

**Auswirkung von Heidelbeerextrakt auf den Knochenstatus
von Mäusen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Heilmann, Florian
aus Lüneburg

Gießen, 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Experimentelle Unfallchirurgie

der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Gutachterin: Prof. Dr. Katrin Susanne Lips

Gutachter: Prof. Dr. Gunter Peter Eckert

Tag der Disputation: 01.11.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bau und Stoffwechsel des Knochens	2
1.1.1	Makroskopie und Histologie	2
1.1.2	Bau eines Femurs	4
1.1.3	Bau eines Wirbels	5
1.1.4	Grundsubstanz des Knochens	5
1.1.5	Knochenzellen	6
1.1.6	Regulation des Knochenbaus	11
1.2	Heidelbeeren	14
1.2.1	Inhaltstoffe	14
1.2.2	Rolle der Anthocyane	16
1.2.3	Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel	18
1.3	Fragestellung	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Versuchstiere und Studiendesign	20
2.2	Biomechanik	22
2.2.1	Probeneinbettung und Versuchsaufbau	22
2.2.2	Ermittlung der Maximalkraft	23
2.2.3	Ermittlung der Biegesteifigkeit	24
2.3	Mikro-Computertomographie (μ CT)	24
2.3.1	Datenakquisition und -rekonstruktion	25
2.3.2	Quantifizierung	25
2.3.3	Morphometrische Parameter	28
2.4	Histologie und Histomorphometrie	29
2.4.1	Probeinbettung und Präparateherstellung	29
2.4.2	Färbungen	30
2.4.3	Histomorphometrie	33
2.5	Real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion	37
2.5.1	RNA-Extraktion	37
2.5.2	cDNA-Synthese	38
2.5.3	Real-time RT-PCR	39

2.6 Statistik	41
3 Ergebnisse	42
3.1 Biomechanik	42
3.2 μ CT	43
3.2.1 Spongiosa Wirbelkörper L 1	43
3.2.2 Spongiosa Femur rechts	45
3.2.3 Kortikalis Femur rechts	48
3.3 Histomorphometrie	51
3.4 Real-time RT-PCR	58
3.4.1 Osteoblasten	58
3.4.2 Osteozyten	61
3.4.3 Osteoklasten	62
4 Diskussion	63
4.1 Biomechanik & μ CT der Femora	63
4.2 Trabekuläre Struktur der Wirbelkörper und Femora	65
4.3 Osteoblasten	66
4.4 Osteozyten	68
4.5 Osteoklasten	70
4.6 Gefäßversorgung der Wirbelkörper	73
4.7 Wirksamkeit der Kulturheidelbeere im Vergleich zur Wildheidelbeere	74
4.8 Auswirkung anderer Polyphenole auf den menschlichen Knochenstatus	74
4.9 Auswirkung auf das Frakturrisiko	76
4.10 Schlussfolgerung	77
4.11 Ausblick	79
5 Zusammenfassung	81
6 Summary	83
7 Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	85
8 Literaturverzeichnis	91
9 Publikationsverzeichnis	107
10 Ehrenwörtliche Erklärung	108
11 Danksagung	109

1 Einleitung

Erkrankungen des muskuloskelettalen Systems bilden eine heterogene Gruppe hinsichtlich ihrer Ätiologie und klinischen Manifestation. Sie treten über alle Altersgruppen hinweg auf, zunehmend jedoch im hohen Lebensalter. Als Folge der in den letzten Jahrzehnten gestiegenen Lebenserwartung in den Industrienationen, insbesondere auch in Deutschland, ist daher die Wahrscheinlichkeit groß, im Laufe des Lebens zumindest eine Erkrankung des Bewegungsapparates zu erleiden. So erkranken beispielsweise mehr als 8 % der 50 bis 79-jährigen Deutschen an einer Osteoporose, einer der häufigsten Erkrankungen des muskuloskelettalen Systems (Fuchs et al. 2013). Als Folge von Erkrankungen des Skelettsystems besteht die Gefahr einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität. Aufgründdessen bedarf es der Erforschung präventiver Maßnahmen, die den Knochenstatus positiv beeinflussen und Erkrankungsrisiken reduzieren.

Es ist allgemein bekannt, dass eine gesunde Ernährung eine wichtige Rolle als präventiver Faktor für eine Vielzahl von Erkrankungen spielt. Dies gilt auch für Erkrankungen, die das Skelettsystem betreffen. Beispielsweise werden einer obst- und gemüsereichen Ernährung präventive Effekte für die Entwicklung einer postmenopausalen Osteoporose zugeschrieben (Hu et al. 2018). Da eine gesunde Ernährung für viele Menschen in der heutigen Zeit eine wichtige Rolle spielt, ist es naheliegend, sich diese unterstützend für den Knochenstatus zunutze zu machen. So ergab eine Befragung im Rahmen des Ernährungsreports 2021 vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, dass 91 % der Befragten ein gesundes Essen wichtig sei. Weiterhin gaben 76 % an, täglich Obst und Gemüse zu konsumieren, die überwiegende Mehrheit davon aufgrund gesundheitsfördernder Effekte (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 2021). Mit der vorliegenden Studie soll untersucht werden, ob speziell Heidelbeeren als Nahrungsergänzung zur Verbesserung des Knochenstatus beitragen können.

1.1 Bau und Stoffwechsel des Knochens

Der Knochen erfüllt neben seiner Funktion als stützendes Grundelement des Bewegungsapparates vielfältige Aufgaben im Körper. Hierzu zählen der Schutz lebenswichtiger Organe, die Bildung der Blutzellen in der roten Knochenmark sowie die Speicherfunktion von Calcium und anderen Ionen. Embryologisch entsteht der Knochen aus Mesenchym, das, mit Ausnahme des knöchernen Schädels (Neuralleiste des Neuroektoderms), dem Mesoderm entstammt. Die Form eines Knochens ist sehr variabel. Neben den in den nachfolgend beschriebenen Versuchen verwendeten unregelmäßigen Knochen (Wirbel) und den das Grundgerüst der Extremitäten bildenden Röhrenknochen (Femora) werden kurze, platte, luftgefüllte und in Sehnen eingelagerte (Sesambeine) Knochen unterschieden.

1.1.1 Makroskopie und Histologie

Umgeben wird der Knochen vom Periost, der zweischichtigen Knochenhaut aus dem außen liegenden Stratum fibrosum und dem innen liegenden Stratum osteogenicum. Lediglich die Gelenkflächen sind vom Periost ausgespart. Die im Stratum fibrosum enthaltenen Sharpey-Fasern dienen den Sehnen als Insertionsstelle, das Stratum osteogenicum ist sowohl gut innerviert als auch vaskularisiert und fungiert als Ausgangspunkt des Dickenwachstums des Knochens sowie der Frakturheilung.

Unter dem Stratum osteogenicum liegt mit der Substantia corticalis die stabilste Schicht des Knochens, die im Bereich der Diaphyse der Röhrenknochen als Substantia compacta bezeichnet wird. Sie besteht aus vertikal ausgerichteten Baueinheiten, den Osteonen. In diesen liegen Osteozyten lamellenförmig mit der dazwischenliegenden Interzellularsubstanz um den zentral gelegenen Havers-Kanal mit dem darin enthaltenen Havers-Gefäß angeordnet. Begrenzt werden diese zirkulär verlaufenden Speziallamellen durch die Kittlinie. Die Bereiche zwischen den Speziallamellen werden durch Schaltlamellen ohne Havers-Gefäß ausgefüllt, welche in der Folge des Knochenumbaus durch den Abbau älterer Speziallamellen entstehen. Durch ein Loch in der Kompakta der Diaphyse der Röhrenknochen, dem Foramen nutricum, zieht die den Knochen versorgende Arteria nutricia und speist die vertikal verlaufenden Havers-Gefäße, die weiterhin durch quer verlaufende Volkmann-Gefäße verbunden werden, sowie die Markhöhle. Nach außen und innen wird die Kortikalis durch einige Lagen äußerer bzw.

innerer Generallamellen abgegrenzt. Den inneren Generallamellen liegt die Innenhaut des Knochens, das Endost, an (Abb. 1.1).

Im Inneren des Knochens liegt die Substantia spongiosa, die aus Knochentrabekeln gebildet wird, welche von der Kortikalis aus nach innen ziehen. Zwischen den Trabekeln, die ebenfalls vom Endost überzogen sind, liegt die Markhöhle (Cavitas medullaris), die rotes Knochenmark zur Bildung der Blutzellen (in platten Knochen, Wirbelkörpern, proximalem Femur) bzw. gelbes, fetthaltiges Knochenmark enthält.

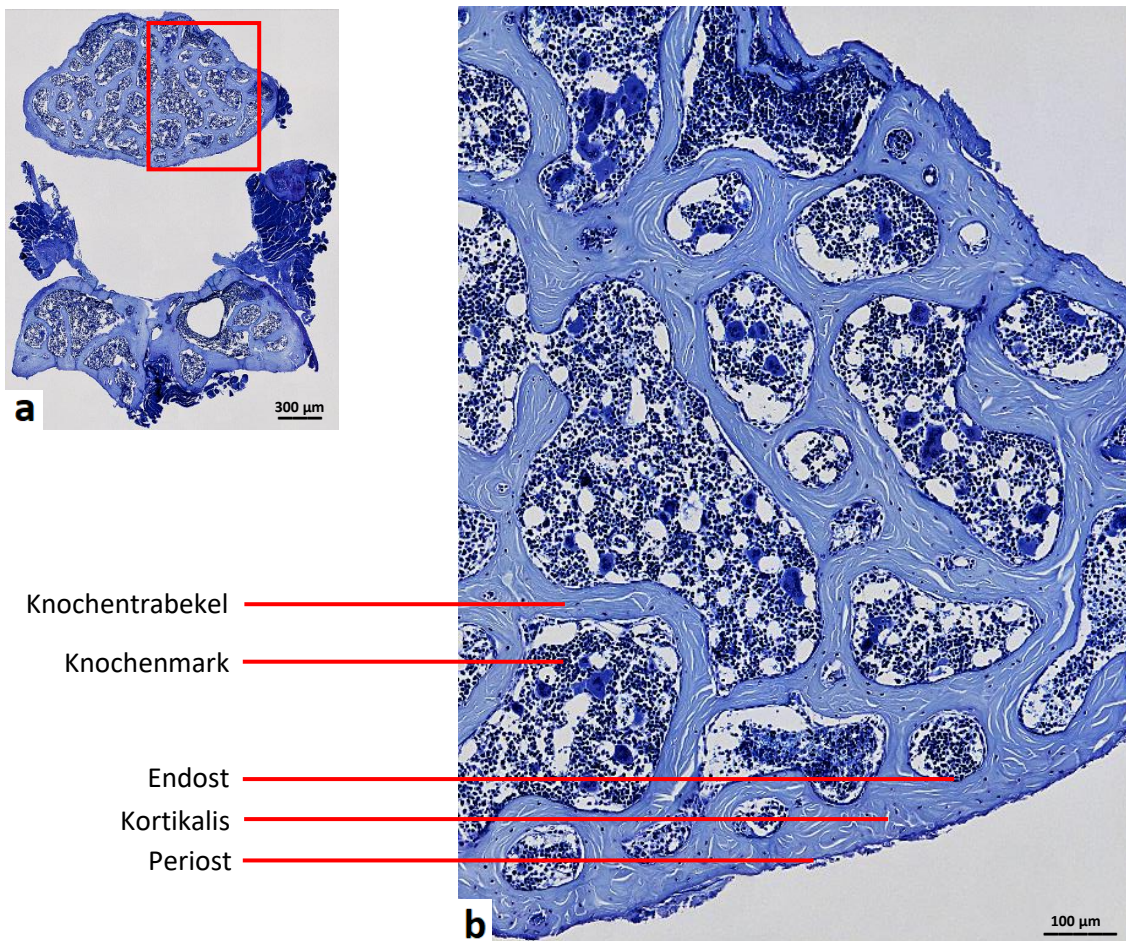


Abb. 1.1: Bau des Knochens am Beispiel eines 3. Lumbalwirbels (a) und vergrößerter Ausschnitt des Wirbelkörpers (b bzw. rotes Quadrat in a), Toluidinblau-Färbung

1.1.2 Bau eines Femurs

Der Femur ist wie alle Röhrenknochen in mehrere Abschnitte unterteilt. Mittig liegt die Diaphyse, was dem Knochenschaft entspricht. Proximal und distal schließt sich die Metaphyse an, die bei Röhrenknochen das dichte Trabekelwerk der Spongiosa enthält. Von der Metaphyse wiederum wird beidseits durch die Epiphysenfuge, an der bis zum Ende der Wachstumsphase das Längenwachstum stattfindet, die Epiphyse abgegrenzt, welche dem gelenkbildenden Abschnitt des Knochens entspricht. Weiterhin haben die Röhrenknochen morphologisch variable, in ihrer Lokalisation jedoch klar determinierte Apophysen. Diese Knochenvorsprünge dienen dem Ansatz von Sehnen, über die die Muskulatur Kraft und Bewegung ausübt (Abb. 1.2).

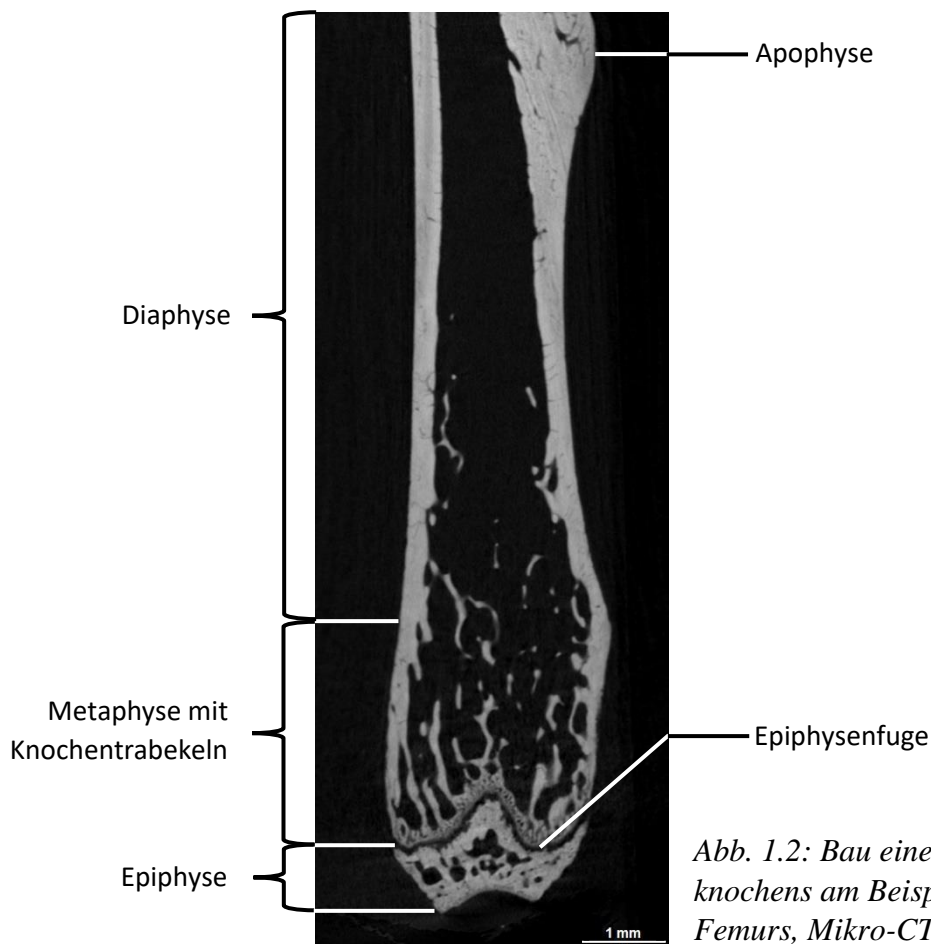


Abb. 1.2: Bau eines Röhrenknochens am Beispiel eines Femurs, Mikro-CT

1.1.3 Bau eines Wirbels

Der Wirbel setzt sich aus zwei Bauelementen zusammen, dem ventral gelegenen Corpus vertebrae und dem dorsal gelegenen Arcus vertebrae. Letzterem sitzen mit den Processus arcus vertebrae verschiedene Fortsätze zur Gelenkbildung und als Ursprungs- bzw. Ansatzpunkt für Bänder und Muskulatur auf. Die Gesamtheit der durch die Arcus vertebrae gebildeten Foramina vertebralia ergeben den Canalis vertebralis, der als knöcherner Kanal das Rückenmark enthält und schützt (Abb. 1.3). Der in der vorliegenden Studie vorwiegend genutzte Corpus vertebrae ist nach kaudal durch die knorpelige Grundplatte, nach kranial durch die ebenfalls knorpelige Deckplatte begrenzt.

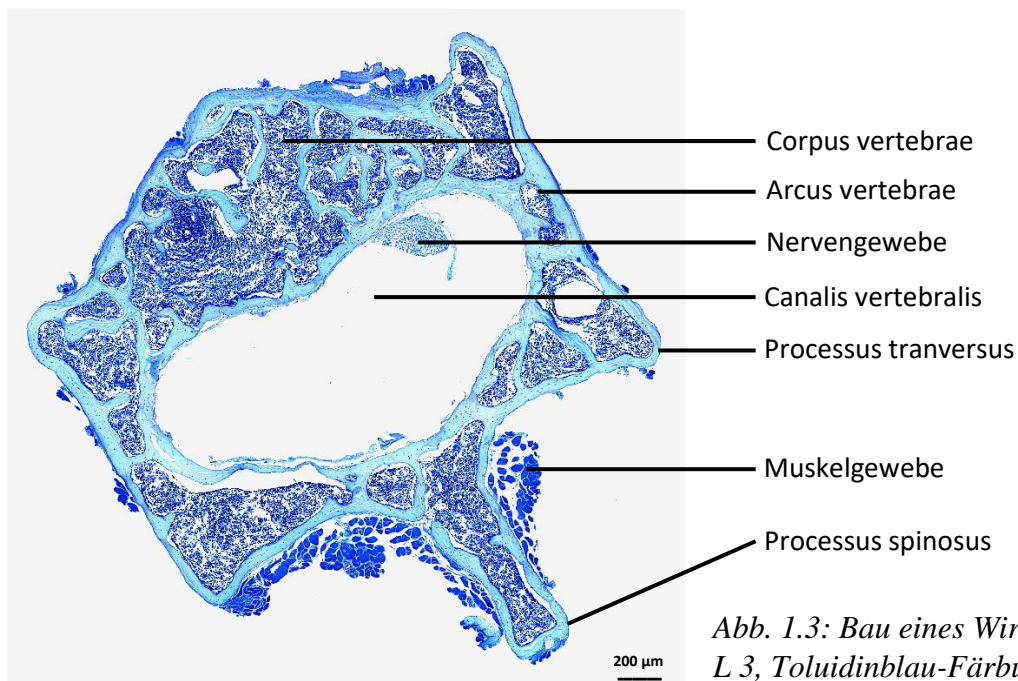


Abb. 1.3: Bau eines Wirbels, L 3, Toluidinblau-Färbung

1.1.4 Interzellulärsubstanz

Das Knochengewebe besteht, genauso wie alle anderen Formen des Binde- und Stützgewebes, aus Zellen und Interzellulärsubstanz. Die Interzellulärsubstanz bzw. Matrix des Knochens wiederum setzt sich aus verschiedenen Bestandteilen zusammen, 50-70 % machen hierbei anorganische (Hydroxylapatit), 20-40 % organische Substanzen sowie 5-10 % Wasser und <3 % Fette aus. Die organischen Substanzen unterteilen sich weiterhin in Kollagen Typ 1 zu 85-90 % und nichtkollagene Proteine (Clarke 2008).

1.1.5 Knochenzellen

Die Zellen, die am Bau und Stoffwechsel des Knochens beteiligt sind, unterteilen sich in Osteoblasten, Osteozyten, endostale Saumzellen (*bone lining cells*, BLCs) und Osteoklasten (Abb. 1.4, S. 11).

Osteoblasten: Aus mesenchymalen Stammzellen entwickeln sich über mehrere Vorstufen (osteochondrale Vorläuferzelle, Präosteoblast) reife Osteoblasten, die der Knochenoberfläche anliegen und ihre Funktion im Knochenauf- und -umbau haben (Bellido 2014). Die Differenzierung zu Osteoblasten erfolgt durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, deren Expression durch *bone morphogenic proteins* (BMPs), die zur *transforming growth factor β* (TGF- β)-Familie gehören, reguliert werden (Chen et al. 2012). BMP 2 und 7 kamen bereits in der Behandlung von Frakturen am Menschen zum Einsatz (Hausmann et al. 2014). BMP 2 fördert zunächst die Expression von *runx-related transcription factor 2* (Runx2) und *distal-less homeobox 5* (Dlx5), durch die die Expression des für die Osteoblastendifferenzierung zentralen Transkriptionsfaktors Sp7, auch als Osterix bezeichnet, induziert wird (Sinha et al. 2013). Weiterhin wird Osterix auch durch den Einfluss von *Msh homeobox 2* (Msx2) verstärkt exprimiert (Matsubara et al. 2008). Osterix kann zudem die Expression von Runx2 vermindern, woraus letztlich ein enges Zusammenspiel von Osterix und Runx2 für die Regulation der Osteoblastendifferenzierung und -aktivität resultiert (Vimalraj et al. 2015).

Daneben spielt für die Aktivierung der Osteoblasten der Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle (Karner et al. 2017). Die durch Wnt induzierte Signalkaskade führt letztlich dazu, dass der Abbau von β -Catenin verhindert wird, dieses intrazellulär akkumuliert und schließlich über verschiedene Zielgene das Knochenwachstum fördert (Maupin et al. 2013, Chen et al. 2015). Des Weiteren ist Wnt in der Lage, die Expression von Runx2 zu steigern und dadurch auf die Osteoblastentätigkeit einzuwirken (Gaur et al. 2005).

Aktivierete Osteoblasten synthetisieren zunächst das Osteoid, was der unverkalkten Knochenmatrix aus Kollagen 1 und nichtkollagenen Proteinen, darunter vor allem Osteocalcin, Osteonektin sowie den *small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins* (SIBLING-Proteine) Osteopontin und *Bone sialoprotein* (BSP), entspricht. Eine entscheidende Funktion der nichtkollagenen Proteine des Knochens ist die Anlagerung von Hydroxylapatit an das Kollagen im Rahmen der Knochenmineralisation.

Osteocalcin hat unter den nichtkollagenen Proteinen des Knochens den größten Anteil und spielt neben der Bindung des Hydroxylapatits eine entscheidende Rolle in der Knochenmorphologie. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass in Abwesenheit von Osteocalcin eine größere Knochenmasse bei einer geringeren Mineralisation mit Hydroxylapatit resultierte (Ducy et al. 1996, Hoang et al. 2003, Bailey et al. 2017). Des Weiteren fördert Osteocalcin die Insulin-Sekretion und erhöht die Insulin-Sensitivität. Über diesen Mechanismus sind Osteoblasten in die Glucosehomöostase eingebunden (Hwang et al. 2009, Ferron et al. 2010, Wei et al. 2015). Osteonectin fördert neben der Mineralisation den Knochenumbau mittels Matrix-Metalloproteasen und ist an der Regulation der Angiogenese beteiligt (Termine et al. 1981, Tremble et al. 1993, Rivera et al. 2011, Bradshaw 2012, Ciceri et al. 2016). Das Fehlen von Osteonectin führt unter anderem zu einem biomechanisch schwächeren Knochen (Rosset et al. 2016).

Für die Regulation sowie als Ansatzpunkt des Hydroxylapatits bei der Mineralisation sind hauptsächlich die SIBLING-Proteine Osteopontin und BSP zuständig. BSP vermittelt die Interaktion von Kollagen 1 und Hydroxylapatit im Rahmen knöcherner Umbauprozesse sowie der Knochenheilung (Hunter et al. 1993, Baht et al. 2008, Monfoulet et al. 2010). Es gibt zudem Hinweise auf eine Verstärkung der Insertionsstelle der Sehnen durch BSP (Marinovitch et al. 2016). Osteopontin hingegen hat einen hemmenden Einfluss auf die Bildung von Hydroxylapatit im Knochen (Gericke et al. 2005, Hunter 2013, Hoac et al. 2017). Auch zeigte sich, dass in Abwesenheit von BSP Osteopontin verstärkt nachweisbar war, was auf das Zusammenwirken der beiden Proteine im Mineralisationsprozess hindeutet (Granito et al. 2014). Weitere Bestandteile des Osteoids sind die Proteoglykane Decorin und Biglycan, welche ebenfalls die Knochenentwicklung und -morphologie beeinflussen (Waddington et al. 2003).

Der Prozess der Mineralisation umfasst die Bildung von Hydroxylapatit aus Calcium und Phosphat in Matrixvesikeln in den Osteoblasten und die Ausschleusung der Matrixvesikel in den Extrazellularraum. Hier wird das Hydroxylapatit aus den Vesikeln freigesetzt, sodass es sich über BSP an das Kollagen anlagern kann (Orimo 2010, Baht et al. 2008). Eine wichtige Rolle für die ausreichende Mineralisation spielt das Enzym *tissue-nonspecific alkaline phosphatase* (alkalische Phosphatase, ALP), das durch *nucleoside pyrophosphohydrolase 1* (NPP1) von ATP abgespaltene Pyrophosphat, welches hemmend auf die Mineralisation wirkt, abbaut (Millán 2013). Osteoblasten sezernieren *receptor activator of nuclear factor κ B ligand* (RANKL) und Osteoprotegerin

(OPG) zwecks Aktivierung und Hemmung der Osteoklasten, woraus eine Förderung bzw. Hemmung des Knochenbaus resultiert.

Später verbleiben Osteoblasten als in der Knochenmatrix eingemauerte Osteozyten, gehen den Weg der Apoptose oder liegen dem Endost als BLCs an (Bellido 2014). Studien zeigen, dass auch BLCs Funktionen im Knochenbau durch Beseitigung von Resten abgebauter Knochenmatrix in den von Osteoklasten hinterlassenen *howship*-Lakunen ausüben (Everts et al. 2002). Des Weiteren scheinen sie die Fähigkeit zu haben, sich unter bestimmten Umständen zu teilen und erneut als Osteoblastenvorläufer zu fungieren (Matic et al. 2016).

Osteozyten: Nach ihrer Tätigkeit als Osteoblasten in der Knochenmatrix eingemauerte Osteozyten sind zwecks Kommunikation untereinander über Gap junctions aus Connexin 43 durch zahlreiche, in Knochenkanälchen (Canaliculi) gelegene Ausläufer miteinander verbunden (Xu et al. 2015). Studien zeigen, dass sowohl für die Entwicklung des Osteoblasten zum Osteozyten als auch zur Formierung dieses kommunikativen Netzwerkes zwischen den Osteozyten die *membrane-type matrix metalloproteinase 1* (MT1-MMP) eine wichtige Rolle einnimmt (Karsdal et al. 2004, Holmbeck et al. 2005).

Über verschiedene Mechanismen steuern die eingemauerten Osteozyten den Knochenstoffwechsel. So sind sie wie ihre Vorläuferzellen, die Osteoblasten, durch die Sekretion verschiedener Proteine in die Regulation der Knochenmineralisation eingebunden. Dies geschieht zum einen durch die Expression des *phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome* (PHEX), bei dessen Funktionsverlust es zum Phosphatdiabetes kommt (Francis et al. 1995, Yuan et al. 2008). Weiterhin sind die SIBLING-Proteine *dentin matrix acidic phosphoprotein 1* (DMP1) und *matrix extracellular phosphoglycoprotein* (MEPE), auch als *osteoblast/osteocyte factor 45* (OF45) bezeichnet, an der Mineralisation beteiligt. DMP1 wird dabei ein fördernder, MEPE ein hemmender Einfluss zugeschrieben (Gowen et al. 2003, Feng et al. 2006, Addison et al. 2008).

Osteozyten fungieren zudem über den Wnt-Signalweg als Sensor für mechanische Belastung und kommunizieren zwecks Anpassung der Knochenmorphologie an die entsprechend notwendige Belastbarkeit nicht nur untereinander, sondern auch mit Osteoblasten und Osteoklasten (Bonewald et al. 2008, Duan et al. 2016). Durch die

Sekretion von Sclerostin bewirken Osteozyten eine Hemmung der Osteoblastendifferenzierung und -aktivität über die Blockierung des Wnt-Signalweges der Osteoblasten (Chen et al. 2015, Delgado-Calle et al. 2017). Die Hemmung der Sclerostin-Wirkung mittels Antikörpern zur Osteoporose-Behandlung wird derzeit in Studien erforscht (Clarke 2014, Appelman-Dijkstra et al. 2016). Wie die Osteoblasten sezernieren auch die Osteozyten RANKL und OPG und regulieren so den Knochenumbau durch die Osteoklasten.

Osteoklasten: Osteoklasten sind als funktioneller Gegenspieler der Osteoblasten im Prozess des Knochenumbaus für die Resorption des Knochens zuständig. Sie entwickeln sich zunächst aus hämatopoetischen Stammzellen über multipotente und myeloische Progenitorzellen, aus denen sich in Anwesenheit von *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) Osteoklasten-Vorläufer und durch deren Zusammenschluss Osteoklasten, mehrkernige Riesenzellen, entwickeln. Eine entscheidende Rolle für diesen Zusammenschluss zu Osteoklasten sowie deren Aktivierung spielt die Sekretion von RANKL durch Osteoblasten und Osteozyten. RANKL bindet an seinen entsprechenden *receptor activator of nuclear factor κ B* (RANK), was über den *tumor necrosis factor receptor associated factor 6* (TRAF6) zur Aktivierung sowohl des *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B)- als auch des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Weges führt. Beide Wege führen zu einer verstärkten Expression des *nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1* (NFATc1), woraus die Transkription verschiedener für die Osteoklastogenese entscheidender Gene resultiert. Das ebenfalls von Osteoblasten und Osteozyten sezernierte OPG hemmt die Entwicklung und Aktivität der Osteoklasten durch Bindung an RANKL, das somit nicht mehr mit RANK interagieren kann (Ono et al. 2018, Park-Min 2018). Klinisch werden in der Osteoporose-Behandlung seit mehreren Jahrzehnten Bisphosphonate zur Hemmung der Osteoklastenaktivität verwendet. Des Weiteren wurde im Lauf des vergangenen Jahrzehnts mit Denosumab ein Antikörper gegen RANKL zugelassen. In der optimalen Dauer der Anwendung von Denosumab gibt es bisher keinen eindeutigen Konsens, jedoch existieren Hinweise auf vermehrte Osteoporose-assoziierte Frakturen nach dem Absetzen des Medikaments (Russell 2011, McClung et al. 2017).

Die Zellmembran des reifen Osteoklasten weist eine charakteristische Polarisation auf. Die dem Knochen zugewandte *ruffled border* und die dem Knochen abgewandte basolaterale Domäne werden durch die *sealing zone*, die, bestehend aus einem Aktin-Ring und weiteren Proteinstrukturen, die Anhaftung des Osteoklasten am Knochen vermittelt, getrennt (Luxenburg et al. 2006, Väänänen et al. 2008).

Die *ruffled border* ist der Ort der Knochenresorption und unterteilt sich weiter in die *fusion zone* und die *central zone*. In der *fusion zone* erfolgt die Sekretion von Cl^- durch den *chloride channel 7* (ClC7) sowie H^+ durch die H^+ -ATPase zur extrazellulären Bildung von HCl, die zum Herauslösen des Hydroxylapatits notwendig ist. Die verbliebene Knochenmatrix wird im Wesentlichen durch die Enzyme Cathepsin K, *tartrate resistant acid phosphatase* (TRAP) 5b und Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) abgebaut, deren Sekretion im Bereich der *central zone* erfolgt (Väänänen et al. 2008, Florencio-Silva et al. 2015). Neben dem Abbau von Kollagen 1 ist Cathepsin K darüber hinaus in der Lage, TRAP durch proteolytische Spaltung zu aktivieren (Littlewood-Evans et al. 1997, Ljusberg et al. 2005). TRAP sorgt durch Dephosphorylierung des Osteopontins auch für eine verminderte Bindung der Osteoklasten am Knochen und ermöglicht ihnen dadurch die weitere Zellmigration (Ek-Rylander et al. 2010).

Die in der *howship*-Lakune anfallenden Abbauprodukte des Hydroxylapatits und der Knochenmatrix werden transzytotisch durch den Osteoklast zur *functional secretory domain*, einem Bereich innerhalb der basolateralen Domäne, transportiert. An der basolateralen Domäne erfolgt auch die Aufnahme von Cl^- im Austausch gegen HCO_3^- für die im Bereich der *ruffled border* folgende HCl-Bildung. HCO_3^- wird in der durch das Enzym Carboanhydrase 2 katalysierten Reaktion $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ abgespalten, in der auch das H^+ für das HCl entsteht (Arana-Chavez et al. 2009, Florencio-Silva et al. 2015).

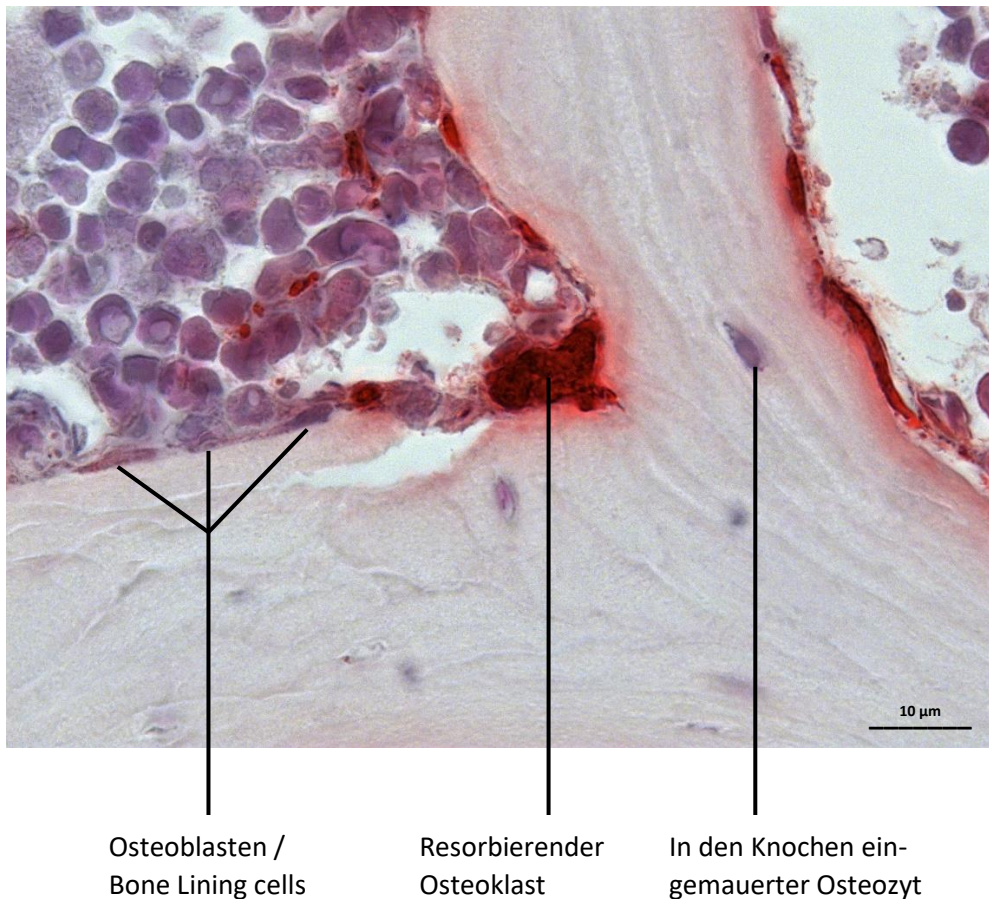


Abb. 1.4: Knochenzellen, enzymhistochemischer Nachweis von TRAP

1.1.6 Regulation des Knochenumbaus

Der Knochen unterliegt während des gesamten Lebens einem kontinuierlichen Umbauprozess, der sich in mehrere Phasen gliedert. Zu Beginn erfolgt ein Stimulus, der den Umbau induziert. Dieser Stimulus kann mechanischer oder hormoneller Genese sein. Daraufhin werden die auf den Knochenauf- und -abbau spezialisierten Zellen aktiv. Zunächst wird altes Knochengewebe durch die Osteoklasten ab-, danach neues Knochengewebe in den entstandenen Lakunen durch die Osteoblasten wieder aufgebaut (Katsimbri 2017). Viele Regulationsmechanismen des Knochenumbaus wurden bereits zur Entwicklung von Pharmazeutika genutzt, welche inzwischen Einzug in die klinische Medizin gefunden haben. Dies soll im Folgenden lediglich exemplarisch erwähnt werden.

