical mechanism of action. *Clin Exp Rheumatol* 11: 101-105.
7. Bolon B, Campagnuolo G and Feige U (2002) Duration of bone protection by a single osteoprotegerin injection in rats with adjuvant-induced arthritis. *Cell Mol Life Sci* 9: 1569-1576.
8. Brackertz D, Mitchell GF and Mackay IR (1977) Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 3: 841-850.

9. Bräuer R, Kette H, Henzgen S and Thoss K (1994a) Influence of cyclosporin a on cytokine levels in synovial fluid and serum of rats with antigen-induced arthritis. *Agents Actions* 1-2: 96-98.
10. Bräuer R, Kittlick PD, Thoss K and Henzgen S (1994b) Different immunological mechanisms contribute to cartilage destruction in antigen-induced arthritis. *Exp Toxicol Pathol* 4-5: 383-388.
11. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ and Simonet WS (1998) Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 9: 1260-1268.
12. Campagnuolo G, Bolon B and Feige U (2002) Kinetics of bone protection by recombinant osteoprotegerin therapy in lewis rats with adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 7: 1926-1936.
13. Cegiela U, Sliwinski L, Kaczmarczyk-Sedlak I and Folwarczna J (2005) In vivo effects of high-dose methotrexate on bone remodeling in rats. *Pharmacol Rep* 4: 504-514.
14. Chang DM, Weinblatt ME and Schur PH (1992) The effects of methotrexate on interleukin 1 in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 11: 1678-1682.
15. Chedeville G, Quartier P, Miranda M, Brauner R and Prieur AM (2005) Improvements in growth parameters in children with juvenile idiopathic arthritis associated with the effect of methotrexate on disease activity. *Joint Bone Spine* 5: 392-396.
16. Connolly KM, Stecher VJ, Danis E, Pruden DJ and LaBrie T (1988) Alteration of interleukin-1 production and the acute phase response following medication of adjuvant arthritic rats with cyclosporin-a or methotrexate. *Int J Immunopharmacol* 6: 717-728.

17. Consden R, Doble A, Glynn LE and Nind AP (1971) Production of a chronic arthritis with ovalbumin. Its retention in the rabbit knee joint. *Ann Rheum Dis* 3: 307-315.
18. Cooke TD and Jasin HE (1972) The pathogenesis of chronic inflammation in experimental antigen-induced arthritis. I. The role of antigen on the local immune response. *Arthritis Rheum* 4: 327-337.
19. Cronstein BN (2005) Low-dose methotrexate: A mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev* 2: 163-172.
20. Cronstein BN, Naime D and Ostad E (1994) The antiinflammatory effects of methotrexate are mediated by adenosine. *Adv Exp Med Biol* 411-416.
21. Darnay BG, Ni J, Moore PA and Aggarwal BB (1999) Activation of nf-kappab by rank requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (traf) 6 and nf-kappab-inducing kinase. Identification of a novel traf6 interaction motif. *J Biol Chem* 274: 7724-7731.
22. Delling G (1975) [endocrine bone diseases morphology, histomorphometry and differential diagnosis (author's transl)]. *Veroff Pathol* 98: 1-111.
23. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C, van der Heide D, Landewe R, Lacey D, Richards WG and Schett G (2007) Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med*. 13(2): 156-163.
24. di Munno O, Mazzantini M, Sinigaglia L, Bianchi G, Minisola G, Muratore M, la Corte R, di Matteo L, Canesi B, Caminiti M, Brogгинi M and Adami S (2004) Effect of low dose methotrexate on bone density in women with rheumatoid arthritis: Results from a multicenter cross-sectional study. *J Rheumatol* 7: 1305-1309.

25. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ and Schuh J (1999) Rank is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 18: 2412-2424.
26. Erben RG, Kohn B, Rambeck WA, Zucker H (1990). Histomorphometric analysis of the rat proximal tibial metaphysis by "linear scanning". *Scanning Microsc* 4 (3): 625-638, discussion 638-640.
27. Erikson EF, Axelrod DW and Melsen F (1994). *Bone Histomorphometry*. Reprint. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
28. Fassbender HG (1983) Histomorphological basis of articular cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Coll Relat Res* 2: 141-155.
29. Feifel H (1994) Die Knochenregeneration in unterschiedlichen Knochenersatzmaterialien und ihre Beeinflussung durch einen osteoinduktiven Proteinkomplex. Histologische und histomorphometrische Untersuchungen am Kaninchen. [Habilitation] Aachen: RWTH.
30. Frost HM (1969) Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res* 3: 211-237.
31. Glynn LE (1975) The role of bacterial adjuvant in experimental arthritis. *Rheumatology* 283-287.
32. Goldring SR and Gravallese EM (2000) Mechanisms of bone loss in inflammatory arthritis: Diagnosis and therapeutic implications. *Arthritis Res* 1: 33-37.
33. Gough A, Sambrook P, Devlin J, Huissoon A, Njeh C, Robbins S, Nguyen T and Emery P (1998) Osteoclastic activation is the principal mechanism leading to secondary osteoporosis in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 25(7): 1282-1289.

34. Gough AK, Lilley J, Eyre S, Holder RL and Emery P (1994) Generalised bone loss in patients with early rheumatoid arthritis. *Lancet* 343: 23-27.
35. Gravallesse EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E and Goldring SR (2000) Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum* 43: 250-258.
36. Hasko G and Cronstein BN (2004) Adenosine: An endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 25: 33-39.
37. Hayashida K, Ochi T, Fujimoto M, Owaki H, Shimaoka Y, Ono K and Matsumoto K (1992) Bone marrow changes in adjuvant-induced and collagen-induced arthritis. Interleukin-1 and interleukin-6 activity and abnormal myelopoiesis. *Arthritis Rheum*. 35(2): 241-245.
38. Hofbauer LC and Heufelder AE (2001a) The role of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44: 253-259.
39. Hofbauer LC and Heufelder AE (2001b) Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 5-6: 243-253.
40. Hofbauer LC, Kuhne CA and Viereck V (2004) The opg/rankl/rank system in metabolic bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 4: 268-275.
41. Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL and Khosla S (1999a) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 25: 255-259.

42. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC and Khosla S (1999b) Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: Potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 10: 4382-4389.
43. Hollinger JO and Kleinschmidt JC (1990) The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1(1): 60-68.
44. Holtmann I, Raspe H, Allolio B, Blind E, Böhning W, Dreher R and Reinshagen M. (2007) DVO-Leitlinie 2006 Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Glukokortikoid-induzierten Osteoporose. *Osteologie* 16: 91–148.
45. Iqbal MP, Ahmed M, Umer M, Mehboobali N and Qureshi AA (2003) Effect of methotrexate and folinic acid on skeletal growth in mice. *Acta Paediatr* 12: 1438-1444.
46. Jiang J, Lv HS, Lin JH, Jiang DF and Chen ZK (2005) Ltb4 can directly stimulate human osteoclast formation from pbmc independent of rankl. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 4: 391-403.
47. Jimi E, Nakamura I, Duong LT, Ikebe T, Takahashi N, Rodan GA and Suda T (1999) Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp Cell Res* 1: 84-93.
48. Johnson WJ, DiMartino MJ, Meunier PC, Muirhead KA and Hanna N (1988) Methotrexate inhibits macrophage activation as well as vascular and cellular inflammatory events in rat adjuvant induced arthritis. *J Rheumatol* 5: 745-749.
49. Kim N, Odgren PR, Kim DK, Marks SC, Jr. and Choi Y (2000) Diverse roles of the tumor necrosis factor family member trance in skeletal physiology revealed by trance deficiency and partial rescue by a lymphocyte-expressed trance transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 20: 10905-10910.

50. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ and Suda T (2000) Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the odf/rankl-rank interaction. *J Exp Med* 2: 275-286.
51. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ and Penninger JM (1999a) Opgl is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 6717: 315-323.
52. Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ and Penninger JM (1999b) Activated t cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 6759: 304-309.
53. Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, Itonaga I, Fujikawa Y and Athanasou NA (2003) Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a rankl-independent mechanism. *Bone* 1: 1-7.
54. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J and Boyle WJ (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 2: 165-176.
55. Lam J, Nelson CA, Ross FP, Teitelbaum SL and Fremont DH (2001) Crystal structure of the trance/rankl cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. *J Clin Invest* 7: 971-979.

56. Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP and Teitelbaum SL (2000) TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* 106(12):1481-1488.
57. Lange F, Bajtner E, Rintisch C, Nandakumar KS, Sack U and Holmdahl R (2005) Methotrexate ameliorates T cell dependent antibody induced or fibroblast induced arthritis autoimmune arthritis and encephalomyelitis but not. *Ann Rheum Dis* 64, 599-605.
58. Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan SC, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL and Boyle WJ (2000) Rank is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 4: 1566-1571.
59. Loveridge N, Farquharson C, Palmer R, Lobley GE and Flint DJ. Growth hormone and longitudinal bone growth in vivo: short-term effect of a growth hormone antiserum. *J Endocrinol.* 1995 Jul;146(1):55-62.
60. Ma YF, Ferretti JL, Capozza RF, Cointy G, Alippi R, Zanchetta J and Jee WS (1995) Effects of on/off anabolic hPTH and remodeling inhibitors on metaphyseal bone of immobilized rat femurs. Tomographical (pQCT) description and correlation with histomorphometric changes in tibial cancellous bone. *Bone* 17(4 Suppl): 321S-327S.
61. May KP, West SG, McDermott MT and Huffer WE (1994) The effect of low-dose methotrexate on bone metabolism and histomorphometry in rats. *Arthritis Rheum* 2: 201-206.
62. May KP, Mercill D, McDermott MT and West SG (1996) The effect of methotrexate on mouse bone cells in culture. *Arthritis Rheum* 3: 489-494.

63. Mazzantini M, Di Munno O, Incerti-Vecchi L and Pasero G (2000a) Vertebral bone mineral density changes in female rheumatoid arthritis patients treated with low-dose methotrexate. *Clin Exp Rheumatol* 3: 327-331.
64. Mazzantini M and Di Munno O (2000b) Methotrexate and bone mass. *Clin Exp Rheumatol* 18 (Suppl. 21): S87-S92.
65. Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K and Ozawa H (1998) Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 3: 610-615.
66. Morgan SL, Chen DT, Carlee J and Baggott JE (2004) Effect of methotrexate therapy on bone mineral density and body composition in rat adjuvant arthritis. *J Rheumatol* 9: 1693-1697.
67. Morony S, Capparelli C, Lee R, Shimamoto G, Boone T, Lacey DL and Dunstan CR (1999) A chimeric form of osteoprotegerin inhibits hypercalcemia and bone resorption induced by il-1beta, tnf-alpha, pth, pthrp, and 1, 25(oh)2d3. *J Bone Miner Res* 9: 1478-1485.
68. Murakami H, Takahashi N, Sasaki T, Udagawa N, Tanaka S, Nakamura I, Zhang D, Barbier A and Suda T (1995) A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. *Bone* 17(2): 137-144.
69. Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, Mogi M, Nakamura H, Horiuchi H, Saito N, Hiraoka BY, Kobayashi Y, Takaoka K, Ozawa H, Miyazawa H and Takahashi N (2003) Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology* 12: 5441-5449.

