Der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen
eingereicht von PD Dr. med. D. Seidlová-Wuttke

Die Wirkung von 20-OH-Ecdyson auf Osteoporose und das Fett im Kniegelenk im Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom

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

vorgelegt von
Marie Sunder-Plassmann
aus
Kappeln

Göttingen 2013

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Endokrinologie unter der Leitung von Prof. Emeritus Dr. med. W. Wuttke an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe im Zeitraum von August 2011 bis Dezember 2013 angefertigt.

Dekan:	Prof. Dr. rer. Nat. H. K. Krömer
1. Berichterstatterin:	PD Dr. med. D. Seidlová-Wuttke
2. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. D. Raddatz
3. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. Margarete Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung ... 1

1.1 Die postmenopausale Frau ... 2

1.2 Metabolisches Syndrom ... 3

1.2.1 Definition und Epidemiologie ... 3

1.2.2 Ursachen und Risikofaktoren ... 4

1.2.3 Exkurs: Intraartikuläres Fett und Osteoarthritis ... 5

1.3 Osteoporose ... 5

1.3.1 Definition und Epidemiologie ... 5

1.3.2 Grundlage: Knochen ... 6

1.3.2.1 Knochenaufbau ... 6

1.3.2.2 Knochenstoffwechsel ... 8

1.3.2.3 Knochenmarker ... 9

1.3.2.4 Knochenmark ... 10

1.3.2.5 Epiphysenfuge ... 10

1.3.3 Ursachen und Risikofaktoren ... 12

1.3.4 Diagnostik ... 13

1.3.5 Therapie und Prophylaxe ... 14

1.4 Metabolisches Syndrom und Osteoporose ... 15

1.5 Modell der ovarektomierten (ovx) Ratte ... 16

1.6 Testsubstanz Beta-Ecdyson ... 17

1.7 Zielsetzung ... 19

2 Material und Methoden ... 21

2.1 Versuchsaufbau ... 21

2.1.1 Versuchsgruppen ... 22

2.2 Testsubstanzen ... 23

2.3 Herstellung der Hartschnittpräparate ... 23

2.4 Histologische Auswertung ... 24

2.4.1 Messung der Anteile der Trabekel, des roten Knochenmarks und des gelben Fettmarks der Metaphyse ... 26

2.4.2 Messung der Kortikalisdicke im metaphysären Bereich ... 27

2.4.3 Messung der Epiphysenfuge ... 28

2.4.4 Messung des intraartikulären Fettgewebes ... 29

2.5 Bestimmung der Serumparameter ... 29

2.6 Statistik ... 30

3 Ergebnisse ... 31
3.1 Körpergewicht und Futteraufnahme ... 31
3.2 Phasenanalyse ... 32
3.2.1 Gelber Markanteil in % ... 32
3.2.2 Trabekelanteil in % ... 33
3.2.3 Roter Markanteil in % ... 33
3.2.4 Index gelbes Mark / rotes Mark ... 34
3.3 Kortikalisdicke ... 34
3.4 Serumparameter ... 35
3.4.1 Osteokalzin in ng/ml ... 35
3.4.2 CrossLaps in ng/ml ... 36
3.5 Epiphysenfuge ... 36
3.5.1 Gesamtbreite ... 37
3.5.2 Basale Schicht (Reservezone) ... 37
3.5.3 Proliferative Schicht (Proliferationszone) ... 38
3.5.4 Hypertrophe Schicht (hypertrophe Zone) ... 39
3.5.5 Prozentuale Anteile der drei Zonen ... 39
3.6 Intraartikuläres Fettgewebe ... 41
4 Diskussion ... 42
4.1 Körpergewicht ... 42
4.2 Knochen im Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom ... 43
4.3 Rotes Knochenmark ... 47
4.4 Epiphysenfuge ... 48
4.5 Intraartikuläres Fettgewebe ... 50
5 Zusammenfassung ... 53
6 Anhang ... 55
Herstellung der Knochenpräparate ... 55
7 Literaturverzeichnis ... 58
8 Abbildungsverzeichnis ... 65
9 Tabellenverzeichnis ... 66

Abkürzungsverzeichnis

BDM	Bone Mineral Density
cm	Zentimeter
dL	Deziliter
DVO	Dachverband Osteologie
DXA	Duale-Röntgen-Absorptiometrie
E2	Estradiolbenzoat
Ecd	20-OH-Ecdyson= beta-Ecdyson
FRAX®	Fracture Risk Assessment Tool
g	Gramm
GLUT-4	Glukosetransporter Typ 4
HDL	High Density Lipoprotein
HRT	Hormonersatztherapie
IE	Internationale Einheiten
IL-6	Interleukin-6
kg	Kilogramm
LDL	Low Density Lipoprotein
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
NCEP-ATP-III	National Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults
ng	Nanogramm
OPG	Osteoprotegerin
Ovx / ovx	Ovarektomie / ovarektomiert
p.o.	per os
PPARγ2	peroxisome proliferator activated receptor gamma
qCT	quantitative Computertomographie
RANK	receptor activator of NF-κB
RANKL	receptor activator of NF-κB ligand
RUNX 2	runt-related transcription factor

RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SD	Sprague-Dawley
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
SERM	selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator
sf	sojafreies Futter
sham-ovx	Schein-Ovarektomie
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
TNFβ	Tumornekrosefaktor beta
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHI	Women's Health Initiative
WHO	World Health Organization
µm	Mikrometer

1 Einleitung

Bei Eintritt der Frau in die Menopause kommt es durch den Östrogenmangel zu vielfältigen Folgen. Neben akuten Symptomen wie Hitzewallungen, Schlafstörungen und Abgeschlagenheit stehen langfristig die Urogenitalatrophie, das erhöhte Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und die Entwicklung der Osteoporose im Vordergrund (Martin und Manson 2008). Die Osteoporose ist durch eine Abnahme der Knochendichte und ein daraus folgendes erhöhtes Frakturrisiko charakterisiert. Durch den demographischen Wandel und den steigenden Anteil der weiblichen Bevölkerung in der Postmenopause stellt die Osteoporose in der heutigen Gesellschaft ein wachsendes Problem dar. Die World Health Organization (WHO) rechnet mit einem dramatischen Anstieg der betroffenen Personen in den nächsten Jahrzehnten und zählt die Osteoporose zu den zehn wichtigsten Erkrankungen der Gegenwart (Kolios et al. 2011). Durch die osteoporotisch bedingten Frakturen kommt es zur Einschränkung der Lebensqualität der Patienten und zusätzlich zu sehr hohen Kosten im Gesundheitswesen durch lange Krankenhausaufenthalte und Rehabilitierungsmaßnahmen (Statistisches Bundesamt 2010).

Zum anderen wurde festgestellt, dass die Prävalenz des Metabolischen Syndroms mit Beginn der Menopause und dem Verlust der Östrogene deutlich ansteigt (Carr 2003). Das Metabolische Syndrom ist gekennzeichnet durch die Faktoren viszerale Adiopositas, Hypertonie, Dyslipidämie und Insulinresistenz, welche zu einer Erhöhung des kardiovaskulären Risikos führen.

In den letzten Jahren konnte zunehmend ein Zusammenhang zwischen dem Metabolischen Syndrom und der Osteoporose gezeigt werden (Hsu et al. 2006; Hwang und Choi 2010; Migliaccio et al. 2011). Dies bedeutet, dass sich durch die steigende Prävalenz des Metabolischen Syndroms in der Bevölkerung ein weiterer wichtiger Risikofaktor für die Osteoporose ergibt.

Bis vor einigen Jahren hatte die Hormonersatztherapie (HRT) eine große Bedeutung in der Behandlung der postmenopausalen Beschwerden. Diese gleicht den durch den Funktionsverlust der Ovarien entstandenen Östrogenmangel aus. In einer groß angelegten Studie der Women’s Health Initiative (WHI) wurde jedoch unter der HRT ein gehäuftes Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen sowie von Brustkrebs festgestellt, was im Jahre 2002 zum Abbruch dieser Studie geführt hat (Rossouw et al. 2002).

Um nun eine wirkungsvolle Therapie jedoch möglichst ohne Nebenwirkung zu finden, wird intensiv im Bereich der Phytotherapie geforscht. Wünschenswert wäre eine Substanz, die vor Osteoporose schützt, die klimakterische Beschwerden mindert und einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung des Metabolischen Syndroms hat.

1.1 Die postmenopausale Frau

Als Klimakterium bezeichnet man den Zeitraum zwischen ca. 45 und 60 Jahren, der durch die hormonelle Umstellung, das heißt durch den Funktionsverlust der Ovarien, gekennzeichnet ist. Das Sistieren der Menstruation gilt als äußeres Zeichen für die nachlassende Ovarialfunktion. Das Klimakterium kann in die drei Phasen Prämenopause, Menopause und Postmenopause eingeteilt werden. Die Menopause ist definiert als das Ausbleiben der Menstruation in zwölf aufeinander folgenden Monaten und trifft im Alter von 45-55 Jahren ein. In Deutschland liegt das Alter im Mittel bei 52 Jahren. Die oft von unregelmäßigen Blutungen gekennzeichnete Zeitspanne vor der Menopause bezeichnet man als Prämenopause, die Zeit danach, in der die hormonelle Produktion der Ovarien komplett aufgehoben ist, als Postmenopause. In der Mitte des vierten Lebensjahrzehntes zeigen sich zunehmend Organveränderungen an den Ovarien wie Follikelverarmung und Gefäßsklerosierungen. Mit Fortschreiten des Klimakteriums fällt die Östrogenbildung deutlich ab, was der Grund für die meisten klinischen Beschwerden ist. Kurzfristige Auswirkungen sind vor allem Hitzewallungen, sogenannte „hot flushes“, Schweißausbrüche und Schlafstörungen. Mittelfristig kommt es zu Hautveränderungen, vaginaler Atrophie und psychischen Symptomen. Zu den langfristigen Auswirkungen zählt man vor allem die Osteoporose und die Atherosklerose, die zu gehäuften kardiovaskulären Ereignissen führt (Stauber und Weyerstahl 2005). Der mit dem Alter eintretende Muskelabbau, die Sarkopenie, begünstigt zusätzlich durch eine zunehmende Immobilisation die Entwicklung einer Osteoporose (Marzetti und Leeuwenburgh 2006).

Auch die Prävalenz des Metabolischen Syndroms erhöht sich mit dem Eintritt in die Menopause (Lobo 2008). Der Übergang von der prä- zur postmenopausalen Frau ist gekennzeichnet durch vielfältige Veränderungen, die das Metabolische Syndrom charakterisieren. Es kommt zu einer Fettumverteilung des subkutanen Fettes in Richtung des viszeralen Fettes. Die intraabdominelle Adipositas führt zu einer Verschiebung der Blutfette hin zu einem atherosklerotischen Profil und zu einer Steigerung der Glukose- sowie der Insulinspiegel im Blut (Carr 2003). Die Erhöhung dieser Risi-

kofaktoren des Metabolischen Syndroms könnte ein direktes Ergebnis des Funktionsverlustes der Ovarien sein oder indirekt durch die metabolischen Konsequenzen der Fettumverteilung wegen des Östrogenmangels bedingt sein (Carr 2003). Die höhere Prävalenz des Metabolischen Syndroms könnte die steigenden kardiovaskulären Ereignissen in der Postmenopause erklären (Hwang und Choi 2010).

1.2 Metabolisches Syndrom

1.2.1 Definition und Epidemiologie

Das Metabolische Syndrom ist charakterisiert durch eine Konstellation aus verschiedenen Faktoren, die das Risiko, an einer koronaren Herzkrankheit zu erkranken, entscheidend erhöht. Zu diesen Faktoren gehören die viszerale Adipositas, die arterielle Hypertonie, veränderte Blutfettwerte (Dyslipidämie) und eine Insulinresistenz (Kaaja 2008). Die Erkrankung betrifft vor allem Menschen in Wohlstandsländern aufgrund des Lebensstils, der gekennzeichnet ist durch Überernährung und Bewegungsmangel. Auch in weniger entwickelten Ländern tritt das Metabolische Syndrom neuerdings aufgrund des vermehrten Junkfood-Konsums verstärkt auf. In der deutschen Bevölkerung liegt die Prävalenz der Erkrankung bei über 20 % (Neuhauser und Ellert 2005). Die postmenopausale Frau hat außerdem ein 60 %ig erhöhtes Risiko, ein Metabolisches Syndrom zu entwickeln (Carr 2003; Park et al. 2003).
Nach dem „National Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults“ (NCEP-ATP-III) wird die Diagnose Metabolisches Syndrom gestellt, wenn mindestens drei der folgenden fünf Kriterien erfüllt sind:

Risikofaktor	Grenzwert
Abdominelle Adipositas	Bauchumfang: > 100 cm Mann, > 90 cm Frau
SerumTriglyzeride	≥ 150 mg/dL
High Density Lipoprotein (HDL)	< 40 mg/dL Mann, < 50 mg/dL Frau
Blutdruck	≥ 130/≥ 80 mmHg
Nüchternblutzucker	≥ 110 mg/dL

Tabelle 1.1: Diagnose-Kriterien für das Metabolische Syndrom der NCEP-ATP-III (2001).

Die Tendenz für das Auftreten des Metabolischen Syndroms ist steigend und die daraus durch die koronare Herzkrankheit resultierende Morbidität und Mortalität ist

sehr hoch (Sundstrom 2006). Auch das Risiko, ein Mamma- oder ein Endometriumskarzinom zu entwickeln, ist durch das Auftreten des Metabolischen Syndroms deutlich gesteigert (Esposito et al. 2012).

1.2.2 Ursachen und Risikofaktoren

Die Pathophysiologie des Metabolischen Syndroms ist komplex und vielfältig. Sie betrifft den Glukose- und den Fettstoffwechsel, das Insulin und verschiedene von den Adipozyten produzierte Hormone und Zytokine (Miranda et al. 2005). Kennzeichnend für das Metabolische Syndrom ist eine Insulinresistenz. Die hyperkalorische Ernährung und der Bewegungsmangel in den Industrieländern bedingen einerseits eine Fettleibigkeit und andererseits einen erhöhten Glukosespiegel im Blut. Das Insulin, welches den Blutzuckerspiegel reguliert, indem es die Aufnahme der Glukose in Fett- und Muskelzellen über den Glukosetransporter Typ 4 (GLUT-4) vermittelt, wird kompensatorisch vermehrt ausgeschüttet. Hierdurch kommt es vorübergehend zu einer Hyperinsulinämie. Durch die hohen Insulinspiegel entwickelt sich jedoch langfristig eine Abnahme der Wirkung des Hormons und es tritt die Insulinresistenz ein (Herold 2011).

Das viszerale Fettgewebe befindet sich in der Bauchhöhle zwischen den Organen und ist hormonell sehr aktiv. Die Adipozyten unterliegen aufgrund der Insulinresistenz einer erhöhten Lipolyse. Es werden vermehrt Entzündungsmediatoren wie Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor alpha (TNFα) freigesetzt und es entsteht ein chronisches Entzündungsmilieu (Nishimura et al. 2009). Die Adipozyten setzen zudem nicht-veresterte Fettsäuren frei, welche die Aufnahme von Glukose in den Skelettmuskel vermindern und die Wirkung von Insulin an der Leber herabsetzen. Dadurch kommt es in der Leber zu einer gesteigerten Glukoneogenese und Glykogenolyse, so dass der Blutzuckerspiegel weiter angehoben wird.

Die freien Fettsäuren führen zusätzlich zu einer Dyslipidämie, die charakterisiert ist durch niedrige HDL-Spiegel, hohe Triglyzeride und hohe *small dense* Low Density Lipoprotein (LDL)-Werte, welche entscheidend zur Bildung der Atherosklerose in den Gefäßen beitragen (Miranda et al. 2005).

Neben der Fehlernährung und dem Bewegungsmangel spielt auch die genetische Disposition eine Rolle in der Entwicklung des Metabolischen Syndroms.

Einige Studien beschreiben den postmenopausalen Zustand der Frau als einen entscheidenden Risikofaktor (Carr 2003; Kaaja 2008; Lobo 2008). Zum einen findet

auch hier eine Umverteilung des Fettes vom subkutanen Fettgewebe zum sehr stoffwechselaktiven viszeralen, also dem zentralen abdominellen Fett statt. Zum anderen verschieben sich die Lipide im Blut hin zu einem atherogenen Lipidprofil mit erhöhten LDL- und Triglyzeriden und erniedrigten HDL. Die Zusammensetzung des LDL verändert sich und der Anteil an dem atherogenen *small dense* LDL wird größer (Carr et al. 2000). Außerdem steigen die Spiegel von Glukose und Insulin im Blut (Carr 2003).

1.2.3 Exkurs: Intraartikuläres Fett und Osteoarthritis

Übergewichtige Menschen leiden oft an einer Arthrose, besonders häufig des Kniegelenks (Bliddal et al. 2011). Die Arthrose ist durch einen Gelenkverschleiß mit Verminderung des Gelenkknorpels gekennzeichnet. Neuere Studien zeigten, dass die Arthrose nicht nur durch die mechanische Komponente des Übergewichts, sondern auch wesentlich durch das entzündliche Milieu, das durch das vermehrte Fettvorkommen in den Gelenken entsteht, bedingt ist (Hu et al. 2011; Rai und Sandell 2011). Im anglo-amerikanischen Sprachbereich wird die Arthrose deshalb als Osteoarthritis bezeichnet, was den entzündlichen Faktor bei der Entstehung der Zerstörung des Gelenkknorpels bereits mit einbezieht. Der sogenannte Hoffa-Fettkörper ist das intraartikuläre Fett, das sich zwischen Femur, Tibia und Patella im Kniegelenk befindet. Er ist durch die Bildung von inflammatorischen Zytokinen eine wichtige Quelle für die Entstehung des lokalen Entzündungsmilieus bei der Osteoarthritis (Distel et al. 2009). Dies tritt bei Menschen mit Metabolischem Syndrom ein. Beim Metabolischen Syndrom ist also nicht nur das viszerale Fett vermehrt vorhanden, sondern auch der Hoffa-Fettkörper im Kniegelenk vergrößert sich und die Produktion von proinflammatorischen Substanzen ist gesteigert. Dadurch wird die Destruktion des Gelenkknorpels gefördert und die Osteoarthritis schreitet weiter voran (Seidlová-Wuttke et al. 2012).

1.3 Osteoporose

1.3.1 Definition und Epidemiologie

Der Dachverband Osteologie e.V. (DVO) definiert die Osteoporose als eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine erniedrigte Knochenmasse und eine mikroarchitektonische Verschlechterung des Knochengewebes mit konsekutiven Knochen-

brüchen charakterisiert ist (DVO-Leitlinie 2009). Besonders betroffen sind die Wirbelkörper, der distale Radius und der Oberschenkelhalsknochen.

Die Osteoporose ist eine Erkrankung von weltweit großer Bedeutung. Im Jahre 2006 wurde die Zahl der an Osteoporose erkrankten Personen bereits auf über 200 Millionen geschätzt (Reginster und Burlet 2006). In Deutschland leiden ca. 7,8 Millionen Menschen an Osteoporose. Die postmenopausale Frau ist dabei weitaus am häufigsten betroffen, da mehr als 25 % der Frauen nach der Menopause eine Osteoporose entwickeln (Häussler et al. 2007). Die Verteilung auf die verschiedenen Altersgruppen veranschaulichen folgende Zahlen:

- 7 % aller Frauen in Deutschland im Alter von 55 Jahren haben eine Osteoporose.
- 19 % aller Frauen in Deutschland im Alter von 80 Jahren haben eine Osteoporose (DVO-Leitlinie 2009).

Pro Jahr verursacht die Osteoporose ca. 8,9 Millionen Frakturen weltweit (WHO 2004). Dabei liegt die Prävalenz von Wirbelkörperfrakturen postmenopausaler Frauen bei 7,7 % und das Auftreten von nichtvertebralen Frakturen bei 12,7 % (Seibel 2001).

Die Osteoporose wird in eine primäre sowie in eine sekundäre Form eingeteilt. Zu der zu 95 % auftretenden weitaus häufigeren primären Form werden die postmenopausale, die senile und die seltene idiopathische Osteoporose junger Menschen gezählt. Die sekundäre Osteoporose, die in 5 % der Fälle auftritt, ist Folge einer Grunderkrankung wie zum Beispiel Endokrinopathologien, einer dauerhaften Einnahme bestimmter Medikamente (z.B. Glukokortikoide) oder einer langen Immobilisation (Herold 2011).

1.3.2 Grundlage: Knochen

Der Knochen der Säugetiere hat vielfältige Funktionen. Neben der Stützfunktion erfüllt er als Kalziumspeicher eine wichtige endokrine Aufgabe. Außerdem findet in der Markhöhle des Knochens die Hämatopoese statt.

Die Struktur, der Knochenstoffwechsel sowie die Knochenmarker sind bei dem Skelett der Ratte identisch.

1.3.2.1 Knochenaufbau

Die Knochensubstanz aller Säugetiere setzt sich aus der Knochenmatrix und den Knochenzellen zusammen. Die Knochenmatrix besteht zu 65 % aus anorganischen

Mineralsalzen. Das häufigste und wichtigste Mineralsalz ist das Kalziumphosphat, auch Hydroxylapatit genannt, welches für die Knochenhärte von großer Bedeutung ist. Die weiteren 35 % bestehen aus organischem Material, wobei das Kollagen Typ I mit 90 % den größten Anteil stellt.

Die langen Röhrenknochen werden in die gelenknahe Epiphyse, in die Übergangsregion, die sogenannte Metaphyse und in die Diaphyse, den Knochenschaft, eingeteilt. Die den Knochen umgebende Knochenhaut, das Periost, ist mit Nerven und Blutgefäßen versorgt und vor allem für die Frakturheilung von Bedeutung. Innerhalb des Knochengewebes ist die Substantia compacta von der Substantia spongiosa abzugrenzen. Die Substantia compacta bildet die äußere Schicht des Knochens und wird daher auch Kortikalis genannt. Sie ist wichtig für die Stabilität des Knochens. Die Substantia spongiosa bildet ein schwammartiges Trabekelwerk, in dessen Zwischenräumen sich das Knochenmark befindet. Die Trabekel verlaufen entlang der Belastungslinien, so dass der Knochen trotz der Leichtigkeit eine hohe Stabilität aufweist. Grundbauelement sind die Osteone, die aus einem zentralen Havers-Kanal mit konzentrisch angeordneten Lamellen bestehen und die einem permanenten Umbau unterliegen (siehe folgende Abbildung) (Niethard und Pfeil 2005).

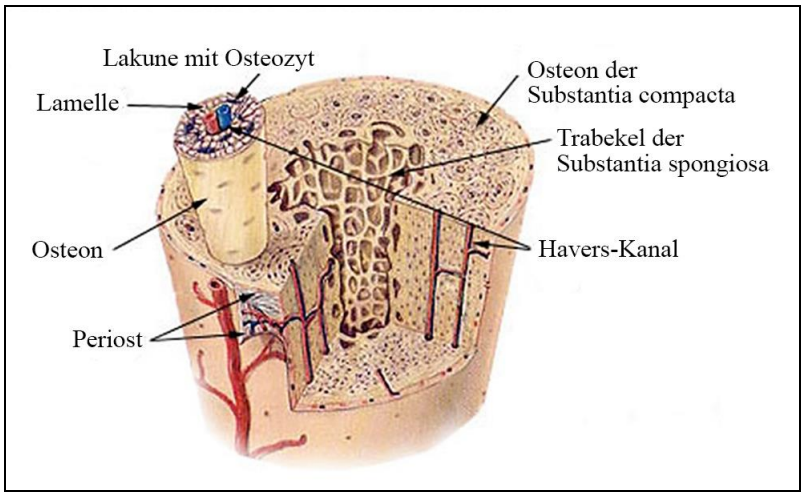


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau eines Röhrenknochens
(‘http://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/tissue.html’, aufgerufen am 25.11.12 und verändert)

Im Verlauf Rahmen der Osteoporose werden die Knochenbälkchen der Substantia spongiosa zunehmend dünner, wodurch das erhöhte Frakturrisiko entsteht.

