

Aus der Arbeitsgruppe Endokrinologie
(Prof. Dr. med. W. Wuttke)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Antiosteoporotische Prinzipien
in *Cimicifuga racemosa* BNO 1055/C001 und ihren Fraktionen

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Lea Laß
aus
Göttingen

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

1. Berichterstatterin: Priv.- Doz. Dr. med. D. Seidlová-Wuttke

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med Dr. med. dent. K. G. Wiese

3. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. T. Crozier

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	3
1.1. Das Klimakterium	3
1.1.1. Das Klimakterium der Frau	3
1.1.2. Das Klimakterium der Ratte	4
1.2. Der Knochen	5
1.2.1. Der Knochen des Menschen	5
1.2.1.1. Aufbau des Knochen	5
1.2.1.2. Osteoblasten	6
1.2.1.3. Osteozyten	6
1.2.1.4. Osteoklasten	7
1.2.1.5. Knochenstoffwechsel	7
1.2.1.6. Das RANK- / RANKL- / Osteoprotegerinsystem	8
1.2.1.7. Marker des Knochenstoffwechsels	9
1.2.2. Der Knochen der Ratte	9
1.3. Die Osteoporose	10
1.3.1. Epidemiologie	10
1.3.2. Definition und Klassifikation	10
1.3.2.1. Definition	10
1.3.2.2. Klassifikation	12
1.3.3. Östrogenmangel und Osteoporose	12
1.3.4. Risikofaktoren der Osteoporose	15
1.3.5. Diagnostik der Osteoporose	15
1.3.6. Therapie der Osteoporose	16
1.4. Die Sarkopenie	17
1.5. Die Fettleibigkeit	17
1.6. Die Therapieansätze im Vergleich	18
1.6.1. Östrogene	18
1.6.2. <i>Cimicifuga racemosa</i>	19
1.6.2.1. <i>Cimicifuga racemosa</i> BNO 1055 und ihre Fraktionen	19

1.6.2.2. <i>Cimicifuga racemosa</i> BNO 1055 und ihre Wirkung auf das Serotoninsystem	21
1.7. Zielsetzung	23
2. Material und Methoden	25
2.1. Tierversuche	25
2.1.1. Versuchstiere	25
2.1.2. Ablauf der Knochenvolumenmineraldichtemessung	25
2.1.3. Ovariectomie	26
2.1.4. Applikation der Wirkstoffe	27
2.1.5. Obduktion	28
2.2. Auswertung	29
2.2.1. Ermittelte Parameter	29
2.2.2. Serumdiagnostik	30
2.2.3. Statistische Methoden	30
3. Ergebnisse	32
3.1. Futteraufnahme und Körpergewicht	33
3.2. Knochengewebe	34
3.2.1. Endosteale Dichte	34
3.2.2. Intraosteale Fläche	36
3.2.3. Intraosteale und periosteale Zirkumferenz	37
3.2.4. Kortikale Dichte	39
3.2.5. Kortikale Fläche	40
3.2.6. Serum Osteokalzin	41
3.2.7. Serum CrossLaps	43
3.3. Muskulatur	44
3.3.1. Muskeldichte	44
3.3.2. Muskelfläche	46
3.4. Fettgewebe	47
3.4.1. Fläche des paratibialen Fettdepots	47
3.4.2. Anteil des paratibialen Fettdepots	49
4. Diskussion	50
4.1. <i>Cimicifuga racemosa</i> BNO 1055	51

4.2. Analyse der Ergebnisse	52
4.2.1. Futteraufnahme und Körpergewicht	52
4.2.2. Endosteale Dichte	53
4.2.3. Intraosteale Fläche	55
4.2.4. Parameter des Knochenstoffwechsels	55
4.2.5. Kortikale Dichte	59
4.2.6. Kortikale Fläche	59
4.2.7. Intraosteale und periosteale Zirkumferenz	60
4.2.8. Muskeldichte	61
4.2.9. Muskelfläche	62
4.2.10. Fettgewebe	63
4.3. Serotoninerge Signalwege im Knochen und Zentralnervensystem	64
4.4. Schlussfolgerungen	66
5. Zusammenfassung	68
6. Anhang: Abb. 1, Tab. 2,3,4	71
7. Literaturverzeichnis	75
8. Abbildungsverzeichnis	82
9. Tabellenverzeichnis	83

Abkürzungsverzeichnis

BMD	Bone Mineral Density (Knochenvolumenmineralisierungsdichte)
BMI	body mass index
CL	CrossLaps
CR	<i>Cimicifuga racemosa</i>
DXA	dual energy X-ray absorptiometry
ED	endosteale Dichte
ER	Östrogenrezeptor
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
HLPC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRT	Hormonersatztherapie
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
IF	intraosteale Fläche
KD	kortikale Dichte
KF	kortikale Fläche
Ko	Kontrollgruppe / Kontrolltiere
LH	luteinisierendes Hormon
OC	Osteokalzin
OPG	Osteoprotegerin
Orx, orx	Ochidektomie, orchidektomiert
Ovx, ovx	Ovarektomie, ovarektomiert
PBM	Peak Bone Mass (Knochengipfelmasse)
Präovx	vor Ovarektomie
PTH	Parathormon
qCT	quantitative Computertomographie / quantitatives Computertomogramm
QUS	quantitativer Ultraschall
RANK	receptor activator of nuclear factor kappa B
RANKL	ligand of receptor activator of nuclear factor kappa B
Rest	Restfraktion
Sap	Saponinfraktion
SERM	selektive Östrogenrezeptormodulatoren

TNF

Tumornekrosefaktor

WHO

World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

1. Einleitung

Die Osteoporose ist im Zuge des demographischen Wandels unserer Gesellschaft in den letzten Jahrzehnten zu einem immer bedeutenderen Problem geworden. Durch den Verlust von Knochengewebe und der damit einhergehenden Abnahme der stabilisierenden und stützenden Eigenschaften des Knochens kommt es gehäuft zu Frakturen. Diese wiederum gehen einher mit Operationen, längeren Krankenhausaufenthalten und einem Verlust der Selbstständigkeit der Betroffenen. Ihre Zahl wird in den nächsten Jahren weiter ansteigen (Kanis und Johnell, 2005). Die in der Vergangenheit oft zum Einsatz gekommene Behandlung der Osteoporose mittels Hormonersatztherapie (HRT) ist in jüngerer Zeit aufgrund eines erhöhten Risikos insbesondere für kardiovaskuläre Erkrankungen und Mammakarzinom immer mehr in die Kritik geraten. Dies konnte im Zeitraum zwischen 1993 und 2001 in verschiedenen Studien wie der Million Women Study (Beral, 2003) und der Women's Health Initiative (WHI) (Rossouw et al., 2002) gezeigt werden. Aus diesem Grund wurde mit der Suche nach alternativen Therapiemöglichkeiten begonnen. Nach Revision der Resultate hat die alternative Osteoporosetherapie ihren Stellenwert bestätigt und neue Aspekte vorgelegt.

1.1. Das Klimakterium

1.1.1. Das Klimakterium der Frau

Der Zeitraum im Leben einer Frau zwischen terminierender Geschlechtsreife und Senium wird gemeinhin als Klimakterium bezeichnet. Mit einer Dauer zwischen 10 und 15 Jahren setzt sich das Klimakterium aus Prämenopause, Menopause, Perimenopause und Postmenopause zusammen. Das Lebensalter der Frau bei Eintritt in die Menopause, die definitionsgemäß 12 Monate nach der letzten

Menstruationsblutung beginnt, beträgt im Durchschnitt 51 Jahre (Greendale et al., 1999).

Die Tatsache, dass nahezu jedes Gewebe des menschlichen Körpers über Östrogenrezeptoren verfügt, erklärt die Gegebenheit, dass die Symptome bei fehlender ovarieller Funktion und demzufolge Östrogenmangel sich nicht nur auf die weiblichen Geschlechtsorgane beschränken, sondern vielfältiger Natur sind. Als Folge der folliculären Atresie geht zunehmend die Fähigkeit der Östrogenproduktion in den weiblichen Gonaden verloren (Blumel et al., 2000; Nelson, 2008). Die zu Beginn des Klimakteriums vorherrschenden psychischen und vegetativen Beschwerden werden mit zunehmender Dauer und Stärke des Östrogenmangels von manifesten Organstörungen begleitet. Typische Symptome, unter denen ein Großteil aller klimakterischen Frauen leidet, sind unter anderem Hitzewallungen, Schweißausbrüche, Schlafstörungen und depressive Verstimmungen (Hammar et al., 1984). Mit weiterem Verlauf und fortbestehendem Östrogenmangel kommen mitunter Osteoporose, ein erhöhtes Risiko der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit und urogenitale Beschwerden, wie beispielsweise Inkontinenz, hinzu (Greendale et al., 1999).

Die Symptome, seien sie vegetativer, psychischer oder organischer Natur, beeinträchtigen die Lebensqualität der betroffenen Frau in erheblichem Ausmaß (Blumel et al., 2000).

1.1.2. Das Klimakterium der Ratte

Die weibliche Ratte entwickelt unter physiologischen Bedingungen keinen klimakterischen Hormonzustand. Etwa ab dem 15. Lebensmonat wird sie hyperestrin und verstirbt ungefähr nach weiteren drei Monaten. Durch Ovx der Tiere kann jedoch ein hormoneller Zustand herbeigeführt werden, der dem einer klimakterischen Frau

entspricht. So ist die ovx Ratte zu einem etablierten Modell in der endokrinologischen Forschung, insbesondere am Knochen, geworden (Bellino, 2000). Für andere denkbare Tiermodelle wie beispielsweise Affen, Ziegen, Schafe oder Schweine würde der Zeitraum nach Ovx bis zur Erlangung eines hormonellen Zustands, der dem der postmenopausalen Frau entspricht, sehr viel länger sein. Die Entwicklung der Ratte hingegen vollzieht sich schneller. Deshalb spricht sie in relativ kurzer Zeit auf hormonelle Veränderungen wie Hormonsubstitution und hormonelle Defizite an, womit sie für Forschungsdesigns über einen kurzen Zeitraum besonders geeignet ist (Kalu, 1991; Frost und Jee, 1992).

1.2. Der Knochen

1.2.1. Der Knochen des Menschen

Die Bedeutung des Knochengewebes beschränkt sich nicht allein auf seine stützenden Eigenschaften. Knochen ist ein lebendiges Kompartiment im Organismus, das in vielerlei Wechselwirkungen mit anderen Geweben steht. Der Knochen liefert jene Vorläuferzellen, die zur Blutbildung und zum Aufbau des Immunsystems dienen, und erhält diese Einheiten durch Reservoirfunktion aufrecht. Er dient darüber hinaus durch seine Festigkeit dem mechanischen Schutz insbesondere des Zentralnervensystems und leistet einen Beitrag zur Aufrechterhaltung des Serumkalziumspiegels, der seinerseits wiederum Auswirkungen auf Abläufe im gesamten Organismus hat (Lorenzo et al., 2008).

1.2.1.1. Aufbau des Knochen

Knochengewebe ist spezialisiertes Binde- und Stützgewebe und muss eine Reihe von Anforderungen erfüllen. Zum einen muss es zug- und druckfest sein. Gleichzeitig soll es auf bestimmte Stimuli dynamisch reagieren können, über eine gewisse

Elastizität, aber auch Stabilität verfügen und besitzt nicht zuletzt durch seine Leichtbauweise ein begrenztes Gewicht (Seeman, 2008). Die Zusammensetzung des Knochens kann in zwei Bestandteile gegliedert werden. Zum einen sei die organische Knochenmatrix zu nennen, deren Gesamtanteilanteil von etwa 20% zu bis zu 95% aus Kollagen Typ 1 besteht. In dieser organischen Phase sind auch die zellulären Bestandteile des Knochens, die Osteozyten, eingelagert. Zum anderen existiert eine sehr feste mineralische Substanz, die etwa 70% des gesamten Knochengewebes ausmacht. Die restlichen 10% sind Wasser. Drei Zellarten sorgen für die notwendige Dynamik im Auf- und Abbau des Gewebes.

1.2.1.2. Osteoblasten

Die Osteoblasten sind die matrixbildenden Zellen im wachsenden Knochen. Sie befinden sich an der Oberfläche von Geflechtknochen, jenem Knochen, der während Knochenentwicklung, Frakturheilung und anderen Reparaturphasen vorhanden ist. Sie sekretieren unter anderem Kollagen, Proteoglykane und verschiedene Proteine wie das Osteokalzin (Delmas, 1993). Darüber hinaus produzieren sie auch Wachstumsfaktoren und besitzen verschiedene Rezeptoren zur Regulation des Knochenmetabolismus. Die von ihnen gebildete Matrix ist noch nicht verkalkt, man nennt sie Osteoid.

1.2.1.3. Osteozyten

Osteozyten sind morphologisch veränderte Osteoblasten, die in die Matrix eingelagert sind. Sie liegen einzeln in kleinen Höhlen, die als Lakunen bezeichnet werden, und kommunizieren über Fortsätze, sogenannte *gap junctions*, durch kleine Kanäle miteinander. Über diese Kanäle wird der Stoffaustausch von Signalstoffen gewährleistet. Die Osteozyten reagieren auf mechanische Beanspruchung des

Knochens und vermögen so über Stimulation der Osteoblasten einen Beitrag zum langsamen Umbau der Matrix zu leisten (Chan et al., 2009).

1.2.1.4. Osteoklasten

Die ebenfalls im Knochen vorkommenden Osteoklasten sind lebenslang für die Resorption der mineralisierten und der organischen Matrix zuständig (Lee und Lorenzo, 2006). Es sind bewegliche, vielkernige Riesenzellen, die bis zu fünfzig dieser Kerne enthalten können. Die Osteoklasten differenzieren sich aus den Monozyten, die wiederum aus dem Knochenmark stammen. Die Klasten sind in der Lage, lysosomale Enzyme wie Kollagenasen und Kathepsine zu sezernieren, und lösen damit in sogenannten Resorptionslakunen die mineralisierte Matrix auf bzw. bauen die Kollagenfibrillen ab. Sie werden unter anderem durch Kalzitonin gehemmt, sowie von Interleukinen aus Osteoblasten in ihrer Aktivität gesteigert. Somit spielen die Osteoblasten neben dem Knochenaufbau auch eine Rolle beim Abbau der Substanz (Roodman, 1993).

1.2.1.5. Knochenstoffwechsel

Das Knochengewebe des Menschen befindet sich in einem lebenslangen Umbauprozess. Seine Bildung und Resorption werden von einer Vielzahl von Faktoren gesteuert und beeinflusst. Wird der Abbau von gesundem Knochen an einer Stelle aufgrund bestimmter Stimuli vollzogen, so wird die Substanz danach stets wieder durch neues Gewebe ersetzt (Iqbal et al., 2009). Im gesamten Skelettsystem können mitunter mehr als eine Million solcher Umbauherde parallel existieren (Boyce und Xing, 2008). Während der gesunde trabekuläre Knochen innerhalb von etwa vier Jahren durch Umbau einmal komplett erneuert wird, benötigt der kompakte Knochen etwa die doppelte Zeit. Dies erklärt, wieso die unten

beschriebenen Schädigungen am kompakten Knochen später in Erscheinung treten als am trabekulären Knochen.

1.2.1.6. Das RANK- / RANKL- / Osteoprotegerinsystem

Die oben beschriebenen Abläufe und Zusammenhänge im Knochenstoffwechsel sollen in diesem Abschnitt auf zellulärer Ebene genauer beleuchtet werden. Wie bereits erwähnt, sind es die Osteoklasten und Osteoblasten, die für die notwendige Dynamik im Knochenumbau sorgen. Die Osteoklasten werden von verschiedenen Zytokinen in ihrer Aktivität über Stimulation bzw. Inhibition reguliert (Roodman, 1993). Ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNFSF-11) stimuliert einerseits die Reifung von Vorläuferzellen der Osteoklasten und steigert ferner auch direkt die reifen Osteoklasten in ihrer resorptiven Aktivität. Dieser Botenstoff wird RANKL genannt und ist Ligand des *receptor activator of nuclear factor- κ B* (NF- κ B). RANKL wird von einigen Knochenmarkszellen und Osteoblasten exprimiert und von Osteoprotegerin (OPG), einem weiteren Mitglied der Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNFRSF-11B), über kompetitive Bindung gehemmt. Osteoprotegerin wirkt somit resorptionshemmend (Lee und Lorenzo, 2006). Östrogene beeinflussen dieses System einerseits durch Hemmung der RANKL-Produktion der Osteoblasten und fördern gleichzeitig die Sekretion von Osteoprotegerin (Hofbauer et al., 1999). Der biologisch aktive, resorptionsfördernde Rezeptor für RANKL ist RANK, ebenfalls Mitglied der Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNFRSF-11A). RANK kommt beispielsweise in Dendritischen Zellen, Osteoklasten - Vorläuferzellen und reifen Osteoklasten vor. Durch Bindung an seinen Liganden RANKL wird der Abbau des Knochens gesteigert (Lee und Lorenzo, 2006).

1.2.1.7. Marker des Knochenstoffwechsels

Um Endokrinopathien der Kalziumhomöostase und metabolische Knochenkrankheiten beurteilen und kontrollieren zu können, existiert eine Reihe von Serumparametern. Unter diesen Kenngrößen kann man differenzieren zwischen jenen, die einen Knochenaufbau signalisieren, und jenen, die den Abbau von Knochengewebe widerspiegeln. Eine verstärkte Tätigkeit der Osteoblasten wird durch erhöhte Parameter der Knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase (BAP) oder Osteokalzin (OC) angezeigt. Beide Marker sind recht spezifisch. Die Abbaumarker, die eine erhöhte Tätigkeit der Osteoklasten signalisieren, sind unter anderem die tartratresistente saure Phosphatase sowie die CrossLaps (CL), ein Abbauprodukt des Typ-1-Kollagens (Garnero und Delmas, 1996).

1.2.2. Der Knochen der Ratte

Das Knochengewebe der Ratte ist dem des Menschen sehr ähnlich. Alle Knochenparameter und metabolischen Regulationsmechanismen, die in dieser Arbeit von Bedeutung sind, existieren in vergleichbarer Form in der ovariectomierten Ratte und der postmenopausalen Frau und können somit übertragen werden (Martin et al., 2003). Die intakte Ratte entwickelt spontan keine Osteoporose. Um diese zu induzieren, werden die Tiere ovariectomiert. Bei ovx Ratten vollziehen sich die postmenopausale und die senile Osteoporose dann in ähnlicher Weise wie beim Menschen. Nach einer anfänglichen schnellen Phase des Knochenverlusts folgt bei länger andauerndem Östrogenmangel eine Phase des langsameren Abbaus mit vergleichbarem Verlust von Spongiosa und Kompakta (Kalu, 1991). Im Unterschied zum Menschen manifestiert sich die Osteoporose der Ratte primär in der Tibia, beginnend etwa zwei Wochen nach Ovx. Dieser Teil des Rattenkörpers ist besonders empfindlich gegenüber hormonellen Veränderungen und wird deshalb oft zur

Grundlage von Untersuchungen antiosteoporotischer Effekte gemacht (Wronski et al., 1986). Erst nach mehreren Monaten manifestiert sich die Osteoporose dann in anderen Bereichen, wie beispielsweise der Vertebra (Wronski et al., 1989 a; Wronski et al. 1989 b). Des Weiteren sei zu erwähnen, dass die Wachstumszone in den langen Knochen der Ratte ein Leben lang persistiert und es nicht wie beim Menschen zu einem Schluss der Epiphysenfugen kommt (Kapur et al., 2010 a). Insgesamt bleibt festzuhalten, dass, unter Berücksichtigung der genannten Unterschiede, dieses Tiermodell nach wie vor als Standard in der endokrinologischen Forschung am Knochen anzusehen ist (Bellino, 2000; Turner, 2001).

1.3. Die Osteoporose

1.3.1. Epidemiologie

Osteoporose betrifft etwa 75 Millionen Menschen in Europa, den USA und Japan (EFFO und NOF, 1997). Die Europäische Kommission geht von einem Anstieg der Prävalenz der osteoporosebedingten Beckenfrakturen von 117.000 im Jahre 2000 auf 240.000 für das Jahr 2040 in Europa aus. Im Jahre 2003 betrug allein in Deutschland die Zahl der an Osteoporose erkrankten Menschen 7,8 Millionen, davon waren 6,5 Millionen der Betroffenen weiblichen Geschlechts. Die Belastung für das deutsche Gesundheitssystem durch Osteoporose belief sich in diesem Jahr auf 5,4 Milliarden Euro (Häussler et al., 2007).

1.3.2. Definition und Klassifikation

1.3.2.1. Definition

Die momentan gültige Definition der Osteoporose wurde 1993 auf der „Consensus Development Conference on Osteoporosis“ festgelegt. Determiniert wurde die Osteoporose als eine systemische skelettale Erkrankung, charakterisiert durch eine

geringe Knochenmasse und eine verminderte Mikroarchitektur des Knochengewebes, mit daraus resultierendem Anstieg der Zerbrechlichkeit des Gewebes bzw. einem erhöhtem Frakturrisiko (Consensus development conference, 1993).

Um den Schweregrad der Erkrankung besser einzuschätzen bzw. die Osteoporose so genauer einzuteilen, existiert neben jener Definition der „Consensus Development Conference on Osteoporosis“ eine weitere Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus dem Jahre 1994 (Delmas, 2000). Diese vergleicht die Knochenmineraldichte, die sogenannte Bone Mineral Density (BMD), ermittelt über DXA (*dual energy X-ray absorptiometry*) eines Individuums mit der mittleren Knochendichte einer jungen gesunden Vergleichsgruppe. Der ermittelte Wert ist der T-Score, ein Maß für den Verlust der Knochenmineralisierung. Des Weiteren ist eine Gegenüberstellung mit einer altersgleichen, gesunden Vergleichsgruppe möglich. Der hieraus resultierende Wert ist der Z-Score, der aussagt, wie hoch das Frakturrisiko des Individuums ist. Beide Werte beziehen sich auf die Standardabweichungen vom statistisch ermittelten Mittelwert der jeweiligen Vergleichsgruppen. Ein T-Score ≥ -1 ist per Definitionem ein Normalbefund. Zwischen -1 und -2,5 spricht man von einer Osteopenie. Ab einem T-Score von $\leq -2,5$ spricht die WHO von einer präklinischen Osteoporose. Kommt zu diesem Wert noch eine Fraktur hinzu, lautet die Diagnose manifeste Osteoporose (Delmas, 2000). Einen Überblick gibt die folgende Tabelle:

Tabelle 1. Definition der Osteoporose anhand des T-Score, einem Maß für den Verlust der Knochenmineralisierung (modifiziert nach WHO 1994 (Delmas, 2000))	
T-Score ≥ -1	Normalbefund
T-Score -1 bis $-2,5$	Osteopenie
T-Score $\leq -2,5$	präklinische Osteoporose
T-Score $\leq -2,5$ + Fraktur	manifeste Osteoporose

Eine vergleichbare Definition für die Ratte existiert derzeit in weltweit gültiger Form noch nicht. Anhand aller Knochenvolumenmineraldichtemessungen der Abteilung aus den vergangenen 12 Jahren von insgesamt 1437 intakten, drei Monate alten weiblichen Ratten auf soyafreiem Futter haben wir einen solchen T-Score festgelegt. Diese Definition ist ein Novum, dessen Ergebnisse in Tabelle 2. im Anhang vorgestellt werden.