Die für den Knochenumbau essentielle mechanische Beanspruchung wird zunächst von den im Knochen eingemauerten Osteozyten registriert. Diese kommunizieren im Folgenden

mit den anderen am Knochenstoffwechsel beteiligten Zellen. Durch die Registrierung der entsprechenden mechanischen Beanspruchung sezernieren die Osteozyten und auch die Osteoblasten RANKL bzw. OPG, was zu einer Förderung bzw. Hemmung der Entwicklung der Osteoklasten führt. Aus diesem Mechanismus resultiert letztlich eine Steigerung bzw. Verminderung des Knochenbaus.

Hormonell wird der Knochenabbau durch mehrere Hormone reguliert, die die Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase des Blutes bewerkstelligen. Entscheidend ist hierbei der Antagonismus der beiden Gegenspieler Calcitonin und Parathormon. Calcitonin wird aus den C-Zellen der Schilddrüse ausgeschüttet und senkt den Plasma-Calcium-Spiegel durch die Hemmung der Osteoklasten. Es wirkt somit hemmend auf den Knochenabbau (Naot et al. 2019). Parathormon wird aus den Nebenschilddrüsen freigesetzt und hat die Aufgabe, den Plasma-Calcium-Spiegel zu erhöhen. Dies geschieht zum einen durch eine indirekte Stimulation der Osteoklasten. Da diese selbst keinen Parathormon-Rezeptor haben, ist die stimulierende Wirkung durch die Aktivierung des Parathormon-Rezeptors der Osteoblasten und der Osteozyten zu erklären, die ihrerseits vermehrt RANKL und weniger OPG ausschütten, was die Osteoklasten aktiviert und den Knochenabbau fördert (Silva et al. 2015). Dass im Zuge der Osteoklasten-Aktivierung auch die Osteoblasten stimuliert werden und somit der Knochenabbau gesteigert wird, wird therapeutisch durch Gabe des Parathormon-Fragments Teriparatid in der Osteoporose-Behandlung genutzt (Hodsman et al. 2005). Zum anderen führt Parathormon zu einer verstärkten Ausschüttung von Calcitriol aus der Niere. Calcitriol fördert den Knochenabbau zum einen direkt über die Stimulation der Osteoblasten, die unter dem Einfluss von Calcitriol verstärkt Kollagen 1 und andere Proteine der Knochenmatrix synthetisieren und über die Sekretion von ALP auch die Mineralisation fördern. Zum anderen werden Osteoklasten indirekt aktiviert, da diese entsprechend des Parathormon-Rezeptors auch keinen Rezeptor für Calcitriol aufweisen. Auch hier ist die Osteoklasten aktivierende Wirkung durch eine vermehrte Expression von RANKL durch die Osteoblasten zu erklären (von Driel et al. 2017).

Nach seiner Aktivierung nimmt der Osteoklast seine Arbeit auf und resorbiert altes Knochengewebe (siehe 1.1.5, S. 10). Infolgedessen wird aus dem Knochen TGF- β freigesetzt und bewirkt wiederum eine Hemmung der Osteoklasten und Stimulation der Osteoblasten (Bonewald et al. 1990, Crane et al. 2014). Aktivierte Osteoblasten

synthetisieren im Folgenden neues Osteoid und bewirken die Mineralisation des neu gebildeten Knochens (siehe 1.1.5, S. 6 ff).

Der Knochenstoffwechsel wird auch durch die Steroidhormone Cortisol, Östrogen und Testosteron beeinflusst. Cortisol verhindert die Proliferation von Zellen, die sich zu Osteoblasten und damit auch zu Osteozyten differenzieren, wodurch der Knochen nicht mehr in der Lage ist, ausreichend neues Knochengewebe zu bilden (Funktion der Osteoblasten) und auf mechanische Stimulation adäquat zu reagieren (Funktion der Osteozyten). Des Weiteren bewirkt Cortisol eine vermehrte Freisetzung von M-CSF und RANKL. Durch die verminderte Produktion von OPG kommt es zu einer vermehrten Bindung von RANKL mit RANK und dadurch zu einer Förderung der Osteoklastogenese sowie zu einer Stimulation der Aktivität der Osteoklasten. Aus einem über einen längeren Zeitraum andauernden Hypercortisolismus kann dadurch eine Osteoporose entstehen (Canalis et al. 2007). Östrogen und Testosteron wirken der Knochenresorption entgegen, Östrogen durch Hemmung der Osteoklastogenese über die Verringerung des Ansprechens der Osteoklasten auf RANKL, Testosteron durch die direkte Stimulation der Osteoblasten und auch indirekt durch seine Aromatisierung zu Östrogen (Srivastava et al. 2001, Mohamad et al. 2016). Die knochenprotektive Wirkung des Östrogens wird klinisch mit dem selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulator Raloxifen zur Behandlung der Osteoporose genutzt (Lee et al. 2008).

1.2 Heidelbeeren

Heidelbeeren (*Vaccinia*) umfassen mehrere hundert Arten und bilden eine Pflanzengattung innerhalb der Unterfamilie der Heidelbeer-Ähnlichen (*Vaccinioideae*), welche wiederum der Familie der Heidekrautgewächse (*Ericaceae*) untergeordnet sind. Sie wachsen an ca. 50 cm hohen Sträuchern, welche im Frühling Blüten tragen. Zu Beginn des Sommers sind die Früchte mit der charakteristischen dunkelblauen Farbe ausgereift. Die bekannteste in Europa vorkommende Art ist die europäische Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus*, engl. *bilberry*), wobei der Begriff Blaubeere synonym verwendet wird. Eine entsprechende, häufig in Nordamerika anzutreffende Art, ist die Wildheidelbeere *Vaccinium angustifolium* (engl. *wild lowbush blueberry*). Von diesen Arten muss die amerikanische Kulturheidelbeere (*Vaccinium corymbosum*, engl. *blueberry*) abgegrenzt werden, welche hauptsächlich gezüchtet und vertrieben wird. Im Gegensatz zur Kulturheidelbeere, welche lediglich eine blaue Schale bei ansonsten hellem Fruchtfleisch aufweist, ist bei der Wildheidelbeere auch dieses blau. Dies ist auf Anthocyane zurückzuführen, welche den Früchten die blaue Farbe verleihen und bei der Wildheidelbeere sowohl in der Schale als auch im Fruchtfleisch, bei der Kulturheidelbeere vor allem in der Schale enthalten sind (Riihinen et al. 2008).

1.2.1 Inhaltsstoffe

Neben Vitaminen und Mineralstoffen enthalten Heidelbeeren als sekundäre Pflanzenstoffe verschiedene Anthocyane, welche aus einem Anthocyanidin und angehängten Zuckern bestehen. Das Anthocyanidin als zuckerfreier Anteil des Anthocyanins verleiht den Pflanzen die unterschiedliche Farbe und enthält als Grundgerüst das Flavan, weshalb die Anthocyane zur Gruppe der Flavonoide gehören (Abb. 1.5).

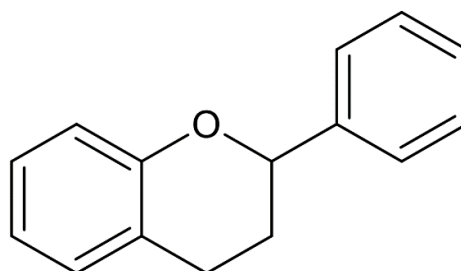


Abb. 1.5: Flavan als Grundgerüst der Anthocyane, erstellt mit ChemSketch (Version 2019.2, ACD/Labs, Toronto, Ontario, Canada)

An das Grundgerüst wiederum sind mehrere Hydroxygruppen sowie weitere unterschiedliche funktionelle Gruppen angehängt. Durch die direkte Bindung der Hydroxygruppen am aromatischen Ring sind die Anthocyane strukturell den Polyphenolen zuzuordnen. Je nachdem, welche funktionellen Gruppen ([R] in Abb. 1.6) an das Anthocyanidin angehängt sind, ergeben sich als am häufigsten vorkommende Anthocyanidine das Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Pelargonidin, Peonidin und das Petunidin.

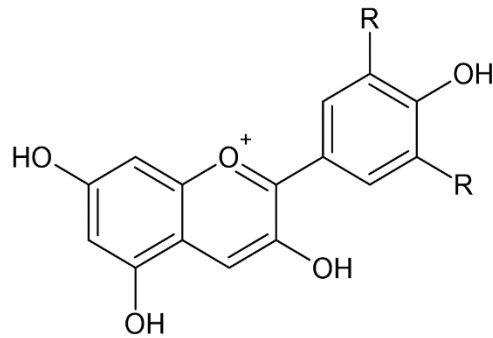


Abb. 1.6: Grundgerüst der Anthocyanidine Cyanidin, Melphinidin, Malvidin, Pelargonidin, Peonidin und Petunidin mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen [R], erstellt mit ChemSketch (Version 2019.2, ACD/Labs, Toronto, Ontario, Canada)

Weiterhin sind den Anthocyanidinen am C3-Atom O-glykosidisch die Zucker Glucose, Galactose oder Arabinose angehängt, was den Anthocyanen eine gute Wasserlöslichkeit vermittelt (Abb. 1.7).

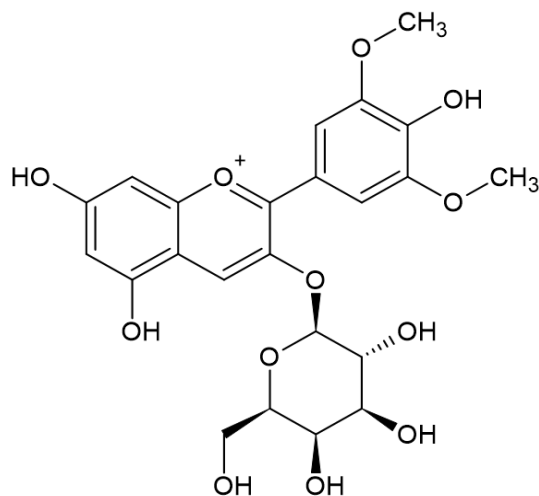


Abb. 1.7: Malvidin-3-O-Galactosid, Beispiel eines in Heidelbeeren vorkommenden Anthocyanins, erstellt mit ChemSketch (Version 2019.2, ACD/Labs, Toronto, Ontario, Canada)

Mittels chromatografischer Bestimmung konnten weitestgehend die gleichen Anthocyane in amerikanischen Kultur- und europäischen Wildheidelbeeren nachgewiesen werden. Es konnten jedoch Unterschiede im Verhältnis der vorkommenden Anthocyane zueinander sowie in deren Gesamtkonzentration festgestellt werden. Letzteres wird darauf zurückgeführt, dass die als Kulturheidelbeere gezüchteten Arten verstärkt Licht und hohen Temperaturen ausgesetzt ist, was zum Zerfall der Anthocyane und zu einer Gesamtkonzentration an Anthocyanen von lediglich ca. einem Drittel verglichen mit der europäischen Wildheidelbeere führt (Müller et al. 2012). Bei der in der vorliegenden Studie zur Herstellung des Heidelbeerextraktes verwendeten Heidelbeere handelt es sich um die amerikanische Kulturheidelbeere *Vaccinium corymbosum* (Shukitt-Hale et al. 2015).

1.2.2 Rolle der Anthocyane

Sekundäre Pflanzenstoffe, insbesondere Anthocyane, spielen aufgrund ihrer polyphenolischen Struktur eine wichtige präventive Rolle im Rahmen entzündlicher Prozesse sowie vieler chronischer Erkrankungen verschiedener Organsysteme, beispielsweise des kardiovaskulären Systems (Ma et al. 2018).

Anthocyane vermitteln den gesundheitsfördernden Effekt der Heidelbeere im Wesentlichen durch ihre Funktion als natürliches Antioxidanz. Aufgrund ihrer polyphenolischen Struktur und der daraus resultierenden reduzierenden Eigenschaften sind Anthocyane in der Lage, freie Radikale zu neutralisieren (Speer et al. 2020). Diese freien Radikale, auch als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bezeichnet, fallen als Stoffwechselprodukte im Organismus fortlaufend an, können dem Körper jedoch auch exogen zugeführt werden. Beispiele hierfür sind das Hyperoxid-Anion sowie das Hydroxyl-Radikal. Durch deren hochreaktive Struktur kommt es im Organismus zur Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden, was wiederum zu DNA-Mutationen, strukturveränderten Proteinen und Schäden an Zellmembranen führt, letztlich mit der Folge einer beschleunigten Zellalterung. Bis zu einem gewissen Grad ist der Organismus in der Lage, ROS mittels körpereigenen Antioxidanzien zu neutralisieren, vor allem durch die Enzyme Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase. Kommt es jedoch zu einem vermehrten Anfall an ROS, auch als oxidativer Stress bezeichnet, bedarf es

zusätzlicher, extern zugeführter Stoffe mit antioxidativem Potential, um dem Prozess der Zellalterung entgegenzuwirken.

Hinweise auf positive Effekte von heidelbeerreicher Ernährung sind insbesondere im Rahmen internistischer Erkrankungen sowohl in Tierstudien als auch an Menschen bereits vielfach untersucht worden. So wiesen Liu et al. 2019 bei fettreich ernährten Mäusen unter zusätzlicher Gabe von Heidelbeeren eine erhöhte Insulin-Sensitivität sowie eine verringerte Größe und Apoptose-Rate von pankreatischen β -Zellen im Vergleich zu lediglich fettreich ernährten Mäusen nach. Dies weist auf eine verbesserte Funktion der β -Zellen unter heidelbeerreicher Diät hin (Liu et al. 2019). Ebenfalls anhand von Mäusen konnte unter heidelbeerreicher Diät eine veränderte Morphologie des Darm-Epithels nachgewiesen werden. Es zeigten sich signifikant tiefere Krypten und vermehrtes Vorkommen von Becherzellen und dadurch eine erhöhte Sekretionsleistung von Schleim (Paturi et al. 2012).

Hinsichtlich gesundheitsfördernder Effekte heidelbeerreicher Ernährung beim Menschen wurde die Wirkung häufig im Zusammenhang mit Patienten untersucht, die unter einer oder mehrer Komponenten des metabolischen Syndromes litten. So untersuchten Curtis et al. 2019 die Wirksamkeit von Heidelbeeren an Patienten, die an Adipositas, arterieller Hypertonie, Dyslipidämie und einer pathologischen Nüchternblutglucose litten. Die Patienten erhielten täglich 150 g ganze Heidelbeeren über einen Zeitraum von 6 Monaten. Das Ergebnis waren signifikant verbesserte Flusseigenschaften des Blutkreislaufes und ein erhöhtes HDL (*high density lipoprotein*) im Vergleich zu den Patienten der Kontrollgruppe, welche ein Placebo erhielten. Korrespondierend dazu zeigten sich die entsprechenden Anhocyane im Serum signifikant erhöht (Curtis et al. 2019). Bei Patienten mit Gonarthrose konnte nach einem täglichen Verzehr von 40 g Heidelbeerextrakt über 4 Monate im Vergleich zur Placebo-Gruppe neben reduzierten körperlichen Beschwerden auch ein signifikant verringerter Blutdruck festgestellt werden (Du et al. 2019). Weiterhin zeigten sich bei postmenopausalen Frauen mit leichter arterieller Hypertonie nach einem Verzehr von 22 g Heidelbeerextrakt über 4 Wochen reduzierte Laborparameter für Schäden an der DNA, nach einem Verzehr über 8 Wochen war der Effekt hingegen nicht nachweisbar (Johnson et al. 2017). Auch am Menschen konnten Hinweise auf gesundheitsfördernde Effekte heidelbeerreicher Ernährung auf den Darm nachgewiesen werden. So zeigte sich bei Patienten mit Sinusvenenthrombose nach

einem Verzehr von 10 mg Heidelbeerextrakt über 3 Monate signifikant verringerte pathogene Darmbakterien, was auf ein verringertes Risiko gastrointestinaler Infektionen hinweist (Xu et al. 2017).

1.2.3 Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel

Zunehmend wurden in der Vergangenheit die Effekte polyphenolreicher Ernährung auch auf den Knochenstoffwechsel untersucht. In Meta-Analysen konnten vielversprechende positive Effekte sowohl im Rahmen von Tierstudien als auch am Menschen gezeigt werden (Hubert et al. 2014, Brondani et al. 2019).

Die positive Wirkung polyphenolreicher Ernährung auf den Knochenstoffwechsel ist, wie auch deren Effekte im Rahmen internistischer Erkrankungen, auf die antioxidative Wirkung und die damit verbundene antagonisierende Wirkung auf ROS zurückzuführen. So scheint ein vermehrter Anfall von ROS unter anderem mit einem gesteigerten Risiko für eine Osteoporose im höheren Alter einherzugehen (Melough et al. 2017). ROS führen durch eine gesteigerte Osteoklastendifferenzierung letztlich zu einem Ungleichgewicht zwischen den Knochenzellen zugunsten der Osteoklasten gegenüber den Osteoblasten und Osteozyten, wodurch sich der Knochenstoffwechsel in Richtung des Knochenabbaus verschiebt. Des Weiteren fördern ROS die Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten, wodurch das Verhältnis von RANKL zu OPG ansteigt. Infolgedessen kommt es über die vermehrte Bindung von RANKL an RANK zu einer verstärkten Aktivierung des NF- κ B-Signalweges, was das Ungleichgewicht der Knochenzellen und somit des Knochenstoffwechsels noch weiter verstärkt (Domazetovic et al. 2017). Durch ihre Funktion als natürliches Antioxidanz sind Polyphenole in der Lage, dem beschriebenen Ungleichgewicht entgegenzuwirken.

Polyphenole entfalten ihre positive Wirkung auf den Knochenstoffwechsel jedoch nicht nur durch den Fang von ROS, sondern sind darüber hinaus auch in der Lage, die Osteoblastendifferenzierung direkt zu fördern, indem sie auf deren aktivierende Transkriptionsfaktoren wie BMPs, Runx2 und Osterix sowie auch auf den Wnt-Signalweg einwirken (Torre 2017). Weiterhin wirken Polyphenole auch über eine Östrogen-ähnliche Wirkung fördernd auf den Knochenaufbau (Weaver et al. 2012).

1.3 Fragestellung

Die positiven Auswirkungen einer polyphenolreichen Ernährung zur Prävention chronischer Erkrankungen unterschiedlicher Organsysteme wurde bereits vielfach anhand von Tierstudien sowie auch anhand von Studien am Menschen belegt. Insbesondere gibt es vielfältige Hinweise auf den gesundheitsfördernden Effekt von Heidelbeeren, welche ebenfalls reichhaltig an Polyphenolen sind. Zunehmend sind in den letzten Jahren auch die Auswirkungen einer polyphenolreichen Ernährung auf Erkrankungen des muskuloskelettalen Systems in den Fokus gerückt. In der vorliegenden Studie soll daher die konkrete Auswirkung einer heidelbeerreichen Ernährung auf den Knochenstatus von Mäusen anhand folgender Fragen untersucht werden:

- Kann eine heidelbeerreiche Ernährung die biomechanischen Eigenschaften eines Knochens hinsichtlich ihrer Stabilität beeinflussen?
- Hat eine heidelbeerreiche Ernährung Einfluss auf die Morphologie der Kortikalis und der trabekulären Struktur?
- Gibt es auf histologischer Ebene Auswirkungen auf die Knochenzellen, zum Einen was deren Anzahl, zum Anderen was deren Tätigkeit im Knochenumbau betrifft?
- Lassen sich Veränderungen hinsichtlich der Expression von Genen des Knochenstoffwechsels feststellen?

Die Effekte einer heidelbeerreichen Ernährung auf den Knochenstatus von Mäusen sollen als Grundlage dafür dienen, diese idealerweise auch für die Ernährung des Menschen als präventive Maßnahme gegen chronische Erkrankungen des Skelettsystems zu nutzen, beispielsweise im Hinblick auf die Osteoporose, einer häufigen Erkrankung insbesondere im hohen Lebensalter.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Studiendesign

Die für die Versuche verwendeten Knochen entstammten ausschließlich weiblichen NMRI-Mäusen (Abb. 2.1, S. 21) und wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Gunter P. Eckert vom Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Goethe-Universität Frankfurt a.M. bereitgestellt. Dort erfolgten Tierhaltung und -versuch, genehmigt durch das Regierungspräsidium Darmstadt (Genehmigungsnummer FU/1062), nach dem aktuellen Tierschutzgesetz.

Für die Studie wurden Femora sowie Wirbelkörper von 42 Mäusen, unterteilt in 3 Gruppen, verwendet:

	Heidelbeergruppe (n=14)	Alte Kontrollgruppe (n=14)	Junge Kontrollgruppe (n=14)
Alter zu Beginn der Fütterung	13 Monate	13 Monate	1 Monat
Alter am Ende der Fütterung (Euthanasie)	20 Monate	20 Monate	3 Monate

Tab. 2.1: Versuchsgruppen

Das Futter der Heidelbeergruppe bestand aus einer modifizierten Spezialdiät C1000 (Altromin, Lage, Deutschland). Pro kg wurden der Spezialdiät 20 g Heidelbeerextrakt hinzugefügt. Die Herstellung des Heidelbeerextraktes erfolgte durch Barbara Shukitt-Hale nach von ihr beschriebenen Vorgehen (Shukitt-Hale et al. 2015) und wurde von der Firma Altromin in das Futter gepresst. Die alte und die junge Kontrollgruppe erhielten eine polyphenolarme Diät, ebenfalls auf der Grundlage der Spezialdiät C1000, welche frei von Vitamin C und synthetischen Antioxidantien, jedoch im Vergleich zum Futter

der Heideleergruppe mit zusätzlichen 2500 IE Vitamin A, 20 mg Vitamin E und 150 µg Selen pro kg Futter angereichert war.



Abb. 2.1: Heidelbeermäuse (a) und junge Kontrollmäuse (b) mit Futter

Bei der Euthanasie wurden zur Auswertung folgende Knochen entnommen:

Knochen	Fixierung und Lagerungstemperatur	Verwendung
Femur links	in NaCl getränkte Kompresse bei -20°C	Biomechanik
Femur rechts	4% PFA bei 4°C	µCT
Wirbel L 1	4% PFA bei 4°C	µCT
Wirbel L 3	4% PFA bei 4°C	Histologie (Paraffin)
Wirbel Th 12	4% PFA bei 4°C	Histologie (Technovit 9100)
Wirbel Th 10	RNA-Later bei -80°C	real-time RT-PCR

Tab. 2.2: Zur Auswertung verwendete Knochen (PFA: Phosphat-gepuffertes Paraformaldehyd)

2.2 Biomechanik

Zur biomechanischen Untersuchung wurde ein Dreipunkt-Biegetest zur Analyse der Parameter Maximalkraft und Biegesteifigkeit durchgeführt. Die Versuche erfolgten mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Anita Ignatius und Herrn Prof. Dr. Lutz Dürselen am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik des Universitätsklinikum Ulm.

2.2.1 Probeneinbettung und Versuchsaufbau

Der bei -20°C in der NaCl-getränkten Kompresse gelagerte linke Femur wurde zunächst auf Raumtemperatur aufgetaut. Nach sorgfältiger Entfernung des umliegenden Weichgewebes wurden sowohl ein Femur (axial, der Femurkopf zeigte nach unten) als auch eine Aluminiumhülse (Durchmesser 8 mm) in einer Klemmhalterung (beides Eigenbau des Institutes für unfallchirurgische Forschung und Biomechanik des Universitätsklinikum Ulm) eingespannt. Auf die Aluminiumhülse wurde Zahnzementkleber iCem Self Adhesive (Kulzer, Hanau, Deutschland) aufgetragen und der Femur in der Klemmhalterung so weit auf die Aluminiumhülse heruntergelassen, dass der Femurkopf komplett mit Kleber bedeckt war (Abb. 2.2).



Abb. 2.2: Aluminiumhülse mit linkem Femur und Zahnzementkleber in der Klemmhalterung (a) sowie zur Messung vorbereiteter Femur (b)

Der Kleber härtete 1 min unter der UV-Polymerisationslampe (Exakt, Norderstedt, Deutschland) aus, danach wurde eine weitere Schicht Kleber aufgetragen, die nochmals 1 min unter UV-Licht aushärtete.

Die Messung erfolgte an der Materialprüfmaschine AllroundLine Z010 (Zwick-Roell, Ulm, Deutschland):

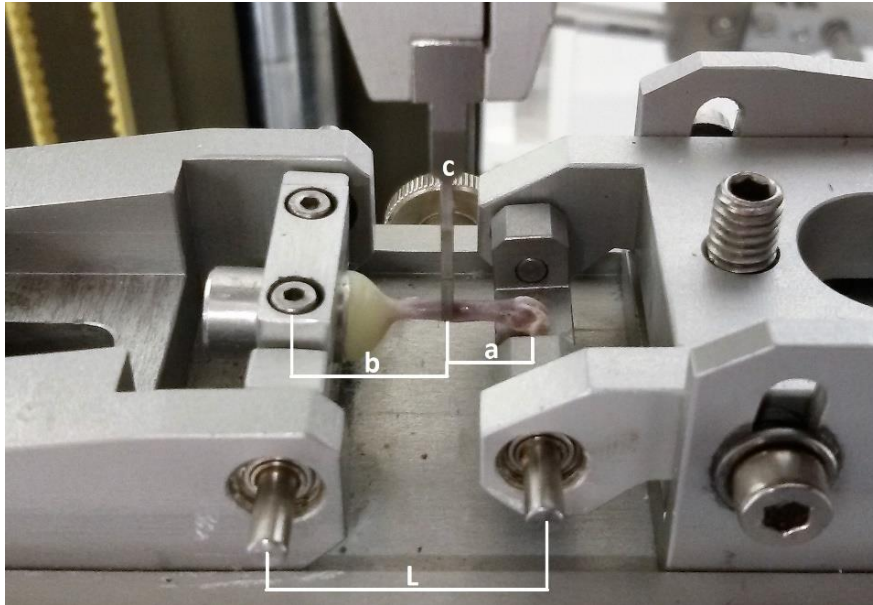


Abb. 2.3: Materialprüfmaschine mit Druckfinne (c), Stützweite (L), Hebelarm (a) und Differenz (b) aus Stützweite und Hebelarm

Die Aluminiumhülse wurde links in der Halterung fixiert, die Femurkondylen lagen rechts auf der mobilen Auflagefläche der Prüfmaschine. Die Stützweite (L) wurde auf 20 mm eingestellt. Anhand der Stellung der Druckfinne (c), deren Positionierung mittig über dem Femur erfolgte, wurde der Hebelarm (a) gemessen (Abb. 2.3). Beide Werte wurden in die mit der Prüfmaschine verbundenen Prüfsoftware testXpert II (Version 3.2, Zwick-Roell) eingetragen.

2.2.2 Ermittlung der Maximalkraft

Zunächst erfolgten 3 Messungen mit einer eingestellten oberen Kraftgrenze von 4 N, mit denen die optimale Anpassung der Femurkondylen an die mobile Auflagefläche für die folgende zerstörende Messung erzielt wurde. Bei dieser wurde eine obere Kraftgrenze von 50 N eingestellt und die Messung bis zum Bruch der Probe durchgeführt. Der von der Software angezeigte Kraftwert beim Probenbruch entsprach der Maximalkraft.

2.2.3 Ermittlung der Biegesteifigkeit

Die Biegesteifigkeit ist definiert als Produkt aus Elastizitätsmodul E und Flächenträgheitsmoment I . Zunächst wurde eine Tangente (K) an die Kraftbiegungskurve (d) angelegt, der annähernd linear verlaufende Bereich festgelegt ($e - f$) und daraus die Steigung berechnet:

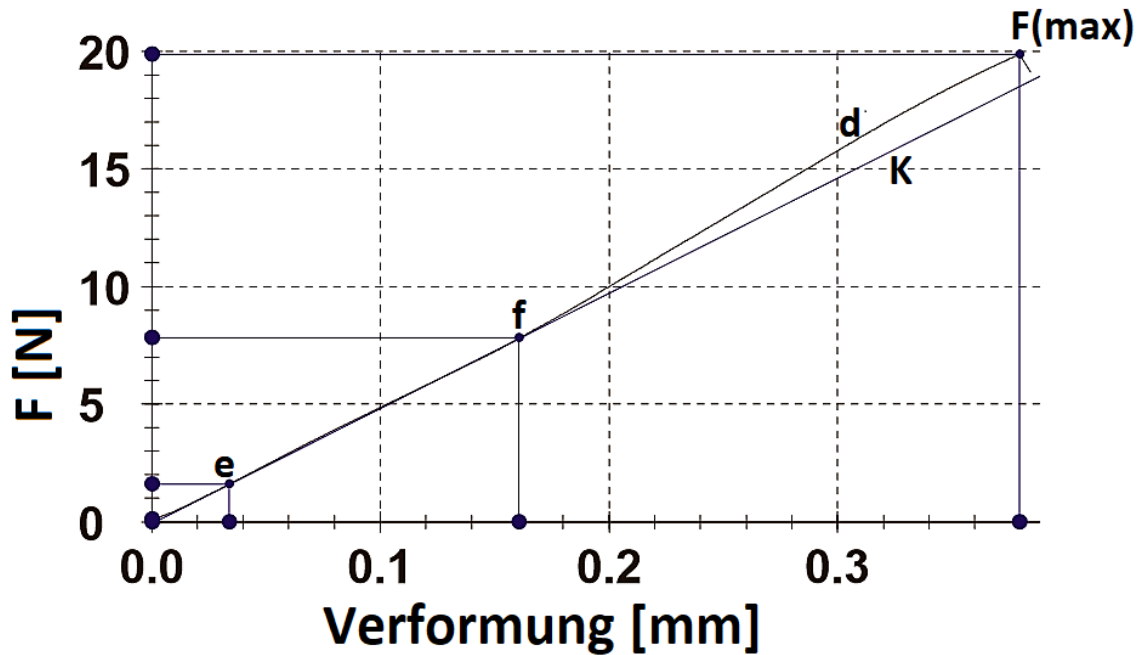


Abb. 2.4: Kraftbiegungskurve (d) mit Probenbruch bei $F(\max)$, Steigungstangente (K) und linear verlaufender Kurvenbereich ($e - f$)

Da der Hebelarm nicht exakt der Hälfte der Stützweite entsprach (Abb. 2.3, S. 23) und es sich somit um eine asymmetrische Dreipunktbiegung handelte, erfolgte die Berechnung der Biegesteifigkeit [Nm^2] nach folgender Formel mit der Steigung k [N/mm], dem Hebelarm a , der Stützweite L und der Differenz b aus Stützweite und Hebelarm (Röntgen et al. 2010):

$$\frac{k * a^2 * b^2}{3 * L}$$

2.3 Mikro-Computertomographie (μCT)

Genauso wie die klinisch genutzte Spiral-Computertomographie arbeitet die μCT mit Röntgenstrahlen, welche von der Röntgenquelle schichtweise aus unterschiedlichen

Richtungen emittiert werden. Treffen die Röntgenstrahlen auf ein Medium, welches hier durch den Probenschlitten um die eigene Achse rotiert wird, werden sie entsprechend des Durchmessers und der Dichte des Mediums durch Absorption abgeschwächt und vom Sensor detektiert (Bouxsein et al. 2010). Die Software des Computers errechnet durch Rückprojektion Transversalschnitte, welche dreidimensional rekonstruiert werden (Feldkamp et al. 1984). Dabei entstehen dreidimensionale isotrope Voxel, deren Größe bei der μ CT aufgrund des geringen Probendurchmessers im Mikrometerbereich liegen (Bouxsein et al. 2010, Engelke et al. 1999).

2.3.1 Datenakquisition und -rekonstruktion

Die rechten Femora wurden mit dem μ CT-Scanner SkyScan 1173 (Software 1.6, Bruker microCT, Kontich, Belgien) von den distalen Kondylen bis zum Trochanter major gescannt. Gleiches erfolgte mit den ersten Lumbalwirbeln, wobei nur die Wirbelkörper quantifiziert wurden. Als Röntgenquelle diente eine Mikrofokusröhre (130 kV, 8 W, $<5 \mu\text{m}$ Brennfleck). Mittels Flachbilddetektor (Hamamatsu 130/300, Matrixgröße 2240x2240 Pixel) wurden die Strahlen detektiert. Zur Verringerung der Strahlenaufhärtung wurde ein Aluminiumfilter (0,5 mm) verwendet.

Die Rotation des Probenschlittens um die eigene Achse erfolgte in Schritten von 0,3 Grad. Gescannt wurde mit einer Röhrenspannung von 40 kV und 200 μA unter Anwendung einer vierfachen Bildmittelung zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses bei einer Belichtungszeit von 1600 ms.

Gespeichert wurden die entstandenen Rohdaten mit einer Tiefe von 16 bit im TIFF-Format. Mit dem Programm NRecon (Version 1.7.0.4, Bruker microCT) erfolgte die dreidimensionale Rekonstruktion der Rohdaten zu BMP-Dateien mit 256 Grauwerten und einer isotropen Voxelgröße von 5,75 μm .

