

METABOLISCHE UNTERSUCHUNG DES
KNOCHENSTOFFWECHSELS BEI
PARODONTITIS

Dissertation zur Erlangung des
akademischen Grades

doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

Von Svenja Zimmermann

Geboren am 15.08.1993 in Bergisch Gladbach

Gutachter:

1. PD Dr. Ulrike Schulze-Späte, Jena
2. Prof. Dr. Dr. Collin Jacobs, Jena
3. PD Dr. Kathrin Becker, Düsseldorf

Tag der öffentlichen Verteidigung: 09.03.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Einführung in die Thematik	3
2.2 Parodontitis	4
2.3 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	7
2.4 Knochen - ein metabolisches Organ	8
2.4.1 Osteoblasten	10
2.4.2 Osteoklasten	11
2.4.3 Osteocalcin	12
2.4.4 TRAP	12
2.4.5 Remodeling	12
2.4.6 Einfluss von Adipositas durch spezifische Fettsäuren auf die Gesundheit und den Knochenmetabolismus	14
2.4.7 Lipotoxizität und Triglycerid-Bildung	15
2.5 Ziele der Arbeit	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Material	18
3.1.1 Geräte	18
3.1.2 Chemikalien, Lösungen und Puffer	19
3.1.3 Antikörper und Färbearbeiten	23
3.2 Methoden	23
3.2.1 Tierversuch	23
3.2.1.1 Fallzahlberechnung	24
3.2.2 Femurpräparation	25
3.2.3 Herstellung von Paraffinschnitten	25
3.2.3.1 Gewebepreparation	25

3.2.3.2	Anfertigung der Schnitte	26
3.2.4	TRAP-Färbung	27
3.2.4.1	Auswertung	28
3.2.5	Osteocalcin-Färbung	29
3.2.5.1	Auswertung	30
3.2.6	Histomorphometrie	31
3.2.6.1	Auswertung	31
4	Ergebnisse	33
4.1	Gewicht der Versuchstiere	33
4.2	Histomorphometrische Veränderungen	34
4.2.1	Palmitinsäure verringert die Knochendichte unter Normalgewicht	34
4.2.2	Ölsäure kann Palmitinsäure-Effekt ausgleichen	35
4.3	Zelluläre Veränderungen	36
4.3.1	Einfluss von fettsäurehaltiger Ernährung und Infektion auf die Osteoklastogenese	36
4.3.1.1	Osteoklastenzahl im Knochen in Abhängigkeit von Ernährung	37
4.3.1.2	Palmitinsäure fördert Anstieg der Osteoklastenzahl unter parodontaler Infektion	39
4.3.2	Reaktion der Osteocalcin-positiven Zellen auf spezifische Fettsäuren und Infektion	42
4.3.2.1	Spezifische Fettsäuren haben keinen Einfluss auf Anzahl der Osteocalcin-positiven Zellen in der Kortikalis	44
4.3.2.2	Einfluss der parodontalen Infektion auf die Osteocalcin-positiven Zellen im Knochen	46
4.4	Vergleich des Knochenmetabolismus nach 8 und 16 Wochen unter Ernährung mit Palmitinsäure	47
5	Diskussion	51
5.1	Versuchsmodell	52
5.2	Palmitinsäure verringert Knochendichte unter Normalgewicht	52
5.3	Umkehrung der Effekte von Palmitinsäure durch Ölsäure möglich	53

5.4	Palmitinsäure moduliert die systemische Reaktion des Wirts auf eine parodontale Infektion durch Zunahme der Osteoklastenzahl	54
5.5	Unter Normalgewicht gibt es keine Veränderung der Anzahl der Osteocalcin-positiven Zellen durch Ernährung und Infektion . . .	56
5.6	Akkumulation von Palmitinsäure und altersbedingte Veränderungen	57
5.7	Methodische Diskussion	58
5.8	Ausblick	59
6	Schlussfolgerungen	61
	Literatur- und Quellenverzeichnis	63
	Anhang	74

Abkürzungsverzeichnis

DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGAT1	Diacylglycerolacyltransferase 1
dH ₂ O	destilliertes Wasser
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FE	Flächeneinheit
FS	Fettsäure
LDL	Low-Density-Lipoprotein
MCSF	macrophage colony-stimulating factor
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	Normal Goat Serum
OA	Ölsäure
OCN+	Osteocalcin-positive Zellen
OK	Osteoklasten
OPG	Osteoprotegerin
PA	Palmitinsäure

PBS	Phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
<i>P.g.</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PTH	Parathormon
RANK	Receptor activator of NF- κ B
RANKL	Receptor activator of NF- κ B ligand
ROI	Region of Interest
SPT2	Serine palmitoyl transferase 2
TG	Triglycerid
TRAP	tartratresistente saure Phosphatase
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Masseprozent

1 Zusammenfassung

Die bakteriell-induzierte inflammatorische Parodontitis nimmt vor allem durch den demografischen Wandel immer mehr an Bedeutung zu. Ziel dieser Arbeit ist es, in Hinblick auf die Entstehung und Progression einer Parodontitis die Auswirkung von fettangereicherter Ernährung unter Normalgewicht näher zu beleuchten. Hierbei soll die Modulierbarkeit der Wirtsantwort bei einer parodontalen Infektion und knochenspezifische Veränderungen untersucht werden. Es hat sich in vorherigen Studien gezeigt, dass verschiedene Fettsäuren unter Adipositas eine unterschiedliche Auswirkung auf den Knochen und die Entstehung einer Parodontitis haben. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob man durch Aufnahme bestimmter Fettsäuren die Knochenstruktur und damit die Anfälligkeit für eine inflammatorische parodontale Erkrankung auch bei Normalgewicht beeinflussen kann.

Es wurde eine tierexperimentelle Studie mit männlichen 4 Wochen alten C57BL/6J-Mäusen durchgeführt. Diese bekamen über 16 Wochen verschiedene fettangereicherte Diäten (gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren, Kombination) und eine nichthochfetthaltige Kontrollernährung. Die Mäuse wurden ab Woche 10 für eine parodontale Infektion mit *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) oder einem Placebo über 5 Wochen 3x wöchentlich oral infiziert. Die Tiere aller Versuchsgruppen wiesen am Versuchsende Normalgewicht auf. Es wurden an Femura immunhistochemische und histomorphometrische Analysen gemacht, um die Anzahl der Osteoklasten (OK), der Osteocalcin-positiven Zellen (OCN+) und die Knochendichte zu bestimmen und somit eine Aussage über den ernährungsassoziierten systemischen Knochenstoffwechsel treffen zu können.

Die Anzahl der knochenresorbierenden Osteoklasten nahm unter Palmitinsäure (PA) nach Infektion mit *P.g.* zu, während die knochenaufbauenden Osteoblasten die weniger reaktive Zellgruppe darstellte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass unter der gesättigten Fettsäure PA die Knochendichte signifikant abnahm gegenüber allen anderen Ernährungen. Eine Umstellung von PA auf Ölsäure (OA) konnte diesen Effekt ausgleichen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es einen unterschiedlichen Einfluss von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren auf den systemischen Knochenstoffwechsel auch schon bei Normalgewicht gibt. Negative Einflüsse auf die Knochenstruktur durch die gesättigte Fettsäure PA konnten durch Umstellung auf OA wieder ausgeglichen werden. Zukünftige experimentelle Schritte könnten die lokalen Faktoren mit einbeziehen, um die präventive und therapeutische Modulierbarkeit der Wirtsantwort auf eine parodontale Infektion weitergehend auch im alveolären Bereich zu untersuchen.

2 Einleitung

2.1 Einführung in die Thematik

Parodontitis ist eine bakteriell-induzierte inflammatorische Erkrankung, die immer häufiger vorkommt und für den Patienten ohne Behandlung oftmals nach Zerstörung des Weich- und Knochengewebes den Zahnverlust bedeutet (Becker et al. 1979). Neben guter Mundhygiene, mechanischer und antibiotischer Therapie werden vermehrt zusätzliche Therapie- und Präventionsmaßnahmen wie beispielsweise die Umstellung der Ernährung diskutiert. Woelber et al. fanden heraus, dass mit einer antiinflammatorischen Ernährung gingivale und parodontale Entzündungsparameter reduziert werden können (Woelber et al. 2016). Auch wurde in einer Pilotstudie von Tennert et al. herausgefunden, dass eine der Mundgesundheit optimal angepasste Ernährung dazu führt, dass es in Plaque-Proben eine Reduktion von potenziell kariogenen Bakterien wie der Streptococcus mitis-Gruppe, Actinomyces spp. und Fusobacterium spp. gibt (Tennert et al. 2020). Unter der antiinflammatorischen Ernährung verstehen beide Forschungsgruppen eine Ernährung, die kohlenhydratarm ist und viele ω 3-Fettsäuren, Antioxidantien, Vitamin C und D und Ballaststoffe beinhaltet.

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss eines bestimmten Aspekts der Ernährung beleuchtet. Der Focus liegt auf der Auswirkung von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren auf den Knochenstoffwechsel. Es wird dabei die Modulierbarkeit der inflammatorischen Wirtsantwort bei Parodontitis untersucht. Für die Entstehung und Progression von Parodontitis sind Knochenarchitektur und Knochenstoffwechsel von entscheidender Bedeutung.

Der Knochen an sich ist das stabilste Gewebe unseres Bewegungsapparats. Entgegen der äußerlichen Erscheinung besteht er aus einer Verbindung lebender Zellen und unterliegt einem ständigen Auf- und Abbau (Wolff 1892). Er ist ein stoffwechselaktives Organ, welches für das System Körper eine wichtige Rolle spielt und auch von der Ernährung beeinflussbar ist, wie man an Untersuchungen zur Ernährung in Zusammenhang mit Osteoporose feststellen kann (Munoz-Garach et al. 2020). Trotzdem ist der Knochenmetabolismus im

Vergleich zum Stoffwechsel der anderen Organe bislang eher spärlich erforscht. Aus diesem Grund zielt die vorliegende Grundlagenforschung darauf ab, Mechanismen des Knochenstoffwechsels zu verstehen. Die Beeinflussung der Gesundheit durch die Ernährung und speziell durch Fettsäuren steht schon lange im Fokus verschiedener Forschungsgruppen (Calder 2015, Najeeb et al. 2016). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll das Wissen über die Auswirkungen von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren auf den Knochenstoffwechsel erweitert werden. Dadurch könnten Präventionsmaßnahmen sowie Therapiemöglichkeiten von den Knochenstoffwechsel betreffenden Erkrankungen verbessert werden.

2.2 Parodontitis

Parodontitis ist eine durch Bakterien initiierte Entzündung des Zahnhalteapparates. Durch eine überschießende Entzündungsreaktion des Wirts auf eine bakterielle Infektion kommt es zur Bildung der parodontalen Tasche durch Weich- und Hartgewebsdefekte. Eine bestehende Parodontitis führt ohne Therapie zur Resorption des Alveolarknochens und letztendlich zum Zahnverlust (Becker et al. 1979). Aus der Fünften Deutschen Gesundheitsstudie geht hervor, dass insbesondere die ältere Bevölkerung häufiger an einer parodontalen Erkrankung leidet, als das der Fall bei jüngeren Menschen ist (Jordan und Micheelis 2016). Die Prozentzahlen der jungen Erwachsenen (35-44 Jahre), die an einer moderaten oder schweren Parodontitis leiden, sind in den letzten Jahren zurückgegangen (Siehe Abb. 2.1).

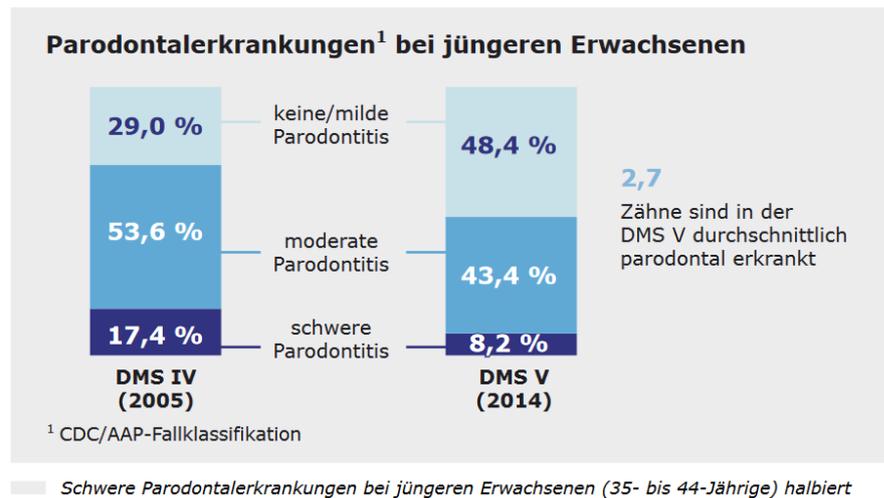


Abbildung 2.1: Prozentuale Darstellung Häufigkeit von Parodontalerkrankungen bei 35- bis 44-Jährigen in Deutschland von 2005 und 2014 (Jordan und Micheelis 2016)

2005 waren es 71 % und 2014 51,6 %. Dabei ist zu bedenken, dass immer noch mehr als 50 % der Menschen betroffen sind. Von den jüngeren Senioren (65-74 Jahre) sind ca. 65 % (siehe Abb. 2.2) und von den älteren (75-100 Jahre) sogar ca. 90 % von einer moderaten oder schweren Parodontitis betroffen (Jordan und Micheelis 2016). Bedingt durch den demografischen Wandel ist daher zunehmend mit einem Anstieg der parodontalen Behandlungsfälle zu rechnen.

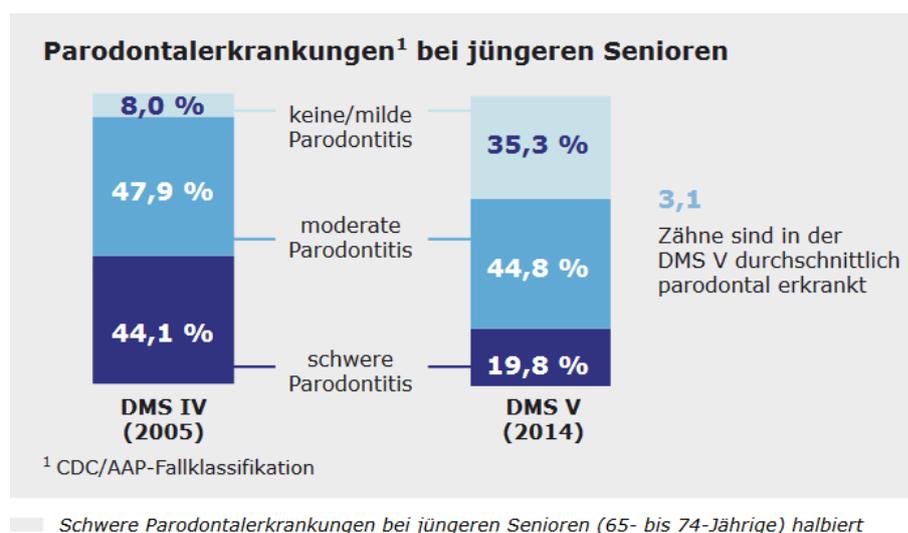


Abbildung 2.2: Prozentuale Darstellung Häufigkeit von Parodontalerkrankungen bei 65- bis 74-Jährigen in Deutschland von 2005 und 2014 (Jordan und Micheelis 2016)

Parodontitis wurde früher als reine Infektionskrankheit betrachtet, doch heutzutage rücken immer mehr die lokalen Faktoren des Wirts, die die Immunantwort auf Bakterien und ihre Mediatoren modulieren, in den Vordergrund (Cekici et al. 2014, Khan et al. 2018). Neben unbeeinflussbaren Faktoren (z. B. genetische Disposition) hängt die Wirtsantwort auf eine bakterielle Infektion auch von beeinflussbaren Determinanten ab. Hierzu zählen neben der Mundhygiene des Patienten der Nikotinkonsum (Bergstrom und Floderus-Myrhed 1983), Adipositas (Saito et al. 2001), sowie die Ernährung (Tennert et al. 2020). An dieser Stelle soll die vorliegende Studie ansetzen und näher beleuchten, wie der Wirt durch die Ernährung, speziell durch verschiedene Fettsäuren, beeinflusst werden kann. Es soll getestet werden, inwiefern der Knochenstoffwechsel an sich und der Verlauf einer Parodontitis durch die Fettsäuren bei Normalgewicht moduliert wird. Parodontitis ist nicht als lokale Erkrankung anzusehen, die nur das Parodont betrifft. Das Zusammenspiel von Parodontitis und systemischen Erkrankungen ist schon auf vielen Gebieten erforscht. Hierzu zählt neben der Adipositas die Assoziation von Parodontitis und Diabetes mellitus (Hove und Stallard 1970, Preshaw et al. 2012), kardiovaskulären Erkrankungen (Seymour und Steele 1998, Mummolo et al. 2019), Risiko einer Frühgeburt (Offenbacher et al. 1996, Walia und Saini 2015) und rheumatoider Arthritis (Mercado et al. 2001, Detert et al. 2010). Darüber hinaus wurde auch ein Zusammenhang zwischen dem systemischen Knochenstoffwechsel und Parodontitis entdeckt. In einer Bevölkerungsstudie wurden ältere Japaner (das Alter betrug 70 Jahre zu Beginn der Studie) hinsichtlich verbleibender Zähne, Attachment-Verlust und Markern des Knochenstoffwechsels untersucht. Dabei wurde herausgefunden, dass der Prozentanteil mit einem Attachment-Verlust von 6 mm oder mehr eine signifikant negative Korrelation zur Anzahl der verbleibenden Zähne und Osteocalcin im Serum aufwies (Yoshihara et al. 2009). LaMonte et al. untersuchten postmenopausale Frauen hinsichtlich Parodontitis in einem 5 Jahres-Abstand. Sie fanden heraus, dass es bei Frauen mit schwerer Parodontitis oder Osteoporose in der Vorgeschichte zu einem beschleunigten oralen Knochenverlust kommen kann (LaMonte et al. 2013). Deswegen ist es wichtig, die systemische Komponente in die Untersuchungen zum lokalen parodontalen Geschehen mit einzubeziehen.

2.3 *Porphyromonas gingivalis*

Das Bakterium *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) ist schwarz pigmentiert, gramnegativ und siedelt sich in der subgingivalen Tasche des humanen Wirts an. Nach Besiedelung kann *P.g.* in die Epithelzelle eindringen, wodurch das parodontale Bindegewebe geschädigt wird (Dorn et al. 2000, Tribble und Lamont 2010). Es gibt viele verschiedene Stämme von *P.g.*, die zahlreiche Virulenzfaktoren haben können. Dazu zählen Gingipaine, vor allem das Arg-gingipain und das Lys-Gingipain, die zur Proteolyse, Inflammation und Zerstörung des parodontalen Gewebes führen (Kadowaki et al. 2000). Auch ist *P.g.* zur Hämagglutination in der Lage und besitzt hämolytische Aktivitäten (Marsh und Martin 2003). Durch die Kapsel ist *P.g.* resistent gegen Phagozytose und es wird die Zytokinproduktion des Wirts reguliert. Es gibt auch Stämme, die keine Kapsel bilden, aber dafür besser in die Epithelzellen eindringen und sich darin replizieren können (Irshad et al. 2012). Bedeutsam für die Virulenz von *P.g.* sind auch die Fimbrien, durch die die Adhäsion, Invasion und Kolonisation erleichtert wird. Diese Virulenzfaktoren machen *P.g.* zu einem der Leitkeime der chronischen Parodontitis (Slots et al. 1986, Haffajee und Socransky 1994). Im Mausmodell wurde *P.g.* bereits in anderen Studien verwendet, um eine parodontale Infektion der Mäuse zu induzieren (Muluke et al. 2016, Nagashima et al. 2017). Es wurde festgestellt, dass unter Adipositas die Aufnahme von Palmitinsäure (PA) eine geringere Knochendichte verursacht (Drosatos-Tampakaki et al. 2014) und diese Mäuse einen verstärkten Knochenabbau unter einer parodontalen Infektion mit *P.g.* aufweisen (Muluke et al. 2016). Unter OA konnte dieser Effekt nicht festgestellt werden. Das macht deutlich, dass nicht das Übergewicht alleine, sondern die Beschaffenheit der ursächlichen Fettsäure für eine schlechtere Knochenstruktur verantwortlich ist. Auch wurde neben der lokalen Wirkung am Parodont ein systemischer Einfluss einer *P.g.*-Besiedlung herausgefunden. Besonders durch das Lipopolysaccharid und die Fähigkeit der Zellinvasion kann *P.g.* nicht nur oral pathogen sein, sondern auch beispielsweise über die Blutbahn im Körper verteilt werden. *P.g.* wird mit einem erhöhten Risiko für die Beschleunigung der Entwicklung einer Atherosklerose assoziiert (Xuan et al. 2017). Des Weiteren ist es möglich, dass *P.g.* in der Lage ist, von der Mundhöhle ausgehend in die Leber zu gelangen und dort die Glykogenese zu beeinflussen (Ishikawa et al. 2013).

