

Aus der Arbeitsgruppe Experimentelle Endokrinologie
(PD. Dr. med. D. Seidlová-Wuttke)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Osteoporose - Das Metabolische Syndrom des Knochens

**Wirkungen von Ecdyson und Vitamin D auf den
postmenopausalen, osteoporotischen Knochen im
Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Lucas Dannenberg

aus
Hamburg

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat H. K. Kroemer

1. Berichterstatterin: PD. Dr. med. Seidlová-Wuttke

2. Berichterstatter: PD. Dr. med. Sehmisch

Promotor: Prof. Dr. med. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Januar 2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	3
1.1 Osteoporose	4
1.1.1 Epidemiologie	4
1.1.2 Definition und Klassifikation	4
1.1.3 Risikofaktoren der Osteoporose	5
1.1.4 Postmenopausale Osteoporose	6
1.1.4.1 Klimakterium	6
1.1.4.2 Postmenopause und Osteoporose	6
1.1.4.3 Ovx-Ratte als Modell der Osteoporose	8
1.1.5 Metabolisches Syndrom und Osteoporose	9
1.1.6 Tierexperimentelle Ansätze zur Diagnostik der Osteoporose	10
1.1.7 Therapie der Osteoporose	11
1.2 Knochen	13
1.2.1 Aufbau des Knochens	13
1.2.2 Osteoblasten	15
1.2.3 Osteozyten	15
1.2.4 Osteoklasten	15
1.2.5 Knochenstoffwechsel	16
1.2.6 Knochenmarker	17
1.2.7 Knochenqualität	17
1.3 Testsubstanzen	19
1.3.1 Ecdysteroide und Ecdyson	19
1.3.2 Vitamin-D-Hormon	21
1.4 Zielsetzung	23
2. Material und Methoden	25
2.1 Versuchsaufbau und -Ablauf	25
2.2 Histologische Auswertung der Tibia-Präparate	28
2.2.1 Messung der Breite des Gelenkknorpels	30
2.2.2. Messung der Breite der Kortikalis	30
2.2.3 Messung der Epyphysenfuge und ihrer Zonen	31

2.2.4 Messung der prozentualen Anteile von rotem Knochenmark, Knochen trabekel und Fettgewebe an der Metaphyse der proximalen Tibia.....	31
2.3 Statistik.....	33
3. Ergebnisse	34
3.1 Futteraufnahme und Körpergewicht.....	34
3.2 Breite des proximalen Gelenkknorpels der Tibia.....	36
3.3 Breite der Epiphysenfuge	37
3.3.1 Breite der Hypertrophiezone der Epiphysenfuge	38
3.3.2 Breite der Proliferationszone der Epiphysenfuge.....	39
3.3.3 Breite der Reservezone der Epiphysenfuge	40
3.3.4 Prozentuale Anteile der Hypertrophiezone, der Proliferationszone und der Reservezone an der gesamten Breite der Epiphysenfuge	41
3.4 Breite der tibialen Kortikalis	42
3.5 Entwicklungen in der Metaphyse der proximalen Tibia	43
3.5.1 Prozentuale Anteile von Knochen trabekel in der Metaphyse der proximalen Tibia.....	43
3.5.2 Prozentuale Anteile von Fettgewebe in der Metaphyse der proximalen Tibia	44
3.5.3 Prozentuale Anteile von rotem Knochenmark in der Metaphyse der proximalen Tibia.....	45
3.5.4 Verhältnis von Knochen trabekel zu Fettgewebe.....	46
3.5.5 Verhältnis von Knochen trabekel zu rotem Knochenmark	47
3.5.6 Verhältnis von Fettgewebe zu rotem Knochenmark	48
3.6 Serumparameter	49
3.6.1 Serum-Osteokalzin	49
3.6.2 Serum-Rat-Laps	50
3.6.3 Serum-Cholesterin.....	51
3.6.4 Serum-Leptin.....	52
3.6.5 Serum-Glukose.....	53
3.7 Basisfutter im Vergleich.....	54
4. Diskussion	55
4.1 Osteoporose - der Einfluss des Östrogenmangels	55
4.2 Osteoporose - das Metabolische Syndrom des Knochens.....	57
4.3 Testsubstanzen	58
4.3.1 Ecdyson	58

4.3.2 Vitamin D	61
4.3.3 Ecdyson und Vitamin D im Vergleich	64
5. Zusammenfassung	68
6. Anhang	71
6.1 Abbildungen	71
6.2 Tabellen	72
7. Literaturverzeichnis	77
8. Abbildungsverzeichnis	86
9. Tabellenverzeichnis	88

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
ATPase	Adenosintriphosphatase
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BiB	Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung
BMD	Bone Mineral Density
BMI	Body Mass Index
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
d	Tag, lat. <i>dies</i>
DVO	Deutscher Dachverband Osteologie
DXA	<i>Dual energy X-ray absorptiometry</i>
E2	Estradiolbenzoat
Ecd	β-Ecdyson (20-Hydroxy-Ecdysone)
EFFO	European Foundation for Osteoporosis
Fa.	Firma
FG	Fettgewebe
g	Gramm
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
h	Stunde, lat. <i>hora</i>
HRT	<i>Hormon Replacement Therapy</i> , Hormonersatztherapie
IE	Internationale Einheiten
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
KT	Knochen trabekel
l	Liter

MMA	Methylmethacrylat
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
NOF	National Osteoporosis Foundation
Nr.	Nummer
OPG	Osteoprotegerin
Ovx, ovx	Ovarektomie, ovariectomiert
PD	Privatdozent/in
pH-Wert	Der negativ dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität; dient als Maß für sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
PMMA	Polymerisations-Methylmethacrylat
PPAR	<i>Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor</i>
PTH	Parathormon
qCT	quantitative Computertomographie
RANK	<i>Receptor Activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
rKM	rotes Knochenmark
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNF- β	Tumornekrosefaktor-beta
v.a.	vor allem
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
vgl.	vergleiche
VitD	Vitamin D
vs.	versus
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Das Zusammenspiel von demographischem Wandel, schlechten Ernährungsgewohnheiten und steigender Lebenserwartung stellt Deutschland, Europa und weitere Industrienationen vor gesundheitsökonomische und sozialpolitische Probleme. Eines dieser Probleme zeigt sich in der steigenden Prävalenz der Osteoporose (Häussler et al. 2007). Osteoporose, oder auch Knochenschwund, ist eine Erkrankung des Knochens, die durch einen Verlust der Knochendichte und ein erhöhtes Frakturrisiko charakterisiert ist (DVO 2009). Entstandene Frakturen gehen mit Operationen, langanhaltenden Aufenthalten in Krankenhäusern und/oder Rehabilitationseinrichtungen sowie dem eventuellen Verlust der Selbstständigkeit einher. Die komplexen, individuellen und sozialökonomischen Folgen sind weitreichend und werden aufgrund der alternden Bevölkerung in den nächsten Jahren noch mehr an Bedeutung gewinnen (vgl. Abb. 31 und 32 im Anhang). Hauptursache ist die steigende Lebenserwartung, die dazu führt, dass immer mehr Frauen für einen längeren Zeitraum einem Östrogenmangel und somit dem stärksten Risikofaktor für Osteoporose ausgesetzt sind. Des Weiteren konnte in den letzten Jahren ein Zusammenhang zwischen dem Metabolischen Syndrom und der Entstehung von Osteoporose gezeigt werden (Hsu et al. 2006, Hwang und Choi 2009, Russel et al. 2010, Cao 2011). Das Metabolische Syndrom wird charakteristisch durch eine gestörte Glukose- und Fettregulation sowie durch eine viszerale Fettleibigkeit gekennzeichnet (Beilby 2004). Die Prävalenz dieses Syndroms wird aufgrund des westlichen Lebenswandels in den nächsten Jahren weiter steigen und demnach immer mehr Menschen einem zusätzlichen Risikofaktor für Osteoporose aussetzen (Benecke und Vogel 2003, Icks et al. 2005).

Um den ovariellen Funktionsverlust bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose auszugleichen, stand bis vor einigen Jahren eine Hormonersatztherapie (HRT) mit weiblichen Sexualhormonen im Vordergrund. Durch diese konnte eine deutlich geringere Abnahme der Knochendichte und eine Reduktion der Frakturhäufigkeit erreicht werden (Kanis et al. 1992). Nach den Auswertungen langjähriger retrospektiver Studien wurde jedoch deutlich, dass eine HRT risikobehaftet ist. Es wurde sowohl eine Erhöhung des Risikos für kardiovaskuläre Erkrankungen als auch ein vermehrtes Auftreten von Mammakarzinomen festgestellt (Rossouw et al. 2002, Manson et al. 2003). Aufgrund der risikohaften Nebenwirkungen hat die Suche nach alternativen Therapiemöglichkeiten vor Jahren begonnen, und es konnten sich bereits einige alternative Arzneimittel auf dem Markt etablieren (Delmas 2002, NOF 2010). Keines dieser Medikamente vermag es jedoch, den Knochen in seiner ganzen Komplexität zu

schützen. Viele medikamentöse Wirkungen setzen direkt am Knochen an, lassen jedoch weitere Bestandteile eines gesunden Skelettsystems außer Acht. So werden knochenprotektive Faktoren wie Muskel- und Knorpelstärke und v.a. das Körpergewicht sowie weitere Einflüsse des Metabolischen Syndroms nur in Teilen oder gar nicht berücksichtigt. Demnach stellt sich die Frage nach Therapiealternativen, die auf metabolische Prozesse, das Knochen-, Muskel- und Knorpelgewebe Einfluss nehmen, einen präventiven Ansatz zeigen und im Sinne von unterstützenden, risikofreien Phytopharmaka die Möglichkeit bieten, den im Laufe des Lebens sicheren Verlust von Knochendichte abzumildern.

1.1 Osteoporose

1.1.1 Epidemiologie

In den USA, Europa und Japan waren 1997 Schätzungen zufolge ca. 75 Millionen Menschen an Osteoporose erkrankt (EFFO und NOF 1997). Die Prävalenz für die Osteoporose in Deutschland liegt zwischen vier und sieben Millionen Menschen, wobei postmenopausale Frauen am häufigsten betroffen sind. Die Prävalenz der Osteoporose wird weiter zunehmen, die Zahl der Hüftfrakturen sich von 117.000 im Jahre 2000 bis zum Jahre 2040 mehr als verdoppeln (Häussler et al. 2007). Insgesamt betragen die im Jahre 2008 entstandenen Kosten in Deutschland durch die Behandlung von Osteoporose jeglicher Ätiologie 1.86 Milliarden Euro (Statistisches Bundesamt 2010). Damit hat die Osteoporose zusätzlich zu der individuellen und gesellschaftlichen auch eine große volkswirtschaftliche Bedeutung.

1.1.2 Definition und Klassifikation

Die Osteoporose wird nach dem Deutschen Dachverband Osteologie (DVO 2009) in der Leitlinie der AWMF als eine systemische Skeletterkrankung definiert, die durch eine verringerte Knochenmasse sowie eine mikroarchitektonische Verschlechterung des Knochengewebes charakterisiert ist und zu einem erhöhten Frakturrisiko führt. Dabei wird die Osteoporose als manifest definiert, wenn eine Fraktur als Folge des Knochenverlusts auftritt.

Diese Definition beinhaltet die seit 1994 von der WHO eingeführte Definition über die Ermittlung der Knochendichte (Kanis et al. 1994). Die Ermittlung der Knochendichte, der sogenannten Bone Mineral Density (BMD), erfolgt über die Doppelröntgen-Absorptiometrie (DXA, *dual energy X-ray absorptiometry*). Der ermittelte Wert wird mit dem Durchschnitt eines Normalkollektivs verglichen. Die Anzahl der Standardabweichungen der BMD

über/unter dem Mittelwert von jungen Menschen des gleichen Geschlechts ergibt den T-Wert (vgl. Tab. 1). Dieser Wert ist ein Maß für den Verlust der Knochendichte. Beim Vergleich der BMD mit einem Kollektiv des gleichen Alters und Geschlechts erhält man den Z-Wert, der Aussagen über das Frakturrisiko zulässt. Ein T-Wert ≥ -1 entspricht einer gesunden Knochendichte. Ein T-Wert von -1 bis $-2,5$ beschreibt eine Osteopenie und ein T-Wert $\leq -2,5$ kennzeichnet eine Osteoporose (Kanis et al. 1994, Delmas 2000, DVO 2009).

T-Wert	Befund
T-Wert ≥ -1	Normalbefund
T-Wert -1 bis $-2,5$	Osteopenie
T-Wert $\leq -2,5$	Osteoporose

Tabelle 1: WHO Definition der Osteoporose anhand des T-Werts

Nach DVO 2009 (modifiziert)

Klassifiziert wird die Osteoporose in eine primäre und sekundäre Form. Die primäre Form ist mit 95 Prozent die häufigste. Dazu zählen die peri- und postmenopausale, die senile und die selten auftretende idiopathische Osteoporose. Die durch den ovariellen Funktionsverlust ausgelöste postmenopausale Osteoporose (Typ I) ist gekennzeichnet durch einen im Verhältnis zur Kompakta höheren Abbau der Spongiosa. Die senile Form der Osteoporose (Typ II), bei der Alterungsvorgänge und Mangelercheinungen im Vordergrund stehen, führt im höheren Alter sowohl bei Frauen als auch bei Männern zum äquivalenten Abbau von Kompakta und Spongiosa (Riggs und Melton 1986). Die Frau durchläuft beide dieser Phasen, was zu einer deutlich erhöhten Inzidenz für Osteoporose und Hüftfrakturen führt. Differentialdiagnostisch abzugrenzen sind die sekundären Osteoporosen, die durch generalisierte Stoffwechselstörungen, durch die Einnahme bestimmter Medikamente und durch eine erhebliche Immobilisation ausgelöst werden können (Hofbauer et al. 2010).

1.1.3 Risikofaktoren der Osteoporose

Die pathophysiologischen Mechanismen bei der Entstehung der Osteoporose sind v.a. postmenopausal bedingt (Riggs und Melton 1986). Die Ausprägungen des Knochenverlustes durch Östrogenmangel sind dabei allerdings individuell sehr unterschiedlich. Grund dafür sind spezifische Risikofaktoren, die zusätzlich negative Einflüsse auf den Verlust der Knochendichte haben können (Dempster und Lindsay 1993). Hier kann zwischen angeborenen Risikofaktoren, zu denen die ethnische Zugehörigkeit, das Geschlecht und die maximal im Leben erreichte Knochendichte (*Peak Bone Mass*) gehören, und variablen Risikofaktoren unterschieden werden. Zu diesen gehören der Konsum von Tabak, ein übermäßiger Alkoholgenuss, schlechte Ernährungsgewohnheiten und eine verminderte

körperliche Aktivität. Weitere Einflüsse haben Vorerkrankungen und die Einnahme von bestimmten Medikamenten (Vokes und Favus 2010). Einen Überblick über einige Risikofaktoren für Osteoporose gibt die Tab. 4 im Anhang.

1.1.4 Postmenopausale Osteoporose

1.1.4.1 Klimakterium

Das Klimakterium beschreibt die Phase des Übergangs von der vollen Geschlechtsreife bis zum vollständigen Verlust der ovariellen Funktion und wird in Prämenopause, Menopause und Postmenopause gegliedert. Im Mittel beträgt das Alter der Frau bei Eintritt in die Menopause 51 Jahre (Greendale et al. 1999). Das Klimakterium ist eine Phase voller individueller Veränderungen im Leben einer Frau, die sowohl physische als auch psychische Wandelungen beinhalten kann. Das klinische Erscheinungsbild ist aufgrund der vielfältigen Aufgaben der Östrogene sehr komplex. Neben genitalen Veränderungen wie der vaginalen Atrophie treten zusätzlich extragenitale Beschwerden auf. So z.B. Hitzewallungen, sogenannte *hot flushes*, Schweißausbrüche, Schlafstörungen und depressive Verstimmungen (Freedman 2002). Des Weiteren sind kardiovaskuläre Erkrankungen, urogenitale Beschwerden und die Entstehung von Osteoporose häufige Begleiterscheinungen (Greendale et al. 1999).

1.1.4.2 Postmenopause und Osteoporose

Schon in den vierziger Jahren des letzten Jahrhunderts konnten Reifstein und Albright (1947) zeigen, dass Osteoporose bei älteren Frauen v.a. auf dem Verlust von Östrogenen beruht und mit einer HRT der Kalziumhaushalt, als Marker des Knochenumsatzes, wieder verbessert werden konnte. Viele nachfolgende Arbeiten bestätigten diese These und zeigten den wichtigen Stellenwert der Östrogene in Bezug auf die Entstehung von Osteoporose (Riggs und Melton 1986). Der physiologische Zustand des stetigen Knochenumbaus ist abhängig von dem empfindlichen Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau. Durch den Verlust der ovariellen Funktion während des Klimakteriums steigt die Aktivität sowohl der knochenabbauenden als auch der knochenaufbauenden Prozesse, jedoch nicht in gleichem Maße. So wird das Gleichgewicht hin zu einem Knochenabbau verschoben, was sich in den Serumwerten der Marker-Proteine für den Knochenstoffwechsel widerspiegelt. Als Zeichen des vermehrten Knochenverlusts steigen knochenresorbierende Marker (z.B. *Cross-Laps/Cross-Links*) um ca. 90 Prozent an, während Marker für den Knochenaufbau, wie

Osteokalzin, nur um 45 Prozent ansteigen (Riggs et al. 1998). Grund hierfür ist die komplexe Interaktion von Östrogenen mit den Zellen des Knochens. Beispiele hierfür sind der Einfluss auf das in Kap. 1.2.5 beschriebene RANK/RANKL/OPG-System und die physiologische Inhibition von Zytokinen wie z.B. Interleukin-6, welche für eine Aktivierung von Osteoklasten sorgen (Manolagas 2000). Östrogene haben auch einen Einfluss auf die Lebensspanne und Entwicklung von Knochenzellen. So wird bei einem Hormonmangel beispielsweise die Lebensdauer der Osteoklasten verlängert (Manolagas 2000). Zudem konnten Okazaki et al. (2002) in tierexperimentellen Versuchen zeigen, dass die Entwicklung von frühen mesenchymalen Vorläuferzellen der Osteoblasten in Richtung Adipozyten verschoben und die Apoptose der Osteoblasten rascher induziert wird. Des Weiteren fällt durch den Verlust der ovariellen Funktion eine wichtige stimulierende Funktion auf das östrogenregulierte Knorpelgewebe der Epiphysenfuge und des Gelenkknorpels weg, sodass die Knochenqualität im Ganzen weiter abnimmt (Nilsson et al. 1999, Wluka et al. 2004).

Insgesamt gliedert sich der Verlust der Knochendichte in mehrere Phasen, eine prämenopausale, eine postmenopausale und eine späte senile Phase. Die frühe postmenopausale Phase tritt in den ersten zehn bis zwanzig Jahren nach Einsetzen der Menopause auf. Sie ist durch einen 20 bis 30 prozentigen Verlust von trabekulären (spongiosen) Knochenanteilen gekennzeichnet, während der Verlust der Kompakta mit 5 bis 10 Prozent deutlich niedriger ist (Riggs et al. 1998). Erste Frakturen treten vornehmlich im Bereich der Wirbelkörper und des distalen Radius auf. Parallel steigt durch die stetige Resorption von Knochenmaterial der Fluss von Kalzium in den Körperkreislauf. Der Organismus wirkt der drohenden Hyperkalzämie entgegen, indem die Kalziumausscheidung in der Niere erhöht wird und parallel die intestinale Kalziumabsorption sinkt (Heaney et al 1978). In der langsam voranschreitenden senilen Phase gleicht sich der Verlust von Kompakta dem der Spongiosa an (Riggs und Melton 1986, Riggs et al. 1998). Es treten v.a. Frakturen an Hüfte und langen Röhrenknochen auf. Diese langsamere Phase wird von einem Anstieg des Parathormons (PTH) begleitet, der einen vermehrten Kalziumverlust kompensieren soll (Riggs et al. 1998, Seeman 2002). Der entstehende sekundäre Hyperparathyreoidismus hat wiederum einen weiteren negativen Einfluss auf die Knochenbilanz, da PTH unter anderem über die Induktion von RANKL die Mobilisation von Kalzium aus dem Knochen fördert (Hofbauer und Schoppet 2010).

1.1.4.3 Ovx-Ratte als Modell der Osteoporose

Zur Beschreibung der postmenopausalen, osteoporotischen Knochenveränderungen eignet sich die Ratte als Versuchstier (Turner et al. 2001). Die weibliche Ratte entwickelt unter physiologischen Umständen kein Klimakterium und keine Osteoporose. Jedoch kann ein ovarieller Funktionsverlust durch eine Ovariectomie (Ovx), durch die Applikation von Östrogen-Rezeptor-Antagonisten oder GnRH-Analoga stimuliert werden (Turner et al. 2001). Aufgrund vergleichbarer endokrinologischer Aufgaben der weiblichen Sexualhormone in Ratte und Mensch sorgt ein Mangel für ähnliche klinische Beschwerden. Es kommt z.B. zum Auftreten von *hot flushes* (Merchenthaler et al. 1998), zu einer Gewichtszunahme (Mayes und Watson 2004) und zum Entstehen von Osteoporose (Kalu 1991, Turner et al. 2001). Hinzu kommen knochenmorphologische Ähnlichkeiten und vergleichbare metabolische Prozesse im Knochen von Ratte und Mensch (Bellino 2000, Turner et al. 2001). Wie beim Menschen entwickelt sich die Osteoporose in zwei Phasen, jedoch ist die Lokalisation des primären Knochenmasseverlustes eine andere. Beim Menschen wird in der ersten frühen Phase der Knochenmasseverlust v.a. an Wirbelkörpern beobachtet, während bei der Ratte der Verlust von Knochenmasse an der Tibia am stärksten ist (Kalu 1991). Dementsprechend werden auch die meisten Untersuchungen an der Tibia der Ratte vorgenommen. Ein weiterer Unterschied zum menschlichen Knochen ist, dass die Epiphysenfuge des Femurs beinahe lebenslang erhalten bleibt (Levolas et al. 2008), während sich beim Menschen mit dem Abschluss des Längenwachstums im Zuge der Pubertät die Wachstumsfuge verschließt. Des Weiteren eignet sich die Ratte als Versuchsmodell aufgrund ihrer kurzen Lebensspanne. Auf den Menschen übertragen, entspricht ein Lebensmonat der Ratte ungefähr 2,5 Lebensjahren (Andreollo et al. 2012). Zudem entwickelt die Ratte an der Tibia schon 14 Tage nach Ovx einen signifikanten Knochenverlust (Levolas 2008). So können die Resultate von Substanzwirkungen auf den osteoporotischen Knochen nach Ovx und anschließender dreimonatiger Substanzapplikation auf einen präventiven Ansatz hin untersucht werden. Übertragen auf den Menschen würde dies einer Untersuchung der Knochen nach einer Substanzapplikationsdauer von 7,5 Jahren entsprechen.

Aufgrund der Möglichkeit, die Ergebnisse von Versuchen an Ratten auf den Menschen übertragen zu können und durch das im Vergleich zu anderen Versuchstieren schnelle Ansprechen auf hormonelle Veränderungen, ist die Ratte zu einem etablierten Modell für Forschungsarbeiten in Zusammenhang mit postmenopausalen, osteoporotischen Veränderungen

geworden (Turner 2001), sodass auch in der vorliegenden Dissertation die Ratte als Versuchstier gewählt wurde.

1.1.5 Metabolisches Syndrom und Osteoporose

Das Metabolische Syndrom bezeichnet eine Konstellation von verschiedenen Faktoren, die das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und die Entstehung eines Diabetes Mellitus Typ II erhöhen. Charakteristische klinische Befunde sind eine beeinträchtigte Glukose-Regulation, Bluthochdruck, eine Dyslipidämie, eine viszerale Fettleibigkeit sowie ein proinflammatorisches und prothrombotisches Milieu (Beilby 2004). Laut der WHO kann ein Metabolisches Syndrom mit den im Anhang dargelegten Kriterien der Tab. 5 diagnostiziert werden (Alberti und Zimmet 1998, Beilby 2004). Die pathophysiologischen Mechanismen des Metabolischen Syndroms sind vielfältig, komplex und bis dato nicht vollständig verstanden (Miranda et al. 2005). Auf der einen Seite liegt eine Insulinresistenz vor, durch die ein hyperglykämischer Zustand entsteht, der einen Stimulus für die insulinproduzierenden Beta-Zellen der Pankreas darstellt und zudem die Bildung von Arteriosklerose fördert. Auf der anderen Seite wird eine Dysfunktion im Energiehaushalt diskutiert, bei der durch Fettleibigkeit die Kapazität der Adipozyten überschritten wird und sich Tryglyzeride in Muskel, Leber, viszeralem und intraossärem Fettgewebe ablagern. Zudem wird dieser Effekt durch eine vermehrte Lipolyse unterstützt (Miranda et al. 2005).

In den letzten Jahren konnte ein negativer Einfluss des Metabolischen Syndroms auf die Knochenqualität immer deutlicher nachgewiesen werden, sodass das Metabolische Syndrom als Risikofaktor für die Entstehung von Osteoporose angenommen werden kann (Hsu et al. 2006, Hwang und Choi 2009, Russel et al. 2010, Cao 2011). Grundlage dieser Vermutungen sind physiologische Interaktionen von Fett- und Knochengewebe, die beim Metabolischen Syndrom gestört sind. Es konnte ein verminderter Osteokalzin-Spiegel, ein Marker für den Knochenaufbau, mit Fettleibigkeit und einem erhöhtem Insulin-Spiegel im Blut assoziiert werden (Pittas et al. 2009). Darüber hinaus manifestierte sich ein erhöhter Leptin-Spiegel. Leptin hat einen regulatorischen Einfluss auf Knochenzellen und sorgt bei eigenem Überangebot für einen Verlust des Gleichgewichts zwischen Knochenauf- und -abbau und führt zu einer Rarefizierung des Knochengewebes (Hsu et al. 2006, Cao 2011). Hinzu kommen eine vermehrte viszerale sowie eine intraossäre, direkt für den Knochen schädliche Fettleibigkeit. Aus dieser Fettleibigkeit resultiert eine vermehrte Produktion von Adipokinen, die ein inflammatorisches Milieu aufbauen (Fontana et al. 2007). Dieses Milieu,

gekennzeichnet durch einen Anstieg von Zytokinen wie Interleukin-6 und TNF- α , sorgt für eine Aktivitätsstimulierung von knochenresorbierenden Osteoklasten (Hofbauer und Schoppet 2010, Russel et al. 2010, Cao 2011). Ferner kommt es zu einer Verschiebung bei der Reifung von Osteoblasten und Adipozyten aus gemeinsamen mesenchymalen Stammzellen zugunsten von Fettzellen (Zhao et al. 2008). So kann ein direkter lipotoxischer Effekt auf den Knochen beschrieben werden, bei dem eine Assoziation von niedriger Knochendichte, vermehrtem viszeralem und intraossärem Fettgewebe und ein erhöhtes Serum-Lipid-Profil vorherrscht (Hsu et al. 2006). Ein Zustand, der als Metabolisches Syndrom des Knochens bezeichnet werden kann.

Ein weiteres Problem stellt die Verknüpfung des Metabolischen Syndroms mit dem postmenopausalen Zustand der Frau dar. Jene Frauen haben ein um 60 Prozent erhöhtes Risiko, an dem Metabolischen Syndrom zu erkranken (Carr 2003). Durch den Verlust der weiblichen Sexualhormone fällt zum einen eine direkte Protektion des Knochens weg und zum anderen sorgt dieses Defizit zusätzlich für eine Verschiebung von Unterhautfettgewebe zu viszeralem Fettgewebe und einer vermehrten Ausschüttung von Adipokinen (Carr 2003, Zhao et al. 2008). Aufgrund einer Prävalenz des Metabolischen Syndroms von 23,8 Prozent (Neuhauser und Ellert 2005) und dem unausweichlich auftretenden postmenopausalen Zustand der Frau sollten nicht nur die Konsequenzen des Metabolischen Syndroms bezogen auf kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes Mellitus Typ II im Vordergrund stehen, sondern auch die Einflüsse auf den Knochen mehr in den Fokus gerückt werden. Denn im Gegensatz zur Menopause ist das Metabolische Syndrom eine Ansammlung von Risikofaktoren, die durch eine Reduzierung von intrinsischen und extrinsischen Einflüssen zu vermeiden sind (Wilson und Grundy 2003). So stellen gut eingestellte Lipidwerte, optimale Blutdruckwerte, vermehrte physische Aktivität und eine Gewichtsreduzierung nicht nur eine Reduzierung von kardiovaskulären Risikofaktoren dar, sondern sorgen auch für eine Verminderung des Risikos für die Entstehung von Osteoporose.

1.1.6 Tierexperimentelle Ansätze zur Diagnostik der Osteoporose

Die führende Methodik bei der Diagnostik der Osteoporose beim Menschen ist die Messung der BMD per DXA an Hüfte oder an Wirbelkörpern (DVO 2009, NOF 2010). Ein Verfahren, dass auch bei Ratten durchgeführt werden kann. Dabei durchleuchten zwei Röntgenstrahlen unterschiedlicher Stärke den Knochen und geben die BMD in g/cm^2 an. Vorteil dieser Methode ist, dass die DXA an fast jeder Skelettregion des Körpers von Mensch und Ratte

angewendet werden kann (Lane 2006, Lelovas 2008). Eine andere Möglichkeit zur Ermittlung der BMD von Mensch und Ratte ist die Untersuchung über eine quantitative Computertomographie (qCT). Diese Methode hat den Vorteil, dass dreidimensionale Bilder erstellt werden können. Im Gegensatz zur Darstellung per DXA kann diese Bildgebung zwischen kortikalen und trabekulären Knochenanteilen unterscheiden und es können bessere Aussagen über strukturelle Veränderungen der BMD gemacht werden (Brunader und Shelton 2002, Lelovas 2008). Dabei sprechen gegen das Anwenden der qCT beim Menschen die deutlich stärkere Strahlenbelastung und die höheren Kosten.

Beide oben beschriebenen Varianten sind Verfahren, die bei der tierexperimentellen Diagnostik von Osteoporose an Ratten durchgeführt werden können. Nachteile dieser Verfahren sind wie auch beim Menschen, dass die exakte morphologische Zusammensetzungen des Knochens sowie exakte strukturelle Veränderungen nicht erfasst werden können. Da mit der BMD nur 60 bis 70 Prozent der Knochenstärke von Ratten beschrieben werden können, fehlen zusätzliche Informationen, um die Knochenqualität genauer untersuchen zu können (Lelovas 2008). Gerade unter dem Aspekt des Metabolischen Syndroms des Knochens ist es von Interesse, Aussagen über die Ultrastruktur der Spongiosa (Knochentrabekel) und des Knochenmarks sowie deren strukturellen und prozentualen Verteilungen machen zu können. Deshalb wurde in der vorliegenden Dissertation die Untersuchung des Knochens mittels postmortaler Histomorphometrie durchgeführt. Bei diesem mikroskopischen Verfahren wird ein hochauflösendes, zweidimensionales Bild erstellt, mit dessen Hilfe genaue Aussagen über den Vernetzungsgrad der Spongiosa und der intraossären Verfettung gemacht werden können. Zusätzlich können unabhängig von der Knochendichte weitere Einflussparameter der Knochenqualität, wie die Breite und Beschaffenheit der Kortikalis, der Epiphysenfuge und des Gelenkknorpels beschrieben werden (Lelovas 2008). Gleichzeitig sind die an Ratten gemessenen Ergebnisse bezogen auf den Verlust von Knochenmasse nicht weniger aussagekräftig als die der DXA und der qCT (Rosen et al. 1995).

1.1.7 Therapie der Osteoporose

Um individuelle und sozialökonomische Auswirkungen frühzeitig zu vermeiden, gewinnt die Prophylaxe der Osteoporose immer mehr an Bedeutung. Ziele der Prophylaxe liegen beispielsweise in der Abwendung von variablen Risikofaktoren wie Nikotin- und Alkoholkonsum, Immobilisation und die inadäquate Zufuhr von Vitamin D (VitD) und Kalzium (Vokes und Favus 2010). Für eine langanhaltende Knochendichte ist ein hoher *Peak*

Bone Mass notwendig, der durch eine schon früh im Leben ausreichende Zufuhr von Kalzium gewährleistet werden kann. Ab dem 50. Lebensjahr empfiehlt die National Osteoporosis Foundation eine Kalziumaufnahme von mindestens 1,2 mg pro Tag (NOF 2010). Ferner wird eine tägliche VitD-Aufnahme von 800 bis 1000 IE gefordert. Daher wurde in den Tierversuchen der vorliegenden Dissertation VitD-reiches und VitD-freies Futter verwendet, um die in den Leitlinien verankerten Wirkungen von VitD reproduzieren zu können. Ziel der Prophylaxe ist es, bei ausreichender Zufuhr und Abwendung von weiteren extrinsischen Faktoren das Frakturrisiko zu senken und eine eventuell dennoch notwendig gewordene medikamentöse Therapie zu unterstützen.