2.3.2 Quantifizierung

Zunächst wurden die rekonstruierten Daten in dem Programm DataViewer (Version 1.5.4.0, Bruker microCT) axial, coronar und sagittal ausgerichtet, sodass im Falle der rechten Femora in der Transversalebene die Kondylen nach kaudal sowie die Facies

patellaris nach ventral zeigte. Im Falle der Wirbel zeigte die Grundplatte nach kaudal sowie die Vorderseite der Wirbelkörper nach ventral.

Der axiale Datensatz wurde mit dem Programm CT-Analyser (Version 1.17.7.1, Bruker microCT) quantifiziert. Hierfür wurden zunächst die zu quantifizierenden Schnitte (*Volume of Interest*, VOI) festgelegt. Bei den Femora wurde im Bereich der Kondylen die Wachstumsfuge, erkennbar an der durchgängigen Knorpelbrücke, aufgesucht.

Als VOI wurden von der Wachstumsfuge ausgehend nach kranial folgende Schnitte gewählt (siehe auch Abb. 2.5, S. 27):

Anzahl Schnitte	Verwendung	Anzahl Schnitte gesamt, kranial der Wachstumsfuge
50	keine	50
310	VOI 1 → Quantifizierung Spongiosa	360
40	Keine	400
80	VOI 2 → Quantifizierung Kortikalis metaphysär	480
420	keine	900
80	VOI 3 → Quantifizierung Kortikalis diaphysär	980

Tab. 2.3: Festlegung der *Volume of Interest* (VOI) der Femora

Bei den Wirbelkörpern wurde zur Festlegung der VOI die knorpelige Grundplatte aufgesucht. Die Schicht kranial der Grundplatte, ab der kein Knorpelgewebe mehr vorhanden war, wurde als kaudale Grenze, die Schicht kaudal der Deckplatte ebenfalls ohne Knorpelgewebe als kraniale Grenze der VOI bestimmt (Abb. 2.6, S. 28). Im Gegensatz zu den Femora wurde somit eine je nach Wirbelkörpergröße individuell unterschiedlich große VOI ausschließlich zur Quantifizierung der Spongiosa festgelegt.

Im letzten Schritt wurden innerhalb der VOI die zu quantifizierenden Regionen (*Region of Interest*, ROI, Tab. 2.4, Abb. 2.5, S. 27 und Abb. 2.6, S. 28) sowie die untere und obere Grauwert-Schwelle (*Lower / Upper Grey Threshold*) festgelegt. Alle Voxel innerhalb dieses Bereichs wurden vom Programm bei der folgenden Quantifizierung als knöcherne Struktur gewertet.

VOI	Anzahl Schnitte	Festlegung der ROI	Lower / Upper Grey Threshold
Femur VOI 1 (Spongiosa)	310	Manuelles Umfahren der Spongiosa alle 10-15 Schnitte mit einem Abstand von wenigen Voxeln zur Kortikalis. Programm interpolierte dazwischenliegende Schnitte.	80 / 255
Femur VOI 2 (Kortikalis metaphysär)	80	Automatische Festlegung durch das Programm, manuelle Korrektur bei fälschlicher Miterfassung von Trabekeln.	85 / 255 (TMD: 90 / 255)
Femur VOI 3 (Kortikalis diaphysär)	80	Siehe Femur VOI 2	85 / 255 (TMD: 90 / 255)
Wirbelkörper (Spongiosa)	variabel	Siehe Femur VOI 1	90 / 255

Tab. 2.4: Festlegung der Region of Interest (ROI) sowie Lower / Upper Grey Threshold (VOI: Volume of Interest; TMD: Tissue Mineral Density)

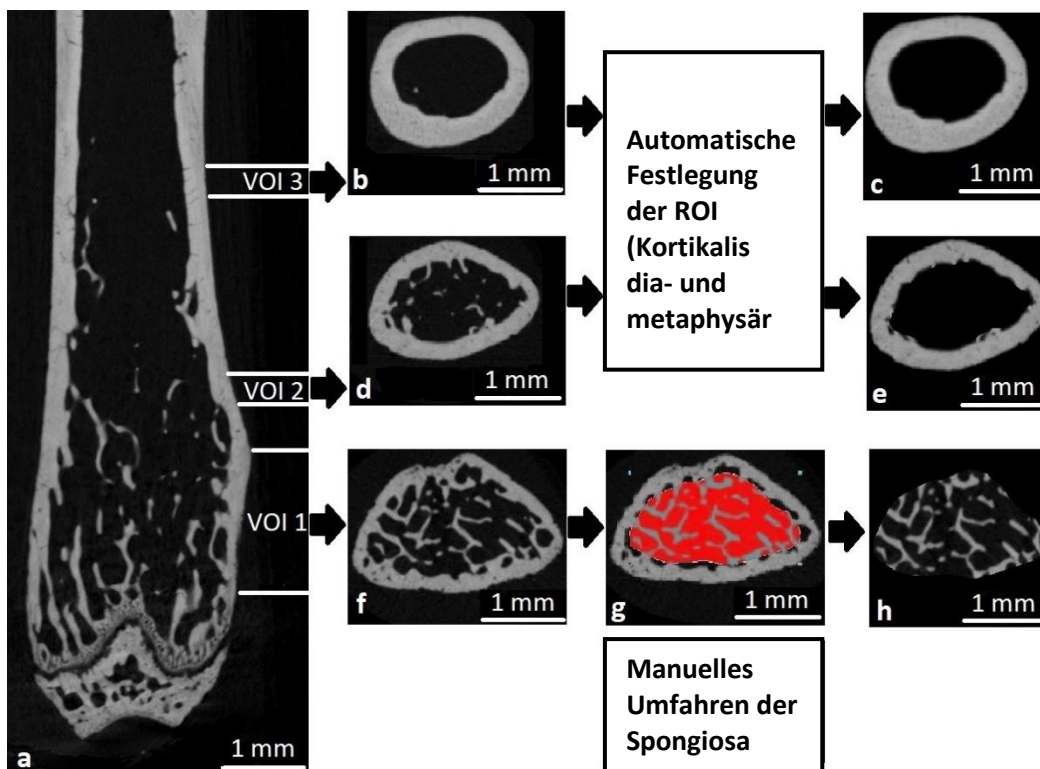


Abb. 2.5: Festlegung der Volume of Interest (VOI (a)) und Region of Interest (ROI (b-h)) des Femurs

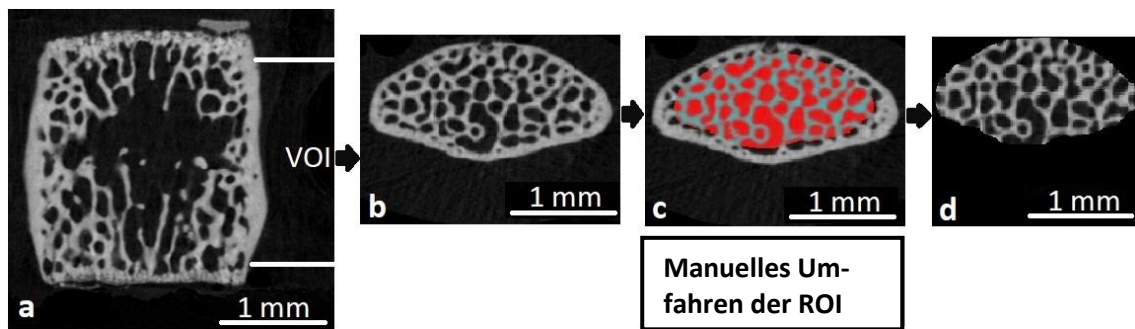


Abb. 2.6: Festlegung der Volume of Interest (VOI (a)) und Region of Interest (ROI (b-d)) des Wirbelkörpers

2.3.3 Morphometrische Parameter

An der Spongiosa wurden relatives Knochenvolumen (*Percent Bone Volume*, BV/TV [%]) sowie durchschnittliche Dicke (*Trabecular Thickness*, Tb.Th [mm]), Abstand (*Trabecular Separation*, Tb.Sp [mm]) und Anzahl der Trabekel (*Trabecular Number*, Tb.N [mm^{-1}]) quantifiziert.

Die Kortikalis wurde auf ihre durchschnittlichen Dicke (*Structure Thickness*, St.Th [mm]), Gesamtquerschnittsfläche (*Mean Total Crossectional Tissue Area*, T.Ar [mm^2]) und Gesamtquerschnittsfläche des rein knöchernen Anteils (*Mean Total Crossectional Object Area*, Obj.Ar [mm^2]) sowie relatives Knochenvolumen (Obj.Ar / T.Ar [%]) untersucht.

Bei der Knochendichtemessung wurden zwei Phantome aus Hydroxylapatit mit einem Durchmesser von 2 mm, ähnlich dem der Mausknöchel, gescannt. Die Konzentration an Hydroxylapatit betrug 0,25 bzw. 0,75 g/cm^3 , anhand der beiden Schwächungskoeffizienten der Phantome wurden die Messwerte kalibriert. Bei Kortikalis und Spongiosa wurde die Dichte des rein knöchernen Anteils (*Tissue Mineral Density*, TMD [g/cm^3]) gemessen, bei der Spongiosa zusätzlich auch die gemittelte Dichte aus knöchernem und weichem Gewebe (*Bone Mineral Density*, BMD [g/cm^3]).

2.4 Histologie und Histomorphometrie

Entnommen wurden 2 Wirbel für folgende Verwendung, wobei ausschließlich die Wirbelkörper ausgewertet wurden:

Wirbel	Einbettung	Färbungen / Nachweise
L 3	Paraffin	Hämatoxylin-Eosin, ALP, TRAP, <i>α-smooth-Muscle-Actin (ASMA)</i>
Th 12	Technovit 9100	Kossa-van Gieson

Tab. 2.5: Zur Analyse entnommene Wirbel und deren Verwendung

2.4.1 Probeneinbettung und Präparateherstellung

Die 3. Lumbalwirbel wurden nach Fixierung für 24 h in 4% Phosphat-gepuffertem Paraformaldehyd (PFA, Roth, Karlsruhe, Deutschland) 6 mal je 5 min in 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,2 – 7,4, Merck, Darmstadt, Deutschland) gespült. Die Entkalkung erfolgte in 10% Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA) aus 17 g Tris (Roth) und 50 g EDTA (Titriplex III, Merck), in 500 ml destilliertem Wasser gelöst (pH 7,0 – 7,4). Anschließend wurden die Proben 1 h unter fließendem Leitungswasser gespült. Am Einbettautomat TP1050 (Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden die Proben zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 h 70%, 2,5 h 80%, 2 h 96%, 3 mal 3 h 100%, Stockmeier, Bielefeld, Deutschland) sowie Xylol (einmal 1 h und 2 mal 45 min, Roth) bei Raumtemperatur dehydriert und dann in Paraffin (3 mal 40 min) bei 58°C eingebettet. Die Schnitte wurden am Rotationsmikrotom HM355S (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) mit einer Schichtdicke von 5 μ m angefertigt.

Das Vorgehen zur Fixierung und Spülung der 12. Thorakalwirbel entsprach dem der 3. Lumbalwirbel. Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei Raumtemperatur unter Schütteln dehydriert. Hierbei blieben die Proben je einen Tag in 70%, 80%, 96%, 4 malig in 100% Ethanol sowie einen Tag in 100% Ethanol p.a. (Merck) und 2 mal je 12 h in Xylol stehen. Präinfiltration sowie Infiltration (alle Technovit 9100 Komponenten von Kulzer) erfolgten bei 4°C auf dem Vibramax 100 (Heidolph, Schwabach, Deutschland, Tab. 2.6, S. 30).

Lösung	Zusammensetzung	Dauer
Präinfiltration 1	125 ml Technovit 9100 Basisflüssigkeit stabilisiert, 125 ml Xylol	1 Tag
Präinfiltration 2	250 ml Technovit 9100 Basisflüssigkeit stabilisiert, 1,25 g Technovit 9100 Härter 1	1 Tag
Präinfiltration 3	250 ml Technovit 9100 Basisflüssigkeit entstabilisiert (vorheriger Durchlauf durch einen Trichter mit 50 g Aluminiumoxid (Roth)), 1,25 g Technovit 9100 Härter 1	1 Tag
Infiltration	250 ml Technovit 9100 Basisflüssigkeit entstabilisiert s.o., 20 g Technovit 9100 PMMA (Polymethylmethacrylat)- Pulver, 1 g Technovit 9100 Härter 1	6 Tage

Tab. 2.6: Präinfiltration und Infiltration bei der Technovit 9100 Einbettung

Der letzte Schritt bestand in der Einbettung und Polymerisation für 2 Tage bei -4°C in Polymerisationslösung (alle Komponenten von Kulzer) aus Stammlösung A zu 90% (500 ml Technovit 9100 Basislösung entstabilisiert, entsprechend der Präinfiltration 3 wie in Tab. 2.6 beschrieben, 80 g Technovit 9100 PMMA (Polymethylmethacrylat)-Pulver, 3 g Technovit 9100 Härter 1) und Stammlösung B zu 10% (44 ml Technovit 9100 Basislösung entstabilisiert, 17,6 ml Technovit 9100 Härter 2, 2 ml Technovit 9100 Regler). Die entstandenen Probenblöcke wurden mit der Diamant Bandsäge Exakt 310 (Exakt) verkleinert, sodass am Rotationsmikrotom RM2155 (Leica) Schnitte mit einer Dicke von $5\ \mu\text{m}$ angefertigt werden konnten. Hierfür wurden Folien des Typs Cryofilm 2C(9) (Kawamotos Section-Lab Co. Ltd., Hiroshima, Japan) nach Erreichen der gewünschten Schnittebene auf den Probenblock geklebt und beim Schneidevorgang mit dem daran klebenden Präparat mit einer Pinzette festgehalten, sodass keine Falten am Präparat entstanden.

2.4.2 Färbungen

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung): Zu Beginn wurden die Präparate 2 mal 5 min in Xylol sowie für jeweils 5 min in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) entparaffiniert und 5 min in destilliertem Wasser rehydriert. Die Kernfärbung erfolgte mit

der Hämatoxylin-Lösung nach Gill (Merck) für 10 min mit anschließendem Abspülen mit destilliertem Wasser sowie Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 min und Inkubieren in destilliertem Wasser für 5 min. Die Färbung des Bindegewebes wurde mit 1% Eosin G (Merck) für 1 min mit folgendem Abspülen und Inkubieren für 5 min in destilliertem Wasser durchgeführt. Abschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol (umgekehrtes Vorgehen zur Entparaffinierung) dehydriert und mit DePex (Serva, Heidelberg, Deutschland) eingedeckelt.

Enzymhistochemischer Nachweis der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP): Entparaffinierung und Rehydrierung wurden entsprechend dem Vorgehen bei der HE-Färbung durchgeführt. Nach Spülung für 10 min in 0,1 M Natriumacetatpuffer (pH 5,2, Merck) wurden die Präparate für 30 min bei 37°C in der Substratlösung inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Die Substratlösung bestand aus 35 mg Naphthol-AS-TR-Phosphat, 125 µl N-N-Dimethylformamid, 35 mg Echtrotsalz und 57,5 mg di-Natriumtartrat-Dihydrat (alle Komponenten von Merck) in 25 ml 0,1 M Natriumacetatpuffer (pH 5,2) gelöst. Mit Shandon Instant Hämatoxylin (Thermo Fisher Scientific) wurden die Präparate 1 min gegengefärbt sowie 1 min in destilliertem Wasser gespült, 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut, erneut 5 min in destilliertem Wasser gespült und anschließend mit Kaisers Glyceringelatine (Roth) eingedeckelt.

Enzymhistochemischer Nachweis der alkalischen Phosphatase (ALP): Entparaffinierung und Rehydrierung wurden entsprechend dem Vorgehen bei der HE-Färbung durchgeführt. Nach Inkubation für 10 min in 0,1 M Tris-Puffer (pH 9,4) erfolgte der Nachweis mit Phosphatase-Substrat BCIP/NBT (SeraCare Life Sciences, Milford, Massachusetts, USA) für 1 h bei 37°C mit anschließendem Abspülen und Inkubieren für 3 mal 5 min in destilliertem Wasser. Mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat (Roth) und anschließendem Spülen in destilliertem Wasser für 3 mal 5 min wurden die Präparate gegengefärbt. Die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol erfolgte wie bei der HE-Färbung, eingedeckelt wurden die Präparate mit Eukitt (Merck).

Immunhistochemischer Nachweis von α -smooth-Muscle-Actin (ASMA): Der Nachweis erfolgte unter der Verwendung von Negativkontrollen. Die Entparaffinierung wurde für 2 mal 5 min in Xylol, 10 min in Aceton (Stockmeier), 10 min in einem Gemisch aus je 50% Aceton und Waschpuffer TBS-X sowie 2 mal 5 min in TBS-X durchgeführt. Zur Herstellung des Waschpuffers TBS-X wurden 250 μ l Triton X-100 (Merck) in 1 l Tris-NaCl-Puffer (pH 7,4), bestehend aus 6,06 g Tris und 8,77 g NaCl in 1 l destilliertem Wasser, gelöst. Nach Blockieren für 10 min in 3% Wasserstoffperoxid (Merck) in TBS-X und erneutem Spülen für 2 mal 5 min in TBS-X wurden die Präparate mit dem primären Antikörper des Kaninchens gegen ASMA (OriGene Technologies, Rockville, Maryland, USA) 1:100, die Negativkontrollen mit *Antibody Diluent* (Dako, Wiesentheid, Deutschland) 24 h bei 4°C inkubiert.

Die Präparate wurden zunächst mit TBS-X abgespült, dann 2 mal 5 min in TBS-X inkubiert. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde mit biotinyliertem IgG der Ziege gegen Kaninchen (Vector, Burlingame, California, USA) 1:500 in 1% bovinem Serumalbumin (Merck) in Tris-NaCl-Puffer (pH 7,4) mit 12,5% Mausserum (Merck) für 30 min bei Raumtemperatur mit anschließendem Abspülen und 2 mal 5 min Inkubieren in TBS-X durchgeführt. Es folgte die Inkubation mit Vectorstain Elite ABC HRP Kit (Vector) für ebenfalls 30 min bei Raumtemperatur und entsprechenden Spülvorgängen. Nach weiterem Spülen in destilliertem Wasser für 5 min wurde der Nachweis mit der Inkubation mit NovaRED HRP Substrate Kit (Vector) für 5 min sowie erneutem Abspülen und Inkubieren für 3 mal 5 min in destilliertem Wasser abgeschlossen. Zur besseren Beurteilung erfolgte eine Gegenfärbung mit Shandon Instant Hämatoxylin für 20 sec mit folgendem Abspülen mit destilliertem Wasser, Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 min und Inkubieren in destilliertem Wasser für 5 min. Die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol sowie das Eindecken mit DePex erfolgte entsprechend des Vorgehens bei der HE-Färbung.

Kossa-van Gieson-Färbung: Zunächst wurden die Präparate 3 mal 10 min in 2-Methoxyethylacetat (Merck) sowie jeweils 5 min in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) entacrylliert und 5 min in destilliertem Wasser rehydriert. Die von Kossa-Färbung wurde mit 3% Silbernitrat (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) für 10 min mit anschließendem Spülen in destilliertem Wasser für 3 mal 2 min durchgeführt.

Anschließend wurde das Silbernitrat mit 10% Natriumkarbonat-Formaldehyd (10% Natriumkarbonat (Roth) und 25 ml 37% Formaldehyd (Merck) mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt) für 2 min und Spülen unter fließendem Leitungswasser für 8 min reduziert. Nach Fixieren in 5% Natriumthiosulfat (Merck) für 5 min und Spülen in destilliertem Wasser für 2 mal 2 min wurden die Präparate mit 0,8% Methylgrün (1 g Methylgrün (Roth) und 25 ml Ethanol in 100 ml destilliertem Wasser gelöst) für 8 min sowie erneutem Spülen in destilliertem Wasser für 3 mal 2 min gegengefärbt. Die van Gieson-Färbung erfolgte mittels Eisenhämatoxylin nach Weigert (Roth) für 6 min mit Spülen unter fließendem Leitungswasser für 8 min sowie der van Gieson-Färbelösung (Waldeck, Münster, Deutschland) für 5 min. Abschließend wurden die Präparate 3 mal in 96% und 1 mal in 100% Ethanol wenige Sekunden eingetaucht, 2 mal 5 min in Xylol inkubiert und mit DePex eingedeckelt.

2.4.3 Histomorphometrie

Die Fotodokumentation für die anschließende Histomorphometrie erfolgte am Mikroskop Leica DM5500B (Leica) mit dem 10x Objektiv über die daran angeschlossene Kamera Leica DCF 7000 T (Auflösung 1920x1440 Pixel, Leica) mit der Software Leica Application Suite X (Leica) im LIF-Format. Gespeichert und ausgewertet wurden die entstandenen Datensätze im TIFF-Format. Zunächst wurde mit Adobe Photoshop CS 4 (Version 11, 64 bit, Adobe Systems, San José, California, USA) eine Maßstableiste (200 µm) eingefügt. Die Festlegung der ROI, die bei allen Färbungen aus der Spongiosa ausschließlich der Wirbelkörper ohne Mitnahme der Kortikalis bestand, sowie aller weiteren zur Auswertung notwendigen Parameter erfolgten durch manuelles Umfahren mit Image-Pro Premier 9.2 (64 bit, Media Cybernetics, Rockville, Maryland, USA).

HE-Färbung (Abb. 2.7, S. 34): Zunächst wurden größere venöse Plexus, wenn vorhanden, gemessen (gelb) und deren Fläche von der der ROI (Innenseite der Kortikalis, grün) abgezogen. Anschließend wurde die Fläche aller Trabekel gemessen (blau) und der Knochenmarkraum, der von Trabekeln umschlossen war (grün), von der Trabekelfläche abgezogen. Ausgewertet wurde dann der Quotient aus Trabekelfläche und ROI [%].

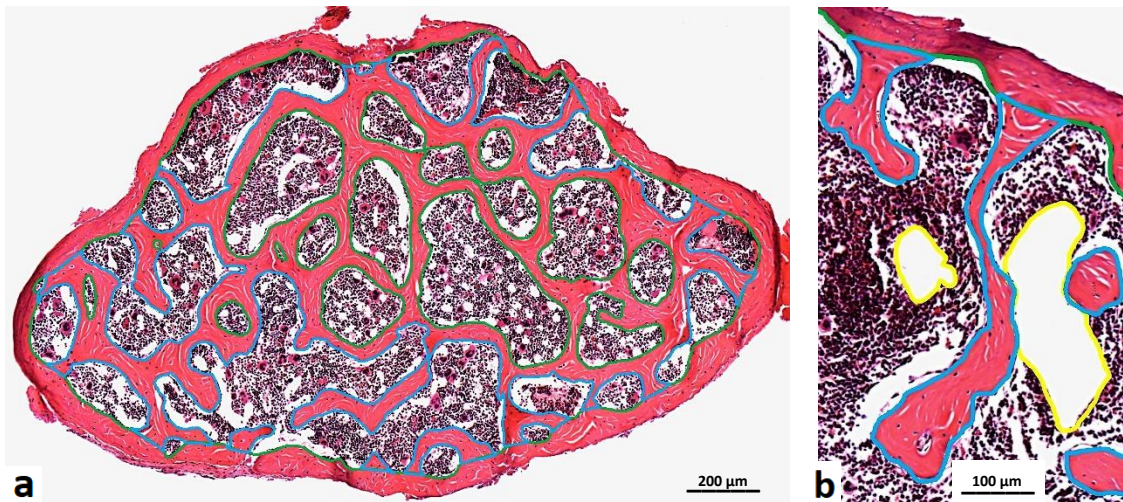


Abb. 2.7: HE-Färbung ausgewertet (a), HE-Färbung mit venösem Plexus (b)

Enzymhistochemischer Nachweis von TRAP (Abb. 2.8): Da die Zellkerne nicht immer eindeutig erkennbar waren, konnten TRAP-positive Zellen häufig nicht sicher als Osteoklasten identifiziert werden. Daher wurde die Trabekeloberfläche in Oberflächen mit anliegenden TRAP-positiven (gelb) und TRAP-negativen (blau) Zellen unterteilt und ausgemessen. Ausgewertet wurde der Quotient aus TRAP-positiver und gesamter Trabekeloberfläche [%].

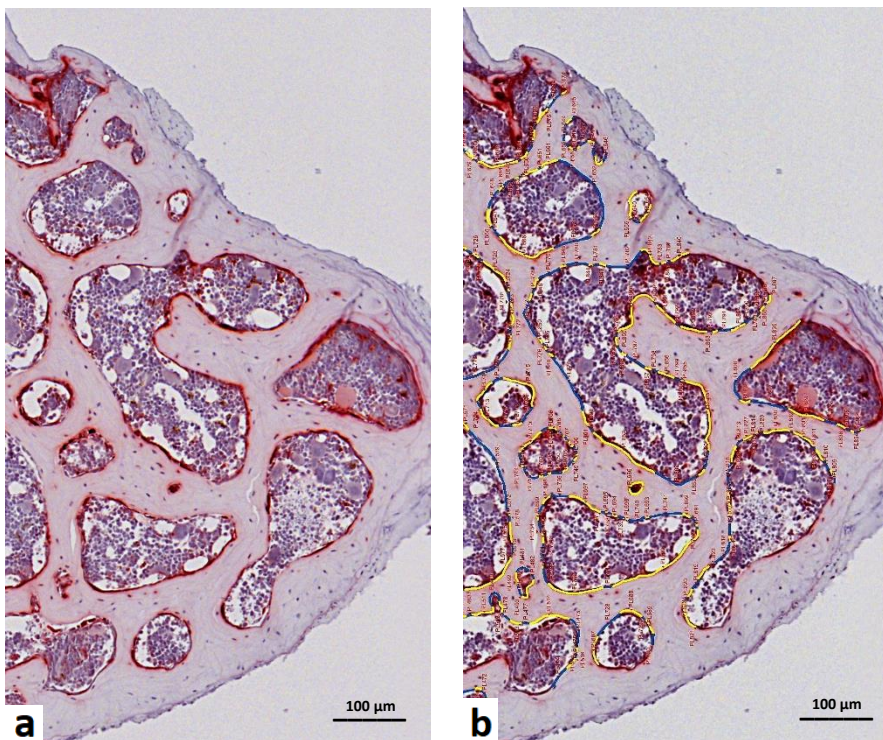


Abb. 2.8: Nachweis von TRAP vor (a) und nach der Auswertung (b)

Enzymhistochemischer Nachweis von ALP (Abb. 2.9): Auf die Auswertung wurde verzichtet, da das Enzym kaum nachweisbar war. Bei einer internen Positivkontrolle (Mauswirbel) war es stark ausgeprägt.

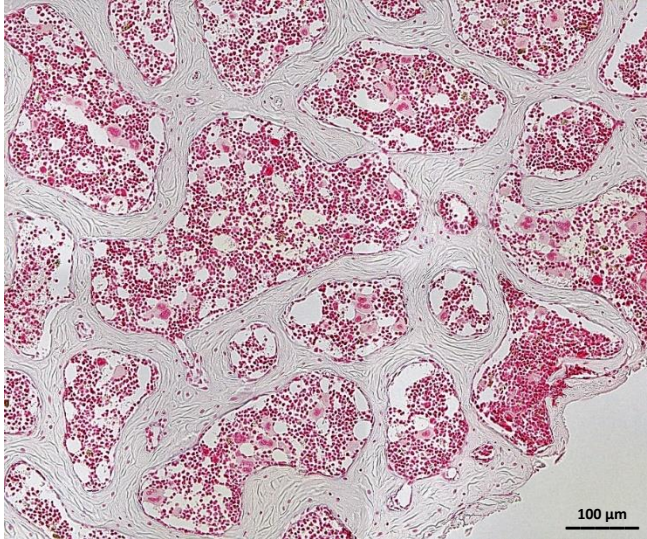


Abb. 2.9: Fehlender Nachweis von ALP

Immunhistochemischer Nachweis von ASMA (Abb. 2.10): Sowohl quer als auch längs angeschnittene ASMA-positive Gefäße wurden gezählt, dabei doppelte Zählungen offensichtlich mehrfach angeschnittener Gefäße vermieden. Ausgewertet wurde der Quotient aus ASMA-positiven Gefäßen und Fläche der ROI (grün), angegeben in Gefäßen pro mm^2 [mm^{-2}]. Bei den verwendeten Negativkontrollen war keine Färbung nachzuweisen.

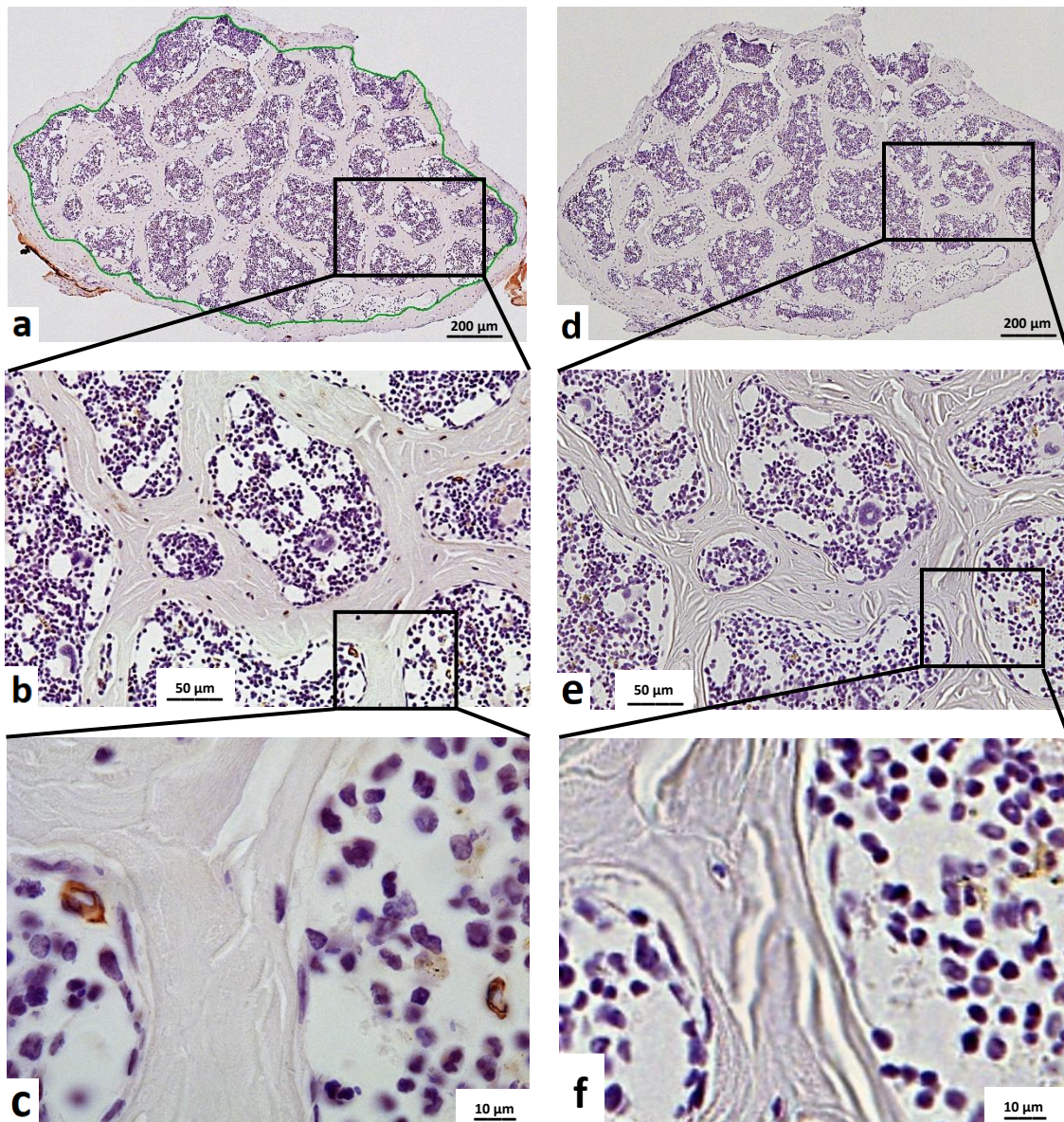


Abb. 2.10: Nachweis von ASMA-positiven Gefäßen (a-c), Negativkontrolle (d-f)

Kossa-van Gieson-Färbung (Abb. 2.11): Die Trabekeloberfläche wurde, unterteilt in mineralisierte Oberfläche (grün) und Oberfläche mit randständigem Osteoid (gelb), ausgemessen. Ausgewertet wurde der Quotient aus Oberfläche mit randständigem Osteoid und Gesamtoberfläche [%].

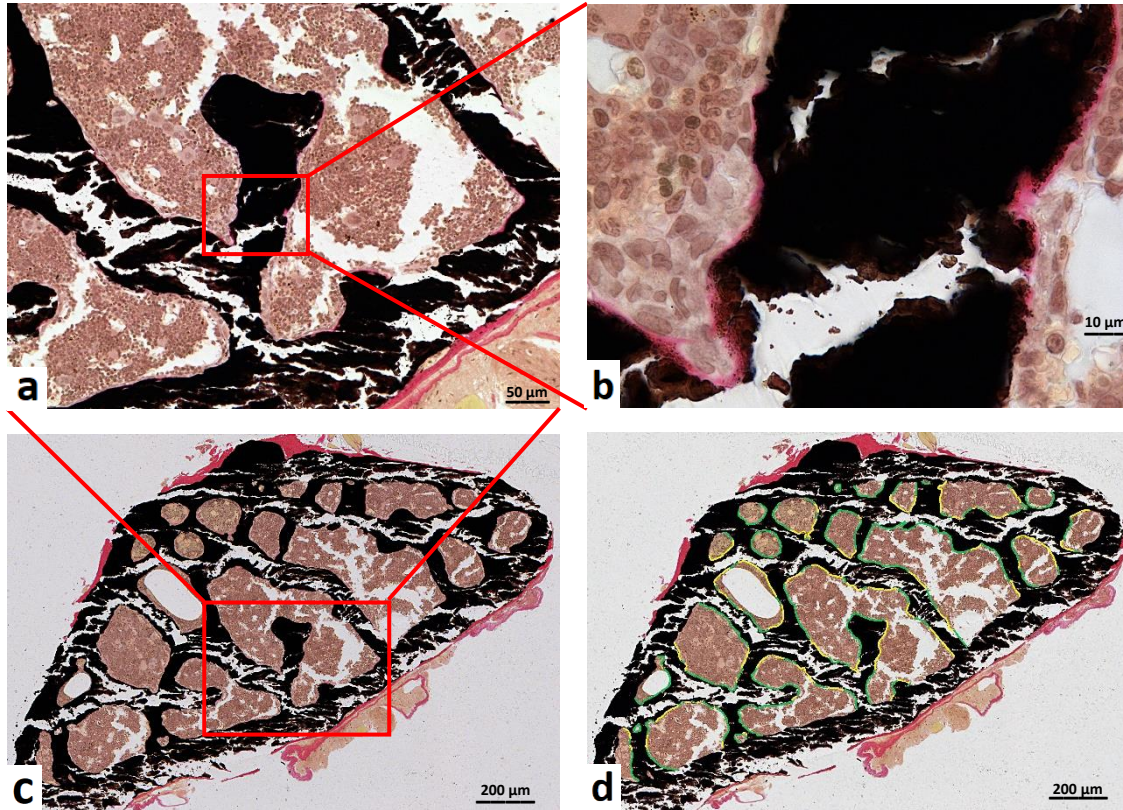


Abb. 2.11: Kossa-van Gieson-Färbung zum Nachweis von Osteoid vor (a-c) und nach der Auswertung (d)

2.5 Real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (real-time RT-PCR)

Die real-time RT-PCR wurde zur Bestimmung der relativen Genexpression verschiedener Gene des Knochenstoffwechsels mit β -Actin als Referenzgen durchgeführt.

