

Aus der Arbeitsgruppe Endokrinologie
(Prof. Dr. med. W. Wuttke)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Der Effekt von 20-Hydroxyecdysen
auf die Tibia orchidektomierter und ovariectomierter Ratten,
gemessen mittels peripherer quantitativer Computertomographie**

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

vorgelegt von
Katharina Jäckel
aus
Hameln

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Wuttke

II. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. P. Thelen

Tag der mündlichen Prüfung: 07.Juni 2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	7
1.1 Osteoporose	8
1.1.1 Definition	8
1.1.2 Formen der Osteoporose	9
1.1.3 Osteoporose des Mannes	10
1.2 Die gonadektomierte Ratte als Osteoporosemodell.....	11
1.2.1 Die ovx Ratte als Tiermodell der postmenopausalen Osteoporose.....	11
1.2.2 Die orx Ratte als Tiermodell der männlichen Osteoporose	12
1.3 Ecdysteroide, Ecd	12
1.3.1 Definition und Struktur der Ecdysteroide	12
1.3.2 Synopsis ausgewählter Ecd-Wirkungen.....	13
1.3.3 Wirkmechanismus der Ecdysteroide	15
1.4 Anatomische und physiologische Aspekte des Knochens.....	16
1.5 Ziel der Studie	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Die Versuchstiere	20
2.2 Die Gonadektomie	21
2.2.1 Die Orx	21
2.2.2 Die Ovx	21
2.3 Das Tierfutter.....	22
2.4 Das Identifikationssystem.....	23
2.5 Die periphere quantitative Computertomographie	24
2.5.1 Theorie der Messungen	24
2.5.2 Messvorgang	26
2.6 Die Serumanalysen	27
2.7 Die statistischen Methoden.....	27
2.8 Der Versuchsablauf	27
3 Ergebnisse	29
3.1 Körpergewicht	29
3.1.1 Entwicklung des Körpergewichtes.....	29

Inhaltsverzeichnis

3.1.2	Delta-Körpergewicht	31
3.2	Futteraufnahme	32
3.3	Knochenparameter	34
3.3.1	Dichte der Spongiosa	34
3.3.2	Dichte der Kortikalis	37
3.3.3	Fläche der Spongiosa	40
3.3.4	Fläche der Kortikalis	42
3.3.5	Periostaler Umfang	45
3.3.6	Endostaler Umfang	47
3.3.7	Polares Widerstandsmoment	50
3.3.8	Anteil der Trabekel an der Spongiosaquerschnittsfläche	52
3.4	Serumparameter	54
3.4.1	Osteokalzin	54
3.4.2	RatLaps	55
3.4.3	RANK-L	56
3.4.4	Osteoprotegerin	57
4	Diskussion	59
5	Zusammenfassung	75
6	Literaturverzeichnis	78
7	Abbildungsverzeichnis	85
8	Tabellenverzeichnis	87
	Danksagung	87

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AR	Androgen-Rezeptor
BMD	Bone Mineral Density
BRU	Bone Remodeling Unit
cm	Zentimeter
DEXA	Dual-Energy-X-Ray-Absorptiometrie
DHT	5 α -Dihydrotestosteron
DVO	Dachverband Osteologie e.V.
E ₂	17 β -Estradiol
Ecd	20-Hydroxyecdysol
EcR	Ecdysol-Rezeptor
ER α	Östrogenrezeptor α
ER β	Östrogenrezeptor β
Fa.	Firma
g	Gramm
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
L2	Lendenwirbel 2
LWS	Lendenwirbelsäule
M-CSF	Makrophagen Koloniestimulierender Faktor
min	Minute
mm	Millimeter
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
OPG	Osteoprotegerin
Orx	Orchidektomie
Orx	orchidektomiert
Ovx	Ovarektomie
Ovx	ovarektomiert
PBM	Peak Bone Mass
PC	Personal Computer

Abkürzungsverzeichnis

pQCT	periphere quantitative Computertomographie
PTH	Parathormon
RANK	receptor activator of nuclear factor κ B
RANK-L	RANK-Ligand
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SA	Spongiosaanteil
S.D.-Ratten	Sprague-Dawley-Ratten
Trap	Tartrate-resistant acid phosphatase
USP	Ultraspiracle Protein
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

20-Hydroxyecdysol (= Ecd) ist eine steroidale Substanz pflanzlichen Ursprungs, die als das am besten erforschte Mitglied der Ecdysteroid-Familie gilt. In der Literatur sind bereits zahlreiche positive Effekte dieses Steroids auf den Säugetierorganismus beschrieben. Darunter existieren einige Studien, die sich mit der Wirkung von Ecd auf den Knochen beschäftigen und ihm ein osteogenes Potenzial attestieren (Gao X et al. 2000, Gao L et al. 2008, Kapur et al. 2010, Seidlová-Wuttke et al. 2010 a, b). Mehrheitlich handelt es sich dabei um in-vitro-Studien, sodass sich die Erforschung der in-vivo-Effekte bezüglich des Knochens auf wenige Arbeiten beschränkt. So konnte die Arbeitsgruppe Endokrinologie der Universität Göttingen an weiblichen ovariectomierten (ovx) Ratten demonstrieren, dass die orale Applikation von Ecd den Anteil der Trabekel an der Spongiosafläche der Tibia signifikant steigert und darüber hinaus protektive Effekte auf den Ovariectomie (Ovx)-induzierten Verlust der Spongiosadichte ausübt (Kapur et al. 2010, Seidlová-Wuttke et al. 2010 b). Eine weitere in-vivo-Studie von L. Gao et al. aus dem Jahre 2008 an männlichen Mäusen ergab, dass Ecd die Entwicklung einer Osteoporose verlangsamt.

Die eben genannten Ergebnisse ermutigen uns dazu, den Einfluss von Ecd auf den Knochen in vivo näher zu untersuchen. Denn mit ihm scheint eine Substanz gefunden, die zukünftig in der Prophylaxe und Behandlung der Osteoporose des Menschen Anwendung finden kann.

Nachdem die Arbeitsgruppe Endokrinologie bereits eine in-vivo-Studie mit Ecd an weiblichen ovx Ratten durchgeführt hat (Kapur et al. 2010, Seidlová-Wuttke et al. 2010 b), beschäftigt sich die vorliegende Arbeit vorrangig mit der Frage, ob Ecd vergleichbare Effekte auf den Knochen der männlichen orchidektomierten (orx) Ratte erzielt. Diese Frage ist aus zwei Gründen von besonderer Relevanz: Zum einen stehen für die Prävention und Therapie der männlichen Osteoporose bislang nur sehr wenige Medikamente zur Verfügung. Zum anderen hat die steigende Lebenserwartung dazu geführt, dass immer mehr Männer von Osteoporose betroffen sind; ein weiterer Anstieg der Prävalenz wird für die Zukunft vorhergesagt (Häussler et al. 2007, Scheidt-Nave 2001).

Deshalb erforscht die vorliegende Studie Ecd mit dem Ziel, eine wirksame Substanz in der Prävention der männlichen Osteoporose zu finden.

Als Tiermodell wird die gonadektomierte Ratte verwendet. Die weibliche ovx Ratte gilt als international anerkanntes Modell für die postmenopausale Osteoporose (Frost und Jee 1992, Thompson et al. 1995, Jee und Yao 2001). Mit der Erforschung der männlichen Osteoporose hat sich seit einigen Jahren auch die orx Ratte als Modell für die Osteoporose des Mannes etabliert, da sich die Wirkungen des Androgendefizits auf den Knochen hier besonders gut nachvollziehen lassen (Vanderschueren et al. 1992, Gunness und Orwoll 1995, Erben et al. 2000). Darüber hinaus verfügt die Arbeitsgruppe Endokrinologie über einen reichen Erfahrungsschatz mit diesen Tieren (Seidlová-Wuttke et al. 2003, 2008 a, b, Stürmer et al. 2009).

Der Effekt von Ecd auf den Knochen wird mithilfe der peripheren quantitativen Computertomographie (pQCT) ermittelt, die eine Quantifizierung der Effekte longitudinal und in vivo erlaubt (Helterbrand et al. 1997). Zusätzlich werden ausgewählte Serumparameter des Knochenstoffwechsels auf den Einfluss von Ecd untersucht.

Neben den männlichen Tieren enthält diese Studie auch einen Versuchsarm mit weiblichen Ratten. Dieser ist als die Fortsetzung des eingangs erwähnten Futtersversuches der Arbeitsgruppe Endokrinologie mit weiblichen ovx Ratten anzusehen. Damals wurde die orale Applikation von Ecd in den Dosierungen von 1, 3 und 6 g/kg Futter untersucht (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b). Es soll nun geprüft werden, ob Ecd auch in den niedrigeren Dosierungen von 0,2 und 0,5 g/kg Futter eine nachweisbare Wirkung auf den Knochen erzielen kann.

1.1 Osteoporose

1.1.1 Definition

Osteoporose wird derzeit definiert als „eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine Störung der Mikroarchitektur des Knochengewebes mit der Folge erhöhter Knochenbrüchigkeit und erhöhtem Frakturrisiko charakterisiert ist“ (Consensus Development Conference Panel 1993). Da es einen klaren Zusammenhang von Knochendichte (Bone Mineral Density, BMD) und Frakturrisiko gibt, legte die WHO eine messtechnische Definition fest, die auf der Knochendichtemessung basiert (WHO 1994, Sipos et al. 2009). Demnach liegt eine Osteoporose vor, wenn die Knochenmineraldichte um 2,5 Standardabweichungen unter dem Mittelwert gesunder prämenopausaler Frauen liegt (Kanis 1994). Derzeit gilt diese Definition auch für Männer (Kanis 2002), wenngleich darüber debattiert wird, ob der Gebrauch von männlichen Referenzgruppen für den T-Score zu einer besseren Einschätzung des Frakturrisikos führen würde (Kamel 2005). Auf die Knochendichte als zentralen Knochenparameter in der Osteoporose-Diagnostik soll auch in der vorliegenden Arbeit Hauptaugenmerk gelegt werden.

1.1.2 Formen der Osteoporose

Es gibt eine Vielzahl an Möglichkeiten, die verschiedenen Formen der Osteoporose zu klassifizieren. Für die vorliegende Studie ist die Differenzierung der primären Osteoporose, wie in der nachfolgenden Tabelle dargestellt, in eine postmenopausale, eine senile und eine männliche Form relevant.

Tabelle 1: Einteilung der primären Osteoporosen (zusammengestellt aus Riggs et al. 1998, Khosla et al. 2008, Bartl 2008, DVO-Leitlinie 2009)

Form der Osteoporose	Postmenopausal	Senil	Männlich
Ätiologie	Funktionsverlust des Ovars mit daraus resultierendem Östrogen-Defizit	Altersassoziierte Veränderungen wie: <ul style="list-style-type: none"> • sek.Hyperparathyreoidismus • gestörter Vit.D-Metabolismus • Funktionseinschränkungen der Osteoblasten • Nutritives Defizit an Vit. D₃ und Kalzium 	Hypogonadismus
Alter	50.-65. Lebensjahr	> 75. Lebensjahr	Meist >70. Lebensjahr
Knochenverlust	20-30% Spongiosa 5-10% Kortikalis ➤ „high turnover“	20-30% Spongiosa 20-30% Kortikalis ➤ „low turnover“	Spongiosa: ca. 1% pro Jahr nach Erreichen der maximalen Knochenmasse, Kortikalis: kein Verlust bis 65.-70. Lebensjahr
Medikamentöse Therapie neben der Basistherapie mit Vitamin D und Kalzium	<ul style="list-style-type: none"> • Bisphosphonate (Alendronat, Ibandronat, Risedronat, Zoledronat) • Selektive Östrogenrezeptormodulatoren (Raloxifen) • Strontiumranelat • Hormone (Parathormon, Östrogene) • RANK-L-Antikörper (Denosumab) 		<ul style="list-style-type: none"> • Bisphosphonate (Alendronat, Zoledronat, Risedronat) • Hormone (Parathormon)

1.1.3 Osteoporose des Mannes

Die primäre Osteoporose des Mannes, wie sie in der vorliegenden Studie simuliert werden soll, ist vor allem auf einen Hypogonadismus zurückzuführen. Bei Männern sinken mit dem Alter die Serumspiegel an frei verfügbarem Testosteron und Östradiol (E_2). Dies ist auf verschiedene Alters-assoziierte Alterationen in den Gonaden, Lebensstil-Faktoren und auf Änderungen in den Serumspiegeln des Sexualhormon-bindenden Globulins zurückzuführen (Orwoll et al. 2006). Neben sexueller Dysfunktion, einer reduzierten Libido und einer Abnahme der Muskelmasse hat ein erniedrigter Testosteronspiegel auch eine Abnahme der Knochendichte zur Folge (Nieschlag et al. 2004).

Makroskopisch betrifft der Knochenverlust des alternden Mannes anfänglich vorwiegend die Spongiosa mit ihrer größeren Oberfläche. Histologisch lässt sich eine Verschmälerung der Trabekel beobachten (Seeman 2001). Dabei bleibt, anders als bei der Frau, die Konnektivität der Knochenbälkchen weitestgehend erhalten. Ob es darüber hinaus zu einer Reduktion der Trabekelanzahl kommt, ist momentan unklar. Die diesbezüglich existierenden Studienergebnisse sind widersprüchlich (Aaron et al. 1987, Rehman et. al 1994). Während die Dichteminderung der Spongiosa bereits im mittleren Alter beginnt, bleibt die Dichte der Kortikalis bis zu einem Alter von 65-70 Jahren bei Männern relativ konstant. Aufgrund der lebenslang anhaltenden periostalen Knochenapposition bleibt auch die Dicke der Kortikalis so lange konstant, bis die endostale Knochenresorption die periostale Appositionsrate übersteigt. Die daraus resultierende Auslenkung der Kortikalis nach außen gewährleistet eine bessere Stabilität des Knochens gegenüber Biege-Beanspruchungen. Auf diese Weise kann die durch die Verschmälerung der Kortikalisfläche bedingte Stärkeminderung des Knochens zumindest partiell ausgeglichen werden (Khosla et al. 2008).

Bei der postmenopausalen Osteoporose hat sich die Substitution von Östrogenen als wirksam gegen den Knochenverlust erwiesen (Cauley et al. 1995). Die Hormontherapie des Mannes mit Testosteron dagegen ist noch nicht ausreichend durch Studien evaluiert. Zwar konnte gezeigt werden, dass bei hypogonadalen Männern durch die Langzeitsubstitution mit Testosteron eine Anhebung der Knochendichte auf das altersentsprechende Referenzniveau erreicht werden kann (Behre et al. 1997); dennoch sind die möglichen Nebenwirkungen von Testosteron auf die Prostata oder das kardiovaskuläre System noch unzureichend erforscht (Francis 2001, Diemer et al. 2005). Weitere Studien sind nötig, um die Effizienz und Risiken dieser hormonellen Therapie besser einschätzen zu können. Insgesamt ist die medikamentöse Osteoporose-Therapie des Mannes, verglichen mit den zahlreichen bei Frauen zugelassenen Präparaten, als unzureichend zu bezeichnen.

1.2 Die gonadektomierte Ratte als Osteoporosemodell

1.2.1 Die ovx Ratte als Tiermodell der postmenopausalen

Osteoporose

1991 definierte Kalu die Anforderungen an ein Tier, das als Modell für die postmenopausale Osteoporose gelten kann. Demnach müsse es sich um ein lebendes Tier handeln, dessen spontaner oder induzierter Knochenverlust aufgrund eines ovariellen Hormondefizites studiert werden könne und bei dem die Charakteristiken des Knochenverlustes und seine Folgekrankheiten denen der postmenopausalen Frau in einer oder mehrerer Hinsicht ähnelten. Nach dieser Definition stellt die ovx Ratte ein geeignetes Modell dar, denn der Ovx-induzierte Knochenverlust der Ratte ähnelt dem der postmenopausalen Frau in vielen Punkten: Bei beiden führt der Ausfall der ovariellen Funktion zu einem erhöhten Knochenumsatz mit Überwiegen der Knochenresorption über die –formation (Wronski et al. 1988). Dabei lässt sich der für die postmenopausale Osteoporose charakteristische biphasische Knochenverlust, der zu Beginn vorwiegend die Spongiosa betrifft, auch bei der ovx Ratte beobachten (Wronski et al. 1989, Jee und Yao 2001). Das spongiöse Remodeling der Ratte ähnelt hier dem des Menschen (Mosekilde 1995). Fläche und Dichte der Kortikalis bleiben bei der postmenopausalen Frau und der ovx Ratte zunächst relativ konstant, da die periostale Knochenapposition die endostale Resorption ausgleichen kann, sodass lediglich eine Aufweitung der Knochenmarkhöhle resultiert (Parfitt 1984, Kimmel und Wronski 1990, Turner RT et al. 1990). Neben dem sich ähnelnden Knochenverlust zeigen die postmenopausale Frau und die ovx Ratte ein vergleichbares Verhalten auf bestimmte Therapien wie E₂, Tamoxifen, Bisphosphonate, Calcitonin und physische Aktivität (Kalu 1991), weshalb die „Food and Drug Administration“ empfiehlt, die Effizienz und Sicherheit von Substanzen, die für die Prävention oder Behandlung der postmenopausalen Osteoporose eingesetzt werden sollen, unter anderem an der ovx Ratte zu untersuchen (Thompson et al. 1995).

Verglichen mit anderen Tieren bietet die ovx Ratte den Vorteil, dass sie bereits extensiv bezüglich ihrer Histomorphometrie, biochemischen Marker und Methodik der Knochendensitometrie erforscht worden ist (Turner AS 2001). So nutzt die Abteilung für Klinische und Experimentelle Endokrinologie der Universität Göttingen die ovx Ratte bereits seit 1999 als Modell für die postmenopausale Osteoporose (Seidlová-Wuttke et al. 2003, 2008 a, 2008 b). Diese langjährige Erfahrung ermöglicht einen sinnvollen Umgang mit den Eigenheiten des Rattenskeletts, wie etwa den lebenslang geöffneten Epiphysen (Dawson 1925). So konnte gezeigt werden, dass die Ratte im Alter von drei Monaten optimale Bedingungen bietet, um Ovx-induzierte Veränderungen an ihr nachzuvollziehen. Denn zu diesem Zeitpunkt ist die Ratte bereits sexuell reif und hat ihre maximale Knochenmasse sowie den Peak an Knochendichte in der Spongiosa schon erreicht (Seidlová-Wuttke et al. 2008a).

Ein weiterer Vorteil der maturen Ratte ist, dass ihr Knochen sehr schnell auf die Ovx reagiert. Es lassen sich in der Spongiosa im Bereich der tibialen Metaphyse bereits nach 14 Tagen signifikante Knochendichteverluste nachweisen (Wronski et al. 1988, Jee et Yao 2001). Die Ratte ist hier größeren

Tieren wie Hunden oder Primaten überlegen, die nach der Ovx bis zu zwei Jahre brauchen, um einen dauerhaften Effekt auf den Knochen zu erzielen.

1.2.2 Die orx Ratte als Tiermodell der männlichen Osteoporose

Ein wesentlicher Risikofaktor für die Entwicklung einer Osteoporose des alternden Mannes ist ein Hypogonadismus. Das resultierende Androgendefizit und seine Auswirkungen auf den Knochen wurden bereits in zahlreichen Studien am Modell der orx Ratte evaluiert (Vanderschueren et al. 1992, Gunness et Orwoll 1995, Erben et al. 2000, Vandenput et al. 2002). Dabei zeigte sich ein in vielen Punkten analoges Verhalten von Mensch und Ratte. So wiesen beide einen erhöhten Knochenumbau mit einem Verlust an spongiöser Knochenmasse und –dicke auf, der sich histologisch in einer Reduktion der Trabekelanzahl und –dicke widerspiegelt (Ke et al. 2001, Khosla et al. 2008). Diese Orx-induzierten Veränderungen lassen sich, wie auch bei der weiblichen ovx Ratte, bereits zwei Wochen nach der Gonadektomie nachweisen (Erben et al. 2000). Die Kortikalis bleibt anfangs noch unberührt vom erhöhten Remodeling (Ke et al. 2001, Khosla et al. 2008). Dies lässt sich, wie bei der postmenopausalen Frau und ihrem Modell der ovx Ratte, auf die lebenslange periostale Knochenapposition zurückführen, die den Verlust an kortikaler Knochenmasse auszugleichen vermag (Ke et al. 2001, Khosla et al. 2008). Bedacht werden muss jedoch auch, dass die Ratte verglichen mit dem Menschen ein reduziertes Remodeling der Kortikalis aufweist (Jee et al. 1990). Nichtsdestotrotz gilt die orx Ratte bei der männlichen Osteoporose als Modell der Wahl (Blouin et al. 2008), da sich der Knochenverlust des hypogonadalen Mannes am besten mit dem der orx Ratte deckt (Vanderschueren et al. 1993).

1.3 Ecdysteroide, Ecd

1.3.1 Definition und Struktur der Ecdysteroide

1954 isolierten Butenandt und Karlson erstmals ein Ecdysteroid, doch seine Struktur wurde erst 1965 von Huber und Hoppe mit Hilfe der Röntgenkristallographie eindeutig als α -Ecdyson identifiziert. Seitdem wurden über 441 Ecdysteroide (Stand: 9.5.2010, Übersicht: <http://ecdybase.org/>) isoliert. Ecdysteroide lassen sich unterteilen in Zoo- und Phytoecdysteroide. Zooecdysteroide sind die Steroidhormone der Arthropoden. Hier regulieren sie die Häutung (griechisch Ekdysis: >das Herauskriechen<), Metamorphose, Reproduktion und Diapause (Dinan 2001). Ecdysteroide kommen als sog. Phytoecdysteroide auch in 5-6% aller Pflanzenspezies vor, und das in weitaus höheren Konzentrationen als in Arthropoden. In Pflanzen dienen sie vermutlich der Abschreckung von Fressfeinden und Fadenwürmern (Báthori et al. 2008).

Das Grundgerüst der Phytoecdysteroide leitet sich vom Cholesterol ab und umfasst 27 bis 29 C-Atome. Nach der Definition von Lafont und Horn von 1989 kennzeichnet die „wahren“ Ecdysteroide das Vorhandensein eines Steroidkerns, dessen A/B-Ring cis-fusioniert vorliegt, einer 7-en-6-on

Einleitung

Chromophor sowie die charakteristische 14α -Hydroxygruppe. Die Anzahl, Lokalisation und Position der Hydroxyl-Substituenten erklärt die große strukturelle Vielfalt der Phytoecdysteroide (Báthori et al. 2008).

Den Archetyp unter den Ecdysteroiden stellt das 20-Hydroxyecdysen dar. Es ist in Pflanzen und Arthropoden am häufigsten und in den höchsten Konzentrationen von allen Ecdysteroiden vertreten.

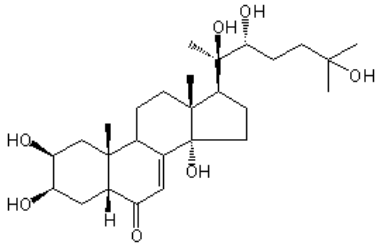


Abb. 1 Struktur des 20-Hydroxyecdysen (β -Ecdyson, Ecd)

1.3.2 Synopsis ausgewählter Ecd-Wirkungen

1966 führte die Entdeckung, dass Ecdysteroide auch in großen Mengen in vielen Pflanzen verfügbar sind und dort als Fraßschutz dienen, zu der Hoffnung, spezifischere und sicherere Insektizide zu entwickeln (Báthori und Pongrácz 2005). Zu diesem Zweck wurden auch pharmakologische Studien an Säugetieren durchgeführt. Sie ergaben, dass Ecdysteroide zahlreiche positive Effekte auf den menschlichen Organismus ausüben, ohne dabei mit gravierenden Nebenwirkungen einherzugehen; weshalb Sláma dieser Steroidgruppe bereits 1993 höchstes Potential als pflanzliches Therapeutikum der „grünen Medizin“ der Zukunft bescheinigt (zitiert aus Sláma und Lafont 1995).

Einleitung

Tabelle 2: Ausgewählte Effekte von Ecd auf den Säugetierorganismus

Effektor-Struktur	Effekt	Publikation
Knochen	Osteoblasten-Proliferation↑	<i>Gao X et al. 2000</i>
	Osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzelle via ER ↑	
	Knochenverlust bei induzierter Osteoporose↓	<i>Gao L et al. 2008</i>
	Frakturheilungszeit↓	<i>Syrov et al. 1986 zitiert aus Lafont und Dinan 2003</i>
Muskel	Faserdicke↑	<i>Bathori et al. 2008</i>
	Muskelmasse↑	<i>Seidlová-Wuttke et al 2010b</i>
Proteinmetabolismus	Proteinsynthese↑	<i>Otaka et al. 1968</i> <i>Todorov et al. 2000</i>
	Polyribosomen-Aktivität↑ Translationskapazität↑	<i>Syrov et al. 1978 Abstract</i>
Lipidmetabolismus	Cholesterol-Biosynthese↓	<i>Uchiyama und Yoshida 1974</i>
	Körperfett↓ Leptinspiegel↓ Triglyceride↓ HDL↑	<i>Seidlová-Wuttke et al. 2010a</i>
Hormonsystem	Keine androgene/antigonadotrope Wirkung	<i>Ogawa et al. 1974</i> <i>Syrov 2000</i>
	Kein (anti-)östrogener Effekt auf das Vaginalepithel	<i>Prabhu und Nayar 1974</i>
	Keine Bindung an Steroidhormonrezeptoren	<i>Báthori et al. 2008</i> <i>Seidlová-Wuttke et al. 2010 b</i>
Leistungsfähigkeit	↑ auch ohne Training	<i>Chermnykh et al. 1988</i>
Wundheilung	Verkürzt	<i>Detmar 1994, zitiert aus Lafont und Dinan 2003</i>
Toxizität	keine (sub)akute	<i>Ogawa et al. 1974</i>

Im Hinblick auf die Behandlung bzw. Prävention der Osteoporose ist die Substanz Ecd neben ihren bereits dargelegten osteogenen Effekten auch aufgrund ihrer Muskel-anabolen Wirkung interessant. Ecd wirkt somit an beiden Komponenten der muskuloskelettalen Einheit, wobei der durch Sehnen übertragene Muskelzug am Knochen den wichtigsten Parameter für den Aufbau und Erhalt der Knochenmasse darstellt (Roth et al. 2007).

1.3.3 Wirkmechanismus der Ecdysteroide

Trotz zahlreicher wissenschaftlicher Beiträge, die belegen, dass Ecdysteroide eine Reihe positiver pharmakologischer Effekte auf Säugetiere ausüben und in der Lage sind, physiologische Funktionen zu beeinflussen, ist ihr Wirkmechanismus in Vertebraten bis jetzt noch nicht bekannt (Dinan und Lafont 2006).

Der Mechanismus, mit dem die Ecdysteroide ihre Effekte auf Invertebraten ausüben, ist bisher besser verstanden: Hier wirken die Ecdysteroide über einen heterodimeren Rezeptorkomplex, bestehend aus dem Ecdyson-Rezeptor (EcR) und dem Ultraspiracle Protein (USP). Nur der Komplex ist in der Lage, den Liganden mit hoher Affinität zu binden (Yao et al. 1993). Das Ecdysteroid bindet dabei an den EcR. Das USP gilt als sogenannter „Orphan Receptor“ (engl. Orphan = Waisenkind), für ihn wurde bisher noch kein definitiver Ligand gefunden. Möglicherweise binden juvenile Hormone, die ebenfalls den Metabolismus der Arthropoden regulieren, an diese Rezeptor-Komponente und modifizieren so die Transaktivierungs-Kapazität des Gesamtkomplexes (Jones und Jones 2000). EcR und USP sind Mitglieder der Kernrezeptor-Superfamilie und besitzen die dafür typischen Domänen. Die C-Domäne des EcR/USP-Komplexes interagiert mit spezifischen Elementen in der Promotorregion von Ecdysteroid-responsiven Genen, um deren transkriptionale Aktivität zu regulieren. Die Ligandenbindungsdomäne (E-Domäne) ist spezifisch für Ecdysteroide und deren Antagonisten bzw. Agonisten, d.h. Steroide, Thyroidhormone oder Retinoide der Vertebraten sind nicht in der Lage dort zu binden und den Komplex zu aktivieren (Dinan und Hormann 2005, zitiert aus Dinan und Lafont 2006).