1.3.2.2. Klassifikation

Es existieren verschiedene Einteilungen bzw. Klassifikationen der Osteoporose mit jeweils unterschiedlichem Schwerpunkt für die Erkrankung und ihre Unterformen. Die Differenzierung zwischen der primären bzw. idiopathischen und der sekundären Osteoporose ist in gewisser Weise beliebig, da die Formen nicht immer klar voneinander zu trennen sind und sich auch gegenseitig beeinflussen können. Die Tabelle 3. im Anhang bietet eine Übersicht. Sie gibt dabei die wichtigsten Beispiele wieder und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Jede der genannten Formen hat dabei eine ganz individuelle Pathogenese und führt jeweils zu unterschiedlichen Ausprägungen der Osteoporose (Dempster und Lindsay, 1993; Painter et al., 2006).

1.3.3. Östrogenmangel und Osteoporose

Die für diese Arbeit relevante Form der Osteoporose ist eine fortschreitende, durch Hormonmangel hervorgerufene Rarifizierung des trabekulären Knochens. Die

postmenopausale und senile Osteoporose ist die beim Menschen verbreitetste Form der Osteoporose und betraf im Jahr 2007 allein in Deutschland jede dritte Frau über 50. Physiologischerweise sind, wie oben beschrieben, der Knochen- Abbau und -Anbau miteinander gekoppelt und sorgen damit für ein Gleichgewicht, sodass es zu keinem Verlust an Knochenmasse kommt. Wird an einer Stelle des Knochens Gewebe abgebaut, so wird dieses stets wieder mit neuer Materie ersetzt. Gerät das Gleichgewicht durch bestimmte Faktoren, wie in diesem Falle durch Östrogenmangel, außer Balance, so kann der Anbau von Knochenmasse den Abbau nicht mehr kompensieren. Zwar werden bei Östrogenmangel sowohl Resorption als auch Knochenbildung angekurbelt, jedoch überwiegt eindeutig der stärker beschleunigte Abbau. Es kommt zu einem Verlust von Knochengewebe (Ivey und Baylink, 1981). Im Blut sind dann erhöhte Werte für Parameter des Aufbaus, wie beispielsweise das Osteokalzin, und stärker erhöhte Werte für Parameter des Abbaus, beispielsweise die CrossLaps, nachweisbar. Durch diesen Verlust von Stützgewebe steigt mit zunehmendem Verlauf der Erkrankung das Frakturrisiko stark an. Haben die betroffenen Frauen schon in der Vergangenheit Frakturen erlitten, so potenziert sich ihr Risiko zusätzlich. Dies fanden Kanis et al. 2004 im Rahmen einer Studie mit 60161 Probanden, davon 44902 weiblichen Geschlechts, heraus. Untersucht wurde das erneute Frakturrisiko nach bereits erfolgtem Knochenbruch unter Einbezug von Faktoren wie Alter, Geschlecht und Knochenmineraldichte. Die Studie zeigte ein allgemein höheres Frakturrisiko für Probanden mit stattgehabten Knochenbrüchen. Dabei war sowohl das allgemeine Risiko für einen erneuten Knochenbruch, das Risiko für eine Fraktur im Bereich des Beckens als auch das Risiko für eine osteoporosebedingte Fraktur bei bereits stattgehabtem Knochenbruch signifikant erhöht. Zwischen den Geschlechtern bestand bei keiner der Frakturen ein signifikanter Unterschied im Wiederholungsrisiko. Eine erniedrigte

Knochenmineraldichte erhöhte nur das Frakturrisiko im Beckenbereich auf signifikante Weise (Kanis et al., 2004).

Der Verlauf der Osteoporose menopausaler Frauen und ovx Ratten vollzieht sich in zwei unterschiedlichen Phasen. Zu Beginn wird die Osteolyse dominiert von einem massiven und schnellen Verlust des trabekulären Knochengewebes. Wie Riggs und Melton 1986 postulierten, beträgt der Verlust von Spongiosagewebe in dieser Phase, die etwa die ersten zehn Jahre nach Einsetzen der Menopause umfasst, bis zu 30%. Der Abbau von Kompakta um bis zu 10% spielt in diesen ersten Jahren eine noch untergeordnete Rolle (Riggs und Melton, 1986). Vorherrschende Knochenbrüche betreffen zu diesem Zeitpunkt insbesondere die Wirbelkörper sowie den distalen Unterarm. Durch den Mangel an Östrogenen steigt - bedingt durch vermehrte Knochenresorption - der Serumkalziumspiegel an. Um den Kalziumspiegel im Blut konstant zu halten, wird in dieser Phase die renale Kalziumausscheidung gesteigert und unterstützend die Aufnahme der Substanz aus dem Darm vermindert. Diese Phase dauert in der Regel die anfänglichen 10 - 20 Jahre der Postmenopause an. In der späten Postmenopause ruft dann eine Reihe von Faktoren das Fortschreiten der Osteoporose und die Entstehung des häufig beobachteten sekundären Hyperparathyreoidismus hervor (Clarke und Khosla, 2010). Diese zweite, langsame Phase des Knochenabbaus wird als senile oder *low turnover* Osteoporose bezeichnet und betrifft sowohl das weibliche als auch das männliche Geschlecht. In der senilen Phase kommt es neben dem Verlust von Spongiosagewebe nun zusätzlich zu einem äquivalenten Abbau der Kompakta. Je geringer die Knochenmineraldichte und je mehr Knochenmasse eingebüßt wird, desto größer wird das Risiko für Frakturen, jetzt vorwiegend im Bereich des Oberschenkelhalses und des Beckens (Seeman, 2002).

1.3.4. Risikofaktoren der Osteoporose

Die Risikofaktoren für die Entwicklung einer Osteoporose sind vielfältig und immer im Kontext mit den körperlichen Voraussetzungen des betroffenen Individuums zu sehen. Die Osteoporose ist somit eine Erkrankung multifaktorieller Genese, bei der neben bestimmten Risikofaktoren auch die Umwelt des Individuums sowie das Individuum selbst eine bedeutende Rolle spielen. Die Kombination dieser verschiedenen Faktoren löst dann entweder eine Osteoporose aus oder eben nicht. Bedeutende Risikofaktoren, die auf der „Consensus Development Conference on Osteoporosis“ im Jahre 1993 diskutiert wurden, sind in Tabelle 4. im Anhang aufgeführt (Consensus development conference, 1993).

1.3.5. Diagnostik der Osteoporose

Grundlage der Osteoporosediagnostik ist die Quantifizierung der Knochendichte (BMD). Sie kann über verschiedene Methoden ermittelt werden. Die konventionelle Röntgentechnik ist erst ab einem Verlust der Knochendichte zwischen 20 und 40% in der Lage, diesen sichtbar zu machen. Neuere Methoden erfassen einen Dichteverlust schon bevor sich radiologisch Auffälligkeiten zeigen (Boehm und Link, 2004). Momentan existieren drei etablierte densitometrische Methoden für die Osteoporose-Diagnostik. Zum einen die *dual energy X-ray absorptiometry* (DXA), ein Verfahren zur Ermittlung der Knochendichte, das an fast jeder Skelettregion des Körpers angewendet werden kann. Problematisch ist, dass bei dieser Messmethode nicht zwischen trabekulärem und kompaktem Gewebe differenziert werden kann. Allerdings ist diese Messmethode in vielen Teilen der Welt, so auch in Regionen mit begrenzten Mitteln im Gesundheitswesen, verbreitet. Das qCT zur Messung der Knochenvolumenmineraldichte ist eine Methode zur selektiven Analyse der Spongiosa (Engelke et al., 2009). Zu beachten ist die Belastung durch

Röntgenstrahlen, die etwa 100 mal größer ist als bei einer gewöhnlichen Röntgen-Thorax-Untersuchung. Seltener findet der Quantitative Ultraschall (QUS) Anwendung. Vorteile dieser Methode sind, dass sie ohne Strahlenbelastung auskommt und sehr viel kostengünstiger ist als die beiden erstgenannten Techniken (Guglielmi et al., 2010).

1.3.6. Therapie der Osteoporose

Therapienansätze zur Behandlung der Osteoporose sind vielfältig. Sie entwickeln sich ständig weiter und sind in den letzten Jahren immer häufiger Gegenstand der Forschung geworden. Nachdem der Einsatz von Östrogenen und Progesteron (HRT) in der WHI-Studie eine karzinogene Wirkung auf das Mammagewebe sowie ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen gezeigt hat (Rossouw et al., 2002), verliert diese Form der Osteoporosetherapie heute zunehmend an Stellenwert und die klinische Forschung erprobt vermehrt Substanzen, die in ihrer Wirkung eine vergleichbare Alternative darstellen, ohne das Risikoprofil der HRT aufzuweisen. Darüber hinaus gewinnt eine prophylaktische Behandlung der Osteoporose sowie die Suche nach geeigneten Präparaten zur Langzeittherapie zunehmend an Bedeutung. Momentan finden die Bisphosphonate, die das Risiko für osteoporosebedingte Frakturen senken und die Knochenmineraldichte erhöhen, häufige Anwendung (Drake et al., 2008; Bilezikian, 2009). Weitere Therapiemöglichkeiten sind die Gabe von PTH oder Kalzitonin plus Vitamin-D-Hormon und Kalzium (Chesnut et al., 2000), sowie die selektiven Östrogenrezeptormodulatoren wie beispielsweise das Raloxifen (Cosman und Lindsay, 1999). Eine weitere Alternative bietet ein in jüngerer Zeit entwickelter humaner Antikörper gegen RANKL namens Denosumab, der zu einer Senkung der Knochenresorption sowie des Frakturrisikos führt (Cummings et al.,

2009). Aufgrund seiner guten Verträglichkeit weckt der Wirkstoff derzeit Hoffnungen auf eine Möglichkeit der Langzeittherapie (Lewiecki, 2010).

1.4. Die Sarkopenie

Muskulatur und Knochen des menschlichen Körpers stehen in engem regulatorischen Zusammenhang und werden auch als muskuloskeletale Einheit bezeichnet. Muskulatur stabilisiert den Knochen und wirkt als mechanischer Stimulus. Altersbedingte Veränderungen, wie Muskelschwäche bzw. eine reduzierte Muskelmasse (Sarkopenie), beeinflussen so direkt auch den Knochenstoffwechsel (Blain et al., 2001). Die Ursachen der Sarkopenie sind vielfältig. Große Bedeutung hat der Mangel an Sexualhormonen mit Einsetzen des Klimakteriums (Sirola und Rikkonen, 2005). Darüber hinaus spielt auch eine mangelnde körperliche Ertüchtigung älterer Menschen sowie eine unzureichende Aufnahme von Proteinen mit der Nahrung eine wichtige Rolle. Nicht zuletzt ist auch der im Alter vermehrte Abbau von Synapsen und die dadurch verminderte Verbindung zwischen Nervensystem und motorischer Endplatte ein entscheidender Faktor (Roubenoff, 2001). Die momentanen Therapieprinzipien belaufen sich auf Krafttraining mit Gewichten oder Vibrationstraining, eine Steigerung der Proteinzufuhr bzw. Gabe von Steroidhormonen und Bisphosphonaten, wenn die Sarkopenie mit einer Osteopenie einhergeht.

1.5. Die Fettleibigkeit

Das Fettgewebe des Menschen wird von einer Vielzahl von Faktoren reguliert. Wichtigen Einfluss nehmen unter anderem die Hormone, hier insbesondere die Sexualhormone. Kommt es im Zuge des Klimakteriums zu einem Abfall der

Sexualhormonspiegel, so hat dies starke Auswirkungen auf den Fettstoffwechsel. Der Mangel an Östrogenen führt bei vielen Frauen zu einem Fettverteilungstyp, wie er für das männliche Geschlecht typisch ist. So kommt es zu einem vermehrten Aufbau intraabdomineller Fettdepots. Parallel zur Fettanreicherung im viszeralen Bereich kommt es zu einer vergleichbaren Zunahme von Fettzellen im Knochen. Diese Fettverteilung, wirkt sich in ungünstiger Weise auf den Knochenstoffwechsel aus. Die vom Fettgewebe vermehrt ausgeschütteten Zytokine haben eine lipotoxische Wirkung auf die Knochenstruktur und fördern so die Entwicklung der Osteoporose (Hsu et al., 2006, Zillikens et al., 2010). Darüber hinaus entwickeln einige postmenopausale Frauen eine Dyslipidämie sowie eine Insulinresistenz. All diese Faktoren gehen nachgewiesenermaßen mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einher. Die Prävalenz dieser körperlichen Veränderungen, auch als metabolisches Syndrom bezeichnet, steigt unter Frauen in der Postmenopause erheblich an (Carr, 2003). Abzugrenzen davon ist die Tatsache, dass ein allgemein höherer Körperfettanteil im Sinne eines höheren Körpergewichts positive Auswirkungen auf altersbedingte körperliche Veränderungen wie beispielsweise den Verlust von Knochenmineralisierungsdichte hat, indem es einen endogenen Stimulus für Osteozyten und Osteoblasten darstellt (Huiskes et al., 2000; Seidlová-Wuttke et al., 2011). Andere Ursache dieser protektiven Wirkung ist die Tatsache, dass das vermehrte Fettgewebe über die dort vorhandene Aromatase in der Lage ist, zumindest einen Teil des Östrogenmangels auszugleichen (Blain et al., 2001).

1.6. Die Therapieansätze im Vergleich

1.6.1. Östrogene

Östrogene sind Steroide und gehören neben den Androgenen zur Gruppe der Sexualhormone. Das 17β Estradiol (E_2) ist das biologisch aktivste und somit

wichtigste Östrogen im Körper des Menschen. Seine Bildung findet in vielen Geweben des menschlichen Körpers über die Aromatase aus Testosteron statt (Ghosh et al 2009). Zu nennen sind neben den Gonaden, die mit Abstand den größten Anteil der Produktion übernehmen, auch die Plazenta, die Nebennierenrinde und in geringerem Umfang das Fett-, Muskel- und Nervengewebe (Zhao et al., 2005). Durch Sistieren der wichtigsten Quelle der Östrogene mit dem Klimakterium kommt es insbesondere bei der Frau zu den bereits erwähnten Mangelerscheinungen. Die kombinierte Östrogen- Gestagentherapie (HRT) hat lange Zeit eine wichtige Rolle in der Behandlung dieser Beschwerden gespielt, wird aber aufgrund der negativen Wirkungen auf das Mammagewebe und das kardiovaskuläre System (Rossouw et al., 2002; Beral, 2003) heute nicht mehr standardmäßig angewendet und es wird nach Alternativen gesucht. Einzig eine sogenannte *low dose HRT* in Kombination mit Gabe von Vitamin D und Kalzium wird heute noch prophylaktisch eingesetzt. Die Menge an verabreichten Östrogenen ist hier aber wesentlich geringer als bei der klassischen HRT (Recker et al., 1999)

1.6.2. *Cimicifuga racemosa*

1.6.2.1. *Cimicifuga racemosa* BNO 1055 und ihre Fraktionen

In den letzten Jahren hat die medizinische Wirkung von *Cimicifuga racemosa* immer mehr Interesse der Forschung hervorgerufen; zumal in der Therapie von gynäkologischen, insbesondere klimakterischen Beschwerden gewinnt die Pflanze zunehmend an Bedeutung (Jarry et al., 1985). In vergangenen Experimenten konnte bereits eindeutig belegt werden, dass der *Cimicifuga-racemosa*-Extrakt BNO 1055 seine Wirkung weder über den Östrogenrezeptor ER α noch über den ER β entfaltet. Folgerichtig konnte in mehreren klinischen Studien eine proliferationsfördernde Wirkung des Extrakts auf Uterus und Mammæ, anders als bei der klassischen HRT,

klar ausgeschlossen werden (Wuttke et al., 2003; Raus et al., 2006; Wuttke et al., 2006). Ein weiterer bereits erforschter positiver Aspekt des Extrakts ist neben seiner Linderung von vasomotorischen Beschwerden, den sogenannten *hot flashes* (Kapur et al., 2010 b), seine protektive Wirkung auf das Knochengewebe. In mehreren Arbeiten aus dieser Abteilung konnte gezeigt werden, dass die Wirkstoffe in CR BNO 1055 in der Lage sind, einem osteoporosebedingten Verlust von Knochenmasse entgegenzuwirken (Seidlová-Wuttke et al., 2003 b; Wuttke et al., 2003). In mehreren klinischen Studien zeigte sich darüber hinaus eine gute Verträglichkeit des Extrakts CR BNO 1055 ohne schädigenden Einfluss auf die Leber oder andere klinisch relevante Nebenwirkungen. Nichtsdestotrotz werfen die Pflanze und ihre Fraktionen immer noch eine Reihe von Fragen bezüglich ihrer Wirkungen auf. *Cimicifuga racemosa*, auch nordamerikanische Traubensilberkerze, Wilde Schlangenzwurz oder Wanzenkraut genannt, gehört zur Familie der Hahnenfußgewächse. Sie kann Wuchshöhen von bis zu 2,5 Metern erreichen. Aus dem Rhizom zum Überwintern und den Wurzeln setzt sich der Wurzelstock zusammen, jener Teil der Pflanze, aus dem die Wirkstoffe aus diesem Versuch (CR BNO 1055/C001, die Saponinfraktion, sowie die Restfraktion) gewonnen werden. Die genaue Zusammensetzung der untersuchten Fraktionen ist noch immer unbekannt, mittlerweile konnten jedoch einige Subfraktionen über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ausgemacht werden (Struck et al., 1997). So beinhaltet die Saponinfraktion als Hauptbestandteile die lipophilen Saponine, das Deoxyactein und das Actein. Die Restfraktion umfasst die wasserlöslichen Substanzen wie beispielsweise die Kaffeesäure, Zimtsäurederivate und Methylserotonin (Bionorica®, 2010).

1.6.2.2. *Cimicifuga racemosa* BNO 1055 und ihre Wirkung auf das Serotoninsystem

Nachdem in der Vergangenheit, wie bereits beschrieben, eine Östrogenrezeptor-vermittelte Wirkung in *Cimicifuga racemosa* BNO 1055 durch zahlreiche Versuche ausgeschlossen werden konnte (Jarry et al., 2003; Seidlová-Wuttke et al., 2003 b; Wuttke et al., 2006), hat in jüngeren Studien und Experimenten die Beeinflussung eines anderen Hormonsystems und seine Wirkung auf klimakterische Beschwerden an Bedeutung gewonnen. So konnte unter anderem von Burdette et al. im Jahre 2003 eine partialagonistische Wirkung von *Cimicifuga racemosa* an Serotoninrezeptoren nachgewiesen werden. In diesem Experiment mit ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratten zeigte sich nicht nur eine starke Bindungsfähigkeit, sondern auch Wirkungsinduktion, insbesondere an den Serotoninrezeptoren 5-HT_{1A} und 5-HT₇ durch Stoffe der Pflanze (Burdette et al., 2003). Das Hormon Serotonin oder 5-Hydroxytryptamin ist ein Aminosäurederivat und zeigt seine Wirkung in erster Linie über parakrine Sekretion. Neben seinen zahlreichen Effekten im Zentralnervensystem wurde nun auch eine Bedeutung von Serotonin im Knochengewebe bestätigt. So verfügen Osteoblasten und Osteozyten über funktionsfähige Serotoninrezeptoren und Transporter (Warden et al., 2005). Für klimakterische Frauen spielt das Serotonin folglich in zweierlei Hinsicht eine entscheidende Rolle. Zum einen ist das Serotonin nachgewiesenermaßen mitverantwortlich für die Temperaturregulation im Hypothalamus (Rossmannith und Ruebberdt, 2009). Kommt es infolge des klimakterisch bedingten Östrogenmangels zu den bereits erwähnten Hitzewallungen und Schweißausbrüchen, den sogenannten *hot flashes*, ist Serotonin in der Lage, diese Beschwerden zu lindern. Der genaue Mechanismus bzw. die Rolle des Serotonin ist gegenwärtig aber nur unzureichend erforscht. Es wird angenommen, dass die sinkenden Östrogenspiegel zu einer vermehrten Produktion und Aktivität von Serotonin führen, das dann die

Senkung der Kerntemperatur induziert (Stearns et al., 2002; Rybaczyk et al., 2005). Der Einsatz von selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern, sogenannten SSRI-Präparaten, wie beispielsweise das Fluoxetin, oder von selektiven Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmern, die dazu führen, dass das Serotonin länger im synaptischen Spalt verbleibt und dort seine Wirkung entfalten kann, sind momentan in präklinischer Erprobung und stellen eine mögliche Behandlungsoption dar (Deecher et al., 2007). Momentan finden diese Präparate in erster Linie in der Behandlung von Depressionen Anwendung.

Zweiter bedeutender Aspekt für die postmenopausale Frau ist die Tatsache, dass das Knochengewebe über Serotoninrezeptoren verfügt und es folgerichtig auch zu einer Beeinflussung des Knochenstoffwechsels durch dieses Hormon kommt. Funktionsfähige Serotoninrezeptoren im Knochengewebe konnten in den letzten Jahren in mehreren Versuchen eindeutig nachgewiesen werden (Westbroek et al., 2001; Warden et al., 2005; Haney und Warden, 2008). Wie genau das serotoninerge System auf den Knochenstoffwechsel einwirkt, ist immer noch nicht vollständig geklärt. So wird unter anderem angenommen, dass Serotonin eine Aktivitätsminderung der Osteoblasten induziert und somit einen Verlust von Knochenmasse herbeiführt (Bab und Yirmiya, 2010). Andere Studien hingegen sprechen dem Serotoninsystem eine Wirkung auf die Regulation der Mechanosensibilität des Knochengewebes zu (Westbroek et al., 2001). Auf diesen Aspekt wird zu einem späteren Zeitpunkt noch genauer eingegangen.

1.7. Zielsetzung

Die Untersuchung der antiosteoporotischen Prinzipien in *Cimicifuga racemosa* BNO 1055/C001 und ihren Subfraktionen in der ovx Sprague-Dawley-Ratte ist Inhalt dieser Dissertation. Diese Arbeit ist Teil des Forschungsprojekts AZ-838-08 „Osteoporoseprophylaxe mit pflanzlichen Wirkstoffen“ der bayerischen Forschungsstiftung.