2.4 Knochen - ein metabolisches Organ

Der Knochen erfüllt eine Schutz- und Haltefunktion und dient als Calciumspeicher für den Körper. In den letzten Jahren ist immer mehr seine Bedeutung als stoffwechselaktives Organ in den Vordergrund gerückt (Rosen 2008, Wei et al. 2014). Mittlerweile findet der Knochen sogar als endokrines Organ Anerkennung und es wird eine Beteiligung an der Glucose-Homöostase und dem Energiestoffwechsel diskutiert (Lee et al. 2007, Wei und Karsenty 2015). Seine Stabilität wird hormonell, durch das Immunsystem sowie durch endo- und exogene Faktoren beeinflusst (Iwamoto et al. 2009, Streicher et al. 2017). Im Zentrum stehen dabei die den Knochen aufbauenden Osteoblasten und die den Knochen abbauenden Osteoklasten, die sich in einem dynamischen Gleichgewicht befinden, sodass es zur Knochenhomöostase kommt (Sims und Gooi 2008). Ist das der Fall, unterliegt der Knochen dem physiologischen Knochenstoffwechsel (siehe Abb. 2.3, a). Andernfalls kommt es zu pathologischen Auswirkungen, die mit verschiedenen Krankheitsbildern einhergehen. Tritt eine erhöhte Anzahl oder Aktivität an Osteoblasten auf oder verringert sich Anzahl oder Aktivität an Osteoklasten, so wird vermehrt Knochenmasse gebildet. Andersherum kommt es unter einer geringen Anzahl oder Aktivität von Osteoblasten oder einer großen Anzahl oder Aktivität an Osteoklasten zu einer vermehrten Knochenresorption (siehe Abb. 2.3, b und c). Generell beeinflussen sich Osteoblasten und Osteoklasten gegenseitig, sodass es bei einer vermehrten Aktivität der einen Zellgruppe auch zur erhöhten Aktivität der anderen kommt. Das von den Osteoblasten gebildete RANKL bindet an RANK, einen Rezeptor, der auf den Osteoklastenvorläuferzellen exprimiert wird (siehe Abb. 2.4). Daraufhin differenzieren die Vorläuferzellen zu Osteoklasten. Wenn Osteoprotegerin (OPG), ebenfalls von Osteoblasten gebildet, an RANKL bindet, wird die Bindung von RANKL an RANK verhindert und somit die Osteoklastogenese gehemmt (Boyce und Xing 2007). Festzustellen ist, dass die Knochenresorption schneller ist als die Ossifikation (Harada und Rodan 2003). Es dauert also lange, bis sich der Knochen aufbaut oder regeneriert, wohingegen der Knochenabbau zügig voranschreitet. Generell wird der Knochenstoffwechsel auch vom Parathormon, Östrogen, Leptin, Glukokortikoiden, Zytokinen und Wachstumsfaktoren moduliert (Bartl 2014), aber auch die Ernährung sowie eine parodontale Infektion spielen eine Rolle. In einem Mausversuch von Muluke et

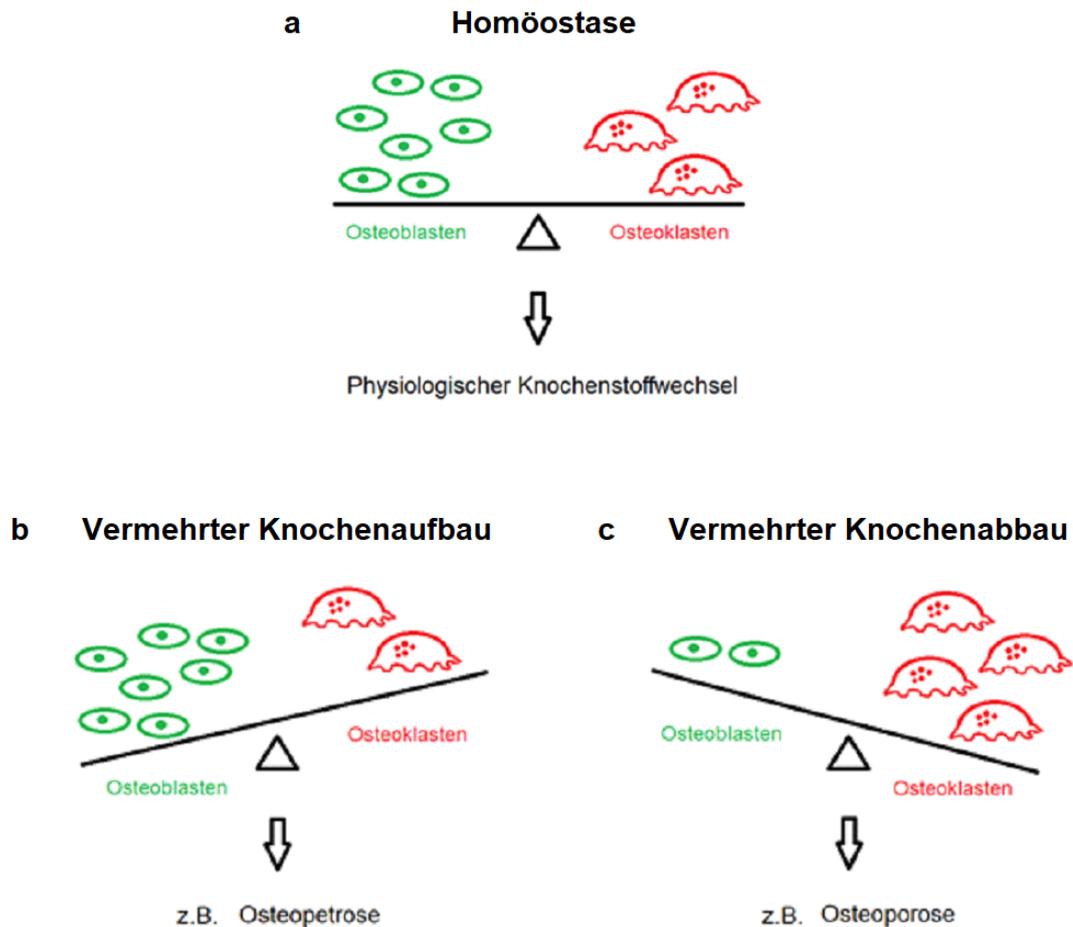


Abbildung 2.3: Vereinfachte schematische Darstellung. Knochenhomöostase bei vorliegendem Gleichgewicht von Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität (a), überwiegende Osteoblastenanzahl oder -aktivität verstärkten Knochenaufbau (b), überwiegende Osteoklastenanzahl oder -aktivität verursacht verstärkten Knochenabbau (c). Modifiziert nach (Neuschäfer-Rube 2013)

al. wurde unter Adipositas gezeigt, dass unter hochfetthaltiger Ernährung mit PA im Vergleich zu OA und der Kontrollernährung eine erhöhte TNF- α -Produktion im Serum stattfindet (Alsahli et al. 2016). Die Ernährung bestimmte hier ein erhöhtes systemisches Inflammationsniveau. Auch Knochenstoffwechselmarker wie beispielsweise Osteocalcin waren unter PA im Vergleich zu den anderen Diäten verringert. In der Studie von Muluke et. al. ist durch eine parodontale Infektion mit *P.g.* das systemische Inflammationsniveau in allen Ernährungsgruppen angestiegen, was sich an erhöhten TNF- α -Spiegeln bemerkbar machte. Es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen dem Anstieg vom TNF- α -Level und den Knochenstoffwechselmarkern (Muluke et al. 2016). Es gibt also systemische Auswirkungen nicht nur aufgrund der

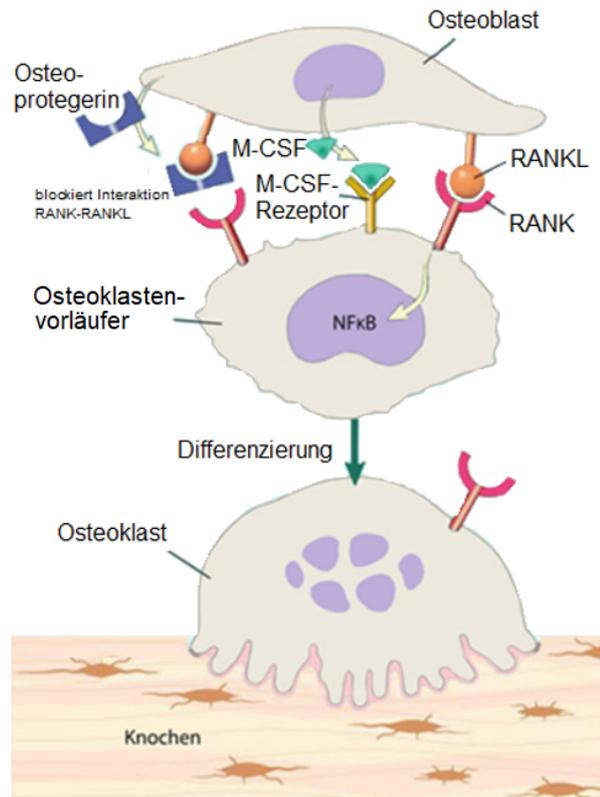


Abbildung 2.4: Abhängigkeit der Osteoklastendifferenzierung von OPG, M-CSF und RANKL, modifiziert nach (Kumar et al. 2014)

Ernährung, sondern auch aufgrund einer *P.g.*-Infektion, die den Knochenstoffwechsel modulieren.

2.4.1 Osteoblasten

Osteoblasten entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen. Daraus differenzieren sich unter Beeinflussung von Hormonen und Zytokinen Osteoprogenitorzellen (Zaidi 2007). Von Osteoprogenitorzellen entwickeln sich die Zellen über Präosteoblasten zu Osteoblasten. Sie beginnen, alkalische Phosphatase zu exprimieren. Aktive Osteoblasten sezernieren außerdem Typ-I-Kollagen und verschiedene nicht kollagenöse Matrixproteine (Zaidi 2007). Außerdem sezernieren sie MCSF (macrophage colony-stimulating factor) (Ushach und Zlotnik 2016), RANKL (Receptor activator of NF- κ B ligand) und OPG (Osteoprotegerin) (Gressner und Arndt 2013), die für die Wechselwirkung von Osteoblasten und Osteoklasten zuständig sind und damit für den Knochenstoffwechsel an sich eine wichtige Funktion haben. Aus Osteoblasten, die sich während der Osteogenese oder während des Remodelings eingemauert

haben, entstehen postmitotische Osteozyten, die untereinander über *gap junctions* in Verbindung stehen (Eriksen 2010). Osteoblasten können sich auch zu Belegzellen (engl. bone lining cells) weiterentwickeln, die alle inaktiven Oberflächen des Knochens bedecken (Jilka et al. 1998).

2.4.2 Osteoklasten

Multinukleäre Osteoklasten entstammen aus hämatopoetischen Stammzellen und entstehen durch die Fusion von mononukleären Progenitorzellen (Arai et al. 1999, Boyle et al. 2003). Bei der Differenzierung spielen die beiden Zytokine RANKL und MCSF eine wichtige Rolle (siehe Abb. 2.5). Die Hauptaufgabe der Osteoklasten ist die Resorption der Knochenmatrix, wodurch sie an der Knochenhomöostase und den ständig ablaufenden Umbauprozessen beteiligt sind. Die Osteoklastogenese wird vor allem von Osteoblasten durch das RANK/RANKL-System beeinflusst. RANKL wird auch noch von anderen Zelltypen, beispielsweise Chondrozyten und Osteozyten produziert (Xiong et al. 2011). Während einer Entzündungsreaktion wird über $\text{TNF-}\alpha$ die Osteoklastogenese stimuliert (Teitelbaum 2006).

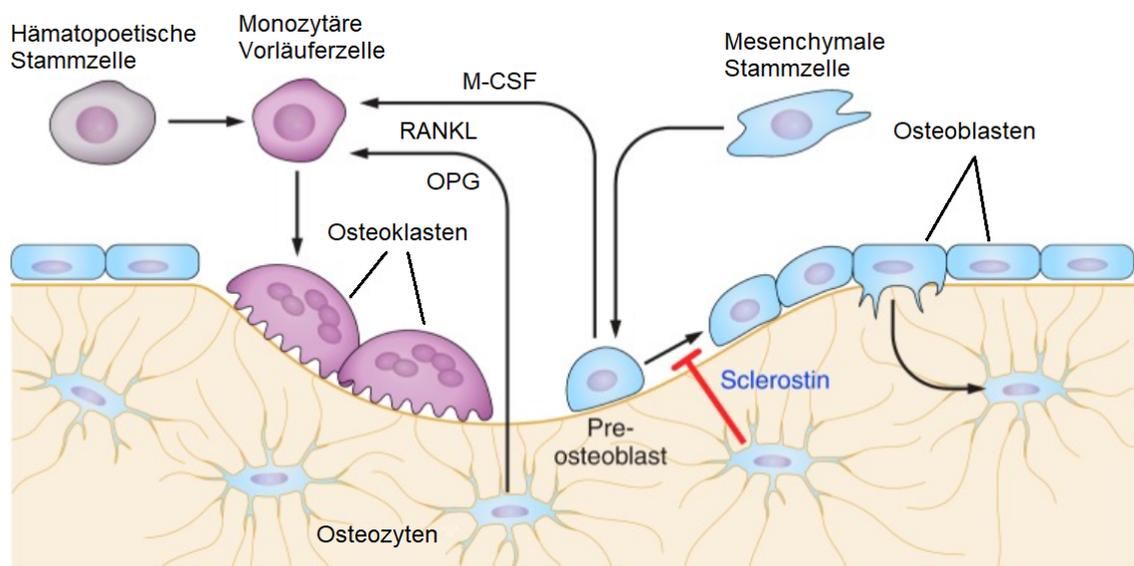


Abbildung 2.5: Entstehung von Osteoblasten und Osteoklasten, modifiziert nach (Riddle und Clemens 2017)

2.4.3 Osteocalcin

Osteocalcin ist das am häufigsten vorkommende Peptidhormon in der nicht-kollagenen Knochenmatrix. Es besteht aus 49 Aminosäuren im Menschen und 46 in Mäusen (Hauschka et al. 1989). Osteocalcin bindet Calcium und wird von Osteoblasten unter dem Einfluss von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D gebildet. Vitamin K spielt in Zusammenhang mit Osteocalcin auch eine Rolle, denn Osteocalcin enthält Glutamatreste, die durch Vitamin K carboxyliert werden. In dieser Form ist es funktionsfähig (Booth 1997). Da Osteocalcin vor allem während der Knochenbildung exprimiert wird, ist es ein spezifischer biochemischer Marker für den Knochenaufbau. Neben dem Einbau in die Knochenmatrix wird Osteocalcin in die Blutbahn sezerniert, wo es zügig von Proteasen abgebaut wird und daher nur eine kurze Halbwertszeit aufweist (Gressner und Arndt 2013). In dieser Arbeit wurde es als Osteoblastenmarker in der immunhistochemischen Untersuchung des Knochens verwendet, um die Osteocalcin-positiven Zellen (OCN+) zu detektieren und damit eine Aussage über die Osteoblastenaktivität machen zu können.

2.4.4 TRAP

Die tartratresistente saure Phosphatase (TRAP) ist ein eisenhaltiges Enzym, was unter anderem von Osteoklasten exprimiert wird und Phosphatesterbindungen spaltet. TRAP wird in großen Mengen von differenzierten Osteoklasten exprimiert und wird daher schon lange als histochemischer Marker für Osteoklastenzahl und -aktivität verwendet (Burstone 1959, Torres et al. 1991). Neben Osteoklasten wurde TRAP in der Maus auch in dendritischen Zellen und Makrophagen nachgewiesen (Hayman et al. 2000).

2.4.5 Remodeling

Es ist bekannt, dass der Knochen einem ständigen Auf- und Abbau unterliegt. Pro Jahr werden ca. 10% des Knochens ausgetauscht, sodass man auf eine Erneuerung des gesamten Knochens nach 10 Jahren schließen kann (Cohen 2006). Osteozyten, Osteoklasten und Osteoblasten bilden hierfür eine funktionelle Einheit, die BMU (Basic multicellular unit), die für den Knochenumbau vonnöten ist. Der Zyklus des Remodelings besteht aus immer

nacheinander ablaufenden Phasen (Henriksen et al. 2009, Raggatt und Partridge 2010) (siehe Abb. 2.6). Belastungen an der Knochenoberfläche werden von Osteozyten detektiert und Mikrofrakturen können den Untergang von Osteozyten verursachen. Diese Informationen werden in biochemische Signale umgewandelt und weitergeleitet, was die Initiierung des Remodelingprozesses darstellt (Han et al. 2004). Der Remodelingprozess kann auch durch Hormone wie Östrogen oder Parathormon (PTH) ausgelöst werden. Im nächsten Schritt kommt es zur Stimulierung der Osteoklastogenese und damit der Knochenresorption, unter anderem durch PTH, colony-stimulating-factor-1 und Matrix-Metalloproteasen, aber auch durch RANKL (Raggatt und Partridge 2010). RANK wird an der Oberfläche von Osteoklasten exprimiert und durch die Bindung von RANKL an RANK kommt es zur Osteoklastendifferenzierung und dadurch zum Knochenabbau. Als nächstes folgt die Phase der Umkehr, in der der Knochenabbau endet und der Knochenaufbau beginnt. Hier wird verstärkt OPG exprimiert und bindet an RANK. Damit wird die Osteoblastendifferenzierung initiiert. Die Osteoblasten sezernieren Knochenmatrix und füllen die abgebauten Anteile mit Knochen auf. Sie werden, eingemauert von der Matrix, zu Osteozyten, die über *canaliculi* und *gap junctions* in Kontakt stehen. Das System gelangt schlussendlich wieder in einen Ruhezustand, der durch den Anstieg der Sklerostinsekretion ausgelöst wird (Eriksen 2010).

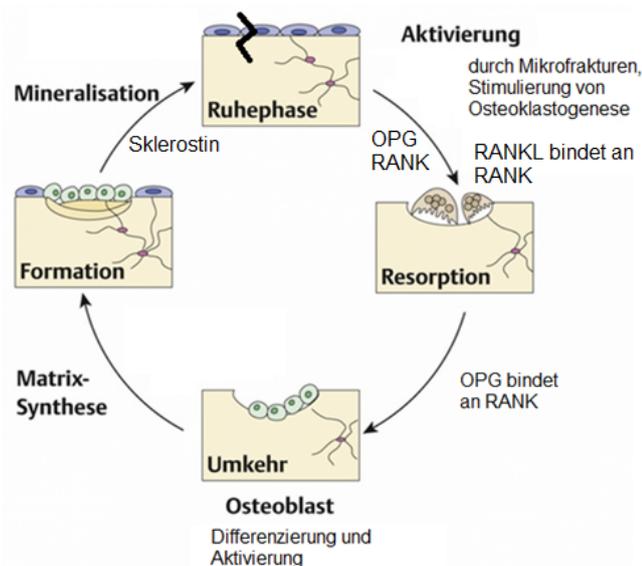


Abbildung 2.6: Zyklus des Remodelings, modifiziert nach (Fischli et al. 2011)

2.4.6 Einfluss von Adipositas durch spezifische Fettsäuren auf die Gesundheit und den Knochenmetabolismus

Adipositas ist mit einer erhöhten Konzentration von freien Fettsäuren und einer Dyslipidämie verbunden (Boden 2008, Ebbert und Jensen 2013, Vekic et al. 2019). Dabei konnte in verschiedenen Tiermodellen mit adipösen Mäusen eine Modulation des Knochenstoffwechsels durch spezifische Fettsäuren wie PA und OA nachgewiesen werden (Muluke et al. 2016, Alsahli et al. 2016, Drosatos-Tampakaki et al. 2014). Es konnte weiterhin im Mausversuch gezeigt werden, dass durch eine hochfetthaltige Ernährung die Bildung des Knochens gehemmt (Parhami et al. 2001) und durch Hyperlipidämie die Resorption begünstigt (Tintut et al. 2004) werden kann. Da diese Effekte unter einer Adipositas bereits nachgewiesen sind, ist es wichtig, die Auswirkung der spezifischen Fettsäuren auch unter Normalgewicht zu testen. So kann erforscht werden, ob die Modulation des Knochenstoffwechsels vermehrt auf die Fettsäuren oder auf die Adipositas an sich zurückzuführen ist. Für die vorliegende Arbeit wurde jeweils eine gesättigte und eine ungesättigte Fettsäure ausgewählt, um zu sehen, wie diese sich auf den Knochenstoffwechsel auswirken und die Immunantwort bei einer Parodontitis modulieren. Palmitinsäure (PA) ist die in der Studie verwendete gesättigte Fettsäure (FS). Sie besteht aus 16 C-Atomen. Man findet sie vor allem in pflanzlichen Fetten (Palmöl, Kokosnussöl), aber auch in tierischen Fetten (Butter) und in Produkten wie Schokolade (Falbe und Regitz 2014). Ölsäure (OA) ist einfach ungesättigt (18:1) und kommt vor allem in der mediterranen Ernährung vor, da Ölsäure einen großer Bestandteil von Olivenöl darstellt (Standards und Technology 2000). Diese beiden Fettsäuren wurden für den Versuch ausgewählt, da sie am häufigsten im humanen adipösen Gewebe und Serum vorkommen. Des Weiteren sind sie die am meisten vorkommenden gesättigten bzw. einfach ungesättigten Vertreter in der westlichen und mediterranen Ernährung (Baylin et al. 2002). Es ist publik, dass verschiedene Fette sich unterschiedlich auf die Gesundheit auswirken können. Beispielsweise können durch gesättigte Fettsäuren Entzündungsmarker wie das C-reaktive Protein oder Interleukin-6 ansteigen (Fernandez-Real et al. 2003) und die β -Zellen des Pankreas geschädigt werden (Eguchi et al. 2012). Unter einer erhöhten Aufnahme von ungesättigten FS wurde weniger LDL (Low-Density-Lipoprotein) im Serum festgestellt (Kien et al.

2014). Es ist bekannt, dass es bei einer überhöhten Fettaufnahme (über 37% der Gesamtmenge) zur Beeinflussung der Insulinsensitivität kommt. Solange die Gesamtmenge der Fettaufnahme nicht 37% der Gesamtzufuhr übersteigt, ist laut Palomer et al. nicht die Menge der Fettaufnahme, sondern die Zusammensetzung der Fettsäuren von großer Bedeutung. Es kann mit einer Ernährungsumstellung von Palmitinsäure auf Ölsäure die schädliche Wirkung der gesättigten Fettsäure stark herabgesetzt werden und das Risiko für eine Insulinresistenz verringert werden (Palomer et al. 2018). Auch der Knochen reagiert unterschiedlich auf verschiedene Fettsäuren. Laut Drosatos-Tampakaki et al. kann die RANKL vermittelte Osteoklastogenese mit einer erhöhten Fettsäureverwertung in Verbindung gebracht werden und im Mausmodell kam es durch die Fütterung einer hoch fetthaltigen Diät mit PA zu einer Verringerung der Knochendichte (Drosatos-Tampakaki et al. 2014). Es wurde bereits beschrieben, dass eine Lipotoxizität durch die intrazelluläre Akkumulation von überschüssigen gesättigten Fettsäuren und deren Stoffwechselprodukten ausgelöst werden kann (Samuel et al. 2010, Drosatos-Tampakaki et al. 2014). Es wurde ferner beobachtet, dass unter einem palmitinsäurereichen Milieu mehr RANK exprimiert wurde. Das wiederum führte durch das RANK-/RANKL-System zu einer erhöhten Osteoklastogenese in vitro. Dies deutet darauf hin, dass die Palmitinsäure, wie schon für andere Organe nachgewiesen wurde (Listenberger et al. 2003, Chavez und Summers 2003, Okere et al. 2006), auch für den Knochen eine gesundheitsschädigende Wirkung hat. Im Gegensatz dazu steht die Ölsäure, die in vitro keine toxische Wirkung zeigte (Listenberger et al. 2003). Bei einer Kultivierung von Osteoklasten, die *P.g.* ausgesetzt waren, kam es unter PA, anders als bei OA, zu einer Erhöhung der Expression von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Muluke et al. 2016). TNF- α wiederum trägt maßgeblich zur Zerstörung des parodontalen Gewebes bei (Graves und Cochran 2003). Das zeigt, dass die erhöhte Osteoklastogenese durch PA über erhöhte TNF- α -Spiegel ausgelöst oder beeinflusst werden kann. Hinzu kommen auch Unterschiede in der Lipotoxizität beider Fettsäuren.