70. Neumann T, Oelzner P, Petrow PK, Thoss K, Hein G, Stein G and Brauer R (2006) Osteoprotegerin reduces the loss of periarticular bone mass in primary and secondary spongiosa but does not influence inflammation in rat antigen-induced arthritis. *Inflamm Res* 1: 32-39.
71. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy (2001) Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy. *JAMA* ;285(6): 785-795.
72. O'Callaghan JW, Forrest MJ and Brooks PM (1988) Inhibition of neutrophil chemotaxis in methotrexate-treated rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int* 1: 41-45.
73. Oelzner P (2001) Beziehungen zwischen Entzündung und Knochenstoffwechsel bei der Rheumatoiden Arthritis und der Antigen-induzierten Arthritis der Ratte [Habilitation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
74. Oelzner P, Kunze A, Henzgen S, Thoss K, Hein G, Stein G und Bräuer R. (2000) High-dose clodronate therapy prevents joint destruction in chronic antigen-induced arthritis of the rat but inhibits bone formation at the axial skeleton. *Inflamm Res*. 2000 Aug;49(8):424-33.
75. Oelzner P, Brauer R, Henzgen S, Thoss K, Wunsche B, Hersmann G, Abendroth K and Kinne RW (1999) Periarticular bone alterations in chronic antigen-induced arthritis: Free and liposome-encapsulated clodronate prevent loss of bone mass in the secondary spongiosa. *Clin Immunol* 1: 79-88.
76. Okazaki Y, Tsurukami H, Nishida S, Okimoto N, Aota S, Takeda S and Nakamura T (1998) Prednisolone prevents decreases in trabecular bone mass and strength by reducing bone resorption and bone formation defect in adjuvant-induced arthritic rats. *Bone* 4: 353-360.

77. Pohlers D, Nissler K, Frey O, Simon J, Petrow PK, Kinne RW and Brauer R (2004) Anti-cd4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: Influence on t helper cell activation. *Clin Exp Immunol* 3: 409-415.
78. Raisz LG (2005) Pathogenesis of osteoporosis: Concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 12: 3318-3325.
79. Rau R (1994) Methotrexat Behandlung der chronischen Polyarthritis – Eine Übersicht. *Z Rheumatol* 53: 199–229
80. Redlich K, Gortz B, Hayer S, Zwerina J, Doerr N, Kostenuik P, Bergmeister H, Kollias G, Steiner G, Smolen JS and Schett G (2004) Repair of local bone erosions and reversal of systemic bone loss upon therapy with anti-tumor necrosis factor in combination with osteoprotegerin or parathyroid hormone in tumor necrosis factor-mediated arthritis. *Am J Pathol* 2: 543-555.
81. Redlich K, Hayer S, Maier A, Dunstan CR, Tohidast-Akrad M, Lang S, Türk B, Pietschmann P, Woloszczuk W, Haralambous S, Kollias G, Steiner G, Smolen JS and Schett G (2002) Tumor necrosis factor alpha-mediated joint destruction is inhibited by targeting osteoclasts with osteoprotegerin. *Arthritis Rheum* 46(3): 785-792.
82. Reid IR (1997) Glucocorticoid osteoporosis--mechanisms and management. *Eur J Endocrinol* 3: 209-217.
83. Revell PA (1983) Histomorphometry of bone. *J Clin Pathol* 12: 1323-1331.
84. Romas E, Sims NA, Hards DK, Lindsay M, Quinn JW, Ryan PF, Dunstan CR, Martin TJ and Gillespie MT (2002) Osteoprotegerin reduces osteoclast numbers and prevents bone erosion in collagen-induced arthritis. *Am J Pathol* 4: 1419-1427.

