

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

**Die Wirkung von Ecdyson und Vitamin D auf
Knochen-, Muskel- und Fettgewebe bei der
ovariektomierten Ratte, bestimmt mittels
quantitativer Computertomographie**

INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von

Maria Katharina Annette Göke

aus

Menden

Göttingen 2017

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2010 bis August 2016 in der Abteilung für experimentelle Endokrinologie, geleitet durch Herrn Prof. Dr. W. Wuttke, an der Universitätsmedizin Göttingen erstellt.

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

Referent/in: PD Dr. med. D. Seidlová-Wuttke

Ko-Referent/in: Prof. Dr. Heide Siggelkow

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung: 21.02.2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Die Wirkung von Ecdyson und Vitamin D auf Knochen, Muskel- und Fettgewebe bei der ovariektomierten Ratte, bestimmt mittels quantitativer Computertomographie“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis.....	4
I. Einleitung.....	6
1. Die Osteoporose	7
1.1 Definition	7
1.2 Knochen	8
1.3 Knochen und Östrogene.....	13
1.4 Die postmenopausale Osteoporose	13
1.5 Die ovx Ratte als Tiermodell der postmenopausalen Osteoporose	14
1.6 Diagnostik.....	16
1.7 Prävention und Therapiemöglichkeiten	18
2. Die Fettleibigkeit.....	19
2.1 Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR).....	21
3. Die Sarkopenie	21
4. Vitamin D	22
4.1 Hormonsynthese	22
4.2 Vitamin D-Rezeptor	22
4.3 Vitamin D-Wirkung.....	23
5. Ecdyson	24
5.1 Die Ecdysteroide	24
5.2 Die Wirkung von Ecd	25
5.3 Wirkmechanismus	27
5.4 Parallelen zwischen Ecdyson und Vitamin D.....	28

6. Zielsetzung der Arbeit	29
II. Material und Methoden	30
1. Der Versuch	30
1.1 Versuchstiere.....	30
1.2 qCT.....	30
1.3 Ovariectomie	32
1.4 Tierfutter und Wirkstoffapplikation	32
1.5 Obduktion	34
2. Auswertung	34
2.1 Knochen im qCT.....	35
2.2 Muskulatur im qCT	37
2.3 Fettgewebe im qCT	37
3. Serumdiagnostik	37
4. Statistische Auswertung und graphische Darstellung	37
III. Ergebnisse.....	39
3. Körpergewicht	39
2. Futteraufnahme.....	40
3. Knochen.....	41
3.1 Endostale Dichte	41
3.2 Endostale Fläche.....	42
3.3 Kortikale Dichte	43
3.4 Kortikale Fläche.....	44
3.5 Endostale Zirkumferenz.....	45
3.6 Periostale Zirkumferenz.....	46
3.7 Osteokalzin im Serum	47
3.8 Crosslaps im Serum	48

4. Muskulatur	49
4.1 Muskelfläche.....	49
4.2 Muskulaturdichte	50
5. Fettgewebe	51
5.1 Fettfläche.....	51
5.3 Serumparameter des Fettstoffwechsels	52
IV. Diskussion.....	54
1. Studienziel	54
2. Analyse der Ergebnisse	55
2.1 Körpergewicht und Futteraufnahme	55
2.2 Fettgewebe.....	56
2.3 Muskulatur.....	57
2.4 Knochen	59
2.5 Mögliche Wirkzusammenhänge von Ecdyson und Vitamin D.....	63
V. Zusammenfassung.....	66
VI. Literaturverzeichnis	68
VII. Anhang.....	80
Abbildungsverzeichnis	83
Tabellenverzeichnis.....	86
Danksagung	87

Abkürzungsverzeichnis

AP	knochenspezifische alkalische Phosphatase
BMD	Knochenmineralisierungsdichte
BMP	Bone Morphogenic Protein
BMU	Basic Multicellular Unit
CL	Cross Laps
E2	Östradiol
Ecd	20-OH-Ecdyson
EcdR	Ecdysonrezeptor
ED	endostale Dichte
EF	endostale Fläche
ER	Estrogenrezeptor
EZM	Extrazelluläre Matrix
DVO	Dachverband für Osteoporose
DXA	Dual X-ray Absorptiometrie
HRT	Hormonersatztherapie
IE	internationale Einheiten
IL	Interleukin
KD	kortikale Dichte
KF	kortikale Fläche
MF	Muskelfläche
MSC	mesenchymale Stammzelle
M-CSF	Macrophage - Colony Stimulating Factor
OC	Osteokalzin
OPG	Osteoprotegerin
Ovx	Ovariectomie
ovx	ovariectomiert

PPAR	Peroxisomen Proliferator-aktivierter-Rezeptor
Präovx	Tiere vor der Ovariectomie
PTH	Parathormon
qCT	quantitative Computertomographie
RANK	Receptor Activator of NFκB
RANKL	Receptor Activator of NFκB ligand
RUNX-2	Runt-related transcription factor 2
RXR	Retinoid X-Rezeptor
SD	Standardabweichung
TNF	Tumornekrosefaktor
USP	Ultraspiracle Protein
VD	Vitamin D
VDR	Vitamin D-Rezeptor
WHI	Women's Health Initiative
WHO	Weltgesundheitsorganisation

I. Einleitung

Die zu erwartende Veränderung der Alterstruktur in Deutschland und weltweit wird durch den immer weiter steigenden Bevölkerungsanteil der über 60-Jährigen in den kommenden Jahren eine zunehmende Herausforderung für unser Gesundheitssystem darstellen. Die Prävalenz tyischer, mit dem Alter assoziierter Erkrankungen wird deutlich ansteigen. In diesem Zusammenhang stellt das Versiegen der ovariellen Östrogenproduktion bei der Frau einen wichtigen Risikofaktor insbesondere für die Entwicklung einer Osteoporose dar. Der Östrogenmangel führt überdies häufig zu einer Zunahme von vorrangig viszeralem Fettgewebe sowie zu einem Abbau von Muskulatur, wodurch die Knochengesundheit weiter negativ beeinflusst wird (Fielding et al. 2011; Wend et al. 2012; Pollock et al. 2010). Die erste klinische Manifestation der Erkrankung besteht in Fragilitätsfrakturen. Diese Frakturen betreffen häufig das Becken, den Schenkelhals, aber auch Wirbelkörper und führen oftmals zu langen Krankenhausaufenthalten und Immobilisation, verbunden mit einer hohen Mortalität und dem Verlust der Selbstständigkeit. Osteoporose stellt nicht nur ein soziales, sondern auch ein wirtschaftliches Problem dar: Die Behandlungskosten für die im Jahre 2003 allein in Deutschland gezählten Patienten beliefen sich auf 5,4 Milliarden Euro (Häussler et al. 2007). Diese Entwicklungen sind Anlass für intensive Forschung zur Entdeckung präventiver Maßnahmen und nebenwirkungsarmer Therapiemöglichkeiten der Osteoporose. In diesem Rahmen zeigte das Ecdysteroid 20-OH Ecdyson (Ecd) ohne bekannte Nebenwirkungen im tierexperimentellen Rahmen vielfach positive Auswirkungen auf die Knochenqualität. Zudem konnte durch Ecd die Zunahme an Fettgewebe reduziert und Muskulatur aufgebaut werden (Seidlová-Wuttke et al. 2010a, Kapur et al. 2008). Die vorliegende Arbeit befasst sich am Tiermodell der ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratte mit der Wirkung von Ecd auf Fett-, Muskel- und Knochengewebe, um einen möglichen präventiven Therapieeinsatz des Ecdysteroids weiter zu prüfen.

1. Die Osteoporose

1.1 Definition

Die *Consensus Development Conference* des *National Institutes of Health* definierte die Osteoporose als eine systemische Skeletterkrankung, welche mit einer verminderten Knochenmasse sowie einer Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes einhergeht. Diese qualitativen und quantitativen Veränderungen führen zu einer erhöhten Knochenfragilität, mit der das Frakturrisiko steigt (1993).

Die klinische Definition der Erkrankung ist eng an diagnostische Maßnahmen gekoppelt. Die Diagnosestellung einer Osteoporose erfolgt heutzutage meist über die Messung der Knochenmineralisierungsdichte (BMD) als indirekter Hinweis für einen Verlust an Knochensubstanz und ein damit assoziiert erhöhtes Frakturrisiko (Kanis 2002).

Die BMD lässt sich mittels Dual-X-ray Absorptiometrie (DXA) messen und wird meist am proximalen Femur oder der Lendenwirbelsäule bestimmt. Die Interpretation der Messwerte erfolgt in der Regel über Bestimmung des von der WHO entwickelten T-Scores. Dieser basiert auf der Annahme, dass der Mensch seine maximale BMD im Alter von etwa 30 Jahren erreicht. Diese sogenannte *Peak Bone Mass* einer Population wird als normal verteilt angenommen (Abb. 1). Beim T-Score wird die gemessene BMD eines Patienten mit dem Mittelwert der BMD einer 30-jährigen Frau seiner Population in Relation gesetzt und in Standardabweichungen (SD) angegeben. Der T-Score ist Grundlage für die Einteilung in die vier diagnostischen Kategorien der WHO für Osteoporose und Osteopenie (s. Tabelle 1): So gilt ein Ergebnis T-Score ≥ -1 als normal. Eine BMD zwischen -1 und $-2,499$ SD wird als niedrige Knochenmasse (Osteopenie) gewertet. Weicht die BMD mehr als $-2,5$ SD vom Referenzmittelwert ab, gilt dies als Osteoporose. Kommen zu einem T-Score $\leq -2,5$ eine oder mehrere Fragilitätsfrakturen hinzu, spricht man von schwerer oder auch manifester Osteoporose (Schuiling et al. 2011). In der Abteilung für Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen wurde ebenfalls ein T-Score für Ratten entwickelt (Mündliche Mitteilung der Verfasserin Laß 2011).

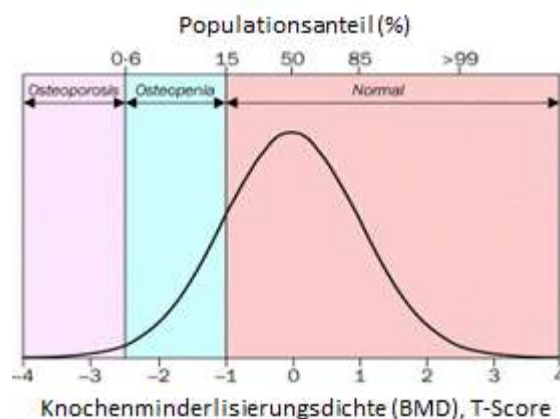


Abbildung 1: Verteilung der BMD gesunder Frauen zwischen dem 30.- 40. Lebensjahr

T –Score	Diagnose
0 - 0,99	Normalbefund
-1 bis -2,499	Osteopenie
$\leq -2,5$	Präklinische Osteoporose
$\leq -2,5$ und aktuelle bzw. vorhergehende Fraktur	Manifeste Osteoporose

Tabelle 1: WHO-Diagnosekriterien für Osteopenie und Osteoporose, basierend auf dem T-Score

1.2 Knochen

Der Knochen aller Säugetiere ist ein lebendiges Organ mit einer Vielzahl von Funktionen und Aufgaben, welchen er zum einen durch seine Materialzusammensetzung, aber auch durch seinen einzigartigen, strukturellen Aufbau gerecht wird. Die Bildung eines inneren Skelettes ermöglicht die aufrechte Körperhaltung. Der Knochen dient ebenfalls als Ansatzpunkt der Muskulatur und vermittelt so Mobilität. Durch seine Festigkeit schützt er lebenswichtige Organe wie das Herz und das zentrale Nerven-

system. Zudem ist der Knochen der größte Mineralstoffspeicher und spielt eine entscheidende Rolle bei der Homöostase von Kalzium, Phosphat und Magnesium.

1.2.1 Anatomie des Knochens

Da sich die vorliegende Arbeit insbesondere mit geometrischen Parametern des Knochens in der quantitativen Computertomographie beschäftigt, wird zunächst der makroskopische Aufbau des Knochens am Beispiel des langen Röhrenknochens erläutert. Der lange Schaft des Knochens, die Diaphyse, endet in den zwei distalen Epiphysen, welche an der Bildung der Gelenkflächen beteiligt sind. Epi- und Diaphyse sind über einen Übergangsbereich, die Metaphyse, miteinander verbunden. Hier befindet sich auch die Epiphysenfuge, bestehend aus Chondrozyten, über welche bis zum Erlangen der Reife des Knochens dessen Längenwachstum erfolgt. Im Gegensatz zum Menschen kommt es bei der Ratte im Laufe des Lebens nicht zu einer Verknöcherung der Wachstumsfuge, so dass der Knochen des Nagetiers zeitlebens wächst.

Periosteal besteht der Knochen aus Kompakta und endostal aus trabekulärem Knochen, der so genannten Spongiosa. Der Knochenmantel umgibt eine zentral gelegene Markhöhle, in der gelbes und rotes Knochenmark zu finden ist. Während das gelbe Knochenmark vorwiegend aus Fettzellen besteht, ist das rote Knochenmark Ort der Blutbildung sowie primäres lymphatisches Organ für die Prägung von B-Lymphozyten. Mikroskopisch betrachtet setzt sich das Stützgewebe Knochen aus zellulären Anteilen und der sie umgebenden Extrazellulären Matrix (EZM) zusammen.

1.2.1.1 Knochenzellen

Zu den knochenspezifischen Zellen zählen im Wesentlichen drei Zelltypen: Die Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Osteoblasten sind knochenbildende Zellen, welche den organischen Teil der EZM synthetisieren und sezernieren. Sobald dieses sogenannte Osteoid kalzifiziert, werden Osteoblasten zu Osteozyten. Die Funktion der Osteozyten konnte bislang noch nicht mit letzter Sicherheit geklärt werden, es wird ihnen jedoch als Mechanosensoren eine regulatorische Funktion bei der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität des Knochens zugeschrieben (Schaffler et

al. 2014). Sie sind von ihrer mineralisierten EZM eingemauert, stehen aber über kleine Knochenkanäle mit weiteren Osteozyten und dem Blutgefäßsystem in Kontakt. Der dritte Zelltyp sind Osteoklasten; dies sind mehrkernige, phagozytierende Zellen, die auf die Resorption mineralisierter Knochenmatrix spezialisiert sind.

1.2.1.2 Knochenmatrix

Die Knochenmatrix ist ein Zweiphasenmaterial aus einer festen, mineralischen Phase in enger Verbindung mit einer organischen Phase. Die organische Matrix besteht vorwiegend aus knochenspezifischem Typ 1-Kollagen. Dieses fibrilläre Protein wird in Lamellen angeordnet, welche durch Quervernetzungen miteinander verbunden werden. Zwischen die Kollagen-Fibrillen lagert sich die mineralische Phase aus Hydroxylapatit ein, welche dort kalzifiziert. Diese Materialverbindung vermittelt zum einen Festigkeit, aber auch Flexibilität, so dass der gesunde Knochen Energie absorbieren kann ohne dabei zu verformen oder zu brechen (Seeman 2007).

1.2.1.3 Knochenfeinbau

Eine besondere Eigenschaft des Knochens ist seine Festigkeit bei gleichzeitig niedrigem Gewicht: Man unterscheidet anhand der Anordnung der EZM zwei Arten von Knochen: $\frac{1}{4}$ der Knochenmasse besteht aus Spongiosa und $\frac{3}{4}$ aus Kompakta. Spongiosa – auch trabekulärer Knochen genannt - ist durch flächige, parallel zur Oberfläche verlaufende Lamellen charakterisiert, welche durch Verbindungspunkte miteinander vernetzt sind. Durch die belastungsabhängige Anordnung dieser Lamellen passt sich der spongiöse Knochen mittelfristig an Belastungssituationen an.

Die Kompakta bildet einen festen Knochenmantel um die Markhöhle und die Spongiosabälkchen. Die Grundeinheit des kompakten Knochens sind Osteone, bestehend aus ca. 5-20 Knochenlamellen, die konzentrisch um den zentral gelegenen Haverskanal angeordnet sind. Im Inneren der Havers-Kanäle befinden sich Gefäße und Nerven. Osteone verlaufen durch Schaltlamellen miteinander verwoben und parallel überlappend in Längsrichtung der langen Röhrenknochen. Sie tragen einen wichtigen Teil zur Stabilität und mechanischen Widerstandsfähigkeit des Knochens bei (Seeman und Delmas 2006).

1.2.2 Physiologie des Knochens

1.2.2.1 Modeling und Remodeling

Als lebendiges Kompartiment herrschen im Knochengewebe ständige Umbauprozesse vor, welche auch als Modeling und Remodeling bezeichnet werden. Diese ermöglichen zum einen die Ausbesserung von Mikroschäden. Zum anderen wird der Knochen in seiner Architektur an die mechanische Belastung adaptiert. Der Umbau erfolgt in temporären, anatomischen Einheiten, welche als *basic multicellular units* (BMU) bezeichnet werden: Eine voranschreitende Gruppe Osteoklasten resorbiert Knochenmatrix, welche durch nachfolgende knochenbildende Osteoblasten wieder ersetzt wird (Jilka 2003). Geschätzt werden durch Remodelingvorgänge jährlich 10% der gesamten Knochenmasse ersetzt (Manolagas 2000). Während des Wachstums, bis zum Erreichen der *Peak Bone Mass*, führt der Knochenumbau sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte zu einer Verdickung von Kortikalis und Spongiosatrabecken. Ob der Knochenumbau in der Summe zu einem Knochenauf- oder abbau führt, wird vor allem durch die Anzahl der aktiven Osteoblasten bzw. Osteoklasten innerhalb der BMUs bestimmt. Die Balance zwischen Proliferation und Apoptose der Osteoblasten und Osteoklasten ist determinierend für die Initiierung neuer BMUs, sowie für das Fortschreiten und die Begrenzung der Lebensdauer bereits existierender BMUs (Manolagas 2000).

1.2.2.2 RANK/RANKL/OPG-System

Die Proliferation von Osteoblasten und Osteoklasten ist ein eng miteinander gekoppelter Prozess, der von Zell-Zell-Interaktionen und lokal produzierten Faktoren abhängt: Beide Knochenzelltypen entwickeln sich aus Stammzellen, die sich im Knochenmark befinden. Osteoblasten entstehen aus mesenchymalen Stammzellen (MSC). Sie benötigen für die Osteoblastogenese eine Vielzahl an lokal produzierten Transkriptionsfaktoren wie *runt-related transcription factor 2* (Runx-2), *bone morphogenic proteins* (BMP) und Osterix. Diese Faktoren werden teils durch Osteoklasten sezerniert (Silva und Branco 2011). Osteoklasten entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen (Manolagas und Jilka 1995). Für die Differenzierung zu Osteoklasten wird zum einen das Zytokin *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) benötigt (Yoshida et al. 1990). Zudem bedarf es des *receptor activator of NFκB ligand* (RANKL), eines Mitglieds der Tumornekrosefaktor (TNF) -Superfamilie. Er akti-

viert den membranständigen Rezeptor *receptor activator of NFκB* (RANK), der sich auf Osteoklasten, wie auch deren Vorläuferzellen, befindet. RANKL wird vor allem als membranständiges Protein von Zellen der osteoblastischen Linie, aber auch von Immunzellen exprimiert. Es stimuliert die Differenzierung zu reifen Osteoklasten sowie deren resorbierende Aktivität (Silva und Branco 2011). An RANK kann jedoch auch ein weiterer Ligand der TNF-Superfamilie binden: Das lösliche Protein Osteoprotegerin (OPG). OPG verhindert durch seine Bindung die RANK/RANKL-Interaktion und hemmt somit die proresorptive Wirkung von RANKL. OPG wird insbesondere von osteoblastischen Zellen und B-Lymphozyten gebildet (Li et al. 2007). Viele Faktoren beeinflussen den Knochenstoffwechsel über eine Veränderung des Gleichgewichtes zwischen RANKL und OPG (Hofbauer und Schoppet 2004). Dazu zählen Steroidhormone wie Östrogene, Vitamin D (VD) aber auch die proinflammatorischen Zytokine Interleukin (IL) 1, IL 6, IL 11 und TNF α (Braun und Schett 2012, Silva und Branco 2011).

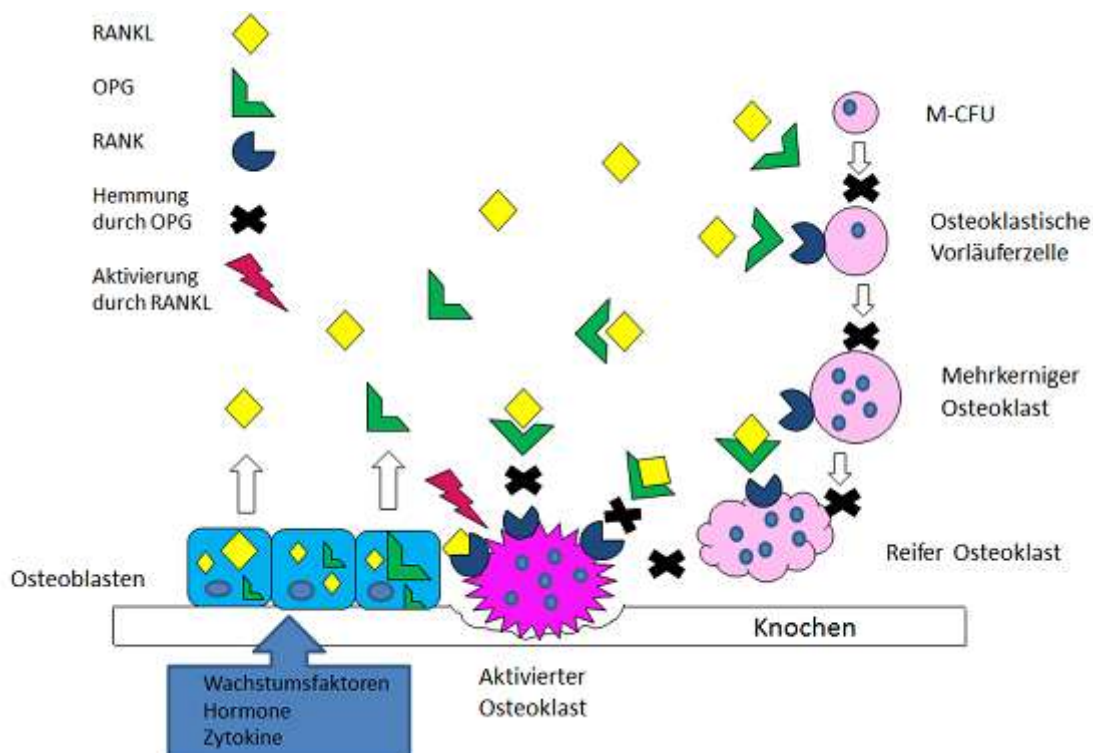


Abbildung 2: Der Wirkmechanismus von RANK, RANKL, OPG

1.3 Knochen und Östrogene

Östrogene gehören zur Gruppe der Steroidhormone. Sie werden bei der Frau vorwiegend in den Ovarien gebildet. Geringe Mengen entstehen auch in den Hoden des Mannes, sowie im Fettgewebe. Die Wirkung erfolgt über Bindung an die Östrogenrezeptoren (ER) α und ER β , welche in einer Vielzahl von Geweben zu finden sind und dort spezifische Wirkungen zeigen (Seidlová-Wuttke et al. 2008b).

Für den Knochen haben Östrogene wichtige regulatorische Funktionen für das Skelettwachstum, indem sie während der Pubertät zum Schluss der Epiphysenfuge führen. Bei erwachsenen Frauen spielen sie eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der Knochenmasse: Östrogene vermitteln eine verminderte Proliferation sowohl von osteoblastischen als auch von osteoklastischen Vorläuferzellen. Ebenso haben Östrogene Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und -formation: Sie haben einerseits eine lebensverlängernde Wirkung auf Osteoblasten und Osteozyten. Auf Osteoklasten hingegen wirken Östrogene proapoptotisch (Manolagas et al. 2002).

1.4 Die postmenopausale Osteoporose

Mit dem Beginn der Menopause und den fehlenden osteoprotektiven Wirkungen der Östrogene steigt das Risiko für Frauen, eine Osteoporose zu entwickeln, stark an. Die postmenopausale Osteoporose (Typ I) ist neben der senilen Osteoporose (Typ II) die häufigste Form dieser Erkrankung und ist ein Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit.

Nach Erreichen der *Peak Bone Mass* im jungen Erwachsenenalter nimmt die trabekuläre Knochenmasse bei normalen Spiegeln der Sexualhormone sowohl bei Männern als auch bei Frauen langsam ab. Mit dem Versiegen der ovariellen Östrogenproduktion kommt es bei der Frau dann zu einer Phase des massiv gesteigerten Abbaus von sowohl trabekulärem als auch kortikalem Knochen (Riggs et al. 2008). Diese sogenannte akzellerierte Phase dauert zwischen 5-10 Jahre nach der Menopause an und geht dann in eine Phase des langsameren Knochenverlusts über, welcher zeitlebens andauert (Riggs 2002).

