

Der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

eingereicht von Prof. Dr. med. W. Wuttke

*Antiosteoporotische und antiarthrotische Wirkung der
Cimicifuga racemosa BNO 1055/C001 sowie ihrer Fraktionen
und Subfraktionen auf den Knochen*

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Viktoria Bichok

aus

Cherson/Ukraine

Göttingen 2016

Diese Dissertation entstand in der Arbeitsgruppe Endokrinologie an der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen im Zeitraum von Februar 2011 bis Juli 2013.

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

I. Berichterstatterin: PD Dr. Dana Seidlová-Wuttke

II. Berichterstatter: PD Dr. Stephan Sehmisch

III. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. März 2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1. Osteoporose und Arthrose	1
1.1.1. Definition und Klassifikation der Osteoporose	2
1.1.2. Ursachen und Risikofaktoren der Osteoporose	3
1.1.3. Zweidimensionale Diagnostik der Knochenarchitektur	4
1.1.4. Hormonersatztherapie	6
1.1.5. Risikofaktoren der Arthrose	6
1.1.6. Knorpeldegeneration	7
1.1.7. Östrogenwirkung auf den Knorpel	8
1.1.8. Symptomatische Therapie der Arthrose	9
1.2. Kortikaler Knochen vs. trabekulärer Knochen	9
1.3. Epiphysenfuge	10
1.4. Östrogenmangel	11
1.5. Mein Modell: Die ovariectomized Ratte	11
1.6. <i>Cimicifuga racemosa</i>	13
1.7. Weitere Hypothesen zum Wirkmechanismus der <i>Cimicifuga racemosa</i>	15
1.8. Zielsetzung der Arbeit	17
2. Material und Methoden	18
2.1. Allgemeines zum Tierversuch	18
2.1.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen	18
2.1.2. Versuchsablauf und Testsubstanzen	19
2.2. Herstellung der Tibiapräparate für die histologische Auswertung	20
2.2.1. Fixierung, Dehydrierung und Einbettung in Acryl	20
2.2.2. Schneiden der Tibiapräparate und Aufziehen der Schnitte auf Objektträger	20
2.2.3. Entplastung und Goldner-Färbung	21
2.3. Histologische Auswertung der Tibia	21
2.3.1. Mikroskop und Computersoftware	21
2.3.2. Auswertung der Trabekelarchitektur im Metaphysenbereich	21
2.3.3. Messung der Knorpeldicke am proximalen Tibiaende	23

2.3.4. Messung der drei Epiphysenfugenzonen – Zone des ruhenden Knorpels, Säulenknorpelzone und Blasenknorpelzone	24
2.4. Statistische Auswertung	25
3. Ergebnisse	26
3.1. Körpergewicht der Tiere	26
3.2. Auswertung der Trabekelarchitektur im Metaphysenbereich	27
3.2.1. Knotenanzahl	28
3.2.2. Anzahl der freien Enden	29
3.2.3. Verhältnis Knoten/freie Enden	30
3.2.4. Anzahl der Verbindungsstücke	31
3.3. Knorpeldicke am proximalen Tibiaende	32
3.4. Epiphysenfuge	33
3.4.1. Epiphysenfuge gesamt	33
3.4.2. Zone des ruhenden Knorpels	34
3.4.3. Säulenknorpelzone	35
3.4.4. Blasenknorpelzone	36
4. Diskussion	37
4.1. Trabekelarchitektur	38
4.2. Knorpel	41
4.3. Epiphysenfuge	43
5. Zusammenfassung	45
6. Anhang	47
6.1. Tabellen	47
6.2. Abbildung 6.1.	50
6.3. Abbildungsverzeichnis	51
7. Literaturverzeichnis	53

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BMD	Bone Mineral Density
C001/S, S1-3	Saponinfraktion des Extraktes <i>Cimicifuga racemosa</i> BNO 1055 und dessen Subfraktionen S1-3
C001/R, R1-3	Restfraktion des Extraktes <i>Cimicifuga racemosa</i> BNO 1055 und dessen Subfraktionen R1-3
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
CR	<i>Cimicifuga racemosa</i>
ES COP	European Scientific Cooperative on Phytotherapy
ER	Östrogenrezeptor
E2	17- β -Östradiol
g	Gramm
HET	Hormonersatztherapie
IL	Interleukin
Ko	Kontrollgruppe
mg	Milligramm
MRT	Magnetresonanztomographie
NIH	National Institutes of Health
nodes	Trabekelknoten
NSAR	nicht-steroidales Antirheumatikum
N/T	Nodes/Termini, Quotient zur Beurteilung der Trabekelkonnektivität
OPG	Osteoprotegerin
Ovx, ovx	Ovarektomie, ovarektomiert
p	Signifikanzniveau
SERM	Selective Estrogen Receptor Modulator
SSRI	Selective Serotonin Reuptake Inhibitor
Strut	Netzwerk von zweidimensionalen Komponenten
Tab.	Tabelle
termini	freies Ende des Trabekel
WHI	Women's Health Initiative
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

Es gibt verschiedene Therapiemöglichkeiten für die postmenopausale Osteoporose. Einige Therapien sind zwar effektiv, aber durch Nebenwirkungen, gleichzeitige Komorbidität und unzureichende langfristige Compliance gekennzeichnet. Die Behandlung der Arthrose beinhaltet bis heute nur die symptomatische Therapie. Daher besteht erheblicher Forschungsbedarf zur Prävention der postmenopausalen Osteoporose sowie der Arthrose. Derzeit werden Pflanzenstoffe wie *Cimicifuga racemosa* (CR) intensiv untersucht. Meine Dissertation beinhaltet tierexperimentelle Untersuchungen der antiosteoporotischen und antiarthrotischen Wirkungen der CR BNO 1055/C001 sowie ihrer Fraktionen und Subfraktionen. Als anerkanntes Tiermodell diente die Ratte. Sie ist ein etabliertes, weit verbreitetes Modell für postmenopausalen Knochenverlust (Kalu 1991, Casari et al. 1997).

1.1. Osteoporose und Arthrose

Aufgrund der Gesundheitskosten und der epidemiologischen Faktoren hat die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die Osteoporose zu einer der 10 wichtigsten Erkrankungen der Gegenwart erklärt. Erhebungen der WHO-Studiengruppe haben gezeigt, dass in den wohlhabenden Staaten der Erde mehr als eine von vier Frauen, älter als 70 Jahre, eine osteoporotische Fraktur erleidet. Das individuelle Risiko, im Laufe des Lebens einen handgelenksnahen Unterarmbruch, eine Schenkelhalsfraktur oder einen Wirbelbruch zu bekommen, lässt sich mit etwa 15% errechnen und findet sich damit im Bereich des Risikos für koronare Herzerkrankungen (Götte und Dittmar 2001).

Im Zuge des demographischen Wandels nimmt der Anteil alter Menschen in den Industrienationen stetig zu. Mit dem Alter kommt es zum Verlust von Knochengewebe und zum Anstieg der Knochenfragilität, die zu Knochenbrüchen führt. In den letzten Jahren ist diese Problematik zu einer großen gesundheitlichen Gefahr geworden. Es leiden mehr als 200 Millionen Menschen weltweit unter Osteoporose. Sie hat die höchste Inzidenz aller Krankheiten in der älteren Bevölkerung (Rachner et al. 2011). Osteoporose hat finanzielle, physische und psychosoziale Folgen, die erhebliche Auswirkungen auf den Einzelnen, die Familie und auf

die Gemeinschaft haben. Unter den 7,8 Mio. in Deutschland lebenden Osteoporosepatienten (Heberlein 2011) erleiden etwa 330.000 Menschen einen Knochenbruch (Försch et al. 2014). In den USA hat die National Osteoporosis Foundation geschätzt, dass derzeit 44 Mio. Menschen über dem 50. Lebensjahr an Osteoporose und ihrer Vorstufe, der Osteopenie, leiden. Nach weiteren Schätzungen wird sich diese Zahl bis zum Jahre 2020 um 1/3 auf 61 Mio. erhöhen (Dolbow et al. 2013).

Da es sich bei Ratten um Quadrupeden handelt, neigen die Versuchstiere im Gegensatz zu einer osteoporotischen Frau nicht zu einer Frakturanfälligkeit, obwohl sich die pathophysiologischen Mechanismen unter Östrogenmangel ähneln. Bei strenger Betrachtung dürfte daher die Ratte nicht als Modell für die postmenopausale Osteoporose bezeichnet werden. Stattdessen dient sie als Modell für postmenopausalen Knochenverlust, da nur bei einer Frau die per Definition festgelegten klinischen Erscheinungsbilder eintreten (Feldhaus 2006).

Arthrose zählt wie Osteoporose zu den häufigsten chronischen Erkrankungen mit einer geschätzten Gesamtprävalenz in der erwachsenen Allgemeinbevölkerung von 11 % bis 24 % (Pereira et al. 2011). Die Prävalenz der Arthrose steigt mit zunehmendem Alter bei Männern und Frauen. Zudem erhöht sich die Inzidenz drastisch nach der Menopause (Sniekers et al. 2010). Die Erkrankung betrifft vor allem Gewicht tragende Gelenke wie Wirbelsäule, Hüfte und Knie (Coggon et al. 2001). Dabei kommt es zu erheblichen Schmerzen und Behinderungen, was nach einer gewissen Zeit einen Hüft- oder Kniegelenk-Ersatz erfordern kann (Bingham et al. 2006). Bei den Ratten hat die Ovx ebenfalls schädliche Auswirkungen auf das Knorpelgewebe, indem sie zur Ausdünnung des Knorpels führt. Daher ist die ovariectomierte (ovx) Ratte ein gutes Modell für Studien der Arthrose (Kapur et al. 2010, Seidlová-Wuttke et al. 2012b).

1.1.1. Definition und Klassifikation der Osteoporose

Der Begriff der Osteoporose wurde von der Consensus Development Conference 1993 wie folgt definiert: Es ist eine systemische skelettale Erkrankung mit einer niedrigen Knochenmasse, mikroarchitektonischen Verschlechterung des Knochengewebes, die zu einer erhöhten Knochenbrüchigkeit und einer konsequenten Erhöhung des Fraktur-Risikos führt (Consensus Development Conference 1993).

Es existieren verschiedene Einteilungen bzw. Klassifikationen der Osteoporose mit jeweils unterschiedlichen Ursachen für die Erkrankung.

Die Osteoporose wird in eine primäre und eine sekundäre Form unterteilt. Die primäre Osteoporose kann bei beiden Geschlechtern und in allen Altersgruppen auftreten. Meistens tritt die primäre Osteoporose bei Frauen im mittleren Lebensalter, nämlich nach dem Abfall der Östrogene auf. Bei Männern hingegen kommt sie erst im höheren Lebensalter vor. Im Gegensatz zur primären Form ist der sekundären Osteoporose meistens eine präzise Ursache zugeordnet. Als Ursache kommen diverse Erkrankungen in Frage, wie z. B. Cushing Syndrom, Hyperthyreose, primärer Hyperparathyreoidismus, Diabetes mellitus, verschiedene maligne Erkrankungen, Medikamente, z. B. Glukokortikoide, Methotrexat und andere Ursachen, z. B. Alkoholabusus, Immobilisation (NIH Consensus Development 2001).

1.1.2. Ursachen und Risikofaktoren der Osteoporose

Die größte Knochenmasse beim Menschen wird in der dritten Lebensdekade erreicht. Danach geht der Knochen in Höhe von 0,6 bis 1 % pro Jahr für den Rest des Lebens verloren (Banu et al. 2012). Sowohl Frauen als auch Männer erleben einen altersbedingten Rückgang der Bone Mineral Density (BMD). In den ersten Jahren nach der Menopause haben Frauen einen rascheren Knochenverlust, was zu einem früheren Frakturrisiko führt. Viele Studien bestätigen, dass eine späte Menarche, ein frühes Klimakterium oder gar ein niedriger endogener Östrogenspiegel für einen niedrigen BMD verantwortlich sind (NIH Consensus Development 2001). Nach der Menopause mit abruptem Abfall der Östrogenkonzentration kommt es zu einem beschleunigten Schwund der Knochenmasse von jährlich bis zu 4 %. Entsprechend verliert die Frau in der Peri- und der frühen Postmenopause 10–20 % ihrer Gesamtknochenmasse (Bartl und Thaler 2007). Aufgrund des Östrogenmangels zeigt sich bei den Frauen eine frühe und später langsame Phase des Knochenverlustes. Diese akzelerierte Phase des Knochenverlustes tritt vor allem während der ersten 3 bis 5 Jahre nach der Menopause auf. Der Verlust ist vor allem an den trabekulären Strukturen des Knochens sichtbar. Die anschließende langsame Phase des Knochenverlustes betrifft sowohl den trabekulären als auch den kortikalen Knochen. Die Veränderungen des kortikalen Knochens sind vor allem am distalen Radius, an der distalen Tibia sowie am Schenkelhals zu sehen. Der trabekuläre Kno-

chenverlust beginnt zuerst an der Wirbelsäule. Von hier schreitet die Osteopenie fort und findet sich dann auch an den anderen Regionen des Körpers (Khosla et al. 2011).

Entsprechend führt die reduzierte spongiöse Knochenstabilität zu Wirbelkörperfrakturen. Dagegen ist die abnehmende Kortikalisschicht mit einem erhöhtem Risiko für Frakturen der langen Röhrenknochen verbunden (Jordan et al. 2000, Bousson et al. 2001).

Weitere Prädiktoren für eine niedrige Knochenmasse sind weiße Rasse, niedriger Body Mass Index, Osteoporose in der Familienvorgeschichte, Rauchen, Alkoholkonsum, übermäßiger Konsum von koffeinhaltigen Getränken oder eine vorhergehende Fraktur (NIH Consensus Development 2001).

Die Ratte hat eine durchschnittliche Lebenserwartung von 1 – 2 Jahren. Ihre Geschlechtsreife erreicht sie im Alter von ca. einem Monat (Hedrich 2000). Unter physiologischen Bedingungen entwickelt sie keinen klimakterischen Hormonzustand (Bellino 2000). Durch die Ovx wird eine künstliche Menopause herbeigeführt. Die Ovx verursacht einen Östrogenmangel, welcher ebenfalls zum Knochenverlust führt. Dieser induzierte Prozess ähnelt sehr dem postmenopausalen Knochenverlust bei Frauen. Es kommt zum erhöhten Knochenumsatz mit vermehrter Resorption und verminderter Knochenneubildung (Kalu 1991).

1.1.3. Zweidimensionale Diagnostik der Knochenarchitektur

Die zunehmende Verwendung von densitometrischen Geräten für die Beurteilung der Knochenbrüchigkeit hat mit der Zeit die Annahme verstärkt, dass Knochenmasse die wichtigste Eigenschaft für die Bestimmung der mechanischen Kompetenz des Knochens sei. Tatsache ist aber, dass Struktur und Mikroarchitektur auch relevante Aspekte der Knochenstärke darstellen (Dalle Carbonare et al. 2005). Die strukturellen Determinanten der Knochenfestigkeit im kortikalen Knochen sind die Breite und die Porosität. Im trabekulären Knochen sind es die Form, die Breite und die Konnektivität der Trabekel. Es konnte beobachtet werden, dass die trabekuläre Struktur durch die altersbedingte Involution in ihrer Anzahl und Konnektivität abnimmt, die Breite der restlichen Trabekel aber zunimmt. Im Laufe des Lebens verringert sich insbesondere die Anzahl der horizontal ausgerichteten Trabekel. Während die vertikalen Trabekel langsamer resorbiert werden, neigen sie dazu, mit dem Alter in der Breite zu zunehmen (Aktinson 1967). Diese biomechanischen Eigenschaften des Knochens sind wichtige Informationen über den Status der Zerbrechlichkeit des Skeletts. Folglich gibt es ein wach-

sendes Interesse an der quantitativen Bewertung dieses morphologischen Aspektes des Knochens.

Es gibt mehrere Methoden für die Bestimmung der Knochenarchitektur, insbesondere auf trabekulärer Ebene, um die Organisation des Knochens im Raum zu erkennen und die Komplexität seiner Struktur quantitativ zu messen (Dalle Carbonare et al. 2005).

1. Optische Mikroskopie – basiert auf den Grundsätzen der Histomorphometrie (quantitative Histologie). Hier kann die Mikroarchitektur auf zweidimensionalen Knochenabschnitten bestimmt werden (Parfitt 1983).
2. Neuere stereologische Methoden, die wertvolle Informationen über die Anbindung von trabekulären Knochen und über die Komplexität des Netzwerkes liefern können (Garrahan et al. 1986).
3. Modernste Diagnosetechniken. Nicht-invasive Techniken wie quantitative Computertomographie, besonders hochauflösende Computertomographie, volumetrische quantitative Computertomographie und hochauflösende Magnetresonanztomographie. Mithilfe dieser Diagnosetechniken kann die Mikroarchitektur auch beurteilt werden (Feldkamp et al. 1989, Müller et al. 1998, Laib et al. 2002).

In der vorliegenden Studie basieren die Untersuchungen des trabekulären Knochens auf der sogenannten Strut-Analyse. Durch den Prozess der „Skelettierung“ des trabekulären Knochens ist es möglich, ein Netzwerk von zweidimensionalen Komponenten (Strut) für eine berechnete Analyse zu erhalten. Es wird die Anzahl der trabekulären Verbindungen auf zweidimensionalen Abschnitten errechnet. Die Verbindung zwischen drei oder mehr Trabekel bildet einen Knoten. Wenn eine Trabekel einheit unterbrochen wird, wird es als „freies Ende“ (Parfitt et al. 1987, Day et al. 2004) oder „termini“ bezeichnet. Je höher die Interkonnektivität ist, welche sich durch eine erhöhte Anzahl von Knoten darstellt, desto höher ist die Fragmentierung des trabekulären Netzes (Le et al. 1992). Im Hinblick auf die Beziehung zwischen Mikroarchitektur und Frakturen bestätigen Beobachtungen, dass mikrostrukturelle Änderungen wichtige Determinanten der Knochenbrüchigkeit, unabhängig von der Knochendichte, sind (Hordon et al. 2000, Legrand et al. 2000, Audran et al. 2001).

Abschließend kann über die Strut-Analyse gesagt werden, dass es durch sie möglich ist, die Mikroarchitektur des Knochens genau zu studieren. Mikroarchitektur ist ein wichtiges Ele-

ment der Knochenqualität, welches die mechanische Kompetenz des Knochens unterstützt. Die Bewertung der Mikroarchitektur ist nützlich für die Abschätzung des Bruchrisikos. Ferner ermöglicht es den Wirkmechanismus eines Therapeutikum zu bewerten (Dalle Carbonare et al. 2005).

1.1.4. Hormonersatztherapie

Die Hormonersatztherapie (HET) als Östrogen-Gestagen-Kombination sowie alleinige Östrogene wirken gut gegen Knochenverlust, aufgrund ihrer Nebenwirkungen sind die Hormone nicht geeignet für eine Osteoporoseprävention (Rossouw et al. 2002). In tierexperimentellen Studien konnte bei ovx Ratten beobachtet werden, dass die verabreichten Östrogene vollständig den Knochenumsatz sowie den Knochenverlust blockieren (Thompson et al. 1995). Ebenfalls kann die spongiöse Osteopenie nach Ovx durch Östrogensatz verhindert werden (Kalu et al. 1989). Daher wurde früher eine HET zur allgemeinen Frakturprophylaxe angewendet. Allerdings beinhaltet die HET viele ernstzunehmende Nebenwirkungen. In der großen epidemiologischen WHI-Studie mit langfristiger hormoneller Ersatztherapie konnte beobachtet werden, dass die HET ein deutlich erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen mit sich bringt. Unter anderem kann es auch zur Entwicklung eines invasiven Mammakarzinoms führen (Rossouw et al. 2002).