1.3.2.2 Knochenstoffwechsel

Der Knochen befindet sich in einem ständigen Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau. Dabei werden drei knochenspezifische Zellen unterschieden, die für diese Umbauprozesse verantwortlich sind. Die Osteoblasten sind Zellen mesenchymaler Herkunft und spielen eine wichtige Rolle für den Knochenaufbau, indem sie das Osteoid für die Knochenmatrix sezernieren. Das Osteoid ist die noch nicht mineralisierte Grundsubstanz des Knochens, die zum größten Teil aus Kollagen Typ I und weiteren Proteinen wie zum Beispiel den Proteoglykanen besteht. Durch Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen wird der Knochen mineralisiert und erhält dadurch seine Festigkeit. Bei diesem Prozess werden die Osteoblasten zu nicht mehr teilungsfähigen Osteozyten, die komplett von der Matrix umschlossen in Lakunen lagern. Über Zell-Zell-Kontakte (Gap Junctions) sind die Osteozyten miteinander verbunden und beteiligen sich an der Regulation des Knochenstoffwechsels. Die für den Knochenabbau zuständigen Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die durch Fusion aus monozytären Vorläuferzellen aus dem Knochenmark entstehen. Mit Hilfe von proteolytischen Enzymen und einem deutlich erniedrigten pH-Wert von 4,5 können sie im sogenannten Faltensaum die Knochenmatrix resorbieren (Lüllmann-Rauch 2009).

Um das Gleichgewicht des ständigen Auf- und Abbaus des Knochens zu regulieren, wird die Interaktion der Knochenzellen durch Zytokine vermittelt. Ein wichtiges Zytokin ist der *Receptor Activator of NF-κB Ligand* (RANKL*)*, der zu der Gruppe der Tumornekrosefaktoren gehört und von den Osteoblasten sezerniert wird. Durch die Bindung des Liganden an den von den Osteoklastenvorläuferzellen exprimierten *Receptor Activator of NF-κB* (RANK) erfolgt die Fusion der Vorläuferzellen zu mehrkernigen Riesenzellen. Diese resorbieren als aktive Osteoklasten den Knochen. Natürlicher Gegenspieler dieser Aktivierung durch den Rezeptor-Liganden-Komplex ist das Osteoprotegerin (OPG), ein weiterer Tumornekrosefaktor, der auch von den Osteoblasten sezerniert wird. Durch Bindung am RANKL verhindert das OPG die Aktivierung des RANK der Osteoklastenvorläuferzellen und damit die Knochenresorption (Robertson et al. 2010). Die Östrogene bewirken eine natürliche Supprimierung dieses Systems, indem sie die Synthese von OPG fördern und die Bildung von RANKL mindern (Bord et al. 2003). Die Abbildung 1.2 stellt diese Vorgänge schematisch dar.

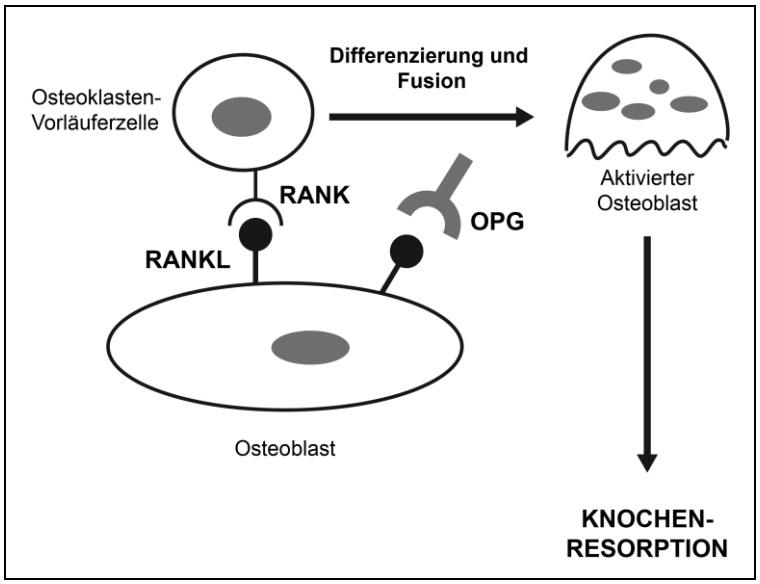


Abbildung 1.2: Aktivierung der Osteoklasten über den RANKL-RANK-Komplex. Hemmung des Systems durch OPG (nach Coetzee und Kruger 2004, S. 507 verändert).

Die Folge ist, dass bei dem Östrogenmangel der postmenopausalen Frau die Aktivierung der Osteoklasten überwiegt und das Gleichgewicht zum Knochenabbau hin verschoben ist.

Darüber hinaus gibt es weitere Faktoren, welche die Aktivierung der Osteoklasten fördern. Dazu gehören verschiedene Interleukine, Interferone und Tumornekrosefaktor alpha (TNFα) und beta (TNFβ) (Robertson et al. 2010), die besonders in einem Entzündungsmilieu gehäuft auftreten. Auch das von Fettzellen gebildete Adiponektin wirkt aktivierend auf die Osteoklasten und fördert den Knochenabbau (Luo et al. 2006).

1.3.2.3 Knochenmarker

Um den Knochenumbau im Körper zu quantifizieren, können verschiedene Marker im Serum bestimmt werden. Das Osteokalzin ist ein knochenspezifisches Protein, das von den Osteoblasten während des Knochenaufbaus synthetisiert wird. Es wird sowohl in die Knochenmatrix eingebaut als auch in die Blutbahn sezerniert. Infolgedessen zeigt der Osteokalzin-Serum-Spiegel einen erhöhten Knochenaufbau an (Jagtap et al. 2011).

Bei der Resorption des Knochens wird das Kollagen durch die Osteoklasten gespalten. Die sogenannten Beta-CrossLaps sind Abbaufragmente des Typ I-Kollagens, die dabei freigesetzt werden. Sie können im Serum bestimmt werden und sind Marker

für die Knochenresorption (French et al. 2008). CrossLaps werden in der Diagnose und in der Therapiekontrolle der Osteoporose eingesetzt (Okabe et al. 2004).

1.3.2.4 Knochenmark

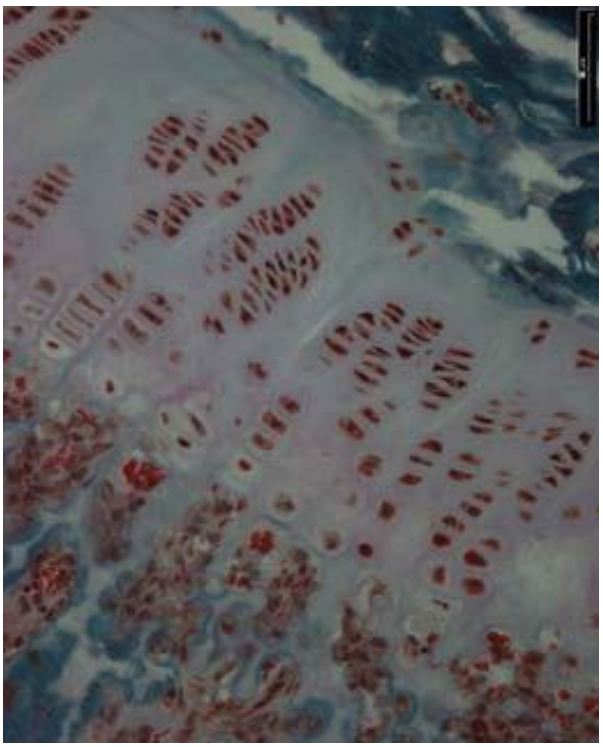
In der Markhöhle zwischen den Trabekeln der Substantia spongiosa befindet sich das Knochenmark, das in das rote und in das gelbe Mark unterteilt wird. Das gelbe Mark besteht aus Fettzellen während im roten Mark die Hämatopoese stattfindet. Die mesenchymalen Vorläuferzellen differenzieren zu Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten, die dann in die Blutbahn übertreten. Das Knochenmark eine große Bedeutung für die Aufrechterhaltung lebenswichtiger Funktionen im Organismus wie unter anderem des Immunsystems. Im Laufe des Lebens wird das blutbildende rote Mark zunehmend in das gelbe, hämatopoetisch inaktive Fettmark umgebaut. Der Fettanteil in dem hämatopoetisch aktiven Knochenmark kann in der achten Lebensdekade bis zu 70 % betragen. Beim Erwachsenen beschränkt sich die Blutbildung auf vereinzelte Lokalisationen wie die proximalen Metaphysen der Röhrenknochen, die Wirbelsäule sowie auf die platten Knochen wie Becken, Brustbein, Rippen und Skapula (Vahlensieck und Schmidt 2000).

Die knochenbildenden Osteoblasten, die Chondroblasten und die Zellen des Fettgewebes, die Adipozyten, besitzen eine gemeinsame mesenchymale Vorläuferzelle (Akune et al. 2004). Zu welcher Zelle sich die Stammzelle differenziert, wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. Für die Differenzierung zum Osteoblasten spielt unter anderem der Transkriptionsfaktor *runt-related transcription factor* (RUNX 2) eine Rolle. Dagegen fördert die Aktivierung des Rezeptors *peroxisome proliferator activated receptor gamma* (PPARγ2) die Adipogenese (Akune et al. 2004; Zhao et al. 2008) Mit fortschreitendem Alter überwiegt die Aktivierung des PPARγ2, so dass daraus eine vermehrte Verfettung des Knochenmarks und ein verminderter Knochenaufbau folgen. Auch bei der Osteoporose ist eine gesteigerte Verfettung des Knochenmarks zu beobachten (Yeung et al. 2005).

1.3.2.5 Epiphysenfuge

Die Epiphysenfuge spielt für das Längenwachstum der Knochen eine Rolle. Sie befindet sich zwischen der Epiphyse und der Metaphyse und besteht aus hyalinem Knorpel, der in drei Zonen unterteilt werden kann. In der basalen Schicht befinden sich die Chondrozyten bzw. ihre Vorläuferzellen einzeln in der Knorpelmatrix oder in Chondronen angeordnet. Diese Schicht liefert den zellulären Nachschub für die fol-

genden Zonen und wird deshalb auch als Reservezone bezeichnet. In der proliferativen Schicht teilen sich die Zellen mitotisch und ordnen sich longitudinal zu dem sogenannten Säulenknorpel an (Proliferationszone).
In der hypertrophen Schicht nehmen die Zellen Wasser auf und erhalten dadurch ein blasenartiges Aussehen was zu der Bezeichnung Blasenknorpel führte (hypertrophe Zone). Die Chondrozyten bilden vermehrt Kollagen, welches die Knorpelmatrix verfestigt und zur Ausbildung von Septen führt, die dann zunehmend mineralisieren. Darüber hinaus produzieren die Chondrozyten *vascular endothelial growth factor* (VEGF), um die Angiogenese anzuregen. In der darauf folgenden Verknöcherungszone werden die hypertrophen Chondrozyten abgebaut und die zwischen ihnen liegenden Septen unter Einfluss von Chondroklasten aufgelöst. In die entstanden Knorpelhöhlen wachsen Blutgefäße, über welche die mesenchymalen Stammzellen einwandern und zu den knochenbildenden Osteoblasten differenzieren. Diese nehmen die Knorpelreste als Orientierungsstruktur und bilden die Knochenmatrix (Nilsson et al., 2005). Bei Frauen bewirken die Östrogene in einem Alter von ca. 20 Jahren den Schluss der Epiphysenfuge und damit das Ende des Längenwachstums. Bei der Ratte hingegen wird die Epiphysenfuge mit dem Alter zwar schmaler, bleibt jedoch bestehen, so dass sie sich lebenslang im Wachstum befindet.



basale Schicht (Reserve-Zone)

proliferative Schicht (Proliferationszone)

hypertrophe Schicht (hypertrophe Zone)

Abbildung 1.3: Übersicht über die Epiphysenfuge der Ratte (Kapur et al. 2010, S. 352).

1.3.3 Ursachen und Risikofaktoren

Im vierten Lebensjahrzehnt besitzt das menschliche Skelett die größte Knochenmasse („peak bone mass“). Anschließend beginnt ein sukzessiver altersabhängiger Knochenabbau, der bei Frauen insbesondere nach der Menopause aufgrund des Östrogenmangels stärker ausgeprägt ist und zu einem Verlust von 35-40 % des kortikalen Knochens und 55-60 % der Spongiosa führt (Niethard und Pfeil 2005).

Bei der physiologischen Altersatrophie, die auch als späte senile Osteoporose Typ II bezeichnet wird, sind die Abbauprozesse langsam. Die Kortikalis und die Spongiosa sind dabei gleichermaßen vom Knochenabbau betroffen. Im Gegensatz dazu ist die frühe postmenopausale Osteoporose Typ I in erster Linie durch einen raschen Spongiosaverlust gekennzeichnet (Herold 2011). Die daraus resultierende erhebliche Abnahme der Tragfestigkeit führt zu pathologischen Frakturen, die die Osteoporose kennzeichnen.

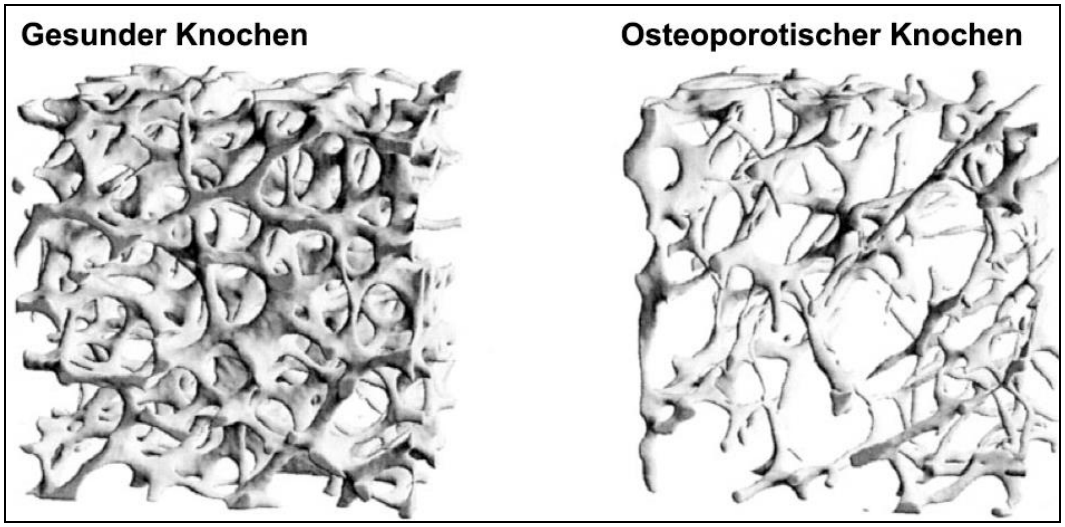


Abbildung 1.4: Darstellung der Substantia spongiosa. Links: Gesunder Knochen, rechts: Osteoporotischer Knochen (Riggs et al. 2002, S. 282).

Die Menopause ist der größte Risikofaktor für die Entwicklung der frühen Osteoporose Typ I (Lüllmann-Rauch 2009). Durch das Fehlen der Östrogene aufgrund des Verlustes der Ovarienfunktion verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und Resorption. Die verminderte Synthese von OPG und die vermehrte Produktion von RANKL führen zu einer negativen Knochenbilanz (Robertson et al. 2010). Außerdem beeinflussen die Östrogene die Lebensdauer und die Entwicklung der Zellen. Bei einem Wegfall kommt es zu einer längeren Lebensspanne der Osteoklasten und einer verfrühten Apoptose der Osteoblasten (Okazaki et al. 2002). Zu-

sätzlich wird die Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzellen in Adipozyten anstelle von Osteoblasten gefördert (Manolagas 2000).
Weitere Faktoren, welche die Entwicklung der Osteoporose begünstigen, sind körperliche Inaktivität, Mangel an Calcium und Vitamin D, starker Zigarettenkonsum, übermäßiger Alkoholgenuss, Einnahme von kortisonhaltigen Medikamenten sowie Vorerkrankungen, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen. Auch die verkürzte Östrogenexpositionszeit, d.h. eine späte Menarche und eine frühe Menopause gilt als ein Risikofaktor. Frauen, die aufgrund von Brustkrebs eine Therapie mit Aromatasehemmern erhalten, entwickeln häufig eine schwere Osteoporose. Therapeutisch nicht zu beeinflussen sind die Risikofaktoren Alter, Geschlecht (Verhältnis Frauen zu Männern 2:1) und die familiäre Vorbelastung (Robertson et al. 2010).

1.3.4 Diagnostik

Für die Diagnose der Osteoporose wird die Knochendichte, die Bone Mineral Density (BDM), ermittelt. Dies erfolgt über die Duale-Röntgen-Absorptiometrie (dual-energy-x-ray-absorptiometry, DXA), bei welcher der so genannte T-Score berechnet wird. Die Ermittlung des T-Wertes ermöglicht eine Aussage zum Knochenbruchrisiko anhand eines Vergleichs des gemessenen Knochendichtewertes mit dem Durchschnittswert junger erwachsener Frauen. Die Anzahl der Standardabweichungen ist der T-Wert. Ein T-Score ≤ -2,5 definiert laut WHO eine Osteoporose. Ein Wert von -2,5 bis -1 kennzeichnet eine Osteopenie und ein T-Score ≥ -1 entspricht einer gesunden Knochendichte (vergleiche Tabelle 1.2) (WHO Study Group 1994; Kanis et al. 1994). Je geringer der T-Wert ist, desto höher ist das Risiko, einen Knochenbruch zu erleiden.

T-Score	Befund
≤ -2,5	Osteoporose
-1 bis -2,5	Osteopenie
≥ -1	Normale Knochendichte

Tabelle 1.2: WHO-Definition der Osteoporose anhand des T-Scores (WHO Study Group, 1994).

Außerdem kann die Knochendichte über quantitative Computertomographie (qCT) und Sonographie ermittelt werden. Um zusätzlich die klinischen Risikofaktoren der Patienten für das Frakturrisiko mit einzubeziehen, wurde von der WHO im Jahre

2008 das Fracture Risk Assessment Tool (FRAX®) entwickelt. Mit diesem Algorithmus lässt sich die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Fraktur in den nächsten zehn Jahren unter Berücksichtigung von vielfältigen Risikofaktoren errechnen (WHO Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases 2008).

1.3.5 Therapie und Prophylaxe

Die DVO-Leitlinien 2009 empfehlen als Prophylaxe der Osteoporoseentwicklung eine tägliche Zufuhr von 1000 mg Kalzium und 800-2000 IE Vitamin D3, eine regelmäßige körperliche Betätigung zur Erhöhung der Muskelkraft um Stürze zu vermeiden und einen Nikotinverzicht (DVO-Leitlinie 2009). Eine medikamentöse Therapie wird empfohlen, wenn das 10-Jahresrisiko für Wirbelkörper- und proximale Femurfrakturen über 30 % beträgt (Herold 2011). Die lange im Vordergrund stehende Hormonersatztherapie wird heute wegen der schweren Nebenwirkungen wie das erhöhte Risiko für Herzinfarkt, Schlaganfall, tiefe Venenthrombosen und Brustkrebs nur noch mit sehr strengen Indikationen eingesetzt. Allerdings gibt es nun Neubewertungen der Studie, so dass eine kurzzeitige postmenopausale Östrogentherapie durchaus sinnvoll erscheint und das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, nicht steigert (Taylor und Manson 2011). Weitere Therapiemöglichkeiten setzen in der Hemmung des Knochenabbaus an. Dazu gehören die Bisphosphonate (Alendronat, Ibandronat, Risendronat, Zoledronat), die eine antiresorptive Wirkung durch Hemmung der Osteoklasten haben. Ein weiteres Medikament ist das Raloxifen, welches zu den Selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM) gehört. Es hat auf die Östrogenrezeptoren des Knochens einen agonistischen und auf die Östrogenrezeptoren in Mamma und Uterus einen antagonistischen Effekt. Eine Kombination aus dem SERM Bazedoxifen mit Östrogenen hat in einer Studie eine gute antiosteoporotische Wirkung mit nur minimalem Effekt auf das Endometrium gezeigt (Kharode et al. 2008). Einen anderen Wirkmechanismus verfolgt das Medikament Denosumab, ein monoklonaler humaner Antikörper, der den RANK-Liganden bindet und damit die Osteoklastenaktivierung verhindert (Bone et al. 2008). Um den Knochenaufbau zu stimulieren, können auch Parathormonpräparate (z.B. Teriparatid, Parathyroidhormon) gegeben werden. Das Strontiumranelat kombiniert beide Wirkmechanismen, indem es zum einen über einen calcimimetischen Effekt am Kationen-Sensing-Rezeptor stimulierend auf die Osteoblasten wirkt und zum anderen die Osteoklasten hemmt (DVO-Leitlinie 2009).

Bei den aufgeführten Medikamenten muss jedoch sorgfältig zwischen Nutzen und Risiko abgewogen werden, da sie mit vielfältigen Nebenwirkungen einhergehen. Ein möglichst wirkungsvolles und nebenwirkungsarmes Medikament zu finden, ist immer noch ein aktuelles Ziel in der Forschung der Osteoporosetherapie. Außerdem wäre es wünschenswert, wenn diese Substanz nicht nur osteoprotektiv wirkt, sondern auch die weiteren postmenopausalen Beschwerden der Frau positiv beeinflussen würde.

Um diesen Ansatz weiter zu verfolgen, soll in der vorliegenden Studie das Potential des pflanzlichen Steroids 20-OH-Ecdyson als mögliche Therapiealternative untersucht werden.

1.4 Metabolisches Syndrom und Osteoporose

In den letzten Jahren konnte zunehmend ein Zusammenhang zwischen dem Metabolischen Syndrom und der Osteoporose hergestellt werden (Hwang und Choi 2010). Es wurde lange Zeit angenommen, dass Fettleibigkeit vor Osteoporose schützen würde (Marcus et al. 1994). Dies wurde jedoch re-evaluiert (Zhao et al. 2007). Neuere Studien zeigen eine negative Korrelation zwischen der Fettmasse und der Knochenmasse (Zhao et al. 2007) und bezeichnen Fettleibigkeit nun als Risikofaktor der Osteoporose (Hsu et al. 2006; Migliaccio et al. 2011). Grundlage dafür sind gestörte Interaktionen zwischen dem Fettgewebe und dem Knochen. Durch die viszerale Adipositas setzen die Adipozyten vermehrt Adipokine frei, die zu einem inflammatorischen Milieu führen (Russell et al. 2010). Dieses Milieu ist gekennzeichnet durch hohe IL-6- und TNFα-Spiegel (Fontana et al. 2007), welche die Osteoklasten des Knochens stimulieren (Mundy 2007). Zusätzlich kommt es durch das insgesamt erhöhte Adiponektin indirekt über eine Stimulierung der RANKL-Produktion und einer Hemmung der OPG-Synthese zu einer weiteren Aktivierung der Osteoklasten (Luo et al. 2006). Dieser Einfluss des Fettes auf den Knochen wird auch als Lipotoxizität bezeichnet (Duque 2008).