Wir haben die ovx Ratte für unsere Versuche gewählt, da sie ein anerkanntes Modell für die klimakterische Frau darstellt. Durch Ovx kommt es bei Ratten, ebenso wie bei Frauen in der Menopause, zu den typischen klimakterischen Veränderungen wie einem Verlust von Knochengewebe, vasomotorischen Beschwerden wie den sogenannten *hot flashes* sowie einer Atrophie der östrogenabhängigen Gewebe. Die eingesetzten Substanzen sollten nach ihrer Wirkung auf den Knochen sowie auf das Muskel- und Fettgewebe untersucht werden. Darüber hinaus sollte eine mögliche Abhängigkeit in der Entwicklung der von uns untersuchten Gewebe zueinander aufgedeckt werden. Grundlage war hier unter anderem die Annahme, dass eine Mehranreicherung von Fettgewebe nach Ovx möglicherweise einen negativen Einfluss im Sinne eines „lipotoxischen Effekts“ auf Muskulatur und Knochendichte haben könnte (Hsu et al., 2006; Zillikens et al., 2010). Zu diesem Zwecke wurden vor und nach vierwöchiger Verabfolgung der Substanzen Knochenvolumenmineraldichtemessungen der tibialen Metaphyse mit dem qCT durchgeführt. Die Ergebnisse von Knochen-, Muskulatur und Fettgewebe wurden im Anschluss in Bezug auf Dichte, Fläche und Anteil der Gewebe ausgewertet. Die Dichte des endostealen Gewebes diente als Grundlage für eine völlig neue Definition der Osteoporose der Ratte. Basierend auf einem neu festgelegten T-Score konnten unsere Messungen und Ergebnisse objektiviert werden.

Durch den völlig neuen Ansatz der Unterteilung des Gesamtextrakts in seine Subfraktionen besteht die Möglichkeit, die verschiedenen Wirkungen den einzelnen Bestandteilen genauer zuzuordnen. Dies könnte in naher Zukunft eine Perspektive zur gezielteren Behandlung klimakterischer Beschwerden, seien sie osteoporosebedingter, vegetativer oder psychischer Natur, aufzeigen.

2. Material und Methoden

2.1. Tierversuche

2.1.1. Versuchstiere

Für die Tierversuche unter der Aufsicht von Priv.– Doz. Dr. med D. Seidlová–Wuttke wurden 40 Sprague-Dawley-Ratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln) in acht Käfigen (Makrolon®-Käfig Typ IV, Firma Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg) zu jeweils fünf Tieren gehalten. Die Tiere waren bei Ankunft im Labor etwa drei Monate alt. Die Haltung in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen fand unter Genehmigung der Bezirksregierung Braunschweig 33.11.42504-04-043/08 statt. Die Tiere waren bei konstanter Raumtemperatur von 23 °Celsius, einer relativen Luftfeuchtigkeit im Bereich zwischen 50 und 55% sowie mit Beleuchtung von 6.00 – 18.00 Uhr untergebracht. Bei Versuchsbeginn hatten alle Ratten ein Gewicht zwischen 245 und 295 g. Den Tieren stand Wasser sowie entsprechendes Futter zur freien Verfügung. Um die einzelnen Gruppen und ihren Gewichtszuwachs bzw. Zuwachs an Gewebe pro Gramm Körpergewicht vergleichbar zu machen, wurden einzelne Tiere vor Verabfolgung der verschiedenen Substanzen in den Käfigen ausgetauscht. So bildete das relativ ausgeglichene Körpergewicht unter den einzelnen Gruppen einen Referenzwert an dem dann die späteren Entwicklungen gemessen werden konnten.

2.1.2. Ablauf der Knochenvolumenmineraldichtemessung

Vor der Ovx sowie nach Ovx und anschließender vierwöchiger Applikation der getesteten Substanzen wurden Knochenvolumenmineraldichtemessungen mit einem quantitativen Computertomographen (Norland Stratec XCT Research SA+, Firma Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim) an den Versuchstieren durchgeführt. Die Ratten erhielten eine Isoflurannarkose (Forene®, Abbott, Illinois, USA), wurden

anschließend gewogen und erhielten zwecks späterer Identifizierung einen Transponder (Transponder-UNO MICRO-ID-System mit ISO-Transponder, Firma Uno-Roesvastaal BV, Zevenaar, Niederlande) subkutan in die Nackenregion implantiert. Zur Zuordnung der jeweiligen Nummer konnte ein elektronisches Lesegerät (Gesreader II GeS008: ISO-kompatibler Taschenleser) verwendet werden. Nachdem die Versuchstiere vorbereitet waren, wurden sie in eine spezielle Vorrichtung gelegt und das linke Bein mit einer Klemme fixiert. So konnte sichergestellt werden, dass die Knochenmineraldichte eines jeden Tieres exakt an der gleichen Stelle der tibialen Metaphyse gemessen wurde. Dann konnte die eigentliche Messung starten, die pro Tier insgesamt etwa 15 Minuten dauerte. Nach Beendigung der Messung wurden die Ratten aus der Vorrichtung gelöst und zum Aufwachen in einen zweiten Käfig gesetzt. Das zugrunde liegende Prinzip der qCT - Messungen wurde in anderen Arbeiten bereits mehrfach beschrieben. Dennoch wird im Abschnitt 2.2.1. ein kurzer theoretischer Überblick gegeben. Die von uns, anhand aller in der Abteilung durchgeführten Knochenvolumenmineraldichtemessungen zwischen 1999 und 2011, gewonnenen Ergebnisse sind Grundlage einer völlig neuen Definition des T-Scores für die Ratte. Diese Definition basiert auf den Mittelwerten der endostealen Dichte und ihren Standardabweichungen.

2.1.3. Ovariectomie

Unter Isoflurannarkose (Forene®, Abbott, Illinois, USA) und postoperativer Analgesie mit Rimadyl® (Pfizer GmbH, Karlsruhe) wurden die Ratten im Anschluss an die qCT – Messungen beidseitig ovx. Nach einer bilateralen Rasur des Abdomen wurde die Haut in diesem Bereich inzidiert und anschließend die Bauchhöhle eröffnet. Nach Verlagerung des Uterus und der Adnexe nach Außen wurden die Ovarien mit einer

Klemme unterbunden und entfernt. Anschließend wurde der Uterus in die Bauchhöhle zurückverlagert und die Wunde verschlossen. Hierfür wurden Muskulatur und Peritoneum gemeinsam vernäht (Vicryl®, Firma Ethicon, Norderstedt) und die Haut im Folgenden mit Michel-Klammern® (Firma Martin, Tuttlingen) verschlossen. Zur Beobachtung, bis die Tiere wieder aus der Narkose erwacht waren, wurden sie in einen zweiten Käfig gelegt. Nachdem sichergestellt war, dass die Wunden nicht nachbluteten, wurden die Ratten zurück in ihre jeweiligen Käfige gesetzt.

2.1.4. Applikation der Wirkstoffe

In ihrer Eingewöhnungsphase erhielten die Tiere sojafreies Futter und wurden dann zwei Wochen vor Versuchsbeginn auf das ebenfalls sojafreie Kontrollfutter EF R/M, E 150000-04 (ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest) umgestellt. Die getesteten Substanzen wurden den Versuchstieren mit Versuchsbeginn per Futter in EF R/M Basisfutter zur freien Verfügung verabreicht (ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest). Die Ratten wurden nach erfolgter Knochendichtemessung und Ovarrektomie in vier Gruppen á zehn Tiere unterteilt, wobei die fünf Tiere eines jeden Käfigs über ein etwa gleiches mittleres Gewicht verfügten. Über einen Zeitraum von vier Wochen wurden sie dann mit dem speziellen Extrakt aus *Cimicifuga racemosa* CR BNO 1055/C001, bzw. seinen Fraktionen per Futter behandelt:

- EF R/M Kontrolle
- CR BNO 1055/C001, 500 mg/kg Futter (Charge Nr. 690 253)
- Saponinfraktion 117,6 mg/kg Futter
- Restfraktion 382,35 mg/kg Futter.

In den Wochen des Versuchs wurde jeweils nach sieben Tagen vormittags die Menge an gefressenem Futter bestimmt. So konnte die mittlere Futtermengeaufnahme und damit auch die mittlere Aufnahme der jeweiligen Substanz pro Tier und Tag ermittelt werden. Genaue Angaben sind Tabelle 5. zu entnehmen.

Tabelle 5. Mittlere Futtermengeaufnahme eines Tieres pro Tag in Gramm und die damit aufgenommene Substanz in Milligramm.		
Testsubstanz	Futtermenge (g/Tier/Tag)	Substanzmenge(mg/Tier/Tag)
EF R/M Kontrolle	17,00	0,00
CR BNO 1055/C001	16,45	8,22
Saponinfraktion	17,42	2,05
Restfraktion	18,49	7,07

2.1.5. Obduktion

Nach vierwöchiger Applikation der Wirkstoffe und anschließender erneuter Knochenvolumenmineraldichtemessung der Tibia im qCT wurden die Versuchstiere an zwei Vormittagen jeweils zwischen 8.30 und 12.00 Uhr obduziert. Die Tiere wurden randomisiert und einzeln, nach erfolgter Identifizierung über den Transponder, in den Obduktionsraum gebracht. Dort wurden sie mittels CO₂ in Narkose versetzt. Anschließend wurden die Ratten enthauptet und das Blut aufgefangen. Aus dem gewonnenen Blut wurden im späteren Verlauf verschiedene Serumparameter bestimmt. Außerdem wurde eine Vielzahl von Organen zur histologischen Aufarbeitung für andere Arbeiten entnommen. So konnte fast jedes Gewebe der getöteten Tiere für spätere Forschungszwecke genutzt werden. Für die vorliegende Arbeit fanden die Serumparameter Osteokalzin und die CrossLaps sowie das tibiale Knochengewebe und das Fett- und Muskelgewebe Verwendung.

2.2. Auswertung

2.2.1. Ermittelte Parameter

Das grundlegende Prinzip der Knochenvolumenmineraldichtemessung mit dem qCT wurde in zahlreichen Publikationen der Abteilung bereits ausführlich beschrieben (Seidlová-Wuttke et al., 2010 b). Dennoch soll hier ein kurzer Überblick geschaffen werden.

Die Messungen der Tibia mit dem qCT wurden jeweils in drei spezifischen Ebenen (im Abstand 3.75, 4.25 und 15mm distal vom Referenzpunkt) durchgeführt. Die ersten beiden Ebenen dienten dabei der Auswertung des trabekulären Knochens sowie der Auswertung von Muskulatur und Fettgewebe. Die dritte Ebene im Abstand von 15mm wurde zur Auswertung der Kortikalis herangezogen. Nachdem die qCT - Messungen im ersten Durchgang vor der Ovariectomie bzw. im zweiten Durchgang nach Versuchsablauf abgeschlossen waren, konnten die ermittelten Daten mit Hilfe eines dazugehörigen Computerprogramms (XCT5,40; Stratec, Pforzheim) ausgewertet werden und so die für diese Arbeit entscheidenden Parameter bestimmt werden. Abbildung 1. im Anhang gibt einen Überblick. Die ermittelten Parameter sind die endosteale Dichte (ED), definiert als die Dichte des Trabekelgeflechts innerhalb des endostealen Raumes (Spongiosa) in mg/cm^3 und die Intraosteale Fläche (IF), also die Querschnittsfläche des endostealen von Kortikalis umschlossenen Raumes (Spongiosa). Ihre Fläche wird in mm^2 angegeben. Die kortikale Dichte (KD) ist die Dichte des die Spongiosa umgebenden Knochenmantels, angegeben in mg/cm^3 . Die kortikale Fläche (KF) ist die Querschnittsfläche des umgebenden Knochenmantels. Sie wird in mm^2 angegeben. Neben diesen Parametern findet noch die intraosteale bzw. die periosteale Zirkumferenz, also der jeweilige Umfang des intraostealen, bzw. periostealen Gewebes in mm Verwendung. Die Fläche des paratibialen Fettdepots ist der gesamte Querschnitt der Metaphyse, abzüglich der knöchernen Strukturen

und der Muskulatur. Die Dichte der Muskulatur ist bis heute leider nur unzureichend definiert. In dieser Arbeit legen wir sie als röntgenologische Dichte, abhängig von der Menge an Elastinfasern pro Fläche (in mg/cm^3) im Muskel fest. Die Muskelfläche ergibt sich aus dem gesamten tibialen Querschnitt abzüglich der knöchernen Strukturen und des Fettgewebes. Sie wird ebenfalls in mm^2 angegeben.

Gewebe, die in der Auswertung eine Dichte von $40 \text{ mg}/\text{cm}^3$ und weniger aufwiesen, wurden als Fettgewebe definiert. Eine Dichte zwischen 40 und $99 \text{ mg}/\text{cm}^3$ sprach für das Vorliegen von Muskulatur. Gewebe mit einer Dichte zwischen 280 und $400 \text{ mg}/\text{cm}^3$ wurde als trabekuläres Knochengewebe festgelegt. In der dritten Ebene wurde noch das kortikale Knochengewebe ausgewertet. Seine Dichte lag im Bereich oberhalb von $710 \text{ mg}/\text{cm}^3$.

2.2.2. Serumdiagnostik

Aus dem nach Dekapitation der Versuchstiere gewonnenen Blut wurden eine Vielzahl von Serumparametern bestimmt. Für diesen Versuch von Bedeutung waren insbesondere die Konzentrationen von Osteokalzin und von CrossLaps. Diese Parameter wurden anhand von standardisierten Radioimmunfluoreszenzanalyse (RIA)-Kits ermittelt. Ferner fand auch das Serum Leptin in dieser Arbeit Verwendung. Da keine Tötung der Tiere zur ausschließlichen Gewinnung und Analyse von Serum durchgeführt wurde, existieren keine Vergleichswerte von Versuchstieren vor Ovx und Wirkstoffapplikation.

2.2.3. Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung wurden die im quantitativen Computertomographen ermittelten Werte in die Computersoftware PRISM® (GraphPadPrism 5.0, San Diego, USA) übertragen. Mit dieser Software wurden Graphen zu den Ergebnissen

erstellt und statistische Werte berechnet. Die Auswertung erfolgte durch Anwendung einer Varianzanalyse für wiederholte Messung eines Faktors (ANOVA) und anschließendem multiplen Vergleichstest nach Dunnett. Hierbei wurden die einzelnen Gruppen mit der Kontrollgruppe verglichen. Darüber hinaus wurde ein ungepaarter T-Test zum gezielten Vergleich der Mittelwerte der Kontrollgruppe mit einer zweiten Gruppe genutzt. Das Signifikanzniveau wurde stets auf $P < 0,05$ festgelegt. Korrelierte Werte basieren auf linearen Regressionsanalysen.

3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Wirkung von *Cimicifuga racemosa* BNO 1055/C001 und ihren Fraktionen auf Knochen-, Muskel- und Fettgewebe. Zu diesem Zwecke wurden Knochenvolumenmineraldichtemessungen mit dem qCT von ovx Sprague-Dawley-Ratten ausgewertet. Besonderes Augenmerk lag dabei auf den antiosteoporotischen Prinzipien der eingesetzten Wirkstoffe. Auf die Ergebnisse dieser Untersuchungen soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

3.1. Futteraufnahme und Körpergewicht

In der Abbildung 2. sind die durchschnittlichen Körpergewichte der jeweiligen Versuchsgruppen nach vierwöchiger Futteraufnahme dargestellt. Mit Schwankungen zwischen 351 und 357g im Mittel bestand kein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

Der durchschnittliche Gewichtszuwachs war dabei nicht proportional zu der durchschnittlichen Futteraufnahme (g/Tier/Tag) der einzelnen Gruppen. Zwar haben die Tiere der Restfraktion am meisten gefressen, die Tiere der Kontrollgruppe aber verzeichneten den größten Gewichtszuwachs.

Körpergewichte Präovx vs. ovx in CR und ihren Fraktionen

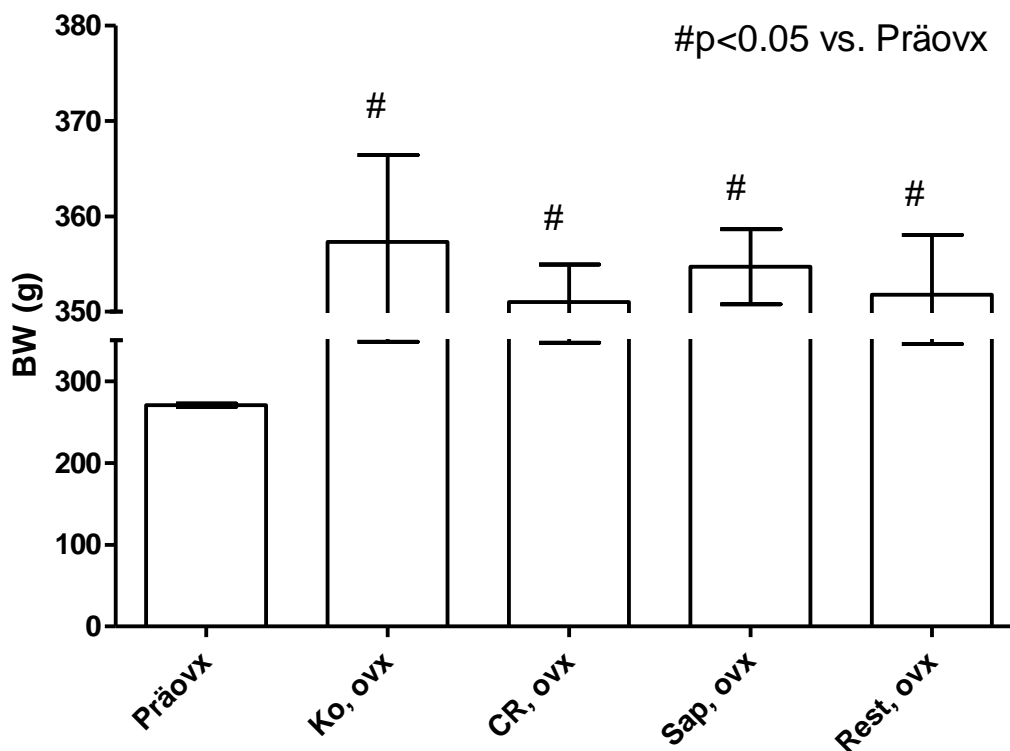


Abbildung 2. Die mittleren Körpergewichte aller Tiere vor Versuchsbeginn und nach Versuchsablauf in den jeweiligen Gruppen.

3.2. Knochengewebe

Zur Analyse des Knochengewebes wurden eine Reihe von Werten aus dem qCT sowie Serumparameter hinzugezogen.

3.2.1. Endosteale Dichte

Insgesamt hat die endosteale Dichte in allen Gruppen nach Ovx abgenommen. Bei der Kontrollgruppe mit einem Dichteverlust von 41% war der Unterschied zu den intakten Tieren am größten. Wie die Abbildung verdeutlicht, haben alle Tiere nach den vier Wochen per Definitionem eine Osteoporose entwickelt. Die Tabelle 2. im Anhang verdeutlicht dies.

Die Tiere in der Gruppe der Saponinfraktion zeigten eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere endosteale Dichte. Sowohl die CR-BNO-1055/C001-Tiere, als auch die Restfraktionstiere zeigen in Abbildung 3. zwar ebenfalls einen geringeren Verlust der endostealen Dichte als die Kontrolltiere, jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant.

**Der Effekt von CR und ihren Fraktionen
(4 Wochen per Futter bei ovx S.D. Ratte) auf:
endosteale Dichte in der Metaphyse der Tibia**

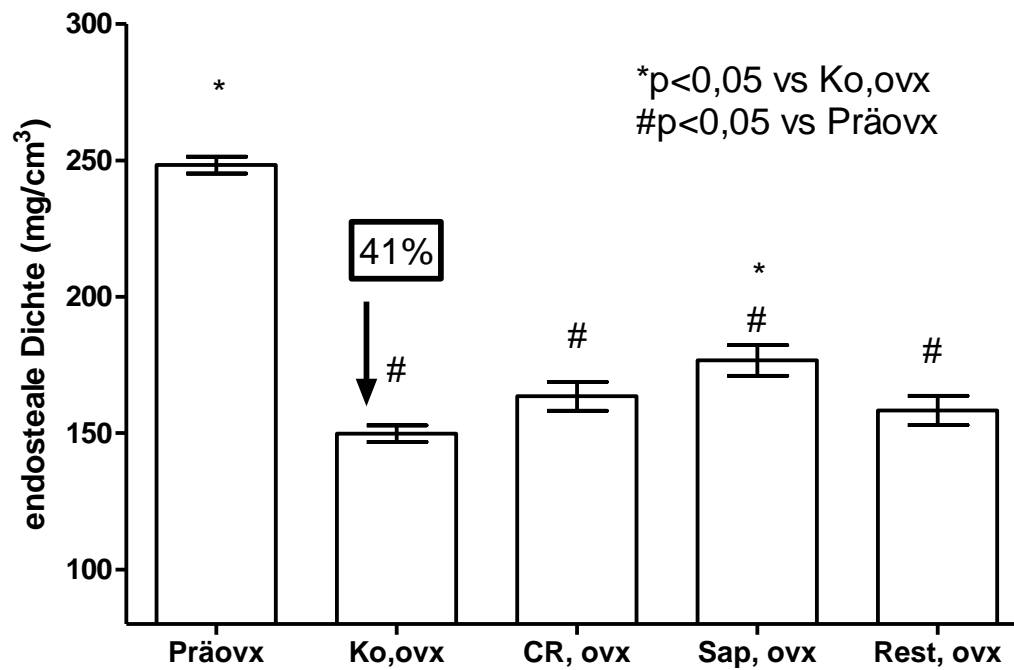


Abbildung 3. Endosteale Dichte in der tibialen Metaphyse von ovx Sprague- Dawley-Ratten. Verglichen mit den intakten Tieren entsteht bei den Kontrolltieren nach Ovx ein Dichteverlust von mehr als 41%. Bei den Tieren der Saponinfraktion ist dieser Dichteverlust signifikant kleiner.

3.2.2. Intraosteale Fläche

Die verschiedenen Substanzen lösten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Fläche des intraostealen Gewebes aus. Tendenziell war allerdings zu erkennen, dass die Tiere der CR-BNO-1055/C001-Gruppe die höchsten und die Tiere der Restfraktion die niedrigsten Werte verzeichneten. Abbildung 4. verdeutlicht dies.

