

2. Literaturübersicht

Die im weiteren Verlauf der Literaturübersicht besprochenen Themen werden vor dem Hintergrund dieser Arbeit in erster Linie am Beispiel des Menschen erläutert. Im Kapitel 2.6. wird auf die Besonderheiten der Ratte als Modell in der Osteoporoseforschung eingegangen.

2.1. Der Knochen

2.1.1. Aufbau und Funktion des Knochens

Der Knochen gehört zum geformten Stützgewebe des Wirbeltierkörpers und geht sowohl onto- als auch phylogenetisch aus dem Bindegewebe hervor. Gemeinsam mit dem Zahnschmelz und dem Zahnbein gehört der Knochen zu den härtesten Substanzen des Körpers. Obwohl starr, wenig elastisch und kaum verformbar, paßt er sich langfristig veränderten statischen Bedingungen durch Umbau an. Zu seinen Funktionen zählt die mechanische Umsetzung der Bewegung, die Stützung (z. B. Rippen) und der Schutz (z. B. Schädelknochen) verschiedener Organe. Eine weitere Funktion des Knochens ist die des Stoffwechseldepots. Die mineralisierte Knochenmatrix dient dabei als Speicherorgan für verschiedene Ionen insbesondere für Kalzium und Phosphor.

Der ausdifferenzierte Knochen besteht aus Zellen und extrazellulärer Matrix. Letztere enthält 65 % anorganische und 35 % organische Bestandteile in der Trockensubstanz. Die anorganische Grundsubstanz besteht hauptsächlich aus Kalziumphosphat, das in Form von Hydroxylapatitkristallen vorliegt. Etwa 90 % des organischen Anteils ist Kollagen Typ I sowie geringe Mengen von Typ III, V und XI. Zu den ca. 10 % nichtkollagenen Proteinen gehören u. a. Syntheseprodukte von Osteoblasten wie Proteoglykane, Glykoproteine, Proteolipide sowie in geringen Mengen auch Plasmaproteine (Albumin), Wachstumsfaktoren und Enzyme (Martin et al. 1988).

Knochen werden aufgrund ihrer Genese unterschieden. Lange Röhrenknochen wie Femur und Tibia, irreguläre Knochen (Wirbel) und kurze Knochen (Hand- und Fußwurzelknochen) entstehen durch enchondrale (indirekte) Ossifikation. Ein primär embryonal angelegtes Knorpelskelett wird bei dieser Entstehungsform durch Knochen ersetzt. Platte Knochen (z.B. Schädelknochen, Schultergürtel) werden durch desmale Ossifikation gebildet, wobei das Knochengewebe direkt aus mesenchyalem Bindegewebe entsteht.

Die meisten Knochen bestehen aus einer äußeren Kompakta oder Kortikalis und einer inneren Spongiosa. Die Kortikalis umschließt die Spongiosa und bildet eine feste äußere Schale, während die Spongiosa, als trabekuläres Maschenwerk trajektorieell nach Druck und Zugbelastungen ausgerichtet ist und damit die innere Festigkeit gewährleistet.

2.1.2. Knochenzellen

Zu den Aufgaben der Knochenzellen gehört die Bildung, der Erhalt und der Umbau des Knochengewebes. Es werden Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten und Knochenbelegzellen (sogenannte *bone lining cells*) unterschieden.

Osteoblasten sind Knochenmatrix synthetisierende Zellen und leiten sich von pluripotenten mesenchymalen Stammzellen ab (Owen 1985, Aubin & Turksen 1996). In aktivem Zustand sind sie kubisch oder hochprismatisch. Das basophile Zytoplasma ist ein Ausdruck für die Ausdehnung des rauhen endoplasmatischen Retikulums und damit auch für die hohe Syntheseleistung dieses Zelltyps. Das Hauptsyntheseprodukt ist das Osteoid, welches sich hauptsächlich aus Kollagen Typ I sowie einer Reihe nicht kollagener Matrixproteine, zu denen auch das Osteocalcin gehört, zusammensetzt.

Osteozyten sind während des Knochenaufbaus in der Knochenmatrix eingeschlossene Osteoblasten, welche über Zytoplasmafortsätze miteinander in Verbindung stehen (Baron et al. 1984, Parfitt 1984b).