Nach den Leitlinien des Dachverbands Osteoporose e.V. (DVO 2009) sollte eine gezielte medikamentöse Therapie der Osteoporose begonnen werden, wenn das geschätzte 10-Jahres-Risiko für Wirbelkörper- und proximale Femurfrakturen größer 30 Prozent beträgt und die Knochendichtemessung einen T-Wert von < -2 ergibt. In den 80er und 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts stand dabei die HRT mit Östrogenen im Vordergrund. Nach Auswertungen langjähriger Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass eine Therapie mit weiblichen Sexualhormonen zu einer Erhöhung des Risikos für Brustkrebs und kardiovaskuläre Erkrankungen geführt hat (Rossouw et al. 2002, Manson et al. 2003). Seit dem Verzicht auf eine HRT haben sich andere Medikamente in der Therapie von Osteoporose und Prophylaxe von Frakturen etablieren können. Therapeutika mit antiresorptiven Ansätzen nehmen v.a. Einfluss auf die Aktivität von Osteoklasten. Hier kommen hauptsächlich die Bisphosphonate zum Einsatz (Vokes und Favus 2010). Ihre Wirkung beruht auf dem inhibierenden Einfluss auf intrazelluläre Signalkaskaden der Osteoklasten, die beispielsweise für das Zellüberleben und den Proteinaustausch zuständig sind (Hofbauer und Schoppet 2010). Weitere antiresorptive Therapeutika sind die Selektiven Östrogen (Estrogen) Rezeptor Modulatoren (SERM), die je nach Östrogenrezeptor einen stimulierenden oder inhibierenden Einfluss haben. Ein Beispiel ist das Raloxifen, das als Agonist im Knochensystem den Knochenabbau verringert, gleichzeitig antagonistisch an Östrogenrezeptoren der Mamma und neutral an denen des Uterus wirkt (Delmas et al. 1997). Seit wenigen Jahren stellt Denosumab, ein humaner Antikörper gegen RANKL, eine risikoarme, antiresorptive Therapiealternative dar. Mit dieser gezielten Therapie kann eine Erhöhung der Knochendichte und eine Senkung der Frakturrate erreicht werden (Cummings et al. 2009). Eine weitere Möglichkeit zur Therapie von Osteoporose ist die Applikation von Kalzitinin oder PTH, das bei pulsatiler Zuführung einen anabolischen Effekt am Knochen hat (Bilezikian et al. 2009).

Jedoch nimmt keines der oben genannten Medikamente Einfluss auf den Zusammenhang zwischen Osteoporose und dem Metabolischen Syndrom.

1.2 Knochen

Der Knochen, bzw. das Knochengewebe ist ein multifunktionelles Organ. Durch seine mechanische Festigkeit gegenüber Zug und Druck ist es ein wichtiger Bestandteil des Bewegungs- und Stützsystems und dient darüber hinaus anderen Organen, wie z.B. dem Gehirn, als Schutzkörper. Des Weiteren nimmt das Knochengewebe wichtige endokrine Funktionen, wie die der Kalziumspeicherung, wahr. Als Ort der Hämatopoese dient das Knochenmark der Bildung von Blutzellen. Hier befinden sich die pluripotenten Stammzellen, die für einen ständigen Nachschub von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten sorgen.

1.2.1 Aufbau des Knochens

Die vielfältigen spezifischen Eigenschaften des Knochengewebes beruhen v.a. auf der Zusammensetzung der Knochenmatrix. Insgesamt besteht die Knochenmatrix zu ca. 65 Prozent aus anorganischen Salzen und zu ca. 35 Prozent aus organischem Material. Dabei setzen sich die organischen Bestandteile zu ca. 90 Prozent aus Kollagen Typ I zusammen. Die Verkalkung der Knochenmatrix und die Einlagerungen von anorganischem Hydroxylapatit ermöglichen eine hohe Druck- und Zugfestigkeit bei gleichzeitiger Torsions- und Biegebeanspruchung (Sobotta und Welsch 2006). Um diese Flexibilität aufrechtzuerhalten, ohne zu Frakturieren, ist ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren nötig. Zum einen die Zusammensetzung des Knochenmaterials und zum anderen der Knochenaufbau. Makroskopisch lassen sich die langen Röhrenknochen, zu denen auch die in der vorliegenden Dissertation untersuchten Tibiae der Ratten gehören, in eine Diaphyse und in jeweils zwei gelenknahe Metaphysen und Epiphysen unterteilen. Während des Längenwachstums befindet sich zwischen Epi- und Metaphyse die Epiphysenfuge. Hier ist der für das Längenwachstum wichtige Epiphysenknorpel lokalisiert, der durch alkalisches Milieu verkalkt und dadurch eine wichtige Grundlage für die Matrix des Knochens bildet (Sobotta und Welsch 2006). Der Knorpel wird durch Chondrozyten gebildet, die sich in der Epiphysenfuge charakteristisch in drei verschiedenen Zonen darstellen. Zum einem die ruhenden Chondroblasten der Reservezone und zum anderen die aktiven bzw. hypertrophen Chondroblasten der Proliferations- und der Hypertrophiezone (Nilsson et al. 2005). Die hypertrophen Zellen bewirken eine Kalzifikation und eine Stimulation von Knochenvorläuferzellen, sodass neuer

Knochen gebildet werden kann (Nilsson et al. 2005). Beim Menschen verknöchert die Epiphysenfuge mit dem Abschluss des Längenwachstums, während sie beim Knochen der Ratte zum Teil ein Leben lang erhalten bleibt (Levolas 2008). Des Weiteren findet man Knorpel an den Gelenkoberflächen von Knochen. Dieser sorgt für eine glatte Oberfläche, die elastisch verformbar ist und für eine stabile Gelenkoberfläche (Sobotta und Welsch 2006). Sowohl der Knorpel der Epiphysenfuge als auch der Gelenkknorpel sind durch Östrogene regulierbar (Nilsson et al. 1999, Karsdal et al. 2012). Außen dem Knochen aufliegend befindet sich das einzige sensibel innervierte Kompartiment des Knochens, das Periost. Sein Erhalt hat bei Knochenbrüchen einen wichtigen Stellenwert, da das Periost in der Lage ist, neuen Knochen zu bilden (Uchida et al. 1988). Innerhalb des Knochengewebes kann man die außen anliegende Kortikalis und die im Inneren liegende Spongiosa (Knochentrabekel) unterscheiden. Die Spongiosa bildet ein mineralisiertes, trabekuläres Netzwerk und beinhaltet das Knochenmark. Die Knochentrabekel sind parallel zu der größten Druckbeanspruchung ausgerichtet und tragen wesentlich zur

Leichtbauweise des Knochens bei (Sobotta und Welsch 2006). Die histologische Struktur von Kortikalis und trabekulärer Spongiosa ist die gleiche und wird durch Osteone und Lamellensysteme charakterisiert (Abb. 1). Diese Lamellensysteme verlaufen konzentrisch um zahlreiche Blutgefäße des Knochens und bilden sogenannte Osteone. Im Zentrum der Osteone befindet sich der Havers-Kanal mit arteriellen und venösen Gefäßen. Innerhalb

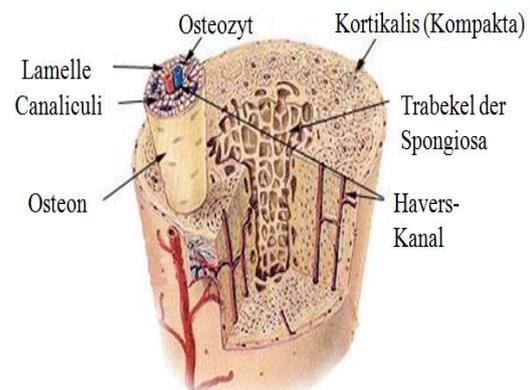


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Knochenaufbaus

Aus National Cancer Institute 2012 (modifiziert)

der Lamellen unterscheidet man Schaltlamellen, die Reste abgebauter Osteone darstellen, sowie Generallamellen, die das Knochengewebe zur Spongiosa und nach außen zum Periost hin abgrenzen. In den Markhöhlen zwischen dem trabekulären Netzwerk der Spongiosa befindet sich das Knochenmark. Dieses lässt sich in ein blutzellbildendes rotes Knochenmark und ein gelbes Knochenmark, das Fettgewebe, unterteilen (Sobotta und Welsch 2006).

Im Knochen werden drei spezifische Zelltypen unterschieden, die für die ständigen Umbauprozesse des Knochens verantwortlich sind.

1.2.2 Osteoblasten

Osteoblasten sind Zellen, die sich auf die Produktion von Proteinen der Knochenmatrix spezialisiert haben. Sie besitzen eine kubische bis prismatische Form und sind über mehrere Nexus miteinander verbunden. Osteoblasten sezernieren Kollagene, Proteoglykane und andere wichtige Bestandteile des Knochens. Ihr Produkt ist eine noch nicht verkalkte Matrix, das Osteoid (Sobotta und Welsch 2006). Für die Regulation des Knochenstoffwechsels besitzen Osteoblasten Rezeptoren für Hormone, Vitamine und für eine Vielzahl von Zytokinen. So beeinflussen Sexualhormone, PTH, VitD oder auch Glukokortikoide die Aktivität der Osteoblasten und regulieren so den Knochenmetabolismus (Hofbauer und Schoppet 2010). Osteoblasten können sowohl parakrin als auch autokrin Wachstumsfaktoren sezernieren und nehmen darüber nicht nur einen wichtigen Stellenwert im Aufbau, sondern auch im Abbau des Knochens ein (Roodman 1993, Hofbauer und Schoppet 2010).

1.2.3 Osteozyten

Osteozyten sind komplett von der Matrix umschlossene, morphologisch veränderte Osteoblasten. Sie liegen in Lakunen und bilden über Zell-Zell-Kontakte (*gap junctions*) an ihren langen, in Canaliculi liegenden Fortsätzen, ein sensorisches Netzwerk (Sobotta und Welsch 2006). Ihren funktionellen Stellenwert demonstrieren Osteozyten-depletierte Knockout-Mäuse, die sehr rasch Osteoporose entwickeln (Tatsumi et al. 2007). Durch ihre Mechanosensibilität registrieren Osteozyten Krafteinwirkungen auf den Knochen und koordinieren über die Aktivierung und Inhibierung von Osteoblasten den Knochenumbau (Chan et al. 2009, Hofbauer und Schoppet 2010).

1.2.4 Osteoklasten

Die Funktion der Knochenresorption übernehmen mehrkernige Riesenzellen, die Osteoklasten. Im Knochenmark gebildete Monozyten sind ihre Vorläuferzellen. Ihre Aktivität wird über Zytokine, Hormone und andere Stoffe beeinflusst. So stimulieren Östrogene aus dem Blutkreislauf oder Zytokine der Osteoblasten die Aktivität der Osteoklasten, während z.B. das aus der Schilddrüse sezernierte Kalzitinin einen inhibierenden Einfluss hat (Hofbauer und Schoppet 2010). Nach der Aktivierung und chemotaktischen Prozessen heften sich die Osteoklasten über Podosomen und Integrinen an die Knochenmatrix an und bilden einen sogenannten Faltsaum (*ruffled border*). Osteoklasten besitzen eine Protonenpumpe, eine vakuolische ATPase sowie Chlorid-Kanäle, um Salzsäure in dem Faltsaum zu

produzieren. Dadurch entsteht ein saures Milieu mit einem pH-Wert von ungefähr 4,5. Dies sind die Voraussetzungen, um eine optimale Aktivität für die von den Osteoklasten sezernierten Hydrolasen zu gewährleisten. Sie sorgen letztendlich für den Abbau der Matrix (Hofbauer und Schoppet 2010).

1.2.5 Knochenstoffwechsel

Das Knochengewebe befindet sich, um den stetig wechselnden Ansprüchen durch Belastungen gerecht zu werden, lebenslang in ständigen Umbauprozessen. Diese Umbauprozesse werden über mechanische Reize stimuliert und in Einklang mit metabolischen Anforderungen, wie z.B. den des Serum-Kalziumspiegels, gebracht. Voraussetzungen für diese Prozesse sind die oben beschriebenen Zellen, die über Zytokine vermittelten Interaktionen und weitere Prozesse.

Eines dieser Zytokine, Mitglied der Tumornekrosesuperfamilie (TNFSF11), ist der *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL). Dieser Ligand wird von Osteoblasten exprimiert. Bindet RANKL den von den Osteoklasten exprimierten *Receptor Activator of NF- κ B* (RANK), wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt und die Knochenresorption gefördert (Lee und Lorenzo 2006). Osteoklasten und ihre Vorläuferzellen beginnen sich zu aktivieren, zu proliferieren, zu differenzieren und vor Apoptose zu schützen (Hofbauer und Schoppet 2010). Gegenspieler des RANKL ist das Osteoprotegerin (OPG), ein weiterer Tumornekrosefaktor, der über eine kompetitive Hemmung RANKL inhibiert. OPG wird wie RANKL von den Osteoblasten gebildet. Die Aktivität von RANK ist demnach abhängig vom Verhältnis von OPG zu RANKL (Hofbauer und Schoppet 2010). Einfluss auf dieses System nehmen z.B. die Östrogene, die die Bildung von RANKL in den Osteoblasten hemmen und synchron die Bildung von OPG fördern. Im Gegensatz dazu steht z.B. das PTH, das die Bildung von RANKL induziert (Hofbauer und Schoppet 2010). Des Weiteren wird die Knochenresorption der Osteoklasten auch über andere Zytokine aktiviert. Zu diesen Stoffen gehören verschiedene Interleukine, TNF- α und TNF- β sowie Interferone (Hofbauer und Schoppet 2010).

Ein wichtiger Signalübertragungsweg bei der Aktivierung von Osteoblasten ist der sogenannte *Wnt-Signalling-pathway*. Bei Anwesenheit von Wnt-Liganden kommt es bei diesem Signalweg zur intrazellulären Stabilisierung von β -Catenin. Dies führt zu Signaltransduktionen und zu vermehrten Knochenumbauprozessen (Williams und Insogna 2009, Hofbauer und Schoppet 2010). Bei der Abwesenheit von Liganden kommt es zur

Phosphorylierung und Abbau von β -Catenin und zur Inhibition der Osteoblasten. Inhibiert wird dieses System beispielsweise durch Sclerostin, das von Osteozyten gebildet wird und den Knochenumbau verhindert. Bei mechanischer Beanspruchung des Knochengewebes, oder bei einem hohen Serumspiegel von PTH, wird Sclerostin vermindert ausgeschüttet und Knochenumbauprozesse werden gefördert (Poole et al. 2005, Hofbauer und Schoppet 2010).

Im gesunden menschlichen Organismus besteht ein feinjustiertes Gleichgewicht zwischen den oben genannten und weiteren Signalübertragungswegen, die den Anforderungen des Körpers gerecht werden müssen. Es entsteht ein ständiger Knochenumbau durch eine Balance aus Knochenresorption und Knochenaufbau. Ist diese Balance wie z.B. im Rahmen der Osteoporose gestört, kommt es zu einem Verlust der Knochendichte und einem damit einhergehenden erhöhten Risiko für Frakturen.

1.2.6 Knochenmarker

Um den Knochenumsatz im Organismus zu quantifizieren können verschiedene Serumparameter bestimmt werden. Zu unterscheiden sind Marker, die für den Knochenaufbau kennzeichnend sind, und Marker, die für den Knochenabbau kennzeichnend sind. Beschreibend für den Knochenaufbau ist z.B. das Osteokalzin, ein Hydroxylapatit-bindendes Protein, das von Osteoblasten sezerniert wird. Im Gegensatz dazu stehen die sogenannten *Cross-Laps/Cross-Links* bzw. die *Rat-Laps* der Ratten, die Abbauprodukte der Kollagene des Knochens sind und somit Marker für die Knochenresorption darstellen (Delmas et al. 2000).

1.2.7 Knochenqualität

Die Qualität des Knochens ist abgestimmt auf die Anforderungen des Körpers. Auf der einen Seite soll eine Stabilität gewährleistet sein, die wechselnden Krafteinwirkungen standhält. Auf der anderen Seite muss eine Leichtbauweise vorhanden sein, die dem Körper die Möglichkeit bietet, kraftsparende und schnelle Bewegungen auszuführen. Um dieser Anforderung gerecht zu werden, liegt eine Variabilität der Dichte der reinen Knochensubstanz vor. Je höher dabei die Dichte, desto höher die Stabilität auf Kosten der Flexibilität (Seeman 2008). So besteht ein Gleichgewicht zwischen außen liegender starrer Kortikalis und innen anliegendem trabekulären Knochen. Ihr Verhältnis nimmt Einfluss auf die Stabilität sowie Flexibilität und ist abhängig von den Kräften, die auf bestimmte Areale des Knochens wirken. An der Diaphyse langer Röhrenknochen findet sich aufgrund der hohen Biegekräfte eine breitere Kortikalis (Kompakta), die es erlaubt, hohe Krafteinwirkungen direkt auf den Schaft

des Knochens zu tolerieren. Im Gegensatz dazu befindet sich bei höheren Kompressionskräften an der Meta- und Epiphyse eine im Verhältnis zur Spongiosa deutlich dünnere Kortikalis (Seeman 2008).

Zudem ist die Qualität des Knochens als Teil des komplexen Bewegungssystems von weiteren Komponenten abhängig. Eine erhöhte Muskelmasse bzw. eine erhöhte Muskelkraft ist, unabhängig von sonstiger Körperkontribution, assoziiert mit einer verstärkten Knochendichte (Burr 1997). Grund dafür ist eine mechanische Reizung durch Muskelbeanspruchungen (Bitsakos et al. 2005). Übergewicht wurde aufgrund des vermehrten mechanischen Reizes auf den Knochen ebenfalls als ein Faktor angenommen, der die Qualität des Knochens schützt (Albala et al. 1996). Zhao et al. (2007) konnten jedoch zeigen, dass sich die Beziehung zwischen Übergewicht und Knochenqualität umkehrt, wenn die mechanische Reizung als statistische Variable vernachlässigt wird, sodass Übergewicht mittlerweile als ein Risikofaktor für schlechte Knochenqualität angenommen wird (Hsu et al. 2006, Zhao et al. 2008, Russel et al. 2010). Ein weiterer Faktor ist die Beschaffenheit und Breite des Knorpels. Hier spielt zum einen der Gelenkknorpel und zum anderen der epiphysiale Knorpel der Epiphysenfuge eine Rolle. Cicuttini et al. (2004) zeigten eine positive Korrelation zwischen der Breite des Knorpels des Kniegelenks und der Knochendichte der Tibia. Des Weiteren konnte in einem tierexperimentellen Versuch an Mäusen gezeigt werden, dass eine mechanische Beanspruchung des Gelenkknorpels für eine Stimulation des Knochenumbaus sorgt (Zhang et al. 2006). Bei dem Knorpel der Epiphysenfuge handelt es sich um eine in verschiedenen Reihen angeordnete Ansammlung von Chondrozyten, deren Hypertrophie eine Kalzifikation und eine Stimulation von Osteoprogenitorzellen bewirkt und so das Längenwachstum und die Knochenqualität fördert (Nilsson et al. 2005). Dies ist jedoch ein Prozess, der nur bei Kindern und juvenilen Erwachsenen möglich ist. Im Erwachsenenalter ist die Epiphysenfuge verknöchert und ein Längenwachstum nicht mehr möglich.

So zeichnet sich die Qualität des Knochens durch ein Zusammenwirken von intra- und extraossären Faktoren aus, die unter Berücksichtigung mechanischer, biochemischer und endokriner Anforderungen gegenseitig Einfluss aufeinander nehmen und in einer Abhängigkeit zueinander stehen. Ist einer der Faktoren gestört, nimmt die Qualität des Knochens in seiner Gesamtheit ab.

1.3 Testsubstanzen

1.3.1 Ecdysteroide und Ecdyson

Ecdysteroide gehören zu den Hormonen von Insekten. Als biochemischer Botenstoff übernehmen sie spezifische regulatorische Funktionen. Das am meisten untersuchte und bekannteste Ecdysteroid ist das von Butenandt und Karlson 1954 erstmals isolierte 20-Hydroxy-Ecdyson (β -Ecdyson = Ecd). Ecd ist beispielsweise beim Schmetterling für die Metamorphose vom Larvenstadium über die Verpuppung bis hin zum Vollinsekt verantwortlich (Karlson 1968). Ein relativ weit verbreitetes natürliches Angebot von Ecd gibt es auch in Pflanzen, wie z.B. in Spinat. Dort dient Ecd als Schutz vor pflanzenfressenden Insekten (Dinan 2001). Wirkungen auf Säugetiere und speziell den menschlichen Organismus sind aufgrund des natürlichen Vorkommens von Ecdysteroiden und der chemischen Ähnlichkeit zu humanen Steroiden Gegenstand verschiedener Forschungsarbeiten geworden. Einer der ersten pharmakologischen Effekte von Ecdysteroiden wurde 1969 von Otaka et al. beschrieben. Sie konnten einen stimulierenden Effekt auf die Proteinsynthese der Leber von Mäusen zeigen. Später wurden Auswirkungen von Ecd auf die Regeneration von Lebergewebe bei Ratten festgestellt (Syrov et al. 1992). Bezüglich der Wirkungen von Ecdysteroiden auf den Lipid- und Glukosestoffwechsel konnte eine Senkung des Cholesterinspiegels (Mironova et al. 1982) und ein antidiabetischer Effekt im Sinne einer Senkung des Blutzuckerspiegels (Yoshida et al. 1971) in tierexperimentellen Versuchen nachgewiesen werden. Ferner konnten weitere spezifische Wirkungen von Ecdysteroiden bzw. Ecd gezeigt werden. V.a. ist ein anaboler Effekt auf die Muskelmasse in den Vordergrund gerückt (Chermnykh et al. 1988). Dabei förderte Ecd auch ohne konstantes Training den Muskelaufbau von Ratten. Einige Bodybuilder nutzen diesen anabolen Effekt und nehmen ecdysonhaltige Muskelaufbaupräparate ein (Dinan und Lafont 2006). Einfluss nimmt Ecd zudem auf die Nieren, indem es nach Applikation von nephrotoxischen Präparaten bei Ratten eine physiologische glomeruläre Filtrationsrate induziert und eine Albuminurie unterdrückt (Syrov und Khushbaktova 2001).

Aufgrund der beschriebenen und weiteren Wirkungen auf Organe wie Gehirn, Haut, Leber, Mamma, Muskel und Niere haben Ecdysteroide und speziell das Ecd einen gewissen Stellenwert in traditioneller und homöopathischer Medizin eingenommen. Ebenso finden sie sich in Nahrungsergänzungsmitteln und in kosmetischen Produkten wieder (Báthori und Kalász 2001, Dinan und Lafont 2006).

In den Forschungsprojekten der Arbeitsgruppe Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen konnten zudem knochenprotektive Effekte und Einflüsse auf metabolische Prozesse in tierexperimentellen Versuchen an Ratten nachgewiesen werden (Kapur et al 2010, Seidlová-Wuttke et al. 2010 a/b). Kapur et al. (2010) beschrieben einen positiven Effekt von Ecd auf das epiphysäre Knorpelgewebe, den Gelenkknorpel und den prozentualen Anteil von trabekulären Knochen bei ovariectomierten (ovx) Ratten. Ebenso konnte ein knochenprotektiver Effekt im Zusammenhang mit postmenopausalen osteoporotischen Veränderungen dargestellt werden. Per qCT und über Marker des Knochenstoffwechsels wurde gezeigt, dass ein Verlust der Knochendichte durch die Behandlung mit Ecd abgemildert wurde (Seidlová-Wuttke et al. 2010 a). Des Weiteren konnten Interaktionen von Ecd mit metabolischen Prozessen nachgewiesen werden. In ovx-Ratten wurde nach dreimonatiger Gabe von Ecd eine Reduzierung von klinischen Symptomen des Metabolischen Syndroms erreicht. So konnte signifikant eine intraabdominelle Fettreduzierung, ein Muskelaufbau sowie eine Senkung von Serum-LDL, Serum-Cholesterin und Serum-Leptin erreicht werden (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b).

Die Mechanismen von diesen und anderen Effekten konnten jedoch bislang nicht detektiert werden. Ein Rezeptor für Ecd, wie er bei Insekten vorkommt, wurde nicht nachgewiesen und zunächst eine Wirkung über die Östrogenrezeptoren vermutet. Dies konnte jedoch durch Immunoassays ausgeschlossen werden (Seidlová-Wuttke et al. 2010 a). In den Fokus gerückt ist nun eine Interaktion mit nukleären Rezeptoren wie dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR). In Insekten agiert Ecd über die Bindung an einem Ecdysteroid-Rezeptor (EcR). Ähnlich dem Vitamin-D-Rezeptor (VDR) folgt anschließend eine Dimerisation mit dem RXR (Dinan und Lafont 2006). So könnten antiosteoporotische und metabolische Wirkungen an Säugetieren über transkriptionelle Effekte mit den RXR und der darauffolgenden Dimerisation mit dem VDR oder den Isoformen der *Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptors* (PPARs) erklärt werden. So stellt sich zum einem die Frage, ob der Ligand-Rezeptorkomplex Ecd/RXR über eine Dimerisation mit dem VitD/VDR-Komplex in der Kombinationstherapie die Wirkungen einer VitD-Monotherapie steigern könnte. Dabei würden die gebildeten Heterodimere als Transkriptionsfaktoren über die Bindung an spezifische Promoterelemente (*Hormone-Responsive-Elements*, HRE) für eine Genexpression oder Hemmung der Expression sorgen und so ihre individuellen oder gemeinsamen Effekte erzielen (Rassow et al. 2008). Zum Anderen stellt sich die Frage, ob Ecd eventuell direkt über den VDR transkriptionelle Effekte erzielt und ob dieser Wirkungsmechanismus möglicherweise die Wirkungen von VitD

imitieren bzw. übertreffen kann. Eine weitere Rolle könnte dabei die Dimerisation mit den PPARs spielen, die Einflüsse auf metabolische Prozesse wie den Glukose- und Fettstoffwechsel nehmen (Michalik et al. 2006, Shulman und Mangelsdorf 2005). Nachgewiesen werden konnten die Interaktionen von Ecd und dem RXR bzw. dem VDR und den PPARs in Säugetieren bislang noch nicht, sodass es sich weiterhin um eine Hypothese handelt.

Nichts desto trotz sind die Wirkungen von Ecdysteroiden auf die Homöostase von Knochen und den Energiehaushalt durch tierexperimentelle Versuche belegt und aufgrund der Zusammenhänge des Metabolischen Syndroms mit osteoporotischen Knochenveränderungen in den Fokus der Arbeitsgruppe Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen gerückt. Positiv zu bemerken ist zudem, dass Nebenwirkungen erst bei sehr hohen Dosen auftreten und Ecd insgesamt als sehr gut verträglich eingestuft werden kann (Slàma und Lafont 1995). So wird intensiv geprüft, ob Ecd pharmakologische Ansätze zur Prävention und Therapie von Osteoporose und dem Metabolischen Syndrom liefern kann. Um die Wirkungen auf die Qualität des Knochens als Teil des Bewegungssystems darzustellen, wurden Messungen an der Spongiosa, dem Knochenmark, der Kortikalis, dem Knorpel und Serumanalysen an Ratten durchgeführt. Des Weiteren wurden aufgrund der vermuteten Interaktion von Ecd mit dem RXR, oder dem VDR in dem vorliegenden Experiment die Wirkungen von Ecd mit denen von VitD verglichen.

1.3.2 Vitamin-D-Hormon

Das Steroidhormon Vitamin D (VitD), auch Cholecalciferol genannt, hat einen wichtigen Stellenwert in der Kalziumhomöostase. Es hat unter anderem die Aufgabe, einen konstanten Kalzium-Serum-Spiegel aufrechtzuerhalten, und nimmt gleichzeitig weitere wichtige Funktionen im Knochenmetabolismus wahr. Es besitzt selbst keine biologische Aktivität, sodass es über zwei Hydroxylierungen in die aktive Form gebracht werden muss. Die Aktivierung erfolgt zuerst in der Leber und dann in der Niere, wobei der zweite Schritt durch das PTH stimuliert wird (DeLuca 2004). Das gebildete aktive Calcitriol (1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol) wiederum inhibiert, als Ausdruck eines negativen Feedbacks, die Ausschüttung von PTH aus der Nebenschilddrüse.

Einfluss auf die Kalziumhomöostase nimmt das aktive VitD über die Bindung mit dem VDR. Dieser Ligand-Rezeptorkomplex dimerisiert mit nukleären RXR, und es kommt zu einer Stimulierung der intestinalen Absorption und der renalen Resorption von Kalzium, sodass der Kalziumspiegel physiologisch konstant gehalten wird. Gleichzeitig aktiviert Calcitriol die

Osteoblasten und stimuliert die Bildung von RANKL, sodass im Einklang mit dem Kalziumspiegel ein Fließgleichgewicht zwischen Auf- und Abbau des Knochens entsteht (DeLuca 2004). In einer Studie mit über 13.000 Probanden konnten Bischoff-Ferrari et al. (2004) zeigen, dass eine positive Korrelation zwischen dem VitD-Status und der Knochendichte vorliegt. Andere klinische Studien zeigten, dass ein Mangel an VitD die Entstehung von Osteoporose unterstützt (Holick 2007). Dabei kommt es durch die fehlende negative Rückkopplung und dem meist zu niedrigen Kalziumspiegel im Blut zu einer vermehrten Ausschüttung von PTH und zur Entstehung eines sekundären Hyperparathyreoidismus, der wiederum in einer negativen Knochenbilanz resultiert (Holick 2007). So ist die Gabe von VitD, wie die von Kalzium, bei der Behandlung und Prävention von Osteoporose mittlerweile Standard (DVO 2009, NOF 2010). Bezüglich der Wirkungen im Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom konnte in einer klinischen Studie gezeigt werden, dass ein Mangel an VitD mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Metabolischen Syndroms assoziiert ist (Chiu et al. 2004). Ford et al. (2005) kamen bei einer Studie mit 8421 Probanden auf das gleiche Ergebnis und konnten eine Korrelation zwischen einem VitD-Mangel und einer Resistenz gegenüber Insulin sowie einem vermehrten Auftreten von Übergewicht zeigen. Die Effekte könnten dabei zum Teil über eine Interaktion des VitD/VDR-Komplexes mit den nukleären PPARs erklärt werden. Diese PPARs sind in der Lage, über die Dimerisation mit dem RXR, dem VDR oder anderen Dimerisationspartnern Einfluss auf den Zucker- und Fettstoffwechsel zu nehmen (Shulman und Mangelsdorf 2005, Kong und Li 2006, Michalik et al. 2006). Beispielsweise konnten Kong und Li (2006) in experimentellen Versuchen mit Adipozyten zeigen, dass VitD in der Lage war, über die Blockade des PPAR γ die Adipoginase zu hemmen. Jedoch sind weitere pathophysiologische Mechanismen eines Mangels von VitD in Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom noch nicht detailliert bekannt. Es scheint dennoch möglich, dass es auch hier eine Verknüpfung zwischen einem VitD-Mangel, dem Metabolischen Syndrom und der Entstehung von Osteoporose geben könnte. So soll in dem vorliegendem Experiment zum einem der Vergleich zu Ecd gezogen werden und zum anderen der Zusammenhang zwischen direkten Wirkungen von VitD auf den Knochen und möglichen indirekten Wirkungen über die Interaktion mit dem Energiehaushalt dargestellt werden.

1.4 Zielsetzung

Im Jahre 2020 werden in Deutschland schätzungsweise 640.000 Frauen und somit eine noch nie da gewesene Anzahl von Frauen in die Menopause kommen (vgl. Abb. 32 im Anhang). Zusätzlich steigt aufgrund von schlechter Ernährung und Bewegungsmangel dramatisch die Prävalenz des Metabolischen Syndroms. Eine Kombination, die das Risiko und die Inzidenz der Frauen, an Osteoporose zu erkranken, deutlich steigen lassen wird. Gerade das Voranschreiten des Metabolischen Syndroms rückt dabei in das Zentrum des Interesses. Hierbei kommt es zu einem lipotoxischen Effekt auf den Knochen, sodass von einem Metabolischen Syndrom des Knochens gesprochen werden kann.

