

Diss. ETH No. 19842

# Functional bone imaging in an *in vivo* mouse model of bone adaptation, aging and disease

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

**Floor Lambers**

Master of Science

born 25<sup>th</sup> of September, 1981

Amsterdam, The Netherlands

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ralph Müller, examiner

Prof. Dr. Markus Rudin, co-examiner

Dr. med. vet. Gisela Kuhn, co-examiner

2011

# Summary

Healthy bone adapts its microstructure to optimally withstand loads with a minimal bone mass through balanced bone resorption (governed by osteoclasts) and formation (governed by osteoblasts). In several bone diseases, with osteoporosis being the most common, this balance is disturbed, with bone resorption exceeding bone formation. This results in a deterioration of the bone microstructure, and consequently leads to an increased fragility and susceptibility to fracture. The cause for this shift in the bone remodeling balance is not well understood, and a major topic of research. By using *in vivo* mouse models that resemble human physiology, and imaging modalities that allow visualization of the bone microstructure, as well as bone dynamics in a longitudinal manner (functional imaging), better insight in bone remodeling can be gained. With these imaging modalities, the present thesis is divided into three aims: (i) to develop a functional bone imaging approach for an *in vivo* mouse model, (ii) to apply the functional bone imaging approach to monitor *in vivo* load adaptation, and (iii) to apply the functional bone imaging approach to monitor osteoporosis and aging.

Initially, in order to develop a functional bone imaging approach, *in vivo* micro-computed tomography (micro-CT) and fluorescence molecular tomography (FMT), two relatively new imaging techniques that allow longitudinal 3D assessment of bone, were examined. From *in vivo* micro-CT data, dynamic bone parameters can be extracted which correspond to a measure of cell activity; that is, bone formation parameters represent osteoblast activity and resorption parameters describe osteoclast activity. Similarly, from FMT measurements, osteoblast activity can be determined from the intensity of the fluorescence signal. This signal depends on how much of a fluorophore, which is linked to a reporter that binds with great affinity to newly mineralizing surfaces, is present. The decrease in fluorescence, caused by resorption of the fluorescent label, represents osteoclast activity. Even though both imaging methods are reproducible and have specific advantages, the spatial resolution of FMT is too low to allow selection of the region of interest only, and thus the sensitivity is limited for our purpose. Consequently, the functional imaging approach with *in vivo* micro-CT was chosen for further use.

Previously, an *in vivo* loading mouse model had been developed at the Institute for Biomechanics, which enables application of controlled loads to a caudal vertebra. This model is used, together with the functional bone imaging approach to investigate load adaptation to 8 N in the sixth caudal vertebra (CV6) in comparison to a non loaded control group. Results show that loading significantly increases bone formation rate by 23% and significantly decreases bone resorption rate by 25%. Regarding the shape of the remodeling sites, the surface of the remodeling sites is modulated 3 to 4 times more than the thickness of formation packages or depth of resorption pits. As the amount of remodeling sites is constant over time, this indicates that load-induced bone adaptation is governed by an increase in net osteoblastic activity and a decrease in net osteoclastic activity. Furthermore, the change in bone strength is significantly correlated with the change in bone volume density, suggesting that remodeling is targeted, and consequently leads to an overall increase in bone strength for the loaded group.

To investigate how bone remodeling is influenced by disease, ovariectomy, the most commonly used model for postmenopausal osteoporosis, was examined for its effect on bone microstructure, bone remodeling, and bone strength. Similarly to osteoporosis in humans, high turnover bone loss is observed, with the bone formation rate 1.6 times greater and bone resorption rate 3.7 times greater for ovariectomized than for sham operated mice. Also, as with human osteoporosis, ovariectomy causes a direct increase in bone resorption rate, while the increase in bone formation rate lags behind (remodeling transient). This leads to a deterioration of the bone microstructure, with a tremendous decline in bone volume density of 35% and cortical area fraction of 9%. Furthermore, in agreement with an increase in bone fragility in osteoporotic humans, strain energy density, which is inversely related to bone strength, increases by 37% in the proximal and 50% in the distal region of the trabecular bone. In conclusion, CV6 is a suitable skeletal site to use as a model for postmenopausal osteoporosis.