Knochenbelegzellen (*bone lining cells*) sind flache, zytoplasmaarme Zellen, die ruhend Knochenoberflächen bedecken. Sie werden auch als ruhende Osteoblasten bezeichnet (Bowman & Miller 1986, Martin et al. 1987).

Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen, die reich an Lysosomen und Mitochondrien, auf der Knochenoberfläche lokalisiert sind und mineralisierten Knochen resorbieren. Ein typisches Merkmal aktiver Osteoklasten ist die zur resorbierenden Knochensubstanz gewandte büstensaumartige Oberfläche, auch "ruffled border" genannt. Osteoklasten leiten sich von monozytisch phagozytierenden Stammzellen ab (Quinn et al. 1998). Durch Fusion von Präosteoklasten entstehen reife Osteoklasten (Suda et al. 1986, Martin et al. 1988, Hattersley et al. 1991).

2.1.3. Wachstum, Modeling und Remodeling

Das Skelett ist einem ständigem Umbau begriffen. Der Knochen kann deshalb nicht als statisch betrachtet werden, sondern als dynamisches Gewebe.

Frost (1983) definierte die Begriffe „Wachstum“, „Modeling“ und „Remodeling“, um die Auf- und Umbauvorgänge am Knochen zu beschreiben. Das von offenen Epiphysenfugen ausgehende Längenwachstum des Knochens bezeichnet er allgemein als Wachstum. Modeling ist der Prozeß, der zur Ausbildung der typischen Knochenform führt und vorwiegend an periostalen und kortikoendostalen Knochenoberflächen stattfindet. Hier können Knochenformation und -resorption räumlich und zeitlich getrennt zu finden sein. Remodeling ist ein lebenslänglicher Umbauvorgang, bei dem Knochenformation und -resorption gekoppelt stattfinden. Er stellt die lebenslange Erneuerung von trabekulärem und kortikalem Knochen dar, welches schon im Kindesalter beginnt. Wachstum und Modeling bestimmen den Knochenstoffwechsel des heranwachsenden Menschen. Die Geschwindigkeit des Modelings ist höher als die des Remodelings mit der Folge eines Anstiegs der Nettoknochenmasse. Im adulten Menschen herrscht ausschließlich das Remodeling vor. Bei jungen Erwachsenen gleicht in jedem Remodeling-Zyklus die Menge an neugebildetem Knochen der abgebauten Menge. Dieser Vorgang gewährleistet die mechanische Integrität des Skeletts über Jahre. Im Alter kommt es zur Störung des Gleichgewichtes zwischen Formation und Resorption mit einem Überwiegen der Resorption und zu einem Knochenmassennettverlust in jedem Remodeling Zyklus (Frost 1976).

2.2. Die Rolle von 17- β -Östradiol im Knochenstoffwechsel

Regulatoren des Knochenstoffwechsels werden unterteilt in mechanische, systemische (Östrogen, Calcitonin, Parathormon, 1,25-Dihydroxivitamin-D₃ u.a.) und lokale Faktoren (Cytokine, Prostaglandine u.a.). Ein wesentlicher Faktor ist das Ovarhormon 17- β -Östradiol. Allgemein bekannt ist, daß einen Östrogenmangel, z. B. durch Ovariectomie oder GnRH-Agonisten verursacht, sich in einem progressiven Knochenverlust auswirkt. Östrogene blockieren die Aktivierung des Knochenstoffwechsels und den Knochenverlust (Turner et al. 1994, Wang et al. 2000). Kürzlich konnten Zittermann et al. (2000) bei zyklischen jungen Frauen den Zusammenhang physiologisch zirkulierender Serumöstradiolspiegel mit den monatlichen Schwankungen der biochemischen Marker der Knochenresorption darstellen.