Neben den Interaktionen mit den Zytokinen des viszeralen Fettgewebes scheint auch das Fett im Knochenmark für die Osteoporose eine Rolle zu spielen. So wurde bei der postmenopausalen Osteoporose eine deutlich vermehrte Infiltration des Knochenmarks mit Fett beobachtet (Yeung et al. 2005). Diese korreliert mit einer negativen Knochenbilanz (Justesen et al. 2001; Verma et al. 2002). Die unter 1.3.2.2 beschriebene Reifung der mesenchymalen Stammzellen in Adipozyten und Osteoblas-

ten ist in Richtung der Adipozyten verschoben (Zhao et al. 2008). Die Stammzellen des osteoporotischen Knochen der postmenopausalen Frau zeigen eine verminderte Fähigkeit, in Osteoblasten zu differenzieren und bevorzugen die Adipogenese (Rodríguez et al. 2000).

Des Weiteren hat die Dyslipidämie des Metabolischen Syndroms, vor allem das erhöhte LDL, einen negativen Einfluss auf die Knochendichte (Poli et al. 2003). Darüber hinaus manifestierte sich beim Metabolischen Syndrom ein erhöhter Leptin-Spiegel. Leptin ist ein Hormon, das vor allem in den Adipozyten gebildet wird und einen regulatorischen Einfluss auf den Fettstoffwechsel hat. Bei einem Überangebot führt es außerdem zum Verlust des Gleichgewichts zwischen Knochenbildung und Resorption und es kommt zu einem Abbau von Knochengewebe (Russell et al. 2010).

Dies zeigt, dass das Metabolische Syndrom, das häufig bei der postmenopausalen Frau auftritt, neben dem Östrogenmangel einen weiteren Risikofaktor für die Entwicklung der Osteoporose darstellt. Da das Metabolische Syndrom durch Ernährung, Sport und guter medikamentöser Einstellung der Blutwerte zu beeinflussen ist, sollte die Prophylaxe und Therapie der Osteoporose auch hier ansetzen.

1.5 Modell der ovarektomierten (ovx) Ratte

Um die Vorgänge im Knochen und im Fettgewebe der postmenopausalen Frau zu untersuchen, hat sich das anerkannte Modell der ovarektomierten Ratte etabliert, das für die Forschung der postmenopausalen Osteoporose eingesetzt wird (Turner 2001). Physiologischerweise hat die Ratte keine Menopause, doch durch die Ovarektomie (Ovx) kann ein vergleichbarer Zustand wie der der postmenopausalen Frau hergestellt werden. Sowohl die ovx-Ratte als auch die postmenopausale Frau entwickeln unter dem Östrogenmangel ähnliche klinische Beschwerden. So sind bei der Ratte „hot flushes“ (Merchenthaler et al. 1998) und eine Gewichtszunahme (Mayes und Watson 2004) zu beobachten. Es findet eine Fettumverteilung mit vermehrten viszeralen Fett und einer darauf folgenden Entwicklung des Metabolischen Syndroms statt (Seidlová-Wuttke et al. 2010b).

Außerdem entsteht das Krankheitsbild der Osteoporose (Wronski et al. 1985). Im Knochen kommt es durch das Fehlen der Östrogene zu einer gesteigerten Umbaurate, wobei die Knochenresorption im Vergleich zur Knochenneubildung überwiegt (Kalu 1991). Die größte Knochenmasse („peak bone mass“) besitzt die Ratte im

dritten Lebensmonat (Seidlová-Wuttke et al. 2008). Der zeitliche Verlauf des Knochenverlustes ist ähnlich dem des menschlichen Knochens, da auf eine anfängliche schnelle Abbauphase eine langsamere folgt. Weitere Gemeinsamkeiten sind der größere Knochenverlust in der Substantia spongiosa als in der Substantia compacta sowie das Ansprechen des Knochens auf Östrogene, Tamoxifen oder Bisphosphonate (Kalu 1991). Allerdings wirkt sich das Östrogendefizit bei der Ratte am schnellsten auf die Metaphyse der Tibia aus, während beim Menschen der frühe Knochenverlust besonders in den Wirbelkörpern beobachtet wird (Kalu 1991). Es wurde gezeigt, dass die Demineralisation der metaphysären Tibia der Ratte drei Monate nach der Ovx bereits 50 % oder mehr beträgt (Wronski et al. 1985; Garner et al. 1991; Seidlová-Wuttke et al. 2008). Deshalb werden in der vorliegenden Studie Präparate der metaphysären Tibia untersucht. Ein weiterer Unterschied liegt in dem lebenslangen Bestehen der Epiphysenfuge, welche sich im Gegensatz dazu beim Menschen mit Abschluss des Wachstums verschließt (Kapur et al. 2010).

Außerdem zeigten Seidlová-Wuttke et al. (2012) in einem Versuch, dass die Ratte nach der Ovx einen vergrößerten Hoffa-Fettkörper aufwies. Zusammen mit den Ergebnissen von Kapur et al. (2010), die eine reduzierte Gelenkknorpeldicke des Kniegelenks nach Ovx beschrieben, scheint die ovx-Ratte geeignet, um die Zusammenhänge des intraartikulären Fettes und der Osteoarthritis zu betrachten.

Das Modell der ovx-Ratte bietet den Vorteil der kurzen Zyklusdauer von vier bis fünf Tagen. So machen sich hormonelle Veränderungen schnell bemerkbar und der Effekt der Testsubstanz kann schon nach kurzer Zeit untersucht werden. Die Abteilung für Klinische und Experimentelle Endokrinologie der Universität Göttingen nutzt die ovx-Ratte bereits seit 1999 als Modell für die postmenopausale Osteoporose.

1.6 Testsubstanz Beta-Ecdyson

Ecdysteroide sind Botenstoffe, die von Insekten und Pflanzen produziert werden (Dinan 2001). Das bekannteste und meist erforschte Ecdysteroid ist das 20-OH-Ecdyson (beta-Ecdyson=Ecd), das von Butenandt und Karlson (1954) erstmalig isoliert wurde. Dieses ist die Testsubstanz in der vorliegenden Studie. Bei Insekten und Spinnen initiiert das Steroidhormon Ecd die Häutung, während es bei den Schmetterlingen die Metamorphose von der Larve über die Verpuppung bis hin zum Schmetterling reguliert (Báthori et al. 2008). Außerdem produzieren verschiedene Pflanzen Ecd, um sich vor pflanzenfressenden Insekten zu schützen (Dinan 2001).

Besonders in Spinat sind größere Mengen an Ecd zu finden (Schmelz et al. 2002; Gorelick-Feldman et al. 2008). Der Mensch ist selbst nicht in der Lage Ecd zu bilden, kann es jedoch über die Nahrung aufnehmen. Die Wirkung von Ecd auf die verschiedenen Organsysteme ist seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung. So wurde bereits 1971 eine antidiabetische Wirkung durch die Senkung des Blutzuckers bei induzierter Hyperglykämie beschrieben (Yoshida et al. 1971). Dies bestätigte sich in einer aktuellen Studie, bei der Ecd die Glukose im Serum bei Ratten mit induzierten Diabetes signifikant senken konnte (Sundaram et al. 2012). Miranova et al. (1982) entdeckten einen antiatherosklerotischen Effekt durch Minderung des Serum-Cholesterols. Außerdem ist seit einigen Jahrzehnten ein anaboler Effekt auf den Muskel bekannt (Yoshida et al. 1971; Gorelick-Feldman et al. 2008), den auch Bodybuilder nutzen, indem sie Ecd-haltige Muskelaufbaupräparate einnehmen (Dinan und Lafont 2006; Báthori et al. 2008). Im Jahre 2009 wurde eine Studie veröffentlicht, die zeigte, dass Ecd eine fettmindernde Wirkung besitzt und den Adipokinanstieg sowie die Insulinresistenz verhindert (Kizelsztein et al. 2009). Dieser positive Einfluss von Ecd auf Faktoren des Metabolischen Syndroms wurde auch in einer Studie von Seidlová-Wuttke et al. (2010b) gezeigt. Die Ecd-Gabe reduzierte bei den ovx-Ratten die intraabdominelle Adipositas, steigerte den Muskelanteil und erniedrigte das LDL, das Cholesterin sowie das Leptin. Ein anderer wichtiger Effekt ist die osteoprotektive Wirkung des Ecds, die bereits in Studien nachgewiesen wurde. So beschrieben Kapur et al. (2010) einen positiven Einfluss auf den prozentualen Anteil des trabekulären Knochens bei der ovx-Ratte. Ebenso konnte ein antiosteoporotischer Effekt über Marker des Knochenstoffwechsels und über Knochendichtemessungen per quantitativer qCT nachgewiesen werden (Seidlová-Wuttke et al. 2010a). Diese positiven Effekte auf das Metabolische Syndrom und auf die Osteoporose sollen in diesem Versuch weiter untersucht werden.

Auch andere klinische Beschwerden der postmenopausalen Frau scheint Ecd mindern zu können. So wurde in einer Studie gezeigt, dass unter Ecd-Gabe die ovx-Ratten weniger „hot flushes“ entwickelten (Puri et al. 2012).

Zu den weiteren positiven Effekten von Ecd zählt die protektive Wirkung auf die Niere (Syrov und Khushbaktova 2001) und die proliferative Wirkung durch Steigerung der Hämatopoese (Syrov et al. 1997).

Der Wirkmechanismus des Ecds ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Interaktion mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) könnte die positive Wirkung auf den Knochen

begründen. Bewiesen ist, dass Ecd nicht über Östrogenrezeptoren wirkt (Seidlová-Wuttke et al. 2010b) und damit auch nicht die Gefahr birgt, Nebenwirkungen wie die einer Östrogentherapie zu entwickeln. Auch bei langjähriger Einnahme von hohen Dosen bei Bodybuildern sind keine Nebenwirkungen bekannt (Dinan und Lafont 2006). Aufgrund dieser vielfältigen bereits erforschten positiven Effekte und der fehlenden Nebenwirkungen scheint Ecd potentiell geeignet zur Herstellung eines ganzheitlichen Medikaments für die postmenopausale Frau. Neben den akuten klimakterischen Beschwerden könnte es auch vor der Entwicklung des Metabolischen Syndroms und der Osteoporose schützen.

1.7 Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist es, weitere Erkenntnisse über das Potential des pflanzlichen Steroids Ecd als mögliche ganzheitliche Therapie für die postmenopausale Frau zu gewinnen. Da die Frau nach der Menopause oft unter vielfältigen Beschwerden leidet, bei denen langfristig besonders die Osteoporose und das erhöhte kardiovaskuläre Risiko als Folge eines Metabolischen Syndroms im Vordergrund stehen, wäre es wünschenswert, wenn Ecd mehrere dieser Faktoren beeinflussen könnte. In durchgeführten Versuchen wurden bereits positive Effekte von Ecd auf den Knochen von oxv-Ratten nachgewiesen (Kapur et al. 2010). In einer Arbeit von Seidlová-Wuttke et al. (2010b) zeigte sich ein schützender Einfluss des Ecds vor der Entwicklung verschiedener Faktoren des Metabolischen Syndroms.

In dem vorliegenden Versuch soll zunächst der protektive Effekt von Ecd auf den Knochen bestätigt werden. Außerdem wird die Fragestellung erweitert und auch der metabolische Effekt von Ecd auf das regionale Fettgewebe wird analysiert.

Für diese Untersuchungen wird das etablierte Modell der ovx-Ratte als postmenopausale Frau genutzt. Dabei wird der Effekt von Ecd und Östrogenen auf die ovx-Ratte verglichen. Nach vierwöchiger Gabe von Ecd und Estradiolbenzoat (E2) soll durch die histomorphologische Auswertung von Knochenpräparaten der linken Tibia und des Kniegelenks der Vergleich mit einer intakten, nicht-ovx Gruppe erfolgen.

Betrachtet werden als Knochenstrukturen die Kortikalisdicke und der Trabekelanteil in der Metaphyse. Zusätzlich erfolgt die Bestimmung von Knochenaufbau- und -abbaumarkern im Blut. Um zu analysieren, inwieweit Ecd einen metabolischen Effekt im Rahmen des Metabolischen Syndroms auf das regionale Fettgewebe hat, wird

einerseits der Anteil von Fett im Knochenmark und andererseits der Gehalt im Gelenkspalt des Knies ermittelt. Die Epiphysenfuge und der Anteil an rotem Knochenmark in der Metaphyse werden bestimmt, um die Erkenntnisse über die proliferative Wirkung von Ecd zu erweitern.

2 Material und Methoden

An dem praktischen Teil des Versuchs und an der Herstellung der histologischen Präparate habe ich selber nicht teilgenommen, sondern dies wurde von dem Team der Arbeitsgruppe Endokrinologie Göttingen unter der Aufsicht von PD Dr. med. Seidlová-Wuttke durchgeführt. Anschließend wurden mir freundlicherweise die Knochenpräparate der Kniegelenke zur mikroskopischen Auswertung zur Verfügung gestellt. Zusätzlich hatten ich und andere Co-Doktoranden die Möglichkeit, aus dem Daten-Pool der Arbeitsgruppe Endokrinologie Göttingen die erhobenen Futter- und Gewichtsdaten sowie Blutserumwerte des Versuchs zu verwenden, da sie für die Interpretation der jeweiligen Arbeiten von Bedeutung waren.

2.1 Versuchsaufbau

Der Versuch wurde im Zeitraum vom 09. März bis zum 18. April 2011 durchgeführt. Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um 40 weibliche Sprague-Dawley (SD)-Ratten, die bei Ankunft drei Monate alt waren. Diese wurden auf vier Gruppen mit jeweils 10 Tieren verteilt. Nach einer einwöchigen Eingewöhnungsphase erfolgte am 16. März 2011 die Ovx.

Über den Zeitraum von 28 Tagen wurden die zu testenden Substanzen bis zur Obduktion am 18. April 2011 per os (p.o.) über das Futter appliziert. Eine zeitliche Übersicht über den Versuchsablauf ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

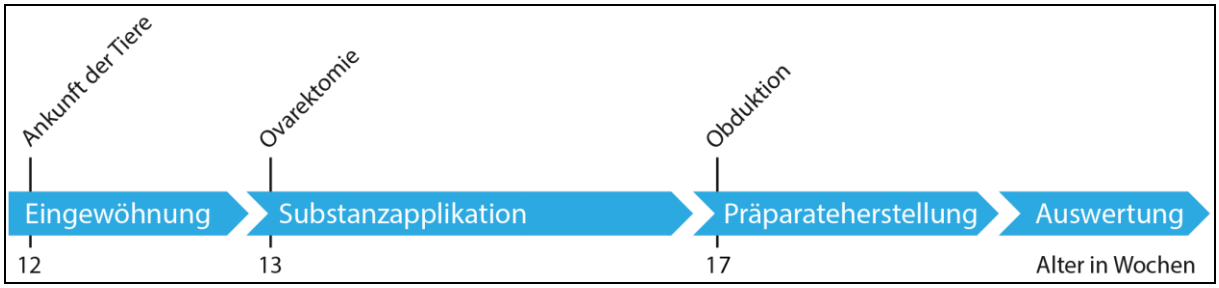


Abbildung 2.1: Übersicht über den Versuchsablauf.

2.1.1 Versuchsgruppen

Die intakte Gruppe (intakt, sf) erhielt neben dem sojafreien Basisfutter keine weiteren Substanzen. Sie stellte in diesem Modell die Frau vor der Menopause mit noch erhaltener Ovarienfunktion dar. Ebenso wurden der Kontrollgruppe ovx keine weiteren Substanzen zugeführt. Sie spiegelte die postmenopausale Frau wider. Um den Effekt der Testsubstanz Ecd auf den osteoporotischen Knochen zu untersuchen, erhielt eine ovx-Gruppe 3,0 g Ecd pro kg Basisutter (ovx-Ecd). Für den Vergleich mit der Wirkung einer Hormontherapie in der Postmenopause wurde der letzten ovx-Gruppe 10 mg Estradiolbenzoat (E2) pro kg Basisfutter hinzugefügt (ovx-E2).
In der Tabelle 2.1 sind die Versuchsgruppen aufgeführt:

Gruppe	Futter	Hersteller	Dosis	Applikation
intakt, sf (sham-ovx)	Sojafreies Basisfutter ssniff EF R/M	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, www.ssniff.de	frei	p.o. 28 Tage
ovx	Sojafreies Basisfutter ssniff EF R/M	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, www.ssniff.de	frei	p.o. 28 Tage
ovx-Ecd	Sojafreies Basisfutter ssniff EF R/M **+Ecd**	Ecd: Changzhou Dahua Corporation, China	3,0 g/kg Futter	p.o. 28 Tage
ovx-E2	Sojafreies Basisfutter ssniff EF R/M **+Estradiolbenzoat**	Estradiolbenzoat: Sigma-Aldrich, USA	10 mg/kg Futter	p.o. 28 Tage

Tabelle 2.1: Darstellung der vier Versuchsgruppen mit Angabe von Testsubstanz, Hersteller, Dosis und Applikation.

2.2 Testsubstanzen

Die Testsubstanz Ecd wurde von der Changzhou Dahua Corperation, China hergestellt und das E2 stammte von der Firma Sigma-Aldrich, USA. Dem Futter wurden die Substanzen mit der Konzentration von 3 g Ecd/kg Futter und 10 mg E2/kg Futter von der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest zugeführt. Durch die individuelle Futteraufnahme der Tiere resultierten daraus folgende durchschnittlichen täglichen Substanzeinahmen:

Gruppe	mittlere Futteraufnahme g/Tag/Tier	mittlere Substanzaufnahme mg/Tag/Tier
intakt, sf (sham-ovx)	16,83	0
ovx	18,66	0
ovx-Ecd	21,90	**65,7 Ecd**
ovx-E2	15,48	**0,01 E2**

Tabelle 2.2: Übersicht über die mittlere Futteraufnahme in g/Tag/Tier sowie über die mittlere Substanzaufnahme von Ecd und E2 in mg/Tag/Tier (Daten aus dem Pool der Arbeitsgruppe Endokrinologie Göttingen).

Die vorliegende Arbeit basiert auf der histomorphologischen Analyse der Tibia links. Zusätzlich wurden die Knochenmarker Osteokalzin und CrossLaps mit einbezogen.

2.3 Herstellung der Hartschnittpräparate

Von jedem Tier wurden jeweils zwei Hartschnittpräparate des linken Kniegelenks, bestehend aus Tibia, Femur, Patella und Gelenkfett hergestellt. Dafür wurde der Knochen zunächst fixiert, in Kunststoffblöcke eingebettet und geschnitten. Danach erfolgten die Entplastung und die Goldner-Färbung der histologischen Präparate (detaillierte Beschreibung der Herstellung siehe Anhang). Meine Aufgabe bestand in der Vermessung der Präparate, der Darstellung der histologischen Strukturen und der anschließenden statistischen Auswertung der Ergebnisse.

2.4 Histologische Auswertung

Für die histologische Auswertung der Tibiapräparate wurde das Mikroskop Zeiss Axiophot der Carl Zeiss AG, Jena verwendet. Eine integrierte CCD-Kamera von Olympus ColorView der Soft Imaging System GmbH, Münster ermöglichte die foto-gestützte Auswertung. Dabei wurden die aufgenommenen Präparatbilder mit Hilfe der Computersoftware Cell-D analySIS® 3.3 der Soft Imaging System GmbH analysiert und ausgewertet. Auf der folgenden Abbildung ist das histologische Präparat zu erkennen. Markiert sind die in dieser Arbeit untersuchten Strukturen.

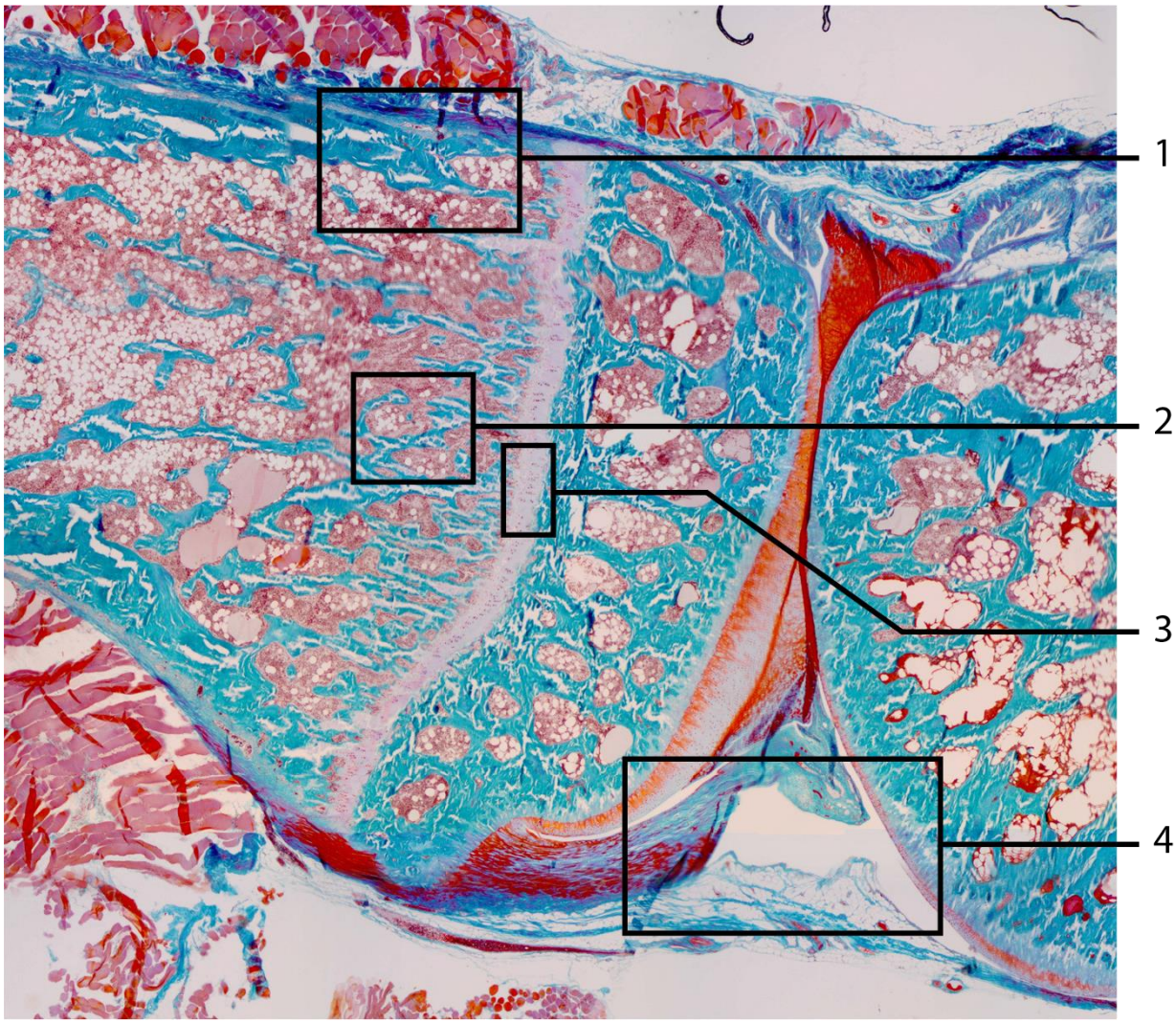


Abbildung 2.2: Übersichtsbild des histologischen Tibiapräparats (Med. Diss. Göttingen unveröffentlicht, mit freundlicher Genehmigung von Lucas Dannenberg).