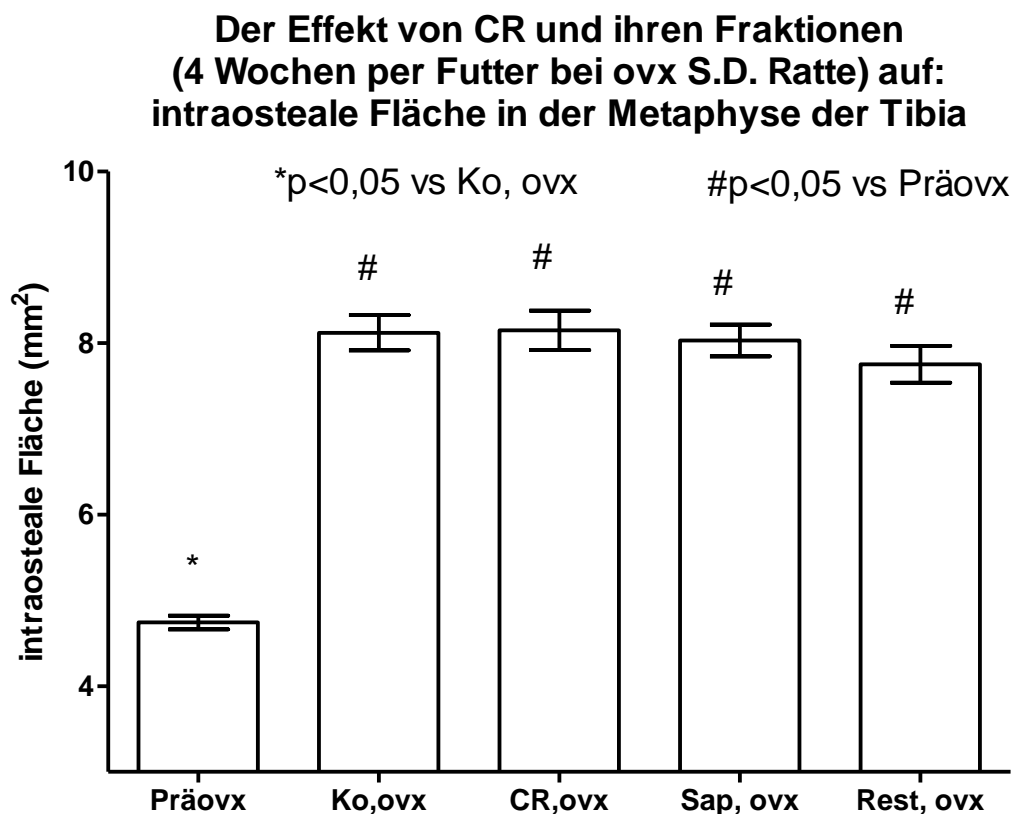


Abbildung 4. Intraosteale Fläche in der tibialen Metaphyse von ovx Sprague-Dawley-Ratten. Die Fläche nimmt bei allen Tieren nach OvX signifikant an Größe zu.

3.2.3. Intraosteale und periosteale Zirkumferenz

Sowohl in Bezug auf den Umfang des Intraosteum als auch in Bezug auf den des Periosteum erreichten die Wirkungen der verschiedenen Substanzen verglichen mit der Kontrollgruppe kein Signifikanzniveau. Wie die Abbildung 5. und 6. deutlich machen, zeigten, verglichen mit den intakten Tieren, alle Gruppen sowohl signifikant höhere Umfänge des intraostealen Raumes als auch signifikant höhere periosteale Werte.

**Der Effekt von CR und ihren Fraktionen
(4 Wochen per Futter bei ovx S.D. Ratte) auf:
intraosteale Zirkumferenz in der Metaphyse der Tibia**

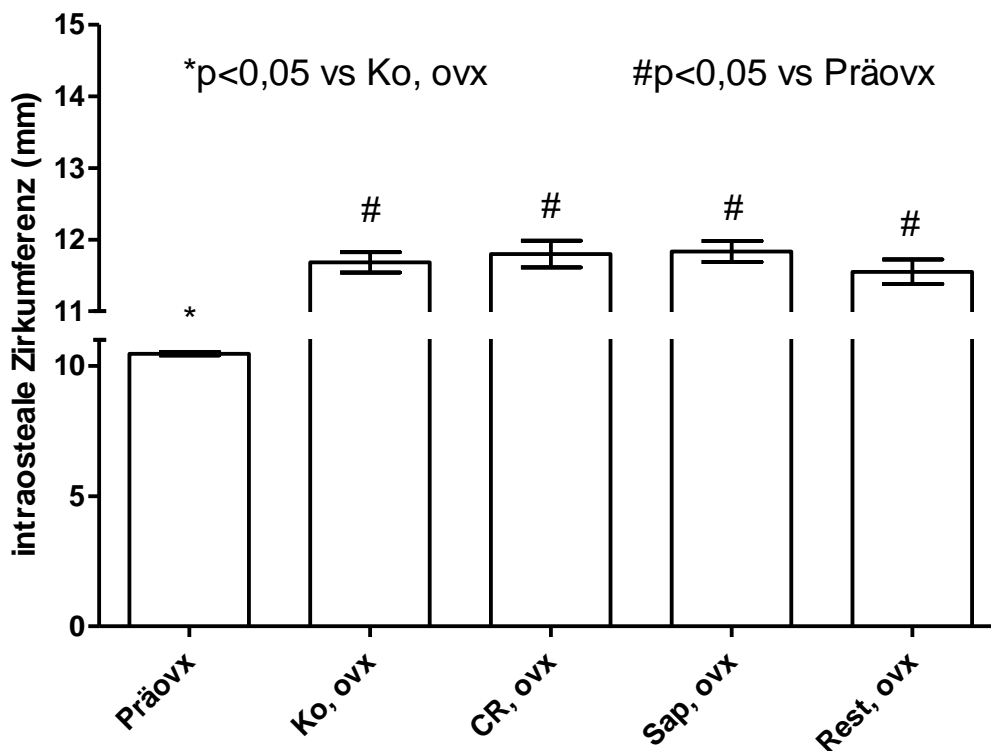


Abbildung 5. Umfang des Intraosteums der tibialen Metaphyse von ovx Sprague-Dawley-Ratten. Der Umfang vergrößerte sich in allen Gruppen nach Ovx signifikant. Die verschiedenen Substanzen zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede in ihrer Wirkung auf die intraosteale Zirkumferenz.

**Der Effekt von CR und ihren Fraktionen
(4 Wochen per Futter bei ovx S.D. Ratte) auf:
periosteale Zirkumferenz in der Metaphyse der Tibia**

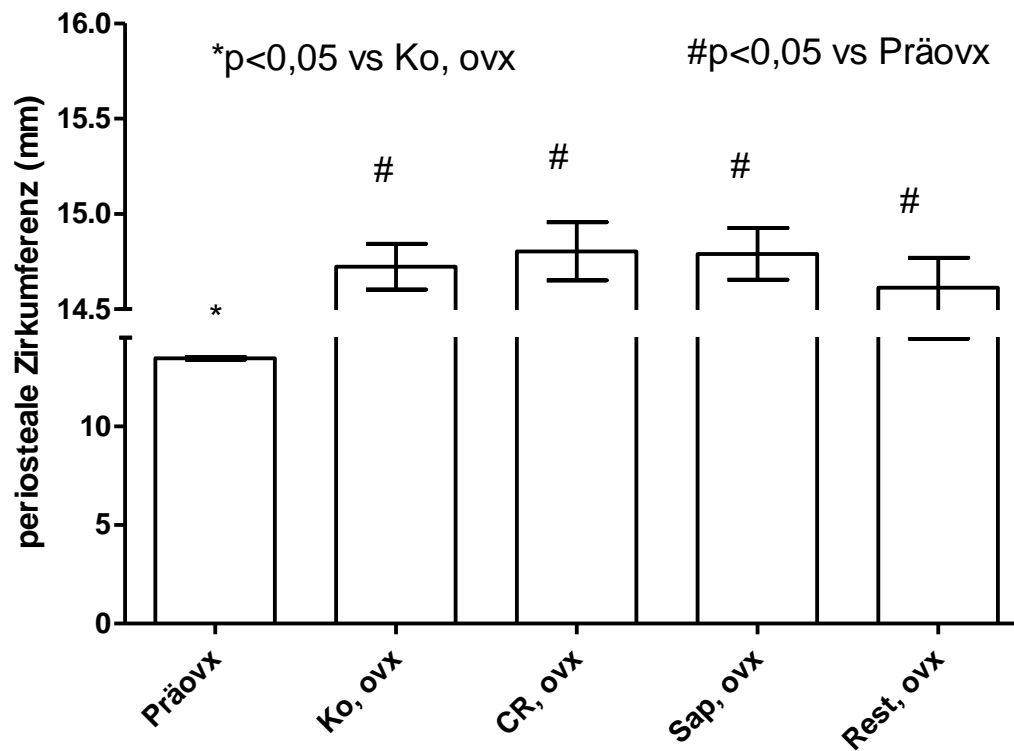


Abbildung 6. Umfang des Periosteums der tibialen Metaphyse von ovx Sprague-Dawley-Ratten. Der Umfang vergrößerte sich in allen Gruppen nach Ovx signifikant. Die verschiedenen Substanzen zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede in ihrer Wirkung auf die periosteale Zirkumferenz.

3.2.4. Kortikale Dichte

In allen Gruppen hat die KD nach Ovarektomie zugenommen.

Verglichen mit der Kontrollgruppe zeigten die Resultate der Bestimmung der kortikalen Dichte nur Tendenzen, jedoch keine signifikanten Unterschiede. In Abbildung 7. werden diese Ergebnisse deutlich.

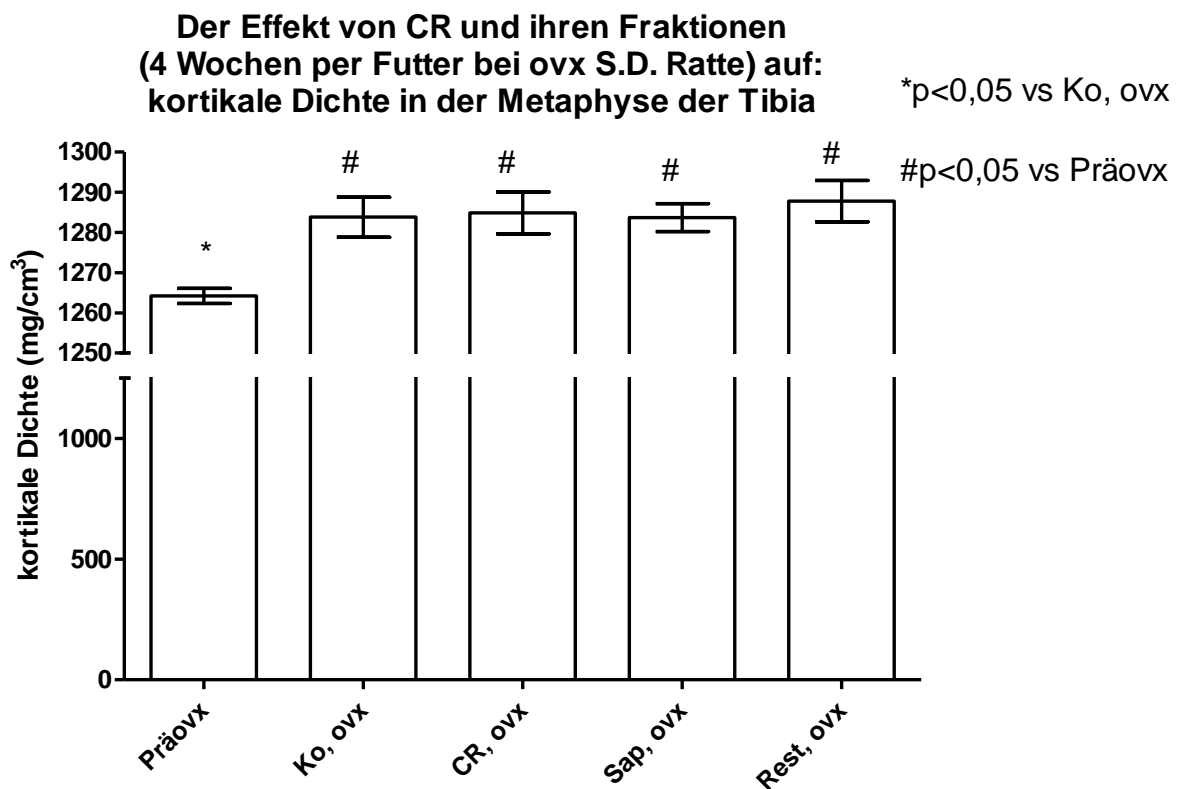


Abbildung 7. Kortikale Dichte in der tibialen Metaphyse von ovx Sprague-Dawley-Ratten. Alle Gruppen nahmen nach Ovx signifikant an Dichte zu. Die verschiedenen Substanzen zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede in ihrer Wirkung auf die KD.

3.2.5. Kortikale Fläche

In allen Gruppen hat sich die KF im Verlauf der vier Wochen nach Ovx und Wirkstoffapplikation vergrößert.

In Abbildung 8. wird im Vergleich mit der Kontrollgruppe deutlich, dass die Wirkung der Restfraktion zu einer signifikant kleineren Fläche der Kortikalis führte. Die Werte in den anderen Gruppen waren verglichen mit den Werten der Kontrolltiere ebenfalls verringert, jedoch erreichten sie kein Signifikanzniveau.

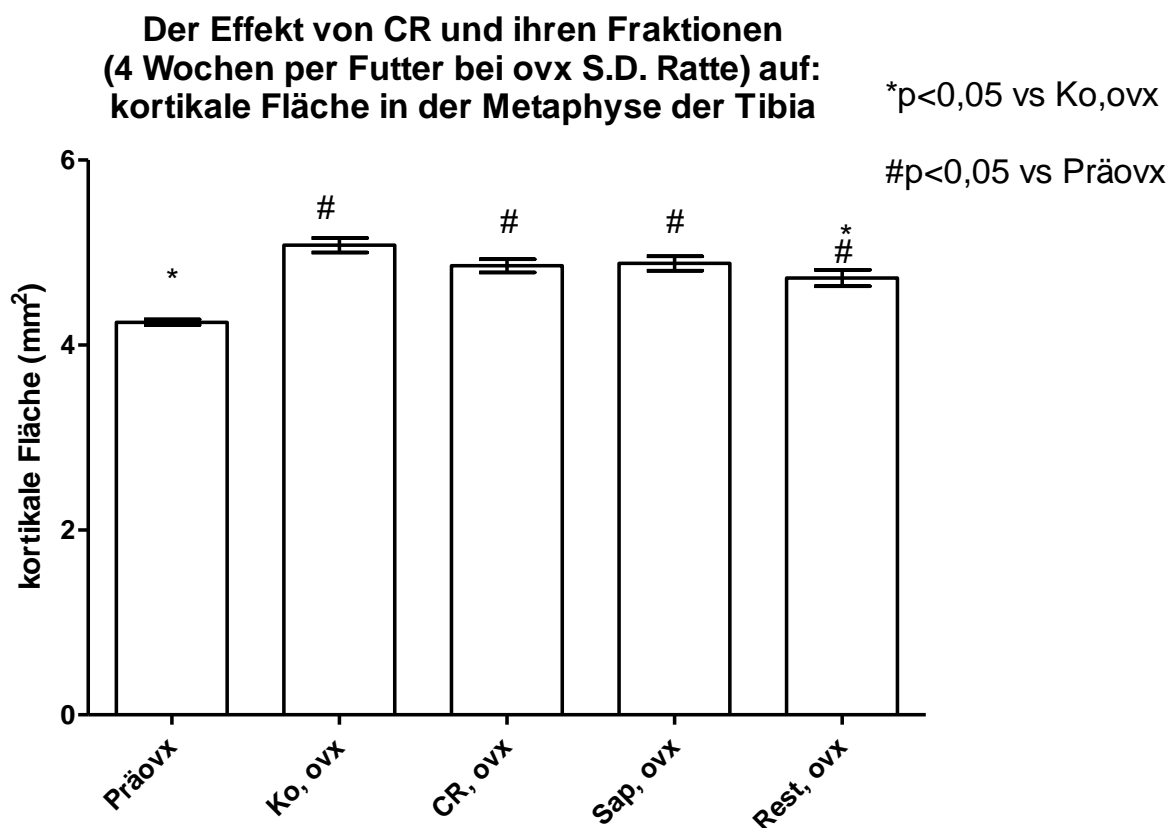


Abbildung 8. Kortikale Fläche in der tibialen Metaphyse von ovx Sprague-Dawley-Ratten. Alle Gruppen nahmen nach Ovx signifikant an Fläche zu. Allein die Restfraktion zeigte auch im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikant kleinere KF.

3.2.6. Serum Osteokalzin

Das Serum Osteokalzin zeigte unterschiedliche Werte in den einzelnen Gruppen. Verglichen mit der Kontrollgruppe, waren diese Unterschiede in der Gruppe der Saponinfraktion signifikant höher. Die Restfraktionsgruppe tendierte zu den kleinsten Werten. Abbildung 9. verdeutlicht dies.

Korrelierte man die Werte der endostealen Dichte aller Gruppen mit den Werten für Osteokalzin, so zeigte sich eine signifikante Regressionsgerade. Je höher das Osteokalzin, desto höher war somit die endosteale Dichte. Abbildung 10. verdeutlicht dies.

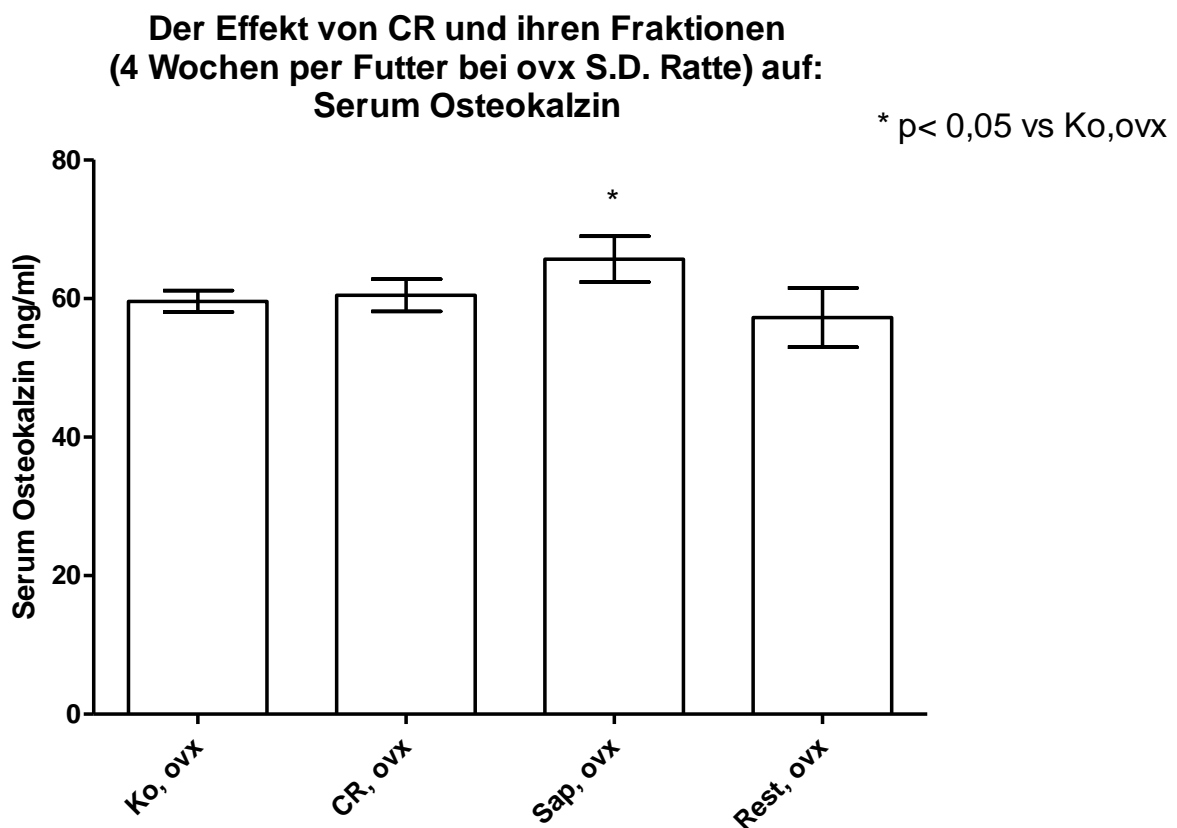


Abbildung 9. Serum Osteokalzin nach vierwöchiger Verabfolgung verschiedener Substanzen aus *Cimicifuga racemosa* BNO 1055/C001. Allein bei der Saponinfraktion konnte, verglichen mit den Kontrolltieren, eine signifikant höhere Osteokalzin Konzentration im Serum nachgewiesen werden.

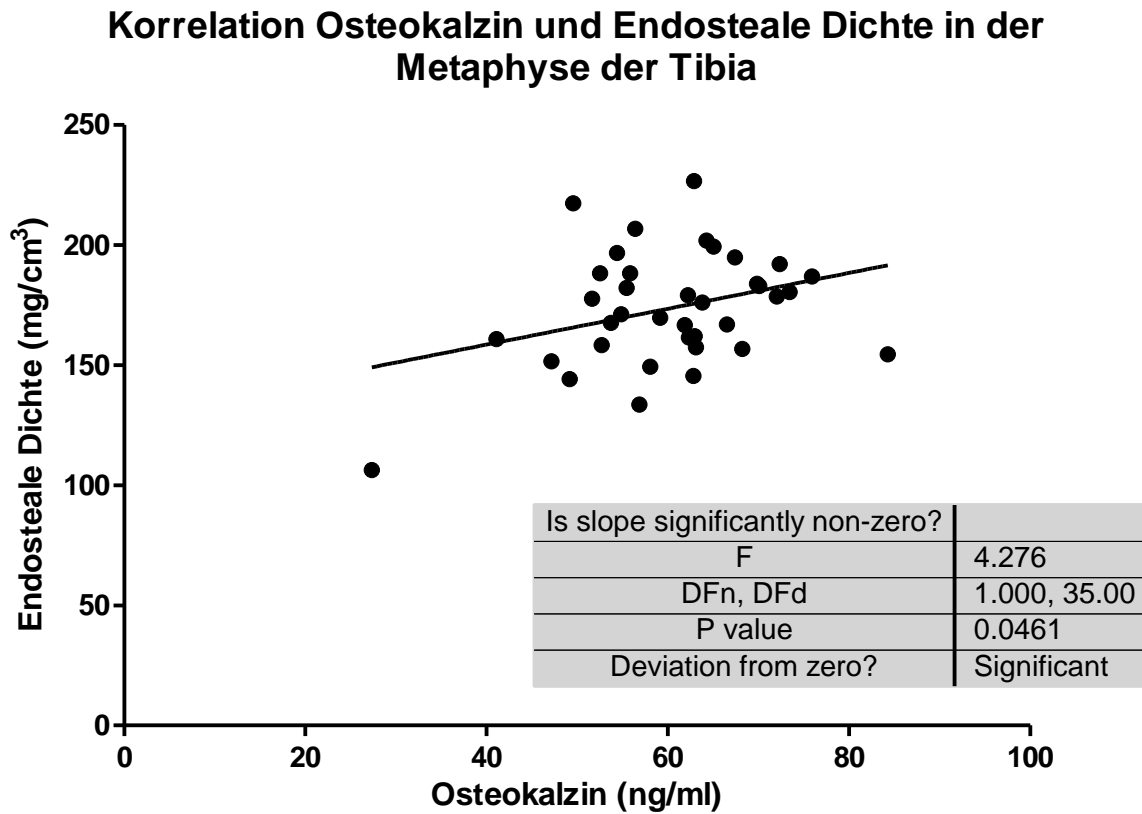


Abbildung 10. Korrelation der endostealen Dichte in der tibialen Metaphyse von ovx Sprague-Dawley-Ratten mit dem Serumosteokalzin nach vierwöchiger Verabfolgung der Substanzen aus *Cimicifuga racemosa* BNO 1055/C001. Es besteht ein signifikanter linearer Zusammenhang.