Die Mechanismen der Östrogenwirkung sind noch nicht vollständig geklärt. Erricksen et al. (1988) konnten in Zellen der osteoblastären Reihe Estrogenrezeptoren hoher Bindungsaffinität finden und sie damit als Zielzellen der Östrogene kennzeichnen. Eine rezeptorabhängige Wirkung des 17- β -Östradiols auf die intestinale Kalziumresorption

wurde von Arjmandi et al. (1993) und Thomas et al. (1993) beschrieben. Jedoch war es nicht möglich, einen direkten Östrogeneffekt auf die Osteoblastenproliferation und – differenzierung darzustellen. Es wurde vermutet, daß Östrogene indirekt über Hemmung oder Verstärkung der Produktion von Cytokinen, welche die Knochenresorption beeinflussen, entweder durch direkte Wirkung auf die Osteoklasten oder indirekt durch Beeinflussung der Rekrutierung von osteoklastären Vorläuferzellen wirken. Mögliche Mediatoren für einen indirekten Östrogeneffekt waren unter anderem IL-1 und IL-6, zwei Cytokine mit potentem stimulierenden Effekt auf die Knochenresorption. Jilka et al. (1992) konnten zeigen, daß Östrogene die IL-6-Synthese in Osteoblasten und anderen im Knochenmark vorkommenden Zellen hemmen. Riggs & Spelsberg (1993) demonstrierten in osteoblastären Zellkulturen eine östrogeninduzierte Verstärkung der Sekretion von TNF- β , einem Faktor der inhibitorisch auf die Knochenresorption wirkt. Mittlerweile wurde nachgewiesen, das TNF- α und IL-1, welche beide die Knochenresorption stimulieren, den ersten Schritt zum Knochenverlust durch Östrogenmangel induzieren (Manolagas & Jilka 1995, Jilka 1998).

2.3. Peak bone mass

Die Knochenmasse eines Menschen steigt während der Kindheit und Jugend linear an, erreicht im dritten Lebensjahrzehnt den Höhepunkt und verringert sich danach wieder (Malluche et al. 1986, Cromer et al. 1996). Speziell bei der Frau stellt sich dieser allgemeine Knochenverlust nach der Menopause beschleunigt ein (Nordin et al. 1966, Gallagher et al. 1987, Nilas & Christiansen 1988).

Die maximal zu erreichende Knochenmasse wird auch als *peak bone mass* bezeichnet. Bonjour et al. (1994) definierte die *peak bone mass* als die Menge an Knochengewebe, welche am Ende der skelettalen Ausreifung vorhanden ist. Die *peak bone mass* und die Geschwindigkeit des nachfolgenden Knochenverlustes charakterisieren hauptsächlich die Anfälligkeit einer Frau an einer postmenopausalen Osteoporose zu erkranken (Rodan et al. 1996). Die Faktoren, die die *peak bone mass* beeinflussen, sind auch als Risikofaktoren für eine postmenopausale Osteoporose gültig. Zu diesen Faktoren zählen Rasse, genetische Veranlagung, Ernährung, Hormonspiegel, Aktivität, Gewicht, Drogenmissbrauch oder Krankheiten. Zu den bedeutendsten Faktoren zählt der Geschlechtshormonstatus (Rizzoli & Bonjour 1999).

2.4. Osteopenie und Osteoporose

Osteoporose ist die häufigste Knochenerkrankung des Menschen. Nach der Definition von Frost & Jee (1976) ist Osteoporose eine Erkrankung, die im Zusammenhang mit einer Osteopenie zu klinischen Symptomen, wie einer erhöhten Knochenbrüchigkeit führt und bei normaler physischer Aktivität Knochenschmerzen verursacht. In diesem Zusammenhang definierten obige Autoren auch den Begriff der Osteopenie. Osteopenisch ist ein Knochen oder ein Skelett mit weniger als normaler Knochendichte. Dieser Zustand allein ist aber nicht als Erkrankung zu werten.

1994 wurde auf der CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE (Anonymus 1994) versucht, die Definition der Osteoporose zu aktualisieren und weltweit zu standardisieren. Osteoporose ist demnach eine systemische Knochenerkrankung, die durch eine Verminderung der Knochenmasse die Mikroarchitektur des Knochengewebes negativ beeinflusst und damit zu einem Anstieg der Knochenbrüchigkeit und zur Anfälligkeit für Frakturen führt.