Die durch das Östrogendefizit induzierte Verschiebung des RANKL/OPG-Gleichgewichts führt dazu, dass mehr Knochenvolumen resorbiert wird als nachgebildet werden kann. Zudem nimmt durch die verlängerte Lebenszeit der Osteoklasten die Tiefe der Resorptionslakunen zu. Es kommt zur Fraktur von Spongiosatrabekeln sowie zum Verlust trabekulärer Verbindungspunkte. Der kortikale Knochen wird in der ersten Phase subendokortikal ausgedünnt, so dass etwa ein Drittel des Cortex Spongiosa-ähnliche Charakteristika annimmt (Chavassieux et al. 2007). Verschärft wird die Problematik der Remodeling Imbalance durch die zusätzlich gesteigerte Initiierung neuer BMUs und einen damit gesteigerten Knochenumsatz (Riggs 2002). Im Rahmen des Remodeling entsteht Knochen, welcher zunächst wenig mineralisiert ist. Erst durch die sekundäre Mineralisierung, welche innerhalb von 24-36 Monaten stattfindet, gewinnt der Knochen zunehmend mechanische Stabilität. Im Zustand des Östrogenmangels steigt also durch den vermehrten Knochenumsatz der Anteil des nur primär mineralisierten, weniger stabilen Knochens (Boivin et al. 2009).

In der zweiten Phase des Knochenverlusts dominiert der fortschreitende Abbau trabekulären Knochens. Die der veränderten Dynamik des Knochenabbaus zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang ungeklärt. Der Verlust an Knochenmasse, die veränderte Mikroarchitektur wie auch qualitative Aspekte nehmen dem Knochen Stabilität und führt zu einer immer weiter steigenden Inzidenz von Fragilitätsfaktoren (Khosla et al. 2011).

1.5 Die ovx Ratte als Tiermodell der postmenopausalen Osteoporose

Die ovariectomierte (ovx) Ratte gilt als etabliertes Tiermodell, das in vielerlei Hinsicht vergleichbare Reaktionen auf Östrogene aber auch auf ein Östrogendefizit wie der menschliche Körper zeigt (Jelinsky et al. 2008).

Die ovarielle Östrogenproduktion der weiblichen Ratte beginnt zwischen dem 35.-40. Lebensjahr der Tiere und dauert bis zu einem Alter von etwa 18 Monaten an (Seidlová-Wuttke et al. 2008b). Ab einem Alter von drei Monaten erreicht die weibliche Ratte ihre Geschlechtsreife. Mit drei Monaten erreicht die Ratte ebenfalls ihre *Peak Bone Mass*. Der zum Beispiel durch eine Ovariectomie (Ovx) herbeigeführte Östrogenmangel wirkt sich auf die Knochen der Ratte sehr ähnlich wie bei Frauen während des Klimakteriums aus. Es kommt initial zu einer Phase beschleunigten Knochenab-

baus, in der die Knochenumsatzrate stark ansteigt und in der Summe die Knochenresorption gegenüber der Knochenformation überwiegt (Dempster et al. 1995). Diese Veränderungen zeigen sich bereits zwei Wochen nach Ovx in der proximalen, metaphysalen Tibia durch einen progressiven Verlust trabekulärer Knochensubstanz. Insbesondere diese Knochenregion reagiert sehr sensibel auf Änderungen des Östrogenspiegels (Seidlová-Wuttke et al. 2008b). Der gesteigerte Knochenumsatz spiegelt sich bei Mensch und Ratte serologisch in erhöhten Osteokalzin (OC) und Crosslaps (CL) Spiegeln wider. Auch bei der Ratte reagiert der kortikale Knochen weniger sensibel auf das Östrogendefizit als der trabekuläre Knochen (Turner et al. 1987). Die Erweiterung der Markhöhle gilt in diesem Zusammenhang als indirekter Parameter für kortikalen Knochenverlust. Es kommt zu endostaler Knochenresorption und periostealer Knochenapposition (Lelovas et al. 2008). Etwa 100 Tage nach Ovx geht diese initiale Phase in die Phase des langsameren Knochenverlustes über (Wronski et al. 1989). Sämtliche Therapien, die in der Behandlung postmenopausaler Osteoporose Anwendung finden, konnten auch den Verlust an Knochensubstanz bei der ovx Ratte teilweise oder komplett aufhalten. Als wirksam erwiesen sich unter anderem Östrogene, Vitamin D - Analoga, Bisphosphonate und SERMs (Kalu 1991).

Eine international gültige Definition der Osteoporose bei der Ratte existiert bislang nicht. Wie bereits einleitend erwähnt, wurde in der Abteilung für Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen ein T-Score für Ratten entwickelt (Mündliche Mitteilung von Laß 2011). Er dient als Vergleichsmaß zur Einordnung der BMD nach Ovx. Die Referenzwerte wurden aus Knochendichtebestimmungen von 1437 intakten, drei Monate alten, sojafrei - ernährten, weiblichen Sprague-Dawley-Ratten ermittelt. Die entsprechenden Dichtewerte sind der folgenden Tabelle 2 zu entnehmen.

T-Score	Befund	Dichte
T-Score ≤ -1	Normalbefund	Dichte: $> 239 \text{ mg/cm}^3$
T-Score -1 bis -2,5	Osteopenie	Dichte: $239 - 200,9 \text{ mg/cm}^3$
T-Score $\leq -2,5$	Osteoporose	Dichte : $<200,9 \text{ mg/cm}^3$

Tabelle 2: Definition der Osteoporose der Ratte anhand des T-Scores (Mündliche Mitteilung von Laß 2011)

1.6 Diagnostik

Mit der voranschreitenden Osteoporose gehen sowohl quantitative als auch qualitative Veränderungen des Knochens einher, welche zu einer verminderten Knochenstabilität führen. Diese Veränderungen lassen sich durch verschiedene diagnostische Maßnahme messen und liefern unterschiedliche Aspekte zur Einschätzung des individuellen Frakturrisikos.

1.6.1 Dual-X-Ray Absorptiometrie (DXA)

Der Goldstandard in der klinischen Diagnostik, aber auch in der Forschung der Osteoporose ist bislang die Messung der BMD per DXA. Demzufolge gibt es einen großen Bestand an Referenzdaten, die eine zuverlässige Interpretation der Messdaten ermöglichen. Die DXA ermöglicht die Erstellung 2-dimensionaler Bilder, bei denen der Knochenmineralgehalt einer Fläche (g/cm^2) gemessen wird (Lane 2006). Eine Unterscheidung zwischen kortikalem und trabekulären Knochen ist jedoch nicht möglich.

1.6.2 Quantitative Computertomographie

Die quantitative Computertomographie (qCT) ist ebenfalls eine Bildgebungstechnik, mit der sich die BMD ermitteln lässt. Der Computertomograph wird mit Hilfe eines Phantoms auf die standardisierte Dichte von Hydroxylapatitkristallen kalibriert (Lane 2006). Mit spezieller Software lassen sich per qCT volumetrische Messungen der BMD (g/cm^3) erstellen.

Das qCT kann im Gegensatz zur DXA zwischen kortikalen und trabekulären Knochendichten unterscheiden und die jeweilige BMD separat ermitteln. Des Weiteren lassen sich durch die Gewinnung dreidimensionaler Daten Aussagen über die Geometrie des Knochens treffen, welche ebenfalls ein Stabilitätskriterium des Knochens darstellt. Das qCT liefert somit wertvolle zusätzliche Informationen.

Nachteile sind eine hohe Strahlenbelastung und höhere Kosten. Zudem sind die gewonnenen BMD-Ergebnisse nicht unmittelbar auf die WHO-Diagnosekriterien übertragbar (Brunader und Shelton 2002; Lane 2006). Aus diesen Gründen findet das qCT bislang vor allem Anwendung in wissenschaftlichen Arbeiten.

1.6.3 Biochemische Marker

Bei allen bisher untersuchten Säugetieren liegen die Ursachen für die Entwicklung einer Osteoporose liegen meist in einer Veränderung des Gleichgewichtes zwischen Knochenresorption und -formation. Für beide Stoffwechselfvorgänge gibt es biochemische Marker, die sich im Serum und Urin nachweisen lassen und positiv mit den entsprechenden Prozessen im Knochen korrelieren. Parameter, die bei der Knochenbildung entstehen, sind zum einen die knochenspezifische alkalische Phosphatase (AP) sowie Osteokalzin (OC). Beim der Resorption von Knochensubstanz lassen sich Abbauprodukte des knochenspezifischen Typ 1 Kollagens nachweisen, welche als *cross-linked telopeptides* oder auch Crosslinks (CL) bezeichnet werden (Szulc und Delmas 2008).

Die Biomarker können Informationen über qualitative Aspekte des Knochens liefern. Sie geben Hinweise auf das Ausmaß der Remodelingvorgänge und somit auch auf das vermehrte Vorliegen weniger mineralisierten Knochens als Risikofaktor für das Auftreten von Fragilitätsfrakturen (Boivin et al. 2009).

In Studien erwiesen sich insbesondere die Marker der Knochenresorption als geeigneter Parameter zur Verlaufskontrolle von Therapiemaßnahmen sowie als sensibler Prädiktor für das Auftreten von Fragilitätsfrakturen, auch unabhängig von der BMD (Sonay-Rendu et al. 2005, Vasikaran et al. 2011).

1.7 Prävention und Therapiemöglichkeiten

Viele Jahre wurden die postmenopausale Osteoporose und auch weitere klimakterische Beschwerden erfolgreich mit Östrogen-/Gestagenpreparaten behandelt. Allerdings stellte sich in verschiedenen Studien unter Therapie ein erheblich erhöhtes Erkrankungsrisiko für Brustkrebs sowie Herzinfarkte, Schlaganfälle und tiefe Beinvenenthrombosen heraus (Beral 2003, Rossouw et al. 2002). Seitdem rät die Women's Health Initiative (WHI) von der sogenannten Hormonersatztherapie (HRT) zur Prävention und Behandlung der postmenopausalen Osteoporose ab. Die Hormonbehandlung mit Östrogenen wird heute nur noch in niedrigster Dosierung über einen begrenzten Zeitraum zur Behandlung neurovegetativer Beschwerden empfohlen (Kanis et al. 2008).

Ist es bereits zu einer signifikanten Abnahme der Knochensubstanz im Sinne einer Osteoporose gekommen, ist es therapeutisch nur noch schwer möglich, den Knochen wieder neu aufzubauen und zu stabilisieren. Somit ist es sinnvoll, Risikogruppen zu identifizieren, um möglichst frühzeitig Präventionsmaßnahmen zu treffen sowie diagnostische und therapeutische Maßnahmen einzuleiten und der Entwicklung einer manifesten Osteoporose entgegenzuwirken. Es gibt mehrere, Risikofaktoren mit unterschiedlicher Wichtung, die das Auftreten der Erkrankung wahrscheinlicher machen: Dazu zählen Alter und Geschlecht, Hormonstatus, eine niedrige *Peak Bone Mass*, die Langzeiteinnahme von Protonenpumpeninhibitoren oder Glukokortikoiden, chronisch entzündliche Erkrankungen, familiäre Vorbelastung und Nikotinabusus. Der DVO sieht in den aktuellen Leitlinien vor, dass postmenopausale Frauen bereits prophylaktisch für eine optimale Versorgung mit Kalzium (mind. 1000 mg/Tag durch die Nahrung und sonst supplementiert) sowie bei geringer Sonnenexposition zusätzlich Vitamin D (800-1000 IU/ Tag) sorgen sollen (DVO 2014). Anhand der individuellen Risikokonstellation empfiehlt der DVO die Durchführung einer sogenannten Basisdiagnostik mittels DXA Knochendichtemessung und Laborchemie und ggf. neben einer gesicherten Kalzium- und Vitamin D-Zufuhr, die Einleitung einer speziellen antiosteoporotischen Therapie.

Die heute zur Verfügung stehenden Medikamente zur routinemäßigen Behandlung manifester Osteoporose haben antiresorptive oder osteoanabole Wirkung. Bisphos-

phonate werden seit über 30 Jahren in der klinischen Praxis angewandt. Sie wirken durch eine Hemmung der Osteoklastenaktivität und führen zu einer geringen Zunahme der BMD (Drake et al. 2008). Ebenfalls resorptionshemmend wirken der selektive Östrogenrezeptor-Modulator (SERM) Raloxifen wie auch der monoklonale humane Antikörper gegen RANKL namens Desunomab (Harris et al. 2012). Eine gefürchtete Nebenwirkung von Bisphosphonaten und Desunomab ist die aseptische Kiefernekrose (Lems und den Heijer 2013). Eine weitere therapeutische Strategie liegt in der intermittierenden Erhöhung des Parathormon (PTH) -Spiegels. Dies führt zu einer Zunahme der Anzahl und Aktivität der Osteoblasten, die eine Zunahme der Knochenmasse und eine verbesserte Architektur von trabekulärem und kortikalem Knochen mit sich bringen (Kanis et al. 2008). Strontiumrelanat ist das einzige zugelassene Medikament, das sowohl antiresorptive als auch knochenbaustimulierende Wirkung hat (Cesareo et al. 2010).

2. Die Fettleibigkeit

Ebenso wie die Osteoporose ist auch die Fettleibigkeit ein in der Gesellschaft zunehmendes Gesundheitsproblem. Insbesondere viszerales Fettgewebe gehört zu den Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung von Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen. Mit der Menopause kommt es bei vielen Frauen zur Gewichtszunahme und insbesondere zur gesteigerten Ausprägung von viszeralem Fettgewebe (Wend et al. 2012). Zudem hat Fettleibigkeit auch Auswirkungen auf die Knochengesundheit. Lange Zeit wurde vermutet, die mit der Fettleibigkeit verbundene erhöhte Körpermasse stelle einen mechanischen Stimulus dar, der zur Proliferation von Osteoblasten führe und somit osteoprotektive Wirkung habe (Zhao et al. 2008). In mehreren Studien wurde aber nun festgestellt, dass sich insbesondere Fettzellen vom viszeralen Typ negativ auf den Knochen auswirken und die Entwicklung einer Osteoporose begünstigen (Pollock et al. 2010). Adipozyten sind neben ihrer Speicherfunktion auch als endokrines Gewebe aktiv: Besonders Fettzellen des viszeralen Typs sezernieren proinflammatorische Zytokine und Hormone wie IL-6, TNF α , Adiponektin und Leptin. Die chronisch erhöhten Entzündungsmediatoren führen über das RANKL/RANK/OPG Gleichgewicht zu einer vermehrten Knochenresorption (Cao

2011). Adipozyten und Osteoblasten stammen beide von pluripotenten, mesenchymalen Stammzellen (MSC) ab (Zhao et al. 2008).

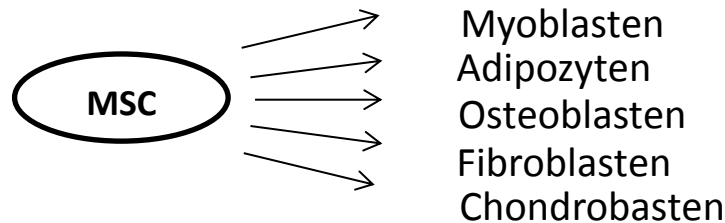


Abbildung 3: Differenzierungsmöglichkeiten mesenchymaler Stammzellen

Abhängig davon welche Wachstums- und Transkriptionsfaktoren ausgeschüttet werden, entwickelt sich die Stammzelle in den einen oder den anderen Zelltyp. Essentiell für die Adipogenese ist das Vorhandensein und die Aktivierung der Peroxisomen-Proliferator-aktivierten-Rezeptoren (PPAR) Subtyp γ , welche durch Fettsäuren aktiviert werden (Göttlicher et al. 1992, Bocos et al. 1995). Entscheidend für die Differenzierung von MSC zu Osteoblasten ist der Transkriptionsfaktor Runx-2. Die Expression der Faktoren, welche die Adipogenese bahnen, ist mit der Herunterregulation der Faktoren, welche die Osteoblastogenese begünstigen verbunden und umgekehrt (Valentini et al. 2011). Mit steigendem Alter, kommt es zu einer Verlagerung des Gleichgewichts zu Gunsten der Adipozyten mit einer zunehmenden Verfettung des Knochenmarks. Syed et al. (2008) stellten fest, dass Östrogene auch in diesem Kontext regulatorische Funktion zu haben scheinen, welche die Differenzierung zu Osteoblasten begünstigt. Zudem wurde ein erhöhter Fettgehalt des Knochenmarks bei Patienten mit Osteoporose festgestellt (Verma et al. 2002). Inwiefern die Gesamtkörperfett und der Fettgehalt des Knochenmarks in Zusammenhang stehen oder als voneinander unabhängige Risikofaktoren für die Entwicklung einer Osteoporose wirken, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt (Sheu und Cauley 2011).

Auch die Fettzellen und Fettdepots der Ratte reagieren auf Östrogenschwankungen. An den unteren Extremitäten wurde das sogenannte „paratibiale Fettdepot“ identifiziert, welches sich im qCT gut darstellen lässt. Es reagiert sehr sensibel auf Östrogen, indem es nach Ovx an Größe zunimmt und durch Östrogen-Gabe wieder kleiner

wird. Analog dazu verhalten sich schwerer zu quantifizierende, abdominale Fettdepots (Seidlová-Wuttke et al. 2003b).

2.1 Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR)

Die PPAR gehören ebenfalls zur Superfamilie nuklearer Hormonrezeptoren. Die Isoformen α , β/δ und γ liegen in unterschiedlichen Geweben vor und nehmen aktivierenden bzw. supprimierenden Einfluss auf die Transkription von Genprodukten des Glukose- und Fettstoffwechsels (Grygiel-Górniak 2014). Sie liegen häufig auch ohne Aktivierung durch Liganden - Fettsäure Derivate, Leukotriene, Eicosanoide - als Heterodimer mit dem RXR im Zellkern vor. Abhängig von Lokalisation, Subtyp, Ligand und verschiedenen Kofaktoren bzw. Kosuppressoren binden sie als Transkriptionsfaktoren an jeweils spezifische, responsive DNS Abschnitte. PPAR α findet sich vor allem in stoffwechselaktiven Geweben wie Herz- und Skelettmuskulatur, aber auch in der Leber und in braunem Fettgewebe. Aktivierung führt zu einer Abnahme von Triglycerid- und Cholesterinspiegel, zu einer Reduktion des Körperfetts sowie einer verminderten muskulären und hepatischen Steatosis (Michalik et al. 2006). PPAR γ findet sich insbesondere im Fettgewebe, fördert die Lipidsynthese und ist essentiell für die Differenzierung von MSC zu Adipozyten. Die Isoform PPAR δ ist bislang am wenigsten erforscht. Sie findet sich zu Großteilen in Skelettmuskelzellen und trägt dort zur Verwertung von Fettsäuren bei. Des Weiteren führt die Aktivierung des PPAR δ in Zusammenhang mit körperlicher Aktivität auch zur Differenzierung von Muskelzellen (Ehrenborg und Kroog 2009).

3. Die Sarkopenie

Mit steigendem Lebensalter kommt es häufig zu einer progredienten Abnahme von Masse und Kraft der Skelettmuskulatur. Zu den multifaktoriellen Gründen für die Entwicklung der so genannten Sarkopenie zählen unter anderem – soweit im hiesigen Sachzusammenhang relevant – verminderte körperliche Betätigung, die Menopause, Fettleibigkeit und ein Vitamin D-Mangel (Fielding et al. 2011). Östrogenen wird hier vor allem ein wichtiger Einfluss auf die Muskelqualität zugeschrieben, der sich in der Menopause durch eine zusätzliche Abnahme der Muskelkraft von 10-15%

zeigt. Hervorzuheben ist auch die Rolle des Fettgewebes: Insbesondere viszerales Fettgewebe wirkt durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine katabol auf Muskelzellen und begünstigt die Progredienz der Sarkopenie (Schrager et al. 2007). Folgen der Sarkopenie sind abnehmende körperliche Betätigung, sowie ein Verlust an Selbstständigkeit und Lebensqualität der Betroffenen (Lowe et al. 2010; Sirola und Kröger 2011).

Die Sarkopenie und Osteoporose treten häufig gemeinsam auf und teilen gemeinsame Risikofaktoren. Muskulatur und Knochen bilden zusammen die muskuloskeletale Einheit. Muskelkontraktionen übertragen Kraft auf den Knochen, welcher sich auf den mechanischen Stimulus hin architektonisch an die Belastung anpasst. Mit nachlassender körperlicher Betätigung und erhöhter Fallneigung steigt das Risiko für Osteoporose und das Auftreten von Fragilitätsfrakturen.

4. Vitamin D

4.1 Hormonsynthese

Die Synthese des Steroidhormons Vitamin D (VD) erfolgt in mehreren Schritten. In diesem Rahmen kommt es in der Haut UVB-strahlenabhängig zur Umwandlung von 7- Dehydrocholesterol zu Cholecalciferol, welches auch medikamentös substituiert werden kann. Cholecalciferol wird in der Leber zu seiner zirkulierenden Speicherform, 25-(OH) Cholecalciferol hydroxyliert. Durch eine weitere Hydroxylierung in der Niere wird diese Speicherform in die biologisch aktive Form des VD umgewandelt: 1-alpha, 25 (OH)₂ Cholecalciferol; auch als Calcitriol bezeichnet. Dieser Umwandlungsprozess wird eng reguliert: Niedrige Kalium- und Phosphatwerte im Serum sowie ein erhöhtes PTH stimulieren den Aktivierungsprozess zu Calcitriol (Lips 2006).

4.2 Vitamin D-Rezeptor

Calcitriol wirkt über die Bindung an den Vitamin D-Rezeptor (VDR). Der VDR gehört zur Superfamilie der nuklearen Steroidhormon Rezeptoren und liegt größtenteils als klassischer Steroidrezeptor intrazellulär vor. Er liegt in Teilen aber auch membrangebunden vor. Bei intrazellulärer Bindung von Calcitriol bildet der VDR ein Homodimer

mit einem weiteren VDR beziehungsweise dimerisiert er klassischer Weise mit dem Retinoid X-Rezeptor (RXR). Der gebildete Komplex wirkt als Transkriptionsfaktor modulatorisch auf die Ausprägung verschiedener Gene (Mangelsdorf et al. 1995). Die Zellantwort manifestiert sich in Teilen innerhalb weniger Minuten, bzw. mehreren Stunden bis Tagen nach der Hormoneinwirkung.

4.3 Vitamin D-Wirkung

Die Wirkung von VD auf den Knochen ist vorwiegend anabol. Zum einen hat es regulatorische Funktionen bei der Homöostase des Mineralstoffhaushalts. Durch die Expression entsprechender Membranproteine wird die enterale Kalziumabsorption erhöht, sowie die Ausscheidung von Kalzium über die Nieren vermindert. Dies fördert die Knochenmineralisierung und wirkt somit stabilisierend auf den Knochen (Meyer 2005; Jurutka et al. 2007). Es wurden ebenfalls direkte Wirkungen von VD auf die Knochenzellen beschrieben. Ein einheitliches Modell dazu fehlt bislang jedoch (Lieben und Carmeliet 2012). Durch die Induktion verschiedener Gene, wie dem Transkriptionsfaktor Runx-2, kommt es zur vermehrten Proliferation und Aktivität von osteoblastischen Zellen. Zudem wurden in vitro anti-apoptotische Effekte durch VD bei Osteoblasten beobachtet (Jurutka et al. 2007). Ein VD Mangel und damit verbundene, niedrige Serumkalzium Spiegel begünstigen im Gegenzug die Entwicklung einer Osteoporose. Durch die Hypokalziämie kommt es zur Ausschüttung von PTH, welches eine gesteigerte Mobilisation von Kalzium und Phosphat aus dem Knochen vermittelt. Es folgen eine Störung von Mineralisierung und Remodelingvorgängen des Knochens mit einem erhöhten Frakturrisiko (Holick 2007, Wacker und Holick 2013).

Des Weiteren sind eine Vielzahl extraskeletaler Wirkungen von VD bekannt. Die Metaanalyse von fünf klinischen Studien mit insgesamt 1237 Teilnehmern zeigte, dass die Substitution von zusätzlichem VD das Sturzrisiko um bis zu 22% senken konnte (Bischoff-Ferrari et al. 2006). Ebenso senkte die fünfmonatige Substitution von täglich 800 IE Cholecalciferol bei Patienten in einem Pflegeheim das Sturzrisiko um 72% (Broe et al. 2007). Die hochsignifikante Reduktion eines wichtigen Risikofaktors für das Auftreten osteoporoseassoziiierter Frakturen, wird der muskelstärkenden Wirkung von VD zugeschrieben. Eine nachgewiesene Zunahme des Durchmesser und

der Anzahl schneller Typ II Muskelfasern nach VD Substitution ist mit einer verbesserten Muskelfunktion assoziiert (Sato et al. 2005). Der Zustand des VD Mangels führt hingegen zu einer Schwächung der Skelettmuskulatur (Holick 2007).