1. **Messung der Kortikalisdicke**
2. **Messung der Anteile an Trabekeln, rotem und gelbem Mark**
3. **Messung der Epiphysenfuge**
4. **Messung des intraartikulären Fettgewebes**

Dargestellt sind von links nach rechts der metaphysäre und epiphysäre Bereich der Tibia mit der Epiphysenfuge, der Gelenkspalt sowie ein Teil des distalen Femurs. Durch die Goldner-Färbung erscheinen die knöchernen Strukturen grün. Zu sehen sind außen die Kortikalis, die aus der Substantia compacta besteht, und innen die Trabekel, die Substantia spongiosa. Die im Knochen liegenden weißen Strukturen sind Artefakte, die durch den Druck in den Präparaten entstanden sind. Das rote Knochenmark stellt sich in der Goldner-Färbung rot dar und das Fettmark, welches durch die Aufarbeitung des Gewebes ausgewaschen wurde, ist als eine Vielzahl von weißen Vakuolen zu erkennen. Die Epiphysenfuge durchzieht die tibiale Epiphyse und ist blassrosa. Es zeigt sich eine Linie aus rot angefärbten Zellkernen der Chondrozyten. Die Tibia und der Femur sind durch eine Gelenkkapsel verbunden, an deren Innenseite sich Anschnitte des Hoffa-Fettkörpers weiß darstellen. Außerdem ist der Gelenkknorpel an den Gelenkflächen in blassgrün bis karminrot zu sehen. Da es in der vorliegenden Arbeit um den Effekt von Ecd auf den Knochen und auf das regionale Fettgewebe ging, waren die zu untersuchenden Strukturen die Anteile von Trabekeln, rotem Knochenmark und gelbem Fettmark in der Metaphyse, die Kortikalis, die Epiphysenfuge und der intraartikuläre Hoffa-Fettkörper. Es erfolgte eine Vergrößerung der einzelnen Strukturen und ihre Vermessung.

2.4.1 Messung der Anteile der Trabekel, des roten Knochenmarks und des gelben Fettmarks der Metaphyse

Im Inneren des Knochens befindet sich das knöcherne Gerüst der Trabekel mit dem dazwischen liegenden Knochenmark. Um die Anteile der Trabekel und des Knochenmarks in der Spongiosa der Metaphyse zu bestimmen, wurde bei einer Vergrößerung von 1,25×10 ein zufälliger Bildausschnitt verwendet. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Ausschnitte jeweils angrenzend an die Epiphysenfuge und auf mittiger Höhe dieser gewählt.

Das Programm analySIS® 3.3 ermöglichte das Markieren der unterschiedlichen Farbbereiche mit Farblayern, so dass die Flächen der verschiedenen Strukturen berechnet werden konnten.

Die durch die Goldner-Färbung grün erscheinende knöcherne Komponente erhielt den Farblayer blau, das rote Knochenmark rot und das ausgewaschene Fettmark gelb. Da zum Teil die weißen Flächen der Artefakte und die der Adipozyten von dem Programm nicht unterschieden werden konnten, war die gelbe Anfärbung allgemein etwas höher als der tatsächliche Adipozytenanteil.

Mit Hilfe des analySIS® 3.3 Bildanalyseprogramms konnte eine Phasenanalyse durchgeführt werden, welche durch die Farbkodierung den jeweiligen prozentualen Anteil an der Gesamtfläche des Bildes ermittelte.

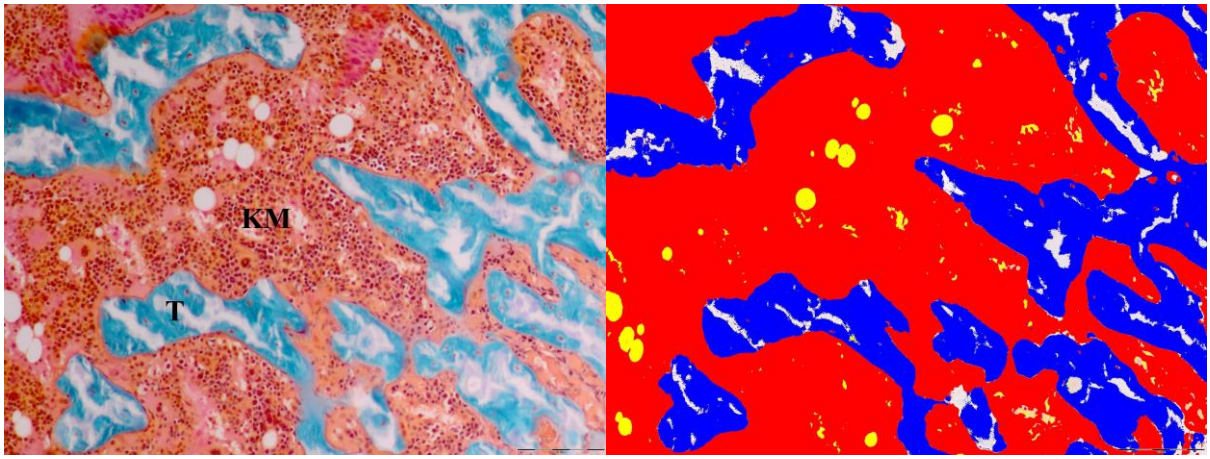


Abbildung 2.3: Darstellung mit der Cell-D analySIS® 3.3 Software bei 1,25×10-Vergrößerung: linkes Bild mit Ausschnitt aus der Spongiosa in Goldner-Färbung, rechts Markierung der Trabekel mit Farblayer blau, rotes Knochenmark rot und gelbes Fettmark gelb (KM=Knochenmark; T=Trabekel).

Um die Fläche der nicht mit Farblayern belegten Artefakte nicht in das Ergebnis einfließen zu lassen, wurde folgende Formel angewandt:

$$\frac{A_X\left[mm^2\right]}{\left(A_{Trabekel}\left[mm^2\right]+A_{rotesMark}\left[mm^2\right]+A_{gelbesMark}\left[mm^2\right]\right)}\acute{}\ 100 = A_X\left[\%\right]$$

2.4.2 Messung der Kortikalisdicke im metaphysären Bereich

Die Messungen zur Bestimmung der Kortikalisdicke wurden bei einer Vergrößerung von 2,5 und einer Kalibrierung von 1,25 bei jedem Präparat jeweils auf beiden Seiten des Tibiapräparats durchgeführt. Um zu gewährleisten, dass es sich bei dem gemessenen Bild um den metaphysären Bereich der Kortikalis handelt, wurde am Bildrand die Epiphysenfuge mit angeschnitten. Daraufhin erfolgten bei jedem Präparat je nach Durchführbarkeit manuell 8-10 senkrechte Messungen vom äußeren zum inneren Rand der Kortikalis. Störende artefaktreiche Kortikalisstrukturen wurden dabei ausgespart.

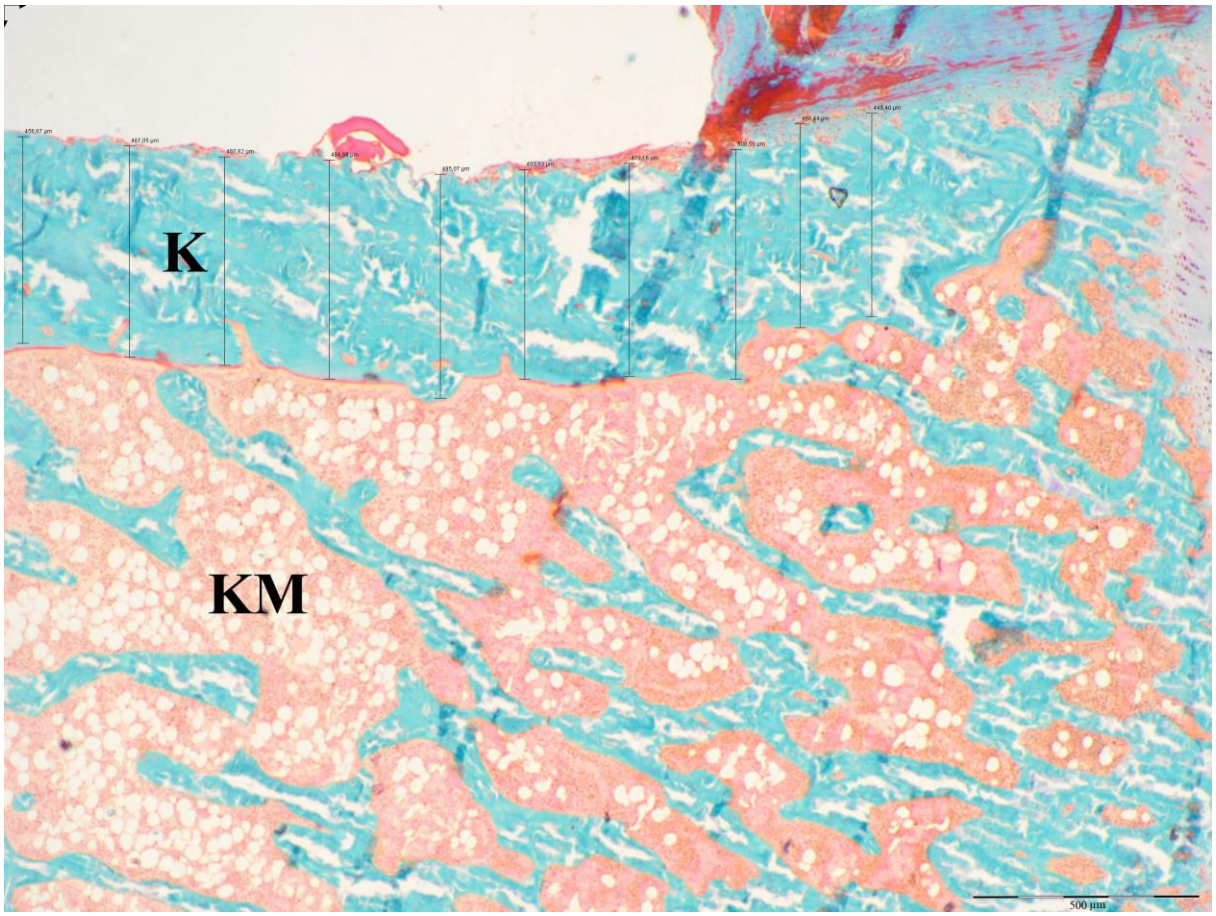


Abbildung 2.4: Messung der Kortikalisdicke im metaphysären Bereich der Tibia , 1,25×2,5 Vergrößerung (K=Kortikalis; KM=Knochenmark).

2.4.3 Messung der Epiphysenfuge

Für die Messung der Epiphysenfuge wurde zunächst mit der Vergrößerung 1,6×10 ein mittig liegender Ausschnitt der Epiphysenfuge gewählt. Durch eingezeichnete Hilfslinien ergab sich eine Dreiteilung der Fuge in die Reservezone, die auch basale Schicht genannt wird und dem Reservepool an Chondrozyten entspricht, gefolgt von der Proliferationszone, in der sich die Zellen longitudinal anordnen und sich teilen. Die an die Trabekel angrenzende hypertrophe Zone ist gekennzeichnet durch die hypertrophierten Chondrozyten, die zu der Bezeichnung Blasenknorpel führten. Die einzelnen Zonenbreiten wurden jeweils durch 12-15 Einzelmessungen ermittelt. Die Summe der Messungen der jeweiligen Zonen ergab die Breite der gesamten Epiphysenfuge.

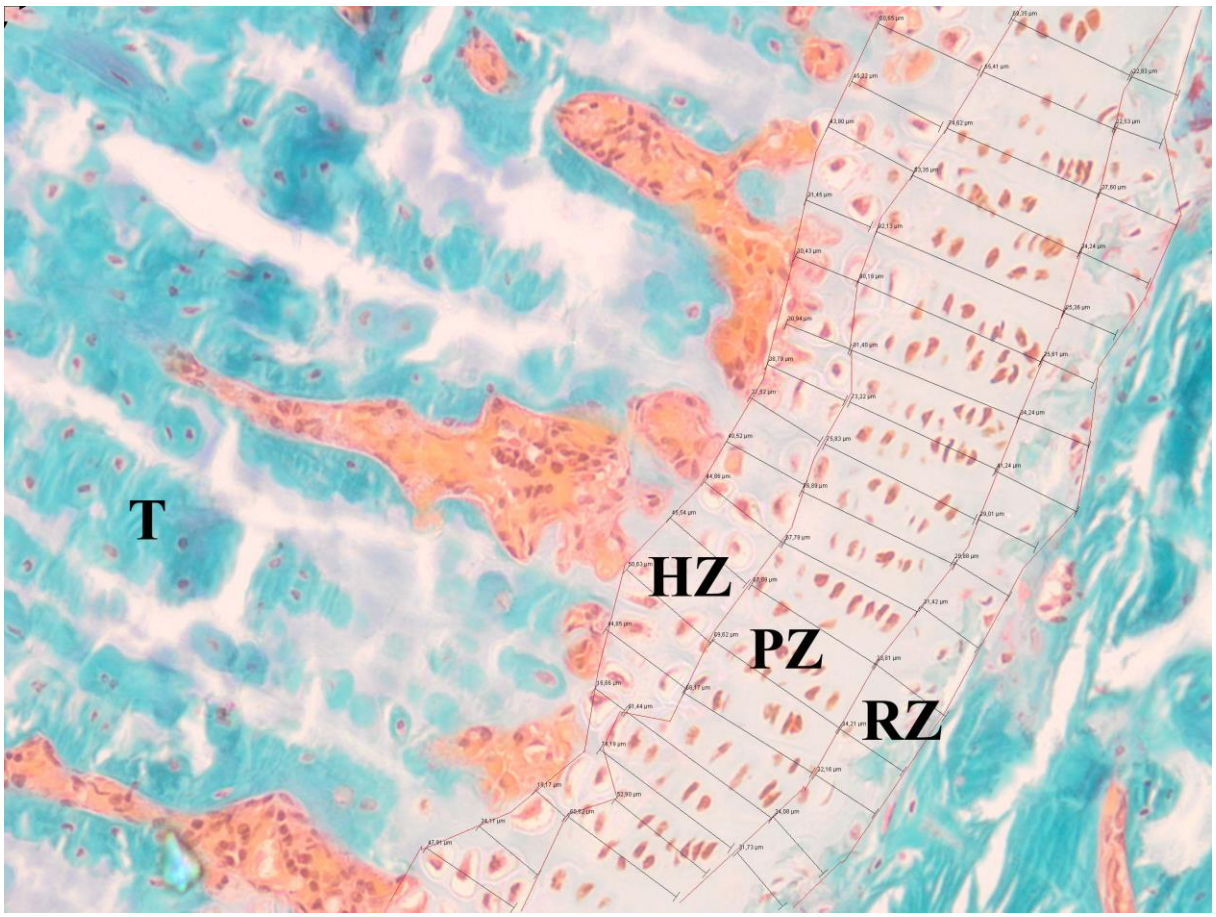


Abbildung 2.5: Einteilung der Epihysenfuge in Reserve-, Proliferations- und hypertrophe Zone, Messung der jeweiligen Zonen, 1,6×10-Vergrößerung (T=Trabekel; HZ=hypertrophe Zone; PZ=Proliferationszone; RZ=Reservezone).

2.4.4 Messung des intraartikulären Fettgewebes

Das in den Präparaten abgebildete Fettgewebe entspricht einem sagittalen Anschnitt des infrapatellären Fettpolsters im Kniegelenk. Dieses wird auch als Hoffa-Fettkörper bezeichnet. Um den Effekt der Ovx und des Ecds auf das intraartikuläre Fett zu beurteilen, wurde dieser Fettgehalt bestimmt. Dies erfolgte durch manuelles Messen des Umfangs der Adipozytenansammlungen, die in dem jeweiligen Präparat zu sehen waren. Mit Hilfe des Computerprogramm konnte mit der Summe dieser Messungen die Gesamtfläche des Fettgewebes in µm² berechnen werden. Die Messungen erfolgten bei einer Vergrößerung von 1,25×2,5.

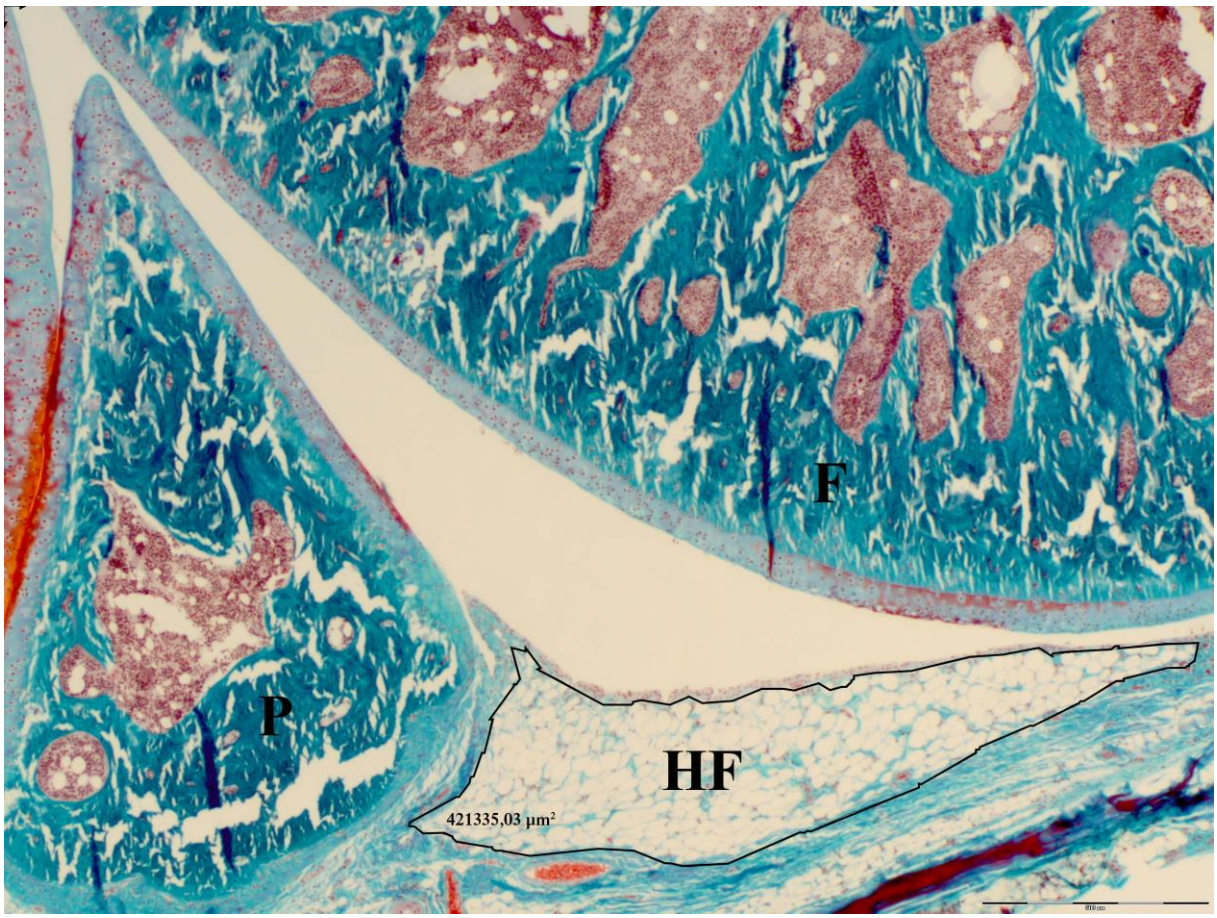


Abbildung 2.6: Messung des Hoffa-Fettkörpers im Kniegelenk, 1,25×2,5-Vergrößerung (P=Patella, F=Femur; HF= Hoffa-Fettkörper).

2.5 Bestimmung der Serumparameter

Während der Obduktion wurde das Blut zur Analyse von Serumparametern entnommen. Die Bestimmungen des Knochenaufbaumarkers Osteokalzin und des Knochen-

resorptionsmarkers CrossLaps erfolgten durch das Team der Arbeitsgruppe Endokrinologie Göttingen mittels ELISA (Osteometer Bio Tech AIS, Dänemark).

2.6 Statistik

Alle Messergebnisse wurden in Tabellen in Microsoft Office Excel 2007 erfasst. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Computerprogramms GraphPadPrism 4® (GraphPad Software, Inc, USA) durchgeführt. Dabei wurden die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der jeweiligen Versuchsgruppen berechnet und graphisch in einem Säulendiagramm dargestellt.

Die Ermittlung der Signifikanz erfolgte durch Anwendung einer einfachen Varianzanalyse für wiederholte Messungen eines Faktors (ANOVA) und anschließenden Dunnett´s Multiple Comparison Test, bei dem die Kontrollgruppe (ovx,sf) mit den anderen Versuchsgruppen (intakt, ovx-Ecd, ovx-E2) verglichen wurde. Das Signifikanzniveau betrug $p<0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Körpergewicht und Futteraufnahme

Während der 28-tägigen Substanzaufnahme erfolgte eine Erhebung des Körpergewichts und der Futteraufnahme, um die Entwicklung der Tiere zu dokumentieren.

Die Abbildung 3.1 zeigt den Effekt von E2 und Ecd auf die Veränderung des Körpergewichts. Die Zu- bzw. Abnahme in Bezug auf das Ausgangsgewicht ist auf der y-Achse in Gramm dargestellt. Auf der x-Achse sind die Versuchsgruppen zu sehen. Diese bestanden aus der intakten Gruppe (intakt), aus der ovx-Kontrollgruppe ohne zusätzlicher Substanzgabe (ovx,sf), aus der ovx-Gruppe, die 10 mg E2 pro kg Futter erhielt (ovx-E2) und aus der ovx-Gruppe, die 3 g Ecd pro kg Futter erhielt (ovx-Ecd).

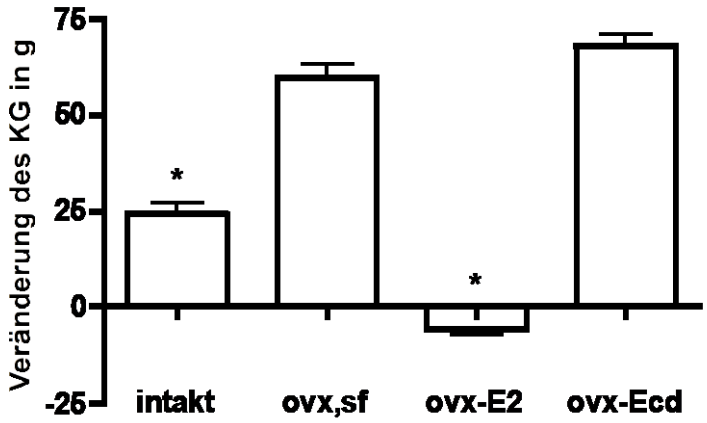


Abbildung 3.1: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: Veränderung des Körpergewichts (KG) in g (*p<0,05 vs ovx,sf) (Daten aus dem Pool der Arbeitsgruppe Endokrinologie Göttingen).