Osteoporose wird in primäre und in sekundäre Formen unterteilt. Im Rahmen dieser Arbeit wird speziell nur auf die humane postmenopausale Osteoporose, die zu den primären (idiopathischen) Formen zählt, eingegangen. Ätiologie und Pathogenese dieser Knochenerkrankung, unter der vor allem Frauen zwischen fünfzig und fünfundsiebzig Jahren leiden, sind noch nicht eindeutig geklärt. Als wesentliche Ursache des postmenopausalen Knochenverlustes gilt die Funktionseinstellung des Ovars im Klimakterium (Lindsay 1988). Der zu diesem Zeitpunkt beginnende und sich postmenopausal verstärkende Östrogenmangel hat einen erhöhten Knochenstoffwechsel mit einem Ungleichgewicht zwischen Formation und Resorption zur Folge, aus der ein fortschreitender Knochenverlust resultiert (Ivey & Baylink 1981). Die Höhe der Östradiolserumkonzentration beeinflusst dabei die Geschwindigkeit des Knochenverlustes (Riis et al. 1985, 1986).

Der postmenopausale Mangel an Ovarhormonen führt in jedem Fall zur Osteopenie, doch nicht unbedingt zur Osteoporose. Weitere Risikofaktoren, die die Entstehung einer postmenopausalen Osteoporose begünstigen, sind eine geringe *peak bone mass*, die genetische Prädisposition, die ethnische Herkunft (farbige Frauen leiden deutlich weniger an Osteoporose), geringe körperliche Aktivität, exzessive Schlankheit, Sexualhormonmangel, geringe Kalzium- und Vitamin D-Aufnahme, sowie Genußmittel wie Alkohol, Nikotin und Koffein (Daniell 1976, Heaney 1996).

Prophylaxe und Therapie der postmenopausalen Osteoporose sollten aus einer Überprüfung der Lebens- und Ernährungsgewohnheiten bestehen. Neben Vitamin D3-

Derivaten, Calcitoninen u. a. hat sich vor allem die Östrogensubstitution erfolgreich durchgesetzt.

2.5. Hormonale Kontrazeptiva

In den meisten hormonalen Kontrazeptiva sind ein Östrogen und ein Gestagen kombiniert (Kombinationspräparate, abgestufte Kombinationspräparate und Sequenzpräparate), einige Präparate enthalten nur eine gestagene Komponente (Depotpräparate, Minipille). Eine weitere Unterteilung erfolgt noch aufgrund der Fähigkeit zur Ovulationshemmung. Im folgenden wird nur noch auf die Ovulationshemmer eingegangen, da durch sie über Störung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse eine dauerhafte Absenkung der endogenen Ovarhormone erfolgt (Taubert & Kuhl 1995).

Zur am häufigsten oral angewendeten Gruppe zählen die Kombinationspräparate. Sie enthalten pro Tablette 20-50 µg Ethinylöstradiol bzw. eine entsprechende Menge Mestranol sowie unterschiedliche Dosierungen synthetischer Gestagene. Anhand der Dosierung der östrogenen Komponente werden die Ovulationshemmer wiederum in niedrigdosierte (<35 µg EE) und in hochdosierte Präparate (50 µg EE) eingeteilt.

Die wichtigsten Eigenschaften der Gestagene bei der Kontrazeption sind ihr antiovulatorischer und antiöstrogener Effekt. Die in hormonalen Kontrazeptiva enthaltenen Gestagene lassen sich nach Struktur und Metabolismus in zwei Gruppen einteilen: 1. Progesteronderivate und 2. Nortestosteronderivate. Die Nortestosteronderivate werden wiederum noch einmal unterteilt in die sogenannten Estrane und Gonane. Zu den Progesteronderivaten zählen Chlormadinonacetat, Cyproteronacetat, Medroxyprogesteronacetat. Zu den Estranen zählen Norethisteron und Gestagene, z.B. Lynestrenol, die sich im Organismus zu Norethisteronacetat metabolisieren lassen. Zu den Gonanen zählen u.a. Levonorgestrel, Desogestrel, Promegeston.