3.2.7. Serum CrossLaps

Die Substanz CR BNO 1055/C001 und die Restfraktion erreichten in ihrer Wirkung auf die Serum CrossLaps verglichen mit der Kontrollgruppe kein Signifikanzniveau. Tendenziell zeigten die Kontrollgruppe sowie die Restfraktion die höchsten Werte gefolgt von CR BNO 1055/C001. Die Saponinfraktion hatte signifikant niedrigere Werte als die Kontrollgruppe zu verzeichnen. Abbildung 11. verdeutlicht dies.

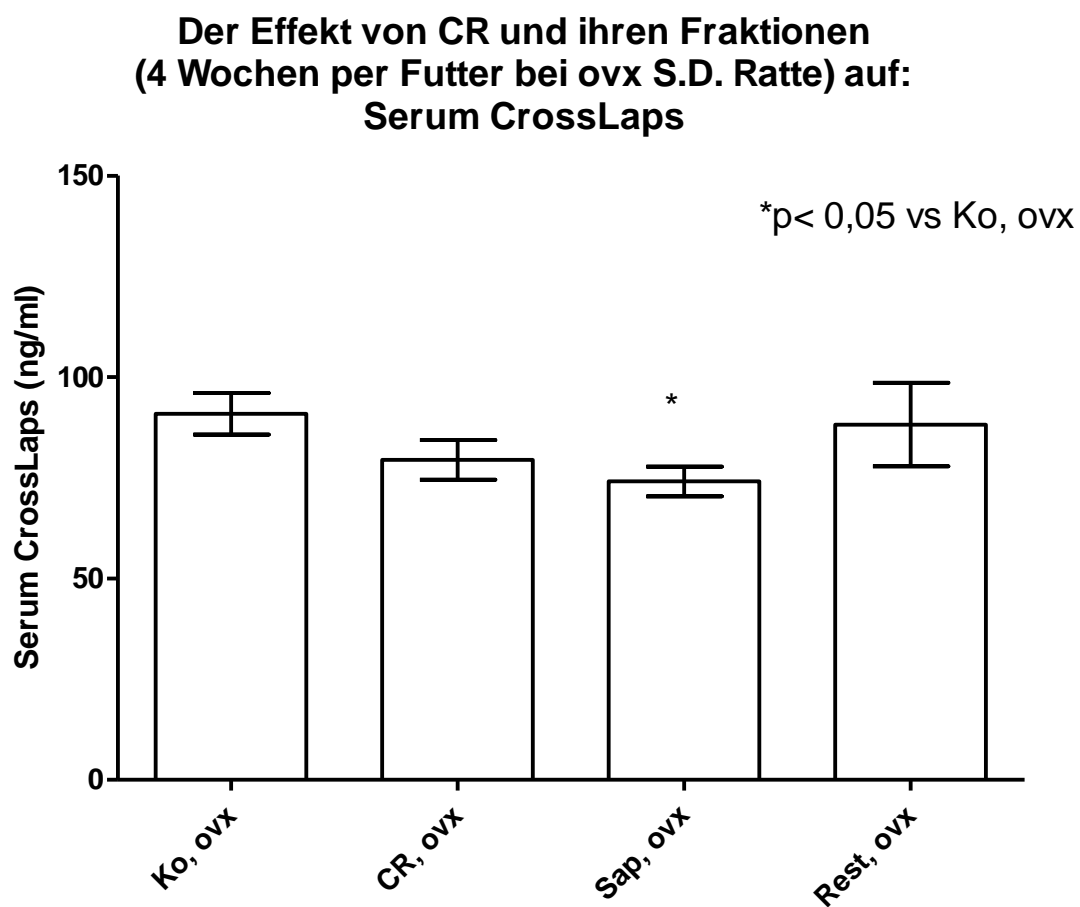


Abbildung 11. Serum CrossLaps nach vierwöchiger Verabfolgung verschiedener Substanzen aus *Cimicifuga racemosa* BNO 1055/C001. Allein bei der Saponinfraktion konnte, verglichen mit den Kontrolltieren, eine signifikant kleinere CrossLaps Konzentration im Serum nachgewiesen werden.

3.3. Muskulatur

3.3.1. Muskeldichte

Wie Abbildung 12. deutlich macht, zeigte die Muskeldichte zwischen den einzelnen Gruppen starke Unterschiede. Die CR-BNO-1055/C001-Tiere hatten verglichen mit der Kontrollgruppe eine signifikant kleinere Muskeldichte, die Tiere der Saponinfraktion tendenziell die größte Muskeldichte. Abbildung 13. stellt die Korrelation des Körpergewichts mit der Muskeldichte aller Gruppen dar. Die lineare Regressionsanalyse zeigte hier keine Signifikanz.

Der Effekt von CR und ihren Fraktionen (4 Wochen per Futter bei ovx S.D. Ratte) auf: Muskeldichte

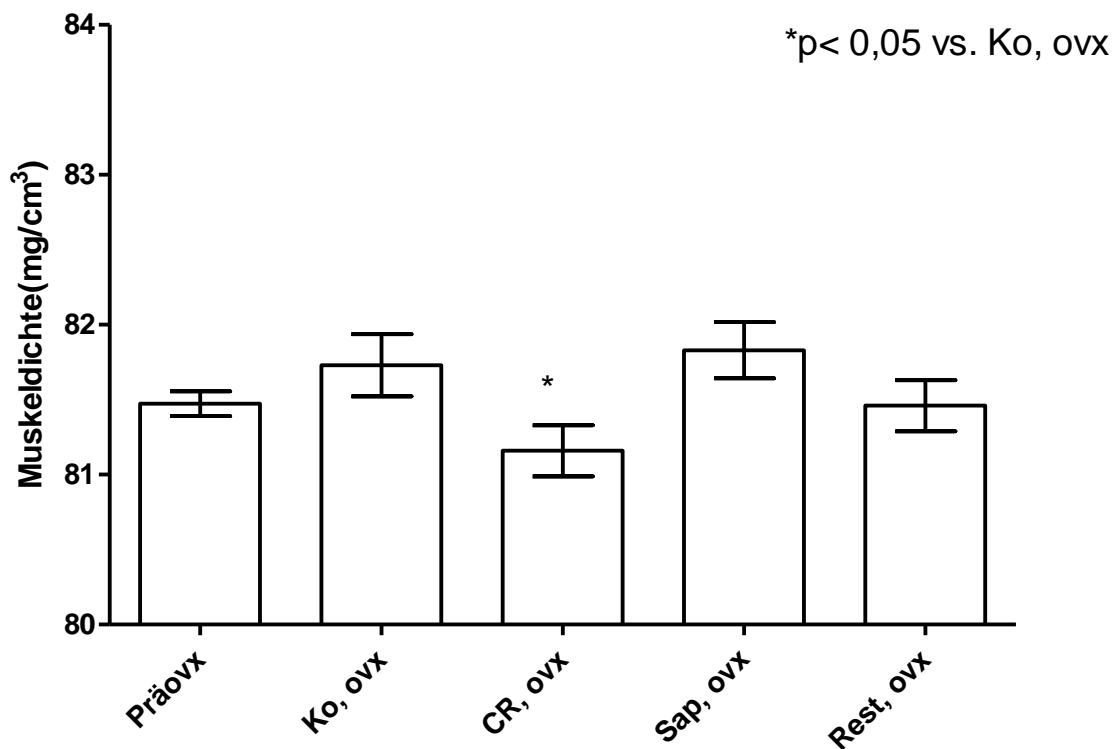
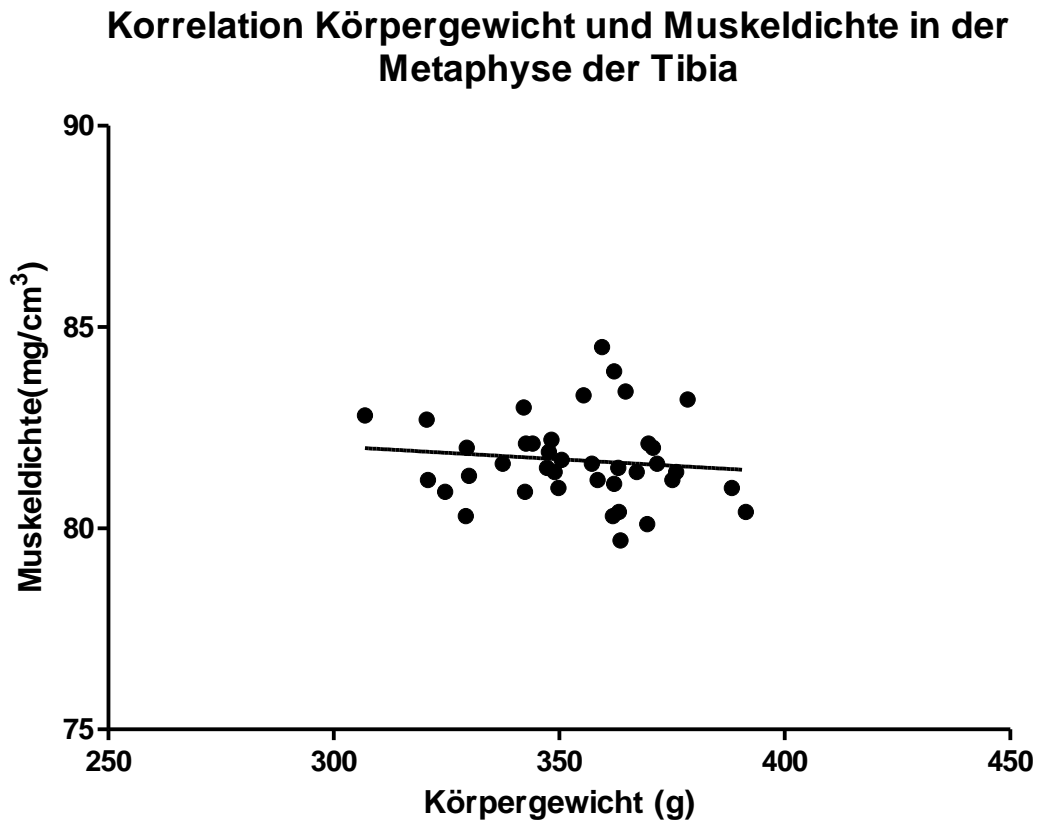


Abbildung 12. Dichte der Muskulatur in der tibialen Metaphyse von ovx Sprague-Dawley-Ratten. Verglichen mit den Kontrolltieren hatten lediglich die Tiere der CR-BNO-1055/C001-Gruppe eine signifikant kleinere Muskeldichte.



Is slope significantly non-zero?	
F	0.5013
DFn, DFd	1.000, 37.00
P value	0.4833
Deviation from zero?	Not Significant

Abbildung 13. Korrelation der Muskeldichte und des Körpergewichts nach vierwöchiger Verabfolgung der Substanzen aus *Cimicifuga racemosa* BNO 1055/C001. Es besteht kein signifikanter linearer Zusammenhang.

3.3.2. Muskelfläche

Insgesamt haben alle Tiere während der vier Wochen des Versuchs an Muskelfläche zugelegt. Die Fläche der Muskulatur zeigte, wie in Abbildung 14. dargestellt, aber nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Die Kontrolltiere hatten hier die größte, die Restfraktion die kleinste Muskelfläche zu verzeichnen. Die Unterschiede waren jedoch nur im Vergleich mit den intakten Tieren signifikant. Es bestand keine signifikante Korrelation zwischen den Werten der Muskelfläche und denen der Muskeldichte.

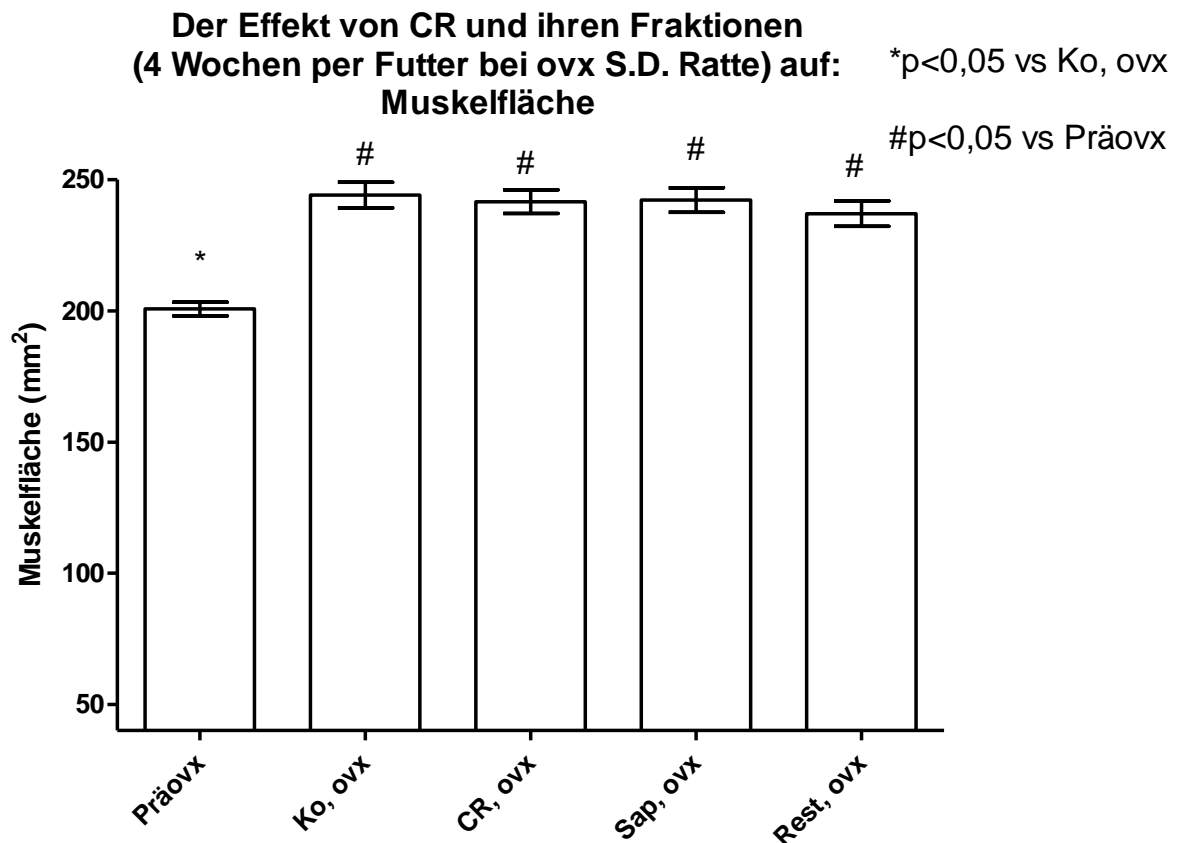


Abbildung 14. Muskelfläche in der tibialen Metaphyse von ovx Sprague-Dawley-Ratten. Die Muskelfläche hat in allen Gruppen nach Ovx signifikant zugenommen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen verglichen mit der Kontrollgruppe.

3.4. Fettgewebe

3.4.1. Fläche des paratibialen Fettdepots

Das paratibiale Fettdepot war bei allen Gruppen verglichen mit den intakten Tieren signifikant erhöht. Der Vergleich mit den Kontrolltieren erreichte jedoch kein Signifikanzniveau. Dies verdeutlicht Abbildung 15. Abbildung 16. zeigt die Korrelation der Fläche des paratibialen Fettdepots mit dem Serum Leptin Spiegel. Es zeigte sich eine signifikante Abhängigkeit. Je größer also das paratibiale Fettdepot, desto größer ist auch der Leptinspiegel im Serum der Versuchstiere.

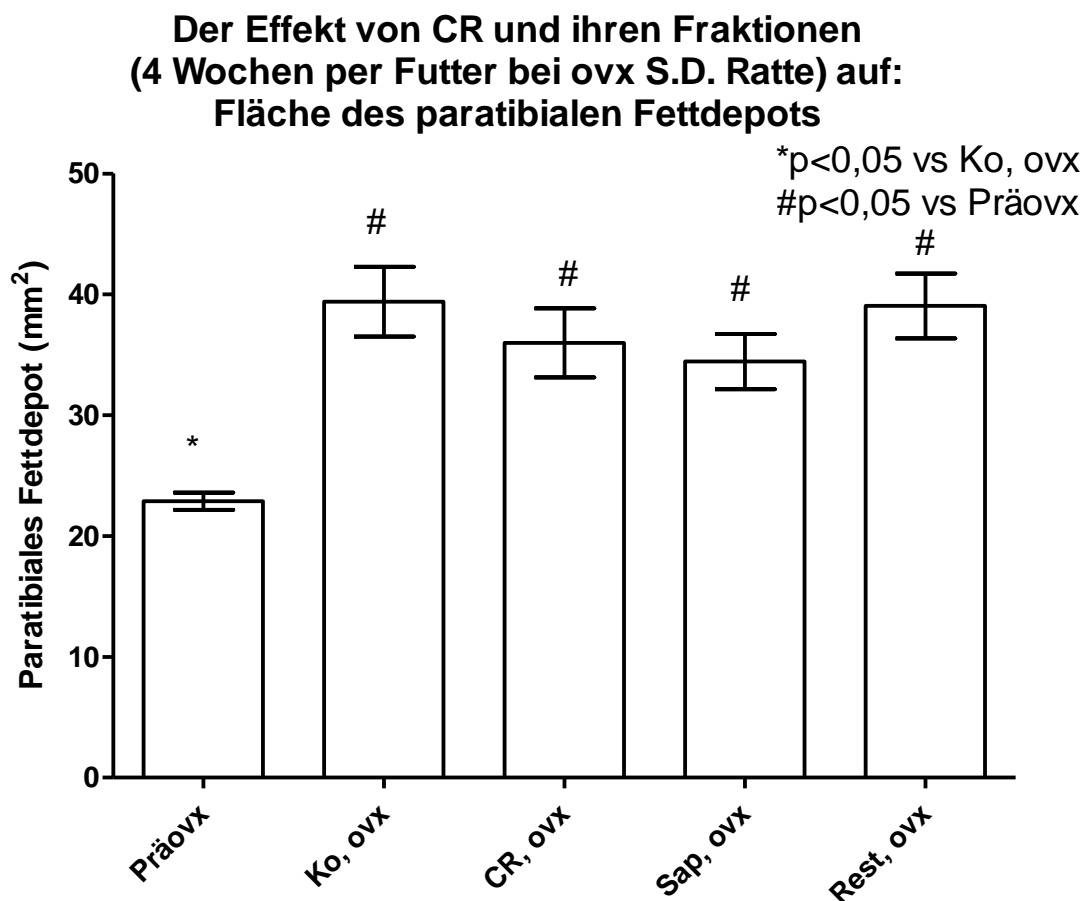
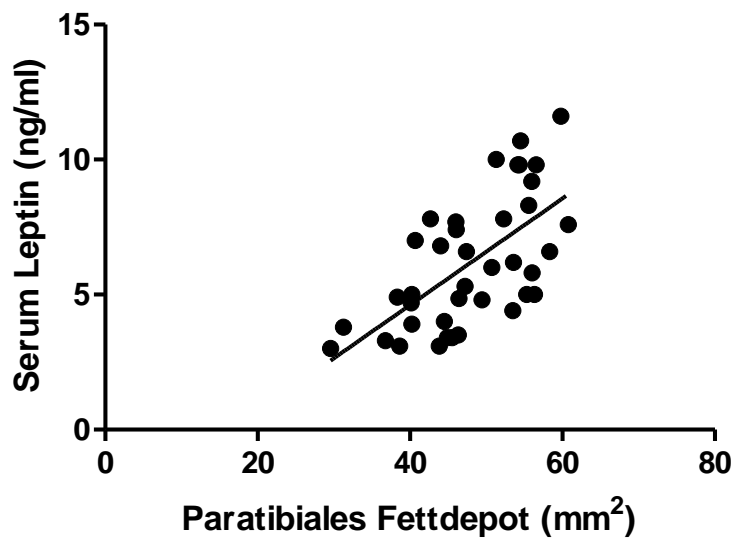


Abbildung 15. Fläche des paratibialen Fettdepots von ovx Sprague-Dawley-Ratten. Die Größe hat in allen Gruppen nach OvX signifikant zugenommen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen verglichen mit der Kontrollgruppe.

Korrelation Fläche des paratibialen Fettdepots und Leptin



Is slope significantly non-zero?	
F	24.73
DFn, DFd	1.000, 37.00
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant

Abbildung 16. Korrelation des Serum Leptin in Abhängigkeit von der Fläche des paratibialen Fettdepots nach vierwöchiger Verabfolgung der Substanzen aus *Cimicifuga racemosa* BNO 1055/C001. Es besteht ein signifikanter linearer Zusammenhang.

3.4.2. Anteil des paratibialen Fettdepots

Den tendenziell größten Anteil des paratibialen Fettdepots am gesamten tibialen Querschnitt verzeichnete die Restfraktion. Die Unterschiede zu den Kontrolltieren erreichten, wie Abbildung 17. zu entnehmen ist, sowohl bei den intakten Tieren, als auch bei denen der Saponinfraktion signifikant kleinere Werte.