1.1.5. Risikofaktoren der Arthrose

Arthrose zeichnet sich durch fokalen, hyalinen Knorpelverlust, subchondrale Sklerose, Osteophytenbildung und in einigen Fällen durch Synovitis mit Beteiligung der periartikulären Strukturen aus (Westacott 2002, Bingham et al. 2006, Baker-LePain und Lane 2012). Die Änderungen im Gelenkknorpel kennzeichnen sich durch den Anstieg des Wassergehaltes, den Verlust der Proteoglycane und die Störung der Kollagenfaser (Buckwalter und Mankin 1998).

Es ist eine multifaktorielle Erkrankung, zu der mehrere Faktoren, wie z.B. Alter, Geschlecht, Trauma und Adipositas, beitragen. Zu den einflussreichsten, aber veränderbaren Risikofaktoren gehört Adipositas. Es führt unter anderem zu einer erhöhten mechanischen Beanspruchung auf den Tibio-femorale Knorpel (Bliddal et al. 2011). Außerdem häufen sich in letzter

Zeit die Beweise, dass Adipositas auch zur Fettansammlung in den Gelenken führt. Die Adipozyten im Fettpolster der Gelenke haben gleiche negative Merkmale wie die viszeralen Fettzellen. Sie sezernieren pro-inflammatorische Zytokine und verursachen lokale Entzündungsprozesse in den Gelenken. Die sezernierten Zytokine hemmen die Reifung der Chondrozyten durch entzündliche Prozesse und führen zur erhöhten Bildung der Matrix-Metalloproteinasen (Enzyme). Diese zerstören die Struktur des Gelenkknorpels (Rai und Sandell 2011, Gandhi et al. 2011, Klein-Wieringa et al. 2011). Daher ist die Arthrose nicht nur eine degenerative Erkrankung durch mechanische Kompression des Knorpels, sondern auch beeinflusst durch entzündliche Komponenten, die genauso wichtig in der Entwicklung und im Fortschreiten dieser Krankheit sind (Chen und Heiman 2001, Seidlová-Wuttke et al. 2003a, Zoth et al. 2010, Gorres et al. 2011).

1.1.6. Knorpeldegeneration

Auch der subchondrale Knochen scheint eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Kniearthrose zu spielen. Burr (2004) berichtet, dass Mikrorisse im subchondralen Knochen, die durch mechanische Überlastung entstehen, zur knöchernen Sklerose führen. Bei der Entstehung der knöchernen Sklerose, im Sinne eines Reparaturvorganges, kommt es zur Anregung des Knochenumsatzes. Dieser führt zur Verschlechterung des subchondralen Knochens mit Rückgang der trabekulären Dicke und Abnahme der Knochenmineraldichte. Der Prozess führt zur Progression der Arthrose (Burr 2004). Eine in vivo durchgeführte MRT-Untersuchung am Kniegelenk von Arthrosepatienten zeigte im Vergleich zu gesunden Patienten erhebliche Unterschiede in der trabekulären Knochenstruktur (Lindsey et al. 2004, Blumenkrantz et al. 2004). Die Verdünnung der einzelnen Trabekel im Durchmesser kann auch in den CT-Bildern gesehen werden (Chiba et al. 2011).

Über den genauen Mechanismus zwischen Knorpeldegeneration und Degeneration des subchondralen Knochens bei der Entstehung einer Arthrose lässt sich noch nicht viel sagen. Die meisten klinischen und experimentellen Studien haben sich einzeln mit dem Fortschreiten der Arthrose beschäftigt. Nur wenige Studien haben sich mit dem Zusammenhang der Arthrose und Degeneration des subchondralen Knochens befasst. In der Studie von Muraoka und Kollegen (2007) wurde die Beziehung zwischen Knorpel und subchondralem Knochen vor

und nach Beginn der Knorpeldegeneration ausgewertet. Im Ergebnis konnte festgestellt werden, dass der subchondrale Knochen zerbrechlich vor dem Einbruch der Knorpeldegeneration wird. Dieses führt zur erhöhten Knochenbildung und verursacht eine Steifigkeit des subchondralen Knochens (Muraoka et al. 2007). Die erhöhte Steifigkeit reduziert die stoßdämpfende Fähigkeit des subchondralen Knochens, was zur Induktion der Knorpel-Degeneration führt (Pugh et al. 1973).

1.1.7. Östrogenwirkung auf den Knorpel

Frühere Studien konzentrierten sich hauptsächlich auf die sekundär entstandene Arthrose durch ein Trauma. Das Ergebnis aus der posttraumatisch entstandenen Arthrose kann nicht auf die primäre, insbesondere im Zusammenhang mit den Wechseljahren stattgefundenene Arthrose, angewendet werden. Da hier der subchondrale Knochen eine wichtige Rolle spielt (Baker-LePain und Lane 2012) scheinen Östrogene nicht nur eine positive Auswirkung auf den Knochen, sondern auch auf den Knorpel, zu haben. Bei ovx Ratten konnte beobachtet werden, dass Östrogenmangel eine Dickenverminderung des Knorpelgewebes im Kniegelenk bewirkt (Seidlová-Wuttke et al. 2012b). In der Studie von Sniekers et al. (2010) wurde ebenfalls nachgewiesen, dass ein Verlust der Östrogene nach Ovx der Ratte zu einem beträchtlichen Knorpelschaden an der Patella sowie zu einem subchondralen Knochenverlust führt. Anschließende Supplementierung der Ratten mit Östrogenen mildert diesen Effekt bzw. verhindert ihn. In anderen Studien wurde der tibiale Knorpelschaden nach Ovx alleine nicht beeinträchtigt (Sniekers et al. 2010). Es bleibt noch ungewiss, ob und welche Beziehung zwischen Osteoporose und Arthrose besteht (Zhu et al. 2013).

Einige Studien bestätigen in Tiermodellen und am Menschen, dass die systemische Osteoporose eine Rolle bei der Pathogenese einer Arthrose spielt (Calvo et al. 2007, Bellido et al. 2010). Es handelt sich dabei um eine metabolische Dysfunktion des Knochens und nicht um eine mechanische „Verschleiß-Erkrankung“ des Knorpels (Mansell et al. 2007).

1.1.8. Symptomatische Therapie der Arthrose

Die pharmakologische Therapie für Arthrose richtet sich derzeit nach der Symptomkontrolle. Analgetika, nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) und Cyclooxygenase 2- (COX-2-) Hemmer kommen zum Einsatz. Gewichtsverlust, physikalische Therapie und sportliche Aktivität sind ebenfalls wichtige Bestandteile der Behandlung. Bisher gab es wenige Anhaltspunkte für Therapien, die den Krankheitsprozess verlangsamen können (Bingham et al., 2006).

1.2. Kortikaler Knochen vs. trabekulärer Knochen

Messungen der trabekulären Knochendichte zwischen dem 20. und 80. Lebensjahr haben gezeigt, dass die Knochendichte bei Frauen in diesem Zeitraum um durchschnittlich 50 % abnimmt. Der „physiologische“ Knochenschwund beim Menschen ist offensichtlich genetisch vorprogrammiert. Bereits Jahre vor der Menopause findet bei Frauen ein progredienter Knochenverlust statt und zwar in einem Zeitraum, in dem der Östrogenspiegel normal ist (Bartl und Thaler 2007). Da der trabekuläre Knochen Östrogenrezeptoren enthält und der Verlust der Spongiosa - zumindest vorübergehend - in der Postmenopause zunimmt, führte dies zu der Erkenntnis, dass der trabekuläre Knochen durch das Hormon geregelt sein muss. Der trabekuläre Knochen scheint einen höheren Schwellenwert gegenüber den Östrogenen zu haben, als der kortikale Knochen (Khosla et al. 2011). Anscheinend sind im Gegensatz zum kortikalen Knochen höhere Östrogenspiegel für den Erhalt des trabekulären Knochens notwendig (Windahl et al. 2001).

Auch bei der Ratte ist vor allem der trabekuläre Knochen Angriffsort des beschleunigten und intensiven Knochenverlustes (Wronski et al. 1985). Die ersten Knochenveränderungen in der proximalen Tibiametaphyse sind bereits 14 Tage nach Ovx erkennbar. Der frühe schnelle Knochenmasseverlust hält bis etwa 3 Monate nach Ovx an (Wronski et al. 1988). Dabei geht die Trabekelkonnektivität verloren, während die Trabekeldicke annähernd konstant bleibt (Dempster et al. 1995). Auf lange Sicht kann auch der kortikale Knochen, jedoch in meist geringer Ausprägung, in entsprechende Veränderungen involviert sein (Danielsen et al. 1993).

Dieses Phänomen kann durch die Gabe von Östradiol verhindert werden (Seidlová-Wuttke et al. 2003a, Kapur et al. 2010)

1.3. Epiphysenfuge

Das Längenwachstum der Röhrenknochen findet nahezu ausschließlich im Bereich ihrer Enden, an der sogenannten Epiphysenfuge, statt. Diese befindet sich zwischen der Epiphyse und der Metaphyse. Von einem gelenknahen Zellreservoir aus proliferieren Chondrozyten und ordnen sich in Zellsäulen, dem sog. Säulenknorpel an. Zur Metaphyse hin werden die Zellen größer. Die verbliebenen longitudinalen Knorpelmatrixleisten verkalken und werden schließlich durch Knochenlamellen ersetzt (Milz et al. 2002, Hefti 2006). Im histologischen Bild zeigt sich eine charakteristische Gliederung der Epiphysenfuge in 3 Zonen:

- Zone der ruhenden Zellen / Reservezone
- Zone des Säulenknorpels / Proliferative Zone
- Zone des Blasenknorpels / Hypertrophe Zone (Nilsson et al. 2005)

Bei Menschen beider Geschlechter ist die Epiphysenfuge für das Wachstum in der Pubertät verantwortlich. Die wichtigste Rolle aus der Hormonreihe spielen dabei die Östrogene. Diese stimulieren die Chondrogenese in der Epiphysenfuge und induzieren die Einsprossung von Gefäßen und Osteoblasten (Grumbach 2000). Der pubertäre Wachstumsschub wird jedoch durch niedrige Östrogenlevel verursacht. Bei wieder ansteigenden Östrogenwerten erfolgt die langsame Verknöcherung der Fuge. Dieser Prozess wird also ausschließlich durch Östrogene gesteuert. Bei Störungen der lokalen Östrogenrezeptoren kommt es deswegen zu Großwuchs und zu Osteoporose (Van der Eerden et al. 2003). Männliche Jugendliche europäischer Herkunft haben den Fugenschluss frühestens mit 16 Jahren. Bei weiblichen Jugendlichen, unabhängig ihrer Herkunft, sind diese mit spätestens 16 Jahren geschlossen (Crowder und Austin 2005).

Die Ratte als häufig verwendetes Tiermodell für das Studium der Wachstumsfuge repräsentiert die menschliche Epiphysenfuge schlecht. Einer der offensichtlichsten Unterschiede ist, dass bei Nagetieren kein Epiphysenfugenschluss am Ende der sexuellen Reife stattfindet (Nilsson et al. 2003). Bei weiblichen Ratten hört das Wachstum an der proximalen Tibia mit 15 Monaten auf (Erben 1996, Jee und Yao 2001). Bei einer durchschnittlichen Lebenserwartung von 12 – 24 Monaten (Hedrich 2000) zeigt das Rattenskelett also ein fast anhaltendes Längenwachstum (Lelovas et al. 2008).

1.4. Östrogenmangel

Östrogenmangel gehört zu den häufigsten Ursachen der Osteoporose bei Frauen. Erstmals wurde die postmenopausale Osteoporose aufgrund des Östrogenmangels von Albright und Kollegen (1941) erkannt (Albright et al. 1941). Die wichtigsten natürlichen Östrogene fallen nach der Menopause um 10 - 15 % ihrer prämenopausalen Konzentration im Serum ab (Khosla et al. 1997).

Östrogene sind wichtige Regulatoren des Knochenstoffwechsels. Sie gewährleisten ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Knochenresorption und -synthese, indem sie die Knochenresorption durch Reduktion der Osteoklastenzahl sowie durch die Osteoklastenaktivität hemmen. Dadurch beeinflussen sie die Osteoblastenfunktion für die Knochensynthese positiv (Manolagas 2000, Compston 2001). Durch den Östrogenmangel gerät das Gleichgewicht auf zellulärer Ebene außer Balance. Es kommt zum Knochenverlust (Sambrook und Cooper 2006). Der daran beteiligte Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Es ist unter anderem bekannt, dass Östrogenmangel zu einer Zunahme der Immunfunktion führt. Die daran beteiligten Faktoren sind T-Zellen, Antigen präsentierte Zellen, Zytokine wie Tumornekrosefaktor, Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-7 und Transforming Growth Factor- β (Pacifi 2007).

1.5. Mein Modell: Die ovariectomierte Ratte

Die ovx weibliche Ratte gilt seit Jahren aufgrund ihrer Angemessenheit, Bequemlichkeit und Relevanz als etabliertes Tiermodell des postmenopausalen Knochenverlustes. Durch Ovx der Ratte wird die körpereigene Östrogensynthese überwiegend unterbunden. Dies entspricht dem Zustand der Frau nach der Menopause. Sowohl die ovx Ratte als auch die Frau in der Postmenopause zeigen nach Verlust der ovariellen Funktion ähnliche Reaktionen auf den Knochenstoffwechsel (Wronski et al. 1991, Frost und Jee 1992, Turner et al. 2001, Seidlová-Wuttke et al. 2003a). Ebenfalls weisen ovx Ratten ähnliche Reaktionen auf therapeutisch wirksame Substanzen auf wie Frauen in ihrer postmenopausalen bzw. osteoporotischen Phase (Lindsay 1988). Im Jahre 1994 hat die amerikanische Food and Drug Administration die ovx Ratte als Modell für die Medikamentenforschung für die Behandlung und die Prophylaxe der Osteoporose zugelassen (US FDA 1994).

Kalu hat 1991 zwei verschiedene Modelle für die Standardisierung des Versuchsmodells der ovx Ratte vorgestellt, nämlich das *mature rat model*, bei dem drei Monate alte Ratten, und das *aged rat model*, bei dem 12 Monate alte Ratten, verwendet werden. Die postmenopausale Osteoporose ist eine Erkrankung der erwachsenen Frau. Das spricht für den Einsatz der älteren Tiere mit abgeschlossenem Knochenwachstum. Allerdings kann bei älteren Ratten ein durch Ovx ausgelöster Knochenschwund zusätzlich durch alters- und krankheitsbedingte Ursachen überlagert werden. Auch die wesentlich längere Zeitdauer, bis der histologisch nachweisbare Knochenverlust der älteren Tiere in Erscheinung tritt und die damit verbundenen höheren Anschaffungskosten sowie die Verfügbarkeit sprechen für die Verwendung jüngerer Tiere (Kalu 1991). Die ersten Knochenveränderungen in der proximalen Tibiametaphyse sind bereits 14 Tage nach Ovx erkennbar (Wronski et al. 1988). Dabei entsprechen die Knochenverhältnisse in etwa denen der postmenopausalen Frau. Es resultiert ein erhöhter Knochenumsatz mit einem negativen Knochengleichgewicht, was letztendlich zum Knochenverlust führt (Wronski et al. 1989). Vor allem beim trabekulären Knochen kann der beschleunigte und intensive Knochenverlust beobachtet werden (Wronski et al. 1985). Entsprechend dem bei der postmenopausalen Frau beobachteten zweiphasigen Knochenmassenverlust - mit dem schnellen und anschließenden langsamen Rückgang - konnte dies bei ovx Tieren ebenfalls beobachtet werden (Wronski et al. 1989).

Ovx Tiere zeigen ebenfalls schädliche Auswirkungen auf das Knorpelgewebe mit Ausdünnung der Knorpelschicht. Für die Studie der Arthrose scheint die ovx Ratte ein gutes Tiermodell zu sein (Kapur et al. 2010), da Ovx bei Ratten sowohl die Osteoporose als auch die Arthrose induzieren kann (Zhu et al. 2013).

Eine Einschränkung in der Forschung und keinen Vergleich zum Menschen stellt die ovx Ratte mit ausbleibenden Epiphysenfugenschluss dar. Folglich zeigt das Rattenskelett ein anhaltendes Längenwachstum (Lelovas et al. 2008).

1.6. *Cimicifuga racemosa*



Abb. 1.1 *Cimicifuga racemosa*

Der Abdruck erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Firma Bionorica® SE, Neumarkt, Deutschland

Cimicifuga racemosa (*Actaea Racemosa*, Traubensilberkerze, *black cohosh*) ist eine mehrjährige Heilpflanze aus Nordamerika, die seit Jahrhunderten in der indigenen Medizin zur Behandlung verschiedener Beschwerden wie Erkältung, Rheuma oder Hitzewallungen in den Wechseljahren angewendet wird. Heute zählen zu den akzeptierten Behandlungen mit *CR* Wechseljahrbeschwerden sowie neurovegetative und emotionale Symptome. Für die Therapie werden Auszüge aus dem Wurzelstock verwendet. *CR*-Extrakt wurde im Jahr 2003 von der Europäischen wissenschaftlichen Genossenschaft für Phytotherapie (ESOP) als pharmakologisch wirksame Therapie klimakterischer Symptome anerkannt. (McKenna et al. 2001). Im Jahr 2010 hat der *CR*-Extrakt von der Europäischen Arzneimittel-Agentur einen allgemeinen Verwendungsstatus erhalten (Schellenberg et al. 2012)

In vielen Studien wurde ein positiver Effekt des *CR*-Extraktes beobachtet und nachgewiesen. Eine Übereinstimmung in mehreren Studien besteht darin, dass *CR*-Extrakt signifikant die Häufigkeit und Intensität von Hitzewallungen, sogenannte *hot flashes*, bei postmenopausalen Frauen verringert (Wuttke et al. 2003, Frei-Kleiner et al. 2005, Osmers et al. 2005). Ebenfalls führt er zur Reduktion einer Depression in einem Mausmodell und schützt den Knochen vor übermäßiger Resorption bei Ratten und Mensch nach Ovx bzw. während der Peri-

menopause (Winterhoff et al. 2003, Seidlová-Wuttke et al. 2003a, Wuttke et al. 2003). Die Überprüfung nach Nebenwirkungen der Traubensilberkerze ergab in klinischen Studien milde und reversible Magen-Darm-, Muskel- und Bindegewebebeschwerden. In vereinzelt Fällen traten Hepatitis, Leberversagen, Ödembildung und Vaskulitis auf. Es gibt jedoch nicht genügend Beweise für einen kausalen Zusammenhang zwischen diesen Nebenwirkungen und *CR* (Borrelli und Ernst 2008). Auch bei den Ratten konnte keine Veränderung der Leberenzyme und Koagulation-Marker im Blut beobachtet werden. (Wuttke et al. 2006).