Eine weitere extraskeletale Wirkung besteht in einer Interaktion zwischen VD und dem Fett- und Glukosestoffwechsel. Niedrige VD-Spiegel werden mit einer erhöhten Körperfettmasse assoziiert - insbesondere mit dem Vorkommen von vermehrtem abdominellem Fettgewebe (Liel et al. 1988, Ford et al. 2005). Kong 2006 demonstrieren an 3T3-L1 Stammzellen, dass VD die Adipogenese über eine Hemmung von PPAR γ hemmen kann.

5. Ecdyson

Nachdem das enorme Risikoprofil der HRT als Therapie postmenopausaler Beschwerden und Osteoporose bekannt wurde (Rossouw et al. 2002), begann eine intensive Suche nach Alternativen. Die endokrinologische Abteilung der Universitätsmedizin Göttingen hat sich in diesem Zusammenhang mit der Pflanze *Tinospora cordifolia* beschäftigt, welche aus der Ayurveda Medizin bekannt ist. Kapur et al. 2008 stellten eine antiosteoporotische Wirkung der Pflanze fest und das Ecdysteroid 20-OH-Ecdyson (Ecd) wurde als aktiver Wirkstoff identifiziert (Seidlová-Wuttke et al. 2010a). Dies war der Beginn einer intensiven Forschung der Abteilung unter Leitung von Prof. Wuttke auf diesem Gebiet.

5.1 Die Ecdysteroide

Ecdysteroide sind Steroidhormone der Arthropoden, die regulatorische Funktionen bei deren Verpuppung bzw. Häutung haben. Sie finden sich allerdings auch in Pflanzen, wo sie oft in höheren Konzentrationen angereichert sind und sich gut zu Forschungszwecken isolieren lassen (Dinan und Lafont 2006). Ecdysteroidreiche Pflanzen in Mitteleuropa sind insbesondere Farne wie *Polypodium vulgare* oder auch Spinat (*Spinacia oleracea*). Die Phytoecdysteroide dienen den Pflanzen zum Schutz vor Herbivoren durch Herbeiführen eines vorzeitigen Verpuppens (Báthori et al. 2008).

Ecdysteroide zeigen eine große Diversität in ihrem strukturellen Aufbau. Bereits 1954 wurde das erste Ecdysteroid durch Butenandt und Karlson isoliert und 1965 durch Huber und Hoppe in seiner Struktur identifiziert (Dinan und Lafont 2006). Über 250 strukturanaloge Ecdysteroide sind bisher hinzugekommen (Dinan 2001). Das häufigste sowohl in Pflanzen als auch Arthropoden vorgefundene Ecdysteroid ist das in Abbildung 4 gezeigte Ecd (Dinan und Lafont 2006).

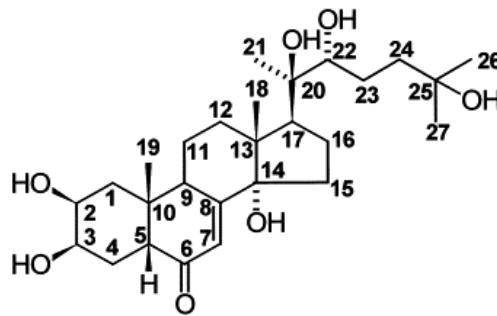


Abbildung 4: Struktur eines typischen Ecdysteroids (20-OH-Ecdyson) mit Nummerierung der Kohlenstoffatome

5.2 Die Wirkung von Ecd

Die orale und auch die injizierte Applikation von Ecd zeigte in vielen publizierten Studien positive Effekte hinsichtlich einer Vielzahl physiologischer Prozesse bei Säugtieren und Menschen, insbesondere in Bereichen des Knochen-, Fett- und Muskelstoffwechsels, die in der Menopause und in der vorliegenden Arbeit eine tragende Rolle spielen.

5.2.1 Muskel- und Proteinstoffwechsel

In den sechziger Jahren zeigten erste Studien, dass Ecd stimulierend auf die Proteinsynthese in der Mäuseleber wirkt. Daraufhin wurden die wissenschaftlichen Bestrebungen auf weitere Säugetierspezies und Gewebe ausgeweitet. So wurde insbesondere in der Skelettmuskulatur eine muskelanabole Wirkung nach Ecd- Applikation beobachtet (Lafont und Dinan 2003): Im Jahr 2008 stellten Tóth et al. fest, dass Ecd zu einer Größenzunahme von Muskelfasern des M. soleus bei Ratten, besonders bei sich regenerierendem Muskel, führt (Tóth et al. 2008; Tóth et al. 2010). Eine weitere Forschungsgruppe stellte *in vitro* fest, dass die Proteinsynthese bei murinen und humanen Skelettmuskelzellen nach Ecd Applikation um 20% gesteigert wurde. *In vivo* beobachtete dieselbe Forschungsgruppe eine signifikante Stärkung der Greifmuskulatur.

latur nach oraler Ecd-Applikation (50 mg/kg) bei Ratten (Gorelick-Feldman et al. 2008).

Auch Forschungen in der endokrinologischen Abteilung von Prof. Wuttke an der Universitätsmedizin Göttingen bestätigten die muskelaufbausteigernde Wirkung: In qCT Messungen wurde eine Zunahme der Muskelfläche bei ovx Ratten nach oraler Ecd-Applikation nachgewiesen (Seidlová-Wuttke et al. 2010b).

5.2.2 Fettgewebe

In der Abteilung von Prof. W. Wuttke wurde ebenfalls festgestellt, dass ovx Ratten nach Ecdysongabe weniger abdominales Fettgewebe im Vergleich zu ovx Kontrolltieren entwickeln. Dies zeigte sich unter anderem im qCT in einer Verkleinerung des paratibialen Fettdepots (Seidlová-Wuttke et al. 2003b, Seidlová-Wuttke et al. 2010b). Damit kongruent waren die reduzierten Leptinwerte in den Ecd-Gruppen (Seidlová-Wuttke et al. 2010b). Zudem wurde wiederholt nachgewiesen, dass Ecdysonapplikation in Säugetieren ebenfalls zu verminderten Cholesterinwerten im Blut und in der Leber führt (Lupien et al. 1969, Syrov et al. 1986, Seidlová-Wuttke et al. 2010b).

5.2.3 Knochen

Auch eine antiosteoporotische Wirkung von Ecd konnte wiederholt demonstriert werden: Im qCT zeigten ovx Ratten nach Gabe von mit *Tinospora Cordifolia* sowie mit Ecd-Extrakt angereichert

em Futter eine bessere endostale Dichte (ED) im Vergleich zu den ovx Kontrolltieren (Seidlová-Wuttke et al. 2010a, Kapur et al. 2008).

Eine histomorphometrische Untersuchung zur Auswirkung von Ecd auf die trabekuläre Fläche der metaphysalen Tibia bei ovx Ratten zeigte eine signifikante Flächenzunahme in Futtergruppen, die Ecd oder E2 p.o. erhalten haben im Vergleich zu den ovx Kontrolltieren (Kapur et al. 2010).

Des Weiteren wurden nach Ecd Applikation auf MSC eine signifikant vermehrte Induktion von Runx-2, knochenspezifischem Typ 1-Kollagen und Osteokalzin (OC) beobachtet. Diese Parameter stellen Marker für eine gesteigerte osteogenetische Differenzierung in verschiedenen Stadien dar (Gao et al. 2008). Auch die Ecd-substituierten, ovx Ratten im Versuch von Seidlová-Wuttke (2010a) hatten signifikant

höhere OC-Werte als die Kontrollgruppe. Crosslaps (CL), als Indikator für einen gesteigerten Knochenabbau waren in der Ecd-Gruppe erniedrigt (Seidlová-Wuttke et al. 2010a).

5.3 Wirkmechanismus

Zwar konnten bei Säugetieren reproduzierbare Effekte durch Ecdysongabe demonstriert werden, der zugrunde liegende Wirkmechanismus gilt bislang jedoch als weitgehend ungeklärt. In den Arthropoden wirkt Ecd als Steroidhormon über die Bindung an den Ecdysonrezeptor (EcdR). Auch dieser zählt zur Superfamilie der nuklearen Rezeptoren und wirkt nach Dimerisierung mit dem *Ultraspiracle Protein* (USP). In Säugetieren gibt es jedoch keinen EcdR. Einer der häufigsten Heterodimerpartner von Steroidhormonen bei Wirbeltieren ist der RXR. Zwischen dem RXR und dem USP bestehen viele Analogien, und es konnte gezeigt werden, dass Ecd austauschweise auch in Anwesenheit von EcdR und RXR eine hohe Rezeptorbindungsaffinität aufweist (Yao et al. 1993). Der RXR könnte somit eine Eintrittspforte für Ecd in Säugetieren darstellen.

Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft zu den Steroidhormonen der Säugetiere und einem hormonartigen Wirkungsprofil auf vielfältige Gewebetypen liegt die Vermutung nahe, Ecd könne als allobiotisches Substrat an andere nukleare Steroidhormonrezeptoren binden. Nach Durchführung von Radioligandenassays konnte ein solches Bindungsverhalten, zumindest an ER, Androgen- oder Glukokortikoidrezeptoren, nicht nachgewiesen werden (Báthori et al. 2008; Gorelick-Feldman et al. 2008; Seidlová-Wuttke et al. 2010b).

Auf der Suche nach möglichen Alternativen zur HRT steht insbesondere ein Ausschluss von Östrogenität der Testsubstanzen im Fokus. In diesem Zusammenhang empfiehlt die *Organisation for Economic Cooperation and Development* die Durchführung eines Uterotrophie-Assays bei Nagern (Owens und Koëter 2003): Demnach ist die Gewichtszunahme der Uteri von ovx Ratten ein geeigneter Parameter, um die östrogene Aktivität einer Substanz zu prüfen (Yamasaki et al. 2002). Als weiterer Hinweis auf Östrogenität gilt eine Senkung des Serum-LH-Spiegels. Durch die fehlende negative Feedbackhemmung bei Östrogendefizit ist LH bei der ovx Ratte normalerweise erhöht. Sowohl die Ergebnisse des Uterotrophie Assay als auch die Se-

rumwerte für LH, welche in Versuchen mit Ecd der endokrinologischen Abteilung von Prof. Wuttke bestimmt wurden, bestätigten die nicht-östrogene Wirkung von Ecd (Seidlová-Wuttke et al. 2010a; Seidlová-Wuttke et al. 2010b).

5.4 Parallelen zwischen Ecdyson und Vitamin D

Ecd und das Steroidhormon VD weisen deutliche Parallelen auf. Neben wichtigen Struktur analogien teilen die beiden Wirkstoffe den RXR als möglichen Dimerisierungspartner des VDR bzw. *in vitro* des EcdR (Yao et al. 1993). Zudem gibt es auch eine Vielzahl von Überschneidungen im Wirkungsprofil beider Substanzen: VD und Ecd zeigen eine ähnliche antiosteoporotische Wirkung im Knochen. Sowohl VD- als auch Ecd-Applikation wirken *in vitro und in vivo* stimulierend auf die Differenzierung von MSC zu Osteoblasten und führen dabei zu erhöhten Spiegeln des Proteins Runx-2 und OC (Seidlová-Wuttke et al. 2010a, Gao et al. 2008, Jian et al. 2013). Des Weiteren wurde sowohl nach VD- als auch nach Ecd-Substitution ein schneller Einstrom von Kalzium in Skelettmuskel- und Dünndarmzellen beobachtet sowie die selektive Größenzunahme von schnellen, glykolytischen Muskelfasern (Sato et al. 2005, Tóth et al. 2008, Tóth et al. 2010). Mehrfach wurde beschrieben, dass Ecd die Zunahme von Fettgewebe verhindern kann und auch ein VD-Mangel wurde in mehreren Studien mit einer Adipositas assoziiert (Kong 2006, Chang und Kim 2016; Soares et al. 2012).

Naheliegender ist somit der Gedanke, dass die Wirkung von Ecd in Menschen und Säugetieren an VD bzw. den VDR gekoppelt ist. Eine Bindung an den intrazellulären VDR wurde bislang nicht nachgewiesen (Báthori et al. 2008). Denkbar wäre jedoch eine Transaktivierung des Transkriptionsfaktors VDR/RXR. Ecd könnte hier koaktivierende Aktivität haben, insbesondere weil auch der EcdR den RXR als möglichen Dimerisierungspartner teilt (Horwitz et al. 1996; Yao et al. 1993).

6. Zielsetzung der Arbeit

Nach Veröffentlichung der Ergebnisse der One-Million-Women-Studie gilt die HRT zur Behandlung klimakterischer Beschwerden und zur Prophylaxe und Therapie der Osteoporose als obsolet. Seitdem widmen sich viele Forschungsgruppen der Suche nach nebenwirkungsärmeren Präventions- und Behandlungsalternativen. Ecd scheint in diesem Zusammenhang ein vielversprechender Wirkstoff zu sein, der sich ohne bekannte Nebenwirkungen positiv auf eine Vielzahl von Organen auswirkt, die durch den Östrogenmangel beeinträchtigt werden. Zu diesen Geweben zählen insbesondere Knochen-, Muskel- und Fettgewebe. Sowohl Fettleibigkeit als auch Sarkopenie treten mit dem Versiegen der ovariellen E2 Produktion in der Menopause gehäuft auf. Sie teilen zum einen gemeinsame Risikofaktoren für die Entwicklung einer Osteoporose. Zum anderen bedingen sich die ungünstigen Veränderungen von Knochen, Muskel-, und Fettgewebe teilweise auch gegenseitig.

Die bekannteste und auch am besten erforschte Wirkung von VD ist die osteoanabole Wirkung des Steroidhormons. Nach den Leitlinien des DVO ist die tägliche, optimale Versorgung mit VD fester Bestandteil der Empfehlungen zur Prophylaxe der Osteoporose in Risikogruppen und gilt als Basistherapie bereits Betroffener. Aber auch eine Vielzahl extraskelotaler Wirkungen von VD, unter anderem auf Muskel- und Fettstoffwechsel, sind bekannt. Sowohl strukturell als auch vom Wirkungsprofil weisen VD und Ecd viele Analogien auf und legen einen Zusammenhang zwischen der Wirkung von Ecd und VD nahe. Diese könnte möglicherweise in einer Transaktivierung des Transkriptionsfaktors VDR/RXR bestehen. Die vorliegende Arbeit untersucht in einem Versuch an ovx Sprague-Dawley-Ratten, wie sich Ecd und VD jeweils separat, aber auch gemeinsam auf Gewebe auswirken, in denen Parallelen zwischen der Wirkung von VD und Ecd beobachtet wurden. Damit sollen im direkten Vergleich Wirkbeziehungen zwischen den beiden Steroiden in den Zielorganen Knochen- Muskel- und Fettgewebe aufgedeckt werden. Insbesondere soll auch im Hinblick auf den möglichen therapeutischen Einsatz von Ecd untersucht werden, ob der Wirkstoff die Wirkung von VD imitieren, unterstützen oder vielleicht sogar mit einem besseren Ergebnis übertreffen kann.

II. Material und Methoden

1. Der Versuch

Der dieser Arbeit zugrunde liegende Versuch ist ein Gemeinschaftsprojekt der Abteilung für experimentelle Endokrinologie von Prof. W. Wuttke der Universitätsmedizin Göttingen. Die Verfasserin der vorliegenden Dissertation hat neben der Betreuung der Versuchstiere die qCT Messungen eigenständig durchgeführt und ausgewertet. Neben der Ovariectomie der Ratten erfolgte auch die Betreuung der Arbeit durch Frau PD Dr. D. Seidlová-Wuttke als Doktormutter. Daten über die Gewichtsentwicklung der Tiere, die Futteraufnahme und sämtliche Serumparameter wurden auch anderen Doktoranden der Abteilung zur Verfügung gestellt und können somit auch in weiteren Dissertationen Verwendung finden.

1.1 Versuchstiere

Der Versuch fand an 67 weiblichen Sprague-Dawley - Ratten der Firma Harlan Winkelmann (Borchen) statt. Der Abteilung lag eine Genehmigung der Bezirksregierung Braunschweig unter dem Aktenzeichen 33.11.42504-04-043/08 vor. Die 3 Monate alten Tiere wurden mit jeweils 5 Tieren pro Käfig (Makrolon®-Käfig Typ IV, Firma Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg) in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen untergebracht. Während des Versuchs herrschte im Kleintierstall eine geregelte Belichtungszeit von 06.00-18.00 Uhr, eine konstante Raumtemperatur von 23° C sowie eine durchschnittliche Luftfeuchtigkeit von 50-55%. Wasser und Futter stand den Tieren zur freien Verfügung.

1.2 qCT

Nachdem sich die Tiere 10 Tage an ihre neue Umgebung gewöhnen konnten, startete der Versuch: Die Ausgangswerte über Knochen-, Muskel- und Fettstatus der Tiere wurden mit einer peripheren qCT (Norland Stratec XCT Research SA+, Firma Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim) ermittelt. Um zu gewährleisten, dass die Tiere sich während der Messung nicht bewegen, wurden sie mit Isofluran inhalativ narkotisiert (Forene®, Abbott, Illinois, USA). Die Versuchstiere wurden in Seitenlage auf dem

Tisch des Tomographen positioniert und an ihrem linken Bein mit einer Klemme fixiert. Eine erste Übersichtsaufnahme ermöglichte das Festlegen einer einheitlichen Referenzlinie auf Höhe der proximalen tibialen Epiphysenfuge. Von dort ausgehend, wurden bei jedem Tier im Abstand von 3,75 mm; 4,125 mm und 15 mm drei Schnittbilder erzeugt. Der gesamte Messvorgang dauerte etwa 15 Minuten pro Tier.

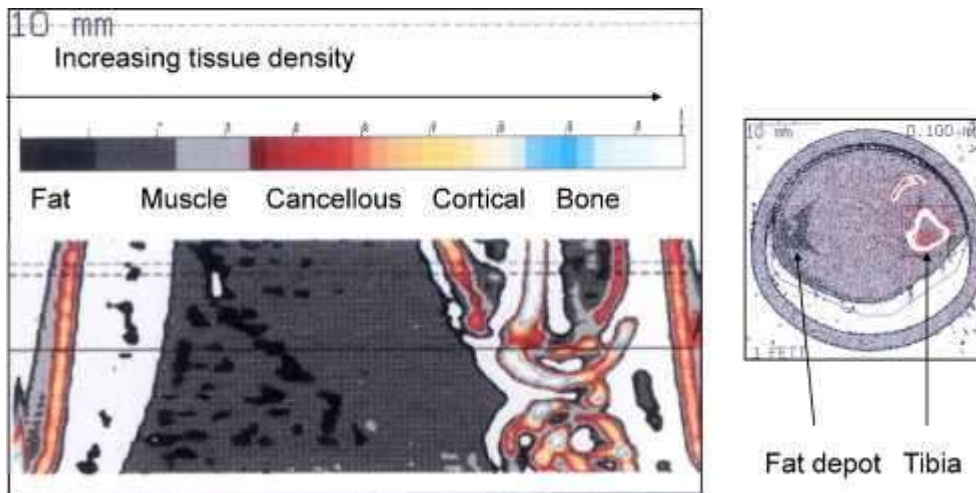


Abbildung 5: Übersichtsaufnahme und Schnittbild einer qCT-Aufnahme der Tibia mit paratibialem Fettdepot (Seidlová-Wuttke et al. 2010b).

Anschließend wurden die Ratten in der Nackenregion mit subkutanen Transpondern versehen (Transponder-UNO MICRO-ID-System mit ISO-Transponder, Firma Uno-Roesvastaal BV, Zevenaar, Niederlande). Damit wurde jedem Tier eine vierstellige Identifikationsnummer zugewiesen, die mit einem Handlesegerät (Gesreader II GeS008: ISO-kompatibler Taschenleser) ausgelesen werden konnte.

Nach der Bestimmung der jeweiligen Körpergewichte kamen die Tiere zum Erwachen aus der Narkose in einen streufreien Käfig und wurden einige Minuten später zu ihren festen Gruppen zurückgesetzt.

1.3 Ovariectomie

2-3 Tage später wurden 60 Tiere ovariectomiert. Zur Narkose erhielten sie Isofluran über eine Inhalationsmaske. Eine Analgesie erfolgte mit Rimadyl® (Pfizer GmbH, Karlsruhe) subkutan.

Nach einer Rasur des unteren Abdomen wurden 2 kleine Hautschnitte gesetzt. Mit einer Schere wurde dann die Bauchhöhle freipräpariert und eröffnet. Nach Darstellung der Ovarien wurden diese mit einem Skalpell entfernt. Der Wundverschluss erfolgte, indem das Peritoneum und die darüber gelegene Muskelschicht miteinander vernäht (Vicryl®, Firma Ethicon, Norderstedt) und der Hautdefekt mit Klemmen versorgt wurde.

Nach der Operation konnten die Tiere jeweils separat in einem Käfig aufwachen. Sie wurden im Hinblick auf Nachblutungen 20 Minuten lang beobachtet, bevor sie nach Wiedererlangen des normalen Verhaltens zurück in ihren Käfig gesetzt wurden.

Anschließend erfolgte das Randomisieren der Tiere auf Basis ihrer Körpergewichte, sodass das durchschnittliche Gewicht der Ratte pro Käfig 266 g betrug. Diese Maßnahme war nötig, um möglichst ähnliche Grundbedingungen in den einzelnen Futtergruppen herzustellen und die Ergebnisse am Ende auf die Therapie mit der entsprechenden Wirkstoffkombination zurückführen zu können.

Unmittelbar nach der Ovx erfolgte die Einteilung in die sieben verschiedenen Futtergruppen zu je 10 Tieren (Tabelle 3).

1.4 Tierfutter und Wirkstoffapplikation

Bis zum Zeitpunkt der ersten qCT Messung erhielten die Tiere sojafreies Pelletfutter, welches seit über 10 Jahren in der Abteilung von Prof. Wuttke für Tierversuche an ovx Ratten genutzt wird. Da bei Soja eine relevante östrogene Wirkung nachgewiesen worden ist, wurde bislang Kartoffelprotein als Proteinquelle genutzt, um die Sojafreiheit des Futters zu gewährleisten (Seidlovà-Wuttke et al. 2008a). Nach der ersten qCT-Messung und Ovx erfolgte anschließend die Einteilung der Tiere in 7 Versuchsgruppen, die sich durch die Futterzusammensetzung und den Operationsstatus voneinander unterscheiden, die der nachfolgenden Tab. 3 zu entnehmen sind. Die Tiere erhielten nun ein anderes, ebenfalls sojafreies Pelletfutter EF R/M, E 150000-

04 (ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest), welches als Kontrollfutter ohne zusätzliche Wirkstoffe bzw mit Ecd oder E2 angereichert war. Sämtliche Futter wurden als VD-arme Variante (< 5 IE Vitamin D3/kg Futter) und als Futter mit einem normalen VD Gehalt (1.500 IE VD3/kg Futter) verabreicht. Diese neuen Futter unterscheiden sich jedoch in ihrer Rezeptur von dem jahrelang zuvor in der Abteilung von Prof. Wuttke genutzten Futter: VD-armes Futter war nur kommerziell erhältlich indem das Milchprotein Kasein an Stelle der zuvor genutzten Kartoffelproteine Verwendung fand. Die Konsequenz der veränderten Futterzusammensetzung waren jedoch insbesondere erhöhte Stärke- und Glukoseanteile, des in diesem Versuch genutzten Tierfutters: Dieses erstmals genutzte Basisfutter enthielt einen prozentualen Anteil an Zucker von 12,9 Prozent bzw. 10,8 Prozent und jeweils einen Stärkeanteil von 46,8 Prozent sowie einen deutlich erhöhten Anteil an dem Milchprotein Kasein. Im Gegensatz dazu wurde bei den vorherigen Versuchsreihen in dieser Abteilung ein Basisfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) mit einem Anteil von 3 Prozent Zucker und 34 Prozent Stärke genutzt und es wurde weitgehend auf Milchproteine verzichtet (Seidlovà-Wuttke et al. 2010a und b). Eine Übersicht über die genauen Futterzusammensetzungen in diesem sowie in einem Vorversuch befindet sich im Anhang.

Nach der Ovx erhielten die sieben Futtergruppen ihr jeweiliges Futter. Grundlage der verschiedenen Futter bildet das Kontrollfutter. Dieses Kontrollfutter wurde einer ovx Kontrollgruppe sowie den intakten Tieren gereicht. Den weiteren Gruppen wurden verschiedene Futter verabreicht, welche die zu prüfenden Wirkstoffe Ecd angereichert in Spinatextrakt (Ecd) oder Estradiolbenzoat (E2) enthielten. Sämtliche Futteransätze wurden einmal als VD+- und als VD--Version gereicht.