Der Ergebnisse der vorliegenden Dissertation dienen dazu, einen möglichen phyto-pharmakologischen Ansatz für die Prophylaxe bzw. die Therapie des Metabolischen Syndroms des Knochens zu finden. Explizit geht es um die Wirkung von Ecd und VitD auf den postmenopausalen, osteoporotischen Knochen in Zusammenhang mit metabolischen Prozessen. Aufgrund von knochenmorphologischen, biochemischen und vergleichbaren osteoporotischen Veränderung des Knochens der Ratte nach Verlust von weiblichen Sexualhormonen im Vergleich zum menschlichen Knochen wurde die ovx-Ratte als Modell für dieses Experiment gewählt (Turner et al. 2001). Der Grund für die Auswahl der Testsubstanzen war zum einem, dass beide Substanzen in früheren Studien einen positiven Effekt auf den Knochen und parallel positive Einflüsse auf das Metabolische Syndrom gezeigt haben und zum anderem die Hypothese, dass es möglicherweise einen ähnlichen Wirkungsmechanismus von Ecd und VitD geben könnte. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob Ecd in der Lage ist, die allgemein anerkannten Wirkungen von VitD zu erreichen, zu imitieren, oder sogar zu übertreffen. Um die Vergleiche zwischen Ecd und VitD zu objektivieren, wurden Monotherapiegruppen, eine Kombinationstherapiegruppe sowie Kontrollgruppen erstellt. Dafür musste auf das in den letzten Jahren genutzte und bewährte Basisfutter der Arbeitsgruppe Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen verzichtet werden. So wurden für den Tierversuch der vorliegenden Arbeit zwei neue Basisfutter erstellt, sodass ein VitD-haltiges und ein VitD-freies Futter mit äquivalenten Nahrungsbestandteilen vorlagen. Gleichzeitig sollten dabei Informationen über das notwendig gewordene neue milchprotein- und energiereichere Futter gesammelt werden. Als Therapieerfolgskontrolle dienten zwei mit Östrogenen gefütterte Positivkontrollgruppen, eine Positivkontrollgruppe mit intakten Ovarien und eine Negativkontrollgruppe, die ausschließlich VitD-freies Basisfutter bekam. Die Tiere wurden in Futtergruppen aufgeteilt und für drei Monaten mit den

Substanzen gefüttert. Anschließend wurden histologische Präparate aus den Tibiae der Ratten hergestellt sowie Serumparameter des Knochenstoffwechsels und des Energiehaushalts untersucht. Die Diagnostik der Tibia erfolgte histomorphometrisch, um detaillierte Angaben über die Ultrastruktur und den Vernetzungsgrad der Spongiosa sowie über die strukturelle und prozentuale Verteilung der Spongiosa, des roten Knochenmarks und des Fettgewebes machen zu können. Zusätzlich war es dadurch möglich, die Qualität des Knochens als komplexen Apparat des Bewegungssystems zu betrachten, indem Aussagen über die intraossäre Verfettung, den Gelenkknorpel, die Kortikalis und die Epiphysenfuge gemacht werden konnten. Anhand der Ergebnisse sollen Aussagen über den Zusammenhang von metabolischen und osteoporotischen Veränderungen sowie der potenziellen Wirkungen der Testsubstanzen gemacht werden. Diese potenziellen Wirkungen könnten eine Therapiealternative bzw. -unterstützung bei der Prävention und/oder Behandlung von Osteoporose in Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom bzw. dem Metabolischen Syndrom des Knochens in Aussicht stellen.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau und -Ablauf

Um Erkenntnisse über die Wirkungen von Ecd und VitD auf den postmenopausalen Knochen im Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom erlangen zu können, wurden in der Arbeitsgruppe Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen Tierversuche an Ratten durchgeführt. Diese vom 16.03.2010 bis zum 08.07.2010 stattgefundenen Tierversuche wurden von der Bezirksregierung Braunschweig unter dem Aktenzeichen 33.11.42504-04-043/08 genehmigt und unter der Aufsicht von PD Dr. med. Seidlová-Wuttke durchgeführt. Aus den Ratten wurden histologische Präparate hergestellt. Ohne an den Tierversuchen direkt beteiligt gewesen zu sein, bestand die Aufgabe des Verfassers der vorliegenden Dissertation ausschließlich in der histologischen Auswertung und Interpretation der Präparate.

Bei den im Experiment verwendeten Tieren handelte es sich um drei Monate alte Sprague-Dawley-Ratten (Fa. Harlan-Winkelmann, Borcheln). Die Tiere wurden bei 22 bis 26 °C Raumtemperatur, freier Wasser- und Futtermittelverfügung und täglicher Beleuchtung von 6 Uhr morgens bis 18 Uhr abends zu jeweils fünf Tieren pro Käfig (Makrolon-Käfig Typ IV, Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg) gehalten. Die Tiere wurden nach ihrer Ankunft gewogen und anhand ihres Körpergewichts in sieben verschiedene Gruppen eingeteilt, sodass im Mittel das Gewicht der gebildeten Gruppen ungefähr übereinstimmte. Initial lag das Gewicht der Ratten zwischen 245,6 g und 294,09 g. Insgesamt ergaben sich so sechs Gruppen bestehend aus jeweils zehn Tieren und eine Gruppe bestehend aus sieben Tieren. Um bestmögliche Aussagen über die Wirkungen der Testsubstanzen im Einzelnen und im Vergleich zu den anderen Substanzen machen zu können, wurden die sieben Gruppen, wie in Tab. 2 dargestellt, verschiedenen Basisfuttermitteln und Substanzen zugeordnet. So wurden Gruppen gebildet, bei denen VitD und Ecd jeweils als Monotherapie (Ovx +VitD; Oxv Ecd - VitD) oder als Kombination (Ovx Ecd +VitD) im Futter angeboten wurden. Als Referenz für die Auswirkungen der Oxv auf die Ratten ohne Therapie wurde eine Gruppe ohne Zusatzsubstanzen (Ovx -VitD) erstellt. Um die Wirkungen im Vergleich zu den nicht-ovx-Ratten erhalten zu können, wurde zudem eine Gruppe mit sieben nicht-ovx-Tieren (Intakt +VitD) erstellt. Zur Darstellung der Effektivität der Therapie von VitD und Ecd im Vergleich zu einer nachgewiesenen wirksamen Therapie wurden als Gruppen eine HRT mit Estradiolbenzoat (E2) plus VitD (Ovx E2 +VitD) und ohne VitD (Ovx E2 -VitD) erstellt.

Alle Substanzen wurden dabei als Bestandteil des Basisfutters oder durch Beimischung in das Basisfutter zur peroralen Applikation angeboten. Als Basisfuttermittel diente zum einem ein VitD-haltiges und zum anderem ein VitD-freies Futter. Beide Futtermittel wurden von Ssniff Spezialdiäten GmbH in Soest hergestellt und entweder als reines Basisfuttermittel, gemischt mit Ecd (Changzhou Dahua Corporation, China) und Spinat (Iglo GmbH, Hamburg), oder mit E2 (Sigma-Aldrich, USA) geliefert. Der Anteil von Ecd im Spinat lag bei 0,5 Prozent. Eine genaue Zusammensetzung der Basisfuttermittel kann der Tab. 6 und 7 des Anhangs entnommen werden.

Gruppe	Basisfutter	Substanzen [Pro Kg Futter]	Mittleres Gewicht [in Gramm]	Anzahl der Tiere
Intakt +VitD	Ssniff EF R/M Kontrolle	1.500 IE VitD	263,35 g	n = 7
Ovx -VitD	Ssniff EF R/M VitD-Def	Keine	266,60 g	n = 10
Ovx +VitD	Ssniff EF R/M Kontrolle	1.500 IE VitD	272,08 g	n = 10
Ovx Ecd -VitD	Ssniff EF R/M VitD-Def	1g Spinatpulver, 3g Ecd	271,18 g	n = 10
Ovx E2 -VitD	Ssniff EF R/M VitD-Def	10 mg E2	264,32 g	n = 10
Ovx Ecd +VitD	Ssniff EF R/M Kontrolle	1g Spinatpulver, 3g Ecd, 1.500 IE VitD	262,15 g	n = 10
Ovx E2 +VitD	Ssniff EF R/M Kontrolle	10 mg E2, 1.500 IE VitD	270,71 g	n = 10

Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen Futtergruppen

Explizite Angaben bezüglich der einzelnen Zusammensetzungen der Basisfutter können der Tab. 6 und 7 des Anhangs entnommen werden.

E2 = Estradiolbenzoat; Ecd = Ecdyson; ovx = ovariectomiert; +VitD = Vitamin D-haltiges Futter; -VitD = Vitamin D-armes Futter.

Um die Wiedererkennung der einzelnen Tiere zu gewährleisten, wurden sie mit IPPT-300 Transpondern (Emsikon Jung GmbH, Fastinning) ausgestattet. Nach einer Eingewöhnungsphase mit sojafreiem Basisfutter (Ssniff EF R/M Kontrolle) wurden die Ratten ovariectomiert. Anschließend wurden die Ratten für drei Monate mit den Substanzen gefüttert und die durchschnittliche tägliche Futterraufnahme der einzelnen Gruppen dokumentiert. Nach zwölf

Wochen der Futterapplikation in den einzelnen Gruppen wurden die Ratten unter Kohlenstoffdioxid-Narkose durch Enthaupten getötet, gewogen und anschließend obduziert. Einen Überblick über den zeitlichen Ablauf des Versuchs gibt die Abb. 2.

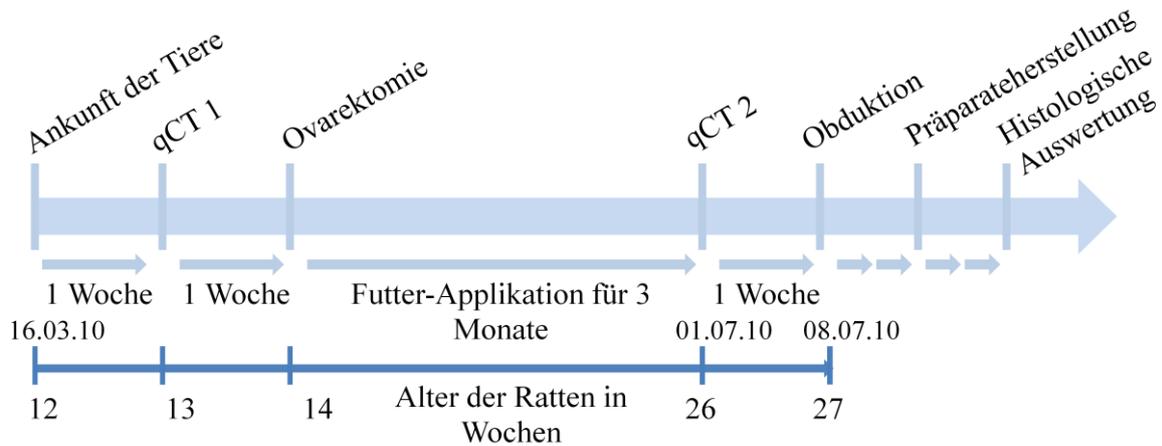


Abbildung 2: Übersicht über den zeitlichen Versuchsablauf

Der dieser Arbeit zugrundeliegende Tierversuch beinhaltete verschiedene analytische Ansätze, um die Wirkungen von Ecd und VitD quantifizieren zu können. Zum einen wurden die Wirkungen der Testsubstanzen auf die Tibiae der Ratten über die Ermittlung der BMD per qCT und zum anderen über die in der vorliegenden Dissertation durchgeführte histomorphometrische Auswertung analysiert.

Um Aussagen über den Energiehaushalt und über knochenmetabolische Prozesse machen zu können, wurden aus dem Blut der Tiere verschiedene Serumparameter bestimmt. Per *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA, Osteometer Bio Tech AIS, Dänemark) wurden die Parameter für den Knochenaufbau, das Osteokalzin und die Rat-Laps, als Ausdruck des Knochenabbaus detektiert. Die Messung des Serum-Cholesterins und der Serum-Glukose erfolgte mit einem Hitachi 902 automatic analyzer (Boehringer, Mannheim). Das Serum-Leptin konnte via Radioimmunfluoreszenzanalyse (RL-83 K, Linco Research, USA) gemessen werden.

Neben der Analyse der Blutwerte stand v.a. die histologische Auswertung der Tibiae im Vordergrund. So wurden den Ratten die Tibiae entnommen und von der Medizinisch-Technischen Assistentin H. Brüggemann-Meyer der Arbeitsgruppe Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen pro Tier zwei Hartschnittpräparate hergestellt. Dafür wurden die entnommenen Tibiae zunächst für 36 Stunden in 4-prozentiger neutral gepufferter Formalinlösung eingelagert und eine Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe durchgeführt. Anschließend erfolgte die Einbettung in Kunststoffblöcke mit dem Polymerisationssystem Technovit 9100 NEU (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim).

Ausführlichere Informationen zur Technovit 9100 NEU und der Herstellung der Präparate sind der Tab. 8 und 9 des Anhangs zu entnehmen.

Nach dem Aushärten der Polymerisate wurden diese mittels eines Rotations-Tischmikrotoms (Leica 2065 Supercut, Leica Biosystems GmbH, Nussloch) und eines 16-cm-Hartmetallmessers mit D-Schliff in 5 µm dicke Längsschnitte geschnitten. Die Schnitte wurden danach auf Objektträgern (SuperFrost Ultra Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig) mithilfe von ethanolhaltiger Streckflüssigkeit aufgezogen. Die Objektträger wurden mit einer Polyethylenfolie (0,025mm x 75mm x 25mm) abgedeckt, gestapelt und in einer Schnittpresse unter Druck bei ca. 50 °C über Nacht gepresst.

Um eine quantitative histomorphometrische Auswertung der Tibiae erreichen zu können, wurden die Präparate, wie in Tab. 10 und 11 des Anhangs aufgeführt, entplastet und mittels Goldner-Färbung angefärbt.

2.2 Histologische Auswertung der Tibia-Präparate

Die Auswertung der histologischen Präparate der Tibiae erfolgte mithilfe eines hochauflösenden Mikroskops (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss AG, Jena). Über eine im Strahlengang des Mikroskops liegende Kamera (Olympus ColorView, Soft Imaging System GmbH, Münster) konnten die mit dem Mikroskop eingestellten Ausschnitte des Präparats als digitale Bilder auf einem Computer betrachtet, bearbeitet und gespeichert werden. Die Messungen an den digitalen Bildern der Präparate wurden mithilfe der Software analySIS 3.0 (Soft Imaging System GmbH, Münster) durchgeführt. Vor und während der Auswertungen am Mikroskop war dem Verfasser der vorliegenden Arbeit nicht bekannt, zu welcher Gruppe das derzeit analysierte Präparat gehörte, sodass eine unvoreingenommene Auswertung durchgeführt werden konnte. Alle Messwerte wurden als Excel-Datensätze (Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Corporation, USA) gespeichert und die Mittelwerte der verschiedenen Messungen an der proximalen Tibia für jedes Tier aus jeder Gruppe errechnet. Abhängig vom Zustand des Präparats wurden, wie in Abb. 3 dargestellt, maximal zehn Messungen pro Präparat durchgeführt. Gemessen wurden jeweils an zwei Stellen des Präparates die Breite des tibialen Knorpels des Kniegelenks, die Breite der Kortikalis auf Höhe der Metaphyse sowie der prozentuale Anteil von rotem Knochenmark, Knochentrabekel und Fettgewebe der proximalen Tibia. Je einmal wurden die Hypertrophiezone, die Proliferationszone und die Reservezone der Epiphysenfuge sowie die gesamte Breite der Epiphysenfuge gemessen.

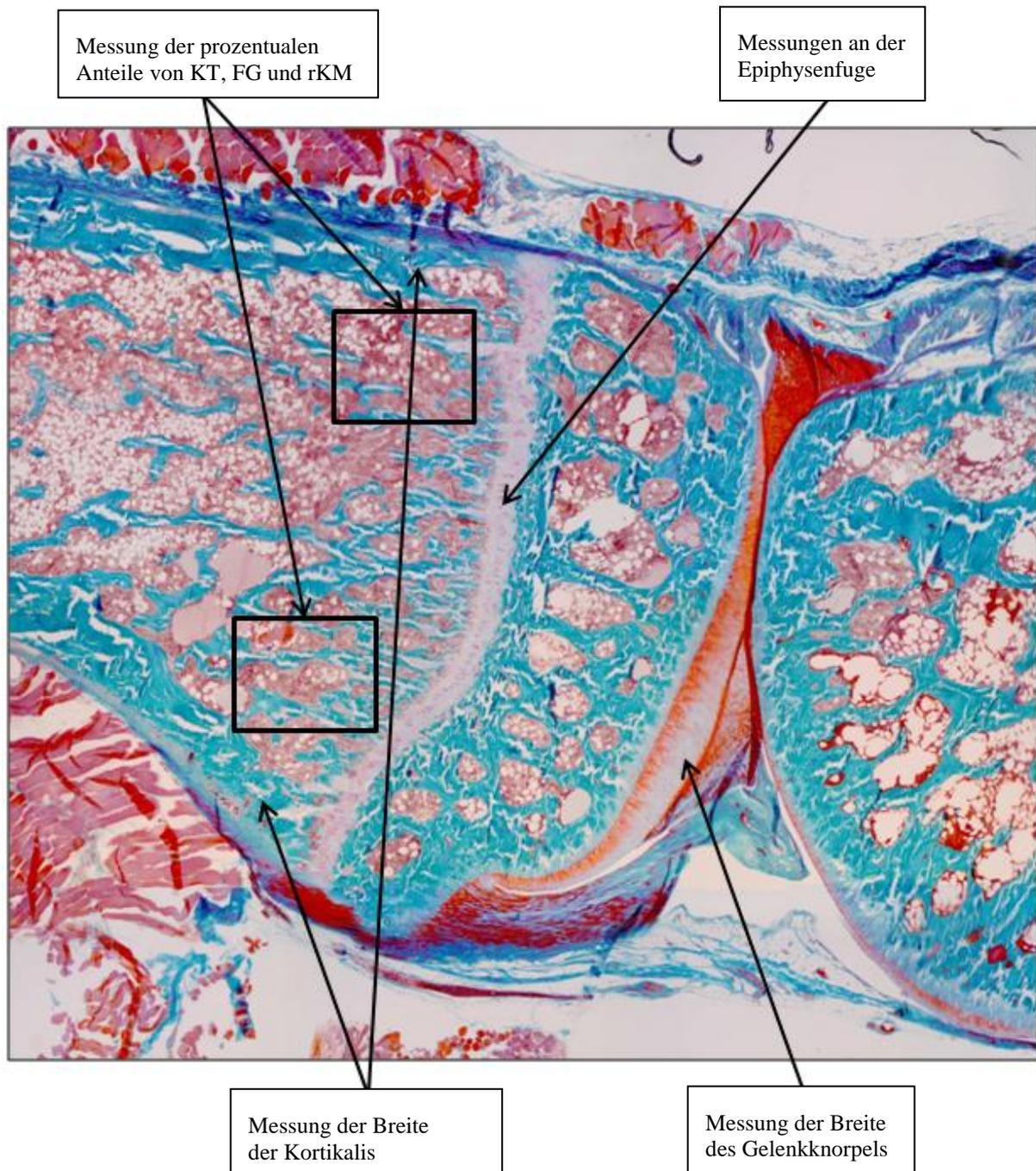


Abbildung 3: Maßpunkte an der proximalen Tibia der Ratte

Bei optimalem Zustand des Präparats wurden zehn Messungen durchgeführt. An zwei Stellen des Präparats eine Messung der Breite der Kortikalis, der Breite des Gelenkknorpels sowie des prozentualen Anteils von rKM (rotem Knochenmark), KT (Knochen trabekel) und FG (Fettgewebe). Jeweils eine Messung wurde zur Detektion der Breite der Epiphysenfuge sowie den innerhalb dieser befindlichen Hypertrophiezone, Proliferationszone und Reservezone durchgeführt.

2.2.1 Messung der Breite des Gelenkknorpels

Die Breite des tibialen Knorpels im Kniegelenkspalt der Ratte wurde mit einer 3,125-fachen optischen Vergrößerung mithilfe der *Abstandsmessfunktion* der *ANALYSIS-Software* gemessen. Dafür wurden bei diesen Messungen sowie bei allen anderen Abstandsmessungen manuell Maßlinien eingefügt und die Breite in Mikrometer (μm) angegeben. Insgesamt wurden bei der Messung der Breite des tibialen Gelenkknorpels je nach Zustand des Objektes pro Präparat maximal zweimal 20 einzelne Maßlinien eingefügt und per Software ein Mittelwert der Knorpelbreite pro Tier bestimmt.

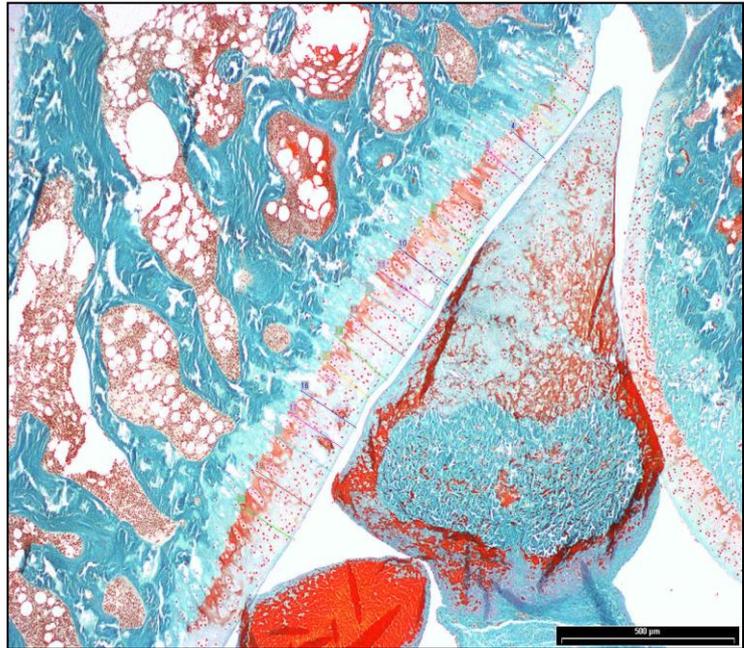


Abbildung 4: Messung der Breite des Knorpels

2.2.2. Messung der Breite der Kortikalis

Die Breite der tibialen Kortikalis wurde an der Metaphyse unmittelbar unterhalb der zum Kniegelenk liegenden Epiphyse durchgeführt. Unter einer 3,125-fachen Vergrößerung wurden je nach Zustand des Objektes maximal zweimal zehn Maßlinien pro Präparat angefertigt. Dabei wurde jeweils eine Messung am oberen und eine am unteren Rand des Präparats durchgeführt. Die gemessenen Werte der Maßlinien pro Präparat wurden in Excel-Datensätzen gespeichert und anschließend der Mittelwert pro Tier bestimmt.

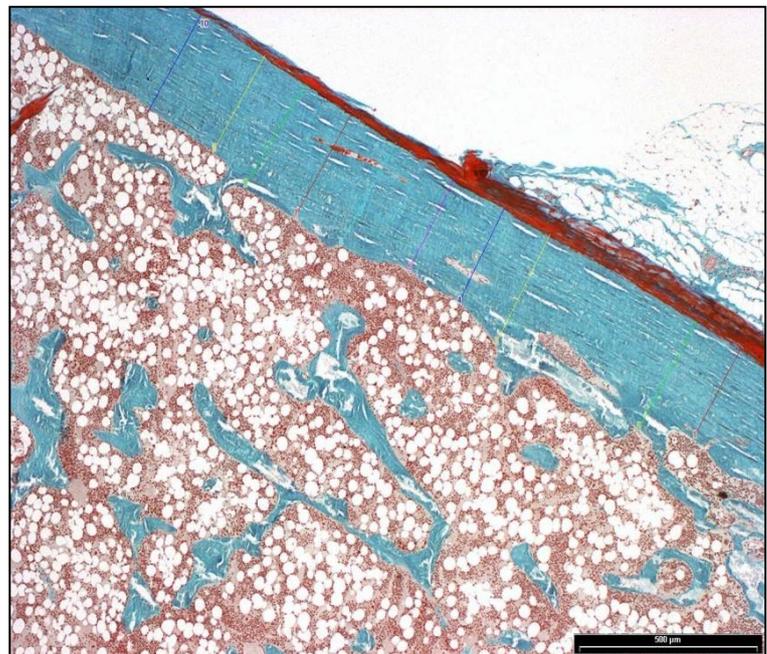


Abbildung 5: Messung der Breite der Kortikalis

2.2.3 Messung der Ephyphysenfuge und ihrer Zonen

Unter einer 12,5-fachen optischen Vergrößerung wurde an einer repräsentativen Stelle der Epiphysenfuge des Präparats über jeweils zehn Maßlinien die mittlere Breite der Hypertrophiezone, Proliferationszone und der Reservezone der Epiphysenfuge in Mikrometer gemessen. Neben der Messung der drei Zonen wurde die gesamte Breite der Epiphysenfuge mit zehn Maßlinien gemessen und jeweils ein Mittelwert pro Tier bestimmt. Des Weiteren wurden die jeweiligen Gesamtbreiten

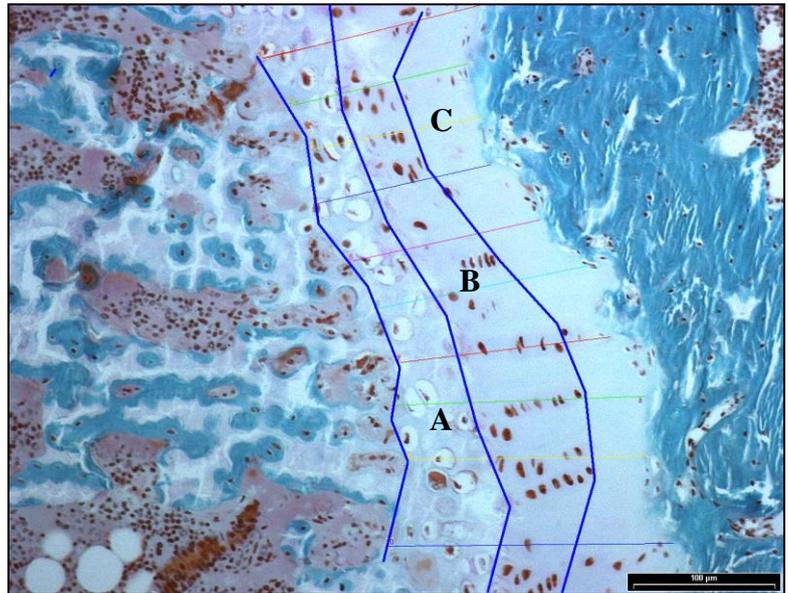


Abbildung 6: Messung der Breite der Epiphysenfuge und deren drei Zonen

A = Hypertrophiezone, B = Proliferationszone, C = Reservezone

den der Epiphysenfugen als 100 Prozent definiert, die prozentualen Anteile der drei dazugehörigen epiphysealen Zonen errechnet und anschließend miteinander verglichen.

2.2.4 Messung der prozentualen Anteile von rotem Knochenmark, Knochen trabekel und Fettgewebe an der Metaphyse der proximalen Tibia

Um Aussagen über den prozentualen Anteil von rotem Knochenmark, Knochen trabekel und dem Fettgewebe innerhalb der Metaphyse machen zu können, wurden mehrere Schritte mit der Software *analySIS* durchgeführt. Zunächst wurden unter einer 4,0-fachen Vergrößerung zwei quadratische Maßfelder ausgewählt. Die Begrenzungen des Maßfeldes wurden so gelegt, dass die Epiphysenfuge und die Kortikalis nicht innerhalb des Maßfeldes lagen, jedoch der Abstand zu

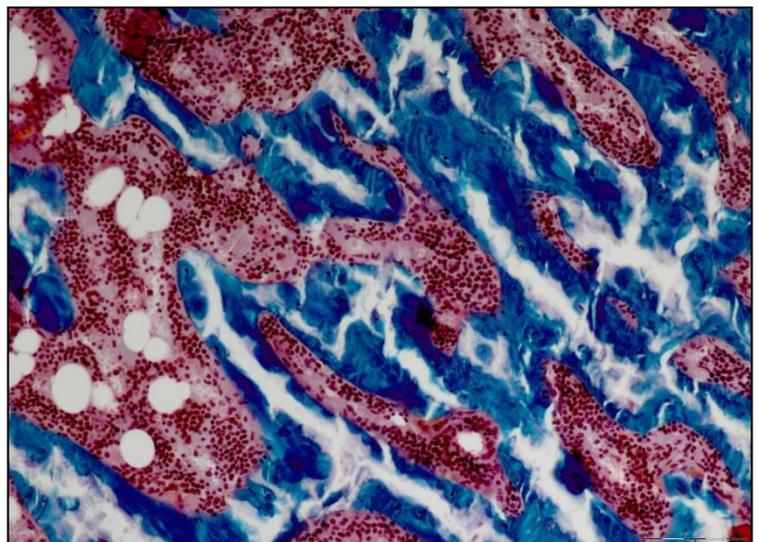


Abbildung 7: Maßfeld für die Messung der prozentualen Anteile von rotem Knochenmark, Knochen trabekel und Fettgewebe an der Spongiosa der proximalen Tibia

beiden so gering wie möglich gehalten wurde (vgl. blaue Kästen in Abb. 3). Im nächsten

Schritt wurde, wie in Abb. 8 und 9 dargestellt, über die *Invertierungsfunktion* der *analySIS*-Software eine Farbumkehr des ausgewählten Feldes durchgeführt und ein Negativbild erzeugt. Dem Negativbild wurde anschließend die Farbe Rot entzogen. An diesem Grauwertbild konnten mithilfe des *RGB-tab* der *analySIS*-Software die verschiedenen Graustufen des Maßfeldes detektiert und anhand von Graphen visualisiert werden. Manuell wurden drei verschiedene Phasen festgelegt und mit Farben gekennzeichnet. Eine rote Phase, stehend für das rote Knochenmark, eine blaue Phase für die Knochen trabekel und eine gelbe Phase für das Fettgewebe. Über die Funktion *Schwellenwerte setzen* der *analySIS*-Software wurden im ständigen Abgleich mit dem Originalbild die Phasen derart verschoben, dass die kennzeichnenden Farben deckungsgleich mit ihrer jeweiligen Struktur waren. Im letzten Schritt wurde eine *Phasenanalyse* durchgeführt und die Fläche der Strukturen in μm^2 gemessen sowie der prozentuale Anteil von rotem Knochenmark, trabekulärem Knochen und Fettgewebe errechnet.

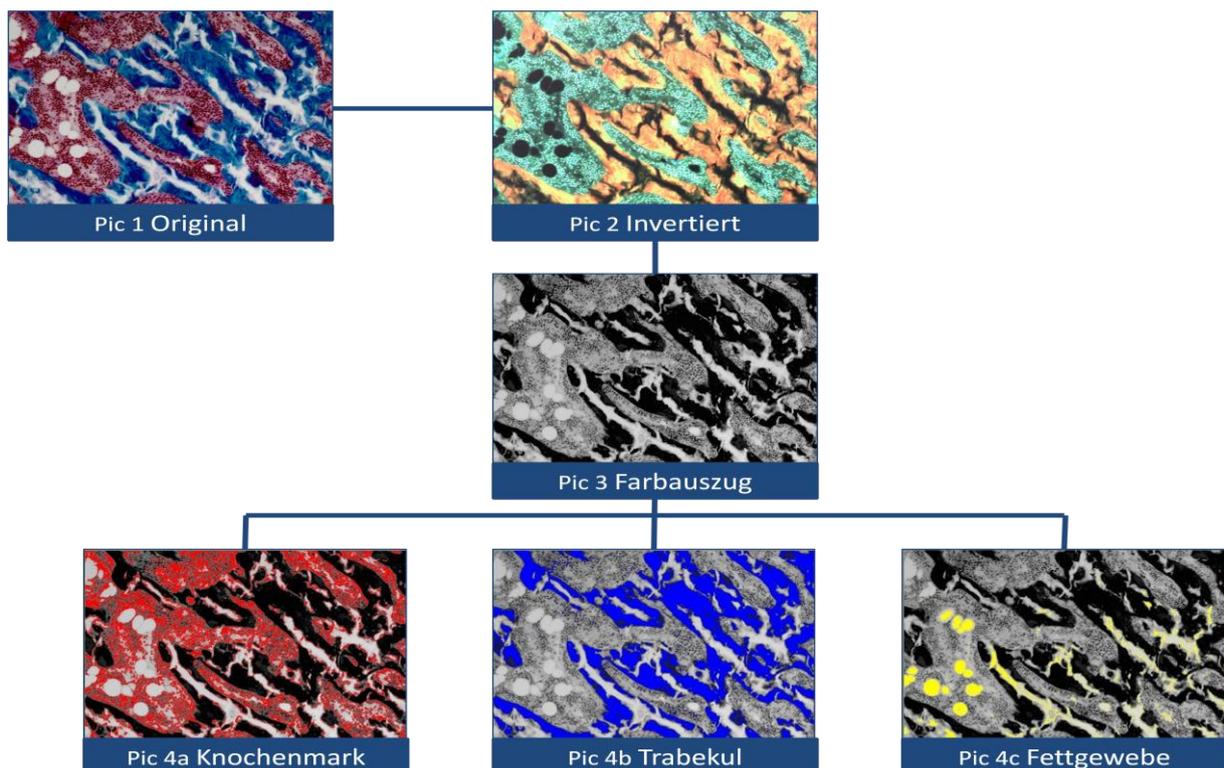


Abbildung 8: Messung der prozentualen Anteile von rotem Knochenmark, Knochen trabekel und Fettgewebe an der Metaphyse der Tibia

Aus dem Originalbild (Pic 1) wurde per *Farbumkehr* ein Negativbild (Pic 2) erzeugt. Im dritten Schritt Pic 2 die Farbe Rot entzogen und so ein Grauwertbild (Pic 3) erstellt. Im ständigen Abgleich mit dem Originalbild (Pic 1) konnten die jeweiligen farbcodierten Phasen derart verschoben werden, dass die definierten Farben und die dazugehörige Struktur übereinstimmten (Pic 4a, 4b, 4c). Anschließend wurde eine *Phasenanalyse* durchgeführt und so die Fläche und der prozentuale Anteil der einzelnen Strukturen gemessen (vgl. Abb. 9).