2.4.7 Lipotoxizität und Triglycerid-Bildung

Lipotoxizität entsteht durch die Anreicherung von überschüssigem Lipid und führt in nicht fetthaltigen Geweben zu einer Funktionsstörung der Zellen, die

letztendlich zum Zelltod führen kann. Wenn es im Skelettmuskel zu einer vermehrten Lipidansammlung kommt, kann dies beispielsweise zu einer Insulinresistenz führen (Kraegen und Cooney 2008). Durch die Studie von Drosatos-Tampakaki et al. wird gezeigt, dass Triglycerid (TG)-Bildung von Bedeutung für die Toxizität einer Fettsäure ist. Dort wurde festgestellt, dass, wenn das Enzym Diacylglycerolacyltransferase-1 (DGAT-1) nicht vorhanden ist und somit die TG-Bildung nicht ablaufen kann, eine vermehrte Osteoklastenbildung und Knochenresorption stattfindet (Drosatos-Tampakaki et al. 2014). Bei ungesättigten Fettsäuren scheint es im Gegensatz zu gesättigten Fettsäuren zur vermehrten TG-Bildung zu kommen. Das stellt eine mögliche Erklärung dafür dar, warum es unter ölsäurehaltiger Ernährung nicht zur RANKL- oder TNF- α -vermittelten Osteoklastogenese kommt und damit auch weniger Knochen abgebaut wird (Drosatos-Tampakaki et al. 2014). Es konnte bereits in verschiedenen Zellkulturmodellen gezeigt werden, dass die kombinierte Palmitin- und Ölsäure-Behandlung die Lipotoxizität der Palmitinsäure verringert (Listenberger et al. 2003, Maedler et al. 2003). Bei einer Umstellung von PA auf OA verhindert OA als einfach ungesättigte Fettsäure die PA-induzierte Osteoklastogenese laut Drosatos-Tampakaki et al. durch Bildung von TG in vitro. Durch die Kombination der Fettsäuren reduziert sich auch die TNF- α -mRNA und die PA-bedingte Osteoklastogenese wird abgeschwächt (Drosatos-Tampakaki et al. 2014). Durch eine Kombination der gesättigten und der ungesättigten Fettsäuren könnten daher die negativen Effekte der gesättigten Fettsäure herabgesenkt werden (siehe Unterabschnitt 2.4.6). Andere Stoffe, die mit Lipotoxizität in Verbindung stehen, sind Ceramide. Als Ceramide bezeichnet man eine Untergruppe der Sphingolipide, die eine Grundstruktur aus N-acyliertem Sphingosin haben und Bausteine für andere Lipide darstellen (Gressner und Arndt 2013). Für Makrophagen, aus denen Osteoklasten hervorgehen (siehe Unterabschnitt 2.4.2), können Ceramide zytotoxisch sein (Zhang et al. 2017). Ceramide werden hauptsächlich aus Palmitinsäure gebildet, wobei neben der Dihydro-Ceramid-Synthase die Serin-Palmitoyl-Transferase 2 (SPT2) ein wichtiges und geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der de novo-Synthese ist (Morales et al. 2007, Merrill 2002). Ceramidsynthese findet in Osteoblasten vor allem unter der Gabe von Palmitinsäure statt, nicht aber unter Ölsäure (Alsahli et al. 2016). Daran wird deutlich, dass die Ceramidsynthese für die Lipotoxizität

von Fettsäuren eine Rolle spielt und dass es aufgrund der unterschiedlichen Verstoffwechslung einen Unterschied in der Auswirkung von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren auf den Knochenstoffwechsel gibt. Dieser soll in der vorliegenden Arbeit unter Normalgewicht untersucht werden.

2.5 Ziele der Arbeit

Die Intention dieser Arbeit ist es, die Auswirkung von fetthaltiger Ernährung unter Normalgewicht näher zu beleuchten. Hierbei soll die immunmodulatorische Komponente der inflammatorischen Wirtsantwort im Vordergrund stehen. Im Mittelpunkt steht die Frage, ob die Wirtsantwort bei Entstehung und Progression von Parodontitis präventiv oder therapeutisch modulierbar ist. Hierzu ist es wichtig, die systemischen Auswirkungen zu untersuchen. Basierend auf vorherigen Untersuchungen, die gezeigt haben, dass unter Adipositas eine Modulation des Knochenstoffwechsels durch Fettsäuren stattfindet, soll untersucht werden, ob dies unter Normalgewicht ebenfalls geschieht. Es wird überprüft, ob der Faktor Adipositas als Ursache der Veränderungen herangezogen werden kann. In der vorliegenden Studie wird erforscht, wie sich gesättigte Fettsäuren in ihrer Wirkung auf den Knochenstoffwechsel von ungesättigten unterscheiden. Untersuchungen unter Adipositas konnten zeigen, dass sich eine palmitinsäurehaltige Ernährung negativ auf die Knochenarchitektur auswirkt. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob das unter Normalgewicht auch so ist und ob die Dauer der PA-Ernährung von Bedeutung ist. Des Weiteren wird überprüft, ob eine Ernährungsumstellung von gesättigten Fettsäuren auf ungesättigte sich positiv auf den Knochenstoffwechsel auswirken kann. In diesem Zusammenhang wird der Frage nachgegangen, ob ein durch Fettsäuren modulierter Wirt verändert auf den bakteriellen Reiz von einem Parodontitisekeim reagiert. Mit der vorliegenden Arbeit wird das Wissen über Knochenmetabolismus und Parodontitis erweitert, um innovative Therapieansätze sowie Präventionsmaßnahmen bei Knochenverlust entwickeln zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Im Folgenden werden die für den Versuch verwendeten Geräte (siehe Tabelle 3.1), Chemikalien, Lösungen und Puffer (siehe Tabelle 3.2) sowie Antikörper und Färbeagenzien (siehe Tabelle 3.3) aufgelistet.

3.1.1 Geräte

Tabelle 3.1: Geräte und Hersteller

Gerät	Hersteller
Analysenwaage ME54T/00	Mettler Toledo
Automated Rotary Microtome- RM2265 E00.010	Leica
Dako Pen, Delimiting pen, Code S2002	Agilent Technologies
Einmal-Skalpell, steril, Fig.15	Dahlhausen
Falcons, 50 mL	Cellstar
Feuchte Kammer, lichtundurchlässig, für 20 Objektträger	labart
HistoCore Arcadia modular tissue embedding system E00.010	Leica
Inverses Mikroskop Axio Vert.A1	Zeiss
Laser-Scanning-Mikroskop TCS SP5	Leica Microsystems Germany
Menzel™ Mikroskop-Deckelgläschen	Fisher Scientific
Microtome blades, Edelstahl N35	Fether

Milli-Q Reference A+	Merck Millipore
Parafree Edelstahl Ausgießform	Leica
Pinzel verschiedener Größen	Mc Paper
Pinzetten, rostfreier Edelstahl	VWR
SuperFrost Ultra Plus™ Adhesion Slides	Thermo Scientific™
Tissue Processor TP1020-Histokinette E00.010	Leica
Tissue-Tek® uni-Cassettes®	Sakura
Trockenschrank	Memmert
Zellkulturschale, 10 cm	Greiner Bio-One

3.1.2 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Tabelle 3.2: Chemikalien, Lösungen und Puffer

Chemikalien, Lösungen und Puffer	Anteil	Anleitung	Hersteller
Aquatex®			Merck
Blockierlösung, 1,5 % NGS (Normal Goat Serum) in PBS	1,5 % (v/v)	NGS in 1x PBS lösen	Thermo Fischer Scientific s.u.
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat			Carl Roth

25 %ige EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)- Lösung	25 % (w/v)	Na ₂ -EDTA Aqua aufschwämmen, auf 90° C erwärmen,	in dest. C 40 %ige NaOH Carl Roth zusetzen, abkühlen lassen pH 7,4 mit 40 %iger NaOH einstellen, auf Endvolumen auffüllen	Carl Roth
Ethylendiamin- tetraessigsäure				Carl Roth
Ethanol, 96 %, vergällt				Carl Roth
Ethanol, reinst				Carl Roth
Hämalaunlösung, sauer, nach Mayer				Carl Roth
Kaliumchlorid				Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat				Carl Roth
Natriumchlorid				Carl Roth
40 %iges Natriumhydroxid (NaOH)	40 % (w/v)	NaOH (zur Einstellung des ph-Wertes)		Carl Roth
Paraffinwachs, Gurr™				VWR Chemicals BDH®
Paraffin-Entferner				Medite

10x PBS (Phosphate-buffered saline)	8 % (w/v)	NaCl	s. o.
	0,5 % (w/v)	KCl	s. o.
	1,44 % (w/v)	Na ₂ HPO ₄ und	s. o.
	1,2 % (w/v)	KH ₂ PO ₄	s. o.
zusammengeben und in ca. 80 % (v/v) Aqua dest. lösen, anschließend auf 100 % (v/v) mit Aqua dest. auffüllen			
1x PBS		100ml PBS auf auffüllen, pH 7,4 mit NaOH oder HCl einstellen und auf 1l auffüllen	10x s. o.
8 % PFA	8 % (w/v)	PFA ad 450 ml H ₂ O,	Sigma-Aldrich
	0,065 % (v/v)	Natronlauge (1M) hinzufügen, dann unter dem Abzug erhitzen und pH 8,0 einstellen	Carl Roth
	10 % (v/v)	und 10x PBS hinzugeben	s. o.
4 % PFA		8 % PFA 1:1 mit 1x PBS verdünnen	s. o. s. o.

ProLong™ Gold Antifade Mountant			Thermo Fischer Scientific
Proteinase K 20 µg ml ⁻¹	25 mg	Proteinase K in 2,5 ml H ₂ O lösen und steril filtrieren	Sigma-Aldrich
Tartrat-Puffer	0,97 % (w/v)	Na-Tartrat dibasic Dihydrat und Natriumacetat	Sigma-Aldrich
	2,72 % (w/v)	Trihydrat in Aqua dest. lösen pH mit Essigsäure auf 5-5,5 einstellen	Carl Roth
TRAP-Färbelösung	0,05 % (w/v)	Naphtol-MX Phosphat und	Sigma-Aldrich
	0,11 % (w/v)	Fast Red LB Salt (Echtrotvioletsalz) in Tartrat-Puffer lösen	Sigma-Aldrich s. o.
Xylol (Isomere)			Carl Roth

3.1.3 Antikörper und Färbeanzeigen

Tabelle 3.3: Antikörper und Färbeanzeigen

Antikörper/ Agens	Firma	Bestellnummer	Verdünnung in 1,5 % NGS
Cyanine Goat anti-rabbit IgG	Cy TM 5 Jackson ImmunoResearch	115-175-146	1:2000
DAPI (4',6-Diamidino-2- phenylindol)	Sigma Aldrich	D9542-5MG	1:10000
Rabbit-anti- Osteocalcin	abcam	ab93876	1:10000

3.2 Methoden

3.2.1 Tierversuch

Der Tierversuch wurde genehmigt unter der Registrierungsnummer UKJ-17-036. Für den Tierversuch wurden ausschließlich männliche 4 Wochen alte C57BL/6J-Mäuse (*mus musculus*) eingesetzt. Die Tiere stammten vom Universitätsklinikum Jena, Service-Einheit Kleinnager, Am Klinikum 1, 07747 Jena. Die Haltung der Tiere entsprach den Richtlinien der Universität Jena und des Universitätsklinikums Jena und erfolgte unter Standardbedingungen bei 21 °C und einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus mit Wasser und Futter ad libitum. Die Versuchstiere wurden zufällig in verschiedene Gruppen eingeteilt. Diese sind der Übersichtlichkeit halber in Tabelle 4 zusammengefasst. Gruppe 1 der Tiere bekam eine Ernährung mit normalem Futter (Fettanteil 4,1%). Gruppe 2 und 3 bekam jeweils palmitinsäurehaltiges oder ölsäurehaltiges Futter (Fettanteil 8,6%). Bei der 4. Gruppe wurde die Ernährung nach 8 Wochen von palmitinsäurehaltigem Futter für weitere 8 Wochen auf ölsäurehaltiges Futter umgestellt. Damit wurde untersucht, ob die Fütterung von Ölsäure potentielle Effekte von Palmitinsäure ausgleicht. Um diese Effekte im Rahmen des Versuches adäquat festhalten zu können, erhielt eine Gruppe für 8 Wochen

Palmitinsäure und wurde dann euthanasiert. Für die restlichen Gruppen dauerte der Versuch insgesamt 16 Wochen lang (siehe Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Gruppeneinteilung der Tiere im Versuch

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
Normale Ernährung (16 Wochen)	Palmitinsäure-haltige Ernährung (16 Wochen)	Ölsäure-haltige Ernährung (16 Wochen)	Palmitinsäure-haltige Ernährung (8 Wochen), dann ölsäure-haltige Ernährung (8 Wochen)	Palmitinsäure-haltige Ernährung (8 Wochen)

Den Mäusen aus Gruppe 1-4 wurde in der 9. Versuchswoche täglich für 4 Tage das Antibiotikum Enrofloxacin ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ im Trinkwasser) verabreicht. Das diente dazu, die Mundflora zu reduzieren und eine vergleichbare Ausgangssituation in allen Tieren herzustellen. Nach drei antibiotikafreien Tagen erhielt die eine Hälfte der Mäuse über einen Zeitraum von 5 Wochen dreimal wöchentlich (insgesamt 15 Mal) orale *P.g.*- Infektionen. Mithilfe einer stumpfen Knopfkanüle mit je 10^9 Zellen *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*, W50; ATCC 53978) in $50 \mu\text{l}$ PBS wurden die Mäuse oral infiziert. Um die Verbleibzeit des Keims im Mundraum zu erhöhen, war die Bakteriensuspension mit 2% Methylzellulose angedickt. Die Kontrollgruppen erhielten im gleichen Rhythmus Phosphate-buffered saline (PBS) mit 2% Methylzellulose als Placebo. Eine Woche nach der letzten *P.g.*- oder Placebo-Behandlung wurden die Tiere euthanasiert. Da das Alter der Tiere zu Beginn des Versuchs 4 Wochen war, wurden Gruppen 1-4 in der 20. und Gruppe 5 in der 12. Lebenswoche euthanasiert.

3.2.1.1 Fallzahlberechnung

Um die Anzahl der Versuchstiere so gering wie möglich zu halten, wurden im Voraus Zellkulturexperimente durchgeführt, um die konkreten molekularen Mechanismen zu identifizieren, die von Fettsäuren in Osteoblasten und

Osteoklasten reguliert werden. Die Anzahl der Versuchstiere betrug 169 Tiere für den kompletten Tierversuch, bei dem neben der Histomorphometrie noch weitere Analysen gemacht wurden. Die Anzahl ergab sich aus den Hauptgruppen, die über einen Zeitraum von 8 bzw. 16 Wochen mit verschiedenen Diäten (normale, bzw. Palmitinsäure-, Ölsäure-, Palmitin- und Ölsäure-reich) gefüttert wurden (siehe Tabelle 3.4), wobei diese noch in Untergruppen eingeteilt wurden (z. B. Infektions- oder Placebogruppe). Für jede Gruppe wurden 12 Tiere verwendet. Die Anzahl von 12 Tieren pro Gruppe ergab sich aus den Berechnungen basierend auf Vorarbeiten. Sie wurde gewählt, um für den Unterschied der Knochenappositionsrate eine statistische Aussagekraft von mehr als 80 % mit einer Signifikanz von 0,05 zu erreichen. Hinzu kamen 10 % Reservetiere (je Gruppe 1 Tier), um mögliche Ausfälle kompensieren zu können.

3.2.2 Femurpräparation

Die Mäuse wurden mittels CO₂-Gas getötet, das linke Bein wurde entnommen und in einer Schale mit PBS präpariert. Die Gelenke wurden mit einer Pinzette und Skalpell präpariert, um den Femur entnehmen zu können, der später histologisch aufbereitet und analysiert werden sollte. Dafür wurde das umliegende Gewebe des Knochens entfernt und der Femur wurde über Nacht bei 4 °C in 4 % PFA in PBS gelagert, um das Gewebe zu fixieren. Anschließend wurde er mit PBS gewaschen und dann darin gelagert.

3.2.3 Herstellung von Paraffinschnitten

3.2.3.1 Gewebevorbereitung

Da Knochen eine Hartschubstanz ist, die nicht ohne Weiteres geschnitten werden kann, wurden die Proben zunächst entkalkt. Dies geschah mittels einer Lösung aus 25 %igem EDTA (siehe Tabelle 3.2). Jeweils der linke Femur der Maus wurde in einem 50 ml Falcon in 25 ml EDTA bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert. Dreimal wöchentlich wurden die Knochen für eine Stunde bei Raumtemperatur in Leitungswasser inkubiert. Im Anschluss an den Wässerungsschritt wurde die Entkalkung mit frischem EDTA bei 37 °C fortgesetzt. Die Gesamtdauer der Entkalkung des Femurs betrug zwei Wochen. Anschließend wurden die Proben dehydriert und dann paraffiniert. Dafür wurden

sie in Körbchen gelegt, die dann in der Histokinette (Tissue Processor TP1020-Histokinette E00.010) einen Zyklus durchliefen. Das Programm wurde so eingestellt, dass die Proben jeweils eine Stunde lang in einer aufsteigenden Alkoholreihe und anschließend in Xylol inkubierten (siehe Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Schritte der Entwässerung in der Histokinette

Schritt	Reagenz	Dauer (in Minuten)
1	70 %iger Alkohol	60
2	70 %iger Alkohol	60
3	96 %iger Alkohol	60
4	96 %iger Alkohol	60
5	Absoluter Alkohol	60
6	Absoluter Alkohol	60
7	Xylol	60
8	Xylol	60

Nach der Entwässerung wurden die Proben mindestens eine Stunde lang in Paraffin gelagert. Darauffolgend konnten sie mithilfe des Paraffiniergerätes (HistoCore Arcadia modular tissue embedding system E00.010) eingebettet werden, indem sie in einem Metallförmchen mithilfe von zwei vorgewärmten Pinzetten positioniert wurden und vollständig mit Paraffin umgossen wurden. Die beschriftete Oberseite des Körbchens wurde auf das Metallförmchen gedrückt. Das Paraffin härtete aus, wodurch ein Paraffinblock entstand, der zum Schneiden im Mikrotom eingespannt werden konnte. Wenn die Blöcke nicht sofort geschnitten wurden, konnten sie bei -20°C gelagert werden. Um das Schneiden zu erleichtern, wurde das Paraffin um den Schnitt herum mit einem scharfen Skalpell so weit entfernt, bis nur noch ein schmaler und glatter Paraffinrand um die Probe herum vorhanden war.

3.2.3.2 Anfertigung der Schnitte

Mit dem Mikrotom (Automated Rotary Microtome - RM2265 E00.010) wurden Serienschnitte mit einer Dicke von $4\ \mu\text{m}$ hergestellt. Sie wurden zur Entfaltung

mit einem Pinsel für ca. 3 Minuten in ein 45 °C warmes Wasserbad gelegt. Zuletzt wurden sie mit einer Pinzette im Wasserbad voneinander getrennt und auf einen Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden anschließend bei Raumtemperatur zum Trocknen ausgelegt.

3.2.4 TRAP-Färbung

Die Paraffinschnitte wurden in Färbeküvetten in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe entwässert und dann 5 Minuten lang in destilliertem Wasser (dH₂O) gewaschen (siehe Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Schritte der Entparaffinierung in Färbeküvetten

Schritt	Reagenz	Dauer (in Minuten)
1	Xylol	10
2	Xylol	10
3	100 % Ethanol	10
4	100 % Ethanol	10
5	96 % Ethanol	5
6	96 % Ethanol	5
7	70 % Ethanol	5
8	70 % Ethanol	5
9	dH ₂ O	5

Die Schnitte inkubierten anschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur im Tartratpuffer (siehe Tabelle 3.2), um alle nicht tartratresistenten Bindestellen zu eliminieren. Daraufhin wurden sie bei 37 °C im Trockenschrank in der TRAP-Färbelösung gelagert. Gelegentlich wurden die Proben herausgenommen und die Intensität der Färbung überprüft. Die Dauer der Inkubation in der Färbelösung betrug 1-3 Stunden. Dann erfolgte ein Waschschriff mit dH₂O. Um eine bessere Übersicht zu erhalten, wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin gegengefärbt. Dafür inkubierten die Proben 2-3 Minuten in der Hämalaun-Lösung nach Mayer und wurden anschließend für 30 Sekunden in

Leitungswasser gebläut. Vor dem Eindeckeln mit Aquatex erfolgte ein weiterer Waschschrift mit dH_2O . Zum Eindeckeln wurden Menzel™ Mikroskop-Deckelgläschen verwendet. Die fertigen Schnitte konnten bei 4°C ohne Licht aufbewahrt werden.

3.2.4.1 Auswertung

Die gefärbten Knochenschnitte wurden am inversen Mikroskop mit der Software Zen bei 10-facher Vergrößerung gescannt. Für die Auswertung wurde die Epiphysenfuge und ein Teil der Diaphyse verwendet. Im Folgenden wird beispielhaft die Quantifizierung der Auswertung der Epiphysenfuge dargestellt. Hierfür wurde mit Photoshop ein immer gleichgroßes Kästchen in die Epiphysenfuge gelegt (siehe Abb. 3.1).

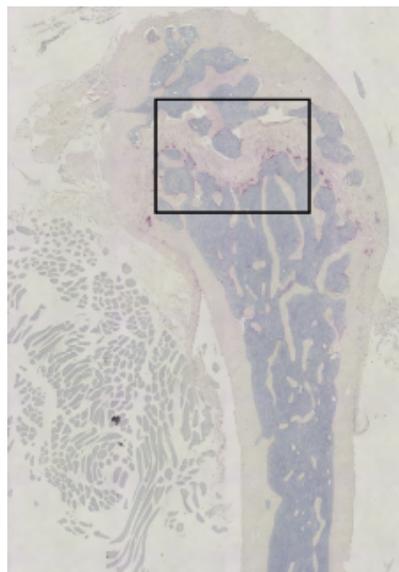


Abbildung 3.1: TRAP-Färbung, Gelenkkopf des Femurs mit Kästchen in der Mitte der Epiphysenfuge, das den Bereich kennzeichnet, der ausgezählt wurde.

Der dortige Anteil der Epiphysenfuge wurde umkreist und die Fläche gemessen (siehe Abb. 3.2). Anschließend wurden die Osteoklasten gezählt, also TRAP-positive, mehrkernige Zellen und die Anzahl durch die zuvor gemessene Knochenfläche geteilt. Die Ergebnisse wurden mittels Prism GraphPad unter Anwendung des Welchtests ausgewertet und grafisch dargestellt. Bei einem

p-Wert $p \leq 0,05$ galt das Ergebnis als signifikant (*), bei $p \leq 0,01$ als sehr signifikant (**) und $p \leq 0,001$ als hoch signifikant (***).

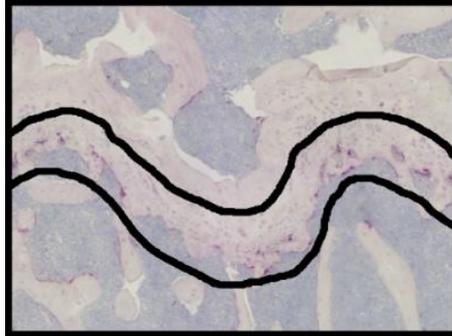


Abbildung 3.2: TRAP-Färbung, Vergrößerung des Kästchens, Umkreisung der Epiphysenfuge, innerhalb liegen die TRAP-gefärbten OK, die ausgezählt wurden.