Die Auswirkungen des *CR*-Extraktes sind im Zusammenhang mit klimakterischen Beschwerden und der Entwicklung einer Osteoporose an ovx Ratten in vielen Experimenten von Wuttke et al. (2003, 2006) und Seidlová-Wuttke et al. (2003, 2005) untersucht worden. In den Studien wurde *CR* BNO 1055 in seiner Wirkung mit Östrogenen und Placebo verglichen.

Zuerst wurde angenommen, dass *CR* mit selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM-Aktivität) verglichen werden kann. Ein idealer SERM wirkt wie Östrogene auf Knochen und Gehirn und agiert nicht wie Östrogene auf das Brust- und Gebärmuttergewebe. Das heißt, man erwartete Effekte im Gehirn/Hypothalamus, im Knochen und in der Scheide, aber keine negativen Auswirkungen auf Uterus und Mammæ (Wuttke et al. 2003, Seidlová-Wuttke et al. 2003b, Seidlová-Wuttke et al. 2003a, Nisslein und Freudenstein 2003, Seidlová-Wuttke et al. 2005, Viereck et al. 2005). Anhand dieser Berichte zeigt sich der *CR*-Extrakt konsistent in seiner Auswirkung auf selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren. Diese Erkenntnisse hätten möglicherweise zu einer Alternative zur HET geführt (Liske et al. 2002, Seidlová-Wuttke et al. 2003b). Allerdings wurde in späteren Experimenten eindeutig belegt, dass *CR*-Extrakt seine Wirkung im Knochen nicht über Östrogenrezeptoren vermittelt. Es scheint, dass die Pflanze auf eine andere Art und Weise ihre Wirkung entfaltet als die Östrogene. *CR* stimuliert die Osteoblastenaktivität, Östrogene hemmen die Osteoklastenaktivität. Östrogene zeigen eine stark proliferierende Wirkung auf die vaginale Mukosa, während *CR* eine viel schwächere Wirkung ausübt. Es wurde auch eindeutig bewiesen, dass *CR*-Extrakt keine Auswirkung sowohl auf die endometriale Dicke als auch auf das Brustgewebe hat. Östrogene weisen hingegen einen uterotrophen Effekt auf und wirken proliferationsfördernd auf die Mammæ (Wuttke et al. 2006).

In klinischen Studien konnte beobachtet werden, dass Traubensilberkerze-Präparate vasomotorische Symptome, Schlafstörungen und starke Stimmungsschwankungen in den Wech-

seljahren reduzieren (Uebelhack et al. 2006). Der für diesen Zweck verwendete *CR*-Extrakt wurde effektiv und mit einer guten Verträglichkeit bis zu drei Monaten in klinischen Studien getestet.

Der Wirkmechanismus des *CR*-Extraktes beruht auf der Bindungsfähigkeit mit Neurotransmitter-Rezeptoren. Viele Wechseljahresbeschwerden wie Hitzewallungen, Schlaflosigkeit, Stimmungsschwankungen und Angst werden durch das Zentralnervensystem vermittelt. Burdette und Kollegen (2002) haben in ihrer Studie eine starke Bindungsfähigkeit der *CR* an Serotoninrezeptoren bei ovx Ratten nachgewiesen. *CR* entfaltet seine Wirkung möglicherweise ähnlich wie selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI), das führt dazu, dass Serotonin länger im synaptischen Spalt verbleibt und seine Wirkung länger entfalten kann (Burdette et al. 2002). In der Studie von Cicek et al. (2010) wurde eine Modulation der GABA-Rezeptoren durch Traubensilberkerze-Extrakte festgestellt. Es wird angenommen, dass die Modulation zu vorteilhaften Wirkungen bei der Behandlung von klimakterischen Beschwerden beiträgt (Cicek et al. 2010).

Auch Knochenzellen exprimieren eine Reihe von Neurotransmitter-Rezeptoren, z.B. für Glutamat, γ -Aminobuttersäure, 5-Hydroxytryptamin, Katecholamine (Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin) und Neuropeptide (vasointestinales Peptid, Substanz P und Calcitonin Gene-Related Peptid) (Spencer et al. 2004).

Ein weiterer Aspekt konnte eindeutig belegt werden, nämlich dass *CR* wie Östrogene die OPG-Sekretion aus menschlichen Osteoblasten (Osteoprotegerin, ein potenter Inhibitor der Knochenresorption) verbessert und erhöht. Das geschieht über einen östrogenrezeptorabhängigen Mechanismus. Diese Effekte zählen zu den positiven Auswirkungen des *CR*-Extraktes auf das Skelett (Viereck et al. 2005, Kolios et al. 2010).

1.7. Weitere Hypothesen zum Wirkmechanismus der *Cimicifuga racemosa*

In der experimentellen Studie von Seidlová-Wuttke et al. (2003) wurde beobachtet, dass *CR*-Extrakt BNO 1055 einerseits eine Reduktion des Körpergewichtes herbeiführt, andererseits den Verlust der Knochenmineraldichte (BMD) bei ovx Ratten reduziert. Es wurde eine Korrelation zwischen diesen beiden Parametern festgestellt. Die Dichte des Fettgewebes im Kno-

chen und Knochenmark verhält sich umgekehrt zur mineralischen Dichte und Mikroarchitektur der Trabekel in der Metaphyse der Tibia (Seidlová-Wuttke et al. 2003a). Auch andere experimentelle, epidemiologische und klinische Studien haben festgestellt, dass Fettsammlungen die Knochenmasse beeinträchtigen. Die pathophysiologische Beziehung zwischen Adipositas und Knochen ist komplex und ist weiterhin ein Bereich der aktiven Forschung. Möglicherweise wird sie durch mehrere Mechanismen beeinflusst (Cao 2011).

Bei Adipositas kommt es wie bei einer chronischen Entzündung zur Erhöhung der, sowohl zirkulierenden, als auch ins Gewebe einwandernden pro-inflammatorischen Zytokine (Wellsen und Hotamisligil 2003). Dies führt zur Aktivierung der Akute-Phase-Reaktion (Mundy 2007). Es gibt auch Beweise, dass Adipozyten im Knochenmark pro-inflammatorische Zytokine sezernieren, die knochenbildende Osteoblasten hemmen und die Osteoklastenaktivität fördern (Yang et al. 2009). Adipozyten und Osteoblasten werden von einer gemeinsamen multipotenten mesenchymalen Stammzelle abgeleitet (Gregoire et al. 1998). Diese Tatsache lässt vermuten, dass es zur Abnahme der Osteoblastendifferenzierung und der Knochenbildung kommt. Das Übergewicht führt zur erhöhten Differenzierung der Adipozyten und Fettanhäufung (Cao 2011). Die positive Wirkung der Saponin-Subfraktion beruht höchstwahrscheinlich darauf, dass die Triterpene aus Saponinen die Fettbelastung im Knochenmark nach Ovx der Ratten reduzieren und somit zu einer verringerten Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine führen (Seidlová-Wuttke et al. 2012c). Eine andere Hypothese ist, dass Acteine aus Saponinen sogar in der Lage sind, pro-inflammatorische Zytokine direkt zu hemmen (Schmid et al. 2009). Es ist nicht auszuschließen, dass die Wirkung von *CR* auf entzündungshemmender Eigenschaft basiert (Yang et al. 2009).

Es gibt auch Indizien, dass eine Östrogenminderung in den Wechseljahren eine Produktion pro-inflammatorischer Zytokine anregt. Diese verursachen durch eine erhöhte Aktivität der Osteoklasten den charakteristischen Verlust der Knochendichte und führen zur Entwicklung von Fettleibigkeit (Mundy 2007). Um diesen entzündungsaktiven und -fortschreitenden Weg zu durchbrechen, haben sich bioaktive Bestandteile aus dem Rhizom der *CR* als wirkungsvoll gezeigt, indem sie in der Lage sind, eine Lipopolysaccharid - induzierte TNF α - Produktion zu unterdrücken (Yang et al. 2009).

1.8. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die antiosteoporotische und antiarthrotische Wirkung der Fraktionen und Subfraktionen aus *CR* BNO 1055/C001 an Sprague-Dawley-Ratten zu untersuchen. Dies erfolgte anhand histologischer Auswertungen.

Die Studie fand am gut etablierten Osteoporose- und Arthrose-Modell der ovx Ratte statt. Durch Ovx wird die körpereigene Östrogensynthese überwiegend unterbunden. Dies entspricht dem Zustand der postmenopausalen Frau. Sowohl die ovx Ratte als auch die Frau in der Postmenopause zeigen nach Verlust der ovariellen Funktion ähnliche Reaktionen auf den Knochen- und Knorpelstoffwechsel (Wronski et al. 1991, Frost und Jee 1992, Turner et al. 2001, Seidlová-Wuttke et al. 2003a). Ebenfalls weisen ovx Ratten ähnliche Reaktionen auf therapeutisch wirksame Substanzen auf wie Frauen in ihrer postmenopausalen Phase (Lindsay 1988).

Sprague-Dawley-Ratten wurden ovx und ein Monat lang mit sojafreier Nahrung mit oder ohne jeweilige Beimengung von E2, Fraktionen und Subfraktionen des *CR*-Extraktes gefüttert. Anschließend erfolgte die Herstellung und histologische Auswertung der Tibiapräparate, die mit ovx Kontrolltieren verglichen wurde. In den Voruntersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass *CR*-Extrakt einen positiven Effekt auf Knochen, Knorpel sowie auf die postmenopausale Symptomatik ausübt. Durch die Unterteilung des Gesamtextraktes in seine Fraktionen und Subfraktionen bestand zum ersten Mal die Möglichkeit, die Wirkung der einzelnen Bestandteile zu beobachten. Möglicherweise können die untersuchten Wirkstoffe gezielt Osteoporose und Arthrose verhindern bzw. ein weiteres Fortschreiten aufhalten.

2. Material und Methoden

2.1. Allgemeines zum Tierversuch

Die Durchführung dieses Tierversuches stand unter der Aufsicht von Priv.-Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke. Die Tierversuchsgenehmigung erfolgte von der Bezirksregierung Braunschweig unter folgender Nummer: 33.11.42504-04-043/08. Die Finanzierung dieses Projektes geschah aus Mitteln des bayerischen Forschungsförderungsprogramms – Osteoporoseprophylaxe mit pflanzlichen Wirkstoffen (AZ-838-08). Die Arbeitsgemeinschaft setzt sich aus der Abteilung Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen (Prof. W. Wuttke), der muskuloskelettalen Forschungsgruppe der orthopädischen Klinik der Universität Würzburg (Prof. F. Jakob) und der Firma Bionorica® SE mit Hauptsitz in Neumarkt zusammen. Die Firma Bionorica® SE stellte die CR-Extrakt sowie Saponin- und Restfraktion her.

2.1.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Der Versuch wurde an 100 3 Monate alten weiblichen Sprague-Dawley-Ratten vorgenommen. Diese stammen von der Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln. Die Tiere wurden am 25.8.2010 an die Tierställe des Universitätsklinikums Göttingen geliefert. Die Ratten wurden auf 20 Käfige (Makrolon®-Käfig Typ IV, Firma Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg) zu jeweils 5 Tieren aufgeteilt. Sie befanden sich in einem fensterlosen, vollklimatisierten Raum bei einer Temperatur von 22-26 °C. Der Tierstall wurde mit künstlichem Licht täglich von 6.00 bis 18.00 Uhr beleuchtet. Den Tieren stand Futter und Wasser zur freien Verfügung. Zur Eingewöhnung, bis zum Versuchsstart, bekamen die Tiere sojafreies Futter (V 1354-000 ssniff R-Z, 10 mm Phytoestrogenarm, Maus/Ratte, Soest). Jedem Tier wurde im Nackenbereich subkutan ein Transponder (Emsicon Jung GmbH, Förstening) zur Wiedererkennung implantiert.

2.1.2. Versuchsablauf und Testsubstanzen

Dieser Versuch verlief in der Zeit vom 25.8 - 4.10.2010. Ich habe an dem Versuch selbst nicht teilgenommen. Darum werde ich mich bei dem Versuchsangaben auf die wichtigsten Punkte beschränken.

Es handelt sich um einen einmonatigen Versuch an dem Modell der ovx Ratte zur Erforschung neuer pflanzlicher Alternativen zur Therapie der klimakterischen Beschwerden und zur Bekämpfung der postmenopausalen Osteoporose.

Die pflanzlichen Stoffe stammen von der Firma Bionorica® SE (Neumarkt, Deutschland) und wurden in unser östrogenfreies Futter durch die Firma ssniff Spezialdiäten GmbH eingemischt und zwar in bestimmten Mengen. Diese beruhen auf jahrelange Erfahrungen mit der wirksamen Konzentration des Gesamtextraktes von CR. Die einzelnen Konzentrationsmengen der Subfraktionen wurden von der Firma Bionorica® SE bestimmt. Siehe Tabelle 1 im Anhang. Die wichtigsten Inhaltsstoffe der Gesamtsaponin- und Gesamtrestfraktion sind in der Abbildung 6.1 im Anhang aufgelistet.

Um die durchschnittliche Nahrungs- und Wasseraufnahme der Tiere festzustellen, wurde wöchentlich die Futter- und Flüssigkeitsmenge gemessen. Eine ovx Ratte nimmt durchschnittlich 18,41 g Futter pro Tag auf. Ausgenommen die Ratten, die mit Estradiolbenzoat angereichertes Futter bekamen. Bei diesen lag die durchschnittliche Nahrungsmenge bei 10,81 g täglich. Die Aufnahme der Testsubstanzenmenge konnte über den Futterverbrauch errechnet werden.

Zum Versuchsende erfolgte unter einer CO₂ - Betäubung die Enthauptung der Ratten. Anschließend wurden die Organe entnommen und bearbeitet. Gleichzeitig haben wir durch die Obduktion Blut entnommen, um die Hormonparameter aus dem Serum bestimmen zu können.

2.2. Herstellung der Tibiapräparate für die histologische Auswertung

Es wurden zwei Schnitte pro Tier hergestellt. Histologisch wurden zwei Ausschnitte in jedem Schnitt untersucht.

2.2.1. Fixierung, Dehydrierung und Einbettung in Acryl

Die proximale Tibia wurde zuerst zur Fixierung für 36 Std. in einer 4% neutral gepufferten Formalinlösung (0,1 M Phosphatpuffer) eingelagert. Diese Arbeit wurde von Frau H. Brüggemann-Meyer, MTA, durchgeführt. Dann mussten die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei Raumtemperatur dehydriert werden. Nach der Dehydration wurden die Knochenstücke für jeweils 24 Stunden in zwei Intermedien aus Xylol gegeben. Als letzter Schritt folgte die Einbettung, die sich aus den Präinfiltrationen und der Infiltration zusammensetzte. Tabelle 2 im Anhang stellt das Entwässerungsprotokoll und die nächsten Verarbeitungsschritte für die Einbettung der Tibia dar.

2.2.2. Schneiden der Tibiapräparate und Aufziehen der Schnitte auf Objektträger

Die ausgehärteten Kunststoffblöcke wurden mit Hilfe eines Rotations-Tischmikrotom (Leica 2065 Supercut, Leica Biosystems GmbH, Nussloch) zu 3 µM dicken Präparate im longitudinalen Knochenverlauf geschnitten. Die Schnitte wurden in 40%iges Ethanol getaucht und dann auf die Objektträger (SuperFrost Ultra Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig) aufgezo-gen. Anschließend wurden die Präparate mit einer Schutzfolie (Kisol-Folie, Firma Kettenbach, Eschenburg-Wissenbach) abgedeckt und für 24 Stunden in einer Presse bei 37°C in den Trockenschrank gestellt.

2.2.3. Entplastung und Goldner-Färbung

Vor dem Färben der Dünnschnittpräparate erfolgte das Entfernen des Einbettungsmaterials. Tabelle 3 im Anhang zeigt die Entplastungsschritte durch Eintauchen der Schnitte in die Reagenzien.

Nach der Entplastung wurden die Dünnschnitte mittels Goldner-Färbung (habe ich zusammen mit Frau H. Brügemann-Meyer, MTA gemacht) für die histologische Auswertung vorbereitet. Dafür wurden die Präparate in vorgegebener Reihenfolge und Zeitdauer in die entsprechenden Reagenzien eingetaucht. Der Ablauf wird in Tabelle 4 im Anhang vorgestellt.

Zum Abschluss wurden die gefärbten Präparate mit Hilfe eines Tropfen Eukitt® auf dem Objektträger mit einem Deckglas versehen.

2.3. Histologische Auswertung der Tibia

2.3.1. Mikroskop und Computersoftware

Die histologische Auswertung der Tibiapräparate wurde von mir durchgeführt. Ich habe die Präparate unter einem Zeiss Axiophot Mikroskop (Carl Zeiss AG, Jena) betrachtet. Über eine Kamera (Olympus ColorView, Soft Imaging System GmbH, Münster) wurden die Bilder aufgenommen und diese mit Hilfe der analySIS® 3,0 Computersoftware (Soft Imaging System GmbH, Münster) ausgewertet.

2.3.2. Auswertung der Trabekelarchitektur im Metaphysenbereich

Die Bestimmung des trabekulären Vernetzungsgrades habe ich mit Hilfe der Strut-Analyse nach der Methode von Dalle Carbonare et al. (2005) und Garrahan et al. (1986) durchgeführt. Für die Analyse habe ich, bei einer Vergrößerung von 4,0 (2,5 x 1,6), immer zwei Trabekelbilder in einem Präparat aufgenommen. Das eine Bild - medial der lateralen Tibiaseite und distal der Epiphysenfuge, das andere Bild - lateral der medialen Tibiaseite und distal der Epiphysenfuge. Bei der Analyse habe ich die Trabekelknoten mit roten Punkten markiert. Knoten sind die Stellen im Trabekel, von denen drei oder mehr Achsen eingezeichnet wer-

den können. Freie Enden mit grünen Punkten sind die Unterbrechungen im trabekulären Netzwerk. Verbindungsstücke mit schwarzen Punkten sind die Stellen, von denen genau zwei Achsen eingezeichnet werden können.

Zum Schluss habe ich die roten, schwarzen und grünen Punkte gezählt und in einer Excel-Tabelle gespeichert. Danach wurde das Verhältnis der Knoten zu den freien Enden errechnet und der Mittelwert der Punkte bestimmt.