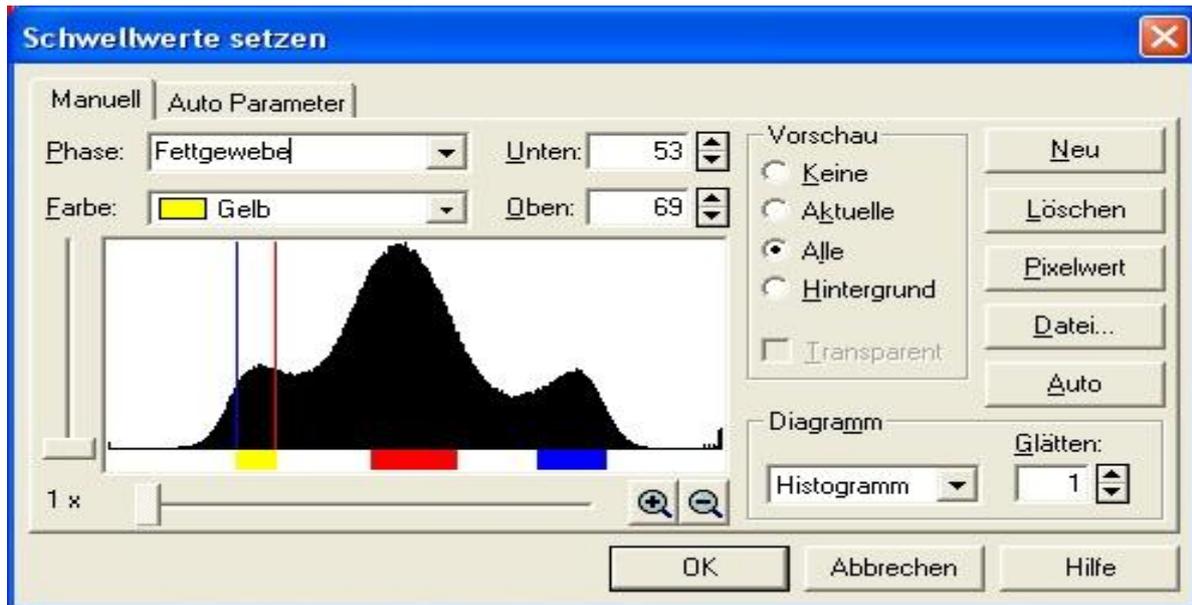


Abbildung 9: Funktion *Schwellwerte setzen* der analySIS-Software

Mit der analySIS-Software wurden manuell drei Phasen erstellt und drei verschiedenen Farben zugeordnet. Gelb für das Fettgewebe, Rot für das rote Knochenmark und Blau für den trabekulären Knochen. Die Phasen wurden manuell so verschoben, dass die Farben deckungsgleich mit den Strukturen des Maßfeldes waren (vgl. Abb. 8 Pic 4a, 4b, 4c). Anschließend wurde eine *Phasenanalyse* durchgeführt und die Fläche, sowie der prozentuale Anteil der jeweiligen Struktur gemessen.

2.3 Statistik

Für die statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse anhand von Graphen wurde die Computersoftware GraphPadPrism 5.01 (GraphPad Software, Inc, USA) verwendet. Alle Ergebnisse aus den histologischen Auswertungen wurden zunächst in Excel-Dateien gespeichert und anschließend in GraphPadPrism übertragen. Mithilfe der Software konnten die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte der verschiedenen Futtergruppen bestimmt werden und diese Ergebnisse visuell als Graphen dargestellt werden. Im nächsten Schritt wurden die Ergebnisse der einzelnen Gruppen mittels eines ungepaarten T-Tests miteinander verglichen. Das Signifikanzniveau wurde dabei stets mit $p < 0,05$ definiert.

3. Ergebnisse

Alle im folgenden Kapitel dargelegten Resultate beziehen sich auf die in Kap. 2 beschriebenen Tierversuche. Der Verfasser der vorliegenden Arbeit hat dabei nur die histologische Auswertung durchgeführt. Die Daten der Futteraufnahme, der Gewichtsveränderungen und die Ergebnisse der Serum-Analysen wurden dabei für alle beteiligten Doktoranden der verschiedenen Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse sollen Informationen über die Wirkungen von Ecd und VitD auf den osteoporotischen Knochen in Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom liefern.

3.1 Futteraufnahme und Körpergewicht

Während der 12-wöchigen Dauer der Versuchsreihe nahmen die Tiere der verschiedenen Gruppen durchschnittlich zwischen 12,11 und 16,86 g Futter pro Tag ein. Die Tiere der Gruppe Ovx Ecd +VitD verbrauchten im Mittel das meiste Futter, wobei zwischen allen Gruppen, die nicht mit E2 gefüttert wurden, keine signifikanten Unterschiede zu erkennen waren. Die Gruppen Ovx E2 +VitD und -VitD verbrauchten im Vergleich zu den restlichen Gruppen signifikant am wenigsten Futter. Die durchschnittlichen täglichen Einnahmen der einzelnen Substanzen pro Tier und pro Tag der jeweiligen Gruppen sind in der Tab. 3 aufgeführt.

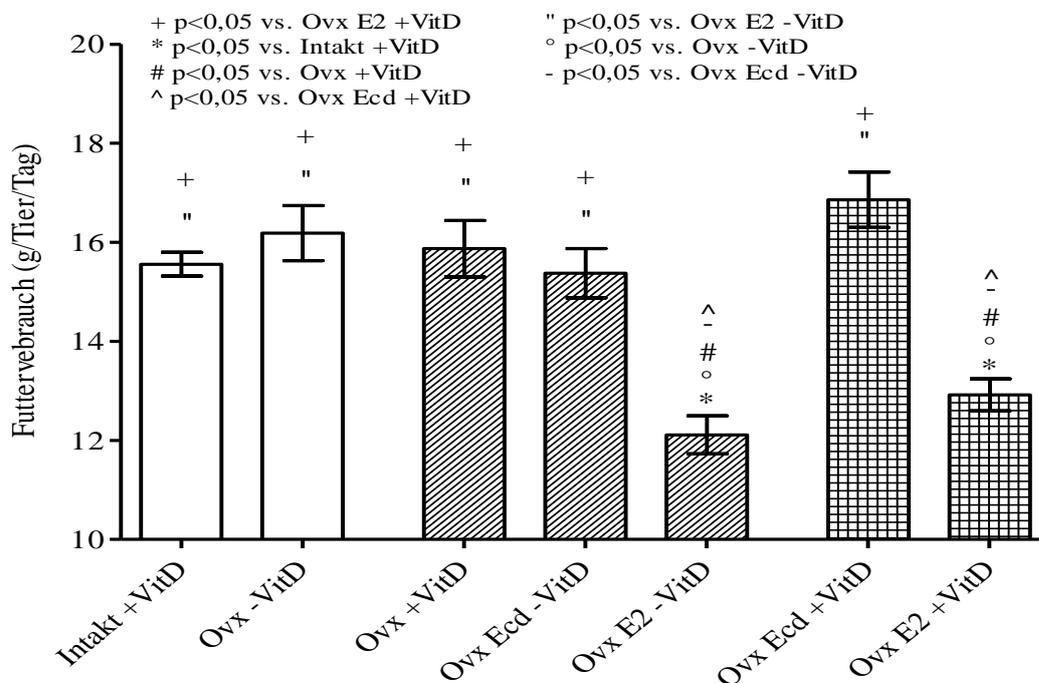


Abbildung 10: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf die tägliche Futteraufnahme in g/Tier

Gruppe	Futtermittelverbrauch [g/Tier/Tag]	Tägliche Substanzeinnahme [pro Tag/Tier]
Intakt +VitD	15,56	23,34 IE VitD
Ovx -VitD	16,19	Keine
Ovx +VitD	15,87	23,81 IE VitD
Ovx Ecd -VitD	15,37	46,11 mg Ecd + 15,37 mg Spinat (Gesamt-Ecd: 46,19 mg)
Ovx E2 -VitD	12,11	0,12 mg E2
Ovx Ecd +VitD	16,86	50,58 mg Ecd + 16,86 mg Spinat (Gesamt-Ecd: 50,66 mg) + 25,9 IE VitD
Ovx E2 +VitD	12,92	0,13 mg E2 + 19,38 IE VitD

Tabelle 3: Täglicher Futtermittelverbrauch und die täglich eingenommene Menge der Testsubstanzen pro Tier in den jeweiligen Versuchsgruppen

Das Körpergewicht der Tiere nahm in allen Gruppen im Verlauf der Versuchsreihe zu. Den stärksten Zuwachs des Körpergewichts zeigten die ovx-Ratten der Gruppen -VitD, +VitD und Ecd +VitD. Im Vergleich mit den restlichen Gruppen war diese Gewichtszunahme signifikant höher. Einzig die mit E2 -VitD und Ecd -VitD gefütterten Tiere zeigten im Vergleich mit den intakten Tieren keinen signifikanten Unterschied. Die Steigerung der Körpergewichte war dabei nicht proportional zu der Menge des täglich aufgenommenen Futters.

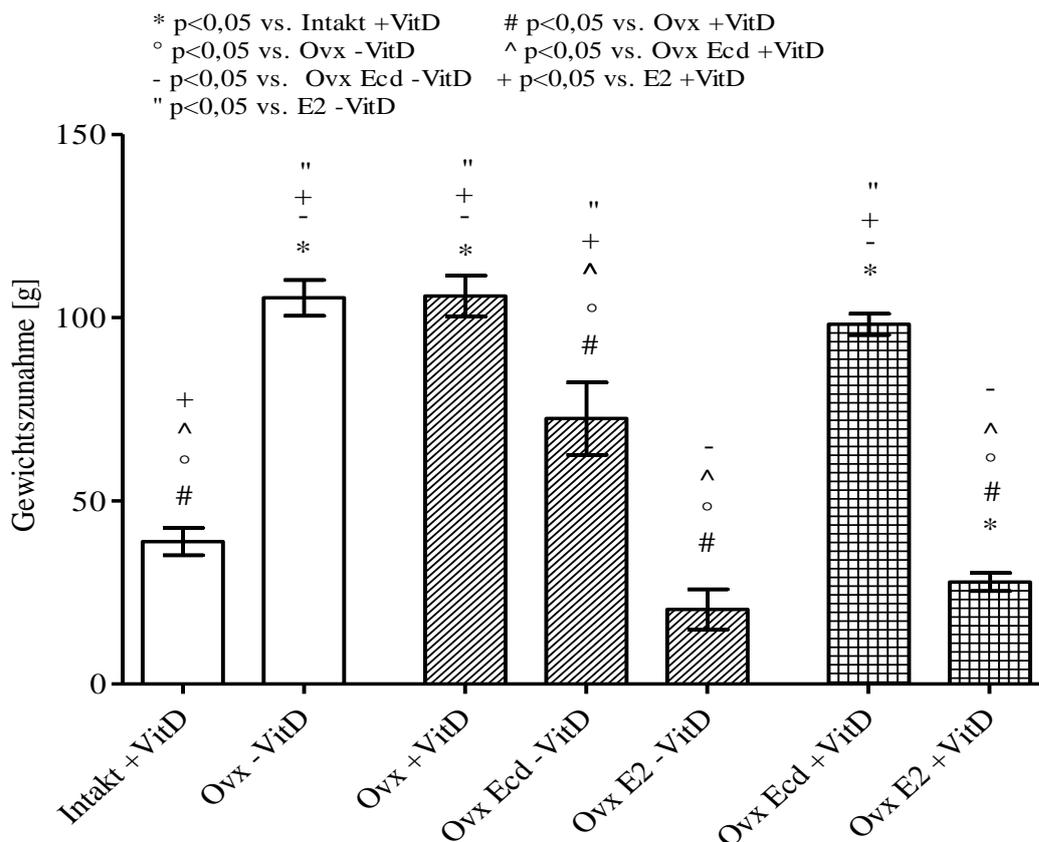


Abbildung 11: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf das Körpergewicht der ovx-Ratte

3.2 Breite des proximalen Gelenkknorpels der Tibia

Die Messungen der Breite des Knorpels an der proximalen Tibia ergaben in den verschiedenen Gruppen ähnliche Ergebnisse. Die Gruppe Ovx Ecd +VitD wies im Mittel mit einer Breite von 167,79 μm die größte Breite des Gelenkknorpels auf. Zudem zeigte die Gruppe einen signifikanten Unterschied zu der Gruppe Ovx E2 +VitD, die den kleinsten Wert erreichte. Die schmalsten Knorpelbreiten neben der Gruppe Ovx E2 +VitD zeigten die intakten Tiere, die Gruppe Ovx -VitD, Ovx +VitD und E2 -VitD.

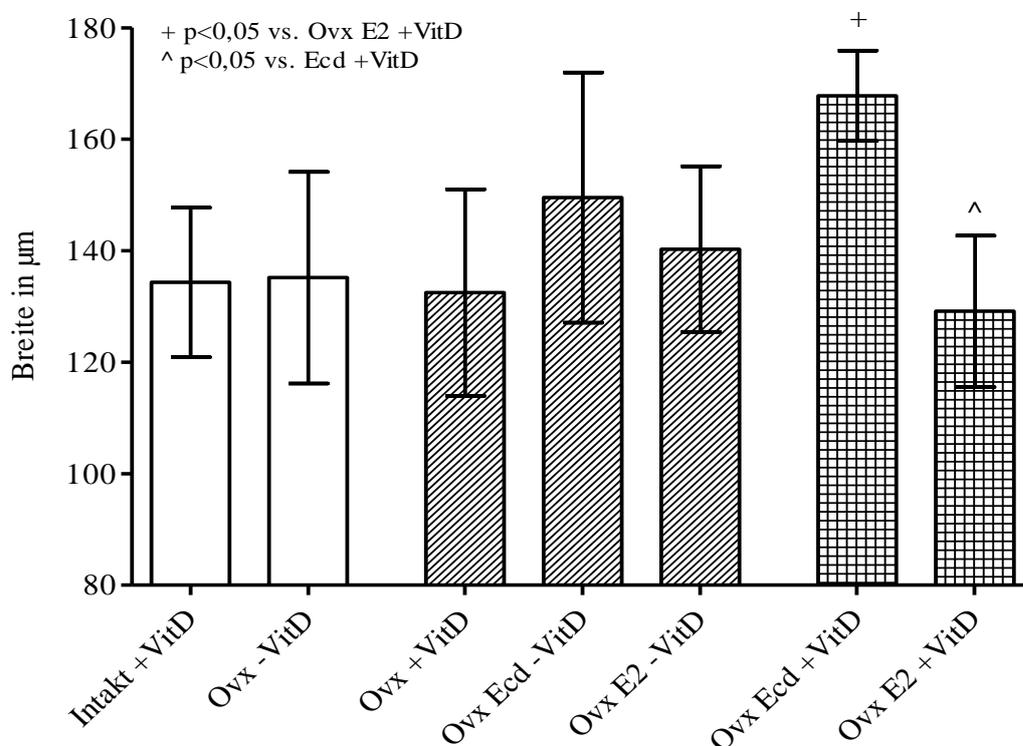


Abbildung 12: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf die Breite des Gelenkknorpels an der proximalen Tibia der ovx-Ratte

3.3 Breite der Epiphysenfuge

Bei der Messung der vollständigen Breite der Epiphysenfuge fiel auf, dass alle Gruppen bis auf die Gruppe Ovx E2 -VitD keine signifikanten Unterschiede zu den intakten Tieren zeigten. Gleichzeitig zeigte die Gruppe Ovx E2 -VitD signifikant schmalere Epiphysenfugen als die Gruppen Ovx -VitD, Ovx +VitD, E2 -VitD und Ecd +VitD, jedoch nicht im Vergleich zu der Gruppe Ovx Ecd -VitD.

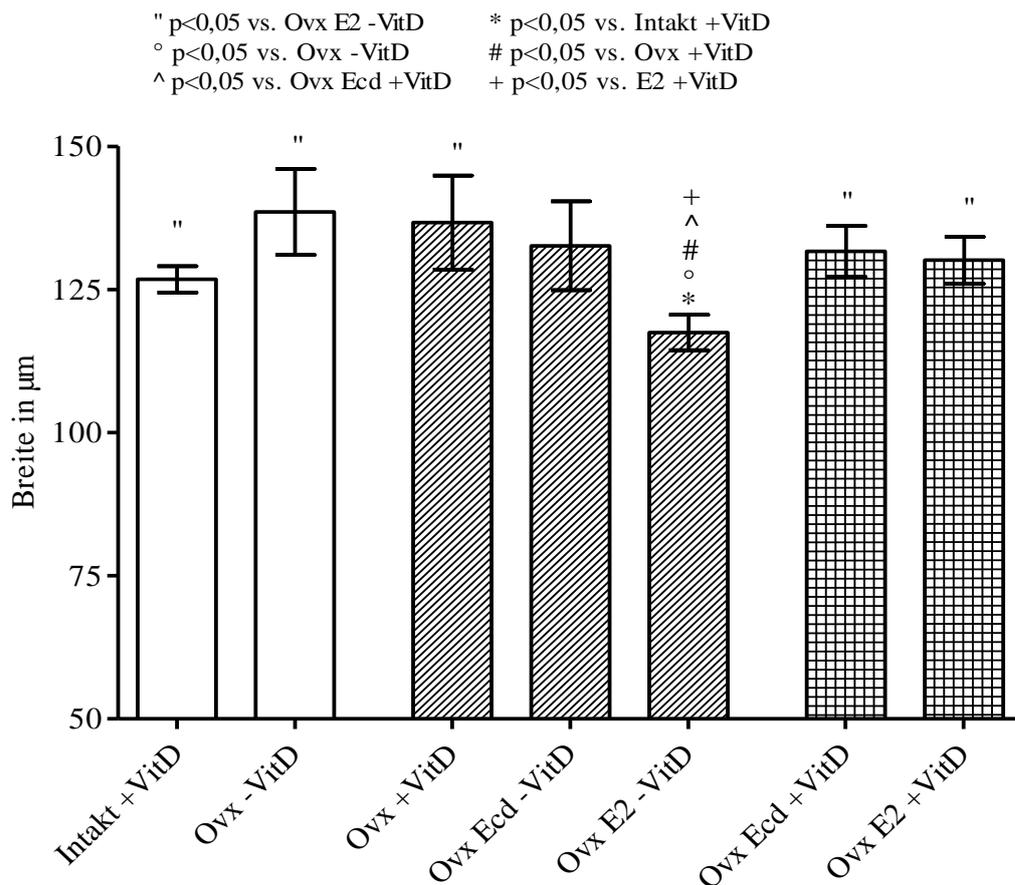


Abbildung 13: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf die gesamte Breite der Epiphysenfuge an der proximalen Tibia der ovx-Ratte

3.3.1 Breite der Hypertrophiezone der Epiphysenfuge

Nach zwölf Wochen der Testsubstanzapplikation zeigten im Vergleich mit der Gruppe Intakt +VitD die Gruppe OvX -VitD und die Gruppe OvX E2 +VitD signifikant höhere Werte in der Breite der Hypertrophiezone der Epiphysenfuge. Die Gruppe OvX E2 -VitD wies die schmalste Breite sowie eine signifikant niedrigere Breite auf als die Gruppe OvX E2 +VitD.

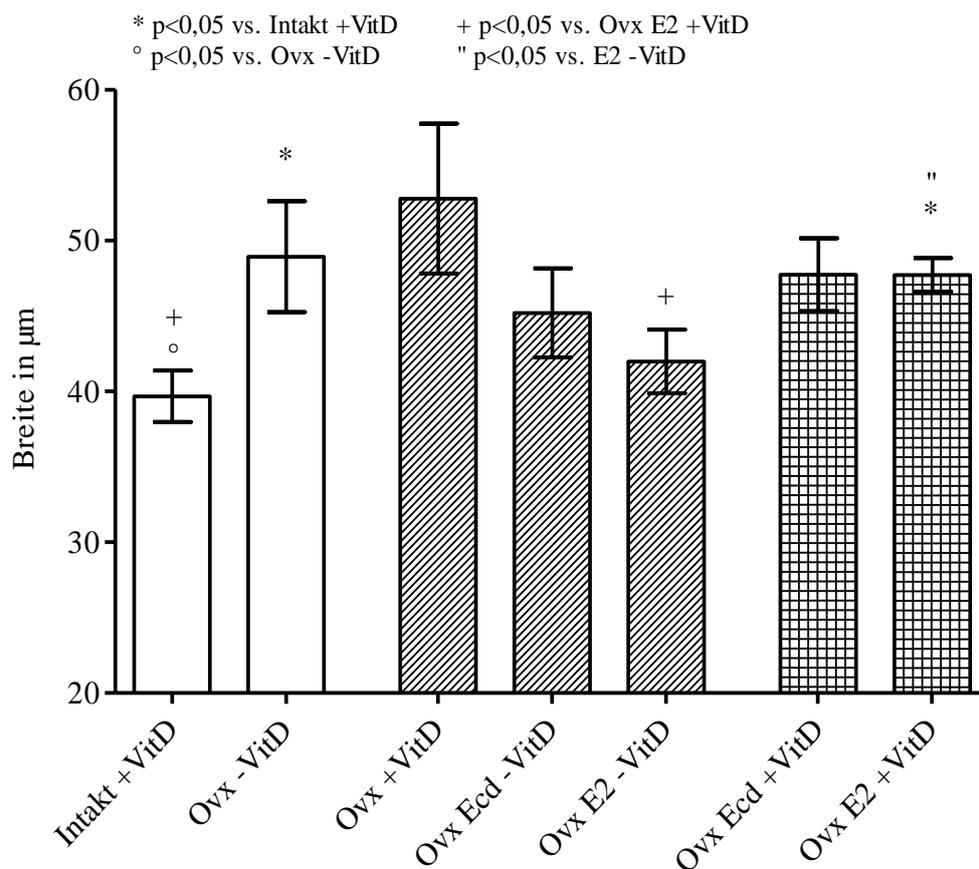


Abbildung 14: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf die Breite der Hypertrophiezone der Epiphysenfuge an der proximalen Tibia der ovx-Ratte

3.3.2 Breite der Proliferationszone der Epiphysenfuge

Die geringsten Breiten der Proliferationszonen innerhalb der Epiphysenfugen nach zwölf Wochen der Futterapplikation zeigten die Gruppen Ovx Ecd +VitD und Ovx E2 +VitD. Die mittlere Breite der Proliferationszone beider Gruppen lag signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe Intakt +VitD. Bei den restlichen Testgruppen konnten keine weiteren signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

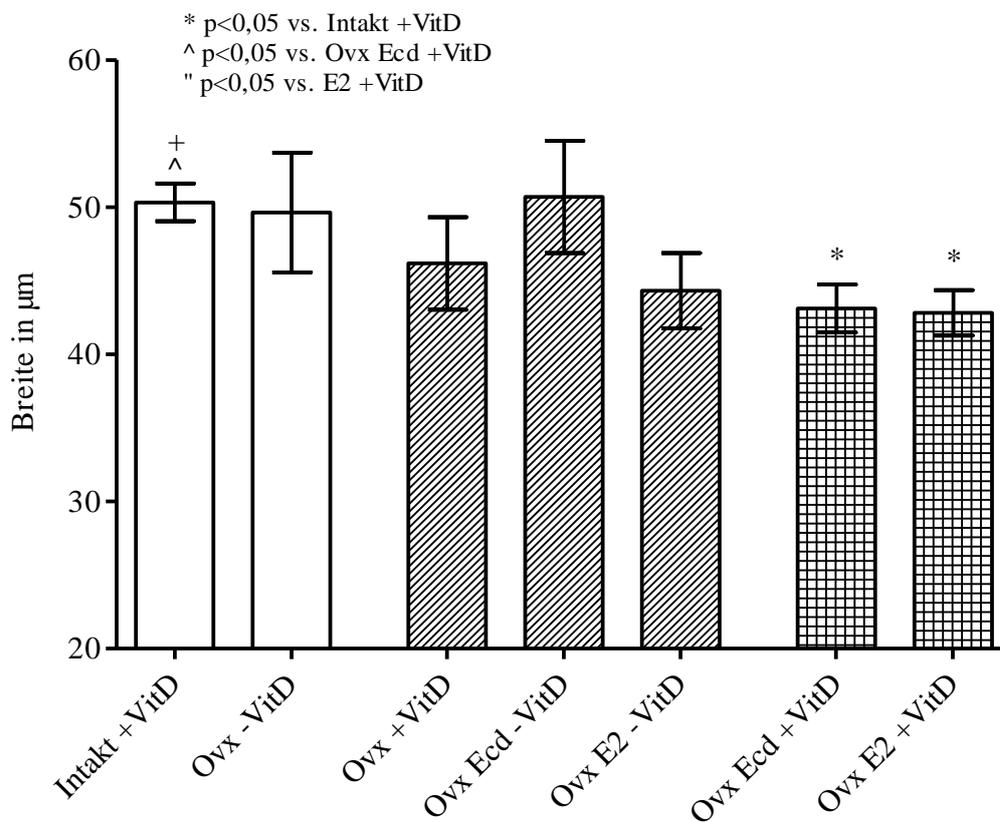


Abbildung 15: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf die Breite der Proliferationszone der Epiphysenfuge an der proximalen Tibia der ovx-Ratte

3.3.3 Breite der Reservezone der Epiphysenfuge

Mit einer mittleren Breite der Reservezone innerhalb der Epiphysenfuge von 35,82 μm und dem kleinsten Wert aller Gruppen wies die Gruppe OvX E2 -VitD signifikante Unterschiede zu den ovx-Tieren der Gruppen -VitD, +VitD, Ecd +VitD und E2+VitD auf. Alle anderen Gruppen zeigten untereinander bei den Messungen der mittleren Breite der Reservezone keine signifikanten Unterschiede.

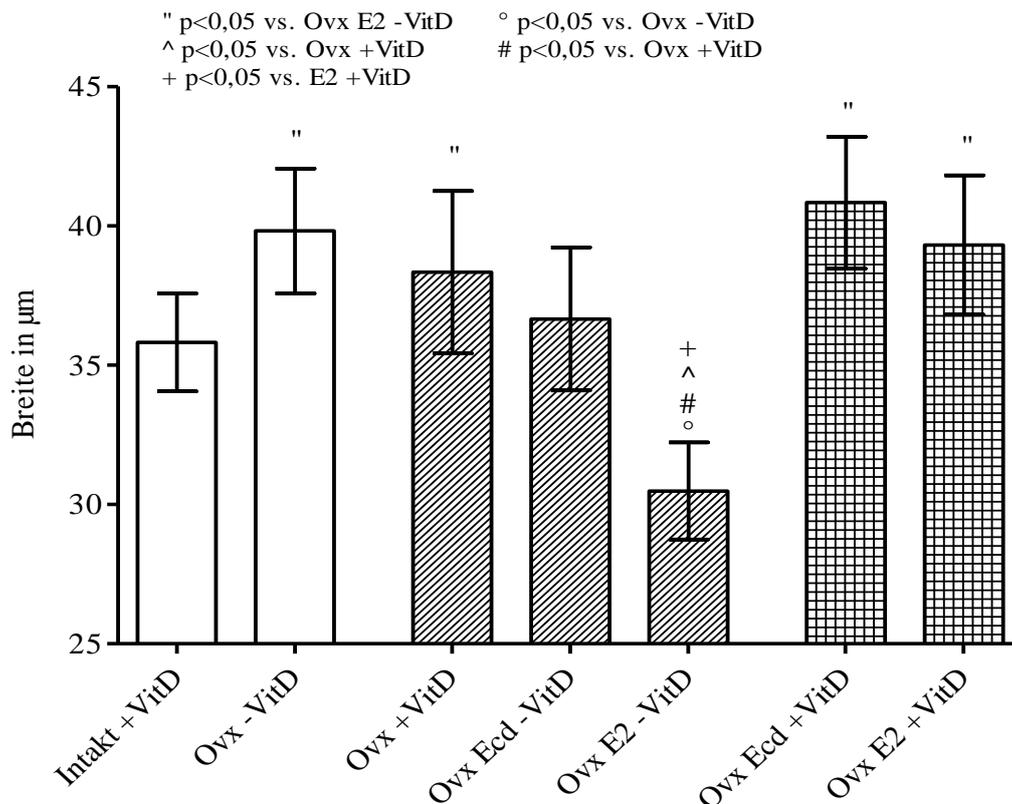


Abbildung 16: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf die Breite der Reservezone der Epiphysenfuge an der proximalen Tibia der ovx-Ratte

3.3.4 Prozentuale Anteile der Hypertrophiezone, der Proliferationszone und der Reservezone an der gesamten Breite der Epiphysenfuge

Die Breite der gesamten Epiphysenfuge wurde bei dieser Messung als 100 Prozent definiert und die prozentualen Anteile der Hypertrophiezone, der Proliferationszone und der Reservezone graphisch dargelegt. Dabei zeigten alle Gruppen bis auf die Gruppe Ovx Ecd - VitD einen signifikant höheren Anteil der Hypertrophiezone als die der intakten Tiere. Beim Vergleich der prozentualen Anteile der Proliferationszone mit den intakten Tieren zeigte zusätzlich zu der Gruppe Ovx Ecd - VitD nur die Gruppe Ovx E2 - VitD keinen signifikanten Unterschied. Zudem zeigte die Gruppe Ovx Ecd - VitD den höchsten prozentualen Anteil der Proliferationszone aller ovx-Tiere. Dieser Wert lag dabei signifikant höher als bei den ovx-Tieren der Gruppen +VitD, Ecd +VitD und E2 +VitD. Des Weiteren stellte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den mit E2 behandelten Tieren der Gruppen +VitD und - VitD dar. Bezogen auf die Reservezone wiesen nur die Gruppen Ovx Ecd +VitD und Ovx E2 +VitD einen signifikant größeren Anteil als die Tiere der Gruppe Ovx E2 - VitD auf. Keine der Ovx-Gruppen zeigte signifikante Unterschiede zu den intakten Tieren.

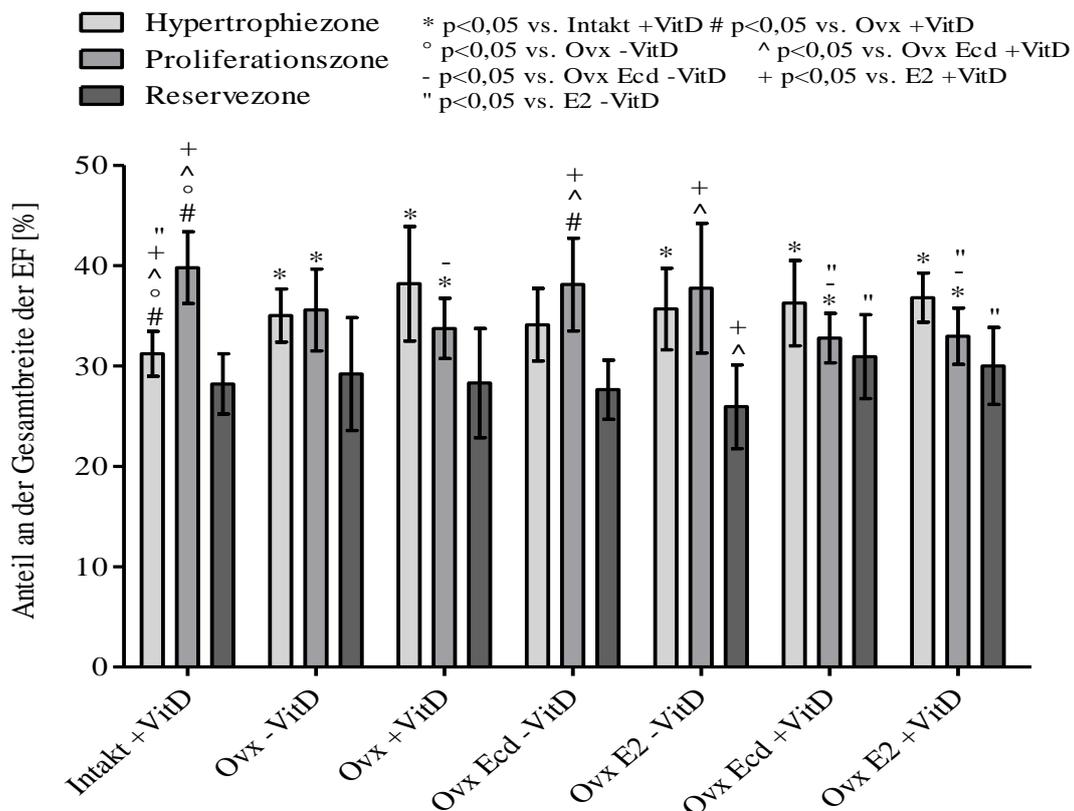


Abbildung 17: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf den prozentualen Anteil der Hypertrophiezone, Proliferationszone und der Reservezone auf die gesamte Breite der Epiphysenfuge

3.4 Breite der tibialen Kortikalis

Im Mittel lag die Breite der tibialen Kortikalis der intakten Tiere bei 340,16 μm . Die mittleren Werte der anderen Gruppen lagen bei ähnlichen Werten und wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Einzig zwischen der Breite der Gruppe Ovx E2 +VitD und den ovx-Tieren der Gruppen -VitD, +VitD und Ecd +VitD, die die größten Kortikalisbreiten verzeichneten, bestand ein signifikanter Unterschied.