3.2.5 Osteocalcin-Färbung

Die Entparaffinierung und Entwässerung erfolgten in gleicher Weise wie bei der TRAP-Färbung. Die Objektträger wurden 5 Minuten lang in PBS gewaschen und dann 15 Minuten lang in 4 %igem PFA (siehe Tabelle 3.2) fixiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit PBS für jeweils 5 Minuten und anschließend der 15-minütige Verdau in Proteinase K. Dies diente dazu, gegebenenfalls maskierte Epitope freizulegen und somit dem Antikörper die Zugänglichkeit zum Epitop zu erleichtern. Daraufhin wurden die Objektträger 5 Minuten lang in PBS gewaschen und anschließend noch einmal für 5 Minuten in 4 %igem PFA fixiert. Darauf folgten zwei Waschschriffe mit PBS für jeweils 5 Minuten. Die Schnitte wurden mit dem Fettstift (Dako Pen) umrandet, was dazu diente, die Schnitte voneinander abzugrenzen und dadurch die Lösung exakt auf einen Schnitt pipettieren zu können, ohne dass sich die Lösungen verschiedener Schnitte miteinander vermischten. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde 1,5% NGS (siehe Tabelle 3.2) auf jeden Schnitt pipettiert. Nach 20 Minuten wurde die Lösung abgenommen und es erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper ab93876, Anti-Osteocalcin (siehe Tabelle 2) über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 Minuten in PBS gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper

abzuspülen. Anschließend wurden die Proben für 90 Minuten bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper Cy3 rabbit und DAPI (siehe Tabelle 2) inkubiert und erneut dreimal 10 Minuten lang mit PBS und schlussendlich einmal mit Aqua dest. gewaschen. Zur Konservierung der Schnitte wurden sie mit Prolong Gold (siehe Tabelle 3.2) eingedeckelt und bei 4 °C ohne Licht aufbewahrt.

3.2.5.1 Auswertung

Die Schnitte wurden am invertierten konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop TCS SP5 (Leica Microsystems Germany) mikroskopiert und mit 10-facher Vergrößerung gescannt. Die Auswertung wurde mit ImageJ gemacht. Es wurde ein Teil der Kortikalis in der Diaphyse sowie die Epiphysenfuge ausgewählt. Die Quantifizierung wird hier beispielhaft an der Diaphyse dargestellt (siehe Abb. 3.3). Im Ausschnitt wurde die Kortikalis grün umrandet, um die ROI (Region of Interest) zu definieren, und die Fläche wurde gemessen. Gezählt wurden die Zellen, die ein positives Signal sowohl im Osteocalcin- als auch im DAPI-Kanal zeigten. Durch eine Negativkontrolle wurden falsch positiv gewertete Ergebnisse ausgeschlossen.

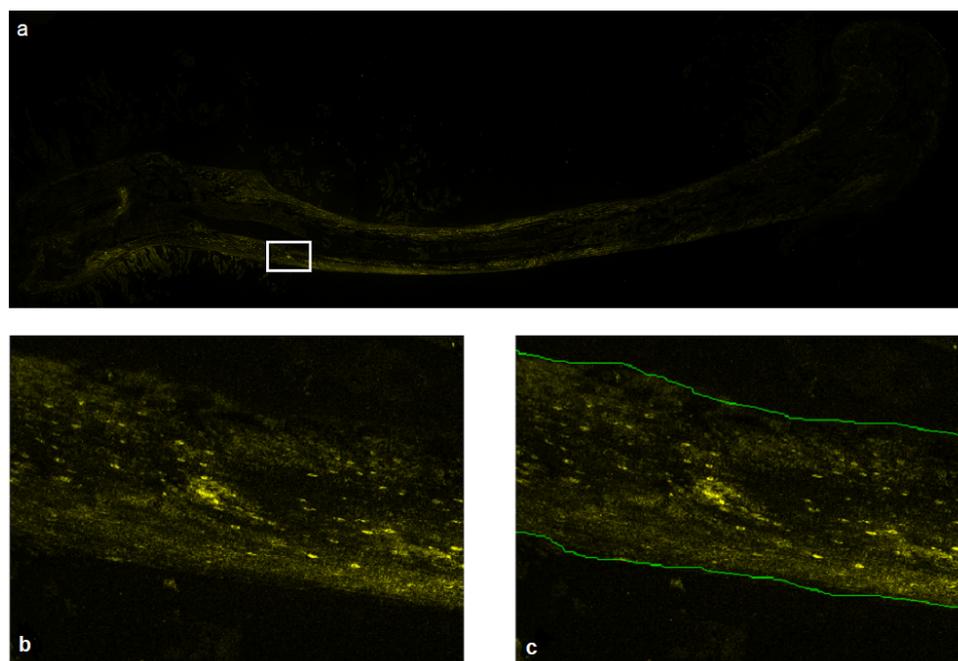


Abbildung 3.3: Osteocalcin-Färbung, Übersichtsaufnahme des Femurs (a), Ausschnitt der Kortikalis ohne (b) und mit grün umrandeter ROI (Region of Interest) (c)

Anschließend wurde die Anzahl der OCN+ pro Knochenfläche ermittelt, pro Kondition wurden 4 Versuchstiere analysiert. Die Ergebnisse wurden mittels Prism GraphPad unter Anwendung des Welchtests ausgewertet und grafisch dargestellt. Bei einem p-Wert $p \leq 0,05$ galt das Ergebnis als signifikant (*), bei $p \leq 0,01$ als sehr signifikant (**) und $p \leq 0,001$ als hoch signifikant (***).

3.2.6 Histomorphometrie

Hierfür wurden die bereits gescannten TRAP-gefärbten Schnitte verwendet (siehe Unterabschnitt 3.2.4).

3.2.6.1 Auswertung

Um eine quantitative Aussage über die Knochenstruktur zu treffen, wurde durch Histomorphometrie der Knochenanteil pro Gesamtgewebefläche bestimmt. Die Scans wurden in 10-facher Vergrößerung analysiert. Es wurde ein Ausschnitt ausgewählt, der die Epiphyse, Metaphyse und einen Teil der Diaphyse beinhaltet (siehe Abb. 3.4). Zur markierten ROI gehörte der spongiöse Teil des Knochenabschnitts unterhalb der Epiphysenfuge, die Kortikalis wurde nicht berücksichtigt.

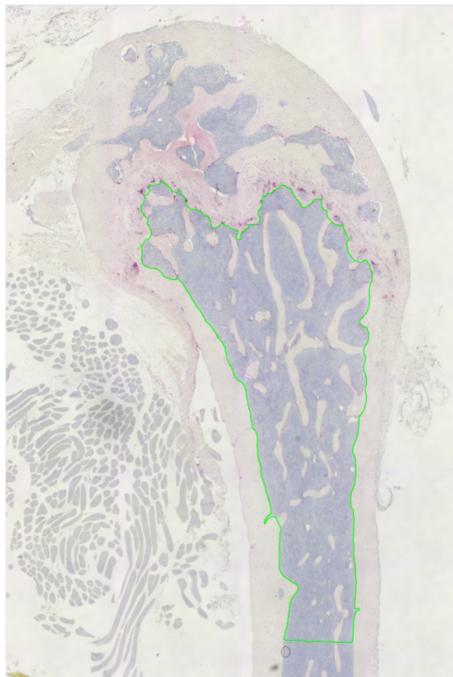


Abbildung 3.4: Ausschnitt des Femurs mit grün umrandeter Region of Interest (ROI) als Gesamtfläche

Innerhalb der ROI wurden nun alle Trabekel farblich markiert und die Trabekeloberfläche und Gesamtfläche wurden gemessen (siehe Abb. 3.5). Somit konnte der Anteil der Knochenfläche von der Gesamtfläche errechnet werden. Es wurden 4 Tiere pro Kondition analysiert mit jeweils zwei biologischen Replikaten. Die Ergebnisse wurden mittels Prism GraphPad unter Anwendung des Welchtests ausgewertet und grafisch dargestellt. Bei einem p-Wert $p \leq 0,05$ galt das Ergebnis als signifikant (*), bei $p \leq 0,01$ als sehr signifikant (**) und $p \leq 0,001$ als hoch signifikant (***) .

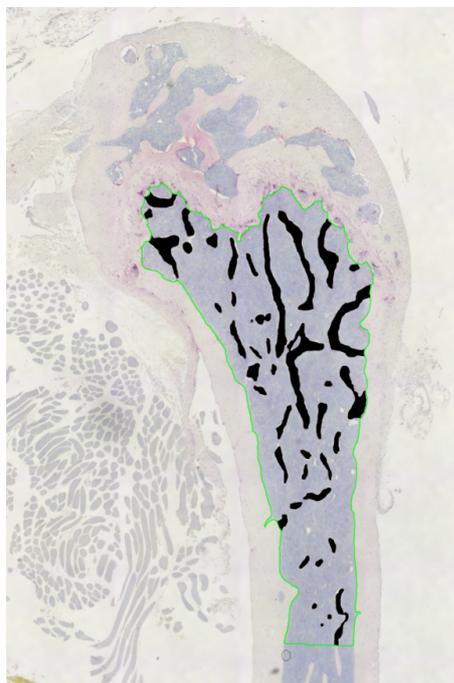


Abbildung 3.5: Ausschnitt des Femurs mit grün umrandeter „Region of Interest“(ROI) als Gesamtfläche

4 Ergebnisse

4.1 Gewicht der Versuchstiere

Die Mäuse wurden im Rahmen des Tierversuchs jede Woche gewogen. Sie nahmen kontinuierlich an Gewicht zu und befanden sich am Ende des Versuchs im Normbereich. Laut Züchter liegt die Obergrenze des maximalen Normalgewichts für C57BL6J Mäuse, wie sie für den Versuch verwendet wurden, bei 37,1 g (Laboratory 2020). Die leichteste Gruppe war die mit normaler Diät mit $29,2 \pm 2,2$ g und die schwerste war PA mit einem Endgewicht von $32,1 \pm 2,7$ g. Wichtig war, dass die Gruppen mit einer hochfetthaltigen Ernährung nicht adipös werden sollten. Neben der PA-Gruppe wurde dieses Kriterium auch bei OA mit dem Endgewicht von $30,5 \pm 2,2$ g und bei der PA-OA-Wechseldiät mit $31,3 \pm 2,4$ g erfüllt (siehe Abb. 4.1).

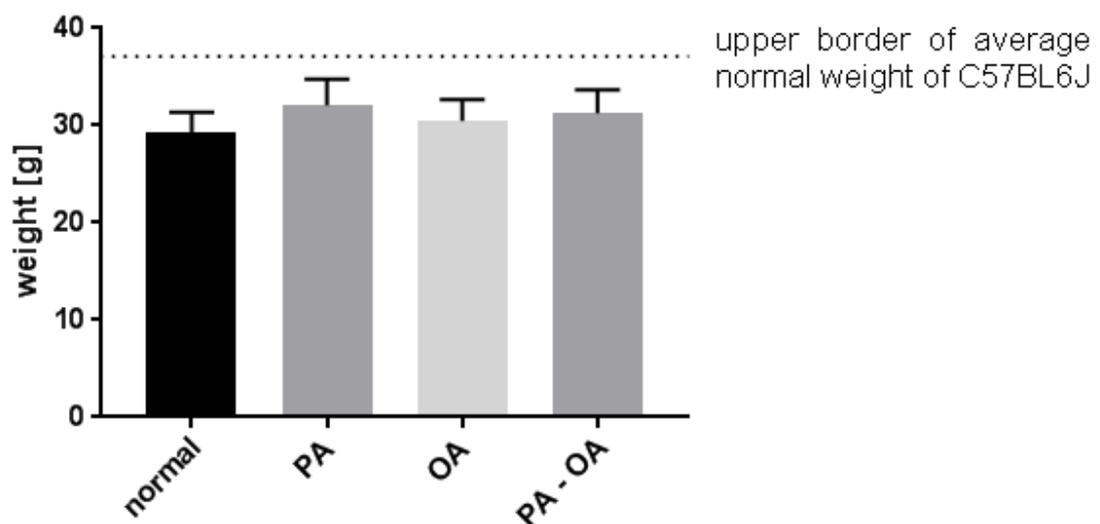


Abbildung 4.1: Endgewicht der Versuchstiere nach 16 Wochen. Mit einem Endgewicht von $29,2 \pm 2,2$ g (normal), $32,1 \pm 2,7$ g (PA); $30,5 \pm 2,2$ g und $31,3 \pm 2,4$ g (PA+OA) befanden sich alle Versuchsgruppen im Normbereich.

4.2 Histomorphometrische Veränderungen

Es ist belegt, dass durch eine PA-reiche Ernährung unter Adipositas die Knochendichte abnimmt (Drosatos-Tampakaki et al. 2014). Da in dieser Arbeit die Komponente Adipositas nicht vorhanden ist, ist es möglich, die Effekte der spezifischen Fettsäuren isoliert zu untersuchen. Hierfür wurde in histologischen Schnitten die Oberfläche der Knochen trabekel des Femurs gemessen. So lässt sich eine Aussage über die Knochenstruktur treffen.

4.2.1 Palmitinsäure verringert die Knochendichte unter Normalgewicht

Unter Adipositas hat sich in der Vorläuferstudie von Drosatos-Tampakaki et al. nach 12 Wochen hochfetthaltiger Ernährung mit PA die Knochenstruktur verändert. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe hatte die Versuchsgruppe ein geringeres Knochenvolumen, geringere Knochendichte und der Abstand zwischen den Trabekeln war vergrößert (Drosatos-Tampakaki et al. 2014). Dies war unter der hochfetthaltigen OA-Diät nicht der Fall. Somit ist die Veränderung der Knochenstruktur nicht nur auf die Adipositas, sondern auch auf die speziellen Eigenschaften der jeweiligen Fettsäuren zurückzuführen.

Im Vergleich zwischen den verschiedenen Diäten war in der vorliegenden Studie zu erkennen, dass ein Unterschied in der Auswirkung der Fettsäuren auf den Knochenstoffwechsel besteht. Das Trabekelvolumen war unter PA im Vergleich zu allen anderen Gruppen signifikant geringer. Die Kontrollgruppe hatte eine ähnliche Knochendichte wie die reine OA-Gruppe ($p = 0,3$) und auch die PA-OA-Gruppe war dem ähnlich ($p = 0,667$). Im Vergleich zu PA war die Knochendichte der Gruppe mit normaler Ernährung signifikant höher ($p = 0,021$). Vergleicht man die gesättigte FS PA mit der ungesättigten OA, findet man unter OA eine signifikant höhere Knochendichte ($p = 0,026$). Die Gruppe PA-OA wies ebenfalls eine signifikant höhere Knochendichte als PA auf ($p = 0,039$). Im histologischen Bild fiel auf, dass unter PA die kleinsten Trabekel zu finden waren. Unter normaler Diät waren die Trabekel etwas größer und mehr zusammenhängend. Bei PA-OA konnte man das gleichermaßen erkennen, wobei es bei OA die größten Trabekelstrukturen gab (siehe Abb. 4.2).

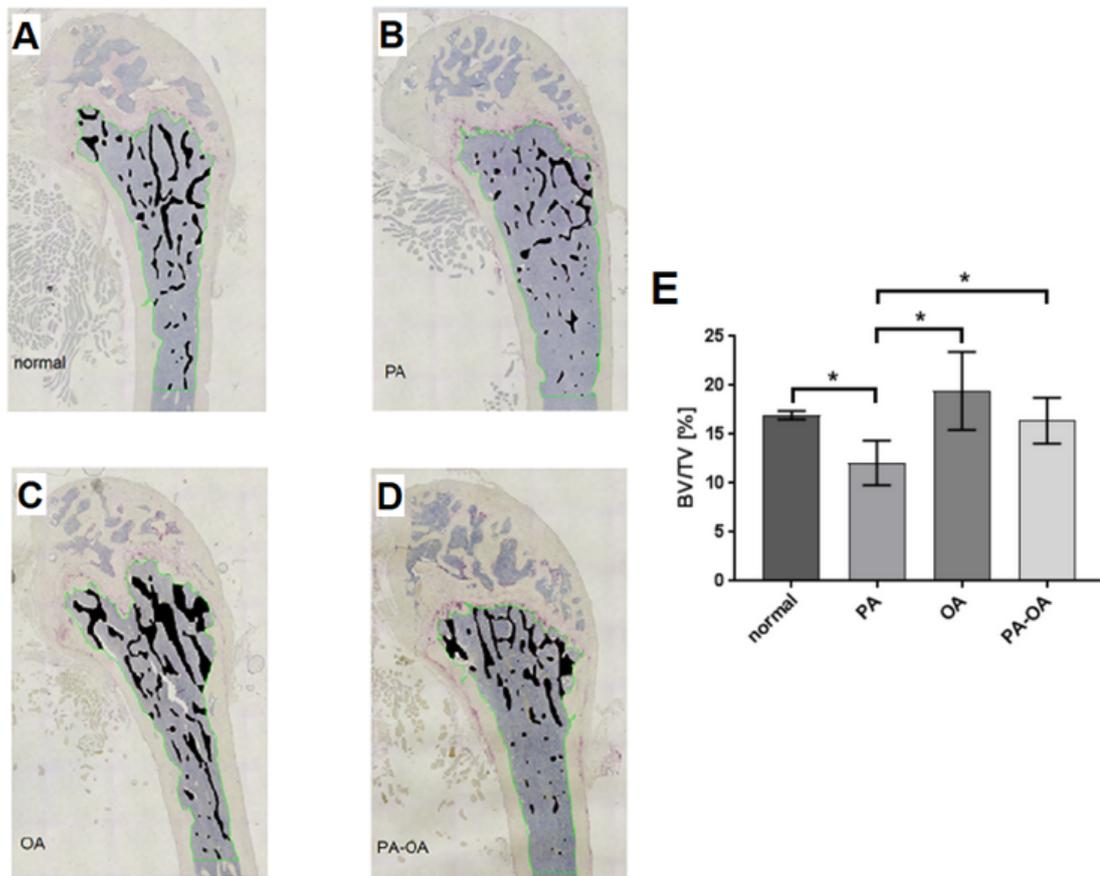


Abbildung 4.2: TRAP-gefärbte Schnitte des jeweils linken Femurs mit schwarz eingefärbten Knochentrabekeln in der ROI (grün umrandet). Unter normaler Ernährung (A) gibt es eine größere Trabekelfläche als unter palmitinsäurereicher Ernährung (B). Ölsäurehaltige Ernährung (C) bringt eine höhere Trabekeloberfläche als PA hervor mit vermehrt zusammenhängenden Trabekeln. Unter der PA-OA-Wechseldiät (D) gibt es eine signifikant größere Trabekeloberfläche verglichen mit PA. E zeigt die grafische Darstellung des Trabekelvolumens pro Knochenvolumen (BV/TV) unter normaler, palmitinsäurereicher (PA), ölsäurereicher (OA) sowie abwechselnd palmitinsäurereicher und ölsäurereicher (PA-OA) Ernährung. Man sieht ein signifikant geringeres Trabekelvolumen von der PA-Gruppe verglichen mit allen anderen.

4.2.2 Ölsäure kann Palmitinsäure-Effekt ausgleichen

Wie schon erwähnt, war es in der Studie von Drosatos-Tampakaki et al. der Fall, dass die Veränderungen der Mikroarchitektur des Knochens unter PA auftraten, nicht aber unter OA. Das legt nahe, dass gesättigte und ungesättigte Fettsäuren unterschiedlich auf den Knochenstoffwechsel einwirken. Es stellt sich die Frage,

inwiefern die durch PA induzierten Effekte durch OA ausgeglichen werden können. Schon in früheren Studien führte die kombinierte Behandlung mit PA und OA auf zellulärer Ebene dazu, dass die Lipotoxizität von PA abgeschwächt wurde (Dole 1956, Bierman et al. 1957). Laut Drosatos-Tampakaki et al. hat eine Inkubation mit 0,2 mM PA zu einer verstärkten Osteoklastogenese geführt. Bei einer kombinierten Behandlung der Zellen mit PA und OA wurden Osteoklasten detektiert, die in Anzahl und Größe denen der Kontrollgruppe ähnlich waren (Drosatos-Tampakaki et al. 2014). In diesem Teil der Arbeit ging es darum zu untersuchen, ob diese Mechanismen auch *in vivo* stattfinden und inwieweit man mit einer Ernährungsumstellung eine Verbesserung der Knochenarchitektur erreichen kann.

In der grafischen Darstellung der Auswertung der Schnitte sieht man, dass OA die PA-Wirkung ausgleichen konnte (siehe Abb. 4.2). Folgte auf eine 8-wöchige PA-Ernährung eine 8-wöchige OA-Ernährung, so war die Knochendichte auf einem ähnlichen Niveau wie unter der Kontrollgruppe. Wurde allerdings nach 8 Wochen PA weiterhin PA gefüttert, so war die Knochendichte signifikant geringer zur Kontrollgruppe und zur PA-OA-Wechseldiät. Das sieht man auch an der Trabekelstruktur auf dem Schnittbild, wo die Wechseldiät morphologisch ähnliche Trabekelstrukturen hervorgebracht hat (siehe Abb. 4.2).

Den histomorphometrischen Veränderungen liegen die zellulären Veränderungen zugrunde. Im Folgenden wurden die am Knochenstoffwechsel maßgeblich beteiligten Zellen betrachtet, die Osteoklasten (OK) für den Knochenabbau und die Osteocalcin-positiven Zellen (OCN+) zur Bestimmung des Osteoblastenvorkommens.

4.3 Zelluläre Veränderungen

4.3.1 Einfluss von fettsäurehaltiger Ernährung und Infektion auf die Osteoklastogenese

Es ist bekannt, dass unter Adipositas PA-reiche Ernährung eine vermehrte Osteoklastogenese hervorruft, OA hingegen nicht. Aus früheren Studien geht hervor, dass OA den Effekt von PA *in vitro* abschwächen kann, sodass unter einer kombinierten zellulären Stimulation durch PA-OA eine verringerte

Osteoklastenbildung stattfindet (Drosatos-Tampakaki et al. 2014). Des Weiteren ist beschrieben, dass es unter PA *in vitro* und *in vivo* zu einer vermehrten inflammatorische Antwort auf einen Reiz durch *P.g.* kommt (Muluke et al. 2016). Ob diese Auswirkungen nur in Zusammenhang mit einer Adipositas auftreten, konnte bisher nicht geklärt werden. Deswegen wurde die dieser Arbeit zugrunde liegende Studie unter Normalgewicht durchgeführt.

Getestet wurde, ob sich gesättigte und ungesättigte Fettsäuren unter Normalgewicht unterschiedlich auf die Osteoklastogenese auswirken und wie dadurch die Immunantwort auf einen parodontal pathogenen Keim moduliert wird. Sowohl die spezifische Ernährung als auch Parodontitis haben Auswirkungen auf den systemischen Knochenstoffwechsel (siehe Abschnitt 2.2). Im Rahmen meiner Untersuchungen sollten die systemischen Veränderungen beurteilt werden, daher fanden die Untersuchungen am Femur statt. Für die Bestimmung der Osteoklasten wurde jeweils der linke Femur von je 4 Versuchstieren pro Kondition verwendet. Es wurde ein histologischer Schnitt angefertigt, an dem mittels einer TRAP-Färbung die Osteoklasten sichtbar gemacht wurden und im Bereich der Epiphysenfuge und der Diaphyse gezählt werden konnten.

4.3.1.1 Osteoklastenanzahl im Knochen in Abhängigkeit von Ernährung

In vitro wurde festgestellt, dass PA, aber nicht OA die Osteoklastogenese verstärkt und dass unter PA mehr TNF- α mRNA vorhanden ist (Drosatos-Tampakaki et al. 2014). TNF- α ist dafür bekannt die Osteoklastogenese zu stimulieren (Kobayashi et al. 2000).