85. Schett G, Stolina M, Bolon B, Middleton S, Adlam M, Brown H, Zhu L, Feige U and Zack DJ (2005a) Analysis of the kinetics of osteoclastogenesis in arthritic rats. *Arthritis Rheum* 10: 3192-3201.
86. Schett G, Middleton S, Bolon B, Stolina M, Brown H, Zhu L, Pretorius J, Zack DJ, Kostenuik P and Feige U (2005b) Additive bone-protective effects of anabolic treatment when used in conjunction with rankl and tumor necrosis factor inhibition in two rat arthritis models. *Arthritis Rheum* 5: 1604-1611.
87. Schett G, Redlich K, Hayer S, Zwerina J, Bolon B, Dunstan C, Gortz B, Schulz A, Bergmeister H, Kollias G, Steiner G and Smolen JS (2003) Osteoprotegerin protects against generalized bone loss in tumor necrosis factor-transgenic mice. *Arthritis Rheum* 7: 2042-2051.
88. Segawa Y, Yamaura M, Aota S, Omata T, Tuzuike N, Itokazu Y, Oka H, Tamaki H and Nakamura T (1997) Methotrexate maintains bone mass by preventing both a decrease in bone formation and an increase in bone resorption in adjuvant-induced arthritic rats. *Bone* 5: 457-464.
89. Seitz M, Zwicker M and Loetscher P (1998) Effects of methotrexate on differentiation of monocytes and production of cytokine inhibitors by monocytes. *Arthritis Rheum* 41(11): 2032-2038
90. Seitz M, Loetscher P, Dewald B, Towbin H, Rordorf C, Gallati H and Gerber NJ (1996) Interleukin 1 (il-1) receptor antagonist, soluble tumor necrosis factor receptors, il-1 beta, and il-8--markers of remission in rheumatoid arthritis during treatment with methotrexate. *J Rheumatol* 9: 1512-1516.
91. Shen V, Birchman R, Liang XG, Wu DD, Lindsay R and Dempster DW (1997) Prednisolone alone, or in combination with estrogen or dietary calcium deficiency or immobilization, inhibits bone formation but does not induce bone loss in mature rats. *Bone* 4: 345-351.

92. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R and Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 2: 309-319.
93. Sinigaglia L, Nervetti A, Mela Q, Bianchi G, Del Puente A, Di Munno O, Frediani B, Cantatore F, Pellerito R, Bartolone S, La Montagna G and Adami S (2000). A multicenter cross sectional study on bone mineral density in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 27(11): 2582-2589.
94. Stolina M, Adamu S, Ominsky M, Dwyer D, Asuncion F, Geng Z, Middleton S, Brown H, Pretorius J, Schett G, Bolon B, Feige U, Zack D and Kostenuik PJ (2005) RANKL is a marker and mediator of local and systemic bone loss in two rat models of inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res* 10: 1756-1765.
95. Suzuki Y, Nakagawa M, Masuda C, Ide M, Uehara R, Ichikawa Y and Mizushima Y (1997) Short-term low dose methotrexate ameliorates abnormal bone metabolism and bone loss in adjuvant induced arthritis. *J Rheumatol* 10: 1890-1895.
96. Suzuki Y, Tanihara M, Ichikawa Y, Osanai A, Nakagawa M, Ide M and Mizushima Y (1995) Periarticular osteopenia in adjuvant induced arthritis: role of interleukin-1 in decreased osteogenic and increased resorptive potential of bone marrow cells. *Ann Rheum Dis* 54(6): 484-490
97. Symmons DP (2002) Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 16: 707-722.
98. Themel A (1990) Versuche zur Erarbeitung eines histomorphometrischen Standards für Wirbelkörper und Tibiakopf der Ratte [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