In dem Säulendiagramm ist zu sehen, dass alle Gruppen bis auf die ovx-E2-Gruppe an Gewicht zugenommen haben. Dabei hat die intakte Gruppe mit einer mittleren Gewichtszunahme von 24,40 g signifikant weniger an Gewicht gewonnen als die ovx,sf-Kontrollgruppe, die im Mittel 60,35 g zunahm. Die E2-Gabe hat im Verlauf des Versuches das Körpergewicht im Mittel sogar um 5,60 g reduziert.

Die Tabelle 3.1 zeigt die mittlere Futteraufnahme in g pro Tag pro Tier der vier Versuchsgruppen:

intakt	ovx,sf	ovx-E2	ovx-Ecd
16,38 g	18,66 g	15,48 g	21,90 g

Tabelle 3.1: Mittlere Futteraufnahme in g/Tag/Tier (Daten aus dem Pool der Arbeitsgruppe Endokrinologie Göttingen).

Die ovx-Ecd-Gruppe hat im Mittel 5,52 g mehr Futter aufgenommen als die intakten Tiere, während ovx-E2 0,90 g weniger aufnahm.

3.2 Phasenanalyse

Die Phasenanalyse wurde, wie unter 2.4.3 beschrieben, durchgeführt. In den folgenden Abbildungen ist der Effekt von E2 und Ecd auf die Strukturen der Metaphyse der Tibia zu sehen. Dargestellt sind die Anteile des gelben Marks, des roten Marks und der Knochentrabekel in der Metaphyse in %. Zur besseren Übersicht des Verhältnisses von rotem und gelbem Mark ist in der Abbildung 3.5 der Index dieser Anteile aufgeführt.

3.2.1 Gelber Markanteil in %

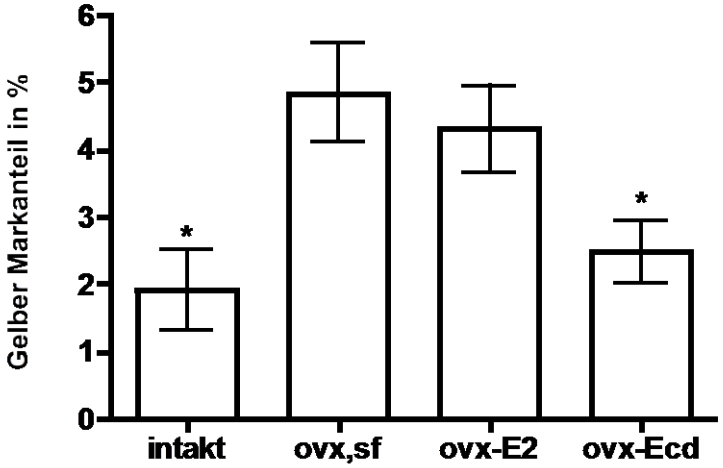


Abbildung 3.2: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: gelber Markanteil in % (*p<0,05 vs ovx,sf).

In der Abbildung 3.2 ist der Effekt von E2 und Ecd auf den Anteil des Fettes im Knochenmark zu sehen. Die ovx-Ecd-Gruppe zeigt einen signifikant geringeren Anteil des gelben Marks als die Kontrollgruppe ovx,sf. Damit ist sie vergleichbar mit der

Gruppe intakt, die ebenso einen signifikant kleineren Anteil an gelbem Mark aufweist. Die mit E2 behandelte Gruppe dagegen hat einen ähnlich hohen Fettanteil wie die ovx,sf-Tiere.

3.2.2 Trabekelanteil in %

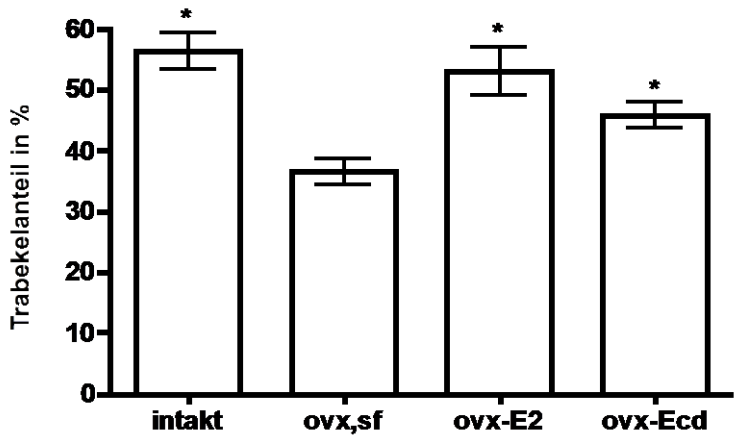


Abbildung 3.3: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: Trabekelanteil in % (*p<0,05 vs ovx,sf).

Die Abbildung 3.3 zeigt den Effekt von E2 und Ecd auf den Trabekelanteil in der Metaphyse. Alle drei Versuchsgruppen zeigen einen signifikant höheren Trabekelanteil als die Kontrollgruppe ovx,sf. Die Gruppe intakt und die Gruppe ovx-E2 haben mit den Mittelwerten von 56,43 % und 53 % noch einen höheren Anteil als die Gruppe ovx-Ecd, die einen mittleren Anteil von 45,86 % aufweist.

3.2.3 Roter Markanteil in %

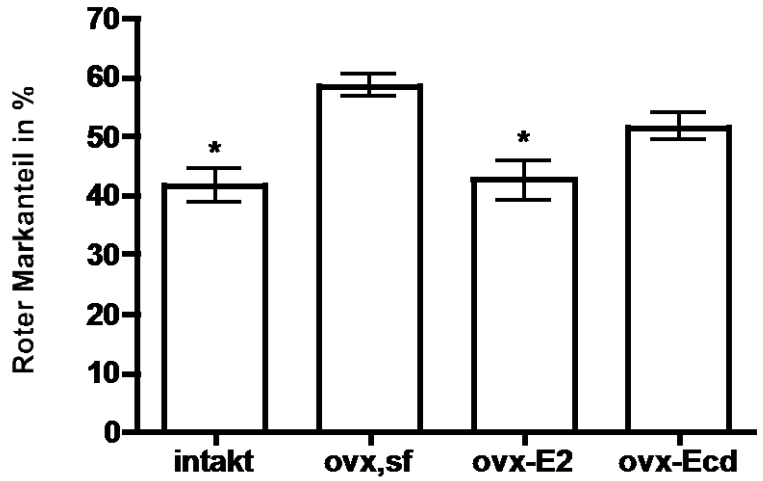


Abbildung 3.4: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: roter Markanteil in % (*p<0,05 vs ovx,sf).

Bei dem Effekt von E2 und Ecd auf das rote Mark zeigen die intakte Gruppe und die ovx-E2-Gruppe einen signifikant kleineren Anteil an rotem Knochenmark als die Kontrollgruppe ovx,sf. Diese hat ebenso wie die Gruppe ovx-Ecd einen höheren Anteil an rotem Mark.

3.2.4 Index gelbes Mark / rotes Mark

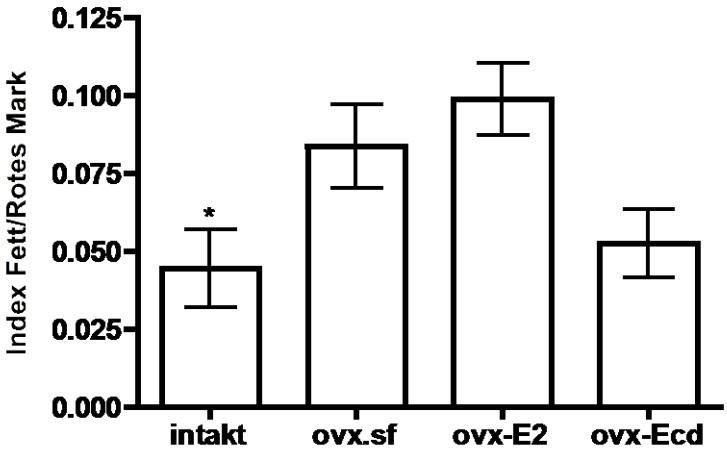


Abbildung 3.5: Index zwischen gelbem Mark und rotem Mark (*p<0,05 vs ovx,sf).

Um das Verhältnis von rotem und gelbem Knochenmark zu veranschaulichen, ist in der Abbildung 3.5 der berechnete Index in einem Säulendiagramm dargestellt. Zu sehen ist, dass die intakten Tiere signifikant weniger Fett pro rotes Mark haben als die Gruppe ovx,sf. Die ovx-Ecd-Gruppe hat eine ähnliche Tendenz, diese ist jedoch nicht signifikant. Die ovx-E2-Gruppe ist ebenfalls nicht signifikant verändert.

3.3 Kortikalisdicke

Die Kortikalisdicke wurde im Bereich der Metaphyse der Tibia gemessen. Die Abbildung 3.6 stellt in einem Säulendiagramm die Dicke der Kortikalis der ovx,sf-Kontrollgruppe und die der Versuchsgruppen dar.

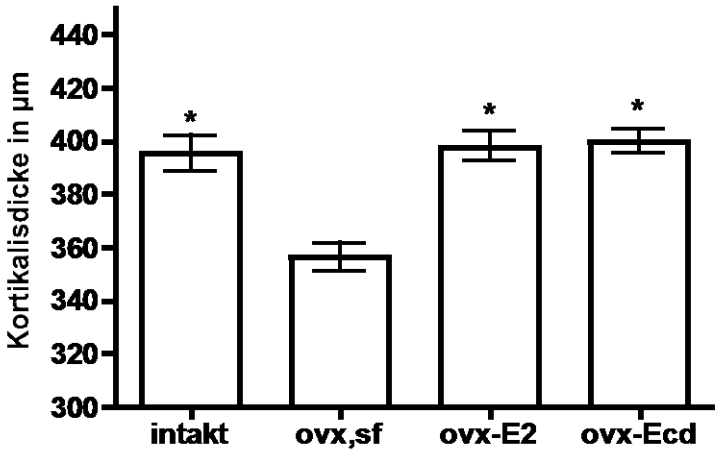


Abbildung 3.6: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: Kortikalisdicke in der Metaphyse der Tibia in µm (*p<0,05 vs ovx,sf).

Die Ovx führt zur Abnahme der Kortikalisdicke. In dem Versuch hat die ovx,sf-Kontrollgruppe eine mittlere Dicke von 356,4 µm. Alle drei Versuchsgruppen (intakt, ovx-E2, ovx-Ecd) weisen eine signifikant dickere Kortikalis auf.
Bei den mit Ecd gefütterten Tieren (mittlere Dicke 399,9µm) besteht eine Differenz von 43,5 µm. Sie hat in etwa die gleiche Dicke der Kortikalis wie die intakte Gruppe und die ovx-E2-Gruppe.

3.4 Serumparameter

In den folgenden Säulendiagrammen sind die im Serum bestimmten Knochenparameter der vier Versuchsgruppen dargestellt.

3.4.1 Osteokalzin in ng/ml

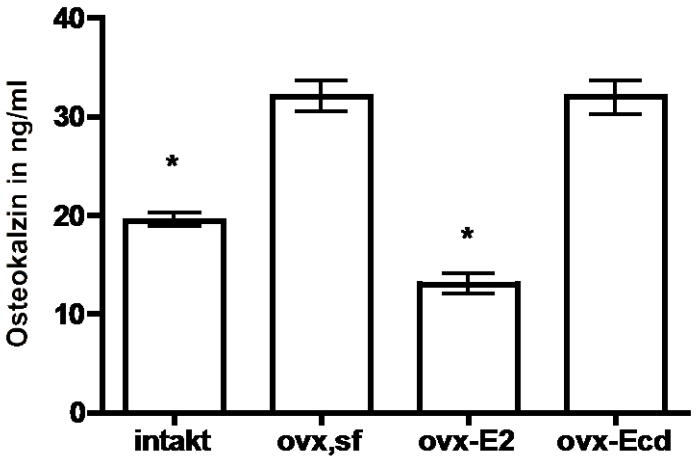


Abbildung 3.7: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: Osteokalzin im Serum in ng/ml (*p<0,05 vs ovx,sf) (Daten aus dem Pool der Arbeitsgruppe Endokrinologie Göttingen).

In der Abbildung 3.7 ist der Effekt von E2 und Ecd auf den Knochenneubildungsmarker Osteokalzin im Blut in ng/ml zu sehen. Die intakte Gruppe sowie die ovx-E2-Gruppe haben eine signifikant geringere Menge an Osteokalzin im Serum als die ovx-Gruppe. Die ovx-Ecd-Gruppe hat dagegen mit einem mittleren Wert von 32,01 ng/ml eine ähnlich hohe Menge an Knochenneubildungsmarker wie die ovx-Gruppe (32,05 ng/ml).

3.4.2 CrossLaps in ng/ml

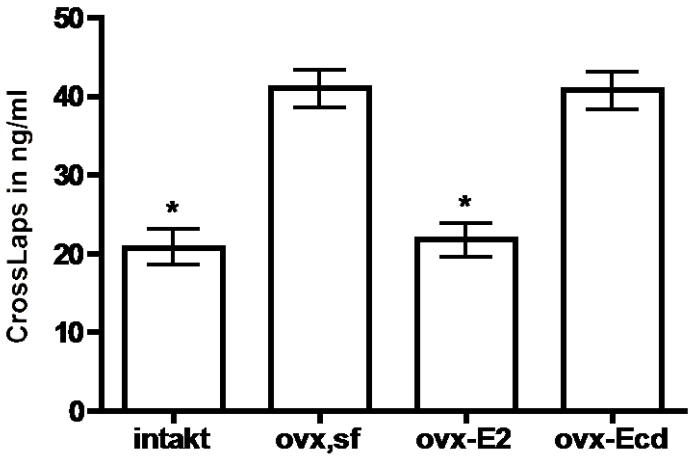


Abbildung 3.8: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: CrossLaps im Serum in ng/ml (*p<0,05 vs ovx,sf) (Daten aus dem Pool der Arbeitsgruppe Endokrinologie Göttingen).

Als Marker für die Knochenresorption erfolgte die Bestimmung des Serum-CrossLaps. In der Abbildung 3.8 ist zu sehen, dass die intakte sowie die ovx-E2-Gruppe signifikant weniger von dem Knochenabbauprodukt CrossLaps in ng/ml im Serum haben als die ovx-Gruppe. Die ovx-Ecd-Gruppe hat wiederum eine nicht signifikant andere, sondern ähnlich hohe Menge (40,72 ng/ml) wie die ovx-Gruppe (41,00 ng/ml).

3.5 Epiphysenfuge

In den folgenden Säulendiagrammen ist zunächst die Gesamtbreite der Epiphysenfuge der Tibia dargestellt, gefolgt von den Diagrammen der Breite der einzelnen Zonen. Auf der Ordinate ist jeweils die Schichtdicke in µm aufgetragen und auf der Abszisse sind die Versuchsgruppen dargestellt (intakt, ovx,sf, ovx-E2, ovx-Ecd).

3.5.1 Gesamtbreite

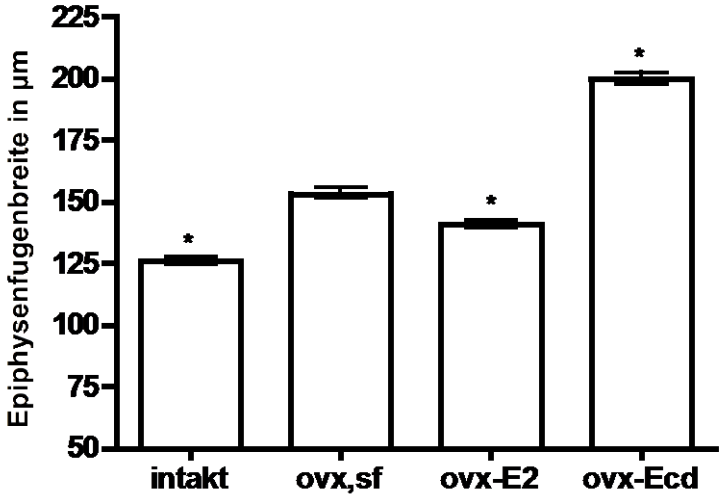


Abbildung 3.9: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: Gesamtbreite der Epiphysenfuge in µm (*p<0,05 vs ovx,sf).

In der Abbildung 3.3 ist der Effekt von E2 und Ecd auf die Gesamtbreite der Epiphysenfuge zu sehen. Die mit E2 behandelte Gruppe ovx-E2 ist ähnlich wie die Gruppe intakt signifikant schmaler als die Kontrollgruppe ovx,sf.

Die Gruppe ovx-Ecd dahingegen zeigt eine signifikant verbreiterte Epiphysenfuge verglichen mit ovx,sf. Diese haben im Mittel eine Epiphysenbreite von 153,3 µm, während die mit Ecd gefütterten Tiere eine mittlere Gesamtbreite von 199,5 µm besitzen.

3.5.2 Basale Schicht (Reservezone)

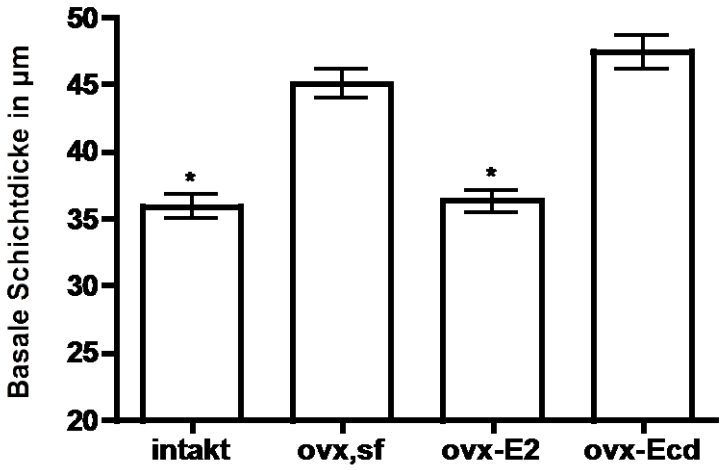


Abbildung 3.10: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: basale Schicht der Epiphysenfuge in µm (*p<0,05 vs ovx,sf).

Im Säulendiagramm der Abbildung 3.10 ist in µm die basale Schichtdicke der Epiphysenfuge der verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt. Diese entspricht in etwa der Verteilung der Gesamtbreite. Auch hier besitzen die intakte und die Gruppe ovx-E2 eine signifikant schmalere basale Schicht. Die Ecd-Gruppe ist jedoch mit einem mittleren Wert von 47,42 µm nicht signifikant breiter als die Kontrollgruppe ovx,sf mit einem Wert von 45,06 µm.

3.5.3 Proliferative Schicht (Proliferationszone)

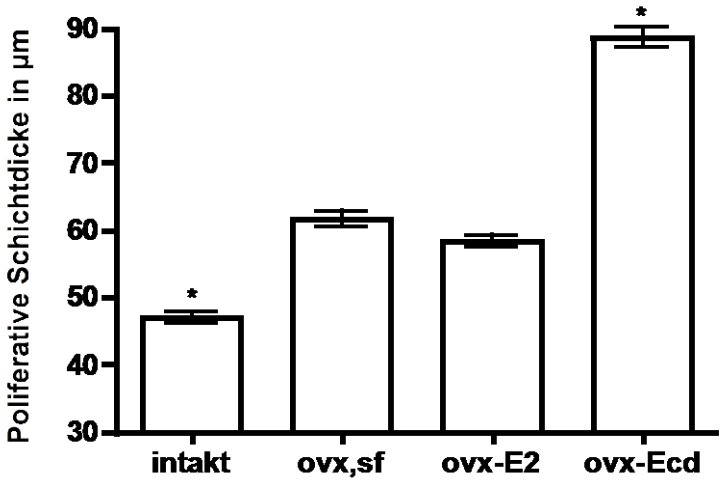


Abbildung 3.11: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: proliferative Schicht der Epiphysenfuge in µm (*p<0,05 vs ovx,sf).

Die Abbildung 3.11 zeigt den Effekt von E2 und Ecd auf die proliferative Schicht der Epiphysenfuge. Die intakten Tiere haben erneut eine signifikant schmalere proliferative Schicht als die Kontrollgruppe ovx,sf. Die Gruppe ovx-E2 zeigt keine Signifikanz. Die mit Ecd gefütterten Tiere haben eine signifikante, deutlich breitere proliferative Schicht als die Gruppe ovx,sf entwickelt. Die mittlere Differenz dieser beiden Gruppen beträgt 26,98 µm.

3.5.4 Hypertrophe Schicht (hypertrophe Zone)

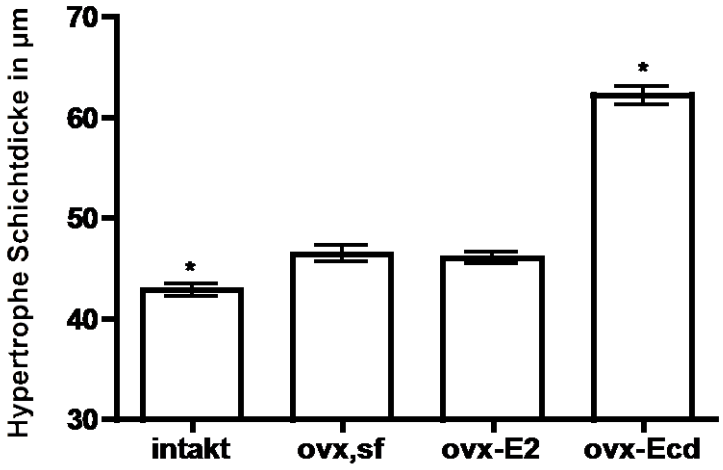


Abbildung 3.12: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: hypertrophe Schicht der Epiphysenfuge in µm (*p<0,05 vs ovx,sf).

Die Verteilung der hypertrophen Schicht zeigt eine ähnliche Tendenz wie die der proliferativen Schicht. Auch hier besitzt die intakte Gruppe eine signifikant schmalere hypertrophe Schicht, während die Ecd-Gruppe eine signifikante und deutlich breitere hypertrophe Schicht als die Kontrollgruppe ovx,sf entwickelt hat.

3.5.5 Prozentuale Anteile der drei Zonen

Insgesamt ist die Gesamtbreite der Epiphysenfuge bei den mit Ecd behandelten Tieren deutlich am höchsten. Im folgenden Säulendiagramm wird nun dargestellt, wie sich die prozentualen Anteile der drei Epiphysenfugenzonen auf die Gesamtbreite bezogen, verhalten. Die Zonenbreite ist in % auf der Ordinate angegeben. Auf der Abszisse sind die Reservezonen (basale Schicht), die Proliferationszonen (proliferative Schicht) und die hypertrophen Zonen (hypertrophe Schicht) der verschiedenen Versuchsgruppen aufgetragen.