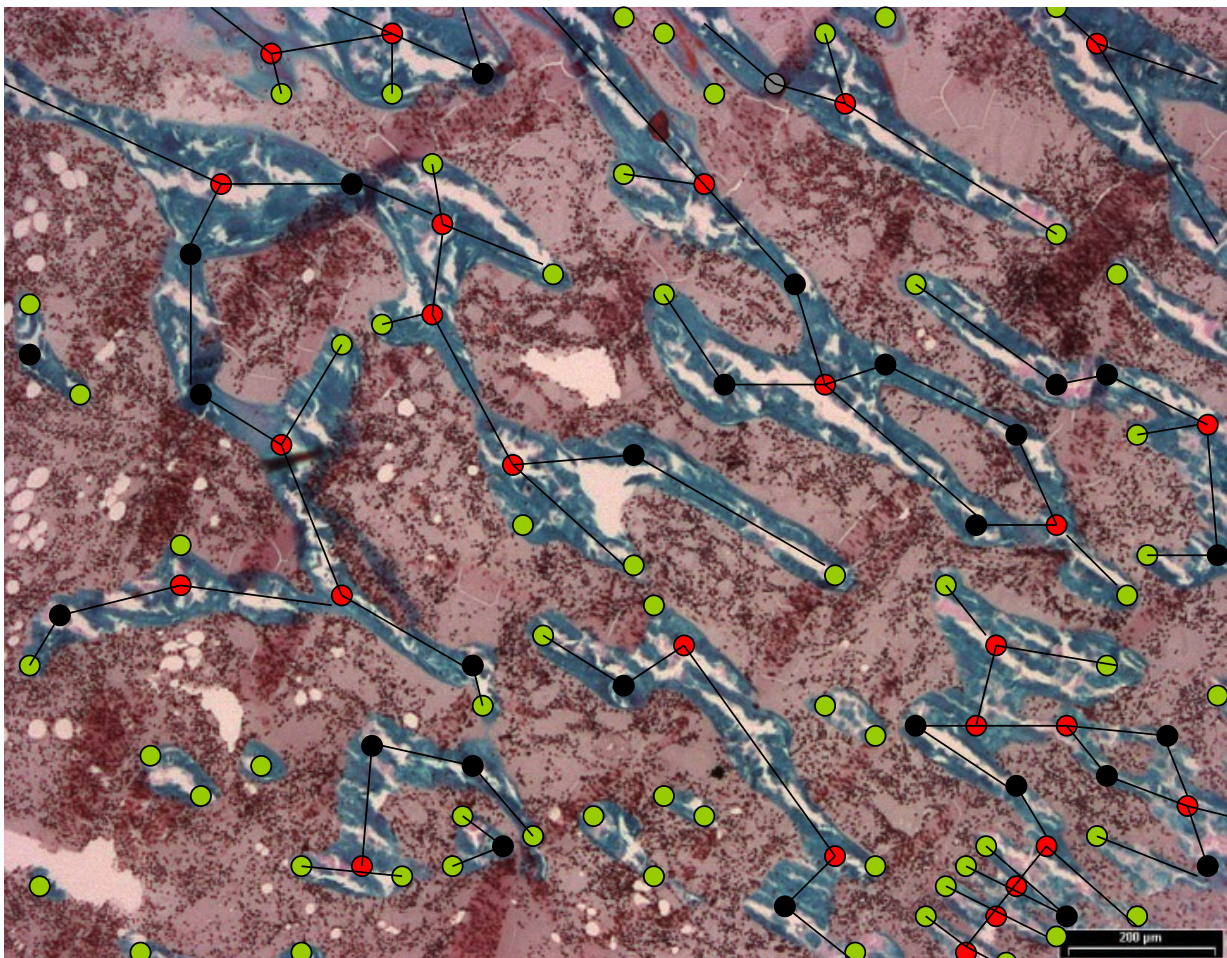


Abb. 2.1 Trabekelarchitektur nach dem Einsetzen der roten, schwarzen und grünen Punkte

2.3.3. Messung der Knorpeldicke am proximalen Tibiaende

Die Knorpeldicke habe ich am proximalen Ende der Tibia gemessen. Es ist das gleiche Vorgehen wie bei der Messung der Kortikalis, mit der Ausnahme, dass ich statt zehn Einzelmessungen zwanzig Messungen durchgeführt habe.



Abb. 2.2 Knorpel in der proximalen Tibia mit zwanzig Einzelmessungen

2.3.4. Messung der drei Epiphysenfugenzonen - Zone des ruhenden Knorpels, Säulenknorpelzone und Blasenknorpelzone

Für die Epiphysenfuge habe ich eine andere Vergrößerung 12,5 (10 x 1,25) gewählt. Nachdem das Bild mit der Kamera fixiert wurde und der Messbalken im Bild eingezeichnet war, habe ich mit Hilfe des Computerprogramms Trennlinien zwischen die einzelnen Zonen eingezeichnet. Danach habe ich mit jeweils zehn Einzelmessungen die Dicke der drei Zonen bestimmt. Die Messergebnisse wurden in einer Excel-Tabelle gespeichert, und für jede Zone wurde der Mittelwert berechnet. Um auch die Dicke der gesamten Epiphysenfuge zu haben, habe ich anschließend die Summe der einzelnen Zonenmessungen im Excel-Programm bestimmt und auch dafür den Mittelwert berechnet.

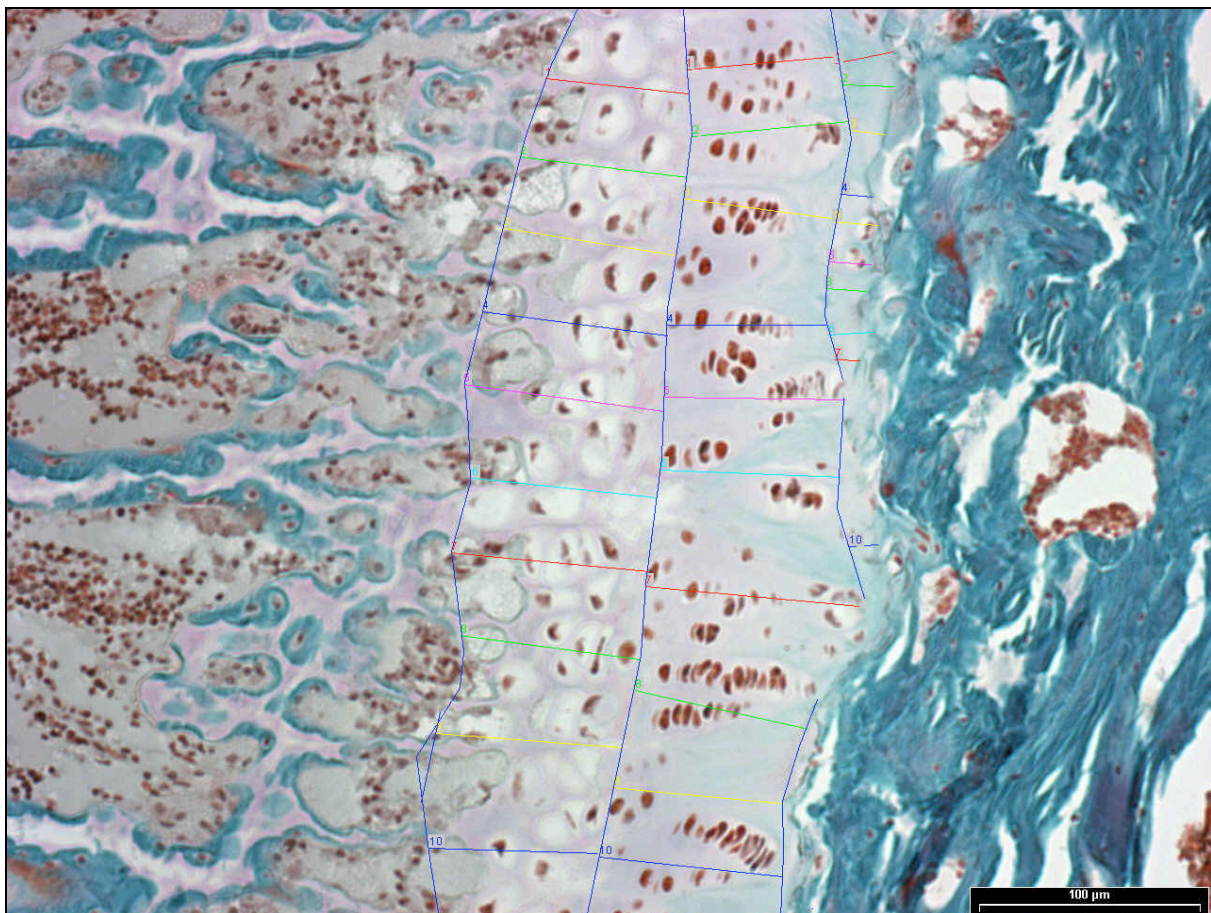


Abb. 2.3 Epiphysenfuge mit Trennlinien und dreißig Einzelmessungen

2.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der ermittelten Werte erfolgte mit der Computersoftware GraphPadPrism 5.01 (GraphPad Software, Inc., USA). Die Ergebnisse sind in Form von Säulendiagrammen dargestellt. Standardfehler des Mittelwerts (SEM) bzw. das Streuungsmaß wurde durch Fehlerbalken gekennzeichnet. Die Auswertung erfolgte durch Anwendung der Varianzanalyse (Analysis of Variance, ANOVA) und durch einen Vergleichstest nach Dunnett. Alle Gruppen wurden mit der Kontrollgruppe verglichen. Die signifikanten Auswirkungen sind mit $p < 0,05$ festgelegt und in den Graphen durch * kenntlich gemacht.

3. Ergebnisse

3.1. Körpergewicht der Tiere

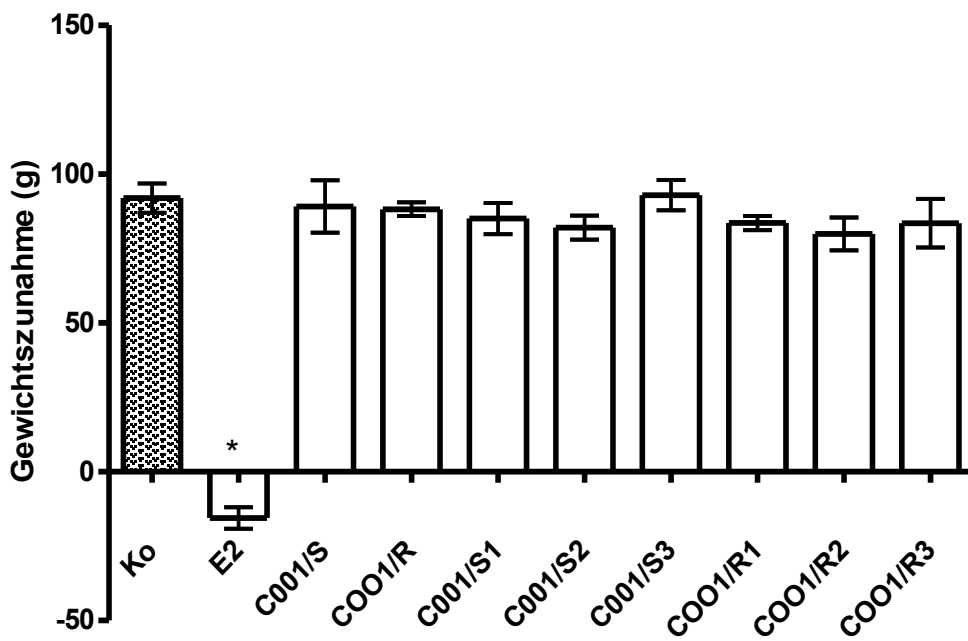


Abb. 3.1
 Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus CR (28 Tage per Futter) auf das Gewicht der ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)
 * $p < 0,05$ vs. Ko

Abbildung 3.1 zeigt die Gewichtszunahme bzw. -abnahme der Ratten zum Ende des Versuches. Die Ratten wurden nach der ovx und vor der CO₂ - Betäubung gewogen. Die Differenz ergibt sich aus dem Endgewicht minus dem Gewicht nach der ovx. Alle Tiere, bis auf die E2-Gruppe, haben an Gewicht zugenommen (knapp 100 g). Die E2-Tiergruppe hat ca. 20 g an Gewicht verloren. Nur die E2-Gruppe zeigt ein signifikantes Ergebnis im Vergleich zu ovx Kontrollgruppe ohne Östrogen Beimengung.

3.2. Auswertung der Trabekelarchitektur im Metaphysenbereich

Die folgenden Ergebnisse zeigen den trabekulären Vernetzungsgrad. Die Trabekelarchitektur wurde nach einer bestimmten Methode von Dalle Carbonare et al. (2005) und Garrahan et al. (1986) gemessen. Es handelt sich hier um Trabekelknoten (nodes), freie Enden der Trabekel (termini), das Verhältnis zwischen den Knoten und freien Enden sowie der Anzahl der schwarzen Punkte. Die zuletzt genannten Punkte stellen Verbindungsstücke zwischen den nodes und den termini dar. Die Trabekelknoten sind die Stellen im Trabekel, von denen drei oder mehr Achsen in verschiedene Richtungen ausgehen können. Das heißt, je mehr Knoten vorhanden sind, umso verzweigter ist die Trabekelarchitektur. Freie Enden der Trabekel sind genau das Gegenteil. Diese stellen die Unterbrechungen im trabekulären Netzwerk dar. Hier ist nur eine Achsenrichtung vorhanden. Aus den schwarzen Punkten gehen genau zwei Achsenrichtungen hervor.

3.2.1. Knotenanzahl

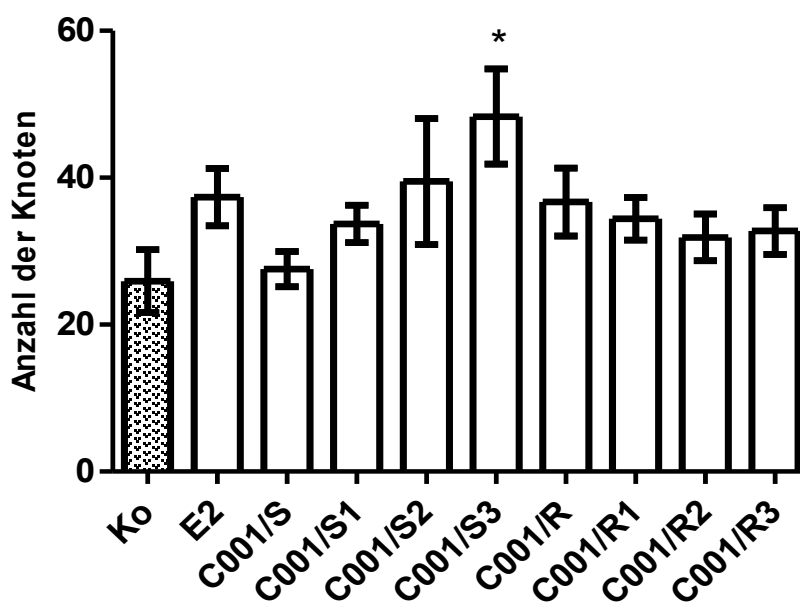


Abb. 3.2
 Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus *CR* auf die Anzahl der Knoten in den Trabekeln der Metaphyse der Tibia bei ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)
 * $p < 0,05$ vs. Ko

In der Abbildung 3.2 ist die Anzahl der Knoten graphisch dargestellt. Der Mittelwert der Knoten zeigt wie verzweigt die Trabekelarchitektur in der Metaphyse der Tibia unter Substitution von E2 und den Fraktionen sowie Subfraktionen der *CR* ist. Anhand der graphischen Darstellung ist ersichtlich, dass alle Gruppen einen höheren Verzweigungsgrad der Trabekel im Vergleich zur Ko-Gruppe haben. Aber nur die C001/S3-Gruppe zeigt mit einem Mittelwert von 48,33 Knoten eine signifikant höhere Anzahl der Knoten. Im Vergleich dazu beträgt der Mittelwert der Ko-Gruppe 26 Knoten, der E2-Gruppe 37,39 Knoten und die C001/S-Gruppe wird dicht gefolgt von der Ko-Gruppe mit einem Mittelwert von 27,57 Knoten.

3.2.2. Anzahl der freien Enden

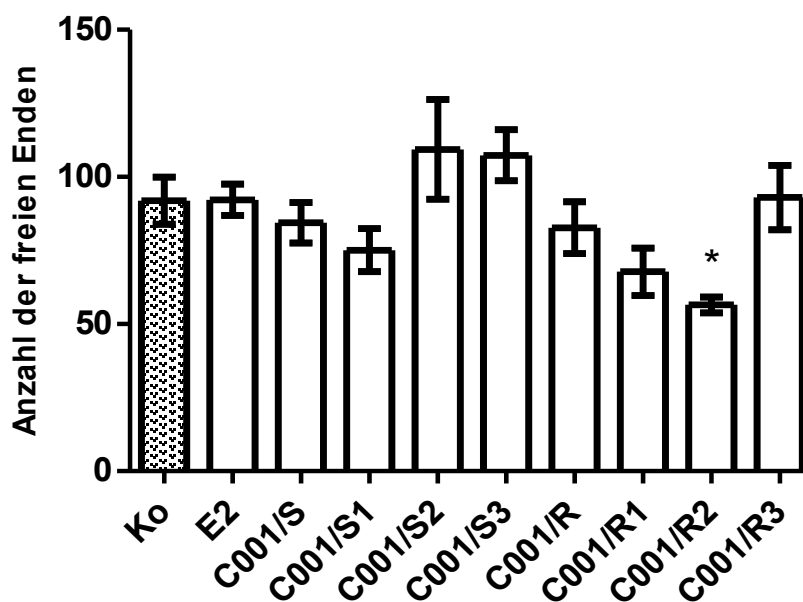


Abb. 3.3

Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus *CR* auf die Anzahl der freien Enden der Trabekel in der Metaphyse der Tibia bei ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)

* $p < 0,05$ vs. Ko

In der Abbildung 3.3 ist die Anzahl der freien Enden der Trabekel graphisch dargestellt. Anhand des Mittelwertes der freien Enden kann eine Einschätzung gemacht werden, wie viele Unterbrechungen im trabekulären Netzwerk vorhanden sind. Im Vergleich zur Ko-Gruppe mit einem Mittelwert von 91,89 zeigt die C001/R2-Gruppe mit einem Mittelwert von 56,5 eine signifikant niedrigere Anzahl der freien Enden. Weniger als die Ko-Gruppe zeigen auch die C001/S-, C001/S1-, C001/R- und C001/R1-Gruppe, jedoch ohne signifikanten Unterschied. Die meisten freien Enden sind in der C001/S2- und C001/S3-Gruppe gewesen, nämlich mit einem Mittelwert von 109,33 und 107,33. Auch hier zeigt sich keine Signifikanz. Die E2-Gruppe hat vergleichbar viele freie Enden wie die Ko-Gruppe.

3.2.3. Verhältnis Knoten/freie Enden

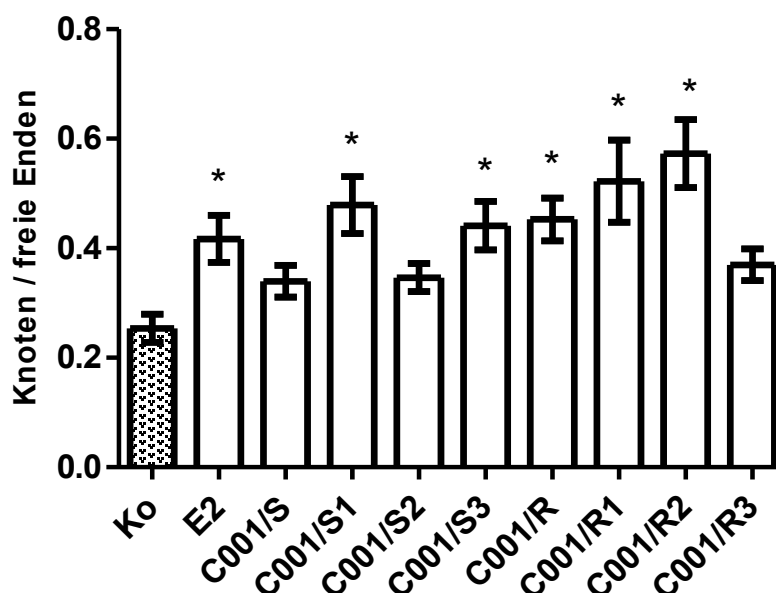


Abb. 3.4
 Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus *CR* auf das Verhältnis zwischen Knoten und freien Enden in den Trabekeln der Metaphyse der Tibia bei ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)
 * $p < 0,05$ vs. Ko

Abbildung 3.4 zeigt ein graphisch dargestelltes Verhältnis zwischen Knoten und freien Enden der Trabekel. Vor der graphischen Darstellung wurde der Mittelwert der Knoten durch den Mittelwert der freien Enden in jeder Gruppe geteilt. Das heißt, je mehr Knoten vorhanden sind, umso größer ist der Mittelwert des Verhältnisses. Das Ergebnis zeigt, dass alle Gruppen eine höhere Anzahl von Knoten im Vergleich zur Ko-Gruppe erzielt haben. Vor allem die E2-, C001/S1-, C001/S3-, C001/R-, C001/R1-, und C001/R2-Gruppen zeigen einen signifikant höheren Wert. Die C001/S-, C001/S2-, sowie C001/R3-Gruppe haben auch ein höheres Verhältnis zwischen den Knoten und freien Enden der Trabekel, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied.