Andersherum sind Ecdysteroide nicht befähigt, an die Steroidhormonrezeptoren der Vertebraten zu binden (Báthori et al. 2008). Der EcR und seine Liganden kommen in Vertebraten nicht vor (Palli et al. 2005). Lediglich der in Säugetierzellen vorkommende Retinoid-X-Rezeptor (RXR) stellt das Pendant zum USP der Invertebraten dar und kann ebenfalls mit dem EcR dimerisieren.

1.4 Anatomische und physiologische Aspekte des Knochens

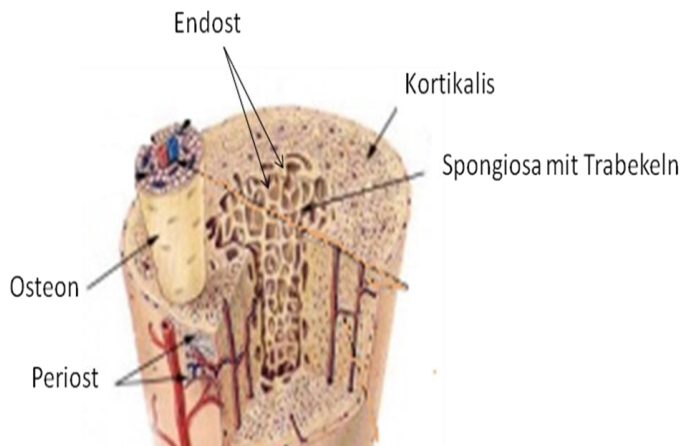


Abb. 2 Knochenschema

(modifiziert aus:
http://de.wikibooks.org/wiki/Histologie:_Binde-_und_St%C3%BCtzgewebe)

Das nebenstehende Schema illustriert die für die vorliegende Studie wesentlichen Knochenstrukturen und kann sowohl für die Tibia der Ratte als auch für die des Menschen gelten.

Für die computertomographische Analyse ist insbesondere die Unterscheidung zwischen der soliden Masse der Substantia corticalis in der Peripherie des Knochens und der Substantia spongiosa als dreidimensionales System an Trabekeln in seinem Inneren von Bedeutung, da die volumetrische Knochendichte (in

mg/cm^3 Kalziumhydroxylapatit) des trabekulären und kortikalen Knochens separat bestimmt werden können.

Die Hohlräume zwischen den Knochenbälkchen der Spongiosa sind mit Knochenmark gefüllt. Auf seiner Oberfläche wird der Knochen vollständig von Bindegewebe umhüllt; das nach innen zum Mark liegende wird Endost, das nach außen zeigende Periost genannt. Letztgenannte Parameter können im Zuge der computertomographischen Messungen dieser Studie rechnerisch ermittelt werden.

Röhrenknochen wie die Tibia bestehen aus zwei mit hyalinem Knorpel überzogenen Knochenenden, den sog. Epiphysen (griechisch Epiphysis: >der Auswuchs<) und einem Schaft, der sog. Diaphyse. Dort ist das spongiöse Netzwerk stark zurückgebildet und das Knochenmark liegt in einer einheitlichen Markhöhle. Die mechanische Stabilität der Diaphyse hängt deshalb ganz entscheidend von der Beschaffenheit der Substantia corticalis ab. Aus diesem Grunde werden die Knochenparameter für die Kortikalis im Bereich der Diaphyse ermittelt. Zwischen der Epi- und Diaphyse liegt die sog. Metaphyse. Hier werden die Parameter für die Spongiosa eruiert.

Die Knochenmatrix besteht zur Hälfte aus anorganischem Material, welches hauptsächlich in Form von Hydroxylapatitkristallen vorliegt. Die organischen Komponenten der Knochenmatrix, überwiegend Kollagen vom Typ I und Proteoglykane, werden von Zellen mesenchymaler Herkunft, den Osteoblasten, synthetisiert.

Die Gegenspieler der Osteoblasten stellen die Osteoklasten dar. Diese mehrkernigen Riesenzellen leiten sich vom mononukleären Phagozytensystem, den Makrophagen, ab und sind in der Lage, mittels Sekretion von Protonen und Proteasen, den mineralisierten Knochen zu resorbieren. Für seine Reifung zum muren Osteoklasten benötigt der Präosteoklast u.a. M-CSF, die Expression verschiedener Gene (u.a. c-fos), die Initiation der Trap (engl.: tartrate-resistant acid phosphatase), sowie RANK (engl.:

Einleitung

receptor activator of nuclear factor κ B) (Robling et al. 2006). Letzterer ist ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Familie und spielt in der Kommunikation mit dem Osteoblasten eine Schlüsselrolle: Der Ligand des RANK (RANK-L) wird auf der Oberfläche von Osteoblasten exprimiert und kann nach Bindung an den Rezeptor die Reifung des Osteoklasten induzieren. Die Osteoblasten sind aber auch befähigt, die Reifung der Osteoklasten zu unterbinden, indem sie Osteoprotegerin (OPG) synthetisieren. OPG ist ein lösliches Protein, das an RANK auf dem Osteoklasten binden und dadurch dessen weitere Reifung blockieren kann. OPG wird deshalb auch als „Täuschungsrezeptor“ des RANK bezeichnet. Diese Kopplung zwischen Osteoblasten und -klasten soll eine Balance zwischen Knochenresorption und -aufbau gewährleisten (Sims und Gooi 2008). Im Zuge der vorliegenden Untersuchung werden die Serumspiegel für RANK-L und OPG der Ratten bestimmt.

Der Knochen ist ein dynamisches Organ mit einer hohen Durchblutungs- und Stoffwechselaktivität. Beim Menschen ist das Knochenwachstum (sog. modeling) in der Pubertät mit der Verknöcherung der Epiphysen abgeschlossen. Dennoch kommt es weiterhin zu einem Austausch von Knochensubstanz (sog. remodeling). Dieser dient der Kalziummobilisation im Sinne der Kalziumhomöostase, dem Ersatz alten Knochengewebes, der Adaptation an neue Belastungssituationen und der Reparatur von (Mikro-)Frakturen.

Das Remodeling ist hierbei in sog. Bone Remodeling Units (BRUs) organisiert. Diese stellen eine temporäre anatomische Struktur aus Osteoklasten und -blasten dar, die älteres Knochengewebe durch neues ersetzt. Dieser Knochenumbau folgt einer bestimmten Sequenz aus Aktivierung (Bereitstellung der Osteoklasten), Resorption und anschließender Formation (Osteoidproduktion und -mineralisation) (Parfitt 1979, Robling et al. 2006). Die Umbaurate des menschlichen Skeletts beträgt ca. 4-10% der gesamten Knochenmasse pro Jahr (Fleisch und Hadji 2007). Kortikaler und spongioser Knochen unterliegen dabei unterschiedlichen Umbauraten. Der kortikale Knochen weist ein sehr niedriges Oberflächen/Volumen-Verhältnis auf und ist stark kalzifiziert, weshalb er eher träge reagiert und einem Umbau von jährlich ca. 2,5% unterliegt. Der spongiöse Knochen hat eine viel größere Oberfläche, sodass hier pro Jahr ca. 25% umgebaut werden. Dies erklärt, warum sich die Osteoporose zunächst an den Knochen mit hohem Spongiosa-Anteil (SA), wie der Lendenwirbelsäule (75% SA), proximalem Femur (50-75% SA) und der Ferse (70% SA) manifestiert (Bartl 2008).

Regulation des Knochenstoffwechsels

Der humane Knochenstoffwechsel kann durch verschiedene hormonelle, genetische und mechanische Einflüsse modifiziert werden, um seinen oben genannten Aufgaben gerecht zu werden.

Die wichtigsten Hormonsysteme im Hinblick auf die Pathophysiologie der Osteoporose sind die Sexualhormone Östradiol (E_2) und Testosteron sowie das Vitamin-D-endokrine-System nebst Parathormon.

E_2 induziert beim Menschen zusammen mit dem Wachstumshormon und IGF-1 das pubertäre Wachstum des Skeletts und ist anschließend für den Schluss der Epiphysenfugen in beiden

Einleitung

Geschlechtern verantwortlich. Ein Erreichen der Spitzenknochenmasse ist ohne E_2 nicht möglich. Auch nach Abschluss der Knochenreifung spielt E_2 eine entscheidende Rolle im Knochenstoffwechsel: Es ist neben der biomechanischen Belastung hauptverantwortlich für die Erhaltung der Knochenmasse, indem es den Knochenmetabolismus supprimiert und eine Balance zwischen Knochenresorption und -formation aufrechterhält (Riggs et al. 2002). Osteoblasten exprimieren die beiden Östrogenrezeptor(ER)-Subtypen α und β (Bord et al. 2001, 2003).

E_2 induziert vermutlich über ERs die Expression eben dieser Östrogen-Rezeptoren sowie die von OPG und RANK-L. Letzteres mag verwunderlich klingen, lässt sich aber mit den antiresorptiven Eigenschaften des E_2 in Einklang bringen: Es wurde festgestellt, dass die Expression von RANK-L unter E_2 nur ca. 48h gesteigert wird, die des OPG hingegen längere Zeit, sodass die OPG/RANK-L-Ratio somit unter E_2 in den anti-resorptiven Bereich verschoben wird (Bord et al. 2003). Des Weiteren vermögen Östrogene über den $ER\alpha$ die Apoptose der Osteoklasten zu induzieren und somit deren Lebensspanne zu regulieren. Ferner führt die Behandlung mit Östrogenen von Osteoklasten in vitro zu einer Reduktion der Osteoklasten-spezifischen Gene (Imai et al. 2009).

Bei Männern werden über 95% des zirkulierenden Testosterons in den Testes gebildet. Während der Pubertät entwickeln Männer ein größeres Knochenvolumen als Frauen, da es unter dem Einfluss von Testosteron zu einer stärkeren periostalen Apposition kommt (Vanderschueren et al. 2004).

Des Weiteren sorgt Testosteron nach Abschluss der Knochenreifung für die Erhaltung der Knochenmasse, indem es die Proliferation von Progenitor-Osteoblasten und die Differenzierung der maturaen Osteoblasten fördert, deren Apoptose jedoch hemmt (Vanderschueren et al. 2004). Ferner wurde nachgewiesen, dass 5α -Dihydrotestosteron (DHT), welches über die 5α -Reduktase aus Testosteron entsteht, über den Androgen-Rezeptor (AR) in Osteoklasten in vitro deren Resorptionskapazität mindern kann (Pederson et al. 1999). Huber et al. zeigten 2001 ebenfalls in einer in-vitro-Studie, dass DHT die durch RANK-L und M-CSF induzierte Bildung von Osteoklasten verhindern konnte. Testosteron kann über die Östrogen-Synthetase auch direkt zu E_2 konvertiert werden und so dual über den AR und den $ER\alpha$ wirken.

Neben den Sexualsteroiden sind vor allem die beiden zentralen Hormone der Kalziumhomöostase, $1,25(OH)_2$ -Vitamin D_3 und das Parathormon (PTH), für den gesunden Knochen unverzichtbar.

Vitamin D_3 übt u.a. über seinen intrazellulären Rezeptor in Osteoklasten und -blasten resorptive bzw. antiresorptive Effekte auf den Knochen aus. Ein Überwiegen der Knochenresorption wird durch die $1,25(OH)_2$ -Vitamin D_3 -vermittelte Hemmung der PTH-Sekretion verhindert (Jakob 1999).

PTH vermag das Remodeling und die Knochenresorption zu stimulieren, um im Rahmen der Kalziumhomöostase eine Freisetzung dieses Ions aus dem Knochen zu erreichen. Diese Wirkung wird über den PTH-1-Rezeptor auf Stromazellen und Osteoblasten vermittelt, dessen Aktivierung zu einer vermehrten Produktion von RANK-L und M-CSF sowie zu einer Suppression von OPG führt (O'Brien et al. 2008).

1.5 Ziel der Studie

Ziel der Studie ist es, die Wirkung von Ecd auf den Knochen der Ratte in vivo zu untersuchen. Mit Hilfe der pQCT, die eigens für die Bestimmung von Dichte- und anderen geometrischen Knochenparametern bei Kleintieren entwickelt worden ist (Helterbrand et al. 1997), wurde die Metaphyse bzw. Diaphyse der Tibia analysiert. Neben Dichte, Fläche und Umfang der beiden Knochenkompartimente Spongiosa und Kortikalis wurden der Trabekelanteil der Spongiosaquerschnittsfläche sowie das polare Widerstandsmoment bestimmt. Letzteres gibt Auskunft über die Knochenfestigkeit der Tibia bei einwirkender Torsion (Wilks et al. 2009).

Da bekannt ist, dass Ecd Einfluss auf die Muskel- und Fettmasse bzw. das Gewicht der Ratte haben kann (siehe 1.3.2.), wurden zusätzlich die Futterraufnahme und das Körpergewicht der Tiere bestimmt und jeder Knochenparameter in Relation zum Körpergewicht der S.D.-Ratten angegeben.

Durch die Analyse der o.g. Knochenparameter sollen vorrangig folgende Fragen beantwortet werden:

- 1.) Lässt sich bei der männlichen S.D.-Ratte ein osteoprotektiver Effekt von Ecd auf den Gonadektomie-induzierten Knochenverlust nachweisen, wie er bereits bei der weiblichen Ratte beobachtet worden ist (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b)? Wenn ja, welche der gewählten Ecd-Dosen von 1/2, 1 und 3 g/kg Futter ist die effektivste in der Osteoporose-Prophylaxe?
- 2.) Der Versuchsarm mit den weiblichen S.D.-Ratten stellt die Fortführung eines Futtersversuches der Arbeitsgruppe Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen aus dem Jahr 2007 dar. Damals wurde der Effekt von Ecd in den Dosen 1, 3 und 6 g/kg Futter auf den Knochen untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Studie soll nun folgende Frage beantwortet werden: Lässt sich mit den niedrigeren Dosen von 0,2 bzw. 0,5 g/kg Futter ein vergleichbarer osteoprotektiver Effekt von Ecd auf den Knochen erzielen?
- 3.) Zusätzlich zu der computertomographischen Analyse wurden verschiedene Knochenparameter (Osteokalzin, RatLaps, RANK-L und Osteoprotegerin) im Serum der Tiere bestimmt. Werden sie durch Ecd beeinflusst?

2 Material und Methoden

2.1 Die Versuchstiere

Der vorliegende Tierversuch wurde an 96 Sprague-Dawley-Ratten (S.D.-Ratten, Züchter der Muttertiere: Winkelmann, Borcheln), davon 60 männliche und 36 weibliche Tiere, durchgeführt. Die Genehmigung dafür erteilte die Bezirksregierung Braunschweig am 3.8.2006 (AZ: 33.42502-082-06).



Abb. 3 Käfige im Tierstall (Foto: Dana Seidlová-Wuttke)

Ab ihrer Ankunft am 17.10.2007 befanden sich die Tiere unter den Bedingungen der offenen Haltung in einem separaten Raum des Tierstalls des Klinikums der Universität Göttingen, in welchem eine konstante Temperatur von ca. 21°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 46% herrschte.

Die S.D.-Ratten wurden in Gruppen à sechs Tieren pro Käfig (Makrolonkäfige Typ IV, 1800cm², Fa. Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg) gehalten. Nach elf Wochen wurde die Gruppenstärke der männlichen Tiere aufgrund ihres Gewichtes und ihrer Größe auf vier Tiere pro Käfig reduziert.

Die Beleuchtung des Raumes erfolgte in einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus (von 6h bis 18h bzw. von 7h bis 19h) mit maximal ca. 500 Lux.

Die Käfige wurden zweimal pro Woche vom Tierpflegepersonal gesäubert und mit frischem Streu (Lignocel, Fa. J. Rettenmaier & Söhne GmbH und Co.KG, Rosenberg) ausgelegt.

Die Fütterung der Tiere erfolgte einmal pro Woche über die Raufen. Die Versorgung mit Trinkwasser wurde über automatische Tränken gewährleistet, sodass den Tieren Wasser ad libitum zur Verfügung stand.

Zu Beginn des Versuches, das heißt zum Zeitpunkt der ersten qQCT-Messung, waren die Tiere ca. drei Monate alt. Die männlichen Tiere wogen im Mittel 386,0g +/- 1,9g (Standardfehler), die weiblichen Tiere 247,5g +/-1,7g (Standardfehler). Dieses Gewicht entspricht den vorgegebenen Zuchtbedingungen von Harlan Winkelmann (www.harlaneurope.com).

2.2 Die Gonadektomie

Im Zeitraum vom 10. bis 14.12.2007 wurden die ausgewählten S.D.-Ratten gonadektomiert. Dieser Eingriff erfolgte unter einer kurzzeitigen Inhalationsvollnarkose mit Isofluran (Forene®, Fa. Abbott) und einer Gabe von Rimadyl (0,1 ml in 10 ml Ampuwa; die weiblichen Tiere erhielten ca. 0,3 ml, die männlichen Tiere ca. 0,4 ml dieser Lösung, Fa. Pfizer, Karlsruhe) zwecks Analgesie.

2.2.1 Die Orx

Zunächst wurden mittels Evaluation aus der Bauchhöhle die Hoden der Ratte beidseits aufgesucht. Nach Desinfektion des Operationsgebietes erfolgte die mediale Inzision der Skrotalhaut mit Durchtrennung des viszeralen Peritoneums. Daraufhin wurde der Hoden freipräpariert. Anschließend wurde der Ductus epididymus mit seinen Gefäßen dargestellt, mit einem Vicrylfaden (Fa. Ethicon) ligiert und der Hoden nach der Unterbindung mit einem Skalpell (Fa. HMD Healthcare, Horsham U.K.) entfernt.

Anschließend erfolgte die Kontrolle des Operationsfeldes auf Blutungsfreiheit. War diese gewährleistet, wurde die Skrotalhaut wieder mit einem Vicrylfaden verschlossen. Das oben beschriebene Verfahren wurde in gleicher Weise auf der kontralateralen Seite durchgeführt.

2.2.2 Die Ovx

Nach Scheren des Felles im Bereich der Flanke und Desinfektion des Operationsfeldes folgte die Eröffnung der Bauchhöhle in einem Bereich zwischen der Wirbelsäule und dem Rippenbogen. Das Ovar wurde aus dem umliegenden Fettgewebe freipräpariert und das Oviduct aufgesucht. Dieses wurde mit Hilfe eines Vicrylfadens ligiert und das Ovar mit einem Skalpell abgesetzt. Auch hier wurde das Operationsfeld auf Blutungsfreiheit kontrolliert. Das verbleibende Uterushorn wurde in die Bauchhöhle reponiert und diese wieder zugenäht. Die Entfernung des Ovars der kontralateralen Seite erfolgte in gleicher Weise.

2.3 Das Tierfutter

Ab ihrer Ankunft im Tierstall am 17.10.2007 erhielten die S.D.-Ratten ca. sechs Wochen lang phytoöstrogenarmes Futter (V1355-000, R-Z, 10mm phytoöstrogenarm, Fa. Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) folgender Zusammensetzung:

Tabelle 3 Futterzusammensetzung

Inhaltsstoffe	[%]	Zusatzstoffe	
Rohprotein	21,70	Vitamin A	15.000 IE
Rohfett	4,30	Vitamin D3	1.000 IE
Rohfaser	4,20	Vitamin E	100mg
Rohasche	6,10	Vitamin C	
Calcium	1,00	Kupfer, Kupfer-	5mg
Phosphor	0,70	(II)-sulfat	
Natrium	0,19	Pentahydrat	

Nach der Gonadektomie erfolgte die Umstellung des Futters entsprechend folgender Gruppeneinteilung:

Tabelle 4 Gruppeneinteilung Männchen

Männliche Tiere:

Gruppe	Dosis Ecd [g/kg Futter]	Ø Futteraufnahme [g/Tier/Tag]	Ø Einnahme v. Ecd [mg/Tier/Tag]
12 orx Tiere	Phytoöstrogenarm	20,71	--
12 intakte Tiere	Phytoöstrogenarm	22,06	--
12 orx Tiere	+0,5	22,21	11,11
12 orx Tiere	+1,0	22,19	22,19
12 orx Tiere	+3,0	22,31	66,93

Tabelle 5 Gruppeneinteilung Weibchen

Weibliche Tiere:

Gruppe	Dosis Ecd [g/kg Futter]	Ø Futteraufnahme [g/Tier/Tag]	Ø Einnahme v. Ecd [mg/Tier/Tag]
12 ovx Tiere	Phytoöstrogenarm	18,78	--
12 ovx Tiere	+0,2	19,31	3,86
12 ovx Tiere	+0,5	19,34	9,67

Das Ecd-haltige Futter (PS, R/M, 10mm, +0,2 bzw. +0,5, +1,0, +3,0 g/kg β -Ecdyson, Fa. Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) besteht wie das phytoöstrogenarme ebenfalls aus einer sojafreien Basis, der Ecd in den verschiedenen Konzentrationen zugesetzt worden ist.

Für die einmal wöchentliche Fütterung waren unter der Aufsicht von Fr. Dr. Dana Seidlová-Wuttke die in den Versuch involvierten Studentinnen verantwortlich. Hier wurde darauf geachtet, dass die Tiere der verschiedenen Futtergruppen nicht mit substanzhaltigem Futter anderer Konzentration in Berührung kamen.

Die wöchentliche Futteraufnahme pro Tier wurde wie folgt ermittelt: Das nach einer Woche in den Raufen befindliche Restfutter wurde gewogen, von der wöchentlichen Futtermenge pro Käfig (1500g) subtrahiert und schließlich durch die Anzahl der Tiere des Käfigs dividiert. Basierend auf der so errechneten Futteraufnahme konnte die Ecd-Aufnahme pro Tier pro Tag geschätzt werden.

2.4 Das Identifikationssystem

Im Zuge der ersten qQCT-Messungen wurde sämtlichen S.D.-Ratten ein Transponder (Transponder-UNO MICRO-ID der Länge 12mm, Fa. Uno-Roevastaal BV, Zevenaar Holland) mit Hilfe einer Einmal-Applikationsspritze (Fa. Uno-Roevastaal, Zevenaar Holland) subkutan unter die Nackenhaut implantiert. Mit einem tragbaren Transponder-Lesegerät (Gesreader II, ISO kompatibler Taschenleser) konnte der individuelle Zahlencode des Transponders abgelesen und so jedes Tier eindeutig identifiziert werden.



Abb. 4
Transponder-Lesegerät und
Applikationsspritze für die Transponder

2.5 Die periphere quantitative Computertomographie

Die pQCT stellt bei Kleintieren wie Ratten eine sensitive, reproduzierbare und nicht-invasive Methode zur Überwachung von Veränderungen der Knochenmasse, -dichte und anderer geometrischer Knochenparameter dar (Gasser 1995).

Zur Erhebung der Daten wurde ein XCT Research Bone Scanner (Firma Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim) verwendet. Dieses Messgerät dient zur Bestimmung der Knochendichte und einiger anderer geometrischer Knochenparameter. Es arbeitet vollautomatisch und leitet seine Messergebnisse an einen PC weiter, an dem die Bildmatrix berechnet und die Auswertung der Daten vorgenommen werden kann.

2.5.1 Theorie der Messungen

Das Messprinzip der pQCT beruht auf der Absorption von Photonen durch das zu messende Objekt. Dabei registriert das Gerät das Absorptionsprofil und konvertiert es in elektrische Impulse.

Zunächst fertigt der Apparat einen Übersichtsscan an, der knochendichte Anteile hell und Weichteile dunkel darstellt. Anhand dieses Bildes kann nun die Referenzlinie manuell oder gemäß eines Vorschlages der Software positioniert werden – die eigentlichen qQCT-Messungen werden dann im Abstand von 3,75 mm, 4,25 mm und 15 mm zu dieser Linie ausgeführt.

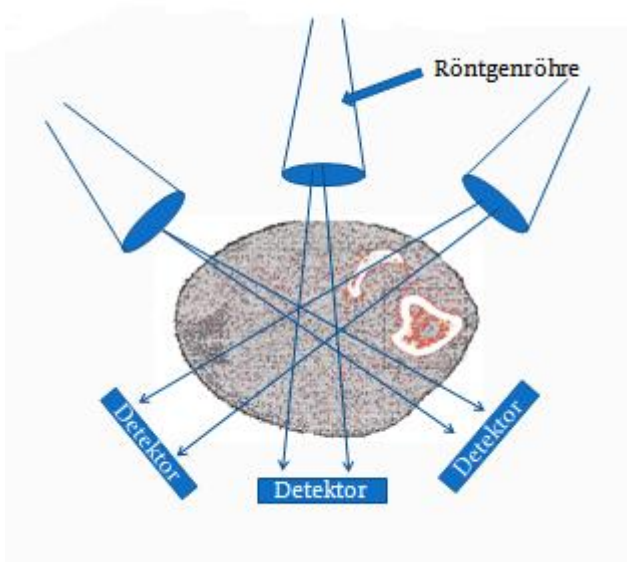


Abb. 5
Das Prinzip der
Computertomographie in einer
vereinfachten Schemazeichnung

Hierbei unterscheidet die Software (XCT 5.40, Fa. Stratec, Pforzheim) anhand der Dichte in einem ersten Schritt (Schwellenwert 280 mg/cm^3) zwischen Knochen und Weichteilen und in einem zweiten Schritt zwischen Spongiosa und Kortikalis. Hierzu wurde eine innere Schwelle zwischen 400 und 710 mg/cm^3 gewählt. Sämtliche Bildpunkte mit einer Dichte unterhalb dieser Schwelle werden der Spongiosa, alle mit einer Dichte oberhalb dieser Schwelle werden der Kortikalis zugeordnet. Daran

2.5.2 Messvorgang

Die qQCT-Messungen erfolgten unter einer Inhalations-Vollnarkose. Hierfür wurde ein Kleintiernarkosegerät in Kombination mit einem Flow-Meter (beides Firma Uno, Zevenaar, Holland) verwendet. Über eine den Mund und die Nase bedeckende Maske wurde den Ratten Isofluran (Forene®, Fa. Abbott) in der Dosierung 0,2 l/min verabreicht. Die Sauerstoffzufuhr wurde ebenfalls über das Flow-Meter reguliert und betrug ca. 0,2 bis 0,4 l/min.

Nachdem durch Beobachtung von Atmung und Muskeltonus sichergestellt war, dass die Ratten ausreichend narkotisiert worden sind, konnte mit den Messungen begonnen werden, welche ausschließlich an der linken Tibia erfolgten. Dazu wurden die S.D.-Ratten in Rechtsseitenlage gebracht und das linke Bein mit Hilfe einer eigens dafür vorgesehenen Kunststoffhalterung fixiert. Die Schnittebene wurde zunächst visuell festgelegt, als Positionierungshilfe diente ein in das Gerät integrierter Dioden-Laser.

Nach Durchlauf des Vorscans konnte anhand des Rasterbildes eine exakte Positionierung der Referenzlinie in der Metaphyse der Tibia vorgenommen werden. Darauf folgte dann die eigentliche Messung, welche ca. sieben Minuten in Anspruch nahm. Nach Beendigung der Messungen wurden die S.D.-Ratten mit einer Digitalwaage (BL 3100, Fa. Sartorius, Göttingen) gewogen und anschließend in einem separaten, mit Zellstoff ausgekleideten Käfig bis zum vollständigen Erwachen beobachtet.



Abb. 7
S.D.-Ratte in Messposition vor dem
XCT-Reserach Bone Scanner
(Foto: Dana Seidlová-Wuttke)

2.6 Die Serumanalysen

Das im Zuge der Obduktion durch Dekapitation gewonnene Blut stand für die Analyse ausgewählter Serumparameter zur Verfügung.

Zu Beginn des Versuches wurde auf eine Blutentnahme verzichtet, da diese in vivo für die Tiere risikoreich ist. Des Weiteren können den lebenden Tieren nur wenige Mikroliter Blut entnommen werden, wodurch die Bestimmung der Serumparameter limitiert wird. Bereits in Vorversuchen ermittelte, standardisierte Referenzwerte für die Beurteilung der Serum-Parameter stellte das Department für Endokrinologie zur Verfügung.