To investigate the effect of aging on bone remodeling, mice were monitored with the functional bone imaging approach between an age of 16 and 88 weeks. In CV6, bone formation rate and bone resorption rate reduce drastically with age, while the bone volume density and bone strength continue to increase with age, with a stabilization around an age of 52 weeks. In the tibia, the bone volume fraction reduces from an early age. Nevertheless, the resistance to bending and torsion as observed from micro-CT data is sustained, indicating that bones remain mechanosensitive. To further substantiate this observation, load-induced bone adaptation was monitored in mice aged 15, 52 and 82 weeks. For all three age groups there is a beneficial effect of

loading on the bone microstructure and on bone remodeling. Bone formation rates are increased, while bone resorption rates are decreased compared to non loaded controls. Furthermore, for all three age groups bone is formed at sites subjected to high loads, and resorbed at sites subjected to low loads, leading to an overall increase in bone strength. This further supports the premise that CV6 remains mechanosensitive throughout aging.

In conclusion, the application of a functional imaging approach, as developed in this Ph.D. thesis, is shown to be very useful for gaining new insights in how bone remodeling is influenced by mechanical loading, disease or aging. In future, this functional imaging approach will facilitate further exploration of bone remodeling in a number of treatments, strengthen the understanding of the relation between bone remodeling and micro-mechanical environment, and permit investigation of genetic and molecular pathways involved in bone remodeling and bone adaptation.

# Zusammenfassung

Gesunder Knochen passt seine Mikrostruktur mittels ausgewogenem Knochenabbau (durch Osteoklasten) und Knochenaufbau (durch Osteoblasten) laufend an, um Belastungen mit einem Minimum an Material widerstehen zu können. Bei verschiedenen Knochenkrankheiten, von denen Osteoporose die häufigste ist, ist diese Balance gestört, wobei die Abbaurate höher als die Neubildung von Knochen ist. Dies führt zu einer Auflösung/Zerfall der Mikrostruktur woraus eine erhöhte Knochenbrüchigkeit resultiert, die mit einem erhöhten Frakturrisiko einhergeht. Der Grund für diese Verschiebung des Gleichgewichts ist noch weitgehend unverstanden und deshalb von grossem Interesse für die Forschung. Mit Hilfe von *in vivo* Maus Modellen, die die menschliche Physiologie widerspiegeln, sowie Bildgebungstechniken, die die Möglichkeit bieten, sowohl die Knochenstruktur zu visualisieren, als auch dynamische Prozesse im Knochen über einen längeren Zeitraum zu beobachten, kann ein besserer Einblick in den Knochenstoffwechsel gewonnen werden. Anhand dieser Kriterien wurden die folgenden drei Hauptziele dieser Dissertation definiert: (i) Entwicklung einer funktionellen Knochenbildungsmethode für ein *in vivo* Maus Modell, (ii) Anwendung der funktionellen Knochenbildungsmethode auf ein Modell für mechanische Adaptation, (iii) Anwendung der funktionellen Knochenbildungsmethode um Osteoporose und das Altern zu beobachten.

Bei der Entwicklung der funktionellen Knochenbildungsmethode lag der Schwerpunkt auf *in vivo* Mikro-Computertomographie (Mikro-CT) und Fluoreszenz-Molekular-Tomographie (FMT). *In vivo* Mikro-CT Aufnahmen erlaubten die Analyse statischer und dynamischer Knochenparameter über einen längeren Zeitraum, während mit Hilfe von FMT Erkenntnisse über die Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität erlangt werden konnten. Beide Bildgebungsmethoden waren reproduzierbar. Während der Vorteil des Mikro-CT die hohe räumliche Auflösung von 10,5  $\mu\text{m}$  war, zeichnete sich FMT durch kurze Aufnahmezeiten aus. Allerdings war die räumliche Auflösung des FMT zu gering, um Messungen nur in der relevanten Region durchzuführen, wodurch die Sensitivität des FMT für unsere Zwecke nicht ausreichte. Daher wurde für weitere Experimente die funktionale Bildgebungsmethode mit *in vivo* Mikro-CT gewählt.