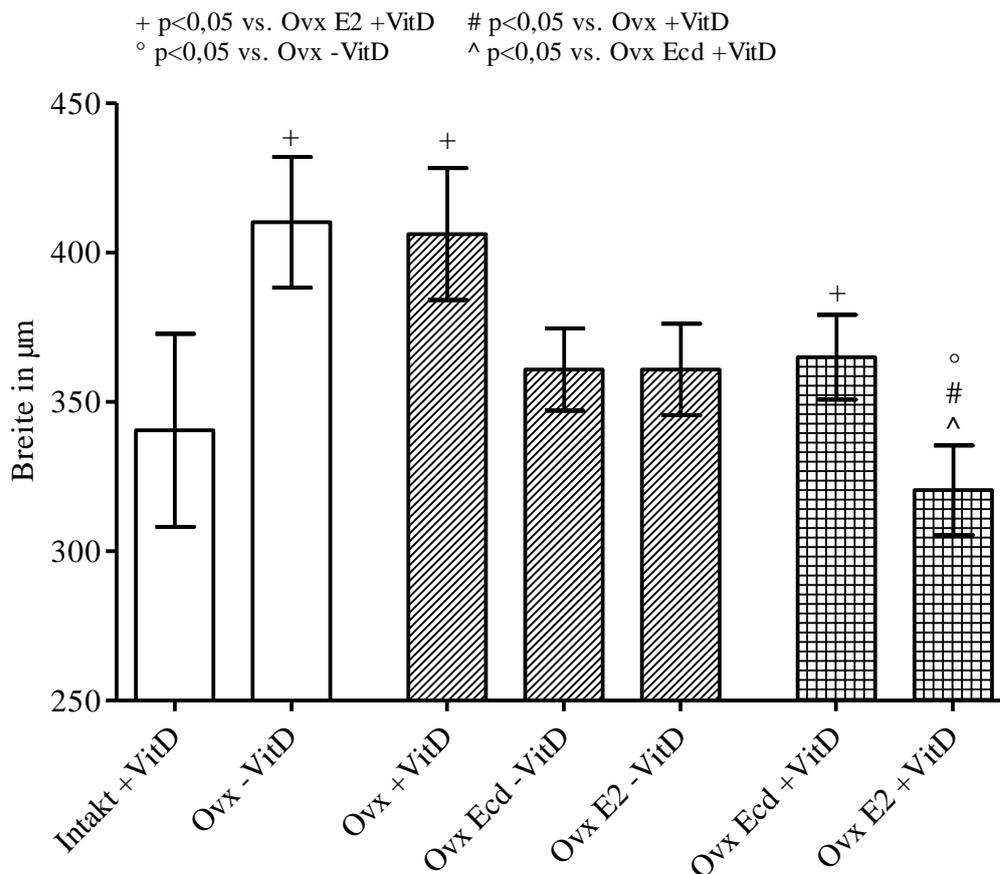


Abbildung 18: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf die Breite der Kortikalis an der proximalen Tibia der ovx-Ratte

3.5 Entwicklungen in der Metaphyse der proximalen Tibia

Im Folgenden wurden die Effekte von Ecd, VitD und E2 auf die prozentualen Anteile von Knochentrabekel, Fettgewebe und rotem Knochenmark in Metaphyse der proximalen Tibia dargestellt. Anschließend wurden die Quotienten der einzelnen Komponenten gebildet, um ein Verhältnis zueinander darzustellen.

3.5.1 Prozentuale Anteile von Knochentrabekel in der Metaphyse der proximalen Tibia

Die Ergebnisse der Phasenanalysen zeigten, dass in der Gegenüberstellung mit den intakten Tieren alle Gruppen geringere prozentuale Anteile der Knochentrabekel in der Metaphyse aufwiesen. Dieser Unterschied war bei allen Gruppen bis auf bei der Gruppe OvX E2 +VitD signifikant. Den niedrigsten Wert erreichte die Gruppe OvX -VitD. Im Vergleich zu dieser Gruppe konnten die ovx-Tiere der Gruppen +VitD, Ecd -VitD und Ecd +VitD keine signifikante Abmilderung beim Verlust des prozentualen Anteils von Knochentrabekel erreichen. Einzig die mit E2 behandelten Gruppen konnten verglichen mit der Negativkontrollgruppe OvX -VitD einen signifikant höheren Anteil vorweisen. Innerhalb der E2-Gruppen zeigte die Gruppe OvX E2 +VitD einen signifikant höheren Wert als die Gruppe OvX E2 -VitD.

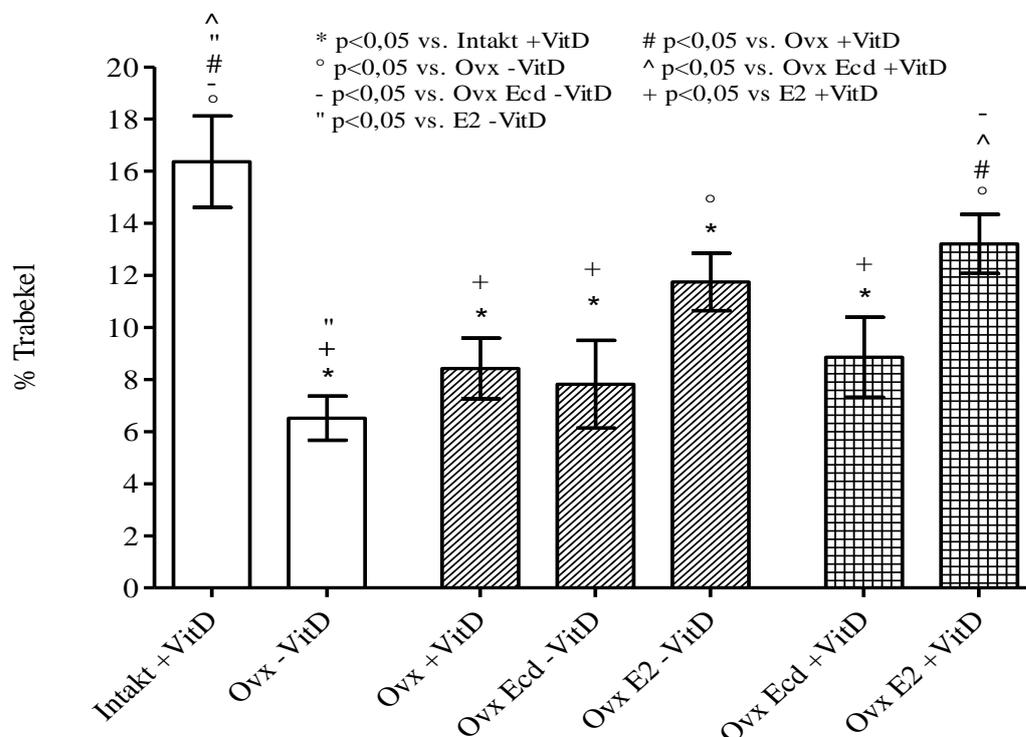


Abbildung 19: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf den prozentualen Anteil der Knochentrabekel an der proximalen Tibia der ovx-Ratte

3.5.2 Prozentuale Anteile von Fettgewebe in der Metaphyse der proximalen Tibia

Die Ergebnisse der prozentualen Anteile des Fettgewebes in der proximalen Tibia der ovx-Ratten nach 12-wöchiger Futterapplikation verhielten sich im Vergleich zu den Anteilen der Knochen trabekel konträr. Alle Mittelwerte der prozentualen Anteile des Fettgewebes der ovx-Tiere waren signifikant höher als die der intakten Tiere. Den höchsten Wert mit einem mittleren prozentualen Anteil von 21,73 Prozent erreichte die Gruppe Ovx Ecd +VitD. Wie die Gruppen Ovx +VitD und Ovx Ecd -VitD zeigte die Gruppe Ovx Ecd +VitD keinen signifikanten Unterschied zu der Gruppe Ovx -VitD. Die mit E2 behandelten Gruppen +VitD und -VitD zeigten verglichen mit den ovx-Tieren der Gruppen -VitD, +VitD, Ecd +VitD und Ecd -VitD signifikant niedrigere Werte.

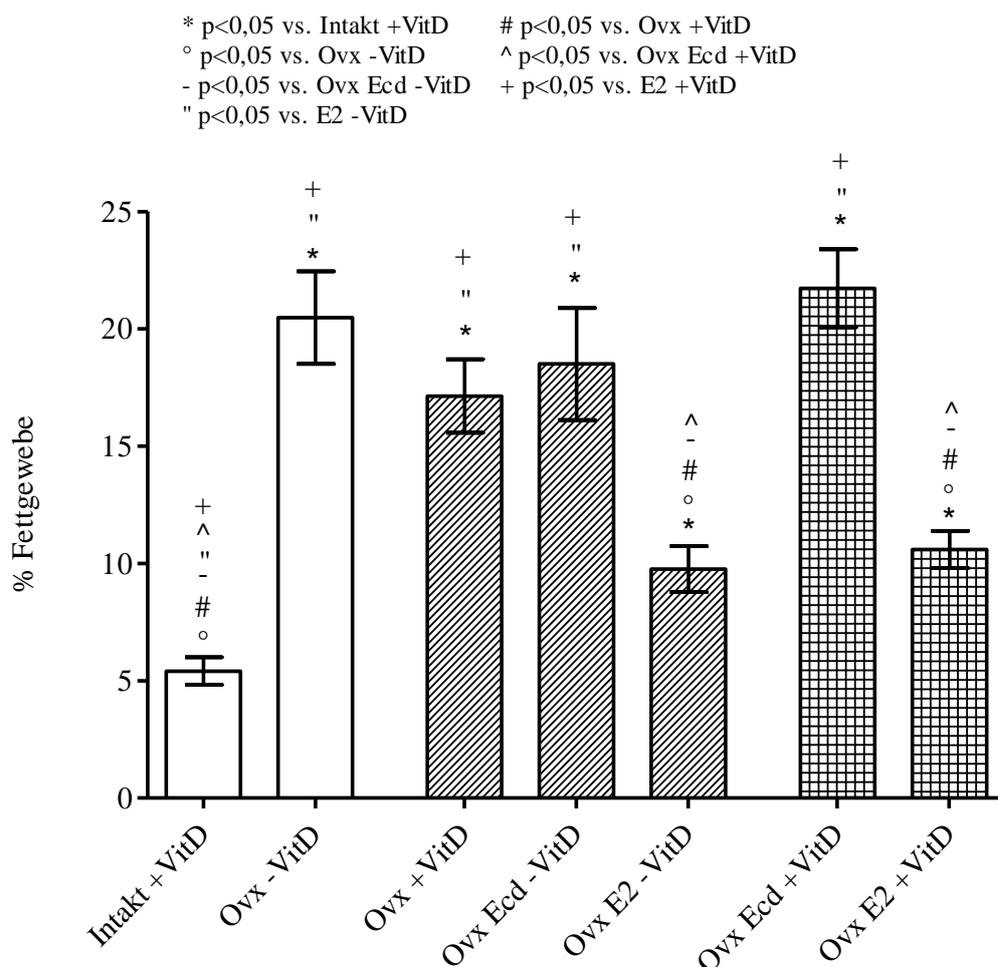


Abbildung 20: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf den prozentualen Anteil des Fettgewebes an der proximalen Tibia der ovx-Ratte

3.5.3 Prozentuale Anteile von rotem Knochenmark in der Metaphyse der proximalen Tibia

Die Analyse der prozentualen Anteile des roten Knochenmarks der Metaphyse an der proximalen Tibia der Ratte legte dar, dass die intakten Tiere mit einem mittleren Anteil von 41,35 Prozent den höchsten Wert aufwiesen. Die Gruppen Ov^x -VitD und Ov^x Ecd +VitD zeigten als einzige Gruppen im Vergleich mit den intakten Tieren signifikant niedrigere Werte. Zudem stellten sich weitere signifikante Verluste des prozentualen Anteils von rotem Knochenmark der Gruppe Ov^x Ecd +VitD gegenüber den Tieren der Gruppe Ov^x +VitD und den mit E2 behandelten Tieren der Gruppen Ov^x E2 +VitD und -VitD dar.

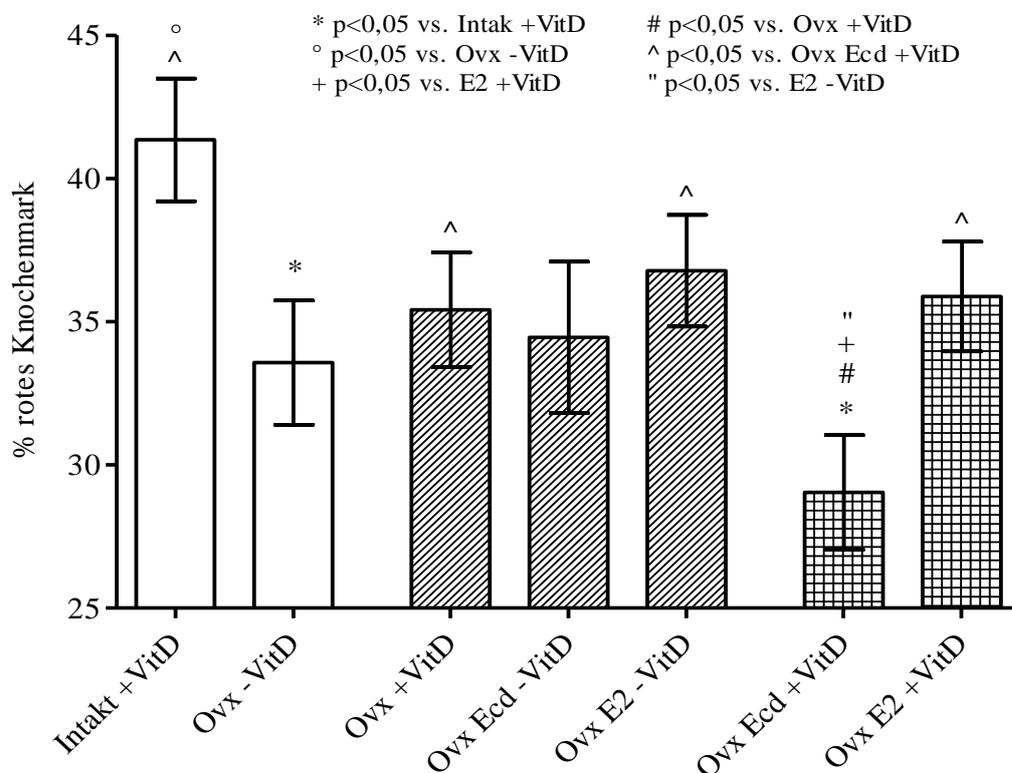


Abbildung 21: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf den prozentualen Anteil des roten Knochenmarks an der proximalen Tibia der ovx-Ratte

3.5.4 Verhältnis von Knochen trabekel zu Fettgewebe

Bei dem Vergleich des Verhältnisses der Flächenanteile von Knochen trabekel und Fettgewebe zeigte die Gruppe Intakt +VitD mit einem ca. dreifach höheren Anteil von Knochen trabekel gegenüber dem Anteil von Fettgewebe den höchsten Wert. Alle anderen Gruppen erreichten signifikant niedrigere Verhältnisse. Unter den ovx-Tieren erzielten einzig die Gruppen E2 +VitD und E2 -VitD Werte größer Eins und erreichten somit einen höheren Anteil von Knochen trabekel gegenüber dem Anteil von Fettgewebe. Die ovx-Tiere der Gruppen +VitD, Ecd -VitD, Ecd +VitD und die Negativkontrollgruppe OvX -VitD zeigten einen höheren Anteil von Fettgewebe als Knochen trabekel und erreichten bis auf die Gruppe OvX Ecd -VitD signifikant niedrigere Werte als die Gruppen OvX E2 +VitD und OvX E2 -VitD. Der niedrigste Wert mit 0,36 konnte bei der Negativkontrollgruppe OvX -VitD ermittelt werden.

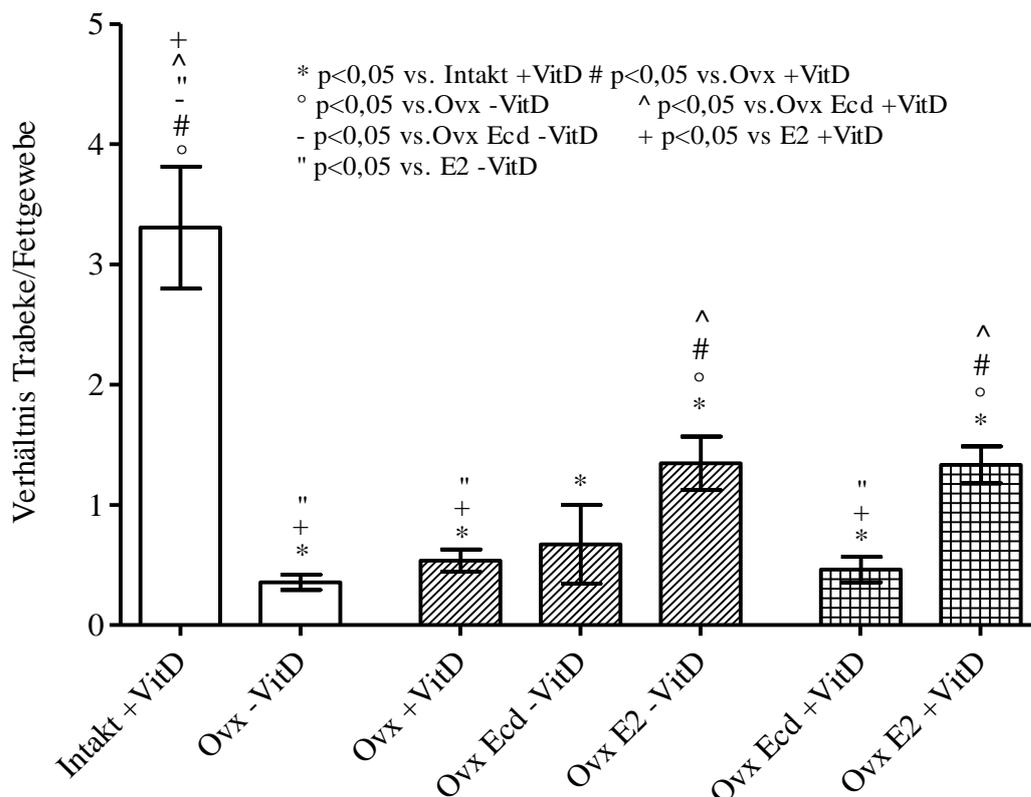


Abbildung 22: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf das Verhältnis zwischen dem Anteil der Knochen trabekel und dem Fettgewebe an der proximalen Tibia der ovx-Ratte

3.5.5 Verhältnis von Knochentrabekel zu rotem Knochenmark

Bei der Auswertung des Verhältnisses von Knochentrabekel zu rotem Knochenmark zeigte die Gruppe Intakt +VitD einen mehr als doppelt so hohen Anteil von rotem Knochenmark zu Knochentrabekel. Nicht signifikant niedrigere Werte erreichten die Gruppen Ovx E2 +VitD und Ovx E2 -VitD sowie die Gruppe Ovx Ecd +VitD. Die Negativkontrollgruppe Ovx -VitD zeigte im Verhältnis zum roten Knochenmark den niedrigsten Anteil von Knochentrabekel an der Metaphyse. Dieser Anteil war signifikant niedriger als der der Gruppen Ecd +VitD, E2 +VitD, E2 -VitD und der intakten Tiere. Die Gruppen Ovx +VitD und Ovx Ecd -VitD erreichten ähnlich niedrige Werte wie die Gruppe Ovx -VitD, zeigten allerdings nur gegenüber den Gruppen Intakt +VitD und Ovx E2+ VitD einen signifikanten Unterschied. Gleichzeitig konnte die Gruppe Ovx Ecd +VitD als einzige ovx-Gruppe, die nicht mit E2 behandelt wurde, ähnliche Verhältnisse erreichen wie die Tiere der Gruppe Intakt +VitD.

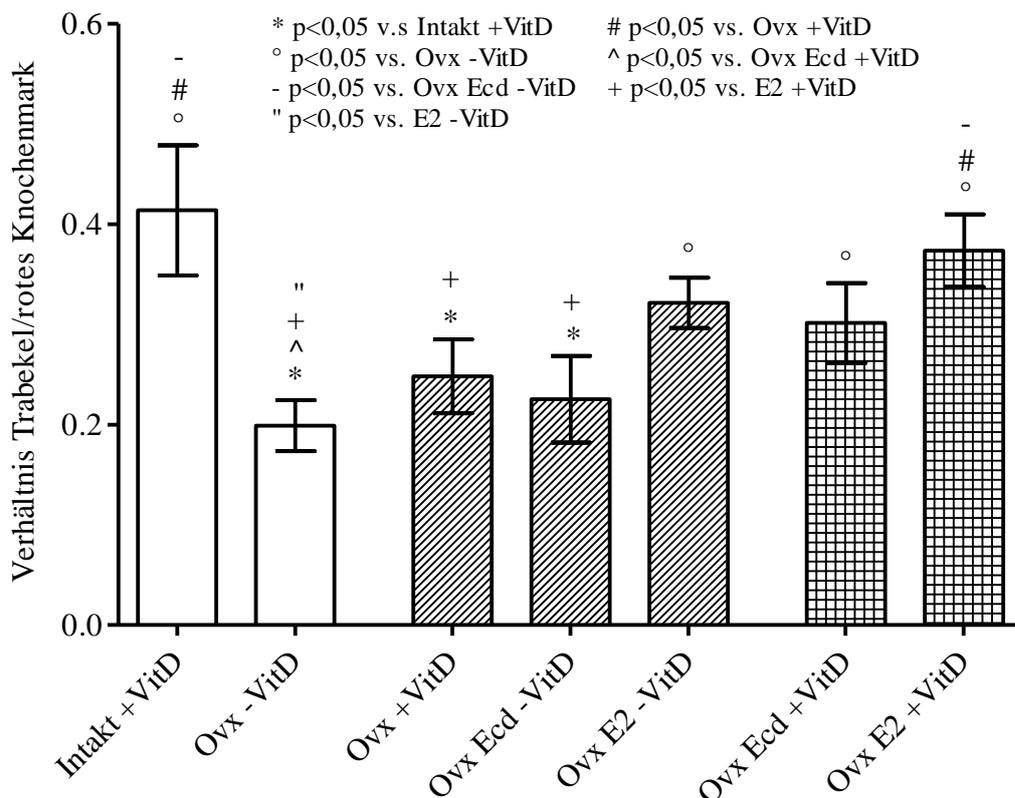


Abbildung 23: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf das Verhältnis zwischen dem Anteil der Knochentrabekel und dem roten Knochenmark an der proximalen Tibia der ovx-Ratte

3.5.6 Verhältnis von Fettgewebe zu rotem Knochenmark

Der Anteil von Fettgewebe im Verhältnis zum roten Knochenmark war bei der Gruppe Ovx Ecd +VitD mit einem Wert von ca. 0,8 am höchsten und signifikant höher als die Werte der ovx-Tiere der Gruppen +VitD, E2 +VitD, E2 -VitD und der Gruppe Intakt +VitD. Niedrigere Werte ohne signifikanten Unterschied zu der Gruppe Ovx Ecd +VitD stellten sich in den Gruppen Ovx -VitD und Ovx Ecd -VitD dar. Die niedrigsten Anteile von Fettgewebe im Verhältnis zum roten Knochenmark der ovx-Gruppen zeigten die Gruppen E2 +VitD und E2 -VitD. Diese waren signifikant niedriger als die der ovx-Tiere der Gruppen +VitD, -VitD, Ecd +VitD und Ecd -VitD sowie signifikant höher als die der Gruppe Intakt +VitD, deren Tiere im Mittel einen mehr als fünffach höheren Anteil von rotem Knochenmark im Verhältnis zum Fettgewebe aufwiesen.

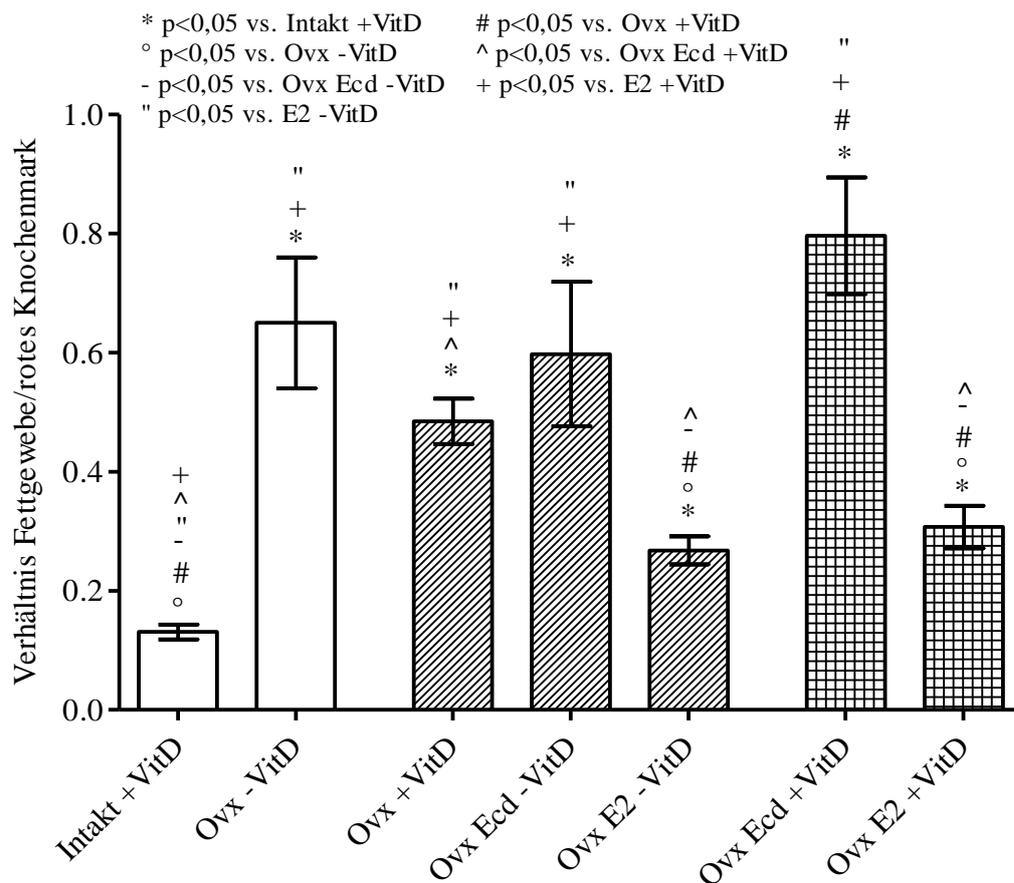


Abbildung 24: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf das Verhältnis zwischen dem Anteil des Fettgewebes und dem roten Knochenmark an der proximalen Tibia der ovx-Ratte

3.6 Serumparameter

3.6.1 Serum-Osteokalzin

Die Osteokalzinspiegel im Serum verhielten sich zwölf Wochen nach Ovx in allen sieben Gruppen unterschiedlich. Am höchsten lag die mittlere Konzentration des Osteokalzins im Serum in der Negativkontrollgruppe Ovx -VitD, welche auch als einzige Gruppe einen signifikanten Unterschied zu der Gruppe Intakt +VitD aufweisen konnte. Die niedrigsten Werte zeigten die Gruppen Ovx E2 +VitD und Ovx E2 -VitD. Die Serumwerte dieser Gruppen waren signifikant niedriger als die Serumwerte der Gruppen Ovx -VitD, Ovx +VitD und Ovx Ecd +VitD. Nur die Serumkonzentrationen der intakten Tiere und der Gruppe Ovx Ecd -VitD erreichten ähnlich niedrige Werte und zeigten signifikante Unterschiede zu der Gruppe Ovx -VitD.

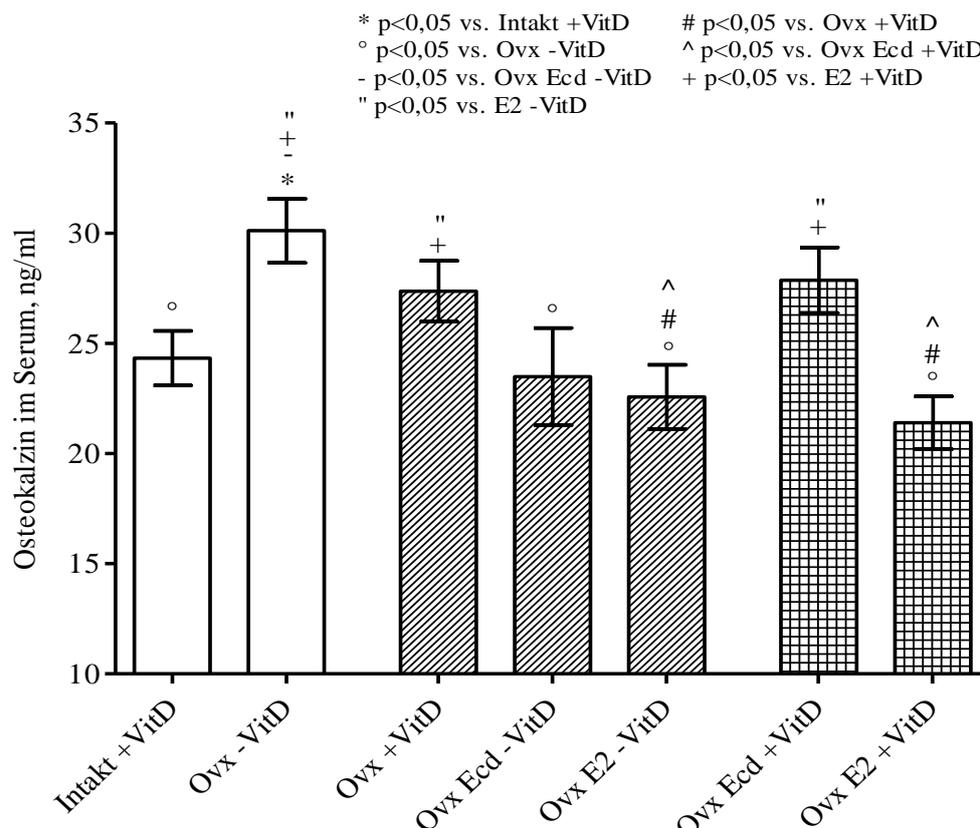


Abbildung 25: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf das Serum-Osteokalzin in ovx-Ratten

3.6.2 Serum-Rat-Laps

Nach der Ovx zeigten alle Gruppen einen mäßigen bis signifikanten Anstieg der Rat-Laps im Serum. Die niedrigsten Werte zeigten neben der Gruppe Intakt +VitD, die Gruppen Ovx E2 +VitD und Ovx E2 -VitD. Einen zu diesen Gruppen signifikant höheren Wert und gleichzeitig den höchsten Anstieg der Serum Rat-Laps-Werte erzielte die Negativkontrollgruppe Ovx -VitD. Ähnlich hohe Werte erreichten die ovx-Tiere der Gruppen +VitD, Ecd +VitD und Ecd -VitD, erreichten jedoch keine Signifikanz zu der Gruppe Ovx E2 -VitD. Nur die Gruppe Ovx Ecd -VitD wies zudem keinen signifikanten Unterschied zu der Gruppe Intakt +VitD auf.

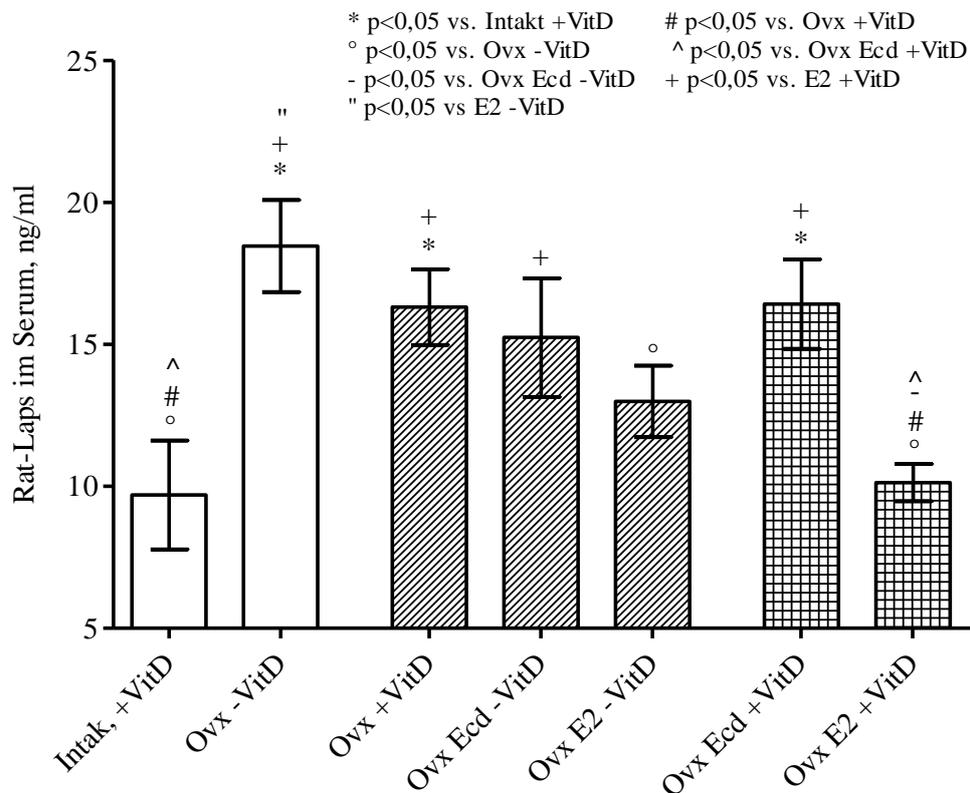


Abbildung 26: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf die Serum-Rat-Laps von ovx-Ratten

3.6.3 Serum-Cholesterin

Im Vergleich mit den intakten Tieren stiegen die Serum-Cholesterinwerte im Verlauf der zwölf Wochen nach der Ovx in den Gruppen +VitD, Ecd +VitD und Ecd -VitD sowie in der Negativkontrollgruppe Ovx -VitD auf einen signifikant höheren Wert an. Im Gegensatz dazu lagen die Serumkonzentrationen des Cholesterins der Gruppen Ovx E2 +VitD und Ovx E2 -VitD verglichen mit der Gruppe Intakt +VitD signifikant niedriger. Die Gruppe Ovx E2 +VitD wies im Mittel mit 60,5 ng/dl die minimalsten Konzentrationen auf und zeigte zudem einen signifikant niedrigeren Wert als die Gruppe Ovx E2 -VitD.