2.5.1 RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA erfolgte mittels RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Der in RNA-Later (Qiagen) gelagerte 10. Thorakalwirbel wurde zusammen mit 1 ml Qiazol (Kit-Bestandteil) und einer Mahlkugel (Zirkonoxid, 5 mm, Kobe, Marburg, Deutschland) 1 min bei 30 Hz in der Schwingmühle MM 400 (Retsch,

Haan, Deutschland) homogenisiert und anschließend bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl Chloroform (Roth) sowie Schütteln für 15 sec, erneuter Inkubation für 3 min und Zentrifugation (Mikro 220 R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) bei 22000 G für 15 min bei 4°C wurde das Homogenat in drei Phasen getrennt. Die wässrige obere Phase (ca. 600 µl) mit der RNA wurde unter Vermeidung der Kontamination durch die mittlere Phase abpipettiert. Nach Zugabe der gleichen Menge an 70% Ethanol p.a. und Mischen wurden 700 µl auf ein *RNeasy Mini Spin Column* (Kit-Bestandteil) aufgetragen. Dieses wurde dann in einem 2 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) platziert und bei 8000 G 15 sec bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend der Durchfluss verworfen. Die restliche Probe wurde nun ebenfalls auf die Säule aufgetragen, zentrifugiert und der Durchfluss erneut verworfen. Die nächsten Schritte bestanden aus drei weiteren, dem vorherigen Prozedere entsprechenden Durchgängen, davon einmal nach Auftragen von 700 µl Buffer RW1 sowie zweimal nach Auftragen von 500 µl Buffer RPE (beides Kit-Bestandteile), jeweils mit Zentrifugation und Durchflussverwerfung. Es folgte 1 min Zentrifugation bei 22000 G bei Raumtemperatur in einem neuen 2 ml Reaktionsgefäß. Zum Schluss wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) platziert, 30 µl RNase-freies Wasser (Qiagen) aufgetragen und jeweils bei Raumtemperatur 5 min inkubiert sowie bei 8000 G 1 min zentrifugiert. Das entstandene Eluat wurde bei -80°C gelagert.

Zur Messung des RNA-Gehalts wurde zunächst das Spektrophotometer NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) mit 1 µl RNase-freiem Wasser geeicht und dann zur Bestimmung der Konzentration 1 µl des Eluats aufgetragen. Als Maß für die Reinheit der Probe wurde der Quotient aus den Absorptionswerten bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Er lag durchweg zwischen 1,8 und 2,2, was als Bereich einer ausreichenden Reinheit festgelegt wurde.

2.5.2 cDNA-Synthese

Das Umschreiben der im vorhergehenden Schritt isolierten RNA in cDNA erfolgte mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) im TC-3000 Thermal Cycler (Cole-Parmer, Vernon Hills, Illinois, USA). Zunächst wurde aus dem zuvor berechneten RNA-Gehalt das Volumen an Probe bestimmt, das 1,5 µg RNA enthält. Zusammen mit 3 µl gDNA Wipeout Buffer (Kit-Bestandteil) und dem Volumen an RNase-freiem Wasser,

das für ein Gesamtvolumen von 21 µl notwendig war, wurde die Probe zur Elimination genomischer DNA an zentrifugiert und 5 min bei 42°C inkubiert. 14 µl wurden für den RT+ Ansatz, 7 µl für den RT- Ansatz als Negativkontrolle der Elimination genomischer DNA bei der folgenden real-time RT-PCR verwendet. Für die reverse Transkription wurde jedem RT+ Ansatz 6 µl Mastermix aus 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase (beim RT- Ansatz RNase-freies Wasser), 4 µl Quantiscript RT Buffer und 1 µl RT Primer Mix (alles Kit-Bestandteile) hinzugegeben und 30 min bei 42°C sowie zur Inaktivierung der Enzyme 3 min bei 95°C inkubiert. Der RT+ Ansatz wurde mit 140 µl, der RT- Ansatz mit 70 µl RNase-freiem Wasser auf eine Verdünnung von 1:8 ergänzt und bei -20°C gelagert.

2.5.3 Real-time RT-PCR

Zur Etablierung genspezifischer Primer und Kontrolle der Effizienz der real-time RT-PCR im LightCycler 2.0 (Roche, Basel, Schweiz) mit der LightCycler Software 4.1 (Roche) wurde für jeden Primer (Eurofins Scientific, Luxemburg, Luxemburg, Tab. 2.7, S. 40) eine Standardkurve angefertigt, bei der folgende Verdünnungen in Doppelbestimmung verwendet wurden: pur, 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000. Als cDNA wurde hierfür eine Positivkontrolle (Mauswirbel) eingesetzt.

Jeweils 4 µl cDNA wurden in LightCycler *Capillaries* (Roche) mit 5 µl QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen), 0,8 µl RNase-freiem Wasser und 0,2 µl Primern versetzt. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle, bei der die cDNA durch Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen, Deutschland) ersetzt wurde, angesetzt. Nach Anzentrifugieren wurde das folgende real-time RT-PCR-Programm durchgeführt, was später auch für die Knochen der Versuchstiere verwendet wurde. Zu Beginn wurde die cDNA 5 min bei 95°C denaturiert. Es folgten 40 Zyklen, bestehend aus einer erneuten Denaturierung für 10 sec bei 95°C und Primer-Annealing sowie Elongation für 30 sec bei 60°C. Zur Überprüfung der Spezifität der real-time RT-PCR sowie zum Ausschluss von Primer-Dimeren diente die Schmelzkurve, bei der die Temperatur von 65°C um 0,1°C pro sec auf 95°C erhöht wurde. Zum Schluss kühlte das Gerät die PCR-Produkte auf 4°C herunter.

Das Ziel der Etablierung war eine PCR-Effizienz von > 1,9 bzw. > 90% bei einem gemessenen *Cycle Threshold* (Ct-Wert) zwischen 15 und 18 der unverdünnten Probe.

Primer	<i>Accession Number</i>	<i>forward</i>	<i>reverse</i>	Produkt (Basenpaare)
β-Actin	NM_007393.3	TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA	GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA	165
RANKL	NM_011613	TCC TGT ACT TTC GAG CGC AG	TCA GGT AGT GTG TCT TCA CTC TC	136
Cathepsin K	NM_007802	GAG GCG GCT ATA TGA CCA CT	CTT TGC CGT GGC GTT ATA CA	119
Sclerostin	NM_024449	GCC TCC TCC TGA GAA CAA CC	GGC ATG GGC CGT CTG TC	143
Osteoprotegerin (OPG)	NM_008764	ACT TCA TCG AAA GCA CCC TGT	TGG TAG GAA CAG CAA ACC TGA	181
Alkalische Phosphatase (ALP)	NM_007431	TCA GCT AAT GCA CAA TAT CAA GG	TCC ACA TCA GTT CTG TTC TTC G	87
Connexin 43	NM_010288	TGC TTC CTC TCA CGT CCC AC	CGC GAT CCT TAA CGC CCT TG	127
RANK	NM_009399	CAT CTC GGA CGG TGT TGC	ATC TTC TTC ATT CCA GGT GTC C	129
Osteocalcin	NM_007541	TTC TGC TCA CTC TGC TGA CC	TAT TGC CCT CCT GCT TGG AC	111
Kollagen 1a1	NM_007742	TGG CAT CCC TGG ACA GCC TG	ATG GGG CCA GGC ACG GAA AC	144

Tab. 2.7: Verwendete Primer

Entsprechend des etablierten Vorgehens konnte die real-time RT-PCR für jedes Zielgen anhand des RT+ Ansatzes der zuvor synthetisierten cDNA in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Im Falle einer zu starken Exprimierung eines Gens, was bei ermittelten Ct-Werten von <15 angenommen wurde (β-Actin, Cathepsin K, Osteocalcin), wurde statt der etablierten 4 µl cDNA 1 µl verwendet, was wiederum mit 3,8 µl statt 0,8 µl RNase-freiem Wasser ausgeglichen wurde. Neben dem RT- Ansatz als Kontrolle bei

nicht Intron spannenden Primern (Connexin 43) und der Negativkontrolle mit Aqua ad injectabilia wurde zur Bestimmung der PCR-Effizienz eine Positivkontrolle (Mauswirbel) in Doppelbestimmung angesetzt.

Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte anhand der von der Software ermittelten Ct-Werte der doppelbestimmten RT+ Ansätze nach der Δ Ct- Methode (Pfaffl 2001). Dafür wurde zur Berechnung der Δ Ct-Werte für jedes Zielgen jeder Probe jeweils der Mittelwert aus der Doppelbestimmung gebildet und davon der entsprechend doppelbestimmt gemittelte Ct-Wert des Referenzgens β -Actin abgezogen. Anschließend wurden $\Delta\Delta$ Ct-Werte aus der Differenz zwischen Δ Ct-Wert und dem Mittelwert der Δ Ct-Werte der alten Kontrollgruppe bestimmt. Die relative Genexpression wurde anhand folgender Formel berechnet (Pfaffl 2001):

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS (Versionen 23 und 24, IBM, Armonk, New York, USA). Zunächst wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test als Test auf die Normalverteilung durchgeführt. Bei normalverteilten Messwerten folgte der t-Test bei unabhängigen Stichproben, welcher bei Signifikanz mittels Bonferoni-Holm-Prozedur korrigiert wurde. Im Falle nicht normalverteilter Werte wurde der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Mann-Whitney-Test bei Signifikanz durchgeführt. Als signifikant wurden p-Werte $\leq 0,05$, als Tendenz p-Werte $< 0,06$ gewertet.

Graphisch werden die Ergebnisse als Box-Whisker-Plot dargestellt. Hierbei enthält die Box als durchgezogene Linie den Median und wird oben durch das 75., unten durch das 25. Perzentil begrenzt, sodass sie die mittleren 50% der Werte beinhaltet. Die *Whiskers* reichen bis zum Anderthalbfachen der Höhe der Box oder, wenn im oberen bzw. unteren Grenzbereichen der *Whiskers* keine Werte vorhanden sind, bis zum größten bzw. kleinsten Wert. Extremwerte, die das Anderthalbfache der Höhe der Box überschreiten, werden mit einem Kreis dargestellt. Signifikanzen mit p-Werten $\leq 0,05$ sind mit einem Stern (*), p-Werte $\leq 0,01$ mit 2 (**), p-Werte $\leq 0,001$ mit 3 Sternen (***) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Biomechanik

Nach der Messung mittels Dreipunkt-Biegetest wurden die Parameter Maximalkraft und Biegesteifigkeit analysiert. Von jeder Gruppe wurden jeweils zehn linke Femora randomisiert ausgewählt und analysiert.

	Heidelbeer- gruppe (n=10)	Alte Kontroll- gruppe (n=10)	Junge Kontroll- gruppe (n=10)
Maximalkraft [N]	14,6 ± 2,6	17,3 ± 2,7	11,8 ± 1,4
Biegesteifigkeit [Nm ²]	6025 ± 1067	6733 ± 1346	3716 ± 423

Tab. 3.1: Datentabelle Biomechanik (Mittelwert ± Standardabweichung)

Sowohl die Femora der Heidelbeer-, als auch die der alten Kontrollgruppe brachen bei steigender Druckbelastung durchschnittlich später als die der jungen Kontrollgruppe, was auch statistisch jeweils mit einer signifikant größeren Maximalkraft nachgewiesen werden konnte ($p = 0,012$ bzw. $0,000$). Des Weiteren zeigten die Femora der alten Kontrollgruppe eine signifikant größere Maximalkraft als die der Heidelbeergruppe ($p = 0,034$, Tab. 3.1, Abb. 3.1).

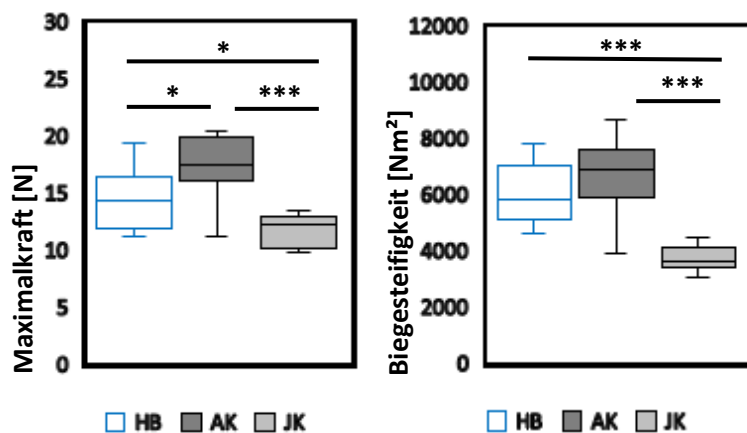


Abb. 3.1: Statistik Biomechanik (HB: Heidelbeergruppe; AK: Alte Kontrollgruppe; JK: Junge Kontrollgruppe; Signifikanzen: $p \leq 0,05$: (*); $p \leq 0,001$: (***)

Ein ähnliches Bild bot die Analyse der Biegesteifigkeit. Hier wiesen Heidelbeer- und alte Kontrollgruppe hochsignifikant größere Werte als die junge Kontrollgruppe auf (jeweils $p < 0,001$). Die Biegesteifigkeit der Femora der alten Kontrollgruppe gegenüber denen der Heidelbeergruppe ergab keinen signifikanten Unterschied (Tab. 3.1, Abb. 3.1, S. 42).

3.2 Mikro-Computertomographie (μ CT)

In der μ CT wurden die Spongiosa der ersten Lumbalwirbelkörper, des Weiteren sowohl Spongiosa als auch meta- und diaphysäre Kortikalis der rechten Femora quantifiziert. Analysiert wurden jeweils alle 42 bei der Euthanasie entnommenen Knochen, wobei drei Wirbel und zwei Femora aufgrund von Materialbrüchen bei der Präparation oder Knochentumoren ausgeschlossen wurden. Zur Veranschaulichung der trabekulären Morphologie wurden beispielhaft von jeder Gruppe dreidimensional rekonstruierte Bilder mit dem Programm Analyze 12.0 (AnalyzeDirect, Overland Park, Kansas, USA) erstellt.

3.2.1 Spongiosa Wirbelkörper L 1

Morphologisch auffällig war ein quantitativer Unterschied an Trabekeln, was das Alter der Knochen bzw. der Versuchstiere bei der Euthanasie betraf. So wiesen die ersten Lumbalwirbelkörper sowohl der Heidelbeer-, als auch der alten Kontrollgruppe (beide zum Zeitpunkt der Euthanasie 20 Monate alt) weniger Trabekel als die der jungen Kontrollgruppe (3 Monate) auf (Abb. 3.2).

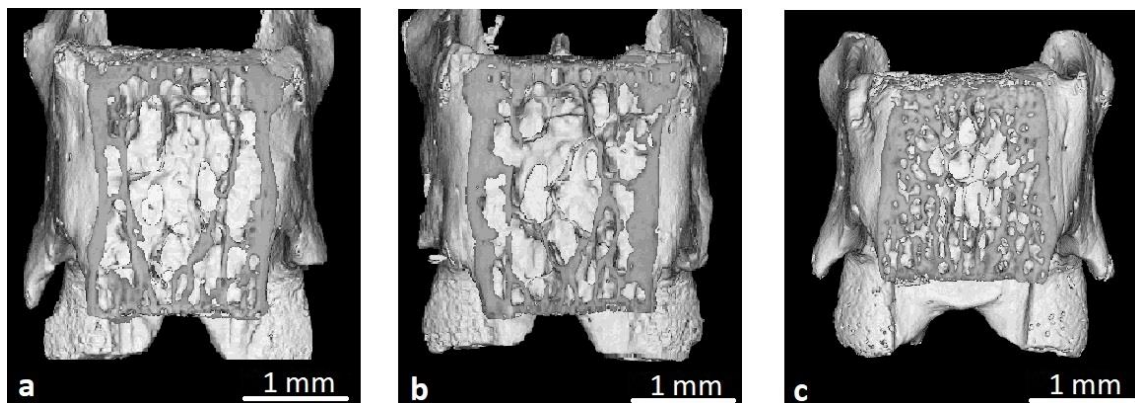


Abb. 3.2: Dreidimensionale Rekonstruktion der ersten Lumbalwirbel unter Entfernung der ventralen Kortikalis mit Blick auf die Spongiosa. Morphologisch deutlich weniger Trabekel bei der Heidelbeer- (a) und der alten Kontroll- (b) als bei der jungen Kontrollgruppe (c).

Dieser morphologische Unterschied spiegelte sich auch in der Quantifizierung bzw. in der Statistik wider. Zwar war das relative Knochenvolumen (BV/TV) der Heidelbeer- und der alten Kontrollgruppe bei jeweils kleinerem Mittelwert nicht signifikant, jedoch waren sowohl die Trabekelzahl (Tb.N) signifikant kleiner (jeweils $p = 0,009$) als auch der Trabekelabstand (Tb.Sp) signifikant größer ($p = 0,004$ bzw. $0,007$) als bei der jungen Kontrollgruppe. Die Trabekel der 20 Monate alten Versuchstiere zeigten zudem eine größere Streuung in Bezug auf BV/TV und Tb.N als die der jungen Kontrollgruppe (Tab. 3.2 und Abb. 3.3, S. 45). Keine Auffälligkeiten gab es in der Trabekeldicke (Tb.Th).

	Heidelbeergruppe (n=13)	Alte Kontrollgruppe (n=12)	Junge Kontrollgruppe (n=14)
BV/TV [%]	17,7 ± 7,4	17,2 ± 7,1	21,8 ± 4,9
Tb.N [mm ⁻¹]	2,94 ± 0,95	2,79 ± 1,17	3,94 ± 0,56
Tb.Sp [mm]	0,32 ± 0,08	0,32 ± 0,09	0,22 ± 0,03
Tb.Th [mm]	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01
BMD [g/cm ³]	0,27 ± 0,1	0,26 ± 0,09	0,38 ± 0,26
TMD [g/cm ³]	1,1 ± 0,09	1,1 ± 0,1	1,02 ± 0,08

Tab. 3.2: Datentabelle μ CT. Spongiosa L1 (Mittelwert \pm Standardabweichung, BV/TV: Relatives Knochenvolumen; Tb.N: Trabekelzahl; Tb.Sp: Trabekelabstand; Tb.Th: Trabekeldicke; BMD: Gemittelte Dichte aus knöchernem und weichem Gewebe; TMD: Dichte des rein knöchernen Anteils)

Die Messung der gemittelten Dichte aus knöchernem und weichem Gewebe (BMD) bestätigte das Bild des relativen Knochenvolumens (BV/TV). Auch hier wiesen Heidelbeer- und alte Kontrollgruppe geringere Durchschnittswerte als die junge Kontrollgruppe auf, jedoch ohne Signifikanz. Die Dichte des rein knöchernen Anteils (TMD) hingegen war bei allen 3 Gruppen ähnlich (Tab. 3.2 und Abb. 3.3, S. 45). Zwischen Heidelbeer- und alter Kontrollgruppe konnten insgesamt weder morphologische noch quantitative Unterschiede in den untersuchten Parametern festgestellt werden.

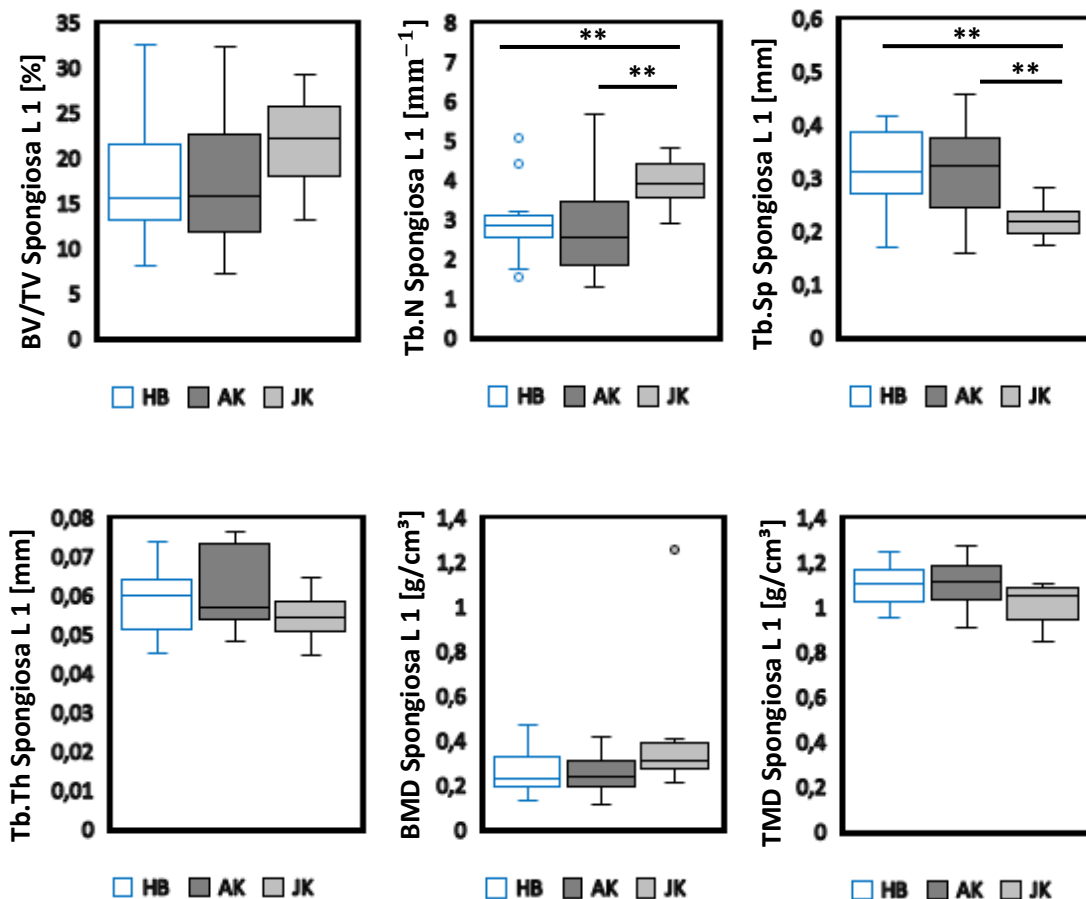


Abb. 3.3: Statistik μ CT. Spongiosa Wirbel L1 (HB: Heidelbeergruppe; AK: Alte Kontrollgruppe; JK: Junge Kontrollgruppe; BV/TV: Relatives Knochenvolumen; Tb.N: Trabekelzahl; Tb.Sp: Trabekelabstand; Tb.Th: Trabekeldicke; BMD: Gemittelte Dichte aus knöchernem und weichem Gewebe; TMD: Dichte des rein knöchernen Anteils; Signifikanzen: $p \leq 0,01$: (**); (o): Extremwerte, die das Anderthalbfache der Höhe der Box überschreiten)

3.2.2 Spongiosa Femur rechts

Die rechten Femora boten hinsichtlich der trabekulären Struktur im Vergleich zu den ersten Lumbalwirbelkörpern ein ähnliches, noch deutlicheres Bild. Morphologisch waren auch hier bei der Heidelbeer- und der alten Kontrollgruppe Trabekel deutlich geringer ausgeprägt als bei der jungen Kontrollgruppe, teilweise waren sie sogar kaum vorhanden (Abb. 3.4, S. 46).

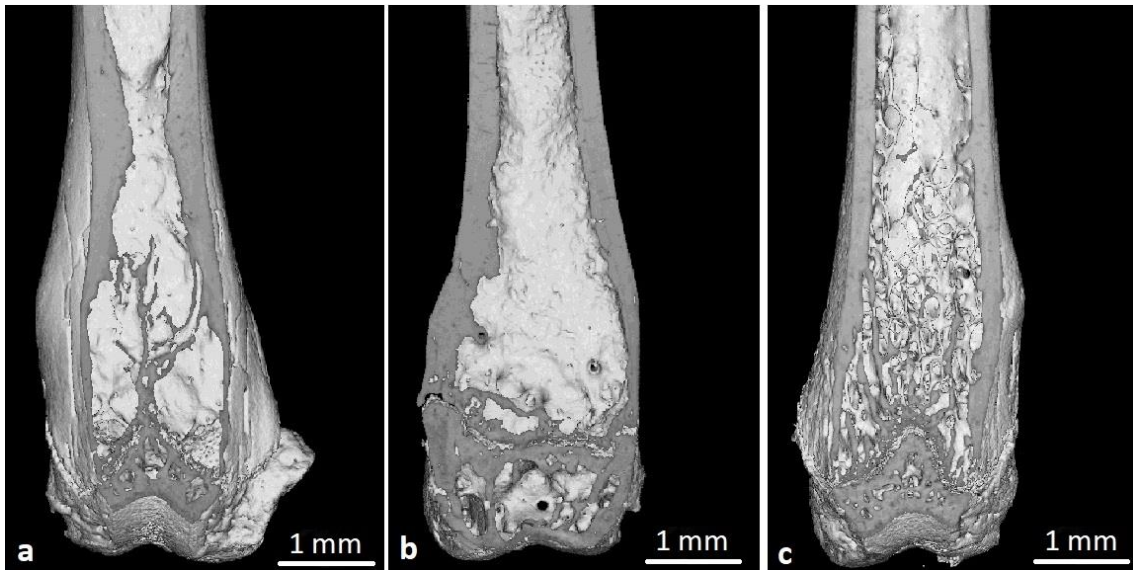


Abb. 3.4: Dreidimensionale Rekonstruktion der rechten Femora unter Entfernung der ventralen Kortikalis mit Blick auf die Spongiosa. Morphologisch deutlich weniger Trabekel bei der Heidelbeer- (a) und alten Kontroll- (b) als bei der jungen Kontrollgruppe (c).

Aus diesen morphologisch auffälligen Befunden resultierten statistisch hochsignifikante Unterschiede in den quantifizierten Parametern. So war das relative Knochenvolumen beider 20 Monate alten Versuchsgruppen signifikant kleiner (BV/TV, jeweils $p < 0,001$), was auch mit einer geringeren gemittelten Dichte aus knöchernem und Weichgewebe (BMD, jeweils $p < 0,001$) einherging. Wie bei den ersten Lumbalwirbelkörpern war bei den rechten Femora die Trabekelzahl ebenfalls signifikant kleiner (Tb.N, jeweils $p < 0,001$) und der Trabekelabstand signifikant größer (Tb.Sp, jeweils $p < 0,001$). Analog zur Trabekeldicke (Tb.Th) der ersten Lumbalwirbelkörper war diese auch bei den rechten Femora bei allen drei Versuchsgruppen ähnlich (Tab. 3.3, Abb. 3.5, S. 47).

Auf die Messung der Dichte des rein knöchernen Anteils (TMD) wurde bei den Femora im Gegensatz zu den Wirbelkörpern verzichtet, da die Trabekelzahl bei der Heidelbeer- und der alten Kontrollgruppe mit Durchschnittswerten von $\leq 1 \text{ mm}^{-1}$ für aussagekräftige Ergebnisse zu gering war. Morphologische und quantitative Unterschiede in der trabekulären Struktur konnten, mit Ausnahme einer geringeren Streuung der Werte bei BV/TV der Heidelbeergruppe, auch bei den Femora zwischen Heidelbeer- und alter Kontrollgruppe nicht nachgewiesen werden.

	Heidelbeergruppe (n=13)	Alte Kontrollgruppe (n=13)	Junge Kontrollgruppe (n=14)
BV/TV [%]	2,5 ± 2,4	2,9 ± 5	13,7 ± 4,1
Tb.N [mm ⁻¹]	0,42 ± 0,43	0,39 ± 0,61	2,14 ± 0,51
Tb.Sp [mm]	0,79 ± 0,17	0,81 ± 0,24	0,28 ± 0,05
Tb.Th [mm]	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,01
BMD [g/cm ³]	0,07 ± 0,05	0,07 ± 0,06	0,21 ± 0,06

Tab. 3.3: Datentabelle μ CT. Spongiosa Femur rechts (Mittelwert \pm Standardabweichung, BV/TV: Relatives Knochenvolumen; Tb.N: Trabekelzahl; Tb.Sp: Trabekelabstand; Tb.Th: Trabekeldicke; BMD: Gemittelte Dichte aus knöchernem und weichem Gewebe)

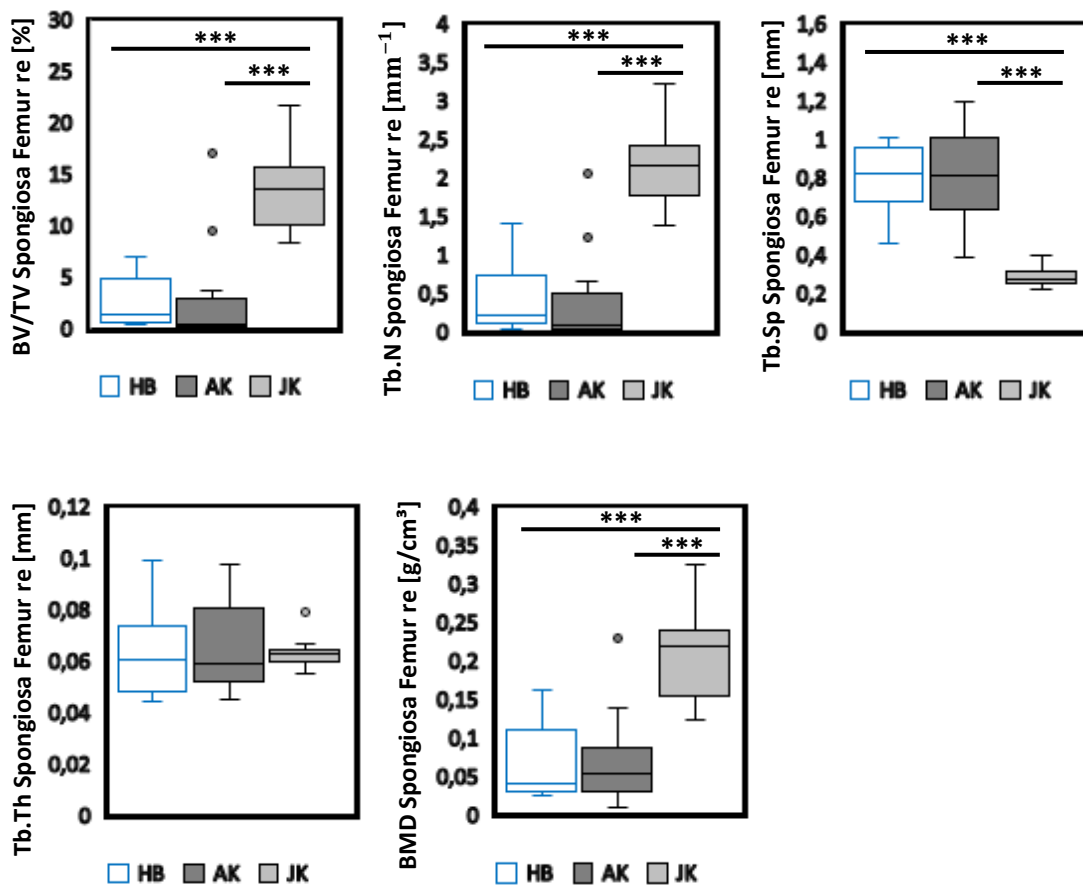


Abb. 3.5: Statistik μ CT. Spongiosa Femur rechts (HB: Heidelbeergruppe; AK: Alte Kontrollgruppe; JK: Junge Kontrollgruppe; BV/TV: Relatives Knochenvolumen; Tb.N: Trabekelzahl; Tb.Sp: Trabekelabstand; Tb.Th: Trabekeldicke; BMD: Gemittelte Dichte aus knöchernem und weichem Gewebe; Signifikanzen: $p \leq 0,001$: (***) ; (o): Extremwerte, die das Anderthalbfache der Höhe der Box überschreiten)

3.2.3 Kortikalis Femur rechts

Die Kortikalis wurde sowohl anhand eines metaphysären als auch eines diaphysären Abschnittes analysiert.

Kortikalis metaphysär: Die statistische Auswertung ergab eine signifikant dickere Kortikalis (St.Th) der alten Kontrollgruppe gegenüber der der jungen ($p < 0,001$), wobei die Heidelbeergruppe ohne signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen lag. Dieses Bild konnte mit der Auswertung sowohl der Gesamtquerschnittsfläche (T.Ar) als auch der Gesamtquerschnittsfläche des rein knöchernen Anteils (Obj.Ar) bestätigt werden. Auch hier hatte die alte Kontrollgruppe signifikant größere Durchschnittswerte als die junge ($p = 0,019$ bzw. $0,013$), die Heidelbeergruppe wies keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollgruppen auf (Tab. 3.4 und Abb. 3.6, S. 49).

	Heidelbeer- gruppe (n=13)	Alte Kontrollgruppe (n=13)	Junge Kontrollgruppe (n=14)
St.Th [mm]	$0,23 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,01$
T.Ar [mm ²]	$1,19 \pm 0,19$	$1,31 \pm 0,2$	$1,13 \pm 0,08$
Obj.Ar [mm ²]	$1,18 \pm 0,19$	$1,3 \pm 0,2$	$1,11 \pm 0,08$
Obj.Ar. / T.Ar [%]	$0,989 \pm 0,004$	$0,992 \pm 0,003$	$0,985 \pm 0,005$
TMD [g/cm ³]	$1,45 \pm 0,1$	$1,44 \pm 0,09$	$1,37 \pm 0,1$

Tab. 3.4: Datentabelle μ CT. Kortikalis Femur rechts metaphysär (Mittelwert \pm Standardabweichung, St.Th: Dicke; T.Ar: Gesamtquerschnittsfläche; Obj.Ar: Gesamtquerschnittsfläche des rein knöchernen Anteils; Obj.Ar / T.Ar: Relatives Knochenvolumen; TMD: Dichte des rein knöchernen Gewebes)

Die Auswertung des relativen Knochenvolumens (Obj.Ar / T.Ar) hingegen zeigte einen signifikant größeren knöchernen Anteil sowohl der Heidelbeer- als auch der alten Kontrollgruppe verglichen mit der jungen Kontrollgruppe ($p = 0,044$ bzw. $p < 0,001$). Zudem ließ sich eine tendenzielle Erhöhung der Dichte des rein knöchernen Anteils (TMD) beider 20 Monate alter Versuchsgruppen gegenüber der jungen Kontrollgruppe erkennen (jeweils $p = 0,053$). Zwischen Heidelbeer- und alter Kontrollgruppe konnten in

den analysierten Parametern der metaphysären Kortikalis insgesamt keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Tab. 3.4, S. 48 und Abb. 3.6).