Der Futtermittelverbrauch wurde über die Versuchsdauer von drei Monaten einmal wöchentlich in jedem Käfig dokumentiert. Dazu wurde das Restfutter gewogen und von den wöchentlich aufgefüllten 1.500 Gramm Futter subtrahiert. Das Ergebnis wurde sowohl durch die Anzahl der vergangenen Tage als auch durch die Anzahl der Käfigbewohner (in der Regel fünf) geteilt. Aus den wöchentlich gewonnenen Werten wurde für jede Futtergruppe am Ende des Versuches der Mittelwert der Futteraufnahme pro Tag pro Tier annähernd berechnet. Somit konnte auch die durchschnittliche tägliche Wirkstoffaufnahme pro Tier annähernd analysiert werden.

Operationsstatus	Futter	Futtergruppen-Bezeichnung
Intakt (keine Ovx)	Kontrollfutter mit VD	Intakt
Ovx	Kontrollfutter mit VD	Ko, VD+
Ovx	Kontrollfutter ohne VD	Ko, VD-
Ovx	Kontrollfutter mit VD und mit E2	E2, VD+
Ovx	Kontrollfutter ohne VD und mit E2	E2, VD-
Ovx	Kontrollfutter mit VD und mit Ecd	Ecd, VD+
Ovx	Kontrollfutter ohne VD und mit Ecd	Ecd, VD-

Tabelle 3: Die Futtergruppen

1.5 Obduktion

Bevor der Versuch nach dreimonatiger Wirkstoffapplikation p.o. mit der Obduktion der Ratten enden sollte, erfolgten zunächst ein zweites qCT sowie eine Gewichtskontrolle. Das Procedere entsprach dem zu Versuchsbeginn.

Die Obduktion erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Die Tiere wurden randomisiert, anhand ihrer Transpondernummern identifiziert und einzeln in ein vorbereitetes Labor gebracht. Unter Kohlenstoffdioxid-Narkose verloren sie das Bewusstsein und wurden anschließend dekapitiert. Das Blut wurde zwecks Bestimmung relevanter Serumparameter aufgefangen und es wurden verschiedene Gewebe und Organe zu weiteren Forschungszwecken entnommen.

2. Auswertung

Während des Versuches wurden bei jedem Tier zwei qCT Messungen durchgeführt. Eine vor der Ovx und eine am Versuchsende, vor der Dekapitation. Die gewonnenen Bilder wurden mit Hilfe der zum Computertomographen mitgelieferten Software

(XCT5,40; Stratec, Pforzheim) ausgewertet. Um die Parameter, Knochen-, Muskel- und Fettgewebe mit dem Computerprogramm zu identifizieren und zu analysieren, wurden jedem Gewebstypen verschiedene Dichtewerte zugewiesen. Nach Eichung des Tomographen mittels eines Phantoms auf die standardisierte Dichte von Hydroxylapatitkristallen hängen diese Dichtewerte vom Kalkgehalt der untersuchten Gewebe ab.

2.1 Knochen im qCT

Dichtewerte von 280-400 mg/cm³ werden als endostale Dichte (ED) definiert. Die später vorgestellten Ergebnisse stammen aus den beiden Schnittbildern, die auf Höhe der proximalen Metaphyse der Tibia erstellt wurden (3,75 mm und 4,25 mm distal der Referenzlinie). ED bezeichnet die Dichte des trabekulären Knochens innerhalb des endostalen Raumes, auch Spongiosa genannt. Die endostale Querschnittsfläche (EF) wird in mm² angegeben. Kortikalem Knochen werden Dichtewerte > 710 mg/cm³ zugeordnet. Zur Beurteilung des kortikalen Knochens wird das dritte Schnittbild auf Höhe der Diaphyse der Tibia herangezogen. Zunächst wird auch hier die Knochendichte der Kortikalis (KD) betrachtet (mg/cm³). Die Kortikale Fläche (KF) umgibt den Endostalen Raum mantelartig und wird in mm² angegeben. Von innen wird die Kortikale Fläche durch die endostale Zirkumferenz (EZ) begrenzt, von außen durch die Periosteale Zirkumferenz (PZ).

Eine Übersicht über die vorgestellten knochengeometrischen Parameter vermitteln Tabelle 4 und Abbildung 6.

Parameter	Abkürzung	Maßeinheit	Referenzbereich
Endostale Dichte	ED	mg/cm ³	280-400
Endosteostale Fläche	EF	mm ²	-
Kortikale Dichte	KD	mg/cm ³	> 710
Kortikale Fläche	KF	mm ²	-
Endostale Zirkumferenz	EZ	mm	-
Periosteale Zirkumferenz	PZ	mm	-
Dichte der Muskulatur	MD	mg/cm ³	40-100
Muskulaturfläche	MF	mm ²	-
Dichte des Fettgewebes	FD	mg/cm ³	-
Fettfläche (Prätibiales Fettdepot)	FF	mm ²	<40

Tabelle 4: Erhobene Parameter

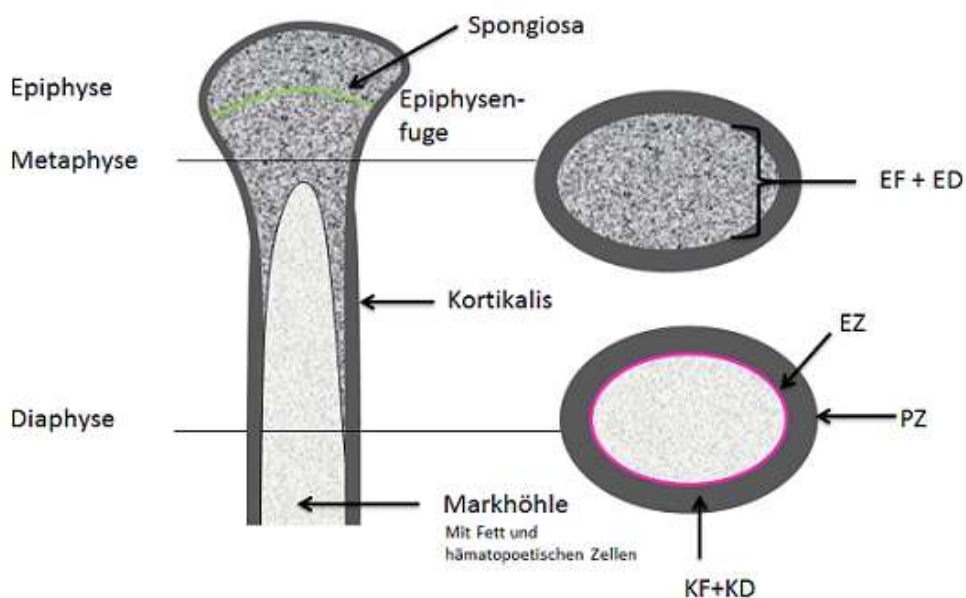


Abbildung 6: Knochengeometrische Parameter

2.2 Muskulatur im qCT

Dichtewerte zwischen 40 – 100 mg/cm³ sprechen für das Vorliegen von Muskelgewebe. Zur Auswertung des Muskelgewebes werden sowohl die Schnittbilder der metaphysalen als auch der diaphysalen Tibia herangezogen.

Die gemessene Dichte der Muskulatur wird als röntgenologische Dichte definiert, welche von der Menge an Elastinfasern pro Fläche Muskel (mg/cm³) abhängt. Die Muskelfläche (mm²) wurde aus der Querschnittsgesamtfläche, abzüglich der Fett- und Tibiafläche, berechnet.

2.3 Fettgewebe im qCT

Im qCT gemessene Dichtewerte unter 40 mg/cm³ werden dem Fettgewebe zugeschrieben. Diesbezüglich wurden die Schnittbilder 1 und 2 ausgewertet und dem so genannten paratibialen Fettdepot zugeordnet. Die Fettfläche wird ebenfalls im Querschnitt gemessen und wird in mm² angegeben.

3. Serumdiagnostik

In dem während der Obduktion entnommenen Blut der Versuchstiere wurde eine Vielzahl an Serumparametern mit Hilfe von standardisierten Radioimmunfluoreszenz-Kits bestimmt. Vergleichswerte der Tiere vor Versuchsbeginn existieren nicht, da sich eine Tötung der Tiere zur ausschließlichen Serumdiagnostik ethisch nicht rechtfertigen lässt. Die für den Knochenstoffwechsel relevanten Parameter, die in dieser Arbeit Anwendung finden sollen, sind Osteokalzin (OC) und Crosslaps (CL). Zudem wurden Serumleptin, und -Cholesterin ermittelt.

4. Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Die gewonnenen Daten wurden zunächst in Excel-Tabellen zusammengefasst. Anschließend erfolgten die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse mit Hilfe des Programmes PRISM® (GraphPad Prism 5.0, San Diego, USA).

Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe einer einfachen Varianzanalyse für wiederholte Messungen eines Faktors (ANOVA) analysiert. Anschließend wurde ein multiplexer T-Test nach Dunnett durchgeführt, um etwaige signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten einer Referenzgruppe und den Mittelwerten der übrigen Versuchsgruppen bezüglich eines untersuchten Parameters zu prüfen. Die Referenzgruppen waren einmal die Tiere vor der Ovx (Präovx), die intakten Tiere und die Kontrollgruppe Ko, VD+. Um einzelne Versuchsgruppen gezielt miteinander zu vergleichen, wurde ein T-Test für ungepaarte Stichproben verwendet. Bei einem p-Wert > 0,05 wird ein Unterschied als signifikant eingestuft.

Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit werden im Folgenden meist mit Balkendiagrammen dargestellt. Diese teilen einen ähnlichen Aufbau, der nun erläutert werden soll: Auf der Abszisse befinden sich in wiederkehrender Reihenfolge die unterschiedlichen Futtergruppen. Der Balken ganz links zeigt die Daten der Tiere zu Versuchsbeginn vor der Ovx (präovx). Die präovx-Daten wurden in der Untersuchung vor der Ovx durch das erste qCT gewonnen. Es folgen auf der Abszisse drei verschiedene Kontrollgruppen: Zunächst die intakten Tiere und anschließend ovx Tiere, einmal mit VD-reichem und einmal mit VD-armem Futter. Die nächsten zwei Balken beziehen sich auf die ovx Tiere, die E2 in VD-reichem oder -armem Futter erhielten. Die letzten zwei Versuchsgruppen bekamen Ecd, wobei wiederum den Tieren links das VD haltigem Futter und rechts das VD-arme Futter gereicht wurde. Die Ordinate zeigt jeweils die Parameter, auf die sich die unterschiedlichen Behandlungsstrategien ausgewirkt haben. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung wurden entsprechend der Signifikanzlegende (s. Tabelle 5) oberhalb der Balken gekennzeichnet. So wurde jede einzelne Futtergruppe mit den Ergebnissen der präovx-Tiere, denen der intakten Tiere und denen der Kontrollgruppe Ko, VD+ verglichen.

Vergleichsgruppe	Kennzeichnung
Vs Präovx	#
Vs Intakt	*
Vs Ko, VD+	+

Tabelle 5: Signifikanzlegende

III. Ergebnisse

3. Körpergewicht

Nach dreimonatiger Futterapplikation entwickelten sich die Körpergewichte der Ratten sehr unterschiedlich. Zu Beginn des Versuches betrug das Körpergewicht der Tiere durchschnittlich 266 g. Nach dreimonatiger Futterapplikation konnte eine hochsignifikante Gewichtszunahme bei den ovx Kontrolltieren und in den zwei Ecd-Gruppen beobachtet werden. Tiere, die Ecd ohne VD bekamen, wogen signifikant weniger als die, welche Ecd mit VD-Zusatz erhalten haben. Die Futtergruppen, welche E2 erhielten, zeigten nahezu keine Gewichtszunahme. Sie wogen sogar signifikant weniger als die intakten Ratten mit einer physiologischen Östrogenproduktion

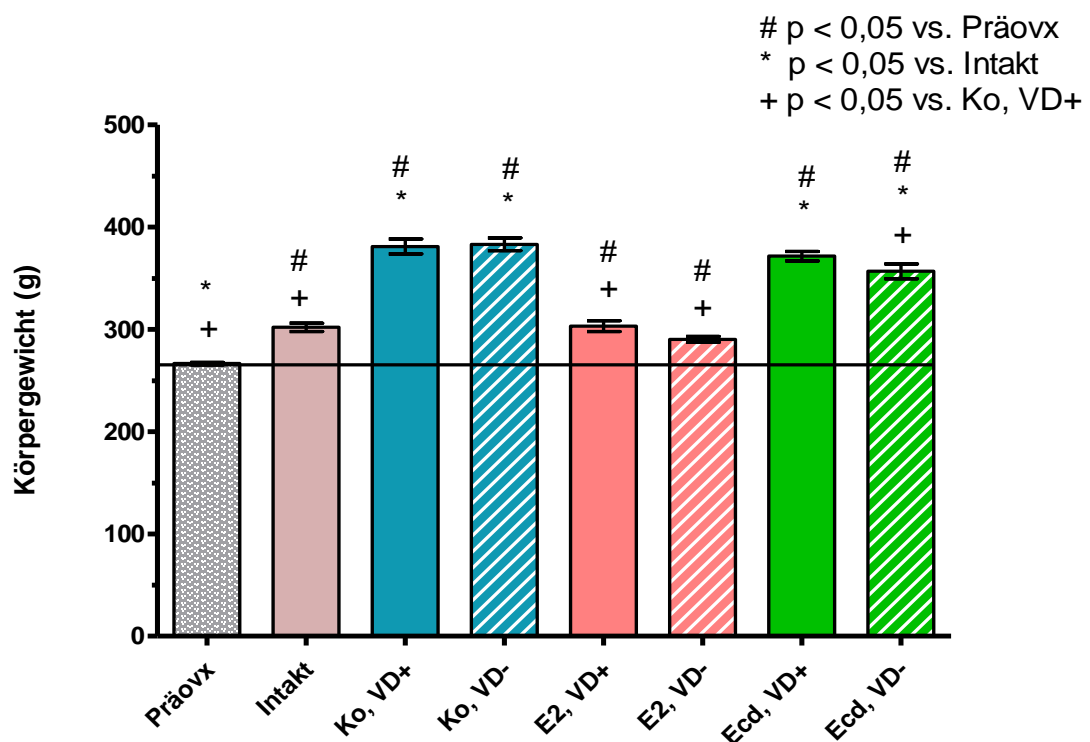


Abbildung 7: Das Körpergewicht
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD (3 Monate p.o. bei der ovx Ratte).

2. Futteraufnahme

Die folgende Graphik zeigt die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme der Tiere in den unterschiedlichen Versuchsgruppen.

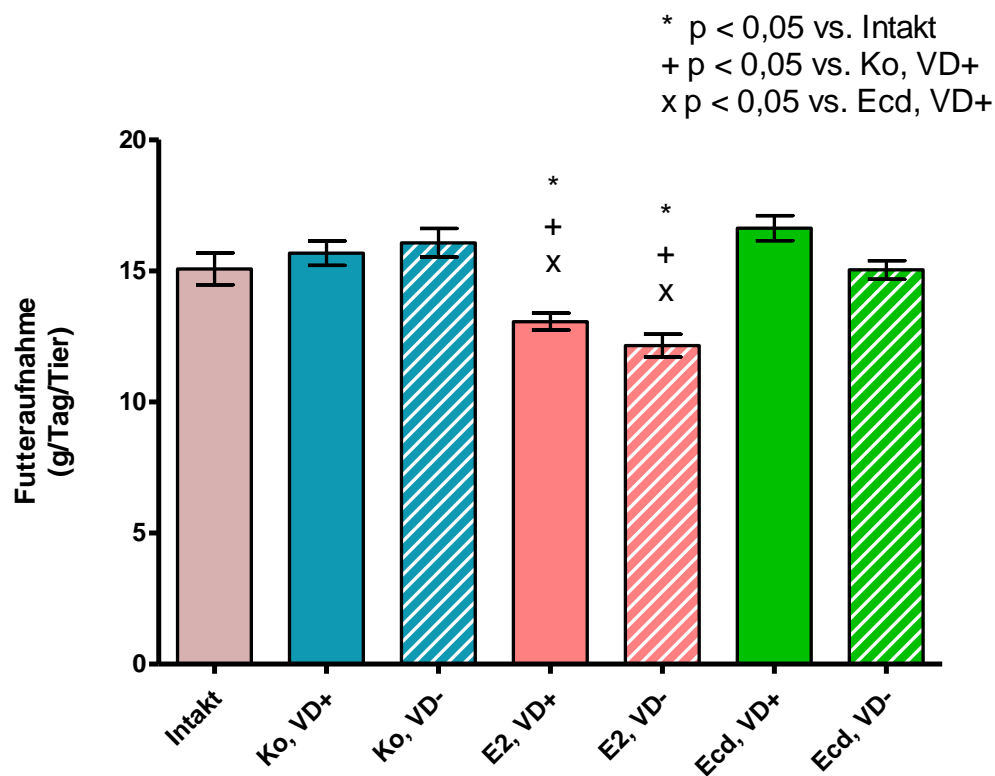


Abbildung 8: Die tägliche Futteraufnahme
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD (3 Monate p.o. bei der ovx Ratte)

Die intakten Tiere haben durchschnittlich 15,7 g täglich gefressen. Die deutlich schwereren Kontrolltiere (16 g bzw. 16,3 g/Tag/Tier) sowie die Gruppe Ecd, VD- (15,4 g/Tag/Tier) haben ähnliche Mengen gefressen, wogen allerdings schlussendlich alle deutlich mehr. Die Gruppe Ecd VD+ hat mit durchschnittlich 16,9 g/Tag/Tier am meisten Futter zu sich genommen. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen, täglichen Futteraufnahme ergab sich lediglich im Bezug auf die E2 substituierten Tiere, die mit 12,4 g (VD+) und 12,2 g (VD-) am wenigsten gefressen haben. Für die Futteraufnahme der Tiere vor Ovx liegen keine Daten vor.

3. Knochen

Nach dreimonatiger Futtergabe konnten folgende Beobachtungen nach Auswertung der qCT Messungen über die Tibiae der Versuchstiere gemacht werden.

3.1 Endostale Dichte

Der Abbildung 9 zeigt, dass die ED der intakten Kontrolltiere eine signifikante Dichtezunahme innerhalb der drei Monate erfuhr. Sämtliche übrigen Tiere entwickelten nach dem T-Score für Ratten (Tabelle 2) mit Dichtewerten $< 200\text{mg/cm}^3$ eine Osteoporose. Die ovx Kontrollgruppen verzeichneten den deutlichsten Dichteabfall um 55% bzw 58%. Dabei zeigten die Tiere mit VD-haltigem Futter eine um 3 % bessere Dichte, mit statistischer Signifikanz. Durch Substitution von E2 war der Abfall der ED in diesen Gruppen deutlich geringer: Die Verluste betragen in der Gruppe E2, VD+ 27% und E2, VD- 35,5%. Ecd zeigte weder mit noch ohne VD eine Verbesserung der ED gegenüber den ovx Kontrolltieren, und auch unter den beiden Ecd Gruppen zeigte sich kein statistisch relevanter Dichteunterschied.

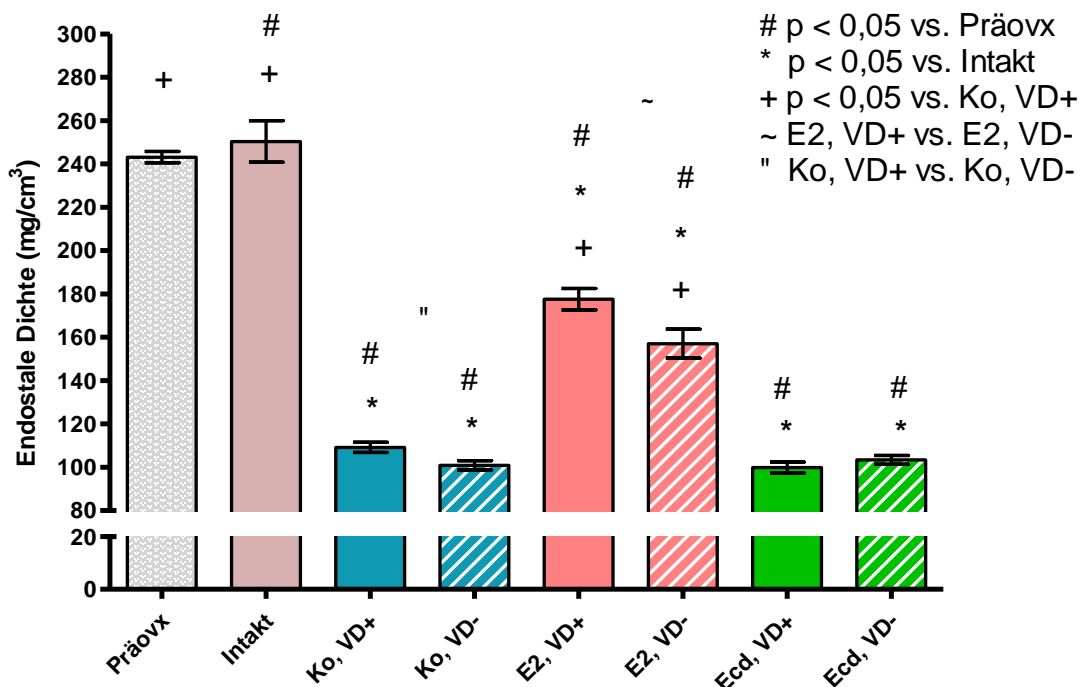


Abbildung 9: Die endostale Dichte (ED) der Metaphyse der Tibia
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD (3 Monate p.o. bei der ovx Ratte).

3.2 Endostale Fläche

Bei den intakten Ratten kam es während der drei Monate Versuchsdauer zu keiner Zunahme der endostalen Fläche (EF) (4,8 mm²). Im Gegensatz dazu wurde bei allen ovx Ratten eine endostale Flächenvergrößerung gemessen. Insbesondere waren davon die Tiere betroffen, die die größten Verluste an ED zu verzeichnen hatten: Ko, VD+ und -VD- sowie Ecd, VD+ (ca. 6,5 mm²). Eine vergleichbare Flächenzunahme der EF zeigte sich auch bei den Tieren E2, VD+. Bei der E2 Gruppe ohne Vitamin D war die Flächenzunahme zwar signifikant größer als bei den intakten Tieren, aber dennoch signifikant geringer als bei den ovx Kontrollen. Auch bei der Versuchsgruppe Ecd VD- kam es zu einer Zunahme der EF.

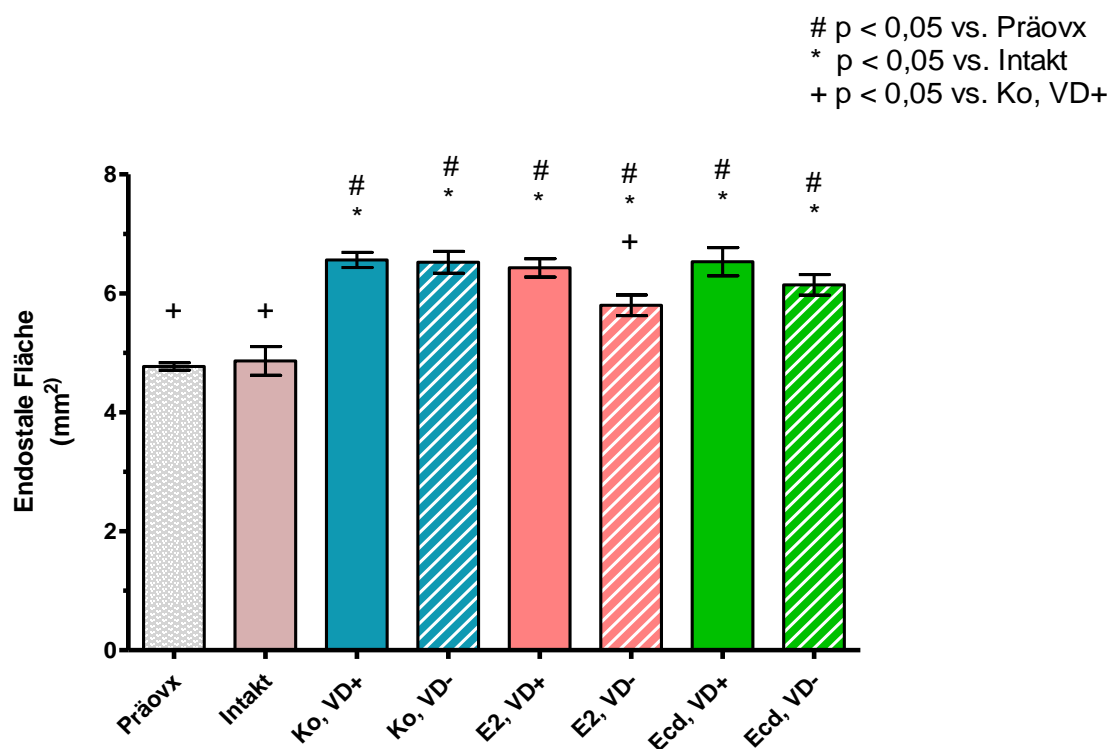


Abbildung 10: Die endostale Fläche (EF) der Metaphyse der Tibia
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD (3 Monate p.o. bei der ovx Ratte).