Am Institut für Biomechanik ist bereits ein *in vivo* Maus Modell entwickelt worden, welches es ermöglicht den 6. Schwanzwirbel kontrolliert einer Belastung durch mechanische Kräfte auszusetzen. Dieses Modell wurde mit funktioneller Knochenbildung kombiniert, um zu untersuchen, wie der Knochen sich an die Belastung anpasst. Durch die mechanische Belastung stieg die Knochenaufbaurrate in einem höheren Mass, als die Knochenabbaurate sank. Während sich die Umbaufläche vergrösserte, waren kaum Veränderungen in der Dicke des neugebildeten Knochen oder der Tiefe der Resorptionslakunen zu sehen. Da die Anzahl der Umbaustellen während der Messungen konstant blieb, kann davon ausgegangen werden, dass die Anpassung des Knochens auf die Einwirkung der mechanischen Kraft durch eine Erhöhung der Osteoblastenaktivität sowie Verringerung der Osteoklastenaktivität geschieht. Ausserdem korrelierte die Veränderung der Knochenfestigkeit signifikant mit Veränderungen der Knochendichte. Dies lässt den Schluss zu, dass der Umbau gezielt abläuft und mechanische Belastung die Knochenfestigkeit insgesamt verbessert.

Um zu erforschen wie Krankheiten den Knochenumbau beeinflussen, wurde die Auswirkung einer Ovariectomie, welche ein weit verbreitetes Modell für postmenopausale Osteoporose ist, auf die Knochenmikrostruktur, den Knochenumbau und die Knochenfestigkeit untersucht. Ähnlich wie beim Menschen stieg durch die Ovariectomie die Knochenresorptionsrate sofort an, während der Anstieg der Knochenaufbaurrate erst später erfolgte. Dies führte zu einer Zerstörung der Knochenmikrostruktur, die von einer starken Verringerung der trabekulären Knochendichte und dem Anteil der kortikalen Knochenfläche begleitet war, wodurch auch die Knochenfestigkeit sank. Somit kann gefolgert werden, dass der 6. Schwanzwirbel geeignet ist, postmenopausale Osteoporose zu imitieren.

Des Weiteren wurde der Einfluss des Alterns auf den Knochenumbau untersucht. Dafür wurden mit der funktionellen Knochenbildungsmethode Messungen an Mäusen in einem Alter von 16 bis 88 Wochen durchgeführt. Im Laufe des Alterns sanken sowohl die Knochenaufbau-, als auch die Knochenabbaurate im 6. Schwanzwirbel drastisch, während die trabekuläre Knochendichte und die Knochenfestigkeit zunächst anstiegen und ab einem Alter von etwa 52 Wochen stabil blieben. In der Tibia sank die trabekuläre Knochendichte bereits frühzeitig, jedoch blieb die Widerstandsfähigkeit gegen Verbiegen und Verdrehen bewahrt, was schlussfolgern lässt, dass die Knochen weiterhin mechanosensitiv sind. Um dies tiefergehend zu erforschen, wurde die Belastungs-induzierte Knochenanpassung an Mäusen untersucht, die bei Versuchsbeginn 15; 52 oder 82 Wochen alt waren. Bei allen drei Altersgruppen konnte durch diese Belastung ein positiver Effekt auf die

Knochenmikrostruktur und den Knochenumbau festgestellt werden. Im Vergleich zur nichtbelasteten Kontrollgruppe war die Knochenaufbaurrate erhöht und die Knochenabbaurate erniedrigt. Alle drei Altersgruppen zeigten darüber hinaus einen Knochenaufbau an Stellen mit starker mechanischer Belastung, während an kaum belasteten Stellen Knochen resorbiert wurde, was insgesamt zu einem Anstieg der Knochenfestigkeit führte. Dies unterstützt die Annahme, dass der 6. Schwanzwirbel auch mit dem Alter mechanosensitiv bleibt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Anwendung der in dieser Doktorarbeit entwickelten funktionellen Bildgebungsmethode neue Einblicke in die Beeinflussung des Knochenumbaus durch mechanische Belastung, Krankheit und Altern verschafft. Zukünftig wird diese Bildgebungsmethode hilfreich sein, den Knochenumbau bei verschiedenen Behandlungen zu erforschen, das Verständnis für die Verbindung zwischen Knochenumbau und dem mikromechanischen Umfeld zu verbessern und es erlauben verschiedene genetische und molekulare Prozesse des Knochenumbaus zu untersuchen.