Kontrovers zu dieser Aussage existiert eine Studie, die besagt, dass in Knochenmarkszellen, die mit gesättigten Fettsäuren kultiviert werden, die Osteoklastogenese verringert wurde (Cornish et al. 2008).

Zur Quantifizierung des Osteoklastenvorkommens wurde eine TRAP-Färbung der Femur-Schnitte durchgeführt. Die Auszählung erfolgte in der Diaphyse und der Wachstumszone und wurde auf die Fläche normalisiert (siehe Unterunterabschnitt 3.2.4.1). Geprüft wurde, ob das Osteoklastenvorkommen im Mausmodell unter dem Einfluss von PA und OA bei Normalgewicht verändert ist. Dabei wurden alle Ernährungskonditionen miteinander verglichen.

In der stoffwechselaktiven Wachstumszone gab es zwischen der normalen Diät, der OA- und der PA-OA-Wechseldiät keine auffälligen Unterschiede. Verglichen mit der normalen Ernährung gab es unter PA keine signifikanten Veränderungen ($p = 0,111$). Dies traf auch auf OA zu ($p = 0,655$) und ebenfalls auf die PA-OA-Wechseldiät ($p = 0,855$). Zwischen PA und OA ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,179$) und die PA-OA-Wechseldiät brachte annähernd die gleiche Anzahl an OK hervor wie PA ($p = 0,32$) (siehe Abb. 4.3).

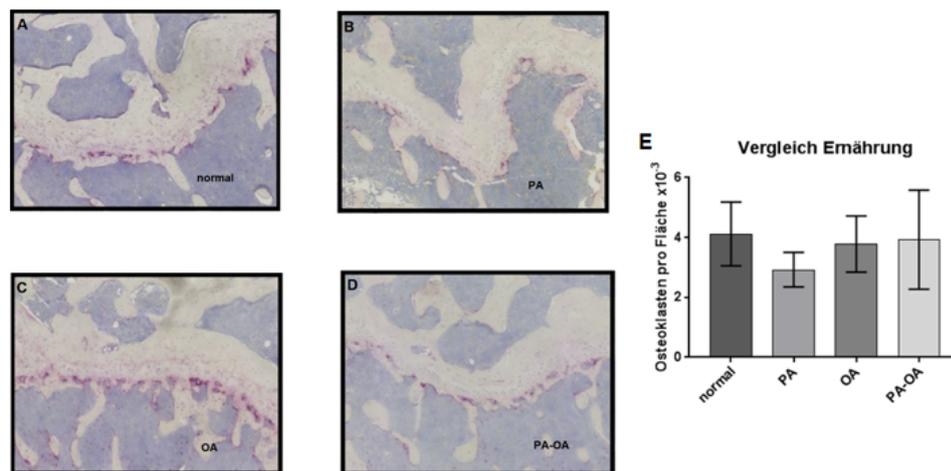


Abbildung 4.3: Histologischer Schnitt der Epiphysenfuge des Femurs, TRAP-gefärbte Osteoklasten unter normaler (A), palmitinsäurerhaltiger (B), ölsäurehaltiger (C) und abwechselnd palmitin- und ölsäurehaltiger Ernährung (D). Grafische Darstellung der Ergebnisse der Auszählung von Osteoklasten pro Fläche (E). Es bestehen keine signifikanten Unterschiede.

In der Diaphyse wurde gleichermaßen kein signifikanter Unterschied zwischen den Ernährungen detektiert (siehe Abb. 4.4).

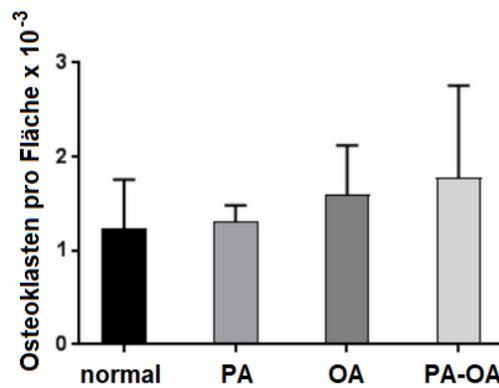


Abbildung 4.4: Auswertung der Auszählung der OK in der Diaphyse. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Konditionen festgestellt.

4.3.1.2 Palmitinsäure fördert Anstieg der Osteoklastenzahl unter parodontaler Infektion

Allein durch die Unterschiede in der Ernährung war keine signifikante Veränderung der Osteoklastenzahl im Knochen zu sehen. Im Folgenden wurde getestet, wie sich die Reaktion des Wirts auf einen bakteriellen Reiz verändert und ob die Ernährung hierbei eine Rolle spielt. Hier wurde hinsichtlich des Osteoklastenvorkommens überprüft, wie sich die parodontale Infektion mit *P.g.* auf den systemischen Knochenstoffwechsel auswirkt.

In Osteoklasten, die in 0,2 mM PA kultiviert wurden, gab es laut Muluke et al. eine deutliche Immunantwort in Anwesenheit von *P.g.*, es wurde vermehrt TNF- α und IL6 sezerniert (Muluke et al. 2016). Auch wurde in dieser Studie im adipösen Mausmodell unter PA-Diät und *P.g.* ein lokaler Knochenabbau des Alveolarknochens festgestellt.

Es zeigte sich in der vorliegenden Studie ein systemischer Effekt der *P.g.*-Infektion unter PA. Durch eine vermehrte Aufnahme von Palmitinsäure kam es unter bakterieller Infektion zu einem signifikanten Anstieg der Osteoklastenzahl im Femur ($p = 0,019$) (siehe Abb. 4.5).

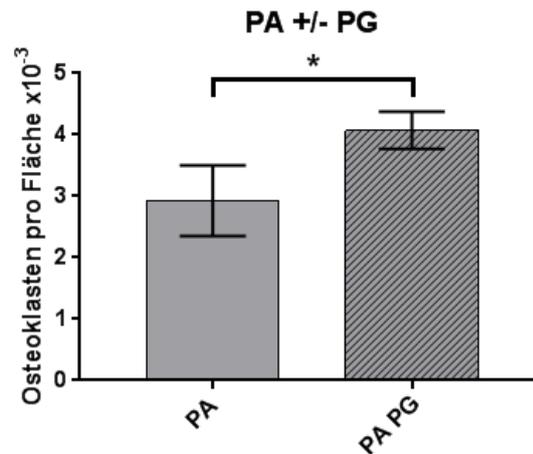


Abbildung 4.5: Grafische Darstellung der Auswertung der Auszählung von Osteoklasten pro Knochenfläche in der TRAP-Färbung ohne und mit parodontaler Infektion unter PA. Es gibt einen hoch signifikanten Anstieg der Osteoklasten nach *P.g.*-Infektion ($p = 0,019$).

Auch im histologischen Bild machte sich der Anstieg der Osteoklasten bemerkbar. In der stoffwechselaktiven Wachstumszone konnte man einen deutlichen Anstieg der rot gefärbten Osteoklasten feststellen (siehe Abb. 4.6).

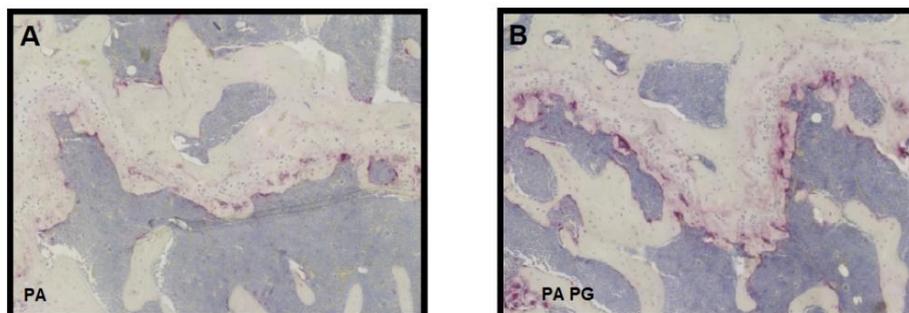


Abbildung 4.6: Histologischer Schnitt der Epiphysenfuge des Femurs, TRAP-Färbung. Unter palmitinsäurehaltiger Ernährung ohne *P.g.*-Infektion (A) zeigen sich weniger Osteoklasten als mit *P.g.*-Infektion (B).

Bei der normalen Ernährung, der ölsäurehaltigen und der PA-OA-Wechseldiät war kein signifikanter Unterschied in der Osteoklastenzahl zwischen Infektionsgruppe und Placebogruppe zu ermitteln (siehe Abb. 4.7, Abb. 4.8 und Abb. 4.9).

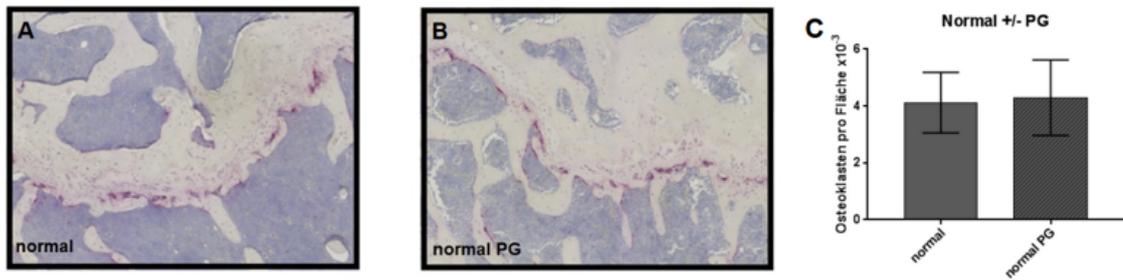


Abbildung 4.7: Histologischer Schnitt der Epiphysenfuge des Femurs, TRAP-Färbung. Im Vergleich zur normalen Ernährung ohne Infektion (A) und mit Infektion (B) ist kein Unterschied in der OK-Anzahl erkennbar. Grafische Darstellung der Osteoklastenzählung (C) ($p = 0,845$).

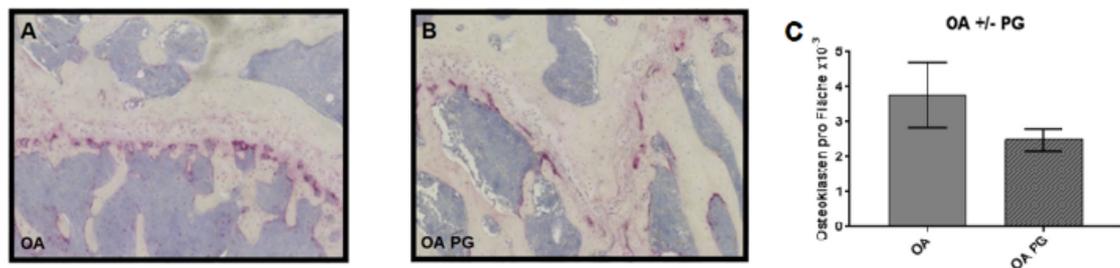


Abbildung 4.8: TRAP-gefärbter Ausschnitt der Epiphysenfuge des Femurs. Unter OA ohne Infektion (A) und mit Infektion (B) sind keine deutlichen Unterschiede zu erkennen. Die grafische Darstellung der Osteoklastenzählung (C) zeigt, dass es keine signifikanten Abweichungen in der OK-Anzahl gibt ($p = 0,065$).

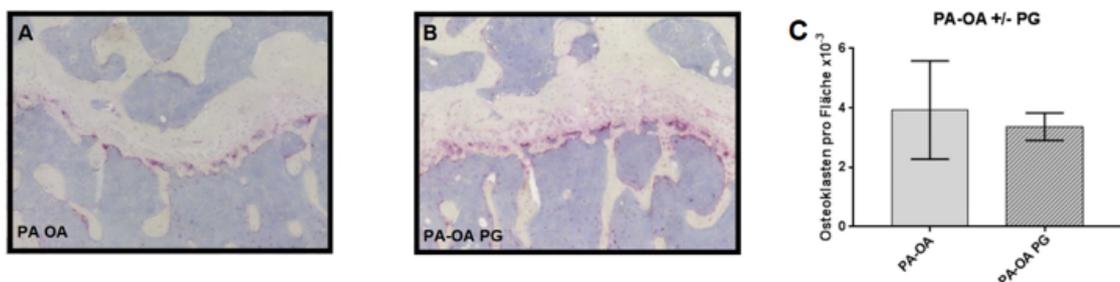


Abbildung 4.9: TRAP-Färbung, Ausschnitt der Wachstumszone des Femurs unter PA-OA-Wechseldiät ohne Infektion (A) und mit Infektion (B), grafische Darstellung der Osteoklastenzählung (C). Es ist kein signifikanter Unterschied der OK-Anzahl zwischen Infektions- und Placebogruppe zu sehen ($p = 0,554$).

Auch in der Diaphyse wurden unter Infektion keine Unterschiede festgestellt (siehe Abb. 4.10).

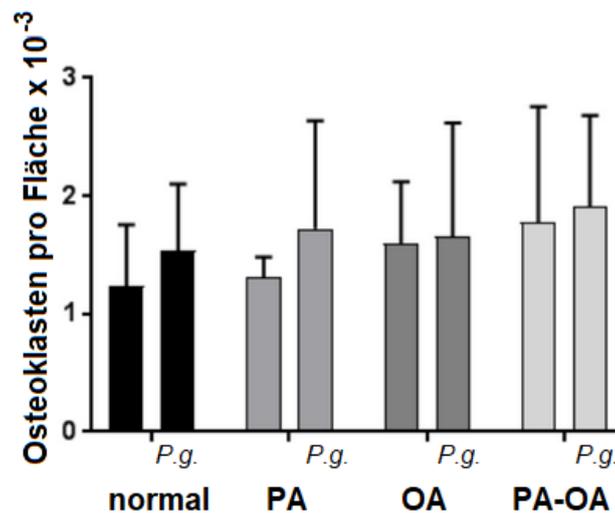


Abbildung 4.10: Auswertung der Auszählung der OK in der Diaphyse. Auch unter *P.g.*-Infektion trat kein signifikanter Unterschied in den Ernährungsgruppen auf.

4.3.2 Reaktion der Osteocalcin-positiven Zellen auf spezifische Fettsäuren und Infektion

Damit eine Aussage über das Remodeling möglich ist, wurden in dieser Arbeit nicht nur die Osteoklasten, sondern auch die Osteoblasten berücksichtigt. Die beiden Zelltypen beeinflussen sich in Vorkommen und Differenzierung gegenseitig (siehe Abschnitt 2.4). Es wurde weiterhin von Alsahli et al. gezeigt, dass mit erhöhtem Serumspiegel von PA auch eine PA-Akkumulation bei Adipositas im Knochen stattfindet (Alsahli et al. 2016). Das führte in dieser Studie zu einer Verringerung der Knochenbildungsmarker und einem Anstieg von inflammatorischem TNF- α , was in einer verminderten Osteoblastenaktivität resultieren könnte. Um vergleichen zu können, ob bei dem Versuchsmodell unter Normalgewicht ähnliche Mechanismen vorhanden sind, wurden OCN⁺ Zellen analysiert. Osteocalcin wird von Osteoblasten gebildet und diente daher als Osteoblastenmarker. Es wurden jeweils im linken Femur von je 4 Versuchstieren pro Kondition die Zellen in einem Ausschnitt der Epiphysenfuge und der

Diaphyse gezählt (siehe Unterunterabschnitt 3.2.5.1).

In der metabolisch aktiveren Epiphysenfuge waren die Schnitte nicht auswertbar, da sich das Bild sehr diffus dargestellt hat und keine einzelnen Zellen abgrenzbar gewesen sind. Es konnte dadurch keine eindeutige Aussage über die Anzahl der OCN+ gemacht werden (siehe Abb. 4.11).

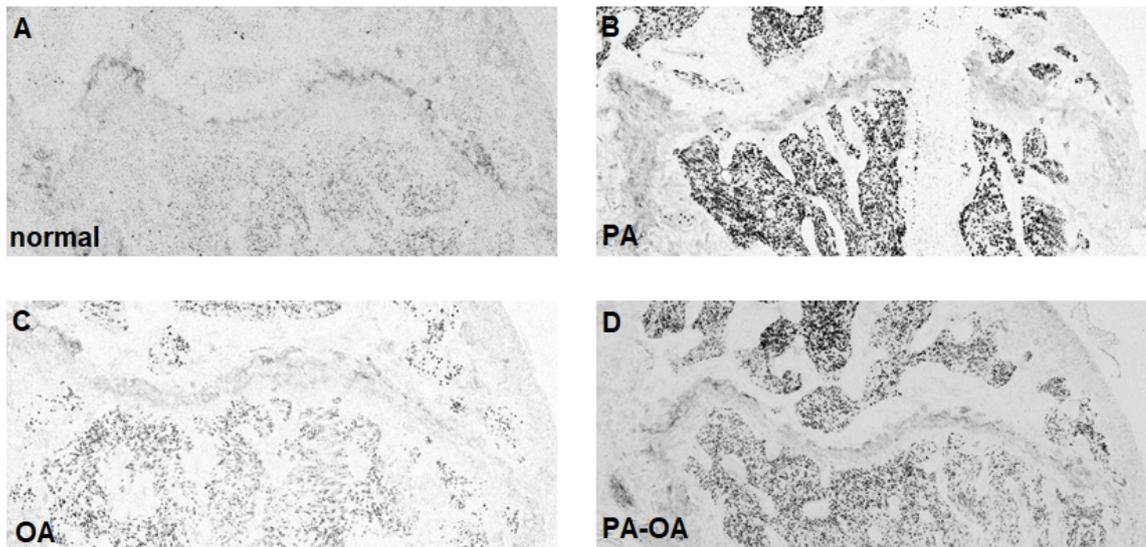


Abbildung 4.11: OC-Färbung an Epiphysenfuge unter normaler Ernährung (A), PA (B), OA (C) und der PA-OA-Wechseldiät (D). Es sind keine einzelnen Zellen erkennbar und somit ist die OC-Färbung an der Epiphysenfuge nicht auswertbar.

Aufgrund dessen wird im Folgenden nur auf die Auswertung der Diaphyse eingegangen.

4.3.2.1 Spezifische Fettsäuren haben keinen Einfluss auf Anzahl der Osteocalcin-positiven Zellen in der Kortikalis

Eine gesteigerte PA-Aufnahme wird mit einer erhöhten Akkumulation von Ceramiden in Verbindung gesetzt, die die molekularen Mechanismen beeinflussen und deren Folge die Lipotoxizität ist (DeFronzo 2010). In Bezug auf Osteoblasten geht aus einer der vorherigen Studien hervor, dass Osteoblastenvorläuferzellen, die mit 0,2 mM PA inkubiert wurden, eine erhöhte Ansammlung von C16-, C20- und C22-Ceramiden aufwiesen und in ihrer Aktivität gestört waren (Alsahli et al. 2016). Da die unter anderem auch zur Apoptose führenden Ceramide hauptsächlich aus Palmitinsäure gebildet werden, sollte untersucht werden, ob es im Vergleich zu den anderen Ernährungen Unterschiede in der Anzahl der OCN+ gab. Unter hochfetthaltiger PA-Ernährung ist die Knochendichte unter Adipositas nachgewiesenermaßen vermindert (Drosatos-Tampakaki et al. 2014), daher könnte man auf eine Verminderung der OCN+ schließen.

In der vorliegenden Studie waren im Vergleich zwischen den verschiedenen Diäten keine signifikanten Unterschiede aufgefallen (siehe Abb. 4.12). Unter der normalen Ernährung waren im Vergleich zu PA ähnlich viele OCN+ vorhanden ($p = 0,91$). Dies war auch im Vergleich zu OA ($p = 0,961$) und PA-OA der Fall ($p = 0,691$). Ferner gab es zwischen PA und OA keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,931$). Im Vergleich von PA zur PA-OA-Wechseldiät zeigte sich ebenfalls keine signifikante Variation der Anzahl der OCN+ in der Diaphyse ($p = 0,516$).

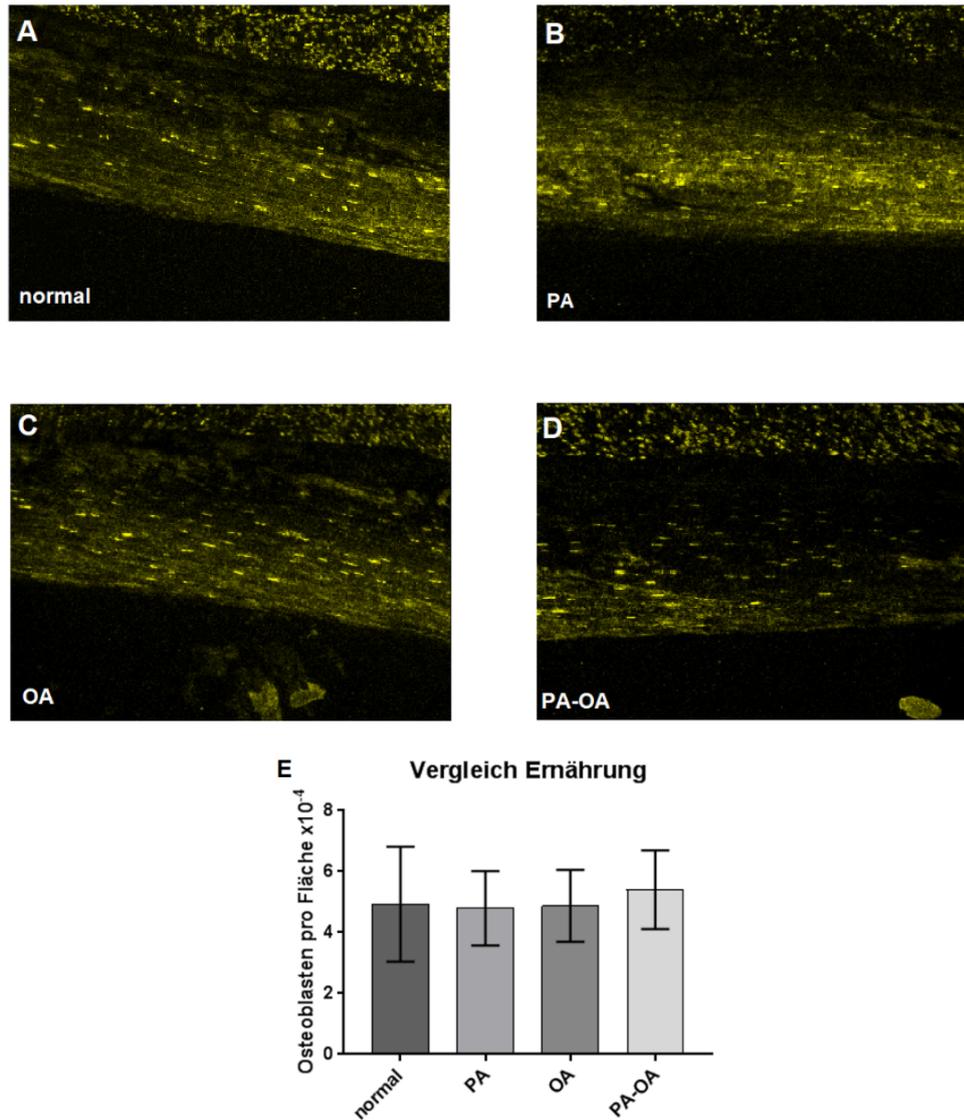


Abbildung 4.12: Osteocalcin-Färbung, Ausschnitt der Kortikalis des Femurs, OCN+ als gelbes Signal im Osteocalcin-Kanal unter normaler (A), palmitinsäurehaltiger (B), ölsäurehaltiger (C) und abwechselnd palmitinsäurehaltiger und ölsäurehaltiger Diät (D). Grafische Darstellung der Auswertung (E). Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der OCN+ in der Kortikalis.