Die Osteokalzin-Serumspiegel wurden mit Hilfe des kommerziell verfügbaren Elecsys-Systems (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) bestimmt.

Zur Ermittlung der RatLaps-Serumspiegel dienten ELISA (Nordic Biosciences, Herlev, Dänemark).

Die beiden Serumparameter OPG und RANKL (beide: Fa. Osteomedical/ Biomedica Medicals, Wien, Österreich) wurden mittels Immunoassay bestimmt.

2.7 Die statistischen Methoden

Für die Erhebung der statistischen Daten wurde das Computerprogramm Graph Pad PRISM 4 ® für das Betriebssystem Windows verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Da die unbehandelten Kontrolltiere und die mit einer jeweiligen Konzentration der Testsubstanz behandelten Tiere voneinander unabhängig sind, konnte die statistische Analyse mit Hilfe des unpaarigen t-Testes durchgeführt werden.

2.8 Der Versuchsablauf

Mit ihrer Ankunft im Tierstall des Universitätsklinikums am 17.10.2007 begann für die Versuchstiere eine sechswöchige Gewöhnungsphase, in der sie sojafreies, phytoöstrogenarmes Pellet-Futter erhielten.

Nach Abschluss dieser Phase erfolgten die ersten computertomographischen Messungen (vom 28.11 bis 7.12.2007), die den Versuchsbeginn kennzeichnen.

Im Anschluss an die pQCT-Messungen wurden die ausgewählten S.D.-Ratten gonadektomiert (10. bis 14.12.2007). Gleich darauf wurde die Umstellung auf substanzhaltiges Futter, entsprechend der vor Versuchsbeginn festgelegten Gruppeneinteilung, vorgenommen. Die Applikation von Ecd über das Futter erfolgte nun für zwölf Wochen.

Danach wurden die S.D.-Ratten einer zweiten qQCT-Messung (25.2. bis 2.3.2008) unterzogen.

Schließlich erfolgte die Obduktion der Tiere. Dazu wurden die S.D.-Ratten mittels CO₂ narkotisiert und durch Dekapitation getötet.

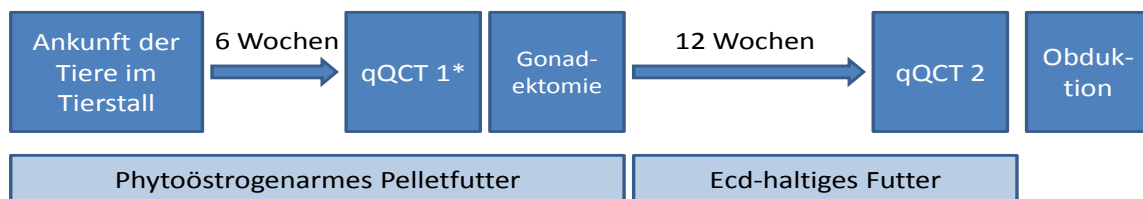
Im Rahmen der Obduktion wurden Blut für die Bestimmung der Serum-Parameter gewonnen und verschiedene Organe (Leber, Herz, Uterus bzw. Samenblase und Prostata) entnommen. Ferner wurden

die Tibiae der Ratten präpariert, um später ihre Länge und den Durchmesser der Metaphyse mit einem digitalen Messschieber bestimmen zu können.

Das Gewicht der Ratten wurde während des Versuchszeitraumes insgesamt fünfmal bestimmt, so auch im Zuge der beiden qQCT-Messungen und der Obduktion. Anhand dieser Werte können die Entwicklung des Körpergewichtes und das Delta-Körpergewicht nachvollzogen werden.

Im Zuge der einmal wöchentlich stattfindenden Fütterung wurde der Futterverbrauch pro Käfig pro Woche ermittelt, der die Basis für die Berechnungen der Futter- und Ecd-Aufnahme darstellt.

Die Daten der intakten weiblichen S.D.-Ratten der Kontrollgruppe bezüglich Gewicht, Futteraufnahme und Knochenparametern entstammen dem Vorversuch der vorliegenden Studie (Seidlová-Wuttke et al. 2010b), welcher 2007 von der Arbeitsgruppe Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt worden ist und für den identische Versuchsbedingungen galten. Diese Daten sind im Ergebnisteil durch Schraffierungen gekennzeichnet.



* Versuchsbeginn

Abb. 8
Versuchsablauf schematisch dargestellt

3 Ergebnisse

3.1 Körpergewicht

3.1.1 Entwicklung des Körpergewichtes

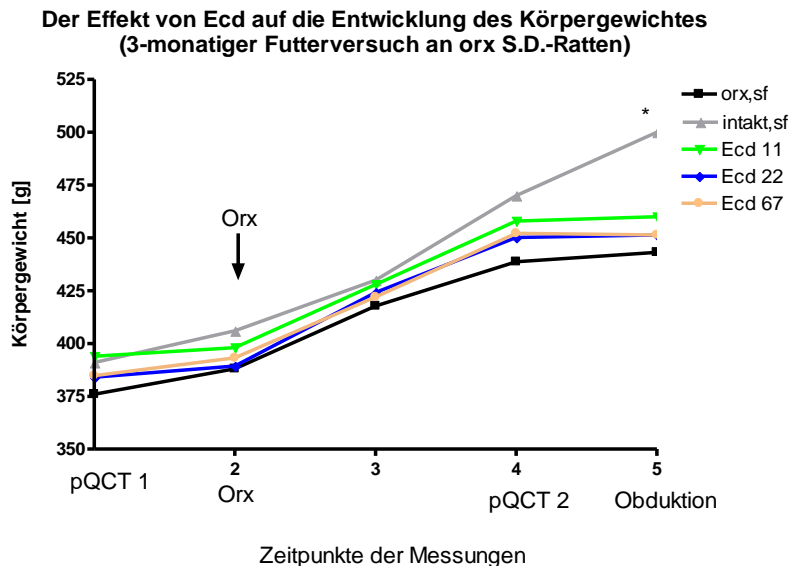


Abb. 9 * $P < 0,05$ vs orx,sf

Über den Versuchszeitraum gewannen sämtliche Gruppen an Körpergewicht. Die Gewichtszunahme fiel bei den intakten Tieren am stärksten aus. Sie wogen zum Zeitpunkt der Obduktion signifikant mehr als alle anderen Gruppen. Die mit Ecd behandelten Gruppen zeigten eine tendenziell stärkere Gewichtszunahme als die orx Kontrollgruppe.

Das Körpergewicht der Ratten wurde während des Versuchszeitraumes insgesamt fünfmal gemessen, meist im Zuge von größeren Manipulationen an den Tieren wie den pQCT-Messungen oder der Gonadektomie.

Zu Beginn des Versuches wogen die männlichen S.D.-Ratten zwischen $386 \pm 1,9$ g.

Es ließ sich bei allen männlichen Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum eine Zunahme des Körpergewichtes beobachten. Insbesondere die intakten Tiere gewannen an Gewicht, sodass sie zum Zeitpunkt der Obduktion signifikant mehr wogen (im Mittel 500g) als alle anderen Gruppen. Die Applikation von Ecd hatte in keiner der gewählten Dosierungen einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung des Körpergewichtes (siehe auch Delta Körpergewicht), wenngleich die mit Ecd behandelten Tiere eine tendenziell stärkere Gewichtszunahme aufwiesen als die orx Kontrollgruppe.

Ergebnisse

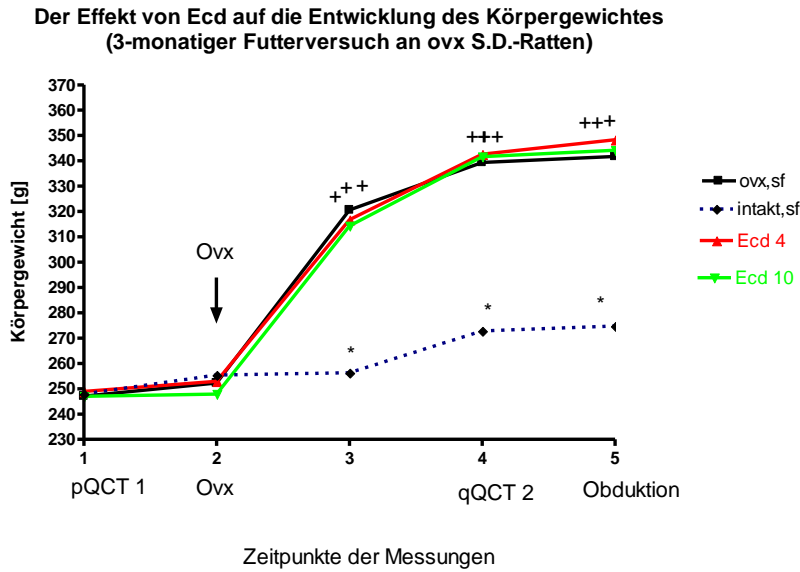


Abb. 10 * $P < 0,05$ vs ovx,sf; + $P < 0,05$ vs intakt, sf

Nach der Ovx zeigten die gonadektomierten Tiere eine intensiviertere Gewichtszunahme. Zwischen der ovx Kontrollgruppe und den Ecd-Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede. Die intakten Tiere nahmen während des Versuchszeitraumes signifikant weniger zu als die ovx Kontrollgruppe und die mit Ecd behandelten Gruppen.

Die weiblichen Tiere wogen zu Beginn des Versuches 248 ± 2 g. Nach der Ovx kam es bei den ovx Gruppen zu einer gleichförmigen, gesteigerten Gewichtszunahme. Die beiden mit Ecd behandelten Gruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede in der Entwicklung ihres Körpergewichtes verglichen mit der ovx Kontrollgruppe auf. Das Körpergewicht der intakten Tiere stieg signifikant weniger als das aller anderen ovx Gruppen.

3.1.2 Delta-Körpergewicht

Das Delta-Körpergewicht repräsentiert die mittlere Gewichtszunahme über den Versuchszeitraum und errechnet sich aus dem Gewicht zu Versuchsbeginn subtrahiert vom Obduktionsgewicht.

Der Effekt von Ecd auf das Delta-Körpergewicht (3-monatiger Futtersuch an orx S.D.-Ratten)

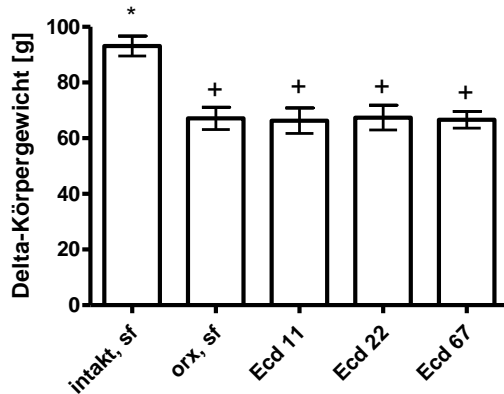


Abb. 11 *P<0,05 vs orx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf

Im Mittel nahm die intakte Gruppe 93 Gramm zu und besaß somit ein signifikant größeres Delta-Körpergewicht als alle anderen Gruppen. Die Ecd-Gruppen zeigten keine relevanten Unterschiede zur orx Kontrollgruppe.

Die männlichen intakten Tiere nahmen mit durchschnittlich +93g über die drei Monate signifikant mehr an Gewicht zu als alle anderen Gruppen. Die Applikation von Ecd erzielte in keiner der gewählten Dosierungen einen signifikanten Effekt auf das Delta-Körpergewicht, da die behandelten Gruppen keinen signifikanten Unterschiede zu der orx Kontrollgruppe aufwiesen.

Der Effekt von Ecd auf das Delta-Körpergewicht (3-monatiger Futtersuch an ovx S.D.-Ratten)

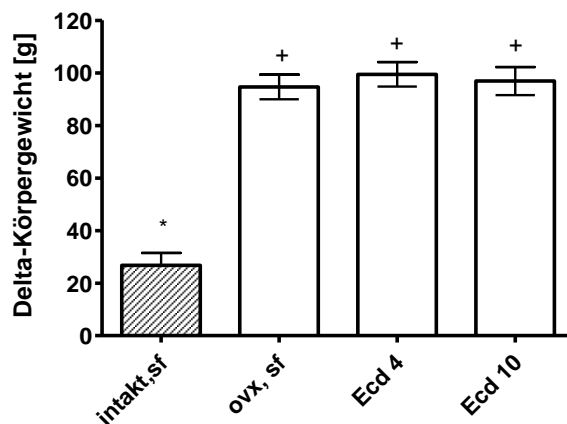


Abb. 12 *P<0,05 vs ovx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf

Die intakten Tiere wogen signifikant mehr als alle ovx Gruppen. Ecd hatte keinen Einfluss auf das Delta-Körpergewicht.

Die intakten Tiere nahmen während des Versuchszeitraumes im Mittel 27 Gramm und somit signifikant weniger zu als alle ovx Gruppen. Die Applikation von Ecd hatte bei den ovx Tieren keinen Einfluss auf das Delta-Körpergewicht.

3.2 Futteraufnahme

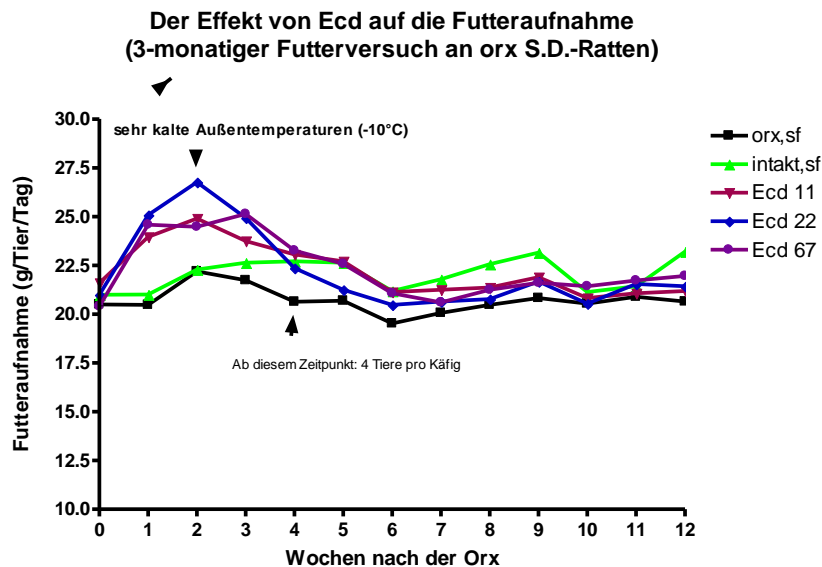


Abb. 13 Die Behandlung mit Ecd führte zu einer Stimulation der Futteraufnahme, insbesondere nach der Orx.

Tabelle 6 Die mittlere und die effektive Futteraufnahme der männlichen Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum

Gruppe	orx,sf	intakt,sf	Ecd 11	Ecd 22	Ecd 67
Mittlere Futteraufnahme [g/Tier/Tag]	20,71+	22,06*	22,21*	22,19*	22,31*
Delta-BW [g]	67,14	93,14	66,28	67,41	66,65
Effektive Futteraufnahme	0,31	0,24	0,34	0,33	0,33

*P<0,05 vs orx,sf +P<0,05 vs intakt,sf

Bei den männlichen Tieren führte die Behandlung mit Ecd in allen Dosierungen zu einer Anregung der Futteraufnahme, insbesondere direkt nach der Orx. Die mit Ecd behandelten Tiere fraßen im Mittel signifikant mehr Futter als die orx Kontrolltiere, sodass sich die Futteraufnahme der Ecd-Gruppen nicht signifikant von der der intakten Tiere unterschied. Die effektive Futteraufnahme ergibt sich aus der mittleren Futteraufnahme über den Versuchszeitraum dividiert durch das Delta-Körpergewicht. Dadurch werden die Futteraufnahme und der Zugewinn an Körpergewicht in ein Verhältnis gesetzt, das eine Aussage darüber erlaubt, inwieweit das aufgenommene Futter in eine Gewichtszunahme umgesetzt worden ist.

Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wiesen die intakten Tiere die geringste effektive Futtermittelaufnahme auf. Die mit Ecd behandelten Gruppen zeigten alle eine höhere effektive Futtermittelaufnahme verglichen mit der orx Kontrollgruppe.

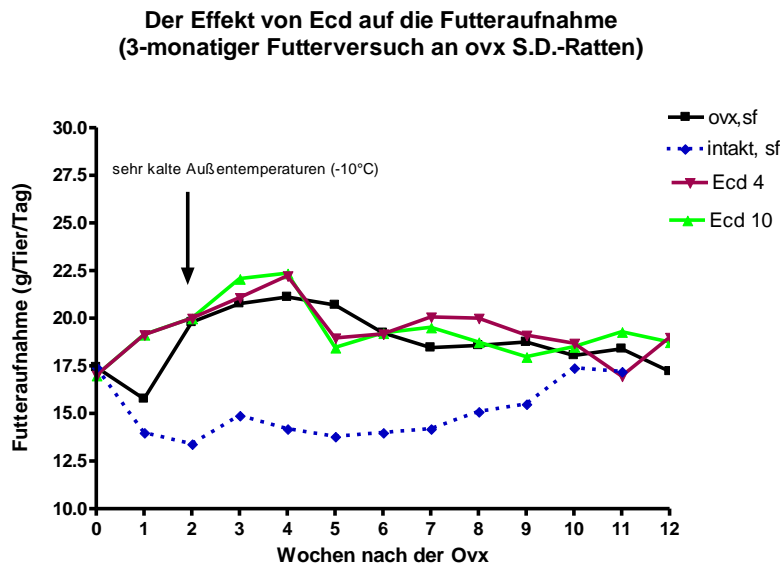


Abb. 14 Die Applikation von Ecd führte in beiden Dosierungen zu einer Stimulation der Futtermittelaufnahme direkt nach der Ovx, wohingegen die unbehandelten Tiere mit einer verminderten Futtermittelaufnahme auf diesen Eingriff reagierten.

Tabelle 7 Die mittlere und die effektive Futtermittelaufnahme der weiblichen Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum

Gruppe	ovx,sf	Ecd 4	Ecd 10
Mittlere Futtermittelaufnahme [g/Tier/Tag]	18,78	19,31	19,34
Delta-BW [g]	94,64	99,43	96,9
Effektive Futtermittelaufnahme	0,20	0,19	0,20

Die Behandlung mit Ecd führte bei den weiblichen Gruppen zu einer Anregung der Futtermittelaufnahme direkt nach der Gonadektomie. Konträr dazu reagierte die ovx Kontrollgruppe vorübergehend mit einer verminderten Futtermittelaufnahme auf den operativen Eingriff. Über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet hatte die Behandlung mit Ecd jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Futtermittelaufnahme.

3.3 Knochenparameter

Im Folgenden wird jeder mittels pQCT ermittelte Knochenparameter in absoluten Werten und in Relation zum Gewicht des entsprechenden Tieres (berechnet pro 100g Körpergewicht) angegeben.

Die im Zuge der ersten pQCT-Messung ermittelten Werte werden nachfolgend als Prä- oder Vorwerte bezeichnet. Die entsprechende Säule ist im Diagramm mit „pre orx“ bzw. „pre ovx“ gekennzeichnet und enthält die Präwerte aller Tiere, da zum Zeitpunkt ihrer Erhebung zu Versuchsbeginn für sämtliche Tiere dieselben Bedingungen galten (alle Ratten waren noch intakt und erhielten bis dato ausschließlich sojafreies, phytoöstrogenarmes Futter).

Bei den Knochenparametern sind die geometrischen von den Dichteparametern zu unterscheiden. Letzere beschreiben den Mineralisationsgrad des Knochens in mg/cm^3 Kalziumhydroxylapatit. Dabei kann das pQCT-Gerät anhand verschiedener Schwellenwerte (s. 2.5.1.) zwischen spongiöser und kortikaler Dichte unterscheiden. Die geometrischen Knochenparameter geben Auskunft über die Struktur des Knochens.

3.3.1 Dichte der Spongiosa

Der Effekt von Ecd auf die Dichte der Spongiosa der Tibiametaphyse (3-monatiger Futtersuch an orx S.D.-Ratten)

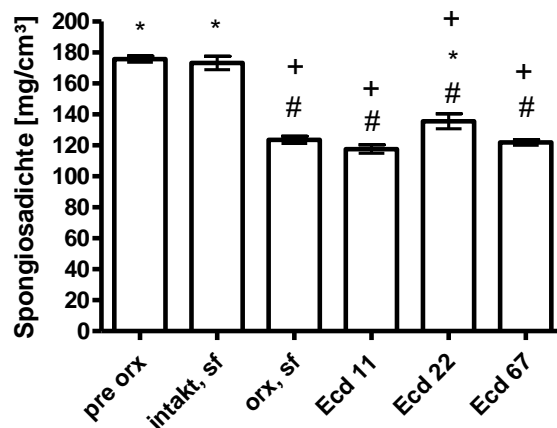


Abb. 15 # $P < 0,05$ vs pre orx; * $P < 0,05$ vs orx,sf; + $P < 0,05$ vs intakt,sf.

Die intakte Gruppe zeigte keine relevante Veränderung der Spongiosadichte über den Versuchszeitraum. Bei allen anderen Gruppen kam es durch die Orx zu einem signifikanten Abfall der Knochendichte. Lediglich die Ecd22-Gruppe präsentierte eine gegenüber der orx Kontrollgruppe signifikant höhere Spongiosadichte, wobei diese immer noch signifikant niedriger ausfiel als die der intakten Gruppe.

**Der Effekt von Ecd auf die Dichte der Spongiosa der Tibiametaphyse/100g Körpergewicht
(3-monatiger Futtersuch an orx S.D.-Ratten)**

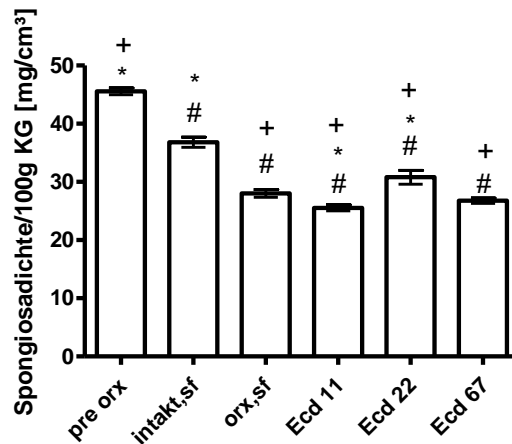


Abb. 16 # $P < 0,05$ vs pre orx; * $P < 0,05$ vs orx,sf; + $P < 0,05$ vs intakt,sf.

Bezogen auf das Körpergewicht wiesen alle Gruppen ausnahmslos eine signifikante Minderung der Knochendichte gegenüber den Ausgangswerten auf, die bei der intakten Gruppe am mildesten ausfiel: Sie besaß eine signifikant höhere Spongiosadichte als alle anderen Gruppen. Die Ecd22-Gruppe wies eine signifikant größere bzw. die Ecd11-Gruppe eine signifikant niedrigere Spongiosadichte als die orx Kontrollgruppe auf.

Drei Monate nach der Orx zeigte sich bei allen orx Gruppen ein signifikanter Dichteverlust der Spongiosa. Lediglich die Ecd-Aufnahme von 22mg/Tier/Tag vermochte diesen Verlust zu mindern: hier war die Spongiosadichte signifikant höher als bei der orx Kontrollgruppe.

Bei der intakten Gruppe fanden sich in absoluten Werten keine relevanten Unterschiede zu den Ausgangswerten, in Bezug auf das Körpergewicht ließ sich jedoch ebenfalls eine signifikante Abnahme der Spongiosadichte feststellen, wenngleich diese milder ausfiel als bei den orx Gruppen.

**Der Effekt von Ecd auf die Dichte der Spongiosa der Tibiametaphyse
(3-monatiger Futtermessung an ovx S.D.-Ratten)**

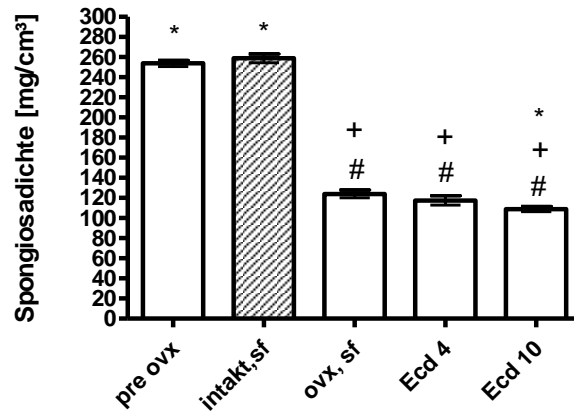


Abb. 17 #P<0,05 vs pre ovx; *P<0,05 vs ovx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf

Während sich die Spongiosadichte der intakten Tiere über den Versuchszeitraum nicht signifikant änderte, nahmen alle ovx Gruppen signifikant an Spongiosadichte ab. Die Ecd10-Gruppe wies zudem eine signifikant niedrigere Dichte als die ovx Kontrollgruppe auf.

**Der Effekt von Ecd auf die Dichte der Spongiosa der Tibiametaphyse/100g Körpergewicht
(3-monatiger Futtermessung an ovx S.D.-Ratten)**

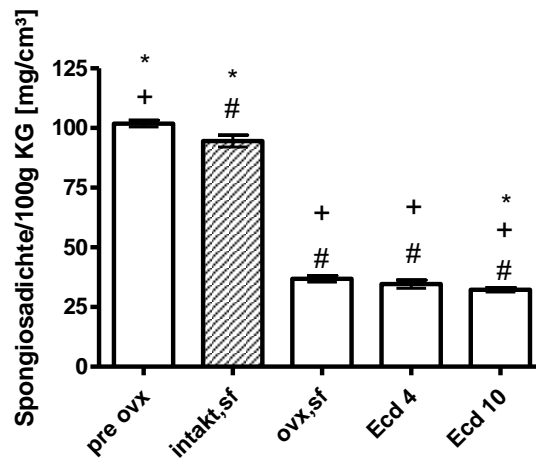


Abb. 18 #P<0,05 vs pre ovx; *P<0,05 vs ovx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf

In Relation zum Körpergewicht erfuhren alle Gruppen einen signifikanten Dichteverlust der Spongiosa. Bei den ovx Gruppen fiel dieser auch gegenüber der intakten Gruppe signifikant aus. Bei der Ecd10-Gruppe war die Dichteminderung außerdem signifikant stärker als bei der ovx Kontrollgruppe

Bei den weiblichen Gruppen zeigten die intakten Tiere in absoluten Werten keine signifikante Veränderung ihrer Spongiosadichte, wohl aber in Relation zu ihrem Körpergewicht- hier kam es über den Versuchszeitraum zu einer signifikanten Minderung der Spongiosadichte. Alle ovx Gruppen verloren signifikant gegenüber den Vorwerten und den intakten Tieren an Spongiosadichte, wobei die Applikation von Ecd in den gewählten Dosierungen keinen signifikanten protektiven Effekt auf die Dichteminderung erkennen ließ.

3.3.2 Dichte der Kortikalis

Der Effekt von Ecd auf die Dichte der Kortikalis der Tibiadiaphyse (3-monatiger Futtermittelsversuch an orx S.D.-Ratten)

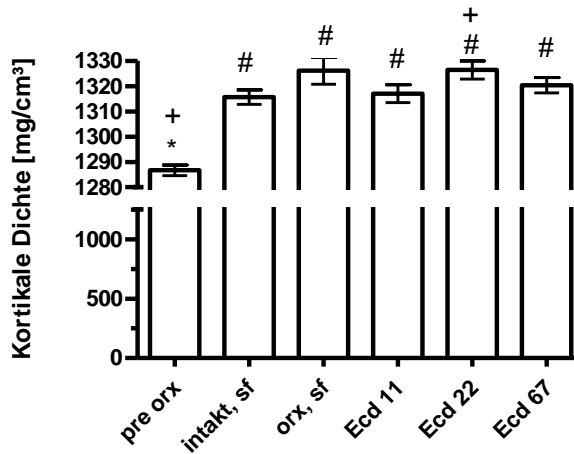


Abb. 19 # $P < 0,05$ vs pre orx; * $P < 0,05$ vs orx,sf; + $P < 0,05$ vs intakt,sf.