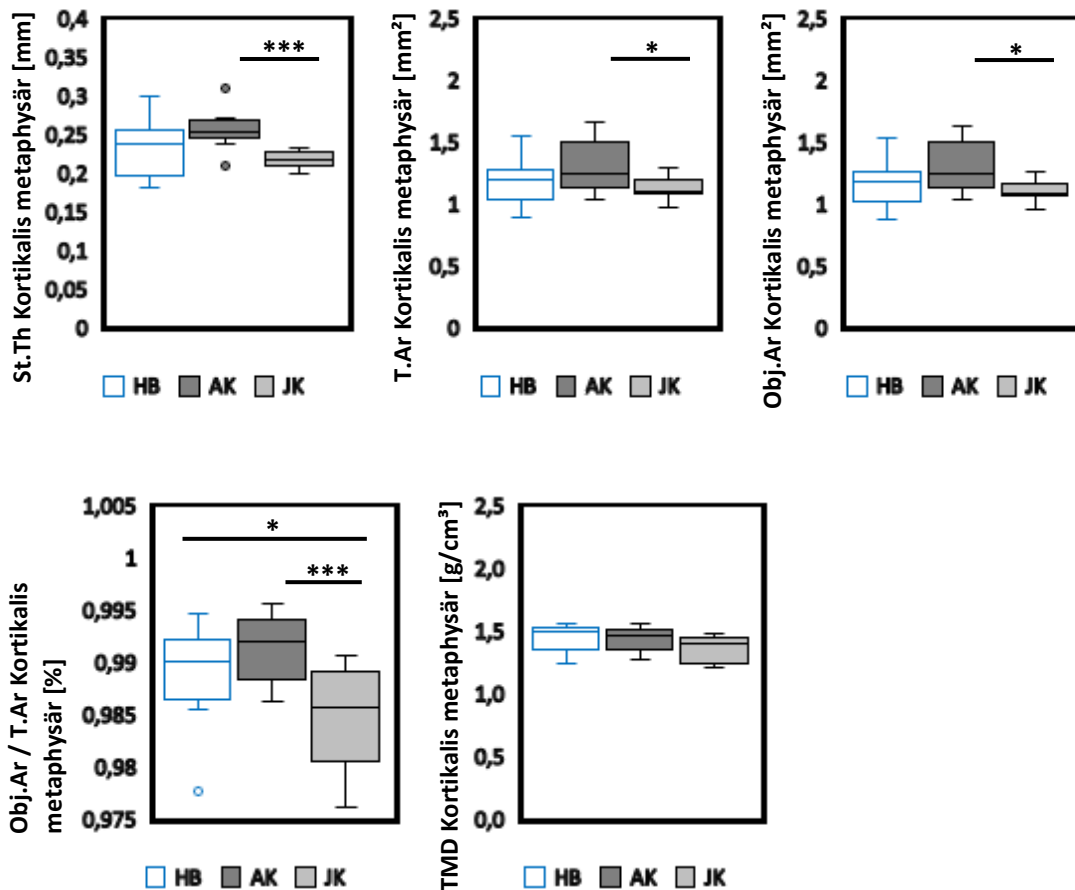


Abb. 3.6: Statistik μ CT. Kortikalis Femur rechts metaphysär (HB: Heidelbeergruppe; AK: Alte Kontrollgruppe; JK: Junge Kontrollgruppe; St.Th: Dicke; T.Ar: Gesamtquerschnittsfläche; Obj.Ar: Gesamtquerschnittsfläche des rein knöchernen Anteils; Obj.Ar / T.Ar: Relatives Knochenvolumen; TMD: Dichte des rein knöchernen Anteils; Signifikanzen: $p \leq 0,05$: (*); $p \leq 0,001$: (***); (o): Extremwerte, die das Anderthalbfache der Höhe der Box überschreiten)

Kortikalis diaphysär: Ähnlich der Auswertung der metaphysären ergab auch die der diaphysären Kortikalis einen signifikanten Unterschied in der Dicke (St.Th) zugunsten der alten gegenüber der jungen Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Auch hier lagen die Durchschnittswerte der Heidelbeergruppe ohne Signifikanzen dazwischen. Die Gesamtquerschnittsfläche (T.Ar) sowie die des rein knöchernen Anteils (Obj.Ar) boten

ebenfalls ein ähnliches, aber deutlicher ausgeprägtes Bild als das der Metaphyse. Sowohl die Heidelberg- ($p = 0,006$ bzw. $p = 0,007$) als auch die alte Kontrollgruppe (jeweils $p < 0,001$) lagen in beiden Parametern signifikant über der jungen Kontrollgruppe (Tab. 3.5 und Abb. 3.7, S. 51).

	Heidelberg- gruppe (n=13)	Alte Kontrollgruppe (n=13)	Junge Kontrollgruppe (n=14)
St.Th [mm]	$0,29 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,01$
T.Ar [mm ²]	$1,24 \pm 0,18$	$1,36 \pm 0,17$	$1,02 \pm 0,07$
Obj.Ar [mm ²]	$1,23 \pm 0,17$	$1,35 \pm 0,17$	$1,01 \pm 0,07$
Obj.Ar. / T.Ar [%]	$0,996 \pm 0,002$	$0,997 \pm 0,002$	$0,998 \pm 0,001$
TMD [g/cm ³]	$1,62 \pm 0,11$	$1,61 \pm 0,09$	$1,52 \pm 0,11$

Tab. 3.5: Datentabelle μ CT. Kortikalis Femur rechts diaphysär (Mittelwert \pm Standardabweichung, St.Th: Dicke; T.Ar: Gesamtquerschnittsfläche; Obj.Ar: Gesamtquerschnittsfläche des rein knöchernen Anteils; Obj.Ar / T.Ar: Relatives Knochenvolumen; TMD: Dichte des rein knöchernen Gewebes)

Das relative Knochenvolumen (Obj.Ar. / T.Ar) dagegen zeigte ein anderes Ergebnis als das der Metaphyse, hier war das der Heidelberg- und der alten Kontrollgruppe signifikant kleiner als das der jungen Kontrollgruppe ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,015$). Deutlicher als bei der Metaphyse fielen auch die Unterschiede der Dichte des rein knöchernen Anteils (TMD) aus. Hier hatte die Heidelberggruppe signifikant dichteres Knochengewebe als die junge Kontrollgruppe ($p = 0,011$), die alte Kontrollgruppe ebenfalls tendenziell dichteres als die junge Kontrollgruppe ($p = 0,053$). Entsprechend der Metaphyse zeigte auch die diaphysäre Kortikalis keine signifikanten Unterschiede zwischen Heidelberg- und alter Kontrollgruppe (Tab. 3.5 und Abb. 3.7, S. 51).

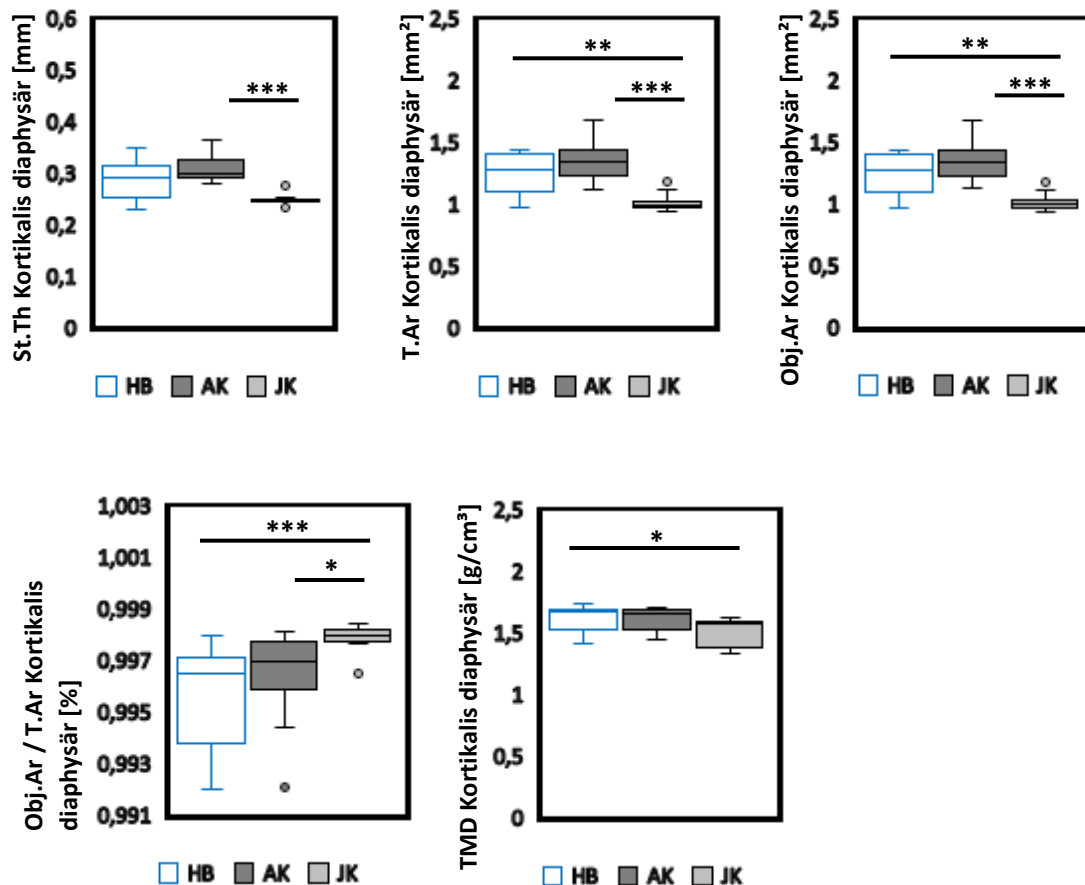


Abb. 3.7: Statistik μ CT. Kortikalis Femur rechts diaphysär (HB: Heidelbergergruppe; AK: Alte Kontrollgruppe; JK: Junge Kontrollgruppe; St.Th: Dicke; T.Ar: Gesamtquerschnittsfläche; Obj.Ar: Gesamtquerschnittsfläche des rein knöchernen Anteils; Obj.Ar / T.Ar: Relatives Knochenvolumen; TMD: Dichte des rein knöchernen Anteils; Signifikanzen: $p \leq 0,05$: (*); $p \leq 0,01$: (**); $p \leq 0,001$: (***); (o): Extremwerte, die das Anderthalbfache der Höhe der Box überschreiten)

3.3 Histomorphometrie

Von jeder Gruppe wurden acht randomisiert ausgewählte Schnitte histomorphometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Als *Region of Interest* (ROI) war zuvor bei allen Färbungen die Spongiosa des dritten Lumbalwirbelkörpers (außer Kossa-van Gieson, hier zwölfter Thorakalwirbelkörper) ohne Kortikalis festgelegt worden.

HE-Färbung: In der Färbung stellten sich die Zellkerne blau, das Bindegewebe und somit auch die zu analysierenden Trabekel rot dar. Ausgewertet wurde der Quotient aus

Trabekelfläche und ROI, was dem relativen Knochenvolumen zweidimensional entsprach. Dabei konnte ein ähnliches Bild wie bei der bereits beschriebenen dreidimensionalen μ CT-Auswertung der Spongiosa des ersten Lumbalwirbelkörpers festgestellt werden. Auch hier ließ sich, abhängig vom Alter der Versuchstiere, morphologisch bei der jungen Kontrollgruppe ein stärker ausgeprägtes Trabekelwerk beobachten (Abb. 3.8). Statistisch bestätigte sich dies mit einem im Vergleich zur Heidelberggruppe signifikant größeren ($p = 0,021$) bzw. zur alten Kontrollgruppe tendenziell größeren ($p = 0,053$) relativen Knochenvolumen (Tab. 3.6 und Abb. 3.9, S. 53).

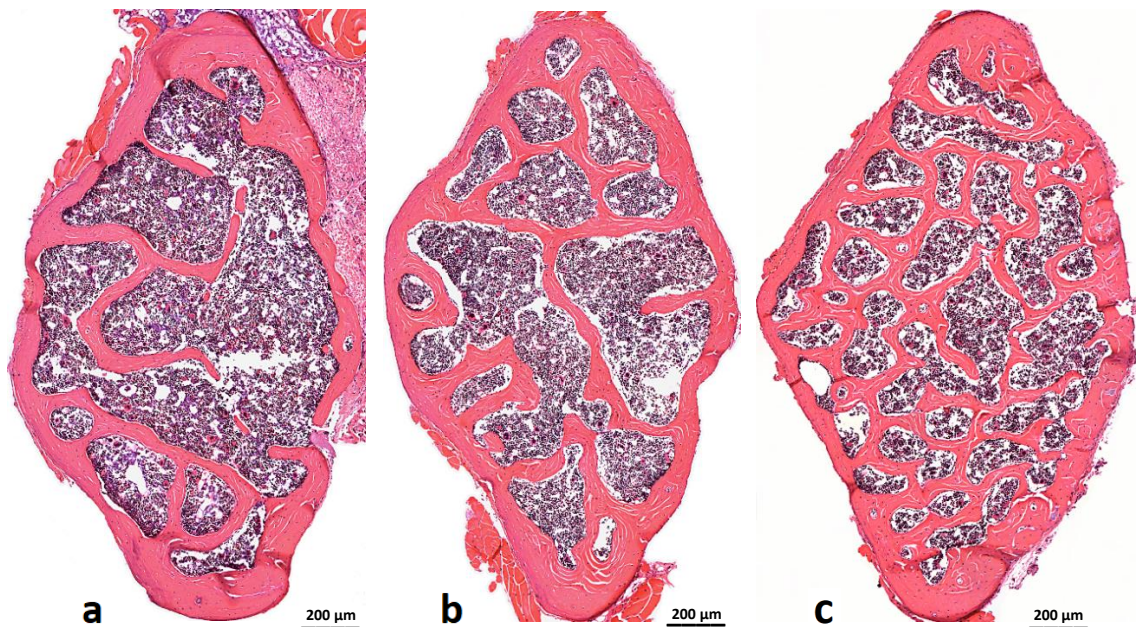


Abb. 3.8: HE-Färbung der dritten Lumbalwirbelkörper. Morphologisch weniger Trabekel bei der Heidelberg- (a) und der alten Kontroll- (b) als bei der jungen Kontrollgruppe (c).

	Heidelberg- gruppe (n=8)	Alte Kontrollgruppe (n=8)	Junge Kontrollgruppe (n=8)
Relatives Knochen- volumen [%]	20,3 ± 6,8	25,1 ± 4,9	32,5 ± 8,6

Tab. 3.6: Datentabelle Histomorphometrie. Relatives Knochenvolumen (Mittelwert ± Standardabweichung)

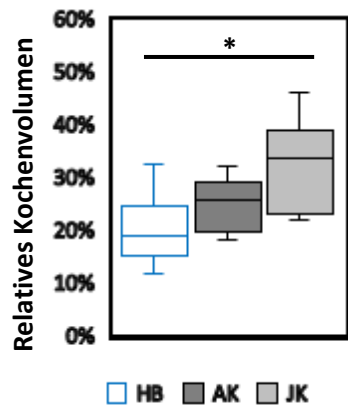


Abb. 3.9: Statistik Histomorphometrie. Relatives Knochenvolumen (HB: Heidelbeergruppe; AK: Alte Kontrollgruppe; JK: Junge Kontrollgruppe; Signifikanzen: $p \leq 0,05$: (*))

Enzymhistochemischer Nachweis von TRAP: Mittels enzymhistochemischen Nachweises von TRAP wurden Zellen, die das Enzym enthielten, rot gefärbt. Zur Analyse wurden alle den Trabekeln anliegenden TRAP-positiven Zellen berücksichtigt und der Quotient aus TRAP-positiver und gesamter Trabekeloberfläche ausgewertet. Morphologisch imponierten bei allen Gruppen auffällig viele TRAP-positive Zelle (Abb. 3.10). Die statistische Auswertung des Anteils der TRAP-positiven Trabekeloberfläche ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Tab. 3.7, Abb. 3.11, S. 54).

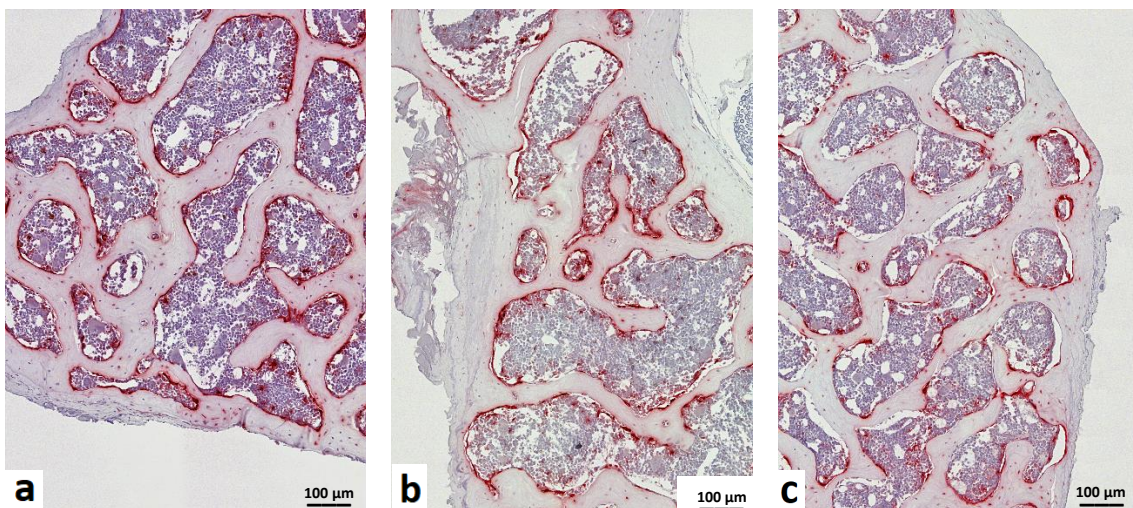


Abb. 3.10: Nachweis vieler TRAP-positiver Zellen im dritten Lumbalwirbelkörper der Heidelbeer- (a), alten (b) und jungen Kontrollgruppe (c)

	Heidelbeergruppe (n=8)	Alte Kontroll- gruppe (n=8)	Junge Kontroll- gruppe (n=8)
TRAP-positive Trabekeloberfläche [%]	39,8 ± 7,6	38 ± 5,9	34,7 ± 7,1

Tab. 3.7: Datentabelle Histomorphometrie. TRAP (tartrat-resistente saure Phosphatase)-positive Trabekeloberfläche (Mittelwert ± Standardabweichung)

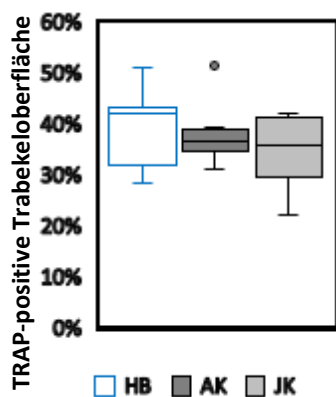


Abb. 3.11: Statistik Histomorphometrie. TRAP (tartratresistente saure Phosphatase)-positive Trabekeloberfläche (HB: Heidelbeergruppe; AK: Alte Kontrollgruppe; JK: Junge Kontrollgruppe; (◦): Extremwerte, die das Anderthalbfache der Höhe der Box überschreiten)

Enzymhistochemischer Nachweis von ALP: Der enzymhistochemische Nachweis von ALP wurde zur histomorphometrischen Analyse der Osteoblasten durchgeführt. Nach erfolgter Färbung sollten die innerhalb der Spongiosa den Trabekeln als blauer randständiger Saum anliegenden Osteoblasten ausgewertet werden. Das Enzym bzw. die blaue Färbung war jedoch nur sehr gering im Bereich der Wirbelbögen vorhanden. In den Wirbelkörpern war es hingegen gar nicht nachweisbar. Auf die Auswertung wurde daher verzichtet (Abb. 3.12, S. 55).

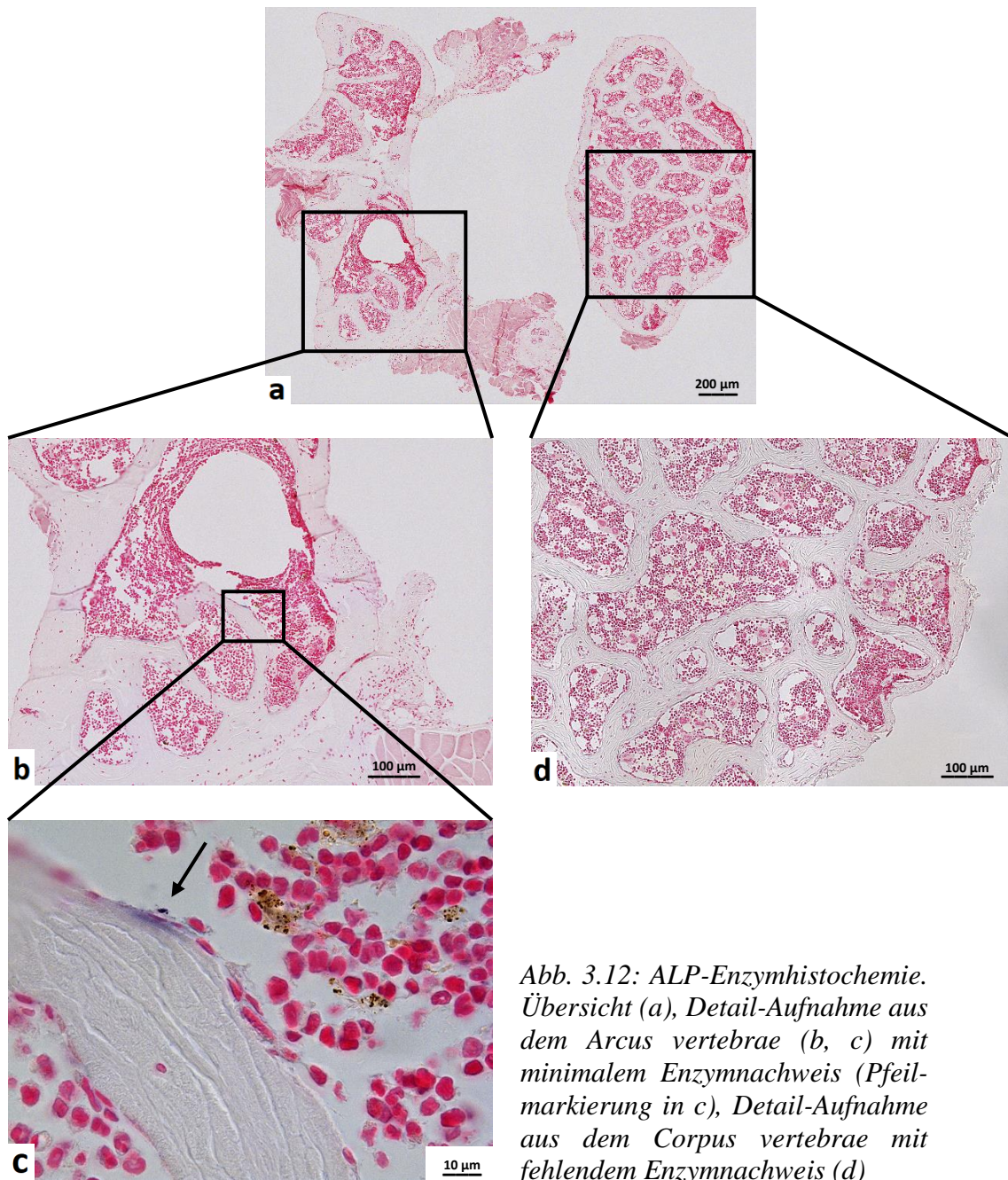


Abb. 3.12: ALP-Enzymhistochemie. Übersicht (a), Detail-Aufnahme aus dem Arcus vertebrae (b, c) mit minimalem Enzymnachweis (Pfeilmarkierung in c), Detail-Aufnahme aus dem Corpus vertebrae mit fehlendem Enzymnachweis (d)

Immunhistochemischer Nachweis von ASMA: Der immunhistochemische Nachweis von ASMA diente dem Nachweis von Blutgefäßen, die sich im Präparat braun darstellten (Abb. 3.13, S. 56). Ausgewertet wurde der Quotient aus allen im Wirbelkörper liegenden ASMA-positiven Blutgefäßen und der Fläche der ROI. Auffällig war vor allem bei der jungen Kontrollgruppe eine erhebliche Schwankung der Werte (Tab. 3.8, S. 56). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten, möglicherweise auch durch diese Schwankungen bedingt, nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.14).

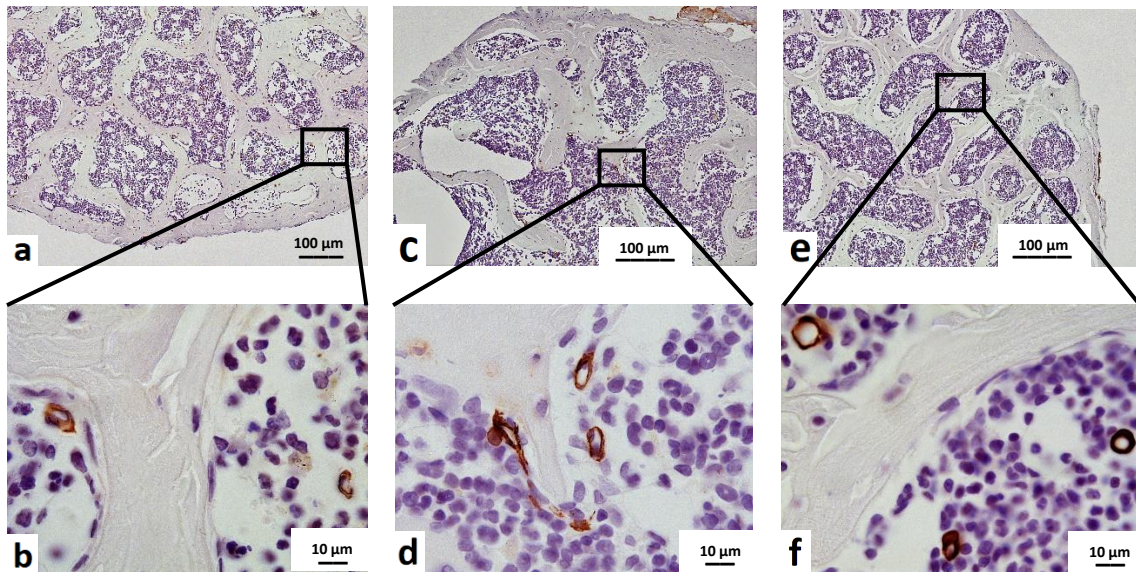


Abb. 3.13: Nachweis ASMA-positiver Gefäße im dritten Lumbalwirbelkörper der Heidelbeer- (a, b), alten (c, d) und jungen Kontrollgruppe (e, f)

	Heidelbeergruppe (n=8)	Alte Kontrollgruppe (n=8)	Junge Kontrollgruppe (n=8)
ASMA-positive Gefäße [mm ⁻²]	16,1 ± 7,3	13 ± 5,8	21,3 ± 14,5

Tab. 3.8: Datentabelle Histomorphometrie. ASMA (α -smooth-Muscle-Actin)-positive Gefäße (Mittelwert \pm Standardabweichung)

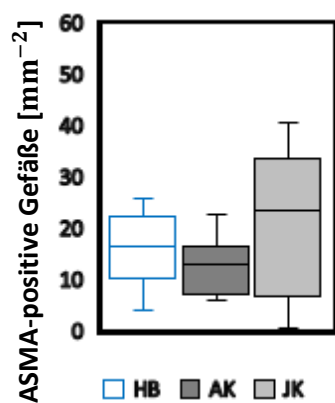


Abb. 3.14: Statistik Histomorphometrie. ASMA (α -smooth-Muscle-Actin)-positive Gefäße (HB: Heidelbeergruppe; AK: Alte Kontrollgruppe; JK: Junge Kontrollgruppe)

Kossa-van Gieson-Färbung: In der Färbung stellten sich die Zellen braun (Zellkern dunkler, Zytoplasma heller), verkalktes Knochengewebe schwarz, Kollagenfasern und

somit auch das zu analysierende Osteoid rot dar. Morphologisch fiel ein bei allen Versuchsgruppen gleichermaßen nur sporadisch vorhandener sehr schmaler Saum aus Osteoid auf den Trabekeloberflächen auf (Abb. 3.15). Ausgewertet wurde der Quotient aus Osteoid-positiver und gesamter Trabekeloberfläche. Statistisch bedeckte das Osteoid insgesamt ca. ein Drittel der Trabekeloberfläche, jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Tab. 3.9 und Abb. 3.16, S. 58).

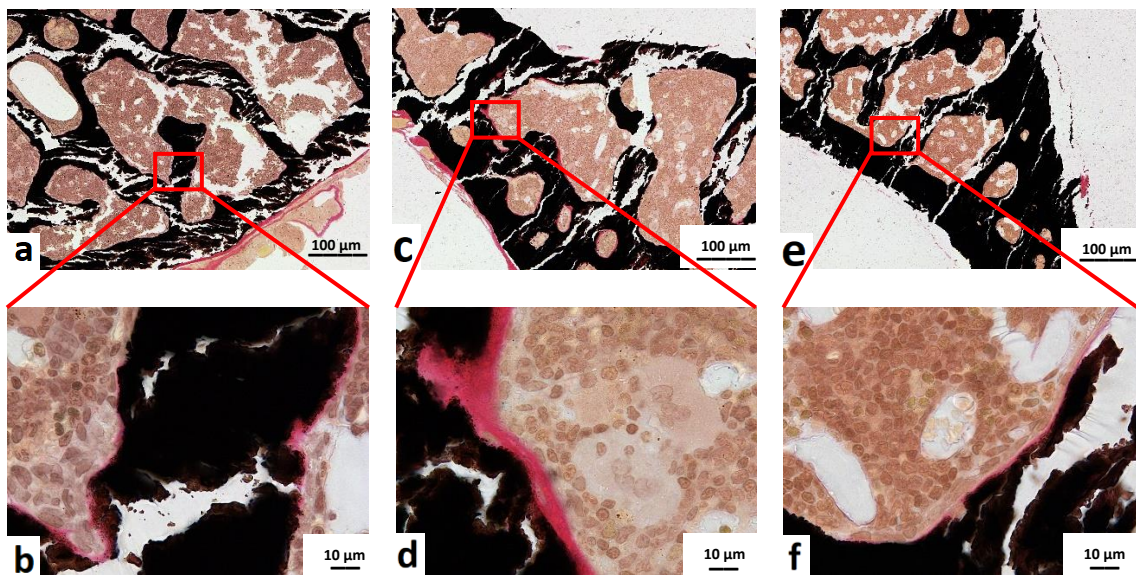


Abb. 3.15: Kossa-van Gieson-Färbung der zwölften Thorakalwirbelkörper. Trabekeloberflächen der Heidelbeer- (a, b), alten (c, d) und jungen Kontrollgruppe (e, f) mit schmalem Osteoid-Saum (rot)

	Heidelbeer- gruppe (n=8)	Alte Kontroll- gruppe (n=8)	Junge Kontroll- gruppe (n=8)
Osteoid-positive Trabekeloberfläche [%]	35,3 ± 12,7	33,7 ± 15,9	26,2 ± 15,5

Tab. 3.9: Datentabelle Histomorphometrie. Osteoid-positive Trabekeloberfläche (Mittelwert ± Standardabweichung)

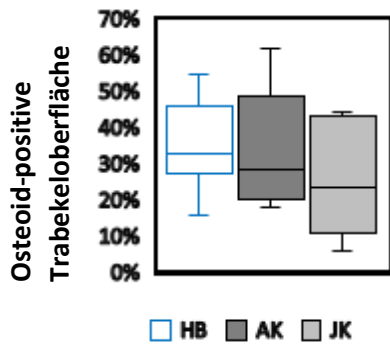


Abb. 3.16: Statistik Histomorphometrie. Osteoid-positive Trabekeloberfläche (HB: Heidelbeergruppe; AK: Alte Kontrollgruppe; JK: Junge Kontrollgruppe)

3.4 Real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Nach Extraktion der RNA jeweils sechs randomisiert ausgewählter zehnter Thorakalwirbel pro Gruppe und anschließender cDNA-Synthese mittels reverser Transkription wurde die real-time RT-PCR zur Bestimmung der Ct-Werte durchgeführt. Ausgewertet wurde dann die relative Genexpression verschiedener Marker der Knochenzellen mit der Δ Ct-Methode mit β -Aktin als Referenzen. Bei jeder real-time RT-PCR wurde die Effizienz durch eine Positivkontrolle (Mauswirbel) in Doppelbestimmung mit bekannter Expression des entsprechenden Zielgens überprüft. Des Weiteren wurde beachtet, dass bei der Negativkontrolle in Form von Aqua ad injectabilia statt cDNA keine PCR-Produkte entstanden.

3.4.1 Osteoblasten

Die Auswertung der Osteoblasten-Marker ergab eine signifikant geringere relative Genexpression des Osteocalcins sowohl bei der Heidelbeer- als auch bei der alten Kontrollgruppe gegenüber der jungen Kontrollgruppe ($p = 0,004$ bzw. $p = 0,003$). Ein ähnliches Bild bot das Kollagen 1a1, dessen relative Genexpression ebenfalls bei der alten gegenüber der jungen Kontrollgruppe signifikant niedriger war ($p = 0,045$), wobei die Heidelbeergruppe ohne Signifikanzen dazwischen lag. Das Osteoprotegerin hingegen war bei der Heidelbeer- im Vergleich zur jungen Kontrollgruppe signifikant niedriger ($p = 0,042$). Hier wies die alte Kontrollgruppe keine Signifikanzen auf (Abb. 3.17, S. 60).

Keine signifikanten Unterschiede gab es bei der relativen Genexpression von ALP und RANKL. Auffällig war bei der Auswertung der ALP die große Streubreite der Werte bei

der jungen Kontrollgruppe, was zu einer großen Differenz zwischen Median (2,04) und Mittelwert (66,86) führte (Tab. 3.10).

Zusammenfassend ließ sich, entsprechend der Ergebnisse der zuvor beschriebenen Untersuchungen, eine unterschiedlich starke relative Genexpression der Osteoblasten-Marker nachweisen, was das Alter der Versuchsgruppen betraf. So war die Expression bei der Heidelbeer- und der alten Kontrollgruppe (20 Monate bei der Euthanasie) im Vergleich zur jungen Kontrollgruppe (3 Monate) größtenteils signifikant verringert.