4.3.2.2 Einfluss der parodontalen Infektion auf die Osteocalcin-positiven Zellen im Knochen

Eine bakteriell-induzierte inflammatorische Parodontitis geht bekanntlich mit lokalem Knochenabbau einher. Um zu überprüfen, ob es eine systemische Wirkung auf die Infektion mit dem Bakterium gibt und ob eine fettsäure-angereicherte Ernährung Einfluss auf die daraus resultierende Immunreaktion hat, wurden die OCN+ auch unter parodontaler Infektion der Mäuse gezählt und die einzelnen Versuchsgruppen mit ihrer jeweiligen Kontrollgruppe verglichen. Hierbei war im Trend erkennbar, dass nach Infektion eine Reduktion der OCN+ in allen Ernährungsgruppen auftrat. Es waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar (siehe Abb. 4.13).

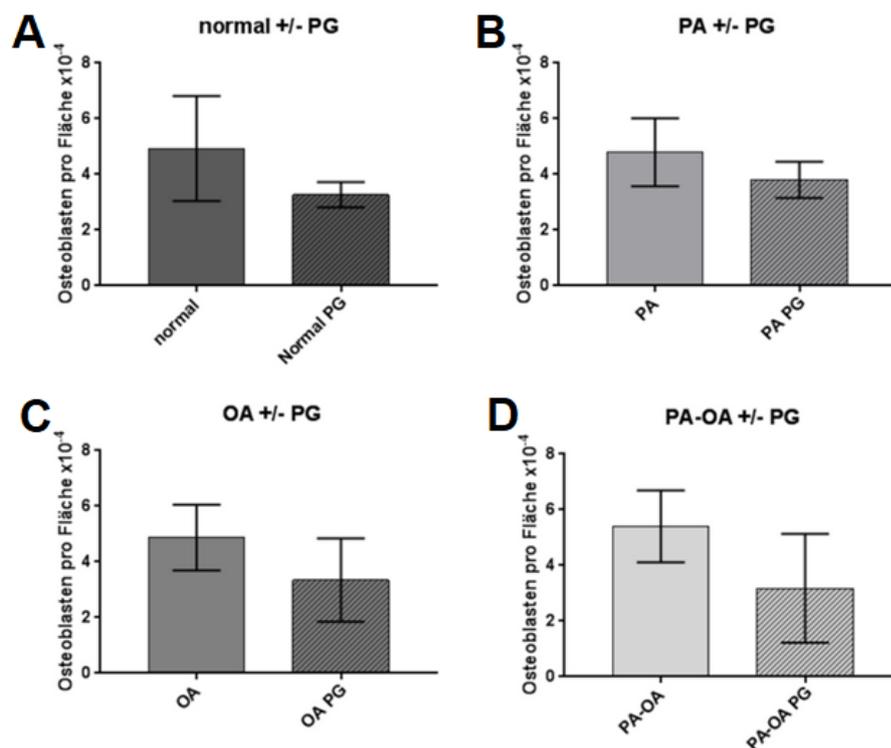


Abbildung 4.13: OCN+ pro Fläche ohne und mit Infektion unter normaler Ernährung (a), palmitinsäurereicher Ernährung (b), ölsäurereicher Ernährung (c) und wechselnder Ernährung (8 Wochen palmitinsäurereiche und anschließend 8 Wochen ölsäurereiche Ernährung) (d). In jeder Gruppe ist ein Trend zu einer verminderten Anzahl der OCN+ nach Infektion feststellbar.

Unter normaler Ernährung waren in der Placebogruppe ähnlich viele OCN+ vorhanden wie in der Infektionsgruppe ($p = 0,176$). Unter PA ohne und mit *P.g.* verhielt es sich ähnlich ($p = 0,216$), genau wie bei OA mit und ohne *P.g.* ($p = 0,164$). Unter PA-OA gab es ein deutlicheres Signal in der Immunfluoreszenzfärbung in der Gruppe, die nicht mit *P.g.* infiziert wurde (siehe Abb. 4.14), jedoch sind diese Unterschiede nicht signifikant ($p = 0,114$).

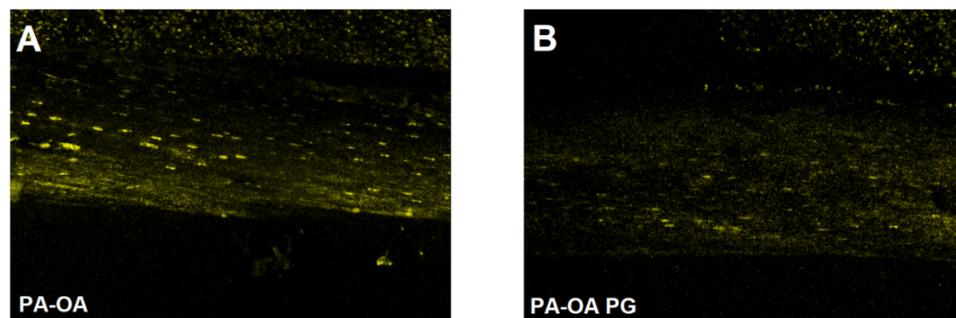


Abbildung 4.14: Osteocalcin-Färbung, Ausschnitt der Kortikalis des Femurs, OCN+ als gelbes Signal im Osteocalcin-Kanal. In der PA-OA-Gruppe (A) sieht man deutlich mehr OCN+ als in der PA-OA-Gruppe mit Infektion (B).

4.4 Vergleich des Knochenmetabolismus nach 8 und 16 Wochen unter Ernährung mit Palmitinsäure

Palmitinsäure wird mit erhöhten Apoptosemarkern (Yang et al. 2018) und der De-novo-Ceramidsynthese assoziiert (Martinez et al. 2015). Auch wurde herausgefunden, dass der PA-Spiegel im Gegensatz zu OA nach einer fettsäurereichen PA Ernährung im Knochen ansteigt (Alsahli et al. 2016). Es wurde deswegen überprüft, ob es mit zunehmender Aufnahme von PA zu einer Reaktion auf den Knochenmetabolismus kommt.

Nach 8 Wochen PA-Gabe lag der Anteil an Trabekelvolumen über Gesamtvolumen bei ca. 25,62%, nach weiteren 8 Wochen PA war der Trabekelanteil signifikant geringer (ca. 12,08%) ($p = 0,021$). Auf dem

histologischen Bild sieht man unter 8 Wochen PA-Fütterung große zusammenhängende Trabekel, nach 16 Wochen PA-Fütterung sind diese deutlich kleiner (siehe Abb. 4.15). Das Alter der jungen Mäuse betrug 12 Wochen und das Alter der älteren 20 Wochen.

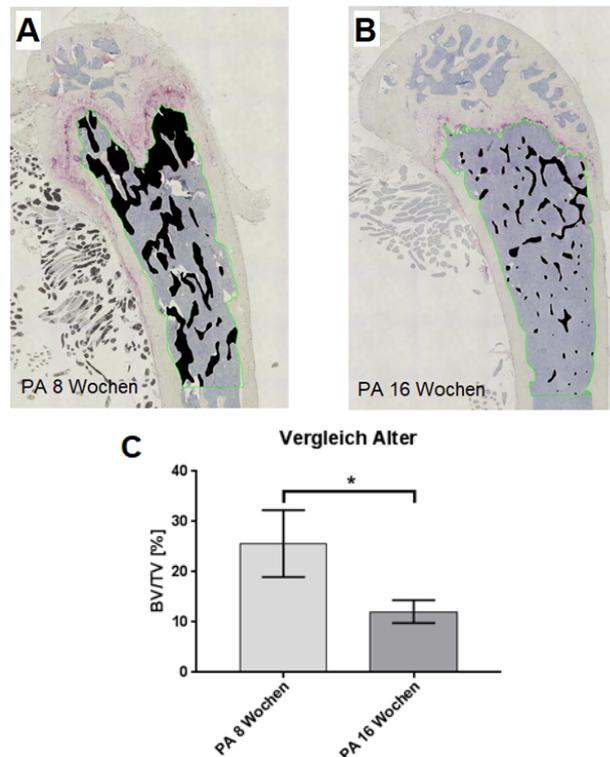


Abbildung 4.15: TRAP-gefärbte Schnitte des Femurs mit schwarz eingefärbten Knochen trabekeln in der ROI (grün umrandet), unter 8 Wochen palmitinsäurereicher Ernährung (A) sind die Trabekel größer und die Knochendichte ist höher als unter 16 Wochen palmitinsäurereicher Ernährung (B). Grafische Darstellung der Ergebnisse (C). Es ist eine signifikante Verringerung der Knochendichte nach 16 Wochen PA zu erkennen ($p = 0,021$).

Es stellte sich heraus, dass mit zunehmend längerer Gabe von PA die Anzahl der Osteoklasten abnahm. Nachdem die Mäuse 16 Wochen lang PA gefüttert bekommen haben, waren hoch signifikant weniger OK im Knochen detektierbar ($p = 0,01$) (siehe Abb. 4.16). Die Reduktion betrug in diesem Zeitraum 2,31 OK pro Flächeneinheit (FE).

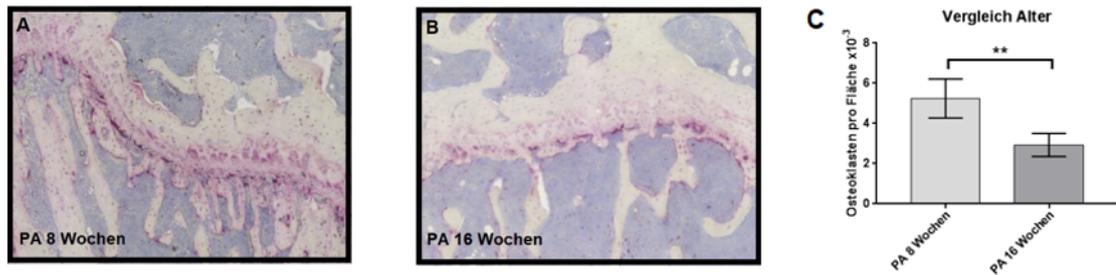


Abbildung 4.16: Histologischer Schnitt der Epiphysenfuge des Femurs, TRAP-Färbung, Osteoklasten pro Knochenfläche unter 8 Wochen (A) bzw. 16 Wochen (B) palmitinsäurehaltiger Ernährung. Grafische Darstellung der Auswertung der TRAP-Färbung (C). Man sieht deutlich weniger Osteoklasten bei längerer Gabe von PA ($p = 0,01$).

Die Anzahl der OCN+ war zu beiden Zeitpunkten ähnlich ($p = 0,71$) (siehe Abb. 4.17).

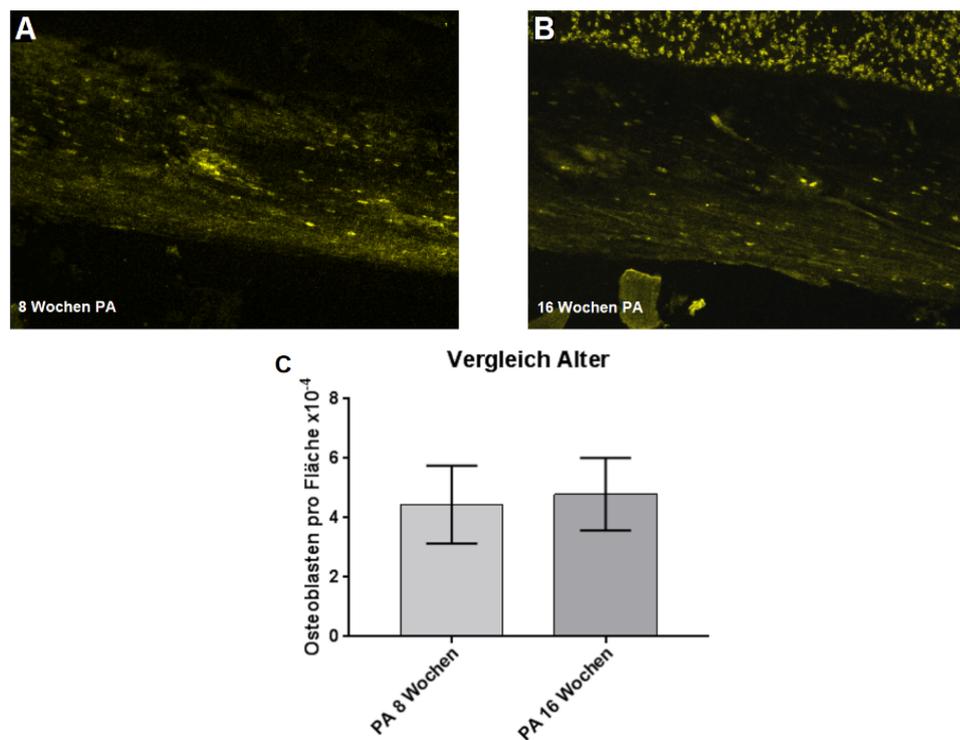


Abbildung 4.17: Osteocalcin-Färbung, Ausschnitt der Kortikalis des Femurs, OCN+ als gelbes Signal im Osteocalcin-Kanal unter palmitinsäurehaltiger Ernährung nach 8 (A) bzw. 16 Wochen (B). Grafische Darstellung der Ergebnisse (C). Durch die Einwirkzeit sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar ($p = 0,71$).

Auf Knochenebene konnte also eine Verringerung der Knochendichte erfasst werden, auf zellulärer Ebene jedoch wurden signifikant weniger OK und ähnlich viele OCN+ vermerkt.

5 Diskussion

Die Ernährung hat einen Einfluss darauf, wie der Körper auf eine Entzündung reagiert (van Woudenberg et al. 2013). In Zusammenhang mit einer bakteriell-induzierten inflammatorischen Parodontitis wird auch immer mehr der Allgemeinzustand des Wirts diskutiert und inwieweit man diesen beeinflussen kann, damit er einen antiinflammatorischen Grundzustand aufweist. Bei einer Parodontitis gibt es stets eine überschießende inflammatorische Wirtsreaktion, die zur Gewebszerstörung mit schlussentlichem Zahnverlust führen kann.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden Untersuchungen durchgeführt, inwiefern die Physis des Wirts durch eine bestimmte Ernährung moduliert werden kann. Dabei lag der Fokus darauf, wie sich die in der westlichen Ernährung am häufigsten vorkommende und gesättigte Palmitinsäure und ihr mediterranes Äquivalent, die einfach ungesättigte Ölsäure (Baylin et al. 2002), unter Normalgewicht auf den Knochenstoffwechsel auswirken. Es wurde überprüft, ob die unter Adipositas bereits nachgewiesenen Effekte von Palmitinsäure sich bestätigen und diese mit einer Ernährungsumstellung auf Ölsäure ausgeglichen werden können. Ein weiteres Ziel war es zu erforschen, inwiefern sich durch die Aufnahme der Fettsäuren die Reaktion des Wirts auf einen parodontalen Keim verändert. Langfristig sollen dadurch die Mechanismen des Knochenstoffwechsels weiter aufgeschlüsselt und die Rolle der Ernährung dargestellt werden. Es stellt sich die Frage, ob durch eine Ernährungsumstellung von gesättigten auf ungesättigte Fettsäuren das Risiko der Entstehung und Progression einer Parodontitis reduziert werden kann.

5.1 Versuchsmodell

In Anlehnung an vorangegangene Studien (Drosatos-Tampakaki et al. 2014, Li et al. 2015, Muluke et al. 2016) war das von uns gewählte Tierversuchsmodell ein 16-wöchiges Modell mit den unterschiedlichen Ernährungen PA (gesättigt), OA (einfach ungesättigt) und einer neu etablierten PA-OA-Wechseldiät, wobei die Versuchstiere über 5 Wochen lang mit dem parodontal pathogenen Bakterium *Porphyromonas gingivalis* infiziert wurden. Die Fettsäurekonzentration der PA- und OA-basierten Futtermittel von 21% der Gesamtkalorien (bei der nicht-fettsäureangereicherten Diät 11% der Gesamtkalorien) führte bei den Versuchstieren nicht zu einer Adipositas. Somit konnten die Auswirkungen der Fettsäuren auf den Knochenstoffwechsel und deren modulierende Bedeutung bei einer parodontalen Infektion anders als in vorangegangenen Studien unter Normalgewicht betrachtet werden.

5.2 Palmitinsäure verringert Knochendichte unter Normalgewicht

Der Knochen wies unter PA die kleinste Knochendichte auf, diese war signifikant geringer als unter den anderen Konditionen. Es ist festzuhalten, dass im Vergleich zu den anderen Ernährungsgruppen ein verringerter Knochenaufbau oder ein verstärkter Knochenabbau stattgefunden hat. Die geringe Knochendichte unter PA macht den Einfluss der Ernährung auch unter Normalgewicht deutlich. Es könnte zu einer Akkumulation von PA gekommen sein, die verantwortlich für die verminderte Knochenbildung oder die verstärkte Knochenresorption sein könnte. Es wurde beschrieben, dass PA, jedoch nicht OA, die Osteoklastogenese fördert (Drosatos-Tampakaki et al. 2014). Das Resultat dessen ist eine verminderte Knochendichte, wie es in der vorliegenden Studie der Fall ist. Wie auch in der Studie von Drosatos-Tampakaki et al. beschrieben wurde, führte OA im Gegensatz zu PA nicht zu einer erhöhten Osteoklastogenese. Auch das wird in der vorliegenden Studie gezeigt, in der die Knochendichte der OA-Gruppe signifikant höher ist als die der PA-Gruppe. Dies könnte zum einen über den RANK/RANKL-Mechanismus getriggert sein, der durch PA-Akkumulation ausgelöst werden kann (Drosatos-Tampakaki et al. 2014). Zum anderen könnte es auch über TNF- α zu einem erhöhten

Knochenabbau gekommen sein, da PA auch die TNF- α -Produktion ohne Anwesenheit von RANKL fördern kann und ein erhöhter TNF- α -Spiegel mit einer erhöhten Osteoklastogenese einhergeht (Drosatos-Tampakaki et al. 2014). Die Marker RANKL und TNF- α wurden von einem anderen Teil der Arbeitsgruppe zum Zeitpunkt der Euthanasierung, eine Woche nach der letzten Infektion, untersucht und es zeigte sich dort kein signifikanter Anstieg durch die Ernährung. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es nur geringe Veränderungen von RANKL und TNF- α gab oder dass eine mögliche Erhöhung dieser Knochenstoffwechsel- und Immunmarker im Versuchsverlauf stattfand, aber zur Zeit der Tötung nicht mehr messbar war.

Die geringe Knochendichte unter PA könnte auch auf die Ceramidsynthese zurückzuführen sein, die unter PA-Akkumulation entsteht und eine zytotoxische Wirkung haben kann (siehe Unterabschnitt 2.4.7).

5.3 Umkehrung der Effekte von Palmitinsäure durch Ölsäure möglich

Unter PA hatten die Versuchstiere die geringste Knochendichte, unter OA war sie im Vergleich dazu signifikant höher. Folgte auf eine 8-wöchige PA-Ernährung eine 8-wöchige OA-Ernährung, war die Knochendichte signifikant höher als bei reiner PA-Diät.

In einer vorangegangenen Studie wurden Diacylglycerolacyltransferase 1 Knockout-Mäuse untersucht (siehe Unterabschnitt 2.4.7). Hier war die Qualität des Knochens verringert und es gab einen Anstieg der Osteoklastogenese (Drosatos-Tampakaki et al. 2014). Bei normalen Mäusen fand die Triglycerid-Bildung nur unter der OA-Diät statt und es wurde angenommen, dass dadurch die Knochengesundheit verbessert wurde. Außerdem machte diese Studie deutlich, dass unter OA-Ernährung und Adipositas eine OA-Akkumulation zwar im Serum stattfindet, aber nicht im Knochen (Alsahli et al. 2016). In der vorliegenden Studie war die Knochendichte unter der reinen OA-Ernährung nicht nur höher als die von PA, es stellte sich auch heraus, dass die Gabe von OA nach einer 8-wöchigen PA-Diät den Effekt von PA umkehren konnte. Das könnte zum einen daran liegen, dass die TG-Bildung unter

OA-Gabe stattgefunden hat und sich positiv auf die Knochengesundheit ausgewirkt hat. Zum anderen kommt auch die Vermutung auf, dass das in den Knochen eingelagerte PA abgebaut wurde und so die Osteoklastogenese wieder auf ein Normalmaß zurückreguliert wurde.

Palomer et al. haben herausgefunden, dass die Ernährungsumstellung von PA auf OA einen positiven Effekt auf die Insulinresistenz in Fettgewebe, Muskel und Leber hat (siehe Unterabschnitt 2.4.6) (Palomer et al. 2018). Es konnte beim Ernährungswechsel ein gesundheitsfördernder Effekt festgestellt werden, was das Ergebnis der vorliegenden Studie in Hinblick auf den Knochenstoffwechsel widerspiegelt.

Falls weitere Untersuchungen diese These bestätigen sollten, könnte somit in Zukunft dem Patienten zu einer Ernährungsumstellung geraten werden, um die Knochenstruktur zu stabilisieren und einer Resorption entgegen zu wirken. Hierzu bedarf es allerdings noch weiterer grundlegender Untersuchungen.

5.4 Palmitinsäure moduliert die systemische Reaktion des Wirts auf eine parodontale Infektion durch Zunahme der Osteoklastenanzahl

Ein wichtiger Teil der Studie war es, zu untersuchen wie Osteoklasten auf PA und OA, die am häufigsten in der westlichen Ernährung im Serum vorkommenden gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren, reagieren.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass gesättigte FS, im Gegensatz zu ungesättigten, eine inflammatorische Reaktion in unterschiedlichen Organen auslöst (Vassiliou et al. 2009, Gupta et al. 2012, Huang et al. 2012). Unter dem Aspekt, dass eine Entzündungsreaktion zu Osteoklastogenese und Knochenabbau führen kann (Azuma et al. 2000, Kobayashi et al. 2000, Kim et al. 2005) und dass die Inflammation das Remodeling und die Neubildung des Knochens beeinträchtigt (Walsh et al. 2009, Tomomatsu et al. 2009), kann eine erhöhte PA-Aufnahme zu einer Verminderung der Knochengesundheit führen. Unter Adipositas wurde beschrieben, dass PA eine proinflammatorische

Immunantwort induziert und über TNF- α und vermehrte Expression von RANK die Osteoklastogenese gefördert wird. Ein Überschuss an OA hingegen inhibierte eine proinflammatorische Immunantwort durch die Induktion der neutralen TG-Bildung (Drosatos-Tampakaki et al. 2014).