Wie bei allen Steroidhormonen werden die meisten Wirkungen der Gestagene durch die Bindung an bestimmte Rezeptoren vermittelt. Die Tatsache, daß die Gene der Progesteron-, Androgen-, Glucocortikoid- und Mineralocortikoidrezeptoren große Ähnlichkeiten in ihrer Sequenz aufweisen, erklärt das vielfältige Wirkungsspektrum der Gestagene. Die Strukturdomänen der betreffenden Rezeptoren weisen große Homologien auf, so daß die Gestagene nicht nur an den Progesteronrezeptor sondern auch entsprechend ihrer chemischen Struktur an den Androgenrezeptor und zum Teil auch an den Glucocortikoid- und Mineralocortikoidrezeptor binden. Die Strukturverwandtschaft der verschiedenen Rezeptoren stellt die Basis für die unterschiedlichen Partialwirkungen der

Gestagene dar. So führt beispielsweise die Verabreichung von verschiedenen Gestagenen aufgrund ihres unterschiedlichen anabolen Potentials auch zu einer unterschiedlichen Beeinflussung des Knochens. Ein Gestagen mit stark androgener Partialwirkung ist Levonorgestrel (Phillips et al. 1987, Kuhnz & Beier 1994), ein Gestagen mit geringer androgener Partialwirkung ist Medroxyprogesteronacetat (Phillips et al. 1987) und zu den Gestagenen ohne androgene Partialwirkung wird Promegeston gezählt (Raynaud & Ojasoo 1983).

Schon bei den ersten Versuchen zur Entwicklung eines oral wirksamen, hormonalen Kontrazeptivums wurde die ovulationshemmende Wirkung synthetischer Gestagene erkannt, jedoch traten als Nebenwirkung unregelmäßige Blutungen auf (Pincus et al. 1958). Erst als sich die vielen Nebenwirkungen der östrogenen Komponente wie Kopfschmerzen, Gewichtszunahme und thromboembolische Erkrankungen herauskristallisierten, wurden die reinen Gestagenpräparate wieder aktuell.

Die Verabreichung synthetischer Sexualsteroiden führt dosisabhängig zur Beeinträchtigung des ovariellen Regelkreises. Die durch das negative Feedback der synthetischen Steroide reduzierte Gonadotropinsekretion verhindert die Entwicklung eines sprungreifen Follikels und damit die Ovulation. Dadurch wird auch eine deutliche Reduktion der endogenen Hormonspiegel hervorgerufen. Ovulationshemmende Dosen synthetischer Gestagene führen zu einem Abfall des Östradiol-Serumspiegels auf einen konstant niedrigen Spiegel (Johannson 1975, Wilks et al. 1983). Bei dauerhaft ovulationsgehemmten Ratten wird ein konstant niedriger Östradiol-Serumspiegel und das Ausbleiben des präovulatorischen Östradiolanstiegs, welcher den Proöstrus charakterisiert (Butcher et al. 1974), erwartet.

Kontrovers wird deshalb die langjährige Nutzung oraler Kontrazeptiva als Risikofaktor für eine Osteoporoseerkrankung diskutiert. Es gibt eine Anzahl Studien, die den Einfluß oraler Kontrazeptiva auf die postmenopausale Knochenentwicklung für günstig befunden haben (Goldsmith and Johnston 1975, Lindsay et al. 1986, Michaëlsson et al. 1999, Pasco et al. 2000). Andere Studien konnten keine Auswirkungen auf die Postmenopause ableiten (Lloyd et al. 1989, Hreshchyshyn et al. 1988, Rodin et al. 1991). Für beide Richtungen gilt, daß der Einfluß der älteren Generationen oraler Kontrazeptiva, also orale Kontrazeptiva mit gleich oder mehr als 30µg Ethinylöstradiol pro Pilleneinheit, überprüft wurden. Östrogendefizite durch eine massive Absenkung der endogenen E₂-Spiegel (Johannsson 1975, Ling et al. 1985, Jung-Hoffmann et al. 1988), die die Folge der Pilleneinnahme waren, konnten durch die vergleichsweise hohen EE-Dosierungen der älteren Präparate wieder substituiert werden. Ob aber die niedrigdosierten oralen Kontrazeptiva (EE ≤ 20 µg) der jüngeren Pillengeneration dieses Östrogendefizit ausgleichen können, ist

noch umstritten. Polatti et al. (1995) und Hartard et al. (1997) stellten einen negativen Einfluß auf die Knochendichte fest, während Mais et al. (1993) keinen Einfluß finden konnten.