	Heidelbeergruppe (n=6)	Alte Kontrollgruppe (n=6)	Junge Kontrollgruppe (n=6)
Osteocalcin	2,42 ± 1,04	1,68 ± 1,49	5,6 ± 1,56
Kollagen 1a1	2,22 ± 0,48	1,62 ± 1,05	4,32 ± 2
Osteoprotegerin	0,94 ± 0,33	1,3 ± 0,98	1,77 ± 0,6
Alkalische Phosphatase	1,23 ± 0,41	1,2 ± 0,7	66,86 ± 109,39
RANKL	1,8 ± 0,9	1,18 ± 0,79	2,55 ± 1,52

Tab. 3.10: Datentabelle real-time RT-PCR. Relative Genexpression der Osteoblasten-Marker (Mittelwert ± Standardabweichung)

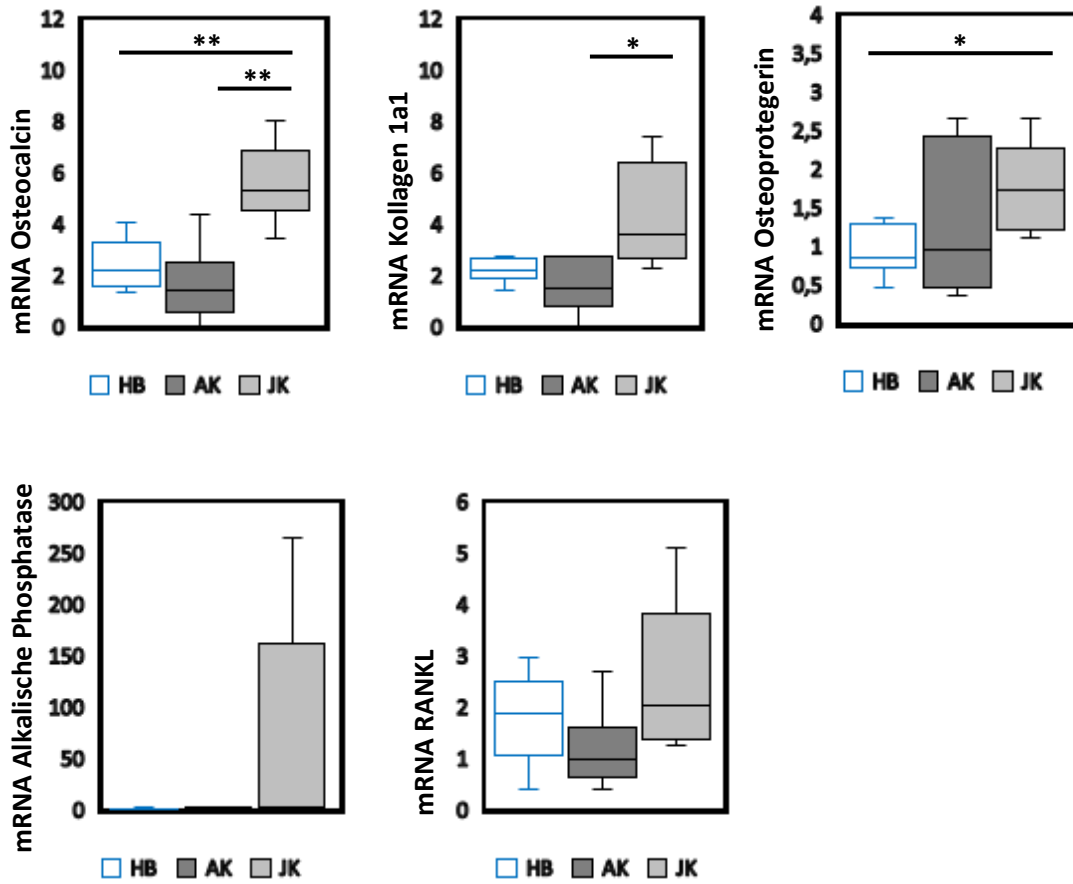


Abb. 3.17: Statistik real-time RT-PCR. Relative Genexpression der Osteoblasten-Marker (HB: Heidelbeergruppe; AK: Alte Kontrollgruppe; JK: Junge Kontrollgruppe; Signifikanzen: $p \leq 0,05$: (*); $p \leq 0,01$: (**))

3.4.2 Osteozyten

Die relative Genexpression der Osteozyten-Marker zeigte ein ähnliches Bild wie die der Osteoblasten-Marker. So war auch Connexin 43 sowohl bei der Heidelberg- als auch der alten Kontrollgruppe signifikant schwächer exprimiert als bei der jungen Kontrollgruppe ($p = 0,006$ bzw. $p = 0,032$, Abb. 3.18). Bei dem als Negativkontrolle der Elimination genomischer DNA eingesetzten RT- Ansatz für Connexin 43 (nicht Intron spannender Primer) wurde kein PCR-Produkt nachgewiesen. Sclerostin wies zwar ebenfalls bei der Heidelberg- und der alten Kontrollgruppe etwas geringere Mittelwerte als die junge Kontrollgruppe auf, jedoch ohne Signifikanz (Tab. 3.11).

	Heidelberggruppe (n=6)	Alte Kontrollgruppe (n=6)	Junge Kontrollgruppe (n=6)
Connexin 43	1,27 ± 0,42	1,31 ± 0,95	2,81 ± 0,83
Sclerostin	1,01 ± 0,69	1,31 ± 0,94	2,68 ± 1,93

Tab. 3.11: Datentabelle real-time RT-PCR. Relative Genexpression der Osteozyten-Marker (Mittelwert ± Standardabweichung)

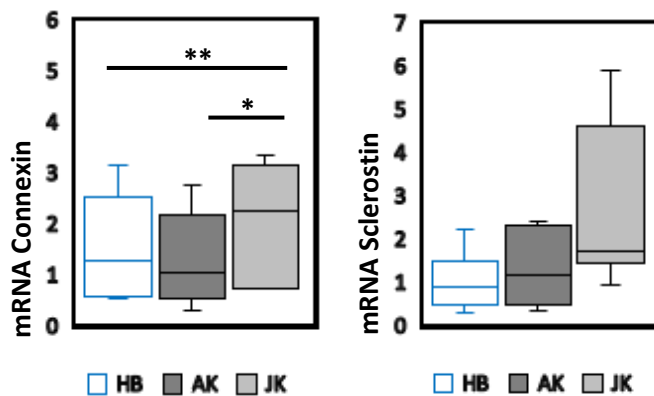


Abb. 3.18: Statistik real-time RT-PCR. Relative Genexpression der Osteozyten-Marker (HB: Heidelberggruppe; AK: Alte Kontrollgruppe; JK: Junge Kontrollgruppe; Signifikanzen: $p \leq 0,05$: (*); $p \leq 0,01$: (**))

3.4.3 Osteoklasten

Bei der Auswertung der relativen Genexpression der Osteoklasten-Marker Kathepsin K und RANK konnten bei ebenfalls etwas geringeren Mittelwerten der Heidelbeer- und der alten Kontrollgruppe gegenüber der jungen Kontrollgruppe keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Tab. 3.12, Abb. 3.19).

	Heidelbeergruppe (n=6)	Alte Kontrollgruppe (n=6)	Junge Kontrollgruppe (n=6)
Kathepsin K	1,53 ± 1,02	1,29 ± 0,94	2,08 ± 1,15
RANK	1,16 ± 0,45	1,17 ± 0,63	1,97 ± 0,83

Tab. 3.12: Datentabelle real-time RT-PCR. Relative Genexpression der Osteoklasten-Marker (Mittelwert ± Standardabweichung)

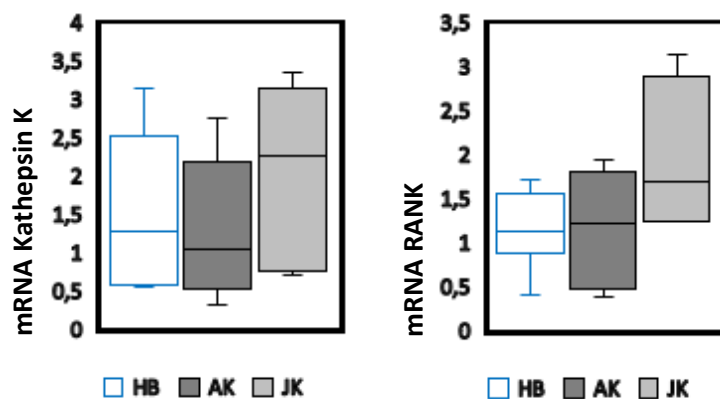


Abb. 3.19: Statistik real-time RT-PCR. Relative Genexpression der Osteoklasten-Marker (HB: Heidelbeergruppe; AK: Alte Kontrollgruppe; JK: Junge Kontrollgruppe)

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie ging es darum, die Auswirkung eines Heidelbeerextraktes, welches dem Futter kontinuierlich über mehrere Monate beigemischt wurde, auf den Knochenstatus von Mäusen zu untersuchen. Ausgewertet wurden Femora sowie Wirbelkörper von 3 Gruppen weiblicher NMRI-Mäuse (jeweils n=14), darunter eine Heidelbeergruppe, welche das heidelbeerextrakthaltige Futter bekam, sowie je eine gleichaltrige und eine jüngere Kontrollgruppe, welche eine polyphenolarme Kontrolldiät erhielten. Zur Ermittlung der biomechanischen Parameter wurde ein Dreipunkt-Biegetest durchgeführt. Mittels Mikro-Computertomographie (μ CT) wurde die dreidimensionale Struktur der Kortikalis und der Spongiosa quantifiziert. In der Histologie kamen verschiedene Färbungen sowie enzym- und immunhistochemische Verfahren für die anschließende Histomorphometrie der Knochen und der Knochenzellen zum Einsatz. Des Weiteren erfolgte die Analyse der relativen Expression verschiedener Gene des Knochenstoffwechsels mittels real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR).

Ein relevanter Effekt des Heidelbeerextraktes auf den Knochenstatus konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Die verschiedenen Methoden, insbesondere der Dreipunkt-Biegetest und die μ CT ergaben ein in sich schlüssiges Gesamtbild, bei dem sich die Heidelbeer- und die alte Kontrollgruppe ähnelten sowie beide genannten Gruppen ähnliche, deutlich signifikante Unterschiede zur jungen Kontrollgruppe aufwiesen.

4.1 Biomechanik & μ CT der Femora

Die Auswertung der Femora ergab hinsichtlich ihrer biomechanischen und CT-morphologischen Parameter ein größtenteils plausibles Ergebnis. So gingen die weitestgehend signifikant größere Maximalkraft und Biegesteifigkeit der Femora der Heidelbeer- und der alten Kontrollgruppe gegenüber denen der jungen Kontrollgruppe einher mit einer teilweise hoch signifikant größeren Gesamtquerschnittsfläche (T.Ar; Obj.Ar) der diaphysären Kortikalis und einem signifikant größeren relativen Knochenvolumen (Obj.Ar / T.Ar) der metaphysären Kortikalis.

Das relative Knochenvolumen (Obj.Ar / T.Ar) der diaphysären Kortikalis der jungen Kontrollgruppe war dagegen signifikant größer als das der Heidelbeer- und der alten Kontrollgruppe. Auch die Auswertung der Spongiosa der Femora widersprach den Ergebnissen der biomechanischen Parameter, hier zeigten sich hoch signifikante Unterschiede in der Knochendichte (BMD), dem relativem Knochenvolumen (BV/TV) sowie der Trabekelzahl (Tb.N) zugunsten der jungen Kontrollgruppe bei gleichzeitig hoch signifikant kleinerem Trabekelabstand (Tb.Sp). Es ist anzunehmen, dass diese zugunsten der jungen Kontrollgruppe ausgefallenen Parameter die teilweise hoch signifikant größere Gesamtquerschnittsfläche der diaphysären Kortikalis der beiden älteren Gruppen nicht kompensieren konnten, und sich daher in den biomechanischen Tests nicht widerspiegelten. Bereits in früheren Studien, die Zusammenhänge zwischen der Morphologie und den biomechanischen Eigenschaften von Röhrenknochen untersuchten, zeigte sich, dass der knöcherne Durchmesser bzw. die kortikale Querschnittsfläche die Maximalkraft sowie die Steifigkeit des Knochens entscheidend beeinflusst (Jaemsa et al. 1998, Jepsen 2009).

Hieraus muss geschlossen werden, dass das oben genannte Ergebnis der Femora hinsichtlich biomechanischer und CT-morphologischer Parameter maßgeblich durch das Alter der Versuchstiere beeinflusst wurde. Die in der Studie verwendeten jungen Kontrollmäuse waren zum Zeitpunkt der Euthanasie, welche im Alter von 3 Monaten erfolgte, nicht vollständig ausgewachsen. So wirkten deren Knochen insgesamt kleiner als die der Heidelbeer- und der alten Kontrollgruppe und auch das durchschnittliche Gewicht der jungen Kontrollmäuse lag mit 27,67 g deutlich unter dem der beiden älteren Gruppen (38,44 bzw. 40,31 g bei einem Alter von jeweils 20 Monaten zum Zeitpunkt der Euthanasie). Da die biomechanischen Eigenschaften maßgeblich von der Querschnittsfläche des Knochens beeinflusst werden (s.o.), welche bei den beiden älteren Gruppen deutlich größer war, war der nachgewiesene Unterschied zu den jungen Kontrollmäusen zu erwarten. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie wiesen Mumtaz et al. 2020 eine signifikant größere maximale Last der Femora und Tibiae weiblicher Mäuse im Alter von 6 gegenüber denen im Alter von 22 Monaten nach. Hier war die durchschnittliche Gewichtsdiﬀerenz zwischen den 6 und 22 Monate alten Tieren deutlich geringer als zwischen den 3 und 20 Monate alten Tieren der vorliegenden Studie, woraus eine bessere Vergleichbarkeit resultiert (Mumtaz et al. 2020).

4.2 Trabekuläre Struktur der Wirbelkörper und Femora

In der μ CT erfolgte die dreidimensionale Quantifizierung der trabekulären Struktur des ersten Lumbalwirbelkörpers. Weiterhin wurde mittels HE-Färbung das relative Knochenvolumen der Spongiosa des dritten Lumbalwirbelkörpers zweidimensional bestimmt. Die Ergebnisse beider Untersuchungen stimmten weitestgehend mit dem bereits in 4.1 angesprochenen Ergebnis der femoralen Spongiosa überein. Sowohl bildmorphologisch als auch quantitativ ergab die μ CT eine deutliche Rarefizierung der Trabekel bei der Heidelbeer- und der alten Kontrollgruppe gegenüber der jungen Kontrollgruppe, was sich statistisch mit einer signifikant geringeren Trabekelzahl (Tb.N) und einem signifikant größeren Trabekelabstand (Tb.Sp) bestätigte. Gestützt wurde das Ergebnis der μ CT durch die Histomorphometrie, auch hier war das relative Knochenvolumen der jungen Kontrollgruppe signifikant größer als das der Heidelbeergruppe und tendenziell größer als das der alten Kontrollgruppe.

Die deutliche Reduktion der trabekulären Struktur der beiden 20 Monate alten Gruppen, die bereits bildmorphologisch in der μ CT und in der Histologie zu erkennen ist, vermittelt den Eindruck eines osteoporotischen Knochens. Hierbei manifestiert sich der Knochenabbau häufig schon zu einem frühen Zeitpunkt im Bereich der Spongiosa (Graef et al. 2018). Dieser Eindruck wird durch die bereits in 4.1. angesprochene hoch signifikant geringere Knochendichte (BMD) der femoralen Spongiosa beider älterer Gruppen im Vergleich zur jungen Kontrollgruppe verstärkt. Eine verringerte Knochendichte ist ein zentrales Kriterium in der Osteoporosediagnostik (Shevroja et al. 2021). Als Beweis für das Vorliegen einer Osteoporose hätte beispielsweise mittels Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DXA) der Z-Score ermittelt werden müssen. Die Aussagekraft dieses Verfahrens ist jedoch bei Kleintieren begrenzt, sodass hier häufig auf die μ CT zurückgegriffen wird (Turner 2001).

Fraglich ist, ob das für die vorliegende Studie möglicherweise zu hohe Alter der Heidelbeer- und der alten Kontrollgruppe das Ergebnis hinsichtlich eines fehlenden signifikanten Unterschiedes zwischen den beiden genannten Gruppen beeinflusst hat. Zwar wiesen beide Gruppen das gleiche Alter auf und sind somit miteinander vergleichbar. Unter der Annahme einer Auswirkung des Heidelbeerextraktes auf die trabekuläre Struktur ist allerdings anzunehmen, dass als Voraussetzung für einen

statistisch signifikanten Unterschied eine Mindestzahl an Trabekeln hätte vorhanden sein müssen.

4.3 Osteoblasten

Die Analyse der Osteoblasten erfolgte zum einen über den Nachweis verschiedener Gene mittels real-time RT-PCR, zum anderen histomorphometrisch durch den Nachweis des Osteoids. Auf die statistische Auswertung des enzymhistochemischen Nachweises der alkalischen Phosphatase (ALP) wurde verzichtet, da das Enzym in allen Versuchsgruppen kaum nachweisbar war.

Zwischen der Heidelbeer- und der gleichaltrigen alten Kontrollgruppe gab es in der relativen Genexpression aller untersuchten Osteoblastenmarker keine signifikanten Unterschiede. Die junge Kontrollgruppe hingegen zeigte eine signifikant vermehrte relative Expression des Osteoprotegerins gegenüber der Heidelbeergruppe, des Kollagens 1a1 gegenüber der alten Kontrollgruppe sowie des Osteocalcins gegenüber beiden älteren Gruppen. Hinsichtlich der relativen Genexpression von ALP und RANKL unterschied sich auch die jungen Kontrollgruppe nicht von den älteren Gruppen. Das von Osteoblasten und Osteozyten produzierte RANKL wird aufgrund der Zugehörigkeit zu den knochenkatabolen Markern genauer bei den Osteoklasten diskutiert (siehe 4.5, S. 70). Bei der Analyse des Osteoids konnten über alle Versuchsgruppen hinweg keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Bildmorphologisch fiel jedoch über alle Versuchsgruppen hinweg ein lediglich sporadisch vorhandener, schmaler Osteoidsaum auf.

Ähnlich wie bei den bereits in 4.1 und 4.2 beschriebenen biomechanischen, kortikalen und trabekulären Eigenschaften muss auch hinsichtlich der Osteoblastenaktivität gefolgert werden, dass eine fehlende Wirksamkeit des Heidelbeerextraktes in dem Alter der Versuchstiere zum Zeitpunkt der Studie begründet liegt. So erfolgte die Fütterung der mit Heidelbeerextrakt angereicherten Spezialdiät im Alter von 13 bis 20 Monaten und somit in einem Zeitraum, in dem die Versuchstiere längst ausgewachsen waren.

Im Gegensatz dazu wiesen Chen et al. 2010 eine erhöhte relative Genexpression verschiedener Osteoblastenmarker nach heidelbeerreicher Diät nach. In ihrer Studie mit

Ratten begann die Fütterung allerdings bereits 20 Tage postnatal. Die Folge war eine signifikant erhöhte relative Genexpression von ALP, Osteocalcin und auch Runx2 verglichen mit der gleichaltrigen Kontrollgruppe bereits nach 14 Tagen Fütterung, noch deutlicher fiel der Unterschied nach 40 Tagen aus. Hier zeigten sich auch histomorphometrisch signifikante Unterschiede in der Osteoblasten- und Trabekelzahl (Chen et al. 2010). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Zhang et al. 2011, in deren Studie Ratten ebenfalls ab dem 20. postnatalen Tag für 14 oder 40 Tage eine heidelbeerreiche Diät erhielten. Hier wurden die Versuchstiere zusätzlich zwischenzeitlich ovariectomiert bzw. scheinoperiert. Ähnlich wie bei Chen et al. 2010 führte auch hier sowohl die kurz- als auch die längerfristige heidelbeerreiche Diät kombiniert mit der Ovariectomie zu einer erhöhten relativen Genexpression der Osteoblastenmarker ALP, Osteocalcin und Runx2 gegenüber der ovariectomierten und scheinoperierten Kontrollgruppe. Des Weiteren wiesen auch hier insbesondere die längerfristig heidelbeerreich ernährten Versuchstiere histomorphometrisch eine signifikant erhöhte Osteoblasten- und Trabekelzahl auf (Zhang et al. 2011). Es ist anzunehmen, dass die Wirksamkeit der enthaltenen Anthocyane auf einen altersbedingt bereits verringerten Knochenstoffwechsel geringer ausfällt als auf einen ohnehin erhöhten Stoffwechsel während des Wachstums.

Verglichen mit den zuvor genannten Studien, in denen die Versuchstiere zu Beginn der Diät lediglich 20 Tage alt waren, fielen die Ergebnisse bei einer Diät zu einem späteren Zeitpunkt heterogener aus. Li et al. 2014 kamen in ihrer Studie mit nach 8 Lebenswochen ovariectomierten Ratten und darauf folgender 12-wöchiger heidelbeerreicher Diät zu einem Ergebnis, das dem der beiden zuvor genannten Studien ähnelte. Es zeigte sich eine signifikant höhere relative Genexpression von Kollagen 1, β 1-Integrin und fokaler Adhäsionskinase (FAK) bei der ovariectomierten Heidelbeer- gegenüber der ovariectomierten sowie der scheinoperierten Kontrollgruppe, was für eine knochenanabole Stoffwechsellaage spricht. Signifikant größer war ebenfalls die Trabekelzahl, nicht jedoch der Umfang des Osteoids (Li et al. 2014). Im Gegensatz dazu führte die Studie von Shimizu et al. 2018 bei ähnlichem Studiendesign mit Ovariectomie nach 12 Lebenswochen und darauffolgender Diät für 8 Wochen zu keinem wesentlichen histomorphometrischen Unterschied zwischen ovariectomierter Heidelbeer- und Kontrollgruppe. Auch in den untersuchten Parametern der DXA und der peripheren

quantitativen Computertomographie (pQCT) ähnelten sich die beiden Gruppen (Shimizu et al. 2018).

Mit einem Alter von 20 Wochen zum Zeitpunkt der Euthanasie und vorheriger heidelbeerreicher Diät wiesen die Versuchsgruppen auch in den beiden zuletzt genannten Studien ein noch erheblich jüngeres Alter als die in der vorliegenden Studie verwendeten Tiere auf. Hier wurden die Versuchstiere erst nach 20 Lebensmonaten euthanasiert und auch die vorangehende Fütterung des Heidelbeerextraktes begann erst zu einem Zeitpunkt, zu dem die Tiere bereits lange ausgewachsen waren. Zudem wurde in der Mehrzahl der vorangehenden Studien mittels Ovariectomie eine Osteoporose zu einem frühen Zeitpunkt induziert, wodurch sich die Ergebnisse nur bedingt vergleichen lassen.

4.4 Osteozyten

Osteozyten greifen wie auch ihre Vorläufer, die Osteoblasten, regulierend in den Knochenauf- und -abbau mittels Sekretion von Osteoprotegerin (OPG) und RANKL ein. Die Parameter wurden bzw. werden daher ausführlich bei den Osteoblasten und Osteoklasten diskutiert (siehe 4.3, S. 66 und 4.5, S. 70). Beide waren im Mittel bei der jungen Kontrollgruppe stärker ausgeprägt als bei der Heidelbeer- sowie der alten Kontrollgruppe, OPG teils signifikant. Dies passt insgesamt zum Bild eines altersbedingt verstärkten Knochenumbaus bei den jüngeren Versuchstieren.

Weiterhin wurde zur Untersuchung der Osteozyten die relative Genexpression von Connexin 43 und Sclerostin bestimmt. Letzteres ist durch die Hemmung der Osteoblasten über den Wnt-Signalweg den Parametern des Knochenabbaus zuzuordnen. Es konnten über alle Versuchsgruppen hinweg keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Domazetovic et al. 2019 untersuchten mittels Osteozyten-Zellkultur den Einfluss von Heidelbeersaft sowie auch Heidelbeerextrakt auf die Expression von Sclerostin und RANKL. Beides führte zu einer ähnlich signifikant geringeren Expression der beiden knochenkatabolen Parameter im Vergleich zur Kontrollgruppe mit serumfreiem Kontrollmedium. Des Weiteren wurde die Apoptoserate der mit Heidelbeersaft oder -extrakt behandelten Zellen untersucht, auch hier zeigten sich jeweils signifikant geringere Werte als bei der Kontrollgruppe. Zudem konnte eine hoch signifikant geringere Ausprägung von reaktiven Sauerstoffspezies unter Behandlung mit Heidelbeersaft und -

extrakt nachgewiesen werden, passend zu dem antioxidativen Effekt von Heidelbeeren (Domezetovic et al. 2019). Der mögliche Zusammenhang zwischen oxidativem Stress, einer gesteigerten Apoptoserate und einer erhöhten Expression von Sclerostin und RANKL in der Zellkultur mit Osteozyten war bereits zuvor beschrieben worden (Yu et al. 2017).

Die Analyse der relativen Genexpression von Connexin 43, einem Bestandteil der Gap junctions zur Kommunikation der Osteozyten untereinander, ergab im Gegensatz zu der von Sclerostin ein zu den untersuchten Osteoblasten-Markern passendes Bild. Auch hier war die relative Expression bei der jungen Kontrollgruppe am ehesten altersbedingt signifikant höher als bei der Heidelbeer- sowie der alten Kontrollgruppe, ebenfalls ohne signifikanten Unterschied zwischen den zuletzt genannten gleichaltrigen Gruppen. Ma et al. 2019 untersuchten anhand von Mäusen die Auswirkung einer Mutation des Connexin 43-Gens auf den Knochenstatus. Hierbei wurden sowohl Versuchstiere des Wildtyps als auch der genetisch veränderten Mäuse teils zwecks Osteoporoseinduktion ovariektomiert, teils zur Kontrolle scheinoperiert. Nach der Euthanasie zeigte sich hinsichtlich der Trabekelzahl und -dicke sowie dem relativen Knochenvolumen ein insgesamt signifikanter Verlust an Knochensubstanz der ovariektomierten Tiere mit mutiertem Connexin 43-Gen gegenüber den korrespondierenden scheinoperierten Tieren, ebenfalls mit mutiertem Connexin 43-Gen. Die Unterschiede zwischen ovariektomierten und scheinoperierten Tieren des Wildtyps waren hingegen nicht signifikant (Ma et al. 2019).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Zhao et al. 2020 in ihrer Studie mit Mäusen anhand derselben Connexin 43-Mutation. Hier wurde eine Osteoporose statt durch eine Ovariektomie durch Entlastung der Hinterbeine induziert und ähnlich der vorangehenden Studie jeweils Versuchs- und Kontrollgruppe des Wildtyps sowie entsprechend die beiden Gruppen mit Connexin 43-Mutation verglichen. Das Ergebnis war auf zellulärer Ebene eine signifikant vermehrte Anzahl endostal gelegener Osteoklasten sowie eine verringerte Anzahl periostal gelegener Osteoblasten der entlasteten, Connexin 43-mutierten Tiere im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe. In der Mikro-Computertomographie (μ CT) zeigten sich unter Connexin 43-Mutation signifikant geringere Werte für den kortikalen Knochendurchmesser und das kortikale Knochenvolumen. Dagegen unterschieden sich in den genannten Parametern auch hier Versuchs- und Kontrollgruppe des Wildtyps nicht signifikant (Zhao et al. 2020).

Die Ergebnisse der beiden zuvor beschriebenen Studien zeigen somit insgesamt die wichtige Rolle des Connexin 43 bzw. der Osteozyten im Knochenstoffwechsel und deren Zusammenspiel mit den Osteoklasten und Osteoblasten.

4.5 Osteoklasten

Die Osteoklasten wurden zum einen mittels enzymhistochemischen Nachweises der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP) analysiert. Zum anderen wurde auch hier mittels real-time RT-PCR die relative Genexpression verschiedener Osteoklastenmarker untersucht.

Bildmorphologisch fielen über alle 3 Versuchsgruppen hinweg viele TRAP-positive Zellen auf, was in der histomorphometrischen Auswertung bestätigt wurde. Die TRAP-positiven Zellen nahmen durchschnittlich mehr als ein Drittel der Trabekeloberfläche ein, bei der Heidelbeer- sowie der alten Kontrollgruppe betrug der Anteil sogar fast 40% (Tab. 3.7, S. 54). Bereits aus den zuvor diskutierten Ergebnissen ließ sich schlussfolgern, dass sich insbesondere die beiden zuletzt genannten Versuchsgruppen in einer katabolen Lage des Knochenstoffwechsels befanden. Der ausgeprägte Nachweis der TRAP passte insofern zu dem nur gering vorhandenen Osteoid und dem nicht auswertbaren Nachweis der ALP sowie auch zu der deutlich rarefizierten trabekulären Struktur in der μ CT (Abb. 3.2, S. 43 und Abb. 3.4, S. 46).

Hinsichtlich der Signifikanz bestätigten sich die zuvor diskutierten Ergebnisse bei den Osteoklasten jedoch nicht. Auch hier wären enzymhistochemisch und molekularbiologisch signifikante Unterschiede zwischen der jungen Kontrollgruppe und den beiden älteren Gruppen zu erwarten gewesen, welche allerdings nicht festgestellt wurden. So wie bei der histomorphometrischen Auswertung von TRAP war auch die relative Genexpression von RANK und Kathepsin K sowie die des von Osteoblasten und Osteozyten produzierten RANKL als Hinweis auf einen vermehrten Knochenumbau bei der jungen Kontrollgruppe durchschnittlich am größten, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Ebenso wie bei den Osteoblasten zeigte sich in Studien, bei denen Versuchstiere eines deutlich jüngeren Alters verwendet wurden, auch bei der Auswertung der Osteoklasten

ein Ergebnis, was auf einen signifikant erhöhten Stoffwechsel zugunsten des Knochenaufbaus nach heidelbeerreicher Diät schließen lässt. Chen et al. 2010 sowie Zhang et al. 2011, hier in Verbindung mit Ovariectomie, wiesen bei Ratten mit entsprechender Diät ab dem 20. Lebenstag für 14 bzw. 40 Tage eine histomorphometrisch teils signifikant geringere Osteoklastenzahl als bei den Kontrollgruppen nach. Chen et al. 2010 untersuchten die Osteoklasten des Weiteren mittels real-time RT-PCR und Zellkultur anhand von Knochenmarkstammzellen. Es zeigte sich nach heidelbeerreicher Diät sowohl eine signifikant geringere relative Genexpression von RANKL als auch eine signifikant geringere Anzahl an Vorläuferzellen der Osteoklasten (Chen et al. 2010, Zhang et al. 2011). Li et al. 2014 kamen in ihrer Studien an älteren Versuchstieren histomorphometrisch zu einem ähnlich eindeutigen Ergebnis. Nach heidelbeerreicher Diät zeigte sich bei 20 Wochen alten, zwischenzeitlich ovariectomierten Ratten eine signifikant geringere Osteoklastenzahl und eine anteilig geringere Oberfläche, an der Knochenresorption stattfand. Wie auch bei der Analyse der Osteoblasten bestätigte sich dieses Ergebnis bei Shimizu et al. 2018 nicht. Bei ähnlichem Studiendesign waren hier die beiden genannten Osteoklastenparameter bei der Heidelbeergruppe nicht verringert (Li et al. 2014, Shimizu et al. 2018).

Insgesamt liegt die fehlende Wirksamkeit des Heidelbeereextraktes somit auch hinsichtlich der Osteoklasten im Alter der in der vorliegenden Studie verwendeten Versuchstiere sowie möglicherweise auch in der nicht durchgeführten Ovariectomie begründet. Die zuvor beschriebenen, zum Vergleich herangezogenen Studien (Chen et al. 2010, Zhang et al. 2011, Li et al. 2014, Shimizu et al. 2018) wurden mit Ratten durchgeführt, die sich zum Zeitpunkt der Auswertung in einem Alter zwischen 5 und 20 Wochen bei einer Lebenserwartung von wenigen Jahren befanden. Trotz einer Altersspanne von 15 Wochen, immerhin einem Entwicklungszeitraum bis zum möglichen Erreichen der Geschlechtsreife entsprechend, befanden sich die Versuchstiere somit letztlich in allen Studien in der Wachstumsphase. Die dort untersuchten histomorphometrischen und molekularbiologischen Parameter ergaben insgesamt ein Bild, was bei größtenteils signifikant vermehrter Osteoblasten- und erniedrigter Osteoklastenaktivität unter heidelbeerreicher Diät einem gesteigerten anabolen Knochenstoffwechsel während der Wachstumsphase entspricht.

Devareddy et al. 2008 untersuchten im Gegensatz dazu die Wirksamkeit einer heidelbeerreichen Ernährung an Ratten, die die Wachstumsphase bereits vollendet hatten. Die Versuchstiere waren hier zum Zeitpunkt der Ovariectomie bereits 6 Monate alt, erhielten nachfolgend die entsprechende Diät für 100 Tage und wurden dann schließlich euthanasiert. Es zeigte sich, wie in den zuvor diskutierten Studien mit im Wachstum befindlichen Versuchstieren, auch hier eine signifikant erniedrigte relative Genexpression der TRAP unter heidelbeerreicher Diät verglichen mit der ovariectomierten, normal ernährten Kontrollgruppe, einer erniedrigten Osteoklastenaktivität entsprechend. Im Gegensatz zu den zuvor genannten Studien (Chen et al. 2010, Zhang et al. 2011, Li et al. 2014), in denen es zu signifikant erhöhten Osteoblastenmarkern kam, war hier jedoch auch die relative Genexpression von ALP und Kollagen, Osteoblastenmarkern entsprechend, bei der Experimentalgruppe signifikant erniedrigt. Verglichen mit der scheinoperierten, nachfolgend normal ernährten Kontrollgruppe zeigte die Experimentalgruppe in den 3 genannten Parametern ähnliche, nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte. Bei signifikant erniedrigten Osteoblasten- und Osteoklastenmarkern der Experimentalgruppe im Vergleich zur korrespondierenden ovariectomierten Kontrollgruppe sowie ähnlicher Knochenstoffwechsellage im Vergleich zur scheinoperierten Kontrollgruppe konnte hier somit insgesamt geschlussfolgert werden, dass bei ausgewachsenen Tieren ein durch Ovariectomie induzierter Knochenumbau mittels heidelbeerreicher Diät gehemmt wurde (Devareddy et al. 2008).

Verglichen mit der vorliegenden Studie, in der der Anteil des Heidelbeerextraktes am Futter 2 % betrug, lag er in anderen diskutierten Studien, die die Auswirkung eines Heidelbeerextraktes auf den Knochen bzw. die Knochenzellen untersuchten, zwischen 5 und 10 % (Devareddy et al. 2008, Chen et al. 2010, Zhang et al. 2011, Li et al. 2014, Shimizu et al. 2018). Es ist jedoch fraglich, ob ein höherer Anteil an Heidelbeerextrakt den am ehesten altersbedingt osteopenen Knochencharakter ausreichend hätte kompensieren können. An jungen Versuchstieren wiesen Zhang et al. 2013 eine entsprechende Wirksamkeit auf den Knochenstoffwechsel auch bei einem geringen Anteil eines Heidelbeerextraktes am Futter und auch ohne vorherige Ovariectomie nach. In ihrer Studie ließ sich an Ratten nach entsprechender Diät ab dem 25. Lebenstag für 31 Tage schon bei einem Anteil von 1 % eine signifikant geringere relative Genexpression von TRAP und RANKL sowie eine signifikant erhöhte Expression von ALP, Osteocalcin

und weiterer Osteoblastenmarker nachweisen, insgesamt passend zu einer gesteigerten anabolen Knochenstoffwechsellage unter heidelbeerreicher Diät. Weitere Versuchsgruppen erhielten in der Studie einen Anteil des Heidelbeerextraktes von 3 bzw. 5 %, hier fielen die Unterschiede der untersuchten Parameter im Vergleich zur Kontrollgruppe mit steigendem Anteil noch zunehmend signifikanter aus. Es konnte somit auch ein quantitativer Zusammenhang zwischen Heidelbeerextrakt und der Auswirkung auf die Osteoklasten- sowie auch auf die Osteoblastentätigkeit nachgewiesen werden (Zhang et al. 2013).