3.3 Kortikale Dichte

Die Kortikalis der Tiere wurde auf Höhe der Diaphyse gemessen. Der folgende Graph zeigt, dass es nach dem dreimonatigen Versuch, unabhängig von Ovx, VD, Substitution mit E2 oder Ecd, bei allen Ratten zu einer signifikanten Dichtezunahme des kortikalen Knochens kam.

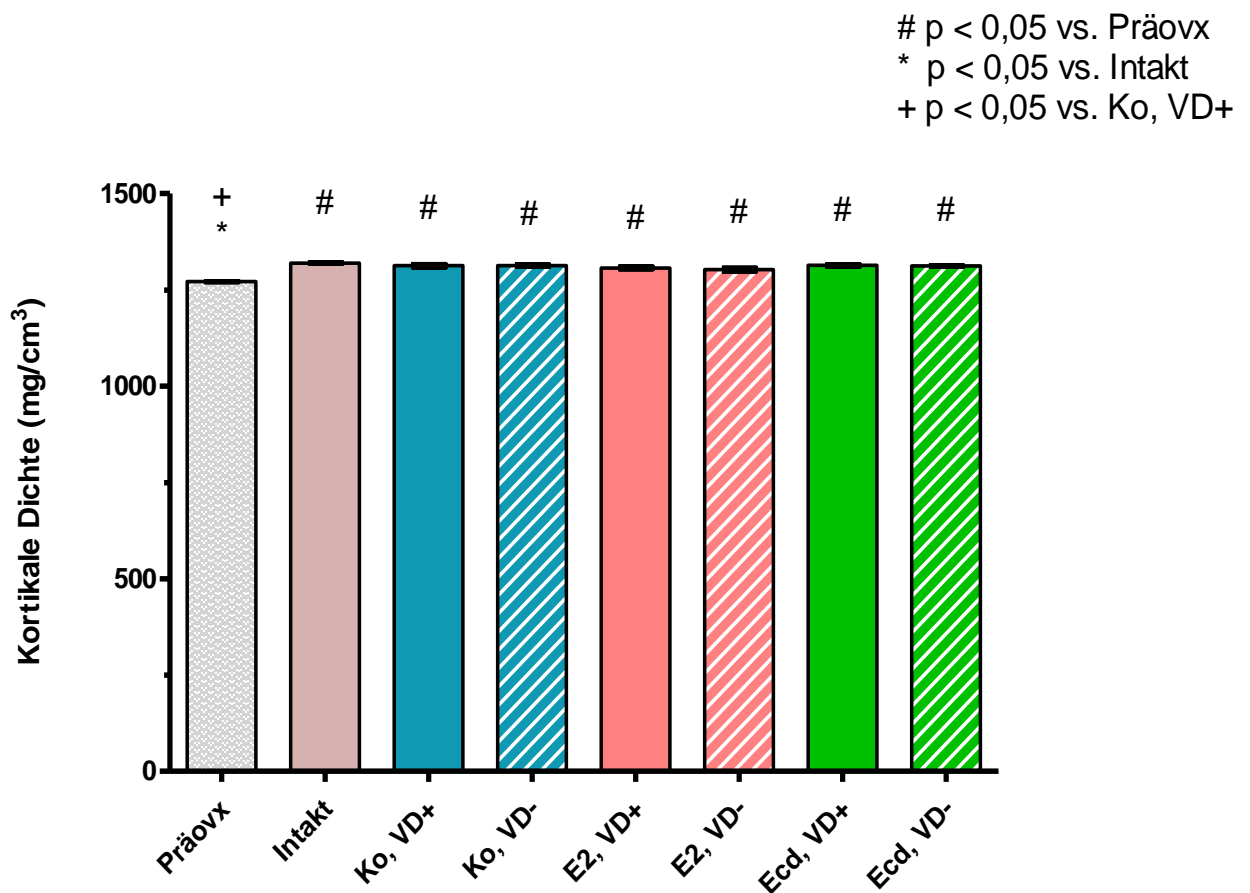


Abbildung 11: Die kortikale Dichte (KD) der Diaphyse der Tibia
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD (3 Monate p.o. bei der ovx Ratte).

3.4 Kortikale Fläche

Ebenfalls hat die KF unabhängig von der Ovx zugenommen. Lediglich die Tiere, welche das Futter E2, VD- erhalten hatten, zeigten eine signifikant kleinere Gesamtfläche als die ovx Kontrollgruppe.

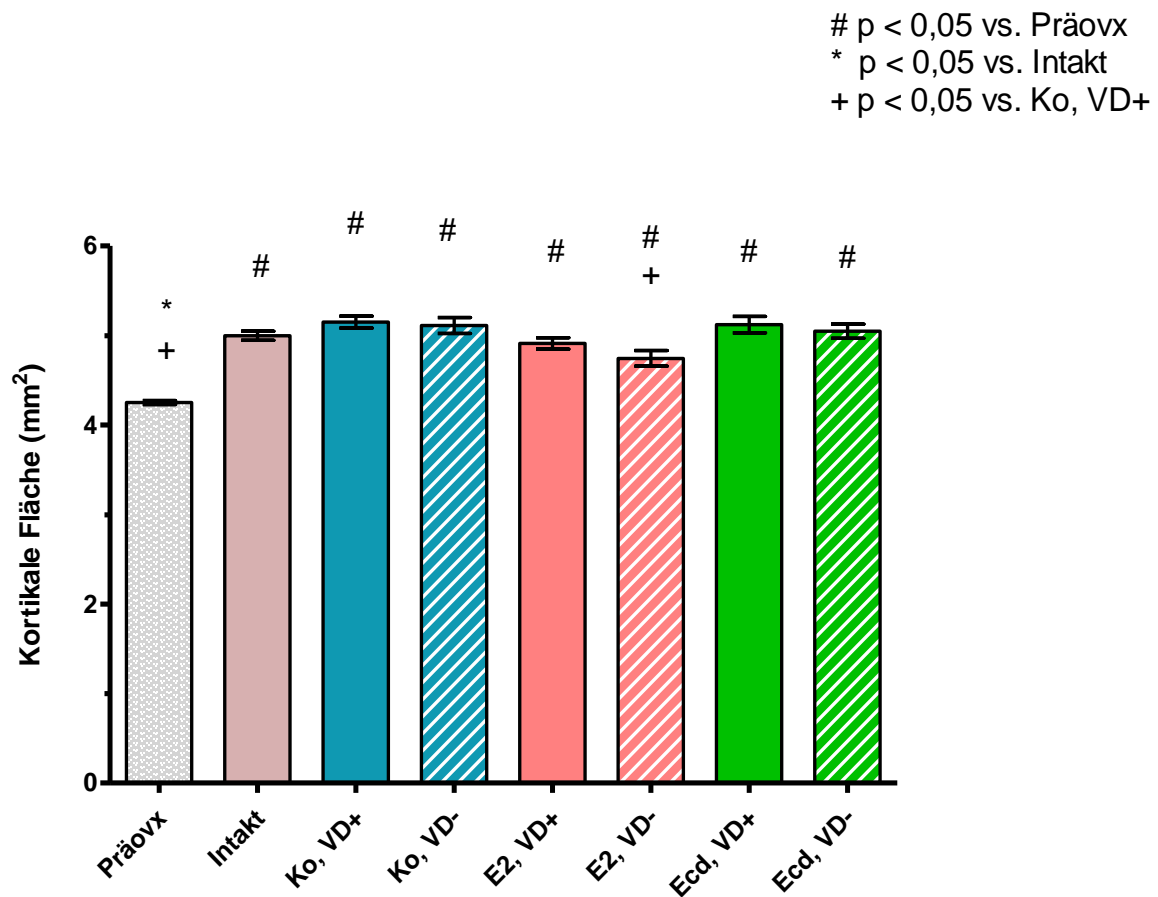


Abbildung 12: Die kortikale Fläche (KF) der Diaphyse der Tibia
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD (3 Monate p.o. bei der ovx Ratte).

3.5 Endostale Zirkumferenz

Die EZ der intakten Tiere hat nicht zugenommen. Ebenso wenig bei den Tieren, die E2 oder Ecd, VD- erhalten haben. Dies sind gleichzeitig die Gruppen, bei denen ebenfalls keine Vergrößerung der EF im Bereich der Metaphyse stattgefunden hat. In allen anderen Futtergruppen kam es drei Monate nach Ovx zu einer signifikant verlängerten EZ.

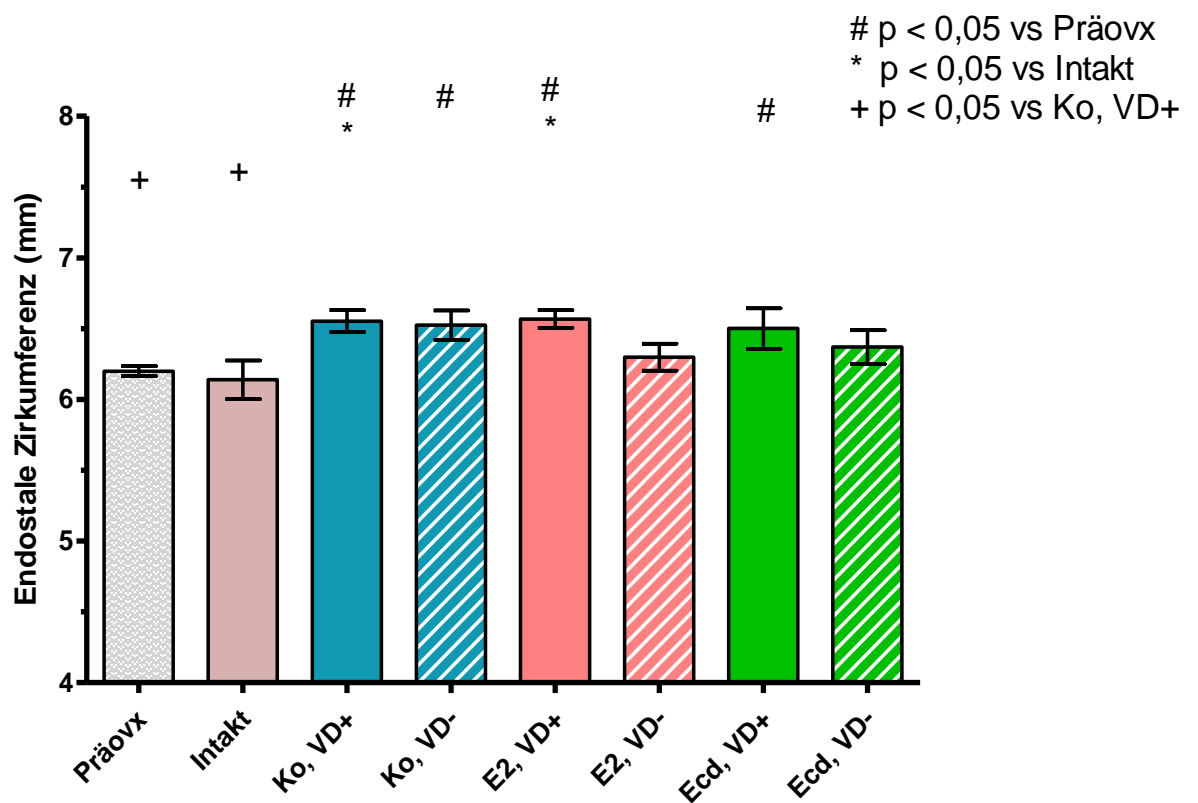


Abbildung 13: Die endostale Zirkumferenz (EZ) der Diaphyse der Tibia
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD (3 Monate p.o. bei der ovx Ratte).

3.6 Periostale Zirkumferenz

Dieser Parameter verhält sich ähnlich wie die Fläche der Kortikalis und nahm nach der Ovx bei allen Tieren gleichmäßig und signifikant zu. Allein die Gruppe E2, VD- zeigte eine geringere PZ als die ovx Kontrollgruppe mit VD.

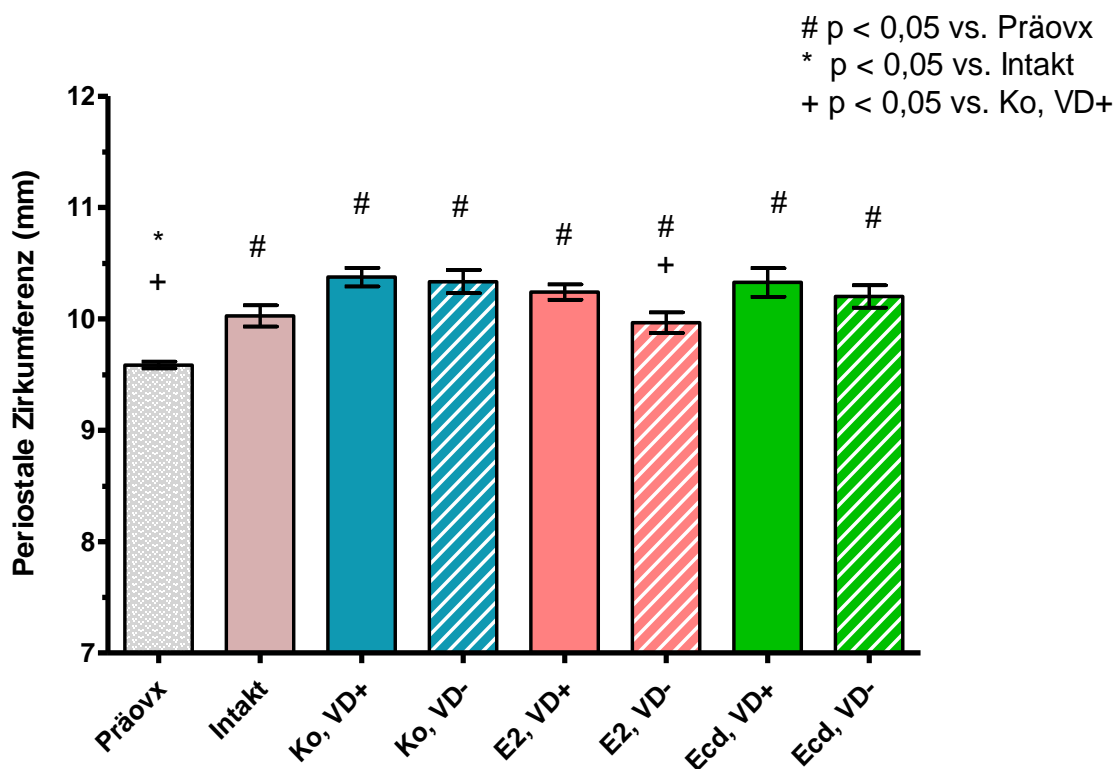


Abbildung 14: Die periostale Zirkumferenz (PZ) der Diaphyse der Tibia. Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD (3 Monate p.o. bei der ovx Ratte).

3.7 Osteokalzin im Serum

Bezüglich des OC im Serum der Tiere ergaben sich kaum signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Lediglich die Gruppe E2, VD+ zeigte einen deutlich niedrigeren OC-Spiegel als die Kontrollgruppe mit VD.

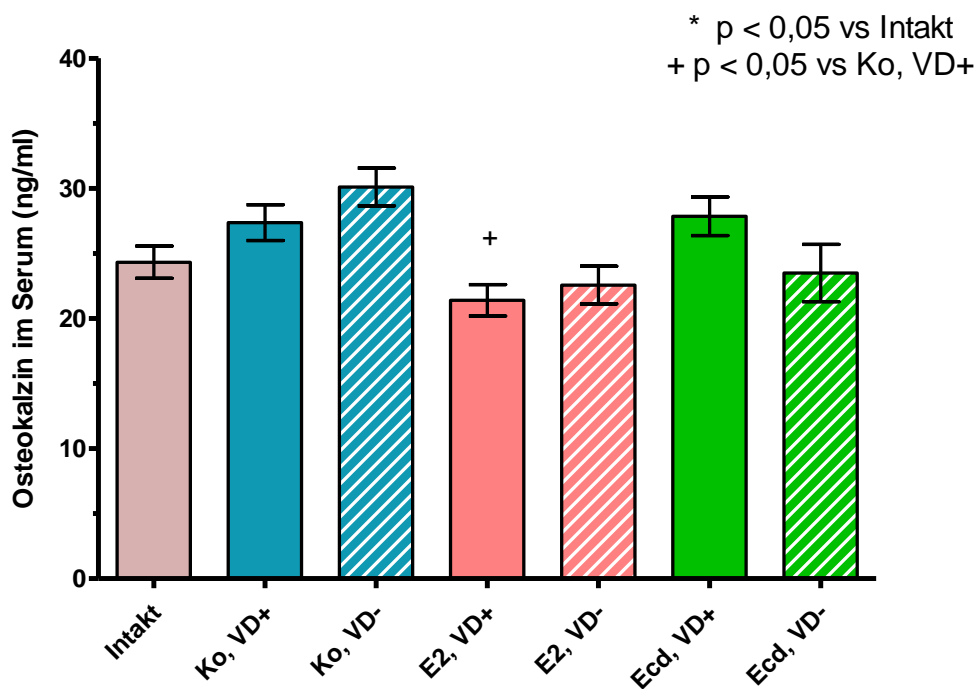


Abbildung 15: Osteokalzin (OC) im Serum
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD (3 Monate p.o. bei der ovx Ratte).

3.8 Crosslaps im Serum

Verglichen mit den intakten Tieren kam es nur in der Kontrollgruppe VD- zu einem signifikanten Anstieg der CL. Allein in der Gruppe E2, VD+ waren die CL deutlich niedriger als in der ovx Kontrollgruppe mit VD. Auffällig ist die große Varianz der gemessenen CL-Werte in den einzelnen Futtergruppen, so dass sich nur bei ausgeprägten Unterschieden zwischen den Gruppen statistische Signifikanzen ergeben.

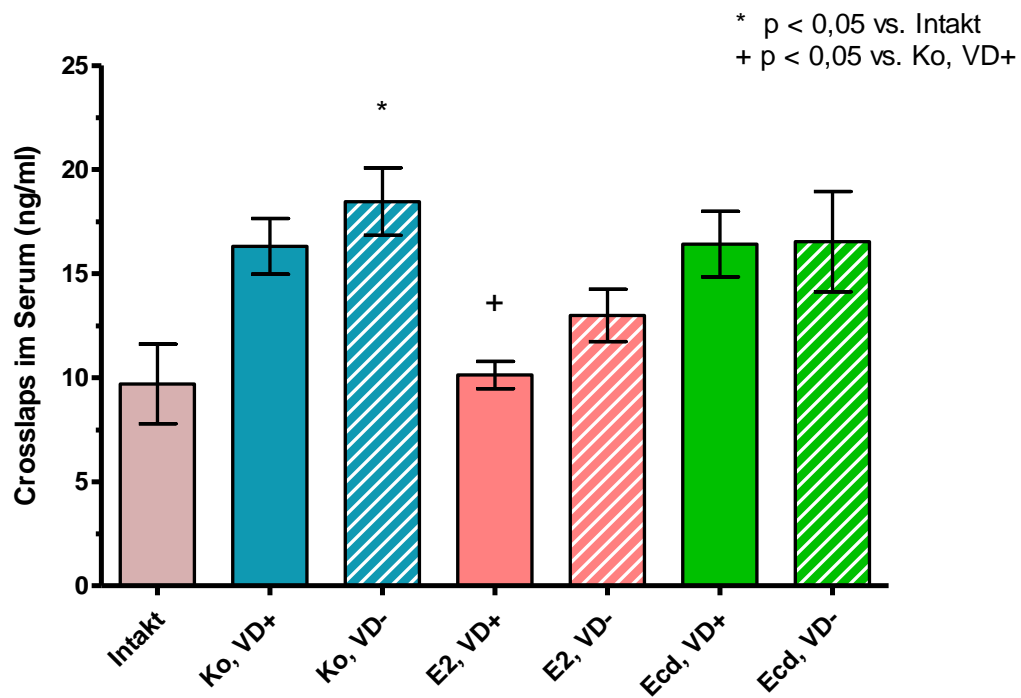


Abbildung 16: Crosslaps (CL) im Serum
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD (3 Monate p.o. bei der ovx Ratte).

4. Muskulatur

4.1 Muskelfläche

Bezüglich der Muskelfläche (MF), die auf Höhe der Metaphyse gemessen wurden, ergaben sich große Unterschiede. Sowohl die intakten Tiere als auch beide E2-Gruppen nahmen nicht an MF zu (ungefähr 200 mm²). Beide ovx Kontrollgruppen und die Gruppe Ecd VD+ zeigten eine signifikante Flächenzunahme in einem Größenordnungsbereich von ca. 35-45 mm². Den größten, muskelanabolen Effekt bewirkte die Kombination Ecd, VD-. Bei dieser Futtergruppe nahm die MF durchschnittlich um 80 mm² zu. Damit unterschied sich die MF der Gruppe Ecd ohne VD signifikant von der Ecd Gruppe mit VD. In den ovx Kontrollgruppen führte der unterschiedliche VD-Gehalt des Futter zu einer signifikant größeren MF in der Gruppe Ko, VD+.

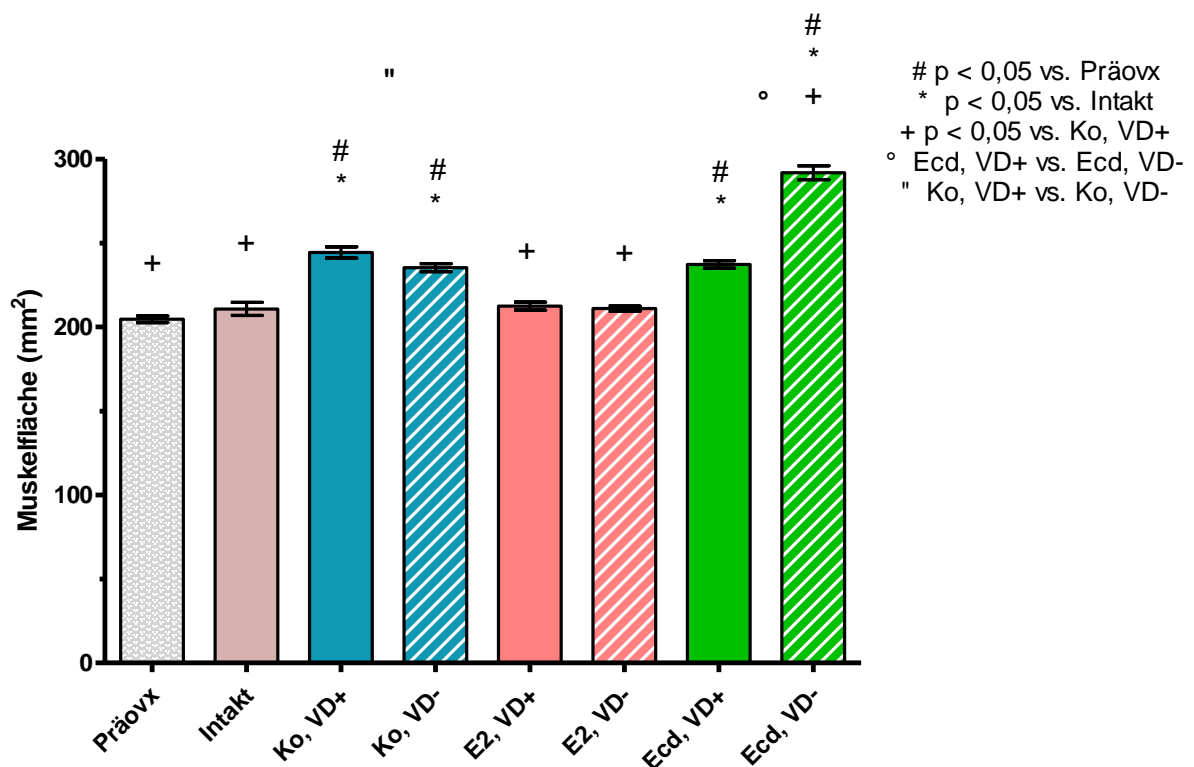


Abbildung 17: Die Muskelfläche (MF) auf Höhe der Metaphyse der Tibia. Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD (3 Monate p.o. bei der ovx Ratte).

4.2 Muskulaturdichte

Die folgende Abbildung 18 zeigt die zugehörigen, röntgenologischen Dichtewerte der Muskulatur mit folgenden Ergebnissen. Die Muskeldichte blieb innerhalb der drei Monate weitestgehend konstant. Eine Ausnahme bildete allein die Gruppe Ko, VD-, deren Muskulaturdichte bei zeitgleicher Flächenzunahme im Vergleich zu den präovx-Werten minimal, aber signifikant abnahm.