3.2.4. Anzahl der Verbindungsstücke

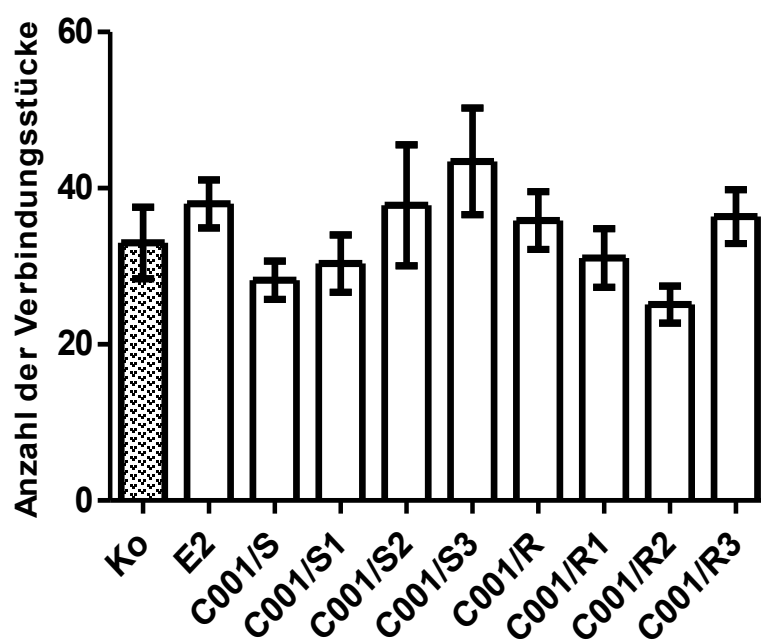


Abb. 3.5
Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus *CR* auf die Anzahl der Verbindungsstücke der Trabekel in der Metaphyse der Tibia bei ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)

In der Abbildung 3.5 ist die Anzahl der Verbindungsstücke zwischen Knoten und freien Enden graphisch dargestellt. Das Ergebnis zeigt zwar unterschiedliche Werte in den Gruppen, jedoch ist in keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied zu sehen.

3.3. Knorpeldicke am proximalen Tibiaende

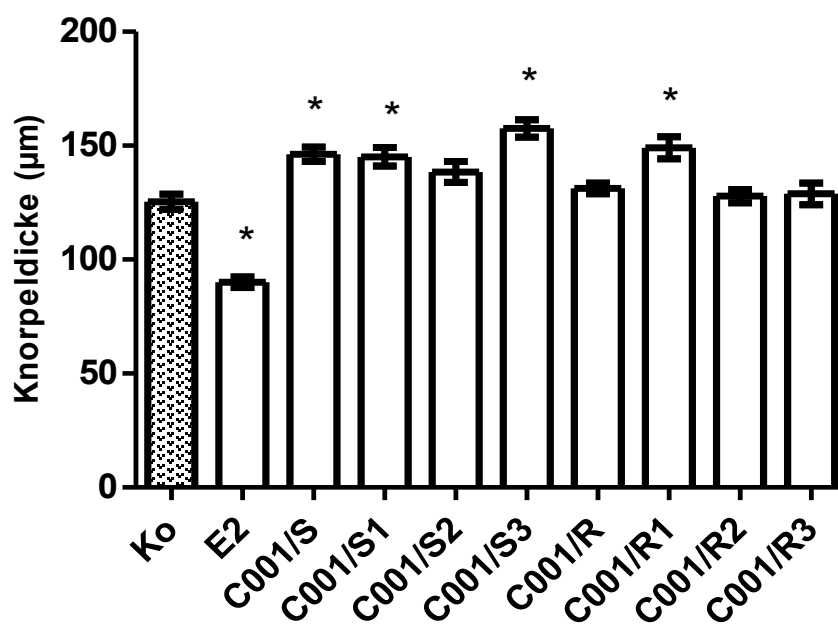


Abb. 3.6

Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus *CR* auf die Knorpeldicke am proximalen Ende der Tibia bei ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)

* $p < 0,05$ vs. Ko

Signifikante Veränderungen, im Vergleich zur Ko-Gruppe mit einer mittleren Knorpeldicke von 125,35 µm, zeigen sich in der E2-, C001/S-, C001/S1-, C001/S3- und C001/R1-Gruppe. Zu beachten ist, dass die Knorpeldicke der E2-Gruppe signifikant kleiner ist. Die der anderen Gruppen ist signifikant größer. In der E2-Gruppe beträgt die mittlere Knorpeldicke 90,13 µm. Alle anderen, mit *CR* gefütterte Tiere, zeigen eine größere Knorpeldicke im Vergleich zur ovx Tieren. Gleiches gilt für die C001/S2-, C001/R-, C001/R2- und C001/R3-Gruppe, jedoch ohne signifikanten Unterschied. Die größte Knorpeldicke von 157,56 µm hat sich bei der C001/S3-Gruppe ergeben.

3.4. Epiphysenfuge

Die Epiphysenfuge lässt sich in drei Zonen aufteilen: Zone des ruhenden Knorpels, Säulenknorpelzone und Blasenknorpelzone. Alle Zonen wurden gesondert untersucht.

3.4.1. Epiphysenfuge gesamt

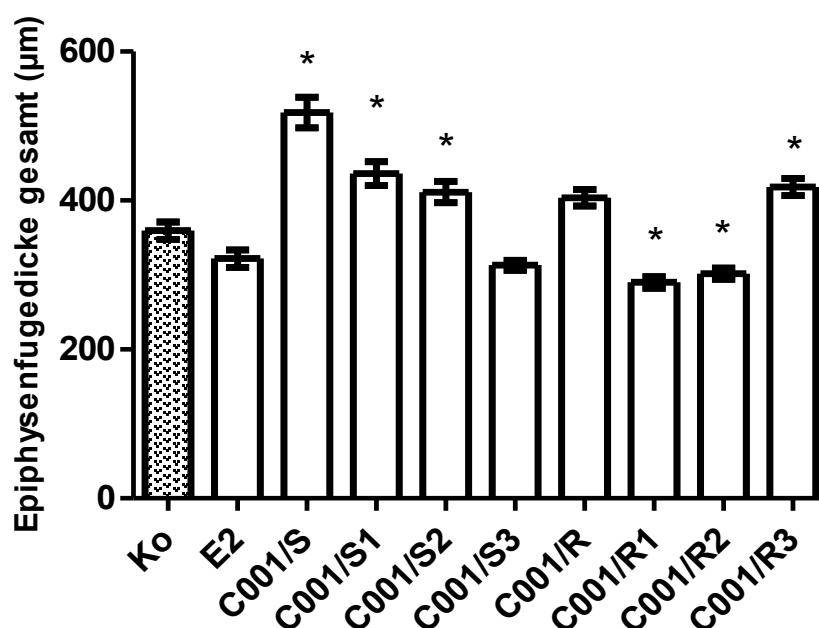


Abb. 3.7

Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus CR auf die Dicke der gesamten Epiphysenfuge in der Tibia bei ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)

* $p < 0,05$ vs. Ko

Im Vergleich zur Ko-Gruppe mit einem Mittelwert von 359,54 µm zeigen sich die Ergebnisse in der C001/S-, C001/S1-, C001/S2- und C001/R3-Gruppe signifikant größer. Die größte Epiphysenfuge wurde in der C001/S-Gruppe mit 518,27 µm gemessen. Signifikant kleiner zeigt sich die Epiphysenfuge in den C001/R1- sowie in der C001/R2-Gruppe, nämlich mit einer vergleichbaren Größe von 290 µm (C001/R1) und 301,81 µm (C001/R2). Die E2-Gruppe, sowie C001/S3- und C001/R-Gruppe zeigen keine Signifikanz.

3.4.2. Zone des ruhenden Knorpels

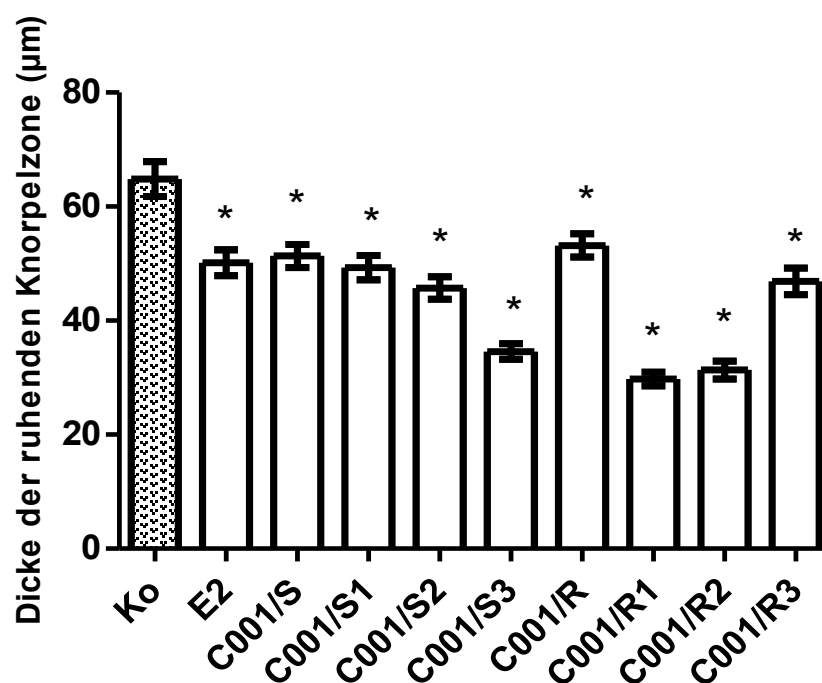


Abb. 3.8
 Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus *CR* auf die Dicke der ruhenden Knorpelzone der Epiphysenfuge in der Tibia bei ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)
 * $p < 0,05$ vs Ko

Bei dieser Auswertung ergeben sich in allen Gruppen signifikante Veränderungen. Alle Tiere, einschließlich Tiere der E2-Gruppe, haben im Vergleich zur Ko-Gruppe eine dünnere Zone des ruhenden Knorpels entwickelt. Der Mittelwert der Ko-Gruppe liegt bei 64,85 µm. Im Vergleich zu dieser Gruppe beträgt die Zonendicke des ruhenden Knorpels in der E2-Gruppe 50,17 µm. Die dünnste Zone ist bei der C001/R1-Gruppe mit einem Mittelwert von 29,75 µm festzustellen.

3.4.3. Säulenknorpelzone

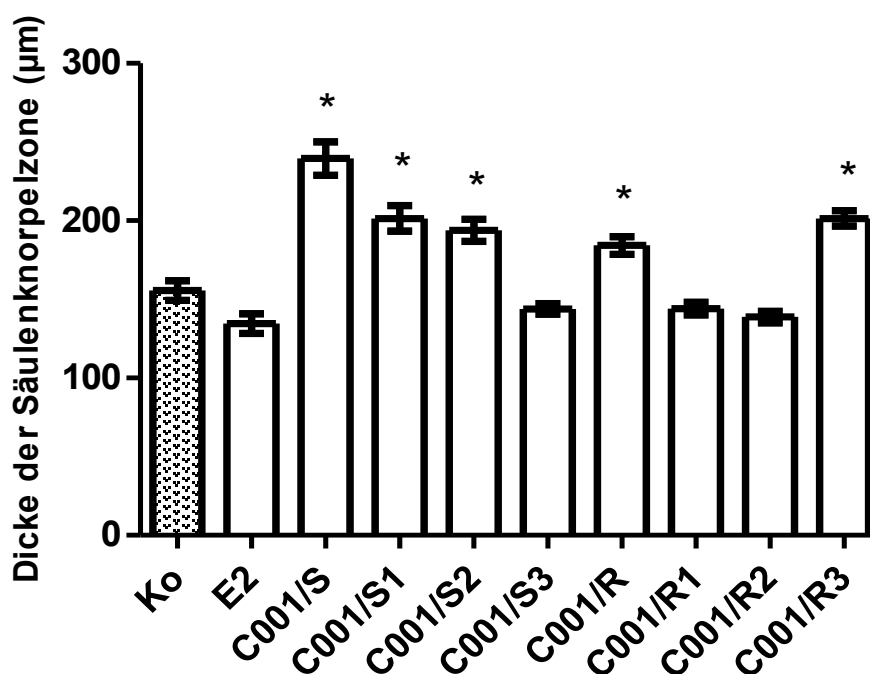


Abb. 3.9
 Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus CR auf die Dicke der Säulenknorpelzone der Epiphysenfuge in der Tibia bei ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)
 * $p < 0,05$ vs Ko

Die Gruppen, die einen signifikanten Unterschied zu der Ko-Gruppe zeigen, haben eine größere Säulenknorpelzone entwickelt. Den größten Wert zeigt die C001/S-Gruppe, nämlich mit einem Mittelwert von 239,57 µm. Die kleinste Säulenknorpelzone hat die E2-Gruppe mit einem Mittelwert von 134,68 µm.

3.4.4. Blasenknorpelzone

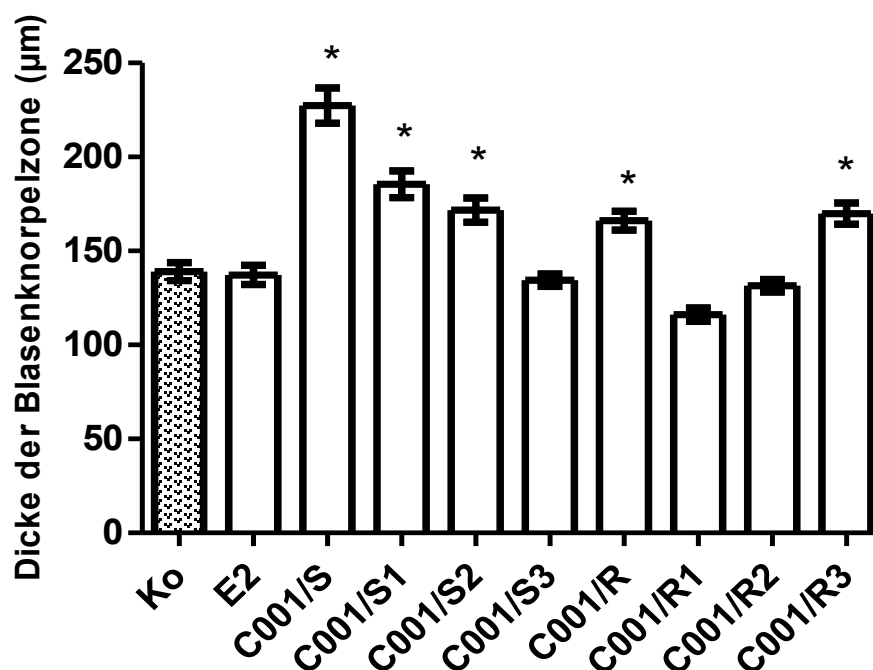


Abb. 3.10

Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus *CR* auf die Dicke der Blasenknorpelzone der Epiphysenfuge in der Tibia bei ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)

* $p < 0,05$ vs Ko

Diese Ergebnisse sind fast identisch mit den Ergebnissen der Säulenknorpelzone. Es zeigen die gleichen Gruppen, nämlich die C001/S-, C001/S1-, C001/S2-, C001/R- sowie C001/R3-Gruppe eine signifikant größere Zone zur Ko-Gruppe auf. Dementsprechend hat den größten Mittelwert von 227,35 µm die C001/S-Gruppe. Die kleinste Zone mit einem Mittelwert von 116,16 µm hat hier allerdings die C001/R1-Gruppe entwickelt. Die E2-Gruppe hat eine vergleichbare Größe der Blasenknorpelzone wie die der Ko-Gruppe.

4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zeigen, welchen Effekt die Fraktionen und Subfraktionen aus *CR* BNO 1055/C001 auf den Knochen sowie auf den Knorpel unter Östrogenmangel ausüben. In früheren tierexperimentellen Studien konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass der Gesamtextrakt von *CR* unter anderem zur Reduzierung des Körpergewichts sowie zum reduzierten Verlust der Knochenmineraldichte (BMD) bei ovx Ratten führt (Seidlová-Wuttke et al. 2003a). Es entstand die Frage nach einer genauen Zusammensetzung der Pflanze, um möglichst die effektiven Substanzen aus *CR* zu extrahieren und damit den prophylaktischen Effekt auf den Knochen zu erhöhen. Im Jahr 2010 gelang es der Firma Bionorica®, aus dem Rhizom der Pflanze zwei Hauptgruppen zu trennen – die Saponinfraktion und die Restfraktion. Daran anschließend sind Subfraktionen aus Saponinfraktion (C001/S1, C001/S2, C001/S3) und Restfraktion (C001/R1, C001/R2, C001/R3) über Hochleistungsflüssigkeitschromatographen identifiziert worden. Die genaue Zusammensetzung der Gesamtsaponin- sowie Gesamtrestfraktion ist in der Abb. 6.1 im Anhang dargestellt.

Ein großer Vorteil der Pflanze ist, im Gegensatz zu Östrogenen, dass es weder Auswirkungen auf die endometriale Dicke noch auf das Brustgewebe zeigt (Wuttke et al. 2003).

Für die Simulation einer beginnenden Osteoporose diente die weibliche ovx Sprague-Dawley-Ratte. Diese zeigt nach dem Verlust der ovariellen Funktion und des daraus folgenden Östrogenmangels ähnliche Reaktionen auf den Knochen und Knorpel wie Frauen in der Postmenopause (Wronski et al. 1991, Frost und Jee 1992, Turner et al. 2001, Seidlová-Wuttke et al. 2003a). Die Versuchsdauer betrug 4 Wochen. Als Basis des täglichen Futters diente sojafreies Grundfutter mit Beimengung der Fraktionen bzw. Subfraktionen. Somit konnte sichergestellt werden, dass nur Fraktionen und Subfraktionen als prophylaktische Maßnahme auf den Knochen und Knorpel eine Auswirkung hatten. Zum Vergleich gab es eine Kontrollgruppe, die nur sojafreies Futter bekam (Ko) und eine, die Estradiolbenzoat angereichertes Futter bekam (E2). Nach 4-wöchiger Substitution erfolgte im Anschluss die Herstellung der Tibiapräparate und die histomorphometrische Untersuchung.