Über den Versuchszeitraum entwickelten alle Gruppen eine signifikant höhere Kortikalisdichte. Die intakte Gruppe besaß dabei eine tendenziell niedrigere Kortikalisdichte als die orx Kontrollgruppe, es bestanden aber keine signifikanten Unterschiede. Lediglich die kortikale Dichte der Ecd22-Gruppe war gegenüber der intakten Gruppe signifikant erhöht.

Der Effekt von Ecd auf die Dichte der Kortikalis der Tibiadiaphyse/100g Körpergewicht (3-monatiger Futtermittelsversuch an orx S.D.-Ratten)

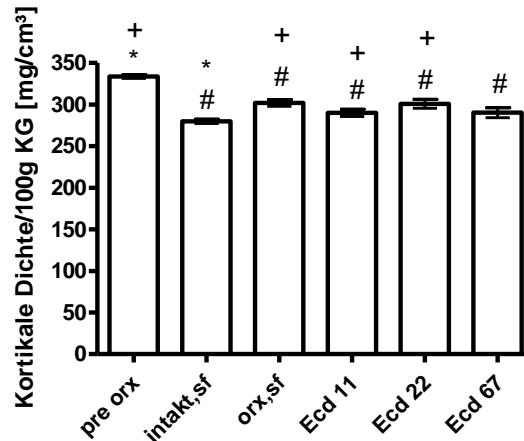


Abb. 20 # $P < 0,05$ vs pre orx; * $P < 0,05$ vs orx,sf; + $P < 0,05$ vs intakt,sf.

In Relation zum Körpergewicht kam es bei allen Gruppen zu einer signifikanten Abnahme der Kortikalisdichte. Die orx Kontrollgruppe wies eine signifikant höhere kortikale Dichte als die intakte Gruppe auf. Auch die Ecd-Gruppen 11 und 22 zeigten eine signifikant höhere Kortikalisdichte als die intakte Gruppe.

Ergebnisse

In absoluten Werten entwickelten alle männlichen Gruppen eine signifikante Zunahme der Kortikalisdichte gegenüber den Präwerten. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen der intakten Gruppe und der orx Kontrollgruppe, wengleich erstere eine tendenziell geringere Kortikalisdichte aufwies. Bei den Ecd-Gruppen zeigte lediglich die Ecd22-Gruppe in absoluten Werten eine signifikant höhere Kortikalisdichte als die intakte Gruppe, es bestanden jedoch keine relevanten Unterscheide zur orx Kontrollgruppe.

In Relation zu ihrem Körpergewicht haben allerdings alle Gruppen signifikant an Kortikalisdichte verloren. Hier wurde der Unterschied zwischen der intakten Gruppe und der orx Kontrollgruppe signifikant: letztere wies eine höhere Kortikalisdichte auf. Auch die Ecd-Gruppen 11 und 22 wiesen eine gegenüber der intakten Gruppe signifikant höhere Kortikalisdichte auf. Es bestanden in keiner Darstellungsweise signifikante Unterschiede zwischen der orx Kontrollgruppe und den Ecd-Gruppen.

Der Effekt von Ecd auf die Dichte der Kortikalis der Tibiadiaphyse (3-monatiger Futtersversuch an ovx S.D.-Ratten)

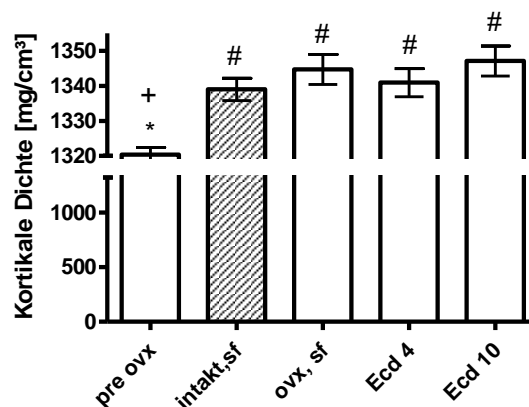


Abb. 21 #P<0,05 vs pre ovx; *P<0,05 vs ovx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf

Über den Versuchszeitraum stieg die Kortikalisdichte bei allen Gruppen signifikant. Ecd ließ keinen Einfluss auf diesen Parameter erkennen.

**Der Effekt von Ecd auf die Dichte der Kortikalis/100g Körpergewicht in der Tibiadiaphyse
(3-monatiger Futtermessung an ovx S.D.-Ratten)**

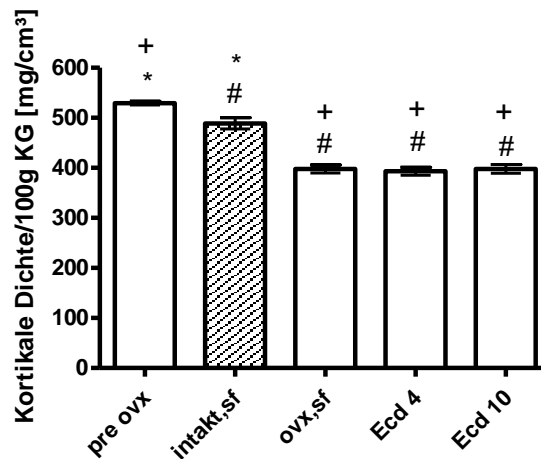


Abb. 22 #P<0,05 vs pre ovx; *P<0,05 vs ovx, sf, +P<0,05 vs intakt, sf

Bezogen auf das Körpergewicht zeigte sich eine signifikante Abnahme der kortikalen Dichte sämtlicher Gruppen, wobei die intakten Tiere eine signifikant mildere kortikale Dichteminderung zeigten als alle ovx Gruppen. Ecd hatte keinen signifikanten Einfluss auf die gewichtsrelativierte Kortikalisdichte.

Die weiblichen Tiere reagierten ähnlich wie die männlichen Tiere auf die Gonadektomie: Alle Gruppen entwickelten in absoluten Werten eine signifikant höhere Kortikalisdichte. Bezogen auf das Körpergewicht kam es jedoch ausnahmslos zu einem signifikanten Abfall der Dichte gegenüber den Präwerten. Die Ecd-Gruppen wiesen keinerlei signifikante Unterschiede zur ovx Kontrollgruppe auf. Somit hatte Ecd in den gewählten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Kortikalisdichte.

3.3.3 Fläche der Spongiosa

Der Effekt von Ecd auf die Querschnittsfläche der Spongiosa der Tibiametaphyse (3-monatiger Futtersuch an orx S.D.-Ratten)

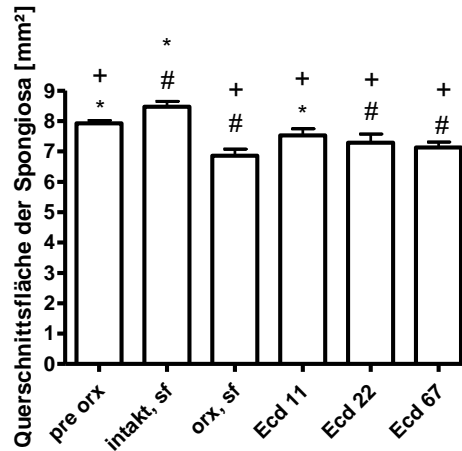


Abb. 23 #P<0,05 vs pre orx; *P<0,05 vs orx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf.

Bei den intakten Tieren kam es zu einer signifikanten Vergrößerung der Spongiosaquerschnittsfläche. Bei der orx Kontrollgruppe und den Ecd-Gruppen 22 und 67 sank die Spongiosafläche signifikant. Lediglich die Ecd-Aufnahme von 11mg/Tier/Tag milderte die Abnahme der Spongiosafläche: Sie war signifikant größer als die der orx Kontrollgruppe.

Der Effekt von Ecd auf die Querschnittsfläche der Spongiosa der Tibiametaphyse/100g Körpergewicht (3-monatiger Futtersuch an orx S.D.-Ratten)

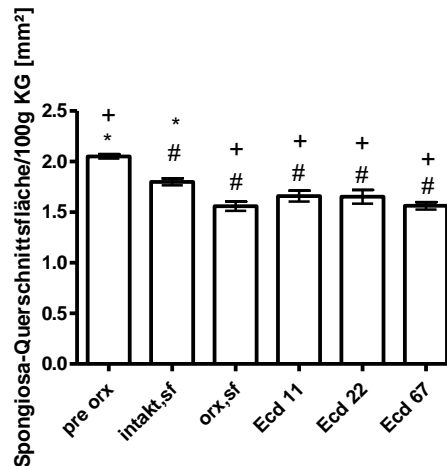


Abb. 24 #P<0,05 vs pre orx; *P<0,05 vs orx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf.

Gewichtsrelativiert kam es bei allen Gruppen zu einem signifikanten Abfall der Spongiosaquerschnittsfläche. Bei den orx Gruppen zeigte sich dieser Abfall signifikant stärker als bei der intakten Gruppe. Zwischen den Ecd-Gruppen und der orx Kontrollgruppe bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Ergebnisse

Die männlichen intakten Tiere entwickelten über den Versuchszeitraum in absoluten Werten eine signifikante Zunahme der Spongiosaquerschnittsfläche. Setzt man die Spongiosaquerschnittsfläche in Relation zum Körpergewicht der Tiere, so ergibt sich jedoch eine signifikante Reduktion dieser Fläche. In beiden Darstellungen besaß die intakte Gruppe eine signifikant größere Spongiosafläche als die orx Kontrollgruppe.

Bei allen orx Gruppen war eine signifikante Abnahme der Spongiosafläche über den Versuchszeitraum zu beobachten; mit lediglich einer Ausnahme: Die Ecd11-Gruppe zeigte in absoluten Werten keine signifikante Reduktion der Fläche gegenüber den Präwerten und wies eine signifikant größere Spongiosafläche als die orx Kontrollgruppe auf.

Der Effekt von Ecd auf die Querschnittsfläche der Spongiosa der Tibiametaphyse (3-monatiger Futtersversuch an ovx S.D.-Ratten)

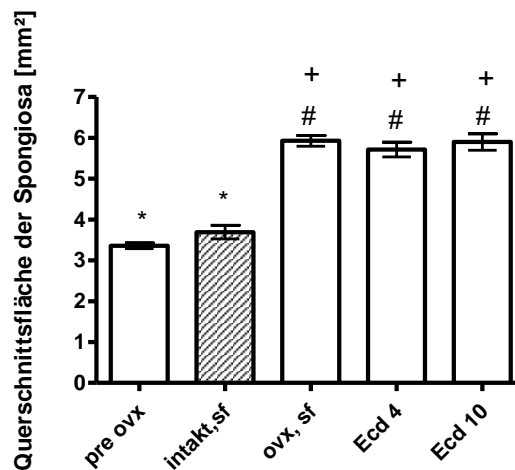


Abb. 25 # $P < 0,05$ vs pre ovx; * $P < 0,05$ vs ovx,sf; + $P < 0,05$ vs intakt,sf

Während sich die Querschnittsfläche der Spongiosa bei den intakten Tieren nicht signifikant änderte, entwickelten alle ovx Gruppen eine signifikante Vergrößerung dieser Fläche. Zwischen der ovx Kontrollgruppe und den Ecd-Gruppen bestanden keine relevanten Unterschiede.

Der Effekt von Ecd auf die Querschnittsfläche der Spongiosa/100g Körpergewicht in der Tibiametaphyse (3-monatiger Futtersuch an ovx S.D.-Ratten)

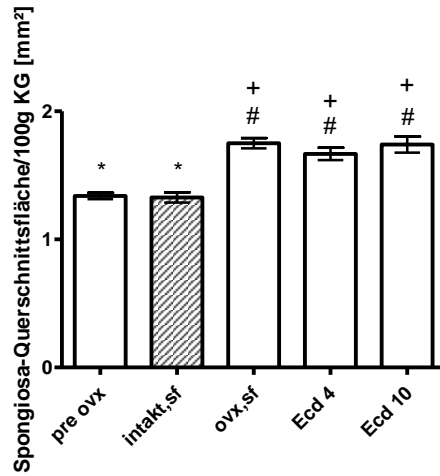


Abb. 26 #P<0,05 vs pre ovx; *P<0,05 vs ovx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf
Bei allen ovx Gruppen nahm die Spongiosafläche signifikant zu, bei den intakten Tieren blieb sie gewichtsrelativiert unverändert. Ecd hatte keinen Einfluss auf diesen Knochenparameter.

Anders als bei den männlichen Tieren entwickelten alle weiblichen Gruppen drei Monate nach der Gonadektomie eine signifikante Zunahme der Spongiosaquerschnittsfläche und zwar sowohl in absoluten Werten als auch relativ zu ihrem Gewicht. Ecd hatte in keiner der gewählten Dosierungen einen signifikanten Einfluss auf die Spongiosaquerschnittsfläche.

3.3.4 Fläche der Kortikalis

Der Effekt von Ecd auf die Querschnittsfläche der Kortikalis der Tibiadiaphyse (3-monatiger Futtersuch an orx S.D.-Ratten)

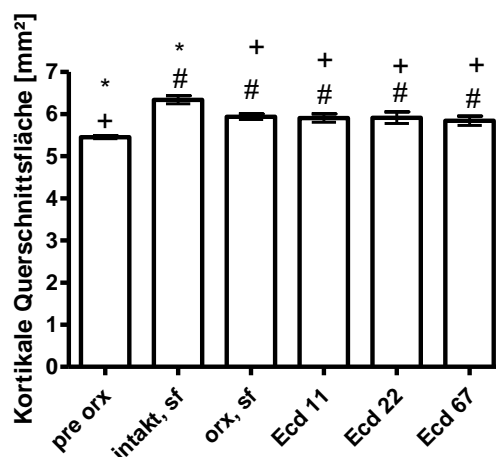


Abb. 27 #P<0,05 vs pre orx; *P<0,05 vs orx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf.
Über den Versuchszeitraum kam es bei allen Gruppen zu einer signifikanten Vergrößerung der kortikalen Querschnittsfläche, die bei den intakten Tieren signifikant am höchsten ausfiel. Ecd hatte keinen Einfluss auf die Fläche der Kortikalis.

Der Effekt von Ecd auf die Querschnittsfläche der Kortikalis der Tibiadiaphyse/100g Körpergewicht (3-monatiger Futtersversuch an orx S.D.-Ratten)

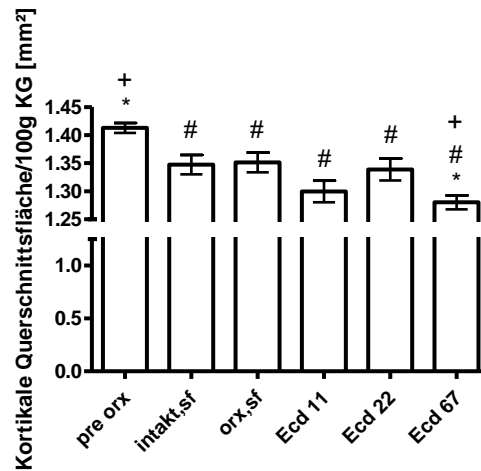


Abb. 28 #P<0,05 vs pre orx; *P<0,05 vs orx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf.

In der prozentualen Darstellung offenbarten alle Gruppen eine signifikante Reduktion der Kortikalisfläche, die bei der Ecd67-Gruppe am gravierendsten ausfiel: Hier war die Fläche sowohl gegenüber der intakten Gruppe als auch gegenüber der orx Kontrollgruppe signifikant geringer.

Über den dreimonatigen Versuchszeitraum entwickelten alle männlichen Gruppen ausnahmslos eine signifikante Zunahme der kortikalen Fläche.

In absoluten Werten war die kortikale Fläche der intakten Gruppe signifikant größer als die aller anderen männlichen Gruppen. Die Applikation von Ecd hatte in keiner der gewählten Dosierungen einen signifikanten Einfluss auf die kortikale Fläche.

In Relation zu ihrem Körpergewicht erfuhren allen Gruppen eine signifikante Abnahme der kortikalen Fläche. Diese fiel bei der Ecd67-Gruppe besonders stark aus: hier war die kortikale Fläche signifikant kleiner als die der orx Kontrollgruppe und der intakten Gruppe.

**Der Effekt von Ecd auf die Querschnittsfläche der Kortikalis der Tibiadiaphyse
(3-monatiger Futtersversuch an ovx S.D.-Ratten)**

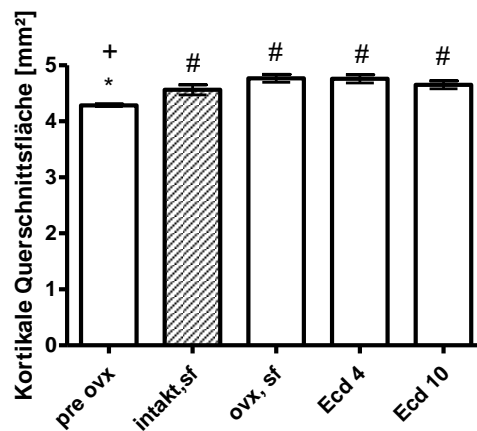


Abb. 29 #P<0,05 vs pre ovx; *P<0,05 vs ovx,sf; +P<0,05 vs intakt, sf
Alle weiblichen Gruppen entwickelten eine signifikante Vergrößerung der Kortikalisfläche. Ecd hatte in den gewählten Dosierungen keinen Einfluss auf die Kortikalisfläche.

**Der Effekt von Ecd auf die Querschnittsfläche der Kortikalis/100g Körpergewicht in der Tibiadiaphyse
(3-monatiger Futtersversuch an ovx S.D.-Ratten)**

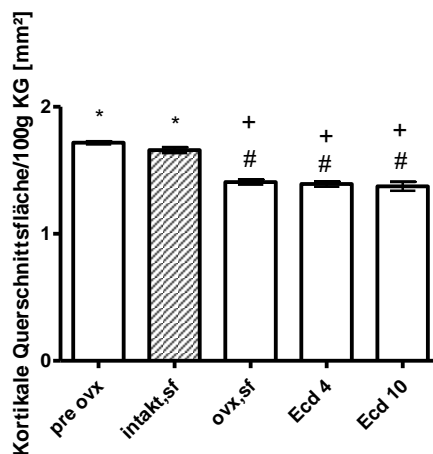


Abb. 30 #P<0,05 vs pre ovx; *P<0,05 vs ovx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf
Bezogen auf das Körpergewicht kam es bei allen ovx Gruppen zu einer signifikanten Reduktion der Kortikalisfläche, während sich die gewichtsrelatierte Fläche bei den intakten Tieren nicht signifikant änderte. Ecd hatte in den gewählten Dosierungen keinen signifikanten Effekt.

Die weiblichen Gruppen präsentierten ein den männlichen Gruppen ähnliches Bild mit einer Zunahme der Kortikalisfläche in absoluten Werten und einer Abnahme dieser Fläche in Relation zum wachsenden Körpergewicht der Tiere (mit Ausnahme der intakten weiblichen Gruppe, die in Relation zu ihrem Körpergewicht keine signifikante Reduktion der Kortikalisfläche zeigte). Ecd hatte in den gewählten Dosierungen keinen Einfluss auf die Ausdehnung der Kortikalis, denn es bestanden in keiner Darstellung signifikante Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen und der ovx Kontrollgruppe.

3.3.5 Periostaler Umfang

Der periostale Umfang wird von der Software des XCT Research Bone Scanners anhand eines Ringmodells ermittelt. Dazu errechnet das System einen Kreis, dessen Fläche der gesamten Knochenfläche (d.h. Spongiosa- und Kortikalisquerschnittsfläche addiert) entspricht. Der Umfang dieses Kreises stellt dementsprechend den periostalen Umfang dar.

**Der Effekt von Ecd auf den periostalen Umfang der Tibiametaphyse
(3-monatiger Futtersuch an orx S.D.-Ratten)**

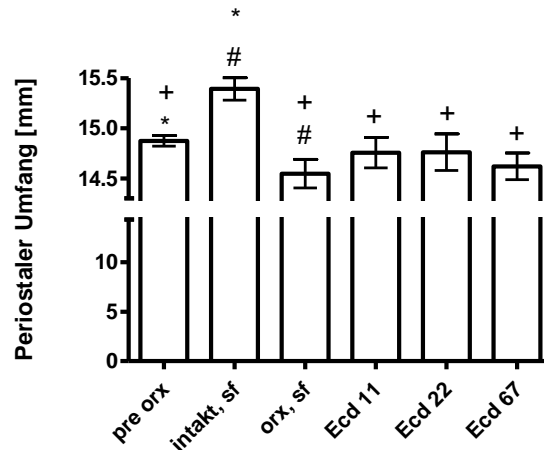


Abb.31 #P<0,05 vs pre orx; *P<0,05 vs orx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf.

Die intakten Tiere entwickelten eine signifikante Zunahme, die orx Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme des periostalen Umfangs verglichen mit den Präwerten. Die Ecd-Gruppen besaßen einen gegenüber der intakten Gruppe signifikant erniedrigten periostalen Umfang. Es bestanden keine signifikanten Abweichung der Ecd-Gruppen von der orx Kontrollgruppe oder den Vorwerten.

**Der Effekt von Ecd auf den periostalen Umfang der Tibiametaphyse/100g Körpergewicht
(3-monatiger Futtersuch an orx S.D.-Ratten)**

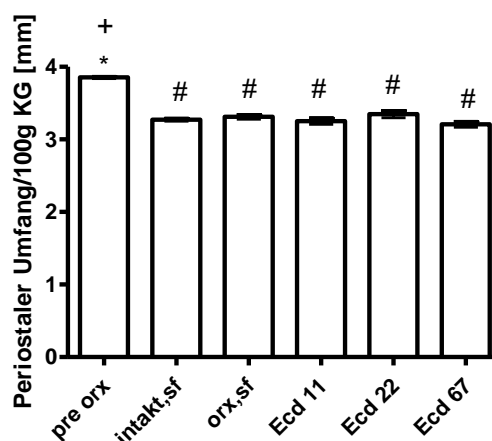


Abb. 32 #P<0,05 vs pre orx; *P<0,05 vs orx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf.

Gewichtsrelativiert kam es bei allen Gruppen zu einer signifikanten Reduktion des periostalen Umfanges. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festzustellen. Die gewählten Dosierungen von Ecd hatten keinen Einfluss auf diesen Knochenparameter.

Bei den männlichen Gruppen nahm der periostale Umfang in absoluten Werten bei der intakten Gruppe signifikant zu, bei der orx Kontrollgruppe signifikant ab. Die mit Ecd behandelten orx Gruppen wiesen einen periostalen Umfang auf, der weder von den Vorwerten noch von der orx Kontrollgruppe signifikant abwich. Die Applikation von Ecd hatte demnach keinen signifikanten Effekt. In Relation zum ihrem Körpergewicht kam es bei allen Gruppen zu einer signifikanten Verminderung des periostalen Umfangs, die bei allen Gruppen gleich stark ausfiel.

**Der Effekt von Ecd auf den periostalen Umfang der Tibiametaphyse
(3-monatiger Futtersversuch an ovx S.D.-Ratten)**

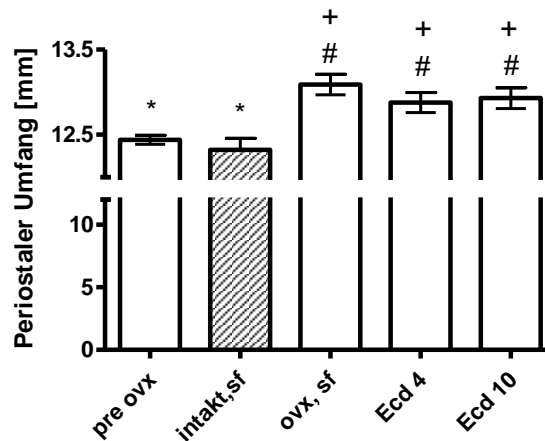


Abb. 33 #P<0,05 vs pre ovx; *P<0,05 vs ovx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf
Die OvX führte bei den entsprechenden Gruppen zu einer signifikanten Zunahme des periostalen Umfangs. Ecd zeigte keinen signifikanten Einfluss auf den periostalen Umfang.

**Der Effekt von Ecd auf den periostalen Umfang/100g Körpergewicht in der Tibiametaphyse
(3-monatiger Futtersversuch an ovx S.D.-Ratten)**

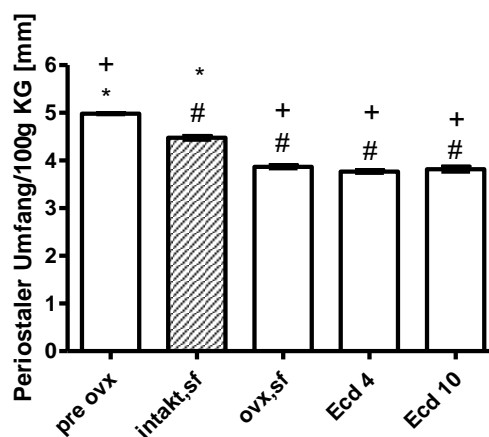


Abb. 34 #P<0,05 vs pre ovx; *P<0,05 vs ovx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf
Gewichtsrelativiert erfuhren alle Gruppen eine signifikante Reduktion des periostalen Umfangs, wobei diese bei den ovx Gruppen signifikant stärker ausfiel als bei der intakten Gruppe. Ecd hatteauch in Relation zum Gewicht der Tiere keinen signifikanten Einfluss auf den periostalen Umfang.

Alle ovx weiblichen Gruppen entwickelten in absoluten Werten eine signifikante Vergrößerung, in Relation zu ihrem Körpergewicht eine signifikante Reduktion des periostalen Umfangs. Die dreimonatige Behandlung mit Ecd führte in keiner der beiden Dosierungen zu einer signifikanten Beeinflussung des periostalen Umfangs.

3.3.6 Endostaler Umfang

Der endostale Umfang wird ähnlich wie der periostale Umfang anhand des Ringmodells von der Software ermittelt. Dazu wird von dem errechneten Kreis, der die gleiche Fläche aufweist wie der gesamte Querschnitt des Knochens, die Fläche der Kortikalis subtrahiert. Die Fläche des nun entstandenen Kreises entspricht der Spongiosaquerschnittsfläche und ihr Umfang dem endostalen Umfang.

Der Effekt von Ecd auf den endostalen Umfang der Tibiametaphyse (3-monatiger Futtermessung an orx S.D.-Ratten)

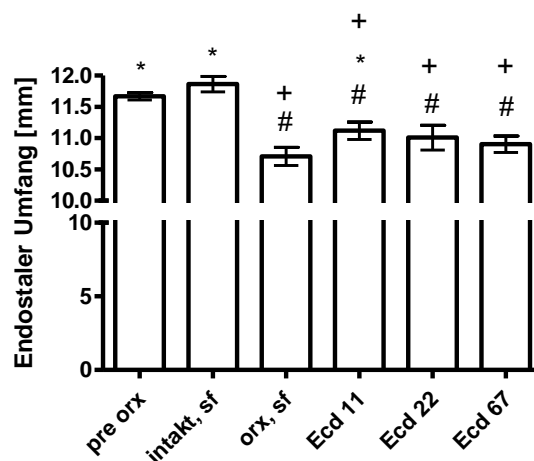


Abb. 35 #P<0,05 vs pre orx; *P<0,05 vs orx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf.

Bei den intakten Tieren kam es zu keiner relevanten Änderung des endostalen Umfangs. Die Orx führte bei der orx Kontrollgruppe und den Ecd-Gruppen zu einer signifikanten Abnahme des endostalen Umfangs sowohl gegenüber den Ausgangswerten als auch gegenüber den intakten Tieren. Die Ecd-Aufnahme von 11mg/Tier/Tag minderte die Orx-bedingte Abnahme des Umfangs signifikant.

**Der Effekt von Ecd auf den endostalen Umfang der Tibiametaphyse/100g Körpergewicht
(3-monatiger Futtermessung an orx S.D.-Ratten)**

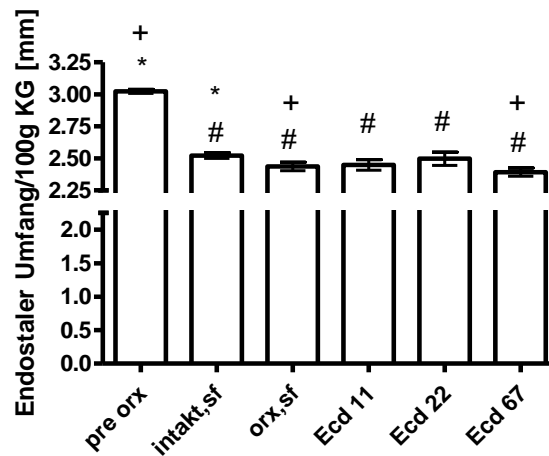


Abb. 36 # $P < 0,05$ vs pre orx; * $P < 0,05$ vs orx, sf; + $P < 0,05$ vs intakt, sf.