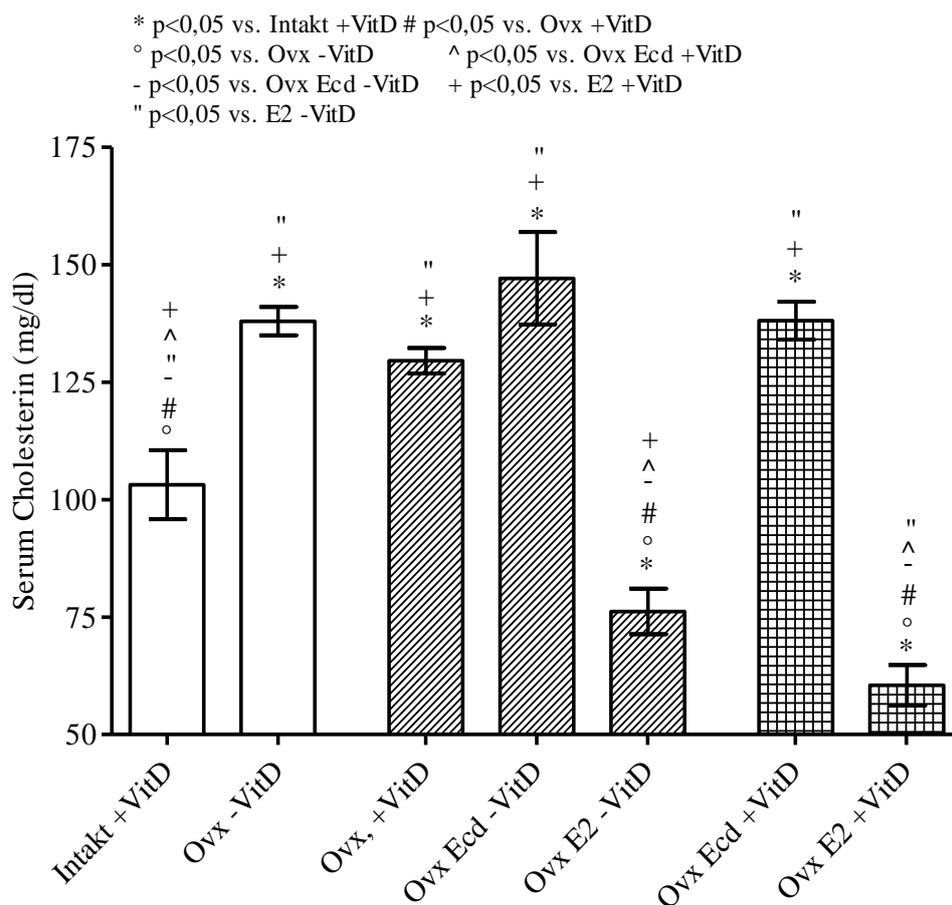


Abbildung 27: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf das Serum-Cholesterin von ovx-Ratten

3.6.4 Serum-Leptin

Die Leptin-Werte im Serum stiegen in den Gruppen Ovx +VitD und Ovx Ecd +VitD sowie in der Negativkontrollgruppe Ovx -VitD zwölf Wochen nach Ovx im Vergleich mit der Gruppe Intakt +VitD signifikant an. Die Tiere der Gruppe Ovx Ecd -VitD zeigten zwar höhere Werte, jedoch keinen signifikanten Unterschied zu den intakten Tieren. Den niedrigsten Wert erreichte die Gruppe Ovx E2 +VitD, die, verglichen mit der Gruppe Intakt +VitD, im Mittel signifikant niedrigere Leptin-Serumwerte aufwies. In einer Gegenüberstellung mit den E2-Gruppen wiesen die ovx-Tiere der Gruppen +VitD, Ecd +VitD, Ecd -VitD und die Negativkontrollgruppe Ovx -VitD signifikant höhere Werte auf.

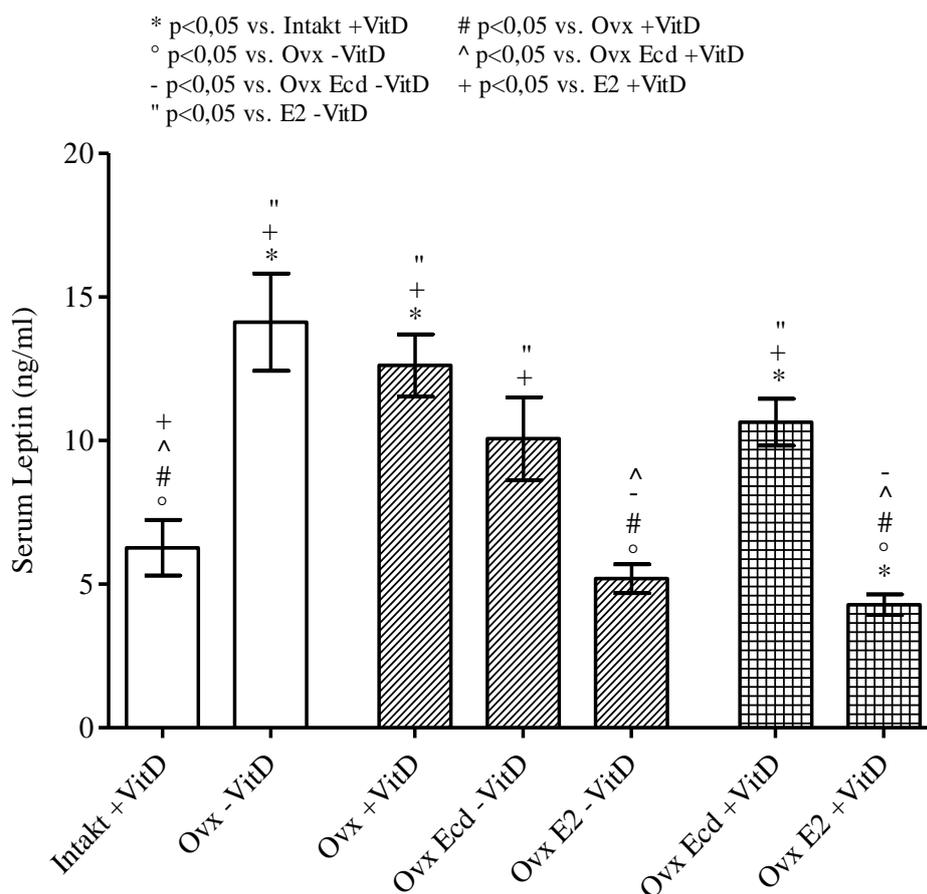


Abbildung 28: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf das Serum-Leptin von ovx-Ratten

3.6.5 Serum-Glukose

Im Vergleich mit den intakten Tieren zeigten die Glukose-Serumwerte aller Gruppen mit ovx-Tieren keine signifikanten Unterschiede. Innerhalb der Gruppen der ovx-Tiere konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen +VitD, Ecd +VitD und der Negativkontrollgruppe Ov_x -VitD festgestellt werden. Allein die Gruppe Ov_x Ecd -VitD zeigte verglichen mit den Gruppen Ov_x -VitD und Ov_x +VitD signifikant höhere Werte. Die Gruppen Ov_x E2 +VitD und Ov_x E2 -VitD wiesen nur zu der Gruppe Ov_x +VitD signifikant höhere Serum-Glukose-Werte auf.

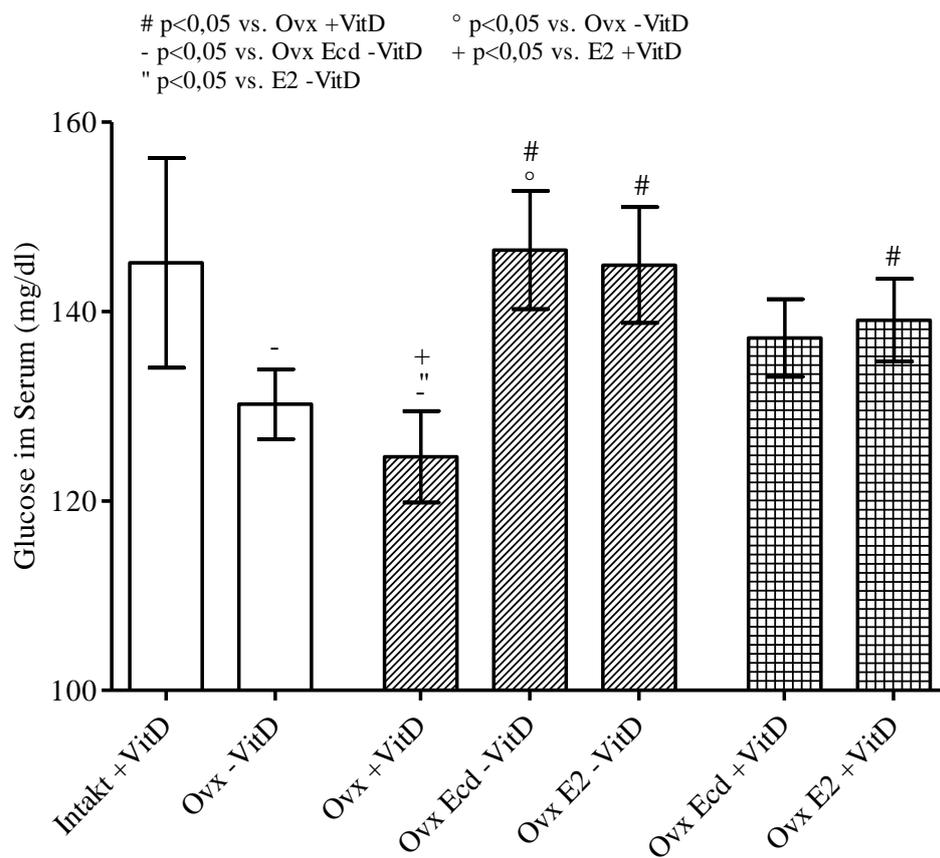


Abbildung 29: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf die Serum-Glukose von ovx-Ratten

3.7 Basisfutter im Vergleich

Bei der Untersuchung des finalen Körpergewichts nach dreimonatiger Futterapplikation zeigte sich im Vergleich zu den Auswertungen aus Seidlová-Wuttke et al. 2010 b, dass die ovx-Tiere unter gleichen Versuchsbedingungen, aber unterschiedlichem Basisfutter signifikant mehr an Gewicht zunahmten. Gleichzeitig verbrauchten die Tiere des vorliegenden Versuchs signifikant weniger Futter pro Tag.

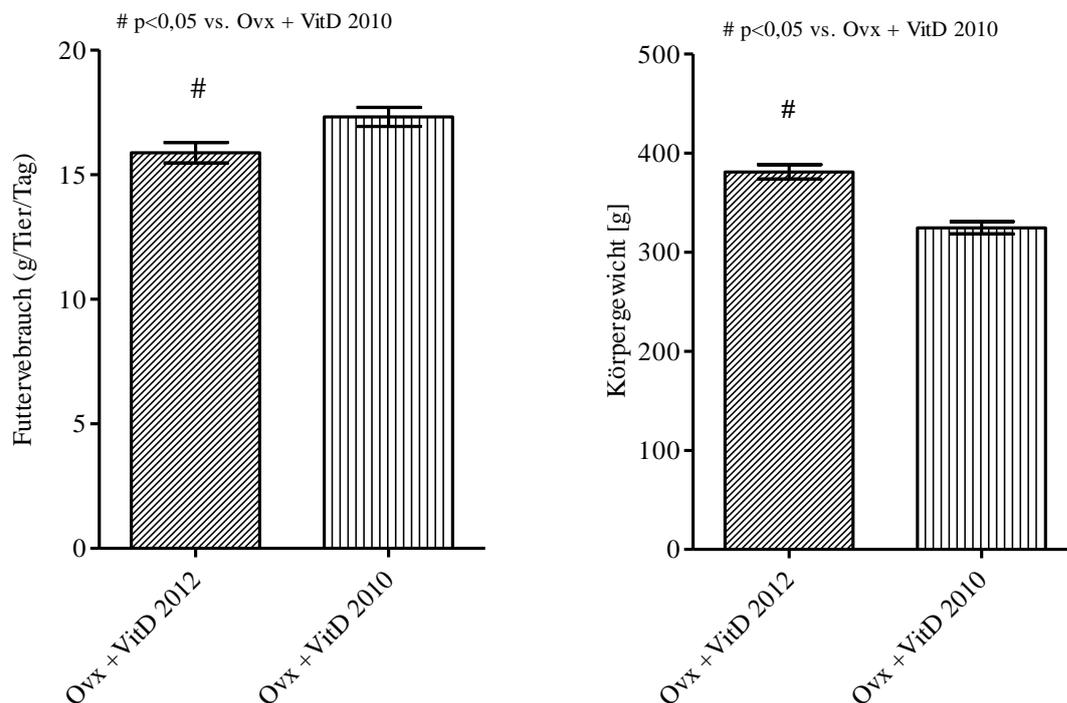


Abbildung 30: Die Effekte des Basisfutters +VitD auf den Futterverbrauch und das Körpergewicht im Vergleich zu den tierexperimentellen Versuchen aus Seidlová-Wuttke et al. 2010 b

Ovx +VitD 2012 = Ovx-Tiere aus der vorliegenden Dissertation mit dem Basisfutter +VitD

Ovx +VitD2010 = Ovx-Tiere aus der Kontrollgruppe mit dem Basisfutter +VitD, ohne Zusatzsubstanzen aus Seidlová-Wuttke et al. 2010 b.

4. Diskussion

Der zugrunde liegende Tierversuch, die Messungen sowie die statistische Analyse der Ergebnisse dienten dazu, mögliche positive Wirkungen von Ecd und VitD auf den osteoporotischen Knochen von ovx-Ratten darzustellen. Positive Effekte durch Ecd konnten schon in vorherigen Versuchen, sowohl in der Abteilung Experimentelle Endokrinologie des Universitätsklinikums Göttingen, als auch in anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Kapur et al 2010, Seidlová-Wuttke et al. 2010 a/b). Wirkungen von VitD sind seit Langem ein fester Bestandteil in der Osteoporose-Therapie (DVO 2009, NOF 2010).

Ein zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit soll es sein, den Knochen als Teil eines komplexen metabolischen Systems zu betrachten. Dabei wurden die Einflüsse eines Östrogenmangels auf das Metabolische Syndrom in Zusammenhang mit Osteoporose, im Sinne eines Metabolischen Syndroms des Knochens, untersucht. Folgend sollen die Resultate der Testsubstanzen Ecd und VitD mit denen in der Literatur verglichen und mögliche Ansätze für Effekte am Knochen in Zusammenhang mit metabolischen Prozessen bzw. Veränderungen gebracht und diskutiert werden. Des Weiteren soll sich der Frage angenommen werden, ob Ecd in der Lage ist, die in der Literatur beschriebenen und in der Therapie von Osteoporose genutzten Wirkungen von VitD (DVO 2009, NOF 2010) zu imitieren, zu unterstützen oder sogar zu ersetzen. Ebenso sollen mögliche Wirkungsansätze der beiden Substanzen aufgeführt und miteinander verglichen werden.

4.1 Osteoporose - der Einfluss des Östrogenmangels

In dem vorliegenden Tierexperiment wurde die Ratte als Versuchstier gewählt, da sie als anerkanntes Modell für die Darstellung von osteoporotischen Veränderungen am Knochen gilt (Turner et al. 2001). Da die Ratte unter physiologischen Umständen kein Klimakterium entwickelt, wurden die Ratten ovx, sodass ein postmenopausaler Zustand imitiert wurde. Der Einfluss des Östrogens bzw. das Fehlen des Östrogens nach Ovx zeigte erwartungsgemäß deutliche Auswirkungen auf den Knochen der Ratte.

Die ovx-Tiere der Negativkontrollgruppe Ovx -VitD, die das reine Basisfutter ohne Zusatzsubstanzen verabreicht bekommen haben, zeigten im Vergleich mit den intakten Tieren deutliche Verluste in ihrer Knochenqualität. Die intakten Tiere wiesen ein im Verhältnis zum Fettgewebe dreimal so hohen Anteil von Knochentrabekel auf. Im Gegensatz dazu drehte sich

das Verhältnis bei der Negativkontrollgruppe Ovx -VitD nahezu um. Auch ein Verlust des roten Knochenmarks zugunsten von Fettgewebe war deutlich zu erkennen. Beim direkten Vergleich des prozentualen Anteils von Knochen trabekel im Verhältnis zu Fettgewebe und rotem Knochenmark zeigte sich ein Unterschied von 16,83 Prozent bei den intakten Tieren zu 6,52 Prozent bei den Tieren der Gruppe Ovx -VitD. Auch die Knochenmarker im Serum spiegelten die 1998 von Riggs et al. beschriebenen Veränderungen wider. Im Vergleich mit den intakten Tieren zeigte sich eine deutliche Zunahme der Rat-Laps-Werte, die von einer kompensatorischen, aber niedrigeren Erhöhung der Osteokalzin-Werte im Serum begleitet wurde. Somit weisen die Knochenmarker im Serum eine Gleichgewichtsverlagerung auf, bei der das Gleichgewicht vom Knochenauf- und -abbau zugunsten von Knochenabbau verschoben wurde und es zu einer Rarefizierung des Knochens im Sinne der Osteoporose kam. Bei der Breite der Kortikalis zeichnete sich eine mäßige Verdickung ab, die nicht signifikant gegenüber der Breite der intakten Tiere, aber signifikant im Vergleich mit der Gruppe Ovx E2 +VitD war. Gleiches gilt für die Breite der Epiphysenfuge, bei der ein signifikanter Unterschied gegenüber der Gruppe Ovx E2 -VitD zu sehen war. Beides könnten Zeichen einer Kompensation des trabekulären Knochenverlusts sein. Eine Zunahme bzw. Abnahme des Gelenkknorpels konnte nicht beobachtet werden.

Um den Verlust der Knochenqualität auf das Fehlen der ovariellen Funktion stärker hervorzuheben, ist es möglich, einen Vergleich mit der Kontrollgruppe Ovx E2 -VitD zu ziehen. Die Tiere der Gruppe Ovx E2 -VitD bekamen das gleiche Basisfutter wie die Gruppe Ovx -VitD und zusätzlich 10 mg E2 pro kg Futter pro Tag. Allein durch die orale Gabe von E2 konnte signifikant der Verlust der Knochenqualität abgemildert werden. So kann die entstandene Osteoporose bei den ovx-Tieren der Gruppe Ovx -VitD als postmenopausal definiert werden. Die Resultate zeigen auch, dass die Gabe von Östrogenen gemäß einer HRT den größten Benefit von allen in diesem Versuch benutzten Substanzen erbrachte. Aufgrund der unselektiven Wirkungen der weiblichen Sexualhormone führt jedoch eine HRT zu einer Risikoerhöhung für kardiovaskuläre Ereignisse und einem erhöhten Auftreten von Mammakarzinomen (Rossouw et al. 2002, Manson et al. 2003), sodass eine therapeutische Applikation bei der Therapie der Osteoporose kritisch gesehen werden muss und deshalb die Suche nach alternativen Therapieansätzen weiter im Interesse der Forschung liegt.

4.2 Osteoporose - das Metabolische Syndrom des Knochens

In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass nicht nur die klassischen Mechanismen wie Alterserscheinungen, intrinsische und extrinsische Risikofaktoren sowie der postmenopausale Zustand der Frau eine ungünstige Rolle bei der Entstehung von Osteoporose spielen. Es zeichnet sich immer mehr ein negativer Einfluss von Parametern des Metabolischen Syndroms auf die Knochenqualität ab (Hsu et al. 2006, Hwang und Choi 2009, Russel et al. 2010, Cao 2011). Erhöhte Leptin-Werte, eine Dyslipidämie, viszerale und intraossäre Fettleibigkeit, Übergewicht, Insulinresistenzen und ein proinflammatorisches Milieu konnten mit schlechter Knochendichte assoziiert werden. Somit konnte das Metabolische Syndrom als Risikofaktor für die Osteoporose deklariert werden. Erschwerend hinzu kommt, dass das Risiko, am Metabolischen Syndrom zu erkranken, bei Frauen in der Menopause um 60 Prozent erhöht ist (Carr 2003). Auch in diesem Versuch konnte ein Zusammenhang zwischen dem Metabolischen Syndrom, dem ovariellen Funktionsverlust und schlechter Knochenqualität dargestellt werden.

Bei der Analyse der ovx-Ratten fiel auf, dass die Tiere der Negativkontrollgruppe Ovx -VitD im Vergleich mit den intakten Tieren bei ähnlichem Futterverbrauch ihr Körpergewicht signifikant steigerten. Während die intakten Tiere im Laufe des Versuchs im Mittel 38,5 g zunahmen, nahmen die Tiere der Gruppe Ovx -VitD 105,4 g zu. Dies deutet darauf hin, dass sich der Stoffwechsel bzw. der Energiehaushalt im Körper der Ratten aufgrund der ausbleibenden Stimulation der Östrogene veränderte: Auf der einen Seite erkennbar an dem mikroskopisch sichtbaren Verlust der Knochentrabekel auf Kosten von Fettgewebe und auf der anderen Seite anhand der Veränderungen des Energiehaushalts. Die Ovx führte bei den Ratten zu einem signifikanten Anstieg der Leptin- und Cholesterin-Werte. Die Gabe von E2 verhinderte dies. So kann im Einklang mit der Literatur angenommen werden, dass die Östrogene nicht nur einen direkten Effekt auf den Knochen haben, sondern auch Einflüsse auf metabolische Prozesse nehmen und zusätzlich indirekt den Knochen schützen. Durch die Ovx fällt der Einfluss auf die mesenchymalen Vorläuferzellen weg, sodass diese sich vermehrt in Richtung Adipozyten entwickeln (Okazaki et al. 2002). Ferner kommt es zu einer Verschiebung des Unterhautfettgewebes zu viszeralem Fett sowie einer Verfettung des Knochens und so zu einer verstärkten Ausschüttung von Adipokinen, die einen Anstieg von Leptin- und Cholesterin-Werten erklären (Carr 2003, Fontana et al. 2007). Beide Werte sind assoziiert mit schlechterer Knochenqualität (Russel et al. 2010).

Die Veränderungen des Energiestoffwechsels und die starke Gewichtszunahme entsprechend dem Metabolischen Syndrom, die mikroskopisch sichtbare Verfettung der Metaphyse auf Kosten trabekulärer Strukturen sowie die kompensatorische Verbreiterung der Kortikalis und der Epiphysenfuge zeigen, dass die Qualität des Knochens in seiner Gesamtheit abnimmt. Dies lässt die Annahme zu, dass man von einem Metabolischen Syndrom des Knochens sprechen kann. Da das Östrogen direkt auf die Knochenzellen und indirekt über metabolische Prozesse Einfluss auf die Entstehung von Osteoporose nimmt, ist die Menopause einer der wichtigsten Faktoren für die Entstehung und das Voranschreiten des Metabolischen Syndroms des Knochens. So sollte langfristig ein Therapieansatz gefunden werden, der den Wegfall der Östrogene nicht nur direkt am Knochen ersetzen kann, sondern zudem Einfluss auf lipotoxische Effekte nimmt und den Risikofaktor Metabolisches Syndrom reduziert.

4.3 Testsubstanzen

4.3.1 Ecdyson

Das in Insekten vorkommende Hormon Ecd fiel schon in den letzten Jahrzehnten durch anabolische Wirkungen an Muskel und Knochen auf (Kapur et al 2010, Seidlová-Wuttke et al. 2010 a/b). Zudem wurden positive Wirkungen auf den Lipid- und Glukosehaushalt ermittelt (Dinan und Lafont 2006). Gleichzeitig konnten jedoch Wirkungsmechanismen aufgrund des fehlenden Rezeptors für Ecd bei Säugetieren nicht genauer untersucht werden (Dinan und Lafont 2006). Unter Berücksichtigung dieser Daten wurde der vorliegende Versuch mit der Annahme eines möglichen präventiven bzw. therapeutischen Ansatzes zur Behandlung der Osteoporose im Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom durchgeführt und ausgewertet. Weiterhin soll ein möglicher Ansatzpunkt der Wirkungen von Ecd diskutiert und mit denen von VitD verglichen werden.

Bei der Analyse der ovx-Tiere, die als Zusatzsubstanz nur Ecd erhielten (Ovx Ecd -VitD), fiel zunächst auf, dass diese eine deutlich reduzierte Gewichtszunahme im Vergleich zu den Tieren der Negativkontrollgruppe Ovx -VitD aufwiesen. Die Tiere nahmen mit 72,42 g im Durchschnitt signifikant weniger zu als die Tiere der Gruppe Ovx -VitD mit 105,4 g. Zudem zeigte sich, dass die Leptin-Werte im Vergleich mit den intakten Tieren keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. So kann v.a. ein schützender Effekt von Ecd im Hinblick auf die Fettleibigkeit und das Körpergewicht angenommen werden. Diese Annahme konnte nach Auswertungen anderer Arbeiten im Rahmen des Versuches der vorliegenden Dissertation per

qCT der Knochen und mikroskopischer Analyse der Leber gestützt werden. Göke (2013) und weitere Mitglieder der Arbeitsgruppe Experimentelle Endokrinologie (2013) zeigten in Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Effekten, dass Ecd in der Lage war, eine Verfettung der genannten Organe signifikant abzumildern und im Falle der Leber sogar gänzlich zu verhindern.

Darüber hinaus stellte sich heraus, dass die Gelenkknorpel der Tibia bei den ovx-Tieren, die Ecd und VitD zu sich nahmen (Ovx Ecd +VitD), sowie den Tieren, die nur mit Ecd gefüttert wurden (Ovx Ecd -VitD), die deutlich größten Breiten aufwiesen, wobei nur die Ergebnisse der Gruppe Ovx Ecd +VitD einen signifikanten Unterschied gegenüber der Gruppe Ovx E2 +VitD aufwiesen. Zudem konnte eine andere Auswertung der Versuchstiere im beschriebenen Versuch zeigen, dass die Gabe von Ecd zu einer Vergrößerung der Muskelfläche führte (Göke 2013). Bei der zusammenfassenden Betrachtung der oben genannten positiven Einflüsse zeigte sich, dass Ecd in der Lage war, verschiedene Parameter, die Einflüsse auf die Gesamtqualität des Knochens haben (Burr 1997, Cicuttini et al. 2004), zu verbessern.

Ein weiteres Indiz dafür, dass durch Ecd die Qualität des Knochens im Ganzen gestärkt wird, ist das Ausbleiben einer kompensatorischen Verdickung der Kortikalis. So zeigten die Tiere der Negativkontrollgruppen Ovx -VitD sowie die mit VitD behandelten Tiere der Gruppen Ovx +VitD und Ovx Ecd +VitD einen Zuwachs der gemessenen Breite der Kortikalis. Diese kompensatorische Verbreiterung ist womöglich in der Lage, den Schaden von direkten Biegekräften zu reduzieren, entsteht aber auf Kosten der Flexibilität, sodass die Qualität des Knochens in ihrer Gesamtheit abnimmt (Seeman 2008). Des Weiteren spiegelt sich dieser kompensatorische Effekt auch in der Epiphysenfuge wider. Die mit Ecd behandelten Tiere der Gruppe Ovx Ecd -VitD konnten als einzige die physiologischen, prozentualen Anteile der einzelnen Epiphysenfugenabschnitte der intakten Tiere beibehalten. Sie erreichten wie die intakten Tiere in der Hypertrophiezone die niedrigsten und in der Proliferationszone die höchsten gemessenen prozentualen Anteile an der Epiphysenfuge. Da die kompensatorischen Mechanismen ausblieben, scheint es so, als könne Ecd in der Lage sein, durch die Wirkungen an Körpergewicht, Knorpel, Muskelfläche und Fettgewebe eine gewisse Qualität des Knochens aufrecht zu erhalten.

Die erwarteten Ergebnisse von Ecd in der histologischen Auswertung der Metaphysen konnten jedoch nicht erreicht werden. Im Vergleich zu der Gruppe Ovx -VitD stellte der prozentuale Anteil von Knochen trabekel zwar mit 7,82 Prozent zu 6,52 Prozent einen leicht höheren Wert und der Anteil des Fettgewebes mit 18,51 Prozent zu 20,48 Prozent einen

geringfügig niedrigeren Wert dar. Jedoch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zugunsten der mit Ecd gefütterten Tiere. Dieser Verlust spiegelte sich jedoch nicht in der Analyse der Knochenmarker im Serum wider, da die gemessenen Osteokalzin- und Rat-Laps-Spiegel physiologische Werte erreichten und sich keine signifikanten Unterschiede zu den intakten Tieren zeigten. Dennoch konnte Ecd in dem vorliegenden Versuch einen wichtigen Teilaspekt des Metabolischen Syndroms des Knochens, nämlich den einer Verfettung des Knochens auf Kosten trabekulärer Strukturen, nicht verhindern.

So bleibt festzuhalten, dass einige Wirkungen von Ecd, die in der Literatur beschrieben und in vorherigen Versuchen dieser Abteilung gezeigt wurden, nicht reproduziert werden konnten. Seidlová-Wuttke et al. (2010 a/b) beschrieben nach Untersuchungen mithilfe von qCT und Serumanalysen, dass der Verlust der spongiösen Dichte in den ovx-Ratten durch Ecd signifikant abgemildert werden konnte. Hinzu kamen eine Erhöhung des Osteokalzin- und eine Verminderung des Rat-Laps-Spiegels. Des Weiteren legten sie dar, dass Ecd das durch die OvX akkumulierte intraabdominelle Fett reduzieren konnte und signifikant die Serumfette (Cholesterin, Triglyzeride und LDL) senkte. Einen möglichen Erklärungsansatz für das Ausbleiben einiger positiver Wirkungen von Ecd könnte das Futter liefern. Um einen äquivalenten Anteil der Nahrungsbestandteile des Futters zu erstellen, bei dem zum einen ein VitD-Defizit und zum anderen kein VitD-Defizit vorliegt, wurde der Arbeitsgruppe Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen ein neues Basisfutter erstellt (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Dieses erstmals genutzte Basisfutter enthielt einen prozentualen Anteil an Zucker von 12,9 Prozent bzw. 10,8 Prozent und jeweils einen Anteil an Stärke von 46,8 Prozent sowie einen deutlich erhöhten Anteil des Milchproteins Casein. Im Gegensatz dazu wurde bei den vorherigen Versuchsreihen in dieser Abteilung ein Basisfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) mit einem Anteil von 3 Prozent Zucker und 34 Prozent Stärke genutzt sowie weitgehend auf Milchproteine verzichtet (Seidlová-Wuttke et al. 2010 a/b). Dabei stehen zwei wesentliche Aspekte im Vordergrund. Zunächst ist das in dem vorliegenden Versuch genutzte Futter deutlich energiereicher und bildete demnach eine ungünstigere metabolische Grundvoraussetzung der Tiere für eine erfolgreiche Therapie. Ein Beleg dafür ist ein Vergleich der Tiere der Gruppe OvX +VitD in diesem Versuch mit denen aus Seidlová-Wuttke et al. 2010 b, bei dem der Einfluss von Ecd auf metabolische Effekte untersucht wurde. Es zeigte sich, dass nach jeweils dreimonatiger Futterapplikation und gleichen Versuchsbedingungen die Tiere des vorliegenden Versuchs ein signifikant höheres Körpergewicht bei signifikant niedrigerem Futtermittelverbrauch aufwiesen (vgl. Abb. 30 in Kap.