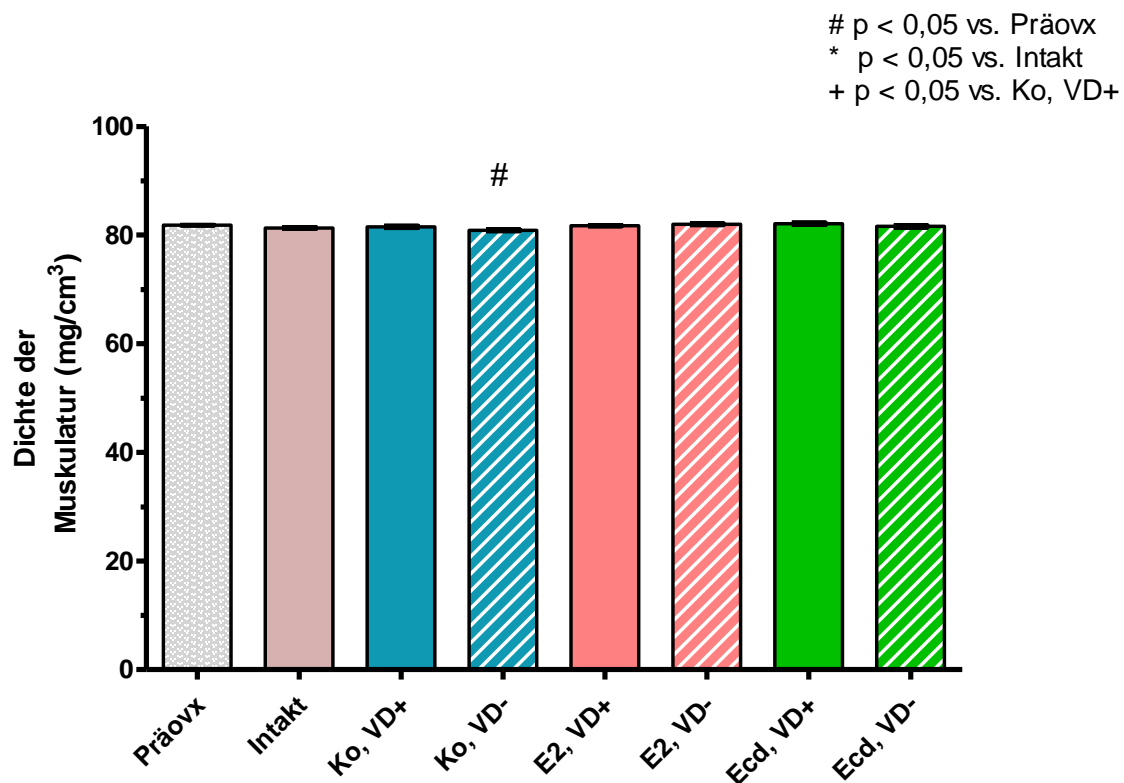


Abbildung 18: Röntgendichte der Muskulatur
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD (3 Monate p.o. bei der ovx Ratte).

5. Fettgewebe

5.1 Fettfläche

Die intakte Ratte nahm in drei Monaten ungefähr 12 mm² an Fettgewebsfläche zu. Die Tiere, bei denen E2 substituiert worden ist, hatten eine Fettgewebsvermehrung von etwa 10 mm² und somit eine kleinere Fettfläche als die intakten Tiere. Am ausgeprägtesten war die Fettgewebsvermehrung in den ovx Kontrollgruppen, die ihr paratibiales Fettdepot mehr als verdoppelten. Auch die beiden Ecd-Gruppen zeigten eine deutliche Vergrößerung ihres paratibialen Fettdepots. Allerdings war diese in beiden Fällen signifikant geringer als bei den ovx Kontrolltieren.

Die angedeuteten Unterschiede zwischen VD-reichem und VD-armem Futter waren in sämtlichen Futtergruppen nicht signifikant.

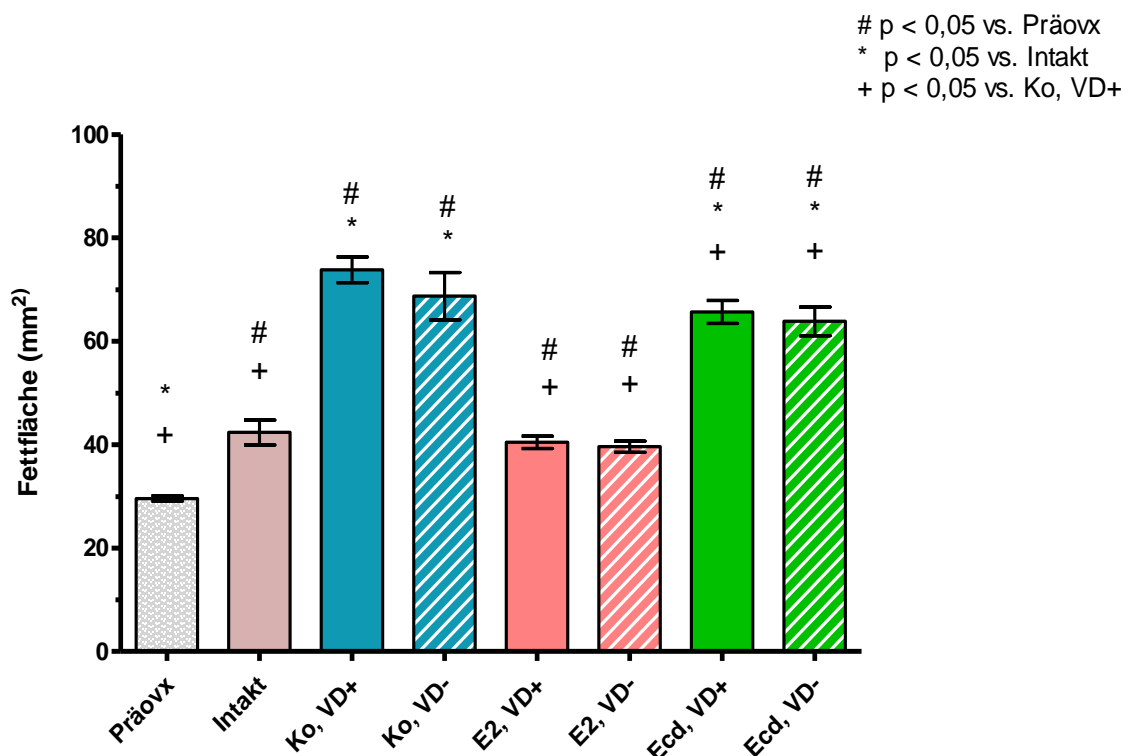


Abbildung 19: Die Fläche des paratibialen Fettgewebes
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD (3 Monate p.o. bei der ovx Ratte).

5.3 Serumparameter des Fettstoffwechsels

5.3.1 Leptin im Serum

Der Serum Leptinspiegel der ovx Kontrollgruppen war, insbesondere ohne VD, mehr als doppelt so hoch wie bei den intakten Tieren. Ebenfalls waren die Leptinspiegel der Gruppe Ecd, VD+ erhöht. Im Gegensatz dazu stieg der Leptinwert in der Gruppe Ecd VD-, verglichen mit den intakten Tieren, nicht statistisch relevant an. Die Tiere unter E2-Substitution zeigten niedrigere Leptinwerte als die intakte Gruppe.

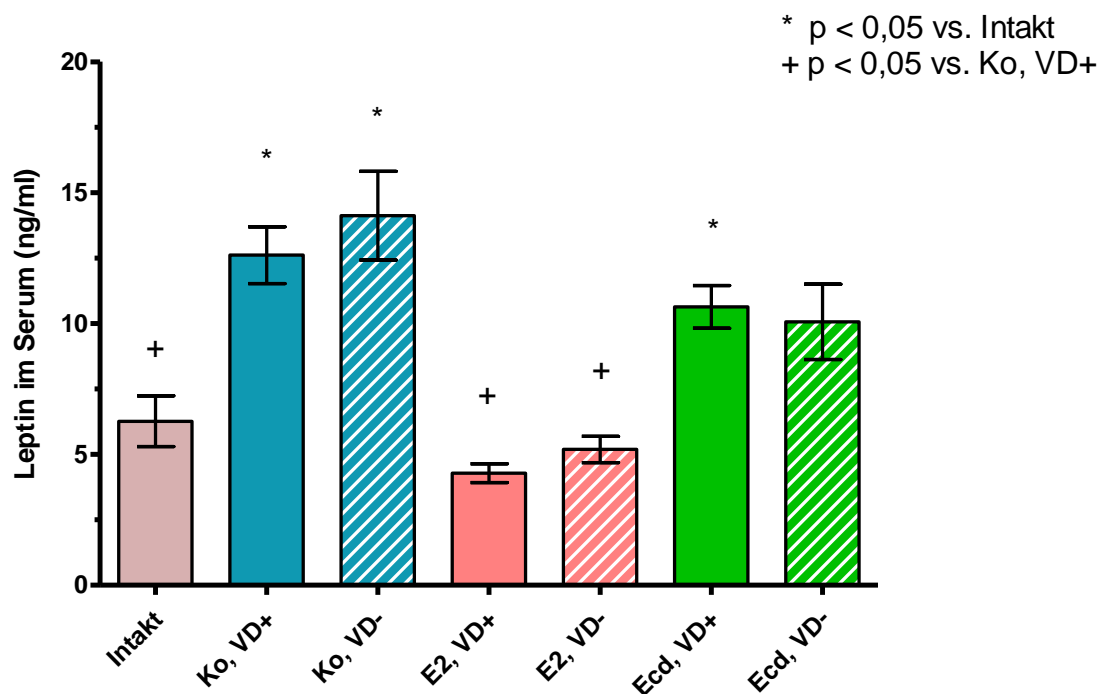


Abbildung 20: Leptin im Serum
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD (3 Monate p.o. bei der ovx Ratte).

5.3.2 Cholesterin im Serum

Die Serum Cholesterin Werte wichen in allen Gruppen signifikant von den Werten der intakten Tiere ab. Die ovx Kontrollen und Ecd wiesen im Vergleich deutlich erhöhte Cholesterinspiegel auf, die sich statistisch nicht voneinander unterschieden. Das Cholesterin in den E2-Gruppen war niedriger als in sämtlichen anderen Futtergruppe, auch als bei den intakten Tieren mit einer physiologischen Östrogenproduktion.

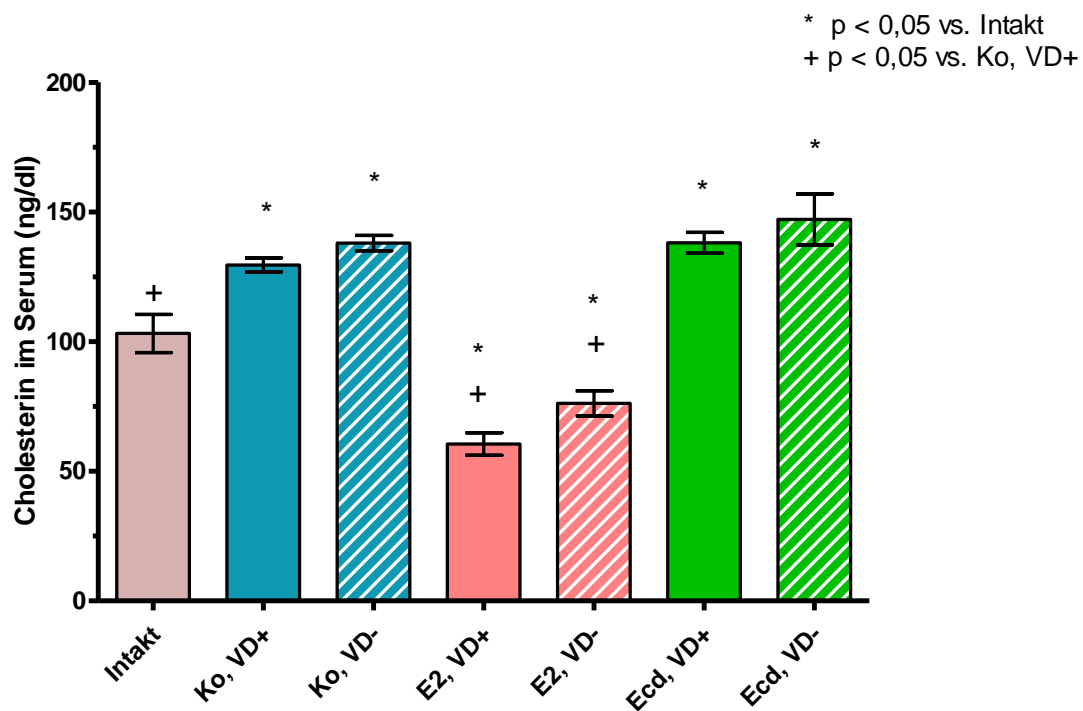


Abbildung 21: Cholesterin im Serum
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD (3 Monate p.o. bei der ovx Ratte).

IV. Diskussion

1. Studienziel

Auf der Suche nach Alternativen zur HRT als Prävention und Behandlung der postmenopausalen Osteoporose weckt der Wirkstoff Ecd zunehmend wissenschaftliches Interesse. Wiederholt konnte eine antiosteoporotische sowie muskulanabole und den Fettaufbau hemmende Wirkung gezeigt werden (Seidlová-Wuttke et al. 2010a, 2010b, Gorelick-Feldmann et al. 2008). Im Rahmen von Forschungsarbeiten zu dem bislang ungeklärten Wirkmechanismus des Steroids fielen sowohl strukturelle Analogien als auch Parallelen in den Wirkungsprofilen von Ecd und VD auf (Tóth et al. 2010). Das *Ultraspiracle Protein* (USP) ist Dimerisierungspartner des EcdR und zeigt deutliche Homologien zum RXR (Yao et al. 1993). Dieser stellt einen Bindungspartner für multiple, Steroidhormonrezeptoren dar, wie beispielsweise den VDR aber auch die PPARs, denen eine Schlüsselrolle im Fettstoffwechsel zukommt. Die zu prüfende Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass Ecd seine Wirkung über den RXR und VDR erzielt. Um zwei verschiedene Basisfutter herstellen zu können, welche sich nur in ihrem VD-Gehalt unterscheiden, wurde die Rezeptur im Nebeneffekt dahingehend verändert, dass das Futter in diesem Versuch einen deutlich gesteigerten Anteil an Kohlenhydraten sowie Milchprotein Kasein enthielt. Auch in der heutigen Gesellschaft entwickeln immer mehr Menschen durch ungesunde Ernährung eine gesundheitsbedrohende Fettleibigkeit. Mit dem Versiegen der ovariellen Östrogenproduktion der Frau steigt das Risiko, ein Metabolisches Syndrom zu entwickeln, um über 60% an (Carr 2003). Ecd erwies in vielen Studien positive Auswirkungen auf den Fettstoffwechsel und die Gewichtsentwicklung, die nun auch in dieser Arbeit demonstriert werden sollten (Seidlová-Wuttke et al. 2010b).

2. Analyse der Ergebnisse

Zur Einordnung der aktuellen Ergebnisse werden zwei vorhergehende wissenschaftliche Arbeiten der Abteilung Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen vergleichend herangezogen: Diesen Arbeiten liegt ein gemeinsamer Versuch zugrunde, in dem ovx Ratten ebenfalls drei Monate lang mit Ecd und E2 in verschiedenen Dosen gefüttert wurden. Die Versuchsbedingungen unterschieden sich allein im verabfolgten Futter. Im Anschluss wurde zum einen die Wirkung von Ecd auf den Knochen untersucht (Seidlová-Wuttke et al. 2010a), zum anderen wurden die metabolischen Effekte des Wirkstoffs betrachtet (Seidlová-Wuttke et al. 2010b).

2.1 Körpergewicht und Futteraufnahme

Insgesamt kam es in der vorliegenden Arbeit nach 3 Monaten bei sämtlichen Versuchstieren zu einer signifikanten Gewichtszunahme, die im Vergleich zum Vorversuch deutlich ausgeprägter war. Die Verteilung der Körpergewichte in den unterschiedlichen Gruppen war zu einem Großteil erwartungsgemäß. Das durch die Ovx herbeigeführte Östrogendefizit führt zu einem herabgesetzten Energiestoffwechsel, und die Tiere bewegen sich typischer Weise weniger. Dementsprechend war die Gewichtszunahme in den ovx Kontrollgruppen deutlich ausgeprägter als bei den intakten Tieren und den ovx Tieren mit E2 Substitution, welche neben der günstigeren Stoffwechselsituation auch bekannter Weise weniger fressen (Seidlová-Wuttke 2008b). VD hatte in den genannten Gruppen keine relevante Auswirkung auf die Gewichtsentwicklung. Die Körpergewichte der Tiere, die Ecd erhalten haben hingegen unterschieden sich hinsichtlich des VD-Gehaltes: Die Gewichte der Tiere Ecd VD+ entsprachen annäherungsweise denen der ovx Kontrolltiere. Im Gegensatz dazu hatten die Tiere der Gruppe Ecd ohne VD ein signifikant geringeres, finales Körpergewicht.

Ein Vergleich mit den Arbeiten Seidlová-Wuttke et al. 2010a, 2010b zeigt gleichzeitig eine geringere Futteraufnahme in sämtlichen Futtergruppen des aktuellen Versuches. In den Vorversuchen erbrachte die Dosierung von 3 g Ecd/kg Futter die besten therapeutischen Ergebnisse, so dass diese Wirkstoffkonzentration übernommen wurde. Konsequenz der geringeren Futteraufnahme im aktuellen Versuch ist eine

ebenfalls reduzierte Wirkstoffaufnahme der Tiere. So wurde die als optimal herausgestellte Tagesdosis Ecd von 57 mg/Tag/Tier in beiden Ecd-Gruppen nicht aufgenommen, sondern nur 50,88 mg/Tag/Tier (Ecd, VD+) bzw. 46,2 mg/Tag/Tier (Ecd VD-). Eine Erklärung für das veränderte Fressverhalten bietet am ehesten die veränderte Futterrezeptur. So könnte der erhöhte Kaseingehalt zu einem früher eingetretenen Sättigungsgefühl der Tiere geführt haben (Abou-Samra et al. 2011). Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass das Futter für die Tiere geschmacklich nicht ansprechend war.

2.2 Fettgewebe

Um die Entwicklung des Fettgewebes und des Fettstoffwechsels der Tiere zu bewerten wurde die Fläche des paratibialen Fettdepots im qCT gemessen und ergänzend wurden Leptin und Cholesterin im Serum bestimmt. In unserer Abteilung konnte in mehreren Studien beobachtet werden, dass Veränderungen der paratibialen Fettfläche mit gleichsinnigen Veränderungen des viszeralen Fettgewebes assoziiert sind (Seidlová-Wuttke et al. 2008a; Seidlová-Wuttke et al. 2003; Rachoń et al. 2008; Seidlová-Wuttke et al. 2003b). Da aber das paratibiale Fettdepot bislang nur in der Abteilung von Prof. Wuttke beschrieben wurde, können die gemessenen Daten nur mit abteilungsinternen Ergebnissen direkt verglichen werden. Bei allen Tieren kam es zu einer signifikanten Zunahme der genannten Fettfläche. Diese Entwicklung wurde auch in vorhergehenden Versuchen der Arbeitsgruppe Seidlová-Wuttke bei intakten Ratten beobachtet, so dass sie zum einen als Teil des physiologischen Wachstums der Tiere eingeordnet werden muss. Jedoch übersteigt das Ausmaß der Fettzunahme die Werte aus den Vorversuchen um ein Vielfaches. Ebenso bewegen sich die mit der Fettmasse korrelierten Leptinspiegel aller Tiere im aktuellen Versuch auf einem höheren Niveau (Seidlová-Wuttke et al 2010b, Rosenbaum et al. 1996). Erwartungsgemäß war das Fettdepot bei den ovx Kontrolltieren am größten und bei den E2-substituierten Tieren am kleinsten.

Auch in den Ecd-Gruppen kam es zu einer massiven Vergrößerung der paratibialen Fettdepots. Dennoch konnte der Wirkstoff sowohl mit als auch ohne VD die Vermehrung des paratibialen Fettgewebes im Vergleich zu den ovx Kontrollen signifikant verringern und stimmt an dieser Stelle mit den Vorversuchen überein (Seidlová-Wuttke

2010b). Ein relevanter Unterschied hinsichtlich der Fettfläche ergab sich zwischen den beiden VD-Varianten im aktuellen Versuch nicht. Weiterhin demonstrierte Ecd mit und ohne VD in diesem Versuch keine hypocholesterinämische Wirkung, wie es in der Literatur und Vorversuchen beschrieben wurde (Syrov et al. 1986, Seidlovà-Wuttke et al. 2010b). Die Leptin-Werte in den Ecd-Gruppen unterschieden sich statistisch nicht von den ovx Kontrollgruppen. Die Leptinspiegel der Ecd-Tiere ohne VD wichen statistisch jedoch auch nicht von den physiologischen Werten der intakten Tiere ab. Diese Tatsache weist neben der reduzierten Gewichtszunahme auf die günstigere, metabolische Situation der Gruppe Ecd, VD- gegenüber den Kontroll- und Ecd, VD+-Tieren hin. Dies könnte zum einen darin begründet sein, dass die Tiere ohne VD tendenziell weniger gefressen haben, aber auch mehr Muskelmasse hatten und sich mehr bewegt haben.

Ein Calcium- und Vitamin D-Mangel wurde in vielen, wissenschaftlichen Arbeiten mit einer Adipositas assoziiert (Soares et al. 2012; Pathak et al. 2014). Darüber hinaus beschrieben Pathak et al. 2014, dass VD ohne Kalorienrestriktion jedoch nicht zu einer Verbesserung der Fettleibigkeit führt. Der zugrunde liegende Wirkzusammenhang konnte bislang nicht abschließend geklärt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte VD in keiner Versuchsgruppe die Zunahme an Fettgewebe signifikant abmildern. Unabhängig von VD zeigte Ecd positiven Einfluss auf die Entwicklung des Fettgewebes. Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass Ecd seine Wirkung zumindest nicht ausschließlich über den VDR erzielt. Denkbar wäre an dieser Stelle auch eine Interaktion von Ecd mit den PPARs, die als zentrale Regulatoren des Fettstoffwechsels ebenfalls über den RXR wirken. So könnte Ecd möglicherweise aktivierende Wirkung auf die PPAR α ausgeübt haben oder auch als Kosuppressor des PPAR γ gewirkt haben. Hypothetischerweise könnte diesem Ergebnis auch ein kompetitiver Wirkmechanismus zwischen den PPARs und dem VDR um den RXR zugrunde liegen, bei dem VD und der VDR verdrängt wurden.

2.3 Muskulatur

Hinsichtlich der Muskelfläche sind deutliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen erkennbar. Die intakten und E2-substituierten Tiere zeigten keine Zunahme der Muskelfläche im Vergleich zu den 3 Monate alten Versuchstieren vor Ovx.

McCormick et al. 2004 zeigten in einem Versuch, dass Tiere unter Östrogeneinfluss kleinere Muskelfasern und weniger Muskelmasse als die ovx Kontrollgruppe entwickeln. Dementsprechend nahm die MF der ovx Kontrolltiere und auch der Ecd-Tiere im aktuellen Versuch vergleichsweise zu.

Insgesamt erreichte die Gruppe Ecd, VD- in diesem Versuch die größte Muskelfläche, die sich signifikant von allen anderen Gruppen abhob. Die muskelanabole Wirkung von Ecdysteroiden ist lange bekannt (Tóth 2010). Eine Vergrößerung der Muskelfläche durch Ecd konnte auch in vorhergehenden qCT Messungen unserer Abteilung bestätigt werden (Seidlová-Wuttke et al. 2010b). Die VD-haltige Futtervariante mit Ecd zeigte diese muskelanabolen Effekte gegenüber den ovx Kontrollgruppen im Gegensatz zur Gruppe Ecd, VD- im aktuellen Versuch nicht. Die zuvor in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesenen, muskelanabolen Effekte durch Ecd wurden an Ratten gezeigt, die ebenfalls VD-haltiges Futter erhalten haben. Auffällig ist auch hier, dass die Wirkstoffe Ecd und VD ausgerechnet bei den schwersten Tieren, die am meisten gefressen haben (ovx Ko, VD+ und VD-, ovx Ecd VD+) nicht gewirkt haben. Auch Myozyten entwickeln sich aus MSC. Nicht nur für den Knochenstoffwechsel, sondern auch für die Entwicklung und Regeneration von Muskelzellen werden lipotoxische Effekte durch proinflammatorische Zytokine wie TNF alpha, IL1 und IL6 sowie erhöhte Leptinspiegel beschrieben (Akhmedov und Berdeaux 2013).