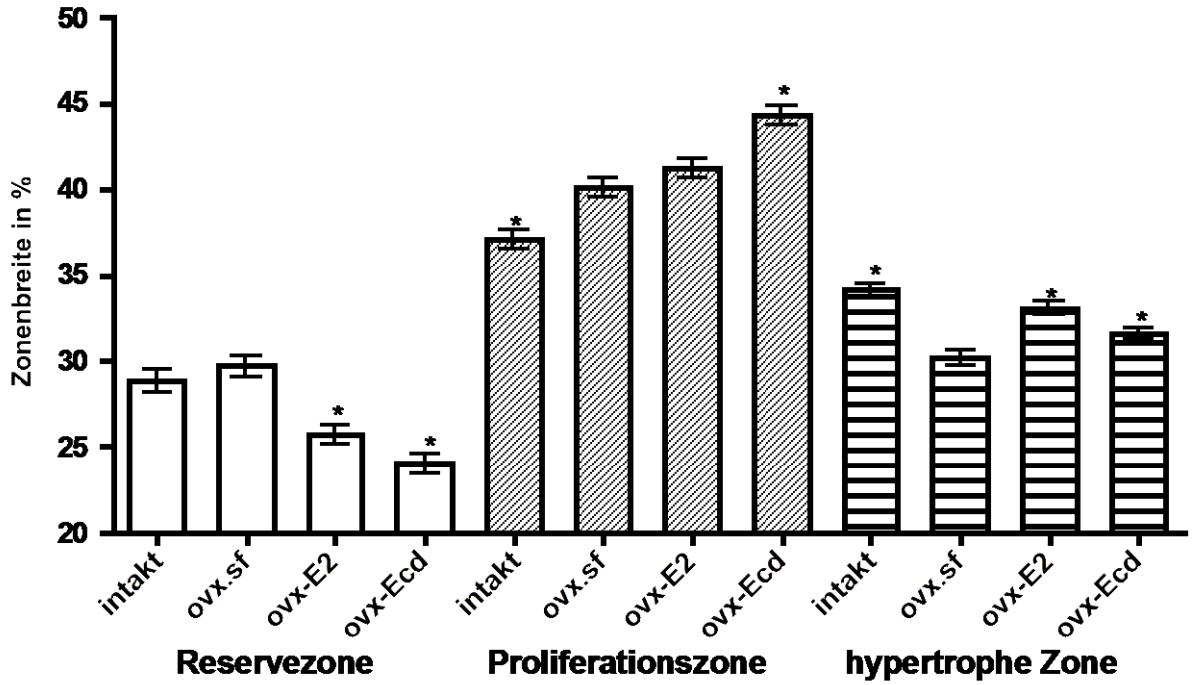


Abbildung 3.13: Vergleich der prozentualen Anteile der Reservezone, Proliferationszone und der hypertrophen Zone der vier verschiedenen Versuchsgruppen (*p<0,05 vs ovx,sf).

Die intakten Tiere zeigen relativ ausgewogene Anteile der drei Zonen an der gesamten Epiphysenfugenbreite. Dagegen haben die ovx,sf-Tiere im Vergleich mit den anderen Gruppen einen kleineren Anteil der hypertrophen Zone. Die Gruppe ovx-E2 besitzt anteilig eine schmalere Reservezone während die Gruppe ovx-Ecd vor allem durch den signifikanten Anstieg der Proliferationszone dominiert.
Die mittleren Prozentzahlen der Versuchsgruppen sind in der Tabelle 3.2 zu sehen.

	intakt	**ovx,sf**	**ovx-Ecd**	**ovx-E2**
Reservezone	29 %	29 %	24 %	26 %
Proliferationszone	37 %	40 %	45 %	41 %
hypertrophe Zone	34 %	31 %	31 %	33 %

Tabelle 3.2: Übersicht über die mittleren prozentualen Anteile der Reservezone, Proliferationszone und hypertrophen Zone an der Gesamtbreite der Epiphysenfuge, angegeben in Prozent auf ganze Zahlen gerundet.

3.6 Intraartikuläres Fettgewebe

In der folgenden Abbildung 3.14 ist die Menge des Fettgewebes im Kniegelenkspalt dargestellt. Dieses entspricht dem Hoffa-Fettkörper. Auf der y-Achse ist der Fettgehalt in µm² aufgetragen. Die vier Versuchsgruppen befinden sich auf der x-Achse.

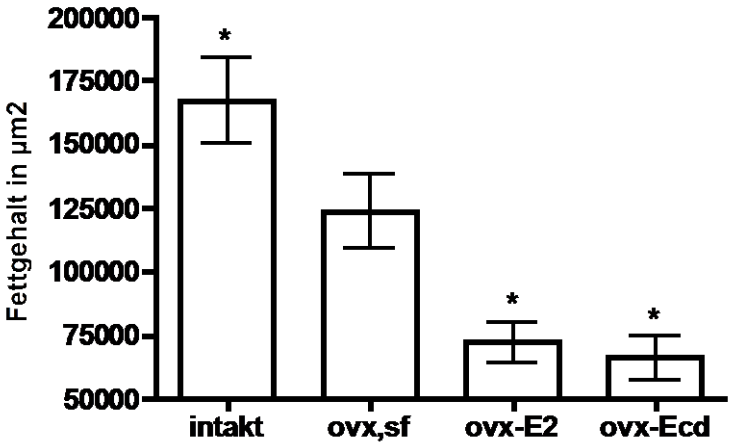


Abbildung 3.14: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: intraartikuläres Fettgewebe in µm² (*p<0,05 vs ovx,sf).

Den signifikant höchsten Fettgehalt im Gelenkspalt zeigen mit einem Mittelwert von 167400 µm² die intakten Tiere. Die ovx-E2-Gruppe sowie die ovx-Ecd-Gruppe haben mit den Mittelwerten von 72370 µm² und 66310 µm² signifikant weniger Fett im Kniegelenk als die ovx-Tiere, die einen mittleren Fettgehalt von 123900 µm² besitzen.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung des pflanzlichen Steroids Ecd auf den Knochen der ovx-Ratte zu untersuchen, um einen möglichen neuen Therapieansatz für die Osteoporose der postmenopausalen Frau zu finden. Dabei sollten nicht nur die direkten Veränderungen am Knochen untersucht werden, sondern auch verschiedene weitere Faktoren wie der Anteil des Fettes im Knochenmark und der intraartikuläre Fettgehalt, um die stattfindenden komplexen Interaktionen mit dem Metabolischen Syndrom zusätzlich mit einzubeziehen.

Der positive Einfluss des Pflanzensteroids Ecd auf den Knochen konnte bestätigt werden. Außerdem zeigte sich eine protektive Wirkung auf die Entwicklung des regionalen Fettgewebes.

Um diese Wirkungen des Ecds zu untersuchen, wurde das etablierte Modell der ovx-Ratte für die postmenopausale Frau angewandt. Nach vierwöchiger Gabe der Testsubstanz erfolgte die histomorphologische Auswertung an der metaphysären Tibia. Hierbei konnte zum einen anhand der Messung der Kortikalisdicke und des Trabekelanteils, der die Osteoporoseentwicklung widerspiegelt, der Effekt auf den Knochen analysiert werden. Zusätzlich wurden Serummarker des Knochenstoffwechsels miteinbezogen. Zum anderen stellte sich durch Messen der Epiphysenfuge sowie durch Ermittlung des Anteils des roten Knochenmarks die proliferative Wirkung des Ecds dar. Um Aufschluss zu erhalten, inwieweit sich der metabolische Effekt von Ecd im regionalen Fett widerspiegelt, erfolgten die Bestimmungen der Fettanteile im Knochenmark und im Gelenkspalt. Dies wirkt aufgrund der Lipotoxizität durch die Produktion von inflammatorischen Zytokinen destruierend auf den Knochen und auf den Gelenkknorpel, so dass auch die Bildung einer Osteoarthritis gefördert wird.

4.1 Körpergewicht

Die postmenopausale Frau entwickelt gehäuft eine Gewichtszunahme mit erhöhten Fettdepots (Göretzlehner und Zimmermann 2002). Adipositas ist einer der Faktoren, die das Metabolische Syndrom charakterisieren. Auch bei der Ratte ist bereits bekannt, dass der Östrogenmangel nach der Ovx zu einer Fettakkumulation und somit zu einem erhöhten Körpergewicht führt (Kapur et al. 2010) und sich daraus ein Metabolisches Syndrom entwickeln kann (Seidlová-Wuttke et al. 2010b).

Die vorliegende Arbeit konnte diesen Effekt bestätigen und zeigt ein höheres Körpergewicht der ovx-Tiere. Durch E2-Gabe kann das Ausgangskörpergewicht gehalten werden. Es wird vermutet, dass Östrogene einen anti-lipogentischen Effekt haben (Anwar et al. 2001). So behielt die E2-Gruppe auch in der vorliegenden Studie ein annähernd konstantes Körpergewicht.

Die ovx-Ecd-Gruppe hingegen zeigte nach Versuchende erwartungsgemäß ein signifikant höheres Körpergewicht. Dieses Ergebnis ist bereits in der Studie von Kapur et al. (2010) aufgefallen. Sie konnten zeigen, dass das erhöhte Körpergewicht der Ecd-Gruppe jedoch im Gegensatz zu der Gruppe ovx,sf durch eine reduzierte Fettmasse und eine erhöhte Muskelmasse bedingt ist. Im Zusammenhang mit dem vorliegenden Versuch zeigte eine andere Arbeit, dass die ovx-Ecd-Gruppe mit 16 % einen signifikant geringeren Zuwachs der Fläche des intraabdominellen Fettdepots als die ovx,sf-Kontrollgruppe aufwies. Dieses Phänomen könnte durch den anabolen Effekt des Ecds begründet sein (Báthori et al. 2008; Gorelick-Feldman et al. 2008). Auch andere Studien haben gezeigt, dass Ecd die Muskelmasse erhöht (Sláma et al. 1996; Kratky 1997). Vor allem die Kombination aus körperlichem Training und Ecd-Gabe soll sehr effektiv auf den Muskelaufbau wirken (Báthori et al. 2008). Die gesteigerte Muskelmasse hat eine vermehrte mechanische Stimulation des Knochens zur Folge, was schützend auf den Knochen wirkt (Rubin et al. 2002; Ferretti et al. 2003; Luu et al. 2009). Dies ist besonders bedeutend für die postmenopausale Frau, die häufig von einer Sarkopenie betroffen ist. Zum einen könnte die durch Ecd induzierte erhöhte Muskelmasse vor Stürzen und somit vor Frakturen schützen und zum anderen verhindert die mechanische Stimulation den gesteigerten Knochenabbau und damit die Osteoporoseentwicklung.

4.2 Knochen im Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom

Die Metaphyse der Rattentibia reagiert besonders sensibel und schnell auf den Östrogenverlust, so dass es bereits innerhalb von drei Monaten nach der Ovx zu einer Demineralisation von bis zu 50 % des Knochens kommt (Garner et al. 1991; Seidlová-Wuttke et al. 2003a; Seidlová-Wuttke et al. 2003b; Perry et al. 2005; Klinck und Boyd 2008). Die Auswirkungen des Östrogenverlustes spiegeln sich auch in der vorliegenden Arbeit bei der Kontrollgruppe ovx,sf wider. Hier zeigt sich nach der Ovx ein signifikanter Verlust der Kortikalisdicke. Dahingegen behält die ovx-E2-Gruppe auch nach der Ovx eine gleichbleibende Kortikalisdicke. Die Testsubstanz Ecd

scheint ebenso wie das E2 die Kortikalis stabilisieren zu können, da auch die ovx-Ecd-Gruppe weiterhin eine Dicke der Kortikalis wie die der intakten Tiere besitzt. Dies bestätigt die bereits in mehreren Studien gezeigte osteoprotektive Wirkung des Ecds (Walliser 2009; Coors 2010; Seidlová-Wuttke et al. 2010a; Kapur et al. 2010). Da bei der postmenopausalen Osteoporose der Knochenschwund nicht nur in der Substantia compacta, also in der Kortikalis, sondern vor allem in der Substantia spongiosa stattfindet, war die Ermittlung des Anteils der Trabekel in der Metaphyse auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Mittels Phasenanalyse zeigte sich, dass die ovx-E2 sowie die ovx-Ecd-Gruppen einen signifikant höheren Anteil an Trabekeln besitzen als die Kontrollgruppe ovx,sf. Somit hat die Testsubstanz Ecd, ebenso wie das E2, das Potential, nach Ovx einen annähernd gleichen trabekulären Anteil wie den der intakten Tiere zu erhalten. Auf diese Weise schützen sowohl E2 als auch Ecd vor Osteoporose.

Die Ergebnisse der Publikation von Kapur et al. (2010) decken sich mit denen der hier vorliegenden Studie. Sie zeigten, dass die Tiere nach einmonatiger Gabe von Ecd einen signifikant höheren Anteil an Trabekeln in der Metaphyse hatten als die ovx,sf-Kontrollgruppe. In einer weiteren Studie von Seidlová-Wuttke et al. (2010a) wurde die Dichte des trabekulären Anteils der Metaphyse nach dreimonatiger Ecd-Gabe mittels qCT ermittelt. Auch hier zeigte sich, dass die Testsubstanz Ecd in der Lage war, die Abnahme der Trabekeldichte nach Ovx zu vermindern.

Die Auswertung der Knochenmarker im Serum unterstützt diese Beobachtungen. Als Parameter für den Knochenaufbau wurde das von den Osteoblasten sezernierte Osteokalzin bestimmt. CrossLaps, ein Abbauprodukt des Kollagens spiegelte den Knochenabbau durch die Osteoklasten wider (Seidlová-Wuttke et al. 2003a; French et al. 2008). Die Versuchsgruppen zeigten signifikant unterschiedliche Serumspiegel von Osteokalzin und CrossLaps. Das normalerweise bestehende Gleichgewicht zwischen Knochenbildung und -resorption ist bei Fehlen von E2 verschoben und es entsteht die Osteoporose (Riggs et al. 2002; Bord et al. 2003). In dem vorliegenden Versuch hatten die intakte und die ovx-E2-Gruppen niedrige Spiegel an Osteokalzin und CrossLaps, während die ovx,sf und die ovx-Ecd-Gruppen signifikant höhere Spiegel aufwiesen. Die erhöhten Spiegel der Knochenaufbau- und abbaumarker zeigen, dass sowohl die Osteoblasten- als auch die Osteoklastenaktivität bei Abwesenheit von E2 gesteigert ist. Durch die Gabe von E2 sinken Osteokalzin und CrossLaps im Blut. Diese Konstellation der Serummarker wurde schon in der Studie

von Seidlová-Wuttke et al. (2010a) beobachtet. Der erhöhte Knochenstoffwechsel lässt vermuten, dass die antiosteoporotische Wirkung des Ecds nicht wie bei E2 über eine Hemmung des Knochenabbaus, sondern durch einen kompensatorischen vermehrten Knochenaufbau durch die Osteoblasten begründet ist (Kapur et al. 2010).
Der genaue Wirkmechanismus, der zu diesem knochenstabilisierenden Effekt des Ecds führt, ist noch nicht abschließend geklärt. Eine Beteiligung des Östrogenrezeptors konnte ausgeschlossen werden (Seidlová-Wuttke et al. 2010a), so dass man bei einer Ecd-Therapie nicht mit den gravierenden Nebenwirkungen einer Hormonersatztherapie rechnen muss.
Aufgrund der Lipotoxizität, die durch große Fettmengen entsteht, vermutet man auch einen Zusammenhang zwischen dem Fett im Knochenmark und der Osteoporoseentwicklung. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist die postmenopausale Frau nicht nur häufig von der Osteoporose betroffen, sondern auch von der Entwicklung eines Metabolischen Syndroms (Carr 2003; Kaaja 2008). Ziel der vorliegenden Arbeit war es unter anderem, einen Zusammenhang dieser beiden Krankheitsbilder der postmenopausalen Frau aufzuzeigen. Vielfältig beschriebene Interaktionen zwischen dem Fett- und Knochenstoffwechsel (Rosen und Bouxsein 2006; Zhao et al. 2007; Cao 2011) machen deutlich, welchen Einfluss das Metabolische Syndrom als Risikofaktor für die Entwicklung einer Osteoporose hat (Hsu et al. 2006; Migliaccio et al. 2011).
Es ist bekannt, dass die ovx-Ratte durch den Östrogenmangel eine viszerale Adipositas entwickelt (Mayes und Watson 2004) und dass eine Östrogengabe vor der Entwicklung eines Metabolischen Syndroms durch gesteigerte Bewegung und verminderte Futteraufnahme schützt (Mayes und Watson 2004; Lobo 2008). Da jedoch aufgrund der unerwünschten Nebenwirkungen die Indikation einer Hormonersatztherapie der postmenopausalen Frau streng gestellt werden sollte, untersuchten Seidlová-Wuttke et al. (2010b) die potentiell gleichwertigen protektiven Eigenschaften des Phytosteroids Ecd. In dieser Studie zeigte sich, dass die Testsubstanz Ecd den abdominellen Fettanteil und das paratibiale Fettpolster der Ratten, welche nach Ovx dramatisch ansteigen (Seidlová-Wuttke et al. 2003a; Rachon et al. 2007), signifikant verringern konnte. Dies ist auch für die Entwicklung der Osteoporose bedeutend, da das Fett stoffwechselaktiv ist und den Knochen durch die Lipotoxizität stark beeinflussen kann. Durch die von den Adipozyten ausgeschütteten Adipokine wie z.B. TNFα und IL-6 entsteht ein Entzündungsmilieu (Fontana et al. 2007; Cao 2011). Die

proinflammatorischen Zytokine stimulieren die Osteoklasten über das RANKL-RANK System und fördern auf diese Weise eine Verschiebung des Gleichgewichts des Knochenstoffwechsels hin zum Knochenabbau und somit zur Osteoporoseentstehung (Pfeilschifter et al. 2002; Mundy 2007; Cao 2011).

Der Anteil des abdominellen Fettes der Tiere wurde im Rahmen einer weiteren Dissertation zu dem durchgeführten Versuch bestimmt. Dabei wiesen die Ratten unter Ecd-Gabe einen signifikant kleineren Anteil der Fläche an abdominellem Fett im Vergleich zu den ovx,sf-Tieren auf. Dies lässt vermuten, dass die ovx-Ecd-Gruppe durch Ecd-Gabe vor der Entwicklung eines Metabolischen Syndroms geschützt wurde.

Um auch die Wirkung von Ecd auf die regionale Fettakkumulation und deren Lipotoxizität direkt im Knochen zu untersuchen, wurde in der Phasenanalyse der Anteil des Fettmarks in der Metaphyse bestimmt. Physiologischerweise kommt es im Laufe des Lebens zu einer Umwandlung des roten blutbildenden Marks in das gelbe Fettmark (Vahlensieck und Schmidt 2000). Bei der postmenopausalen Osteoporose wurde eine deutlich vermehrte Infiltration des Knochenmarks mit Fett beobachtet (Yeung et al. 2005), die mit einer negativen Knochenbilanz korreliert (Justesen et al. 2001; Verma et al. 2002). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass die Adipozyten und die knochenbildenden Osteoblasten eine gemeinsame mesenchymale Stammzelle besitzen (Akune et al. 2004). Wie oben beschrieben, fördert die Aktivierung des Transkriptionsfaktor RUNX 2 die Osteoblastenbildung während durch die Aktivierung des Rezeptors PPARγ2 die Stammzellen zu Adipozyten differenzieren (Akune et al. 2004; Zhao et al. 2008). Bei dem osteoporotischen Knochen der postmenopausalen Frau zeigen die mesenchymalen Stammzellen eine verminderte Fähigkeit in Osteoblasten zu differenzieren und bevorzugen die Adipogenese, so dass das Knochenmark verfettet (Rodríguez et al. 2000). Also scheint ein erhöhter Fettgehalt im Knochen vermutlich durch die lipotoxische Wirkung eng mit der Osteoporoseentstehung verbunden zu sein.

Die vorliegenden Ergebnisse spiegeln diese Vorgänge wider. Die ovx,sf-Tiere mit dem osteoporotischen Knochen und dem höheren abdominellen Fettanteil haben einen deutlich höheren Anteil an fettreichem Mark als die intakten Tiere. Die ovx-Ecd-Gruppe zeigt dahingegen einen signifikant kleineren Anteil an Fettmark im Knochen. Das heißt, dass Ecd den Anstieg des Fettanteils im Knochenmark nach Ovx verhindert und einen ähnlich niedrigen Fettanteil im Knochenmark wie der der intak-

ten Gruppe erhalten kann. E2 scheint keinen schützenden Effekt auf die Fettentwicklung zu haben.

Folglich könnte die in der vorliegenden Studie im Vergleich mit der ovx,sf-Gruppe beobachtete stabilisierte Kortikalis und Spongiosa der ovx-Ecd-Gruppe auch Ergebnis einer durch Ecd verhinderten Fettakkumulation im Knochenmark mit folgender verminderter Lipotoxizität sein.

Ein weiterer interessanter Punkt ist, dass der Diabetes auch einen Einfluss auf die Fettzusammensetzung im Knochenmark zu haben scheint. Bekannt ist, dass insulinpflichtige Diabetiker ein erhöhtes Risiko für Osteoporose haben (Kemink et al. 2000). In einer Studie konnte eine erhöhte Fettinfiltration des Knochenmarks sowie eine erhöhte PPARγ2-Expression bei diabetischen Mäusen festgestellt werden (Botolin et al. 2005). Das heißt, dass dieser Faktor des Metabolischen Syndroms zusätzlich die Verfettung des Knochens und die Osteoporoseentwicklung fördert. In einer aktuellen Studie wurde nun ein schützender Effekt von Ecd auf diabetische Mäuse beobachtet (Sundaram et al. 2012). Dies stärkt die Vermutung der osteoprotektiven Wirkung von Ecd im Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom.

4.3 Rotes Knochenmark

Durch die durchgeführte Phasenanalyse konnte der schon oben beschriebene Anteil an Trabekeln sowie die Anteile an rotem und gelbem Knochenmark der Metaphyse ermittelt werden. Es fiel auf, dass der rote Knochenmarkanteil, welcher den blutbildenden Zellen entspricht, bei der ovx,sf-Gruppe und bei der ovx-Ecd-Gruppe höher war als bei der intakten und bei der ovx-E2-Gruppe.

Eine stimulierende Wirkung des Ecds auf die Erythropoese ist seit langem bekannt (Syrov et al. 1997). Auch in der Dissertation Walliser (2009) wird ein hoher roter Knochenmarkanteil nach Ecd-Gabe beschrieben. In der Arbeit hatte die ovx,sf-Gruppe aber im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen einen niedrigeren Anteil an rotem Mark als die intakte Gruppe. Allerdings ist zu beachten, dass in der Studie von Walliser (2009) die Auswertungen nach drei Monaten und nicht wie im vorliegenden Fall nach einem Monat durchgeführt wurden. Dies könnte bedeuten, dass die ovx,sf-Tiere zunächst kompensatorisch auf die Mangelsituation mit einer gesteigerten Blutbildung reagieren, die aber nicht drei Monate anhält.

Bei Ecd-Gabe dahingegen zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse einen erhöhten Anteil an rotem Mark nach einmonatiger Ecd-Gabe und die Ergebnisse von Walliser

(2009) nach dreimonatiger Ecd-Gabe können diese auch noch bestätigen. Deshalb könnte man vermuten, dass die Ecd-Gabe die Stimulation der Blutbildung dauerhaft aufrechterhalten kann.

Das rote Knochenmark hat eine essentielle Bedeutung für die Aufrechterhaltung des Organismus (Vahlensieck und Schmidt 2000). Ein stimulierender Effekt auf den roten Knochenmarkanteil könnte einen positiven Einfluss auf das Immunsystem, die allgemeine Gesundheit des Körpers und den Knochen haben. Korkmaz et al. (2012) publizierten eine Studie, die zeigte, dass bei Vorhandensein einer Anämie bei postmenopausalen türkischen Frauen die Knochendichte signifikant vermindert war. Im Umkehrschluss könnte eine Stimulation des roten Knochenmarks den Knochen vielleicht vor der Osteoporoseentwicklung schützen.