3.7). Durch die vermehrt zugeführte Energie wurde das Körpergewicht und somit die Fettreserven, einschließlich der viszeralen und der intraossären Fettdepots, deutlich erhöht. Dieser Zustand könnte möglicherweise dazu geführt haben, dass vermehrt Adipokine produziert wurden, die in einer Aktivitätsstimulierung von knochenresorbierenden Osteoklasten resultierten (Fontana et al. 2007; Russel et al. 2010). Zudem könnte es zu einer vermehrten Verschiebung bei der Reifung von Osteoblasten und Adipozyten aus gemeinsamen mesenchymalen Stammzellen zugunsten von Fettzellen gekommen sein (Zhao et al. 2008). Dieser futterabhängige Aspekt könnte zusätzlich zu der Ovx die lipotoxischen Effekte im Sinne des Metabolischen Syndroms des Knochens gesteigert haben. Ein Zustand, gegen den sich die intraossären Wirkungen von Ecd nur schwer durchsetzen konnten. Außerdem verglichen Seidlová-Wuttke et al. (2010 a) die Wirkungen von Ecd bei einer täglichen Substanzaufnahme von 18 mg, 57 mg und 121 mg. Die besten Ergebnisse lieferte dabei die Gruppe mit einer Aufnahme von 57 mg Ecd pro Tag. In dem der Arbeit zugrundeliegenden Versuch sollte mit der gleichen täglichen Substanzeinnahme gearbeitet werden, um die bestmöglichen Ergebnisse zu erzielen. Jedoch erreichten die Tiere der Ovx Ecd -VitD nur eine Aufnahme von im Mittel 46,19 mg Ecd pro Tag. Eine Erklärung dafür kann, wie zuvor beschrieben, das Futter liefern. Die Annahme, dass das in dem vorliegenden Versuch vermehrt zugeführte Milchprotein Casein für ein stärkeres Sättigungsgefühl sorgte, kann der Grund dafür sein, dass die erwartete tägliche Substanzaufnahme nicht eingehalten wurde (Abou-Samra et al. 2011).

Schlussendlich zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation und die Ergebnisse aus den anderen Arbeiten mit denselben Tieren, dass einige Wirkungen von Ecd trotz der Einflüsse des Futters beobachtet werden konnten. So sorgen eine reduzierte Gewichtszunahme, ein verbreiteter Gelenkknorpel, vermehrte Muskelmasse und extraossäre, lipolytische Effekte für eine unter dem Aspekt des Metabolischen Syndroms des Knochens gesehene Verbesserung der Gesamtqualität des Knochens. Dies wiederum würde bedeuten, dass eine Therapie oder Prophylaxe mit Ecd v.a. dann einen positiven Effekt zeigen kann, wenn eine ausreichende Dosierung gewährleistet ist und ausgewogene Bewegungs- und Ernährungsgewohnheiten die Basis darstellen würden.

4.3.2 Vitamin D

Das Hormon VitD bzw. die aktive Form Calcitriol ist aufgrund der anabolischen Effekte auf den Knochen mittlerweile zu einem Basis- und Standardmedikament in der Behandlung und

Prävention von Osteoporose geworden und hat Einzug in die meisten Leitlinien gefunden (DVO 2009, NOF 2010). Einfluss nimmt VitD dabei über die Bindung an den VDR und einer Dimerisation mit dem RXR. Dies führt zu einer vermehrten Bildung von RANKL in den Osteoblasten und einer gleichzeitigen Steigerung der renalen sowie intestinalen Kalziumabsorption (DeLuca 2004). Auch konnten Wirkungen von VitD auf Parameter des Metabolischen Syndroms gezeigt werden, die dabei zum Teil über eine Interaktion des VDR mit den PPARs erklärt werden können. So zeigten Kong und Li (2006), dass VitD in vitro in der Lage war über die Blockade von PPAR γ die Adipogenese zu hemmen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Mangel von VitD mit einem höheren Risiko für die Erkrankung an dem Metabolischen Syndrom einhergeht und mit einem erhöhten Auftreten von Übergewicht assoziiert ist (Ford et al. 2005). Interessant für diese Studie ist nun, inwieweit sich die positiven Effekte auf den Knochen durch Veränderungen im Energiehaushalt erklären lassen und in welcher Form sich die Ergebnisse im Vergleich mit Ecd präsentieren.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Gruppe Ovx +VitD, bei der ausschließlich ein VitD-haltiges Basisfutter genutzt wurde, fielen keine signifikanten Unterschiede zu den Tieren der Negativkontrollgruppe Ovx -VitD auf. So konnte VitD die Entstehung eines Metabolischen Syndroms des Knochens nicht verhindern bzw. einzelne Komponenten des Syndroms nicht einmal reduzieren. Der prozentuale Anteil von Knochentrabekel lag nur wenig höher als der Anteil der Gruppe Ovx -VitD. Auch das Verhältnis von Knochentrabekel zu rotem Knochenmark und Fettgewebe sowie die Knochenmarker des Serums zeigten im Vergleich keine signifikanten Unterschiede. Zudem konnten keine Veränderungen am Gelenkknorpel festgestellt werden. Des Weiteren stellte sich eine kompensatorische Verdickung der Kortikalis und eine Erhöhung des prozentualen Anteils der Hypertrophiezone an der Epiphysenfuge ähnlich zu den ovx-Tieren der Gruppe Ovx -VitD dar. Ebenso konnten die in der Literatur beschriebenen metabolischen Effekte, weder auf das Körpergewicht noch auf die Serumwerte für Leptin, Cholesterin und Glukose dargestellt werden.

Die Effekte von VitD präsentierten sich im Gegensatz zu denen in der Literatur. Es zeigten sich in allen Messungen keine signifikanten Verbesserungen, sondern nur positive Tendenzen. Einzig die histologische Auswertung des M. gastrocnemius aus einer anderen Arbeit der vorliegenden Versuchsreihe zeigte im Unterschied zur Gruppe Ovx -VitD, dass VitD in der Lage war, eine Verfettung des Muskels zu verhindern (Arbeitsgruppe Experimentelle Endokrinologie 2013).

Nun stellt sich im Versuch, der die Basis dieser Dissertation bildet, wiederum die Frage, warum VitD die in der Literatur beschriebenen und in den Leitlinien verankerten Wirkungen nicht zeigen konnte. Auch in diesem Fall bietet sich v.a. die Erklärung aufgrund des verwendeten Futters an. So scheint VitD gegen die metabolische Stoffwechsellage der Ratten seine Wirkungen nicht durchsetzen zu können. Eine Ursache für die geringe Wirksamkeit könnte zugleich sein, dass das fettlösliche, lipophile VitD aufgrund des erhöhten Fettgehalts im Organismus schneller aus dem zirkulären Kreislauf gelöst wird, sich in den Fettdepots einlagert und somit wichtige Wirkungen an Knochen, Leber und Niere nicht erreicht werden können (Adams und Hewison 2010).

Bei der Annahme, dass eine Therapie mit Östrogenen die Stoffwechsellage der Ratte verbessert, liegt nun die Vermutung nahe, dass sich in den östrogenbehandelten Tieren (Ovx E2 +VitD) Effekte von VitD darstellen müssten. Bei dem Vergleich der E2-Gruppen mit VitD und VitD-Defizit zeigten sich im direkten Vergleich niedrigere Cholesterin-Werte, eine verbreiterte Hypertrophie- und Reservezone sowie eine größere Gesamtbreite der Epiphysenfuge zugunsten der mit VitD behandelten Tiere. Bei dem individuellen Vergleich der beiden Gruppen mit den intakten Tieren (Intakt +VitD) konnten weitere positive Effekte festgestellt werden. Die Tiere mit VitD und E2 (Ovx E2 +VitD) zeigten als einzige der ovx-Tiere im Vergleich mit den intakten Tieren keinen signifikanten Verlust von Knochen trabekel in der Metaphyse. Weitere positive Effekte konnten für die Gewichtszunahme und den Leptin-Wert dargestellt werden. Außerdem zeigte die Gruppe Oxv E2 +VitD im Gegensatz zu der Gruppe Oxv E2 -VitD im Vergleich mit der Negativkontrollgruppe Oxv -VitD eine schmalere Kortikalis.

So ist zu erkennen, dass es VitD über den VDR bei gesünderer Stoffwechsellage gelingt, einen gewissen Schutz des Knochens zu gewährleisten. Über die Dimerisation mit dem RXR wird hierbei die Bildung von RANKL in den Osteoblasten (DeLuca 2004) sowie eine Aktivierung der Chondroblasten der Epiphysenfuge erzielt (Schwartz et al. 2002, Nilsson et al. 2005). Es kommt zu einer direkten Stimulierung des Knochenaufbaus und zu einer Stimulation der Hypertrophie- und Reservezone der Epiphysenfuge. Wie in der Literatur beschrieben, wurden ebenso Einflüsse auf Parameter des Metabolischen Syndroms sichtbar. Diese Effekte könnten über eine Interaktion des VDRs mit den PPARs erklärt werden.

Insgesamt aber zeigte die Gabe von VitD nicht die erwarteten Resultate bezüglich der Wirkungen auf den Knochen sowie auf metabolische Parameter, sodass ein direkter Vergleich der Resultate mit den Effekten von Ecd erschwert wird.

4.3.3 Ecdyson und Vitamin D im Vergleich

Bei der Gegenüberstellung von Ecd und VitD steht die Frage im Fokus, inwiefern die Substanzen einzelne Aspekte des Metabolischen Syndroms des Knochens positiv beeinflussen können. Des Weiteren stellt sich die Frage nach möglichen individuellen und gemeinsamen Mechanismen dieser Effekte und ob Ecd möglicherweise in der Lage ist, die in den Leitlinien verankerten Wirkungen von VitD zu imitieren, zu ersetzen, oder sogar zu übertreffen.

Bei dem direkten Vergleich der Resultate der Ecd- und VitD-Monotherapien zeigte sich zunächst, dass die mit Ecd behandelten Tiere signifikant weniger an Gewicht zunahmten. Zudem zeigte die Gruppe Ovx Ecd -VitD im Vergleich zu der Gruppe Ovx +VitD physiologische Leptin-Werte. Bei den Glukose-Werten zeigte wiederum die Gruppe Ovx +VitD signifikant niedrigere Werte als die mit Ecd gefütterten Tiere (Ovx Ecd -VitD), während sich bei den Cholesterin-Werten keine Unterschiede zeigten. Beim Hinzuziehen der Resultate weiterer Untersuchungen der vorliegenden Versuchsreihe wurde deutlich, dass Ecd einen lipolytischen Effekt auf die Leber und VitD auf den Muskel hatte (Arbeitsgruppe Experimentelle Endokrinologie 2013), sodass noch deutlicher hervortritt, dass beide Substanzen unterschiedliche Einflüsse auf Bestandteile des Metabolischen Syndroms nehmen.

Bezogen auf die Resultate der rein histologischen Auswertung der Knochen zeigten sich kaum Unterschiede. Sowohl bei den prozentualen Anteilen von Knochentrabekel, Fettgewebe und rotem Knochenmark als auch bei der Breite des Gelenkknorpels fielen keine Unterschiede in den Wirkungen von Ecd und VitD auf. Einzig bei dem Verhältnis von Knochentrabekel zu Fettgewebe konnte die Gruppe Ovx Ecd -VitD im Gegensatz zur Gruppe Ovx +VitD ähnliche positive Wirkungen wie die mit E2 behandelten Tieren der Gruppen Ovx E2 +VitD und Ovx E2 -VitD aufweisen. Ferner zeigte sich bei den mit VitD gefütterten Tieren eine kompensatorische Verdickung der Kortikalis sowie der Epiphysenfuge. Der erhöhte Anteil der Hypertrophiezone an der Epiphysenfuge bei den Tieren der Gruppe Ovx +VitD scheint dabei aber nicht nur kompensatorisch zu sein, sondern wird wohl zudem durch den direkt stimulierenden Einfluss durch VitD auf die Chondroblasten unterstützt (Schwartz et al. 2002, Nilsson et al. 2005). Bei der Analyse der Knochenmarker im Serum konnten wiederum beide Substanzen einen physiologischen Osteokalzin-Wert vorweisen und somit einen kompensatorischen Anstieg verhindern. Einen physiologischen Rat-Laps-Wert konnte allerdings nur die Ecd-Monotherapie aufrechterhalten.

So zeigten sich in einigen Auswertungen keine Unterschiede, während sich in anderen Messungen entweder Ecd oder VitD durch einen positiven Effekt auszeichnen konnten. Diese positiven, individuellen Effekte konnten jedoch bei der Kombinationstherapie von Ecd und VitD in den meisten Fällen nicht aufrechterhalten werden. Die positiven Effekte auf das Körpergewicht, die Leptin- und Rat-Laps-Spiegel verloren sich, während sich die Effekte auf die Cholesterin-, Glukose- und Osteokalzin-Werte sowie auf die prozentualen Anteile von Knochen trabekel und Fettgewebe nicht veränderten. Schlechter als die individuellen Effekte präsentierten sich dagegen die Wirkungen auf den prozentualen Anteil des roten Knochenmarks. Die einzig positiven Wirkungen einer Kombinationstherapie aus Ecd und VitD konnten bei der Analyse des Gelenkknorpels dargestellt werden. Hier erreichte die Gruppe Ovx Ecd +VitD die größte Breite.

Dementsprechend haben Ecd und VitD, im Hinblick auf den Schutz der komplexen Knochenqualität, zum einen individuelle und ergänzende Vorteile in ihren Wirkungsansätzen und zum anderen aufhebende Effekte. Zusammenfassend stellte sich heraus, dass die Wirkungen von Ecd und VitD rein histologisch keine Unterschiede zeigten, jedoch bei der Betrachtung der Knochenqualität im Ganzen einzelne Vorteile bei der Gabe von Ecd zu erkennen waren. Ecd zeigte bessere Ergebnisse in Bezug auf das Körpergewicht, den Leptin-Wert und die Breite des Gelenkknorpels. Die Resultate der weiteren Auswertungen aus der Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit, die einen lipolytischen Effekt an der Leber sowie eine Zunahme der Muskelmasse zeigten, können einzelne Vorteile von Ecd gegenüber VitD komplettieren. Des Weiteren blieb eine kompensatorische Verbreiterung der Kortikalis und der Epiphysenfuge aus, sodass von einer Erhöhung der Qualität des Knochens durch Ecd, im Sinne einer positiven Einflussnahme auf das Metabolische Syndrom des Knochens, gesprochen werden kann. Eine Reduzierung der Zunahme des Körpergewichts kann eine vermehrte Mobilität ermöglichen und demnach zu einer vermehrten Reizung der mechanosensiblen Osteozyten führen, die wiederum für eine Stimulation des Knochenaufbaus sorgen (Chan et al. 2009). Ferner können durch die Aufrechterhaltung bzw. Verstärkung des Gelenkknorpels und der Zunahme der Muskelmasse weitere Qualitätsfaktoren des Knochens gesichert bzw. verstärkt werden (Cicuttini et al. 2004, Zhang et al. 2006, Burr 1997).

Als hypothetischer Erklärungsansatz für die positiven Effekte von Ecd scheint eine Interaktion von Ecd mit dem RXR (Dinan und Lafont 2006) oder direkt mit dem VDR möglich. Ecd könnte durch die Bindung an den RXR und über eine Dimerisation mit dem Komplex VitD/VDR, den PPARs oder über die direkte Bindung an den VDR Einfluss auf die

Genexpression nehmen. So wäre es zum einem denkbar, dass über den VDR direkt an den Osteoblasten die Bildung von RANKL und Osteokalzin stimuliert wird. Zum anderem könnte über die Dimerisation mit den PPARs der Einfluss auf den Energiehaushalt erklärt werden. Hierbei würde eine Dimerisation des Ecd/RXR-Komplexes mit den PPAR γ für eine Hemmung bzw. mit den PPAR α für eine Stimulation der Genexpression sorgen und folglich ein lipolytischer Effekt entstehen (Yamauchi et al 2001, Michalik et al. 2006, Takada et al. 2007). Ein Effekt, der histologisch in der Leber, per qCT im Knochen und per Serum-Leptin-Analyse auch in den Tieren der vorliegenden Versuchsanordnung nachgewiesen werden konnte (Göke 2013, Arbeitsgruppe Experimentelle Endokrinologie 2013). Ebenso kann eine Interaktion von Ecd und RXR bzw. dem VDR und der Dimerisation mit den PPARs für die Verbreiterung des Gelenkknorpels angenommen werden. Hierbei könnte durch die Dimerisation mit den PPARs eine Aktivierung von Chondroblasten zustande kommen, die in einem Aufbau des Knorpels resultieren würde (Bordji et al. 2000, Monemdjou et al. 2012). Unterstützt wird diese These durch eine weitere Auswertung der Versuchstiere. Dabei konnte eine vermehrte Expression von PPARs-Gamma-Co-Aktivatoren in den mit Ecd behandelten Tieren nachgewiesen werden (Castor 2013). Des Weiteren könnte auch die Erhöhung der Muskelmasse über eine Interaktion des Ecd/VDR-Komplexes bzw. des Ecd/RXR-Komplexes mit den PPAR δ erklärt werden. Ehrenborg und Krook (2009) konnten die Relevanz der PPARs im Muskelmetabolismus zeigen. Dabei könnte über die Stimulierung der PPAR δ die Muskelfläche erhöht werden und durch die vermehrte Masse die mechanische Stimulation der Knochen zunehmen, was in einer Verbesserung der Knochenqualität resultieren würde.

Doch trotz möglicher Interaktionen mit dem RXR, dem VDR, der Dimerisation mit den PPARs und der positiven Effekte von Ecd auf das Metabolische Syndrom sowie auf Teilaspekte der Knochenqualität zeichneten sich keine signifikanten Verbesserungen bei der histologischen Analyse der Metaphyse ab. Bei der Annahme, dass die Effekte von Ecd über den RXR bzw. den VDR erreicht werden, stellt sich nun die Frage, warum Ecd extraossäre, lipolytische Effekte sowie anabole Wirkungen an Knorpel und Muskel bewirken konnte, jedoch keine Effekte an der Metaphyse des Knochens erzielte. Des Weiteren stellte sich die Frage, warum die beschriebenen Wirkungen in einer Kombinationstherapie mit VitD nicht aufrechterhalten werden konnten. Ursache könnte zum einen sein, dass die Bindung von Ecd an den RXR und den VDR einer selektiven Rezeptormodulation unterliegt. Diese Rezeptormodulation könnte möglicherweise durch die Lokalisation der Interaktionen sowie durch variable Dimerisationspartner in ihrer Sensibilität verändert werden. Zum anderen scheint es

so, als könnte es sich bei Ecd und VitD um kompetitive Agonisten handeln. So könnten Ecd und VitD um dieselben Rezeptoren bzw. Dimerisationspartner konkurrieren, je nach Lokalisation bzw. Selektivität der Rezeptoren aber ein unterschiedliches Ausmaß an Wirkung erzielen. Beispielsweise könnten die PPARs, die an der Regulation des Körpergewichts beteiligt sind, möglicherweise deutlich sensibler für Ecd sein, während eine Interaktion mit den PPARs in Bezug auf den Glukosestoffwechsel eine erhöhte Sensitivität für VitD aufweisen könnte. Eine Dimerisation des VDRs und des RXRs an den Knochenzellen sowie eine Dimerisation mit den PPARs des Gelenkknorpels würden derweil für beide Substanzen ähnlich selektiv sein. Folglich könnte eine lokalisationsabhängige Effektvariabilität entstehen, die aufgrund eines kompetitiven Agonismus der Substanzen für eine Verbesserung oder Aufhebung individueller Effekte sorgt. Des Weiteren kann die Hypothese einer gemeinsamen Wirkungsverstärkung durch eine mögliche Dimerisation von Ecd/RXR und VitD/VD nicht bekräftigt werden, da die Kombinationstherapie keine Verbesserungen in Bezug auf die Knochenqualität und das Metabolische Syndrom erreichte. Dennoch scheint es möglich, dass die Wirkungen von Ecd über die Interaktionen mit dem RXR, dem VDR und den PPARs erklärt werden können.

Eine lückenlose Interpretation der Werte wird aber durch den Einfluss des Futters und den damit einhergehenden schwächeren Effekten durch beide Substanzen erschwert. So empfiehlt es sich, weitere Versuche mit energie- und milchproteinärmerem Futter und den erforderlichen täglichen Substanzkonzentrationen durchzuführen. Nichtsdestotrotz zeigen die Resultate der vorliegenden Dissertation, dass Ecd die Wirkungen von VitD zum Teil imitieren, zum Teil nicht erreichen, aber v.a. durch zusätzliche Ansatzpunkte in Bezug auf die Komplexität der Knochenqualität ergänzen kann. So kann nach der Analyse dieser Ergebnisse und in Übereinstimmung mit den Resultaten aus früheren Studien festgehalten werden, dass Ecd eine gute Ergänzung zu der Therapie mit VitD darstellen könnte. Als nebenwirkungsarmes Phytopharmakon könnte es in präventiver und therapeutischer Hinsicht der Qualität des Knochens als komplexes Konstrukt aus mineralisierter Matrix, Knorpel, Muskel und metabolischen Einflussgrößen, einen weiteren Schutz bieten, um den sicheren Verlust der Knochenqualität durch die Menopause abzumildern.

5. Zusammenfassung

Im Laufe der nächsten Jahre wird im Zuge der Bevölkerungsentwicklung in Deutschland die Anzahl der Frauen, die in die Menopause kommen, ungemein ansteigen. Darüber hinaus verlängert sich aufgrund der steigenden Lebenserwartung der Zeitraum, in dem die Frauen einer fehlenden Produktion der weiblichen Sexualhormone ausgesetzt sind. Gleichzeitig steigt aufgrund des Lebenswandels, im Sinne einer schlechteren Ernährung und einer verminderten körperlichen Aktivität im Alltag, die Prävalenz des Metabolischen Syndroms. Unabhängig davon erhöht sich für Frauen nach der Menopause ohnehin das Risiko, an dem Metabolischen Syndrom zu erkranken. So entsteht eine metabolische und hormonelle Grundlage, die die Zahl der an Osteoporose erkrankten Menschen steigen lassen wird. Dabei spielt der fehlende Einfluss der Östrogene, als wichtigster Risikofaktor, die größte Rolle. Aber auch der Einfluss des Metabolischen Syndroms bei der Entstehung von Osteoporose gewinnt seit einigen Jahren immer mehr an Bedeutung. Folglich wird die steigende Zahl der an Osteoporose erkrankten Frauen für eine Erhöhung des Risikos für Frakturen sorgen, die mit langanhaltenden Aufenthalten in Krankenhäusern und einem möglichen Verlust der Selbständigkeit einhergehen. Folgen, die auch eine sozioökonomische Relevanz haben.

Eine effektive HRT stellt durch die Erhöhung des Risikos für kardiovaskuläre Erkrankungen und für die Entstehung von Tumoren der Mammae mittlerweile keine risikoarme Alternative mehr für die Therapie der Osteoporose im Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom dar. Ein Zusammenhang, der durch die derzeit genutzten Medikamente nicht aufgegriffen wird. Ein neuer Ansatz der Therapie könnte nun sein, die Osteoporose unter dem Aspekt des Metabolischen Syndroms des Knochens zu betrachten und so die Qualität des Knochens in seiner ganzen Komplexität zu schützen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die in der Literatur beschriebenen Effekte von Ecd auf den Energiehaushalt und auf den postmenopausalen Knochen, im Sinne des Metabolischen Syndroms des Knochens, miteinander zu verknüpfen. Aus diesen Erkenntnissen wurde versucht, einen risikofreien, phytopharmakologischen Ansatz in der Prävention bzw. der Therapie von Osteoporose im Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom zu finden. Des Weiteren diente dieser Versuch dazu, die Wirkungen von Ecd mit den anerkannten Wirkungen von VitD zu vergleichen. Vor diesem Hintergrund wurden 67 Sprague-Dawley-Ratten in sechs verschiedene Futtergruppen (Intakt +VitD; Ovx -VitD; Ovx +VitD; Ovx Ecd -VitD; Ovx E2 -VitD; Ovx Ecd +VitD; Ovx E2 +VitD) eingeteilt, 60 davon

ovx. Alle Gruppen wurden anschließend für drei Monate mit sojafreiem Basisfutter gefüttert. Wie erwartet entwickelten die ovx-Ratten osteoporotische Knochen und ein Metabolisches Syndrom. Übergewicht, Dyslipidämie und lipotoxische Effekte in der Metaphyse auf Kosten trabekulärer Strukturen sowie kompensatorische Veränderungen der Kortikalis und der Epiphysenfuge bestätigen dabei die These, dass von einem Metabolischen Syndrom des Knochens gesprochen werden kann.

Die Gabe von Ecd konnte bei der histologischen Auswertung die aus Versuchen der Abteilung Experimentelle Endokrinologie des Universitätsklinikums Göttingens beschriebenen lipolytischen Effekte zugunsten von Knochen trabekel in der Metaphyse nicht reproduzieren, sodass die Resultate dieses Teilaspekts des Metabolischen Syndroms des Knochens hinter den Erwartungen zurückblieben. Als Grund dafür kann das umgestellte Futter angenommen werden, welches aufgrund des höheren Energiegehalts schlechtere metabolische Grundvoraussetzungen schuf. Weiterhin konnte durch die erhöhte Menge von Milchproteinen im Futter und dem dadurch entstandenen Sättigungsgefühl die Zieldosis von mindestens 57 mg/d pro Ratte nicht erreicht werden. Bis auf die Zieldosis gilt gleiches auch für die mit VitD behandelten Tiere, sodass für weitere vergleichende Versuche zwischen Ecd und VitD ein energie- und milchproteinärmeres Futter genutzt werden sollte.

Doch trotz der Nutzung eines metabolisch ungünstigeren Futters zeichneten sich auch positive Wirkungen ab. Ecd konnte in der vorliegenden Arbeit die Entstehung von Übergewicht deutlich reduzieren und eine Erhöhung der Leptin-Werte, der Rat-Laps-Werte sowie eine kompensatorische Verbreiterung der Kortikalis und der Epiphysenfuge verhindern. Weiterhin konnte die Gesamtqualität des Knochens durch eine Erhöhung der Breite des Gelenkknorpels der Tibia gestärkt werden. Gegenüber den Effekten von VitD stellte sich heraus, dass Ecd in den genannten positiven Effekten deutliche Vorteile hatte. VitD konnte dagegen bessere Resultate bei den Glukose-Werten erreichen. Des Weiteren konnte eine Kombinationstherapie aus Ecd und VitD nur die Breite des Gelenkknorpels verbessern, während die meisten positiven Ergebnisse aus den Monotherapien nicht aufrechterhalten werden konnten.

Ein möglicher Ansatz für die Erklärung der Effekte von Ecd könnte die Interaktion mit dem VDR bzw. dem RXR und einer darauffolgenden Dimerisation mit den PPARs liefern. Dabei könnten die extraossären lipolytischen Effekte sowie die Verbreiterung des Gelenkknorpels durch eine Regulation der Genexpression über die PPARs erklärt werden. Angenommen werden kann auch, dass die Wirkungen an den Knochenzellen über die Dimerisation mit dem VDR zustande kommt. Ähnlich bzw. über gleiche Signalübertragungswege kann der

Wirkungsansatz von VitD erklärt werden. Jedoch zeigten die Auswertungen der Ergebnisse unterschiedliche Effekte von Ecd und VitD in Bezug auf das Metabolische Syndrom. Bezogen auf die Metaphyse zeigten weder Ecd noch VitD positive Effekte. So entsteht die Vermutung, dass es sich bei Ecd und VitD um kompetitive Agonisten handelt. Dabei könnte angenommen werden, dass die Bindung an den RXR, den VDR oder den PPARs einer selektiven Rezeptormodulation unterliegt, die beispielsweise durch die jeweiligen Liganden, die Dimerisationspartner und durch die Lokalisation in ihrer Sensibilität verändert wird. Es entsteht demnach eine lokalisationsabhängige Effektvariabilität, die in diesem Versuch Vorteile der Wirkung von Ecd gegenüber der Wirkung von VitD zeigte.

So könnte Ecd als nebenwirkungsarmes Phytopharmakon eine mögliche Ergänzung zu VitD zum zusätzlichen Schutz der komplexen Knochenqualität in der Prävention und Therapie des Metabolischen Syndroms des Knochens darstellen.

6. Anhang

6.1 Abbildungen

Abbildung 31: Entwicklung der prozentualen Anteile der Bevölkerung von unter 20, über 65 und über 80 Jahre alten Menschen in Deutschland

Aus BiB - Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung 2009 (modifiziert)

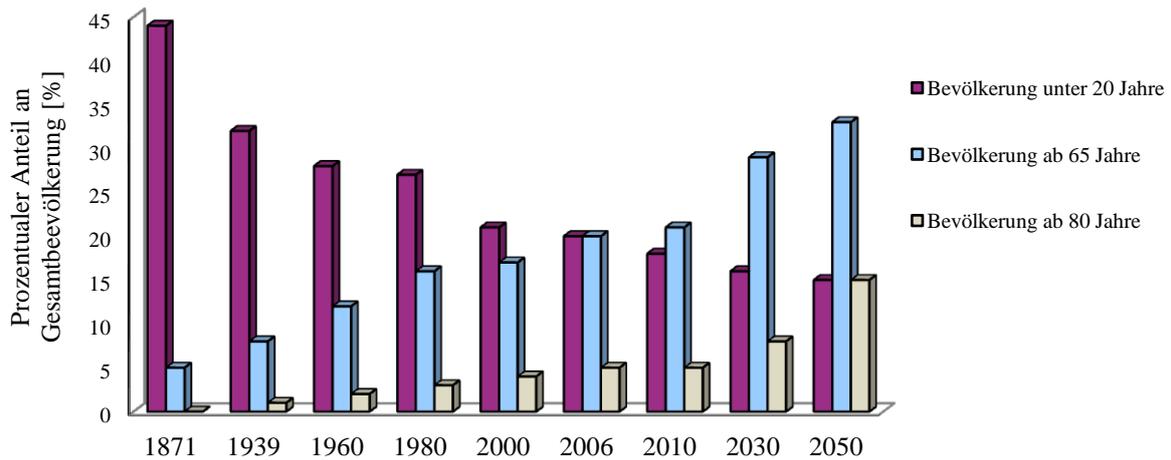
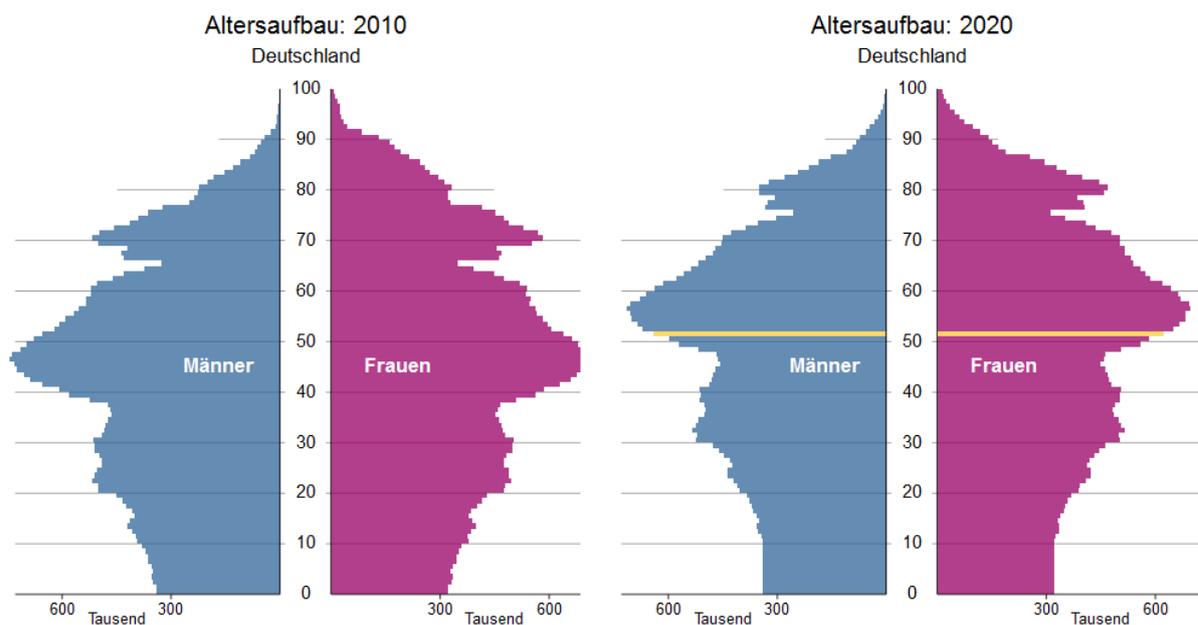


Abbildung 32: Altersaufbau in Deutschland im Jahre 2010 und 2020

Aus Statistisches Bundesamt 2009 (modifiziert)

Das durchschnittliche Alter der Frau bei Eintritt in die Menopause beträgt 51 Jahre, sodass bei der derzeitigen Bevölkerungsentwicklung angenommen werden kann, dass 2020 schätzungsweise 640.000 Frauen in die Menopause kommen werden.