Gewichtsrelativiert kam es bei allen Gruppen ausnahmslos zu einer Reduktion des endostalen Umfangs. Die intakten Tiere haben einen signifikant größeren endostalen Umfang als die orx Kontrollgruppe und die Ecd67-Gruppe.

Nach drei Monaten entwickelten alle orx Tiere eine signifikante Verkleinerung des endostalen Umfangs. In absoluten Werten konnte Ecd in der niedrigsten Dosierung von 11mg/Tier/Tag eine signifikante Minderung des Umfangsverlustes gegenüber der orx Kontrollgruppe erzielen.

Bezogen auf das Körpergewicht erfuhren alle männlichen Gruppen eine signifikante Abnahme des endostalen Umfangs. Jene fiel bei der orx Kontrollgruppe und der Ecd67-Gruppe am stärksten aus, sodass diese Gruppen einen gegenüber den intakten Tieren signifikant verminderten endostalen Umfang aufwiesen. Die Ecd-Aufnahme von 11mg/Tier/Tag und 22mg/Tier/Tag führte zu einer Abmilderung des endostalen Umfangsverlustes dahingehend, dass hier keine signifikanten Unterschiede zur intakten Gruppe vorlagen.

**Der Effekt von Ecd auf den endostalen Umfang der Tibiametaphyse
(3-monatiger Futtersuch an ovx S.D.-Ratten)**

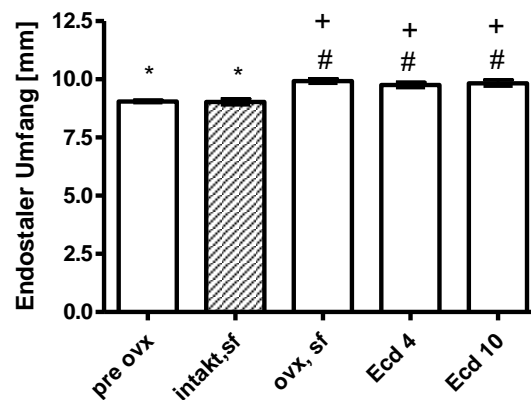


Abb. 37 #P<0,05 vs pre ovx; *P<0,05 vs ovx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf
Über den dreimonatigen Versuchszeitraum entwickelten alle Gruppen eine signifikante Zunahme des endostalen Umfangs. Ecd hatte hier keinen signifikanten Einfluss.

**Der Effekt von Ecd auf den endostalen Umfang/100g Körpergewicht in der Tibiametaphyse
(3-monatiger Futtersuch an ovx S.D.-Ratten)**

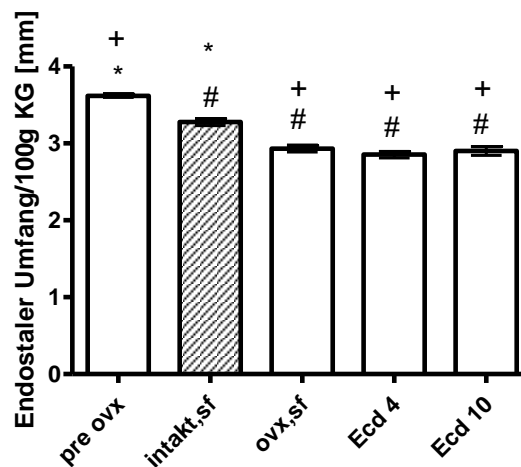


Abb. 38 #P<0,05 vs pre ovx; *P<0,05 vs ovx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf
Gewichtsrelativiert kam es bei allen Gruppen zu einer signifikanten Verminderung des endostalen Umfangs. Beide Ecd-Gruppen wiesen keinen signifikanten Unterschied zu der ovx Kontrollgruppe auf.

Drei Monate nach der Ovx hatten alle weiblichen Gruppen eine signifikante Zunahme des endostalen Umfangs entwickelt. In Relation zu ihrem Körpergewicht kam es hingegen bei allen ovx Tieren zu einer signifikanten Reduktion desselben. Ecd hat in den gewählten Dosierungen keinen signifikanten Einfluss auf diesen Knochenparameter.

3.3.7 Polares Widerstandsmoment

Mit Hilfe der Software (XCT 5.40, Fa. Stratec, Pforzheim) lässt sich auf der Basis der Daten für die Gesamtfläche der Tibia das polare Widerstandsmoment berechnen. Es gibt Auskunft über den Widerstand, den die Tibia mit gegebenem Querschnitt einer einwirkenden Torsion entgegenbringt.

Der Effekt von Ecd auf das polare Widerstandsmoment der Tibiametaphyse (3-monatiger Futtersuch an orx S.D.-Ratten)

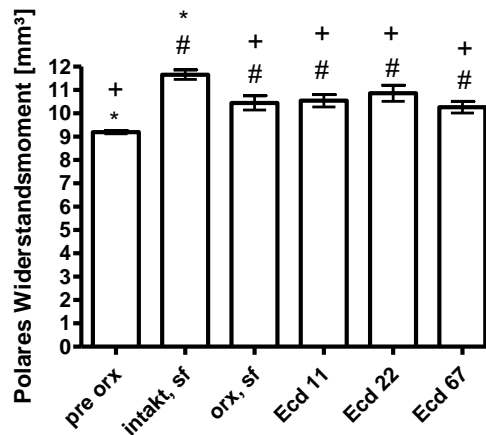


Abb. 39 #P<0,05 vs pre orx; *P<0,05 vs orx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf.

Das polare Widerstandsmoment nahm bei allen Gruppen signifikant zu. Besonders ausgeprägt war diese Entwicklung bei den intakten Tieren- ihr Widerstandsmoment war signifikant am größten. Die mit Ecd behandelten Gruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede zur orx Kontrollgruppe auf.

Der Effekt von Ecd auf das polare Widerstandsmoment der Tibiametaphyse/100g Körpergewicht (3-monatiger Futtersuch an orx S.D.-Ratten)

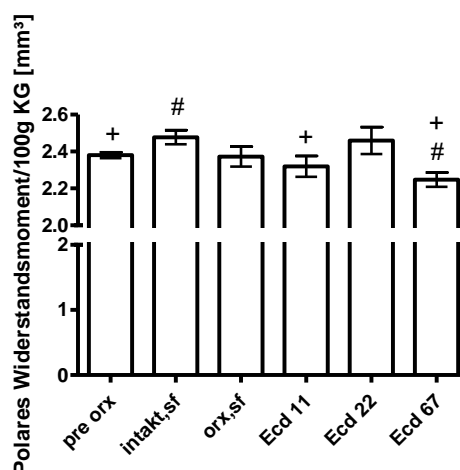


Abb.40 #P<0,05 vs pre orx; *P<0,05 vs orx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf.

In Relation zum Körpergewicht hatte sich das Widerstandsmoment nach drei Monaten bei zwei Gruppen signifikant verändert: bei den intakten Tieren war es signifikant gestiegen, bei der Ecd67-Gruppe signifikant gefallen. Die Ecd-Gruppen 11 und 67 wiesen ein gegenüber den intakten Ratten signifikant erniedrigtes polares Widerstandsmoment auf.

Es war bei allen männlichen Gruppen eine Zunahme des polaren Widerstandsmomentes zu beobachten, die bei den intakten Tieren signifikant stärker ausfiel als bei allen anderen Gruppen. Die Behandlung mit Ecd führte in keiner der gewählten Dosierungen zu einer signifikanten Beeinflussung des polaren Widerstandsmomentes.

In Relation zum Körpergewicht steigerten die intakten Tiere ihr polares Widerstandsmoment signifikant, wohingegen bei der orx Kontrollgruppe und den beiden mit den niedrigen Ecd-Dosen behandelten Gruppen keine Veränderung gegenüber den Vorwerten zu beobachten war. Die Behandlung mit Ecd in der höchsten Dosierung von 67mg/Tier/Tag führte gewichtsrelativiert jedoch zu einem polaren Widerstandsmoment, das signifikant unter jenes zu Versuchsbeginn sank.

**Der Effekt von Ecd auf den polaren Widerstandsmoment der Tibiametaphyse
(3-monatiger Futtersversuch an ovx S.D.-Ratten)**

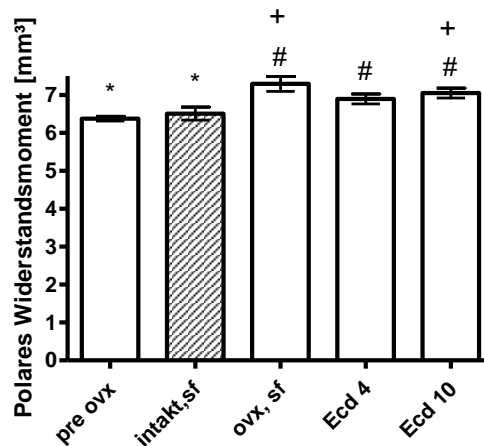


Abb. 41 #P<0,05 vs pre ovx; *P<0,05 vs ovx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf

Bei allen ovx Gruppen nahm das polare Widerstandsmoment signifikant zu. Ecd hatte in den gewählten Dosierungen keinen signifikanten Einfluss auf diesen Knochenparameter, wenngleich die beiden behandelten Gruppen ein tendenziell geringeres polares Widerstandsmoment als die ovx Kontrollgruppe aufwiesen. Bei den intakten Tieren blieb das polare Widerstandsmoment gegenüber den Vorwerten unverändert.

Der Effekt von Ecd auf das polare Widerstandsmoment/100g Körpergewicht in der Tibiametaphyse (3-monatiger Futtersversuch an ovx S.D.-Ratten)

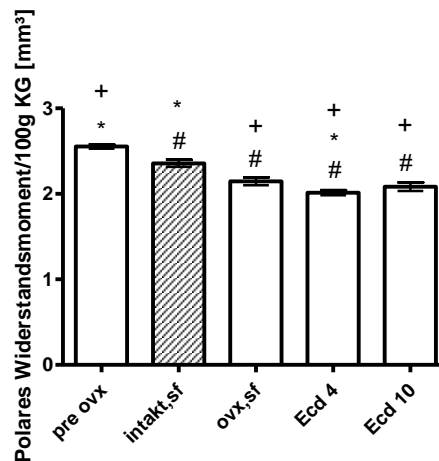


Abb. 42 #P<0,05 vs pre ovx; *P<0,05 vs ovx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf

In Relation zu ihrem Körpergewicht entwickelten alle Gruppen eine signifikante Abnahme des polaren Widerstandsmomentes. Die Behandlung mit Ecd in der niedrigsten Dosierung von 4mg/Tier/Tag führte gewichtsrelativiert zu einem gegenüber der ovx Kontrollgruppe signifikant geminderten polaren Widerstandsmoment.

Alle weiblichen ovx S.D.-Ratten entwickelten über den dreimonatigen Versuchszeitraum ein gegenüber den Vorwerten signifikant erhöhtes polares Widerstandsmoment. In Relation zu ihrem wachsenden Körpergewicht kam es jedoch bei diesen Gruppen zu einer signifikanten Minderung dieses Knochenparameters gegenüber den Vorwerten. Die Applikation von Ecd in der niedrigsten Dosierung von 4 mg/Tier/Tag hatte in der gewichtsrelativierten Darstellung ein am Versuchsende gegenüber der ovx Kontrollgruppe signifikant gemindertes polares Widerstandsmoment zur Folge.

3.3.8 Anteil der Trabekel an der Spongiosaquerschnittsfläche

Der prozentuale Anteil der Trabekel an der Spongiosaquerschnittsfläche wurde, basierend auf den computertomographisch gewonnenen Daten für die Spongiosa- und Kortikalisdichte, nach folgender Formel berechnet:

$$\text{(Spongiosadichte Slice 1 / Kortikalisdichte Slice 3) x 100 = \% - \text{Anteil der Trabekel an der Spongiosaquerschnittsfläche}}$$

bzw.

$$\text{(Spongiosadichte Slice 2 / Kortikalisdichte Slice 3) x 100 = \% - \text{Anteil der Trabekel an der Spongiosaquerschnittsfläche}}$$

Der Effekt von Ecd auf den %-Anteil der Trabekel an der Spongiosaquerschnittsfläche (3-monatiger Futtersversuch an orx S.D.-Ratten)

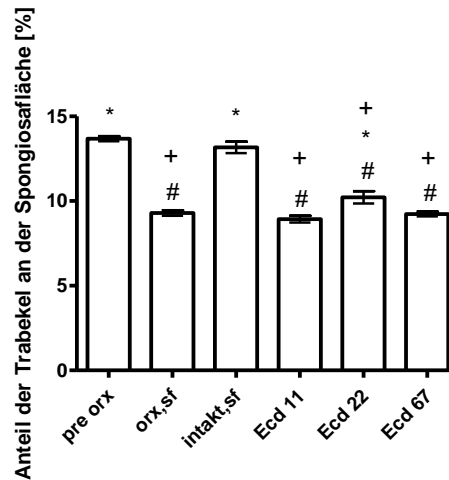


Abb. 43 #P<0,05 vs pre orx; *P<0,05 vs orx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf.

Die Orx induzierte eine signifikante Reduktion des Trabekelanteiles bei allen orx Gruppen. Die intakten Tieren zeigen keine signifikante Änderung des Anteils der Trabekel an der Spongiosa über den dreimonatigen Versuchszeitraum. Die Ecd-Aufnahme von 22mg/Tier/Tag konnte die Reduktion des Trabekelanteiles signifikant gegenüber der orx Kontrollgruppe mindern.

Der Effekt von Ecd auf den %-Anteil der Trabekel an der Spongiosaquerschnittsfläche (3-monatiger Futtersversuch an ovx S.D.-Ratten)

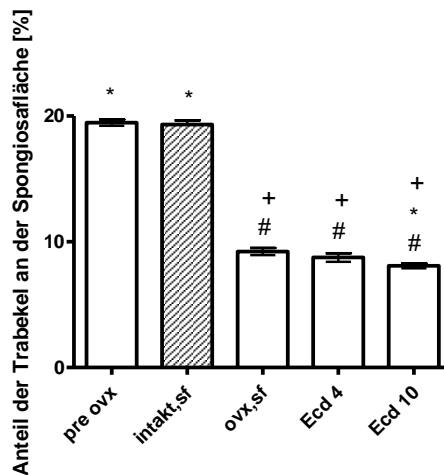


Abb. 44 #P<0,05 vs pre ovx; *P<0,05 vs ovx,sf; +P<0,05 vs intakt,sf

Nach der OvX reduzierte sich der Anteil der Trabekel an der Spongiosafläche bei allen ovx Gruppen signifikant. Bei der intakten Gruppe änderte sich der Trabekelanteil gegenüber den Vorwerten nicht signifikant. Die Ecd10-Gruppe zeigt einen gegenüber der ovx Kontrollgruppe signifikant reduzierten Anteil an Trabekeln.

Bei beiden Geschlechtern reduzierte sich der Anteil der Trabekel an der Spongiosaquerschnittsfläche nach der Gonadektomie signifikant.

Ergebnisse

Bei den Männchen vermochte Ecd in der mittleren Dosierung von 22 mg/Tier/Tag diesen Prozess signifikant gegenüber der orx Kontrollgruppe zu mindern, wenngleich nicht das Niveau der intakten Tiere erreicht wurde.

Bei den Weibchen zeigte die mit der höheren Dosis von 10 mg/Tier/Tag behandelte ovx Gruppe einen gegenüber der ovx Kontrollgruppe signifikant geminderten Trabekelanteil.

3.4 Serumparameter

Als Ergänzung zu den computertomographisch gewonnenen Daten und um einen Einblick in den Metabolismus des Knochens zu erlangen, wurden aus dem bei der Obduktion gewonnenen Blut nachfolgende Serumparameter des Knochenaufbaus (Osteokalzin und Osteoprotegerin) und -abbaus (RatLaps und RANK-L) bestimmt.

3.4.1 Osteokalzin

Osteokalzin ist ein von Osteoblasten gebildetes Peptidhormon der Knochenmatrix, welches Kalzium bzw. Hydroxylapatit bindet. Es stellt einen spezifischen Marker für die osteoblastische Aktivität und somit der Knochenneubildung dar und wird bereits in der Osteoporosedagnostik genutzt.

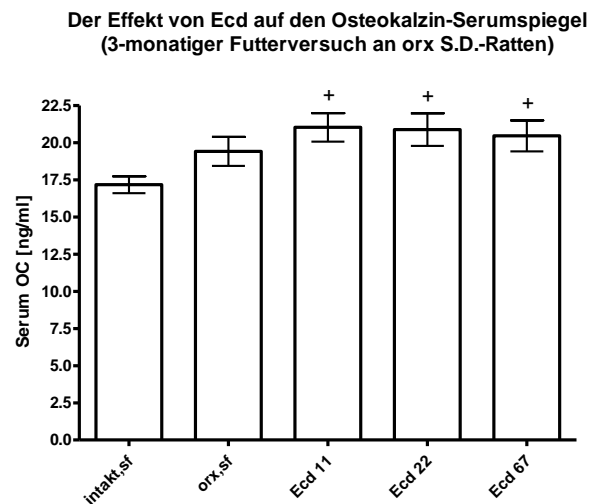


Abb. 45 +P<0,05 vs intakt, sf

Die Behandlung mit Ecd führte in allen gewählten Dosierungen zu einer signifikanten Erhöhung der Serum-Osteokalzinspiegel gegenüber der intakten Gruppe; signifikante Unterschiede zu der orx Kontrollgruppe bestanden jedoch nicht.

Ergebnisse

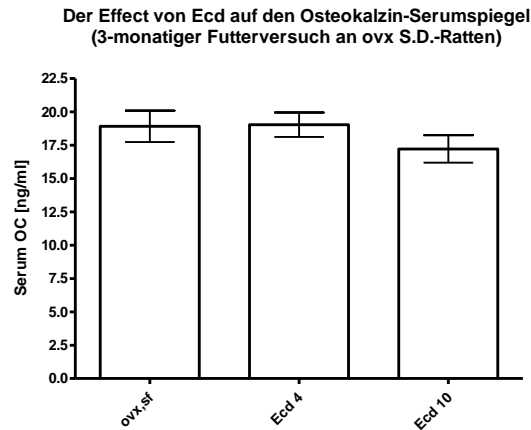


Abb. 46 Bei den Weibchen hatte Ecd in den gewählten Dosierungen keinen signifikanten Effekt auf den Serum-Osteoklazinspiegel.

3.4.2 RatLaps

Beim Abbau des knochenspezifischen Typ-I- Kollagens durch die Osteoklasten entstehen C-terminale Telopeptide, die mittels ELISA im Serum bestimmt werden können. Diese sog. RatLaps geben somit Auskunft über die Osteoklastenaktivität.

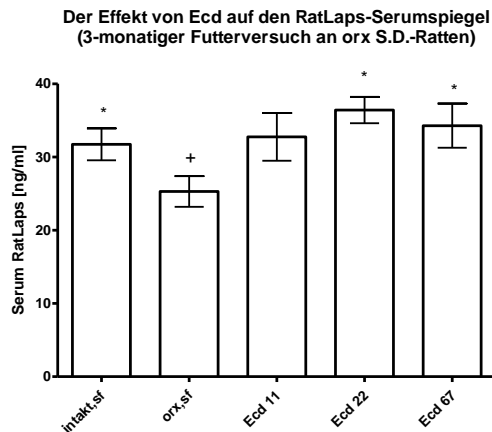


Abb. 47 * $P < 0,05$ vs orx,sf; + $P < 0,05$ vs intakt,sf

Ecd bewirkte in den beiden höheren Dosierungen von 22 und 67 mg/Tier/Tag einen signifikant erhöhten, die Dosierung von 11 mg/Tier/Tag einen tendenziell erhöhten Serum-RatLaps-Spiegel gegenüber der orx Kontrollgruppe. Alle drei behandelten Gruppen lassen keinen signifikanten Unterschied zur den intakten Tieren erkennen.

Ergebnisse

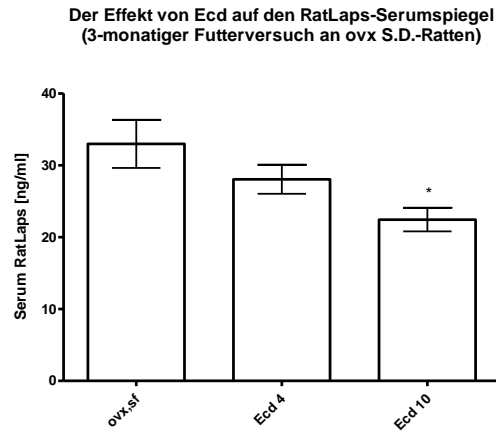


Abb. 48 * $P < 0,05$ vs ovx,sf

Die Applikation von Ecd in der Dosierung 10 mg/Tier/Tag hatte signifikant erniedrigte Serum-RatLaps-Spiegel gegenüber der ovx Kontrollgruppe zur Folge. Die niedrigste Dosis Ecd von 4 mg/Tier/Tag schien ebenfalls einen supprimierenden Effekt auf den Serum-RatLaps-Spiegel zu haben, wenngleich dieser nicht signifikant gegenüber der ovx Kontrollgruppe ausfiel.

3.4.3 RANK-L

RANK-L (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) wird u.a. von Osteoblasten sezerniert und löst durch Bindung an seinen Rezeptor RANK, der von monozytären Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimiert wird, deren Differenzierung zu reifen Osteoklasten aus.

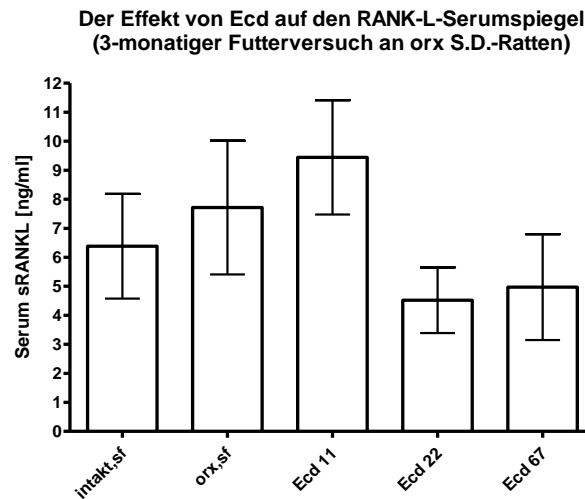


Abb. 49 Die Ecd11-Gruppe wies einen gegenüber der orx Kontrollgruppe und den intakten Tieren tendenziell erhöhten RANK-L-Serumspiegel auf. Eine höhere Dosierung von 22 und 67 mg/Tier/Tag führte dagegen zu erniedrigten RANK-L-Serumspiegeln, die unter dem Niveau der orx Kontrollgruppe und auch der intakten Tiere lagen. Zwischen den einzelnen Gruppen fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

Ergebnisse

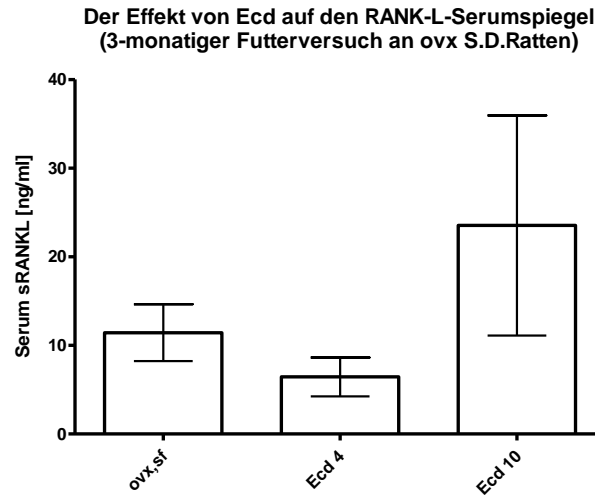


Abb. 50 Die Applikation von Ecd hatte bei den Weibchen in den gewählten Dosierungen keinen signifikanten Einfluss auf den RANK-L-Serumspiegel.

3.4.4 Osteoprotegerin

Osteoprotegerin, ein von Osteoblasten synthetisiertes Protein, agiert als sog. Täuschungsrezeptor für RANK. Durch seine Bindung an den Rezeptor verhindert es die Differenzierung der monozytären Osteoklastenvorläufer zu reifen Osteoklasten und hemmt somit die Osteolyse.

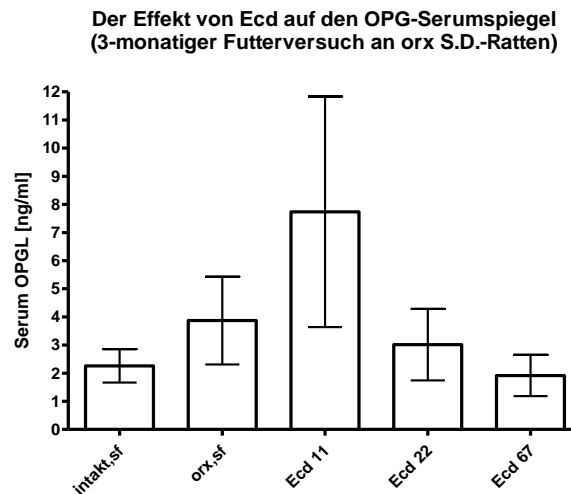


Abb. 51 Die intakte Gruppe wies tendenziell niedrigere OPG-Serumspiegel auf als die orx Kontrollgruppe. Die niedrigste Dosis Ecd von 11 mg/Tier/Tag führte eher zu gegenüber der orx Kontrollgruppe erhöhten OPG-Serumspiegeln. Es bestanden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Gruppen.

Ergebnisse

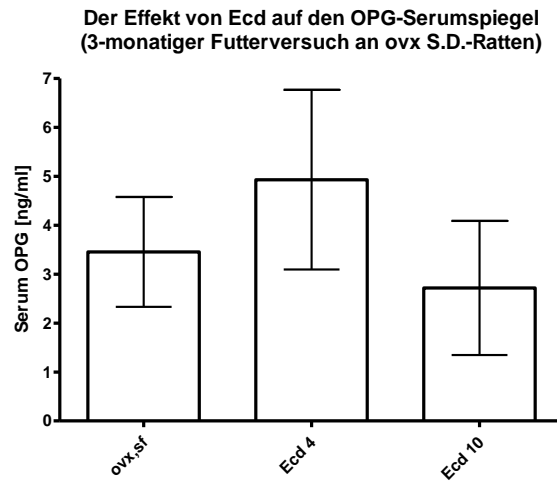


Abb. 52 Bei den Weibchen hatte Ecd in keiner Dosierung einen signifikanten Effekt auf den OPG-Spiegel.

4 Diskussion

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, die Wirkung von Ecdin zwei bzw. drei niedrigen Dosierungen auf den Gonadektomie-induzierten Knochenverlust der weiblichen und männlichen S.D.-Ratte zu untersuchen. Hat Ecd hier osteoprotektive Eigenschaften? Um dieser Fragestellung gerecht zu werden, wurde mit der Applikation von Ecd unmittelbar nach der Gonadektomie, folglich noch vor Einsetzen des Knochenverlustes, begonnen.

Es existieren gegenwärtig wenige Studien, die sich mit den Effekten von Ecd auf den Knochen befassen. Mehrheitlich handelt es sich dabei um in-vitro-Versuche. So konnten Gao L et al. 2008 nachweisen, dass Ecd die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen fördert. Ebenfalls unter in-vitro-Bedingungen konnten Gao X et al. im Jahre 2000 zeigen, dass Ecd die Proliferation von Ratten-Osteoblasten um 41% steigern kann. Neben den ohnehin schon wenigen in-vitro-Untersuchungen sind in der Literatur nur ein paar Studien bekannt, die sich mit den Effekten von Ecd auf den Knochen in vivo beschäftigen. Eine davon entstammt der Arbeitsgruppe Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen.