Um das Verhältnis des gelben Knochenmarkanteils zum roten Knochenmarkanteil zu beurteilen, wurde ein Index gebildet. Bei dem wird deutlich, dass die intakten Tiere signifikant weniger Fett pro rotem Mark besitzen als die ovx,sf-Gruppe. Bei der ovx-Ecd-Gruppe zeigte sich auch die Tendenz zu weniger Fett pro rotem Mark, diese war jedoch nicht signifikant.

4.4 Epiphysenfuge

Für die Bildung der Trabekel in der Substantia spongiosa ist die Epiphysenfuge von Bedeutung. Die Chondrozyten proliferieren im proximalen Teil der Epiphysenfuge und hypertrophieren beim Durchlaufen der Schichten bis in den distalen Teil, wo sie das Einwandern von Gefäßen und Osteoblasten nach sich ziehen. Diese ersetzen schließlich den Knorpel und bilden die knöchernen Trabekel. Daraus folgt das Längenwachstum des Knochens (Nilsson et al. 2005). Eine stimulierende Wirkung auf die Knorpelzellen der Epiphysenfuge könnte unter anderem die osteoprotektive Wirkung des Ecds unterstützen.

Bei der Ratte wird die Epiphysenfuge mit steigendem Alter schmaler, ohne jedoch jemals zu verschließen. In den vorliegenden Ergebnissen ist zu erkennen, dass die intakten und die mit E2 substituierten Tiere eine signifikant schmalere Epiphysenfuge aufweisen als die ovx,sf- und die ovx-Ecd-Gruppen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen einer Studie von Kapur et al. (2010) überein. Auch sie hatten bereits die Wirkung von Ecd und E2 auf die Epiphysenfuge der ovx-Ratte untersucht. Nach einmonatiger Gabe der Testsubstanz erfolgte die Vermessung der Gesamtbreite sowie der einzelnen Schichten der Epiphysenfuge. Außerdem bestimmten sie den Trabekelan-

teil in der Metaphyse. Ihr Ergebnis zeigte ebenso eine signifikant schmalere Epiphysenfuge nach E2-Gabe. Dies deckt sich mit bereits bestehenden Forschungsergebnissen, die aussagen, dass E2 eine hemmende Wirkung auf die Epiphysenfuge hat (Weise et al. 2001). Beim Menschen ist E2 sogar für den Schluss der Epiphysenfuge verantwortlich (Nilsson et al. 2005). Die deutlich gehemmte Verkleinerung der Epiphysenfuge unter Ecd-Gabe ist bereits bei Kapur et al. (2010) aufgefallen. Dies ging mit einem höheren Anteil an Trabekeln in der Metaphyse einher. Wie bereits beschrieben, zeigte sich auch in der vorliegenden Studie ein signifikant höherer Trabekelanteil unter Ecd-Gabe als bei den ovx-Tieren. Um einen besseren Vergleich zu haben, wurde in der vorliegenden Studie im Gegensatz zu der von Kapur et al. (2010) zusätzlich eine intakte Gruppe untersucht. Diese wies eine signifikant schmalere Epiphysenfuge als die ovx,sf-Gruppe auf. Das bestätigt, dass die Ovx und das Fehlen von E2 eine Verbreiterung der Epiphysenfuge zur Folge haben. Eine stimulierende Wirkung des Östrogenmangels auf die Knorpelzellen wurde mehrfach beschrieben (Tajima et al. 1998; Yao et al. 2006). In dem vorliegenden Versuch war die beobachtete Epiphysenfuge unter Ecd-Gabe noch signifikant breiter als die der ovx,sf-Tiere.

Um die Vorgänge in der Epiphysenfuge genauer zu untersuchen, erfolgte die Messung der einzelnen Schichten, bestehend aus basaler, Proliferations- und hypertropher Schicht. Hierbei war festzustellen, dass das Verhalten der einzelnen Schichten unter den verschiedenen Einflüssen in etwa dem der gesamten Epiphysenfugebreite entsprach. Die basale Schicht (Reservezone), die dem Pool der proliferierenden Chondrozyten entspricht, war bei der intakten Gruppe und bei der ovx-E2-Gruppe schmaler als bei der ovx,sf- und der ovx-Ecd-Gruppe. Eine Überlegung wäre, dass sowohl die intakten als auch die mit Hormonen substituierten Tiere, bei denen die regulierende Wirkung der Östrogene noch vorhanden ist, nicht den Bedarf eines vergrößerten Reservepools der Chondrozyten zum Ausgleich des vermehrten Knochenabbaus haben. Im Gegensatz dazu stehen die ovx,sf- und die ovx-Ecd-Gruppen, bei denen ein Östrogenmangel besteht. Hier könnte man vermuten, dass das verschobene Gleichgewicht des Knochens durch einen gesteigerten Knochenaufbau der Epiphysenfuge ausgeglichen werden soll. Die proliferative Schicht ist bei der ovx-Ecd-Gruppe signifikant breiter als bei der ovx,sf-Gruppe. Die gleiche Wirkung des Ecds ist auch in der hypertrophen Schicht zu beobachten, die deutlich und signifikant breiter ist als die der restlichen Gruppen.

Ecd scheint auf die Epiphysenfuge eine ganz andere Wirkung zu haben als E2. Trotzdem gehen beide mit einem erhöhten Trabekelanteil in der Metaphyse einher.
Betrachtet man die prozentualen Anteile der einzelnen Schichten an der Gesamtbreite, so wird deutlich, dass Ecd alle Schichten verbreitert, wobei die proliferative Schicht ca. 45 % der gesamten Epiphysenfugenbreite ausmacht. Der Anteil der basalen Schicht ist wie bei der ovx-E2-Gruppe signifikant geringer als bei der ovx,sf-Gruppe, so dass die Basalzellen gespart werden könnten. Diese Beobachtung, dass Ecd die Epiphysenfuge signifikant stimuliert, unterstützt die Vermutung, dass Ecd den Knochen über eine gesteigerte Knochenneubildung schützt (Kapur et al. 2010) und nicht wie E2 über eine Hemmung der Knochenresorption wirkt (Bord et al. 2003). Allerdings stellt sich nun die Frage, ob die Testsubstanz Ecd beim Menschen auch diese osteoprotektive Wirkung entfalten würde. Denn im Gegensatz zu der Ratte ist die Epiphysenfuge bei der postmenopausalen Frau bereits verschlossen und kann somit nicht mehr zum Knochenaufbau beitragen. Würde man annehmen, dass die proliferierende Wirkung des Ecds auf die Epiphysenfuge den osteoprotektiven Effekt begründete, könnte die postmenopausale Frau nicht davon profitieren.

4.5 Intraartikuläres Fettgewebe

Als Teil der vorliegenden Arbeit wurde auch der Fettgehalt im Kniegelenk ermittelt, um Aufschluss über die Ecd-Wirkung auf die unmittelbar an den Knochen angrenzenden Fettdepots zu erhalten. Da der Hoffa-Fettkörper bei entsprechender Größe viele proinflammatorische Zytokine produziert, die destruierend auf den Gelenkknorpel wirken, kann das Metabolische Syndrom im Zusammenhang mit der Osteoarthritis eine wichtige Rolle spielen (Seidlová-Wuttke et al. 2012). Seidlová-Wuttke et al. (2012) zeigten bereits in einem Versuch, dass die Ratten nach der Ovx einen signifikant größeren Fettanteil im Kniegelenk aufwiesen. Dies korrelierte mit einer verminderten Breite des Gelenkknorpels und ließ somit einen Zusammenhang zwischen dem intraartikulären Fettgehalt und der Knorpeldicke, also der Osteoarthritis, vermuten.
In dem vorliegenden Versuch war der Fettgehalt bei der intakten Gruppe interessanterweise am höchsten. Es hat uns aber beruhigt zu sehen, dass die ovx-Ecd-Gruppe genauso wie die ovx-E2-Gruppe einen signifikant niedrigeren Fettgehalt als die ovx,sf-Gruppe aufzeigt. So konnten wir eine gesteigerte lipotoxische Wirkung auf den Knochen und den Gelenkknorpel durch vermehrte angrenzende Adipozytenzahl bei

Ecd-Gabe ausschließen. Das spiegelt sich auch in der Breite des Gelenkknorpels wider. Daten der Arbeitsgruppe Endokrinologie Göttingen zu dem vorliegenden Versuch ergaben, dass der Gelenkknorpel der Tibia sowohl nach E2-Gabe als auch nach Ecd-Gabe signifikant breiter war als bei der ovx,sf- und der intakten Gruppe. Das spricht dafür, dass der höhere Fettgehalt eine Verminderung des Gelenkknorpels zur Folge hat und somit eine Osteoarthritis begünstigt. E2 und Ecd konnten in dem vorliegenden Versuch diese Folge verhindern. Das heißt, die Testsubstanz Ecd könnte auch auf das Metabolische Syndrom des Kniegelenks protektiv wirken und vor der Entwicklung einer Osteoarthritis schützen.
Allerdings erfolgte die Bestimmung des Fettgehaltes durch Vermessen des Umfangs der Fettdepots in der Gelenkkapsel. Das heißt, nur die in diesem Präparat zufällig angeschnittenen Fettflächen wurden miteinander verglichen. Um definitivere Aussagen über den Fettgehalt im Kniegelenk zu machen, wäre es sinnvoll in einer weiteren Studie mehrere Schnitte des gleichen Kniegelenks zu vermessen. Es könnte auch die Korrelation zwischen Fettgehalt, Gelenkknorpelbreite und Zytokinen errechnet werden, um bessere Aussagen über den Zusammenhang des Metabolischen Syndroms und der Osteoarthritis treffen zu können.

Insgesamt wird deutlich, dass die postmenopausale Osteoporose durch ein Zusammenspiel von vielen verschiedenen Faktoren bedingt ist, die mit Beginn der Menopause gehäuft auftreten. Wenn man bedenkt, wie wichtig die Einflüsse des Bewegungsmangels, des Muskelabbaus, der abdominellen Verfettung und des Diabetes mellitus auf die Osteoporoseentstehung sind, so könnte man die Osteoporose auch als „Metabolisches Syndrom des Knochens“ bezeichnen. Ecd scheint auf viele dieser Faktoren einen positiven Einfluss zu haben. Meine Arbeit ist eine von mehreren Studien, die zum Ziel haben, mehr Kenntnisse über die Möglichkeit von Ecd als Medikament für die postmenopausale Frau zu erlangen.
In der vorliegenden Dissertation bestätige ich durch die histomorphologische Auswertung von Tibiapräparaten den osteoprotektiven Effekt des Ecds. Neu ist die Erkenntnis, dass Ecd das angrenzende regionale Fettgewebe zu vermindern scheint. Zum einen betrifft es das Fett im Knochenmark und zum anderen den Hoffa-Fettkörper im Gelenkspalt der ovx-Ratte. So könnte Ecd nicht nur durch Reduzierung des Fetts im Knochenmark vor der Osteoporose schützen, sondern auch vor dem „Metabolischen Syndrom des Gelenks“, also vor dem vergrößerten Hoffa-Fettkörper

mit erhöhter Produktion inflammatorischer Substanzen und folgender Osteoarthritis. Es wäre sinnvoll, dies in einer folgenden Studie zu bestätigen. Auf das rote Knochenmark und die Epiphysenfuge wirkt Ecd stimulierend.

Durch die beobachteten Effekte bietet das Phytosteroid Ecd die Möglichkeit einer ganzheitlichen Therapie, die an vielen Punkten der Osteoporoseentstehung ansetzt und auch die Interaktionen zwischen dem Fett- und dem Knochenstoffwechsel miteinbezieht. Möglicherweise hat das Ecd durch die schützende Wirkung vor der Entwicklung eines Metabolischen Syndroms auch das Potential, das erhöhte Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse in der Postmenopause zu vermindern. Zusammen gesehen mit den bereits gezeigten positiven Effekten auf weitere Beschwerden des Klimakteriums und dem niedrigen Nebenwirkungsprofil, scheint Ecd ein vielversprechendes Medikament für die postmenopausale Frau zu sein. Somit wäre es sinnvoll, weitere Forschung über die Wirkungsweise und den Effekt von Ecd zu betreiben.

5 Zusammenfassung

Die Frau hat in der Postmenopause ein erhöhtes Risiko, eine Osteoporose (Bord et al. 2003) und ein Metabolisches Syndrom zu entwickeln (Carr 2003; Lobo 2008). Dies sind zwei Erkrankungen mit weltweit wachsender Bedeutung, die mit schwerwiegenden Folgen einhergehen. In den letzten Jahren konnte zunehmend ein Zusammenhang dieser Erkrankungen durch Interaktionen des Fett- und Knochenstoffwechsels hergestellt werden (Hwang und Choi 2010).

Um eine nebenwirkungsärmere Alternative zu den bestehenden Medikamenten für die Frau in der Postmenopause zu finden, wird im Bereich der Phytotherapie geforscht. Bisherige Studien haben gezeigt, dass das pflanzliche Steroidhormon Ecd vielfältige positive Wirkungen zu haben scheint. So verbesserte es im Tierversuch die für die Menopause typischen „hot flushes“ (Puri et al. 2012) und verhinderte die Entwicklung der Osteoporose und des Metabolischen Syndroms (Seidlová-Wuttke et al. 2010a; Seidlová-Wuttke et al. 2010b).

Die vorliegende Arbeit sollte die Erkenntnisse über die Effekte von Ecd als mögliche Therapie der postmenopausalen Frau erweitern. Neben der Wirkung von Ecd auf den Knochen wurde auch die Wirkung auf das angrenzende regionale Fettgewebe untersucht, um die Interaktionen zwischen dem Fett- und Knochenstoffwechsel miteinzubeziehen.

Dafür wurde das etablierte Modell der ovx-Ratte für die postmenopausale Frau verwendet. Es gab vier Versuchsgruppen: eine intakte und drei ovarektomierte. Diese erhielten jeweils über einen Monat sf-Futter, sf-Futter + Ecd oder sf-Futter + E2. Danach erfolgte die histomorphologische Auswertung von Tibia- und Gelenkpräparaten. Betrachtet wurden die Anteile von Fett, Trabekeln und rotem Knochenmark in der Metaphyse, die Kortikalisdicke, die Epiphysenfuge und der Fettgehalt im Gelenkspalt.

Am Knochen zeigte sich, dass Ecd die Kortikalisdicke der Tibia erhalten konnte. Diese war nach vierwöchiger Ecd-Gabe signifikant breiter als die der ovx,sf-Gruppe. Auch der die Osteoporose kennzeichnende Verlust des Trabekelanteils in der Metaphyse wurde gemindert. Die ovx-Ecd-Gruppe wies einen signifikant höheren Trabekelanteil als die ovx,sf-Gruppe auf. Die Knochenmarker Osteokalzin und CrossLaps spiegelten einen erhöhten Knochenstoffwechsel nach Ecd-Gabe wider. Das bestärkt die Vermutung, dass die antiosteoporotische Wirkung von Ecd durch einen gestei-

gerten Knochenaufbau und nicht wie bei E2 durch einen verminderten Knochenabbau begründet sein könnte (Kapur et al. 2010).

Auf die Fettentwicklung scheint Ecd ebenso eine protektive Wirkung zu haben. Der Anteil von Fett im Knochenmark der Metaphyse war signifikant geringer als derjenige der ovx,sf-Gruppe. Dadurch ist der angrenzende Knochen einer geringeren Lipotoxizität durch Adipokinausschüttung der Adipozyten ausgesetzt (Cao 2011). Auch der Gehalt von Fett im Gelenkspalt bei der ovx-Ecd-Gruppe war signifikant geringer. Zusammen betrachtet mit den von der Abteilung Endokrinologie Göttingen erhobenen Daten, die ergaben, dass der Gelenkknorpel bei der ovx-Ecd und der ovx-E2-Gruppe signifikant breiter war, könnte Ecd durch den metabolischen Effekt auf das Fett auch vor einer Osteoarthritis schützen. Dies sollte in einem weiteren Versuch bestätigt werden.

Zusätzlich zeigte sich die bereits bekannte proliferative Wirkung des Ecds. Die Epiphysenfuge war unter Ecd-Gabe deutlich breiter und der Anteil des roten Knochenmarks in der Metaphyse signifikant höher als der der ovx,sf-Gruppe.

Aufgrund der Interaktionen zwischen Fett- und Knochenstoffwechsel könnte man die Osteoporose auch als „Metabolisches Syndrom des Knochens“ bezeichnen. Im durchgeführten Versuch ist zu sehen, dass Ecd sowohl auf den Knochen wie auch auf das angrenzende regionale Fettgewebe protektiv wirkt. Das heißt, dass ein Medikament aus dem pflanzlichen Steroid Ecd das Potential haben könnte, an vielfältigen Punkten der Osteoporoseentwicklung anzusetzen und diese zu verhindern.

6 Anhang

Herstellung der Knochenpräparate

Nach 36 Stunden Fixierung in einer 4 %igen Formalinlösung wurden die Proben bei Raumtemperatur durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert. Darauf folgte die Entfettung durch eine zweimalige 24-stündige Behandlung mit dem Intermedium Xylol.

Zur Einbettung der Gewebeproben wurde ein Polymerisationssystem auf Methylmethacrylat-Basis (Technovit® 9100 NEU der Firma Heraeus) verwendet. Hierzu wurden die Proben zunächst in drei verschiedenen Präinfiltrationslösungen für jeweils 24 Stunden gelagert bis sie in der endgültigen Infiltrationslösung für zwei bis drei Tage unter Sauerstoffausschluss im Kühlschrank bei -8 °C aushärteten.

Prozessstufen	**Materialien**	**Dauer, Temp. in °C**
Fixierung	4% ige neutral gepufferte Formalinlösung	36 h Raumtemp.
Dehydratation	1. Ethanol 70 % 2. Ethanol 80 % 3. Ethanol 96 % 4. Ethanol 100 % 5. Ethanol 100 % 6. Ethanol 100 % 7. Ethanol 100 %	4-5 d Raumtemp.
Intermedium	1. Xylol 2. Xylol	24 h Raumtemp
Präinfiltration	1. Xylol/Technovit® 9100 Neu Basis (stabilisiert) 50 % 2. Technovit® 9100 Neu Basis (entstabilisiert) 3. Technovit® 9100 NeuBasis (entstabilisiert)+Härter1	24 h, Raumtemp. 4 °C 4 °C
Infiltration	1. Technovit® 9100 Neu Basis+Härter1+PMMA-Pulver	2-3 d -8 °C

Tabelle 6.1: Übersicht der Herstellung von Kunststoffpolymerisaten: Angegeben sind die einzelnen Prozesse, die zur Herstellung durchlaufen werden müssen, die dazu benötigten Chemikalien und die jeweilige Dauer und Temperatur (Technovit® 9100 Neu Basis = Methylmethacrylat; Härter1 = Peroxidverbindung, PMMA = Füllstoff).

Nach dem vollständigen Aushärten der Polymerisate konnten diese mit Hilfe eines Hartschnittmikrotoms zu lichtmikroskopischen Präparaten verarbeitet werden. Verwendet wurde das Rotationstischmikrotom Jung Supercut 2065 mit einem 16 cm-Hartmetallmesser mit D-Schliff. Die eingebetteten Proben wurden unter Zugabe von 40 %igem Ethanol als Schneideflüssigkeit in 5µm dicke Längsschnitte geschnitten, auf die Objektträger (Menzel Gläser, SuperFrost Ultra Plus®) aufgetragen und mit 70 %igem Ethanol gestreckt. Anschließend wurden die Schnitte mit Kisolfolie der Firma Kettenbach abgedeckt und über Nacht in einer Schnittpresse bei +57 °C getrocknet.
Zur besseren Differenzierung der histologischen Strukturen wurden die Schnitte mit der Trichrom-Färbung nach Goldner koloriert, welche sich insbesondere zum farblichen Hervorheben der kollagenhaltigen Knochensubstanz eignet.
Dafür wurde zunächst das Einbettungsmaterial aus dem Gewebe extrahiert. Dies erfolgte durch Behandlung mit 3× 20 min. Xylol, 1× 20 min. 2-Methoxyethylacetat, 2× 5 min. Aceton und einer 2× 2 min. anschließenden Spülung mit destilliertem Wasser.
Nach der Entplastung wurde die Goldner-Färbung in folgenden Schritten durchgeführt:

1. Weigerts Hämatoxylin, 10 min. (Kernfärbung)
2. „Bläuen“ in Leitungswasser, 10 min.
3. Ponceau de Xylidine Lösung, 45 min.
4. Spülen in 1 %iger Essigsäure, 1 min
5. Abspülen mit Aqua dest.
6. Wolframatophosphorsäurelösung, 7 min (vollständige Gewebeentfernung)
7. Spülen mit 1 %iger Essigsäure, 1 min.
8. Lichtgrün, 10 min. (Gegenfärbung)
9. Auswaschen mit 1 %iger Essigsäure
10. 1× 96 %iges Ethanol, 3×100 %iges Ethanol jeweils 5 min. (Entwässerung)
11. 3× 5 min. Xylol

Weigerts Hämatoxylin Lösung A + B werden im Verhältnis 1:1 verwendet Lösung A: 1 g Hämatoxylin in 100 ml 96 %igem Ethanol lösen Lösung B: 1.16 g Eisen(III)-chlorid in 99 ml Aqua dest. lösen, dann 1 ml 25 %ige Salzsäure zugeben
Ponceau de Xylidine-Lösung 2 g Ponceau de Xylidine + 1 g Säurefuchsin + 0,4 ml 1 %ige Essigsäure + 200 ml Aqua dest.
Wolframatophosphorsäurelösung 2 g Wolframatophosphorsäure und 1 g Orange G in 200 ml Aqua dest. lösen
Lichtgrün 0,4 g Lichtgrün in 200 ml Aqua dest., das mit 0,4 ml Essigsäure versetzt wurde, lösen

Tabelle 6.2: Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen der Goldner-Färbung.