6.2 Tabellen

Tabelle 4: Risikofaktoren für die Entstehung einer Osteoporose

Aus Vokes und Favus 2010 (modifiziert)

Lebensstilfaktoren	Genetische Faktoren	Medikamente
● Rauchen	● <i>Peak Bone Mass</i>	● Glukokortikoide
● Alkoholkonsum	● Weibliches Geschlecht	● Immunsuppressiva bei Organtransplantation
Aktivitätslevel	● Ethnie (Weiß, Asiatisch)	● GnRH-Agonisten, Aromataseinhibitoren
● Herabgesetzte physische Aktivität	● Positive Familienanamnese für Nierensteine	● Antikonvulantien
● Immobilisation	● Positive Familienanamnese für Knochenbrüche und einer niedrigen BMD	
Ernährungsgewohnheiten	Pubertäre Entwicklung	Gynäkologische Faktoren
● Starke Gewichtsreduzierung	● Fehlentwicklungen	● Irreguläre Menstruation
● Geringe Kalziumzufuhr	● Anorexia während der Pubertät	● Infertilität
● Geringe Vitamin-D-Zufuhr		● Einnahme von oralen Kontrazeptiva
● Übermäßige Zufuhr von Salz und tierischen Proteinen		

Tabelle 5: WHO Definition für die Diagnosestellung des Metabolischen Syndroms

Aus Beilby 2004 (modifiziert)

Insulin-Resistenz, definiert durch:

- Diabetes Mellitus Typ II
- gestörte Nüchtern-Glukose-Werte
- gestörte Glukose-Toleranz
- oder bei normalen Nüchtern-Glukose-Werten (<6.1 mmol/l) eine Glukose-Aufnahme, die unter hyperinsulinämischen, euglykämischen Zuständen niedriger ist als die kleinste Quartile der Hintergrundpopulation

Plus mindestens zwei der folgenden Kriterien:

- Antihypertensive Therapie und/oder Bluthochdruck (≥ 140 mm Hg systolisch, ≥ 90 mm Hg diastolisch)
- Plasma-Triglyzeride ≥ 1.7 mmol/l
- BMI > 30 kg/m² und/oder Bauch/Hüft-Verhältnis $> 0,9$ bei Männern, $> 0,85$ bei Frauen
- Renale Albumin-Filtration ≥ 20 μ g/min, oder Albumin/Kreatinin-Verhältnis $\geq 3,4$ mg/mmol

Tabelle 6: Ssniff EF R/M Kontrolle

Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest

Zusammensetzung des Basisfuttermittels mit normalem Vitamin-D3-Anteil

Rohnährstoffe	[Prozent]	Mineralstoffe	[Prozent]
Trockensubstanz	95,2	Kalzium	0,9
Rohprotein	20,8	Phosphor	0,63
Rohfett	4,2	Natrium	0,19
Rohfaser	5	Magnesium	0,21
Rohasche	5,6	Kalium	0,97
N-freie Extraktstoffe	59,4		
Stärke	46,8	Energie	[MJ/kg]
Zucker	10,8	Bruttoenergie	18
Vitamine	per kg	Spurenelemente	per kg
Vitamin A	15.000 IE	Eisen	166 mg
Vitamin D3	1.500 IE	Mangan	98 mg
Vitamin E	150 mg	Zink	65 mg
Vitamin K	20 mg	Kupfer	14 mg
Vitamin C	30 mg	Iod	1,2 mg
Thiamin (B1)	16 mg	Selen	0,14 ng
Riboflavin (B2)	16 mg	Cobalt	0,15 mg
Pyridoxin (B6)	18 mg		
Cobalamin (B12)	30 µg	Aminosäuren	[Prozent]
Nicotinsäure	49 mg	Lysin	1,71
Pantothensäure	56 mg	Methionin	0,73
Folsäure	19 mg	Met+Cys	0,82
Biotin	310 µg	Threonin	0,93
Cholin-Cl	1.040 mg	Tryptophan	0,27
Inositol	80 mg	Arginin	0,76
		Histidin	0,66
Fettsäuren	[Prozent]	Valin	1,42
C 14:0	0,02	Isoleucin	1,09
C 16:0	0,45	Leucin	2,05
C 16:1	0,02	Phenylalanin	1,11
C 18:0	0,19	Phe+Tyr	2,22
C 18:1	1,07	Glycin	0,43
C 18:2	2,12	Glutaminsäure	4,69
C 18:3	0,26	Asparaginsäure	1,55
C 20:0	0,02	Prolin	2,39
		Alanin	0,68
		Serin	1,24

Tabelle 7: Ssniff EF R/M Vitamin-D3-Defizit

Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest

Zusammensetzung des Basisfuttermittels ohne Vitamin-D3 und mit geringeren Anteilen von Kalzium und Phosphor

Rohnährstoffe	[Prozent]	Mineralstoffe	[Prozent]
Trockensubstanz	95,1	Kalzium	0,34
Rohprotein	20,8	Phosphor	0,22
Rohfett	4,2	Natrium	0,19
Rohfaser	5	Magnesium	0,21
Rohasche	4	Kalium	0,67
N-freie Extraktstoffe	61,2		
Stärke	46,8	Energie	[MJ/kg]
Zucker	12,9	Bruttoenergie	18
Vitamine	per kg	Spurenelemente	per kg
Vitamin A	15,000 IE	Eisen	166 mg
Vitamin D3	< 5 IE	Mangan	98 mg
Vitamin E	150 mg	Zink	65 mg
Vitamin K	20 mg	Kupfer	14 mg
Vitamin C	30 mg	Iod	1,2 mg
Thiamin (B1)	16 mg	Selen	0,14 mg
Riboflavin (B2)	16 mg	Cobalt	0,15 mg
Pyridoxin (B6)	18 mg		
Cobalamin (B12)	30 µg	Aminosäuren	[Prozent]
Nicotinsäure	49 mg	Lysin	1,71
Pantothensäure	56 mg	Methionin	0,73
Folsäure	19 mg	Met+Cys	0,82
Biotin	310 µg	Threonin	0,93
Cholin-Cl	1.040 mg	Tryptophan	0,27
Inositol	80 mg	Arginin	0,76
		Histidin	0,66
Fettsäuren	[Prozent]	Valin	1,42
C 14:0	0,02	Isoleucin	1,09
C 16:0	0,45	Leucin	2,05
C 16:1	0,02	Phenylalanin	1,11
C 18:0	0,19	Phe+Tyr	2,22
C 18:1	1,07	Glycin	0,43
C 18:2	2,12	Glutaminsäure	4,69
C 18:3	0,26	Asparaginsäure	1,55
C 20:0	0,02	Prolin	2,39
		Alanin	0,68
		Serin	1,24

Tabelle 8: Systemkomponenten Technovit 9100 NEU

Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim
 MMA = Methylmethacrylat
 PMMA = Polymerisations-Methylmethacrylat

Bezeichnung	Menge
MMA Basislösung, stab.	1.000 ml
PMMA-Pulver	120 g
Härter 1	8x 1g
Härter 2	10 ml
Polymerisationsregler	5 ml

Tabelle 9: Herstellung der Hartschnittpräparate

Der Fixation mittels Formalinlösung folgt die Dehydratation über eine aufsteigende Alkoholreihe. In drei Präinfiltrationsschritten wird das Gewebe komplett mit Methylmethacrylat (MMA) durchzogen, um danach der Infiltration in Einbettungsformen zugeführt zu werden. Diese mit MMA und den Tibiae gefüllten Einbettungsformen werden luftdicht verschlossen und für 3 Tage bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Schritt	Prozedur	Zeit	Temperatur
Fixation	4% neutral gepufferte Formalinlösung mit 0,1 M Phosphatpuffer	36 h	RT 20° C
Dehydratation 1	Ethanol 70%	24 h	RT 20° C
Dehydratation 2	Ethanol 80%	24 h	RT 20° C
Dehydratation 3	Ethanol 96%	24 h	RT 20° C
Dehydratation 4	Ethanol 100%	24 h	RT 20° C
Dehydratation 5	Ethanol 100%	24 h	RT 20° C
Dehydratation 6	Ethanol 100%	24 h	RT 20° C
Dehydratation 7	Ethanol 100%	24 h	RT 20° C
Intermedium 1	Xylol	24 h	RT 20° C
Intermedium 2	Xylol	24 h	RT 20° C
Präinfiltration 1	Xylol/MMA Basis (stab.) 1:1	24 h	10° C
Präinfiltration 2	MMA Basis (entstab.)	24 h	4° C
Präinfiltration 3	MMA Basis (entstab.) + Härter 1	24 h	4° C
Infiltration	MMA Basis (entstab.) + Härter 1 + PMMA	3 d	4° C

Tabelle 10: Entplastung der in Technovit 9100 NEU eingebetteten Schnitte

In diesem Schritt wurden die polymerisierten und eingebetteten Präparate der Färbung nach Goldner zugänglich gemacht.

Schritt-Nr.	Prozedur	Zeit [min]
1.	3 Behandlungen mit Xylol	Jeweils 20
2.	2 Behandlungen mit 2-Methoxyethylacetat	Jeweils 15
3.	2 Behandlungen mit Aceton	Jeweils 5
4.	2 Behandlungen mit Aqua destillata	Jeweils 2

Tabelle 11: Färbung nach Goldner

Um die histomorphometrische Auswertung des Knochengewebes unter dem Mikroskop zu ermöglichen, wird die Färbung nach Goldner genutzt. Dabei werden die Zellkerne braunschwarz, das Zytoplasma ziegelrot und die Kollagenfasern, wie die des Knochens, grün bis blau dargestellt.

Schritt-Nr.	Prozedur	Zeit [min]
1.	Weigerts Hämatoxylin	10
2.	Spülen unter Leitungswasser	10
3.	2 g Ponceau de Xylidine, 1 g Säurefuchsin, 0,4 ml 1%-ige Essigsäure, 200 ml Aqua destillata	45
4.	Spülen in 1%-ige Essigsäure	1
5.	Kurzes Abspülen mit Aqua destillata	<1
6.	2 g Phosphorwolframsäure, 1 g Orange G, 200 ml Aqua destillata	7
7.	Spülen in 1%-iger Essigsäure	1
8.	0,4 g Lichtgrün, 0,4 ml Essigsäure, 200 ml Aqua destillata	10
9.	Auswaschen mit 1%-ige Essigsäure	1
10.	Entwässern mit 1x 96%-igem Ethanol und 3x mit 100%-igem Ethanol, danach in Xylol	Je 10

7. Literaturverzeichnis

- Abou-Samra R, Keersmaekers L, Brienza D, Mukherjee R, Macé K (2011): Effect of different protein sources on satiation and short-term satiety when consumed as a starter. *Nutr J* 10, 139
- Adams JS, Hewison M (2010): Update in Vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 95(2), 471-478
- Albala C, Yáñez M, Devoto E, Sostin C, Zeballos L, Santos JL (1996): Obesity as a protective factor for postmenopausal osteoporosis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20(11), 1027-1032
- Alberti KG, Zimmet PZ (1998): Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15(7), 539-53.
- Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR (2012): Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir Dig* 25(1), 49-51
- Arbeitsgruppe Experimentelle Endokrinologie: Unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Experimentelle Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen. Persönliche Mitteilung des Verfassers. Göttingen 2013
- Báthori M, Kalász H (2001): Separation methods for phytoecdysteroids. *LC GC Eur* 14(10), 626
- Beilby J (2004): Definition of Metabolic Syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Clin Biochem Rev* 25(3), 195-198
- Bellino FL (2000): Nonprimate Animal Models of Menopause: Workshop Report. *Menopause* 7(1), 14-24
- Benecke A, Vogel H: Übergewicht und Adipositas; in Gesundheitsberichtserstattung des Bundes, Heft 16; Robert-Koch-Institut, Berlin 2003
- BiB - Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung (2009): 1973 – 2008, 35 Jahre bevölkerungswissenschaftliche Forschung am BiB – ein öffentlicher Tätigkeitsbericht. Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung, Wiesbaden 2009
- Bilezikian JP, Matsumoto T, Bellido T, Khosla S, Martin J, Recker RR, Heaney R, Seeman E, Papapoulos S, Goldring SR (2009): Targeting Bone Remodeling for the Treatment of Osteoporosis: Summary of the Proceedings of an ASBMR Workshop. *J Bone Miner Res* 24(3), 373-385

- Bischoff-Ferrari HA, Dietrich T, Orav EJ, Dawson-Hughes B (2004): Positive association between 25-hydroxy vitamin d levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. *Am J Med* 116(9), 634-639
- Bitsakos C, Kerner J, Fisher I, Amis AA (2005): The effect of muscle loading on the simulation of bone remodelling in the proximal femur. *J Biomech* 38(1), 133-139
- Bordji K, Grillasca JP, Gouze JN, Magdalou J, Schohn H, Keller JM, Bianchi A, Dauça M, Netter P, Terlain B (2000): Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes. *J Biol Chem* 275(16), 12243–12250
- Brunader R, Shelton DK (2002): Radiologic bone assessment in the evaluation of osteoporosis. *Am Fam Physician* 65(7), 1357-64
- Burr DB (1997): Muscle Strength, Bone Mass, and Age-Related Bone Loss. *J Bone Miner Res* 12(10), 1547-1551
- Butenandt A, Karlson P (1954): Über die Isolierung eines Metamorphosehormones der Insekten in kristallisierter Form. *Zeitschrift für Naturforschung* 9B, 389–391
- Cao JJ (2011): Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res* 6, 30
- Carr MC (2003): The Emergence of the Metabolic Syndrome with Menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 88(6), 2404 -2411
- Castor J: Fettregulation unter Ecdyson-Gabe bei der ovx-Ratte (vorläufiger Titel einer Dissertation). Persönliche Mitteilung des Verfassers. Göttingen 2013
- Chan ME, Lu XL, Huo B, Baik AD, Chiang V, Guldborg RE, Lu HH, Guo XE (2009): A Trabecular Bone Explant Model of Osteocyte–Osteoblast Co-Culture for Bone Mechanobiology. *Cel Mol Bioeng* 2, 405-415
- Chermnykh NS, Shimanovskii NL, Shutko GV, Syrov VN (1988): The action of methandrostenolone and ecdysterone on the physical endurance of animals and on protein metabolism in the skeletal muscles. *Farmakol Toksikol* 51(6), 57-60
- Chiu KC, Chu A, Go VLW, Saad MF (2004): Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and β cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 79(5), 820-825
- Cicutini F, Wluka A, Davis S, Strauss BJG, Yeung S, Ebeling PR (2004): Association Between Knee Cartilage Volume and Bone Mineral Density in Older Adults Without Osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 43(6), 765-769

- Cummings SR, Martin JS, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A et al. (2009): Denosumab for Prevention of Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N Engl J Med* 361(8), 756-765
- Delmas PD (2000): Do We Need to Change the WHO Definition of Osteoporosis? *Osteoporosis Int* 11(3), 189-191
- Delmas PD (2002): Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 359(9322), 2018-2026
- Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux A-C, Shah AS, Huster WJ, Draper M, Christiansen C (1997): Effects of Raloxifene on Bone Mineral Density, Serum Cholesterol Concentrations, and Uterine Endometrium in Postmenopausal Women. *N Engl J Med* 337(23), 1641-1647
- Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J (2000): The Use of Biochemical Markers of Bone Turnover in Osteoporosis. *Osteoporosis Int* 11, 2-17
- Dempster DW, Lindsay R (1993): Pathogenesis of osteoporosis. *Lancet* 341(8848), 797-801
- DeLuca HF (2004): Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 80(6), 1689-1696
- Dinan L (2001): Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry* 57(3), 325-339
- Dinan L, Lafont R (2006): Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. *J Endocrinol* 191(1), 1-8
- DVO - Dachverband Osteoporose e.V. (2009): Leitlinie 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen. *Osteologie* 4, 304-324
- EFFO - European Foundation for Osteoporosis, NOF - National Osteoporosis Foundation (1997): Who are candidates for prevention and treatment for osteoporosis? *Osteoporosis Int* 7, 1-6
- Ehrenborg E, Krook A (2009): Regulation of Skeletal Muscle Physiology and Metabolism by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ . *Pharmacol Rev* 61(3), 373-393
- Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S (2007): Visceral Fat Adipokine Secretion Is Associated With Systemic Inflammation in Obese Humans. *Diabetes* 56(4), 1010-1013
- Ford ES, Ajani UA, McGuire LC, Liu S (2005) Concentrations of Serum Vitamin D and the Metabolic Syndrome Among U.S. Adults. *Diabetes Care* 28(5), 1228-1230
- Freedman MA (2002): Quality of Life and Menopause: The Role of Estrogen. *J Womens Health (Larchmt)* 11(8), 703-718

- Göke M: Die Wirkung von Ecdyson und Vitamin D auf Knochen- Muskel und Fettgewebe - Auswertung per qCT (vorläufiger Titel einer Dissertation). Persönliche Mitteilung des Verfassers. Göttingen 2013
- Greendale GA, Lee NP, Arriola ER (1999): The menopause. *Lancet* 353(9152), 571-580
- Häussler B, Gothe H, Göl D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D (2007): Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany—the BoneEVA Study. *Osteoporos Int* 18, 77-84
- Heaney RP, Recker RR, Saville PD (1978): Menopausal changes in calcium balance performance. *J Lab Clin Med* 92(6), 953-963
- Hofbauer LC, Schoppet M (2010): Bone Biology Underlying Therapeutic Approaches. *Transl Endocrinol Metab* 1(1), 117 – 148
- Hofbauer LC, Hamann C, Ebeling PR (2010): Approach to the patient with secondary osteoporosis. *Eur J Endocrinol* 162(6), 1009-1020
- Holick MF (2007): Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med* 357(3), 266-281
- Hsu YH, Venners SA, Terwedow HA, Feng Y, Niu T, Li Z, Laird N, Brain JD, Cummings SR, Bouxsein ML et al. (2006): Relation of body composition, fat mass, and serum lipids to osteoporotic fractures and bone mineral density in Chinese men and women. *Am J Clin Nutr* 83(1), 146-154
- Hwang DK, Choi HJ (2009): The relationship between low bone mass and metabolic syndrome in Korean women. *Osteoporos Int* 21(3), 425-431
- Icks PH, Rathmann W, Rosenbauer J, Giani G: Diabetes Mellitus; in Gesundheitsberichtserstattung des Bundes, Heft 24; Robert-Koch-Institut, Berlin 2005
- Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15(3), 175-191
- Kanis JA, Johnell O, Gullberg B, Allander E, Dilsen G, Gennari C, Lopes Vaz AA, Lyritis GP, Mazzuoli G (1992): Evidence for efficacy of drugs affecting bone metabolism in preventing hip fracture. *BMJ* 305, 1124-1128
- Kanis JA, WHO Study Group (1994): Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: Synopsis of a WHO report. *Osteoporosis Int* 4(6), 368-381
- Kapur P, Wuttke W, Jarry H, Seidlová-Wuttke D (2010): Beneficial effects of β -Ecdysone on the joint, epiphyseal cartilage tissue and trabecular bone in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17(5), 350-355

- Karlson P (1966): Ecdyson, das Häutungshormon der Insekten. *Naturwissenschaften* 53(18), 445-453
- Karsdal MA, Bay-Jensen AC, Henriksen K, Christiansen C (2012): The pathogenesis of osteoarthritis involves bone, cartilage and synovial inflammation: may estrogen be a magic bullet? *Menopause Int* 18, 139-146
- Kong J, Li YC (2006): Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol* 290(5), E916-E924
- Lane NE (2006): Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol* 194(2 Suppl), 3-11
- Lee S-K, Lorenzo J (2006): Cytokines regulating osteoclast formation and function. *Curr Opin Rheumatol* 18, 411-418
- Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA (2008): The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. *Comp Med* 58(5), 424-430
- Manolagas SC (2000): Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocr Rev* 21(2), 115-137
- Manson JE, Hsia J, Johnson KC, Rossouw JE, Assaf AR, Lasser NL, Trevisan M, Black HR, Heckbert SR, Detrano R (2003): Estrogen plus Progestin and the Risk of Coronary Heart Disease. *N Engl J Med* 349, 523-534
- Mayes JS, Watson GH (2004): Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev* 5(4), 197-216
- Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S et al. (2006): International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacol Rev* 58(4), 726-741
- Miranda PJ, DeFronzo RA, Califf RM, Guyton JR (2005): Metabolic syndrome: Definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am Heart J* 149(1), 33-45
- Mironova VN, Kholodova YuD, Skachkova TF, Bondar OP, Datsenko ZM (1982): Hypocholesterolemic effect of phytoecdysones during experimental hypercholesterolemia in rats. *Vopr Med Khim* 28(3), 101-105
- Merchenthaler I, Funkhouser JM, Carver JM, Lundeen SG, Ghosh K, Winneker RC (1998): The effect of estrogens and antiestrogens in a rat model for hot flush. *Maturitas* 30(3), 307-316

- Monemdjou R, Vasheghani F, Fahmi H, Perez G, Blati M, Taniguchi N, Lotz M, St-Arnaud R, Pelletier J-P, Martel-Pelletier J et al. (2012): Association of cartilage-specific deletion of peroxisome proliferator-activated receptor γ with abnormal endochondral ossification and impaired cartilage growth and development in a murine model. *Arthritis Rheum* 64(5), 1551-1561
- National Cancer Institute: Structure of Bone tissue; in Cancer Registration & Surveillance Modules. URL 19.07.2012:
<http://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/tissue.html>
- Neuhauser H, Ellert U: Meeting Abstract: Prävalenz des metabolischen Syndroms in Deutschland: eine Sensitivitätsanalyse. 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie, 12. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Epidemiologie. Freiburg im Breisgau. German Medical Science, Köln 2005, URL 19.07.2012:
<http://www.egms.de/en/meetings/gmds2005/05gmds183.shtml>
- Nilsson LO, Boman A, Sävendahl L, Grigelioniene G, Ohlsson C, Ritzén EM, Wroblewski J (1999): Demonstration of estrogen receptor-beta immunoreactivity in human growth plate cartilage. *J Clin Endocrinol Metab* 84(1), 370-373
- Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J (2005): Endocrine Regulation of the Growth Plate. *Horm Res* 64(4), 15-165
- NOF - National Osteoporosis Foundation: Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis, virtuell überarbeitete 2. Auflage. National Osteoporosis Foundation, Washington DC 2010, URL 19.07.2012: <http://www.nof.org/professionals/clinical-guidelines/>
- Okazaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S, Ooka H, Tomiyama H, Sakamoto Y, Matsumoto T (2002): Estrogen Promotes Early Osteoblast Differentiation and Inhibits Adipocyte Differentiation in Mouse Bone Marrow Stromal Cell Lines that Express Estrogen Receptor (ER) α or β . *Endocrinology* 143(6), 2349-2355
- Otaka T, Okui S, Uchiyama M (1969): Stimulation of protein synthesis in mouse liver by ecdysterone. *Chem Pharm Bull* 17(1), 75-81
- Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B (2009): Association between Serum Osteocalcin and Markers of Metabolic Phenotype. *J Clin Endocrinol* 94(3), 827-832
- Poole KES, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Löwik CW, Reeve J (2005): Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J* 19, 1842-1844

- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: Duale Reihe: Biochemie. 2. aktualisierte Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2008
- Reifenstein EC, Albright F (1947): THE METABOLIC EFFECTS OF STEROID HORMONES IN OSTEOPOROSIS. *J Clin Invest* 26(1), 24-56
- Riggs BL, Melton LJ (1986): Involutional Osteoporosis. *N Engl J Med* 314(26), 1676-1686
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ (1998): A Unitary Model for Involutional Osteoporosis: Estrogen Deficiency Causes Both Type I and Type II Osteoporosis in Postmenopausal Women and Contributes to Bone Loss in Aging Men. *J Bone Miner Res* 13(5), 763-773
- Roodman GD (1993): Role of cytokines in the regulation of bone resorption. *Calcif Tissue Int* 53, 94-98
- Rosen HN, Tollin S, Balena R, Middlebrooks VL, Beamer WG, Donohue LR, Rosen C, Turner A, Holick M, Greenspan SL (1995): Differentiating between orchietomized rats and controls using measurements of trabecular bone density: A comparison among DXA, Histomorphometry, and peripheral quantitative computerized tomography. *Calcif Tissue Int* 57(1), 35-39
- Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., Jackson, R.D., Beresford, S.A.A., Howard, B.V., Johnson (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288, 321-333
- Russell M, Mendes N, Miller KK, Rosen CJ, Lee H, Klibanski A, Misra M (2010): Visceral Fat Is a Negative Predictor of Bone Density Measures in Obese Adolescent Girls. *J Clin Endocrinol Metab* 95(3), 1247-1255
- Schwartz Z, Ehland H, Sylvia VL, Larsson D, Hardin RR, Bingham V, Lopez D, Dean DD, Boyan BD (2002): $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ and $24R,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ Modulate Growth Plate Chondrocyte Physiology Via Protein Kinase C-Dependent Phosphorylation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Endocrinology* 143(7), 2775-2786
- Seeman E (2002): Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet* 359(9320), 1841-1850
- Seeman E (2008): Bone quality: the material and structural basis of bone strength. *J Bone Miner Metab* 26(1), 1-8
- Seidlová-Wuttke D, Christel D, Kapur P, Nguyen BT, Jarry H, Wuttke W (2010 a): β -Ecdysone has bone protective but no estrogenic effects in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17(11), 884-889

- Seidlová-Wuttke D, Ehrhardt C, Wuttke W (2010 b): Metabolic effects of 20-OH-Ecdysone in ovariectomized rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 119(3-5), 121-126
- Shulman AI, Mangelsdorf DJ (2005): Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med* 353(6), 604-615
- Slàma K, Lafont R (1995): Insect hormones – ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates. *Eur J Entomol* 92, 355-377
- Sobotta J, Welsch U: *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie*. 2. Auflage; Urban & Fischer, München 2006
- Statistisches Bundesamt: Animierte Alterspyramide im Internet. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2009, URL 03.05.2013: <https://www.destatis.de/bevoelkerungspyramide/>
- Statistisches Bundesamt: Krankheitskosten 2002, 2004, 2006 und 2008; in Fachserie 12 Gesundheit, Reihe 7.2; Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2010
- Syrov VN, Khushbaktova ZA (2001): Experimental study of pharmacotherapeutic effect of phytoecdysteroids and nerobol in toxic liver damage. *Eksp Klin Farmakol* 4(4), 56-58
- Syrov VN, Khushbaktova ZA, Nabiev AN (1992): An experimental study of the hepatoprotective properties of phytoecdysteroids and nerobol in carbon tetrachloride-induced liver lesion. *Eksp Klin Farmakol* 55(3), 61-65
- Takada I, Suzawa M, Matsumoto K, Kato S (2007): Suppression of PPAR Transactivation Switches Cell Fate of Bone Marrow Stem Cells from Adipocytes into Osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* 1116(1), 182-195
- Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, Ito M, Takeshita S, Ikeda K (2007): Targeted Ablation of Osteocytes Induces Osteoporosis with Defective Mechanotransduction. *Cell Metab* 5, 464-475
- Turner AS (2001): Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 1, 66-81
- Turner RT, Maran A, Lotinin S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, Sibonga JD (2001): Animal Model for Osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord* 2(1), 117-127
- Uchida A, Kikuchi T, Shimomura Y (1988): Osteogenic capacity of cultured human periosteal cells. *Acta Orthop* 59, 29-33
- Vokes TJ, Favus MJ (2010): Clinical Management of the Patient with Osteoporosis. *Transl Endocrinol Metab* 1(1), 9-54
- Williams BO, Insogna KL (2009): Where Wnts Went: The Exploding Field of Lrp5 and Lrp6 Signaling in Bone. *J Bone Miner Res* 24, 171-178

- Wilson PWF, Grundy SM (2003): The Metabolic Syndrome. *Circulation* 108(13), 1537-1540
- Wluka AE, Wolfe R, Davis SR, Stuckey S, Cicuttini FM (2004): Tibial cartilage volume change in healthy postmenopausal women: a longitudinal study. *Ann Rheum Dis* 63(4), 444-449
- Yamauchi T, Waki H, Kamon J, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Miki H, Kubota N, Terauchi Y, Tsuchida A et al. (2001): Inhibition of RXR and PPARgamma ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest* 108(7), 1001-1013
- Yoshida T, Otake T, Uchiyama M, Ogawa S (1971): Effect of ecdysterone on hyperglycemia in experimental animals. *Biochem Pharmacol* 20(12), 3263-3268
- Zhang P, Su M, Tanaka SM, Yokota H (2006): Knee loading stimulates cortical bone formation in murine femurs. *BMC Musculoskelet Disord* 7, 73
- Zhao L-J, Liu Y-J, Liu P-Y, Hamilton J, Recker RR, Deng H-W (2007): Relationship of Obesity with Osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 92(5), 1640-1646
- Zhao L, Jiang H, Papasian CJ, Maulik D, Drees B, Hamilton J, Deng H (2008): Correlation of Obesity and Osteoporosis: Effect of Fat Mass on the Determination of Osteoporosis. *J Bone Miner Res* 23(1), 17-29

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Knochenaufbaus.....	14
Abbildung 2: Übersicht über den zeitlichen Versuchsablauf.....	27
Abbildung 3: Maßpunkte an der proximalen Tibia der Ratte	29
Abbildung 4: Messung der Breite des Knorpels	30
Abbildung 5: Messung der Breite der Kortikalis	30
Abbildung 6: Messung der Breite der Epiphysenfuge und deren drei Zonen.....	31
Abbildung 7: Maßfeld für die Messung der prozentualen Anteile von rotem Knochenmark, Knochen- trabekel und Fettgewebe an der Spongiosa der proximalen Tibia	31
Abbildung 8: Messung der prozentualen Anteile von rotem Knochenmark, Knochen- trabekel und Fettgewebe an der Metaphyse der Tibia.....	32
Abbildung 9: Funktion <i>Schwellenwerte setzen</i> der analySIS-Software	33
Abbildung 10: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf die tägliche Futtermittelaufnahme in g/Tier.....	34
Abbildung 11: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf das Körpergewicht der ovx-Ratte	35
Abbildung 12: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf die Breite des Gelenkknorpels an der proximalen Tibia der ovx-Ratte	36
Abbildung 13: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf die gesamte Breite der Epiphysenfuge an der proximalen Tibia der ovx-Ratte.....	37
Abbildung 14: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf die Breite der Hypertrophiezone der Epiphysenfuge an der proximalen Tibia der ovx-Ratte	38
Abbildung 15: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf die Breite der Proliferationszone der Epiphysenfuge an der proximalen Tibia der ovx-Ratte	39
Abbildung 16: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf die Breite der Reservezone der Epiphysenfuge an der proximalen Tibia der ovx-Ratte	40
Abbildung 17: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf den prozentualen Anteil der Hypertrophiezone, Proliferationszone und der Reservezone auf die gesamte Breite der Epiphysenfuge.....	41

Abbildung 18: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf die Breite der Kortikalis an der proximalen Tibia der ovx-Ratte	42
Abbildung 19: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf den prozentualen Anteil der Knochentrabekel an der proximalen Tibia der ovx-Ratte	43
Abbildung 20: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf den prozentualen Anteil des Fettgewebes an der proximalen Tibia der ovx-Ratte.....	44
Abbildung 21: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf den prozentualen Anteil des roten Knochenmarks an der proximalen Tibia der ovx-Ratte	45
Abbildung 22: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf das Verhältnis zwischen dem Anteil der Knochentrabekel und dem Fettgewebe an der proximalen Tibia der ovx-Ratte	46
Abbildung 23: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf das Verhältnis zwischen dem Anteil der Knochentrabekel und dem roten Knochenmark an der proximalen Tibia der ovx-Ratte.....	47
Abbildung 24: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf das Verhältnis zwischen dem Anteil des Fettgewebes und dem roten Knochenmark an der proximalen Tibia der ovx-Ratte.....	48
Abbildung 25: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf das Serum-Osteokalzin in ovx-Ratten	49
Abbildung 26: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf die Serum-Rat-Laps von ovx-Ratten	50
Abbildung 27: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf das Serum-Cholesterin von ovx-Ratten	51
Abbildung 28: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf das Serum-Leptin von ovx-Ratten	52
Abbildung 29: Die Effekte von Ecd/Spinat, VitD und E2 (per oraler Applikation für 3 Monate) auf die Serum-Glukose von ovx-Ratten	53
Abbildung 30: Die Effekte des Basisfutters +VitD auf den Futtermittelverbrauch und das Körpergewicht im Vergleich zu den tierexperimentellen Versuchen aus Seidlová-Wuttke et al. 2010 b	54
Abbildung 31: Entwicklung der prozentualen Anteile der Bevölkerung von unter 20, über 65 und über 80 Jahre alten Menschen in Deutschland	71
Abbildung 32: Altersaufbau in Deutschland im Jahre 2010 und 2020	71

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO Definition der Osteoporose anhand des T-Werts	5
Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen Futtergruppen.....	26
Tabelle 3: Täglicher Futtermittelverbrauch und die täglich eingenommene Menge der Testsubstanzen pro Tier in den jeweiligen Versuchsgruppen.....	35
Tabelle 4: Risikofaktoren für die Entstehung einer Osteoporose	72
Tabelle 5: WHO Definition für die Diagnosestellung des Metabolischen Syndroms	72
Tabelle 6: Ssniff EF R/M Kontrolle.....	73
Tabelle 7: Ssniff EF R/M Vitamin-D3-Defizit	74
Tabelle 8: Systemkomponenten Technovit 9100 NEU.....	75
Tabelle 9: Herstellung der Hartschnittpräparate	75
Tabelle 10: Entplastung der in Technovit 9100 NEU eingebetteten Schnitte.....	76
Tabelle 11: Färbung nach Goldner.....	76

Danksagung

Besonders möchte ich mich bei PD. Dr. D. Seidlová-Wuttke für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit des wissenschaftlichen Arbeitens bedanken. Sie hat mir immer mit Rat und Tat zu Seite gestanden und stets für eine positive Arbeitsatmosphäre gesorgt.

Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. W. Wuttke für die vielen kritischen und nützlichen Anmerkungen. Seine große Erfahrung erleichterte das Arbeiten an der vorliegenden Dissertation in hohem Maße.

Ich danke dem ganzen Team der Arbeitsgruppe Experimentelle Endokrinologie für die tolle Unterstützung während der histologischen Auswertungen. Hier seien besonders Frau Brüggemann-Meyer und Frau Lüdemann erwähnt, die mir in vielen organisatorischen und auch wissenschaftlichen Fragestellungen sehr helfen konnten.