Erhöhte Serumspiegel gelöster Fettsäuren sind ein wichtiges Kriterium der Adipositas (Boden 2008). Diese Bedingungen sind assoziiert mit einer chronischen Inflammation im Körper (Izaola et al. 2015), es gibt erhöhte TNF- α -Spiegel und damit auch einen erhöhten Knochenabbau bei einer Infektion (Adamopoulos 2018). Vorherige Untersuchungen konnten zeigen, dass es bei einer PA-angereicherten Ernährung neben Adipositas zu einem Anstieg von PA in Knochen und Serum kommt (Alsahli et al. 2016). Die Einlagerung im Knochen kommt wahrscheinlich unter den gegebenen Bedingungen bei Normalgewicht nicht im gleichen Ausmaß zustande. In der vorliegenden Studie hatte die Ernährung allein nur einen geringen Einfluss auf das systemische Osteoklastenvorkommen. Deswegen muss davon ausgegangen werden, dass, um den Status der chronischen Inflammation zu erreichen und somit einen die Immunantwort regulierenden Faktor vorweisen zu können, eine Adipositas vorliegen muss, was in der vorliegenden Studie nicht der Fall war. In diesem Zusammenhang ist das vermehrte Vorkommen von Osteoklasten nach *P.g.*-Infektion zu sehen, da somit wahrscheinlich ein Entzündungsreiz gegeben war, der in PA-ernährten Tieren am stärksten ausgeprägt war.

In der Studie von Alsahli et al. war der Unterschied zwischen der Reaktion des Körpers auf PA und OA schon in der Aufnahme der Fettsäuren erkennbar. PA wird im Gegensatz zu OA vermehrt in den Knochen aufgenommen, wo es dann zu dementsprechenden metabolischen Veränderungen gekommen sein könnte. Dazu zählt eine inflammatorische Aktivierung und gleichzeitige Osteoklastogenese. Es ist möglich, dass, unter PA-Diät eine Einlagerung der Fettsäure in den Knochen stattgefunden hat und es somit zur verstärkten Ceramidsynthese und Produktion von TNF- α und RANKL in den Osteoklasten kam. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass nach längerer Aufnahme von PA weniger Osteoklasten detektiert wurden, allerdings wurde in der histomorphometrischen Analyse deutlich, dass eine Verringerung des Trabekelvolumens stattgefunden hat.

Eine andere mögliche Erklärung für die geringere Osteoklastenzahl ist, dass zur Zeit der Tötung die knochenmodulierenden Mechanismen bereits abgeschlossen waren und daher die Anzahl der Osteoklasten zu diesem Zeitpunkt nicht mehr erhöht war. Im Verlauf des Versuchs muss es zur Erhöhung der Osteoklastenzahl oder -aktivität gekommen sein oder zu einer Verringerung des Osteoblastenvorkommens oder der Osteoblastenaktivität. Dies kann man am Knochenvolumen erkennen, das in Abschnitt 5.2 diskutiert wurde.

5.5 Unter Normalgewicht gibt es keine Veränderung der Anzahl der Osteocalcin-positiven Zellen durch Ernährung und Infektion

In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass durch PA eine Lipotoxizität entsteht, die zur Hemmung von Osteoblastenfunktion führen kann (Gunaratnam et al. 2014). Unter Adipositas wurde im Trend eine Verringerung der Osteoblastenmarker Osteocalcin und Knochenformationsmarker P1NP (Prokollagen Typ 1 N-terminales Propeptid) unter PA festgestellt (Alsahli et al. 2016). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Fettsäuren unter einer hochfettthaltigen Ernährung die Osteoblastenfunktion einschränken können. Auch wurde in dieser Studie entdeckt, dass die Osteoblasten wie es auch bei den Osteoklasten der Fall war, mehr auf PA als auf OA reagieren.

In der durchgeführten Studie ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der OCN+ hinsichtlich auf die Ernährung und Infektion. In den Kontrollgruppen lag fast die gleiche Anzahl an OCN+ vor wie in der PA- oder der OA-Gruppe. Auch in Hinblick auf die parodontale Infektion gab es keine signifikanten Unterschiede. Dies steht im Gegensatz zu den in Abschnitt 5.4 beschriebenen Osteoklasten, die unter PA und einer *P.g.*-Infektion vermehrt vorkamen. Das könnte darauf hindeuten, dass die Osteoklasten die Zellen sind, die am ehesten auf eine akute Veränderung der Versuchsbedingungen reagieren, während die Osteoblasten bei geringeren Veränderungen eher konstant bleiben. Die Vermutung stimmt mit den Ergebnissen vorausgegangener Studien überein, bei denen auch nur minimale Effekte auf die Osteoblasten festgestellt werden konnten (Mulukey et al. 2016).

Es gibt eine negative Korrelation zwischen Osteoblastenmarkern und der Palmitinsäureaufnahme bei Adipositas (Alsahli et al. 2016), wodurch man durch die dieser Arbeit zugrunde liegende Studie vermuten kann, dass sich diese Korrelation wahrscheinlich erst ab einer gewissen Ansammlung der Fettsäuren einstellt, die unter den Versuchsbedingungen nicht erreicht wurde. Das lässt die Überlegung aufkommen, dass durch eine vermehrt fettsäurehaltige Ernährung das Osteoblastenvorkommen zwar beeinflusst wird, aber dass für eine Messbarkeit eine höhere Fettsäureakkumulation vorhanden sein muss. Auch ist es möglich, dass eine Veränderung der Osteoblastenzahl- und -aktivität bereits vor der Messung abgeschlossen war und dadurch nicht mehr detektiert werden konnte.

PA ist ein Hauptsubstrat für die de novo Ceramidsynthese (Morales et al. 2007) und Ceramide gehören zu den zytotoxischen Mediaten beim Fettsäurestoffwechsel, die auch mit Apoptose assoziiert sind (Lu et al. 2003). Unter einer PA-Diät wurde festgestellt, dass die Ceramid-Spiegel in Osteoblasten ansteigen, unter OA war dies nicht der Fall. Auch induziert Palmitinsäure die Apoptose menschlicher Osteoblasten-ähnlicher Saos-2-Zellen über endoplasmatischen Retikulum-Stress und Autophagie in vitro (Yang et al. 2018). Diese Annahmen, dass sich PA negativ auf die OCN⁺ auswirkt, konnte nicht bestätigt werden. Im Tierversuchsmodell unter Normalgewicht war kein Einfluss der spezifischen Fettsäuren auf die OCN⁺ feststellbar. Auch hierbei ist zu erwarten, dass sich PA-bedingte Veränderungen wahrscheinlich erst ab einer größeren Menge einstellen. Durch den Konsum gesättigter Fettsäuren konnte man in dieser Studie den Knochenstoffwechsel in Bezug zu den Osteoblasten, im Gegensatz zu den Osteoklasten, nicht maßgeblich beeinflussen.

5.6 Akkumulation von Palmitinsäure und altersbedingte Veränderungen

Es ist zu vermuten, dass die Akkumulation von PA im Knochen eine Rolle spielt, da die Knochendichte nach 8 Wochen PA signifikant höher war als nach 16 Wochen PA-Fütterung. Das Alter und Wachstum der Mäuse ist hierbei von Bedeutung. Die Tiere, die 8 Wochen lang PA bekommen haben, waren zum Zeitpunkt der Euthanasierung 12 Wochen alt und die Gruppe, die die Ernährung

über 16 Wochen erhalten hat, war 20 Wochen alt. In einer Studie von Glatt et al. gab es unter nicht hochfetthaltiger Diät von Woche 4 bis Woche 12 einen Anstieg des Knochenvolumens und darauffolgend von der 12. bis zur 20. Woche einen Abfall (Glatt et al. 2007). In der Studie von Glatt et al. nimmt das Knochenvolumen unter einer Standardernährung von der 12. bis zur 20. Woche um ca. 36% ab. In der vorliegenden Studie nimmt es unter Palmitinsäure um ca. 53% ab. Dies führt zum Rückschluss, dass unter PA der Knochenabbau verstärkt ist. Zum Zeitpunkt der Euthanasie gab es signifikant weniger Osteoklasten in der älteren Gruppe im Vergleich zur jüngeren, während die OCN+ weitestgehend gleichgeblieben sind. In der Studie von Glatt et al. nimmt das Knochenvolumen ab Woche 12 ab. Dies stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie überein, in der es bei den jüngeren Mäusen eine Verschiebung der Knochenhomöostase zugunsten der Osteoklasten gab und daraus ein erhöhter Knochenabbau resultierte.

5.7 Methodische Diskussion

Das Modell des Tierversuchs, das für diese Arbeit verwendet wurde, ist mehrfach in anderen Studien beschrieben und etabliert und somit für die geplanten Analysen gut geeignet gewesen (Alsahli et al. 2016, Muluke et al. 2016). Die Anzahl der eingeschlossenen Tiere basierte auf Fallzahlberechnungen, die aus einer bereits durchgeführten Studie ermittelt wurden (Muluke et al. 2016).

Die Verwendung von *P.g.* als Parodontitis induzierendes Bakterium ist in der Grundlagenforschung anerkannt und *P.g.* wurde auch in einer der Studien verwendet, die der vorliegenden Arbeit als Basis dienten (Muluke et al. 2016). Das in der vorliegenden Studie ebenfalls ausgewählte parodontal pathogene Bakterium *P.g.* konnte im Nachhinein eine Woche nach der letzten Infektion nicht mehr im oralen Bereich nachgewiesen werden, jedoch konnten Reaktionen auf diesen Keim festgestellt werden. Die betreffenden Ergebnisse unter Infektion sollten daher nicht als Akutgeschehen interpretiert werden. In einer erneuten Versuchsreihe könnte ein zusätzlicher Zeitpunkt, der näher an der letzten Infektion liegt, gewählt werden, sodass man die detektierten Veränderungen präzise auf die Manifestation des Keims zurückführen kann.

Die Methode der histomorphometrischen Analyse ergab in dieser Arbeit

eindeutige Ergebnisse. Die Schnitte konnten sehr gut analysiert und unter gleichen Bedingungen ausgewertet werden. Artefakte beim Schneiden sind selten aufgetreten, von fast allen Knochen konnten sehr gute Schnitte angefertigt werden und am Ende wurden aus einer Vielzahl an Schnitten nur die ausgewählt, die eindeutig auswertbar waren, um bestmögliche Ergebnisse zu bekommen und eine Vergleichbarkeit sicherzustellen.

Die TRAP-Färbung für die Osteoklasten war ebenso genau und basierte auf festgelegten Protokollen der Osteoklastenanalyse (Drosatos-Tampakaki et al. 2014). Auch wenn zu sagen ist, dass die Intensität der Färbung in manchen Schnitten variierte, konnten eindeutig die mehrkernigen TRAP-positiven Zellen als Osteoklasten erkannt werden.

Die Osteocalcin-Färbung ist kritisch zu betrachten, da die Bilder des Laserscanning-Mikroskops sich teilweise sehr stark unterschieden, obwohl versucht wurde, immer die bestmögliche und eine kontinuierlich gleiche Einstellung zu verwenden. So ist in manchen Bildern der Hintergrund stärker zu sehen als bei anderen, was die Auswertung erschwerte. Dadurch, dass die Bilder aber von zwei unabhängigen Personen ausgewertet wurden, wurden Fehler ausgeschlossen, die auf die subjektive Wahrnehmung zurückzuführen sind. Auch wurde durch die Negativkontrollen ausgeschlossen, dass falsch positive Ergebnisse entstehen.

Insgesamt sollten weitere Versuche durchgeführt werden, um zufällige Abweichungen auf ein Minimum zu reduzieren und somit das Ergebnis aussagekräftiger zu machen. Der Versuch könnte unter den genannten Parametern wiederholt werden, um weitere Zeitpunkte der Analyse mit einzubeziehen und sicherzustellen, dass die Ergebnisse nicht nur eine momentane Situation darstellen, sondern auch auf längere Sicht hin reproduzierbar sind.

5.8 Ausblick

Mithilfe dieser tierexperimentellen Arbeit wurde nachgewiesen, dass es einen unterschiedlichen Einfluss von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren auf den Knochenstoffwechsel gibt. Dies wurde in dieser Arbeit systemisch anhand der Veränderungen im Femur überprüft. Der nächste Schritt könnte sein, die lokalen

Faktoren mit einzubeziehen. Um die präventive und therapeutische Modulierbarkeit des Wirts eingehender auf die Parodontitis zu beziehen, sollten die hier beschriebenen Resultate mit den Veränderungen im Alveolarbereich korreliert werden. Hier wäre es sicherlich interessant, die Knochendichte des Alveolarknochens unter den einzelnen Fettsäuren zu definieren und sie mit den systemischen Ergebnissen zu vergleichen. Auch sollte die Knochenresorption untersucht werden, um zu erforschen, ob ein Knochenrückgang durch die Ernährung mit gesättigten Fettsäuren schneller vorangeht und inwieweit ungesättigte Fettsäuren diesen Effekt abfangen können. Da die statische Histomorphometrie in der vorliegenden Arbeit Unterschiede im zellulären Vorkommen und der Knochenstruktur zeigen konnte, würde die zusätzliche Untersuchung des Knochen-Remodelings mittels dynamischer Histomorphometrie weitere Erkenntnisse liefern. Gleichzeitig könnten Mikro-CT-Untersuchungen verwendet werden, um noch genauer die Einflüsse der verschiedenen Fettsäuren auf die Knochenstruktur in einem drei-dimensionalen Rahmen zu definieren. Es sollten weiterhin Untersuchungen durchgeführt werden, die die Mechanismen beleuchten, durch die die Veränderungen im Knochen entstehen, wie z. B. ELISA zur Messung der Entzündungs- und Knochenremodelingmarker oder Versuche mit Serine palmitoyl transferase 2, um eine Ceramidakkumulation zu verhindern, damit man feststellen kann, wie sehr sich Ceramide auf die Knochenbildung auswirken.

Interessant wäre es weiterführend zu ermitteln, ob es nicht nur zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren Unterschiede gibt, sondern auch zwischen mehrfach ungesättigten. Man könnte das Spektrum der Fettsäuren erweitern, um einen Überblick zu erhalten, welche für eine Modulation des Knochenstoffwechsels am besten geeignet ist. Um generell auf das Thema „Einfluss der Ernährung auf den Knochenstoffwechsel“ einzugehen, ist es sicherlich auch von Bedeutung Untersuchungen zu den Komponenten Kohlenhydrate, Ballaststoffe, Vitamine und Mineralien durchzuführen. Dies passt zum Trend der heutigen Zeit, denn das Interesse durch gesunde Ernährung Krankheiten vorzubeugen oder abzumildern tritt gesellschaftlich und medizinisch vermehrt in den Fokus.

6 Schlussfolgerungen

Ziel dieser Arbeit war es, die systemischen Auswirkungen der hochfetthaltigen Ernährung unter Normalgewicht näher zu beleuchten. Es wurde festgestellt, dass eine Modulierbarkeit des Wirts durch Fettsäuren auch unter Normalgewicht besteht. Auch ohne den Faktor Adipositas gab es Veränderungen in der Knochendichte, die allein auf die Zufuhr von gesättigter oder ungesättigter Fettsäure zurückzuführen sind.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die Auswirkungen der Ernährung auf die Effekte der Osteoklasten höher liegen als auf den Osteoblasten. Das sieht man daran, dass es bei den Osteoblasten temporär keine signifikanten Veränderungen unter den Ernährungen gab. Osteoklasten bilden möglicherweise die reaktivere Zellgruppe. Dies steht im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen, wo das Osteoklastenvorkommen nach Infektion unter der gesättigten Fettsäure angestiegen ist und unter der ungesättigten nicht.

Ein weiteres Ziel war es, den Unterschied der Auswirkung von gesättigten vs. ungesättigten Fettsäuren herauszustellen. Durch diese Studie wird vorläufig bestätigt, dass sich die einfach ungesättigte Fettsäure Ölsäure positiver auf die Knochendichte auswirkt als die gesättigte Palmitinsäure. Die ausgleichende Wirkung in der Wechseldiät von gesättigter und ungesättigter Fettsäure wird bestätigt, denn nach der Wechseldiät war die Knochendichte nicht anders als unter normaler oder reiner OA-Ernährung. Also kann man sagen, dass die schädlichen Einflüsse von PA durch OA-Aufnahme abgefangen werden können.

In Hinblick auf die Entstehung und Progression von Parodontitis können keine eindeutigen Aussagen gemacht werden, da die Infektion schon eine Woche zurück lag und in der vorliegenden Arbeit nur eine statische Analyse durchgeführt wurde. Es konnte dennoch gezeigt werden, dass die Anzahl der Osteoklasten nach Infektion unter der gesättigten Fettsäure ansteigt, was darauf hindeutet, dass durch PA ein Wirt eher zu einer Parodontitis neigt. Alles in allem hat sich die mediterrane Ernährung als gesünder erwiesen als die westliche

mit gesättigten Fettsäuren. Dadurch wäre es als Präventionsmaßnahme oder als Therapieansatz denkbar, den Patienten, wenn sie schon nicht gänzlich auf Fette im Essen verzichten wollen, zu raten, dass sie anstatt auf gesättigte eher auf ungesättigte Fettsäuren im Essen zurückgreifen sollten. Auch nach vorheriger westlicher Ernährung ist ein Wechsel auf ungesättigte Fettsäuren sinnvoll, da die Veränderungen von gesättigten durch ungesättigte Fettsäuren ausgeglichen werden können. Damit wurde bewiesen, dass die Fettsäuren in der Ernährung auch unter Normalgewicht einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel aufweisen, nicht nur unter Adipositas. Es wurde erfasst, dass ungesättigte Fettsäuren auch unter Normalgewicht eine gesundheitsfördernde Bedeutung für den Knochenstoffwechsel haben, die gesättigten Fettsäuren wirken dagegen gesundheitsmindernd.

Die Ergebnisse der Studie bekräftigen die Annahme, dass durch Ernährungsumstellung von gesättigter auf ungesättigter Fettsäure der Knochenstoffwechsel positiv beeinflusst werden kann. Diese Erkenntnisse können als Grundlage für die Erforschung von präventiven und therapeutischen Maßnahmen bei Parodontitis dienen.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Adamopoulos IE. 2018. Inflammation in bone physiology and pathology. *Curr Opin Rheumatol*, 30(1):59–64.
- Alsahli A, Kiefhaber K, Gold T, Muluke M, Jiang H, Cremers S, Schulze-Spate U. 2016. Palmitic Acid Reduces Circulating Bone Formation Markers in Obese Animals and Impairs Osteoblast Activity via C16-Ceramide Accumulation. *Calcif Tissue Int*, 98(5):511–519.
- Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, Miyata T, Anderson DM, Suda T. 1999. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J Exp Med*, 190(12):1741–1754.
- Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. 2000. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem*, 275(7):4858–4864.
- Bartl R. 2014. *Klinische Osteologie: Entstehung, Diagnostik, Prävention und Therapie aller Knochenerkrankungen*. Georg Thieme Verlag.
- Baylin A, Kabagambe EK, Siles X, Campos H. 2002. Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *Am J Clin Nutr*, 76(4):750–757.
- Becker W, Berg L, Becker BE. 1979. Untreated periodontal disease: a longitudinal study. *J Periodontol*, 50(5):234–244.
- Bergstrom J, Floderus-Myrhed B. 1983. Co-twin control study of the relationship between smoking and some periodontal disease factors. *Community Dent Oral Epidemiol*, 11(2):113–6.
- Bierman EL, Dole VP, Roberts TN. 1957. An abnormality of nonesterified fatty acid metabolism in diabetes mellitus. *Diabetes*, 6(6):475–479.
- Boden G. 2008. Obesity and free fatty acids. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 37(3):635–646, viii–ix.

- Booth SL. 1997. Skeletal functions of vitamin K-dependent proteins: not just for clotting anymore. *Nutr Rev*, 55(7):282–4.
- Boyce BF, Xing L. 2007. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*, 9 Suppl 1:S1.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937):337–342.
- Burstone MS. 1959. Histochemical demonstration of acid phosphatase activity in osteoclasts. *J Histochem Cytochem*, 7(1):39–41.
- Calder PC. 2015. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 39(1 Suppl):18S–32S.
- Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. 2014. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*, 64(1):57–80.
- Chavez JA, Summers SA. 2003. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem Biophys*, 419(2):101–109.
- Cohen J M M. 2006. The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A*, 140(23):2646–2706.
- Cornish J, MacGibbon A, Lin JM, Watson M, Callon KE, Tong PC, Dunford JE, van der Does Y, Williams GA, Grey AB, Naot D, Reid IR. 2008. Modulation of osteoclastogenesis by fatty acids. *Endocrinology*, 149(11):5688–5695.
- DeFronzo RA. 2010. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia*, 53(7):1270–1287.
- Detert J, Pischon N, Burmester GR, Buttgerit F. 2010. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis Res Ther*, 12(5):218.
- Dole VP. 1956. A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *J Clin Invest*, 35(2):150–154.

- Dorn BR, Burks JN, Seifert KN, Progulske-Fox A. 2000. Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 187(2):139–44.
- Drosatos-Tampakaki Z, Drosatos K, Siegelin Y, Gong S, Khan S, Van Dyke T, Goldberg IJ, Schulze PC, Schulze-Spate U. 2014. Palmitic acid and DGAT1 deficiency enhance osteoclastogenesis, while oleic acid-induced triglyceride formation prevents it. *J Bone Miner Res*, 29(5):1183–1195.
- Ebbert JO, Jensen MD. 2013. Fat depots, free fatty acids, and dyslipidemia. *Nutrients*, 5(2):498–508.
- Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, Ohsugi M, Kono N, Ogata F, Yagi N, Ohto U, Kimoto M, Miyake K, Tobe K, Arai H, Kadowaki T, Nagai R. 2012. Saturated fatty acid and TLR signaling link beta cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab*, 15(4):518–33.
- Eriksen EF. 2010. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*, 11(4):219–227.
- Falbe J, Regitz M. 2014. RÖMPP Lexikon Chemie, 10. Auflage, 1996-1999: Band 2: Cm - G. Thieme.
- Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Ricart W. 2003. Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition. *Diabetes Care*, 26(5):1362–8.
- Fischli S, Spinass G, Berneis K, Imthurn B, Kraenzlin M. 2011. *Endokrinologie und Stoffwechsel kompakt*. Thieme.
- Glatt V, Canalis E, Stadmeier L, Bouxsein ML. 2007. Age-related changes in trabecular architecture differ in female and male C57BL/6J mice. *J Bone Miner Res*, 22(8):1197–207.
- Graves DT, Cochran D. 2003. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 74(3):391–401.
- Gressner A, Arndt T. 2013. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Berlin Heidelberg.

- Gunaratnam K, Vidal C, Gimble JM, Duque G. 2014. Mechanisms of palmitate-induced lipotoxicity in human osteoblasts. *Endocrinology*, 155(1):108–116.
- Gupta S, Knight AG, Gupta S, Keller JN, Bruce-Keller AJ. 2012. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *J Neurochem*, 120(6):1060–1071.
- Haffajee AD, Socransky SS. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 5:78–111.
- Han Y, Cowin SC, Schaffler MB, Weinbaum S. 2004. Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(47):16689–94.
- Harada S, Rodan GA. 2003. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 423(6937):349–355.
- Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. 1989. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev*, 69(3):990–1047.
- Hayman AR, Bune AJ, Bradley JR, Rashbass J, Cox TM. 2000. Osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5): its localization to dendritic cells and diverse murine tissues. *J Histochem Cytochem*, 48(2):219–28.
- Henriksen K, Neutzsky-Wulff AV, Bonewald LF, Karsdal MA. 2009. Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone*, 44(6):1026–1033.
- Hove KA, Stallard RE. 1970. Diabetes and the periodontal patient. *J Periodontol*, 41(12):713–8.
- Huang S, Rutkowski JM, Snodgrass RG, Ono-Moore KD, Schneider DA, Newman JW, Adams SH, Hwang DH. 2012. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res*, 53(9):2002–2013.
- Irshad M, van der Reijden WA, Crielaard W, Laine ML. 2012. In vitro invasion and survival of *Porphyromonas gingivalis* in gingival fibroblasts; role of the capsule. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 60(6):469–476.