Nicht untersucht wurden in der vorliegenden Studie die Auswirkungen von Heidelbeeren mittels Zellkultur. Zhao et al. 2019 wiesen nach entsprechender Behandlung von Stammzellen eine signifikant geringere Osteoklastenzahl sowie auch eine verringerte Aktivität hinsichtlich der Knochenresorption nach.

4.6 Gefäßversorgung der Wirbelkörper

Zur Analyse der Knochen-Vaskularisation wurde der immunhistochemische Nachweis α -*smooth-muscle-actin* (ASMA)-positiver Blutgefäße durchgeführt. Es konnten über alle Versuchsgruppen hinweg keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Hinsichtlich der Wirkung polyphenolreicher Nahrungsmittel auf die Vaskularisation des Knochens existieren bisher wenige Studien. Unbestritten ist die Notwendigkeit einer guten Vaskularisation des Knochens für den Knochenumbau (Sivaraj et al. 2016). Insbesondere im Rahmen reparativer Vorgänge des Knochens spielt die Durchblutung eine wichtige Rolle, z.B. bei der Frakturheilung (Wazzani et al. 2021). Kennedy et al. 2014 untersuchten an Ratten unter anderem die Auswirkungen belastungsinduzierter Mikrofrakturen auf die Synthese des für die Angiogenese wichtigen *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Das Ergebnis war eine signifikant erhöhte Produktion von VEGF durch die um die mikrofrakturierten Zonen gelegenen Osteozyten (Kennedy et al. 2014).

Ob sich eine polyphenolreiche Ernährung positiv auf die Vaskularisation des Heilungsprozesses pathologisch veränderter Knochen auswirken und somit unterstützend zum Knochenumbau beitragen kann, lässt sich auf Grundlage der bisher vorhandenen Studien nicht sicher sagen. Hierfür sind weitere Studien, zum Beispiel im Rahmen eines Frakturmodells, nötig.

4.7 Wirksamkeit der Kulturheidelbeere im Vergleich zur Wildheidelbeere

Fraglich hinsichtlich der Auswirkung auf das Ergebnis der vorliegenden Studie ist die Verwendung eines Heidelbeerextraktes aus der amerikanischen Kulturheidelbeere *Vaccinium corymbosum*. Verglichen mit Arten der Wildheidelbeere enthalten diese lediglich etwa ein Drittel an Anthocyanen (Müller et al. 2012, siehe auch 1.2.1, S. 16). Der Unterschied an sekundären Pflanzenstoffen zwischen Vertretern der europäischen Wild- und der amerikanischen Kulturheidelbeere wurde bereits zuvor von Giovanelli et al. 2009 herausgearbeitet. Auch hier zeigten sich hochsignifikant größere Konzentrationen an Polyphenolen, insbesondere an Anthocyanen, in der Wildheidelbeere. Daraus resultierte bei diesen auch eine deutlich vermehrte antioxidative Kapazität. So verwendeten mehrere der zuvor zum Vergleich herangezogenen Studien, in denen positive Effekte auf den Knochenstatus von Mäusen oder Ratten nachgewiesen wurden, ein Heidelbeerextrakt aus der nordamerikanischen Wildheidelbeere *Vaccinium angustifolium* (Chen et al. 2010, Zhang et al. 2011, Zhang et al. 2013).

Jedoch gibt es auch Beispiele für Tierstudien, in denen die Verwendung eines Extraktes aus der europäischen Wildheidelbeere *Vaccinium myrtillus* nicht die vermutete Wirkung am Knochen erzielte (Shimizu et al. 2018). Umgekehrt konnte auch unter Verwendung eines Extraktes aus der amerikanischen Kulturheidelbeere *Vaccinium corymbosum* signifikante Veränderungen im Knochenstoffwechsel nachgewiesen werden (Devareddy et al. 2008). Dass in der vorliegenden Studie die Verwendung eines Heidelbeerextraktes aus einer Art der Wildheidelbeere trotz der altersbedingt osteopenen Knochenstruktur der Versuchstiere zu signifikanten Unterschieden geführt hätte, erscheint daher insgesamt unwahrscheinlich.

4.8 Auswirkung anderer Polyphenole auf den menschlichen Knochenstatus

Abseits von Heidelbeeren gab es in der Vergangenheit bereits einige Studien, die die Auswirkungen anderer polyphenolreicher Nahrungsmittel auf den menschlichen Knochenstatus untersuchten. Hier gab es teils vielversprechende Ergebnisse, insbesondere was die Knochendichte betrifft.

So konnten New et al. 2000 Hinweise auf positive Effekte einer Ernährung, welche reich an Früchten ist, feststellen. In der Studie wurden Frauen im Alter zwischen 45 und 55

Jahren mittels Fragebögen bezüglich ihrer Ernährung in der Kindheit verglichen und hinsichtlich ihres Knochenstatus untersucht. Das Ergebnis war eine signifikant erhöhte Knochendichte des Femurhalses bei Frauen, welche in ihrer Kindheit größere Mengen an Früchten verzehrten, verglichen mit Probandinnen mit anamnestischem Verzehr von mittleren und geringen Mengen an Früchten. Im Hinblick auf eine unterstützende Maßnahme zur Prävention der Femurhalsfraktur, einer der häufigsten Frakturen im höheren Lebensalter, ist dies ein vielversprechendes Ergebnis. Des Weiteren unterstreicht das Ergebnis auch die Wichtigkeit einer polyphenolreichen Ernährung bereits im Kindesalter.

Die Auswirkungen einer Ernährung, welche den regelmäßigen Verzehr von Pflaumen beinhaltete, wurde von Hooshmand et al. 2011 untersucht. Hier erhielten Frauen nach der Menopause über einen Zeitraum von einem Jahr täglich 100 g getrocknete Pflaumen, ebenfalls reich an Polyphenolen. Während dieses Zeitraumes wurde der Knochenstatus alle 3 Monate reevaluiert. Nach einem Jahr zeigte sich eine signifikant erhöhte Knochendichte, insbesondere in Ulna und Wirbelsäule. Des Weiteren lieferte die Untersuchung des Serum hinsichtlich der Parameter des Knochenstoffwechsels Hinweise auf eine Verminderung des altersbedingten Knochenumbaus bei den Probandinnen.

Ebenfalls mittels Fragebögen untersuchten Welch et al. 2012 die Auswirkungen einer Ernährung, welche reich an verschiedenen sekundären Pflanzenstoffen war, hier anhand einer Zwillingsstudie. Befragt wurden Frauen zwischen 18 und 79 Jahren, die Studie beinhaltete somit sowohl Probandinnen vor als auch nach der Menopause. Es zeigte sich bei vermehrtem Verzehr einiger sekundärer Pflanzenstoffe eine erhöhte Knochendichte, teils in der Wirbelsäule, teils im Becken. Darüber hinaus zeigte sich speziell bei einem verstärkten Verzehr von Anthocyaninen nicht nur eine generell erhöhte Knochendichte, sondern interessanterweise auch eine größere Diskrepanz der Knochendichte innerhalb der postmenopausalen Zwillinge bei verstärktem gegenüber geringem Verzehr von Anthocyaninen als innerhalb der prämenopausalen. Dies kann als wichtiger Hinweis auf den unterstützenden, präventiven Charakter einer pflanzenstoffreichen Ernährung in Bezug auf die Entwicklung einer senilen Osteoporose angesehen werden.

4.9 Auswirkung auf das Frakturrisiko

Die Effekte einer polyphenolreichen Ernährung auf den Knochen wurden beim Menschen in der Vergangenheit bereits auch anhand der Auswirkung auf das Frakturrisiko untersucht. Ähnlich der positiven Effekte auf die Knochendichte zeigten sich auch hier Hinweise auf einen präventiven Nutzen.

In einer groß angelegten, multizentrischen Studie mit weiblichen (hier sowohl prä- als auch postmenopausalen) und männlichen Probanden aus 8 europäischen Ländern wurde die Auswirkung einer vorwiegend mediterranen Ernährung, reich an Früchten und Gemüse, auf das Risiko, eine Fraktur der Hüfte zu erleiden, untersucht. Die vermehrte Zufuhr sowohl von Früchten als auch Gemüse konnten das Risiko senken, eine fleischreiche Ernährung hingegen führte zu einem gesteigerten Frakturrisiko (Benetou et al. 2013). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Byberg et al. 2015. Hier wurden insgesamt über 75 000 Frauen und Männer zwischen 45 und 83 Jahren aus Schweden bezüglich der Menge an täglicher Zufuhr von Obst und Gemüse über einen Zeitraum von 14,2 Jahren eingeteilt und über dieses Zeitintervall das Risiko für eine Hüftfraktur ermittelt. Ähnlich wie bei Benetou et al. 2013 führte auch hier der verstärkte Konsum sowohl von Obst als auch von Gemüse zu einem verminderten Frakturrisiko.

Der frakturprotektive Effekt einer polyphenolreichen Ernährung konnte auch von Studien anhand von Patientenkollektiven anderer Kontinente bestätigt werden. So führten Xie et al. 2013 eine Fall-Kontroll-Studie mit chinesischen Probanden zwischen 55 und 80 Jahren durch, ebenfalls mit der Fragestellung, wie sich eine obst- und gemüsereiche Ernährung auf das Risiko einer Hüftfraktur auswirkt, hier über einen Zeitraum von 5 Jahren. Das Ergebnis war ein vermindertes Frakturrisiko der männlichen Probanden sowohl bei obst- als auch gemüsereicher Ernährung, bei Frauen führte lediglich eine gemüsereiche Ernährung zu einem verminderten Risiko. Des Weiteren untersuchten Blekkenhorst et al. 2017 das Frakturrisiko bei australischen Frauen nach der Menopause, welche sich über einen Zeitraum von 7 Jahren besonders obst- oder gemüsereich ernährten. Das Ergebnis war ein vermindertes Frakturrisiko bei Probandinnen, die sich gemüsereich ernährten hatten, eine obstreiche Ernährung hatte auffälligerweise auch hier keinen Einfluss auf das Frakturrisiko.

Ob explizit Polyphenole aus Heidelbeeren diese Ergebnisse bestätigen können, bleibt zukünftigen Studien vorbehalten. Da jedoch bereits zahlreiche Tierstudien den positiven Effekt explizit von Heidelbeeren belegen konnten, erscheint dies auch für Studien am Menschen realistisch, insbesondere vor dem Hintergrund der Ergebnisse bereits erfolgter Studien über andere Polyphenole und deren Auswirkungen auf den Knochenstatus, insbesondere hinsichtlich der Knochendichte und des Frakturrisikos. Davon abgesehen erscheint es realistischer, dass eine im Alltag umsetzbare ausgewogene, polyphenolreiche Ernährung vorwiegend aus einer Mischung verschiedener polyphenolreicher Quellen bestehen sollte.

4.10 Schlussfolgerung

Das Design der vorliegenden Studie wurde so gewählt, dass die heidelbeerreich ernährte Versuchsgruppe mit einer gleichaltrigen, ebenfalls ausgewachsenen Kontrollgruppe sowie einer jungen, nicht vollständig ausgewachsenen Kontrollgruppe verglichen wurde. Das Ziel der Studie war es, Unterschiede zwischen den beiden gleichaltrigen, ausgewachsenen Gruppen in den untersuchten Eigenschaften der Knochen zugunsten der Versuchsgruppe nachzuweisen. Des Weiteren waren Ähnlichkeiten zwischen Versuchs- und junger Kontrollgruppe als Zeichen einer Verzögerung des altersbedingten Knochenabbaus erhofft worden.

Insgesamt muss geschlossen werden, dass die fehlende Wirksamkeit des Heidelbeerextraktes im Alter der Versuchstiere begründet liegt. So begannen die entsprechenden Diäten für die Mäuse der Heidelbeer- sowie der alten Kontrollgruppe mit 13 Monaten erst lange nach dem Ende der Wachstumsphase. Des Weiteren hatten diese zum Zeitpunkt der Euthanasie und Auswertung der Knochen mit 20 Monaten ein Alter erreicht, das bereits in der Nähe der natürlichen Lebenserwartung der untersuchten Mäuse liegt. Insbesondere in den untersuchten μ CT-Parametern schlug sich das fortgeschrittene Alter der beiden Gruppen in einer deutlichen Osteopenie nieder, was in Zusammenhang mit dem späten Beginn der heidelbeerreichen Diät mutmaßlich signifikante Unterschiede verhinderte. Vor dem Hintergrund der Osteopenie der beiden älteren Gruppen waren die teils hochsignifikanten Unterschiede zur jungen Kontrollgruppe zu erwarten.

Hinsichtlich des Alters der Versuchstiere war das Design anderer Studien, die positive Auswirkungen eines Heidelbeerextraktes auf den Knochenstatus von Mäusen oder Ratten belegten, so gewählt worden, dass sowohl die Diät als auch der Zeitpunkt der Euthanasie in der Wachstumsphase stattfanden. Häufig begann die heidelbeerreiche Diät schon innerhalb des ersten Lebensmonats (Chen et al. 2010 und Zhang et al. 2011 nach 20 Tagen; Zhang et al. 2013 nach 25 Tagen). Bei einem in der Wachstumsphase ohnehin vermehrten Stoffwechsel ist es eher zu erwarten, dass sich bei einer tatsächlichen Wirksamkeit des Heidelbeerextraktes auf den Knochen die Unterschiede auch statistisch signifikant widerspiegeln. Passend dazu konnte ein positiver Effekt auf die Knochendichte bei einer bereits in der Kindheit erfolgten, fruchtreichen Ernährung bei Frauen zwischen 45 und 55 Jahren bereits nachgewiesen werden (New et al. 2000).

Wenig untersucht wurden in den bisherigen Maus- und Rattenmodellen die langfristigen Auswirkungen einer heidelbeerreichen Ernährung. In der Mehrzahl der Studien erhielten die Versuchstiere ein Heidelbeerextrakt über einen Zeitraum von maximal einigen Wochen. Lediglich bei Devareddy et al. 2008 dauerte die Diät 100 Tage, beginnend mit einem Alter der Tiere von immerhin 6 Monaten und somit nach abgeschlossenem Wachstum, auch hier jedoch mit zwischenzeitlich erfolgter Ovariectomie. Für eine realistischere Bewertung der langfristigen Wirkung von Heidelbeeren auf den Knochenstatus, insbesondere auch für eine bessere Einschätzung des Nutzens einer heidelbeerreichen Ernährung für den Menschen, erscheinen daher Tiermodelle sinnvoll, in denen die Zufuhr in den ersten Lebenstagen beginnt und bis in das hohe Erwachsenenalter anhält.

Des Weiteren wurde in der Mehrheit der Studien zu dem Thema bei den jungen Versuchstieren mittels Ovariectomie eine Osteoporose induziert, was einen wesentlichen Unterschied zu der vorliegenden Studie darstellt und die Vergleichbarkeit erheblich einschränkt (Devareddy et al. 2008, Li et al. 2014, Shimizu et al. 2018, Zhang et al. 2011, Zhang et al. 2013). Die Studienlage bezüglich der Auswirkungen einer polyphenolreichen Ernährung auf den menschlichen Knochenstatus explizit bei Vorliegen einer sekundären Osteoporose z.B. im Rahmen einer Ovariectomie oder einer Kortisontherapie ist lückenhaft, hier bedarf es weiterer Studien. Da jedoch der präventive Nutzen für die Knochendichte insbesondere bei postmenopausalen Frauen bereits nachgewiesen wurde,

ist davon auszugehen, dass eine polyphenolreiche Ernährung auch bei einer sekundären Osteoporose positive Effekte mit sich bringt (Hooshmand et al. 2011, Welch et al. 2012).

4.11 Ausblick

Obwohl der erhoffte positive Effekt des Heidelbeerextraktes auf den Knochenstatus von Mäusen nicht nachgewiesen werden konnte, so konnte zumindest gezeigt werden, dass die heidelbeerreiche Ernährung mit Beginn im adulten Alter der Versuchstiere in der vorliegenden Studie allein nicht ausreichte, dem altersbedingten Verlust an Knochensubstanz entgegenzuwirken. Dass Polyphenole durch deren antioxidative Wirkung und den damit verbundenen Fang von Radikalen sowie verschiedener Mechanismen einer gesteigerten Osteoblastenaktivierung und Osteoklastenhemmung der Alterung des Kochens entgegenwirken können, konnte in Studien sowohl an Tieren als auch am Menschen bereits gezeigt werden. (Hubert et al. 2014, Melough et al. 2017). Daneben konnte im Rahmen einer Meta-Analyse an Probanden, die das 50. Lebensjahr überschritten hatten, auch ein vermindertes Frakturrisiko bei obst- und gemüsereicher Ernährung gezeigt werden (Brondani et al. 2019). Im Hinblick auf die Prävention und supportive Behandlung des Krankheitsbildes der Osteoporose und die damit verbundenen Komplikationen sind dies vielversprechende Hinweise.

Insbesondere am Menschen sind in Zukunft weitere Studien nötig, um die bereits nachgewiesenen Effekte polyphenolreicher Ernährungen präventiv im Alltag und auch bei bereits bestehenden pathologischen Veränderungen des Skelettsystems optimal nutzen zu können. Die Frage, ob eine alleinige, ausgewogene, polyphenolreiche Ernährung eine gleichermaßen wirksame Alternative zu pharmakologischen Therapien der modernen Medizin sein kann, sollte hierbei nicht im Vordergrund stehen. Vielmehr sollte eine optimierte polyphenolreiche Ernährung als Ergänzung in Prävention und Rehabilitation bei Erkrankungen des Skelettsystems fungieren, insbesondere natürlich auch unter Berücksichtigung der vielfältigen weiteren gesundheitsfördernden Effekte von Polyphenolen abseits der Knochen. Zudem sollte eine polyphenolreiche Ernährung nicht erst im fortgeschrittenen Alter bei bereits verminderter Knochensubstanz erfolgen, sondern genauso wie auch andere präventive Maßnahmen idealerweise in jungen Lebensjahren beginnen und langfristig erfolgen.

Ein weiterer, wichtiger Gegenstand künftiger Studien sollte auch die eher geringe Bioverfügbarkeit der Polyphenole aus Heidelbeeren sein. Diese liegt beim Menschen insgesamt lediglich im Bereich von 1 % (Zhou et al. 2017). Bei einigen Polyphenolen erscheint es daher fraglich, ob diese bei einer Zufuhr über die Nahrung in ausreichender Konzentration im Blut vorliegen, um Effekte auf die Gesundheit zu entfalten (Di Lorenzo et al. 2021). In der jüngeren Vergangenheit wurde bereits an den Möglichkeiten der Lebensmittelverarbeitung polyphenolreicher Nahrungsmittel mit dem Ziel einer erhöhten Bioverfügbarkeit der biologisch aktiver Wirkstoffe geforscht, beispielsweise durch thermische Verfahren (Arfaoui 2021). Die bisherigen Ergebnisse sind allerdings uneindeutig und als unzureichend anzusehen. Hier bedarf es dringend weiterer Studien mit dem Ziel der Optimierung einer polyphenolreichen Ernährung, um einen optimalen gesundheitsfördernden Effekt zu erreichen, gerade auch im Hinblick auf den Knochenstatus.

5 Zusammenfassung

Erkrankungen des muskuloskelettalen Systems betreffen, insbesondere im höheren Lebensalter, einen beträchtlichen Anteil der Bevölkerung. So tritt beispielsweise die Osteoporose als eine der häufigsten Erkrankungen des Bewegungsapparates bei 8 % der 50 bis 79-jährigen Deutschen auf (Fuchs et al. 2013). Hieraus kann eine deutliche Einschränkung an Lebensqualität resultieren. Es bedarf daher neben pharmakologischer und operativer Therapie auch präventiver Maßnahmen zur Reduzierung des Verlustes an Knochensubstanz wie beispielsweise einer optimalen Ernährung. Insbesondere eine reichhaltige Zufuhr von Polyphenolen, enthalten vor allem in Obst und Gemüse, scheint hier einen protektiven Effekt zu haben (Hubert et al. 2014, Brondani et al. 2019). Da in den letzten Jahren mehrere Studien explizit die Wirkung von Heidelbeeren, ebenfalls reich an Polyphenolen, auf den Knochenstatus untersuchten und vielversprechende Hinweise auf einen positiven Effekt zeigen konnten, sollte dies in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden (Devareddy et al. 2008, Chen et al. 2010, Zhang et al. 2011, Li et al. 2014, Shimizu et al. 2018).

Die Studie wurde mit weiblichen NMRI-Mäusen durchgeführt, aufgeteilt in 3 Gruppen zu jeweils 14 Tieren. Der Heidelbeergruppe wurde dem Futter über 7 Monate 20 g eines Heidelbeerextraktes pro kg Futter bis zur Euthanasie im Alter von 20 Monaten zugeführt. Die beiden Kontrollgruppen, welche eine polyphenolarme Kontrolldiät erhielten, bestanden aus einer alten (entsprechend dem Alter der Tiere der Heidelbeergruppe) und einer jungen Kontrollgruppe, welche die Kontrolldiät über 2 Monate bis zur Euthanasie im Alter von 3 Monaten erhielt. Untersucht wurden mehrere Wirbelkörper sowie die Femora. Die Messung der biomechanischen Eigenschaften der Femora erfolgte durch einen Dreipunkt-Biegetest. Mittels μ CT und Histomorphometrie wurde die Feinstruktur der Kortikalis und der Spongiosa von Wirbelkörpern und Femora quantifiziert. Zwecks Analyse der Knochenzellen sowie der Gefäße wurden enzym- und immunhistochemische Verfahren durchgeführt. Für die Analyse der Genexpression verschiedener Gene des Knochenstoffwechsels kam die real-time RT-PCR zum Einsatz.

In der vorliegenden Studie konnte ein Effekt des Heidelbeerextraktes nicht nachgewiesen werden. Insgesamt ergaben die Ergebnisse der verschiedenen Methoden, insbesondere die des Dreipunkt-Biegetestes sowie die der μ CT, ein schlüssiges Bild, bei dem sich die

Heidelbeer- und die alte Kontrollgruppe ähnelten sowie beide genannten Gruppen sich teils deutlich signifikant von der jungen Kontrollgruppe unterschieden. So zeigte der Dreipunkt-Biegetest eine signifikant größere Maximalkraft der Femora der Heidelbeer- und alten Kontrollgruppe gegenüber denen der jungen Kontrollgruppe. Passend dazu ergab die Quantifizierung der Kortikalis in der μ CT einen größeren Durchmesser. Umgekehrt wiesen Femora und Wirbelkörper der jungen Kontrollgruppe eine größere Zahl an Trabekeln auf. Auch in der real-time RT-PCR zeigten die Heidelbeer- und die alte Kontrollgruppe viele Gemeinsamkeiten und unterschieden sich beide teils signifikant von der jungen Kontrollgruppe, wobei die Gene des Knochenabbaus in der Heidelbeer- und in der alten Kontrollgruppe stärker ausgeprägt waren.

Ursächlich für den fehlenden, relevanten Effekt des Heidelbeerextraktes ist das Alter der Versuchstiere in der vorliegenden Studie anzusehen. So begann die Fütterung mit dem Heidelbeerextrakt erst lange nach dem Ende der Wachstumsphase. Die Euthanasie erfolgte schließlich erst in einem Alter in der Nähe der statistischen Lebenserwartung der Versuchstiere. Insbesondere in der μ CT zeigten die Knochen der Heidelbeer- und der alten Kontrollgruppe deutliche Zeichen einer Osteopenie, wodurch ein messbarer, statistisch signifikanter Effekt des Heidelbeerextraktes mutmaßlich verhindert wurde. Vergleichbare Tierstudien, die einen Effekt einer heidelbeerreichen Ernährung nachweisen konnten, nutzten ein Studiendesign, bei dem die entsprechende Diät bereits in der frühen Wachstumsphase erfolgte (Chen et al. 2010, Zhang et al. 2011, Zhang et al. 2013).

Die Auswirkungen einer heidelbeerreichen Ernährung auf den menschlichen Knochenstatus wurde bisher unzureichend untersucht. Jedoch gibt es bereits zahlreiche Studien, die einen Zusammenhang zwischen der vermehrten Zufuhr unterschiedlicher, polyphenolreicher Lebensmittel und einer gesteigerten Knochendichte zeigen konnten (New et al. 2000, Hooshmand et al. 2011, Welch et al. 2012). Eine langfristige, polyphenolreiche Ernährung sollte somit als Baustein in die Prävention vor einem altersbedingten oder sekundären Knochenverlust integriert werden. Inwieweit explizit Heidelbeeren dabei optimal genutzt werden können, sollte anhand zukünftiger Studien evaluiert werden.

6 Summary

Musculoskeletal diseases affect a significant proportion of the population, especially in old age. For example, osteoporosis as one of the most common diseases of musculoskeletal system affects 8 % of 50 to 79-year-old Germans (Fuchs et al. 2013). This can result in a significant reduction in quality of life. Therefore, in addition to pharmacological and surgical therapy, preventive measures to reduce bone loss are required, such as optimal nutrition. Especially a rich intake of polyphenols, contained mainly in fruits and vegetables, seems to have a protective effect (Hubert et al. 2014, Brondani et al. 2019). Because of several studies in recent years having examined the effect of explicitly blueberries, also rich in polyphenols, on bone status and having shown promising hints of a positive effect, this should be proven in the present study (Devarreddy et al. 2008, Chen et al. 2010, Zhang et al. 2011, Li et al. 2014, Shimizu et al. 2018).

The study was conducted with female NMRI mice, divided into 3 groups of 14 animals each. The blueberry group was fed with 20 g of a blueberry extract per kg of feed over 7 months until euthanasia at the age of 20 months. The two control groups, which received a control diet poor in polyphenols, consisted of an old (corresponding to the age of the animals of the blueberry group) and a young control group, which received the control diet over 2 months until euthanasia at the age of 3 months. Vertebral bodies and femora were examined. Biomechanical properties of femora were measured by three-point bending test. Using μ CT and histomorphometry, ultrastructure of cortical bone and spongiosa of vertebral bodies and femora was quantified. For the analysis of bone cells and vessels, enzyme- and immunohistochemical procedures were performed. Real-time RT-PCR was used to analyze gene expression of various bone metabolism genes.

In the present study, an effect of the blueberry extract could not be proven. The results of the various methods, in particular those of three-point bending test and μ CT, resulted in similarity of blueberry and old control group while both of them differed significantly from young control group. Thus, three-point bending test showed a significantly higher maximum power of the femora of blueberry and old control group compared to those of young control group. Corresponding, quantification of cortical bone in μ CT resulted in a larger diameter. Conversely, femora and vertebral bodies of young control group had a larger number of trabecula. Also in real-time RT-PCR, blueberry and old control group

showed many similarities and both differed significantly from young control group, whereby genes of bone loss were more pronounced in blueberry and in old control group.

The reason that there was no relevant effect of the blueberry extract might be the age of the test animals in the present study. Thus, feeding of the blueberry extract began long after the end of growing period. After all, euthanasia took place at an age close to the statistical life expectancy of the test animals. Especially in μ CT, the bones of blueberry and old control group showed signs of osteopenia, which prevented a measurable, statistically significant effect of the blueberry extract. Comparable animal studies which were able to prove an effect of a diet rich in blueberries used a study design in which the corresponding diet was already carried out in early growing period (Chen et al. 2010, Zhang et al. 2011, Zhang et al. 2013).

The effects of a diet rich in blueberries on human bone status have been studied insufficiently. However, there are already numerous studies that have shown a connection between higher intake of different, polyphenol-rich food and increased bone density (New et al. 2000, Hooshmand et al. 2011, Welch et al. 2012). Altogether a long-term, polyphenol-rich diet should be a part in prevention of age-related or secondary bone loss. The best possible use of blueberries should be evaluated on the basis of future studies.

7 Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AK	Alte Kontrollgruppe
ALP	Alkalische Phosphatase
ASMA	α -Smooth-Muscle-Actin
ATP	Adenosintriphosphat
BLCs	Bone Lining Cells
BMD	Bone Mineral Density (gemittelte Dichte aus knöchernem und weichem Gewebe in g/cm ³)
BMPs	Bone Morphogenic Proteins
BSB	Bone Sialoprotein
BV/TV	Percent Bone Volume (relatives Knochenvolumen) in % (Spongiosa)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ClC7	Chloride Channel 7
cm	Zentimeter
Ct	Cycle Threshold
Dlx5	Distal-Less Homeobox 5
DMP1	Dentin Matrix Acidic Phosphoprotein 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Elastizitätsmodul
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Kraft
F(max)	Maximalkraft
G	Beschleunigungsgröße der Zentrifuge
g	Gramm
h	Stunde
HB	Heidelbeergruppe
HDL	High Density Lipoprotein

HE	Hämatoxylin-Eosin
Hz	Hertz
I	Flächenträgheitsmoment
IE	Internationale Einheit
JK	Junge Kontrollgruppe
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
M	Mol
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MEPE	Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
μ A	Mikroampere
μ CT	Mikro-Computertomographie
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
L 1	1. Lumbalwirbel
L 3	3. Lumbalwirbel
MMP9	Matrix Metalloproteinase
Msx2	Msh Homeobox 2
MT1-MMP	Membrane-Type Matrix Metalloproteinase 1
N	Newton
NFATc1	Nuclear Factor of activated T-cells, Cytoplasmic 1
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells
nm	Nanometer
NMRI	Naval Medical Research Institute
NPP1	Nucleoside Pyrophosphohydrolase 1

Obj.Ar	Mean Total Crossectional Object Area (kortikale Gesamtquerschnittsfläche des rein knöchernen Anteils) in mm ²
Obj.Ar / T.Ar	Relatives Knochenvolumen in % (Kortikalis)
OF45	Osteoblast/Osteocyte Factor 45
OPG	Osteoprotegerin
PFA	Phosphat-gepuffertes Paraformaldehyd
PHEX	Phosphate-Regulating Gene With Homologies to Endopeptidases on the X Chromosome
PMMA	Polymethylmethacrylat
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor κ B
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of Interest
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
Runx2	Runt-Related Transcription Factor 2
sec	Sekunde
SIBLING	Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins
St.Th	Structure Thickness (durchschnittliche Kortikalisdicke in mm)
Tab	Tabelle
T.Ar	Mean Total Crossectional Tissue Area (kortikale Gesamtquerschnittsfläche) in mm ²
Tb.N	Trabecular Number (Anzahl der Trabekel) in mm ⁻¹
Tb.Sp	Trabecular Separation (durchschnittlicher Trabekelabstand) in mm
Tb.Th	Trabecular Thickness (durchschnittliche Trabekeldicke) in mm
TGF- β	Transforming Growth Factor β
Th 10	10. Thorakalwirbel
Th 12	12. Thorakalwirbel
TMD	Tissue Mineral Density (Dichte des rein knöchernen Anteils) in g/cm ³
TRAF6	Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 6
TRAP	Tartratesistente saure Phosphatase

UV	Ultraviolettstrahlung
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VOI	Volume of Interest
W	Watt
°C	Grad Celsius

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Bau des Knochens am Beispiel eines 3. Lumbalwirbels und vergrößerter Ausschnitt des Wirbelkörpers, Toluidinblau-Färbung	3
Abb. 1.2	Bau eines Röhrenknochens am Beispiel eines Femurs, Mikro-CT	4
Abb. 1.3	Bau eines Wirbels, L 3, Toluidinblau-Färbung	5
Abb. 1.4	Knochenzellen, enzymhistochemischer Nachweis von TRAP	11
Abb. 1.5	Flavan als Grundgerüst der Anthocyane, erstellt mit ChemSketch	14
Abb. 1.6	Grundgerüst der Anthocyanidine, erstellt mit ChemSketch	15
Abb. 1.7	Malvidin-3-O-Galactosid, Beispiel eines in Heidelbeeren vorkommenden Anthocyanins, erstellt mit ChemSketch	15
Abb. 2.1	Heidelbeermäuse und junge Kontrollmäuse mit Futter	21
Abb. 2.2	Aluminiumhülle mit linkem Femur und Zahnzementkleber in der Klemmhalterung sowie zur Messung vorbereiteter Femur	22
Abb. 2.3	Materialprüfmaschine mit Druckfinne, Stützweite, Hebelarm und Differenz aus Stützweite und Hebelarm	23
Abb. 2.4	Kraftbiegungskurve mit Probenbruch bei F(max), Steigungstangente und linear verlaufender Kurvenbereich	24
Abb. 2.5	Festlegung der VOI und ROI des Femurs	27
Abb. 2.6	Festlegung der VOI und ROI des Wirbelkörpers	28
Abb. 2.7	HE-Färbung ausgewertet, HE-Färbung mit venösem Plexus	34
Abb. 2.8	Nachweis von TRAP vor und nach der Auswertung	34
Abb. 2.9	Fehlender Nachweis von ALP	35
Abb. 2.10	Nachweis von ASMA-positiven Gefäßen, Negativkontrollen	36
Abb. 2.11	Kossa-van Gieson-Färbung zum Nachweis von Osteoid vor und nach der Auswertung	37

Abb. 3.1	Statistik Biomechanik	42
Abb. 3.2	Dreidimensionale Rekonstruktion der ersten Lumbalwirbel unter Entfernung der ventralen Kortikalis mit Blick auf die Spongiosa	43
Abb. 3.3	Statistik μ CT. Spongiosa Wirbel L 1	45
Abb. 3.4	Dreidimensionale Rekonstruktion der rechten Femora unter Entfernung der ventralen Kortikalis mit Blick auf die Spongiosa	46
Abb. 3.5	Statistik μ CT. Spongiosa Femur rechts	47
Abb. 3.6	Statistik μ CT. Kortikalis Femur rechts metaphysär	49
Abb. 3.7	Statistik μ CT. Kortikalis Femur rechts diaphysär	51
Abb. 3.8	HE-Färbung der dritten Lumbalwirbelkörper	52
Abb. 3.9	Statistik Histomorphometrie. Relatives Knochenvolumen	53
Abb. 3.10	Nachweis vieler TRAP-positiver Zellen im dritten Lumbalwirbelkörper der Heidelbeer-, alten und jungen Kontrollgruppe	53
Abb. 3.11	Statistik Histomorphometrie. TRAP	54
Abb. 3.12	ALP-Enzymhistochemie. Übersicht, Detail-Aufnahme aus dem Arcus vertebrae mit minimalem Enzymnachweis, Detail-Aufnahme aus dem Corpus vertebrae mit fehlendem Enzymnachweis	55
Abb. 3.13	Nachweis ASMA-positiver Gefäße im dritten Lumbalwirbelkörper der Heidelbeer-, alten und jungen Kontrollgruppe	56
Abb. 3.14	Statistik Histomorphometrie. ASMA	56
Abb. 3.15	Kossa-van Gieson-Färbung der zwölften Thorakalwirbelkörper. Trabekeloberfläche der Heidelbeer-, alten und jungen Kontrollgruppe mit schmalem Osteoid-Saum	57
Abb. 3.16	Statistik Histomorphometrie. Osteoid-positive Trabekeloberfläche	58
Abb. 3.17	Statistik real-time RT-PCR. Relative Genexpression der Osteoblasten-Marker	60
Abb. 3.18	Statistik real-time RT-PCR. Relative Genexpression der Osteozyten-Marker	61
Abb. 3.19	Statistik real-time RT-PCR. Relative Genexpression der Osteoklasten-Marker	62