Die Arbeitsgruppe Endokrinologie befasste sich bereits 2007 mit der Wirkung von Ecd auf den Knochen der weiblichen ovx Ratte. Dabei war von vorrangigem Interesse, ob Ecd einen osteoprotektiven Effekt auf den Ovx-induzierten Knochenverlust ausübt. Bei dem in diesem Zusammenhang durchgeführten Futtersuch an weiblichen ovx S.D.-Ratten wurde Ecd in den Dosierungen 1, 3 und 6g/kg Futter direkt nach der Gonadektomie über einen Zeitraum von drei Monaten verabreicht. Für Ecd konnten in allen drei Dosierungen eine partielle Abmilderung des Knochenverlustes nachgewiesen werden, wobei sich die mittlere Dosis in der Aufrechterhaltung der Spongiosadichte effektiver zeigte als die höchste (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b).

Aus diesen ermutigenden Ergebnissen ergab sich das Konzept für den Versuchsarm mit weiblichen Tieren der vorliegenden Studie. Er ist somit als Fortführung des Futtersuches von 2007 anzusehen. Hier sollte nun geprüft werden, ob Ecd in den niedrigeren Dosierungen von 0,2 und 0,5 g/kg Futter einen osteoprotektiven Effekt auf den Knochen der weiblichen ovx S.D.-Ratten auszuüben vermag.

Die Erforschung von Ecd im Hinblick auf einen möglichen osteoprotektiven Effekt bei der männlichen Ratte ist ein Novum. Hinsichtlich der steigenden Prävalenz der Osteoporose des Mannes, der höheren Morbidität und Mortalität von männlichen Osteoporose-Patienten (Schürch et al. 1996, Center et al. 1999) verglichen mit dem weiblichen Geschlecht und nicht zuletzt aufgrund der wenigen medikamentösen Therapieoptionen ist die Erforschung neuer Substanzen, die in der Prophylaxe und Behandlung der männlichen Osteoporose eingesetzt werden können, zunehmend in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt. Die „klassische“ Hormontherapie des Mannes mit Testosteron ist weitaus weniger erforscht als die der Frau mit Östrogenen und Gestagenen. Ferner ist die Substitution von Testosteron mit Risiken wie der Entstehung eines Prostatakarzinoms behaftet, weshalb ihre Indikation

streng zu stellen ist. Aus diesem Grund steigt das Interesse an Substanzen, die hormonähnliche Wirkung aufweisen, ohne jedoch mit den für Hormone typischen Nebenwirkungen einherzugehen. Einer wirksamen Prophylaxe gegen den altersbedingten Knochenverlust kommt dabei ein besonders hoher Stellenwert zu. Denn nur so lassen sich Frakturen und die damit einhergehenden hohen sozioökonomischen Folgekosten der Osteoporose verhindern. Ferner gilt es zu bedenken, dass bereits das Vorliegen einer Osteoporose ohne Fraktur die Lebensqualität des Betroffenen stark beeinträchtigen kann, da sie oft zu Schmerzen, Immobilität und draus resultierendem sozialem Rückzug führt (Jahelka et al. 2009).

In der Literatur ist bereits bekannt, dass Ecd neben den Effekten auf den Knochen auch auf andere Gewebe wie Fett und Muskeln Einfluss nimmt (Báthori et al. 2008, Seidlová-Wuttke et al. 2010 a). Der Knochen ist als Teil einer muskuloskeletalen Einheit zu sehen, bei der er in ständiger Wechselwirkung mit den ihn umgebenden Weichteilen steht (Frost 1997). Deshalb muss berücksichtigt werden, dass sich Effekte von Ecd auf das Fett- und Muskelgewebe indirekt auch auf den Knochen auswirken können. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie zusätzlich der Einfluss von Ecd auf das Körpergewicht und die Futteraufnahme der S.D.-Ratten untersucht. Um eine Darstellung der Knochenparameter zu erhalten, die unabhängig vom Körpergewicht ist, wurde jeder absolute Messwert auch in Relation zum Körpergewicht des Tieres (pro 100g) angegeben.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen einen osteoprotektiven Effekt von Ecd auf den Knochen der männlichen orx S.D.-Ratte. Neben einer signifikanten Milderung des Orx-induzierten Knochenverlustes führte die mittlere Dosis von 22 mg Ecd/Tier/Tag zu einer signifikanten Steigerung des Trabekelanteiles an der Spongiosaquerschnittsfläche gegenüber der orx Kontrollgruppe und erwies sich somit als effizienteste Dosierung.

Die Ergebnisse des weiblichen Versuches zeigten, dass die niedrigen Ecd-Dosen von 4 und 10 mg/Tier/Tag nicht ausreichten, um einen signifikanten osteoprotektiven Effekt auf den Ovx-induzierten Knochenverlust der weiblichen S.D.-Ratte zu erzielen, wie er mit den höheren Dosierungen des Vorversuches beobachtet werden konnte.

Körpergewicht und Delta-Körpergewicht

Um Irritationen der Tiere zu vermeiden, die sich auf die Futter- und somit auf die Substanzaufnahme auswirken könnten, wurde das Körpergewicht der S.D.-Ratten vorwiegend im Zuge von größeren, durch den Versuchsaufbau vorgegebenen Manipulationen wie den pQCT-Messungen, der Gonadektomie und der Obduktion, insgesamt zu fünf Zeitpunkten, bestimmt.

Dabei zeigte sich, dass alle männlichen Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum an Körpergewicht zunahmten, wobei die Gewichtszunahme der orx Tiere milder ausfiel als die der intakten Gruppe, sodass die intakten männlichen Tiere am Ende des Versuches signifikant mehr wogen als alle anderen Gruppen. Es ist bereits aus mehreren Studien bekannt, dass eine Orx die

physiologische Gewichtssteigerung der männlichen Ratten in diesem Alter inhibiert, weshalb die gonadektomierten Tiere in der Regel signifikant weniger wiegen als ihre intakten Artgenossen (Erben et al. 2000, Ke et al. 2001). Die genannten Beobachtungen spiegeln sich im Delta-Körpergewicht wider: Die intakten männlichen Tiere nahmen über den Versuchszeitraum mit +93g signifikant mehr zu als alle anderen männlichen Gruppen, deren Delta-Körpergewicht zwischen 66g und 67g lag. Die Applikation von Ecd hatte in den gewählten Dosierungen keinen Einfluss auf die Entwicklung des Körpergewichtes der orx S.D.-Ratten.

Konträr zu den Männchen induziert die Gonadektomie bei den Weibchen in der Regel eine signifikante Gewichtszunahme (Wronski et al. 1985, 1987, Seidlová-Wuttke et al. 2008 a). Auch in der vorliegenden Studie ließ sich eine Ovx-bedingte Gewichtssteigerung beobachten. Das Delta-Körpergewicht der weiblichen ovx Gruppen betrug zwischen 95 und 99g und war somit signifikant höher als das der intakten Tiere. Ecd hatte in den gewählten Dosierungen auch bei den weiblichen S.D.-Ratten keinen signifikanten Einfluss auf die Gewichtsentwicklung und das Delta-Körpergewicht.

Futteraufnahme

In einer sechswöchigen Eingewöhnungsphase, zwischen ihrer Ankunft im Tierstall und dem Versuchsbeginn, erhielten alle S.D.-Ratten phytoöstrogenarmes Futter. Bei diesem Spezialfutter wurden die Soja- durch Kartoffelproteine ersetzt, da Soja u.a. Isoflavone enthält, die bereits eine östrogene Wirkung auf den Organismus ausüben und somit zu einer Verfälschung unserer Ergebnisse bezüglich des Knochens hätten führen können (Degen et al. 2002).

Bei den orx Männchen erreichte die Futteringestion unter Ecd das Niveau der intakten Tiere. Interessanterweise sind, bei gleicher Futteraufnahme, die mit Ecd behandelten männlichen Gruppen am Versuchsende signifikant leichter als die intakten Tiere. Diese Beobachtung steht in Widerspruch zu den Erfahrungen der ehemaligen Sowjetunion, die Ecdysterioide in der Rinderzucht einsetzten, um ein höheres Körpergewicht bei geringerer Futteraufnahme zu erzielen (Báthori und Pongrácz 2005). Andererseits ist in der Literatur bereits bekannt, dass Ecdysterioide durch eine Stimulation der Proteinsynthese in der Lage sind, die „lean body mass“ (Körpermasse abzüglich Fettmasse) zu erhöhen sowie die Muskelmasse und -kraft zu verbessern (Chermnykh et al. 1988, Lafont und Dinan 2003). Denkbar wäre, dass die Applikation von Ecd bei den männlichen orx Ratten zu einer vermehrten Umsetzung des Futters in Muskel- statt in Fettmasse führte. Durch eine höhere Muskelmasse der mit Ecd behandelten Tiere ließe sich ihr gesteigerter Futterverbrauch gegenüber den intakten Tieren erklären. Die Muskelmasse des Unterschenkels sowie das paratibiale Fettdepot wurden im Rahmen der vorliegenden Studie ebenfalls computertomographisch ermittelt, sie sind jedoch nicht Gegenstand dieser Dissertation. Eine Synopsis aller Studienresultate wäre allerdings wünschenswert, um eine genauere Aussage über den Effekt von Ecd auf die Umsetzung des Futters treffen zu können.

Bei den ovx Weibchen ließ die Applikation von Ecd in den weitaus niedrigeren Dosierungen keinen signifikanten Einfluss auf die über den Versuchszeitraum gemittelte Futteraufnahme erkennen.

Diskussion

Nichtsdestotrotz ist den vorliegenden Daten zu entnehmen, dass Ecd die Futteraufnahme unmittelbar nach einem körperlichen Eingriff, wie ihn die Gonadektomie darstellt, stimuliert. Die unbehandelten ovx bzw. orx Kontrollgruppen reagierten indes mit einer reduzierten bzw. unveränderten Futteraufnahme auf den operativen Eingriff. Möglich ist, dass die Behandlung mit Ecd die Verträglichkeit der Operation verbesserte, sodass die behandelten Tiere nach dem Eingriff ein größeres Wohlbefinden und deshalb einen gesteigerten Appetit aufwiesen als ihre unbehandelten Artgenossen. Auf der Basis der bisher in der Literatur beschriebenen Eigenschaften der Ecdysteroide ließe sich eine verbesserte Bewältigung der Operation dadurch erklären, dass sie die allgemeine Leistungsfähigkeit steigern, weshalb sie bereits seit Jahrhunderten als „Stärkungsmittel“ eingesetzt werden (Chermnykh et al. 1988). Ferner wirken sich Ecdysteroide verkürzend auf die Wundheilung aus (Detmar 1994 zitiert aus Lafont und Dinan 2003). Nicht auszuschließen ist auch, dass das Ecd-haltige Futter einen besseren Geschmack aufwies als das phytoöstrogenarme Futter und deshalb von den Ratten bevorzugt wurde. Letzten Endes kann auf der Basis der Literatur nur spekuliert werden und es ist hier nicht eindeutig zu klären, warum Ecd die Futteraufnahme nach der Gonadektomie anregte.

Um eine genauere Aussage darüber treffen zu können, inwiefern das aufgenommene Futter in eine Gewichtszunahme umgesetzt worden ist, wurde die sogenannte effektive Futteraufnahme ermittelt. Sie setzt die über den Versuchszeitraum gemittelte Futteraufnahme in Relation zum Delta-Körpergewicht der Tiere. Je kleiner der Wert für die effektive Futteraufnahme, desto weniger Futter wird benötigt, um eine gewisse Gewichtszunahme zu erreichen. Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass die mit Ecd behandelten Männchen mehr Futter benötigten als die orx Kontrollgruppe, um eine gewisse Gewichtsteigerung zu erzielen. Die intakten männlichen Tiere wiesen den niedrigsten Wert für die effektive Futteraufnahme auf. Somit setzten sie das aufgenommene Futter am besten in eine Gewichtszunahme um. Diese Beobachtung steht in Einklang mit der oben beschriebenen Feststellung, dass die behandelten Tiere bei gleicher Futteraufnahme signifikant weniger wiegen als die intakten Tiere.

Bei den weiblichen Gruppen hatte die orale Gabe von Ecd keinen relevanten Einfluss auf die effektive Futteraufnahme. Vermutlich waren die gewählten Dosen zu gering, um einen messbaren Effekt, wie er bei den Männchen beobachtet werden konnte, erzielen zu können.

Knochen

Die Wirkung von Ecd auf den Knochen der orx bzw. ovx Ratte wurde mit Hilfe der pQCT und ausgewählter Serumparameter des Knochenstoffwechsels (Osteokalzin, RatLaps, RANK-L und Osteoprotegerin) ermittelt. Die computertomographischen Messungen erfolgten mit einem speziell für Kleintiere entwickelten XCT Research Bone Scanner (Fa. Stratec Medizintechnik GmbH). Die pQCT stellt eine sensitive und reproduzierbare Methode dar, um bei Kleintieren wie Ratten einen Ovx-induzierten Knochenverlust zu detektieren (Gasser 1995). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist ihre non-invasive Durchführbarkeit, die eine Quantifizierung der Effekte auf den Knochen longitudinal und in vivo erlaubt (Helterbrand et al. 1997). Mit der pQCT ist es, anders als mit der in der Osteoporose-Diagnostik gängigen DEXA-Methode, möglich, die volumetrische Knochendichte (in mg/cm^3 Kalziumhydroxylapatit) des trabekulären und kortikalen Knochens separat zu bestimmen. So können Veränderungen an der Spongiosa nicht durch solche der Kortikalis maskiert werden. Dies ist in Bezug auf die vorliegende Studie von besonderem Vorteil, da ein Ovx-induzierter E_2 -Mangel anfangs insbesondere an der Spongiosa mit ihrer sehr großen Oberfläche zu einem rapiden Dichteverlust führt (Pevrhal und Genant 1999).

Bereits zwei Wochen nach der Gonadektomie lassen sich osteoporotische Veränderungen am Knochen der männlichen und weiblichen Ratte nachweisen (Wronski et al. 1988, Gunness und Orwoll 1995). Vor allem die Metaphyse der Ratten-Tibia reagiert höchst sensitiv auf das E_2 -Defizit, weshalb die computertomographischen Messungen in diesem Bereich erfolgten (Jee und Yao 2001, Seidlová-Wuttke et al. 2006).

Spongiosadichte

Der mit dem Erlöschen der Ovarialfunktion eintretende E_2 -Mangel hat einen erhöhten Knochenumbau zur Folge. Beim Menschen und der Ratte ist hiervon zunächst vorwiegend der spongiöse Knochen betroffen (Kimmel und Wronski 1990, Vanderschueren et al. 1993, Bartl 2008).

Um das Ausmaß der Osteoporose zu quantifizieren, ist die Spongiosadichte am besten geeignet (Stürmer et al. 2006). Neben der Dichte spielt die trabekuläre Mikrostruktur für die Festigkeit des Knochens eine ebenso entscheidende Rolle (Ito et al. 2002). Deshalb wurde in der vorliegenden Studie besonderes Augenmerk auf die Veränderungen der Spongiosa und ihres Trabekelwerkes gelegt.

Aus früheren Untersuchungen anderer Autoren ist bekannt, dass ein Hypogonadismus bei Ratten, ähnlich wie beim Menschen, u.a. eine Ausdünnung der Trabekel und eine Abnahme der Knochendichte in der Spongiosa zur Folge hat (Vanderschueren et al. 1993, Erben 2001).

Diese Beobachtungen werden in der vorliegenden Studie für beide Geschlechter bestätigt.

So verloren alle männlichen Gruppen nach der Orx signifikant an Spongiosadichte. Bei den männlichen intakten Tieren änderte sich die Dichte der Spongiosa hingegen nicht. Lediglich die gewichtsrelativierte Spongiosadichte nahm bei den intakten Tieren ab, jedoch in signifikant geringerem Maße als bei den orx Gruppen.

Die mittlere Dosis Ecd von 22mg/Tier/Tag vermochte die Orx-induzierte Abnahme der Spongiosadichte signifikant gegenüber der orx Kontrollgruppe zu mindern. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den von Gao L et al. 2008 postulierten osteoprotektiven Eigenschaften des Ecd. Anders als in der vorliegenden Studie induzierten Gao L und sein Forschungsteam bei männlichen Mäusen einen Verlust an Knochenmineraldichte durch die Gabe von All-trans-Retinoid-Säure. Alternativ zur Gonadektomie ist dies ein anerkanntes Verfahren, um bei Tieren eine Osteoporose hervorzurufen (Liao et al. 2003). Gao L et al. konnten zeigen, dass die Ausbildung einer Osteoporose bei den männlichen Mäusen durch die intravenöse Gabe von Ecd in einer Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht über drei Wochen gemildert werden kann.

Über welchen molekularen Mechanismus Ecd seine Effekte auf den Knochen vermittelt, kann anhand dieser Studie nur spekuliert werden. Die wenigen Studien, die sich bisher mit der Wirkung von Ecdysteroiden auf den Knochen befasst haben, geben lediglich Anlass zu derartigen Spekulationen. So mutmaßen L. Gao et al. 2008 auf der Basis ihrer Studienergebnisse, dass Ecd die Osteoblastendifferenzierung zumindest partiell über den ER induziert, da sich die Differenzierung durch einen spezifischen ER-Antagonisten inhibieren ließ. Diese Vermutung steht jedoch in Widerspruch zu den von Báthori et al. 2008 mittels Radioliganden-Bindungs-Assay erhobenen Daten. Hiernach binden Ecd und andere Ecdysterioide nicht an die Steroidrezeptoren der Vertebraten, folglich auch nicht an den ER. Die existierende Literatur bezüglich des Wirkmechanismus der Ecdysterioide ist diskrepant, weshalb zukünftig weitere Untersuchungen notwendig sind, um unsere Ergebnisse erklärbar zu machen.

Auch bei den weiblichen Gruppen dieser Studie induzierte die Ovx einen signifikanten Abfall der Spongiosadichte, wie er in der Literatur bereits vielfach beschrieben worden ist (Wronski et al. 1988, Seidlová-Wuttke et al. 2008 a). Die hier gewählten Dosierungen von 4 bzw. 10 mgEcd/Tier/Tag konnten den Dichteverlust der Spongiosa nicht vermindern. Unter der höheren Dosierung von 10 mg/Tier/Tag kam es bei den ovx Weibchen sogar zu einer signifikanten Reduktion der Spongiosadichte über das Maß der ovx Kontrollgruppe hinaus. Weshalb es dazu kam, kann hier nicht geklärt werden. Möglicherweise ist diese Beobachtung als ein Einzeleffekt zu werten, der beispielsweise durch einen Messfehler hervorgerufen wurde. Festzuhalten bleibt, dass für den niedrigen Dosisbereich des weiblichen Versuchsarmes keine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung zu bestehen scheint.

Prozentualer Anteil der Trabekel an der Spongiosaquerschnittsfläche

Neben ihrer Dichte stellt die Mikrostruktur der Spongiosa eine wichtige Variable der Knochenfestigkeit dar (Ito et al. 2002). Khosla et al. untersuchten 2006 in einer Populations-basierten Studie die Veränderungen der spongiösen Mikrostruktur von Tibia und Radius bei beiden Geschlechtern. Junge Männer (zwischen 20 und 29 Jahren) wiesen dickere Trabekel auf als gleichaltrige Frauen; die Anzahl und der Separationsgrad der Trabekel war jedoch bei beiden Geschlechtern gleich. Im Laufe des Lebens kam es bei den untersuchten Frauen zu einer signifikanten Reduktion der Trabekelanzahl von etwa 13%, wohingegen die Männer lediglich eine Abnahme der

Diskussion

Trabekeldicke aufwiesen. Die Trabekelanzahl scheint jedoch für die Knochenfestigkeit eine entscheidendere Rolle zu spielen als ihre Dicke (Silva und Gibson 1997). Das Modell der orx Ratte weist, anders als der alternde Mann, neben einer Ausdünnung der Trabekel auch eine Reduktion ihrer Anzahl auf (Erben et al. 2000). Bei der weiblichen Ratte führt die Ovx, analog zu den Veränderungen bei der postmenopausalen Frau, zu verschmälerten und in der Anzahl reduzierten Trabekeln (Thompson et al. 1995).

In der vorliegenden Studie wurde der prozentuale Anteil der Trabekel an der Spongiosaquerschnittsfläche basierend auf den Dichtewerten der beiden Kompartimente Spongiosa und Kortikalis rechnerisch ermittelt. Leider ist es anhand dieses Rechnungsmodells nicht möglich, zwischen einer Verschmälerung der Trabekel und einer Abnahme ihrer Anzahl zu unterscheiden - beide Phänomene würden nach der vorgegebenen Berechnung zu einer Abnahme des Trabekelanteiles an der Spongiosaquerschnittsfläche führen.

Wie in der Literatur bereits vielfach beschrieben, hatte die Gonadektomie auch bei den Männchen der vorliegenden Studie eine signifikante Abnahme des Trabekelanteiles zur Folge. Die intakten männlichen Tiere wiesen diesbezüglich keine signifikanten Veränderungen gegenüber den Vorwerten auf.

Die orale Aufnahme von Ecd in einer Dosierung von 22 mg/Tier/Tag war imstande, den Verlust an Trabekelanteilen signifikant gegenüber der orx Kontrollgruppe zu mindern. Dieses Ergebnis ist kongruent zu den Befunden bezüglich der Spongiosadichte, deren Verlust ebenfalls durch die Aufnahme der mittleren Dosis Ecd gegenüber der orx Kontrollgruppe signifikant gemildert werden konnte.

Bei den weiblichen S.D.-Ratten führte die Gonadektomie ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion des Trabekelanteiles an der Spongiosaquerschnittsfläche. Dabei ließen die beiden behandelten Gruppen keinen osteoprotektiven Effekt von Ecd erkennen. Vermutlich waren die hier verwendeten Dosen, wie bei der Spongiosadichte bereits angemerkt, nicht ausreichend, um einen osteoprotektiven Effekt zu erzielen. Konform zu den Beobachtungen an der Spongiosadichte wiesen die ovx Gruppe mit einer Ecd-Aufnahme von 10mg/Tier/Tag eine signifikante Abnahme des Trabekelanteiles über das ovx Maß hinaus auf. Dieses Resultat erscheint schlüssig, bedenkt man, dass die Spongiosadichte in die Berechnung des Trabekelanteiles mit einfließt.

Kortikalisdichte

Bei dem biphasischen Knochenverlust der postmenopausalen Frau bzw. bei dem des alternden Mannes geht einer kortikalen Dichteminderung ein Dichteverlust der Spongiosa voraus (Parfitt 1984, Khosla et al. 2008). Ein derartiges Muster des Knochenverlustes kann auch bei beiden Geschlechtern der gonadektomierten Ratte beobachtet werden (Vanderschueren et al. 1993, Jee und Yao 2001).

In der vorliegenden Studie entwickelten alle männlichen Gruppen ausnahmslos einen signifikanten Anstieg der kortikalen Dichte, wobei keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den intakten Tieren und den orx Gruppen bestanden.

Diskussion

Bei der Interpretation der Ergebnisse bezüglich der Kortikalisdichte sind, anders als bei der Spongiosadichte, das Alter der Tiere sowie die Länge des Versuchszeitraumes zu berücksichtigen. Ke et al. untersuchten 2001 die Langzeiteffekte des Alterns und der Orx auf den Knochen von drei Monate alten, männlichen S.D.-Ratten. Sie beobachteten, dass die kortikale Dichte intakter Tiere bis zu einem Alter von 12 Monaten ansteigt und die Orx den altersbedingten Zuwachs der kortikalen Dichte inhibiert. Diese Orx-assoziierte Dichteminderung falle aber erst fünf Monate nach der Gonadektomie signifikant gegenüber den intakten Tieren aus.

In der vorliegenden Studie kamen, analog zu der Studie von Ke et al., drei Monate alte S.D.-Ratten zum Einsatz. Vor diesem Hintergrund könnte der dreimonatige Versuchszeitraum nicht ausgereicht haben, um einen signifikanten inhibitorischen Effekt der Orx auf die kortikale Dichte zu erzielen, sodass dieser unter dem altersbedingten Zuwachs an Kortikalisdichte verschleiert blieb.

Ecd nahm in den gewählten Konzentrationen bei den Männchen keinen Einfluss auf die Kortikalisdichte, da zwischen den behandelten Gruppen und der intakten Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede zu erkennen waren.

Zusammenfassend muss bei der Verwendung von jüngeren orx Ratten berücksichtigt werden, dass sich die Kortikalis bis zu einem Alter von ca. 12 Monaten verdichtet. Greift man dennoch auf junge Tiere zurück, so ist auf einen ausreichend langen Versuchszeitraum zu achten, damit der Gonadektomie-induzierte Knochenverlust die Wachstumsrate übersteigt und es zur Ausbildung einer Osteoporose an der Kortikalis kommt.

Des Weiteren gilt bei der Interpretation der Ergebnisse zur Kortikalis zu beachten, dass Ratten ein limitiertes BRU-basiertes Remodeling aufweisen. So zeigen intakte, acht Monate alte Ratten und solche gleichen Alters, die im Alter von drei Monaten gonadektomiert worden sind, keine erhöhte Remodeling-Aktivität der Kortikalis (Jee et al. 1990). In diesem Punkt weicht der Knochenstoffwechsel der jüngeren gonadektomierten Ratte von dem der postmenopausalen Frau und dem des alternden Mannes ab.

Die Remodeling-Rate könnte auch bei der Interpretation der durch Ecd erzielten Effekte eine Rolle spielen: So erwirkte die Behandlung der S.D.-Ratten mit Ecd in der mittleren Dosierung bei der entsprechenden männlichen orx Gruppe einen signifikanten osteoprotektiven Effekt auf die Dichte der Spongiosa, ließ jene der Kortikalis jedoch unbeeinflusst. Denkbar wäre, dass Ecd vorwiegend auf Knochenkompartimente mit einer hohen Remodeling-Rate einwirkt. Das Design der vorliegenden Studie erlaubt jedoch letzten Endes keine Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus von Ecd.

Setzt man den kortikalen Dichtezuwachs der männlichen Tiere in Relation zu ihrem gestiegenen Körpergewicht, so resultiert eine geminderte relative Kortikalisdichte, die bei den intakten Tieren am niedrigsten ausfiel. Dies ist schlüssig, bedenkt man, dass die kortikale Dichte bei allen männlichen Gruppen in gleichem Maße zunahm, die intakten Tiere jedoch ein wesentlich höheres Delta-Körpergewicht als alle anderen Gruppen aufwiesen.

Analog zu den männlichen S.D.-Ratten fand bei den ovx Weibchen ein signifikanter Zuwachs an kortikaler Dichte statt, der offensichtlich ebenfalls dem Wachstum der Tiere geschuldet war, denn zwischen den intakten Tieren und den ovx Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede. Die Gewichtszunahme war auch bei den Weibchen verhältnismäßig größer als der kortikale Dichtezuwachs, sodass die relative Kortikalisdichte bei allen weiblichen Gruppen signifikant gegenüber den Vorwerten abnahm. Ähnlich wie Ke et al. an männlichen Ratten, konnten Kimmel und Wronski 1990 in einer Studie an weiblichen Ratten zeigen, dass 540 Tage nach der Ovx noch kein signifikanter Verlust an kortikaler Dichte zu verzeichnen ist. Dies lässt die Mutmaßung zu, dass der Versuchszeitraum der vorliegenden Studie nicht ausreichte, um einen signifikanten Effekt der Ovx auf die Kortikalis beobachten zu können.

Die orale Applikation von Ecd hatte bei den Weibchen in den beiden gewählten Dosierungen keinen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der Kortikalisdichte. Dies war, angesichts der durch weitaus höhere Dosen von Ecd unbeeinflussten Kortikalisdichte bei den Männchen, zu erwarten.

Spongiosaquerschnittsfläche

Hinsichtlich der Spongiosafläche verhält sich der osteoporotische Knochen der postmenopausalen Frau und der des alternden Mannes gleich. Beide zeigen aufgrund einer vermehrten endostalen Resorption eine Expansion dieser Fläche (Parfitt 1984, Khosla et al. 2008).