**Der Effekt von CR und ihren Fraktionen
(4 Wochen per Futter bei ovx S.D. Ratte) auf:
Anteil des paratibialen Fettdepots**

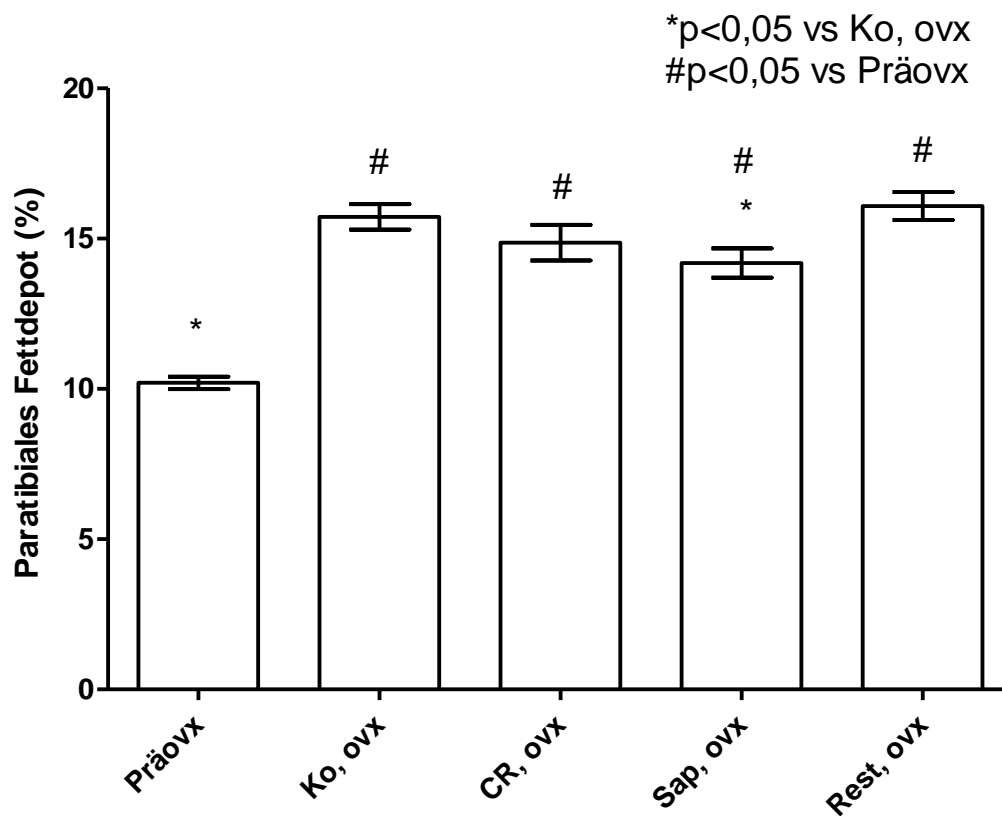


Abbildung 17. Prozentualer Anteil des paratibialen Fettdepots am gesamten tibialen Querschnitt von ovx Sprague-Dawley-Ratten. Ein Zuwachs war bei allen Tieren nach Ovx zu verzeichnen. Signifikant kleiner waren die Anteile im Vergleich zur Kontrolle nur bei den intakten Tieren und den Tieren der Saponinfraktion.

4. Diskussion

Die zugrunde liegenden Experimente sollten die Frage beantworten, welche Wirkstoffe des Extrakts CR BNO 1055/C001 einen antiosteoporotischen Effekt in der tibialen Metaphyse von Sprague-Dawley-Ratten zu verursachen vermögen. Zu diesem Zweck wurde der komplette Extrakt CR BNO 1055/C001 (Charge Nr. 690 253) in zwei seiner Subfraktionen, die Saponinfraktion und die Restfraktion, aufgeteilt. Die vorliegenden Ergebnisse entstanden nach vierwöchiger Verabfolgung dieser Substanzen aus *Cimicifuga racemosa* BNO 1055/C001 in den ovariectomierten Versuchstieren. Die Resultate konnten mittels qCT - Messung und Serumanalyse gewonnen werden.

Die untersuchten Wirkstoffe wurden nach statistischer Auswertung der Ergebnisse jeweils mit der Kontrollgruppe verglichen. Eine Untersuchung der Wirkung dieser einzelnen Subfraktionen auf die Knochen-, Muskel- und Fettgewebe der Tiere ist ein Novum. Ein Vergleich mit internationaler Literatur ist aus diesem Grund nur bedingt möglich.

Wie bereits einleitend erwähnt, reagiert das Knochengewebe der Ratte sowie das des Menschen auf einen manifesten Östrogenmangel mit der Entwicklung einer Osteoporose (Ivey und Baylink, 1981; Wronski et al., 1986; Riggs et al., 1998; Seeman, 2002). Dieser Mangel an Sexualhormon wurde bei unseren Versuchstieren durch Ovx hervorgerufen. So konnte sichergestellt werden, dass ausschließlich die verabfolgten Substanzen auf den Knochenstoffwechsel wirkten und nicht etwa die ovariell produzierten Östrogene, die unter physiologischen Bedingungen starken regulatorischen Einfluss auf Differenzierung, Reifung und Stabilität des Knochens haben (Spelsberg et al., 1999; Riggs et al., 2002). Die Östrogenproduktion der verbliebenen Gewebe, wie beispielsweise des Fettgewebes sowie der Nieren und Nebennieren, ist so gering, dass sie in diesem Experiment vernachlässigt werden

konnte. Im Übrigen wurden die Tiere bis zum Beginn des eigentlichen Versuchs und Verabfolgung der entsprechenden Testsubstanzen ausschließlich mit sojafreiem Futter versorgt, um auch hier einen östrogenartigen Effekt auszuschließen. Durch Herbeiführen dieses hormonellen Zustands konnte im Anschluss untersucht werden, welche Bestandteile im *Cimicifuga racemosa* BNO 1055/C001 in der Lage sind, einem östrogenmangelbedingten Verlust von Knochenmasse entgegenzuwirken.

4.1. Cimicifuga racemosa BNO 1055

In vorangegangenen tierexperimentellen Studien an ovx Sprague-Dawley-Ratten aus dieser Abteilung konnte eine antiosteoporotische Wirkung in *Cimicifuga racemosa* BNO 1055 im Sinne einer verminderten Resorption klar nachgewiesen werden. Wie auch in unserem aktuellen Versuch wurden unter anderem die nach Versuchsablauf verbliebene Dichte des trabekulären Knochens sowie die Serumparameter des Knochenstoffwechsels der Versuchstiere zur Auswertung herangezogen (Seidlová-Wuttke et al., 2003 b). Des Weiteren konnte in einer Studie an 62 postmenopausalen Frauen aus demselben Jahr eine positive Wirkung auf klimakterische Beschwerden sowie ebenfalls eine knochenprotektive Wirkung des Extrakts im Menschen gezeigt werden. Verglichen wurden die Wirkungen von CR BNO 1055, konjugierten Östrogenen sowie einem Placebo auf postmenopausale Beschwerden, den Knochenstoffwechsel und das Endometrium der Probandinnen. Die in der Studie untersuchten konjugierten Östrogene hingegen, hatten zwar eine suffizientere osteoprotektive Wirkung, verfügten allerdings auch über die nachteilige proliferationsfördernde Wirkung auf das Uterusgewebe (Wuttke et al., 2003).

CR BNO 1055 erzielte in den damaligen Versuchen zwar den gewünschten und erwarteten antiosteoporotischen Effekt, wirkte dabei aber weder im Tierexperiment noch im Rahmen der klinischen Studie uterotrop. Es zeigte sich, dass die durch den

Extrakt hervorgerufenen Resultate nicht auf direkter Induktion der Östrogenrezeptoren ER α oder ER β beruhen (Seidlová-Wuttke et al., 2003 b; Wuttke et al., 2003).

Zahlreiche weitere Experimente und Studien konnten eine direkte Wirkung von *Cimicifuga racemosa* an Östrogenrezeptoren ebenfalls klar ausschließen. In einem Versuch von Liu et al. aus dem Jahre 2001 beispielsweise zeigte *Cimicifuga racemosa* erneut keinerlei Bindung an die Östrogenrezeptoren ER α und ER β (Liu et al., 2001). Auch von der Annahme, dass die Pflanze zwar nicht über direkte Induktion an den Östrogenrezeptoren wirkt, wohl aber über selektive östrogenrezeptormodulierende Eigenschaften verfügt (Seidlová-Wuttke et al., 2003 a), ist man mittlerweile abgekommen. Wie einleitend beschrieben, geht man heute davon aus, dass Wirkstoffe in CR BNO 1055/C001 Neurotransmittersysteme, insbesondere das Serotoninsystem, beeinflussen und über diesen Mechanismus ihre Wirkungen entfalten.

Mit diesem aktuellen Versuch wurde nun erstmalig eine Differenzierung des Extrakts CR BNO 1055/C001 in seine Subfraktionen vorgenommen, um zu untersuchen, welche der Wirkstoffe die antiosteoporotischen Prinzipien der Pflanze innehaben.

4.2. Analyse der Ergebnisse

4.2.1. Futteraufnahme und Körpergewicht

Vor Beginn des Versuchs wurden die Körpergewichte der Ratten als Referenz festgelegt. Alle Gruppen verfügten über ein ähnliches mittleres Körpergewicht (270 g \pm 5 g), sodass sie im Verlauf miteinander verglichen werden konnten. Eine andere mögliche Referenz stellt beispielsweise die endosteale Dichte dar, wonach die Tiere anhand der im ersten qCT ermittelten Werte in möglichst ausgeglichene Gruppen aufgeteilt werden. Dies setzt allerdings voraus, dass die Ergebnisse sofort

nach Ermittlung und noch vor Versuchsbeginn ausgewertet werden, was einen gewissen zeitlichen Aufwand mit sich bringt. Wir haben uns für die erstgenannte Möglichkeit entschieden, da sie zeitsparender ist und ohnehin nicht nachgewiesen ist, ob eine Einteilung nach Knochenvolumenmineralisierungsdichte einen Vorteil in der Vergleichbarkeit und Genauigkeit gegenüber unserer Methode liefert. Die Futteraufnahme und die daran gekoppelte Wirkstoffaufnahme der Tiere wurden im Verlauf des Experiments, wie bereits erwähnt, einmal pro Woche ermittelt. Es zeigten sich interessante Ergebnisse, da die Tiere der Restfraktion zwar den größten Futtermittelverbrauch hatten, nicht aber auch am meisten Körpergewicht zugelegt haben. Den geringsten Zuwachs an Körpergewicht hatten die CR-BNO-1055/C001-Extrakt-Tiere, die allerdings auch den geringsten Futtermittelverbrauch hatten. Den stärksten Zuwachs an Körpergewicht verzeichneten die Tiere der Kontrollgruppe, deren Futtermittelverbrauch im Vergleich zur Saponin- und Restfraktion relativ gering war. Diese Inkongruenz kann verschiedene Ursachen haben. Es scheinen in diesem Versuch nicht ermittelte Parameter, beispielsweise nicht definierte Fettdepots oder möglicherweise eine Einlagerung von Wasser im Gewebe zu sein, die Einfluss auf die Gewichtszunahme der Tiere unabhängig von der Menge an aufgenommenem Futter nehmen.

4.2.2. Endosteale Dichte

Alle Versuchstiere zeigten nach Ovx und vierwöchigem Experiment eine signifikant kleinere endosteale Dichte, wohl in Folge einer Rarifizierung der Trabekel. Anhand unserer Definition der Osteoporose der Ratte über den T-Score kann bei allen Tieren von der Entwicklung einer Osteoporose gesprochen werden. Verglichen mit den präovx Tieren lag der Dichteverlust der Kontrollgruppe bei etwa 41%. Dieser und ähnliche Werte zeigten sich bei ovx Kontrolltieren schon in vorangegangenen

Experimenten, beispielsweise bei einem Versuch aus dem Jahre 2010 aus dieser Abteilung. Nach dreimonatiger Dauer des Experiments zeigte sich hier ein Dichteverlust von mehr als 50% (Seidlová-Wuttke et al., 2003 b; Seidlová-Wuttke et al., 2010 a). Bei kürzeren Versuchen war der Verlust entsprechend etwas kleiner, sodass anzunehmen ist, dass die Rarifizierung der trabekulären Strukturen infolge Östrogenmangel relativ stabile Ausmaße annimmt.

Im aktuellen Versuch zeigte sich in der Gruppe der Saponinfraktion ein im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant dichteres endosteales Gewebe. Diese Resultate legen die Erkenntnis nahe, dass es Wirkstoffe in der Saponinfraktion sind, die einer osteoporotischen Rarifizierung der Trabekel am stärksten entgegenzuwirken vermögen. Diese positive Wirkung der Saponine auf das Knochengewebe konnte auch in zahlreichen anderen Experimenten gezeigt werden. In einem aktuellen Versuch aus dem Jahre 2010 an 72 ovx Sprague-Dawley-Ratten wiesen Shen und Kollegen eine osteoprotektive Wirkung von Saponinen aus der Ginsengpflanze nach. Die Ergebnisse zeigten eine gesteigerte Knochenvolumenmineraldichte, bei vermindertem Verlust der trabekulären Strukturen. Darüber hinaus zeigte sich bei Betrachtung der Uteri der Versuchstiere kein hyperplastisches Gewebe (Shen et al., 2010). Vergleichbare Resultate zeigte ein Versuch mit Saponinen aus Yamswurzelgewächsen (*Dioscorea spongiosa*) aus dem Jahre 2004 (Yin et al., 2004).

Die CR-BNO-1055/C001-Fraktion tendierte in unseren Versuchen zwar ebenfalls zu diesen Effekten, jedoch lag sie mit nicht signifikanten Werten hinter der Saponinfraktion. Diese Ergebnisse entsprechen nicht denen aus vorherigen Experimenten, in welchen ovx Ratten *Cimicifuga-racemosa*-Extrakt BNO 1055 verabreicht wurde. Die Tiere wiesen sonst stets ein im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant dichteres trabekuläres Gewebe in der Metaphyse der Tibia auf (Seidlová-

Wuttke et al., 2003 b). Es ist anzunehmen, dass sich die aktuellen Ergebnisse aus der kürzeren Versuchslaufzeit ergeben und sich bei länger andauernder Verabfolgung von CR BNO 1055/C001 womöglich ähnliche Ergebnisse wie jene aus den vorherigen Untersuchungen ausgeprägt hätten.

Die Wirkung der Restfraktion auf die endosteale Dichte war nicht signifikant. Der Wirkstoff war somit nicht in der Lage, der Ovx-induzierten Rarifizierung der Trabekel entgegen zu wirken.

4.2.3. Intraosteale Fläche

Bei Betrachtung der intraostealen Fläche stellte sich bei keinem der applizierten Wirkstoffe eine signifikante Beeinflussung der Größenzunahme heraus. Alle Gruppen zeigten einen annähernd gleichen Zuwachs an Fläche, der somit wahrscheinlich im uneingeschränkten Wachstum der Tiere durch Ovx begründet ist. Weiterhin ist zu beachten, dass eine Vergrößerung der intraostealen Fläche in gewissem Rahmen auch als eine Kompensation für den Verlust der Dichte zu betrachten ist. Unterstrichen wird diese Annahme durch die Tatsache, dass es bei intakten weiblichen Ratten, die ja keine Osteoporose entwickeln, nicht zu einem Zuwachs der intraostealen Fläche kommt (Seidlová-Wuttke et al., 2008).

4.2.4. Parameter des Knochenstoffwechsels

Betrachtet man im aktuellen Versuch die Parameter des Knochenumbaus das Serum Osteokalzin und die Serum CrossLaps, so bestätigen sie den Ausgang der Messungen der endostealen Dichte. Es zeigten sich ausschließlich in der Saponinfraktion signifikant höhere Osteokalzinspiegel, jene Marker für den Knochenaufbau, was die Annahme unterstreicht, dass die Saponinfraktion die knochenprotektiven Wirkungen der Pflanze innehat. Auch im zuvor erwähnten

Versuch von Shen et al. spiegelte sich die antiosteoporotische Wirkung von Saponinen in den Stoffwechselfparametern des Knochen wieder. Die chinesische Forschergruppe ermittelte die knochenspezifische Alkalische Phosphatase im Serum (BAP) als Marker für den Knochenaufbau. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg, der auf eine vermehrte Aktivität der Osteoblasten durch Gabe von Saponinen schließen lässt (Shen et al., 2010). Gleichzeitig zeigte die Saponinfraktion in unserem Versuch als einzige unter den getesteten Substanzen signifikant niedrigere CrossLaps Spiegel. Da diese Marker bei steigender Aktivität der Osteoklasten im Blut ansteigen, deutet eben dieser verminderte Serumspiegel auf eine verminderte Resorption des Knochengewebes hin. Bei Shen und Kollegen wurde diese schwächere Osteoklastenaktivität durch das verminderte Desoxypyridinolin, einem spezifischen Knochenabbaumarker, gemessen (Shen et al., 2010).

Die Wirkungen aller übrigen Fraktionen in unserem aktuellen Versuch hatten weder auf Osteokalzin noch auf die CrossLaps im Serum einen signifikanten Einfluss. Jedoch zeigten die Tiere der Restfraktion, wenn auch nicht signifikant, konträre Ergebnisse. Die Abbaumarker waren stark erhöht und das Osteokalzin tendierte zu relativ niedrigen Messwerten. Der Extrakt CR BNO 1055/C001 zeigte ebenfalls keine signifikante Beeinflussung der Serumparameter. Aus bereits publizierten Forschungsprojekten dieser Abteilung gehen abweichende Ergebnisse hervor.

CR BNO 1055 zeigte in klinischen Studien sowie in einigen Experimenten an ovx Ratten durchaus eine signifikante Beeinflussung der Serumparameter im Sinne einer verminderten Resorption. In der eingangs bereits erwähnten Studie an 62 postmenopausalen Probandinnen aus dem Jahre 2003 wurden die Spiegel der CrossLaps sowie die der BAP (Knochenspezifische Alkalische Phosphatase) genauer analysiert. Unter Verabfolgung von CR BNO 1055 kam es zu einem deutlichen und signifikanten Anstieg der BAP, einem Marker für

Osteoblastenaktivität, sowie zu einer leichten Verminderung der CrossLaps im Serum. Die ermittelten Parameter führen zu einem vergrößerten Index log (BAP zu CL), der bei +0,40 lag. Dieser Index dient als Maß für die Stärke, bzw. den Effekt des Knochenumsatzes. So schien CR BNO 1055 seine Wirkung hier eher über Aktivierung der Osteoblasten als über eine Hemmung der Osteoklasten zu entfalten (Wuttke et al., 2003). Vergleichbar wäre die Bildung eines Index aus Osteokalzin und den CrossLaps. In unserem aktuellen Versuch liegt dieser Index für die CR-BNO-1055/C001-Gruppe bei -0,12. Es kam also, wie bereits erwähnt, nicht zu einer signifikanten Steigerung der Aktivität der Osteoblasten bzw. nicht zu einer Verminderung der Knochenresorption.

Den Resultaten der Studie von 2003 mit CR BNO 1055 ähnliche Ergebnisse erzielten auch Nian und Kollegen in einem Experiment mit Saponinen an ovx Ratten. Im Versuch aus dem Jahre 2006 wurden den Tieren Saponine aus einem Liliengewächs verabreicht. Der Wirkstoff zeigte mit seinen osteoprotektiven Eigenschaften ein ähnliches Wirkprofil im Blut wie CR BNO 1055 im Jahre 2003. Auch im Versuch von Nian et al. wirkten die Saponine primär über eine Förderung des Knochenaufbaus unter geringerer Hemmung der Resorption (Nian et al. 2006).

Auch die im Jahr 2003 veröffentlichten Ergebnisse der bereits erwähnten tierexperimentellen Untersuchung zeigten interessante Erkenntnisse. Die Aktivität der Osteoklasten wurde durch Gabe von CR BNO 1055 nicht beeinflusst, während das Osteokalzin signifikant reduziert war (Seidlová-Wuttke et al., 2003 b). Dies deutet ebenfalls auf einen primär knochenprotektiven Einfluss der Substanz hin im Sinne eines verminderten Umsatzes bzw. eines sich neu einstellenden Gleichgewichts auf einem niedrigeren Aktivitätslevel, jedoch mit wenig Einflussnahme auf die Resorptionsaktivität der Osteoklasten. Es stellt sich die Frage, ob diese unterschiedlichen Resultate auf die Tatsache zurückzuführen sind, dass die

vorherigen Ergebnisse jeweils nach einer Versuchslaufzeit von drei Monaten entstanden sind und nicht wie in unserem aktuellen Experiment nach lediglich vier Wochen. Möglicherweise hätte eine Verabfolgung über einen längeren Zeitraum ebenfalls zu einer signifikanten Beeinflussung der Serumparameter durch CR BNO 1055/C001 geführt.

Ähnliche Beobachtungen, wie jene zu den Saponinen in unserem aktuellen Versuch, konnten auch bei einer Reihe von Untersuchungen zur Wirkung von Östrogenen auf den Knochenumsatz gemacht werden. So beispielsweise in einer Studie von Hannon und Kollegen aus dem Jahre 1998. Untersucht wurden 11 postmenopausale Probandinnen, denen über einen Zeitraum von 24 Wochen transdermales 17β Estradiol verabreicht wurde. Es zeigte sich ein signifikanter und schneller Abfall der Marker der Knochenresorption, während der Knochenaufbau, gemessen anhand der C- und N- terminalen Kollagen-Typ-I - Propeptide, angekurbelt wurde (Hannon et al., 1998). Unter Berücksichtigung der Erkenntnis, dass die Auszüge aus *Cimicifuga racemosa* BNO 1055 ihre Wirkung nicht über Induktion des Östrogensystems entfalten, lässt sich in ihrer Wirkung dennoch eine Ähnlichkeit zum eingesetzten 17β Estradiol beobachten, was auf eine Verbindung der regulierenden Systeme des Knochenstoffwechsels schließen lässt.

Eine weitere Bestätigung der von uns formulierten Vermutungen zur Wirkung der Saponinfraktion aus CR BNO 1055/C001 zeigte sich bei Korrelation der Werte der Dichte des trabekulären Knochen mit den ermittelten Osteokalzinspiegeln im Serum. Es wurde deutlich, dass sich innerhalb des Versuchszeitraums von vier Wochen ein direkter linearer Zusammenhang zwischen beiden Parametern entwickelte. Alternativ formuliert bedeutet dies, dass ein Anstieg des Serumosteokalzins mit einem dichteren Endosteum verbunden ist bzw. dass eine niedrigere endosteale Dichte mit verringerten Osteokalzinspiegeln im Serum einhergeht. Mit Hilfe der statistischen

Analyse konnte zwar ein kausaler Zusammenhang nicht nachgewiesen werden, jedoch deuten unsere aktuellen Ergebnisse und die bestehenden allgemeinen Kenntnisse auf diesen hin.

4.2.5. Kortikale Dichte

Bezüglich der kortikalen Dichte zeigte sich in verschiedenen tierexperimentellen Untersuchungen am Knochen von ovx Sprague-Dawley-Ratten, dass der Verlust von kortikaler Dichte nach Ovx durch die Wirkung von verschiedenen Saponinen eingedämmt werden konnte (Yin et al., 2004).