Untersucht und ausgewertet sind in der vorliegenden Arbeit der spongiöse Knochen in der proximalen Tibiametaphyse, der Knorpel am proximalen Ende der Tibia und die Epiphysenfuge an der proximalen Tibia.

4.1. Trabekelarchitektur

Besondere Aufmerksamkeit wurde der Spongiosa geschenkt. Der Verlust des spongiösen Knochens aufgrund von Östrogenmangel entspricht der ersten schnellen Phase des Knochenmasseverlustes (Wronski et al. 1989). In unserem Versuch betrug die Zeit des Östrogenmangels durch Ovx der Sprague-Dawley-Ratte 4 Wochen. Die ersten Knochenveränderungen in der proximalen Tibiametaphyse sind bereits 14 Tage nach Ovx erkennbar. Der frühe schnelle Knochenmasseverlust hält bis etwa 3 Monate nach Ovx an (Wronski et al. 1988).

Bei Frauen mit einem abrupten Abfall der Östrogenkonzentration nach der Menopause kommt es zum akzelerierten Schwund von jährlich bis zu 4 % der Knochenmasse (Bartl und Thaler 2007). Das Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochensynthese gerät außer Balance (Manolagas 2000, Compston 2001). Folglich überwiegt die Knochenresorption gegenüber der Knochensynthese (Gilbert et al. 2000). Die spezifischen Veränderungen im Knochenumbau lassen sich in zwei Phasen einteilen (Wronski et al. 1991). Die erste Phase umfasst in etwa die ersten 3 bis 5 Jahre nach der Menopause. Im Vergleich zum Verlust der Kompakta ist sie durch einen überproportionalen Verlust an spongiösem Knochen gekennzeichnet. Die anschließende langsame Phase des Knochenverlustes betrifft sowohl den trabekulären als auch den kortikalen Knochen (Khosla et al. 2011).

Es gibt mehrere Methoden für die Bestimmung der Knochenarchitektur, insbesondere auf trabekulärer Ebene. Die Organisation des Knochens im Raum wird gekennzeichnet und die Komplexität dieser Struktur quantitativ gemessen (Dalle Carbonare et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit basiert die Untersuchung der Mikroarchitektur auf der Bestimmung der Anzahl von Knoten, freien Enden, Verbindungstrabekeln sowie auf der Bestimmung des Quotienten dieser Werte, also dem Verhältnis zwischen Knoten und freien Enden der Trabekel. Knoten stellen eine Struktureinheit dar, die einen Zusammenfluss von drei oder mehr Trabekeln aufweisen. Aus qualitativer Sicht ist die Konnektivität der trabekulären Struktur ein Index für die Gesamtanzahl der Verbindungen innerhalb des trabekulären Netzwerkes (DeHoff et al. 1972) und damit die Stabilität des Knochens. Wenn einseitig kein Knoten hinzugefügt werden kann, bezeichnet man es als „freies Ende“. Das „freie Ende“ stellt die Unterbrechung im trabekulären Netzwerk dar (Parfitt et al. 1987, Day et al. 2004). Das Verhältnis zwischen *nodes* und *termini* in einem Knochenabschnitt ist also ein Index der räumlichen Anbindung (Le et al. 1992). Je höher der Index ist, desto größere Verzweigungen herrschen im trabekulären Netzwerk.

Vor der Bestimmung der Knotenanzahl, der Anzahl der freien Enden und der Verbindungstrabekel habe ich jedes Trabekelstück „skelettirt“. Durch diesen Prozess der „Skelettierung“ ist es insbesondere möglich ein Netzwerk von zweidimensionalen Komponenten (Strut) zu erhalten. Das stellt die Messung des trabekulären Profils sowie die Anzahl ihrer Verbindungen auf zweidimensionalen Knochenabschnitten durch eine berechnete Analyse, die sogenannte Strut-Analyse, dar. Die Strut-Analyse reproduziert die trabekuläre Verteilung im Raum, das trabekuläre Netzwerk (Garrahan et al. 1986). Die Bewertung der Mikroarchitektur ist nützlich für die Abschätzung des Bruchrisikos. Ferner ermöglicht es die Wirkung eines Therapeutikum zu bewerten (Dalle Carbonare et al. 2005).

Nun kommen wir zu der Analyse der Ergebnisse. Alle Versuchstiere zeigen nach Ovx und vierwöchigem Experiment mit Fraktionen und Subfraktionen der CR eine höhere Knotenanzahl als die ovx Ko-Gruppe ohne Östrogene. Die Knotenanzahl bei ovx Kontrolltieren war, wie erwartet, am niedrigsten, sie haben also die geringste trabekuläre Vernetzung in der proximalen Tibiametaphyse. In früheren Experimenten konnte festgestellt werden, dass die Tibiametaphyse von ovx Ratten ein ideales Modell für das Testen der Osteoporose-Prävention ist (Lelovas et al. 2008). Besonders rapide verschlechtert hat sich nach Ovx die Trabekelarchitektur in der Metaphyse der langen Röhrenknochen. Dies kann mit der Gabe von E2 verhindert werden (Wuttke et al. 2002, Seidlová-Wuttke et al. 2003a, Kapur et al. 2010). Auch in unserer Studie war eine Gruppe (E2), die ovx und Estradiolbenzoat angereichertes Futter bekam. Die E2-Gruppe hat zwar eine höhere Anzahl von Knoten erreicht, aber dieses Ergebnis war nicht signifikant. Die Untersuchung der Wirkung von Subfraktionen auf den Knochen ist ein Novum. Ein überraschendes Ergebnis mit signifikant höherer Knotenanzahl lieferte die Versuchsgruppe C001/S3. Die C001/S3 enthält als Hauptbestandteil lipophile Saponine. Dieser Wirkstoff ist in der Lage, eine große Vernetzung des trabekulären Systems zu schaffen. Bei Betrachtung der restlichen Versuchsgruppen bezüglich ihres trabekulären Netzwerkes, ergibt sich im Vergleich zur Ko-Gruppe bei allen Tieren eine höhere Knotenanzahl, jedoch ohne Signifikanz.

Bezüglich der Anzahl der freien Enden zeigen alle Tiere ein vergleichbares Ergebnis. Die positiv hervorstechende Anzahl der Knoten der C001/S3-Versuchsgruppe zeigt auch eine höhere Anzahl an freien Enden als die Ko-Gruppe. Jedoch war diese ebenfalls nicht signifikant. Eine signifikant niedrigere Anzahl der freien Enden zeigt die C001/R2-Gruppe. Die Hauptbestandteile im Futter sind hier Zimtsäurederivate. Daraus lässt sich ableiten, dass es

im Vergleich zur Ko-Gruppe signifikant weniger Unterbrechungen im trabekulären Netzwerk gibt. Betrachtet man die Ergebnisse der restlichen Gruppen zeigt sich ein gemischtes Bild der freien Enden in der Trabekelarchitektur.

Bei Betrachtung der trabekulären Verbindungsstücke in ihrer Anzahl stellt sich bei keinem der applizierten Wirkstoffe eine signifikante Beeinflussung heraus.

In der Darstellung der zweidimensional ermittelten Trabekelarchitektur zeigt sich ein positives Ergebnis im Verhältnis zwischen Knoten und freien Enden in Bezug auf Fraktionen und Subfraktionen der CR. Und zwar die C001/S1-Gruppe, welche als Hauptbestandteile im Futter polare Saponine, Actein, Deoxyactein und Isoferulasäure beinhalten, die C001/S3-Gruppe, die lipophile Saponine enthält, die C001/R-Gruppe, die hauptsächlich Kaffeesäure, Zimtsäurederivate und Methylserotonin enthält, die C001/R1-Gruppe mit Hauptbestandteil Kaffeesäure, die C001/R2-Gruppe mit Zimtsäurederivate und die E2-Gruppe, haben im Vergleich zu den ovx Kontrolltieren einen signifikant höheren Quotienten erzielt. Die Fraktionen und Subfraktionen, die signifikante Ergebnisse zeigen, haben sogar höhere Werte als die E2-Gruppe erreicht. Die restlichen drei Versuchsgruppen C001/S, C001/S2, C001/R3 zeigen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Ko-Gruppe. Für die genaue Zusammensetzung der Fraktionen und Subfraktionen siehe Abb. 6.1.

Dieses Ergebnis bestätigt die positive Wirkung der CR an der trabekulären Knochenarchitektur. In der Anfangsphase der Experimente an Traubensilberkerze wurde eine deutlich höhere trabekuläre Knochenmineraldichte in der proximalen Metaphyse der Tibia bei Ratten mittels qCT nachgewiesen (Wuttke et al. 2002).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Strut-Analyse, dass das trabekuläre Netzwerk bei den ovx Tieren stark gestört war. Die Anzahl der Knoten war reduziert und die der freien Enden erhöht. Das führte zu einer Verminderung des Quotienten zwischen Knoten und freien Enden. Dieses Ergebnis spricht für einen Stabilitätsverlust des Knochens, was mit erhöhter Knochenbrüchigkeit einhergehen kann. In der Studie von Seidlová-Wuttke et al. (2012) wurde nachgewiesen, dass bei ovx Ratten der Fettgewebsanteil im Knochenmark steigt. Das Fettgewebe im Knochen bzw. im Knochenmark korreliert umgekehrt mit seiner mineralischen Dichte und Mikroarchitektur der trabekulären Infrastruktur in der Metaphyse der Tibia (Seidlová-Wuttke et al. 2012c). Adipozyten im Knochenmark sezernieren pro-inflammatorische Zytokine, die Osteoblasten hemmen und Osteoklasten stimulieren (Yang et al. 2009). Im Gegensatz zur Ko-Gruppe haben die E2-Gruppe, die Fraktionen und die

Subfraktionen eine positive Wirkung auf die Trabekelarchitektur aufgezeigt. Höchstwahrscheinlich können die Fraktionen und Subfraktionen die Osteoporoseentwicklung aufhalten, indem sie die Fettbelastung im Knochenmark reduzieren. Folglich reduziert sich die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine. Auch in einer früheren Studie von Seidlová-Wuttke et al. (2012) konnte nachgewiesen werden, dass die Fettbelastung im Knochenmark bei den *CR* behandelten ovx Ratten im Vergleich zu E2 behandelten Tieren deutlich reduzierter war. Auch die Saponin- und die Restfraktion reduzieren das Fettgewebe effizienter als E2 (Seidlová-Wuttke et al. 2012c). Das heißt, die Wirkung von *CR* basiert vermutlich auf einer entzündungshemmenden Eigenschaft (Yang et al. 2009) durch Hemmung der Fettzellen. Nach Ovx und anschließender Verschlechterung der Trabekelkonnektivität konnten die Wirkstoffe der *CR* die Konnektivität des trabekulären Knochens signifikant erhöhen. Diese Ergebnisse sprechen mit den Ergebnissen der früheren Experimenten an *CR* sowie Saponin- und Restfraktion überein (Seidlová-Wuttke et al. 2006, Seidlová-Wuttke et al. 2012a, Seidlová-Wuttke et al. 2012b). Mittlerweile ist bekannt, dass *CR* alle bedeutenden klimakterischen Beschwerden genauso effektiv reduziert wie konjugierte Östrogene (Wuttke et al. 2014). Es konnte bestätigt werden, dass *CR* einen schützenden Effekt auf den trabekulären Knochen nach Ovx der Tiere ausübt und somit eine antiosteoporotische Wirkung aufweist. Da in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal die Subfraktionen untersucht wurden, wissen wir jetzt, welche Wirkstoffe der Pflanze im Einzelnen besonders positiv auf die Trabekelarchitektur wirken. Den signifikant positiven Effekt haben wir in der C001/S1- und C001/S3-Gruppe beobachten können. Gleiches gilt für die C001/R-, C001/R1- und C001/R2-Gruppe. In der Studie von Trzeciakiewicz et al. (2009) wurde auch der antiosteoporotische Effekt der Polyphenole nachgewiesen (Trzeciakiewicz et al. 2009). Actein, Hauptbestandteil der Subfraktion C001/S2, hat einen schützenden Effekt auf den Knochen (Einbond et al. 2006, Cicek et al. 2010). Es zeigt eine hemmende Wirkung auf pro-inflammatorische Zytokine (Schmid et al. 2009).

4.2. Knorpel

Neben Osteoporose zählt auch Arthrose zu den großen gesundheitlichen Problemen in der zunehmend älter werdenden Bevölkerung, vor allem bei postmenopausalen Frauen. Eine Beziehung zwischen Arthrose und Osteoporose ist noch nicht eindeutig geklärt (Zhu et al. 2013). Einige Studien haben in Tiermodellen und beim Menschen nachgewiesen, dass

systemische Osteoporose eine Rolle bei der Pathogenese der Arthrose spielt (Calvo et al. 2007, Bellido et al. 2010). Es handelt sich dabei um eine metabolische Dysfunktion des Knochens und nicht um eine mechanische „Verschleißkrankung“ (Mansell et al. 2007). Arthrose ist eine komplexe Erkrankung des gesamten Gelenks, die Knochen- und Knorpeldegeneration verursacht (Karsdal et al. 2008). Die trabekuläre Knochenstruktur korreliert mit dem Gelenkknorpel. Dies deutet darauf hin, dass Verlust des mineralisierten Knochens mit Knorpeldegeneration verbunden ist (Bolbos et al. 2008). Arthrose zeichnet sich durch einen schrittweisen und ungleichmäßigen Verlust des hyalinen Gelenkknorpels, mit Osteophytenbildung, subchondraler Sklerose und Degeneration der periartikulären Strukturen aus (Baker-LePain und Lane 2012). Eine optimale Behandlung der Arthrose sollte daher eine positive Auswirkung sowohl auf den Knorpel als auch auf den ausdünnenden Knochen beinhalten.

In unserem Versuch wird die Knorpeldicke am proximalen Tibiaende der ovx Sprague-Dawley-Ratten beurteilt. Bis auf die Ko-Gruppe und E2-Gruppe wurde bei allen anderen Versuchstieren eine höhere Knorpeldicke gemessen. Ein signifikantes Ergebnis kann bei der C001/S-, C001/S1-, C001/S3- sowie bei der C001/R1-Gruppe beobachtet werden. Die C001/S2-, C001/R-, C001/R2- und C001/R3-Gruppe zeigen keine signifikante Erhöhung der Knorpeldicke. In der Studie von Einbond und Kollegen (2006) wurde auch eine chondroprotektive Wirkung durch Saponinanteil beobachtet, während der polare Restwirkstoff sich als unwirksam gezeigt hat (Einbond et al. 2006). In unserer Studie wird dieses Ergebnis bestätigt. Auch bei uns zeigt die Saponin-Gruppe einen signifikant höheren Knorpelanteil am proximalen Tibiaende der Ratten. Die in unserem Versuch zum ersten Mal untersuchten Subfraktionen C001/S1 sowie C001/S3 zeigen ebenfalls eine chondroprotektive Wirkung. Die E2-Gruppe hat eine signifikant kleinere Knorpeldicke im Vergleich zur Ko-Gruppe erzielt. Zu erklären ist dieses Ergebnis durch eine unterschiedliche Körpergröße der Ratten, siehe Abb 3.1 Die mit Östrogenen behandelte Tiere fallen viel kleiner aus als die, die sojafreies Futter sowie Fraktionen und Subfraktionen in ihr Futter beigemischt bekommen haben. Dementsprechend fällt auch die Knorpeldicke bei E2-behandelten Tieren kleiner aus. Es ist bekannt, dass Östrogene den Knorpel vor Verschleiß schützen können. Östrogene haben eine positive Auswirkung sowohl auf den Knochen als auch auf den Knorpel (Sniekers et al. 2010). In früheren Versuchen wurde eine deutliche Erhöhung der Gelenkknorpeldicke bei den E2 substituierten Tieren nachgewiesen (Kapur et al. 2010).

Eine Studie von Seidlová-Wuttke und Kollegen (2012) fand heraus, dass die Knorpeldicke am tibialen Ende des Kniegelenks am niedrigsten bei ovx Tieren war und deutlich größer bei den mit CR-Extrakt sowie mit Saponin- und Restfraktion behandelten Tieren. Es wurde nachgewiesen, dass Saponinfraktion die Fettmasse im Kniegelenk reduziert, was von einer deutlich höheren Knorpeldicke begleitet wurde. Es zeigte sich eine umgekehrte Korrelation zwischen Knorpeldicke und der Fettbelastung im Kniegelenk. Trotzdem beweist diese signifikante Korrelation nicht, dass die hohe Fetttlast im Kniegelenk der auslösende Faktor für die verminderte Knorpeldicke ist, aber es macht diese Beziehung wahrscheinlich (Seidlová-Wuttke et al. 2012b). Es ist bekannt, dass Adipozyten im Fettpolster der Gelenke die gleichen negativen Merkmale wie die viszeralen Fettzellen aufweisen. Sie sezernieren pro-inflammatorische Zytokine und verursachen dadurch lokale Entzündungsprozesse im Gelenk. Dieses wirkt sich negativ auf die Chondrozytenreifung aus. Die sezernierten Zytokine führen außerdem zur erhöhten Bildung der Matrix-Metalloproteinasen. Diese Enzyme zerstören die Struktur des Gelenkknorpels. Daher ist die Ursache für Arthrose nicht nur das Übergewicht, sondern auch eine lokale Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen durch Fettzellen (Gandhi et al. 2011, Klein-Wieringa et al. 2011, Rai und Sandell 2011).

Unser Versuch sowie Versuche aus anderen Studien haben bewiesen, dass CR sowie im Einzelnen deren Fraktionen und Subfraktionen in der Lage sind Arthrose nach der Menopause zu verhindern bzw. die Knorpeldegeneration aufzuhalten und eine positive Wirkung in den Gelenken zu vollbringen.

4.3. Epiphysenfuge

An der Grenze zur Epiphyse befindet sich eine Zone hyalinen Knorpels, auch Reservezone genannt. (Wasmer und Pförringer 1987). In dieser Zone des ruhenden Knorpels erfolgt kein Wachstum. Sie dient dazu, das Knorpelgewebe der Fuge an der knöchernen Epiphyse zu verankern (Welsch 2003).

Bei der Zellvermehrung in der Proliferationszone kommt es zur Ausbildung isogener Zellgruppen, die sich in typischen Zellsäulen, dem sogenannten Säulenknorpel anordnen. Bei weiterer Reifung verlieren die Zellen ihre Teilungsfähigkeit und nehmen an Größe zu. Diese Größenzunahme kommt durch Flüssigkeitsaufnahme der Zelle zustande. Der Bereich dieser hypertrophierten Zellen wird auch als Blasenknorpelzone bezeichnet und dient hauptsächlich dem Längenwachstum (Schünke 2000).