In Bezug auf eine mögliche Interaktion mit dem RXR und PPARs findet sich im Skelettmuskel größtenteils der Subtyp PPAR δ , dessen Funktion weniger gut erforscht ist. Man weiß, dass die Aktivierung der PPAR δ die Fettsäure Oxidation im Skelettmuskel verbessert (Ehrenborg und Kroog 2009). Zudem wurde gesehen, dass die Administration des synthetisierten PPAR δ Liganden GW501516 nur bei zeitgleichem Muskeltraining zu einer Zunahme der Ausdauerfähigkeit, sowie Zunahme von Typ I Muskelfasern und Mitochondrien führt (Narkar et al. 2008). Denkbar wäre, dass die leichteren Tiere der Gruppe Ecd, VD- sich mehr bewegt haben und Ecd über den PPAR δ muskelanabole Effekte zeigen konnte.

Die Röntgendichte der Muskulatur wurde nicht wesentlich durch die Ovx oder das Alter der Tiere beeinflusst. Allein die Gruppe ovx, Ko VD- zeigte eine signifikant geringere Muskeldichte als Tiere vor Ovx. Eine herabgesetzte Dichte der Muskulatur

könnte durch vermehrte Fetteinlagerung oder Verwässerung der Muskulatur begründet sein. Fett und Flüssigkeit werden im qCT durch niedrigere Dichtewerte definiert. Da die Gruppe ovx Ko, VD- auch aus den schwersten Tieren mit der größten paratibialen Fetteinlagerung bestand, wäre diese Erklärung wohl naheliegend. Sie lässt sich aber durch die Bildgebung allein nicht beweisen.

2.4 Knochen

2.4.1 Endostale Dichte

Der Verlust von Knochensubstanz zeigt sich bei der ovx Ratte im qCT insbesondere durch erniedrigte Dichtewerte des endostalen bzw. trabekulären Knochens, gemessen im Bereich der Metaphyse der Tibia. Bis auf die intakten Tiere entwickelten alle Futtergruppen nach dem von unserer Abteilung etablierten Ratten T-Score eine ED $< 200,9 \text{ mg/cm}^3$ und somit per definitionem eine Osteoporose. Wie erwartet führte das Östrogendefizit in den ovx Kontrollgruppen zu einem massiven Verlust der ED um über 50%. Die Substitution von E2 nach OvX zeigte die beste osteoprotektive Wirkung, indem sie den ED Abfall signifikant verringern konnte. Die Gabe von VD konnte im Einklang mit der Literatur die Knochendichte insbesondere im Zusammenspiel mit E2 signifikant verbessern (Kaastad et al. 2001; Duque et al. 2002).

In vorhergehenden Arbeiten der Abteilung von Prof. Wuttke konnte eine verbesserte Knochendichte nach Ecd-Gabe im Vergleich zur Kontrollgruppe bei ovx Ratten nachgewiesen werden (Seidlová-Wuttke et al. 2010a). Diese Wirkung von Ecd konnte im Versuch der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Weder die Gruppe Ecd, VD+ noch die Gruppe Ecd VD- zeigte eine signifikante Verbesserung der ED im Vergleich zu den ovx Kontrollgruppe. Zudem konnte im Gegensatz zu den übrigen Versuchsgruppen VD die Knochendichte auch innerhalb der Ecd-Gruppen nicht verbessern.

Ein Vergleich der absoluten Dichtewerte der vorliegenden Arbeit mit den Daten der Arbeit Seidlová-Wuttke et al. 2010a zeigt, dass im Jahr 2010 in sämtlichen Futtergruppen höhere ED gemessen wurden. Der markante Unterschied zwischen den Versuchsbedingungen in den Vorversuchen der Abteilung und dem Versuch der vorliegenden Dissertation besteht in der veränderten Futterrezeptur. Eine Korrelation zwischen Kasein und einer Abnahme der Knochendichte wird in der Literatur nicht beschrieben. Insgesamt liegt die Vermutung nahe, dass sich im aktuellen Versuch

die aus dem kohlenhydratreichen Futter resultierende Stoffwechselsituation der Ratten negativ auf die Knochenqualität ausgewirkt haben könnte. Der Zusammenhang zwischen Adipositas und der BMD ist wissenschaftlich umstritten. Forschungsergebnisse der letzten Jahre weisen zunehmend darauf hin, dass die Fettleibigkeit insgesamt einen Risikofaktor für die Entwicklung einer Osteoporose darstellt: Viszerale und intraossäre Fetteinlagerungen sowie erhöhte Spiegel von Leptin, Adiponektin und proinflammatorischen Mediatoren sind Faktoren, die sich zum Teil gegenseitig bedingen und die mit einer verringerten Knochendichte assoziiert sind (Russell et al. 2010, Cao 2011, sowie mündliche Mitteilung durch Dannenberg 2013). Sie führen über eine Verschiebung des RANKL/RANK/OPG-Gleichgewichts zu einer verstärkten, Osteoklasten-vermittelten Knochenresorption. Weiterhin führen die Zunahme des viszeralen Fettgewebes, aber auch das Östrogendefizit selbst zu einer Vermehrung knochenständiger Adipozyten (Sheu and Cauley 2011; Syed et al. 2008). Diese Entwicklung ist ebenfalls mit einer erniedrigten BMD assoziiert (Shen et al. 2007). Die Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung der Knochen des aktuellen Versuches können diese Annahmen bestätigen: Übereinstimmend mit den niedrigen ED Werten der metaphysalen Tibia wies Dannenberg 2013 einen ausgeprägten Verlust trabekulärer Knochensubstanz sowie einen erhöhten Fettanteil im Knochen der Kontroll- und Ecd Gruppen nach.

Knochenmarkständige Adipozyten und Osteoblasten entwickeln sich aus einer gemeinsamen MSC. Dabei stellt PPAR γ den essentiellen Transkriptionsfaktor für die Adipogenese dar, während RUNX-2 die Schlüsselrolle bei der Osteoblastogenese spielt. Die Expression und Aktivierung des einen Schlüsselproteins ist in den meisten Fällen mit der Herabregulation des anderen Proteins, im Sinne einer inversen Korrelation verbunden (Valentini et al. 2011). Im Rahmen der sehr gehaltvollen Ernährung der Ratten könnte es zu einem Energieüberschuss gekommen sein, der die Differenzierung der MSC zu Adipozyten begünstigt hat. Fettsäuren sind aktivierende Liganden des PPAR γ , der mit dem RXR dimerisiert und die Adipogenese induziert. Diese Wirkung kann generell durch Bildung des VDR/RXR-Komplexes zugunsten der Osteoblastogenese supprimiert werden (Kong 2005). Die hypothetische Annahme, dass Ecd über den VDR bzw. RXR Effekte auslöst, wäre kongruent mit der reduzierten, osteoprotektiven Wirkung von Ecd und ebenfalls von VD hinsichtlich der ED. Das

kalorienreiche Futter könnte zu einem relativen Überwiegen von Fettsäuren gegenüber VD und Ecd geführt haben, so dass sich im Sinne eines kompetitiven Wirkmechanismus mehr PPAR γ /RXR als VDR/RXR bildete und so die Proliferation der MSC zu Adipozyten dominierte.

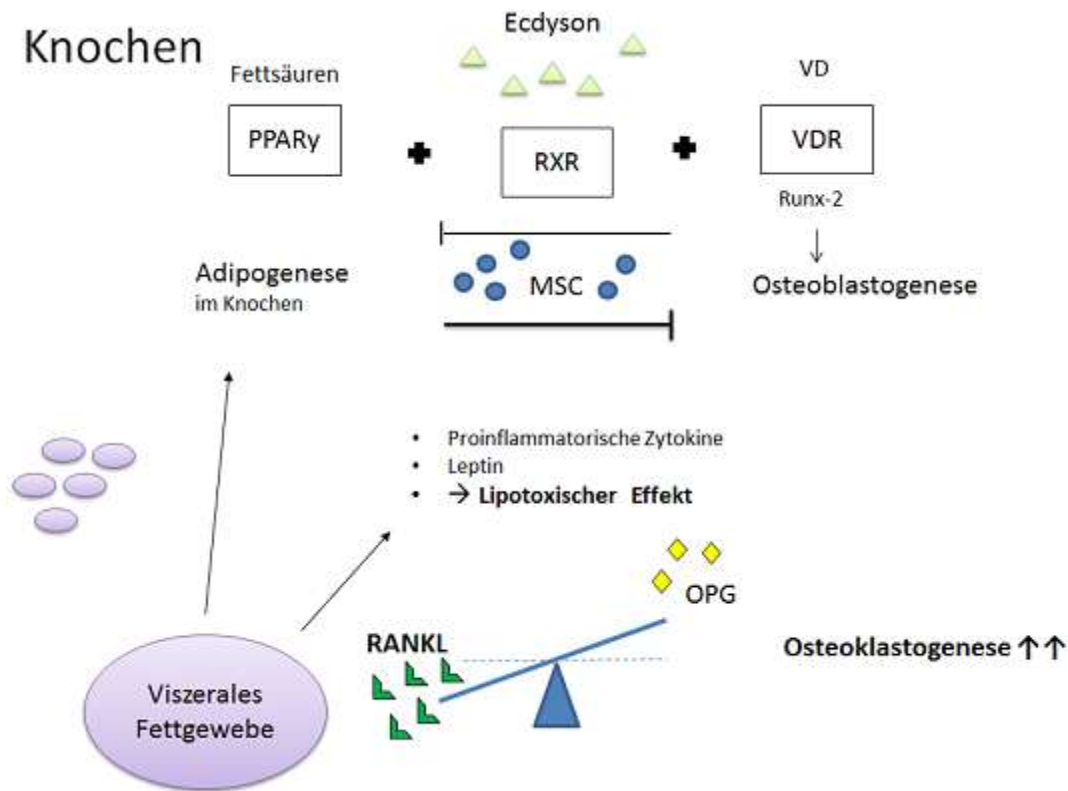


Abbildung 22: Mögliche pathophysiologische Wirkzusammenhänge bei der Entwicklung einer Osteoporose im aktuellen Versuch

Darüber hinaus zeigte sich ebenfalls eine reduzierte, muskelanabole Wirkung durch Ecd in diesem Versuch. Auch dieser Faktor könnte die reduzierte osteoprotektive Potenz von Ecd im aktuellen Versuch weiter bedingt haben.

2.4.2 Kortikale Dichte

Die KD nahm nach drei Monaten sowohl bei den intakten als auch bei allen ovx Tieren gleichermaßen zu. Die zunehmende Knochendichte der Kortikalis wird als Teil des Wachstumsprozesses der Ratte eingeordnet. Die Entwicklung der KD wurde durch das Östrogendefizit nicht beeinflusst, was sich mit den Ergebnissen vorhergehender Studien deckt (Seidlovà-Wuttke et al. 2008b). Da die Kortikalis weniger Oberflächen bietet, an denen sich Remodelingvorgänge abspielen, tritt ein Verlust kortika-

ler Knochensubstanz sehr viel milder und später nach Versiegen der ovariellen Funktion ein (Seeman und Delmas 2006, Lelovas et al. 2008). Auch in vorhergehenden Versuchen unserer Abteilung konnte diese Beobachtung wiederholt bestätigt werden. Insbesondere Ecd zeigte weder hier noch in unseren Vorversuchen eine Einflussnahme auf die KD (Seidlová-Wuttke et al. 2008a, 2008b, Seidlová-Wuttke et al. 2010a).

2.4.3 Knochenflächen

Eine typische Veränderung, die im Rahmen des osteoporotischen Umbaus langer Röhrenknochen nach einer Ovx beobachtet wird, ist die Zunahme des Knochen-durchmessers. Es zeigt sich eine Vergößerung der endostalen Fläche sowie eine Ausdünnung der Kortikalis (Aerssens 1996). Diese als Kompensationsmechanismus verstandene Verbreiterung des Durchmessers schützt den Knochen zwar eventuell vor Schäden durch direkte Biegekräfte. Jedoch nehmen die Flexibilität des Knochens und auch die Gesamtstabilität durch diesen Mechanismus insgesamt ab (Seidlová-Wuttke et al. 2008a, Seeman 2007).

Bei allen ovx Tieren war eine endostale Flächenzunahme des trabekulären Knochens festzustellen. Ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des endostalen Dichteverlustes und der jeweiligen Flächenzunahme war nicht ersichtlich. Sowohl die ovx Kontrollgruppen, welche den stärksten Verlust trabekulärer Knochensubstanz aufwiesen, als auch die Gruppe E2, VD+, die nach Ovx die besten Dichtewerte zeigte, unterschieden sich hier nicht.

Die kortikale Fläche hat nach drei Monaten in allen Versuchsgruppen in einem ähnlichem Rahmen zugenommen. Betrachtet man dabei die Umfänge, die diese Fläche begrenzen, werden Unterschiede zwischen den intakten und den ovx Tieren ersichtlich. Kortikaler Knochenverlust durch Östrogenmangel zeigt sich durch Knochenresorption an endostalen Oberflächen sowie durch periostale Knochenapposition (Ke et al. 1993, Miller et al. 1991). Eine periosteale Umfangsvermehrung ließ sich im aktuellen Versuch bei allen Versuchstieren nachweisen. Da es auch bei den intakten Tieren, die keine Osteoporose entwickelt haben, zu dieser Entwicklung kam, muss diese zunächst als physiologische Entwicklung eingeordnet werden. Jedoch kam es bei den ovx Tieren im Gegensatz zu den intakten Tieren gleichzeitig zu einer Ver-

größerung der Markhöhle, gekennzeichnet durch eine Zunahme des endostalen Umfangs EZ. Die dickere Kortikalis der Gruppe Ecd, VD- im Vergleich zur Kontrollgruppe könnte somit ein Hinweis darauf sein, dass diese Subgruppe nach Ecd-Gabe insgesamt etwas weniger stark von den osteoporotischen Veränderungen des Knochens betroffen war.

2.4.4 Serumparameter des Knochenstoffwechsels

Die Auswirkungen des Östrogendefizits auf den Knochenstoffwechsel lassen sich auch indirekt durch die Bestimmung von Serumparametern nachvollziehen. Die im Vergleich mit den intakten Tieren deutlich erhöhten CL der Tiere Ko, VD- spiegeln die in der Bildgebung am stärksten von Osteoporose betroffenen Knochen wieder. In der Gruppe E2, VD+ zeigen sich signifikant niedrigere Werte für OC und CL im Vergleich zu den Kontrolltieren. Diese Werte sprechen für eine den Knochenstoffwechsel supprimierende Wirkung der Östrogene. Die restlichen, unterschiedlich ausgeprägten, osteoporotischen Veränderungen der Knochen spiegeln sich in den Serumparametern allenfalls tendenziell wieder. Für VD ist eine hemmende Wirkung auf die Osteoklastogenese und stimulierende Wirkung auf die Osteoblastogenese beschrieben. Dementsprechend sollte sich VD-reiches Futter gegenüber VD-armem Futter durch ein vergleichsweise erhöhtes OC und erniedrigte Werte der CL zeigen (Shiraishi et al. 2000). Der direkte Vergleich zwischen VD-haltiger und VD-armer Futtervariante im aktuellen Versuch deckt sich in keiner der Futtergruppen mit genannten Erwartungen. An dieser Stelle wird deutlich, dass auch VD in dieser Arbeit nicht richtig wirken konnte. Während in vorhergehenden Studien eine signifikante Erhöhung von OC nach Ecd-Gabe beobachtet wurde, konnte im aktuellen Versuch kein signifikanter Unterschied zwischen den ovx Kontroll- und Ecd-Gruppen festgestellt werden (Gao et al. 2008, Seidlová-Wuttke et al. 2010a). Ein erhöhtes OC war ein Parameter, der einen Zusammenhang zwischen der Wirkung von Ecd und dem VDR vermuten ließ. Offensichtlich wurde nicht nur Ecd sondern auch VD im Kontext dieser Arbeit in der osteoprotektiven Wirkpotenz deutlich eingeschränkt.

2.5 Mögliche Wirkzusammenhänge von Ecdyson und Vitamin D

Insgesamt zeigten sowohl VD als auch Ecd nicht in allen Organen und dort auch nur in sehr viel geringerem Ausmaß, die in Literatur und Vorversuchen beschriebenen

osteoprotektiven, den Fettaufbau hemmenden und muskelanabolen Wirkungen. In der Gesamtbetrachtung des Versuchs ergibt sich, dass das veränderte Futter bei den ovx Versuchstieren eine Stoffwechselsituation erzeugt hat, die sowohl die Wirkung von Ecd als auch von VD maßgeblich beeinträchtigt hat. An welcher Stelle diese Interaktion genau stattgefunden hat lässt sich, insbesondere bei dem ungeklärten Wirkmechanismus von Ecd, aus den präsentierten Ergebnissen nicht eruieren.

Es lassen sich dennoch einige Punkte bezüglich der Wirkbeziehungen von Ecd und VD aus diesem Versuch diskutieren: Auf Grundlage der dargelegten Versuchsergebnisse kann insgesamt festgehalten werden, dass Ecd auch unabhängig von VD nachweisbare Effekte zumindest auf Muskel- und Fettstoffwechsel auslösen kann. Die vereinzelt, positiven Auswirkungen von VD und Ecd haben sich im Zusammenspiel in keiner Untersuchung dieser Dissertation potenziert, so dass eine synergistische Wirkbeziehung zwischen VD und Ecd nach diesem Versuch nahezu auszuschließen ist. Ein konstanter Wirkzusammenhang zwischen den beiden Steroiden lässt sich auf Grundlage der Versuchsergebnisse nicht ableiten.

Insgesamt könnte die Tatsache, dass sowohl VD als auch Ecd in ihrer Wirkung durch die veränderte Stoffwechselsituation beeinträchtigt wurden, als Indiz gewertet werden, dass relevante Gemeinsamkeiten im Wirkmechanismus der beiden Hormone vorliegen. Der RXR ist als Dimerisierungspartner des VDR ein wichtiger Bestandteil des Wirkmechanismus von VD und möglicherweise auch von Ecd. Zugleich stellt der RXR aber auch den zentralen Dimerisierungspartner für weitere Steroidhormonrezeptoren dar, insbesondere auch für die PPARs. So könnte der RXR einmal ein Bindeglied bei der Beeinflussung der Ecd- und VD-Wirkung durch das reichhaltige Futter darstellen. Eine mögliche Erklärung ist ein kompetitiver Wirkzusammenhang zwischen den beiden Steroiden, so dass VD und Ecd um gemeinsame Rezeptoren bzw. Dimerisierungspartner wie den RXR oder den VDR konkurrieren.

Eine weiterführende Erklärung für die uneinheitlichen Ergebnisse wäre, dass Ecd über eine Interaktion mit dem RXR eben nicht nur den VDR beeinflusst, sondern seine Wirkung über weitere, nukleare Steroidhormonrezeptoren herbeiführt. So wäre insbesondere im Hinblick auf die den Fettstoffwechsel hemmende Wirkung von Ecd eine bereits angesprochene, direkte Interaktion mit den PPARs denkbar.

Darüber hinaus wäre auch das Prinzip der selektiven Rezeptormodulation mit den sehr heterogenen, gewebsabhängigen Effekten von VD und Ecd in Betracht zu ziehen (Seidlová-Wuttke et al. 2003a). Denkbar wäre, dass der VDR und RXR lokalisationsabhängig verschieden starke Affinitäten zu den beiden Substraten haben. So konnte Ecd alleine eine deutliche, muskelanabole Wirkung zeigen. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von VD überwog jedoch die Affinität von VDR und RXR zu VD, und Ecd konnte über die notwendigen Rezeptoren seine Wirkung nicht mehr erbringen. Hingegen könnten entsprechende Rezeptoren im Fettgewebe sensibler für Ecd als für VD sein, so dass in beiden Ecd-Gruppen eine die Fettakkumulation hemmende Wirkung nachzuweisen war. Bezüglich des Knochens führte nur VD in Alleingabe im Vergleich zur Versuchsgruppe ovx, VD- zu einer leichten Verbesserung der ED. In der Kombination VD mit Ecd konnte dieser Effekt jedoch nicht mehr aufrechterhalten werden. Das Ausbleiben der kompensatorischen Vergrößerung des Knochendurchmessers ist ein vereinzelter Hinweis auf eine etwas bessere Knochenqualität in der Versuchsgruppe Ecd VD-. Dieser Effekt könnte neben einer direkten Wirkung von Ecd ebenso durch die Zunahme der Muskulatur sowie die bessere Fettstoffwechsellage dieser Tiere zu erklären sein, die sich in der Summe positiv auf die Knochenqualität ausgewirkt haben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich nicht lückenlos interpretieren. Insgesamt ist schwer abzugrenzen, welche Versuchsergebnisse allein auf die Wirkung von Ecd zurückzuführen sind, welche Veränderungen aus den Wechselwirkungen mit VD, dem VDR, dem RXR und den PPARs resultieren und an welchen Stellen das veränderte Futter und die metabolische Situation der Ratten beispielsweise durch lipotoxische Effekte intervenierend gewirkt haben. Somit könnte das Studiendesign dahingehend verändert werden, dass das Futter energie- und milchproteinärmer ist. Um einen nicht auszuschließenden Wirkzusammenhang von Ecd und VD näher zu untersuchen, könnte der Einsatz von mehr als zwei verschiedenen Dosen der beiden Testsubstanzen möglicherweise weitere Hinweise liefern. Jedoch bietet die Arbeit insbesondere Anlass zu Forschungsarbeiten hinsichtlich einer möglichen Wirkbeziehung von Ecd und den PPARs.

V. Zusammenfassung

Im Zuge des demographischen Wandels wird die Prävalenz der Osteoporose in den kommenden Jahren stetig ansteigen. Somit steht die Suche nach sinnvollen Präventionsmaßnahmen sowie nebenwirkungsarmen Therapiemöglichkeiten der Osteoporose im Fokus der Wissenschaft. Ecd galt in diesem Zusammenhang bislang als ein vielversprechender Wirkstoff. Umso überraschender war die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit sowohl Ecd als auch VD die erwarteten Wirkungen in den untersuchten Organsystemen nur sehr inhomogen und in einem viel geringeren Ausmaß zeigten. So führte Ecd in diesem Versuch weder mit noch ohne VD zu einer relevanten Verbesserung der BMD gegenüber den ovx Kontrollgruppen. Allenfalls in Tendenzen erbrachte Ecd ohne VD eine leichte Verbesserung der Knochenqualität.

Das kohlenhydrat- und kaseinreiche Futter und die daraus resultierende Stoffwechselsituation der Ratten müssen zu einem Überwiegen negativer Einflussfaktoren auf den Knochen geführt haben. Zu diesen zählen neben dem Östrogendefizit vermutlich ein proinflammatorisches Milieu sowie die Begünstigung der Differenzierung von knochenständigen MSC zu Adipozyten anstelle von Osteoblasten. Die Relevanz der einzelnen angesprochenen Mechanismen lässt sich aus den qCT- und Serumanalysen jedoch weder ableiten noch beweisen.

So lässt sich im Ergebnis kein einheitlicher Wirkmechanismus aus diesem Versuch ableiten. Konstatiert werden kann aber in jedem Fall, dass Ecd auch unabhängig von VD Wirkung erbringen kann und dass am ehesten keine synergistische Wirkbeziehung zwischen den beiden Steroiden besteht. Grundsätzlich ist die Hypothese, dass die Wirkung von Ecd auf einer Interaktion mit dem RXR oder dem VDR beruht, mit den Versuchsergebnissen vereinbar. Die These könnte jedoch dahin gehend erweitert werden, dass vermutlich auch weitere nukleare Steroidhormonrezeptoren wie die PPARs, die den RXR als Dimerisierungspartner teilen, in den Wirkmechanismus von Ecd involviert sein könnten. Es ist denkbar, dass die beiden Testsubstanzen Ecd

und VD mit den vermehrten Fettsäuren um den RXR als Dimerisierungspartner des PPAR γ sowie des VDR konkurriert haben und in diesem Rahmen verdrängt wurden.

Die aktuellen Versuchsergebnisse verdeutlichen die Verwobenheit und Komplexität der Faktoren, welche in der Summe zu einem osteoporotischen Umbau des Knochens führen. Insbesondere aber enttarnt sich in dieser Arbeit die Fettleibigkeit als wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung einer Osteoporose. Es erscheint somit umso wichtiger, bei der weiteren Erforschung und Therapie der Osteoporose auch einen Schwerpunkt auf die Identifikation, Prävention und Behandlung von Faktoren zu legen, die einen Knochenabbau begünstigen. Östrogenmangel, eine erhöhte Kalorienzufuhr und wenig Bewegung lassen die Prävalenz der krankhaften Adipositas in der Gesellschaft stark ansteigen. Die Versuchsergebnisse zeigen, dass Ecd durch diese Umstände maßgeblich in seiner osteoprotektiven Potenz beeinträchtigt wird. Um die dennoch auch in dieser Arbeit nachgewiesenen positiven Effekte, besonders im Hinblick auf den Fettstoffwechsel zu nutzen, könnte der Einsatz von Ecd als Nahrungsergänzungsmittel sinnvoll sein. Auf Grundlage der in diesem Versuch gewonnenen Erkenntnisse kann der therapeutische Einsatz von Ecd jedoch nicht als wirkungsvolle Präventionsmaßnahme der postmenopausalen Osteoporose betrachtet werden.