Die Dichte des kompakten Knochens in den jeweiligen Gruppen unseres Versuchs zeigte allerdings keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. Alle Tiere haben infolge Ovx an Dichte hinzu gewonnen. Teilweise spielt hier sicherlich eine frühe Kompensation des endostealen Dichteverlusts über Steigerung der kortikalen Dichte eine Rolle. In vorherigen Untersuchungen an Pobanden zeigte sich, dass es zu einer Einbüßung der Dichte der Kompakta kommt, wenn über einen sehr langen Zeitraum ein manifester Östrogenmangel im Sinne einer senilen bzw. *low turnover* Osteoporose besteht (Han et al., 1996; Seeman, 2002), was die Frage aufwirft, wie sich die Entwicklung der kortikalen Dichte im Knochen der Ratten nach länger andauerndem Östrogenmangel vollziehen würde.

4.2.6. Kortikale Fläche

Um dem Stabilitätsverlust durch Rarifizierung der Trabekel entgegen zu wirken, besteht im osteoporotischen Knochen ein partieller Kompensationsmechanismus. Während im Zuge der Osteoporose die Dichte des intraostealen Gewebes durch Resorption schwindet, wird die Fläche des Knochens bis zu einem gewissen Grade durch Anbau von Kompakta vergrößert. Beim Mann ist dieser kompensatorische

Aufbau von kompaktem Knochengewebe ausgeprägter, sodass er insgesamt weniger Knochenmasse einbüßt. Die Betrachtung der gesamten Knochenmineralisierungsdichte in der Metaphyse der Tibia zeigt deshalb bei Männern höhere Werte, obwohl in dieser Phase nicht weniger Knochenmasse abgebaut wird als bei der Frau (Seeman, 2002).

In unserem aktuellen Versuch hat sich die Fläche der Kortikalis nach den vier Versuchswochen in allen Gruppen signifikant vergrößert. Verglichen mit den Kontrolltieren, zeigte die Gruppe der Restfraktion jedoch eine signifikant kleinere Fläche. Sie war also nicht im selben Maße wie die anderen Versuchsgruppen in der Lage, den Verlust der endostealen Dichte durch Aufbau von periostealer Fläche zu kompensieren. Ob diese Ergebnisse auch auf die Ingestion der Wirkstoffe oder ausschließlich auf das durch Osteoporosemangel ungebremste Wachstum der ovx Ratten zurück zu führen ist, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht klar beantwortet werden. Auch hier ist als ein möglicher beeinflussender Faktor der Versuchszeitraum zu sehen. Womöglich würden die Resultate nach einer längeren Versuchsdauer von drei Monaten deutlichere Unterschiede im Ausmaß der Kompensation zwischen den einzelnen Gruppen zeigen.

4.2.7. Intraosteale und periosteale Zirkumferenz

Sowohl die Umfänge des Endosteums als auch die des Periosteums vergrößerten sich innerhalb der Versuchslaufzeit nach Ovariectomie folgerichtig proportional zum Zuwachs der intraostealen – bzw. kortikalen Fläche. Dieser Zuwachs an Länge scheint also, ebenso wie jener der Fläche des trabekulären Knochens und der Kompakta, in erster Linie durch das Größenwachstum der Tiere bedingt zu sein.

4.2.8. Muskeldichte

Der Begriff der Muskeldichte ist zu diesem Zeitpunkt leider nicht genau definiert. Überträgt man die Definition für die Knochendichte auf die der Muskulatur, so ist wohl am ehesten von einer Abhängigkeit der röntgenologischen Dichte von der Menge an Elastinfasern des Muskels auszugehen. Wir ziehen diese Definition für unsere Betrachtung der Muskulatur heran. Für die Muskeldichte der Versuchstiere zeigt sich kein einheitliches Bild. Einige Ratten haben an Dichte hinzugewonnen, so zum Beispiel die Kontrolltiere sowie die Tiere der Saponinfraktion. Die CR-BNO-1055/C001-Gruppe verzeichnete als einzige eine signifikante Abnahme der Muskeldichte, sogar noch unter jene Werte der intakten Tiere vor Versuchsbeginn. Die Ursache für diese signifikant kleinere Dichte der Muskulatur der CR-BNO-1055/C001-Gruppe kann demzufolge verschiedene Ursachen haben. Wahrscheinlich scheinen, neben einer Reduktion der Muskulatur aufgrund des Sexualhormonmangels, entweder eine Verwässerung bzw. vermehrte Durchblutung des Gewebes oder aber eine Verfettung der Muskelfaserbündel, die dann im qCT eine geringere Dichte aufweisen, da sowohl Flüssigkeiten als auch Fettgewebe sehr viel weniger dicht sind als das Muskelgewebe bzw. die Elastinfasern. Beim Menschen ist erwiesen, dass ein manifester Sexualhormonmangel neben einigen anderen Faktoren ursächlich für die Entstehung einer Sarkopenie, also einem Verlust von Muskelmasse im Sinne einer Muskelatrophie, ist (Sirola und Rikkonen, 2005). Bei Ratten scheinen die Entwicklungen in Abhängigkeit vom Geschlecht unterschiedlich zu sein. Kastrierte männliche Tiere zeigten in einem Versuch aus dieser Abteilung einen deutlichen Verlust von Muskeldichte (die bei den intakten männlichen Tieren sehr viel größer war als bei den intakten weiblichen Tieren), während die weiblichen Tiere nach Ovx eine Steigerung der Muskeldichte verzeichneten. Darüber hinaus zeigte sich in den männlichen Tieren nach Orx eine

Akkumulation von Fettgewebe im Muskel (Seidlová-Wuttke et al., 2011). Diese Anreicherung konnte auch bei alternden Probanden, unabhängig vom Gesamtkörperfett, einer Gewichtszunahme oder einem Gewichtsverlust, beobachtet werden (Delmonico et al., 2009). Überträgt man diese Erkenntnisse auf unseren Versuch, so ist anzunehmen, dass ein Versuchsdesign mit längerer Laufzeit womöglich prägnantere Resultate erbracht hätte. Wie sich die verschiedenen Substanzen auf die Entwicklung der Sarkopenie ausgewirkt hätten, bleibt vorerst jedoch unklar. Zu bedenken ist ferner, dass möglicherweise auch das Körpergewicht der Tiere Einfluss auf deren Muskeldichte genommen hat. Auffällig ist hier, dass jene Tiere, die über das größte Körpergewicht verfügten, nämlich die Kontrolltiere, auch eine überdurchschnittliche Muskeldichte aufwiesen. Die CR-BNO-1055/C001-Tiere wogen nach Abschluss des Versuchs am wenigsten und verfügten wie bereits erwähnt über die signifikant kleinste Muskeldichte. Dieser Zusammenhang mag sich aus der größeren Belastung der Tiere aufgrund ihres großen Körpergewichts im Sinne eines „Krafttrainings“ erklären, welches einen Stimulus für den Aufbau von Muskelmasse darstellt.

4.2.9. Muskelfläche

Die Fläche der Muskulatur ist in allen Versuchsgruppen nach Ovx größer geworden. Dass zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede im Flächenzuwachs zu beobachten sind, lässt darauf schließen, dass die Steigerung allein durch das Wachstum der Tiere, nicht jedoch durch die verabfolgten Substanzen bedingt ist.

4.2.10. Fettgewebe

Das Fettgewebe, hier als paratibiales Fettdepot bezeichnet, wurde in diesem Versuch als Teil des Fettes am gesamten tibialen Querschnitt, exklusive Muskulatur und Knochengewebe, ausgewertet. Darüber hinaus wurde auch sein Anteil (in Prozent) angegeben.

Sämtliche Tiere haben nach Ovx, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, an Fettgewebe hinzu gewonnen. Diese Zunahme von Fettgewebe geht einher mit Erkenntnissen verschiedener Experimente aus denen bereits hervor gegangen ist, dass ein Mangel an Sexualhormonen in Folge einer Kastration sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Ratten zu einem starken Zuwachs an Fettgewebe führt (Babaei et al., 2010, Seidlová-Wuttke et al., 2011). Auch beim Menschen steht ein klimakterischer Hormonzustand in engem Zusammenhang mit der Entwicklung eines metabolischen Syndroms, insbesondere einer vermehrten Anreicherung von intraabdominellem, zentralem Fettgewebe (Carr, 2003).

Die Tiere der Restfraktion tendierten unter allen Gruppen zu den größten Fettgewebsanteilen am gesamten tibialen Querschnitt. Verglichen mit den Kontrolltieren zeigte die Saponinfraktion jedoch einen signifikant kleineren Anteil des Fettdepots. Somit liegt nahe, dass Wirkstoffe in der Saponinfraktion dazu in der Lage sind, den Aufbau von Fettgewebe nach Ovx, also der Entwicklung einer Fettleibigkeit infolge eines klimakterischen Hormonzustandes in der Ratte, zu verhindern.

Die Tatsache, dass die Saponinfraktion als einzige Gruppe ein signifikant kleineres paratibiales Fettdepot aufwies, unterstützt die Vermutung, dass die Saponinfraktion nicht nur im Knochen, sondern auch im Fettgewebe, über eine östrogenartige („anorektische“) Wirkung verfügt. Diese wird jedoch, wie bereits mehrfach erwähnt, nicht über die Östrogenrezeptoren selbst erreicht, sondern ist vielmehr Resultat der Induktion von Neurotransmittersystemen, insbesondere von serotoninerger

Signalwegen. Verknüpft man diese Ergebnisse der Saponinfraktion mit den Resultaten am Knochen der Tiere, so zeigt sich ein verminderter „lipotoxischer Effekt“. Die Saponine aus CR BNO 1055/C001 waren also in der Lage, den Knochen, neben den direkten Wirkungen auf die endosteale Dichte, auch indirekt über einen verminderten Aufbau von Fettgewebe zu schützen.

4.3. Serotoninerge Signalwege im Knochen und Zentralnervensystem

Erweiternd sollte noch die Rolle des Serotoninsystems bzw. seiner Rezeptoren im Knochen und Zentralnervensystem und seine Beeinflussung durch die Wirkstoffe in CR BNO 1055/C001 betrachtet werden. Wie bereits mehrfach erwähnt, verfügt das Knochengewebe über funktionsfähige Serotoninrezeptoren. Nach neueren Erkenntnissen existieren Wirkstoffe in *Cimicifuga racemosa*, die ihre Wirkung über diese Rezeptoren und somit über das Serotoninsystem entfalten. Als eine wichtige Substanz ist hier das Methylserotonin zu nennen, das sich im von uns eingesetzten Extrakt CR BNO 1055/C001 vornehmlich in der Restfraktion sowie in Spuren auch in der Saponinfraktion befindet (Bionorica®, 2010). Es wird angenommen, dass die Induktion der Serotoninrezeptoren, insbesondere 5-HT_{1A} und 5-HT₇, im Knochengewebe durch Aktivitätsminderung der Osteoblasten die aufbauenden Prozesse herunter reguliert (Warden et al., 2005, Bliziotis, 2010). In den Ergebnissen anderer Experimente an Hühnern und Mäusen hingegen wird ein Einfluss des Serotonins auf die Regulation der Mechanosensibilität des Knochens, vermittelt über die 5-HT₂ Rezeptoren in Osteozyten und Osteoblasten, sowie eine Beeinflussung des Umbaus von Knochensubstanz postuliert (Westbroek et al., 2001). In einer Studie von Collet et al. aus dem Jahre 2008 werden diese Annahmen untermauert. Den im Tierexperiment untersuchten Mäusen fehlte der 5-HT_{2B} Rezeptor. Die Tiere zeigten eine reduzierte Knochendichte sowie signifikant

erniedrigte Werte der BAP. Collet und Kollegen deuten diese Ergebnisse als die Manifestation einer Osteopenie infolge Abwesenheit der serotoninerger Wirkung am Knochen (Collet et al., 2008). All diese Mechanismen und Hypothesen sind zum momentanen Zeitpunkt nur unzureichend geklärt und werden weiterhin kontrovers diskutiert. Auffallend in unseren Ergebnissen war die Tatsache, dass die Tiere der Restfraktion neben der Kontrollgruppe zu den geringsten Dichtewerten im trabekulären Knochengewebe der tibialen Metaphyse tendierten. Der durch Ovx induzierte Abbau des Knochens konnte also durch jene Fraktion am wenigsten verhindert werden. Schaut man sich die genaue Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen aus CR BNO 1055/C001 an, so ist bekannt, dass die Restfraktion neben Zimtsäurederivaten und Methylserotonin als einen Hauptbestandteil Kaffeesäure enthält (Bionorica®, 2010). In jüngeren Versuchen an drei Monate alten weiblichen Wistar-Ratten zeigte sich eine negative Auswirkung von Kaffeesäure auf die mechanische Stabilität des Knochens (Zych et al. 2010). Ob und wie dieser Aspekt auch in unserem Experiment von Bedeutung war und ob es durch eine weitere Aufreinigung der Subfraktionen aus CR BNO 1055/C001 in ihre Einzelbestandteile zu anderen Ergebnissen kommen würde, bleibt vorerst offen und bedarf einer weiteren Aufklärung.

4.4. Schlussfolgerungen

Mit dem hier vorgestellten Experiment ist der Versuch unternommen worden, zu ergründen, welche Fraktionen aus dem Wurzelextrakt der Traubensilberkerze CR BNO 1055/C001 einen antiosteoporotischen Effekt in der tibialen Metaphyse von ovx Sprague-Dawley-Ratten zu verursachen vermögen.

Klar gezeigt werden konnte eine antiosteoporotische Wirkung im Sinne eines geringeren Verlusts der Dichte des trabekulären Knochens, sowie einem Anstieg des Serumosteokalzin durch die Saponinfraktion aus *Cimicifuga racemosa* BNO 1055/C001. Darüber hinaus zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen diesen Parametern, der die Osteoprotektion im Sinne eines geringeren Verlusts von Spongiosadichte im Blut über die Marker des Knochenaufbaus widerspiegelte. Diese positiven Effekte am Knochen sind nicht auf Induktion des Östrogensystems zurückzuführen, wohl aber über Neurotransmittersysteme, insbesondere serotoninerge Signalwege reguliert. Diese zwei Systeme wiederum stehen in engem Zusammenhang bei der Regulation von Auf- und Abbauprozessen im Knochengewebe.

Neben den Effekten am Knochen, zeigte insbesondere die Saponinfraktion eine signifikante Beeinflussung des Fettgewebes. Unter Gabe von Saponinen aus CR BNO 1055/C001 kam es zu einer signifikanten Reduktion des sexualhormonmangelbedingtem Aufbaus von Fettgewebe. Übertragen auf den Menschen und das Klimakterium entstünde nach dieser hormonellen Umstellung oftmals ein metabolisches Syndrom. Bei Korrelation der Fläche des paratibialen Fettdepots mit den ermittelten Serum Leptinspiegeln zeigte sich eine lineare Abhängigkeit. Wie bereits in der Diskussion erwähnt, deutet dies auf die Fähigkeit der Substanz, durch verringerte Entwicklung einer sexualhormonmangelbedingten

Fettleibigkeit und den damit einhergehenden verringerten Leptinspiegeln, den Knochen vor einem "lipotoxischen Effekt" zu schützen.

Der Gesamtextrakt CR BNO 1055/C001 blieb in seinen Wirkungen deutlich hinter den Erwartungen zurück. Er zeigte in seiner Wirkung auf das Knochengewebe, insbesondere die endosteale Dichte, lediglich positive Tendenzen.

Die Betrachtung der Kortikalis zeigte ihre Vergrößerung in allen Gruppen, was die Annahme unterstreicht, dass auch die Ratte auf einen Verlust von trabekulärem Knochen mit der Vergrößerung der kortikalen Fläche im Sinne eines Kompensationsmechanismus reagiert. Beim Menschen gilt dies als erwiesen.

Unser Versuch konnte ferner untermauern, dass ein enger Zusammenhang zwischen Muskulatur und Körpergewicht bzw. Fettgewebe besteht. Jene Tiere mit dem größten Körpergewicht verfügten über das dichteste Muskelgewebe, während die Tiere mit einer sehr geringen Muskeldichte auch ein geringeres Körpergewicht besaßen, was eine Stimulation der Muskulatur durch vermehrtes Körpergewicht im Sinne eines „Krafttrainings“ nahe legt.

5. Zusammenfassung

Im Zuge des demografischen Wandels der Gesellschaft ist die Osteoporose in den letzten Jahrzehnten zu einem bedeutenden Problem und Kostenfaktor für das Gesundheitssystem geworden. Die Zahl alter Menschen steigt und mit ihr die Inzidenz der Osteoporose und der damit oftmals einhergehenden Frakturen. Für die Betroffenen bedeutet dies Immobilität, Schmerzen, lange Krankenhausaufenthalte und eine stark eingeschränkte Selbständigkeit. Die Hormonersatztherapie stellt heute aufgrund des erhöhten Risikos insbesondere für Brustkrebs und das kardiovaskuläre System keine Option zur Langzeitbehandlung der Erkrankung mehr dar. Vielfach wird nach Alternativen geforscht. Einen vielversprechenden Ansatz stellt das Konzept der gezielten und gewebspezifischen Induktion bzw. Antagonisierung des Östrogensystems dar. Darüber hinaus scheint auch die Modulation der serotoninergen Signalwege von Bedeutung für das Knochengewebe sowie für zentralnervöse Strukturen, die in die Regulation klimakterischer Beschwerden involviert sind, zu sein. Die vorliegende Arbeit setzte sich mit der Fragestellung auseinander, ob und wie der Wurzelextrakt aus *Cimicifuga racemosa* CR BNO 1055/C001 und die darin enthaltenen Subfraktionen der Manifestation einer sexualhormonmangelbedingten Osteoporose entgegen zu wirken vermögen. Vor diesem Hintergrund wurden 40 zuvor ovariectomierte Sprague-Dawley-Ratten in vier Gruppen unterteilt. Über einen Zeitraum von 28 Tagen wurden den Tieren anschließend, ausgenommen die Kontrollgruppe mit soyafreiem Kontrollfutter, die verschiedenen Substanzen aus der Traubensilberkerze (CR BNO 1055/C001, die Saponinfraktion und die Restfraktion) verabreicht. Anhand der Messung der Knochenvolumenmineraldichte sowie der Analyse von Muskulatur und Fettgewebe konnten die Auswirkungen der verschiedenen Wirkstoffe ermittelt und verglichen werden.

Die Saponinfraktion zeigte die mit Abstand deutlichsten Ergebnisse dieses Versuchs. Ihre Wirkung zeigte sich insbesondere in einer signifikanten Inhibition der Rarifizierung trabekulärer Strukturen. Auch die Parameter des Knochenstoffwechsels wurden im Falle des Osteokalzins signifikant erhöht bzw. im Falle der CrossLaps signifikant vermindert. Diese Ergebnisse sprechen für die Fähigkeit der Substanz, den sexualhormonmangelbedingten gesteigerten Knochenabbau zu vermindern. In Zukunft könnten die Ergebnisse dieser Fraktion aus dem Gesamtextrakt einen guten Wegweiser in der Therapie der Osteoporose darstellen.

Ebenfalls signifikant war der im Vergleich zur Kontrollgruppe wesentlich kleinere Anteil des paratibialen Fettdepots am gesamten tibialen Querschnitt. So scheint die Substanz also darüber hinaus die postmenopausale Mehranreicherung von Fettgewebe zu begrenzen. Übertragen auf die Frau könnte die Saponinfraktion aus CR BNO 1055/C001 also in Zukunft neben ihrer Anwendung in der Therapie der postmenopausalen Osteoporose ein mögliches Medikament zur Prophylaxe der Entwicklung einer sexualhormonmangelbedingten Fettleibigkeit bzw. eines Metabolischen Syndroms darstellen.

Der Gesamtextrakt CR BNO 1055/C001 erzielte in der Analyse der Dichte des trabekulären Knochens keine signifikant größeren Werte als die Kontrollgruppe. Auch die von uns eingesetzten Parameter des Knochenstoffwechsels, das Osteokalzin und die CrossLaps, wurden von der Substanz im Vergleich zur Kontrolle nur tendenziell beeinflusst. CR BNO 1055/C001 blieb somit stark hinter den Erwartungen aus vorherigen Projekten zurück. Dies mag zum einen an dem relativ kurzen Versuchszeitraum von vier Wochen liegen. Zum anderen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die verschiedenen Wirkstoffe der Pflanze sich im Gesamtextrakt

eventuell gegenseitig beeinflussen bzw. in ihrer Wirkung stören. Eine Aufreinigung, wie teilweise bereits erfolgt, und eine damit einhergehende gezieltere Behandlung mit einzelnen Fraktionen aus CR BNO 1055/C001 vermag in Zukunft wohl prägnantere Ergebnisse liefern.

Die Restfraktion zeigte abgesehen von einigen wenigen Ausnahmen keine signifikanten Wirkungen. Weder am Knochen noch im Fettgewebe konnte sie klare positive Effekte hervorrufen. Womöglich stellt eine weitere Aufreinigung der Fraktion in ihre Einzelbestandteile wie beispielsweise die Zimt- und Kaffeesäure, von denen eine schädigende Wirkung auf das Knochengewebe bekannt ist, und das Methylserotonin in Zukunft eine Option dar, dennoch eine osteoprotektive Wirkung dieser Fraktion auszumachen und therapeutisch nutzen zu können.

Im Rahmen des Forschungsprojekts „Osteoporoseprophylaxe mit pflanzlichen Wirkstoffen“ der Bayerischen Forschungstiftung (AZ-838-08), das noch bis Ende März 2012 läuft, liefern die Ergebnisse dieser Untersuchung gute Anhaltspunkte für eine weitergehende Erprobung und Weiterentwicklung der Wirkstoffe aus CR BNO 1055/C001 mit der Aussicht, in Zukunft eine noch gezieltere Therapie postmenopausaler Beschwerden zu ermöglichen und zu verwirklichen.