Die Ratte hingegen reagiert bezüglich ihrer Spongiosaquerschnittsfläche geschlechtsspezifisch auf die Gonadektomie. Bei den weiblichen Ratten führen das durch die Ovx stimulierte periostale Knochenwachstum und die endostale Knochenresorption zu einer Aufweitung der Knochenmarkshöhle, sodass eine Vergrößerung der Spongiosaquerschnittsfläche resultiert (Jee und Yao 2001). Bei der männlichen adulten Ratte hat die Orx wiederum eine signifikante Reduktion der Spongiosafläche zur Folge (Erben et al. 2000).

Diese in der Literatur bereits bekannten Gegebenheiten ließen sich auch an den Tieren der vorliegenden Studie nachvollziehen. Dementsprechend entwickelten alle orx Männchen, außer die mit der niedrigsten Dosis mit Ecd behandelte Gruppe, eine signifikante Verkleinerung der Spongiosafläche in absoluten und gewichtsrelativierten Werten. Dabei inhibierte die Orx nicht nur das physiologische Spongiosawachstum, welches bei der intakten Gruppe zu beobachten war, sondern führte darüber hinaus sogar zu einer Reduktion der Spongiosafläche gegenüber den Vorwerten.

Anders als bei der Spongiosadichte, für die ein Effekt von Ecd in der mittleren Dosierung nachgewiesen werden konnte, ist es hier die niedrigste Dosierung von 11 mg/Tier/Tag, die einen Effekt auf die Spongiosafläche zu erzielen schien. Sie vermochte in Absolutwerten die Orx-induzierte Flächenabnahme der Spongiosa signifikant zu mindern, sodass die Spongiosafläche unverändert blieb. Dieser Effekt ließ sich in der gewichtsrelativierten Darstellung jedoch nicht bestätigen. Somit hatte Ecd in den gewählten Dosierungen keinen Einfluss auf die Orx-induzierte Flächenreduktion der Spongiosa.

Konträr zu den Männchen induzierte die Gonadektomie bei den Weibchen eine signifikante Zunahme der Spongiosafläche. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von Seidlová-Wuttke et al. die zeigten, dass weibliche S.D.-Ratten, die im Alter von drei Monaten einer Ovx unterzogen wurden, bereits nach vier Wochen eine größere Spongiosafläche aufwiesen als die Tiere der intakten Kontrollgruppe (Seidlová-Wuttke et al. 2008 b).

Die Applikation von Ecd hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Spongiosaquerschnittsfläche der ovx Weibchen. Vermutlich waren hier, wie schon bei der Spongiosadichte beobachtet, die Dosierungen zu gering, um einen signifikanten Effekt auf die Spongiosa zu erzielen.

Endostaler Umfang

Der endostale Umfang wurde von der Computersoftware mit Hilfe eines Ringmodells, basierend auf den Daten für die Querschnittsflächen von Spongiosa und Kortikalis, errechnet. Dazu konstruierte die Software einen Kreis, dessen Fläche ($= r^2 \times \pi$) der Spongiosafläche entsprach. Der errechnete Umfang des Kreises wurde dementsprechend als endostaler Umfang ($= 2 \times \pi \times r$) angegeben.

Analog zu den Veränderungen an der Spongiosafläche war bei den Männchen eine signifikante Abnahme des endostalen Umfanges aller orx Gruppen in absoluten und in den gewichtsrelativierten Werten zu beobachten. Ferner zeigte auch hier die mit der niedrigsten Dosis von 11 mg Ecd/Tier/Tag behandelte orx Gruppe, wie schon bei der Spongiosaquerschnittsfläche beobachtet, ein signifikant größeren endostalen Umfang in absoluten Werten, der sich in der gewichtsrelativierten Darstellung nicht bestätigen ließ. Somit konnte für Ecd in keiner der bei den orx Männchen gewählten Dosierungen ein Effekt auf den endostalen Umfang oder die Spongiosafläche nachgewiesen werden.

Bei den weiblichen ovx Gruppen verhielt sich der endostale Umfang ebenfalls konform zur Spongiosafläche und nahm über den Versuchszeitraum signifikant zu, wobei die Behandlung mit Ecd in keiner Dosierungen einen signifikanten Einfluss auf den endostalen Umfang hatte.

Das gleichgerichtete Verhalten von Spongiosafläche und endostalem Umfang war zu erwarten, da der endostale Umfang mathematisch aus der Spongiosafläche abgeleitet wurde.

Lediglich in der gewichtsrelativierten Darstellung des endostalen Umfanges kam es bei den Weibchen zu einer divergenten Entwicklung von Spongiosafläche und endostalem Umfang: Während sich der Umfang reduzierte, kam es zu einer Vergrößerung der Fläche. Bei der Interpretation dieses Ergebnisses muss berücksichtigt werden, dass die Vergrößerung einer Kreisfläche eine verhältnismäßig kleinere Umfangzunahme zur Folge hat, da der Radius r in die Berechnung der Fläche in der zweiten Potenz eingeht, in die des Umfanges jedoch nur als einfacher Faktor. Bezieht man die Entwicklung der beiden Parameter „Spongiosafläche“ und „endostaler Umfang“ nun auf einen weiteren dynamischen Parameter wie das Gewicht, so kann, wie vermutlich hier geschehen, das Gewicht der Tiere verhältnismäßig stärker zugenommen haben als der endostale Umfang, aber weniger stark als die Spongiosafläche. Daraus ergibt sich ein in Relation zum Körpergewicht verminderter endostaler Umfang bzw. eine vergrößerte Spongiosafläche.

Insgesamt ist die Berechnung des endostalen Umfanges nach dem Ringmodell kritisch zu sehen, da ein Kreis, verglichen mit anderen geometrischen Strukturen, den verhältnismäßig kleinsten Umfang aufweist. Es ist daher wahrscheinlich, dass durch die Berechnung auf der Basis eines Kreises der endostale Umfang als zu gering eingeschätzt wurde. Zumal davon auszugehen ist, dass die Spongiosaquerschnittsflächen der Rattentibiae, insbesondere drei Monate nach der Gonadektomie, vermehrt resorptionsbedingte Kavitationen und Irregularitäten aufwiesen, sodass vermutlich nicht von einem kreisförmigen endostalen Umfang ausgegangen werden kann (Hagaman et al. 1992, zitiert aus Jee und Yao 2001). Des Weiteren bleibt fraglich, welchen interpretatorischen Nutzen die Kenntnis des endostalen Umfanges hat, sofern er lediglich rechnerisch aus der Spongiosafläche abgeleitet wird. Möglicherweise könnte durch die manuelle Bestimmung des endostalen Umfanges mit Hilfe des PC eine bessere Näherung an den tatsächlichen endostalen Umfang erreicht werden. Die in dieser Studie verwendete Software erlaubt eine sehr präzise Auswahl bestimmter Regionen des angefertigten computertomographischen Bildes mittels Cursor. Denkbar wäre eine manuelle Nachzeichnung des endostalen Umfanges mit Hilfe des Cursors und anschließender Bestimmung der gezeichneten Strecke.

Kortikalisfläche

Im Alter kommt es bei Männern aufgrund der lebenslang anhaltenden periostalen Knochenapposition zu einer Vergrößerung des Knochenquerschnitts. Gleichzeitig steigt die endostale Knochenresorption in einem Maße an, das die Rate der periostalen Apposition übertrifft. Es resultiert eine Netto-Abnahme der Kortikalisdicke bzw. -fläche. Letzten Endes führen diese Prozesse zu einer Verlagerung der Kortikalis nach außen. Dadurch wird der Verlust an Knochenfestigkeit, der durch die Abnahme der Kortikalisdicke bedingt ist, zumindest partiell ausgeglichen (Khosla et al. 2008). Bei der älteren männlichen Ratte kann nach der Orx ebenfalls eine Versmälnerung der Kortikalis beobachtet werden (Vandenput et al. 2002). In der vorliegenden Studie müssen, wie bereits bezüglich der Kortikalisdicke diskutiert, wachstumsbedingte von Orx-induzierten Veränderungen abgegrenzt bzw. Einflüsse der Orx auf das Wachstum der Ratten berücksichtigt werden.

Ke et al. zeigten im Jahre 2001, dass das physiologische Kortikaliswachstum bei intakten männlichen Ratten im Alter von zwölf Monaten abgeschlossen ist. Die Orx von drei Monate alten Ratten führte dagegen nach fünf Monaten zu einer signifikanten Inhibierung des kortikalen Wachstums.

Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, die ein physiologisches Wachstum der Kortikalisfläche aller männlichen Gruppen erkennen ließen. Die Orx minderte das Kortikaliswachstum gegenüber den intakten Tieren in Absolutwerten bereits nach drei Monaten signifikant. Zu einer Verkleinerung der Fläche über das Ausgangsmaß hinaus, wie bei der Spongiosafläche beobachtet, kam es jedoch nicht. Dies verdeutlicht noch einmal den eingangs beschriebenen unterschiedlich starken Einfluss der Gonadektomie auf die beiden Knochenkompartimente Spongiosa und Kortikalis der Ratte mit einem anfänglich betonten Knochenabbau der Spongiosa.

Diskussion

Trotz der wachstumsbedingten Expansion der Kortikalis in absoluten Werten entwickelten alle männlichen Tiere in Relation zu ihrem Körpergewicht eine signifikante Abnahme der kortikalen Fläche. Diese fiel bei allen männlichen Gruppen gleich aus. Mit einer Ausnahme: Die Behandlung mit Ecd in der höchsten Dosierung führte zu einer gewichtsrelativierten Verkleinerung der Kortikalisfläche, die über das Maß der intakten und sogar der orx Kontrollgruppe hinausging. Dieser Einzeleffekt ist auf der Basis der vorliegenden Daten nicht interpretierbar.

Wie eingangs beschrieben, kommt es bei der postmenopausalen Frau zu einer Abnahme der Knochenmasse, die sich zu Beginn bevorzugt an der Spongiosa und ihrem Trabekelwerk manifestiert. Aber schon in der Phase des schnellen Knochenverlustes beginnt eine vermehrte endostale Knochenresorption, die das innere Drittel der Kortikalis allmählich perforiert und ihr so makroskopisch eine trabekelartige Struktur verleiht. Gleichzeitig findet lebenslänglich eine periostale Knochenapposition statt, sodass sich die Fläche der Kortikalis bei der Frau in den ersten Jahren nach der Menopause wenig verändert. Mit Fortbestehen des E_2 -Defizites kommt es dann in der langsamen Phase des Knochenverlustes zu einer Ausdünnung der Kortikalis (Parfitt 1984). Ähnliches konnten Jee et al. 1990 in einer Studie mit drei Monate alten weiblichen S.D.-Ratten beobachten. Während es vier Monate nach der Ovx an der Spongiosa bereits zu einem massiven Knochenverlust gekommen war, wies der kortikale Knochen noch keine signifikanten Veränderungen auf. Analog zu den Resultaten der männlichen Tiere ist auch bei der Interpretation der Ergebnisse für die Weibchen zu beachten, dass sich die S.D.-Ratten währen des Versuchszeitraumes hinsichtlich der Kortikalis noch in der Wachstumsphase befanden, die bezüglich der Fläche bei intakten Tieren erst im Alter von sieben Monaten abgeschlossen ist (Jee et. al 1990). Dementsprechend war bei allen weiblichen Gruppen der vorliegenden Studie eine signifikantes Wachstum der Kortikalisfläche zu beobachten. Man kann vor dem Hintergrund der eben erwähnten Forschungsergebnisse von Jee et al. vermuten, dass der dreimonatige Versuchszeitraum nicht ausreichte, um einen signifikanten Effekt der Ovx auf die Kortikalis beobachten zu können.

Ecd hatte in den applizierten Mengen keinen Einfluss auf die Kortikalisfläche der ovx Weibchen. Wie bereits bei der Kortikalisdichte diskutiert, scheint auch bei der Kortikalisfläche die Dosierung von Ecd zu niedrig gewählt worden sein, um einen signifikanten Effekt zu erzielen. Auch hier wäre, analog zu den Überlegungen bezüglich der Kortikalisdichte, denkbar, dass Ecd vorwiegend auf die Spongiosa mit ihrer hohen Remodeling-Rate einwirkt und den trägeren Stoffwechsel der Kortikalis zu Beginn einer Osteoporose unbeeinflusst lässt.

Periostaler Umfang

Der periostale Umfang wurde, wie sein endostales Pendant, anhand des Ringmodells ermittelt. Da er die tibiale Gesamtquerschnittsfläche umfasst, spiegelt er ihre Entwicklung wider. Dies war besonders dann interessant, wenn die Flächen von Spongiosa und Kortikalis eine divergente Größenentwicklung zeigten. In diesen Fällen erlaubte der periostale Umfang eine Aussage darüber, welche Flächenänderung den größeren Einfluss auf den Gesamtquerschnitt hatte und ob es netto zu einer Zu- oder Abnahme desselben kam.

Bei den Männchen zeigten die intakten Tiere eine signifikante Zunahme des periostalen Umfanges gegenüber den Vorwerten. Dies war zu erwarten, da bereits die Flächen von Spongiosa und Kortikalis ein signifikantes Wachstum aufwiesen. Die orx Kontrollgruppe präsentierte hingegen eine signifikante Minderung des periostalen Umfanges in absoluten Daten. Da diese Gruppe ein divergentes Verhalten der beiden Knochenkompartimente mit einer Reduktion der Spongiosafläche bzw. einer Zunahme der Kortikalisfläche aufwies, kann nun davon ausgegangen werden, dass der Orx-induzierte Schwund der Spongiosafläche einen stärkeren Einfluss auf den Gesamtquerschnitt hatte als das Wachstum der Kortikalisfläche. Der periostale Umfang der mit Ecd behandelten orx Gruppen blieb gegenüber den Vorwerten unverändert. Auch sie unterlagen in absoluten Werten einer gegensätzlichen Entwicklung ihrer Knochenkompartimente mit einer signifikanten, bzw. im Falle der Ecd11-Gruppe tendenziellen, Abnahme der Spongiosafläche sowie einer in allen Fällen signifikanten Vergrößerung der Kortikalisfläche. Da sich der periostale Umfang nicht änderte, hatten die entgegen gerichteten Veränderungen der beiden Knochenkompartimente vermutlich den gleichen Einfluss auf den Gesamtquerschnitt.

Die orale Applikation von Ecd hatte bei den orx Männchen keinen Einfluss auf den periostalen Umfang. Dies war zu erwarten, da Ecd bereits auf die Entwicklung der beiden Flächen keinen Effekt erzielen konnte.

Bei den Weibchen wiesen alle ovx Tiere eine signifikante Vergrößerung des periostalen Umfanges auf, konform zu den bereits beobachteten Vergrößerungen der Spongiosa- und Kortikalisfläche. Die Applikation von Ecd hatte dabei keinen Effekt auf den periostalen Umfang der Tibia. Dies war ebenfalls zu erwarten, da Ecd bereits die einzelnen Flächen unbeeinflusst ließ.

Die bereits bezüglich des endostalen Umfanges diskutierten Vorbehalte gegenüber der Berechnung anhand eines Ringmodells können auch hier gelten. Wahrscheinlich führt die Transformation der tibialen Querschnittsfläche in eine Kreisform zu einer Unterschätzung des periostalen Umfanges, da diese geometrische Form mit dem verhältnismäßig geringsten Umfang einhergeht.

Polares Widerstandsmoment

Das polare Widerstandsmoment beschreibt das Maß an Widerstand, das die Tibia einer einwirkenden Torsion entgegenbringt (Wilks et al. 2009). Es erlaubt somit eine grobe Einschätzung der Knochenfestigkeit, wenngleich die Ergebnisse noch anhand biomechanischer Tests validiert werden sollten. Die Aussagekraft des polaren Widerstandsmomentes wird auch dadurch limitiert, dass es die Mikrostruktur des Knochens unberücksichtigt lässt, die jedoch neben der Dichte ebenfalls eine entscheidende Rolle für die Knochenfestigkeit spielt (Ferretti et al. 2001). Bestimmt wird das polare Widerstandsmoment mittels pQCT-Messung in den kortikalen Anteilen der Metaphyse eines Knochens, also dort, wo die meisten Frakturen des Erwachsenen ihren Ursprung nehmen (Gasser 1995). Um die Materialeigenschaften des Knochens zu berücksichtigen, fließt in die Berechnung des polaren Widerstandsmomentes der Mineralisationsgrad der Kortikalis mit ein.

Bei den Männchen entwickelten die intakten Tiere das signifikant höchste polare Widerstandsmoment und somit die beste Knochenbruchfestigkeit gegenüber einwirkender Torsion. Aber auch bei sämtlichen orx Gruppen kam es zu einem signifikanten Anstieg des polaren Widerstandsmomentes. Denkbar wäre, dass die Verdichtung der Kortikalis, wie sie auch bei den orx Tieren beobachtet werden konnte, zu einem Anstieg der Bruchfestigkeit bei diesen Gruppen geführt hat. Denn die Kortikalisdichte nimmt, wie bereits oben angeführt, Einfluss auf das polare Widerstandsmoment.

Bei der mit Ecd in der Dosierung 22 mg/Tier/Tag behandelten orx Gruppe konnte eine leichte, wenn auch nicht signifikante, Erhöhung des polaren Widerstandsmomentes gegenüber der orx Kontrollgruppe beobachtet werden. Signifikante Einflüsse von Ecd auf das polare Widerstandsmoment waren jedoch bei keiner der gewählten Dosierungen zu beobachten. Dies war zu erwarten, da dieser Knochenparameter in den kortikalen Abschnitten der Metaphyse bestimmt wurde, welche in der vorliegenden Studie durch Ecd unbeeinflusst blieben.

Bei den Weibchen stieg das polare Widerstandsmoment in absoluten Werten bei allen gonadektomierten Tieren signifikant an. Überraschenderweise zeigten die intakten Weibchen, anders als bei den männlichen S.D.-Ratten beobachtet, nicht den höchsten Wert für das polare Widerstandsmoment. Dies ist möglicherweise damit zu erklären, dass die Weibchen, anders als ihre männlichen Artgenossen, nach der Gonadektomie stärker an Gewicht zunahmten und somit signifikant schwerer waren als die intakten Tiere. Wie eingangs erwähnt, unterliegt der Knochen einer biomechanischen Kopplung mit den ihn umgebenden Weichteilen. Bei den ovx Weibchen kommt es aufgrund des höheren Körpergewichtes zu einer stärkeren mechanischen Stimulation des Knochens, die wiederum einen protektiven Effekt auf den Knochen ausübt (Ferretti et al. 2003) und somit wahrscheinlich zu einer höheren Bruchfestigkeit führt. Des Weiteren konnte bei den ovx Weibchen in absoluten Werten eine tendenziell dichtere Kortikalis als bei der intakten Gruppe beobachtet werden, sodass eine bessere Bruchfestigkeit des Knochens vor dem Hintergrund einer dichteren Kortikalis ebenfalls logisch erscheint. Setzt man nun das polare Widerstandsmoment in Relation zum

Körpergewicht der Tiere, so ergibt sich das erwartete Bild eines polaren Widerstandsmomentes, das bei den intakten Weibchen signifikant höher ist als bei allen ovx Gruppen.

Die Behandlung mit Ecd erwirkte keine signifikante Steigerung des polaren Widerstandsmomentes bei den ovx Weibchen. Es war in der gewichtsrelativierten Darstellung sogar eine signifikante Minderung des polaren Widerstandsmomentes bei der mit der niedrigsten Ecd-Dosierung behandelten weiblichen Gruppe gegenüber der ovx Kontrollgruppe zu beobachten. Dieser Effekt ist auf der Basis der Literatur und der erhobenen Daten nicht interpretierbar.

Serumparameter

Ergänzend zu der computertomographischen Analyse wurden verschiedene Marker im Serum der S.D.-Ratten bestimmt, die eine Aussage über die Stoffwechselaktivität des Knochens zulassen.

Osteokalzin ist ein Kalzium- und Hydroxylapatit-bindendes Peptidhormon, das von Osteoblasten synthetisiert wird. Es stellt einen spezifischen Marker der osteoblastischen Aktivität und somit der Knochenneubildung dar (Civitelli et al. 2009). Bei den männlichen orx Ratten führte die Behandlung mit Ecd zu einer signifikanten und dosisabhängigen Erhöhung der Osteokalzin-Serumspiegel, wobei sich Ecd in der niedrigsten Dosis als am wirksamsten erwies. Denkbar wäre daher, dass Ecd seine osteoprotektiven Effekte zumindest partiell über eine Stimulation der Osteoblasten vermittelt.

Bei den Weibchen hatte Ecd in den gewählten Dosierungen keinen Einfluss auf den Osteokalzin-Serumspiegel.

Einen Marker für die Aktivität der Osteoklasten stellen die sogenannten RatLaps dar. Dies sind Telopeptide, die während des Abbaus von Kollagen Typ I durch die Osteoklasten entstehen (Chen et al. 2008, Civitelli et al. 2009). Bei den männlichen S.D.-Ratten führte die Applikation von Ecd zu einer Erhöhung der RatLaps-Serumspiegel gegenüber der orx Kontrollgruppe, die im Falle der beiden höheren Ecd-Dosen signifikant ausfiel. Da bei den Männchen auch schon ein Einfluss von Ecd auf die Osteoblasten über den Serumparameter Osteokalzin festgestellt werden konnte, scheint Ecd nicht selektiv die Aktivität einer Knochenzellart zu stimulieren, sondern allgemein proliferative Effekte auf Osteoblasten und -klasten zu haben.

Bei den ovx Weibchen führte die höhere Dosis von Ecd zu einer signifikanten Erniedrigung der RatLaps-Serumspiegel unter das Niveau der ovx Kontrollgruppe. Ein erniedrigter RatLaps-Spiegel weist auf eine verminderte Aktivität der Osteoklasten hin. Denkbar wäre, dass Ecd in bestimmten Dosierungen eine Aktivitätsminderung der Osteoklasten erwirkt und so seine osteoprotektiven Effekte vermittelt.

RANK-L ist ein von Osteoblasten synthetisiertes Peptid, das nach Bindung an seinen Rezeptor RANK auf Osteoklastenvorläufern deren Reifung zum Osteoblasten initiieren kann (Eghbali-Fatourehchi et al. 2003, Proell et al. 2009).

Diskussion

Die Bestimmung der RANK-L-Serumspiegel ergab bei beiden Geschlechtern keinen signifikanten Einfluss von Ecd.

Osteoprotegerin wird wie RANK-L von Osteoblasten gebildet, agiert jedoch als sein Gegenspieler. Es ist ebenfalls in der Lage, an den RANK auf Osteoklastenvorläuferzellen zu binden, ohne jedoch deren Reifung auszulösen (Hofbauer et al. 2004). Der Osteoprotegerin-Serumspiegel blieb jedoch wie der von RANK-L durch Ecd unbeeinflusst. Es fiel auf, dass bei den beiden letztgenannten Serumparametern eine vermehrte Streuung der Messwerte verglichen mit den beiden anderen Parametern Osteokalzin und RatLaps vorlag.

Es bleibt festzuhalten, dass Ecd in bestimmten Dosierungen in der Lage ist, sowohl Zellen des Knochenaufbaus als auch des -abbaus bei der Ratte zu stimulieren, wenngleich nur bestimmte Mechanismen des komplexen Zusammenspiels von Osteoblasten und Osteoklasten beeinflusst zu werden scheinen.

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, dass oral appliziertes Ecd in einer bestimmten Dosierung die Ausbildung einer Gonadektomie-induzierten Osteoporose bei der männlichen Ratte partiell mildern kann. Ebenso scheint Ecd in der Lage, Einfluss auf die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten zu nehmen. Über den genauen Wirkmechanismus, mit dem Ecd seine osteoprotektiven Effekte auf den Knochen vermittelt, kann hier keine Aussage getroffen werden. Weitere Untersuchungen sind deshalb nötig, um die vorliegenden Befunde erklärbar zu machen.

Auf der Basis dieser Ergebnisse scheint es jedoch denkbar, dass Ecd in der Zukunft als pflanzliches Nahrungsergänzungs-Präparat in der Präventionstherapie der Osteoporose eingesetzt werden kann, zumal es zahlreiche weitere positive Nebeneffekte (siehe 1.3.2.) wie etwa eine muskelanabole oder den Cholesterinspiegel-senkende Wirkung auf den Säugetierorganismus ausübt, ohne dabei mit den für die konventionellen Hormonpräparate typischen Nebenwirkungen einherzugehen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Ecd einen osteoprotektiven Effekt auf den Gonadektomie-induzierten Knochenverlust der männlichen und weiblichen S.D.-Ratte ausübt. In einem von der Arbeitsgruppe Endokrinologie im Jahre 2007 durchgeführten Vorversuch wurde die Wirkung von Ecd auf den Ovx-induzierten Knochenverlust der weiblichen S.D.-Ratte in den Dosierungen 18, 56 und 116 mg/Tier/Tag bereits untersucht. Damals hatte sich gezeigt, dass Ecd osteoprotektive Wirkung zeigt, indem es den Verlust an Trabekelanteilen an der Spongiosaquerschnittsfläche bzw. an Spongiosadichte signifikant verminderte. Dabei erwies sich die mittlere Dosis als am wirkungsvollsten (Seidlová-Wuttke et al. 2010b).

In der vorliegenden Studie wurde zum einen untersucht, ob Ecd bei den Weibchen auch in niedrigeren Dosierungen von 4 und 10 mg/Tier/Tag noch osteoprotektive Effekte erzielen kann. Zum anderen wurde erstmals die Wirkung von Ecd auf den Orx-induzierten Knochenverlust der männlichen S.D.-Ratte erforscht, wobei für Ecd die Dosierungen 11, 22 und 67 mg/Tier/Tag gewählt worden sind.

Während des gesamten dreimonatigen Versuchszeitraumes wurde Ecd mit dem Futter appliziert. Direkt vor der Gonadektomie und am Versuchsende wurden die pQCT-Messungen in der Metaphyse der Rattentibia durchgeführt, da diese besonders sensibel und schnell auf die Gonadektomie und das damit einhergehende Hormondefizit reagiert. Dabei wurden neben Dichte und Fläche der Spongiosa bzw. Kortikalis auch weitere geometrische Knochenparameter wie der endostale und periostale Umfang, das polare Widerstandsmoment sowie der Anteil der Trabekel an der Spongiosaquerschnittsfläche ermittelt. Ferner wurde der Einfluss von Ecd auf den Knochenstoffwechsel mit Hilfe der Serumparameter Osteokalzin, RatLaps, RANK-L und Osteoprotegerin analysiert.

Zusätzlich wurden das Gewicht und die Futteraufnahme der Tiere bestimmt und jeder Knochenparameter in Relation zum Körpergewicht der Tiere (pro 100g) angegeben.

1. Der Gonadektomie-induzierte Mangel an Androgenen bei den männlichen bzw. an Östrogenen bei den weiblichen S.D.-Ratten führte bei beiden Geschlechtern insbesondere an der Spongiosa zu einer Osteoresorption. Dabei reduzierte sich der Anteil der Trabekel an der Spongiosaquerschnittsfläche verglichen mit den entsprechenden intakten Tieren bei der männlichen orx Kontrollgruppe um etwa 4 Prozent bzw. bei der weiblichen ovx Kontrollgruppe um etwa 10 Prozent. Weiterhin konnte bei allen gonadektomierten Tieren eine signifikante Dichteminderung der Spongiosa beobachtet werden.

Ferner zeigte sich, dass die Tibia weiblicher S.D.-Ratten anders auf die Gonadektomie reagiert als die männlicher Tiere: Während die Ovx bei den Weibchen eine signifikante Vergrößerung der Spongiosafläche induzierte, nahm sie bei den Männchen nach der Orx signifikant

Zusammenfassung

ab.Fläche und Dichte der Kortikalis blieben von der Gonadektomie bei beiden Geschlechtern unbeeinflusst.

2. Ecd bewirkte bei den männlichen S.D.-Ratten in einer Dosierung von 22 mg/Tier/Tag eine signifikante Abmilderung sowohl des Orx-induzierten Dichteverlustes der Spongiosa als auch des Schwundes von Trabekelanteilen an der Spongiosaquerschnittsfläche. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den bereits in der Literatur bekannten osteoprotektiven Eigenschaften des Ecd, wenngleich im Rahmen dieser Studie sein Wirkmechanismus nicht eruiert werden kann.