VI. Literaturverzeichnis

- Abou-Samra R, Keersmaekers L, Brienza D, Mukherjee R, Macé K (2011): Effect of different protein sources on satiation and short-term satiety when consumed as a starter. *Nutr J* 10, 139
- Aerssens J (1996): Effect of 1alpha-vitamin D3 and estrogen therapy on cortical bone mechanical properties in the ovariectomized rat model. *Endocrinology* 137, 1358–1364
- Akhmedov D, Berdeaux R (2013): The effects of obesity on skeletal muscle regeneration. *Front Physiol* 4, 371
- Armstrong RB, Phelps RO (1984): Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am J Anat* 171, 259–272
- Báthori M, Tóth N, Hunyadi A, Márki A, Zádor E (2008): Phytoecdysteroids and anabolic-androgenic steroids--structure and effects on humans. *Curr Med Chem* 15, 75–91
- Beral V (2003): Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362, 419–427
- Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B (2006): Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 84, 18–28
- Bocos C, Gottlicher M, Gearing K, Banner C, Enmark E, Teboul M, Crickmore A, Gustafsson JA (1995): Fatty acid activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). *J Steroid Biochem Mol Biol* 53, 467–473
- Boivin G, Farlay D, Bala Y, Doublier A, Meunier PJ, Delmas PD (2009): Influence of remodeling on the mineralization of bone tissue. *Osteoporos Int* 20, 1023–1026
- Braun T, Schett G (2012): Pathways for bone loss in inflammatory disease. *Curr Osteoporos Rep* 10, 101-8

- Broe KE, Chen TC, Weinberg J, Bischoff-Ferrari HA, Holick MF, Kiel DP (2007): A higher dose of vitamin d reduces the risk of falls in nursing home residents: a randomized, multiple-dose study. *J Am Geriatr Soc* 55, 234–239
- Brunader R, Shelton DK (2002): Radiologic bone assessment in the evaluation of osteoporosis. *Am fam Physician* 65, 1357–1364
- Cao JJ (2011): Effects of obesity on bone metabolism. *J of orthop Surg Res* 6, 30
- Carr MC (2003): The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2404-2411.
- Cesareo R, Napolitano C, Iozzino M (2010): Strontium ranelate in postmenopausal osteoporosis treatment: a critical appraisal. *Int J Womens Health* 9, 1-6
- Chang E, Kim Y (2016): Vitamin D decreases adipocyte lipid storage and increases NAD-SIRT1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Nutrition* 32, 702–708
- Chavassieux P, Seeman E, Delmas PD (2007): Insights into material and structural basis of bone fragility from diseases associated with fractures: how determinants of the biomechanical properties of bone are compromised by disease. *Endocrine reviews* 28, 151–164
- Consensus development conference (1993): diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 94, 646-650
- Dannenberg L (2013): Osteoporose – das Metabolische Syndrom des Knochens Wirkungen von Ecdyson und Vitamin D auf den postmenopausalen, osteoporotischen Knochen im Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom. Persönliche Mitteilung des Verfassers. Göttingen 2013
- Dempster DW, Birchman R, Xu R, Lindsay R, Shen V (1995): Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. *Bone* 16, 157–161
- Dinan L (2001): Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry* 57, 325–339
- Dinan L, Lafont R (2006): Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. *J Endocrinol* 191, 1–8
- Drake MT, Clarke BL, Khosla S (2008): Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clinic* 83, 1032–1045

Duque G, El Abdaimi K, Macoritto M, Miller MM, Kremer R (2002): Estrogens (E2) regulate expression and response of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in bone cells: changes with aging and hormone deprivation. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 446-54

DVO – Dachverband Osteoporose e.V. (2014): Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der OSTEOPOROSE bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen. http://www.dv-osteologie.org/dvo_leitlinien/osteoporose-leitlinie-2014, Zugriff am 09.01.2017

Ehrenborg E, Krook A (2009): Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Pharmacol Rev* 61, 373–393

Fielding RA, Vellas B, Evans WJ, Bhasin S, Morley JE, Newman AB, van Abellan Kan G, Andrieu S, Bauer J, Breuille D et al. (2011): Sarcopenia: An Undiagnosed Condition in Older Adults. Current Consensus Definition: Prevalence, Etiology, and Consequences. International Working Group on Sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc* 12, 249–256

Ford ES, Ajani UA, McGuire LC, Liu S (2005): Concentrations of Serum Vitamin D and the Metabolic Syndrome Among U.S. Adults. *Diabetes Care* 28, 1228–1230

Gao L, Cai G, Shi X (2008): Beta-ecdysterone induces osteogenic differentiation in mouse mesenchymal stem cells and relieves osteoporosis. *Biol Pharm Bull* 31, 2245–2249

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

Göttlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA (1992): Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 4653–4657

Grygiel-Gómiak B (2014) Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review *Nutr J* 13, 17

- Harris KB, Nealy KL, Jackson DJ, Thornton PL (2012): The clinical use of denosumab for the management of low bone mineral density in postmenopausal women. *J Pharm Pract* 25, 310–318
- Häussler B, Gothe H, Göl D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D (2007): Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany-the BoneEVA Study. *Osteoporos Int* 18, 77–84
- Hofbauer LC, Schoppet M (2004): Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 292, 490–495
- Holick MF (2007): Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357, 266–281
- Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS, Tung L. (1996): Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol* 10, 1167-77
- Jelinsky SA, Choe SE, Crabtree JS, Cotreau MM, Wilson E, Saraf K, Dorner AJ, Brown EL, Peano BJ, Zhang X et al. (2008): Molecular analysis of the vaginal response to estrogens in the ovariectomized rat and postmenopausal woman. *BMC Med Genomics* 1, 27
- Jian C, Liu X, Hu J, Li C, Zhang G, Li Y, Zhu J, Tan Y (2013): 20-Hydroxyecdysone-induced bone morphogenetic protein-2-dependent osteogenic differentiation through the ERK pathway in human periodontal ligament stem cells. *Eur J Pharmacol* 698, 48–56
- Jilka RL (2003): Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *J Med Paediatr Oncol* 41, 182–185
- Jurutka PW, Bartik L, Whitfield GK, Mathern DR, Barthel TK, Gurevich M, Hsieh J, Kaczmarska M, Haussler CA, Haussler MR (2007): Vitamin D Receptor: Key Roles in Bone Mineral Pathophysiology, Molecular Mechanism of Action, and Novel Nutritional Ligands. *J Bone Miner Res* 22, V2-V10
- Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15, 175–191
- Kanis JA (2002): Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet* 359, 1929–1936

- Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster J, Borgstrom F, Rizzoli R (2008): European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 19, 399–428
- Kapur P, Jarry H, Wuttke W, Pereira BMJ, Seidlová-Wuttke D (2008): Evaluation of the antiosteoporotic potential of *Tinospora cordifolia* in female rats. *Maturitas* 59, 329–338
- Kapur P, Wuttke W, Jarry H, Seidlová-Wuttke D (2010): Beneficial effects of beta-Ecdysone on the joint, epiphyseal cartilage tissue and trabecular bone in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17, 350–355
- Kaastad TS, Reikerås O, Halvorsen V, Falch JA, Obrant KJ, Nordsletten L (2001): Vitamin D deficiency and ovariectomy reduced the strength of the femoral neck in rats. *Calcif Tissue Int* 69, 102-8
- Ke HZ, Jee WS, Zeng QQ, Li M, Lin BY (1993): Prostaglandin E2 increased rat cortical bone mass when administered immediately following ovariectomy. *Bone Miner* 21, 189–201
- Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ (2008): Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease. *Endocr Rev* 29, 155–192
- Khosla S, Melton LJ, Riggs BL (2011): The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: Is a revision needed? *J Bone Miner Res* 26, 441–451
- Kong J (2006): Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Pathol* 290, E916
- Lafont R, Dinan L (2003): Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J Insect Sci* 3, 7
- Lane NE (2006): Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol* 194, S3-11

- Laß L. (2011): Antiosteoporotische Prinzipien in *Cimicifuga racemosa* BNO 1055/C001 und ihren Fraktionen, Persönliche Mitteilung der Verfasserin Göttingen 2011
- Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA (2008): The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 58, 424–430
- Lems WF, den Heijer M (2013): Established and forthcoming drugs for the treatment of osteoporosis. *Neth J Med.* 71, 188-93
- Li Y, Toraldo G, Li A, Yang X, Zhang H, Qian W, Weitzmann MN (2007): B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood* 109, 3839–3848
- Lieben L, Carmeliet G (2012): Vitamin D signaling in osteocytes: Effects on bone and mineral homeostasis. *Bone* 54, 237-43
- Liel Y, Ulmer E, Shary J, Hollis BW, Bell NH (1988): Low circulating vitamin D in obesity. *Calcif Tissue Int* 43, 199–201
- Lips P (2006): Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 92, 4-8
- Lowe DA, Baltgalvis KA, Greising SM (2010): Mechanisms behind estrogen's beneficial effect on muscle strength in females. *Exerc Sport Sci Rev* 38, 61–67
- Lupien PJ, Hinse C, Chaudhary KD (1969): Ecdysone as a hypocholesterolemic agent. *Arch Int Physiol Biochim* 77, 206–212
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P et al. (1995): The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835–839
- Manolagas SC (2000): Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21, 115–137
- Manolagas SC, Jilka RL (1995): Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 332, 305–311

Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL (2002): Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 57, 385–409

McCormick KM, Burns KL, Piccone CM, Gosselin LE, Brazeau GA (2004): Effects of ovariectomy and estrogen on skeletal muscle function in growing rats. *J Muscle Res Cell Motil* 25, 21–27

Meyer MB (2005): The Human Transient Receptor Potential Vanilloid Type 6 Distal Promoter Contains Multiple Vitamin D Receptor Binding Sites that Mediate Activation by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Intestinal Cells. *Mol Endocrinol* 20, 1447–1461

Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S et al. (2006): International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacol Rev* 58, 726–741

Miller SC, Bowman BM, Miller MA, Bagi CM (1991): Calcium absorption and osseous organ-, tissue-, and envelope-specific changes following ovariectomy in rats. *Bone* 12, 439–446

Narkar VA, Downes M, Yu RT, Emblar E, Wang Y-X, Banayo E, Mihaylova MM, Nelson MC, Zou Y, Juguilon H, Kang H, Shaw R, Evans RM (2008): AMPK and PPAR δ agonists are exercise mimetics. *Cell* 134, 404-415

Owens W, Koëter HBWM (2003): The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: an overview. *Environ Health Perspect* 111, 1527–1529

Pathak K, Soares MJ, Calton EK, Zhao Y, Hallett J (2014): Vitamin D supplementation and body weight status: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Obes Rev* 15, 528-537

Pollock NK, Bernard PJ, Wenger K, Misra S, Gower BA, Allison JD, Zhu H, Davis CL (2010): Lower bone mass in prepubertal overweight children with prediabetes. *J Bone Miner Res* 25, 2760–2769

Rachoń D, Vortherms T, Seidlová-Wuttke D, Wuttke W (2008): Effects of black cohosh extract on body weight gain, intra-abdominal fat accumulation, plasma lipids and glucose tolerance in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Maturitas* 60, 209-15

- Riggs BL (2002): Endocrine causes of age-related bone loss and osteoporosis. *Novartis Found Symp* 242, 247-59; discussion 260-4
- Riggs BL, Melton LJ, Robb RA, Camp JJ, Atkinson EJ, McDaniel L, Amin S, Rouleau PA, Khosla S (2008): A population-based assessment of rates of bone loss at multiple skeletal sites: evidence for substantial trabecular bone loss in young adult women and men. *J Bone Miner Res* 23, 205–214
- Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, Heymsfield SB, Gallagher D, Chu F, Leibel RL (1996): Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 3424–3427
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SAA, Howard BV, Johnson KC et al. (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288, 321–333
- Russell M, Mendes N, Miller KK, Rosen CJ, Lee H, Klibanski A, Misra M (2010): Visceral fat is a negative predictor of bone density measures in obese adolescent girls. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 1247-55
- Sato Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K (2005): Low-dose vitamin D prevents muscular atrophy and reduces falls and hip fractures in women after stroke: a randomized controlled trial *Cerebrovasc Dis* 20, 187–192
- Schaffler MB, Cheung W-Y, Kennedy O (2014): Osteocytes: master orchestrators of bone *Calcif Tissue Int* 94: 5–24
- Schrager MA, Metter EJ, Simonsick E, Ble A, Bandinelli S, Lauretani F, Ferrucci L (2007): Sarcopenic obesity and inflammation in the InCHIANTI study. *J. Appl. Physiol.* 102, 919–925
- Schulling KD, Robinia K, Nye R (2011): Osteoporosis update. *J Midwifery Womens Health* 56, 615–627
- Seeman E (2007): Is a change in bone mineral density a sensitive and specific surrogate of anti-fracture efficacy? *Bone* 41, 308–317

Seeman E, Delmas PD (2006): Bone quality-the material and structural basis of bone strength and fragility. *The New England Journal of Medicine* 354, 2250–2261

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

Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Becker T, Christoffel V, Wuttke W (2003b): Pharmacology of *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. *Maturitas* 44, S39-50

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

Seidlová-Wuttke D, Prella K, Fritzemeier K, Wuttke W (2008b): Effects of estrogen receptor alpha- and beta-selective substances in the metaphysis of the tibia and on serum parameters of bone and fat tissue metabolism of ovariectomized rats. *Bone* 43, 849–855

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

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

Shen W, Chen J, Punyanitya M, Shapses S, Heshka S, Heymsfield SB (2007): MRI-measured bone marrow adipose tissue is inversely related to DXA-measured bone mineral in Caucasian women. *Osteoporos Int* 18, 641–647

Sheu Y, Cauley JA (2011): The role of bone marrow and visceral fat on bone metabolism. *Curr Osteoporos Rep* 9, 67–75

Shiraishi A, Takeda S, Masaki T, Higuchi Y, Uchiyama Y, Kubodera N, Sato K, Ikeda K, Nakamura T, Matsumoto T et al. (2000): Alfacalcidol inhibits bone resorption and stimulates formation in an ovariectomized rat model of osteoporosis: distinct actions from estrogen. *J Bone Miner Res* 15, 770–779

Silva I, Branco JC (2011): Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta Reumatol Port* 36, 209–218

Sirola J, Kröger H (2011): Similarities in acquired factors related to postmenopausal osteoporosis and sarcopenia. *J Osteoporos* 2011, 536735

Soares MJ, Murhadi LL, Kurpad AV, Chan She Ping-Delfos WL, Piers LS (2012): Mechanistic roles for calcium and vitamin D in the regulation of body weight. *Obes Rev* 13, 592-605

Sornay-Rendu E, Munoz F, Garnero P, Duboeuf F, Delmas PD (2005): Identification of osteopenic women at high risk of fracture: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 20, 1813–1819

Suda T, Ueno Y, Fujii K, Shinki T (2003): Vitamin D and bone. *J Cell Biochem* 88, 259–266

Szulc P, Delmas PD (2008): Biochemical markers of bone turnover: potential use in the investigation and management of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 19, 1683-704

Syed FA, Oursler MJ, Hefferanm TE, Peterson JM, Riggs BL, Khosla S (2008): Effects of estrogen therapy on bone marrow adipocytes in postmenopausal osteoporotic women. *Osteoporos Int* 19, 1323–1330

Syrov VN, Nabiev AN, Sultanov MB (1986): Action of phytoecdysteroids on the bile-secretory function of the normal liver and in experimental hepatitis. *Farmakol Toksikol* 49, 100–103

Tóth N (2010): Ecdysteroid profile of *Silene viridiflora* and the effect of 20-hydroxyecdysone on rat muscle fibres in vivo. Ph D Thesis. http://doktori.bibl.u-szeged.hu/573/1/Thesis_Noemi_Toht_jav.pdf (Zugriff am 09.01.2017)

Tóth N, Szabó A, Kacsala P, Héger J, Zádor E (2008): 20-Hydroxyecdysone increases fiber size in a muscle-specific fashion in rat. *Phytomedicine* 15, 691–698

Tóth N, Hunyadi A, Báthori M, Zádor E (2010): Phytoecdysteroids and vitamin D analogues--similarities in structure and mode of action. *Curr Med Chem* 17, 1974–1994

- Turner RT, Vandersteenhoven JJ, Bell NH (1987): The effects of ovariectomy and 17 beta-estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. *J Bone Miner Res* 2, 115–122
- Valenti MT, Garbin U, Pasini A, Zanatta M, Stranieri C, Manfro S, Zucal C, Dalle Carbonare L (2011): Role of ox-PAPCs in the differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) and Runx2 and PPAR γ 2 expression in MSCs-like of osteoporotic patients. *PLoS ONE* 6, e20363
- Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garnero P, Griesmacher A, McClung M, Morris HA, Silverman S, Trenti T et al. (2011): Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int* 22, 391–420
- Verma S, Rajaratnam JH, Denton J, Hoyland JA, Byers RJ (2002): Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. *J Clin Pathol* 55, 693–698
- Wacker M, Holick MF (2013): Vitamin D - effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. *Nutrients* 5, 111–148
- Wend K, Wend P, Krum SA (2012): Tissue-Specific Effects of Loss of Estrogen during Menopause and Aging. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3, 19
- Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M (1989): Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 45, 360–366
- Yamasaki K, Takeyoshi M, Yakabe Y, Sawaki M, Imatanaka N, Takatsuki M (2002): Comparison of reporter gene assay and immature rat uterotrophic assay of twenty-three chemicals. *Toxicology* 170, 21–30
- Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM (1993): Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* 366, 476–479
- Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD (1990): The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345, 442–444

Zhao L, Jiang H, Papasian CJ, Maulik D, Drees B, Hamilton J, Deng H (2008): Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 23, 17–2

VII. Anhang

Zusammensetzung des Basisfuttermittels mit normalem Vitamin-D3-Anteil

Rohnährstoffe	[Prozent]	Mineralstoffe	[Prozent]
Trockensubstanz	95,2	Kalzium	0,9
Rohprotein	20,8	Phosphor	0,63
Rohfett	4,2	Natrium	0,19
Rohfaser	5	Magnesium	0,21
Rohasche	5,6	Kalium	0,97
N-freie Extraktstoffe	59,4		
Stärke	46,8	Energie	[MJ/kg]
Zucker	10,8	Bruttoenergie	18

Vitamine	per kg	Spurenelemente	per kg
Vitamin A	15.000 IE	Eisen	166 mg
Vitamin D3	1.500 IE	Mangan	98 mg
Vitamin E	150 mg	Zink	65 mg
Vitamin K	20 mg	Kupfer	14 mg
Vitamin C	30 mg	Iod	1,2 mg
Thiamin (B1)	16 mg	Selen	0,14 ng
Riboflavin (B2)	16 mg	Cobalt	0,15 mg
Pyridoxin (B6)	18 mg		
Cobalamin (B12)	30 µg	Aminosäuren	[Prozent]
Nicotinsäure	49 mg	Lysin	1,71
Pantothensäure	56 mg	Methionin	0,73
Folsäure	19 mg	Met+Cys	0,82
Biotin	310 µg	Threonin	0,93
Cholin-Cl	1.040 mg	Tryptophan	0,27
Inositol	80 mg	Arginin	0,76
		Histidin	0,66
Fettsäuren	[Prozent]	Valin	1,42
C 14:0	0,02	Isoleucin	1,09
C 16:0	0,45	Leucin	2,05
C 16:1	0,02	Phenylalanin	1,11
C 18:0	0,19	Phe+Tyr	2,22
C 18:1	1,07	Glycin	0,43
C 18:2	2,12	Glutaminsäure	4,69
C 18:3	0,26	Asparaginsäure	1,55
C 20:0	0,02	Prolin	2,39
		Alanin	0,68
		Serin	1,24

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

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

Zusammensetzung des in Vorversuchen genutzten Basisfutter mit normalem VD Gehalt

Rohnährstoffe	[Prozent]	Mineralstoffe	[Prozent]
Trockensubstanz	88,2	Kalzium	1,0
Rohprotein	21,7	Phosphor	0,7
Rohfett	4,3	Natrium	0,19
Rohfaser	4,2	Magnesium	0,20
Rohasche	6,1	Kalium	0,67
N-freie Extraktstoffe	52,2		
Stärke	34,0	Energie	[MJ/kg]
Zucker	3,0	Bruttoenergie	16,8
Vitamine	per kg	Spurenelemente	per kg
Vitamin A	15.000 IE	Eisen	169 mg
Vitamin D3	1.000 IE	Mangan	78 mg
Vitamin E	115 mg	Zink	101 mg
Vitamin K	5 mg	Kupfer	14 mg
Thiamin (B1)	18 mg	Iod	2,2 mg
Riboflavin (B2)	22 mg	Selen	0,4 mg
Pyridoxin (B6)	20 mg	Cobalt	2,2 mg
Cobalamin (B12)	100 µg		
Nicotinsäure	120 mg	Aminosäuren	[Prozent]
Pantothensäure	40 mg	Lysin	1,22
Folsäure	7 mg	Methionin	0,44
Biotin	460 µg	Met+Cys	0,83
Cholin-Cl	2.380 mg	Threonin	0,97
Inositol	100 mg	Tryptophan	0,28
		Arginin	1,13
		Histidin	0,51
Fettsäuren	[Prozent]	Valin	1,25
C 14:0	0,01	Isoleucin	1,03
C 16:0	0,56	Leucin	1,95
C 16:1	0,01	Phenylalanin	1,21
C 18:0	0,08	Phe+Tyr	2,20
C 18:1	0,82	Glycin	1,05
C 18:2	2,26	Glutaminsäure	3,95
C 18:3	0,22	Asparaginsäure	2,18
C 20:0	0,01	Prolin	1,53
		Alanin	1,26
		Serin	1,17

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:		
Verteilung der BMD gesunder Frauen zwischen dem 30.-40. Lebensjahr		8
Abbildung 2:		
Der Wirkmechanismus von RANK, RANKL, OPG		12
Abbildung 3:		
Differenzierungsmöglichkeiten mesenchymaler Stammzellen		20
Abbildung 4:		
Struktur eines typischen Ecdysteroids (20-Oh-Ecdyson) mit Nummerierung der Kohlenstoffatome		25
Abbildung 5:		
Übersichtsaufnahme und Schnittbild einer qCT-Aufnahme der Tibia mit paratibialem Fettdepot (Seidlová-Wuttke et al. 2010b), mit freundlicher Genehmigung der Autorin		31
Abbildung 6:		36
Knochengeometrische Parameter		
Abbildung 7:		
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD auf: Das Körpergewicht		39
Abbildung 8:		
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD auf: Die tägliche Futtermittelaufnahme		40
		83

Abbildung 9:		
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD:		41
Die endostale Dichte der metaphysalen Tibia		
Abbildung 10:		
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD auf:		42
Die endostale Fläche der metaphysalen Tibia		
Abbildung 11:		
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD auf:		43
Die kortikale Dichte der Diaphyse der Tibia		
Abbildung 12:		
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD:		44
Die kortikale Fläche der Diaphyse der Tibia		
Abbildung 13:		
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD auf:		45
Die endostale Zirkumferenz der Diaphyse der Tibia		
Abbildung 14:		
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD auf:		46
Die periostale Zirkumferenz der Diaphyse der Tibia		
Abbildung 15:		
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD auf:		47
Osteokalzin im Serum		
Abbildung 16:		
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD auf:		48
Crosslaps im Serum		

Abbildung 17:	
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD auf:	49
Die Muskelfläche auf Höhe der Metaphyse der Tibia	
Abbildung 18:	
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD auf:	50
Die Röntgengichte der Muskulatur	
Abbildung 19:	
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD auf:	51
Die Fläche des paratibialen Fettgewebes	
Abbildung 20:	
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD auf:	52
Leptin im Serum	
Abbildung 21:	
Der Effekt von Ecd und E2, mit und ohne VD auf:	53
Cholesterin im Serum	
Abbildung 22:	
Mögliche pathophysiologische Wirkzusammenhänge bei der	61
Entwicklung einer Osteoporose im aktuellen Versuch	

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:		
	WHO-Diagnosekriterien für Osteopenie und Osteoporose, basierend auf dem T-Score	8
Tabelle 2:		
	Definition der Osteoporose der Ratte anhand des T-Scores.	16
Tabelle 3:		
	Die Futtergruppen	34
Tabelle 4:		
	Erhobene Parameter	36
Tabelle 5:		
	Signifikanzlegende	38

Danksagung

Ich bedanke mich zunächst bei der Abteilung für experimentelle Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen für die Möglichkeit, eine experimentelle Doktorarbeit durchführen zu können und dabei das wissenschaftliche Arbeiten zu lernen. Besonderer Dank gilt Frau Priv.- Doz. Dr. med. D. Seidlová-Wuttke und den medizinisch-technischen Assistentinnen für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie Frau Priv.- Doz. Dr. med. D. Seidlová-Wuttke und Herrn Prof. Dr. med. W. Wuttke für die anschließende Betreuung beim Verfassen der Arbeit.