7 Literaturverzeichnis

Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung U, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y,Azuma Y, Nakamura K, et al. (2004): PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. J Clin Invest 113, 846–855

Anwar A, McTernan PG, Anderson LA, Askaa J, Moody CG, Barnett AH, et al. (2001): Site-specific regulation of oestrogen receptor-alpha and -beta by oestradiol in human adipose tissue. Diabetes Obes Metab 3, 338–349

Báthori M, Tóth N, Hunyadi A, Márki A, Zádor E (2008): Phytoecdysteroids and anabolic-androgenic steroids--structure and effects on humans. Curr Med Chem 15, 75–91

Bliddal H, Leeds AR, Stigsgaard L, Astrup A, Christensen R (2011): Weight loss as treatment for knee osteoarthritis symptoms in obese patients: 1-year results from a randomised controlled trial. Ann Rheum Dis 70, 1798–1803

Bone HG, Bolognese MA, Yuen CK, Kendler DL, Wang H, Liu Y, et al. (2008): Effects of Denosumab on Bone Mineral Density and Bone Turnover in Postmenopausal Women. JCEM 93, 2149–2157

Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE (2003): The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. Bone 32, 136–141

Botolin S, Faugere M-C, Malluche H, Orth M, Meyer R, McCabe LR (2005): Increased Bone Adiposity and Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor-γ2 Expression in Type I Diabetic Mice. Endocrinology 146, 3622–3631

Cao JJ (2011): Effects of obesity on bone metabolism. J Orthop Surg Res 6, 30

Carr M C (2003): The emergence of the metabolic syndrome with menopause. J Clin Endocrinol Metab 88, 2404–2411

Carr M C, Kim KH, Zambon A, Mitchell ES, Woods NF, Casazza CP, et al. (2000): Changes in LDL density across the menopausal transition. J Investig Med 48, 245–250

Coetzee M, Kruger MC (2004): Osteoprotegerin-receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand ratio: a new approach to osteoporosis treatment? South Med J 97, 506–511

Coors NC: Analyse des Effekts von ß-Ecdyson auf die histologische Struktur der proximalen Tibia von gonadektomierten Sprague-Dawley-Ratten. Med. Diss. Göttingen 2010

Dinan L (2001): Phytoecdysteroids: biological aspects. Phytochemistry 57, 325–339

Dinan L, Lafont R (2006): Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. J Endocrinol 191, 1–8

Distel E, Cadoudal T, Durant S, Poignard A, Chevalier X, Benelli C (2009): The infrapatellar fat pad in knee osteoarthritis: an important source of interleukin-6 and its soluble receptor. Arthritis Rheum 60, 3374–3377

Duque G (2008): Bone and fat connection in aging bone. Curr Opin Rheumatol 20, 429–434

DVO-Leitlinie 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen. Unter: http://www.dv-osteologie.org/dvo_leitlinien/dvo-leitlinie-2009 (abgerufen am 12.06.2012)

Esposito K, Chiodini P, Colao A, Lenzi A, Giugliano D (2012): Metabolic Syndrome and Risk of Cancer A systematic review and meta-analysis. Dia Care 35, 2402–2411

Ferretti JL, Cointry GR, Capozza RF, Frost HM (2003): Bone mass, bone strength, muscle-bone interactions, osteopenias and osteoporoses. Mech Ageing Dev 124, 269–279

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, 1010–1013

French DL, Muir JM, Webber CE (2008): The ovariectomized, mature rat model of postmenopausal osteoporosis: an assessment of the bone sparing effects of curcumin. Phytomedicine 15, 1069–1078

Garner SC, Anderson JJ, Mar MH, Parikh I (1991): Estrogens reduce bone loss in the ovariectomized, lactating rat model. Bone Miner 15, 19–31

Gorelick-Feldman J, Maclean D, Ilic N, Poulev A, Lila MA, Cheng D, et al. (2008): Phytoecdysteroids increase protein synthesis in skeletal muscle cells. J Agric Food Chem 56, 3532–3537

Göretzlehner G, Zimmermann T. (2002): Veränderungen des Gewichts in den verschiedenen Phasen des Klimakteriums und unter dem Einfluß der Hormonersatztherapie. Journal für Menopause 9, 41–46

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

Herold G: Innere Medizin. 7. Auflage; Verlag Arzt + Information, Köln 2011, 749-752, 697

Hsu Y-H, Venners SA, Terwedow HA, Feng Y, Niu T, Li Z, 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, 146–154

Hu P, Bao J, Wu L (2011): The emerging role of adipokines in osteoarthritis: a narrative review. Mol Biol Rep 38, 873–878

Hwang D-K, Choi H-J (2010): The relationship between low bone mass and metabolic syndrome in Korean women. Osteoporos Int 21, 425–431

Jagtap VR, Ganu JV, Nagane NS (2011): BMD and Serum Intact Osteocalcin in Postmenopausal Osteoporosis Women. Indian J Clin Biochem 26, 70–73

Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M (2001): Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. Biogerontology 2, 165–171

Kaaja RJ (2008): Metabolic syndrome and the menopause. Menopause Int 14, 21–25

Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner 15, 175–191

Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N (1994): The diagnosis of osteoporosis. J Bone Miner Res 9, 1137–1141

Kapur P, Wuttke W, Jarry H, Seidlová-Wuttke D (2010): Beneficial effects of beta-Ecdysone on the joint, epiphyseal cartilage tissue and trabecular bone in ovariectomized rats. Phytomedicine 17, 350–355

Kemink SA, Hermus AR, Swinkels LM, Lutterman JA, Smals AG (2000): Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; prevalence and aspects of pathophysiology. J Endocrinol Invest 23, 295–303

Kharode Y, Bodine PVN, Miller CP, Lyttle CR, Komm BS (2008): The Pairing of a Selective Estrogen Receptor Modulator, Bazedoxifene, with Conjugated Estrogens as a New Paradigm for the Treatment of Menopausal Symptoms and Osteoporosis Prevention. Endocrinology 149, 6084–6091

Kizelsztein P, Govorko D, Komarnytsky S, Evans A, Wang Z, Cefalu WT, et al. (2009): 20-Hydroxyecdysone Decreases Weight and Hyperglycemia in a Diet-Induced Obesity Mice Model. Am J Physiol Endocrinol Metab 296, E433–E439

Klinck J, Boyd SK (2008): The magnitude and rate of bone loss in ovariectomized mice differs among inbred strains as determined by longitudinal in vivo micro-computed tomography. Calcif Tissue Int 83, 70–79

Kolios L, Takur C, Moghaddam A, Hitzler M, Schmidt-Gayk H, Suda AJ, et al. (2011): Anamnestic risk factor questionnaire as reliable diagnostic instrument for osteoporosis (reduced bone morphogenic density). BMC Musculoskelet Disord 12, 187

Korkmaz U, Korkmaz N, Yazici S, Erkan M, Baki AE, Yazici M, et al. (2012): Anemia as a risk factor for low bone mineral density in postmenopausal Turkish women. Eur J Int Med 23, 154–158

Kratky F, Hejhalek J, Kucharova S, Opletal L (1997): Effect of 20-hydroxyecdysone on the protein synthesis in pigs. Zivocisna Vyroba - UZPI 42, 445-451

Lobo RA (2008): Metabolic syndrome after menopause and the role of hormones. Maturitas 60, 10–18

Lüllmann-Rauch R: Histologie: Knochen. 13 Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2009, 145–151

Luo X-H, Guo L-J, Xie H, Yuan L-Q, Wu X-P, Zhou H-D, et al. (2006): Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. J Bone Miner Res 21, 1648–1656

Luu YK, Capilla E, Rosen CJ, Gilsanz V, Pessin JE, Judex S, et al. (2009): Mechanical stimulation of mesenchymal stem cell proliferation and differentiation promotes osteogenesis while preventing dietary-induced obesity. J Bone Miner Res 24, 50–61

Manolagas SC (2000): Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocr Rev 21, 115–137

Marcus R, Greendale G, Blunt BA, Bush TL, Sherman S, Sherwin R, et al. (1994): Correlates of bone mineral density in the postmenopausal estrogen/progestin interventions trial. J Bone Miner Res 9, 1467–1476

Martin KA, Manson JE (2008): Approach to the Patient with Menopausal Symptoms. JCEM 93, 4567–4575

Marzetti E, Leeuwenburgh C (2006): Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age. Exp Gerontol 41, 1234–1238

Mayes JS, Watson GH (2001): Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. Obes Rev 5, 197–216

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, 307–316

Migliaccio S, Greco EA, Fornari R, Donini LM, Lenzi A (2011): Is obesity in women protective against osteoporosis? Diabetes Metab Syndr Obes 4, 273–282

Miranda PJ, DeFronzo RA, Califf RM, Guyton JR (2005): Metabolic syndrome: Definition, pathophysiology, and mechanisms. Am Heart J 149, 33–45

Mironova VN, Kholodova ID, Skachkova TF, Bondar' OP, Datsenko ZM (1982): Hypocholesterolemic effect of phytoecdysones during experimental hypercholesterolemia in rats. Vopr Med Khim 28, 101–105

Mundy GR (2007): Osteoporosis and inflammation. Nutr Rev 65, 147–151

National Cancer Institute: Structure of Bone Tissue. Unter: http://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/tissue.html (aberufen am 25.11.2012)

Neuhauser H, Ellert U: Prävalenz des metabolischen Syndroms in Deutschland: eine Sensitivitätsanalyse. German medical science 2005. Unter: http://www.egms.de/static/en/meetings/gmds2005/05gmds183.shtml (abgerufen am 25.05.2012)

Niethard FU, Pfeil J: Duale Reihe Orthopädie. 5. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005, 144–146

Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J (2005): Endocrine regulation of the growth plate. Horm Res 64, 157–165

Nishimura S, Manabe I, Nagai R: Adipose Tissue Inflammation in Obesity and Metabolic Syndrome. Discovery Medicine 2009. Unter: http://www.discoverymedicine.com/Satoshi-Nishimura/2009/09/22/adipose-tissue-inflammation-in-obesity-and-metabolic-syndrome (abgerufen am 31.05.2012)

Okabe R, Inaba M, Nakatsuka K, Miki T, Naka H, Moriguchi A, et al. (2004): Significance of serum CrossLaps as a predictor of changes in bone mineral density during estrogen replacement therapy; comparison with serum carboxyterminal telopeptide of type I collagen and urinary deoxypyridinoline. J Bone Miner Metab 22, 127–131

Okazaki R, Totsuka Y, Hamano K, Ajima M, Miura M, Hirota Y, et al. (1997): Metabolic improvement of poorly controlled noninsulin-dependent diabetes mellitus decreases bone turnover. J Clin Endocrinol Metab 82, 2915–2920

Okazaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S, Ooka H, et al. (2002): Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. Endocrinology 143, 2349–2356

Park Y-W, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB (2003): The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. Arch Intern Med 163, 427–436

Perry MJ, Gujra S, Whitworth T, Tobias JH (2005): Tamoxifen Stimulates Cancellous Bone Formation in Long Bones of Female Mice. Endocrinology 146, 1060–1065

Pfeilschifter J, Köditz R, Pfohl M, Schatz H (2002): Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. Endocr Rev 23, 90–119

Poli A, Bruschi F, Cesana B, Rossi M, Paoletti R, Crosignani PG (2003): Plasma low-density lipoprotein cholesterol and bone mass densitometry in postmenopausal women. Obstet Gynecol 102, 922–926

Puri P, Wuttke W, Seidlová-Wuttke D (2012): 20-OH-ecdysone prevents hot flushes in ovariectomized rats. Planta Med 78, 109–114

Rachon D, Seidlová-Wuttke D, Vortherms T, Wuttke W (2007): Effects of dietary equol administration on ovariectomy induced bone loss in Sprague-Dawley rats. Maturitas 58, 308–315

Rai MF, Sandell LJ (2011): Inflammatory mediators: tracing links between obesity and osteoarthritis. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 21,131–142

Reginster J-Y, Burlet N (2006): Osteoporosis: a still increasing prevalence. Bone 38, 4–9

Riggs BL, Khosla S, Melton LJ (2002): Sex Steroids and the Construction and Conservation of the Adult Skeleton. Endocrine Reviews 23, 279–302

Robertson RP, Khosla S, Giudice LC, Jameson, JL, Kahn BB, Moore DD, et al. (2010): Translational Endocrinology & Metabolism: Osteoporosis Update. The Endocrine Society 1, 70-72

Rodríguez JP, Montecinos L, Ríos S, Reyes P, Martínez J (2000): Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. J Cell Biochem 79, 557–565

Rosen CJ, Bouxsein ML (2006): Mechanisms of Disease: is osteoporosis the obesity of bone? Nat Clin Pract Rheumatol 2, 35–43

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. (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

Rubin C, Turner AS, Mallinckrodt C, Jerome C, McLeod K, Bain S (2002): Mechanical strain, induced noninvasively in the high-frequency domain, is anabolic to cancellous bone, but not cortical bone. Bone 30, 445–452

Russell M, Mendes N, Miller KK, Rosen CJ, Lee H, Klibanski A, et al. (2010): Visceral Fat Is a Negative Predictor of Bone Density Measures in Obese Adolescent Girls. J Clin Endocrinol Metab 95, 1247–1255

Schmelz EA, Grebenok RJ, Ohnmeiss TE, Bowers WS (2002): Interactions between Spinacia oleracea and Bradysia impatiens: a role for phytoecdysteroids. Arch Insect Biochem Physiol 51, 204–221

Seibel, Markus J: Evaluation des osteoporotischen Frakturrisikos. Deutsches Ärzteblatt 2001. Unter: http://www.aerzteblatt.de/archiv/27773 (abgerufen am 13.06.2012)

Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Becker T, Christoffel V, Wuttke W (2003a): Pharmacology of Cimicifuga racemosa extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. Maturitas 44, 39–50

Seidlová-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T et al. (2003b): Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (Cimicifuga racemosa) extract: comparison with estradiol-17beta. Eur J Endocrinol 149, 351–362

Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Jäger Y, Wuttke W (2008): Bone development in female rats maintained with soy-free or soy-containing food as determined by computer-assisted tomography and serum bone markers. J Bone Miner Metab 26, 321–327

Seidlová-Wuttke D, Christel D, Kapur P, Nguyen BT, Jarry H, Wuttke W (2010a): Beta-ecdysone has bone protective but no estrogenic effects in ovariectomized rats. Phytomedicine 17, 884–889

Seidlová-Wuttke D, Ehrhardt C, Wuttke W (2010b): Metabolic effects of 20-OH-ecdysone in ovariectomized rats. J Steroid Biochem Mol Biol 119, 121–126

Seidlová-Wuttke D, Eder N, Stahnke V, Kammann M, Stecher G, Haunschild J, et al. (2012): Cimicifuga racemosa and its triterpene-saponins prevent the Metabolic Syndrome and deterioration of cartilage in the knee joint of ovariectomized rats by similar mechanisms. Phytomedicine 19, 846–853

Sláma K, Koudela K, Tenora J, Mathová A (1996): Insect hormones in vertebrates: anabolic effects of 20-hydroxyecdysone in Japanese quail. Experientia 52, 702–706

Statistisches Bundesamt: Krankheitskosten in Mio. € für Deutschland. Gliederungsmerkmale: Jahre, Alter, Geschlecht, ICD10. Statistisches Bundesamt 2010. Unter: http://www.gbe-bund.de/oowa921-

install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_PROC?_XWD_2/2/XWD_CUBE.DRILL/_XWD_30/D.416/29375#SOURCES (abgerufen am 11.06.2012)

Stauber M, Weyerstahl T: Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005, 133–134

Sundaram R, Naresh R, Shanthi P, Sachdanandam P (2012): Efficacy of 20-OH-ecdysone on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. Phytomedicine 19, 725–729

Sundstrom J (2006): Clinical value of the metabolic syndrome for long term prediction of total and cardiovascular mortality: prospective, population based cohort study. BMJ 332, 878–882

Syrov VN, Khushbaktova ZA (2001): Experimental study of pharmacotherapeutic effect of phytoecdisteroids and nerobol in toxic liver damage. Eksp Klin Farmakol 64, 56–58

Syrov VN, Nasyrova SS, Khushbaktova ZA (1997): The results of experimental study of phytoecdysteroids as erythropoiesis stimulators in laboratory animals. Eksp Klin Farmakol 60, 41–44

Tajima Y, Yokose S, Kawasaki M, Takuma T (1998): Ovariectomy causes cell proliferation and matrix synthesis in the growth plate cartilage of the adult rat. Histochem J 30, 467–472

Taylor HS, Manson JE (2011): Update in Hormone Therapy Use in Menopause. JCEM 96 255–264

Turner AS (2001):Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. Eur Cell Mater 1, 66–81

Vahlensieck M, Schmidt H-M (2000): Normales Knochenmark und seine Variationen in der MRT. Der Radiologe 40, 688–693

Verma S, Rajaratnam JH, Denton J, Hoyland JA, Byers RJ (2002): Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. J Clin Pathol 55, 693–698

Walliser K: Wirkungen des Ecdysteroids Ecdyson an der Tibia weiblicher ovarektomierter Ratten. Med. Diss. Göttingen 2009

Weise M, De-Levi S, Barnes KM, Gafni RI, Abad V, Baron J (2001): Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 6871–6876

WHO Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases: WHO Fracture Risk Assessment Tool 2008. Unter: http://www.shef.ac.uk/FRAX/ (abgerufen am 11.11.2012)

WHO Study Group: Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical Report Series 1994. Unter: http://www.who.int/reproductivehealth/publications/ageing/9241208430/en/index.html (abgerufen am 08.11.2012)

WHO 2004: WHO Scientific Group on the assessment of Osteoporosis at primary Health Care Level. Summary meeting Report Brussels 2004

Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA (1985): Skeletal alterations in ovariectomized rats. Calcif Tissue Int 37, 324–328

Yao X, Chen H, Ohtake N, Shoumura S (2006): Morphological alterations in the growth plate cartilage of ovariectomized mice. Med Mol Morphol 39, 193–197

Yeung DKW, Griffith JF, Antonio GE, Lee FKH, Woo J, Leung PC (2005): Osteoporosis is associated with increased marrow fat content and decreased marrow fat unsaturation: a proton MR spectroscopy study. J Magn Reson Imaging 22, 279–285

Yoshida T, Otaka T, Uchiyama M, Ogawa S (1971): Effect of ecdysterone on hyperglycemia in experimental animals. Biochem Pharmacol 20, 3263–3268

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, 1640–1646

Zhao L-J, Jiang H, Papasian CJ, Maulik D, Drees B, Hamilton J, et al. (2008): Correlation of Obesity and Osteoporosis: Effect of Fat Mass on the Determination of Osteoporosis. J Bone Miner Res 23, 17–29

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau eines Röhrenknochens 7
Abbildung 1.2: Aktivierung der Osteoklasten über den RANKL-RANK-Komplex. Hemmung des Systems durch OPG. 9
Abbildung 1.3: Übersicht über die Epiphysenfuge der Ratte 11
Abbildung 1.4: Darstellung der Substantia spongiosa. Links: Gesunder Knochen, rechts: Osteoporotischer Knochen. 12
Abbildung 2.1: Übersicht über den Versuchsablauf. 21
Abbildung 2.2: Übersichtsbild des histologischen Tibiapräparats 24
Abbildung 2.3: Darstellung mit der Cell-D analySIS® 3.3 Software bei 1,25×10-Vergrößerung 26
Abbildung 2.4: Messung der Kortikalisdicke im metaphysären Bereich der Tibia , 1,25×2,5. 27
Abbildung 2.5: Einteilung der Epihysenfuge in Reserve-, Proliferations- und hypertrophe Zone, Messung der jeweiligen Zonen, 1,6×10-Vergrößerung. 28
Abbildung 2.6: Messung des Hoffa-Fettkörpers im Kniegelenk, 1,25×2,5-Vergrößerung 29
Abbildung 3.1: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: Veränderung des Körpergewichts (KG) in g (*p<0,05 vs ovx,sf). 31
Abbildung 3.2: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: gelber Markanteil in % (*p<0,05 vs ovx,sf). 32
Abbildung 3.3: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: Trabekelanteil in % (*p<0,05 vs ovx,sf). 33
Abbildung 3.4: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: roter Markanteil in % (*p<0,05 vs ovx,sf). 33
Abbildung 3.5: Index zwischen gelbem Mark und rotem Mark (*p<0,05 vs ovx,sf). 34
Abbildung 3.6: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: Kortikalisdicke in der Metaphyse der Tibia in µm (*p<0,05 vs ovx,sf). 35
Abbildung 3.7: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: Osteokalzin im Serum in ng/ml (*p<0,05 vs ovx,sf) 35
Abbildung 3.8: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: CrossLaps im Serum in ng/ml (*p<0,05 vs ovx,sf). 36
Abbildung 3.9: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: Gesamtbreite der Epiphysenfuge in µm (*p<0,05 vs ovx,sf). 37
Abbildung 3.10: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: basale Schicht der Epiphysenfuge in µm (*p<0,05 vs ovx,sf). 37
Abbildung 3.11: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: proliferative Schicht der Epiphysenfuge in µm (*p<0,05 vs ovx,sf). 38
Abbildung 3.12: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: hypertrophe Schicht der Epiphysenfuge in µm (*p<0,05 vs ovx,sf). 39
Abbildung 3.13: Vergleich der prozentualen Anteile der Reservezone, Proliferationszone und der hypertrophen Zone der vier verschiedenen Versuchsgruppen (*p<0,05 vs ovx,sf). 40
Abbildung 3.14: Der Effekt von E2 und Ecd (28 Tage per Futter) auf: intraartikuläres Fettgewebe in µm² (*p<0,05 vs ovx,sf). 41

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Diagnose-Kriterien für das Metabolische Syndrom der NCEP-ATP-III (2001). 3
Tabelle 1.2: WHO-Definition der Osteoporose anhand des T-Scores (WHO Study Group, 1994). 13
Tabelle 2.1: Darstellung der vier Versuchsgruppen mit Angabe von Testsubstanz, Hersteller, Dosis und Applikation. 22
Tabelle 2.2: Übersicht über die mittlere Futteraufnahme in g/Tag/Tier sowie über die mittlere Substanzaufnahme von Ecd und E2 in mg/Tag/Tier. 23
Tabelle 3.1: Mittlere Futteraufnahme in g/Tag/Tier 32
Tabelle 3.2: Übersicht über die mittleren prozentualen Anteile der Reservezone, Proliferationszone und hypertrophen Zone an der Gesamtbreite der Epiphysenfuge 40
Tabelle 6.1: Übersicht der Herstellung von Kunststoffpolymerisaten..... 55
Tabelle 6.2: Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen der Goldner-Färbung. 57

Danksagung:

Ich möchte mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke bedanken, die mir das Thema zur Verfügung gestellt hat und mich während der gesamten Arbeit freundlich betreut hat. Auch Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke danke ich für die hilfreiche Unterstützung am Schluss. Mein großer Dank gilt auch den medizinisch-technischen Angestellten der Abteilung, besonders Frau Heidi Brüggemann-Meyer, für die Herstellung und Bereitstellung der Präparate, die ich ausgewertet habe.

Lebenslauf:

Ich wurde am 27.11.1985 als zweites Kind meiner Eltern Brigitte Wesselmann und Gregor Sunder-Plassmann in Kappeln an der Schlei in Schleswig-Holstein geboren. Nachdem ich im Jahre 2005 erfolgreich das Abitur absolvierte, begab ich mich auf eine siebenmonatige Reise durch Südamerika. Dies gab mir die Gelegenheit, eine weitere Sprache zu lernen und viele interessante und neue Erfahrungen zu sammeln. Ich entschloss mich, Medizin zu studieren und begann im Oktober 2006 das Medizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen. Um Einblicke in andere Gesundheitssysteme und Kulturen zu erlangen, nutzte ich die Praktika, um in verschiedene Länder zu reisen und zum Beispiel in einem Krankenhaus in Ecuador zu famulieren. Vom Oktober 2009 bis zum Juni 2010 studierte ich zwei Semester an der Universitat Autònoma de Barcelona in Spanien. Im Laufe des Jahres 2011 begann ich in der Abteilung für Klinische und Experimentelle Endokrinologie in der Klinik für Gynäkologie der Universität Göttingen meine Dissertation. Im Rahmen meines Praktischen Jahres 2012/2013 verbrachte ich ein Tertial in dem französischen Überseedepartement Martinique. Weitere zwei Monate nutze ich, um in einem der größten Krankenhäuser Spaniens, im Hospital Virgen del Rocio in Sevilla, Einblicke in mein Wahlfach Gynäkologie und Geburtshilfe zu erlangen. Im April 2013 habe ich das Medizinstudium mit der Note 1,6 abgeschlossen und die Approbation als Ärztin erhalten.