Die Reifung und das Wachstum der Knochen unterliegen hormonellen Einflüssen. Obwohl die Ratte das am häufigsten verwendete Tiermodell zum Studium der Osteoporose ist, kann sie keinen Vergleich in der Entwicklung der Epiphysenfuge darbieten. Osteoporose ist eine Krankheit, die meistens bei Menschen lange nach dem Epiphysenfugenschluss auftritt bzw. nach längst eingestelltem Knochenwachstum (Martin et al. 2003). Dieses stellt bei den Ratten einen erheblichen Unterschied dar, da sie ein anhaltendes Längenwachstum zeigen (Lelovas et al. 2008) und sie keinen Epiphysenfugenschluss am Ende ihrer sexuellen Reifung haben (Nilsson et al. 2003). Trotzdem kommt in der vorliegenden Arbeit die Frage auf: Wie verändert sich die Epiphysenfuge bei Östrogenmangel der ovx Ratten, bei Östrogenverabreichung nach Ovx sowie nach der Verabreichung der Fraktionen und Subfraktionen des *CR*-Extraktes?

In unserer Tierversuchsstudie hat sich eine signifikante Zunahme der gesamten Epiphysenfugendicke in der C001/S-, C001/S1-, C001/S2- sowie in der C001/R3-Gruppe ergeben. Allerdings zeigt sich in der C001/R1- und C001/R2-Gruppe eine signifikante Reduktion der Epiphysenfugendicke im Vergleich zur Ko-Gruppe. In der E2-Gruppe kam es ebenfalls zur Reduktion der Epiphysenfugendicke im Vergleich zur Ko-Gruppe, aber ohne Signifikanz. In der Zone, in der kein Wachstum erfolgt, Zone des ruhenden Knorpels hat sich eine signifikante Abnahme der Dicke in allen Gruppen gezeigt, auch in der E2-Gruppe. Interessanterweise zeigen die Säulenknorpelzone sowie die Blasenknorpelzone fast identische Ergebnisse in den einzelnen Gruppen. Man sieht eine signifikante Zunahme der Zonen in der C001/S-, C001/S1-, C001/S2- sowie in der C001/R und C001/R3-Gruppe.

Insgesamt zeigt sich an der Epiphysenfuge unter der Fraktion C001/S, Subfraktion C001/S1 und C001/S2, sowie Fraktion C001/R und Subfraktion C001/R3 eine verbreitete Epiphysenfuge und somit Längenwachstum der Ratten, da die entscheidenden Zonen für das Längenwachstum (Säulenknorpelzone und Blasenknorpelzone) vergrößert sind.

Die Tiere in der E2-Gruppe haben eine geringere Dicke in der Säulenknorpel- und Blasenknorpelzone, allerdings ohne Signifikanz.

In allen untersuchten Zonen der Epiphysenfuge zeigt sich eine Reduktion der Dicke bei ovx und anschließend mit Östrogen behandelten Tieren, da das Hormon für die Verknöcherung der Fuge verantwortlich ist. Demensprechend sind die Ratten in der E2-Gruppe kleiner. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Studien überein (Lindberg et al. 2001, Kapur et al. 2010). Die Auswirkung des *CR*-Extraktes auf die Epiphysenfugendicke der ovx Ratten ist ein Novum. Ein Vergleich mit internationaler Literatur ist daher nicht möglich.

5. Zusammenfassung

Der Anteil alter Menschen nimmt in den Industrienationen stetig zu. Mit dem Alter kommt es zum Verlust von Knochengewebe und einem Anstieg der Knochenfragilität, was das Risiko von Knochenbrüchen erhöht. Vor allem Frauen nach der Menopause sind betroffen. Auch die Arthrose zählt zu den häufigsten chronischen Erkrankungen. Die Prävalenz der Arthrose steigt mit zunehmendem Alter. Die Erkrankung betrifft vor allem Gewicht tragende Gelenke wie die Wirbelsäule, die Hüft- und Kniegelenke. Dabei kommt es zu erheblichen Schmerzen und Behinderungen, die bei Progredienz der Erkrankung nach einer gewissen Zeit einen Hüft- oder Knie-Eingriff erfordern könnten.

Es gibt mehrere verschiedene Präventionsmöglichkeiten für eine beginnende postmenopausale Osteoporose. Einige sind effektiv, aber durch Nebenwirkungen, gleichzeitige Komorbidität und unzureichende langfristige Compliance gekennzeichnet. Für die Behandlung einer Arthrose existiert bis heute nur eine symptomatische Therapie. Daher besteht ein großer Bedarf an weiterer Forschung zur Prävention einer postmenopausalen Osteoporose und Arthrose. Derzeit werden Pflanzenstoffe wie *CR* intensiv untersucht. Auch die vorliegende Dissertation beinhaltet tierexperimentelle Untersuchungen der antiosteoporotischen und antiarthrotischen Wirkungen der *CR* BNO 1055/C001 sowie ihrer Fraktionen und Subfraktionen. Dafür wurden 100 Sprague-Dawley-Ratten ovariectomiert und in 10 Gruppen aufgeteilt. Anschließend wurden Fraktionen und Subfraktionen aus *CR*, mit Ausnahme der Kontrolltiere, 4 Wochen lang mit dem Futter verabreicht. Zum Vergleich hat eine weitere Gruppe Estradiolbenzoat angereichertes Futter bekommen. Anhand der histologischen Auswertung der proximalen Tibiapräparate konnten die Auswirkungen der Fraktionen und Subfraktionen aus *CR* BNO 1055/C001 untersucht werden.

Die Ergebnisse der Strut-Analyse zeigen, dass Wirkstoffe der *CR*, im Vergleich zur Ko-Gruppe, die Konnektivität des trabekulären Knochens signifikant erhöht haben. Einen signifikant positiven Effekt haben wir in der C001/S1- und C001/S3-Gruppe sowie in der C001/R-, C001/R1- und C001/R2-Gruppe beobachten können. Mit diesen Ergebnissen konnten wir in unserer Studie bestätigen, dass Fraktionen und Subfraktionen der *CR* einen schützenden

Effekt auf den trabekulären Knochen ausüben und somit einen antiosteoporotischen Effekt beinhalten.

Auch bei der Messung und Beurteilung der Knorpeldicke am proximalen Tibiaende zeigte sich in einigen Tiergruppen eine signifikante Zunahme des Knorpels. Diese Ergebnisse konnten in der C001/S-, C001/S1-, C001/S3- und in der C001/R1-Gruppe beobachtet werden. Letztendlich beweisen die Ergebnisse, dass Fraktionen und Subfraktionen des *CR*-Extraktes in der Lage sind, Knorpeldegeneration aufzuhalten.

Bei der Untersuchung der drei Epiphysenfugenzoneen kam es zu unterschiedlichen Ergebnissen. Zum einen hat die gesamte Epiphysenfugendicke in einigen Gruppen eine signifikante Zunahme gezeigt. Zum anderen ist in einigen Gruppen eine signifikante Abnahme im Vergleich zu den *ovx* Kontrolltieren festgestellt worden.

In unserem Versuch konnten wir die positiven Auswirkungen der *CR* auf den Knochen- und Knorpelstoffwechsel nachweisen. Somit bestätigen sich die Ergebnisse früher durchgeführter Studien (Seidlova-Wuttke et al. 2003b, Wuttke et al. 2003, Einbond et al. 2006). Zusätzlich konnten wir beschreiben, welche Fraktionen und Subfraktionen der *CR* sich besonders knochen- und knorpelprotektiv auswirkten.

6. Anhang

6.1. Tabellen

Tab. 1 Futterart und Futteraufnahme der Tiere

Futterart	Name der Gruppe	Nr. der Tiere	Dosis in mg/kg Futter	Futteraufnahme (g/Tier/Tag)	Substanzeinnahme (mg)
Ko, EF R/M	Ko	10	keine	17,95	Keine
Estradiolbenzoat	EB	10	10	10,81 *	0,108
Saponinfraktion	C001/S	10	117,6	17,17	2,019
Restfraktion	C001/R	10	382,35	19,03	7,26
Saponinsubfraktion 1	C001/S1	10	31,2	18,37	0,573
Saponinsubfraktion 2	C001/S2	10	46,06	17,63	0,802
Saponinsubfraktion 3	C001/S3	10	46,04	19,56	0,900
Restsubfraktion 1	C001/R1	10	276,81	18,75	5,190
Restsubfraktion 2	C001/R2	10	75,37	18,71	1,410
Restsubfraktion 3	C001/R3	10	35,979	18,52	0,666

*p<0,05 vs. Ko

Tab. 2 Einbettung der Knochen mit Hilfe von Technovit 9100 NEU (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim)

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

MMA = Methylmethacrylat, Härter = Peroxidverbindung, PMMA = Füllstoff
stab. = stabilisiert, entspr. MMA, entstab. = entstabilisierte Basislösung durch Zugabe von Chromatographiesäule

Tab. 3 Entplastung der Präparate

1.	3x Behandlung mit Xylol	jeweils 20 Minuten
2.	2x Behandlung mit 2-Methoxyethylacetat	jeweils 15 Minuten
3.	2x Behandlung mit Aceton	jeweils 5 Minuten
4.	2x Behandlung mit Aqua dest.	jeweils 2 Minuten

Tab. 4 Ablauf der Goldner-Färbung

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

6.2. Abbildung 6.1

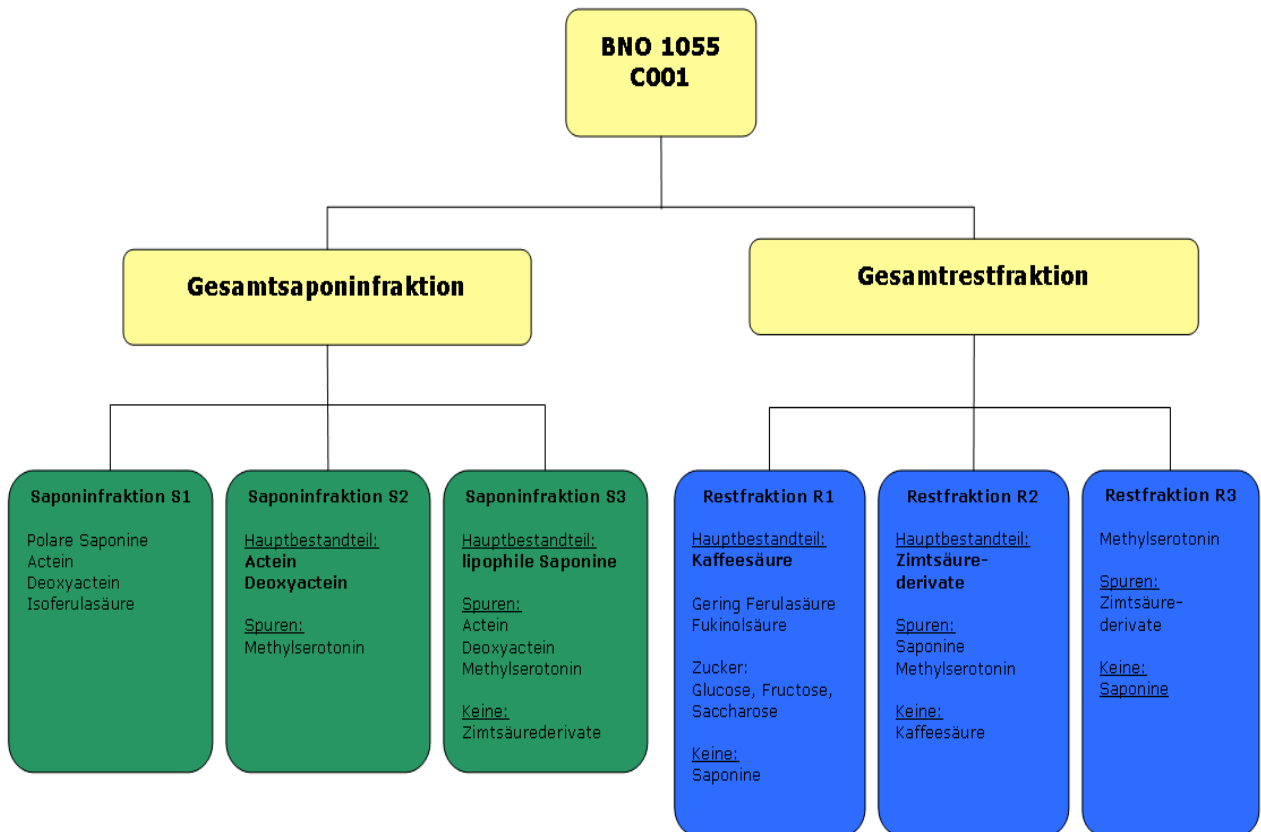
Abb. 6.1 Komplementierende Analytik zu C001/S/1-3 und C001/R/1-3

Abbildung zur Verfügung gestellt von Bionorica® SE 2013

6.3. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	<i>Cimicifuga racemosa</i>	13
Abb. 2.1	Trabekelarchitektur nach dem Einsetzen der roten, schwarzen und grünen Punkte	22
Abb. 2.2	Knorpel in der proximalen Tibia mit zwanzig Einzelmessungen	23
Abb. 2.3	Epiphysenfuge mit Trennlinien und dreißig Einzelmessungen	24
Abb. 3.1	Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus <i>CR</i> (28 Tage per Futter) auf das Gewicht der ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)	26
Abb. 3.2	Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus <i>CR</i> auf die Anzahl der Knoten in den Trabekel der Metaphyse der Tibia bei ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)	28
Abb. 3.3	Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus <i>CR</i> auf die Anzahl der freien Enden der Trabekel in der Metaphyse der Tibia bei ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)	29
Abb. 3.4	Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus <i>CR</i> auf das Verhältnis zwischen Knoten und freien Enden in den Trabekel der Metaphyse der Tibia bei ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)	30
Abb. 3.5	Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus <i>CR</i> auf die Anzahl der Verbindungsstücke der Trabekel in der Metaphyse der Tibia bei ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)	31
Abb. 3.6	Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus <i>CR</i> auf die Knorpeldicke am proximalen Ende der Tibia bei ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)	32
Abb. 3.7	Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus <i>CR</i> auf die Dicke der gesamten Epiphysenfuge in der Tibia bei ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)	33
Abb. 3.8	Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus <i>CR</i> auf die Dicke der ruhenden Knorpelzone der Epiphysenfuge in der Tibia bei ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)	34
Abb. 3.9	Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus <i>CR</i> auf die Dicke der Säulenknorpelzone der Epiphysenfuge in der Tibia bei ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)	35

Abb. 3.10 Effekt der Fraktionen und Subfraktionen aus *CR* auf die Dicke der Blasenknorpelzone der Epiphysenfuge in der Tibia bei ovx Ratten vs. Kontrollgruppe mit (E2) und ohne Östrogen-Futter (Ko)

36

7. Literaturverzeichnis

Albright F, Smith PH, Richardson AM (1941): Postmenopausal Osteoporosis. *JAMA* 116 (22), 2465-2474

Atkinson PJ (1967): Variation in trabecular structure of vertebrae with age. *Calcif Tissue Res* 1 (1), 24–32

Audran M, Chappard D, Legrand E, Libouban H, Baslé MF (2001): Bone microarchitecture and bone fragility in men: DXA and histomorphometry in humans and in the orchidectomized rat model. *Calcif Tissue Int* 69 (4), 214–217

Baker-LePain JC, Lane NE (2012): Role of bone architecture and anatomy in osteoarthritis. *Bone* 51 (2), 197–203

Banu J, Varela E, Bahadur AN, Soomro R, Kazi N, Fernandes G (2012): Inhibition of Bone Loss by *Cissus quadrangularis* in Mice: A Preliminary Report. *J Osteoporos* 2012 (1), 1–10

Bartl R, Thaler CJ (2007): Leitliniengerechte Diagnostik und Therapie der postmenopausalen Osteoporose. *Gynakologe* 40 (11), 913–923

Bellido M, Lugo L, Roman-Blas JA, Castañeda S, Caeiro JR, Dapia S, Calvo E, Largo R, Herrero-Beaumont G (2010): Subchondral bone microstructural damage by increased remodelling aggravates experimental osteoarthritis preceded by osteoporosis. *Arthritis Res Ther* 12 (4), R152

Bellino FL (2000): Nonprimate animal models of menopause: workshop report. *Menopause* 7 (1), 14–24

Bionorica® SE: Ausgewählte Cimicifuga-Fraktionen zur Behandlung von Osteoporose. Europäisches Patentamt 545 932 A1. Patentblatt 2013/03

Bingham CO, Buckland-Wright JC, Garner P, Cohen SB, Dougados M, Adami S, Clauw DJ, Spector TD, Pelletier JP, Raynaud JP (2006): Risedronate decreases biochemical markers of cartilage degradation but does not decrease symptoms or slow radiographic progression in patients with medial compartment osteoarthritis of the knee: Results of the two-year multinational knee osteoarthritis structural arthritis study. *Arthritis Rheum* 54 (11), 3494–3507

Bliddal H, Leeds AR, Stigsgaard L, Astrup A, Christensen R (2011): Weight loss as treatment for knee osteoarthritis symptoms in obese patients: 1-year results from a randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis* 70 (10), 1798–1803

Blumenkrantz G, Lindsey CT, Dunn TC, Jin H, Ries MD, Link TM, Steinbach LS, Majumdar S (2004): A pilot, two-year longitudinal study of the interrelationship between trabecular bone and articular cartilage in the osteoarthritic knee. *Osteoarthritis Cartilage* 12 (12), 997–1005

Bolbos RI, Zuo J, Banerjee S, Link TM, Ma CB, Li X, Majumdar S (2008): Relationship between trabecular bone structure and articular cartilage morphology and relaxation times in early OA of the knee joint using parallel MRI at 3 T. *Osteoarthritis Cartilage* 16 (10), 1150–1159

Borrelli F, Ernst E (2008): Black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) for menopausal symptoms: a systematic review of its efficacy. *Pharmacol Res* 58 (1), 8–14

- Bousson V, Meunier A, Bergot C, Vicaut É, Rocha MA, Morais MH, Laval-Jeantet AM, Laredo JD (2001): Distribution of Intracortical Porosity in Human Midfemoral Cortex by Age and Gender. *J Bone Miner Res* 16 (7), 1308–1317
- Buckwalter JA, Mankin HJ (1998): Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 47, 487–504
- Burdette JE, Chen SN, Lu ZZ, Xu H, White BE, Fabricant DS, Liu J, Fong HH, Farnsworth NR, Constantinou AL (2002): Black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.) protects against menadione-induced DNA damage through scavenging of reactive oxygen species: bioassay-directed isolation and characterization of active principles. *J Agric Food Chem* 50 (24), 7022–7028
- Burr DB (2004): The importance of subchondral bone in the progression of osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 70, 77–80
- Calvo E, Castañeda S, Largo R, Fernández-Valle ME, Rodríguez-Salvanés F, Herrero-Beaumont G (2007): Osteoporosis increases the severity of cartilage damage in an experimental model of osteoarthritis in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 15 (1), 69–77
- Cao JJ (2011): Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res* 6, 30
- Casari E, Alfano M, Valente M, Clarke GD, Ferni G, Grazioli B (1997): Ovariectomy in the rat induces a rapid increase in the urinary excretion of hydroxylysine glycosides and non-reducible crosslink residues. *Osteoporos Int* 7 (6), 539–543
- Chen Y, Heiman ML (2001): Increased weight gain after ovariectomy is not a consequence of leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280 (2), E315–322
- Chiba K, Ito M, Osaki M, Uetani M, Shindo H (2011): In vivo structural analysis of subchondral trabecular bone in osteoarthritis of the hip using multi-detector row CT. *Osteoarthritis Cartilage* 19 (2), 180–185
- Cicek SS, Schwaiger S, Ellmerer EP, Stuppner H (2010): Development of a fast and convenient method for the isolation of triterpene saponins from *Actaea racemosa* by high-speed countercurrent chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *Planta Med* 76 (5), 467–473
- Coggon D, Reading I, Croft P, McLaren M, Barrett D, Cooper C (2001): Knee osteoarthritis and obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 (5), 622–627
- Compston JE (2001): Sex steroids and bone. *Physiol Rev* 81 (1), 419–447
- Consensus Development Conference (1993): Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 94 (6), 646–650
- Crowder C, Austin D (2005): Age ranges of epiphyseal fusion in the distal tibia and fibula of contemporary males and females. *J Forensic Sci* 50 (5), 1001–1007
- Dalle Carbonare L, Valenti MT, Bertoldo F, Zanatta M, Zenari S, Realdi G, Lo Cascio V, Giannini S (2005): Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. *Micron* 36 (7-8), 609–616
- Danielsen CC, Mosekilde L, Svenstrup B (1993): Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. *Calcif Tissue Int* 52 (1), 26–33
- Day JS, Ding M, Bednarz P, van der Linden JC, Mashiba T, Hirano T, Johnston CC, Burr DB, Hvid I, Sumner DR (2004): Bisphosphonate treatment affects trabecular bone apparent