99. Thomas R and Carroll GJ (1993) Reduction of leukocyte and interleukin-1 beta concentrations in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *Arthritis Rheum* 9: 1244-1252.
100. Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T and Higashio K (1997) Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1: 137-142.
101. van de Loo FA, Joosten LA, van Lent PL, Arntz OJ and van den Berg WB (1995) Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2: 164-172.
102. van den Berg WB, Joosten LA, Kollias G and van De Loo FA (1999) Role of tumour necrosis factor alpha in experimental arthritis: Separate activity of interleukin 1beta in chronicity and cartilage destruction. *Ann Rheum Dis* 140-48.
103. van Leeuwen BL, Kamps WA, Hartel RM, Veth RP, Sluiter WJ and Hoekstra HJ (2000) Effect of single chemotherapeutic agents on the growing skeleton of the rat. *Ann Oncol* 9: 1121-1126.
104. Vignery A and Baron R (1980) Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat. *Anat Rec* 2: 191-200.
105. Villiger PM and Bühlmann P (1999) Rheumatoide Arthritis. In: Alexander K, Daniel WG, Diener HC, Freund M, Köhler H, Matern S, Maurer HH, Michel BA, Nowak D, Risler T, Schaffner A, Scherbaum WA, Sybrecht GW, Wolfram G, Zeitz M, Hrsg. *Thiemes Innere Medizin*. 1. Aufl. Stuttgart; New York:Georg Thieme Verlag, 1622-1632.
106. Wagner E (2005) Einsatz von Glukokortikoiden in der Rheumatologie. *Journal für Mineralstoffwechsel* 12 (4): 110-115.

107. Weibel ER (1979) Stereological Methods. In: Practical Methods for Biological Morphometry. London: Academic press.
108. Weinblatt ME, Kaplan H, Germain BF, Block S, Solomon SD, Merriman RC, Wolfe F, Wall B, Anderson L, Gall E and et al. (1994) Methotrexate in rheumatoid arthritis. A five-year prospective multicenter study. *Arthritis Rheum* 10: 1492-1498.
109. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM and Manolagas SC (1998) Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 2: 274-282.
110. Weitzmann MN, Cenci S, Rifas L, Haug J, Dipersio J and Pacifici R (2001) T cell activation induces human osteoclast formation via receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-dependent and -independent mechanisms. *J Bone Miner Res* 2: 328-337.
111. Williams HJ, Willkens RF, Samuelson CO, Jr., Alarcon GS, Guttadauria M, Yarboro C, Polisson RP, Weiner SR, Luggen ME, Billingsley LM and et al. (1985) Comparison of low-dose oral pulse methotrexate and placebo in the treatment of rheumatoid arthritis. A controlled clinical trial. *Arthritis Rheum* 7: 721-730.
112. Wolf E, Röser K, Hahn M, Welkerling H and Delling G (1992) Enzyme and immunohistochemistry on undecalcified bone and bone marrow biopsies after embedding in plastic: a new embedding method for routine application. *Virchows Arch [A]* 420:17-24.
113. Wong BR, Josien R and Choi Y (1999) Trance is a tnf family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *J Leukoc Biol* 6: 715-724.

-
114. Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS, 3rd, Frankel WN, Lee SY and Choi Y (1997) Trance is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-jun n-terminal kinase in t cells. *J Biol Chem* 40: 25190-25194.
115. Wünsche K and Wünsche B (1994). *Histomorphometrische Untersuchungen am spongiösen Knochen der Ratte zur Erfassung alters- und geschlechtsspezifischer Veränderungen des axialen und peripheren Skeletts [Dissertation]*. Jena: Friedrich-Schiller-Universität
116. Yang R, Davies CM, Archer CW and Richards RG (2003) Immunohistochemistry of matrix markers in Technovit 9100 New-embedded undecalcified bone sections. *Eur Cell Mater* 31(6): 57-71.
117. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T and Higashio K (1998a) Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (ocif) and osteoprotegerin (opg): A mechanism by which opg/ocif inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 3: 1329-1337.
118. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N and Suda T (1998b) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to trance/rankl. *Proc Natl Acad Sci U S A* 7: 3597-3602.
119. Zwerina J, Tuerk B, Redlich K, Smolen JS and Schett G (2006) Imbalance of local bone metabolism in inflammatory arthritis and its reversal upon tumor necrosis factor blockade: Direct analysis of bone turnover in murine arthritis. *Arthritis Res Ther* 1: R22.