6. Anhang: Abb. 1., Tab. 2., 3., 4.

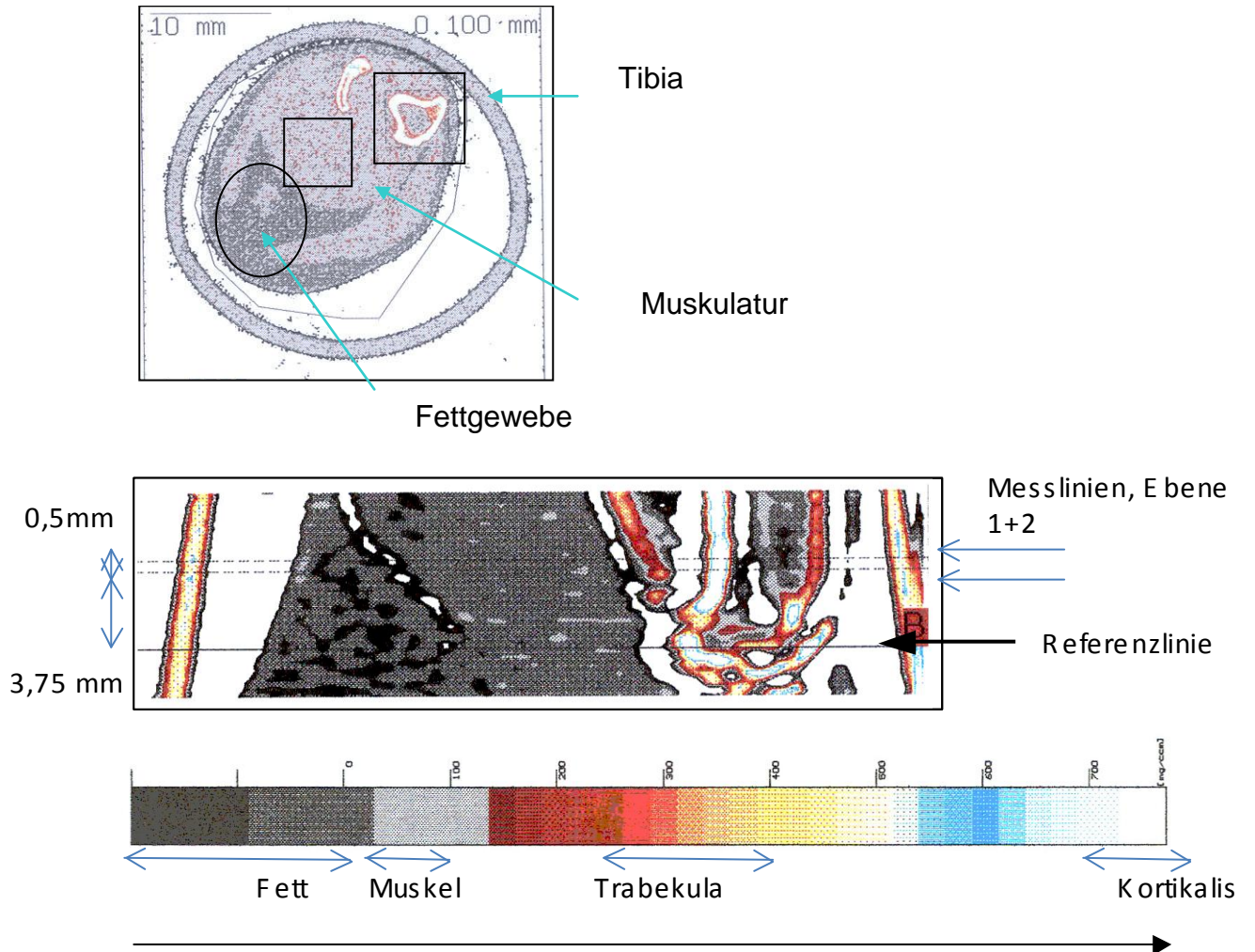


Abbildung 1. Messlinie und Dichtebereiche bei der qCT - Auswertung

Tabelle 2. Definition der Osteoporose bei der Ratte, anhand des T-Score, einem Maß für den Verlust der Knochenmineralisierung.

T-Score \geq -1	Normalbefund	Dichte: $> 239 \text{ mg/cm}^3$
T-Score -1 bis -2.5	Osteopenie	Dichte: 239 bis $200,9 \text{ mg/cm}^3$
T-Score \leq -2,5	präklinische Osteoporose	Dichte: $< 200,9 \text{ mg/cm}^3$
T-Score \leq -2,5 + Fraktur	manifeste Osteoporose	Dichte: $< 200,9 \text{ mg/cm}^3$

Tabelle 3. Osteoporoseformen bzw. ihre Ursachen (modifiziert nach Dempster und Lindsay, 1993) Die primären Formen werden auch als idiopathisch bezeichnet, da eine äußere Ursache nicht immer klar zu benennen ist. Die sekundären Formen sind in ihren Ursachen genauer spezifizierbar.

primäre Osteoporosen	sekundäre Osteoporosen
kindliche oder juvenile Osteoporose	Endokrinopathien
	Cushing Syndrom
prämenopausale Osteoporose	Hyperthyreose
	Hypogonadismus
postmenopausale Osteoporose (Typ I)	Hyperprolaktinämie
	Diabetes mellitus
senile Osteoporose (Typ II)	Hyperparathyreoidismus
	maligne Erkrankungen
	Multiples Myelom
	Non-Hodgkin-Lymphom
	Mastozytose
	diffuse Knochenmarkskarzinose
	Immobilisierung
	Langfristige Bettruhe
	Paraplegie
	Hereditäre Bindegewebserkrankungen
	Osteogenesis Imperfecta
	Ehlers-Danlos-Syndrom
	Marfan-Syndrom
	Pharmaka, Drogen
	Heparin
	Glukokortikoide
	LH-RH-Analoga
	Methotrexat
	Alkohol
	komplexe Osteopathien
	renale Osteopathie
	intestinale Osteopathie (Morbus Chron, Malabsorption...)
	Sonstiges
	rheumatoide Arthritis
	Hypophosphatasie

Tabelle 4. Risikofaktoren der Osteoporose, bzw. osteoporosebedingter Frakturen (modifiziert nach Consensus development Conference, 1993)

Physische Faktoren
geringe "Peak Bone Mass"
geringer BMI
Genetische Faktoren
weibliches Geschlecht
positive Familienanamnese
europäische oder asiatische Herkunft
Hormonelle Faktoren
frühe Menopause
Amenorrhoe
Östrogenmangel
Lebensstil
Rauchen
Alkoholabusus
unzureichende körperliche Aktivität
übermäßige körperliche Aktivität (führt zu Amenorrhoe)
unzureichende Sonnenexposition (führt zu Vit.-D-Hormon Mangel)
Ernährung
unzureichende Kalziumaufnahme
unzureichende Proteinaufnahme
unzureichende Vitamin-D-Aufnahme
übermäßige Phosphataufnahme
Erkrankungen
Multiples Myelom
Anorexia nervosa
Hyperparathyreoidismus
Hyperprolaktinämie
Hyperkortisolismus

7. Literaturverzeichnis

Bab I, Yirmiya R (2010): Depression, Selective Serotonin Reuptake Inhibitors, and Osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 8, 185-191

Babaei P, Mehdizadeh R, Ansar MM, Damirchi A (2010): Effects of ovariectomy and estrogen replacement therapy on visceral adipose tissue and serum adiponectin levels in rats. *Menopause Int* 16, 100-104

Bellino FL (2000): Nonprimate animal models of menopause: workshop report. *Menopause* 7, 14-24

Beral V (2003): Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362, 419-427

Bilezikian JP (2009): Efficacy of bisphosphonates in reducing fracture risk in postmenopausal osteoporosis. *Am J Med* 122, S14-21

Bionorica® : Komplementierende Analytik zu C001/S/1-3 und C001/R1-3. Zitiert nach Inhaltsangabe des Vortrages (gehalten 02.12.2010) in: Fünftes wissenschaftliches Meeting Cimicifuga – Osteoporose, Würzburg 02.12.2010

Blain H, Vuillemin A, Teissier A, Hanesse B, Guillemin F, Jeandel C (2001): Influence of muscle strength and body weight and composition on regional bone mineral density in healthy women aged 60 years and over. *Gerontology* 47, 207-212

Bliziotis M (2010): Update in serotonin and bone. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 4124-4132

Blumel JE, Castelo-Branco C, Binfa L, Gramegna G, Tacla X, Aracena B, Cumsille, MA, Sanjuan A (2000): Quality of life after the menopause: a population study. *Maturitas* 34, 17-23

Boehm HF, Link TM (2004): Bone imaging: traditional techniques and their interpretation. *Curr Osteoporos Rep* 2, 41-46

Boyce BF, Xing L (2008): Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys* 473, 139-146

Burdette JE, Liu J, Chen S, Fabricant DS, Piersen CE, Barker EL, Pezzuto J, Mesecar A, Van Breemen RB, Farnsworth NR et al. (2003): Black cohosh acts as a mixed competitive ligand and partial agonist of the serotonin receptor. *J Agric Food Chem* 51, 5661-5670

Carr MC (2003): The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2404-2411

Chan ME, Lu XL, Huo B, Baik AD, Chiang V, Guldberg RE, Lu HH, Guo XE (2009): A Trabecular Bone Explant Model of Osteocyte-Osteoblast Co-Culture for Bone Mechanobiology. *Cell Mol Bioeng* 2, 405-415

- Chesnut CH, Silverman S, Andriano K, Genant H, Gimona A, Harris S, Kiel D, LeBoff M, Maricic M, Miller P et al. (2000): A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the prevent recurrence of osteoporotic fractures study. PROOF Study Group. *Am J Med* 109, 267-276
- Clarke BL, Khosla S (2010): Female reproductive system and bone. *Arch Biochem Biophys* 503, 118-128
- Collet C, Schiltz C, Geoffroy V, Maroteaux L, Launay JM, de Vernejoul MC (2008): The serotonin 5HT_{2B} receptor controls bone mass via osteoblast recruitment and proliferation. *FASEB J* 22, 418-427
- Consensus development conference (1993): diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 94, 646-650
- Cosman F, Lindsay R (1999): Selective estrogen receptor modulators: clinical spectrum. *Endocr Rev* 20, 418-434
- Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A et al. (2009): Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 361, 756-765
- Deecher DC, Alfinito PD, Leventhal L, Cosmi S, Johnston GH, Merchenthaler I, Winneker R (2007): Alleviation of thermoregulatory dysfunction with the new serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor desvenlafaxine succinate in ovariectomized rodent models. *Endocrinology* 148, 1376-1383
- Delmas PD (1993): Biochemical markers of bone turnover. *J Bone Miner Res* 8 Suppl 2, S549-555
- Delmas PD (2000): Do we need to change the WHO definition of osteoporosis? *Osteoporos Int* 11, 189-191
- Delmonico MJ, Harris TB, Visser M, Park SW, Conroy MB, Velasquez-Mieyer P, Boudreau R, Manini TM, Nevitt M, Newman AB et al. (2009): Longitudinal study of muscle strength, quality, and adipose tissue infiltration. *Am J Clin. Nutr* 90, 1579-1585
- Dempster DW, Lindsay R (1993): Pathogenesis of osteoporosis. *Lancet* 341, 797-801
- Drake MT, Clarke BL, Khosla S (2008): Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc* 83, 1032-1045
- EFFO und NOF (1997): Who are candidates for prevention and treatment for osteoporosis? *Osteoporos Int* 7, 1-6
- Engelke K, Libanati C, Liu Y, Wang H, Austin M, Fuerst T, Stampa B, Timm W, Genant HK (2009): Quantitative computed tomography (QCT) of the forearm using general purpose spiral whole-body CT scanners: accuracy, precision and comparison

with dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). *Bone* 45, 110-118

Frost HM, Jee WS (1992): On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner* 18, 227-236

Garnero P, Delmas PD (1996): New developments in biochemical markers for osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 59 Suppl 1, S2-9

Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W (2009): Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature* 457, 219-223

Greendale G, Lee N, Arriola E (1999): The menopause. *Lancet* 353, 571-580

Guglielmi G, Scalzo G, de Terlizzi F, Peh WCG (1010): Quantitative ultrasound in osteoporosis and bone metabolism pathologies. *Radiol Clin North Am* 48, 577-588

Hammar M, Berg G, Fahraeus L, Larssoncohn U (1984): Climacteric symptoms in an unselected sample of Swedish women. *Maturitas* 6, 345-350

Han ZH, Palnitkar S, Rao DS, Nelson D, Parfitt AM (1996): Effect of ethnicity and age or menopause on the structure and geometry of iliac bone. *J Bone Miner Res* 11, 1967-1975

Haney EM, Warden SJ (2008): Skeletal effects of serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter inhibition: evidence from clinical studies. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 8, 133-145

Hannon R, Blumsohn A, Naylor K, Eastell R (1998): Response of biochemical markers of bone turnover to hormone replacement therapy: impact of biological variability. *J Bone Miner Res* 13, 1124-1133

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

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL (1999): Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 140, 4367-4370

Hsu YH, Venners SA, Terwedow HA, Feng Y, Niu T, Li Z, Laird N, Brain JD, Cummings SR, Bouxsein ML, et al. (2006): Relation of body composition, fat mass, and serum lipids to osteoporotic fractures and bone mineral density in Chinese men and women. *Am J Clin Nutr* 83, 146-154

Huiskes R, Ruimerman R, van Lenthe GH, Janssen JD (2000): Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature* 405, 704-706

Iqbal J, Sun L, Zaidi M (2009): Coupling bone degradation to formation. *Nat Med* 15, 729-731

Ivey JL, Baylink DJ (1981): Postmenopausal osteoporosis: proposed roles of defective coupling and estrogen deficiency. *Metab Bone Dis Relat Res* 3, 3-7

Jarry H, Harnischfeger G, Düker E (1985): Studies on the endocrine effects of the contents of *Cimicifuga racemosa* 2. In vitro binding of compounds to estrogen receptors. *Planta Med* 51, 316-319

Jarry H, Metten M, Spengler B, Christoffel V, Wuttke W (2003): In vitro effects of the *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055. *Maturitas* 44 Suppl 1, S31-38

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

Kanis JA, Johnell O (2005): Requirements for DXA for the management of osteoporosis in Europe. *Osteoporos Int* 16, 229-238

Kanis JA, Johnell O, De Laet C, Johansson H, Oden A, Delmas P, Eisman J, Fujiwara S, Garnero P, Kroger H et al. (2004): A meta-analysis of previous fracture and subsequent fracture risk. *Bone* 35, 375-382

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

Kapur P, Wuttke W, Seidlová-Wuttke D (2010 b): The *Cimicifuga racemosa* special extract BNO 1055 prevents hot flashes in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17, 890-894

Lee S, Lorenzo J (2006): Cytokines regulating osteoclast formation and function. *Curr Opin Rheumatol* 18, 411-418

Lewiecki EM (2010): Treatment of osteoporosis with denosumab. *Maturitas* 66, 182-186

Liu J, Burdette, JE, Xu H, Gu C, van Breemen RB, Bhat KP, Booth N, Constantinou AI, Pezzuto JM, Fong HH, et al. (2001): Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potetial treatment of menopausal symptoms. *J Agric Food Chem* 49, 2472-2479

Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y (2008): Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* 29, 403-440

Martin EA, Ritman EL, Turner RT (2003): Time course of epiphyseal growth plate fusion in rat tibiae. *Bone* 32, 261-267

Nelson HD (2008): Menopause. *Lancet* 371, 760-770

Nian H, Qin LP, Chen WS, Zhang QY, Zheng HC, Wang Y (2006): Protective effect of steroidal saponins from rhizome of *Anemarrhena asphodeloides* on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Acta Pharmacol Sin* 27, 728-734

- Painter SE, Kleerekoper M, Camacho PM (2006): Secondary osteoporosis: a review of the recent evidence. *Endocr Pract* 12, 436-445
- Raus K, Brucker C, Gorkow C, Wuttke W (2006): First-time proof of endometrial safety of the special black cohosh extract (*Actaea or Cimicifuga racemosa* extract) CR BNO 1055. *Menopause* 13, 678-691
- Recker RR, Davies KM, Dowd RM, Heaney RP (1999): The effect of low-dose continuous estrogen and progesterone therapy with calcium and vitamin D on bone in elderly women. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 130, 897-904
- Riggs BL, Melton LJ (1986): Involutional osteoporosis. *N Engl J Med* 314, 1676-1686
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ (1998): A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 13, 763-773
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ (2002): Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 23, 279-302
- Roodman GD (1993): Role of cytokines in the regulation of bone resorption. *Calcif Tissue Int* 53 Suppl 1, S94-98
- Rossmannith WG, Ruebberdt W (2009): What causes hot flushes? The neuroendocrine origin of vasomotor symptoms in the menopause. *Gynecol Endocrinol* 25, 303-314
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson R, Beresford SA, Howard B, Johnson K 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
- Roubenoff R (2001): Origins and clinical relevance of sarcopenia. *Can J Appl Physiol* 26, 78-89
- Rybaczyk LA, Bashaw MJ, Pathak DR, Moody SM, Gilders RM, Holzschu DL (2005): An overlooked connection: serotonergic mediation of estrogen-related physiology and pathology. *BMC Womens Health* 5, 12
- Seeman E (2002): Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet* 359, 1841-1850
- Seeman E (2008): Structural basis of growth-related gain and age-related loss of bone strength. *Rheumatology (Oxford)* 47 Suppl 4, iv2-8
- Seidlová-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T, Wuttke W (2003 a): 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, Becker T, Christoffel V, Wuttke W (2003 b):

Pharmacology of *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. *Maturitas* 44 Suppl 1, S39-50

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 (2010 a): Beta-ecdysone has bone protective but no estrogenic effects in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17, 884-889

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

Seidlová-Wuttke D, Wuttke M, Moses K, Senft A, Jarry H, Wiese KG, Wuttke W (2011) Comparison of effects of castration and vibration therapy of female and male rats on bone, muscle and fat tissue. (*Calcif Tissue Int*, im Druck)

Shen Y, Li YQ, Li SP, Ma L, Ding LJ, Ji H (2010): Alleviation of ovariectomy-induced osteoporosis in rats by *Panax notoginseng* saponins. *J Nat Med* 64, 336-345

Sirola J, Rikkinen T (2005): Muscle performance after the menopause. *J Br Menopause Soc* 11, 45-50

Spelsberg TC, Subramaniam M, Riggs BL, Khosla S (1999): The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. *Mol Endocrinol* 13, 819-828

Stearns V, Ullmer L, López JF, Smith Y, Isaacs C, Hayes D (2002): Hot flushes. *Lancet* 360, 1851-1861

Struck D, Tegtmeier M, Harnischfeger G (1997): Flavones in extracts of *Cimicifuga racemosa*. *Planta Med* 63, 289

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

Warden SJ, Bliziotis MM, Wiren KM, Eshleman AJ, Turner CH (2005): Neural regulation of bone and the skeletal effects of serotonin (5-hydroxytryptamine). *Mol Cell Endocrinol* 242, 1-9

Westbroek I, van der Plas A, de Rooij KE, Klein-Nulend J, Nijweide PJ (2001): Expression of serotonin receptors in bone. *J Biol Chem* 276, 28961-28968

Wronski TJ, Walsh C, Ignaszewski L (1986): Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 7, 119-123

Wronski TJ, Dann LM, Horner SL (1989 a) Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 10, 295-301

Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M (1989 b): Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 45, 360-366

Wuttke W, Seidlová-Wuttke D, Gorkow C (2003): The Cimicifuga preparation BNO 1055 vs. conjugated estrogens in a double-blind placebo-controlled study: effects on menopause symptoms and bone markers. *Maturitas* 44 Suppl 1, S67-77

Wuttke W, Gorkow C, Seidlová-Wuttke D (2006): Effects of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) on bone turnover, vaginal mucosa, and various blood parameters in postmenopausal women: a double-blind, placebo-controlled, and conjugated estrogens-controlled study. *Menopause* 13, 185-196

Yin j, Tezuka Y, Kouda K, Le Tran Q, Miyahara T, Chen Y, Kadota S (2004): In vivo antiosteoporotic activity of a fraction of *Dioscorea spongiosa* and its constituent, 22-O-methylprotodioscin. *Planta Med* 70, 220-226

Zhao H, Tian Z, Hao J, Chen B (2005): Extragonadal aromatization increases with time after ovariectomy in rats. *Reprod Biol Endocrinol* 3, 6

Zillikens MC, Uitterlinden AG, van Leeuwen JP, Berends AL, Henneman P, van Dijk KW, Oostra BA, van Duijn CM, Pols HA, Rivadeneira F (2010): The role of body mass index, insulin, and adiponectin in the relation between fat distribution and bone mineral density. *Calcif Tissue Int* 86, 116-125

Zych M, Folwarczna J, Pytlik M, Sliwinski L, Golden MA, Burczyk J, Trzeciak HI (2010): Administration of caffeic acid worsened bone mechanical properties in female rats. *Planta Med* 76, 407-411

8. Abbildungsverzeichnis		Seite
Abbildung 1.	Messlinie und Dichtebereiche bei der qCT - Auswertung	71
Abbildung 2.	Körpergewichte präovx versus ovx in CR und ihren Fraktionen	33
Abbildung 3.	Der Effekt von CR und ihren Fraktionen auf: endosteale Dichte in der Metaphyse der Tibia	35
Abbildung 4.	Der Effekt von CR und ihren Fraktionen auf: intraosteale Fläche in der Metaphyse der Tibia	36
Abbildung 5.	Der Effekt von CR und ihren Fraktionen auf: intraosteale Zirkumferenz in der Metaphyse der Tibia	37
Abbildung 6.	Der Effekt von CR und ihren Fraktionen auf: periosteale Zirkumferenz in der Metaphyse der Tibia	38
Abbildung 7.	Der Effekt von CR und ihren Fraktionen auf: kortikale Dichte in der Metaphyse der Tibia	39
Abbildung 8.	Der Effekt von CR und ihren Fraktionen auf: Kortikale Fläche in der Metaphyse der Tibia	40
Abbildung 9.	Der Effekt von CR und ihren Fraktionen auf: Serum OC in der Metaphyse der Tibia	41
Abbildung 10.	Korrelation OC und endosteale Dichte in der Metaphyse der Tibia	42
Abbildung 11.	Der Effekt von CR und ihren Fraktionen auf: Serum CL in der Metaphyse der Tibia	43
Abbildung 12.	Der Effekt von CR und ihren Fraktionen auf: Muskeldichte in der Metaphyse der Tibia	44
Abbildung 13.	Korrelation Körpergewicht und Muskeldichte in der Metaphyse der Tibia	45
Abbildung 14.	Der Effekt von CR und ihren Fraktionen auf: Muskelfläche in der Metaphyse der Tibia	46
Abbildung 15.	Der Effekt von CR und ihren Fraktionen auf: Fläche des paratibialen Fettdepots	47
Abbildung 16.	Korrelation Fläche des paratibialen Fettdepots und Leptin	48
Abbildung 17.	Der Effekt von CR und ihren Fraktionen auf: Anteil des paratibialen Fettdepots	49

9. Tabellenverzeichnis		Seite
Tabelle 1.	Definition der Osteoporose	12
Tabelle 2.	T-Score der Ratte	72
Tabelle 3.	Osteoporoseformen bzw. ihre Ursachen	73
Tabelle 4.	Risikofaktoren der Osteoporose	74
Tabelle 5.	Mittlere Futtermittelaufnahme eines Tieres pro Tag in Gramm und aufgenommene Substanz in Milligramm	28

Danksagung

Frau Priv.- Doz. Dr. med. D. Seidlová-Wuttke und Herrn Prof. Dr. med. W. Wuttke gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit in der Abteilung der klinischen und experimentellen Endokrinologie. Bedanken möchte ich mich nicht zuletzt auch für die umfassende und persönliche Betreuung durch Frau Priv.- Doz. Dr. med. D Seidlová-Wuttke. Mein Dank gilt weiterhin den medizinisch-technischen Assistentinnen der Abteilung, die mir bei der praktischen Durchführung der Experimente und deren Auswertung behilflich waren.