Bei den weiblichen S.D.-Ratten erwies sich keine der beiden Dosierungen als ausreichend, um einen signifikanten osteoprotektiven Effekt, wie er 2007 unter den höheren Ecd-Dosen beobachtet werden konnte, zu erzielen.

3. Die Entwicklung des Körpergewichtes divergierte bei den Geschlechtern: Während die Gonadektomie bei den weiblichen S.D.-Ratten eine signifikante Zunahme des Körpergewichtes induzierte, hatte die Orx bei den männlichen S.D.-Ratten eine gegenüber den intakten Tieren signifikant geringere Gewichtszunahme zur Folge.

4. Die orale Applikation von Ecd führte bei beiden Geschlechtern zu einer Anregung der Futteraufnahme unmittelbar nach der Gonadektomie. Verantwortlich dafür könnten ein besserer Geschmack des Ecd-haltigen Futters oder, wie in der Literatur bereits beschrieben, eine bessere Bewältigung der Operation und ihrer Folgen durch Ecd sein. Ferner ließ sich beobachten, dass die mit Ecd behandelten orx S.D.-Ratten ebenso viel Futter aufnahmen wie die intakten Tiere, jedoch ein signifikant niedrigeres Körpergewicht aufwiesen. Denkbar wäre, dass die Applikation von Ecd zu einer Erhöhung der „lean body mass“ (Körpermasse abzüglich Fettmasse) bzw. zu einer Steigerung der Muskelmasse geführt hat, sodass die Tiere bei gleicher Futteraufnahme mehr Futter umsetzten.

5. Bezüglich des Knochenstoffwechsels konnte ein Einfluss von Ecd sowohl auf Parameter des Knochenaufbaus als auch des -abbaus beobachtet werden. So führte die Applikation von Ecd bei den orx Männchen dosisabhängig zu einer Erhöhung des Osteokalzin-Serumspiegels als Marker für die osteoblastische Aktivität, wobei sich Ecd in der niedrigsten Dosierung als am wirkungsvollsten erwies. Ebenso konnte eine Erhöhung des Serumspiegels von RatLaps als Marker für die osteoklastische Aktivität unter den beiden höheren Dosierungen von Ecd bei den orx männlichen S.D.-Ratten beobachtet werden.

Bei den weiblichen S.D.-Ratten wurde unter den gewählten Dosierungen keiner der o.g. Knochenparameter signifikant durch Ecd beeinflusst.

Zusammenfassung

Zusammengefasst haben die vorliegenden Ergebnisse gezeigt, dass oral appliziertes Ecd die Ausbildung einer Gonadektomie-induzierten Osteoporose bei der männlichen S.D.-Ratte partiell abschwächen kann, wobei sich die mittlere Dosis von 22 mg/Tier/Tag als am wirkungsvollsten erwies. Bei den weiblichen S.D.-Ratten konnte für Ecd in keiner der beiden Dosierungen ein signifikanter osteoprotektiver Effekt festgestellt werden, sodass Ecd vermutlich zu niedrig dosiert worden ist.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Ecd über eine Stimulation von Osteoklasten und Osteoblasten Einfluss auf den Knochenstoffwechsel nimmt. Über den genauen Wirkmechanismus, mit dem Ecd seine osteoprotektiven Effekte auf den Knochen vermittelt, kann in der vorliegenden Studie jedoch keine Aussage getroffen werden. Es bedarf weiterer Forschung, um die vorliegenden Befunde erklärbar zu machen.

In Anbetracht der hier bestätigten osteoprotektiven Eigenschaften des Ecd und seiner im Rahmen von anderen Studien erforschten zahlreichen positiven Nebeneffekte ist ein zukünftiger Einsatz von Ecd als pflanzliches Präparat in der Präventionstherapie der Osteoporose denkbar.

6 Literaturverzeichnis

- Aaron JE, Makins NB, Sagreiya K (1987): "The microanatomy of trabecular bone loss in normal aging men and women." *Clin Orthop Relat Res* 215: 260-271.
- Bartl R: Osteoporose: Prävention-Diagnostik-Therapie. 3. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2008
- Báthori M, Pongrácz Z (2005): "Phytoecdysteroids--from isolation to their effects on humans." *Curr Med Chem* 12(2): 153-172.
- Báthori M, Toth N, Hunyadi A, Marki A, Zador E (2008): "Phytoecdysteroids and anabolic-androgenic steroids--structure and effects on humans." *Curr Med Chem* 15(1): 75-91.
- Behre HM, Kliesch S, Leifke E, Link TM, Nieschlag E (1997): "Long-term effect of testosterone therapy on bone mineral density in hypogonadal men." *J Clin Endocrinol Metab* 82(8): 2386-2390.
- Blouin S, Libouban H, Moreau MF, Chappard D (2008): "Orchidectomy models of osteoporosis." *Methods Mol Biol* 455: 125-134.
- Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J (2001): "Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone." *J Clin Endocrinol Metab* 86(5): 2309-2314.
- Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE (2003): "The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts." *Bone* 32(2): 136-141.
- Cauley JA, Seeley DG, Ensrud K, Ettinger B, Black D, Cummings SR (1995): "Estrogen replacement therapy and fractures in older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group." *Ann Intern Med* 122(1): 9-16.
- Center JR, Nguyen TV, Schneider D, Sambrook PN, Eisman JA (1999): "Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study." *Lancet* 353(9156): 878-882.
- Chen JR, Singhal R, Lazarenko OP, Liu X, Hogue WR, Badger TM, Ronis MJ (2008): "Short term effects on bone quality associated with consumption of soy protein isolate and other dietary protein sources in rapidly growing female rats." *Exp Biol Med (Maywood)* 233(11): 1348-1358
- Chermnykh NS, Shimanovskii NL, Shutko GV, Syrov VN (1988): "[The action of methandrostenolone and ecdysterone on the physical endurance of animals and on protein metabolism in the skeletal muscles]." *Farmakol Toksikol* 51(6): 57-60.
- Civitelli R, Armamento-Villareal R, Napoli N (2009): "Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice." *Osteoporos Int* 20(6):843-851
- Consensus Development Conference Panel (1993): "Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis." *Am J Med* 94(6): 646-650.
- Dawson AB (1925): "The age order of epiphyseal union in the long bones of the albino rat." *Anat Rec*31: 1-17.
- Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM (2002): "Estrogenic isoflavones in rodent diets." *Toxicol Lett* 128(1-3): 145-157.

Literaturverzeichnis

- Diemer T, Hauck EW, Rohde V, Weidner W (2005): "[Therapy of the "aging male"]." *Urologe A* 44(10): 1173-1178.
- Dinan L (2001): "Phytoecdysteroids: biological aspects." *Phytochemistry* 57(3):325-339.
- Dinan L, Lafont R (2006): "Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals." *J Endocrinol* 191(1): 1-8.
- DVO e.V.: DVO-Leitlinie 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose. Langfassung. *Osteologie* 18:304-328.
- Eghbali-Fatourechi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL (2003): "Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women." *J Clin Invest* 111(8): 1221-1230.
- Erben RG (2001): "Skeletal effects of androgen withdrawal." *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1(3): 225-233.
- Erben RG, Eberle J, Stahr K, Goldberg M (2000): "Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats: a sequential histomorphometric study." *J Bone Miner Res* 15(6): 1085-1098.
- Ferretti JL, Cointry GR, Capozza RF, Capiglioni R, Chiappe MA (2001): "Analysis of biomechanical effects on bone and on the muscle-bone interactions in small animal models." *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1(3): 263-274.
- Ferretti JL, Cointry GR, Capozza RF, Frost HM (2003): "Bone mass, bone strength, muscle-bone interactions, osteopenia and osteoporoses." *Mech Ageing Dev* 124(3):269-279.
- Fleisch MC, Hadji,P. (2007): "Knochenstoffwechsel und Knochendichte Aspekte für den praktisch tätigen Gynäkologen." *Der Gynäkologe* 40: 611-614.
- Francis RM (2001): "Androgen replacement in aging men." *Calcif Tissue Int* 69(4): 235-238.
- Frost HM (1997): "Defining osteopenias and osteoporoses: another view (with insights from a new paradigm)." *Bone* 20(5): 385-391.
- Frost HM, Jee WS (1992): "On the rat model of osteopenias and osteoporoses." *Bone Miner* 18(3):227-236.
- Gao L, Cai G Shi X (2008): "Beta-ecdysterone induces osteogenic differentiation in mouse mesenchymal stem cells and relieves osteoporosis." *Biol Pharm Bull* 31(12): 2245-2249.
- Gao X, Wang DW Li FM (2000): "[Determination of ecdysterone in *Achyranthes bidentata* Bl. and its activity promoting proliferation of osteoblast-like cells]." *Yao Xue Xue Bao* 35(11): 868-870.
- Gasser JA (1995): "Assessing bone quantity by pQCT." *Bone* 17(4 Suppl): 145S-154S.
- Gunness M, Orwoll E (1995): "Early induction of alterations in cancellous and cortical bone histology after orchietomy in mature rats." *J Bone Miner Res* 10(11): 1735-1744.
- Häussler B, Gothe H, Gol D, Glaeske G, Pientka L Felsenberg D (2007): "Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study." *Osteoporos Int* 18(1): 77-84.

Literaturverzeichnis

- Helterbrand JD, Higgs RE, Jr., Iversen PW, Tysarczyk-Niemeyer G, Sato M (1997): "Application of automatic image segmentation to tibiae and vertebrae from ovariectomized rats." *Bone* 21(5): 401-409.
- Hofbauer LC, Kuhne CA, Viereck V (2004): "The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases." *J Musculoskelet Neuronal Interact* 4(3): 268-275.
- Huber DM, Bendixen AC, Pathrose P, Srivastava S, Dienger KM, Shevde NK, Pike JW (2001): "Androgens suppress osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor." *Endocrinology* 142(9): 3800-3808.
- Imai Y, Youn MY, Kondoh S, Nakamura T, Kouzmenko A, Matsumoto T, Takada I, Takaoka K, Kato S (2009): "Estrogens maintain bone mass by regulating expression of genes controlling function and life span in mature osteoclasts." *Ann N Y Acad Sci* 1173 Suppl 1: E31-39.
- Ito M, Nishida A, Koga A, Ikeda S, Shiraishi A, Uetani M, Hayashi K, Nakamura T (2002): "Contribution of trabecular and cortical components to the mechanical properties of bone and their regulating parameters." *Bone* 31(3): 351-358.
- Jahelka B, Dorner T, Terkula R, Quittan M, Broll H, Erlacher L (2009): "Health-related quality of life in patients with osteopenia or osteoporosis with and without fractures in a geriatric rehabilitation department." *Wien Med Wochenschr* 159(9-10): 235-240.
- Jakob F (1999): "[1,25(OH)₂-vitamin D₃. The vitamin D hormone]." *Internist (Berl)* 40(4): W414-430.
- Jee WS, Yao W (2001): "Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis." *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1(3): 193-207.
- Jee WS, Mori S, Li XJ, Chan S (1990): "Prostaglandin E₂ enhances cortical bone mass and activates intracortical bone remodeling in intact and ovariectomized female rats." *Bone* 11(4): 253-266.
- Jones G, Jones D (2000): "Considerations on the structural evidence of a ligand-binding function of ultraspiracle, an insect homolog of vertebrate RXR." *Insect Biochem Mol Biol* 30(8-9): 671-679.
- Kalu DN (1991): "The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss." *Bone Miner* 15(3): 175-191.
- Kamel HK (2005): "Male osteoporosis: new trends in diagnosis and therapy." *Drugs Aging* 22(9): 741-748.
- Kanis JA (1994): "Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group." *Osteoporos Int* 4(6): 368-381.
- Kanis JA (2002): "Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk." *Lancet* 359(9321): 1929-1936.
- Kapur P, Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D (2010): "Beneficial effects of beta-Ecdysone on the joint, epiphyseal cartilage tissue and trabecular bone in ovariectomized rats." *Phytomedicine* 17(5): 350-355.
- Ke HZ, Crawford DT, Qi H, Chidsey-Frink KL, Simmons HA, Li M, Jee WS, Thompson DD (2001): "Long-term effects of aging and orchidectomy on bone and body composition in rapidly growing male rats." *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1(3): 215-224.

Literaturverzeichnis

- Khosla S, Riggs BL, Atkinson EJ, Oberg AL, McDaniel LJ, Holets M, Peterson JM, Melton LJ, 3rd (2006): "Effects of sex and age on bone microstructure at the ultradistal radius: a population-based noninvasive in vivo assessment." *J Bone Miner Res* 21(1): 124-131.
- Khosla S, Amin S, Orwoll E (2008): "Osteoporosis in men." *Endocr Rev* 29(4): 441-464.
- Kimmel DB, Wronski TJ (1990): "Nondestructive measurement of bone mineral in femurs from ovariectomized rats." *Calcif Tissue Int* 46(2): 101-110.
- Lafont R, Horn D: "Phytoecdysteroids: Structures and Occurrence." In: Koolman, J (Hrsg.): *Ecdysone-From Chemistry to Mode of Action*; Georg Thieme-Verlag, New York 1989:39-64.
- Lafont R, Dinan L (2003): "Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update." *J Insect Sci* 3: 7.
- Liao EY, Luo XH, Wang WB, Wu XP, Zhou HD, Dai RC, Liao HJ, Yang C (2003): "Effects of different nylestriol/levonorgestrel dosages on bone metabolism in female Sprague-Dawley rats with retinoic acid-induced osteoporosis." *Endocr Res* 29(1): 23-42.
- Mosekilde L (1995): "Assessing bone quality--animal models in preclinical osteoporosis research." *Bone* 17(4 Suppl): 343S-352S.
- Nieschlag E, Behre HM, Bouchard P, Corrales JJ, Jones TH, Stalla GK, Webb SM, Wu FC (2004): "Testosterone replacement therapy: current trends and future directions." *Hum Reprod Update* 10(5): 409-419.
- O'Brien CA, Plotkin LI, Galli C, Goellner JJ, Gortazar AR, Allen MR, Robling AG, Boussein M, Schipani E, Turner CH, et al. (2008): "Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes." *PLoS One* 3(8): e2942.
- Ogawa S, Nishimoto N, Matsuda H (1974): "Pharmacology of ecdysones in Vertebrates." In: Burdette, W J (Hrsg.): *Invertebrate Endocrinology and Hormonal Heterophyly*; Springer Verlag, New York: 341-344.
- Orwoll E, Lambert LC, Marshall LM, Phipps K, Blank J, Barrett-Connor E, Cauley J, Ensrud K, Cummings S (2006): "Testosterone and estradiol among older men." *J Clin Endocrinol Metab* 91(4): 1336-1344.
- Otaka T, Uchiyama M, Okui S, Takemoto T, Hikino H (1968): "Stimulatory effect of insect-metamorphosing steroids from *Achyranthes* and *Cyathula* on protein synthesis in mouse liver." *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 16(12): 2426-2429.
- Palli SR, Kapitskaya MZ, Potter DW (2005): "The influence of heterodimer partner ultraspiracle/retinoid X receptor on the function of ecdysone receptor." *FEBS J* 272(23): 5979-5990.
- Parfitt AM (1979): "Quantum concept of bone remodeling and turnover: implications for the pathogenesis of osteoporosis." *Calcif Tissue Int* 28(1): 1-5.
- Parfitt AM (1984): "Age-related structural changes in trabecular and cortical bone: cellular mechanisms and biomechanical consequences." *Calcif Tissue Int* 36 Suppl 1: S123-128.
- Pederson L, Kremer M, Judd J, Pascoe D, Spelsberg TC, Riggs BL, Oursler MJ (1999): "Androgens regulate bone resorption activity of isolated osteoclasts in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(2): 505-510.

Literaturverzeichnis

- Prabhu VK, Nayar KK (1974): "Crustecdysone is without estrogenic or antiestrogenic activity in the rat." *Experientia* 30(7): 821.
- Prevrhal S, Genant HK (1999): "[Quantitative computer tomography]." *Radiologe* 39(3): 194-202.
- Proell V, Xu H, Schüler C, Weber K, Hofbauer LC, Erben RG (2009): "Orchiectomy upregulates free soluble RANKL in bone marrow of aged rats." *Bone* 45(4): 677-681.
- Rehman MT, Hoyland JA, Denton J, Freemont AJ (1994): "Age related histomorphometric changes in bone in normal British men and women." *J Clin Pathol* 47(6): 529-534.
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd (1998): "A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men." *J Bone Miner Res* 13(5): 763-773.
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd (2002): "Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton." *Endocr Rev* 23(3): 279-302.
- Robling AG, Castillo AB, Turner CH (2006): "Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling." *Annu Rev Biomed Eng* 8: 455-498.
- Roth J, Bechtold S, Borte G, Dressler F, Girschick H, Borte M (2007): "[Diagnosis, prophylaxis and therapy of osteoporosis in juvenile idiopathic arthritis: consensus statement of the German Association for Pediatric Rheumatology]." *Z Rheumatol* 66(5): 434-440.
- Scheidt-Nave C (2001): "Die sozioökonomische Bedeutung der Osteoporose." *Bundesgesundheitsblatt* 44: 41-51.
- Schürch MA, Rizzoli R, Mermillod B, Vasey H, Michel JP, Bonjour JP (1996): "A prospective study on socioeconomic aspects of fracture of the proximal femur." *J Bone Miner Res* 11(12): 1935-1942.
- Seeman E (2001): "During aging, men lose less bone than women because they gain more periosteal bone, not because they resorb less endosteal bone." *Calcif Tissue Int* 69(4): 205-208.
- Seidlová-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T, Wuttke W (2003): "Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: comparison with estradiol-17beta." *Eur J Endocrinol* 149(4): 351-362.
- Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Christoffel J, Rimoldi G, Wuttke W (2006): "Comparison of effects of estradiol (E2) with those of octylmethoxycinnamate (OMC) and 4-methylbenzylidene camphor (4MBC)-2 filters of UV light - on several uterine, vaginal and bone parameters." *Toxicol Appl Pharmacol* 210(3): 246-254.
- Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Jager Y, Wuttke W (2008a): "Bone development in female rats maintained with soy-free or soy-containing food as determined by computer-assisted tomography and serum bone markers." *J Bone Miner Metab* 26(4): 321-327.
- Seidlová-Wuttke D, Prella K, Fritzemeier KH, Wuttke W (2008b): "Effects of estrogen receptor alpha- and beta-selective substances in the metaphysis of the tibia and on serum parameters of bone and fat tissue metabolism of ovariectomized rats." *Bone* 43(5): 849-855.
- Seidlová-Wuttke D, Ehrhardt C, Wuttke W (2010a): "Metabolic effects of 20-OH-Ecdysone in ovariectomized rats." *J Steroid Biochem Mol Biol* 119 (3-5): 121-126

- Seidlová-Wuttke D, Christel D, Kapur P, Nguyen BT, Jarry H, Wuttke W (2010b): "β-Ecdysone has bone protective but no estrogenic effects in ovariectomized rats." *Phytomedicine* 17(11):884-889.
- Silva MJ, Gibson LJ (1997): "Modeling the mechanical behavior of vertebral trabecular bone: effects of age-related changes in microstructure." *Bone* 21(2): 191-199.
- Sims NA, Gooi JH (2008): "Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption." *Semin Cell Dev Biol* 19(5): 444-451.
- Sipos W, Pietschmann P, Rauner M, Kerschanch-Schindl K, Patsch J (2009): "Pathophysiology of osteoporosis." *Wien Med Wochenschr* 159(9-10): 230-234.
- Sláma K, Lafont, R (1995): "Insect hormones-ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates." *Eur J Entomol* 92: 335-377.
- Stürmer EK, Sehmisch S, Tezval M, Tezval H, Rack T, Boekhoff J, Wuttke W, Herrmann TR, Seidlová-Wuttke D, Stürmer KM (2009): "Effect of testosterone, raloxifene and estrogen replacement on the microstructure and biomechanics of metaphyseal osteoporotic bones in orchietomized male rats." *World J Urol* 27(4): 547-555.
- Syrov VN (2000): "Comparative experimental investigation of the anabolic activity of phytoecdysteroids and steranabols." *Pharm Chem J* 34(4):193-197.
- Syrov VN, Kurmukov AG, Sakhibov AD (1978): "[Effect of turkesterone and nerobol on the activity of the protein synthesizing system of mouse liver]." *Vopr Med Khim* 24(4): 456-460.
- Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ (1995): "FDA Guidelines and animal models for osteoporosis." *Bone* 17(4 Suppl): 125S-133S.
- Todorov N, Mitrokhin, Yu. I., Efremova, O.I., Sidorenko, L. I. (2000): "The Effect of Ecdysterone on the Biosynthesis of Proteins and Nucleic Acids in Mice." *Pharm Chem J* 34(9):455-458.
- Turner AS (2001): "Animal models of osteoporosis--necessity and limitations." *Eur Cell Mater* 1: 66-81.
- Turner RT, Wakley GK, Hannon KS (1990): "Differential effects of androgens on cortical bone histomorphometry in gonadectomized male and female rats." *J Orthop Res* 8(4): 612-617.
- Uchiyama M, Yoshida, T : "Effect of ecdysterone on carbohydrate and lipid metabolism." In: Burdette W.J.(Hrsg.): *Invertebrate Endocrinology and Hormonal Heterophyly*; Springer Verlag, New York 1974: 401-416.
- Vandenput L, Boonen S, Van Herck E, Swinnen JV, Bouillon R, Vanderschueren D (2002): "Evidence from the aged orchidectomized male rat model that 17β-estradiol is a more effective bone-sparing and anabolic agent than 5α-dihydrotestosterone." *J Bone Miner Res* 17(11): 2080-2086.
- Vanderschueren D, Van Herck E, Suiker AM, Visser WJ, Schot LP, Bouillon R (1992): "Bone and mineral metabolism in aged male rats: short and long term effects of androgen deficiency." *Endocrinology* 130(5): 2906-2916.
- Vanderschueren D, Van Herck E, Schot P, Rush E, Einhorn T, Geusens, P, Bouillon R (1993): "The aged male rat as a model for human osteoporosis: evaluation by nondestructive measurements and biomechanical testing." *Calcif Tissue Int* 53(5): 342-347.

Literaturverzeichnis

- Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C (2004): "Androgens and bone." *Endocr Rev* 25(3): 389-425.
- WHO (1994): "Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group." *World Health Organ Tech Rep Ser* 843: 1-129.
- Wilks DC, Winwood K, Gilliver SF, Kwiet A, Chatfield M, Michaelis I, Sun LW, Ferretti JL, Sargeant AJ, Felsenberg D et al. (2009): "Bone mass and geometry of the tibia and the radius of master sprinters, middle and long distance runners, race-walkers and sedentary control participants: a pQCT study." *Bone* 45(1): 91-97.
- Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA (1985): "Skeletal alterations in ovariectomized rats." *Calcif Tissue Int* 37(3): 324-328.
- Wronski TJ, Schenck PA, Cintron M, Walsh CC (1987): "Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats." *Calcif Tissue Int* 40(3): 155-159.
- Wronski TJ, Cintron M, Dann LM (1988): "Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats." *Calcif Tissue Int* 43(3): 179-183.
- Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintron M (1989): "Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton." *Calcif Tissue Int* 45 (6): 360-366.
- Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM (1993): "Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes." *Nature* 366(6454): 476-479.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Struktur des 20-Hydroxyecdyson	13
Abb. 2	Knochenschema	16
Abb. 3	Käfige im Tierstall	20
Abb. 4	Transponder-Lesegerät und Applikationsspritze für die Transponder	23
Abb. 5	Das Prinzip der Computertomographie, vereinfachte Schemazeichnung	24
Abb. 6	Elemente des pQCT-Dokumentationsdruckes	25
Abb. 7	S.D.-Ratte in Messposition	26
Abb. 8	Versuchsablauf schematisch dargestellt	28
Abb. 9	Entwicklung des Körpergewichtes Männchen	29
Abb. 10	Entwicklung des Körpergewichtes Weibchen	30
Abb. 11	Delta-Körpergewicht Männchen	31
Abb. 12	Delta-Körpergewicht Weibchen	31
Abb. 13	Futteraufnahme Männchen	32
Abb. 14	Futteraufnahme Weibchen	33
Abb. 15	Dichte der Spongiosa Männchen, Absolutwerte	34
Abb. 16	Dichte der Spongiosa Männchen, gewichtsrelativiert	35
Abb. 17	Dichte der Spongiosa Weibchen, Absolutwerte	36
Abb. 18	Dichte der Spongiosa Weibchen, gewichtsrelativiert	36
Abb. 19	Dichte der Kortikalis Männchen, Absolutwerte	37
Abb. 20	Dichte der Kortikalis Männchen, gewichtsrelativiert	37
Abb. 21	Dichte der Kortikalis Weibchen, Absolutwerte	38
Abb. 22	Dichte der Kortikalis Weibchen, gewichtsrelativiert	39
Abb. 23	Fläche der Spongiosa Männchen, Absolutwerte	40
Abb. 24	Fläche der Spongiosa Männchen, gewichtsrelativiert	40
Abb. 25	Fläche der Spongiosa Weibchen, Absolutwerte	41
Abb. 26	Fläche der Spongiosa Weibchen, gewichtsrelativiert	42
Abb. 27	Fläche der Kortikalis Männchen, Absolutwerte	42
Abb. 28	Fläche der Kortikalis Männchen, gewichtsrelativiert	43

Abbildungsverzeichnis

Abb. 29	Fläche der Kortikalis Weibchen, Absolutwerte	44
Abb. 30	Fläche der Kortikalis Weibchen, gewichtsrelativiert	44
Abb. 31	Periostaler Umfang Männchen, Absolutwerte	45
Abb. 32	Periostaler Umfang Männchen, gewichtsrelativiert	45
Abb. 33	Periostaler Umfang Weibchen, Absolutwerte	46
Abb. 34	Periostaler Umfang Weibchen, gewichtsrelativiert	46
Abb. 35	Endostaler Umfang Männchen, Absolutwerte	47
Abb. 36	Endostaler Umfang Männchen, gewichtsrelativiert	48
Abb. 37	Endostaler Umfang Weibchen, Absolutwerte	49
Abb. 38	Endostaler Umfang Weibchen, gewichtsrelativiert	49
Abb. 39	Polares Widerstandsmoment Männchen, Absolutwerte	50
Abb. 40	Polares Widerstandsmoment Männchen, gewichtsrelativiert	50
Abb. 41	Polares Widerstandsmoment Weibchen, Absolutwerte	51
Abb. 42	Polares Widerstandsmoment Weibchen, gewichtsrelativiert	52
Abb. 43	Anteil der Trabekel an der Spongiosaquerschnittsfläche Männchen	53
Abb. 44	Anteil der Trabekel an der Spongiosaquerschnittsfläche Weibchen	53
Abb. 45	Osteokalzin-Serumspiegel Männchen	54
Abb. 46	Osteokalzin-Serumspiegel Weibchen	55
Abb. 47	RatLaps-Serumspiegel Männchen	55
Abb. 48	RatLaps-Serumspiegel Weibchen	56
Abb. 49	RANK-L-Serumspiegel Männchen	56
Abb. 50	RANK-L-Serumspiegel Weibchen	57
Abb. 51	Osteoprotegerin-Serumspiegel Männchen	57
Abb. 52	Osteoprotegerin-Serumspiegel Weibchen	58

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Einteilung der primären Osteoporosen	9
Tabelle 2	Ausgewählte Effekte von Ecd auf den Säugetierorganismus	14
Tabelle 3	Futterzusammensetzung	22
Tabelle 4	Gruppeneinteilung Männchen	22
Tabelle 5	Gruppeneinteilung Weibchen	23
Tabelle 6	Die mittlere und die effektive Futtermittelaufnahme der männlichen Gruppen über den Versuchszeitraum	32
Tabelle 7	Die mittlere und die effektive Futtermittelaufnahme der weiblichen Gruppen über den Versuchszeitraum	33

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. W. Wuttke, der mir das Verfassen dieser Doktorarbeit ermöglicht und mich stets ausgezeichnet wissenschaftlich betreut und unterstützt hat.

Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke für ihre exzellente fachliche Supervision und Betreuung sowie die sehr gute und konstruktive Arbeitsatmosphäre bedanken.

Dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen und hier besonders Sabine Lüdemann danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der Messungen und bei administrativen Belangen.