- Ishikawa M, Yoshida K, Okamura H, Ochiai K, Takamura H, Fujiwara N, Ozaki K. 2013. Oral Porphyromonas gingivalis translocates to the liver and regulates hepatic glycogen synthesis through the Akt/GSK-3beta signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1832(12):2035–2043.
- Iwamoto J, Sato Y, Takeda T, Matsumoto H. 2009. Role of sport and exercise in the maintenance of female bone health. *J Bone Miner Metab*, 27(5):530–7.
- Izaola O, de Luis D, Sajoux I, Domingo JC, Vidal M. 2015. [Inflammation and obesity (lipoinflammation)]. *Nutr Hosp*, 31(6):2352–2358.
- Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. 1998. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res*, 13(5):793–802.
- Jordan AR, Micheelis W. 2016. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V). IDZ-Materialienreihe, Bd. 35. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV.
- Kadowaki T, Nakayama K, Okamoto K, Abe N, Baba A, Shi Y, Ratnayake DB, Yamamoto K. 2000. Porphyromonas gingivalis proteinases as virulence determinants in progression of periodontal diseases. *J Biochem*, 128(2):153–9.
- Khan S, Barrington G, Bettiol S, Barnett T, Crocombe L. 2018. Is overweight/obesity a risk factor for periodontitis in young adults and adolescents?: a systematic review. *Obes Rev*, 19(6):852–883.
- Kien CL, Bunn JY, Stevens R, Bain J, Ikayeva O, Crain K, Koves TR, Muoio DM. 2014. Dietary intake of palmitate and oleate has broad impact on systemic and tissue lipid profiles in humans. *Am J Clin Nutr*, 99(3):436–445.
- Kim N, Kadono Y, Takami M, Lee J, Lee SH, Okada F, Kim JH, Kobayashi T, Odgren PR, Nakano H, Yeh WC, Lee SK, Lorenzo JA, Choi Y. 2005. Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. *J Exp Med*, 202(5):589–595.
- Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ, Suda T. 2000. Tumor necrosis factor alpha stimulates

- osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med*, 191(2):275–286.
- Kraegen EW, Cooney GJ. 2008. Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance. *Curr Opin Lipidol*, 19(3):235–41.
- Kumar V, Abbas A, Aster J. 2014. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition E-Book. Elsevier Health Sciences.
- Laboratory TJ. 2020.
- LaMonte MJ, Hovey KM, Genco RJ, Millen AE, Trevisan M, Wactawski-Wende J. 2013. Five-year changes in periodontal disease measures among postmenopausal females: the Buffalo OsteoPerio study. *J Periodontol*, 84(5):572–584.
- Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. 2007. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*, 130(3):456–469.
- Li Y, Lu Z, Zhang X, Yu H, Kirkwood KL, Lopes-Virella MF, Huang Y. 2015. Metabolic syndrome exacerbates inflammation and bone loss in periodontitis. *J Dent Res*, 94(2):362–370.
- Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese J R V, Ory DS, Schaffer JE. 2003. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(6):3077–3082.
- Lu ZH, Mu YM, Wang BA, Li XL, Lu JM, Li JY, Pan CY, Yanase T, Nawata H. 2003. Saturated free fatty acids, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis by stimulation of ceramide generation in rat testicular Leydig cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 303(4):1002–1007.
- Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, Spinas GA, Donath MY. 2003. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes*, 52(3):726–33.
- Marsh P, Martin M. 2003. *Orale Mikrobiologie: 60 Tabellen*. Thieme.

- Martinez L, Torres S, Baulies A, Alarcon-Vila C, Elena M, Fabrias G, Casas J, Caballeria J, Fernandez-Checa JC, Garcia-Ruiz C. 2015. Myristic acid potentiates palmitic acid-induced lipotoxicity and steatohepatitis associated with lipodystrophy by sustaining de novo ceramide synthesis. *Oncotarget*, 6(39):41479–41496.
- Mercado FB, Marshall RI, Klestov AC, Bartold PM. 2001. Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodontol*, 72(6):779–87.
- Merrill J A H. 2002. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem*, 277(29):25843–6.
- Morales A, Lee H, Goni FM, Kolesnick R, Fernandez-Checa JC. 2007. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis*, 12(5):923–39.
- Muluke M, Gold T, Kiefhaber K, Al-Sahli A, Celenti R, Jiang H, Cremers S, Van Dyke T, Schulze-Spate U. 2016. Diet-Induced Obesity and Its Differential Impact on Periodontal Bone Loss. *J Dent Res*, 95(2):223–229.
- Mummolo S, Severino M, Campanella V, Barlattani J A, Quinzi V, Marchetti E. 2019. Periodontal disease in subjects suffering from coronary heart disease. *J Biol Regul Homeost Agents*, 33(3 Suppl. 1):73–82.
- Munoz-Garach A, Garcia-Fontana B, Munoz-Torres M. 2020. Nutrients and Dietary Patterns Related to Osteoporosis. *Nutrients*, 12(7).
- Nagashima H, Shinoda M, Honda K, Kamio N, Hasuike A, Sugano N, Arai Y, Sato S, Iwata K. 2017. CXCR4 signaling contributes to alveolar bone resorption in *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in mice. *J Oral Sci*, 59(4):571–577.
- Najeeb S, Zafar MS, Khurshid Z, Zohaib S, Almas K. 2016. The Role of Nutrition in Periodontal Health: An Update. *Nutrients*, 8(9).
- Neuschäfer-Rube F. 2013. OSTEOPOROSE - häufigste alterungsbedingte Knochenerkrankung <https://docplayer.org/4265360-Osteoporose-haeufigste-alterungsbedingte-knochenerkrankung-f-neuschaeferrube-11-12-03.html>.

- Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, McKaig R, Beck J. 1996. Periodontal Infection as a Possible Risk Factor for Preterm Low Birth Weight. *J Periodontol*, 67 Suppl 10S:1103–1113.
- Okere IC, Chandler MP, McElfresh TA, Rennison JH, Sharov V, Sabbah HN, Tserng KY, Hoit BD, Ernsberger P, Young ME, Stanley WC. 2006. Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291(1):H38–H44.
- Palomer X, Pizarro-Delgado J, Barroso E, Vazquez-Carrera M. 2018. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol Metab*, 29(3):178–190.
- Parhami F, Tintut Y, Beamer WG, Gharavi N, Goodman W, Demer LL. 2001. Atherogenic high-fat diet reduces bone mineralization in mice. *J Bone Miner Res*, 16(1):182–188.
- Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, Taylor R. 2012. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*, 55(1):21–31.
- Raggatt LJ, Partridge NC. 2010. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*, 285(33):25103–8.
- Riddle RC, Clemens TL. 2017. Bone Cell Bioenergetics and Skeletal Energy Homeostasis. *Physiol Rev*, 97(2):667–698.
- Rosen CJ. 2008. Bone remodeling, energy metabolism, and the molecular clock. *Cell Metab*, 7(1):7–10.
- Saito T, Shimazaki Y, Koga T, Tsuzuki M, Ohshima A. 2001. Relationship between upper body obesity and periodontitis. *J Dent Res*, 80(7):1631–6.
- Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. 2010. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*, 375(9733):2267–2277.
- Seymour RA, Steele JG. 1998. Is there a link between periodontal disease and coronary heart disease? *Br Dent J*, 184(1):33–8.

- Sims NA, Gooi JH. 2008. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol*, 19(5):444–51.
- Slots J, Bragd L, Wikstrom M, Dahlen G. 1986. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol*, 13(6):570–7.
- Standards Nlo, Technology. 2000. NIST Chemistry Webbook: NIST Standard Reference Database Number 69. NIST.
- Streicher C, Heyny A, Andrukhova O, Haigl B, Slavic S, Schuler C, Kollmann K, Kantner I, Sexl V, Kleiter M, Hofbauer LC, Kostenuik PJ, Erben RG. 2017. Estrogen Regulates Bone Turnover by Targeting RANKL Expression in Bone Lining Cells. *Sci Rep*, 7(1):6460.
- Teitelbaum SL. 2006. Osteoclasts; culprits in inflammatory osteolysis. *Arthritis Res Ther*, 8(1):201.
- Tennert C, Reinmuth AC, Bremer K, Al-Ahmad A, Karygianni L, Hellwig E, Vach K, Ratka-Kruger P, Wittmer A, Woelber JP. 2020. An oral health optimized diet reduces the load of potential cariogenic and periodontal bacterial species in the supragingival oral plaque: A randomized controlled pilot study. *Microbiologyopen*, 9(8):e1056.
- Tintut Y, Morony S, Demer LL. 2004. Hyperlipidemia promotes osteoclastic potential of bone marrow cells ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(2):e6–e10.
- Tomomatsu N, Aoki K, Alles N, Soysa NS, Hussain A, Nakachi H, Kita S, Shimokawa H, Ohya K, Amagasa T. 2009. LPS-induced inhibition of osteogenesis is TNF-alpha dependent in a murine tooth extraction model. *J Bone Miner Res*, 24(10):1770–1781.
- Torres R, de la Piedra C, Rapado A. 1991. Clinical usefulness of serum tartrate-resistant acid phosphatase in Paget's disease of bone: correlation with other biochemical markers of bone remodelling. *Calcif Tissue Int*, 49(1):14–6.
- Tribble GD, Lamont RJ. 2010. Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. *Periodontology 2000*, 52(1):68–83.

- Ushach I, Zlotnik A. 2016. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol*, 100(3):481–9.
- Vassiliou EK, Gonzalez A, Garcia C, Tadros JH, Chakraborty G, Toney JH. 2009. Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF-alpha both in vitro and in vivo systems. *Lipids Health Dis*, 8:25.
- Vekic J, Zeljkovic A, Stefanovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. 2019. Obesity and dyslipidemia. *Metabolism*, 92:71–81.
- Walia M, Saini N. 2015. Relationship between periodontal diseases and preterm birth: Recent epidemiological and biological data. *Int J Appl Basic Med Res*, 5(1):2–6.
- Walsh NC, Reinwald S, Manning CA, Condon KW, Iwata K, Burr DB, Gravalles EM. 2009. Osteoblast function is compromised at sites of focal bone erosion in inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res*, 24(9):1572–1585.
- Wei J, Ferron M, Clarke CJ, Hannun YA, Jiang H, Blaner WS, Karsenty G. 2014. Bone-specific insulin resistance disrupts whole-body glucose homeostasis via decreased osteocalcin activation. *J Clin Invest*, 124(4):1–13.
- Wei J, Karsenty G. 2015. An overview of the metabolic functions of osteocalcin. *Rev Endocr Metab Disord*, 16(2):93–8.
- Woelber JP, Bremer K, Vach K, Konig D, Hellwig E, Ratka-Kruger P, Al-Ahmad A, Tennert C. 2016. Erratum to: An oral health optimized diet can reduce gingival and periodontal inflammation in humans - a randomized controlled pilot study. *BMC Oral Health*, 16(1):109.
- Wolff J. 1892. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*, von Dr Julius Wolff. A. Hirschwald.
- van Woudenberg GJ, Theofylaktopoulou D, Kuijsten A, Ferreira I, van Greevenbroek MM, van der Kallen CJ, Schalkwijk CG, Stehouwer CD, Ocke MC, Nijpels G, Dekker JM, Blaak EE, Feskens EJ. 2013. Adapted dietary inflammatory index and its association with a summary score for low-grade

- inflammation and markers of glucose metabolism: the Cohort study on Diabetes and Atherosclerosis Maastricht (CODAM) and the Hoorn study. *Am J Clin Nutr*, 98(6):1533–1542.
- Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. 2011. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med*, 17(10):1235–1241.
- Xuan Y, Shi Q, Liu GJ, Luan QX, Cai Y. 2017. Porphyromonas gingivalis Infection Accelerates Atherosclerosis Mediated by Oxidative Stress and Inflammatory Responses in ApoE^{-/-} Mice. *Clin Lab*, 63(10):1627–1637.
- Yang L, Guan G, Lei L, Lv Q, Liu S, Zhan X, Jiang Z, Gu X. 2018. Palmitic acid induces human osteoblast-like Saos-2 cell apoptosis via endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Cell Stress Chaperones*, 23(6):1283–1294.
- Yoshihara A, Deguchi T, Hanada N, Miyazaki H. 2009. Relation of bone turnover markers to periodontal disease and jaw bone morphology in elderly Japanese subjects. *Oral Dis*, 15(2):176–181.
- Zaidi M. 2007. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med*, 13(7):791–801.
- Zhang Y, Hao J, Sun Y, Li B. 2017. Saturated Fatty Acids Induce Ceramide-associated Macrophage Cell Death. *J Vis Exp*, (128).

Anhang

Tabellenverzeichnis

3.1	Geräte und Hersteller	18
3.2	Chemikalien, Lösungen und Puffer	19
3.3	Antikörper und Färbeanzeigen	23
3.4	Gruppeneinteilung der Tiere im Versuch	24
3.5	Schritte der Entwässerung in der Histokinette	26
3.6	Schritte der Entparaffinierung in Färbeküvetten	27

Abbildungsverzeichnis

2.1	Prozentuale Darstellung Häufigkeit von Parodontalerkrankungen bei 35- bis 44-Jährigen in Deutschland von 2005 und 2014	5
2.2	Prozentuale Darstellung Häufigkeit von Parodontalerkrankungen bei 65- bis 74-Jährigen in Deutschland von 2005 und 2014	5
2.3	Vereinfachte schematische Darstellung. Knochenhomöostase bei vorliegendem Gleichgewicht von Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität (a), überwiegende Osteoblastenanzahl oder -aktivität verstärkten Knochenaufbau (b), überwiegende Osteoklastenanzahl oder -aktivität verursacht verstärkten Knochenabbau (c). Modifiziert nach (Neuschäfer-Rube 2013)	9
2.4	Abhängigkeit der Osteoklastendifferenzierung von OPG, M-CSF und RANKL, modifiziert nach (Kumar et al. 2014)	10
2.5	Entstehung von Osteoblasten und Osteoklasten, modifiziert nach (Riddle und Clemens 2017)	11
2.6	Zyklus des Remodelings, modifiziert nach (Fischli et al. 2011)	13
3.1	TRAP-Färbung, Gelenkkopf des Femurs mit Kästchen in der Mitte der Epiphysenfuge, das den Bereich kennzeichnet, der ausgezählt wurde.	28
3.2	TRAP-Färbung, Vergrößerung des Kästchens, Umkreisung der Epiphysenfuge, innerhalb liegen die TRAP-gefärbten OK, die ausgezählt wurden.	29
3.3	Osteocalcin-Färbung, Übersichtsaufnahme des Femurs (a), Ausschnitt der Kortikalis ohne (b) und mit grün umrandeter ROI (Region of Interest) (c)	30
3.4	Ausschnitt des Femurs mit grün umrandeter Region of Interest (ROI) als Gesamtfläche	31
3.5	Ausschnitt des Femurs mit grün umrandeter „Region of Interest“(ROI) als Gesamtfläche	32
4.1	Endgewicht der Versuchstiere nach 16 Wochen. Mit einem Endgewicht von $29,2 \pm 2,2$ g (normal), $32,1 \pm 2,7$ g (PA); $30,5 \pm 2,2$ g und $31,3 \pm 2,4$ g (PA+OA) befanden sich alle Versuchsgruppen im Normbereich.	33

- 4.2 TRAP-gefärbte Schnitte des jeweils linken Femurs mit schwarz eingefärbten Knochentrabekeln in der ROI (grün umrandet). Unter normaler Ernährung (A) gibt es eine größere Trabekelfläche als unter palmitinsäurereicher Ernährung (B). Ölsäurehaltige Ernährung (C) bringt eine höhere Trabekeloberfläche als PA hervor mit vermehrt zusammenhängenden Trabekeln. Unter der PA-OA-Wechseldiät (D) gibt es eine signifikant größere Trabekeloberfläche verglichen mit PA. E zeigt die grafische Darstellung des Trabekelvolumens pro Knochenvolumen (BV/TV) unter normaler, palmitinsäurereicher (PA), ölsäurereicher (OA) sowie abwechselnd palmitinsäurereicher und ölsäurereicher (PA-OA) Ernährung. Man sieht ein signifikant geringeres Trabekelvolumen von der PA-Gruppe verglichen mit allen anderen. 35
- 4.3 Histologischer Schnitt der Epiphysenfuge des Femurs, TRAP-gefärbte Osteoklasten unter normaler (A), palmitinsäurerhaltiger (B), ölsäurehaltiger (C) und abwechselnd palmitin- und ölsäurehaltiger Ernährung (D). Grafische Darstellung der Ergebnisse der Auszählung von Osteoklasten pro Fläche (E). Es bestehen keine signifikanten Unterschiede. 38
- 4.4 Auswertung der Auszählung der OK in der Diaphyse. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Konditionen festgestellt. 39
- 4.5 Grafische Darstellung der Auswertung der Auszählung von Osteoklasten pro Knochenfläche in der TRAP-Färbung ohne und mit parodontaler Infektion unter PA. Es gibt einen hoch signifikanten Anstieg der Osteoklasten nach *P.g.*-Infektion ($p = 0,019$). 40
- 4.6 Histologischer Schnitt der Epiphysenfuge des Femurs, TRAP-Färbung. Unter palmitinsäurehaltiger Ernährung ohne *P.g.*-Infektion (A) zeigen sich weniger Osteoklasten als mit *P.g.*-Infektion (B). 40

- 4.7 Histologischer Schnitt der Epiphysenfuge des Femurs, TRAP-Färbung. Im Vergleich zur normalen Ernährung ohne Infektion (A) und mit Infektion (B) ist kein Unterschied in der OK-Anzahl erkennbar. Grafische Darstellung der Osteoklastenzählung (C) ($p = 0,845$). 41
- 4.8 TRAP-gefärbter Ausschnitt der Epiphysenfuge des Femurs. Unter OA ohne Infektion (A) und mit Infektion (B) sind keine deutlichen Unterschiede zu erkennen. Die grafische Darstellung der Osteoklastenzählung (C) zeigt, dass es keine signifikanten Abweichungen in der OK-Anzahl gibt ($p = 0,065$). 41
- 4.9 TRAP-Färbung, Ausschnitt der Wachstumszone des Femurs unter PA-OA-Wechseldiät ohne Infektion (A) und mit Infektion (B), grafische Darstellung der Osteoklastenzählung (C). Es ist kein signifikanter Unterschied der OK-Anzahl zwischen Infektions- und Placebogruppe zu sehen ($p = 0,554$). 41
- 4.10 Auswertung der Auszählung der OK in der Diaphyse. Auch unter *P.g.*-Infektion trat kein signifikanter Unterschied in den Ernährungsgruppen auf. 42
- 4.11 OC-Färbung an Epiphysenfuge unter normaler Ernährung (A), PA (B), OA (C) und der PA-OA-Wechseldiät (D). Es sind keine einzelnen Zellen erkennbar und somit ist die OC-Färbung an der Epiphysenfuge nicht auswertbar. 43
- 4.12 Osteocalcin-Färbung, Ausschnitt der Kortikalis des Femurs, OCN+ als gelbes Signal im Osteocalcin-Kanal unter normaler (A), palmitinsäurehaltiger (B), ölsäurehaltiger (C) und abwechselnd palmitinsäurehaltiger und ölsäurehaltiger Diät (D). Grafische Darstellung der Auswertung (E). Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der OCN+ in der Kortikalis. 45
- 4.13 OCN+ pro Fläche ohne und mit Infektion unter normaler Ernährung (a), palmitinsäurereicher Ernährung (b), ölsäurereicher Ernährung (c) und wechselnder Ernährung (8 Wochen palmitinsäurereiche und anschließend 8 Wochen ölsäurereiche Ernährung) (d). In jeder Gruppe ist ein Trend zu einer verminderten Anzahl der OCN+ nach Infektion feststellbar. 46

-
- 4.14 Osteocalcin-Färbung, Ausschnitt der Kortikalis des Femurs, OCN+ als gelbes Signal im Osteocalcin-Kanal. In der PA-OA-Gruppe (A) sieht man deutlich mehr OCN+ als in der PA-OA-Gruppe mit Infektion (B). 47
- 4.15 TRAP-gefärbte Schnitte des Femurs mit schwarz eingefärbten Knochentrabekeln in der ROI (grün umrandet), unter 8 Wochen palmitinsäurereicher Ernährung (A) sind die Trabekel größer und die Knochendichte ist höher als unter 16 Wochen palmitinsäurereicher Ernährung (B). Grafische Darstellung der Ergebnisse (C). Es ist eine signifikante Verringerung der Knochendichte nach 16 Wochen PA zu erkennen ($p = 0,021$). . . 48
- 4.16 Histologischer Schnitt der Epiphysenfuge des Femurs, TRAP-Färbung, Osteoklasten pro Knochenfläche unter 8 Wochen (A) bzw. 16 Wochen (B) palmitinsäurehaltiger Ernährung. Grafische Darstellung der Auswertung der TRAP-Färbung (C). Man sieht deutlich weniger Osteoklasten bei längerer Gabe von PA ($p = 0,01$). 49
- 4.17 Osteocalcin-Färbung, Ausschnitt der Kortikalis des Femurs, OCN+ als gelbes Signal im Osteocalcin-Kanal unter palmitinsäurehaltiger Ernährung nach 8 (A) bzw. 16 Wochen (B). Grafische Darstellung der Ergebnisse (C). Durch die Einwirkzeit sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar ($p = 0,71$). 49

Danksagung

Mein Dank geht an PD Dr. med. dent. habil. Ulrike Schulze-Späte dafür, dass ich Teil des Forschungsteams der Alterszahnmedizin sein durfte und für die enorme Unterstützung während der gesamten Zeit.

Vielen Dank an das Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung für das Interesse an meinem Forschungsthema und die damit verbundene Förderung.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Annika Döding für die hervorragende Betreuung insbesondere im Labor. Mit großem Engagement und stets offenem Ohr stand sie mir mit Rat und Tat zur Seite, was ich sehr zu schätzen weiß.

Weiterhin vielen Dank an Ann-Kathrin Bär für die Auswertung der OC-Bilder vom Schaft und an das gesamte Forschungsteam der Alterszahnmedizin, ohne das der Tierversuch nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank geht an Konstantin für seine großartige Unterstützung und lebenswerte Art mich zu motivieren und zu bestärken.

Zu guter Letzt möchte ich meiner wunderbaren Familie danken, die mich von Anfang bis Ende auf diesem Weg begleitet hat und auf deren Rückhalt ich immer zählen kann.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. dent. habil. Ulrike Schulze-Späte, Dr. rer. nat. Annika Döding,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Köln, 01.05.2022

Svenja Zimmermann