2.6. Die Ratte als Tiermodell der postmenopausalen Osteoporose

Das bisher gebräuchlichste und wohl auch am besten untersuchte Tiermodell in der Osteoporoseforschung ist das der ovariectomierten Ratte. Untersuchungen sind vor allem im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Osteopenie ovariectomierter Ratten mit der postmenopausalen Osteoporose durchgeführt worden (Kalu 1991; Frost & Jee 1992, Wronski & Yen (1991). Die Autoren stellten fest, daß die Veränderungen im Knochenstoffwechsel der ovariectomierten Ratte in vielen Punkten den Folgen des Knochenverlustes im menschlichen Klimakterium gleichen. So kommt es sowohl bei der Frau als auch bei der weiblichen Ratte unter Östrogenmangel zu einem Anstieg des Knochenstoffwechsel mit verstärkter Resorptionsleistung und fortschreitendem Knochenverlust, der in der Spongiosa stärker als in der Kortikalis ausgeprägt ist. Eine weitere Gemeinsamkeit ist, daß dieser Abbau in den langen Röhrenknochen stärker hervortritt, als in den Wirbelknochen. Postmenopausale Knochentherapeutika, insbesondere Östrogene, wirken auch bei der Ratte knochenprotektiv (Wronski et al. 1988, Turner et al. 1987, Abe et al. 1993, Takano-Yamamoto & Rodan 1990).

Eine Einschränkung für das Tiermodell Ratte besteht in der Entstehung einer Osteoporoseerkrankung. Ovariectomierte Ratten entwickeln eine deutliche Osteopenie, lassen aber keine Beeinträchtigung des Bewegungsapparates erkennen. Spontanfrakturen und Mikroläsionen konnten bisher nicht festgestellt werden.

Die von Frost (1976) veröffentlichte Meinung, daß Ratten kein intrakortikales Remodeling besäßen und der Skelettstoffwechsel lebenslang von der Modeling-Aktivität beherrscht werde, wurde von ihm später widerrufen. Das Remodeling ist zwar in jungen Ratten wenig ausgeprägt, aber in älteren Tieren wird der trabekuläre Knochen wie beim Menschen durch Remodeling unter fortlaufender Erneuerung konserviert (Frost and Jee 1992).

Kalu et al. (1989), Mori et al. (1990), Kimmel (1991) und Li et al. (1991) konnten zeigen, daß das Längenwachstum des Extremitätenskeletts in den ersten Lebensmonaten schnell ansteigt, sich die Wachstumsgeschwindigkeit ab dem 4. Lebenmonat verringert und ab dem 12. Monat vernachlässigt werden kann. Mit 18 Monaten waren alle Epiphysenfugen verknöchert. Mit diesen Erkenntnissen konnte die bis dahin gültige Meinung, daß Ratten lebenslang wachsen, widerlegt werden.

Bei langfristig ovulationsgehemmten Ratten wird ein konstant niedriger Östradiol-Serumspiegel und das Ausbleiben des präovulatorischen Östradiolanstiegs, welcher den Proöstrus charakterisiert (Butcher et al. 1973), erwartet. Im Gegensatz dazu muß bei den Kontrolltieren der präovulatorische Östradiolanstieg deutlich feststellbar sein.

Die ovariectomierte Ratte ist unter Bezugnahme oben genannter Gemeinsamkeiten mit der postmenopausalen Frau ein sehr geeignetes Tiermodell, um die durch Östrogenmangel bedingte Osteopenie zu untersuchen (Frost & Jee 1992, Thompson et al. 1995, Miller et al. 1995).

Aufgrund einer Zyklusdauer von vier bis fünf Tagen reagiert die weibliche Ratte viel schneller auf hormonale Veränderungen, als beispielsweise saisonalöstrische oder diöstrische Tiere wie der Hund. Somit bietet die Ratte einen großen Vorteil gegenüber anderen Tiermodellen in der Osteoporoseforschung, da sich Effekte auf den Knochen in kürzerer Zeit darstellen lassen.