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Versuchsgruppen	20
Tab. 2.2	Zur Auswertung verwendete Knochen	21
Tab. 2.3	Festlegung der VOI der Femora	26
Tab. 2.4	Festlegung der ROI sowie Lower / Upper Grey Threshold	27
Tab. 2.5	Zur Analyse entnommene Wirbel und deren Verwendung (Histologie)	29
Tab. 2.6	Präinfiltration und Infiltration bei der Technovit 9100 Einbettung	30
Tab. 2.7	Verwendete Primer	40
Tab. 3.1	Datentabelle Biomechanik	42
Tab. 3.2	Datentabelle μ CT. Spongiosa L 1	44
Tab. 3.3	Datentabelle μ CT. Spongiosa Femur rechts	47
Tab. 3.4	Datentabelle μ CT. Kortikalis Femur rechts metaphysär	48
Tab. 3.5	Datentabelle μ CT. Kortikalis Femur rechts diaphysär	50
Tab. 3.6	Datentabelle Histomorphometrie. Relatives Knochenvolumen	52
Tab. 3.7	Datentabelle Histomorphometrie. TRAP	54
Tab. 3.8	Datentabelle Histomorphometrie. ASMA	56
Tab. 3.9	Datentabelle Histomorphometrie. Osteoid-positive Trabekeloberfläche	57
Tab. 3.10	Datentabelle real-time RT-PCR. Relative Genexpression der Osteoblasten-Marker	59
Tab. 3.11	Datentabelle real-time RT-PCR. Relative Genexpression der Osteozyten-Marker	61
Tab. 3.12	Datentabelle real-time RT-PCR. Relative Genexpression der Osteoklasten-Marker	62

8 Literaturverzeichnis

Addison WN, Nakano Y, Loisel T, Crine P, McKee MD. 2008. MEPE-ASARM peptides control extracellular matrix mineralization by binding to hydroxyapatite: An inhibition regulated by PHEX cleavage of ASARM. *Journal of Bone and Mineral Research* 23 (10): 1638-1649. doi: 10.1359/jbmr.080601

Appelman-Dijkstra NM, Papapoulos SE. 2016. Sclerostin inhibition in the management of Osteoporosis. *Calcified Tissue International* 98 (4): 370-380. doi: 10.1007/s00223-016-0126-6

Arana-Chavez VE, Bradaschia-Correa V. 2009. Clastic cells: Mineralized tissue resorption in health and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41 (3): 446-450. doi: 10.1016/j.biocel.2008.09.007

Arfaoui L. 2021. Dietary plant polyphenols: Effects of food processing on their content and bioavailability. *Molecules* 26 (10): 2959. doi: 10.3390/molecules26102959

Baht GS, Hunter GK, Goldberg HA. 2008. Bone sialoprotein-collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation. *Matrix Biology* 27 (7): 600-608. doi: 10.1016/j.matbio.2008.06.004

Bailey S, Karsenty G, Gundberg C, Vashishth D. 2017. Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1409 (1): 79-84. doi: 10.1111/nyas.13470

Bellido T. 2014. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcified Tissue International* 94 (1): 25-34. doi: 10.1007/s00223-013-9774-y

Benetou V, Orfanos P, Pettersson-Kymmer U, Bergström U, Svensson O, Johansson I, Berrino F, Tumino R, Borch KB, Lund E. 2013. Mediterranean diet and incidence of hip fractures in a European cohort. *Osteoporosis International* 24 (5): 1587-1598. doi: 10.1007/s00198-012-2187-3

Blekkenhorst LC, Hodgson JM, Lewis JR, Devine A, Woodman RJ, Lim WH, Wong G, Zhu K, Bondonno CP, Ward NC, Prince RL. 2017. Vegetable and fruit intake and fracture-related hospitalisations: a prospective study of older women. *Nutrients* 9 (5): 511. doi: 10.3390/nu9050511

Bonewald LF, Mundy GR. 1990. Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clinical Orthopaedic and Related Research* 250: 261-276 doi: 10.1097/00003086-199001000-00036

Bonewald LF, Johnson ML. 2008. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 42 (4): 606-615. doi: 10.1016/j.bone.2007.12.224

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg LE, Jepsen KL, Müller R. 2010. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research* 25 (7): 1468-1486. doi: 10.1002/jbmr.141

Bradshaw AD. 2012. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (3): 480-488. doi: 10.1016/j.biocel.2011.12.021

Brondani JE, Comim FV, Flores LM, Martini, LA, Premaor MO. 2019. Fruit and vegetable intake and bone: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 14 (5): e0217223. doi: 10.1371/journal.pone.0217223

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. 2021. Deutschland wie es isst. Der BMEL-Ernährungsreport 2021.

Byberg L, Bellavia A, Orsini N, Wolk A, Michaelsson K. 2015. Fruit and vegetable intake and risk of hip fracture: a cohort study of Swedish men and women. *Journal of Bone and Mineral Research* 30 (6): 976-984. doi: 10.1002/jbmr.2384

Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP. 2007. Glucocorticoid-induced osteoporosis: Pathophysiology and therapy. *Osteoporosis International* 18 (10): 1319-1328. doi: 10.1007/s00198-007-0394-0

Chen G, Deng C, Li YP. 2012. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International Journal of Biological Sciences* 8 (2): 272-288. doi: 10.7150/ijbs.2929

Chen JR, Lazarenko OP, Wu X, Kang J, Blackburn ML, Shankar K, Badger TM, Ronis MJJ. 2010. Dietary-induced serum phenolic acids promote bone growth via p38 MAPK/ β -catenin canonical Wnt signaling. *Journal of Bone and Mineral Research* 25 (11): 2399-411. doi: 10.1002/jbmr.137

Chen H, Senda T, Kubo KY. 2015. The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. *Medical Molecular Morphology* 48 (2): 61-68. doi: 10.1007/s00795-015-0099-y

Chen S, Feng J, Bao Q, Li A, Zhang B, Shen Y, Zhao Y, Guo Q, Jing J, Lin S, Zong Z. 2015. Adverse effects of osteocytic constitutive activation of β -catenin on bone strength and bone growth. *Journal of Bone and Mineral Research* 30 (7): 1184-1194. doi: 10.1002/jbmr.2453

Ciceri P, Elli F, Cappelletti L, Tosi D, Savi F, Bulfamante G, Cozzolino M. 2016. Osteonectin (SPARC) expression in vascular calcification: In vitro and ex vivo studies. *Calcified Tissue International* 99 (5): 472-480. doi: 10.1007/s00223-016-0167-x

Clarke BL. 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of American Society of Nephrology* 3 (3): 131-139. doi: 10.2215/CJN.04151206

Clarke BL. 2014. Anti-sclerostin antibodies: Utility in treatment of osteoporosis. *Maturitas* 78 (3): 199-2014. doi: 10.1016/j.maturitas.2014.04.016

Crane JL, Cao X. 2014. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- β signaling in bone remodeling. *The Journal of Clinical Investigation* 124 (2): 466-472. doi: 10.1172/JCI70050

Curtis PJ, van der Velpen V, Berends L, Jennings A, Feelisch M, Umpleby AM, Evans M, O Fernandez B, Meiss MS, Minnion M, Potter J, Minihane A-M, Kay CD, Rimm EB, Cassidy A. 2019. Blueberries improve biomarkers of cardiometabolic function in participants with metabolic syndrome – results from a 6-month, double-blind, randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* 109 (6): 1535-1545. doi: 10.1093/ajcn/nqy380

Delgado-Calle J, Sato AY, Bellido T. 2017. Role and mechanism of action of sclerostin in bone. *Bone* 96: 29-37. doi: 10.1016/j.bone.2016.10.007

Devareddy L, Hooshmand S, Collins JK, Lucas EA, Chai SC, Arjmandi BH. 2008. Blueberry prevents bone loss in ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *Journal of Nutritional Biochemistry* 19 (10): 694-699. doi: 10.1016/j.jnutbio.2007.09.004

Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. 2021. Polyphenols and human health: The role of bioavailability. *Nutrients* 13 (1): 273. doi: 10.3390/nu13010273

Doan P, Bonewald LF. 2016. The role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 77 (Pt A): 23-29. doi: 10.1016/j.biocel.2016.05.015

Domazetovic V, Marcucci G, Iantomasi T, Brandi ML, Vincenzini MT. 2017. Oxidative stress in bone remodeling: Role of antioxidants. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 14 (2): 209-216. doi: 10.11138/ccmbm/2017.14.1.209

Domazetovic V, Marcucci G, Pierucci F, Bruno G, Di Cesare Manelli L, Ghelardini C, Brandi ML, Iantomasi T, Meacci E, Vincenzini MT. 2019. Blueberry juice protects osteocytes and bone precursor cells against oxidative stress partly through SIRT1. *FEBS Open Bio* 9 (6): 1082-1096. doi: 10.1002/2211-5463.12634

Du C, Smith A, Avalos M, South S, Crabtree K, Wang W, Kwon Y-H, Vijayagopal P, Juma S. 2019. Blueberries improve pain, gait performance, and inflammation in individuals with symptomatic knee osteoarthritis. *Nutrients* 11 (2): 290. doi: 10.3390/nu11020290

Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. 1996. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382 (6590): 448-452. doi: 10.1038/382448a0

Ek-Rylander B, Andersson G. 2010. Osteoclast migration on phosphorylated osteopontin is regulated by endogenous tartrate-resistant acid phosphatase. *Experimental Cell Research* 316 (3): 443-451. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.10.019

Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W. 1999. Mikro-CT Technologie und Applikationen zur Erfassung von Knochenarchitektur. *Der Radiologe* 39 (3): 203-212. doi: 10.1007/s001170050497

Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W. 2002. The bone lining cell: Its role in cleaning howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research* 17 (1): 77-90. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.1.77

Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW. 1984. Practical cone-beam algorithm. *Journal of the Optical Society of America A*, 1 (6): 612-619. doi: 10.1364/JOSAA.1.000612

Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, Yu X, Rauch F, Davis SI, Zhang S, Rios H, Drezner MK, Quarles LD, Bonewald LF, White KE. 2006. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nature Genetics* 38 (11): 1310-1315. doi: 10.1038/ng1905

Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, Ducy P, Karsenty G. 2010. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 142 (2): 296-308. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.003

Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. 2015. Biology of bone tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Research International* 2015: 421746. doi: 10.1155/2015/421746

Francis F, Henning S, Korn B, Reinhardt R, de Jong P, Poustka A, Lehrach H, Rowe PSN, Goulding JN, Summerfield T, Montford R, Read AP, Popowska E, Pronicka E, Davies KE, O'Riordan JLH, Econs MJ, Nesbitt T, Drezner MK, Oudet C, Pannetier S,

Hanauer A, Storm TM, Meindl A, Lorenz B, Cagnoli B, Mohnike KL, Murken J, Meitinger T. 1995. A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nature Genetics* 11 (2) 130-136. doi: 10.1038/ng1095-130

Fuchs J, Rabenberg M, Scheidt-Nave C. 2013. Prevalence of selected musculoskeletal conditions in Germany: Results of the German health interview and examination survey for adults (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 56 (5-6): 678-686. doi: 10.1007/s00103-013-1687-4

Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyann H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. 2005. Canonical Wnt signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 280 (39): 33132-33140. doi: 10.1074/jbc.M500608200

Gericke A, Qin C, Spevak L, Fujimoto Y, Butler WT, Sørensen ES, Boskey AL. 2005. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcified Tissue International* 77(1): 45-54. doi: 10.1007/s00223-004-1288-1

Giovanelli G, Buratti S. 2009. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chemistry* 112 (4): 903-908. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.06.066

Gowen LC, Petersen DN, Mansolf AL, Qi H, Stock JL, Tkalcevic GT, Simmons HA, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke HZ, McNeish JD, Brown TA. 2003. Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (3): 1998-2007. doi: 10.1074/jbc.M203250200

Graef JL, Ouyang P, Wang Y, Rendina-Ruedy E, Lerner MR, Marlow D, Lucas EA, Smith BJ. 2018. Dried plum polyphenolic extract combined with vitamin K and potassium restores trabecular and cortical bone in osteopenic model of postmenopausal bone loss. *Journal of Functional Foods* 42: 262-270. doi: 10.1016/j.jff.2017.12.057

Granito RN, Boulefour W, Sabido O, Lescale C, Thomas M, Aubin JE, Goodhardt M, Vico L, Malaval L. 2014. Absence of bone sialoprotein (BSP) alters profoundly hematopoiesis and upregulates osteopontin. *Journal of Cellular Physiology* 230 (6): 1342-1351. doi: 10.1002/jcp.24877

Hausmann M, Ehnert S, Hofmann V, Döbele S, Freude T, Stöckle U, Nussler A. 2014. Use of bone morphogenetic proteins (BMPs) for the treatment of pseudarthroses - Efficiency and therapy failure. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* 152 (2): 144-151. doi: 10.1055/s-0034-1368208

Hoac B, Nelea V, Jiang W, Kaartinen MT, McKee MD. 2017. Mineralization-inhibiting effects of transglutaminase-crosslinked polymeric osteopontin. *Bone* 101: 37-48. doi: 10.1016/j.bone.2017.04.007

Hoang QQ, Sicheri F, Howard AJ, Yang DS. 2003. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature* 425: 977-980. doi: 10.1038/nature02079

Hodsman AB, Bauer DC, Dempster DW, Dian L, Hanley DA, Harris ST, Kendler DL, McClung MR, Miller PD, Olszynski WP, Orwoll E, Yuen CK. 2005. Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocrine Reviews* 26 (5): 688-703. doi: 10.1210/er.2004-0006

Holmbeck K, Bianco P, Pidoux I, Inoue S, Billingham RC, Wu W, Chrysovergis K, Yamada S, Birkedal-Hansen H, Poole AR. 2005. The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *Journal of Cell Science* 118 (1): 147-156. doi: 10.1242/jcs.01581

Hooshmand S, Chai SC, Saadat RL, Payton ME, Brummel-Smith K, Arjmandi BH. 2011. Comparative effects of dried plum and dried apple on bone in postmenopausal women. *British Journal of Nutrition* 106 (6): 923-930. doi: 10.1017/S000711451100119X

Hu D, Cheng L, Jiang W. 2018. Fruit and vegetable consumption and the risk of postmenopausal osteoporosis: A meta-analysis of observational studies. *Food & Function* 9 (5): 2607-2616. doi: 10.1039/c8fo00205c

Hubert PA, Lee SG, Lee SK, Chun OK. 2014. Dietary polyphenols, berries, and age-related bone loss: A review based on human, animal, and cell studies. *Antioxidants* 3 (1): 144-158. doi: 10.3390/antiox3010144

Hunter GK. 2013. Role of osteopontin in modulation of hydroxyapatite formation. *Calcified Tissue International* 93 (4): 348-354. doi: 10.1007/s00223-013-9698-6

Hunter GK, Goldberg HA. 1993. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (18): 8562-8565. doi: 10.1073/pnas.90.18.8562

Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY. 2009. The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced β -cell function in middle-aged male subjects. *Diabetes Metabolism Research and Reviews* 25 (8): 768-772. doi: 10.1002/dmrr.1045

Jaemsa T, Jalovaara P, Peng Z, Vaeaenaenen HK, Tuukkanen, J. 1998. Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. *Bone* 23 (2): 155-161. doi: 10.1016/s8756-3282(98)00076-3

Jepsen KJ. 2009. Systems analysis of bone. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems Biology and Medicine* 1 (1): 73-88. doi: 10.1002/wsbm.15

Johnson SA, Feresin FG, Navaei N, Figueroa A, Elam ML, Akhavan NS, Hooshmand S, Pourafshar S, Payton ME, Arjmandi BH. 2017. Effects of daily blueberry consumption on circulating biomarkers of oxidative stress, inflammation, and antioxidant defense in postmenopausal women with pre- and stage 1-hypertension: a randomized controlled trial. *Food & Function* 8 (1): 372-380. doi: 10.1039/c6fo01216g

Karner CM, Long F. 2017. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74 (9): 1649-1657. doi: 10.1007/s00018-016-2425-5

Karsdal MA, Andersen TA, Bonewald L, Christiansen C. 2004. Matrix metalloproteinases (MMPs) safeguard osteoblasts from apoptosis during transdifferentiation into osteocytes: MT1-MMP maintains osteocyte viability. *DNA and Cell Biology* 23 (3): 155-165. doi: 10.1089/104454904322964751

Katsimbri P. 2017. The biology of normal bone remodeling. *European Journal of Cancer Care* 26 (6): e12740. doi: 10.1111/ecc.12740

Kennedy OD, Laudier DM, Majeska RJ, Sun HB, Schaffler MB. 2014. Osteocyte apoptosis is required for production of osteoclastogenic signals following bone fatigue in vivo. *Bone* 64: 132-137. doi: 10.1016/j.bone.2014.03.049

Lee WL, Chao HT, Cheng MH, Wang PH. 2008. Rationale for using raloxifene to prevent both osteoporosis and breast cancer in postmenopausal women. *Maturitas* 60 (2): 92-107. doi: 10.1016/j.maturitas.2008.04.009

Li T, Wu SM, Xu ZY, Ou-Yang S. 2014. Rabbiteye blueberry prevents osteoporosis in ovariectomized rats. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 9: 56. doi: 10.1186/s13018-014-0056-9

Littlewood-Evans A, Kokubo T, Ishibashi O, Inaoka T, Wlodarski B, Gallagher JA, Bilbe G. 1997. Localization of cathepsin K in human osteoclasts by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Bone* 20 (2): 61-68. doi: 10.1016/S8756-3282(96)00351-1

Liu W, Mao Y, Schoenborn J, Wang Z, Tang G, Tang X. 2019. Whole blueberry protects pancreatic beta-cells in diet-induced obese mouse. *Nutrition & Metabolism* 16: 34 doi: 10.1186/s12986-019-0363-6

Ljusberg J, Wang Y, Lång P, Norgård M, Dodds R, Hultenby K, Ek-Rylander B, Andersson G. 2005. Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-resistant acid phosphatase by cathepsin K in osteoclasts. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (31): 28370-28381. doi: 10.1074/jbc.M502469200

Luxenburg C, Addadi L, Geiger B. 2006. The molecular dynamics of osteoclast adhesions. *European Journal of Cell Biology* 85 (3-4): 203-211. doi: 10.1016/j.ejcb.2005.11.002

Ma L, Hua R, Tian Y, Cheng H, Fajardo RJ, Pearson JJ, Guda T, Shropshire DB, Gu S, Jiang JX. 2019. Connexin 43 hemichannels protect bone loss during estrogen deficiency. *Bone Research* 7: 11. doi: 10.1038/s41413-019-0050-2

Ma L, Sun Z, Zeng Y, Luo M, Yang J. 2018. Molecular mechanism and health role of functional ingredients in blueberry for chronic disease in human beings. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (9): 2785. doi: 10.3390/ijms19092785

Marinovich R, Soenjaya Y, Wallace GQ, Zuskov A, Dunkman A, Foster BL, Ao M, Bartman K, Lam V, Rizkalla A, Beier F, Somerman MJ, Holdsworth DW, Soslowky LJ, Laguné-Labarthe F, Goldberg HA. 2016. The role of bone sialoprotein in the tendon-bone insertion. *Matrix Biology* 52-54: 325-338. doi: 10.1016/j.matbio.2016.01.016

Matic I, Matthews BG, Wang X, Dymont NA, Worthley DL, Rowe DW, Grcevic D, Kalajzic I. 2016. Quiescent bone lining cells are a major source of osteoblasts during adulthood. *Stem Cells* 34 (12): 2930-2942. doi: 10.1002/stem.2474

Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, Yoneda T. 2008. BMP2 regulates osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 283 (43): 29119-29125. doi: 10.1074/jbc.M801774200

Maupin KA, Droscha CJ, Williams BO. 2013. A comprehensive overview of skeletal phenotypes associated with alterations in Wnt/ β -catenin signaling in humans and mice. *Bone Research* 1 (1): 27-71. doi: 10.4248/BR201301004

McClung MR, Wagman RB, Miller PD, Wang A, Lewiecki EM. 2017. Observations following discontinuation of long-term denosumab therapy. *Osteoporosis International* 28 (5): 1723-1732. doi: 10.1007/s00198-017-3919-1

Melough M, Sun X, Chun OK. 2017. The role of AOPP in age-related bone loss and the potential benefits of berry anthocyanins. *Nutrients* 9 (7): 789. doi: 10.3390/nu9070789

Michalska A, Łysiak G. 2015. Bioactive Compounds of Blueberries: Post-harvest factors influencing the nutritional value of products. *International Journal of Molecular Sciences* 16 (8): 18642-18663. doi: 10.3390/ijms160818642

Millán JL. 2013. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcified Tissue International* 93 (4): 299-306. doi: 10.1007/s00223-012-9672-8

Mohamad NV, Soelaiman IN, Chin KY. 2016. A concise review of testosterone and bone health. *Clinical Interventions in Aging* 11: 1317-1324. doi: 10.2147/CIA.S115472

Monfoulet L, Malaval L, Aubin JE, Rittling SR, Gadeau AP, Fricain JC, Chassande O. 2010. Bone sialoprotein, but not osteopontin, deficiency impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing. *Bone* 46 (2): 447-452. doi: 10.1016/j.bone.2009.09.007

Müller D, Schantz M, Richling E. 2012. High performance liquid chromatography analysis of anthocyanins in bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), and corresponding juices. *Journal of Food Science* 77 (4): C340-C345. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02605.x

Mumtaz H, Dallas M, Begonia M, Lara-Castillo N, Scott JM, Johnson ML, Ganesh T. 2020. Age-related and sex-specific effects on architectural properties and biomechanical response of the C57BL/6N mouse femur, tibia and ulna. *Bone Reports* 12: 100266. doi: 10.1016/j.bonr.2020.100266

Naot D, Musson DS, Cornish J. 2019. The activity of peptides of the calcitonin family in Bone. *Physiological Reviews* 99 (1): 781-805. doi: 10.1152/physrev.00066.2017

New SA, Robins SP, Campbell MK, Martin JC, Garton MJ, Bolton-Smith C, Grubb DA, Lee SJ, Reid DM. 2000. Dietary influences on bone mass and bone metabolism: further evidence of a positive link between fruit and vegetable consumption and bone health? *American Journal of Clinical Nutrition* 71: 142-151. doi: 10.1093/ajcn/71.1.142

Ono T, Nakashima T. 2018. Recent advances in osteoclast biology. *Histochemistry and Cell Biology* 149 (4): 325-341. doi: 10.1007/s00418-018-1636-2

Orimo H. 2010. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *Journal of Nippon Medical School* 77 (1): 4-12. doi: 10.1272/jnms.77.4

Park-Min KH. 2018. Mechanisms involved in normal and pathological osteoclastogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75 (14): 2519-2528. doi: 10.1007/s00018-018-2817-9

Paturi G, Mandimika T, Butts CA, Zhu S, Roy NC, McNabb WC, Ansell J. 2012. Influence of dietary blueberry and broccoli on cecal microbiota activity and colon morphology in *mdr1a*^{-/-} mice, a model of inflammatory bowel diseases. *Nutrition* 28 (3): 324-330. doi: 10.1016/j.nut.2011.07.018

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29 (9): e45 doi: 10.1093/nar/29.9.e45

Riihinen K, Jaakola L, Kärenlampi S, Hohtola A. 2008. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chemistry* 110 (1): 156-160. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.01.057

Rivera LB, Bradshaw AD, Brekken RA. 2011. The regulatory function of SPARC in vascular biology. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68 (19): 3165-3173. doi: 10.1007/s00018-011-0781-8

Röntgen V, Blakytyn R, Matthys R, Landauer M, Wehner T, Göckelmann M, Jermendy P, Amling M, Schinke T, Claes L, Ignatius A. 2010. Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. *Journal of Orthopaedic Research* 28 (11): 1456-1462. doi: 10.1002/jor.21148

Rosset EM, Bradshaw AD. 2016. SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix Biology* 52-54: 78-87. doi: 10.1016/j.matbio.2016.02.001

Russell RG. 2011. Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone* 49 (1): 2-19. doi: 10.1016/j.bone.2011.04.022

Shevroja E, Cafarelli FP, Guglielmi G, Hans D. 2021. DXA parameters, trabecular bone score (TBS) and bone mineral density (BMD), in fracture risk prediction in endocrine-mediated secondary osteoporosis. *Endocrine* 74: 20-28. doi: 10.1007/s12020-021-02806-

x

Shimizu S, Matsushita H, Morii Y, Ohyama Y, Morita N, Tachibana R, Watanabe K, Wakatsuki A. 2018. Effect of anthocyanin-rich bilberry extract on bone metabolism in ovariectomized rats. *Biomedical Reports* 8 (2): 198-204. doi: 10.3892/br.2017.1029

Sivaraj KK, Adams RH. 2016. Blood vessel formation and function in bone. *Development* 143 (15): 2706-2715. doi: 10.1242/dev.136861

Shukitt-Hale B, Bielinski DH, Lau FC, Willis LM, Carey AN, Joseph JA. 2015. The beneficial effects of berries on cognition, motor behaviour and neuronal function in ageing. *British Journal of Nutrition* 114 (10): 1542-1549. doi: 10.1017/S0007114515003451

Silva BC, Bilezikian JP. 2015. Parathyroid hormone: Anabolic and catabolic actions on the skeleton. *Current Opinion in Pharmacology* 22: 41-50. doi: 10.1016/j.coph.2015.03.005

Sinha KM, Zhou X. 2013. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *Journal of Cellular Biochemistry* 114 (5): 975-984. doi: 10.1002/jcb.24439

Skrovankova S, Sumczynski D, Mlcek J, Jurikova T, Sochor J. 2015. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International Journal of Molecular Sciences* 16 (10): 24673-24706. doi: 10.3390/ijms161024673

Speer H, D'Cunha NM, Alexopoulos NI, McKune AJ, Naumovski N. 2020. Anthocyanins and human health – A focus on oxidative stress, inflammation and disease. *Antioxidants* 9 (5): 366. doi: 10.3390/antiox9050366

Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Pacifici R. 2001. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (12): 8836-8840. doi: 10.1074/jbc.M010764200

Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. 1981. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26 (1): 99-105. doi: 10.1016/0092-8674(81)90037-4

Torre E. 2017. Molecular signaling mechanism behind polyphenol-induced bone anabolism. *Phytochemistry Reviews* 16 (6): 1183-1226. doi: 10.1007/s11101-017-9529-

x

- Tremble PM, Lane TF, Sage EH, Werb Z. 1993. SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *The Journal of Cell biology* 121 (6): 1433-1444. doi: 10.1083/jcb.121.6.1433
- Turner AS. 2001. Animal models of osteoporosis – necessity and limitations. *European Cells and Materials* 1: 66-81. doi: 10.22203/eCM.v001a08
- Väänänen HK, Laitala-Leinonen T. 2008. Osteoclast lineage and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473 (2): 132-138. doi: 10.1016/j.abb.2008.03.037
- Van Driel M, van Leeuwen JPTM. 2017. Vitamin D endocrinology of bone mineralization. *Molecular and Cellular Endocrinology* 453: 46-51. doi: 10.1016/j.mce.2017.06.008
- Vimalraj S, Arumugam B, Miranda PJ, Selvamurugan N. 2015. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *International Journal of Biological Macromolecules* 78: 202-208. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.04.008
- Waddington RJ, Roberts HC, Rugars RV, Schönherr E. 2003. Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation. *European Cells and Materials* 6: 12-21. doi: 10.22203/eCM.v006a02
- Wazzani R, Pallu S, Bourzac C, Ahmaidi S, Portier H, Jaffre C. 2021. Physical activity and bone vascularization: A way to explore in bone repair context? *Life* 11 (8): 783. doi: 10.3390/life11080783
- Weaver CM, Lee Alekel D, Ward WE, Ronis MJ. 2012. Flavonoid intake and bone health. *Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics* 31 (3): 239-253. doi: 10.1080/21551197.2012.698220
- Wei J, Karsenty G. 2015. An overview of the metabolic functions of osteocalcin. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 16 (2): 93-98. doi: 10.1007/s11154-014-9307-7
- Welch A, MacGregor A, Jennings A, Fairweather-Tait S, Spector T, Cassidy A. 2012. Habitual flavonoid intakes are positively associated with bone mineral density in women. *Journal of Bone and Mineral Research* 27 (9): 1872-1878. doi: 10.1002/jbmr.1649

- Xie HL, Wu BH, Xue WQ, He MG, Fan F, Ouyang WF, Tu SI, Zhu HL, Chen YM. 2013. Greater intake of fruit and vegetables is associated with a lower risk of osteoporotic hip fractures in elderly Chinese: a 1:1 matched case-control study. *Osteoporosis International* 24 (11): 2828-2836. doi: 10.1007/s00198-013-2383-9
- Xu H, Gu S, Riquelme MA, Burra S, Callaway D, Cheng H, Guda T, Schmitz J, Fajardo RJ, Werner SL, Zhao H, Shang P, Johnson ML, Bonewald LF, Jiang JX. 2015. Connexin 43 channels are essential for normal bone structure and osteocyte viability. *Journal of Bone and Mineral Research* 30 (3): 436-448. doi: 10.1002/jbmr.2374
- Xu N, Meng H, Liu T, Feng Y, Qi Y, Zhang D, Wang H. 2017. Blueberry phenolics reduce gastrointestinal infection of patients with cerebral venous thrombosis by improving depressant-induced autoimmune disorder via miR-155-mediated brain-derived neurotrophic factor. *Frontiers in Pharmacology* 8 (853). doi: 10.3389/fphar.2017.00853
- Yu C, Huang D, Wang K, Lin B, Liu Y, Liu S, Wu W, Zhang H. 2017. Advanced oxidation protein products induce apoptosis, and upregulate sclerostin and RANKL expression, in osteocytic MLO-Y4 cells via JNK/p38 MAPK activation. *Molecular Medicine Reports* 15 (2): 543-550. doi: 10.3892/mmr.2016.6047
- Yuan B, Takaiwa M, Clemens TL, Feng JQ, Kumar R, Rowe PS, Xie Y, Drezner MK. 2008. Aberrant PheX function in osteoblasts and osteocytes alone underlies murine X-linked hypophosphatemia. *The Journal of Clinical Investigation* 118 (2): 722-734. doi: 10.1172/JCI32702
- Zhang J, Lazarenko OP, Blackburn ML, Shankar K, Badger TM, Ronis MJJ, Chen JR. 2011. Feeding blueberry diets in early life prevent senescence of osteoblasts and bone loss in ovariectomized adult female rats. *PLoS One* 6 (9): e24486. doi: 10.1371/journal.pone.0024486
- Zhang J, Lazarenko OP, Kang J, Blackburn ML, Ronis MJJ, Badger TM, Chen JR. 2013. Feeding blueberry diets to young rats dose-dependently inhibits bone resorption through suppression of RANKL in stromal cells. *PLoS One* 8 (8): e70438. doi: 10.1371/journal.pone.0070438

Zhao D, Liu R, Li G, Chen M, Shang P, Yang H, Jiang JX, Xu H. 2020. Connexin 43 channels in osteocytes regulate bone responses to mechanical unloading. *Frontiers in Physiology* 11: 299. doi: 10.3389/fphys.2020.00299

Zhao H, Lazarenko OP, Chen JR. 2019. Hippuric acid and 3-(3-hydroxyphenyl) propionic acid inhibit murine osteoclastogenesis through RANKL-RANK independent pathway. *Journal of Cellular Physiology* 235 (1): 599-610. doi: 10.1002/jcp.28998

9 Publikationsverzeichnis

Posterpräsentation

Heilmann F, Kauschke V, Silaidos C, Kampschulte M, Heiss C, Eckert GP, Lips KS.
Auswirkung von Heidelbeerextrakt auf den Knochenstatus von Mäusen. Science Day des
Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. 16.11.2018, Gießen.

10 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

12 Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Entstehung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank für die Bereitstellung des Themas und die herausragende Betreuung während sämtlicher Phasen der Arbeit gilt Frau Prof. Dr. Katrin Susanne Lips. Vor allem die durchweg schnellen Antworten auf meine Fragen sowie die klar verständlichen Ratschläge während der Laborversuche und während des Schreibprozesses haben mir die Arbeit sehr erleichtert. Die Unterstützung und Denkanstöße insbesondere während des Verfassens des Diskussionsteils waren mir eine große Hilfe. Die gute Zusammenarbeit hat bei mir einen sehr positiven Eindruck von der Forschung hinterlassen.

Bei Herrn Prof. Dr. Gunter Peter Eckert und Frau Dr. Carmina Silaidos bedanke ich mich herzlich für die Bereitstellung der Versuchstiere am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Goethe-Universität Frankfurt a.M.

Ein Dank für die Einarbeitung und Unterstützung bei der Präparation der Knochen gilt Frau Dr. Vivien Kauschke. Weiterhin bedanke ich mich bei dem Team des Labors für experimentelle Unfallchirurgie für die tatkräftige Unterstützung, ohne die die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere gilt mein Dank Frau Ida Oberst für die Betreuung bei der Histologie, Frau Ivonne Bergen bei der real-time RT-PCR, Frau Dr. Ursula Sommer bei der Mikroskopie und Frau Olga Dakischew bei der Statistik.

Bei Herrn PD Dr. Marian Kampschulte und Frau Grundhild Martels von der experimentellen Radiologie bedanke ich mich für die Betreuung bei der Mikro-CT.

Frau Prof. Dr. Anita Ignatius und Herrn Prof. Dr. Lutz Dürselen danke ich für die Möglichkeit, die biomechanischen Versuche am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik des Universitätsklinikum Ulm durchführen zu können sowie Frau Patrizia Horny für die Betreuung während der Versuche. Im Rahmen dessen danke ich auch meinem Kommilitonen Frederick Engelberth für die gute Zusammenarbeit.

Abschließend gilt ein besonderer Dank meinen Eltern, die mir das Studium und die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben und mich währenddessen zu jeder Zeit und in jeder Hinsicht bedingungslos unterstützt haben.