- modulus through micro-architecture rather than matrix properties. *J Orthop Res* 22 (3), 465–471
- DeHoff RT, Aigeltinger EH, Craig KR (1972): Experimental determination of the topological properties of three-dimensional microstructures. *J Microsc* 95 (1), 69–91
- Dempster DW, Birchman R, Xu R, Lindsay R, Shen V (1995): Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. *Bone* 16 (1), 157–161
- Dolbow JD, Dolbow DR, Gorgey AS, Adler RA, Gater DR (2013): The effects of aging and electrical stimulation exercise on bone after spinal cord injury. *Aging Dis* 4 (3), 141–153
- Einbond LS, Shimizu M, Nuntanakorn P, Seter C, Cheng R, Jiang B, Kronenberg F, Kennelly EJ, Weinstein IB (2006): Actein and a fraction of black cohosh potentiate antiproliferative effects of chemotherapy agents on human breast cancer cells. *Planta Med* 72 (13), 1200–1206
- Erben RG (1996): Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: modeling or remodeling? *Anat Rec* 246 (1), 39–46
- Feldhaus A: Wirkung von Seltenen Erden auf den osteoporotisch veränderten Knochen im Tiermodell der ovariektomierten Ratte. Tiermed. Diss. München 2006
- Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt MA, Jesion G, Kleerekoper M (1989): The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* 4 (1), 3–11
- Förtsch M, Schmidt T, Feldmann C, Maurer T (2014): DVO-Leitlinie (DVO: Dachverband Osteologie) in der osteologischen Schwerpunktpraxis. *Trauma Berufskrankh* 16, 110-121
- Frei-Kleiner S, Schaffner W, Rahlfs VW, Bodmer C, Birkhäuser M (2005): Cimicifuga racemosa dried ethanolic extract in menopausal disorders: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *Maturitas* 51 (4), 397–404
- Frost HM, Jee WS (1992): On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *J Bone Miner* 18 (3), 227–236
- Gandhi R, Takahashi M, Virtanen C, Syed K, Davey JR, Mahomed NN (2011): Microarray analysis of the infrapatellar fat pad in knee osteoarthritis: relationship with joint inflammation. *J Rheumatol* 38 (9), 1966–1972
- Garrahan NJ, Mellish RW, Compston JE (1986): A new method for the two-dimensional analysis of bone structure in human iliac crest biopsies. *J Microsc* 142 (Pt 3), 341–349
- Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J, Nanes MS (2000): Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology* 141 (11), 3956–3964
- Gorres BK, Bomhoff GL, Gupte AA, Geiger PC (2011): Altered estrogen receptor expression in skeletal muscle and adipose tissue of female rats fed a high-fat diet. *J Appl Physiol* 110 (4), 1046–1053
- Götte S, Dittmar K (2001): Epidemiologie und Kosten der Osteoporose. *Orthopade* 30 (7), 402–404
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS (1998): Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78 (3), 783–809

- Grumbach MM (2000): Estrogen, bone, growth and sex: a sea change in conventional wisdom. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13 Suppl 6, 1439–1455
- Heberlein I, Demary W, Bloching H, Braun J, Buttgereit F, Dreher R, Kuhn C, Lange U, Zink A, Zeidler H (2011): Diagnostik und Behandlung der Osteoporose bei rheumatoider Arthritis vor dem Hintergrund der Leitliniennutzung. *Z Rheumatol* 70 (7), 592–601
- Hedrich HJ: History, Strains and Models. In: Krinke GJ (Hrsg.): *The Laboratory Rat*. Academic Press, San Diego 2000, 3-16
- Hefti F: *Kinderorthopädie in der Praxis*. 2. Auflage; Springer, Heidelberg 2006
- Hordon LD, Raisi M, Aaron JE, Paxton SK, Beneton M, Kanis JA (2000): Trabecular architecture in women and men of similar bone mass with and without vertebral fracture: I. Two-dimensional histology. *Bone* 27 (2), 271–276
- Jee WS, Yao W (2001): Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1 (3), 193–207
- Jordan GR, Loveridge N, Bell KL, Power J, Rushton N, Reeve J (2000): Spatial clustering of remodeling osteons in the femoral neck cortex: a cause of weakness in hip fracture? *Bone* 26 (3), 305–313
- Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15 (3), 175–191
- Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW (1989): The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology* 124 (1), 7–16
- Kapur P, Wuttke W, Jarry H, Seidlová-Wuttke D (2010): Beneficial effects of beta-Ecdysone on the joint, epiphyseal cartilage tissue and trabecular bone in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17 (5), 350–355
- Karsdal MA, Leeming DJ, Dam EB, Henriksen K, Alexandersen P, Pastoureau P, Altman RD, Christiansen C (2008): Should subchondral bone turnover be targeted when treating osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage* 16 (6), 638–646
- Khosla S, Atkinson EJ, Melton LJ 3rd, Riggs BL (1997): Effects of age and estrogen status on serum parathyroid hormone levels and biochemical markers of bone turnover in women: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 82 (5), 1522–1527
- Khosla S, Melton LJ 3rd, Riggs BL (2011): The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: Is a revision needed? *J Bone Miner Res* 26 (3), 441–451
- Klein-Wieringa IR, Kloppenburg M, Bastiaansen-Jenniskens YM, Yusuf E, Kwekkeboom JC, El-Bannoudi H, Nelissen RG, Zuurmond A, Stojanovic-Susulic V, Van Osch GJ (2011): The infrapatellar fat pad of patients with osteoarthritis has an inflammatory phenotype. *Ann Rheum Dis* 70 (5), 851–857
- Kolios L, Daub F, Sehmisch S, Frosch KH, Tezval M, Stuermer KM, Wuttke W, Stuermer EK (2010): Absence of positive effect of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) on fracture healing in osteopenic rodent model. *Phytother Res* 24 (12), 1796–1806
- Laib A, Newitt DC, Lu Y, Majumdar S (2002): New model-independent measures of trabecular bone structure applied to in vivo high-resolution MR images. *Osteoporos Int* 13 (2), 130–136

- Le HM, Holmes RE, Shors EC, Rosenstein DA (1992): Computerized quantitative analysis of the interconnectivity of porous biomaterials. *Acta Stereol* 11 Suppl 1, 267-272
- Legrand E, Chappard D, Pascaretti C, Duquenne M, Krebs S, Rohmer V, Basle MF, Audran M (2000): Trabecular bone microarchitecture, bone mineral density, and vertebral fractures in male osteoporosis. *J Bone Miner Res* 15 (1), 13–19
- Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA (2008): The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Com Med* 58 (5), 424–430
- Lindberg MK, Alatalo SL, Halleen JM, Mohan S, Gustafsson JA, Ohlsson C (2001): Estrogen receptor specificity in the regulation of the skeleton in female mice. *J Endocrinol* 171 (2), 229–236
- Lindsay R: Sex steroids in the pathogenesis and prevention of osteoporosis. In: Riggs BL, Melton LJ III (Hrsg.): *Osteoporosis: Etiology, diagnosis and management*. Raven Press, New York 1988, 333–358
- Lindsey CT, Narasimhan A, Adolfo JM, Jin H, Steinbach LS, Link T, Ries M, Majumdar S (2004): Magnetic resonance evaluation of the interrelationship between articular cartilage and trabecular bone of the osteoarthritic knee. *Osteoarthritis Cartilage* 12 (2), 86–96.
- Liske E, Hänggi W, Henneicke-von Zepelin HH, Boblitz N, Wüstenberg P, Rahlfs VW (2002): Physiological investigation of a unique extract of black cohosh (*Cimicifugae racemosae rhizoma*): a 6-month clinical study demonstrates no systemic estrogenic effect. *J Womens Health Gend Based Med* 11 (2), 163–174
- Manolagas SC (2000): Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21 (2), 115–137
- Mansell JP, Collins C, Bailey AJ (2007): Bone, not cartilage, should be the major focus in osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3 (6), 306–307
- Martin EA, Ritman EL, Turner RT (2003): Time course of epiphyseal growth plate fusion in rat tibiae. *Bone* 32 (3), 261–267
- McKenna DJ, Jones K, Humphrey S, Hughes K (2001): Black cohosh: efficacy, safety, and use in clinical and preclinical applications. *Altern Ther Health Med* 7 (3), 93–100
- Milz S, Boszczyk A, Putz R (2002): Development and functional structure of the epiphyseal plate. *Orthopade* 31 (9), 835–840
- Müller R, van Campenhout H, Van Damme B, Van der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, Rügsegger P (1998): Morphometric Analysis of Human Bone Biopsies: A Quantitative Structural Comparison of Histological Sections and Micro-Computed Tomography. *Bone* 23 (1), 59–66
- Mundy GR (2007): Osteoporosis and inflammation. *Nutr Rev* 65 (12 Pt 2), S147-151
- Muraoka T, Hagino H, Okano T, Enokida M, Teshima R (2007): Role of subchondral bone in osteoarthritis development: a comparative study of two strains of guinea pigs with and without spontaneously occurring osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 56 (10), 3366–3374
- NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7-29, 2000: highlights of the conference (2001). *South Med J* 94 (6), 569–573

- Nilsson O, Chrysis D, Pajulo O, Boman A, Holst M, Rubinstein J, Martin Ritzen E, Sävendahl L (2003): Localization of estrogen receptors-alpha and -beta and androgen receptor in the human growth plate at different pubertal stages. *J Endocrinol* 177 (2), 319–326
- Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J (2005): Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res* 64 (4), 157–165
- Nisslein T, Freudenstein J (2003): Effects of an isopropanolic extract of *Cimicifuga racemosa* on urinary crosslinks and other parameters of bone quality in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 21 (6), 370–376
- Osmers R, Friede M, Liske E, Schnitker J, Freudenstein J, Henneicke von Zepelin HH (2005): Efficacy and safety of isopropanolic black cohosh extract for climacteric symptoms. *Obstet Gynecol* 105 (5 Pt 1), 1074–1083
- Pacifici R (2007): T cells and post menopausal osteoporosis in murine models. *Arthritis Res Ther* 9 (2), 102
- Parfitt AM: The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data. In: Recker RR (Hrsg.): *Bone histomorphometry: techniques and interpretation*. CRC Press, Boca Raton 1983, 143–223
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987): Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2 (6), 595–610
- Pereira D, Peleteiro B, Araújo J, Branco J, Santos RA, Ramos E (2011): The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 19 (11), 1270–1285
- Pugh JW, Rose RM, Radin EL (1973): A structural model for the mechanical behavior of trabecular bone. *J Biomech* 6 (6), 657–670
- Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC (2011): Osteoporosis: now and the future. *Lancet* 377 (9773), 1276–1287
- Rai MF, Sandell LJ (2011): Inflammatory mediators: tracing links between obesity and osteoarthritis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 21 (2), 131–142
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC (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 (3), 321–333
- Sambrook P, Cooper C (2006): Osteoporosis. *Lancet* 367 (9527), 2010–2018
- Schellenberg R, Saller R, Hess L, Melzer J, Zimmermann C, Drewe J, Zahner C (2012): Dose-Dependent Effects of the *Cimicifuga racemosa* Extract Ze 450 in the Treatment of Climacteric Complaints: A Randomized, Placebo-Controlled Study. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012, 260-301
- Schmid D, Woehs F, Svoboda M, Thalhammer T, Chiba P, Moeslinger T (2009): Aqueous extracts of *Cimicifuga racemosa* and phenolcarboxylic constituents inhibit production of proinflammatory cytokines in LPS-stimulated human whole blood. *Can J Physiol Pharmacol* 87 (11), 963–972

- Schünke M: Funktionelle Anatomie – Topographie und Funktion des Bewegungssystems. 1. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2000
- Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Becker T, Christoffel V, Wuttke W (2003 a): Pharmacology of *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. *Maturitas* 44 Suppl 1, 39-50
- Seidlová-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T, Wuttke W (2003 b): Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: comparison with estradiol-17beta. *Eur J Endocrinol* 149 (4), 351–362
- Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Pitzel L, Wuttke W (2005): Effects of estradiol-17beta, testosterone and a black cohosh preparation on bone and prostate in orchidectomized rats. *Maturitas* 51 (2), 177–186
- Seidlová-Wuttke D, Stürmer KM, Stürmer EK, Sehmisch S, Wuttke W (2006): Contrasting effects of estradiol, testosterone and of a black cohosh extract on density, mechanical properties and expression of several genes in the metaphysis of the tibia and on fat tissue of orchidectomized rats. *Maturitas* 55 Suppl 1, S64-74
- Seidlová-Wuttke D, Nguyen BT, Wuttke, W (2012 a): Long-term effects of ovariectomy on osteoporosis and obesity in estrogen-receptor- β -deleted mice. *Comp Med* 62 (1), 8–13
- Seidlová-Wuttke D, Eder N, Stahnke V, Kammann M, Stecher G, Haunschild J, Wessels JT, Wuttke W (2012 b): *Cimicifuga racemosa* and its triterpene-saponins prevent the Metabolic Syndrome and deterioration of cartilage in the knee joint of ovariectomized rats by similar mechanisms. *Phytomedicine* 19 (8-9), 846–853
- Seidlová-Wuttke D, Stecher G, Kammann M, Haunschild J, Eder N, Stahnke V, Wessels J, Wuttke W (2012 c): Osteoprotective effects of *Cimicifuga racemosa* and its triterpene-saponins are responsible for reduction of bone marrow fat. *Phytomedicine* 19 (10), 855–860
- Sniekers YH, Weinans H, van Osch, GJ, van Leeuwen JP (2010): Estrogen is important for maintenance of cartilage and subchondral bone in a murine model of knee osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 12 (5), R182
- Spencer GJ, Hitchcock IS, Genever PG (2004): Emerging neuroskeletal signalling pathways: a review. *FEBS Lett* 559 (1-3), 6-12
- Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ (1995): FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 17 (4 Suppl), 125S-133S
- Trzeciakiewicz A, Habauzit V, Horcajada MN (2009): When nutrition interacts with osteoblast function: molecular mechanisms of polyphenols. *Nutr Res Rev* 22 (1), 68–81
- Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, Sibonga JD (2001): Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord* 2 (1), 117–127
- Uebelhack R, Blohmer JU, Graubaum HJ, Busch R, Gruenwald J, Wernecke KD (2006): Black cohosh and St. John's wort for climacteric complaints: a randomized trial. *Obstet Gynecol* 107 (2 Pt 1), 247–255
- US FDA (1994): Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. Hg. v. Div Met End Drug Prod, Food and Drug Admin. Rockville, Maryland, USA. www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/04d-0035-gdl0001.pdf aufgerufen Januar 2013

- van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM (2003): Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr Rev* 24 (6), 782–801
- Viereck V, Gründker C, Friess SC, Frosch KH, Raddatz D, Schoppet M, Nisslein T, Emons G, Hofbauer LC (2005): Isopropanolic extract of black cohosh stimulates osteoprotegerin production by human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 20 (11), 2036–2043
- Wasmer G, Pförringer W: Ultrastruktur und Biochemie der Epiphysenfuge. In: Pförringer W, Rosemeyer B (Hrsg.): Die Epiphysenfugen. 1. Auflage; Perimed Fachbuch-Verlagsgesellschaft, Erlangen 1987, 25-52
- Wellen KE, Hotamisligil GS (2003): Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 112 (12), 1785–1788
- Welsch U: Lehrbuch Histologie. 1. Auflage; Urban und Fischer/Elsevier, München 2003
- Westacott C (2002): Interactions between subchondral bone and cartilage in OA. Cells from osteoarthritic bone can alter cartilage metabolism. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2 (6), 507–509
- Windahl SH, Hollberg K, Vidal O, Gustafsson JA, Ohlsson C, Andersson G (2001): Female estrogen receptor beta-/- mice are partially protected against age-related trabecular bone loss. *J Bone Miner Res* 16 (8), 1388–1398
- Winterhoff H, Spengler B, Christoffel V, Butterweck V, Löhning A (2003): Cimicifuga extract BNO 1055: reduction of hot flushes and hints on antidepressant activity. *Maturitas* 44 Suppl 1, S51-58
- Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA (1985): Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 37 (3), 324–328
- Wronski TJ, Cintrón M, Doherty AL, Dann LM (1988): Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinology* 123 (2), 681–686
- Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M (1989): Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 45 (6), 360–366
- Wronski TJ, Yen CF, Burton KW, Mehta RC, Newman PS, Soltis EE, DeLuca PP (1991): Skeletal effects of calcitonin in ovariectomized rats. *Endocrinology* 129 (4), 2246–2250
- Wuttke W, Jarry H, Westphalen S, Christoffel V, Seidlová-Wuttke D (2002): Phytoestrogens for hormone replacement therapy? *J Steroid Biochem Mol Biol* 83 (1-5), 133–147
- 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 (2), 185–196
- Wuttke W, Jarry H, Haunschild J, Stecher G, Schuh M, Seidlová-Wuttke D (2014): The non-estrogenic alternative for the treatment of climacteric complaints: Black cohosh (*Cimicifuga* or *Actaea racemosa*). *J Steroid Biochem Mol Biol* 139, 302–310

Yang CL, Chik SC, Li JC, Cheung BK, Lau AS (2009): Identification of the bioactive constituent and its mechanisms of action in mediating the anti-inflammatory effects of black cohosh and related *Cimicifuga* species on human primary blood macrophages. *J Med Chem* 52 (21), 6707–6715

Zhu S, Chen K, Lan Y, Zhang N, Jiang R, Hu J (2013): Alendronate protects against articular cartilage erosion by inhibiting subchondral bone loss in ovariectomized rats. *Bone* 53 (2), 340–349

Zoth N, Weigt C, Laudénbach-Leschowski U, Diel P (2010): Physical activity and estrogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 122 (1-3), 100–105

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Priv.-Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke und Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke für die Überlassung des interessanten Themas und der Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit in der Abteilung der klinischen und experimentellen Endokrinologie bedanken. Ebenfalls danke ich Frau Priv.-Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke für die Betreuung und Hilfestellung bei allen Fragen zur Durchführung der Arbeit und Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke für seine Anregungen und Diskussionsbereitschaft, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin gilt mein Dank an Frau H. Brügemann-Meyer, MTA, für ihre Hilfe bei der Herstellung der Knochenpräparate.