7 Anhang

7.1 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

1. Herr Prof. Dr. med. Peter Oelzner, kommissarischer Leiter des Funktionsbereiches Rheumatologie und Osteologie der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Jena: Vergabe des Themas, Durchsicht und Korrektur des Manuskriptes,
2. Herr Dr. med. Thomas Neumann, Oberarzt in der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Jena: Unterstützung beim experimentellen Teil der Arbeit,
3. Herr Andreas Darr, Herr Angelos Costas, Doktoranden in der Klinik für Rheumatologie Jena: Unterstützung beim experimentellen Teil der Arbeit,
4. Frau Renate Stoeckigt, Frau Gabriele Grunert, Medizinisch-Technische Assistenten im Institut für Pathologie bzw. im Osteologischen Labor der FSU Jena: Unterstützung beim experimentellen Teil der Arbeit,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Bad Berka, 19.01.2011

Stefanie Fleißner-Richter

7.2 Danksagung

Diese Dissertation, die experimentelle Untersuchungen im Tiermodell umfasst, wäre ohne die Hilfe einer Reihe von Personen nicht möglich gewesen. Für diese Unterstützung möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. G. Wolf, Direktor der Klinik für Innere Medizin III für die Ermöglichung der Promotion in seiner Klinik.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. P. Oelzner, kommissarischer Leiter des Funktionsbereichs Rheumatologie und Osteologie der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Jena für die Überlassung des Themas, die intensive wissenschaftliche Betreuung sowie für das ausdauernde Korrekturlesen des Manuskriptes.

Mein Dank gilt ferner meinem Betreuer Herrn Dr. med. Thomas Neumann, Klinik für Rheumatologie und Osteologie für die herzliche Aufnahme in das Team, die Unterstützung beim experimentellen Teil der Arbeit und Überarbeiten des Manuskriptes.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. R. Bräuer für die Überlassung des etablierten Tiermodells und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe aus dem Institut für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena insbesondere Frau Renate Stöckigt für die freundliche und engagierte Unterstützung während des tierexperimentellen Teils der Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeitern des Osteologischen Forschungslabors insbesondere Frau Gabriele Grunert für die Einbettung und Färbung der Knochen und die Einarbeitung in die Auswertung histologischer Knochenpräparate.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich unterstützt und immer wieder motiviert haben.

7.3 Lebenslauf

Name: Stefanie Fleißner-Richter, geb. Fleißner
Geb. am: 29. Juli 1979 in Büdingen
Familienstand: verheiratet, 3 Kinder
Nationalität: deutsch
Konfession: römisch-katholisch

09/1990-09/1999 Wolfgang-Ernst-Gymnasium Büdingen
1999 Erlangen der Hochschulreife
11/1999 bis 11/2005 Medizinstudium an der Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena
12/2005 Approbation als Ärztin
2006 Erziehungszeit
01/2007-12/2009 Assistenzärztin in der Klinik für Innere Medizin II, Sophien- und Hufelandklinikum Weimar (PD Dr. med. R. Secknus)
01/2010-09/2010 Erziehungszeit
10/2010-03/2011 Assistenzärztin in der Klinik für Innere Medizin II, Sophien- und Hufelandklinikum Weimar (PD Dr. med. R. Secknus)
Seit 04/2011 Assistenzärztin in der Klinik für Kardiologie, Zentralklinik Bad Berka (Prof. Dr. med. B. Lauer)

Publikation:

Oelzner P, Fleissner-Richter S, Bräuer R, Hein G, Wolf G and Neumann T (2010) Combination therapy with dexamethasone and osteoprotegerin protects against arthritis-induced bone alterations in antigen-induced arthritis of the rat. *Inflamm Res* 59 (9): 731-741. Epub 2010 Mar 20